



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE MOLECOLARI

INDIRIZZO SCIENZE CHIMICHE

XXII CICLO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CATALIZZATORI IDROLITICI COOPERATIVI:

DAI SISTEMI BIOMIMETICI AI NANOZIMI

Direttore: Ch.mo Prof. Maurizio Casarin

Supervisore: Dott. Fabrizio Mancin

Dottorando: Renato Bonomi

Gennaio 2009



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE MOLECOLARI

INDIRIZZO SCIENZE CHIMICHE

XXII CICLO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CATALIZZATORI IDROLITICI COOPERATIVI:

DAI SISTEMI BIOMIMETICI AI NANOZIMI

Direttore: Ch.mo Prof. Maurizio Casarin

Supervisore: Dott. Fabrizio Mancin

Dottorando: Renato Bonomi

Gennaio 2009

Indice

1. Introduzione

1.1. Chimica biomimetica

1.2. Metalloenzimi

1.3. Metalloidrolasi

1.3.1. Metalloidrolasi monometalliche

1.3.2. Metalloidrolasi bimetalliche

1.3.2.1 Fosfatasi alcalina di E.Coli

1.3.2.2. Un esempio di nucleasi: la DNA polimerasi I

1.3.3. Endonucleasi di restrizione di tipo II

1.4. Modelli di metalloenzimi idrolitici

1.4.1. Ruolo degli ioni metallici

1.4.2. Ioni metallici utilizzati

1.4.3. Substrati

1.4.4. Catalizzatori monometallici

1.4.5. Catalizzatori bimetallici

1.4.6. Catalizzatori basati sulla cooperazione tra gruppi funzionali e ioni metallici

1.4.6.1. Catalizzatori bimetallici basati sulla cooperazione tra gruppi funzionali e ioni metallici

1.5. Sistemi multifunzionali autoassemblati

2. Scopo

2.1. Complessi monometallici con gruppi funzionali ausiliari organici

2.2. Complessi bimetallici

2.3. Nanoparticelle d'oro ricoperte con leganti organici

3. Risultati

3.1. Sintesi del legante 42

3.2. Sintesi dei leganti bimetallici

3.3. Sintesi delle nanoparticelle d'oro passivate

3.3.1. Sintesi dei tioli

3.3.1.1. Sintesi del tiolo 48

3.3.1.2. Sintesi del tiolo 49

- 3.3.1.3. Sintesi del tiolo 50**
- 3.3.2. Sintesi delle nanoparticelle passivate**
- 3.4. Caratterizzazione e reattività esterolitica del complesso 42·Zn(II)**
- 3.5. Reattività esterolitica dei complessi bimetallici**
 - 3.5.1. Reattività nei confronti del substrato BNP**
 - 3.5.2. Reattività nei confronti del DNA plasmidico**
- 3.6. Reattività esterolitica delle nanoparticelle d'oro passivate con il legante 48**
 - 3.6.1. Esperimenti preliminari**
 - 3.6.2. Determinazione della reattività esterolitica nei confronti del BNP**
 - 3.6.3. Dipendenza della velocità dalla quantità di ione metallico**
 - 3.6.4. Determinazione delle costanti di binding**
 - 3.6.5. Reattività nei confronti del DNA plasmidico**
- 3.7. Reattività esterolitica delle nanoparticelle d'oro passivate con il legante 49**
- 3.8. Reattività esterolitica delle nanoparticelle d'oro passivate con il legante 50**
 - 3.8.1. Determinazione della reattività esterolitica nei confronti del BNP**
 - 3.8.2. Determinazione delle costanti di binding**
 - 3.8.3. Reattività nei confronti del DNA plasmidico delle nanoparticelle NpCo(III)**
- 4. Discussione**
- 5. Parte sperimentale**
 - 5.1 Strumentazione**
 - 5.2 Materiali e soluzioni**
 - 5.3. Solventi e prodotti commerciali**
 - 5.4. Tamponi**
 - 5.5. Soluzioni madre di $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ e $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$**
 - 5.6. Soluzioni madre di leganti, complessi e substrati**
 - 5.7. Titolazioni spettrofotometriche**
 - 5.8. Misure cinetiche**
 - 5.9. Titolazioni potenziometriche**
 - 5.10. Preparazione degli esperimenti**
 - 5.11. Calcolo delle costanti di pseudo-secondo ordine**
 - 5.12. Studi del meccanismo tramite spettroscopie NMR**
 - 5.13. Esperimenti di idrolisi del DNA plasmidico**
 - 5.14. Sintesi**

- 5.14.1. Sintesi di propil-(3-ammino-N-bis(6-ammino-2-piridilmetil)-propil) disolfuro (43) e bis(3-ammino-N-bis(6-ammino-2-piridilmetil)-propil) disolfuro (47)**
- 5.14.1.1. Sintesi di N-bis(6-acetilammido-2-piridilmetil)-3-cloro-propilammina (XXXII)**
- 5.14.1.2. Sintesi di N-bis(6-acetilammido-2-piridilmetil)-1-tioacetil-3-propilammine (XXXIII)**
- 5.14.1.3. Sintesi di N-bis(6-ammino-2-piridilmetil)-3-tiol-propilammina (XXXIV)**
- 5.14.1.4. Sintesi di propil-(3-ammino-N-bis(6-ammino-2-piridilmetil)-propil) disolfuro (47)**
- 5.14.2. Sintesi di bis(3-ammino-N-bis(6-ammino-2-piridilmetil)-propil) disolfuro (43)**
- 5.14.3. Sintesi di propil-(3-ammino-N-bis(2-piridilmetil)-propil) disolfuro (44) e bis(3-ammino-N-bis(2-piridilmetil)-propil) disolfuro (51)**
- 5.14.3.1. Sintesi di N-bis(2-piridilmetil)-3-cloro-propilammina (XXXVI)**
- 5.14.3.2. Sintesi di N-bis(2-piridilmetil)-1-tioacetil-3-propilammina (XXXVII)**
- 5.14.3.3. Sintesi di N-bis(2-piridilmetil)-3-tiol-propilammina (XXXVIII)**
- 5.14.3.4. Sintesi di propil-(3-ammino-N-bis(2-piridilmetil)-propil) disolfuro (51)**
- 5.14.4. Sintesi di bis(3-ammino-N-bis(2-piridilmetil)-propil) disolfuro (44)**
- 5.14.5. Sintesi di N,N'-bis(2-piridilmetil)-1,8-diottilammina (46)**
- 5.14.6. Sintesi di N,N'-bis(6-ammino-2-piridilmetil)-1,8-diottilammina (45)**
- 5.14.6.1. Sintesi di N,N'-bis(6-acetilammido-2-piridilmetil)-1,8-diottilammina (XXXIX)**
- 5.14.6.2. Sintesi di N,N'-bis(6-ammino-2-piridilmetil)-1,8-diottilammina (45)**
- 5.14.7. Sintesi di N-bis(6-ammino-2-piridilmetil)-1-ammino-2-idrossi-4-butilammina (42)**
- 5.14.7.1. Sintesi di N-bis(6-acetilammido-2-piridilmetil)-1-ammino-2-idrossi-4-butilammina (XII)**
- 5.14.7.2. Sintesi di N-bis(6-ammino-2-piridilmetil)-1-ammino-2-idrossi-4-butilammina (42)**
- 5.14.8. Sintesi di 8-(bis((6-amminopiridin-2-il)metil)ammino)-1ottantiolo (48)**
- 5.14.8.1. Sintesi di 8-azido-1-ottanolo (XLI)**
- 5.14.8.2. Sintesi di 8-ammino-1-ottanolo (XLII)**
- 5.14.8.3. Sintesi di N,N'-(bis-(6-acetammido-2-piridinilmetil))-6-idrossi ottilammina (XLIII)**
- 5.14.8.4. Sintesi di N-8-(bis((6-acetamidopiridin-2-il)metil)ammino) ottilantioato (XLV)**

- 5.14.8.5. Sintesi 8-(bis((6-amminopiridin-2-il)metil)ammino)-1-ottantiolo (48)**
- 5.14.9. Sintesi del tiolo 49**
 - 5.14.9.1. N-[N_α,N_α-Bis(carbossimetil)-L-Lisina]8-(tioacetil)ottilammide (XLVIII)**
 - 5.14.9.2. N-[N_α,N_α-Bis(carbossimetil)-L-Lisina]8-Mercapto-ottilammide (49)**
- 5.14.10. N-Acetil-Bis(carbossimetil)-L-Lisina (53)**
- 5.14.11. Sintesi del tiolo 50**
 - 5.14.11.1. Sintesi di 8-tioacetil-ottilbromuro (II)**
 - 5.14.11.2. Sintesi di 8-tioacetil-ottilciclen (L)**
 - 5.14.11.3. Sintesi di 8-tiol-ottilciclen (50)**
- 5.14.12. Sintesi di ottilciclen (52)**
- 5.14.13. Sintesi di 52·Co(III)**
- 5.15. Sintesi e caratterizzazione delle nanoparticelle d'oro**
 - 5.15.1. Sintesi delle nanoparticelle AuNp1 e AuNp2**
 - 5.15.2. Sintesi e caratterizzazione delle nanoparticelle NpCe(IV)**
 - 5.15.3. Sintesi e caratterizzazione delle nanoparticelle NpCo(III)**

Parte 2: Nanoparticelle d'oro passivate come analoghi sintetici del batterio *Neisseria Meningitidis*

6. Introduzione

6.1. Multivalenza

6.1.1. Nanoparticelle d'oro passivate come sistemi multivalenti autoassemblati

6.2 Multivalenza e sistema immunitario

6.3 Nanoparticelle passivate come antigeni

6.4. Batterio *Neisseria Meningitidis* e relativi oligosaccaridi

7. Scopo

8. Risultati

8.1. Sintesi

8.1.1. Sintesi dei derivati MSH, DSH e TSH

8.1.2. Sintesi e purificazione delle nanoparticelle passivate

8.2. Test di attività biologica

9. Parte sperimentale

9.1. Strumentazione

9.2. Materiali e soluzioni

9.2.1. Solventi e prodotti commerciali

9.3. Sintesi

9.3.1. 8-tioacetil pentafluorofenil ottanoato (LII)

9.3.2. Sintesi dei tioli MSH e TSH

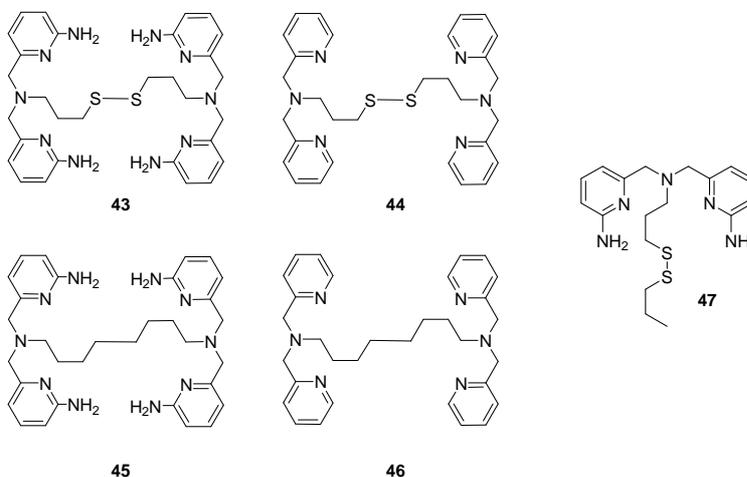
9.4. Caratterizzazione delle nanoparticelle d'oro passivate

10. Bibliografia

Abstract

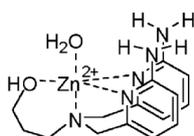
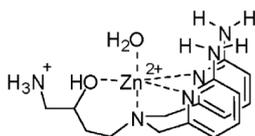
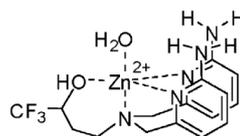
Il mio progetto di dottorato si inserisce nel campo della chimica biomimetica. Essa si occupa della progettazione, della sintesi e dello studio di sistemi artificiali che riproducano, in maniera semplificata, alcuni degli aspetti del funzionamento degli equivalenti sistemi biologici. Quando i sistemi biologici di interesse sono gli enzimi verrà quindi realizzato un cosiddetto “modello di enzima”. Il mio interesse in questo campo si è focalizzato sui sistemi in grado di promuovere l'idrolisi dei diesteri fosforici ed in particolare degli acidi nucleici e quindi nella realizzazione di nucleasi artificiali. La disponibilità di sistemi dotati di un'elevata efficienza nel provocare l'idrolisi di esteri fosforici, ed in particolare del DNA, potrebbe trovare diverse interessanti applicazioni: dalla realizzazione di enzimi di restrizione artificiali per la manipolazione del DNA allo sviluppo di farmaci antitumorali, antivirali e antibiotici.

Nella prima parte del progetto mi sono concentrato sui meccanismi degli enzimi naturali e sulla fedele riproduzione del loro sito attivo. Nella totalità degli enzimi uno o più ioni metallici coordinano il substrato ed alcuni gruppi funzionali dei residui amminoacidici interagiscono mediante diversi meccanismi con il fosfato. Gli approcci, quindi, sono stati essenzialmente di due tipi: la realizzazione di complessi contenenti più di uno ione metallico e la sintesi di leganti recanti diversi gruppi funzionali con una corretta localizzazione spaziale. Ho quindi sintetizzato e studiato la reattività verso il bis-*p*-nitrofenilfosfato e DNA plasmidico dei complessi di Zn(II) di una serie di leganti bimetallici contenenti come unità legante dei derivati della bis-(2metilpiridinil)ammina.



I leganti **43-46** sono in grado di legare due ioni metallici ciascuno e le unità leganti sono separate da semplici catene alchiliche (leganti **45-46**) oppure da catene contenenti il gruppo disolfuro (**43-44**), che può interagire con i centri metallici. Inoltre i leganti **43** e **45** presentano il gruppo amminico posto sugli eterocicli piridinici, mentre i composti **44** e **46** ne sono sprovvisti. Il confronto delle reattività di questi complessi e del legante monometallico **47** fornisce informazioni sul ruolo dei gruppi organici e sul carattere bimetallico dei complessi. La reattività di questi sistemi si è rivelata scarsa verso il substrato modello del DNA (bis-*p*-nitrofenilfosfato), ma inaspettatamente elevata verso il DNA plasmidico superavvolto. Il dato più sorprendente è fornito dall'inversione dell'ordine di reattività verso i due substrati. Infatti per il fosfato modello l'ordine delle reattività è risultato essere $45 \cdot \text{Zn(II)}_2 \approx 43 \cdot \text{Zn(II)}_2 > 47 \cdot \text{Zn(II)} > 46 \cdot \text{Zn(II)}_2$, mentre verso il DNA plasmidico l'andamento diventa $43 \cdot \text{Zn(II)}_2 > 47 \cdot \text{Zn(II)} \approx 45 \cdot \text{Zn(II)}_2$.

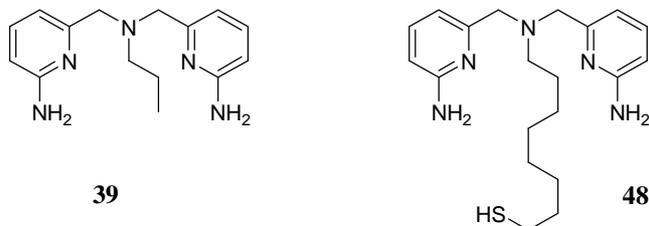
Il secondo approccio da me seguito è stato quello di aumentare il numero dei gruppi organici presenti nelle strutture dei leganti. Seguendo la strategia della chimica biomimetica è stato inserito nella struttura del complesso **40** un ulteriore gruppo amminico (composto **42**). Infatti, come si può osservare nelle endonucleasi di tipo II, un gruppo ammonio di un residuo lisinico è sempre presente nel sito attivo nelle vicinanze della specie nucleofila. Il ruolo di questo gruppo non è tuttora noto, si suppone possa attivare il nucleofilo mediante un legame ad idrogeno.

**40****42****41**

Ho inoltre sintetizzato e testato la reattività del complesso **41**, recante il gruppo elettronattrattore CF_3 ; esso porta ad un complesso avente la specie nucleofila (l'ossidrile sul braccio butilico del legante) con una acidità analoga a quella del complesso **42**. I risultati ottenuti con questi complessi nell'idrolisi dei fosfati BNP e HPNP e dell'estere *p*-nitrofenilacetato hanno permesso di investigare il ruolo del gruppo ammonio adiacente al nucleofilo nel meccanismo di idrolisi dei diesteri fosforici.

Sulla base di quanto si è potuto osservare con questi approcci è apparso quasi spontaneo domandarsi se fosse possibile unire questi due approcci innovativi: quello della multivalenza (sistemi multimetallici) e quello della cooperatività (sistemi con più

gruppi differenti), con lo scopo di ottenere sistemi idrolitici dotati di elevata reattività. Nel terzo anno di dottorato mi sono proposto quindi di realizzare nanoparticelle d'oro funzionalizzate con leganti in grado di complessare ioni Zn(II) e dotati di gruppi donatori di legami a idrogeno in grado di partecipare positivamente alla scissione idrolitica di esteri fosforici.



Il punto di partenza prescelto è stato il legante **39** il cui meccanismo di azione è noto. Questo legante contiene due gruppi amminici in grado di agire come donatori di legami ad idrogeno verso il substrato, forma complessi monometallici con lo ione Zn(II) e si è dimostrato un buon catalizzatore nell'idrolisi del BNP.

Abbreviazioni

Ac	acetile
AcOEt	acetato di etile
AcN	acetonitrile
AP	fosfatasi alcalina
BNP	bis- <i>p</i> -nitrofenilfosfato
Boc	ter-butilossicarbonile
DCM	diclorometano
DMF	N,N-dimetilformammide
DOA	diottilammina
2-DPA	bis(2-piridin-metil)ammina
DMP	dimetilfosfato
EDAC	1-etil-(3-dimetilamminopropil)carbodiimide
ER	endonucleasi di restrizione
HPNP	2-idrossipropil- <i>p</i> -nitrofenilfosfato
N(Et) ₃	triethylammina
AuNp	nanoparticelle d'oro
MeOH	metanolo
NP	<i>p</i> -nitrofenolo
NPP	<i>p</i> -nitrofenilfosfato
PNPA	<i>p</i> -nitrofenil acetato
py	piridina
TFA	acido trifluoroacetico
TOABr	tetraottilammonio bromuro
TsCl	<i>p</i> -toluen solfonilcloruro
Z	benzilossicarbonile

1. Introduzione

1.1. Chimica biomimetica

Sono passati ormai quasi due secoli da quando Friedrich Wohler, nel 1828, riuscì a trasformare il cianato di piombo in urea dimostrando così la possibilità di sintetizzare composti organici che, fino ad allora, si credeva potessero derivare solo dalla materia vivente⁽¹⁾. In quasi due secoli di vita, la chimica organica ha compiuto enormi progressi e si stima che più di sei milioni di sostanze organiche siano state prodotte nei laboratori⁽¹⁾. Nonostante ciò, i chimici che si dedicano alla sintesi ed allo studio dei meccanismi di reazione guardano ancora con stupore alle reazioni chimiche che avvengono nei sistemi biologici. In questi sistemi, infatti, reazioni anche molto complesse avvengono con alta velocità e specificità pressoché totale, in condizioni di pH e temperatura molto blande, grazie all'intervento di enzimi e di altri sistemi bioattivi. La comprensione approfondita dei meccanismi di questi processi e del ruolo dei loro catalizzatori, gli enzimi, può fornire conoscenze di enorme importanza per lo sviluppo delle scienze biologiche, chimiche e mediche.

L'azione degli enzimi si esplica tramite l'intervento contemporaneo di numerosi fattori: il riconoscimento selettivo del substrato, l'attivazione dello stesso e dei gruppi funzionali nel sito attivo, la stabilizzazione dello stato di transizione e dei prodotti. Tutto ciò avviene grazie all'impiego di un'ampia gamma di interazioni "deboli" (legami ad idrogeno, forze di Van der Waals, interazioni elettrostatiche, legami di coordinazione, interazioni idrofobiche) e ad una precisa disposizione spaziale dei gruppi funzionali del sito attivo, resa possibile dalle complesse strutture terziarie e quaternarie della proteina.

Lo studio di questi sistemi è necessariamente molto complicato dato l'enorme numero delle variabili in gioco. Un metodo semplificato, che può fornire informazioni complementari a quelle ottenute con lo studio diretto dei sistemi biologici, è quello costituito dalla cosiddetta chimica biomimetica. Essa consiste, secondo la definizione data da Breslow⁽²⁾, nella progettazione, sintesi e studio di sistemi artificiali che riproducano, in maniera semplificata, alcuni degli aspetti del funzionamento degli equivalenti sistemi biologici. Quando i sistemi biologici di interesse sono gli enzimi

verrà quindi realizzato un cosiddetto “modello di enzima”⁽³⁾. Questo tipo di approccio, che utilizza sistemi molto meno complessi di quelli naturali e quindi più adatti ad uno studio approfondito, presenta la doppia utilità di permettere, da un lato la verifica di ipotesi meccanicistiche e lo studio dei parametri da cui dipendono i meccanismi dell'azione dei sistemi biologici e, dall'altro, la scoperta e lo sviluppo di nuovi composti in grado di svolgere nuove funzioni.

Un "modello di enzima" si propone quindi di riprodurre una o più delle caratteristiche salienti degli enzimi stessi quali, per citarne alcune, la presenza di un sito specifico per il substrato, la disponibilità di funzioni reattive adeguate, la capacità di operare in soluzione acquosa e in condizioni di temperatura e pH fisiologiche. L'approccio più efficace nella realizzazione dei sistemi biomimetici è necessariamente graduale e, comunque, non può prescindere dallo studio della struttura e del meccanismo d'azione degli enzimi che si vogliono imitare. Il mio lavoro di dottorato è dedicato allo sviluppo e allo studio di complessi metallici dotati di attività idrolitica nei confronti di legami fosfoesterei come modelli di nucleasi e fosfatasi. Per questo motivo nell'introduzione illustrerò, in maniera schematica, il meccanismo di azione di alcuni enzimi idrolitici e, quindi, passerò ad illustrare alcuni dei sistemi biomimetici realizzati da altri gruppi di ricerca arrivando infine alle premesse della tesi stessa.

1.2. Metalloenzimi

Nello svolgere la loro funzione diversi enzimi si servono, oltre che dei gruppi funzionali di cui sono dotate le catene laterali dei diversi amminoacidi, di specifiche unità non peptidiche dette gruppi prostetici. Molto spesso, e allora si parla di metalloenzimi, questi contengono o sono costituiti da ioni metallici (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{+} , ecc.). L'importanza di questi ultimi è tale da poter affermare che praticamente tutti i tipi di reazioni organiche (ossidazione, riduzione, deidroalogenazione, idrolisi, ecc.) possono essere catalizzate da metalloenzimi⁽⁴⁾. Tra di essi, i più rilevanti per questa tesi sono le cosiddette metallo-idrolasi: enzimi che mediante l'uso di un gruppo prostetico metallico catalizzano reazioni di idrolisi.

1.3. Metalloidrolasi

Le reazioni di idrolisi di ammidi e di esteri fosforici (*figura 1*) giocano un ruolo molto importante in diversi processi biochimici. E' il caso ad esempio di molte proteine le quali, dopo aver svolto la propria funzione biologica, devono essere distrutte; di acidi nucleici che, dopo aver subito mutazioni, necessitano di riparazioni, oppure semplicemente dell'eliminazione dell'RNA messaggero finita la fase della sintesi proteica. Nonostante queste reazioni siano termodinamicamente favorite, in soluzione acquosa ed in condizioni fisiologiche presentano barriere cinetiche molto elevate. La natura ha superato questo problema sviluppando una serie di enzimi preposti ad accelerare queste reazioni: le peptidasi, che catalizzano l'idrolisi dei legami peptidici; le fosfatasi e le nucleasi che catalizzano l'idrolisi di esteri fosforici, quali DNA e RNA.

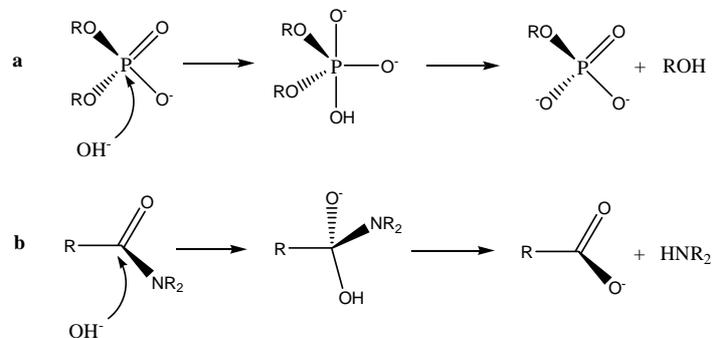


Figura 1: Meccanismo di idrolisi basica di esteri fosforici (a) ed ammidi (b).

Tali enzimi sono in grado di accelerare la velocità di idrolisi del substrato fino a 10^{17} volte rispetto alla reazione non catalizzata⁽⁵⁾. Dal loro studio dettagliato si è osservato che utilizzano una varietà di strutture, gruppi funzionali e meccanismi diversi per poter realizzare simili accelerazioni. Quattro sono i tipi di peptidasi, esemplificati dalla chimotripsina, dalla papaina, dalla pepsina e dalla carbossipeptidasi. Le prime due categorie sfruttano la nucleofilicità di funzioni presenti nelle catene laterali di amminoacidi, come serina e cisteina, il terzo tipo utilizza due gruppi carbossilato di acido aspartico o glutammico in un meccanismo di catalisi acido-base generale⁽⁶⁾. Il quarto gruppo, invece, è costituito da quegli enzimi, come la carbossipeptidasi (tra le peptidasi), le fosfatasi e le nucleasi, che sfruttano l'acidità di Lewis degli ioni metallici, Zn(II) , Mn(II) , Fe(II) , Fe(III) e Mg(II) , per aumentare l'elettrofilicità del carbonio carbossilico (o dell'atomo di fosforo) e allo stesso tempo per modificare il pK_a di una molecola d'acqua coordinata al metallo rendendola un efficace nucleofilo. Spesso questi

Introduzione

ioni sono assistiti da diversi gruppi funzionali delle catene laterali degli amminoacidi presenti nel sito attivo^(6,7). Queste metalloidrolasi possono contenere un singolo ione metallico essenziale per l'attività catalitica, oppure due ioni metallici, opportunamente posizionati, che cooperano per accelerare il processo idrolitico.

In tutti gli esempi di peptidasi e fosfatasi naturali l'idrolisi viene ottenuta mediante rottura rispettivamente del legame C-N ammidico e del legame P-O estereo (*figura 2*).

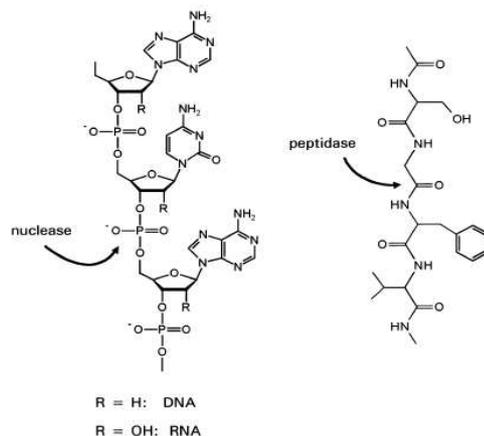


Figura 2: Struttura di acidi nucleici e peptidi e siti di attacco nucleofilo.

1.3.1. Metalloidrolasi monometalliche

Le metalloidrolasi monometalliche sono principalmente le peptidasi ed utilizzano prevalentemente uno ione Zn(II) come cofattore necessario per l'attività idrolitica.

Le due metalloidrolasi monometalliche (peptidasi) più conosciute sono la carbossipeptidasi A e la termolisina (*figura 4*). Nonostante la loro evoluzione molto diversa, i due enzimi sembrano utilizzare lo zinco in modo molto simile per catalizzare l'idrolisi peptidica⁽⁸⁾. La struttura della carbossipeptidasi A è stata determinata in uno studio ai raggi x ad alta risoluzione e si è osservato come lo ione Zn(II) sia situato all'interno della proteina, coordinato a due imidazoli di due istidine (His-69 e His-196) e al carbossilato del Glu-72. La geometria di coordinazione è completata da una molecola d'acqua che agisce da nucleofilo nel meccanismo idrolitico. Infine, vicino al sito catalitico è presente una tasca idrofobica per accogliere il substrato. Anche la struttura della termolisina è stata determinata con precisione ed, esaminando i gruppi funzionali presenti nel sito attivo, si è notato come vi siano molte somiglianze con la carbossipeptidasi A⁽⁸⁾.

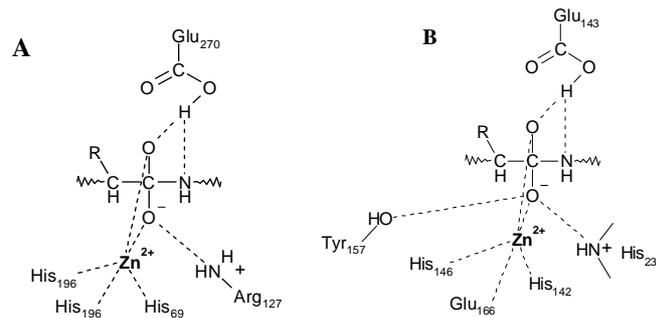


Figura 4: Stato di transizione proposto per l'idrolisi enzimatica del legame peptidico da parte di carbossipeptidasi (A) e termolisina (B).

I due enzimi agiscono con lo stesso meccanismo, il nucleofilo è uno ione OH^- legato allo Zn(II) , generato dalla deprotonazione dell'acqua coordinata. Lo zinco (oltre a generare la specie nucleofila) svolge anche un'altra funzione: stabilizza la carica negativa che si genera nello stato di transizione coordinando l'ossigeno carbossilico. Anche dei residui carichi positivamente (Arg-127 e His-231) contribuiscono a questa stabilizzazione. I due residui di Glu essenziali per l'attività catalitica in entrambi gli enzimi, funzionano dapprima come basi generali per accettare il protone dalla specie nucleofila e poi come acidi generali protonando il gruppo amminico uscente⁽⁹⁾.

1.3.2. Metalloidrolasi bimetalliche

Il numero di enzimi idrolitici, di cui è stata definita la struttura e che utilizzano due o più ioni metallici per catalizzare reazioni di idrolisi, sta aumentando notevolmente grazie alla crescente sofisticazione delle tecniche cristallografiche. Tra questi vi sono enzimi che catalizzano l'idrolisi del legame C-N di urea e guanidina (Arg), il legame peptidico N-terminale di proteine e il legame P-O di mono-, di- e triesteri fosforici sia alchilici che arilici. A quest'ultima classe di substrati appartengono molecole biologicamente molto importanti come l'RNA e il DNA. In quanto più rilevanti per l'argomento di questa Tesi, verranno trattate solo le fosfoidrolasi che rappresentano la classe più ampia di enzimi per i quali è nota la presenza di un sito bimetallico e, in particolare, verranno descritti due esempi di nucleasi e uno di fosfatasi.

1.3.2.1 Fosfatasi alcalina di E.Coli

La fosfatasi alcalina di E.Coli^(6,7) (AP) è una fosfomonoesterasi non specifica presente sia nei procarioti che negli eucarioti. L'enzima nativo è un omodimero di 94

Introduzione

kDa che contiene due ioni Zn(II) e uno ione Mg(II). La sua attività è massima a valori di pH pari a 7.5. I due ioni Zn(II) sono strettamente coinvolti nella reazione di idrolisi, mentre il Mg(II) aumenta l'attività, ma non è strettamente necessario. Nel sito attivo i due ioni zinco sono posizionati a 4.1 Å di distanza. Durante la reazione (*figura 6*) lo Zn(1) è coordinato all'His-331, all'His-412, ai due ossigeni dell'Asp-327 e ad un ossigeno del fosfato; lo Zn(2) è tetracoordinato all'His-370, a due atomi di ossigeno di due Asp e ad un ossigeno del fosfato. La reazione avviene mediante un intermedio fosfo-enzima, con un meccanismo di sostituzione nucleofila a due passaggi, che coinvolge la Ser-102.

I due ioni zinco svolgono un ruolo complementare nei due passaggi della reazione, nel senso che a turno attivano il nucleofilo: uno (Zn^{2+}) attiva il residuo di Ser per l'attacco al fosfomonoestere nel primo passaggio, mentre l'altro attiva una molecola d'acqua per idrolizzare l'intermedio fosfo-enzima⁽⁶⁻⁸⁾. In ogni passaggio i due ioni metallici agiscono in modo diverso e combinato: uno attiva il nucleofilo, l'altro stabilizza la carica negativa che si crea sul gruppo uscente ed entrambi stabilizzano lo stato di transizione pentavalente. Anche il residuo di Arginina-166 svolge un ruolo molto importante, stabilizzando lo stato di transizione mediante legami idrogeno. Oltre ai due ioni metallici, quindi, giocano un ruolo molto importante anche le catene laterali degli amminoacidi presenti nel sito attivo. Infatti è stato osservato che forme mutanti dell'enzima, in cui la Serina-102 e l'Arginina-166 sono state sostituite, presentano un'attività molto ridotta rispetto alla forma nativa.

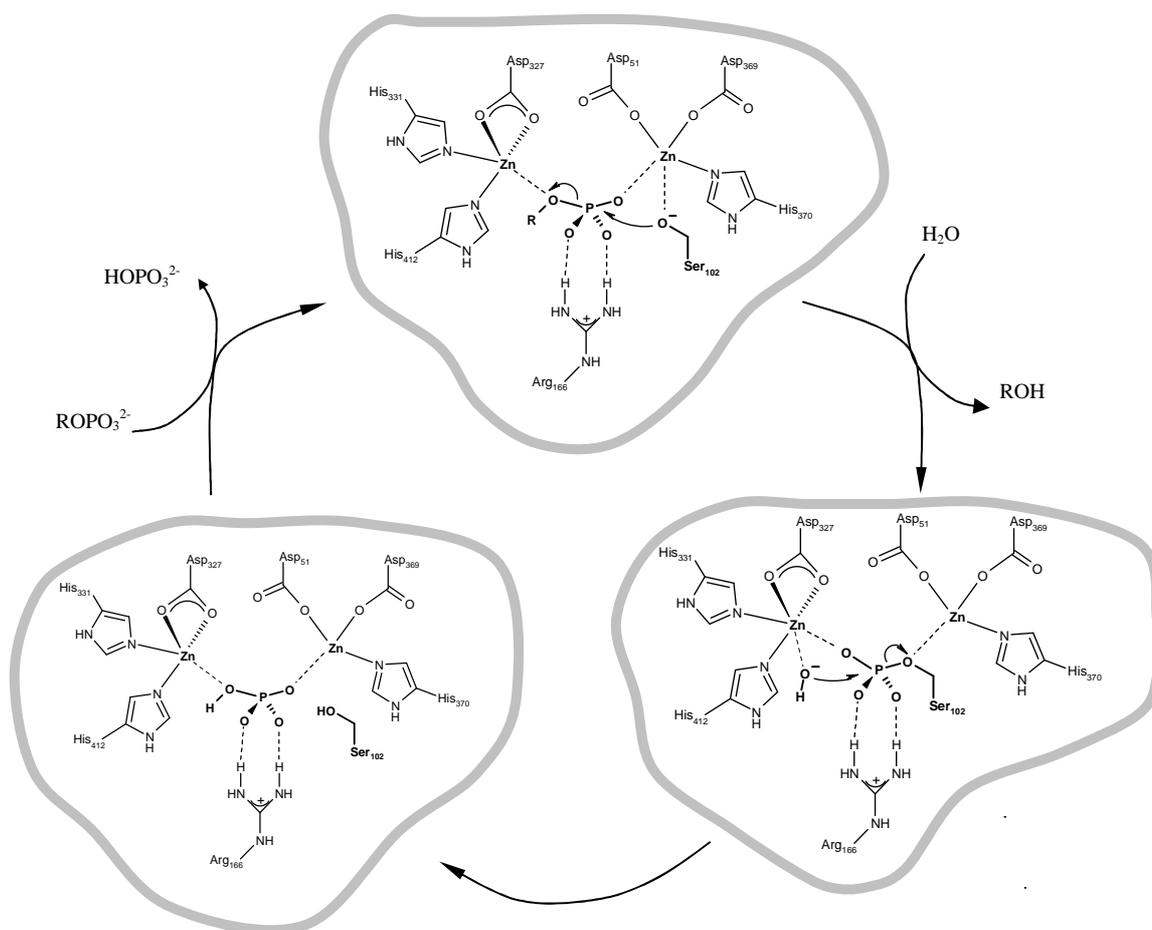


Figura 6: Struttura del sito attivo proposto per l'attività idrolitica della fosfatasi alcalina.

1.3.2.2. Un esempio di nucleasi: la DNA polimerasi I

Negli esseri viventi, gli enzimi RNA e DNA polimerasi svolgono ruoli fondamentali legati alla duplicazione ed alla trascrizione del materiale genetico. Essi presentano inoltre uno o più siti attivi in grado di agire come nucleasi. La DNA polimerasi I, ad esempio, catalizza la sintesi del DNA, la sua idrolisi nelle posizioni 3'-5' e quella nelle posizioni 5'-3' utilizzando tre domini separati presenti nella stessa proteina^(6,7). Ognuno di questi tre siti attivi dipende dalla presenza di ioni metallici divalenti. L'attività nucleasica dell'enzima serve a rimuovere gli errori talvolta commessi durante la sintesi del DNA.

Il sito attivo in grado di promuovere l'idrolisi del DNA in posizione 3'-5' della DNA polimerasi I è uno tra i più studiati e del quale si hanno maggiori informazioni. Ioni divalenti (Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ o Co²⁺) sono essenziali per l'attività e dati cristallografici

1.3.3. Endonucleasi di restrizione di tipo II

Le endonucleasi di restrizione di tipo II (ER2) sono una famiglia di enzimi prodotti dai batteri per degradare acidi nucleici estranei alla cellula. Sono noti almeno 3650 membri di questa grande classe di enzimi, la maggior parte dei quali si trova in forma monometrica o di tetramero⁽¹⁰⁾. Questi enzimi sono in grado di idrolizzare il DNA all'altezza di sequenze note di quattro o otto coppie di basi. Le ER2 sono metallonucleasi e quindi necessitano di ioni metallici: la maggior parte di esse utilizzano da uno a tre ioni, solitamente Mg^{2+} . Esse si distinguono dagli altri enzimi precedentemente descritti dal modo di riconoscimento della sequenza di DNA e dal meccanismo di azione; caratteristiche che hanno suscitato un notevole interesse nei loro confronti.

L'idrolisi del legame fosfodiesterico mediato dalle ER2 segue un meccanismo di tipo S_N2 , caratterizzato quindi dall'inversione di configurazione del fosfato. La reazione procede in tre stadi: la deprotonazione di una molecola d'acqua da parte di una base presente nella proteina, l'attacco nucleofilo dell'idrossido sul fosforo con la formazione di uno stato di transizione nel quale il fosforo pentacoordinato presenta due cariche negative e infine il rilascio del gruppo uscente come alcol.

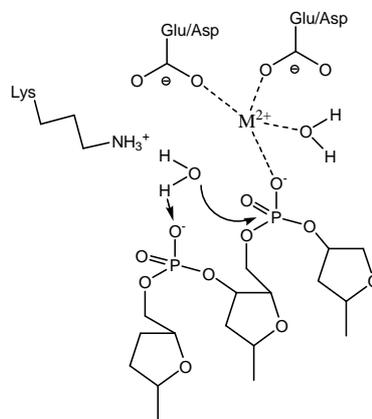


Figura 8: Modello proposto per il meccanismo di idrolisi del DNA da parte di ER2.

Come è possibile osservare nella *figura 8*, in cui è riportato il meccanismo generale proposto per ER monometalliche, lo ione metallico coordina una molecola d'acqua, abbassandone la pK_a e interagisce con il fosfato. La base che accetta il protone rilasciato dall'acqua è un secondo fosfato in posizione 3' rispetto a quello idrolizzato. Nel sito attivo di questi enzimi è spesso presente un gruppo amminico protonato appartenente alla catena laterale di un residuo di lisina, essenziale per il raggiungimento dell'elevata

attività catalitica del sistema. Il ruolo di questo gruppo non è ben chiarito ma si ipotizza che possa aiutare la deprotonazione della molecola d'acqua o che stabilizzi le cariche negative che appaiono sul substrato durante il decorso della reazione.

1.4. Modelli di metalloenzimi idrolitici

1.4.1. Ruolo degli ioni metallici

Dagli esempi illustrati sopra, si è visto come gli ioni di metalli di transizione giochino un ruolo molto importante nella catalisi biologica dell'idrolisi di vari substrati. Parallelamente allo studio dei sistemi biologici, si è sviluppato l'uso di sistemi basati su ioni metallici come catalizzatori idrolitici con lo scopo da un lato di verificare su sistemi più semplici i meccanismi d'azione degli enzimi, e dall'altro di produrre nuovi catalizzatori. Questi studi hanno portato a definire più in dettaglio i vari ruoli che lo ione metallico può assumere nella catalisi idrolitica^(5,9,11). Questi sono molteplici e i più importanti sono riassunti di seguito e illustrati schematicamente in *figura 9*.

1. Effetto *templato*: il metallo si coordina sia al substrato che al nucleofilo portandoli in prossimità, in modo che la reazione diventi quindi (pseudo)intramolecolare.

2. Aumento dell'*elettrofilicità del substrato*: il metallo interagisce con l'ossigeno carbonilico (o fosforilico) polarizzandolo e quindi attivandolo rispetto all'attacco di nucleofili; in questa posizione il metallo è in grado anche di stabilizzare la carica negativa che si forma nel corso della reazione, diminuendo così l'energia di attivazione della stessa.

3. Aumento della "*leaving group ability*": il metallo si coordina al gruppo uscente aumentandone l'acidità e quindi facilitandone l'espulsione.

4. Attivazione del nucleofilo: molti nucleofili sono più reattivi nello stato deprotonato. Interagendo con essi il metallo ne aumenta l'acidità facilitandone la deprotonazione e quindi aumentando la frazione di specie reattiva disponibile.

5. Catalisi acida generale: una molecola d'acqua coordinata al metallo (e quindi più acida) trasferisce un protone al gruppo uscente.

6. Catalisi basica generale: lo ione idrossido coordinato al metallo favorisce l'attacco nucleofilo di una molecola d'acqua.

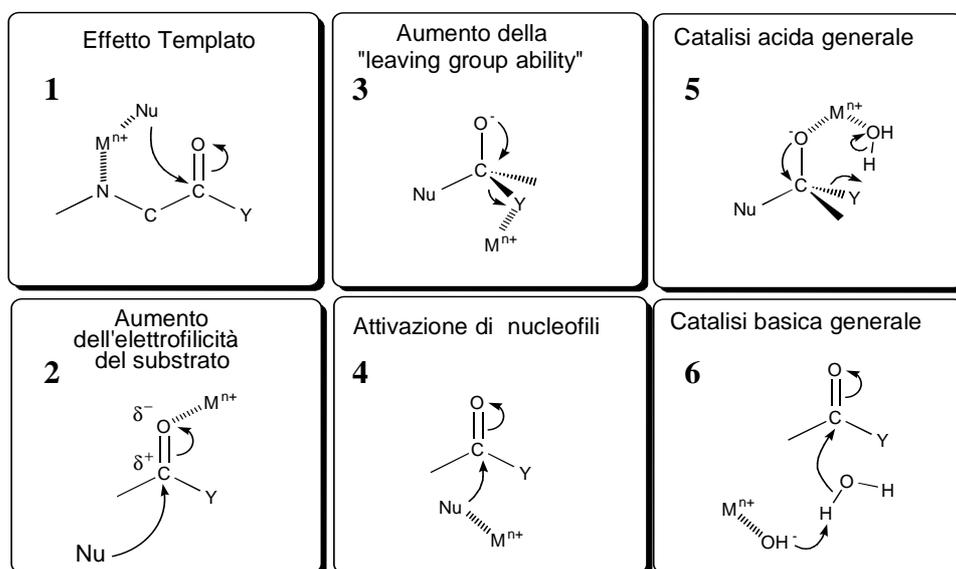


Figura 9: Meccanismi dell'idrolisi di derivati di acidi carbossilici e fosforici catalizzata da ioni metallici.

Quali di questi meccanismi siano attivi in una determinata reazione è determinato dalle caratteristiche del metallo (o del complesso metallico) e da quelle del substrato. Nel caso di semplici esteri carbossilici, ad esempio, sono attivi prevalentemente i meccanismi 4 o 6: il substrato infatti non è in grado di interagire in nessun modo direttamente con il metallo. Gli atomi di ossigeno degli esteri fosforici sono invece in grado di coordinarsi, seppur debolmente, a ioni metallici, per cui nella loro idrolisi catalizzata da ioni metallici sono generalmente attivi almeno i meccanismi 1, 2 e 4. Infine nel caso dell'idrolisi di ammidi, in cui il trasferimento di idrogeno al gruppo uscente è il passaggio chiave del meccanismo, diviene fondamentale il meccanismo 5. Bisogna inoltre tener presente che, utilizzando sistemi contenenti più ioni metallici, tali effetti possono combinarsi rendendo la catalisi ancora più efficace come osservato nel caso delle nucleasi bimetalliche⁽⁵⁾. Ad esempio, nel caso dell'idrolisi dei diesteri fosforici si possono verificare i meccanismi descritti in *figura 5*: doppia attivazione del substrato, attivazione del substrato combinata con la formazione del nucleofilo, attivazione del substrato combinata con l'attivazione del gruppo uscente.

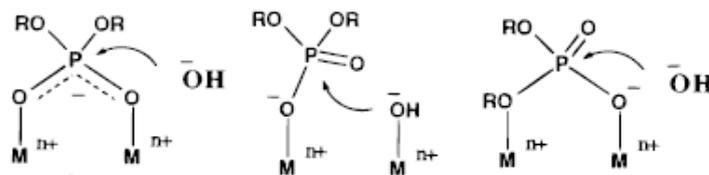


Figura 5: Meccanismi generali di idrolisi di esteri fosforici per una metalloidrolasi bimetallica.

Gli studi sui sistemi artificiali hanno portato alla realizzazione di un serie di complessi metallici in grado di accelerare l'idrolisi di vari tipi di substrati con efficienza elevata anche se ancora lontana da quella mostrata dagli enzimi. Di seguito illustrerò alcuni esempi di questi complessi, limitando il campo a quelli attivi nell'idrolisi di legami fosfoesterei e in particolare di diesteri fosforici perché più rilevanti per questa tesi.

1.4.2. Ioni metallici utilizzati

In natura gli ioni maggiormente riscontrati negli enzimi sono lo ione Zn(II), il Ca(II) e il Mg(II). Essi sono metalli biodisponibili e con un elevata acidità di Lewis. Lo ione Mg(II), ad esempio, presenta un raggio atomico di 0.6Å e due cariche positive. Questi valori lo rendono uno tra i metalli con più elevata densità di carica. Esso è quindi in grado di interagire efficacemente con gli atomi di ossigeno dei fosfati carichi negativamente.

Nello studio dei modelli di enzimi sono stati utilizzati diversi tipi di ioni metallici, tra i quali Cu(II), Co(III), Zn(II) e lantanidi. Tra questi i più usati sono il Cu(II) e lo Zn(II), non tanto per la loro maggior reattività, ma per la loro ben definita chimica di coordinazione. Nonostante i sistemi idrolitici basati su complessi dello ione Zn(II) non si siano mostrati finora particolarmente efficaci, esso risulta comunque lo ione maggiormente indicato. Quest'ultimo presenta infatti notevoli vantaggi quali la scarsa tossicità, la buona biodisponibilità e l'assenza di una chimica redox rilevante, caratteristica che previene la possibilità di meccanismi parassiti di scissione degli acidi nucleici di tipo ossidativo. E' quindi di notevole importanza l'individuazione di metodi in grado di rendere più efficaci gli agenti idrolitici basati sullo ione Zn(II).

1.4.3. Substrati

L'uso degli acidi nucleici o di oligonucleotidi come substrati con cui investigare la reattività dei sistemi idrolitici si presenta poco agevole, almeno nel caso di studi preliminari sulla reattività dei complessi sintetizzati. Per questo motivo, è usuale testare i nuovi composti nei confronti di diesteri fosforici modello. Essi, grazie alla semplice struttura e alla loro disponibilità in commercio sono adatti inoltre per studi meccanicistici approfonditi dei vari sistemi. Generalmente soltanto dopo aver investigato la reattività nei confronti dei substrati modello si passa all'utilizzo degli acidi nucleici.

I substrati modello maggiormente utilizzati sono generalmente caratterizzati da reattività elevate, per consentire di ridurre i tempi di investigazione. Il diestere fosforico bis-*p*-nitrofenil fosfato (BNP) è il substrato utilizzato come modello del DNA (*figura 10*). Esso possiede un buon gruppo uscente (pK_a del *p*-nitrofenolo = 7) e il prodotto della reazione di idrolisi (il *p*-nitrofenato, NP) presenta una forte banda di assorbimento a 400 nm, che rende la reazione facilmente seguibile mediante spettroscopia UV-Vis. In questo ed in altri casi, inoltre, la natura dei prodotti di reazione è di facile individuazione anche mediante le tecniche spettroscopiche quali ESI-MS o ^{31}P -NMR.

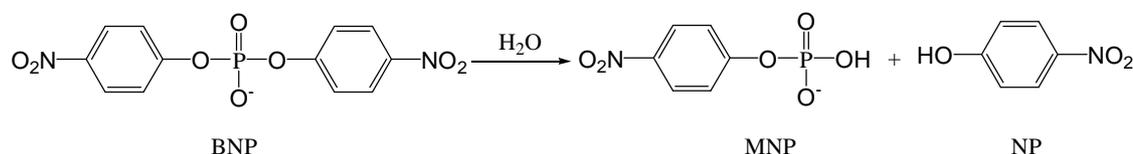


Figura 10: Struttura del diestere fosforico modello BNP e dei prodotti di idrolisi.

Il substrato modello per l'RNA è invece l'HPNP (*figura 11*). Esso ha lo stesso gruppo uscente del BNP e, analogamente all'RNA, presenta un gruppo ossidrilico in posizione beta rispetto al fosfato. Nel corso della reazione l'alcol (o alcolato) fungerà da nucleofilo intramolecolare, portando alla formazione del *p*-nitrofenato e dell'estere ciclico propilene fosfato (PO).

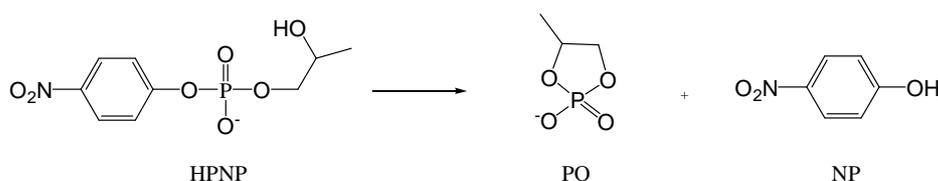


Figura 11: Struttura del diestere fosforico modello HPNP e del prodotto di idrolisi.

Introduzione

Quest'ultimo substrato, avendo a disposizione sul braccio propilico il nucleofilo è molto più labile del BNP, infatti a pH 7 e 25 °C il suo tempo di semivita è di circa 2 anni, mentre quello del BNP è maggiore di 1300 anni⁽¹²⁾.

Per avvicinarsi alla struttura degli acidi nucleici, e quindi per ottenere valori di reattività più attendibili, vengono utilizzati dinucleotidi con struttura analoga a DNA e RNA. I maggiormente utilizzati risultano essere l'ApA e l'UpU, la cui struttura è riportata in *figura 12*.

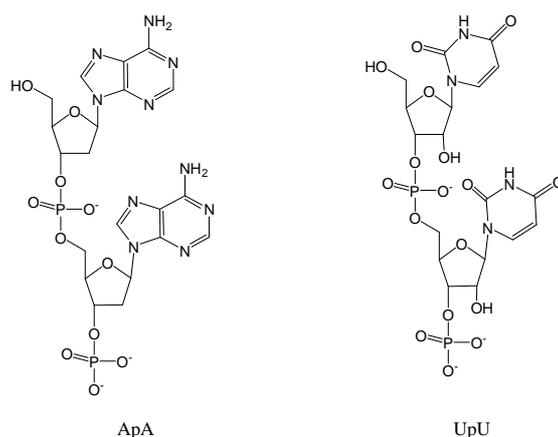


Figura 12: Struttura dei dinucleotidi ApA e UpU.

Lo studio della reattività idrolitica su questi ultimi substrati è però più difficoltoso, non solo per la loro elevata inerzia verso l'idrolisi, ma anche per la difficoltà nel seguire questa reazione. Non avendo come gruppo uscente un alcolato con forti bande di assorbimento nel visibile, l'idrolisi di questi substrati deve essere studiata mediante HPLC in fase inversa.

In alternativa, substrati molto usati sono dei derivati ciclici dell'AMP, il 3'5'cAMP e il 2'3'cAMP e le loro strutture sono riportate in *figura 13*. Questi fosfati racchiudono rispettivamente cicli a sei e a cinque atomi e i prodotti di idrolisi di questo tipo di substrato sono due, a seconda di come si scinde il gruppo fosfestereo. Particolarmente importante è il 2,3-cAMP in cui la tensione dell'anello a 5 rende il substrato molto reattivo anche in assenza di gruppi uscenti attivati.

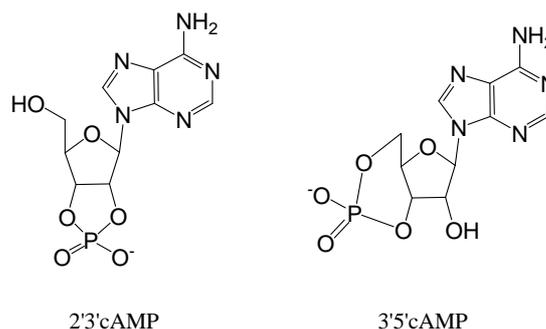


Figura 13: Struttura dei substrati 2'3'cAMP e 3'5' cAMP.

Quando gli studi di reattività arrivano al DNA, viene usato in particolare il DNA plasmidico. Si tratta di un DNA a doppio filamento (4000-6000 coppie di basi) racchiuso su sé stesso e superavvolto. Mediante un singolo evento idrolitico su uno di due filamenti il DNA superavvolto viene convertito nella forma circolare, la quale dopo un ulteriore idrolisi sulla seconda catena, forma la specie lineare. Queste tre forme di DNA sono quantitativamente e qualitativamente osservabili mediante elettroforesi su gel (*figura 14*). Per la maggior parte dei complessi che si ritrovano in letteratura l'unico prodotto osservato è la forma circolare e i motivi sono essenzialmente due: il DNA superavvolto è maggiormente reattivo delle altre forme e statisticamente la formazione della forma lineare è sfavorita. Per la conversione della forma circolare in quella lineare è infatti necessaria l'idrolisi del frammento integro entro le 20 coppie di basi dal primo evento idrolitico e, se questi eventi avvengono in modo casuale, ne sono necessari più di 100 perché avvenga la formazione del DNA lineare⁽¹³⁾.

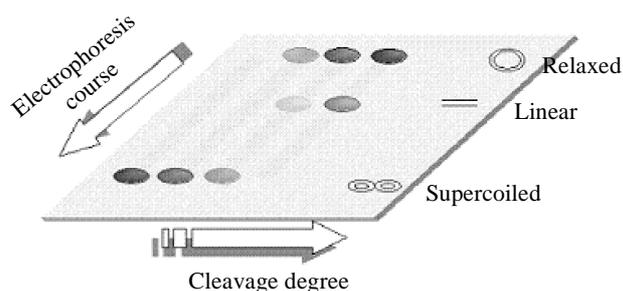


Figura 14: Tipico gel elettroforetico nell'idrolisi del DNA superavvolto.

1.4.4. Catalizzatori monometallici

I primi studi su sistemi in grado di promuovere l'idrolisi dei diesteri fosforici risalgono agli inizi degli anni '80. Inizialmente l'attenzione si concentrò su complessi inerti o semilabili di Co(III) ⁽¹⁴⁾ e Ir(III) ⁽¹⁵⁾ e venne dimostrato come esteri fosforici

coordinati a questi complessi si idrolizzano con velocità molto più elevate rispetto alla reazione spontanea.

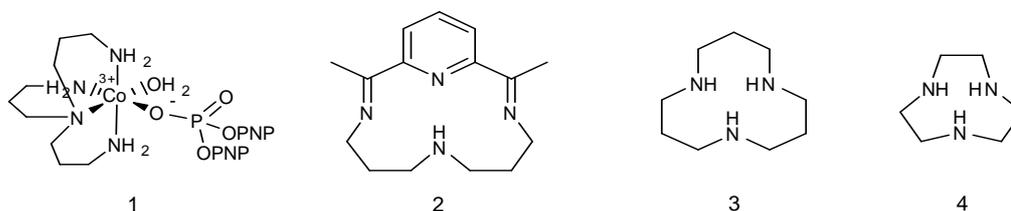
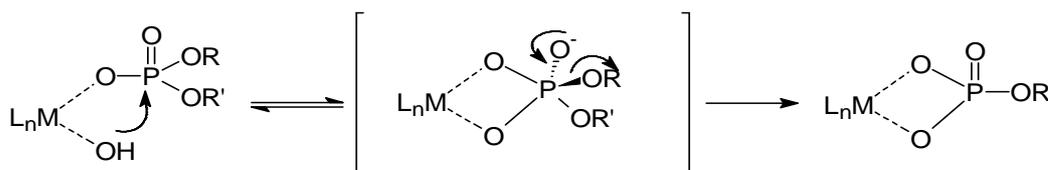


Figura 15

Nel caso del complesso **1** (figura 15), sono state ottenute accelerazioni della velocità di idrolisi del BNP complessato al Co(III) fino a 10 ordini di grandezza a pH 7 e 25° C^(11b). A causa della loro inerzia verso lo scambio dei leganti questi sistemi non sono in grado di agire come catalizzatori, ma questi studi hanno permesso di chiarire come il meccanismo della reazione richieda la disponibilità di due siti di coordinazione sul metallo in posizione cis (schema 1): uno occupato dal substrato ed il secondo da uno ione idrossido che agisce da nucleofilo.



Schema 1

Notevolmente efficaci si sono dimostrati infine gli ioni di metalli lantanidi, a causa della loro elevata acidità di Lewis⁽²⁴⁻²⁵⁻³⁹⁾ e capacità di fare complessi con alti gradi di coordinazione. Il meccanismo di azione di questi ioni è ancora oggetto di studi perché le specie attive sono generalmente cluster di ioni legati da ponti idrossido o ossido la cui stechiometria è di difficile definizione. Anche l'utilizzo di leganti porta alla formazione di specie poco definite che, per di più, sono raramente più efficaci rispetto ai soli sali di questi metalli ed inoltre presentano una elevata tossicità nei confronti dei sistemi biologici.

Pochi anni dopo si è passati allo studio di complessi di Zn(II) che, come illustrato nel paragrafo 1.4.2, è lo ione metallico maggiormente indicato per l'idrolisi dei diesteri fosforici. Nel 1990, Trögler and De Rosch hanno studiato l'idrolisi del substrato BNP catalizzata da complessi di zinco dei leganti **5** e **6** (figura 16). La reattività di questi complessi è risultata scarsa: il complesso **5**·Zn(II), alla temperatura di 75°C, è in grado

di idrolizzare il BNP con una costante del primo ordine di $5.1 \cdot 10^{-8} \text{ s}^{-1}$, ottenendo un incremento di reattività rispetto alla reazione non catalizzata di sole 2 volte⁽⁴¹⁾.

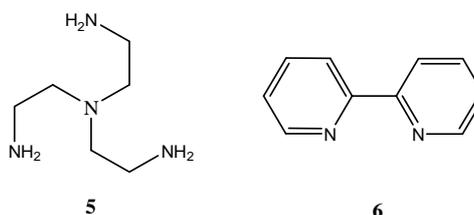


Figura 16

La scarsa reattività di questo sistema è stata attribuita alla saturazione dei siti di coordinazione sullo ione metallico del complesso ternario **5**·Zn(II)·BNP; essendo il **5** un legante tetradentato si ha quindi la mancanza del nucleofilo. Ciò non accade con il complesso del legante **6**, che grazie alla disponibilità di almeno due siti di coordinazione liberi in posizione cis, possiede una reattività maggiore. Esso infatti catalizza l'idrolisi del BNP con una velocità 53 volte maggiore alla reazione spontanea⁽⁴¹⁾.

Nel 1991, Kimura e Koike confrontarono la reattività dei complessi di zinco dei due poliazamacrocicli tetra e tri dentati 1,4,7,10-tetraazaciclododecano (**7**) e 1,5,9-triazaciclododecano (**3**).

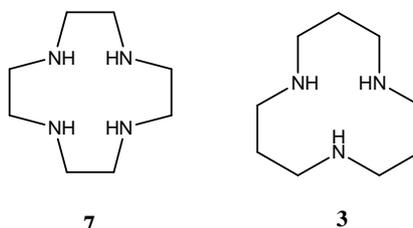


Figura 17

Le costanti di pseudo-primo ordine a 35°C e a pH 7 per l'idrolisi del BNP sono risultate essere rispettivamente di $2.8 \cdot 10^{-9}$ e $3.3 \cdot 10^{-8} \text{ s}^{-1}$, che si traducono in accelerazioni di 46 e 550 volte⁽⁴³⁾. Ancora una volta la differenza di reattività è stata attribuita al diverso numero di siti di coordinazione liberi presenti sul centro metallico. Inoltre, l'acidità della molecola d'acqua coordinata, per il legante tridentato è risultata essere maggiore, il che rende la specie attiva maggiormente disponibile a pH fisiologico.

Successivamente è stata investigata la reattività esterolitica di numerosi complessi di leganti aventi diverse strutture. Sono stati presi in considerazione leganti tri e tetradentati, ciclici e non, ed alcune strutture sono riportate in *figura 18*. La loro

Introduzione

reattività è stata correlata con i rispettivi valori delle pK delle molecola d'acqua coordinate al centro metallico (lo ione idrossido coordinato al metallo è il nucleofilo attivo nel corso della reazione) ed è stato ottenuto il seguente diagramma di Brönsted.

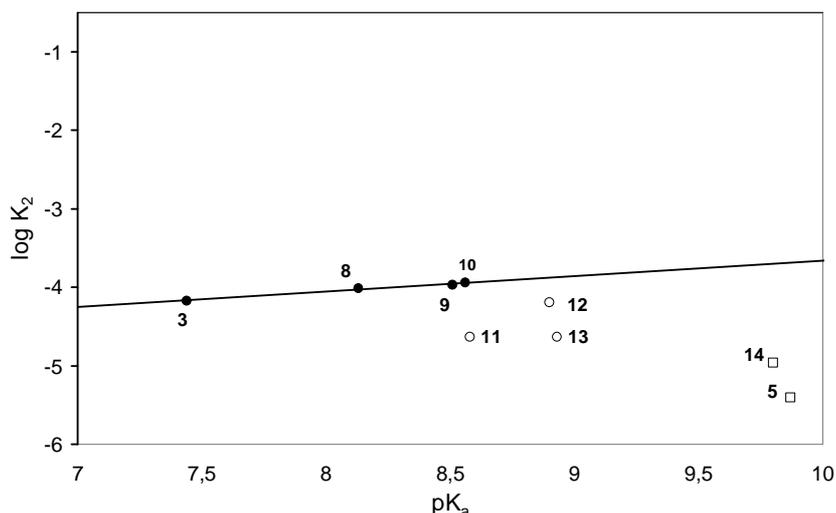
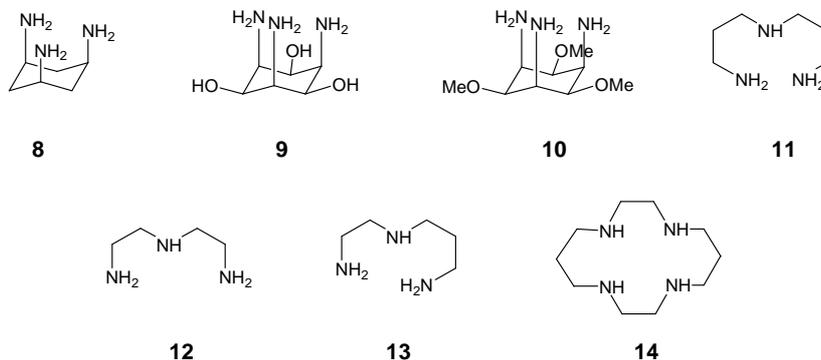


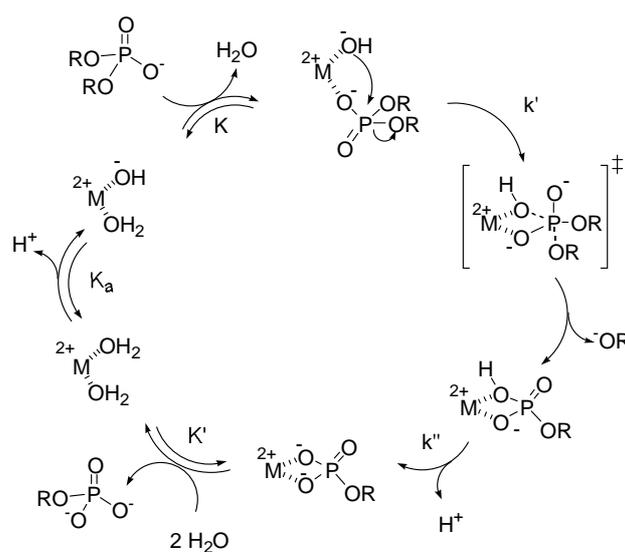
Figura 18: Diagramma di Brönsted per l'idrolisi di BNP in presenza dei complessi di Zn(II) di alcuni leganti amminici.



L'analisi del grafico evidenzia alcuni punti di rilievo: a) non vi è una correlazione semplice tra pK_a della molecola d'acqua coordinata e reattività; b) i complessi studiati possono essere divisi, dal punto di vista della reattività, in tre categorie: tridentati ciclici (●, 8-10), tridentati lineari (○, 11-13) e tetradentati (□, 5-14). Vi è una chiara correlazione tra struttura e reattività: i complessi dei leganti tridentati ciclici sono più reattivi di quelli dei tridentati lineari che a loro volta sono più reattivi dei tetradentati; c) solo all'interno della categoria tridentati ciclici è possibile stabilire una correlazione lineare tra reattività e pK_a, che è caratterizzata da una pendenza molto bassa ($\beta_{\text{nuc}} = 0.20$).

Al di là delle speculazioni meccanicistiche che possono essere invocate per spiegare tali comportamenti, tale studio ha consentito di definire come la struttura del legante influenzi pesantemente la reattività dei complessi. I risultati migliori vengono sicuramente ottenuti utilizzando i leganti triamminici ciclici. All'interno di questa categoria però lo spazio per ulteriori miglioramenti non è molto ampio, infatti il basso valore di β_{nuc} rilevato fa sì che anche a drastiche modificazioni della struttura del legante corrispondano modeste variazioni della sua reattività.

Il meccanismo della reazione è stato studiato dettagliatamente e si è rivelato simile a quello determinato per i complessi inerti di Co(III) e Ir(III) (*schema 2*): esso prevede, in primo luogo, la formazione di complesso metallo-substrato (K) e, successivamente, l'attacco nucleofilo (k') dell'ossidrilico coordinato allo ione metallico sul substrato stesso con l'espulsione di un residuo alcolico. La deprotonazione del prodotto e la sua successiva dissociazione dal metallo completano il ciclo catalitico⁽¹⁶⁾. E' ancora oggetto di discussione se l'espulsione del gruppo alcolico avvenga contemporaneamente all'attacco del nucleofilo (come rappresentato nello *schema 2*) o se vi sia la formazione di un intermedio. Dettagliati studi cinetici effettuati dal gruppo di Burstyn nel caso del complesso 1,4,7-triazaciclononano-Cu(II) hanno permesso di definire un meccanismo concertato nel caso di substrati dotati di buoni gruppi uscenti, ma il meccanismo potrebbe essere diverso nel caso di substrati con gruppi uscenti non attivati o in presenza di ioni metallici differenti⁽¹⁷⁾.



Schema 2

1.4.5. Catalizzatori bimetallici

Se, come abbiamo visto, è difficile ottenere sistemi dotati di elevata reattività nel caso di complessi monometallici, effettivi miglioramenti dell'efficacia catalitica sono stati invece ottenuti facendo ricorso a leganti in grado di complessare due ioni metallici, posizionandoli in modo opportuno per ottenere un'attività catalitica cooperativa. Come si osserva negli enzimi naturali i meccanismi di azione dei catalizzatori bimetallici sono essenzialmente di due tipi. Il primo consiste nella doppia attivazione del substrato mediante la simultanea coordinazione con entrambi i centri metallici e il secondo nella formazione del nucleofilo sullo ione metallico non coordinato al substrato; esempi di questi due meccanismi saranno illustrati e discussi in seguito.

Un esempio interessante è fornito dal gruppo di Chin che ha studiato il complesso dinucleare di Cu(II) (*figura 20a*)⁽¹⁹⁾. In questo caso, nella reazione di transesterificazione dell'HPNP si è osservato un guadagno cinetico di cinquanta volte per il complesso dinucleare rispetto al complesso di un analogo legante contenente un solo ione metallico. Sulla base della struttura ai raggi X del complesso di *figura 20a* con il dibenzilfosfato, gli autori hanno proposto la coordinazione del substrato ai due ioni Cu(II), seguita da un attacco intramolecolare del gruppo OH del substrato (*figura 20b*) giustificando l'elevata accelerazione osservata con un meccanismo di doppia attivazione elettrofilica del substrato.

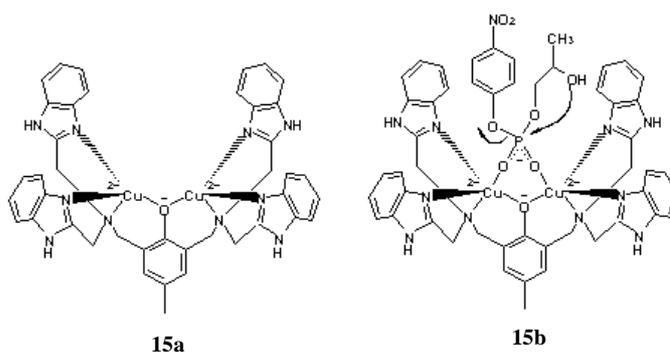
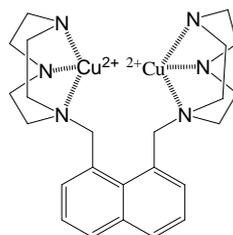
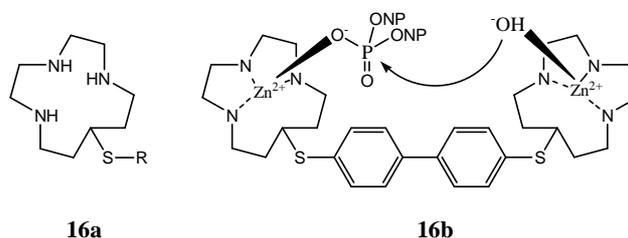


Figura 20: (15a) Complesso dinucleare di Cu(II), (15b): Modello ipotizzato per lo stato di transizione nella reazione di idrolisi dell'HPNP.

**Figura 21**

Un altro interessante esempio, sempre dal gruppo di Chin, è il complesso bimetallico di Cu(II) riportato in *figura 21*, che riesce ad accelerare di 5 ordini di grandezza l'idrolisi di un dinucleotide (ApA) e di addirittura 9 ordini di grandezza quella del fosfato ciclico (2'3'cAMP). Queste accelerazioni sono di particolare rilievo soprattutto se si tiene conto che sono state ottenute con substrati non dotati di un gruppo uscente attivato⁽²⁰⁾.

Un diverso tipo di meccanismo si è riscontrato per il complesso studiato da Breslow riportato in *figura 22b*. Esso è in grado di idrolizzare il BNP a 55 °C e a pH 8.36 di 2000 volte rispetto alla reazione di base e, rispetto al corrispondente complesso monometallico, è risultato essere 5 volte maggiormente reattivo.

**Figura 22**

Come si può osservare in *figura 22b* il primo ione metallico coordina il substrato attivandolo e il secondo forma il nucleofilo (una molecola d'acqua deprotonata), che nel corso della reazione attaccherà il fosfato provocandone la scissione.

Dai valori di reattività riportati si può notare che l'approccio di utilizzare due ioni metallici per la realizzazione di sistemi attivi nell'idrolisi di diesteri fosforici ha portato a sistemi estremamente reattivi verso substrati analoghi all'RNA (HPNP) e quando si utilizzano metalli come il Cu(II). Nel caso dello ione Zn(II) e dei substrati analoghi del DNA (BNP), negli ultimi anni si sono testati numerosi complessi recanti varie unità

spaziatrici contenenti gruppi più o meno rigidi (*figura 23*) ma i risultati ottenuti sono stati nettamente inferiori alle attese.

Il complesso maggiormente reattivo verso il BNP è risultato essere quello del legante **22** che, a pH 7 e 35 °C è in grado di idrolizzarlo con una velocità 350 volte maggiore di quella della reazione non catalizzata e con una costante cinetica del primo ordine di $2.1 \cdot 10^{-8} \text{ s}^{-1(21)}$. Nella maggior parte dei casi, inoltre, la reattività dei complessi bimetallici è di poco superiore a quella dei corrispondenti complessi monometallici.

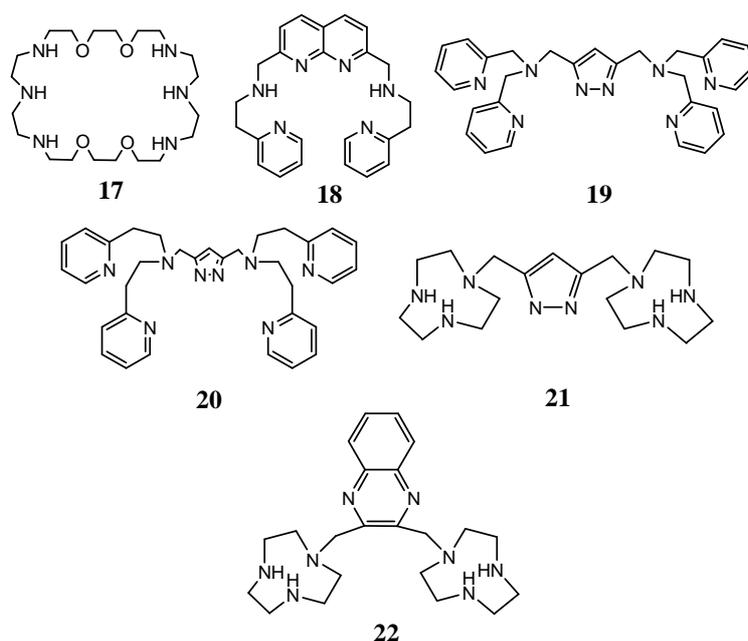


Figura 23: Struttura di alcuni leganti bimetallici studiati.

La scarsa reattività di questi complessi è stata attribuita da un lato alla scarsa cooperatività tra i metalli per leganti aventi spaziatori rigidi e molto lunghi (come nel sistema di Breslow discusso in precedenza) e dall'altro, nel caso i metalli siano troppo vicini tra loro, alla formazione di μ -idrossido dimeri che portano alla saturazione della sfera di coordinazione dei metalli, impedendo la formazione del nucleofilo.

Più recentemente sono emersi in letteratura i primi esempi di catalizzatori di zinco in grado di agire sul DNA plasmidico provocandone la scissione idrolitica. I più efficaci sono essenzialmente due: l'eptapeptide pubblicato da Scrimin e collaboratori nel 2001 (*figura 24 a e b*) e un composto macrociclico studiato recentemente nel gruppo di Bencini.

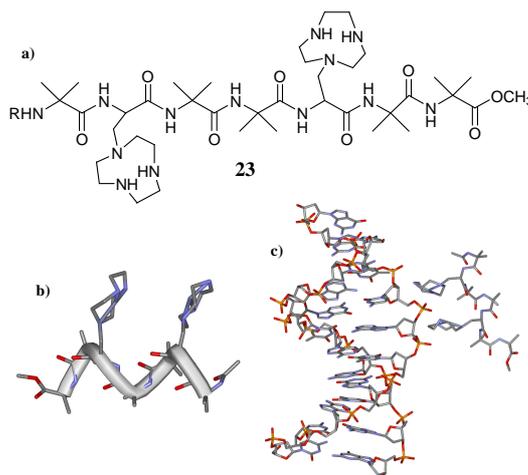


Figura 24: Struttura dell'eptapeptide (a e b) e del complesso supramolecolare con il DNA (c).

Il complesso binucleare di zinco dell'eptapeptide **23** è in grado di idrolizzare il DNA plasmidico a pH 7 e 37°C con una costante cinetica del primo ordine di $1.0 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ⁽²²⁾ e un'accelerazione di un milione di volte rispetto alla reazione non catalizzata. Il peptide in esame, composto da aminoacidi α -sostituiti, si trova in conformazione di elica 3_{10} e le due unità leganti macrocicliche portano i metalli ad una distanza di circa 6Å. La reattività verso il DNA è stata giustificata ancora una volta dalla buona cooperatività dei centri metallici. E' stata proposta una struttura reattiva nella quale i due macrocicli del catalizzatore legano il DNA in corrispondenza di tre gruppi fosfato del substrato (figura 24c). Il gruppo fosfato centrale si trova così attivato da entrambi gli ioni metallici e risulta essere labile verso l'idrolisi.

Il catalizzatore maggiormente reattivo verso il DNA plasmidico è finora risultato essere il complesso bimetallico di zinco del macrociclo di figura 25⁽²³⁾: a pH 7 e 37°C esso è in grado di idrolizzare con resa quantitativa il DNA plasmidico in sole 24 ore (il che indica una costante cinetica per la reazione superiore a $5.0 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$).

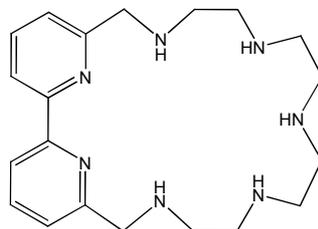


Figura 25: Struttura del legante macrociclico pubblicato da Bencini e collaboratori.

E' stato dimostrato che l'elevata reattività di questo composto è dovuta alla doppia attivazione del fosfato e alla interazione della parte fenantrolinica aromatica del legante con le basi azotate del DNA del solco minore. Questi effetti non solo rendono il

substrato maggiormente attivato, ma aumentano anche l'affinità del catalizzatore nei confronti del substrato stesso aumentandone così l'efficienza. La cooperazione tra i due centri metallici risulta però piuttosto scarsa.

Come si è accennato in precedenza, tra gli ioni metallici maggiormente attivi nell'idrolisi di diesteri fosforici e del DNA vi sono i lantanidi ed in particolare lo ione Ce(IV). Esso possiede numerosi vantaggi tra i quali l'elevata capacità ad attrarre elettroni dovuta all'alto stato di ossidazione, l'alto numero di coordinazione (fino a 12), il veloce scambio dei leganti e l'incapacità di dare reazioni di scissione ossidativa⁽²⁴⁾. Nonostante ciò il Ce(IV) presenta alcuni importanti svantaggi: esso, quando non è complessato forma un largo numero di idrossopolimeri difficilmente identificabili e, a pH superiori a 4, dà origine a precipitati contenenti ossidi e idrossidi anch'essi reattivi. La riproducibilità delle cinetiche effettuate con soluzioni di questo ione risultano sempre scarse e la reattività diminuisce con il passare del tempo. In alcuni lavori sono state ipotizzate come specie reattive idrossocomplessi come $Ce_2(OH)_4^{4+}$, $Ce_2(OH)_7^+$, $Ce_4(OH)_{15}^+$ e molti altri⁽²⁵⁾.

Il meccanismo proposto per spiegare la reattività di questi sistemi è simile a quello dei comuni complessi bimetallici. Gli ossigeni del fosfato vengono coordinati da due ioni metallici adiacenti e il nucleofilo è un ossidrile coordinato (*figura 41*).

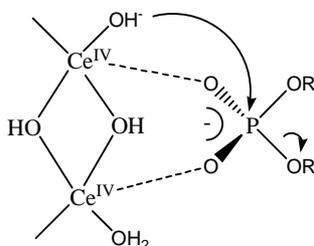


Figura 41

L'alta reattività del sistema è dovuta anche alla presenza del nucleofilo in un largo range di pH. Infatti essi presentano una notevole reattività nell'idrolisi del DNA, che si mantiene pressoché costante da pH 2 a pH 8.5.

Con l'intento di ottenere catalizzatori efficaci e allo stesso tempo riproducibili sono stati sintetizzati complessi di varia natura (*figura 42*). Sono stati utilizzati come leganti poliammidi, polialcoli, eteri e carbossilati ottenendo risultati inferiori alle aspettative. I leganti stabilizzano lo ione metallico rendendo il sistema riproducibile, ma allo stesso

tempo diminuiscono i siti disponibili sul metallo e ne diminuiscono parzialmente la carica positiva.

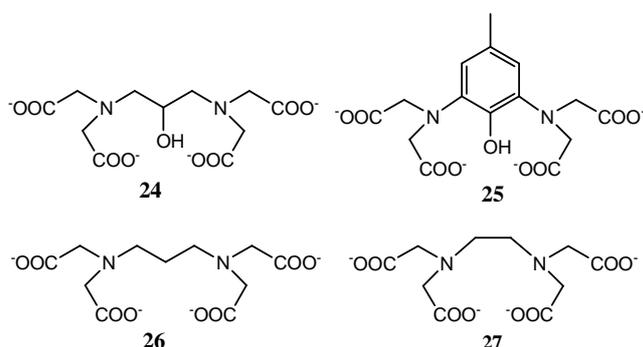


Figura 42

In alcuni casi si sono ottenuti buoni risultati, soprattutto nei confronti del DNA. Il complesso Ce(IV)·**27** è in grado di idrolizzare la forma di DNA a singolo filamento, mentre non è reattivo nei confronti di quello a doppia elica. Questa selettività è stata sfruttata per la realizzazione del cosiddetto sistema ARCUT, fino ad ora l'unico agente di restrizione artificiale noto.

Uno dei complessi di Ce(IV) più efficaci è il complesso bimetallico Ce₂·**25** che, alla concentrazione di 10 μM a pH 8 e a 37 °C accelera l'idrolisi del DNA plasmidico con una costante di primo ordine di $1.4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, che corrisponde ad un tempo di semivita di sole 1.4 ore. Anche in questo caso il sistema è selettivo e porta preferenzialmente alla forma lineare, con un meccanismo analogo a quello descritto per gli ossocluster⁽²⁵⁾.

1.4.6. Catalizzatori basati sulla cooperazione tra gruppi funzionali e ioni metallici

Un'altra strategia per la realizzazione di efficienti nucleasi artificiali, alternativa all'utilizzo di sistemi bimetallici, prevede la funzionalizzazione di complessi metallici con gruppi organici ausiliari in grado di partecipare al processo catalitico. Anche quest'approccio si ispira all'esempio degli enzimi, in cui spesso i gruppi funzionali presenti nelle catene laterali degli amminoacidi hanno un ruolo fondamentale nel meccanismo della reazione. Come si è potuto osservare nel paragrafo 1.3. l'elevata efficienza degli enzimi è dovuta alla cooperatività tra più gruppi funzionali, i quali agiscono sul substrato nel corso della reazione. I meccanismi di azione sono

essenzialmente di tre tipologie: a) gruppi donatori di legami ad idrogeno (in genere gruppi guanidinici o ammonio) stabilizzano le cariche negative sul substrato aumentando l'affinità per l'enzima e abbassando l'energia degli eventuali intermedi/stati di transizione; b) gruppi basici che deprotonano una molecola d'acqua sono in grado di formare il nucleofilo; c) gruppi nucleofili ausiliari in grado di dare transesterificazione. Gli approcci sintetici che si sono sviluppati sono stati essenzialmente dello stesso tipo di quelli usati dalla natura negli enzimi ed hanno portato alla realizzazione di sistemi molto reattivi.

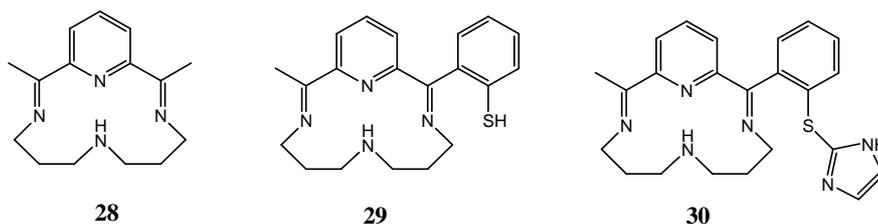


Figura 26

Il primo ad esplorare queste strategie è stato probabilmente il gruppo di Breslow, che nel 1990 ha studiato dei derivati del legante **28** (figura 26) funzionalizzati con un gruppo tiofenolo (**29**) o imidazolo (**30**). Il gruppo funzionale ausiliario è stato posizionato in modo tale da non poter interagire con lo ione metallico Zn(II), coordinato agli atomi di azoto del macrociclo⁽⁴⁴⁾. In acqua, a pH 7 a 37° C, i complessi di Zn(II) di **29** e **30** accelerano la transesterificazione dell'HPNP rispettivamente di 9 e 20 volte rispetto al complesso non funzionalizzato **28**. Gli studi effettuati dagli autori hanno permesso di appurare che, in questo caso, il ruolo dei gruppi organici ausiliari è quello di fornire una catalisi basica generale.

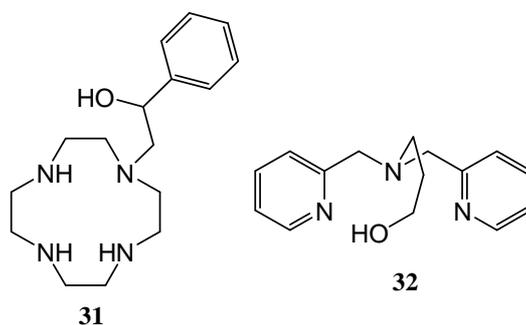


Figura 27

La possibilità di utilizzare gruppi funzionali inseriti nella struttura del complesso metallico, per ottenere nucleofili più efficaci, è stata esplorata sia dal gruppo di Kimura che dal gruppo di Chin che hanno studiato rispettivamente i complessi di Zn(II) del

legante **31**⁽⁴⁵⁾ ed i complessi di Cu(II) del legante **32**⁽²⁸⁾ (figura 27). In entrambi i casi, i complessi di questi leganti si sono dimostrati di 1-2 ordini di grandezza più efficaci dei rispettivi derivati privi del gruppo alcolico e questo effetto è attribuito alla maggiore nucleofilicità del gruppo alcolato coordinato allo ione metallico. Questi sistemi non sono però catalitici: infatti, il prodotto finale della reazione è il derivato fosforilato del complesso, formatosi in seguito all'attacco dell'alcolato sul substrato, il quale non subisce idrolisi per rigenerare la specie attiva.

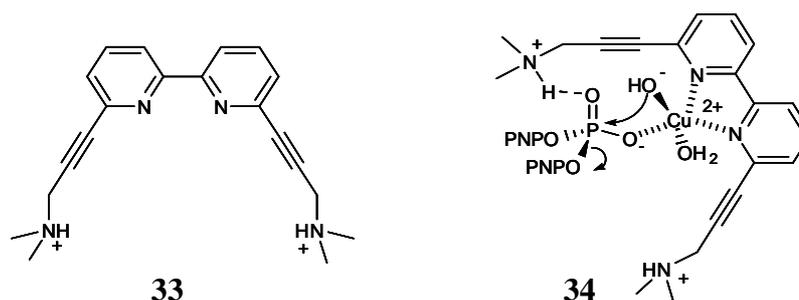


Figura 28

Kramer e collaboratori, invece, hanno studiato la reattività dei complessi di Zn(II) e Cu(II) del legante **33** nell'idrolisi di mono- e diesteri fosforici⁽²⁶⁾. Si è dimostrato che il ruolo dei gruppi ammonio, distanziati dal metallo mediante gruppi rigidi, è quello di donare un legame ad idrogeno verso gli ossigeni del fosfato non legati allo ione metallico. Il complesso di Cu(II) accelera l'idrolisi del BNP, in etanolo/acqua 19:1 a 20° C e pH 6.6, di 7 ordini di grandezza rispetto alla reazione non catalizzata e di 3 ordini di grandezza rispetto alla reazione catalizzata dal complesso di Cu(II) della 2,2'-bipiridina. Il meccanismo della reazione proposto dagli autori (figura 28) prevede la doppia attivazione del substrato da parte dello ione Cu(II) e di un gruppo ammonio, mentre uno ione idrossido coordinato allo ione metallico agisce da nucleofilo intramolecolare.

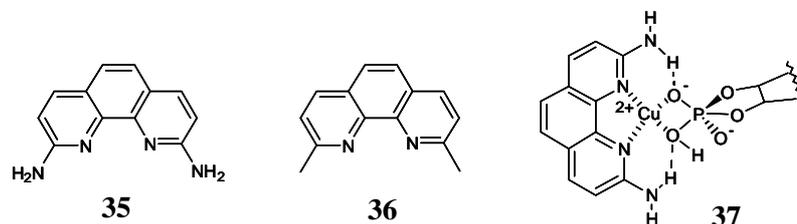


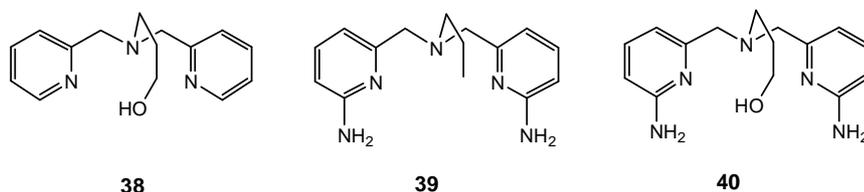
Figura 29

Un altro interessante esempio di cooperazione tra catalisi metallica e legami a idrogeno intracompleso è stato riportato dal gruppo di Chin, che ha studiato la reattività del complesso di Cu(II) del legante **35** (figura 29) verso il BNP ed il cAMP⁽²⁷⁾.

Introduzione

L'idrolisi del cAMP, in acqua a pH 5 e 25° C, è accelerata di 9 ordini di grandezza rispetto alla reazione non catalizzata e di 20000 volte rispetto al complesso del legante **36**, privo dei gruppi amminici. L'accelerazione ottenuta è simile a quella realizzata con i più reattivi complessi bimetallici, quali ad esempio quelli riportati nelle *figure 20-23*. L'efficacia del sistema è attribuita dagli autori ai legami a idrogeno intramolecolari che si vengono a formare nel complesso ternario legante-Cu(II)-substrato (**37**) i quali, da un lato, provocano una notevole diminuzione della pK_a della molecola d'acqua coordinata allo ione Cu(II), dall'altro, attivano il substrato verso l'attacco nucleofilo e infine predispongono il trasferimento del protone dal nucleofilo al gruppo uscente. Quest'ultimo effetto è evidenziato dal fatto che l'efficacia catalitica nei confronti del BNP, dotato di un miglior gruppo uscente, è molto minore (i complessi di **35** sono solo 20 volte più efficaci dei complessi di **36**).

Dei sistemi molto interessanti sono una serie di leganti piridinici investigati presso il gruppo in cui ho svolto il mio lavoro di dottorato (**39** ed **40**). Essi sono derivati del composto **38** (studiato in passato dal gruppo di Chin⁽²⁸⁾). Questo legante contiene un gruppo alcolico in grado di agire come nucleofilo e la sua struttura si presta bene all'introduzione di altri gruppi funzionali in grado di interagire in maniera analoga al sito attivo dell'enzima.



I risultati ottenuti da questi leganti⁽²⁹⁾ sono stati buoni ed in particolare l'aggiunta dei gruppi amminici (passaggio dal legante **38** al legante **40**) ha portato ad un aumento della reattività di 230 volte. Dai risultati ottenuti è emerso che il complesso **40**·Zn(II) accelera la scissione del BNP, rispetto alla reazione non catalizzata, di 10^6 volte a pH 7.

Complesso	k_2 ($M^{-1} s^{-1}$)	k_r
38 ·Zn(II)	$4.2 \cdot 10^{-4}$	1
39 ·Zn(II)	$5.6 \cdot 10^{-3}$	13
40 ·Zn(II)	$9.7 \cdot 10^{-2}$	230 (17) ^(a)

Tabella 1: Costanti cinetiche di secondo ordine (k_2) per l'idrolisi del BNP in presenza dei complessi **38-39-40**·Zn(II) e reattività relative al complesso **38**·Zn(II) (k_r); (a) relative al complesso **39**·Zn(II).

Tale notevole aumento di efficacia è stato attribuito all'introduzione dei gruppi amminici nella struttura del legante; essi partecipano alla reazione stabilizzando la carica negativa dell'ossigeno legato al fosfato mediante legami ad idrogeno (figura 30).

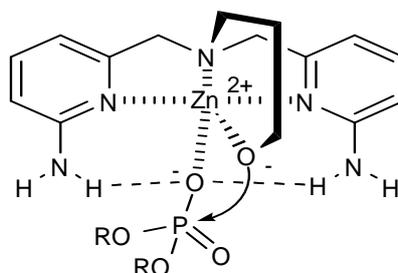


Figura 30: Meccanismo di attacco nucleofilo proposto per il complesso **40**·Zn(II).

In figura 31 è riportato l'andamento delle costanti cinetiche di secondo ordine apparenti (k_2'), ottenute per la reazione tra il BNP ed i complessi di **38-39-40**·Zn(II), in funzione del pH. Appare evidente come vi sia una forte influenza del pH sulla velocità della reazione. Per tutti e tre i complessi si ottengono dei profili a campana: la velocità cresce con l'aumentare del pH, raggiunge un massimo a valori di pH compresi tra 9 e 9.5 a seconda del legante, per poi tornare a diminuire quando il pH aumenta ulteriormente.

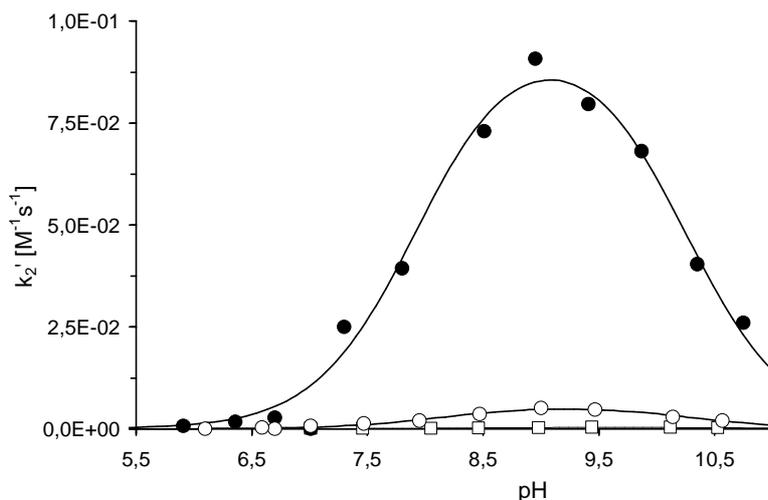


Figura 31: Grafico di k_2 in funzione del pH per la reazione di idrolisi di BNP promossa dai complessi **38**(□)-**39**(○)-**40**(●)·Zn(II).

Questo andamento è stato spiegato (mediante misure cinetiche e titolazioni potenziometriche) con l'intervento, nel corso della reazione, di due specie acide la cui deprotonazione ha un effetto positivo nel caso della prima e negativo nel caso della seconda.

Per tutti i leganti investigati si è dedotto che la prima specie deprotonabile è un'acqua coordinata al metallo, mentre la seconda specie è: il gruppo ossidrilico per i complessi **40**·Zn(II) e **38**·Zn(II) e la seconda acqua coordinata per **39**·Zn(II).

Il meccanismo proposto per il complesso **40**·Zn(II) è il seguente:

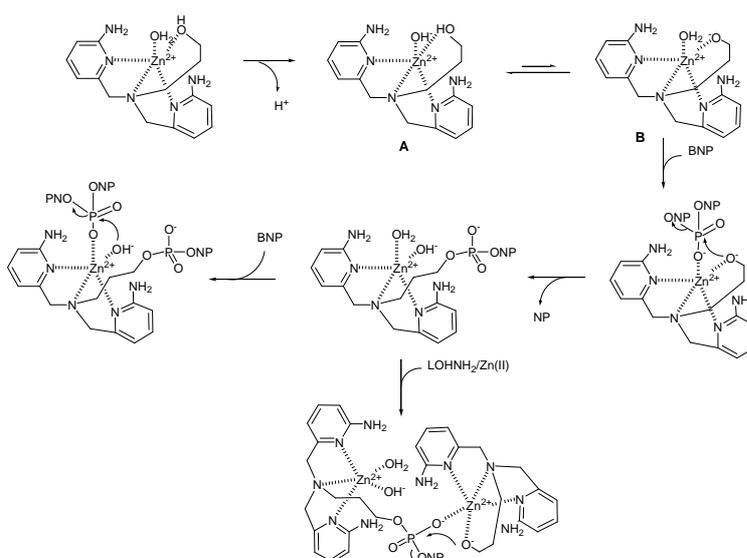


Figura 32: Meccanismo di idrolisi proposto per il complesso **40**·Zn(II).

Il primo stadio è la deprotonazione di una specie coordinata allo ione metallico: in base a calcoli *ab initio* si è stabilito che la forma più stabile è quella in cui la deprotonazione avviene sulla molecola d'acqua legata allo Zn(II), in cui lo ione idrossido è stabilizzato da legami ad idrogeno da parte dei due gruppi amminici. Tuttavia, se questa fosse la specie reattiva, la reazione porterebbe alla formazione di soli prodotti di idrolisi e non di transesterificazione, come evidenziano gli studi cinetici al ^{31}P -NMR. La forma reattiva è quindi quella meno stabile, in cui è presente l'alcolato come specie deprotonata.

E' possibile quindi ipotizzare che tra le due forme deprotonate **A** e **B** (*figura 32*) vi sia un equilibrio spostato verso **A** che consente la presenza di piccole quantità della specie reattiva **B**. Successivamente il substrato si coordina al metallo sostituendo la molecola d'acqua e subisce attacco nucleofilo da parte dell'alcolossido con formazione del complesso *O*-fosforilato. A questo punto è possibile quindi che il braccio idrossipropilico si distacchi dallo ione metallico.

Formato il complesso fosforilato esso può seguire due diversi cammini a seconda delle condizioni in cui si opera: se si è in presenza di un eccesso di substrato una seconda molecola di BNP si coordina al complesso fosforilato e avviene attacco nucleofilo da parte di una molecola d'acqua attivata dal metallo; se invece si lavora in difetto di substrato una nuova molecola di **40**·Zn(II) si lega al complesso del legante fosforilato formando una specie dimerica, in cui il fosfato subisce un ulteriore attacco nucleofilo con rilascio di una seconda unità di *p*-nitrofenossido. Operando invece in presenza di un equivalente di BNP non si osserva poi alcuna reazione.

Dall'osservazione del meccanismo proposto per il complesso **40**·Zn(II) ed in particolare dal fatto che la sua reattività massima è a pH 9 e che a quel pH solamente una piccola quantità di specie reattiva è presente in soluzione si è passati a studiare la reattività del complesso del legante **41** riportato in *figura 33*, in cui alla struttura di partenza **40** è stato aggiunto un gruppo CF_3 in alfa rispetto al gruppo alcolico. Ci si aspettava che la presenza del gruppo elettronattrattore producesse un aumento dell'acidità del gruppo ossidrilico e quindi lo spostamento dell'intervallo di massima reattività a pH più vicini ai valori fisiologici.

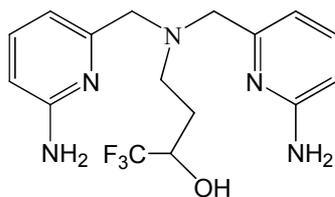


Figura 33: Struttura del legante **41**.

I risultati ottenuti hanno corrisposto solo in parte alle aspettative. Confrontando il profilo della curva k_2' vs pH del legante **40** con quello del legante **41** si osserva, come ci si attendeva, che il pH di massima attività si sia spostato (*figura 34*), da pH 9 a circa 8 e questo risultato indica che la specie nucleofila che agisce sul BNP si forma, ed è quindi disponibile, a valori di pH più bassi. Purtroppo però è diminuito anche il potere nucleofilo del gruppo alcossido del braccio coordinato al metallo e la costante di secondo ordine della reazione con il BNP è circa 80 volte inferiore a quella del composto **40**.

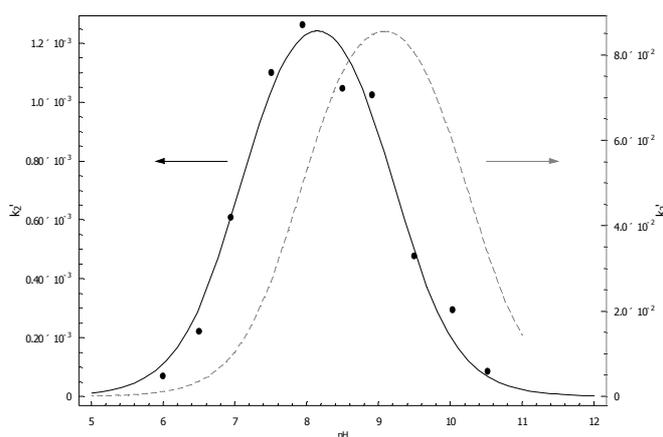


Figura 34: Grafico delle costanti di secondo ordine in funzione del pH per la reazione di idrolisi del BNP promossa dal complesso **41**·Zn(II) (linea continua) e dal complesso **40**·Zn(II) (linea tratteggiata).

L'effettiva efficacia dell'uso dei gruppi ausiliari organici può essere meglio colta esaminando il grafico di Brønsted riportato in *figura 35*, (dove per i leganti •, o e □ il nucleofilo attivo è lo ione idrossido coordinato al metallo, mentre per **38**, **41** e **40** la specie nucleofila è lo ione alcolato).

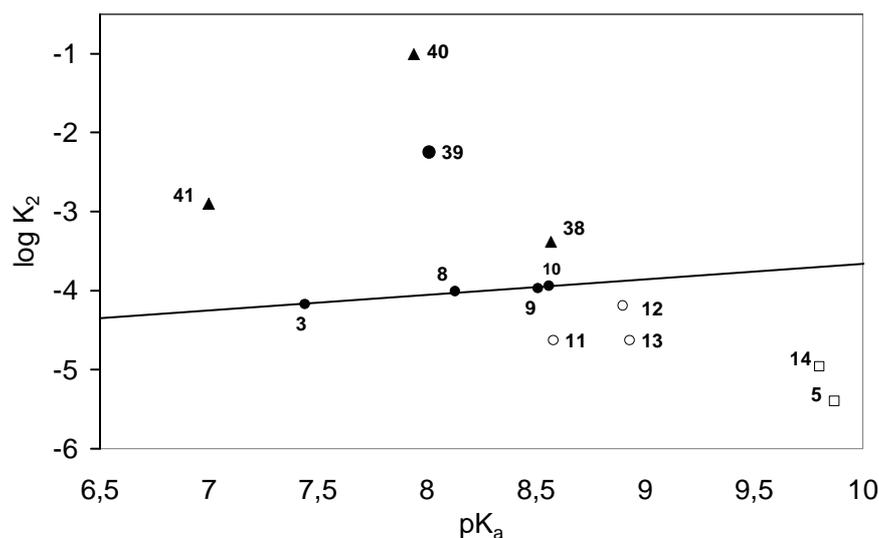


Figura 35: Diagramma di Brønsted per l'idrolisi di BNP in presenza dei complessi di Zn(II) di leganti amminici.

Risulta evidente come i complessi dotati dei gruppi donatori di legami a idrogeno si posizionino in una zona inesplorata del grafico, con reattività nettamente superiori rispetto a quelle dei leganti poliamminici studiati in precedenza.

1.4.6.1. Catalizzatori bimetallici basati sulla cooperazione tra gruppi funzionali e ioni metallici

Recentemente Mareque-Rivas e collaboratori hanno proposto un sistema che sfrutta entrambe le strategie precedentemente descritte (uso di sistemi bimetallici e di gruppi donatori di legami a idrogeno) per aumentare l'efficienza catalitica dei sistemi artificiali nei confronti dell'idrolisi di diesteri fosforici. Essi hanno inserito in un complesso bimetallico di zinco quattro gruppi amminici in grado di donare legami ad idrogeno verso il substrato (*figura 36*).

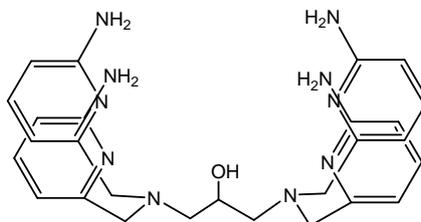


Figura 36

La struttura ai raggi X del complesso in presenza del *p*-nitrofenilfosfato (*figura 37*) indica che il substrato si dispone a ponte tra i due ioni metallici e i due ossigeni legati

Introduzione

agli ioni metallici si trovano alla giusta distanza dai gruppi amminici posti sulle piridine tale da poter interagire con quest'ultimi mediante quattro legami ad idrogeno. La doppia attivazione del substrato da parte dei due ioni metallici e la formazione del network di legami ad idrogeno intracomplesso favoriscono la coordinazione del substrato e lo rendono maggiormente attivato.

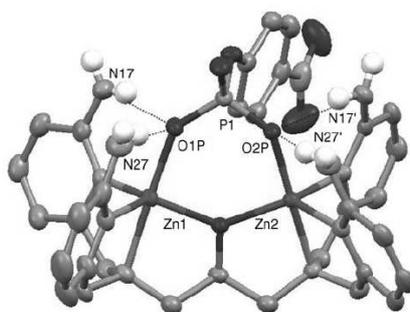


Figura 37

Questo complesso accelera la reazione di idrolisi dell'HPNP a pH 7.4 e 25°C di 10^6 volte, che corrisponde ad un tempo di semivita di circa un minuto⁽³⁰⁾. Esso è tutt'oggi il complesso maggiormente reattivo verso il substrato HPNP. Nei confronti del BNP, invece, questo complesso è completamente non reattivo, probabilmente a causa della saturazione dei siti di coordinazione nel complesso ternario lagante-metalli-substrato.

1.5. Sistemi multifunzionali autoassemblati

Un sistema autoassemblato non è altro che un insieme di semplici componenti molecolari legati assieme spontaneamente.⁽³¹⁾ Si ha quindi la formazione di un sistema supramolecolare complesso, creato a partire dai suoi componenti elementari. Una caratteristica importante dei processi di auto-assemblaggio è che essi possono generare oggetti con dimensione notevole, variabile da qualche nanometro fino a raggiungere la scala micrometrica. Nei sistemi autoassemblati possono essere presenti molti gruppi funzionali analoghi che possono agire simultaneamente nello svolgimento di una certa funzione. Essi si prestano quindi alla costruzione di catalizzatori idrolitici dove gruppi funzionali diversi, quali ioni metallici e gruppi organici, cooperino al raggiungimento dell'attività catalitica.

Questo approccio risulta essere particolarmente interessante perché è possibile ottenere piattaforme di complessità notevole con uno sforzo sintetico relativamente piccolo. Le nanoparticelle ricoperte da monostrati di molecole organiche sono tra le piattaforme più promettenti per lo sviluppo di sistemi autoassemblati.⁽³²⁾ Di recente, il gruppo del prof. Scrimin ha proposto un nuovo approccio che sfrutta le nanoparticelle d'oro come piattaforme per assemblare un grande numero di leganti monometallici:⁽³³⁾

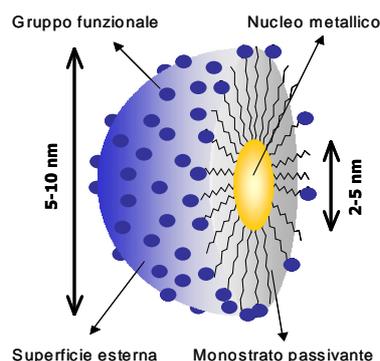


Figura 39: Rappresentazione semplificata della struttura di una nanoparticella d'oro passivata.

Nel 2004, Scrimin e collaboratori hanno sintetizzato nanoparticelle d'oro dal diametro di 2.5 nm funzionalizzate con tioli recanti un gruppo triazaciclononano e semplici catene alchiliche con rapporto 1.2 : 1 (figura 40).

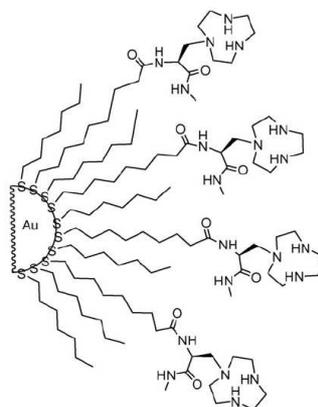


Figura 40

Ogni nanoparticella contiene circa 45 unità di legante e la reattività aumenta con il loading di zinco, fino alla formazione della nanoparticella completamente metallata. L'accelerazione dell'idrolisi dell'HPNP a pH 7.4 e 40°C ottenuta utilizzando queste nanoparticelle è ben 600 volte superiore a quella ottenuta utilizzando una singola specie monometallica⁽³³⁾. La notevole reattività di questo sistema è dovuta alla forte

Introduzione

cooperatività tra i centri metallici, che, come nel caso dei complessi bimetallici, provoca una maggiore attivazione del substrato.

2. Scopo

La ricerca di efficaci catalizzatori per l'idrolisi di esteri fosforici ha ormai portato a importanti sviluppi ed il meccanismo di azione di questi sistemi è stato chiarito nei suoi tratti fondamentali. Questi risultati hanno consentito una migliore, seppur non ancora completa, comprensione dei meccanismi di azione di nucleasi e fosfatasi, mentre la realizzazione di sistemi dotati di un'efficacia simile a quella degli enzimi rimane purtroppo ancora una meta lontana da raggiungere.

La disponibilità di sistemi dotati di un'elevata efficienza nel provocare l'idrolisi di esteri fosforici, ed in particolare del DNA, potrebbe trovare diverse interessanti applicazioni: dalla realizzazione di enzimi di restrizione artificiali per la manipolazione del DNA, allo sviluppo di farmaci antitumorali, antivirali e antibiotici.

Al giorno d'oggi gli agenti specifici usati in biologia molecolare nell'idrolisi di acidi nucleici sono quasi esclusivamente enzimi naturali estratti da colture batteriche. Esistono naturalmente anche vari metodi idrolitici chimici non selettivi che agiscono però in maniera drastica e che non sono utilizzabili su sistemi viventi (idrolisi basica o acida, mediante bromuro di cianogeno ecc.)⁽⁹⁾.

Lo ione metallico che appare più indicato per la realizzazione di nucleasi o fosfatasi artificiali sembrerebbe essere lo Zn(II). Esso infatti possiede una discreta acidità di Lewis e un'alta velocità di scambio dei leganti, due caratteristiche che lo rendono particolarmente adatto per la realizzazione di catalizzatori idrolitici. Inoltre, a differenza di altri ioni metallici dotati delle stesse caratteristiche, quali i lantanidi o il Cu(II), ha una bassa tossicità, possiede una chimica di complessazione ben definita e soprattutto ha delle caratteristiche redox tali da rendere impossibile la presenza di meccanismi di scissione ossidativa. Sfortunatamente, a tutte queste caratteristiche positive corrisponde una reattività inferiore rispetto agli ioni Cu(II) e lantanidi, che proprio per questo motivo hanno riscosso un maggiore successo nella realizzazione di sistemi idrolitici artificiali⁽⁹⁾.

Gli studi disponibili, illustrati nel capitolo precedente, mostrano comunque come sia possibile sfruttare la cooperazione di diverse funzioni reattive per ottenere sistemi dotati di maggiore efficacia. Utilizzando queste strategie, come accade nei sistemi naturali, dovrebbe essere possibile realizzare efficaci nucleasi artificiali basate su ioni Zn(II).

Scopo

Alcuni esempi di catalizzatori bimetallici basati su ioni Zn(II) sono già stati riportati e applicati in qualche caso anche all'idrolisi del DNA. Molto più scarsi sono gli esempi (quasi tutti riportati nel paragrafo 1.4.6.1.) di sistemi in cui venga sfruttata la cooperazione tra ioni metallici e gruppi ausiliari organici.

La prima parte del mio progetto di dottorato si inserisce in questo filone di ricerca e si propone di realizzare agenti idrolitici per esteri fosforici dotati di elevata reattività, sfruttando la cooperazione tra complessi di Zn(II) e diversi gruppi organici.

Gli esempi illustrati nel *paragrafo 1.4.6.* mostrano come i gruppi ausiliari inseriti nella struttura dei leganti ed in grado di agire come donatori di legami ad idrogeno, come nucleofili o come basi possano rendere molto più efficace l'azione del catalizzatore, in modo simile a quanto avviene nel sito attivo degli enzimi. Seguendo questa linea si è pensato di realizzare sistemi che si avvalgano contemporaneamente del contributo gruppi ausiliari organici e di diversi centri metallici, in modo che l'intervento contemporaneo degli ioni metallici e di più gruppi funzionali organici possa portare a notevoli incrementi della velocità di reazione.

2.1. Complessi monometallici con gruppi funzionali ausiliari organici

In prima istanza mi sono occupato di migliorare le prestazioni dei sistemi monometallici sfruttando la cooperazione tra interazioni di coordinazione e legami non covalenti. Il primo passo è stato quindi quello di progettare dei leganti per ioni metallici contenenti gruppi funzionali opportunamente posizionati in modo da poter interagire con il substrato o con il nucleofilo.

Partendo dai leganti basati su unità 2-amminopiridiniche, già in studio nel laboratorio dove ho svolto il mio lavoro di ricerca e mostrati nel precedente capitolo, ho ipotizzato diverse modifiche delle loro strutture chimiche che potessero migliorarne l'attività esterolitica. In particolare la mia attenzione è stata attratta dal sistema studiato da Kramer, illustrato nel *paragrafo 1.4.6.*, che mostra come un donatore di legame a idrogeno in grado di interagire con l'ossigeno fosforilino non coordinato allo ione metallico possa contribuire in modo estremamente significativo alla reattività del sistema. Il legante **33** di *figura 28* però presenta alcuni svantaggi: una bassa costante di formazione del complesso con lo ione Cu(II), l'attivazione del substrato mediante un

solo legame ad idrogeno e la possibilità di formazione di complessi legante:metallo non stechiometrici. A partire da queste osservazioni è stato progettato il legante **42** che può essere visto come un'evoluzione del legante **40** precedentemente studiato. Il gruppo amminico inserito nel braccio idrossipropilico dovrebbe essere in grado di interagire sia con l'ossigeno non coordinato del substrato che con il residuo alcolico del legante. In questo modo, si potrebbe verificare sia una attivazione del nucleofilo (diminuzione dell'acidità) che la stabilizzazione dello stato di transizione (stabilizzazione della carica negativa).

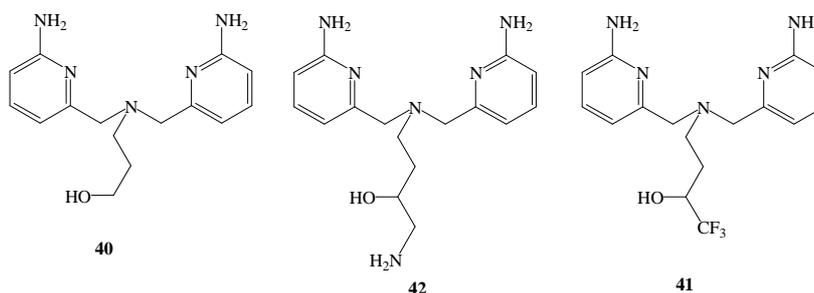


figura 44

E' interessante notare che la struttura del complesso è anche reminescente della struttura del sito attivo delle Endonucleasi di tipo II in cui, come abbiamo visto nel capitolo precedente, un residuo di Lys è localizzato proprio dietro al nucleofilo attivo (una molecola d'acqua coordinata allo ione metallico) ed è indispensabile all'attività catalitica. Lo studio del sistema **42**·Zn(II) potrà quindi fornire anche informazioni utili a interpretare il ruolo del residuo Lys nel sito attivo di questi enzimi (figura 45).

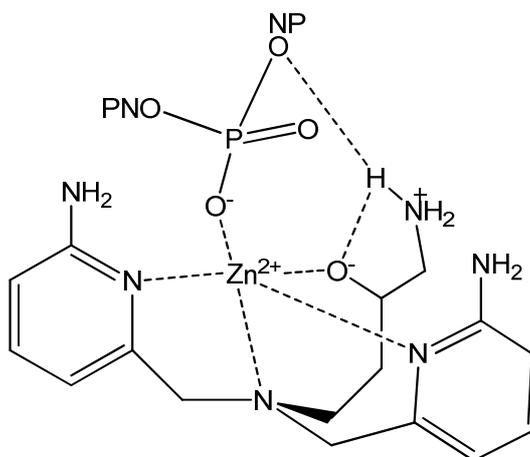


Figura 45

2.2. Complessi bimetallici

In una successiva evoluzione, mi sono dedicato allo studio di sistemi bimetallici, sempre basati sull'unità 2-amminopiridinica, con lo scopo di ottenere ulteriori miglioramenti del sistema idrolitico dal punto di vista della reattività. Come si è visto nell'introduzione, questa strategia si è rivelata molto efficace nello sviluppo di catalizzatori in grado di promuovere la scissione di substrati modello di RNA, mentre nel caso dei modelli di DNA i risultati finora ottenuti sono piuttosto deludenti. Uno dei problemi maggiori è la formazione di ponti μ -idrossido tra i due ioni metallici, bloccano i siti di binding disponibili sul metallo impedendo l'accesso del substrato o del nucleofilo. La formazione di questi ponti μ -idrossido potrebbe essere sfavorita dall'aumento della distanza tra i due metalli e mi è quindi sembrato interessante l'uso dei disolfuri come elementi di collegamento tra le due unità leganti. Questi infatti si formano spontaneamente, semplificando la preparazione del legante bimetallico, e mantengono i due ioni metallici, a cui si coordinano, ad una distanza maggiore rispetto ai ponti alcossido normalmente utilizzati.

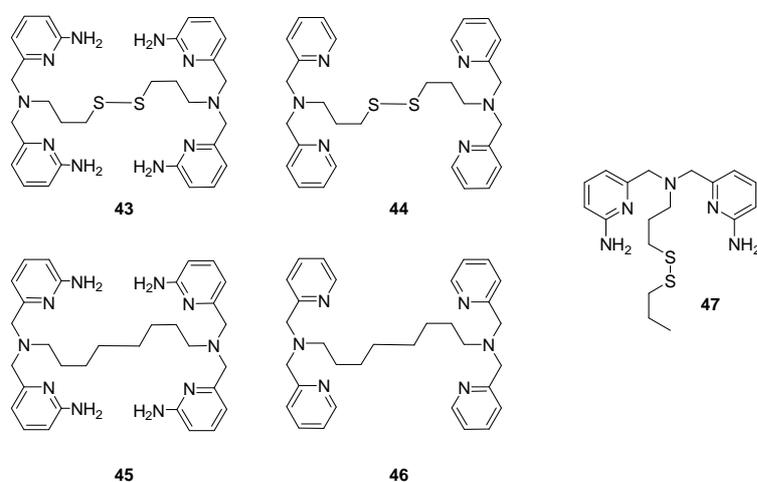


Figura 43

Come si può vedere in *figura 43*, due unità di bis(2-amminopiridinil-metil) ammina sono state collegate tramite un ponte disolfuro per formare il legante **43**. Come composti di riferimento, ho inoltre sintetizzato i composti **44-46** cui mancavano, di volta in volta, i gruppi amminici (**44**), il disolfuro (**45**) o entrambi (**46**); il composto **47** agisce invece come complesso monometallico di paragone. Il confronto tra le reattività dei complessi di Zn(II) di questi leganti ha dato informazioni sul ruolo dei gruppi

funzionali organici amminici e del gruppo disolfuro. Inoltre per la prima volta è stata riportata l'efficacia di complessi di questo tipo nella scissione del DNA plasmidico.

2.3. Nanoparticelle d'oro ricoperte con leganti organici

Sulla scorta dei risultati ottenuti dal gruppo del prof. Scrimin, discussi nel capitolo precedente, utilizzando catalizzatori basati su nanoparticelle d'oro ricoperte da monostrati di leganti organici, è apparso quasi spontaneo domandarsi se la sintesi di sistemi multivalenti contenenti i complessi di Zn(II) di derivati della bis(2-amminopiridinil-metil) ammina potesse portare a sistemi idrolitici dotati di reattività ancor più elevata.

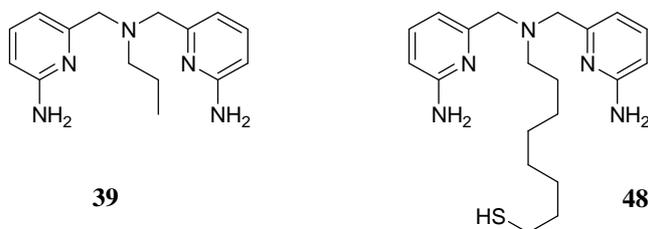


Figura 46: Struttura del leganti 39 e 48.

Il punto di partenza prescelto è stato il legante precedentemente descritto **39** (figura 46), già ampiamente studiato nel gruppo di ricerca in cui sto svolgendo il mio lavoro di dottorato⁽²⁹⁾. Questo legante contiene due gruppi amminici in grado di agire come donatori di legami ad idrogeno verso il substrato e forma complessi monometallici con lo ione Zn(II) e si è dimostrato un buon catalizzatore nell'idrolisi di diesteri fosforici. Il braccio propilico può essere agevolmente sostituito con una catena alchilica più lunga che contenga all'altra estremità un gruppo tiolico per consentire l'ancoraggio alla superficie d'oro.

Ho quindi preparato il nuovo legante **48** che è stato utilizzato per ricoprire nanoparticelle d'oro del diametro di circa 2 nm. La reattività di tali particelle, in presenza di ioni Zn(II), nei confronti dell'estere fosforico modello BNP e del DNA plasmidico è stata studiata ottenendo risultati di tutto rilievo ed in particolare il primo esempio di sistema idrolitico per il DNA basato su nanoparticelle.

Successivamente ho deciso di espandere questo approccio anche a ioni metallici maggiormente reattivi nell'idrolisi di diesteri fosforici rispetto allo Zn(II), quali gli ioni

Scopo

lantanidi o il Co(III). Ancora una volta, mediante l'utilizzo di nanoparticelle d'oro e di nuovi opportuni leganti funzionalizzati con il gruppo tiolico, ho realizzato nanosistemi decorati con diverse copie dello stesso complesso metallico. I leganti utilizzati sono rispettivamente di tipo carbossilico per lo ione Ce(IV) e poliamminico ciclico per il Co(III). Entrambi sono in grado di formare complessi 1:1 con i rispettivi ioni metallici (figura 47).

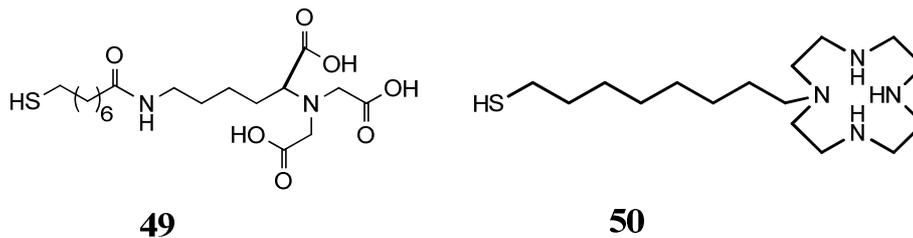


Figura 47

Questi ultimi sistemi di tipo multivalente sono stati testati verso i substrati BNP e DNA plasmidico superavvolto ed hanno fornito interessanti indicazioni sugli scopi e le limitazioni dell'approccio basato sulle nanoparticelle.

3. Risultati

3.1. Sintesi del legante 42

Inaspettatamente, la sintesi del composto **42** è stata piuttosto complicata e, prima di arrivare alla strada che descriverò, sono stati necessari diversi tentativi. Il percorso sintetico individuato (*figura 49*) ha inizio con la protezione dell'allilammina **VIII** con il gruppo Boc (t-butilossicarbonile). Il derivato **IX** così ottenuto viene convertito, mediante una reazione di ciclizzazione di Mitsunobu⁽³⁵⁾ condotta con N-benzilidrossilammina, paraformaldeide e trietilammina in toluene, nel derivato isossazolidinico **X**, protetto ai due gruppi amminici rispettivamente con Boc e Bz (benzile). Dal momento che questi gruppi protettori sono tra loro ortogonali, è stato possibile deproteggere selettivamente il gruppo benzile mediante idrogenolisi con idrogeno e Pd(OH)₂ su carbone. L'ammina **XI** ottenuta in questo modo non è altro che il braccio butilico del legante desiderato, protetto con il gruppo Boc all'ammina terminale.

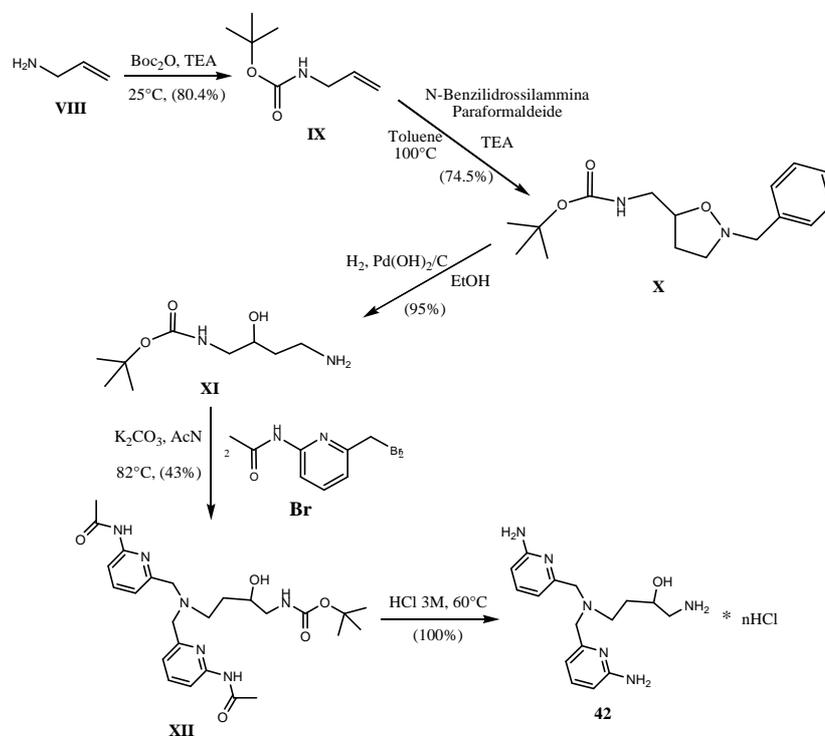


figura 49

A questo punto, seguendo una procedura già messa a punto nel caso dei leganti basati sull'unità 2-amminopiridinica illustrati nel capitolo precedente, il gruppo amminico presente nel derivato **XI** viene fatto reagire con due equivalenti del bromuro alchilico **Br** per ottenere con buone rese il legante protetto (**XII**) il quale, dopo la rimozione di tutti i gruppi protettori in condizioni acide, fornisce il legante **42** cloridrato.

3.2. Sintesi dei leganti bimetallici

La sintesi dei leganti bimetallici riportati in *figura 43* si è rivelata invece molto semplice. I leganti **43** e **44** ed il composto di riferimento **47** sono stati ottenuti mediante un'unica via di sintesi (*figura 48*). I leganti I e II già descritti in precedenza, vengono convertiti nei derivati tioacetilati **III** e **IV** mediante una sequenza di due reazioni: la tosilazione del gruppo ossidrilico e la successiva sostituzione del tosilato con potassio tioacetato. La deprotezione in ambiente basico di **III** e **IV** porta rispettivamente ai dimeri **43** e **44**, mentre il legante di confronto **47**, che richiede la formazione di un disolfuro misto, è stato preparato eseguendo la deprotezione basica di **III** in presenza di un eccesso di propiltiolo.

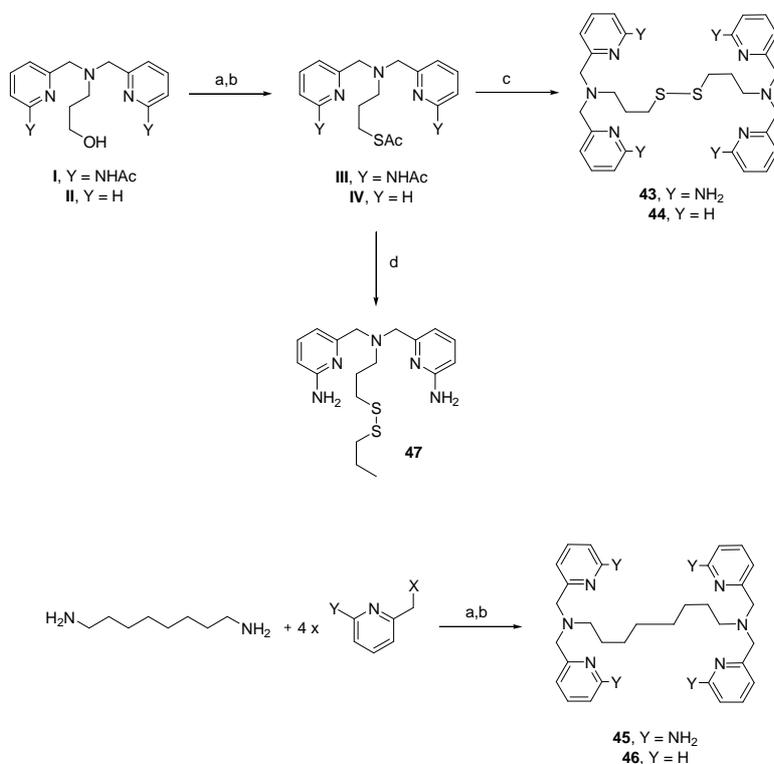


Figura 48: Sintesi sei leganti **43-46**: *a*: TsCl, CH₂Cl₂, NEt₃; *b*: Potassio tioacetato, acetone; *c*: NaOH 3M, H₂O:EtOH 1:1; *d*: Propiltiolo, NaOH 3M, H₂O:EtOH 1:1.

Le sintesi dei composti **45** e **46**, che contengono uno spacer formato da otto unità metileniche, è stata condotta alchilando il 1,8-diammoottano con 2-clorometil-piridina e 2-bromometil-6-acetammido piridina rispettivamente. Quattro equivalenti di questi composti reagiscono con uno di 1,8-diamminooottano per dare il legante protetto con i gruppi acetilici. Anche in questo caso è seguita, nel caso del legante **3**, la deprotonazione basica con NaOH 6M in H₂O/EtOH 1:1 (*figura 48*).

3.3. Sintesi delle nanoparticelle d'oro passivate

La preparazione delle nanoparticelle d'oro passivate con tioli funzionalizzati è stata eseguita secondo una procedura messa a punto negli ultimi anni all'interno del gruppo di ricerca nel quale ho condotto il mio lavoro sperimentale.. Essa è basata su una modificazione del protocollo originale di Brust e Schiffrin⁽³⁶⁾ che sfrutta una reazione di riduzione a trasferimento di fase di un sale d'oro(III) in presenza di tioli. Normalmente la reazione viene condotta in toluene utilizzando come riducente sodioboroidruro acquoso e come catalizzatore a trasferimento di fase (etraottilammonio bromuro (TOABr)). Gli aggregati d'oro così prodotti sono stabilizzati dai tioli adsorbiti sulla superficie. Le dimensioni delle particelle ottenute sono determinate essenzialmente dal rapporto molare tra il sale di oro e i tioli: maggiore è quantità di tioli presente, minore è il diametro medio delle particelle ottenute. Normalmente si utilizzano come passivanti alchiltioli che vengono poi scambiati successivamente con i tioli funzionalizzati che si desidera inserire nel monostrato passivante. Gli inconvenienti di questa procedura sono diversi: in particolare la reazione sostituzione dei tioli richiede l'uso di un grandissimo eccesso di tioli funzionalizzati, con conseguente grande spreco di composti a volte difficili da preparare e difficoltà di purificazione delle particelle. Inoltre la quantità di tioli scambiati non supera mai il 50-60%, limitando quindi la possibilità di controllare la composizione del monostrato passivante.

La principale differenza della procedura da me utilizzata consiste nell'utilizzo di un agente stabilizzante, la diottilammina, con minori capacità coordinanti rispetto ai tioli e quindi in grado di stabilizzare le particelle ma di essere completamente sostituito con dei tioli successivamente aggiunti. Con questa procedura è possibile garantire un ottimo controllo delle dimensioni finali delle particelle, che viene a dipendere essenzialmente

dalla quantità di diottilammina aggiunta. La soluzione di nanoparticelle risulta essere discretamente stabile e la ricopertura con i tioli funzionalizzati può avvenire entro 24 ore dalla sintesi. Questa procedura comporta diversi vantaggi: in particolare, la quantità di tioli necessari allo scambio è molto minore che con la procedura di Burst e Schriffin, inoltre è possibile utilizzare miscele di tioli diversi ottenendo un discreto controllo sulla composizione dello strato passivante.

3.3.1. Sintesi dei tioli

3.3.1.1. Sintesi del tiolo **48**

La preparazione di nanoparticelle contenenti nel monostrato passivante l'unità bis((6-amminopiridin-2-il)metil)ammina richiede la disponibilità di un derivato contenente un gruppo tiolico. I composti di questo tipo già sintetizzati, come ad esempio il derivato **III** descritto nel paragrafo 3.1., non sono adatti allo scopo poiché il braccio alchilico è troppo corto per garantire la stabilità del monostrato passivante. Ho quindi deciso di preparare il derivato **48** contenente un braccio spaziatore di otto atomi di carbonio. Come descritto nei paragrafi precedenti, i derivati della bis((6-amminopiridin-2-il)metil)ammina vengono usualmente sintetizzati a partire dal precursore N-(6-bromometil-2-piridinil)-acetammide **Br** e da una opportuna ammina primaria⁽²⁹⁾, che nel caso del legante **48** questa dovrebbe essere il composto non commerciale 1-amminoottiltiolo. Inoltre, esperienze precedenti suggeriscono di posizionare l'introduzione del gruppo tiolico nella parte finale dello schema di sintesi, poiché l'alchilazione del gruppo amminico con Br in presenza di derivati tiolici, anche in forma protetta, si rivela solitamente difficoltosa.

Ho deciso quindi di progettare una sintesi che partisse dal bromoalcol commerciale **XIX** (*figura 50*). Questo, in seguito a reazione con sodio azide e riduzione mediante trifenilfosfina porta con buona resa all'amminoalcol **XXI**. Facendo reagire **XXI** con due equivalenti di N-(6-bromometil-2-piridinil)-acetammide **Br** si ottiene il composto **XXII**, simile a **48**, ma recante il gruppo alcolico terminale al posto di quello tiolico. Per questa trasformazione sono necessari tre passaggi: la conversione dell'alcol in cloruro, la sostituzione nucleofila del cloro con potassio tioacetato ed infine la deprotezione

dell'acetile con formazione del tiolo libero. Quest'ultimo passaggio è stato effettuato in ambiente acido per far avvenire simultaneamente anche la deprotezione dei gruppi amminici posti sulle piridine e per minimizzare la formazione di disolfuri.

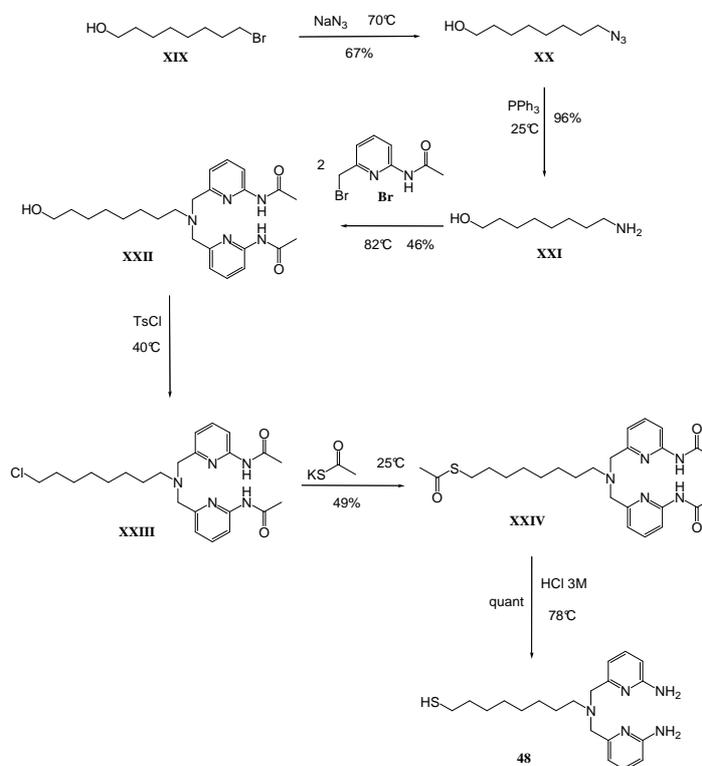


Figura 50

3.3.1.2. Sintesi del tiolo **49**

Se il legante **48** era adatto a complessare ioni Zn(II) e a produrre un effetto cooperativo con i gruppi donatori di legami a idrogeno, per la complessazione di ioni metallici di natura diversa era ovviamente necessario progettare leganti di tipo differente. Come ho spigato nel capitolo precedente, uno dei metalli più efficaci nel provocare la scissione degli esteri fosforici è il Ce(IV) . Questo ione viene complessato efficacemente da legati contenenti gruppi carbossilici, come l'EDTA. Partendo da queste considerazioni ho progettato il legante **49**, che è stato sintetizzato mediante lo schema di reazione mostrato in *figura 51*. La bis(carbossimetil)-L-Lisina **XXVI** disponibile in commercio, è stata fatta reagire con un equivalente dell'estere attivato

XXV⁽³⁷⁾, per ottenere il legante **XXVII**. Questo, mediante idrolisi acida con HCl 6M ha portato all'ottenimento del tiolo desiderato **49**.

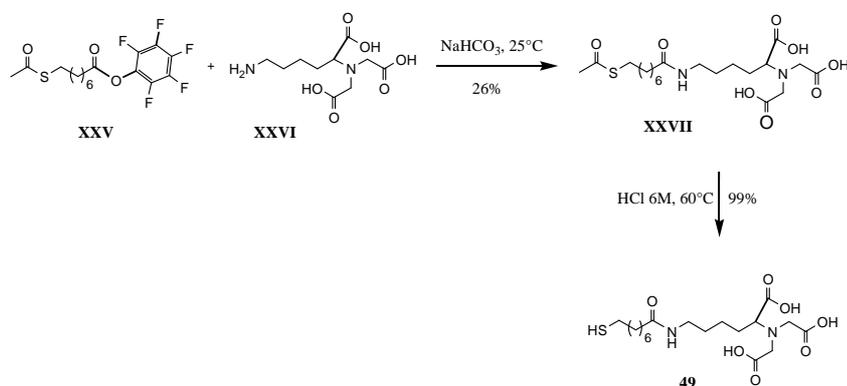


Figura 51

3.3.1.3. Sintesi del tiolo **50**

Un altro ione metallico estremamente attivo nel provocare la scissione di diesteri fosforici è il Co(III). Con questo metallo vi sono però alcuni problemi legati alla sua inerzia cinetica nello scambio dei leganti, che lo rendono in molti casi inadatto ad agire da catalizzatore. E' noto però che i complessi del Co(III) con il tetraazaciclododecano (Cyclen) possiedono una velocità di anazione (scambio dei leganti) sufficientemente elevata e sono stati quindi impiegati con successo nella scissione idrolitica di diesteri fosforici e anche del DNA. Ho quindi deciso di progettare il tiolo **50**, che contiene come unità legante proprio il macrociclo cyclen. La sintesi è rivelata abbastanza semplice ed è riportata in *figura 52*. L' 1,8-dibromooottano è stato fatto reagire con un equivalente di potassio-tioacetato, ottenendo facilmente l'alogeno alchilico **XXVIII**. Mediante la reazione con un largo eccesso del tetraazamacrociclo cyclen si è ottenuto il composto **XXX** che, mediante deprotezione basica, ha portato al tiolo desiderato.

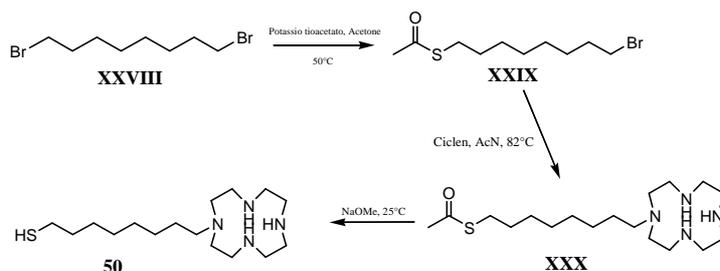
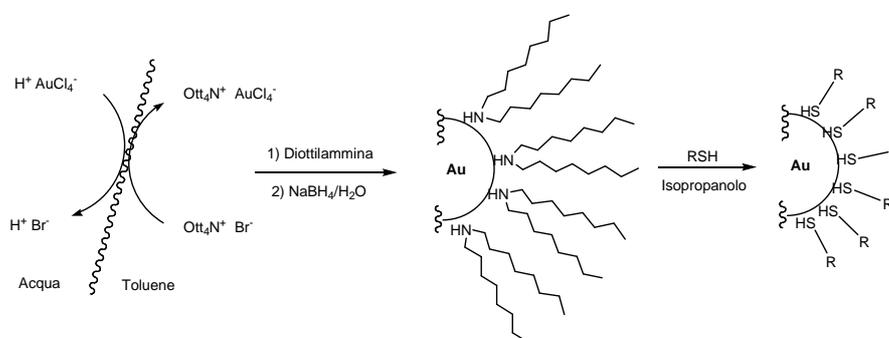


Figura 52

3.3.2. Sintesi delle nanoparticelle

La sintesi delle nanoparticelle di oro passivate viene effettuata a partire da una soluzione acquosa di acido tetracloroaurico che viene estratto con una soluzione di TOABr in toluene. Alla fase organica rossa-arancio per la presenza dello ione AuCl_4^- viene aggiunta sotto vigorosa agitazione la diottilammina in quantità necessaria (nel nostro caso è stata aggiunta in rapporto 50 a 1 rispetto alle moli di Au(III) in modo da ottenere particelle di circa 2 nm di diametro)⁽³⁶⁾. L'ammina in questa fase agisce anche da riducente secondari provocando la decolorazione della soluzione per riduzione dell' Au(III) a Au(I). Viene quindi aggiunta una soluzione acquosa di NaBH_4 che porta nel giro di pochi secondi ad una soluzione nera di colloidi d'oro.



Schema 3: Rappresentazione schematica della procedura di sintesi delle nanoparticelle d'oro passivate.

La copertura dei colloidi con i tioli viene effettuata entro un giorno dalla loro sintesi, affinché non vengano ad alterarsi dimensioni medie e di conseguenza la dispersione. Essa consiste semplicemente nell'aggiunta sotto agitazione di una soluzione dei tioli desiderati sciolti in isopropanolo o DMF. Successivamente le particelle vengono estratte con acqua, purificate mediante estrazioni con solventi organici, precipitate e raccolte per centrifugazione.

3.4. Caratterizzazione e reattività esterolitica del complesso $42 \cdot \text{Zn(II)}$

I primi esperimenti effettuati sono stati dedicati allo studio del comportamento acido-base del legante **42** e della sua affinità per lo ione Zn(II) , che sono stati determinati per mezzo di titolazioni potenziometriche. In *figura 60* sono riportate le curve di titolazione ottenuta per il legante **42** in presenza (\square) ed in assenza (\bullet) di un equivalente di $\text{Zn(NO}_3)_2$. Le misure sono state effettuate titolando con NaOH

Risultati

0.1 M una soluzione contenente legante (circa 0.5 mM), cinque equivalenti di un acido forte (HCl) ed eventualmente $Zn(NO_3)_2$. I valori delle costanti di acidità e di complessazione ottenute sono riportate in *tabella 3*. In quest'ultima sono riportati anche i dati ottenuti in precedenza per il legante **40**⁽²⁹⁾ e i dati relativi a **41**, ottenuti da misure effettuate durante la mia tesi di laurea.

Legante	pK_a^1	pK_a^2	pK_a^3	pK_a^4	$\log K_f$	pK_w^1	pK_w^2	pK_N
40	-	7.72	5.33	1.95	6.68	7.94	9.96	-
42	9.09	7.13	5.36	<2	-6.08	7.64	8.07	9.44
41	10.72*	7.23	5.49	<2	6.00	7.86	8.16	-

Tabella 3: Valori di pK_a dei gruppi ammonio (pK_a^2), piridinio ($pK_a^{3,4}$) e dei gruppi alcolico e ammonio del braccio (pK_a^1) dei leganti **40**, **42**, **41**, costanti di formazione dei complessi $L \cdot Zn(II)$ (K_f), pK_a delle molecole d'acqua e/o ossidrilie coordinati (pK_w^1 , pK_w^2) e pK_a del gruppo ammonio del legante complesso $42 \cdot Zn(II)$ (pK_N), a 25°C, $[NaCl] = 0.1 M$, per **41** $[NaClO_4] = 0.1M$, * = per **41** pK_a^1 è riferito al gruppo alcolico, mentre per **42** appartiene al gruppo ammonio.

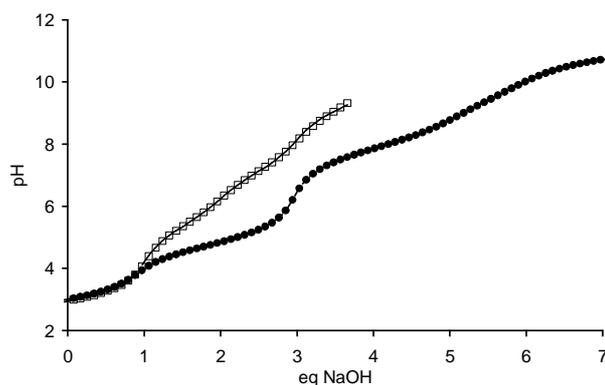


Figura 60: Titolazione potenziometrica di **42** (●) e **42**· $Zn(II)$ (□) a 25°C in presenza di NaCl 0.1M. Titolante NaOH 0.1M, $[42] = 0.5mM$.

L'interpolazione dei dati relativi alla titolazione del legante ha richiesto un modello che preveda la presenza di quattro gruppi deprotonabili, essa è in buon accordo con i punti sperimentali e fornisce i valori di pK_a del gruppo ammonio terziario (pK_a^2), dei due gruppi piridinio (pK_a^3 e pK_a^4) e del gruppo ammonio sul braccio butilico (pK_a^1). Nel caso del complesso di $Zn(II)$, di cui la titolazione conferma la stechiometria 1:1 prevista, si rilevano tre eventi di deprotonazione. Sulla base dei risultati ottenuti in precedenza per sistemi di questo tipo, i primi due sono attribuibili a specie coordinate allo ione metallico: il gruppo alcolico e una molecola d'acqua. La terza deprotonazione

(pK_a 9.44) è probabilmente attribuibile al gruppo ammonio del braccio butilico. Dalla tabella sopra riportata si può notare che i valori di pK_a dei leganti **41**, **40** e **42** sono analoghi, con l'ovvia differenza che in **41** si individua la deprotonazione del gruppo alcolico e in **42** quella del gruppo amminico primario, mentre si ha un notevole variazione dei valori riguardanti i complessi. In particolare il valore della pK_w² (gruppo ossidrilico coordinato al metallo) passa da 9.96 di **40·Zn(II)** a 8.07 di **42·Zn(II)** e 8.14 per **41·Zn(II)**. La presenza del gruppo ammonio, che può esercitare un effetto di stabilizzazione elettrostatica ma anche stabilire un legame a idrogeno con il gruppo ossidrilico, e del gruppo CF₃, forte elettroneattrattore, hanno quindi un effetto simile sull'acidità del gruppo ossidrilico legato allo ione Zn(II), aumentandola di quasi due unità logaritmiche.

Successivamente, sono passato poi allo studio della reattività dei complessi nei confronti di diversi esteri fosforici e carbossilici. Tutti i leganti sintetizzati sono attivi verso i substrati BNP, HPNP e PNPA. Gli esperimenti volti ad investigare l'attività esterolitica dei complessi sono stati svolti essenzialmente tramite misure di assorbimento UV-Vis, seguendo l'aumento di assorbanza a 317 nm (pH < 7) o a 400 nm (pH > 7) dovuta alla formazione rispettivamente di *p*-nitrofenolo o *p*-nitrofenossido. È importante sottolineare però che questo metodo non consente di stabilire se il rilascio del residuo *p*-nitrofenilico sia dovuta ad una reazione di idrolisi o di transesterificazione del substrato, per cui l'identità dei prodotti sarà successivamente verificata per mezzo di altre tecniche sperimentali.

Dai risultati ottenuti negli esperimenti preliminari si è potuto verificare che, negli intervalli di concentrazione esplorati, l'idrolisi dei diversi substrati ha dipendenza lineare dalla concentrazione sia di complesso che di substrato. La legge cinetica risulta quindi essere complessivamente di secondo ordine. Gli esperimenti effettuati hanno anche rivelato che, nel caso del legante **42** e del substrato BNP vengono rilasciati due equivalenti di *p*-nitrofenato. Questo comportamento è diverso da quello riscontrato nel caso dei complessi di **40** e **41**, in cui si osserva il rilascio di un solo equivalente di *p*-nitrofenato.

Negli esperimenti successivi è stato studiato l'andamento della reattività del complesso di Zn(II) al variare del pH. Le cinetiche di idrolisi sono effettuate in presenza di un eccesso di complesso (condizioni di pseudo-primo ordine) alla concentrazione di

Risultati

complesso di $5 \cdot 10^{-4}$ M e alle concentrazioni di substrato comprese tra 0.1 e $2 \cdot 10^{-4}$ M. Nella *figura 61* è riportato l'andamento della reattività nei confronti del substrato BNP (k_2') in funzione del pH per i tre complessi in esame.

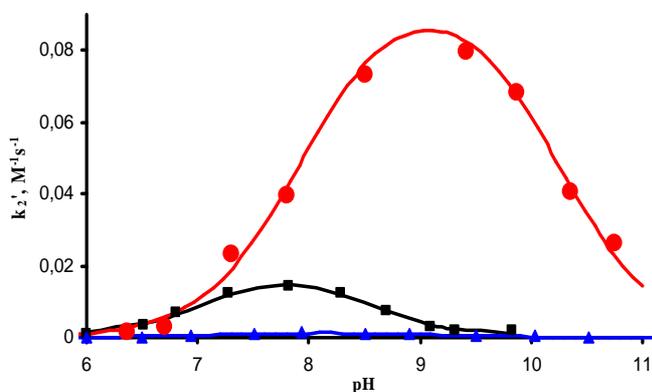


Figura 61: k_2' in funzione del pH per la reazione di idrolisi del BNP promossa dai complessi di Zn(II) dei leganti **42** (■), **41** (▲) e **40** (●); 25°C , $[tamp] = 0.05\text{M}$.

I profili di reattività contro il pH variano notevolmente al modificarsi della struttura del legante. Per tutti i complessi e per entrambi i substrati, la velocità cresce con l'aumentare del pH, raggiunge un massimo a valori compresi tra 7.5 e 9 a seconda del legante, per poi tornare a diminuire quando il pH aumenta ulteriormente. Questo andamento è indicativo dell'intervento, nel corso della reazione, di due specie acide la cui deprotonazione ha un effetto positivo, nel caso della prima, e negativo nel caso della seconda. Le interpolazioni dei dati con questo modello mostrano un buon accordo con i dati sperimentali e forniscono i valori di pK_a per le funzioni acide (pK_{kin}^1 e pK_{kin}^2) ed i valori delle costanti di secondo ordine (k_2) per la reazione tra la specie reattiva monodeprotonata ed il substrato. I valori di pK ottenuti in questo metodo sono in accordo con quelli derivanti dalla titolazione potenziometrica precedentemente descritta. Nei confronti del BNP il composto maggiormente reattivo è il complesso **40** ed è circa 5 volte più reattivo di **42**. Quest'ultimo presenta il massimo di reattività a pH 8 e, a pH neutro, la reattività di questi due complessi è pressoché analoga. L'introduzione del gruppo ammonio porta quindi allo spostamento del massimo di reattività verso valori di pH più vicini all'intervallo fisiologico, ma la diminuzione della reattività che si verifica contemporaneamente vanifica questo vantaggio.

Il vero complesso di confronto a **42** è però quello del legante **41**, avente un valore di pK_a del gruppo nucleofilo analogo. Per questi due leganti il massimo di reattività del profilo a campana viene a trovarsi allo stesso valore di pH, avvalorando i valori ottenuti mediante le titolazioni potenziometriche. In *figura 62* si può osservare che il complesso **41**, non recante il gruppo ammonico, possiede una reattività circa dieci volte inferiore.

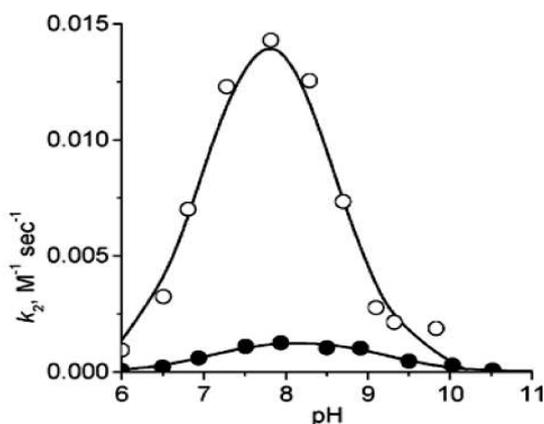


Figura 62: k_2' in funzione del pH per la reazione di idrolisi del BNP promossa dai complessi di Zn(II) del legante **42** e del legante di confronto **41**; 25°C, [tamp] = 0.05M.

Per ottenere maggiori informazioni sul ruolo del gruppo amminico in **42** abbiamo studiato la reattività con altri substrati, il PNPA e l'HPNP. I valori delle costanti di acidità ottenute tramite misure cinetiche e le reattività verso i tre substrati sono riassunte in *tabella 4*.

Nel meccanismo di idrolisi dell'HPNP la specie nucleofila coinvolta non è l'alcolato coordinato allo ione metallico ma il gruppo alcolico del substrato stesso. Come conseguenza, la reattività verso questo fosfato non dipende dalla specie nucleofila presente nel complesso, bensì dall'attivazione del substrato da parte del complesso metallico. In *figura 63* sono mostrati i profili di reattività dei tre complessi in esame verso il substrato HPNP. Come ci si può attendere i profili sono notevolmente differenti da quelli osservati con il BNP ed in particolare i profili di **41** e **40** sono risultati essere simili, anche se la reattività massima è spostata a valori più bassi di pH per il composto **41**, mentre il complesso di **42** si è rivelato questa volta il più reattivo.

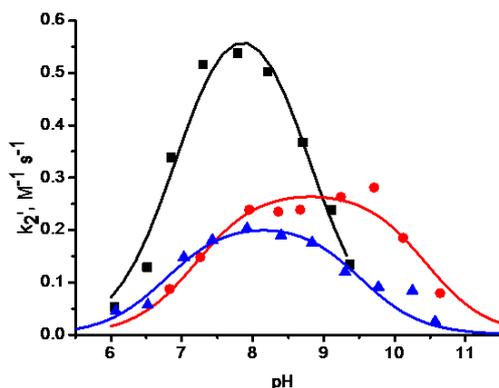
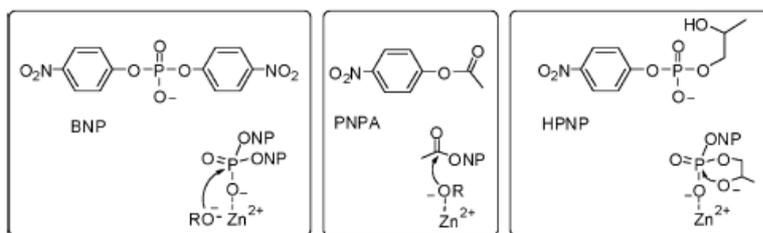


Figura 63: k_2' in funzione del pH per la reazione di idrolisi dell'HPNP promossa dai complessi di Zn(II) del leganti **42**(■), **40** (●) e **41**(▲); 25°C, [tamp] 0.05M.

Il PNPA viene idrolizzato invece mediante un meccanismo puramente nucleofilo e non vi è coordinazione del substrato allo ione metallico. La reattività nei confronti di questo substrato fornisce indicazioni sulla nucleofilicità del gruppo alcolico presente in tutti i complessi. In questo caso, il legante maggiormente reattivo è risultato essere **40**, avente il miglior gruppo nucleofilo, mentre i due complessi **41**·Zn(II) e **42**·Zn(II) presentano una reattività analoga e circa tre volte inferiore.



Meccanismi di idrolisi dei substrati utilizzati

Complesso	pK_a^1	pK_a^2	$k_{\text{BNP}} [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$	$k_{\text{PNPA}} [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$	$K_{\text{HPNP}} [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$
40 ·Zn(II)	7.9	10.2	0.097	1.20	0.26
42 ·Zn(II)	7.3	8.4	0.022	0.26	0.70
41 ·Zn(II)	7.7	8.6	0.0015	0.34	0.22

Tabella 4: Valori di pK_a dalle cinetiche (pK_a^n) e costanti cinetiche di secondo ordine (k_{SUB}) per il complesso di zinco della specie deprotonata; 25°C, [tamp] = 0.05M.

Per escludere che le differenze di reattività tra i tre complessi non siano dovute ad una diversa affinità catalizzatore-substrato sono stati condotti degli studi di inibizione dell'idrolisi del substrato BNP con dimetilfosfato (un diestere fosforico inerte verso l'idrolisi), ottenendo i valori delle costanti di binding del dimetilfosfato ai complessi. I valori ottenuti sono 72 , 75 e 78 M^{-1} rispettivamente per i complessi dei leganti **40**, **42** e **41**: essi sono praticamente analoghi tra loro e indicativi di una relativamente scarsa affinità del substrato per i complessi.

Infine, ho effettuato alcuni esperimenti volti ad individuare i prodotti delle reazioni di idrolisi verso i substrati BNP e HPNP, per ottenere maggiori conferme sui i meccanismi di reazione proposti..

Poiché i substrati sono le uniche molecole presenti nella miscela di reazione a contenere un atomo di fosforo, in prima istanza ho effettuato spettri ^{31}P -NMR sui prodotti delle reazioni. Per l'idrolisi dell'HPNP ho verificato che, per tutti i complessi in esame, il prodotto della reazione è il propilenfosfato (PO). In *figura 65* è riportato lo spettro ottenuto da una soluzione contenente il complesso di Zn(II) del legante **42** ad una concentrazione pari a $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ed un equivalente di HPNP a pH 8.0.

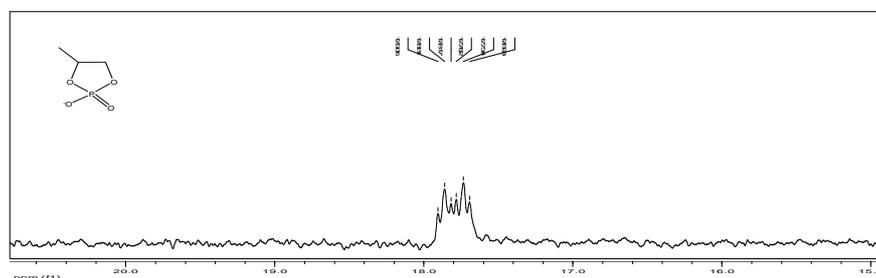


Figura 65: Spettro ^{31}P -NMR accoppiato di una soluzione di HPNP in presenza di $42 \cdot \text{Zn(II)}$ $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{HPNP}] 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; pH 8.0 (EPPS 0.05 M), 25° C ; $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ 10%, 1gg.

Dallo spettro sopra riportato si può vedere che, dopo un giorno di reazione a pH 8, è presente solamente il segnale del prodotto di idrolisi intramolecolare dell'HPNP, composto da un doppietto di tripletti dovuto all'accoppiamento del fosforo con i protoni dell'unità propilenica legata agli ossigeni (lo spettro di un campione autentico di propilenfosfato ciclico è identico a quello riportato per il prodotto della reazione).

Nel caso del legante **42** ho eseguito lo stesso esperimento con il substrato BNP per verificare se il meccanismo fosse di idrolisi o, come nel caso di **40**⁽²⁹⁾, di transesterificazione. Gli spettri ottenuti sono riportati in *figura 66*. Seguendo la reazione

Risultati

condotta in presenza del complesso di Zn(II) di questo legante e di un equivalente di substrato si osserva inizialmente la presenza del solo segnale a -11.37 ppm dovuto al BNP. Successivamente si osserva la comparsa di un segnale a 2.82 ppm che aumenta progressivamente di intensità nel tempo mentre quello relativo al BNP diminuisce. Il nuovo segnale osservato si presenta sotto forma di un doppietto e ciò sta ad indicare che si tratta di un prodotto di transesterificazione in quanto sul carbonio del legante che reca il gruppo ossidrilico è presente un solo protone.

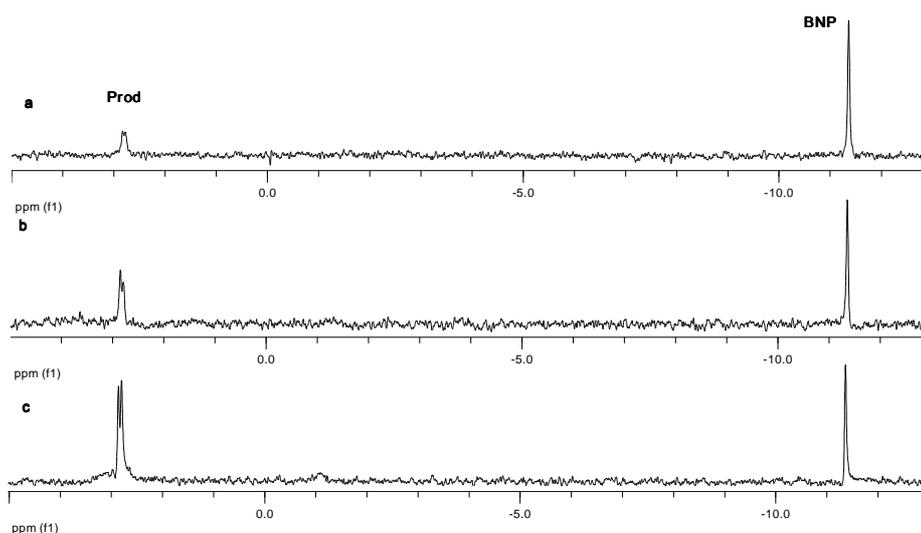


Figura 66: Spettri ^{31}P -NMR accoppiati di una soluzione di BNP in presenza di $42\cdot\text{Zn(II)}$ 0.5 mM, [BNP], 0.5 mM; pH 8.0 (EPPS 0.05 M), 25°C; $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ 10%. a: 8 h; b: 2 gg.; c: 4 gg.

Il chemical shift del picco in esame (2.82 ppm) è attribuibile ad una specie monoesterea avente un sostituito alchilico. Questo risultato è in accordo con gli esperimenti sintetici che rivelavano il rilascio di entrambi i gruppi *p*-nitrofenato del substrato. Per confermare questa ipotesi ho deciso di effettuare ulteriori indagini per accertare la natura dei prodotti. Per far ciò ho eseguito sui prodotti della reazione NMR protonici, analisi ESI-MS e cinetiche UV-Vis in eccesso di substrato.

Esaminando lo spettro ^1H NMR (figura 67) si ha la conferma del prodotto ipotizzato nella descrizione dello spettro NMR al ^{31}P ; infatti non si osservano segnali attribuibili ad un prodotto di transesterificazione.

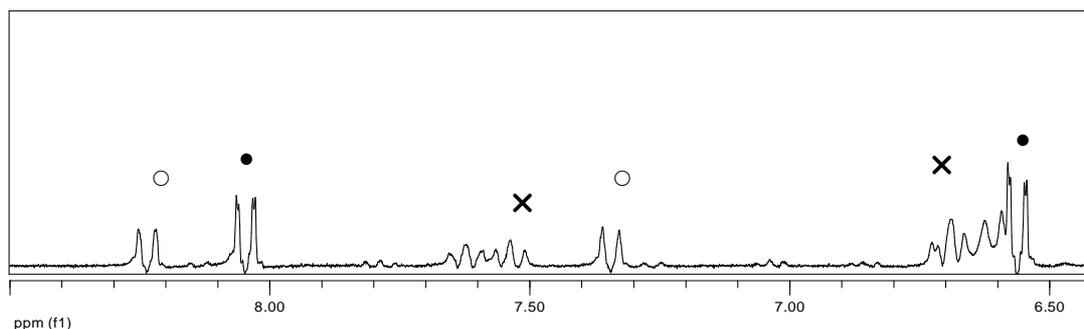


Figura 67: Spettro $^1\text{H-NMR}$ di una soluzione di BNP in presenza di $42 \cdot \text{Zn(II)}$ 0.5 mM dopo 7gg., [BNP] 0.5 mM; pH 8.0 (EPPS 0.05 M), 25° C; $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ 10%; ○ = BNP, × = $42 \cdot \text{Zn(II)}$, ● = NP.

Nella regione aromatica dello spettro protonici si osservano, oltre ai segnali dei gruppi piridinici del complesso, due coppie di doppietti corrispondenti al BNP e al *p*-nitrofenossido (NP). Sono presenti inoltre i segnali di un'altra specie contenente protoni appartenenti al legante con piccoli spostamenti di chemical shift: probabilmente si tratta del legante fosforilato.

Come ultima analisi ho eseguito uno spettro di massa alla una miscela di reazione (figura 68).

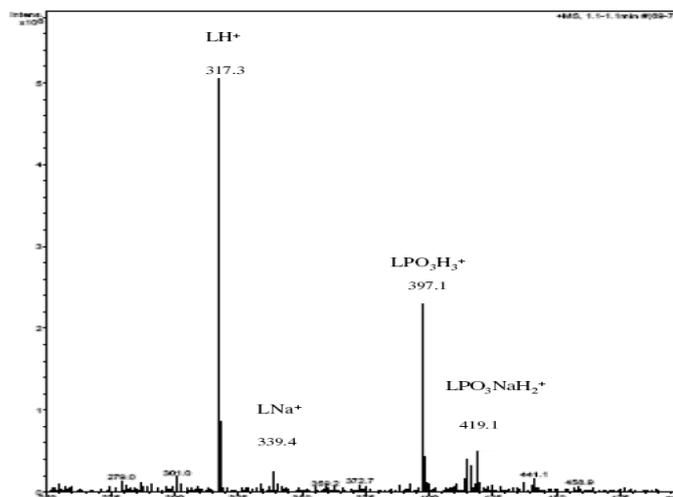


Figura 68: Spettro ESI+FA di una soluzione di BNP in presenza di $42 \cdot \text{Zn(II)}$ $4 \cdot 10^{-6}$ M dopo 7gg., [BNP] $4 \cdot 10^{-6}$ M; pH 8.0, 25° C; solv AcN + 0.1% HCOOH.

Nello spettro ottenuto si possono identificare i picchi del legante protonato, del legante con uno ione sodio, del prodotto fosforilato ipotizzato e del rispettivo ione con il catione Na^+ .

Tutti queste misure hanno portato all'identificazione del prodotto: il monoestere del legante fosforilato all'ossigeno dell'ossidrilica (figura 69). Questo prodotto si forma

Risultati

attraverso una transesterificazione del substrato attaccato dal gruppo alcolico del lagante e successiva idrolisi del prodotto di transesterificazione con conseguente rilascio del secondo gruppo *p*-nitrofenato.

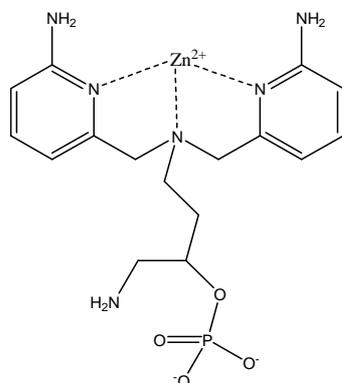


Figura 69: Struttura riscontrata del prodotto della reazione tra BNP e $42 \cdot \text{Zn(II)}$.

Il possibile ruolo del gruppo amminico di **42** nella reazione è stato investigato anche mediante calcoli DFT del complesso ternario legante-metallo-BNP. La struttura ottimizzata (*figura 64*) mostra che sono presenti alcuni legami ad idrogeno legante-substrato. I più evidenti sono i legami ad idrogeno che si instaurano tra le ammine poste sugli eterocicli piridinici del legante e l'ossigeno del substrato coordinato allo ione metallico, che sono i responsabili dell'elevata reattività di questi composti. Esistono però altri due importanti legami ad idrogeno che coinvolgono il gruppo ammonio inserito nella struttura del legante: essi sono diretti verso l'alcolato del legante (specie nucleofila) e verso l'ossigeno del fosfato non legato al metallo.

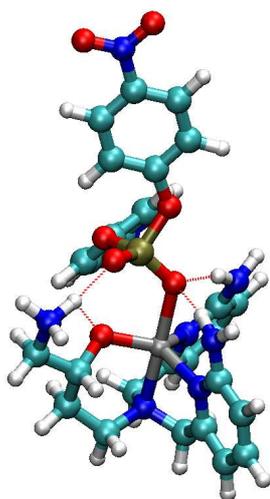


Figura 64: Struttura ottimizzata (PCM model) di $42 \cdot \text{Zn(II)}$ -BNP nella sua forma deprotonata.

Come si accennava nel capitolo precedente, la presenza di quest'ultimo legame ad idrogeno indica anche che il gruppo ammonio inserito nella struttura può interagire con il nucleofilo analogamente al meccanismo proposto per il residuo lisinico presente nelle endonucleasi di tipo II.

3.5. Reattività esterolitica dei complessi bimetallici

3.5.1. Reattività nei confronti del substrato BNP

Anche con questi sistemi, i primi esperimenti sono stati dedicati a valutare la dipendenza della velocità di reazione dalla concentrazione di substrato e di catalizzatore. Le analisi $^{31}\text{P-NMR}$ dei prodotti di reazione ed esperimenti cinetici condotti in presenza di eccesso di substrato hanno dimostrato che la reazione è effettivamente di idrolisi in quanto il prodotto risulta essere il *p*-nitrofenilfosfato. Molti complessi hanno però rivelato problemi di precipitazione in presenza del BNP, per cui sono state esplorati intervalli di concentrazione molto bassi. Dai risultati ottenuti si è potuto verificare che, nell'intervallo di concentrazioni studiate, l'idrolisi del BNP da parte dei complessi di Zn(II) di tutti i leganti ha una dipendenza lineare dalla concentrazione di complesso.

Per quanto riguarda la dipendenza della velocità di reazione dalla concentrazione di substrato, sono stati ottenuti, per i complessi **43**·Zn(II)₂, **45**·Zn(II)₂ e **47**·Zn(II), i profili a saturazione di tipo Michaelis-Menten in presenza di diverse quantità di substrato a pH 9. Questo profilo è quello atteso in accordo con il meccanismo accettato per sistemi di questo tipo, che prevede una reazione di precomplessazione del substrato al centro metallico e successivamente la reazione idrolitica. Normalmente con i complessi di Zn(II) è difficile ottenere profili a saturazione poiché le costanti di binding sono molto piccole e si osservano quindi andamenti lineari (come nel caso dei complessi studiati nel capitolo precedente) corrispondenti al primo tratto della curva. Il fitting dei dati con l'equazione di Michaelis-Menten permette di ottenere le costanti di binding del substrato nei confronti dei vari catalizzatori. Le costanti di binding (K_b) sono risultate essere di $2.7 \cdot 10^3$, $4.3 \cdot 10^3$ e $8.4 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$ rispettivamente per i complessi **43**·Zn(II)₂, **45**·Zn(II)₂ e **47**·Zn(II). Valori così elevati erano attesi nel caso dei substrati bimetallici,

mentre è sorprendente quello misurato per il complesso **47**·Zn(II), molto più elevato di quello ottenuto nel paragrafo precedente con i complessi monometallici studiati.

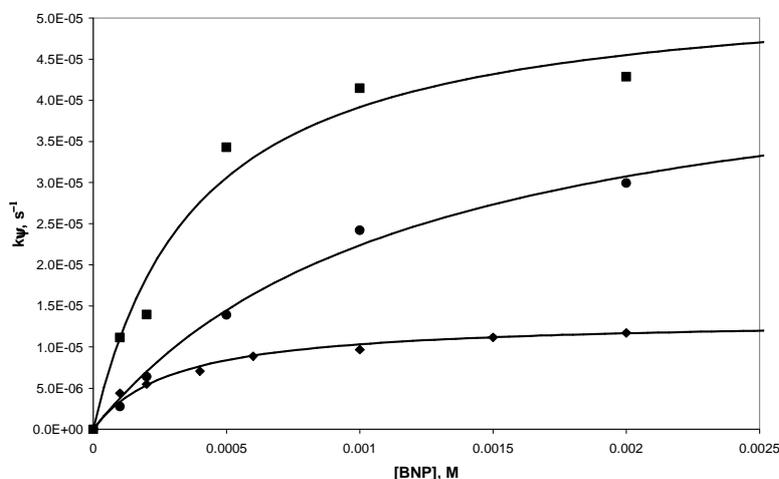


Figura 55: Velocità dell'idrolisi del BNP per i complessi **45**·2Zn(II) (■), **43**·2Zn(II) (●), **47**·Zn(II) (◆) in funzione della concentrazione del substrato. Condizioni: $[L] = 2.00 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $[CHES] = 5.0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $\text{pH} = 9.0$, 40°C . I fitting sono stati ottenuti con l'equazione di Michaelis-Menten.

Negli esperimenti successivi è stato studiato l'andamento della reattività dei complessi di Zn(II) di tutti i leganti al variare del pH e, nel caso dei composti **43** e **45** della concentrazione di zinco. Le cinetiche di idrolisi sono effettuate in condizioni di non saturazione e in presenza di un eccesso di complesso (condizioni di pseudo-primo ordine) e sono stati esplorati valori di pH compresi tra 7 e 11.

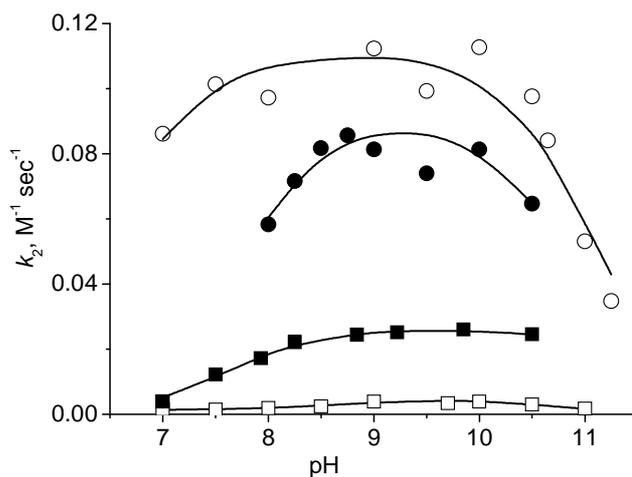


Figura 53: k_2 in funzione del pH per la reazione di idrolisi del BNP promossa dai complessi di zinco di **45**(○), **46**(□), **43**(●), **47**(■); 40°C , $[\text{tamp}] 0.05 \text{ M}$.

In *figura 53* è riportato l'andamento delle costanti cinetiche di secondo ordine apparenti (k'_2), nella reazione tra il BNP ed i complessi di zinco in funzione del pH. I profili di reattività contro il pH variano notevolmente al modificarsi della struttura del legante. Per tutti i complessi la velocità cresce con l'aumentare del pH, raggiunge un massimo a valori compresi tra 8 e 10 a seconda del legante per poi tornare a diminuire quando il pH aumenta ulteriormente. Questo andamento (come dimostrato per il legante **39**⁽²⁹⁾) è indicativo della formazione della specie attiva attorno a questi valori di pH. L'interpolazione dei dati fornisce i valori delle costanti di secondo ordine (k_2) per la reazione tra la specie reattiva monodeprotonata ed il substrato. I valori ottenuti sono riportati in *tabella 2*.

Legante	k_2 [$M^{-1}s^{-1}$]	k_r
45	0.115	1
43	0.105	0.91
47	0.026	0.23
39	0.032	0.28
46	0.0043	0.04

Tabella 2: Costanti cinetiche di secondo ordine (k_2) dei complessi di Zn(II) per la reazione tra la specie monodeprotonata ed il BNP, ottenute tramite misure cinetiche; (40°C).

Dal grafico k_2' vs pH si può osservare che il complesso maggiormente attivo è **45**·2Zn(II), esso presenta lo spacer alchilico ottilico e le ammine poste sugli anelli piridinici. La sua costante cinetica di secondo ordine k_2 è 3.6 volte quella del legante di confronto **39** e, a pH neutro **45**·2Zn(II) accelera la reazione di idrolisi di ben 15 volte rispetto allo stesso riferimento. Una situazione analoga si ha paragonando il legante **43**, recante il gruppo disolfuro nello spacer, al suo legante di confronto **47**. Dal confronto dei valori delle k_2 dei complessi di **45** e **46** possiamo osservare che le ammine sui gruppi piridinici sono molto influenti sulla reattività dei complessi ed aumentano la reattività dei complessi di circa 25 volte (il paragone tra **43** e **44** non è stato possibile in quanto il complesso del secondo legante non è attivo).

I dati fin qui presentati mostrano come i complessi di Zn(II) dei leganti **45** e **43** sono in grado promuovere la scissione idrolitica di diesteri fosforici con una discreta efficienza. Infatti, in presenza del complesso **45**·2Zn(II) alla concentrazione di $2 \cdot 10^{-5}$ M, a pH 7 e 40 °C, la scissione idrolitica del BNP si verifica con una costante cinetica di

Risultati

pseudo primo ordine di $1.7 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$. Nonostante il BNP sia un cosiddetto “substrato attivato”, la sua scissione spontanea è molto lenta e avviene nelle stesse condizioni con una costante di pseudo primo ordine pari a $1.1 \cdot 10^{-10} \text{ s}^{-1}$: la reazione viene quindi accelerata dal complesso **45**-2Zn(II) di circa 15500 volte. Di conseguenza il tempo di semivita del BNP nelle condizioni degli esperimenti cinetici effettuati si riducono da 193 anni a circa 8 giorni. Il complesso del legante **43**, che pur è caratterizzato da una reattività simile, è però decisamente meno efficace a pH 7 a causa della minor acidità del gruppo reattivo.

Questi valori possono sembrare non molto diversi da quelli ottenuti da altri complessi bimetallici di Zn(II) riportati in letteratura, ma va sottolineato che gli esperimenti cinetici sono stati condotti in presenza di concentrazioni di complesso metallico molto piccole ($2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$); significativamente inferiori a quelle normalmente utilizzate per questo tipo di studi ($1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$).

Considerando che i leganti **43-46** sono di tipo bimetallico e che quindi la concentrazione di ione metallico in questi campioni è doppia rispetto ai leganti **39** e **47** si può però dedurre che la cooperatività tra i due centri metallici è bassa. Una prova della scarsa cooperatività degli ioni metallici è data dai risultati ottenuti nell'esperimento riportato in *figura 54*, in cui la velocità di scissione del BNP è stata misurata in presenza di miscele del legante **43** e diversi rapporti di ione Zn(II). Si osserva, infatti, un andamento sigmoidale in cui la reattività del sistema aumenta in modo non proporzionale alla quantità di metallo aggiunto. Come ci si può aspettare il profilo si ferma ad un livello massimo di reattività dopo l'aggiunta di due equivalenti di metallo, dimostrando il carattere bimetallico di questi leganti. La velocità di reazione dopo l'aggiunta di due ioni metallici è approssimativamente 3 volte quella raggiunta ad un equivalente di metallo, indicando che l'effetto è più che additivo, ma non significativamente elevato per attribuire la buona reattività all'effetto cooperativo. Il complesso del legante **45**, invece, mostra un andamento lineare della reattività con il variare della concentrazione dello ione metallico, fino al raggiungimento di due equivalenti. In questo caso possiamo affermare che la cooperatività tra i metalli è pressoché nulla.

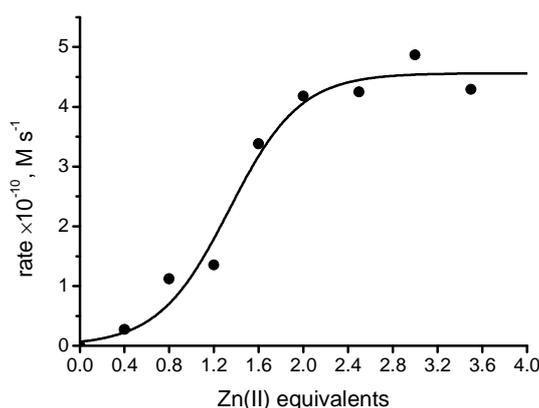


Figura 54: Profilo di reattività al variare della concentrazione di Zn(II): pH 9 (tampono CHES 0.05M, $[43] = 2 \cdot 10^{-5} M$, $40^{\circ}C$).

Anche il confronto tra le costanti di secondo ordine per i complessi monodeprotonati dei leganti **47** e **43** ricavate dal fitting dei profili di reattività in funzione del pH evidenzia come il guadagno di reattività dovuto alla cooperazione tra i due centri metallici non sia molto grande. Il complesso **43**·2Zn(II) ($k_2 = 0.11 M^{-1} s^{-1}$) sembra essere solo 3 volte più reattivo del corrispondente monometallico **47**·Zn(II) ($k_2 = 0.026 M^{-1} s^{-1}$). Dal momento che il probabile meccanismo della reazione prevede la formazione di un pre-complesso catalizzatore-substrato, le costanti cinetiche di secondo ordine ricavate dagli esperimenti a pH variabile sono in realtà il rapporto tra i parametri di Michaelis-Menten k_{cat}/K_M . Il valore di k_{cat} , che fornisce informazioni sulla reale reattività dei due complessi, può essere quindi ricavato utilizzando per il complesso i valori di K_M ottenuti negli esperimenti a concentrazione di substrato variabile, rispettivamente 0.37 mM e 1.2 mM per **43**·2Zn(II) e **47**·Zn(II). Si ottengono così dei valori di k_{cat} pari rispettivamente a $4.1 \cdot 10^{-5} s^{-1}$ e $3.1 \cdot 10^{-5} s^{-1}$ per **43**·2Zn(II) e **47**·Zn(II). Questo dati evidenziano ancora di più la scarsa azione cooperativa tra i centri metallici, che sembra concretarsi essenzialmente nell'aumentare l'affinità per il substrato ma è sostanzialmente inefficace dal punto di vista della reattività.

Siccome tutti i leganti in esame sono poco solubili in acqua non è stato possibile investigare la formazione dei complessi di Zn(II) mediante classiche titolazioni potenziometriche. Per ottenere informazioni sulla complessazione del metallo ed in particolare sul ruolo del gruppo disolfuro dei leganti **43** e **44** sono stati condotti esperimenti 1H -NMR sul legante **47** e sul suo complesso di zinco (figura 56). Come

Risultati

accade per tutti i leganti con struttura bis-(2-piridinil-metil)amminici la formazione dei complessi provoca un significativo e tipico cambiamento dello spettro: il protone piridinico H2 viene spostato verso campi bassi, mentre i segnali dei protoni H1 e H3 vengono fusi in un unico segnale. I protoni metilenici H4 subiscono una forte variazione: i loro segnali vengono splittati in un sistema AB, dovuto alla perdita della flessibilità conformazionale della zona coinvolta nel legame con il metallo. In questo sistema la variazione più significativa è quella che ha interessato il braccio contenente il gruppo disolfuro. Si può osservare che i protoni metilenici adiacenti al gruppo disolfuro hanno subito il maggior shift, che indica la complessazione al metallo di questo gruppo. Quindi anche il gruppo disolfuro è in grado di legarsi al metallo, rendendo il complesso **47**·Zn(II), almeno a pH neutro, un legante tetradentato.

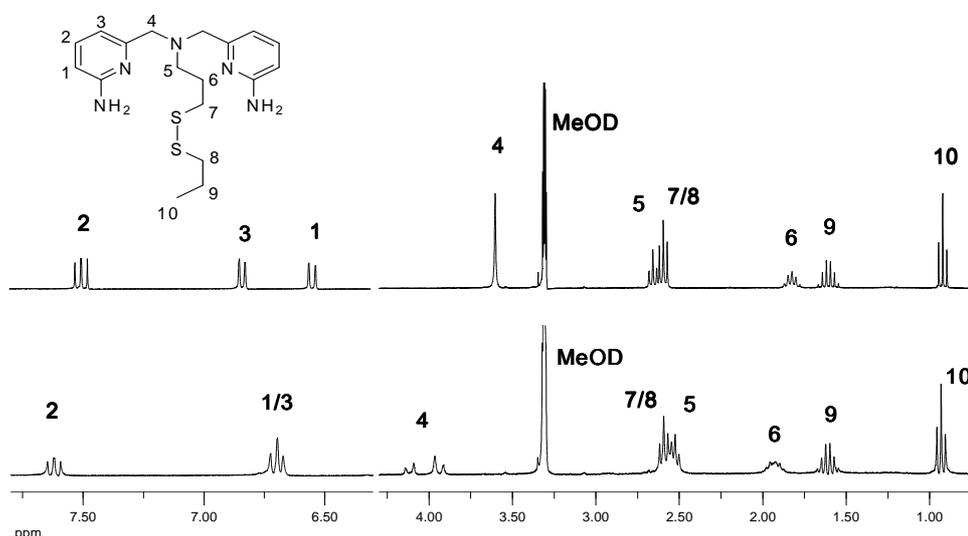
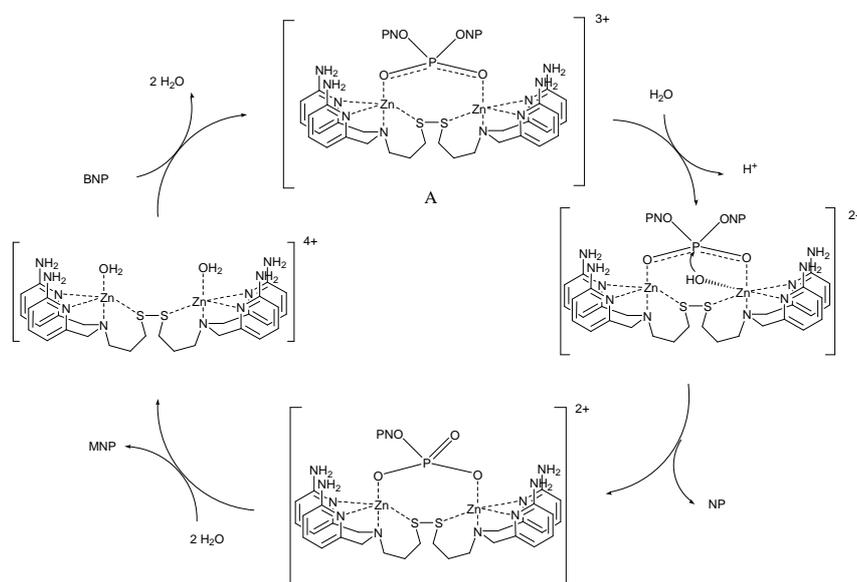


Figura 56: Spettro ^1H NMR di A) **47** e B) **47**·Zn(II): $[\text{L}] = 1.0 \cdot 10^{-3}$ M in MeOD a 25°C .

Sulla base dei dati riportati è possibile quindi proporre per la reazione di idrolisi del BNP catalizzata dal complesso **43**·2Zn(II) un probabile meccanismo di azione (*Schema 4*). Esso è del tutto simile a quelli generalmente proposti per complessi di altri agenti idrolitici bimetallici e prevede i seguenti passaggi: i) la formazione di un complesso ternario con il substrato; ii) la deprotonazione di una molecola d'acqua legata ad uno ione metallico; iii) l'attacco nucleofilo intracompleso da parte dello ione idrossido sul fosfato, con conseguente espulsione di un *p*-nitrofenato. All'interno del complesso A, però, tutti i siti di coordinazione disponibili nei due ioni metallici risultano occupati. La formazione del nucleofilo richiede quindi che uno dei due centri metallici raggiunga il numero di coordinazione 6, accomodando una molecola di solvente, evento che risulta

sfavorito sia dall'ingombro sterico che dalle preferenze del metallo riguardo al suo numero di coordinazione. Infatti, va rilevato che il complesso del legante **44** risulta del tutto inattivo probabilmente proprio per l'indisponibilità di siti di coordinazione sui due ioni metallici e la conseguente difficoltà di formare il nucleofilo che in questo caso non è compensata dall'effetto attivante dei gruppi donatori di legami a idrogeno.

A fronte di una maggior attivazione del substrato e della stabilizzazione dello stato di transizione, dovuta alle diverse interazioni stabilite con il catalizzatore, si verifica quindi una scarsa disponibilità del nucleofilo che deprime la reattività del sistema. L'effetto di accelerazione discusso all'inizio del paragrafo è quindi imputabile essenzialmente alla maggior affinità del catalizzatore per il substrato, data dai due ioni metallici e dai quattro legami ad idrogeno.

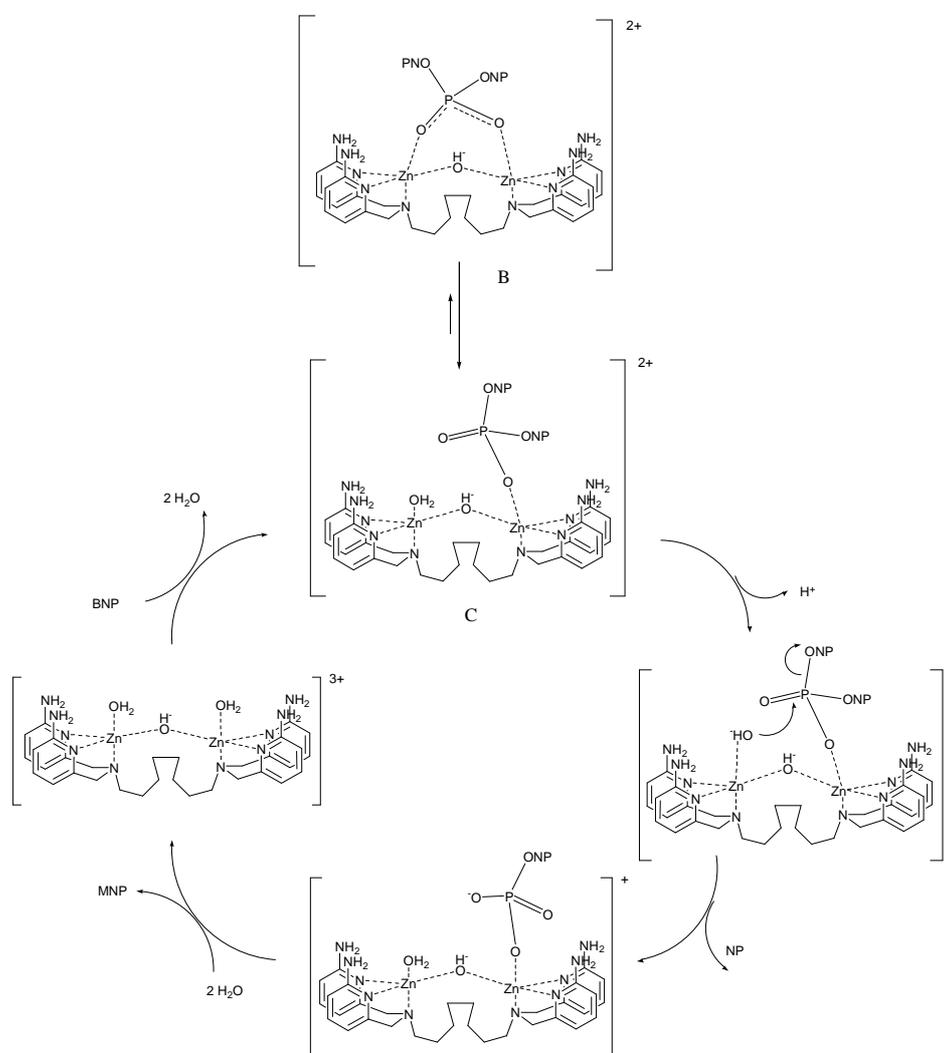


Schema 4: Possibile meccanismo di reazione per l'idrolisi del BNP catalizzata dal complesso **43**·2Zn(II).

La reattività del complesso del legante **45** (schema 5), invece, sembra più difficile da interpretare. Da un lato l'esperienza cinetica effettuata a rapporti variabili legante/metallo non mostra evidenze di cooperatività tra gli ioni metalli, dall'alto l'affinità per il substrato è simile a quella del complesso del legante **43**, e questo dato sembrerebbe indicare che entrambi i metalli partecipino all'interazione con il substrato. Inoltre, dal momento che in questo complesso il ponte disolfuro è assente, dovrebbero rimanere sul metallo un numero sufficiente di siti di coordinazione per accomodare il nucleofilo e questo dovrebbe portare ad una reattività più elevata. Un'evidenza sperimentale che potrebbe fornire un'utile indicazione per conciliare queste

Risultati

osservazioni in apparenza contraddittorie è data di profili di reattività al variare del pH: si osserva infatti che nel caso del complesso del legante **45** la prima deprotonazione avviene a pH molto più bassi che per il complesso del legante **43**. Questo fenomeno indica solitamente la formazione di ponte μ -idrossido tra i due ioni metallici. Se questo fosse vero, il ponte μ -idrossido potrebbe svolgere una funzione analoga al ponte disolfuro presente nel complesso del legante **43**: preorganizzare il complesso mantenendo vicini i due ioni metallici (e questo spiegherebbe l'elevata affinità per il substrato) e saturare i siti di coordinazione sugli ioni metallici deprimendo la reattività del complesso. Ovviamente si tratta allo stadio attuale di mere ipotesi che richiederanno ulteriori investigazioni per essere confermate o scartate.



Schema 5: Possibile meccanismo di reazione per l'idrolisi del BNP catalizzata dal complesso **45**·2Zn(II).

3.5.2. Reattività nei confronti del DNA plasmidico

Successivamente, in collaborazione con la dott.ssa Claudia Sissi del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, si è investigata l'efficacia dei complessi di zinco dei leganti **43-47** nel provocare la scissione idrolitica del DNA plasmidico. Gli esperimenti sono stati condotti incubando il DNA plasmidico (pBR 322) con i complessi di zinco a pH 7 per 24 ore a 37°C a diverse concentrazioni di complesso. Per tutti i leganti è stato osservato come prodotto la forma II del DNA, cioè la forma circolare rilassata. Sorprendentemente la reattività nei confronti del DNA plasmidico si differenzia quella ottenuta verso il BNP. Infatti in questo caso l'ordine di reattività rilevato è il seguente: $43 \cdot \text{Zn(II)}_2 > 47 \cdot \text{Zn(II)} \approx 45 \cdot \text{Zn(II)}_2$, mentre $46 \cdot \text{Zn(II)}_2$ non è reattivo. Un andamento diverso è stato osservato nel caso del legante **44**, il quale risulta essere molto reattivo a basse concentrazioni (alla concentrazione di 10 mM di complesso viene infatti idrolizzato più del 20% di DNA), ma la sua reattività decresce a concentrazioni superiori (figura 57).

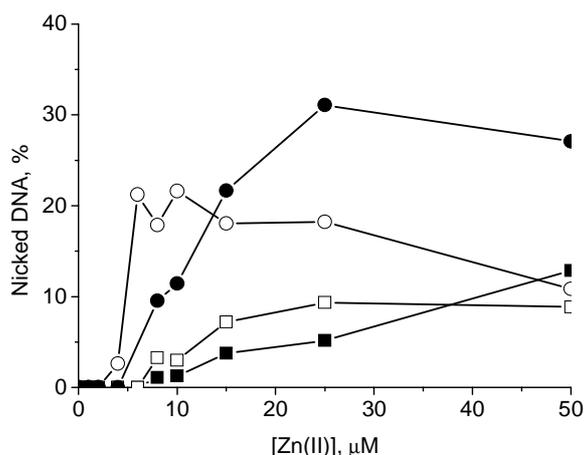


Figura 57: Idrolisi del DNA plasmidico pBR 322 (forma II) dopo incubazione con differenti concentrazioni di complesso dei leganti **43** (●), **44** (○), **45** (□) and **47** (■). $[DNA_{bp}] = 12 \mu\text{M}$. $[\text{HEPES}] = 20 \text{ mM}$, pH 7, 37°C, 24 h, le molarità sono espresse come concentrazioni di ione Zn(II) .

Esperimenti condotti in presenza di scavengers per radicali (DMSO e isopropanolo) hanno evidenziato reattività analoghe a quelle rilevate in assenza di queste sostanze, consentendo di escludere la formazione di specie radicaliche con possibile conseguente scissione ossidativa del DNA. Inoltre, il test di Ellman (che rileva la presenza di tioli) effettuato sulle miscele di reazione ha dato in ogni caso esito negativo, escludendo la formazione di tioli dai leganti complessi recanti i gruppi disolfuro. Infine, esperimenti

di controllo condotti incubando il DNA con i leganti privi del disolfuro insieme a concentrazioni crescenti di dietildisolfuro hanno permesso di escludere l'intervento del gruppo disolfuro nella reazione. Queste evidenze sperimentali hanno confermato il meccanismo idrolitico della reazione di scissione del DNA plasmidico.

E' stato inoltre possibile studiare l'interazione dei complessi con il DNA mediante esperimenti di dicroismo circolare condotti utilizzando un DNA lineare estratto dal timo di vitello. In tutti i casi si è osservata la diminuzione del segnale dicroico, in particolare della banda a 275 nm, indicativa dell'interazione dei complessi con il DNA, con conseguente destabilizzazione della struttura a doppia elica. Questo comportamento è dovuto essenzialmente alle interazioni elettrostatiche tra il DNA carico negativo e i complessi positivi, che provoca la neutralizzazione delle cariche del DNA. Nonostante queste misure non è stato possibile determinare la costante di binding desiderata in quanto, ad alte concentrazioni di complessi, si osserva la precipitazione di addotti DNA-Zn(II)-legante con la conseguente scomparsa del segnale dicroico. Se però si assume che l'entità della variazione del segnale dicroico corrisponda all'affinità del complesso per il DNA è possibile determinare il seguente ordine di affinità: $43 \cdot \text{Zn(II)}_2 \approx 45 \cdot \text{Zn(II)}_2 > 44 \cdot \text{Zn(II)}_2 > 46 \cdot \text{Zn(II)}_2$.

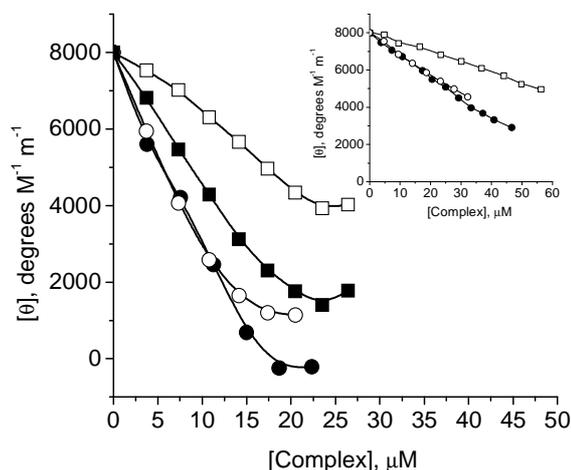


Figura 58: Ellitticità molare del DNA ($[\theta]$) a 275 nm in funzione della concentrazione di Zn(II) per i complessi dei leganti 43 (●), 44 (○), 45 (■) e 46 (□). Insetto: Ellitticità molare del DNA ($[\theta]$) a 275 nm in funzione della concentrazione di Zn(II) per i complessi dei leganti 47 (●), 39 (○) e 51 (□). $[\text{ctDNA}_{bp}] = 180 \mu\text{M}$. $[\text{HEPES}] = 20 \text{ mM}$, pH 7, 25°C, 24 h, le molarità sono espresse come concentrazioni di ione Zn(II).

3.6. Reattività esterolitica delle nanoparticelle d'oro passivate con il legante **48**

3.6.1. Esperimenti preliminari

Visti i risultati deludenti ottenuti con i complessi bimetallici, ho deciso di dedicarmi allo studio della reattività dei sistemi basati su nanoparticelle che, come discusso nel capitolo 1, rappresentano un metodo alternativo e finora efficace di assemblare sistemi idrolitici multimetallici. L'uso del tiolo **48**, descritto nei primi paragrafi del capitolo, per passivare la superficie di una nanoparticella d'oro avrebbe dovuto permettere di assemblare un sistema multimetallico in grado di sfruttare anche la cooperazione di gruppi donatori di legami a idrogeno.

Tutti i leganti della famiglia delle bis-[(6-amino-2-piridinil)metil]-ammine finora studiati presentano una ridotta solubilità in acqua. Per questo motivo ho deciso di ricoprire le particelle con un monostrato misto costituito da due diversi tioli: il legante **48** da me sintetizzato ed il derivato del trietilenglicole, l'8-tiol-N-(2-(2-(2-metossietossi)etossi)etil)ottanammide (**52**, *figura 70*). E' infatti noto che particelle d'oro ricoperte da quest'ultimo tiolo presentano elevate solubilità in soluzioni acquose⁽⁵¹⁾.

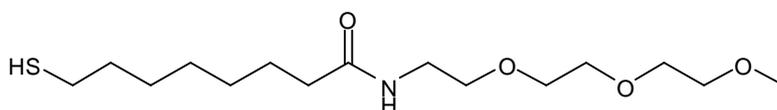


Figura 70: 8-tiol-N-(2-(2-(2-metossietossi)etossi)etil)ottanammide (**52**)

Sono stati preparati due diversi campioni di particelle d'oro utilizzando miscele di ricopertura contenenti percentuali di **48** rispettivamente del 10% (**AuNp1**) e del 40% (**AuNp2**) in moli. In entrambi i casi le particelle ricoperte non sono risultate solubili in toluene e sono precipitate dall'ambiente di reazione. Il solido ottenuto è stato quindi purificato mediante triturazione con toluene, acetato di etile ed etere etilico.

Le particelle ottenute sono risultate solubili in metanolo ed in miscele metanolo-acqua. Gli spettri UV-Vis sono quelli tipici di nanoparticelle d'oro di dimensioni inferiori ai 3 nm, con un intenso assorbimento non strutturato in tutto l'intervallo del visibile che decresce al crescere della lunghezza d'onda. Esperimenti di microscopia TEM confermano questo dato e consentono di misurare un diametro medio delle particelle pari a 1.8 ± 0.6 nm. La composizione del monostrato è stata confermata grazie

dall'analisi degli spettri $^1\text{H-NMR}$ delle particelle. Sulla base di questi dati e di dati di letteratura,⁽⁴⁷⁾ è possibile determinare la formula minima media dei due campioni che risulta essere: $\text{Au}_{201}(\mathbf{48})_7(\mathbf{52})_{64}$ per **AuNp1** e $\text{Au}_{201}(\mathbf{48})_{28}(\mathbf{52})_{43}$ per **AuNp2**.

Per comodità di scrittura, le soluzioni di particelle contenenti Zn(II) in quantità equimolare rispetto alle unità leganti verranno d'ora in poi chiamate **AuNp1·Zn(II)** e **AuNp2·Zn(II)** e ne verrà indicata normalmente la concentrazione molare in unità leganti. I primi esperimenti effettuati sono stati volti ad identificare i prodotti della reazione mediante spettri $^{31}\text{P-NMR}$. In *figura 71* è riportato lo spettro ottenuto da una soluzione contenente le nanoparticelle **AuNp2·Zn(II)** incubate insieme ad un eccesso BNP per 13 giorni a 40 °C a pH 9.0 ([CHES] = 5 mM). La concentrazione di BNP è di $4 \cdot 10^{-4}$ M, quella di nanoparticelle è di 0.23 mg/mL, che corrisponde ad una concentrazione di unità leganti di $1 \cdot 10^{-4}$ M.

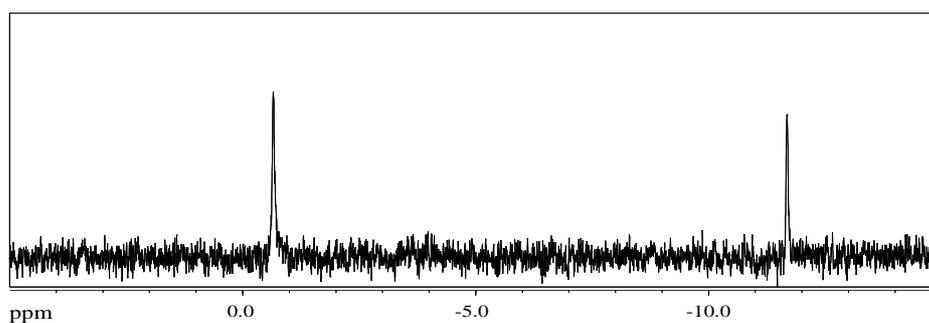


Figura 71: Spettro $^{31}\text{P-NMR}$ 300MHz accoppiato di una soluzione di $[\text{AuNp2}\cdot\text{Zn(II)}] = 0.1 \text{ mM}$, $[\text{BNP}] = 0.4 \text{ mM}$; pH 9.0 ([CHES] = 5 mM), 40° C; 30% metanolo, dopo 13 gg.

In *figura 68* si osserva la presenza del segnale a -11.68 ppm dovuto al BNP e di un secondo segnale a -0.66 ppm dovuto al prodotto di idrolisi *p*-nitrofenilfosfato (MNP). L'identità di entrambi i segnali è stata confermata per il confronto con gli spettri $^{31}\text{P-NMR}$ di campioni commerciali dei due composti. Va inoltre sottolineato come, con questa tecnica, nei tempi e nelle condizioni di reazione usate in questi esperimenti, non si osserva la successiva idrolisi dell'MNP che sarà invece evidenziata successivamente.

Determinati i prodotti della reazione, sono passato agli studi cinetici che, come già spiegato, vengono effettuati essenzialmente mediante misure di assorbimento UV-Vis. Nel caso dei sistemi basati su nanoparticelle d'oro la scelta delle condizioni di reazione da utilizzare negli esperimenti cinetici è piuttosto delicata. La concentrazione di nanoparticelle utilizzabile è sottoposta ad alcuni vincoli pratici: sopra un certo valore, infatti l'assorbanza delle soluzioni diviene talmente alta che non è più possibile

misurare con sufficiente precisione la formazione del *p*-nitrofenossido. Ho quindi scelto di utilizzare una concentrazione di nanoparticelle di circa 0.11 mg/mL, corrispondente ad una concentrazione di unità leganti di $5.0 \cdot 10^{-5}$ M nella miscela di reazione: questa è la massima concentrazione di specie reattive raggiungibile mantenendo l'assorbanza dei campioni inferiore all'unità.

Alcuni esperimenti preliminari hanno inoltre evidenziato la precipitazione delle nanoparticelle dalla miscela di reazione in presenza di un eccesso di BNP. Ho quindi deciso di eseguire la maggior parte degli esperimenti utilizzando una concentrazione di BNP inferiore a quella delle unità leganti e pari a $2 \cdot 10^{-5}$ M. Come abbiamo già visto nei paragrafi precedenti, nello studio di sistemi idrolitici è pratica comune lavorare in condizioni di largo eccesso di catalizzatore (condizioni di pseudo-primo ordine): in queste condizioni è possibile ritenere la concentrazione di catalizzatore costante nel corso della reazione e i profili cinetici seguono quindi degli andamenti di primo ordine. L'uso di questo metodo presenta diversi vantaggi, il più importante dei quali è la facilità di individuare fenomeni parassiti (ad esempio formazione di precipitati o eventuali reazioni secondarie) esaminando forma e ampiezza dei profili stessi, ma anche svantaggi, ad esempio l'impossibilità di studiare la reale efficacia catalitica del complesso studiato. Va però sottolineato come le condizioni da me utilizzate non sono propriamente di pseudo-primo ordine, dal momento che la concentrazione di catalizzatore è poco più di due volte superiore a quella del substrato. Queste condizioni rappresentano però il miglior compromesso tra la necessità di operare con quantità ridotte di BNP e quella di poter osservare una variazione di assorbanza apprezzabile in seguito alla scissione del substrato. Infine ho scelto di svolgere gli esperimenti alla temperatura di 40°C per ridurre i fenomeni di precipitazione e ottenere dei tempi di reazione sufficientemente brevi da consentire di effettuare un numero sufficiente di esperimenti in un intervallo di tempo ragionevole.

3.6.2. Determinazione della reattività esterolitica nei confronti del BNP

Nelle condizioni di reazione utilizzate ($[BNP] = 2 \cdot 10^{-5}$ M, $[AuNp \cdot Zn(II)] = 5 \cdot 10^{-5}$ M) i profili cinetici rivelano il rilascio di entrambe le unità di *p*-nitrofenolo (*figura 72*), con il primo stadio circa dieci volte più veloce del secondo.

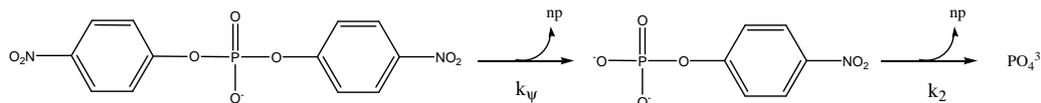


Figura 72

Come conseguenza i dati degli esperimenti cinetici sono stati interpolati con un modello che prevede due reazioni di idrolisi consecutive:

$$A = A_{\text{inf}} \left(1 + \frac{k_{\psi} e^{-k_2 t} + (k_{\psi} - 2k_2) e^{-k_{\psi} t}}{2(k_2 - k_{\psi})} \right)$$

dove k_{ψ} è la costante di pseudo primo ordine per l'idrolisi del BNP, mentre k_2 è quella per l'idrolisi dell'intermedio *p*-nitrofenilfosfato (MNP).

I primi esperimenti sono stati dedicati a valutare la dipendenza della velocità di reazione in funzione del pH. I profili ottenuti per i due campioni di nanoparticelle e per il legante **39**, utilizzato come composto di riferimento, nelle stesse condizioni sono riportati in figura 73.

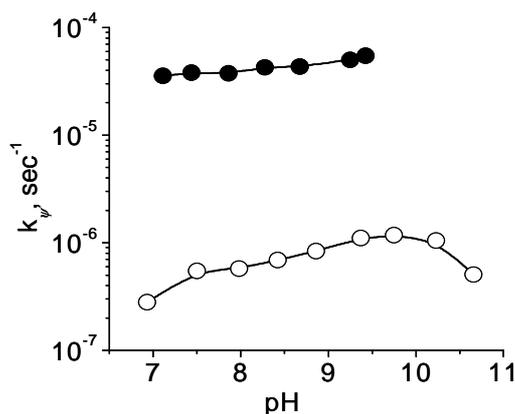


Figura 73: Dipendenza della velocità di reazione dal pH per le nanoparticelle $\text{AuNp2}\cdot\text{Zn(II)}$ (●) e per il complesso di riferimento $\text{39}\cdot\text{Zn(II)}$ (○). Condizioni: $T=40^{\circ}\text{C}$, $[\text{AuNp2}\cdot\text{Zn(II)}]=5\cdot 10^{-5}\text{M}$, $[\text{tampono}]=5\cdot 10^{-3}\text{M}$, $[\text{BNP}]=2\cdot 10^{-5}\text{M}$; legante **39**: $T=40^{\circ}\text{C}$, $[\text{tampono}]=0.05\text{M}$, $[\text{BNP}]=2\cdot 10^{-4}\text{M}$.

I risultati ottenuti, confrontati a quelli dei complessi di Zn(II) degli stessi leganti non supportati su particelle, sono in qualche modo sorprendenti. Nel caso del complesso di zinco del legante **39** vi è una forte influenza del pH sulla velocità della reazione: la velocità cresce con l'aumentare del pH, raggiunge un massimo a valori di pH attorno a 9.5 per poi tornare a diminuire quando il pH aumenta ulteriormente. Profili di questo tipo sono già stati osservati nei paragrafi precedenti e indicano l'intervento, nel corso della reazione, di due specie acide la cui deprotonazione ha un effetto positivo, nel caso della prima, e negativo nel caso della seconda.^(8,15)

L'andamento ottenuto per le particelle **AuNp2**·Zn(II) è invece molto diverso: la reazione avviene sostanzialmente alla stessa velocità a tutti i valori di pH esplorati. Il punto da sottolineare è comunque la maggior reattività delle nanoparticelle confrontate con il complesso **39**: a pH 7.0 esse sono 100 volte più efficaci. La costante di primo ordine osservata in queste condizioni è di $3.6 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, ben 300000 volte più della reazione non catalizzata. Questo valore è il più alto mai osservato verso il substrato BNP per complessi di zinco.

3.6.3. Dipendenza della velocità dalla quantità di ione metallico

In *figura 74* sono riportati i profili di reattività ottenuti mantenendo costante la concentrazione di nanoparticelle **AuNp2** e **AuNp1** e variando quella di Zn(II) nelle seguenti condizioni: pH 9.0 (tampone CHES = $5 \cdot 10^{-3}$ M), [legante] = $5 \cdot 10^{-5}$ M, T = 40 °C.

Si può osservare che l'efficienza idrolitica del sistema aumenta con la concentrazione di Zn(II) fino a raggiungere un *plateau* dopo l'aggiunta di 1 equivalente di ione metallico rispetto alla quantità di legante presente. In particolare, la forma a spezzata della curva ottenuta indica un effetto cooperativo tra gli ioni metallici. Si può osservare infatti che quando più della metà dei siti di legame è occupata da ioni Zn(II) si ha un aumento della velocità della reazione con una maggior pendenza. Questo andamento può essere interpretato assumendo la formazione di siti monometallici fino ad un loading del 50% e, successivamente, all'instaurarsi di siti bimetallici più reattivi. Mediante il fitting di questi punti con questo modello è stato possibile determinare separatamente la reattività dei siti mono e bimetallici, che sono riportate in *tabella 5*.

catalizzatore	k_2 ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
[AuNp1 ·Zn(II)]	0.11
[AuNp1 ·Zn(II)] ₂	1.5
[AuNp2 ·Zn(II)]	0.45
[AuNp2 ·Zn(II)] ₂	1.4

Tabella 5: Costanti di secondo ordine apparenti (k_2) per l'idrolisi del BNP delle specie mono [**AuNpn**·Zn(II)] e bimetalliche [**AuNpn**·Zn(II)]₂, pH 8, 40°C.

Un importante aspetto a riguardo della struttura di queste nanoparticelle è che la probabilità della formazione di siti bimetallici per **AuNp1** e **AuNp2** è diversa: per il campione **AuNp1** solamente il 30% delle unità $48\cdot\text{Zn(II)}$ siti può dare origine a siti bimetallici, mentre per **AuNp2** la percentuale sale al 91%.

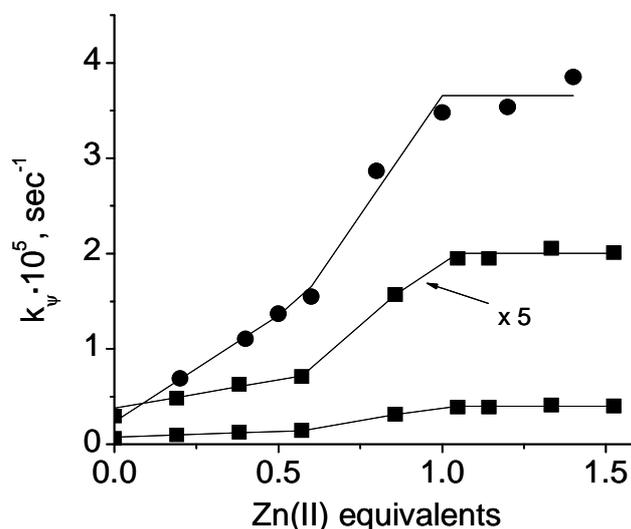


Figura 74: Profilo di reattività di **AuNp1** (■, $[\text{C8SH}] = 1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$) e **AuNp2** (●, $[\text{C8SH}] = 5.0 \times 10^{-5} \text{ M}$) in funzione degli equivalenti di Zn(II) aggiunti a $\text{pH } 8.0$. $[\text{HEPES}] = 50 \text{ mM}$, $[\text{BNP}] = 2 \times 10^{-5} \text{ M}$, 40°C .

3.6.4. Determinazione delle costanti di binding

Un parametro molto rilevante per l'interpretazione dei dati cinetici è la costante di binding tra substrato e catalizzatore. Il metodo più comune per la determinazione di tale costante di binding è quello di effettuare misure di reattività a quantità variabile di substrato, fino ad osservare un andamento a saturazione ed il fitting di questi dati con il modello di Michaelis-Menten fornisce, come abbiamo visto nei paragrafi precedenti, la costante di affinità (K_{BNP}). Purtroppo questo metodo si è potuto applicare solamente nel caso del campione **AuNp1** in quanto la precipitazione delle particelle **AuNp2** in presenza di concentrazioni elevate di BNP impedisce di valutare la formazione di complessi tra i siti attivi sulle particelle e il substrato. Nel grafico riportato in *figura 75* è possibile osservare per il campione **AuNp1**· Zn(II) il tipico profilo a saturazione della velocità con l'aumento della concentrazione di substrato ed il rispettivo fitting.

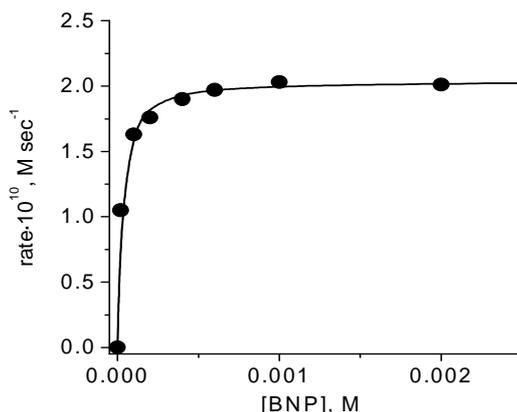


Figura 75: Velocità di idrolisi del BNP per **AuNp1**·Zn(II) in funzione della concentrazione di BNP. Condizioni: $[48] = 1.05 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{Zn(II)}] = 1.05 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{HEPES}] = 5.0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $\text{pH} = 7.0$, $40 \text{ }^\circ\text{C}$. La costante di binding ottenuta (K_{BNP}) è $4.7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Nel caso delle particelle **AuNp2**·Zn(II), già la semplice osservazione della formazione del precipitato indica un'interazione tra le particelle ed il BNP. E' possibile infatti ipotizzare che, una volta legatosi una certa quantità di fosfato alla superficie delle particelle, questa assuma un carattere idrofobico: da un lato la carica complessiva delle particelle verrebbe diminuita dalla presenza degli anioni fosfato legati e dall'altro verrebbero esposti al solvente prevalentemente i residui *p*-nitrofenilici, dal carattere scarsamente idrofilico.

Per ottenere maggiori informazioni sull'affinità dei siti reattivi per i diesteri fosforici ho deciso di utilizzare, come già descritto, esperimenti di inibizione con il dimetilfosfato (DMP). I risultati ottenuti rispettivamente per le nanoparticelle **AuNp2** e **AuNp1** sono riportati nelle *figure 76* e *77* in cui la velocità di reazione, normalizzata rispetto alla velocità misurata in assenza di DMP, è riportata in funzione della concentrazione di DMP aggiunto.

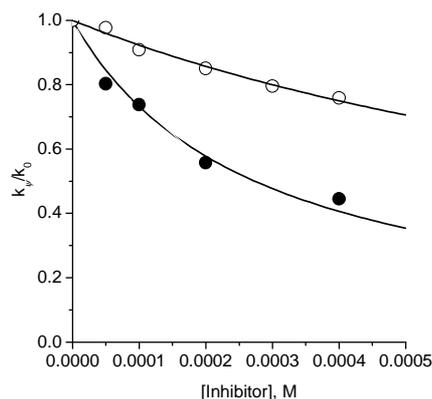


Figura 76: Esperimenti di inibizione competitiva: velocità relative di idrolisi del BNP per **AuNp2** in presenza di 1.0 (●) o 0.2 (○) equivalenti di Zn(II) rispetto alle unità di legante in funzione della concentrazione di DMP. Condizioni: $[48] = 5.0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{HEPES}] = 5.0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $\text{pH} = 7.0$, $[\text{BNP}] = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Le costanti di binding ottenute (K_{DMP}) sono rispettivamente $2.7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ (1 eq.) e $8.3 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$ (0.2 eq.).

Come mi aspettavo, utilizzando l'inibitore DMP è stato possibile esplorare un intervallo di concentrazioni più ampio, dal momento che la precipitazione delle particelle si verifica solo per concentrazioni di fosfato superiori a 0.5 mM. Il fitting dei profili ottenuti in presenza rispettivamente di 1 e 0.2 equivalenti di zinco forniscono i valori delle costanti di binding dei siti bimetallici e di quelli monometallici delle nanoparticelle **AuNp2**.

Per il campione **AuNp1**, studiato in presenza di un equivalente di ioni Zn(II), invece, lo scenario è molto diverso. Dai punti riportati in *figura 77* si può osservare che la reattività scende rapidamente fino all'aggiunta di una concentrazione di 0,002 M di inibitore, per poi diminuire molto più lentamente.

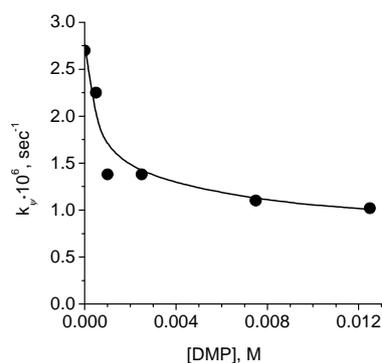


Figura 77: Esperimento di inibizione competitiva: velocità relative di idrolisi del BNP per **AuNp1** in presenza di un equivalente di Zn(II) rispetto al legante in funzione della concentrazione di DMP. Condizioni: $[48] = 1.05 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{Zn(II)}] = 1.05 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{HEPES}] = 5.0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $\text{pH} = 7.0$, $[\text{BNP}] = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Le costanti di binding ottenute (K_{DMP}) sono rispettivamente $2.2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ per i siti bimetallici e $1.3 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$ per i siti monometallici.

Questo andamento suggerisce che sono responsabili della reattività del sistema almeno due diverse specie: come ipotizzato nel paragrafo precedente può trattarsi dei siti bimetallici (forte binding) e dei siti monometallici scarsamente reattivi (binding scarso). Il fitting dei dati con un modello opportuno che tenga conto di due costanti di binding differenti conferma questa interpretazione (*tabella 6*).

Catalizzatore	$K_{DMP} (M^{-1})$
[AuNp1·Zn(II)]	$1.3 \cdot 10^2$
[AuNp1·Zn(II)] ₂	$2.2 \cdot 10^3$ $4.7 \cdot 10^4 (K_{BNP})$
[AuNp2·Zn(II)]	$8.3 \cdot 10^2$
[AuNp2·Zn(II)] ₂	$3.7 \cdot 10^3$

Tabella 6: Costanti di binding del DMP K_{DMP} e del BNP K_{BNP} , pH 7, 40°C per i siti mono e bimetallici.

3.6.5. Reattività nei confronti del DNA plasmidico

Visti gli ottimi risultati ottenuti nell'idrolisi del substrato BNP ho deciso di effettuare prove di idrolisi sul DNA plasmidico superavvolto (pBR 322). L'incubazione del DNA a pH 7 a 37 °C per 24 ore con il campione AuNp2·Zn(II) ha evidenziato una discreta reattività. Alla concentrazione di unità metalliche di 15µM si ottiene l'idrolisi di circa il 16% del DNA incubato (*figura 78*).

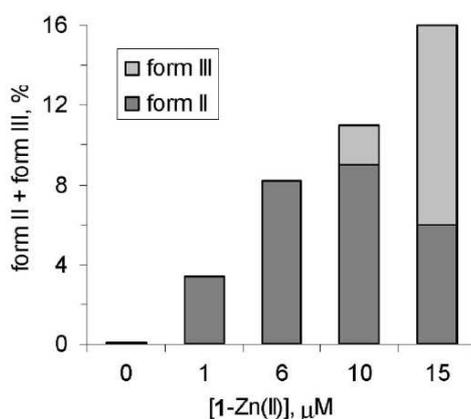


Figura 78: Idrolisi del DNA plasmidico pBR 322 dopo incubazione con concentrazioni variabili di AuNp2·Zn(II). $[DNA_{pp}] = 12\mu M$. $[HEPES] = 20 mM$, pH 7, 37°C, 24 h.

In queste condizioni la costante di pseudo primo ordine è di circa $2 \cdot 10^6$, che corrisponde ad un'accelerazione di 5 ordini di grandezza rispetto alla reazione non catalizzata. La reattività del legante di confronto **39** è risultata essere nulla. Non si è potuto aumentare ulteriormente la concentrazione di nanoparticelle in quanto una concentrazione di **AuNp2**·Zn(II) superiore a 15 μM causa la precipitazione di complessi DNA-nanoparticelle. Il risultato più sorprendente però è che più del 50% del prodotto della reazione è composto da DNA lineare (*figura 78*), fatto inusuale e significativo in quanto, statisticamente, per ottenere questo prodotto sono necessari più di 100 eventi idrolitici casuali (infatti la formazione del DNA lineare avviene solo quando due eventi di scissione si verificano sulle due catene complementari a una distanza inferiore alle 12 coppie di basi).

Questo fenomeno, come verrà illustrato in seguito, può essere originato da una grande stabilità del complesso DNA-nanoparticella e quindi dall'idrolisi simultanea di una molecola di DNA in diversi punti.

3.7. Reattività esterolitica delle nanoparticelle d'oro passivate con il legante **49**

I risultati positivi ottenuti con le nanoparticelle passivate con il tiolo **48** e Zn(II) mi hanno indotto ad investigare sistemi analoghi basati su ioni metallici differenti. L'utilizzo del legante **49** mi ha consentito di preparare nanoparticelle contenenti elevate quantità di Ce(IV) nel monostrato passivante. Le nanoparticelle sono state preparate come descritto all'inizio del capitolo utilizzando il solo tiolo **49** e sono risultate completamente solubili in acqua. Le dimensioni medie sono risultate essere 1.6 ± 0.6 nm. Una soluzione a pH neutro del complesso **NpCe(IV)**, ottenuto mescolando una soluzione di nanoparticelle con una di $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$ è risultata essere stabile per molti giorni e, in questo periodo, la reattività è risultata essere molto riproducibile.

L'attività idrolitica delle nanoparticelle **NpCe(IV)** è stata testata utilizzando ancora una volta il substrato modello del DNA: il BNP. La reazione è stata condotta alla temperatura di 25°C, seguendo la formazione del prodotto *p*-nitrofenato a 400 nm, fino all'idrolisi di almeno il 90% del substrato. Anche in questo caso si è rilevata

Risultati

l'espulsione di entrambi i gruppi *p*-nitrofenilici. Le costanti cinetiche sono state ottenute mediante regressione lineare dei valori di assorbanza nel tempo con l'equazione che prevede due step idrolitici consecutivi.

Come composto di riferimento per la valutazione dell'effetto cooperativo dei centri metallici è stato sintetizzato il legante **53**, recante la stessa unità legante (la N_{α},N_{α} -Bis(carbossimetil)-L-Lisina) acetilata all'ammina terminale.

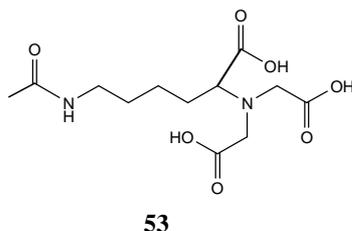


Figura 80: Struttura del legante 53.

La reattività delle nanoparticelle è risulta molto elevata: in presenza di una concentrazione di unità metalliche pari a 50 μM e a pH 7, il BNP viene completamente idrolizzato in sole 4 ore (2 milioni di volte più velocemente della reazione non catalizzata) e il primo step (*figura 81*) risulta essere circa quattro volte maggiore del secondo. Come accade nel caso di cluster di Ce(IV) o di suoi complessi la reattività non è fortemente influenzata dal pH, infatti la reattività a pH 10 è soltanto il doppio di quella a pH 7, il che indica la presenza della specie attiva ad ogni valore di pH (*figura 82*).

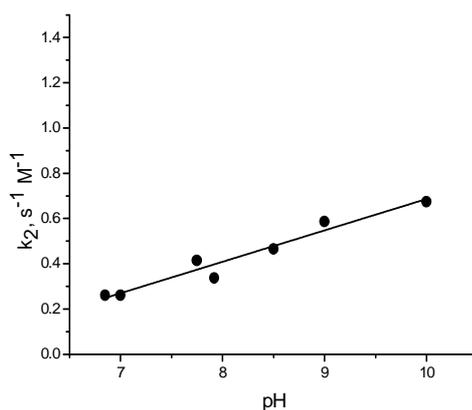


Figura 81: Dipendenza della velocità di reazione dal pH per le nanoparticelle passivate con il complesso di Ce(IV) Condizioni: $T=25^\circ\text{C}$, $[\text{NpCe(IV)}]=5 \cdot 10^{-5} \text{M}$, $[\text{tampone}]=5 \cdot 10^{-3} \text{M}$, $[\text{BNP}]=2 \cdot 10^{-5} \text{M}$.

In *figura 82* è riportato il profilo di reattività per la prima e la seconda idrolisi in funzione della concentrazione di ione Ce(IV) aggiunto ad una soluzione contenente il

tampone e le nanoparticelle passivate, fino al raggiungimento della saturazione dei siti leganti. L'analisi di questo grafico conferma che le specie reattive sono i complessi di Ce(IV) formati sulla superficie delle nanoparticelle, infatti la reattività aumenta fino alla saturazione dei leganti per poi livellarsi.

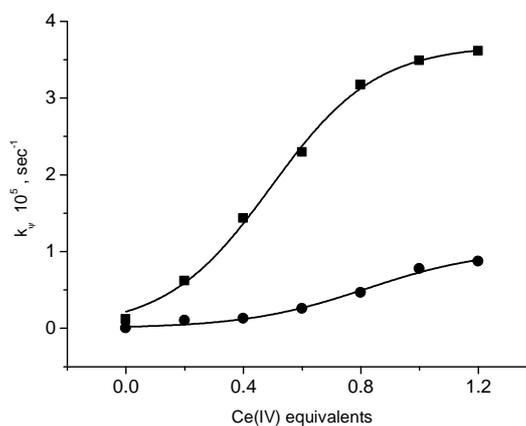


Figura 82: Costanti cinetiche dell'idrolisi del BNP mediate dalle $NpCe(IV)$ ($5 \times 10^{-5}M$) in funzione degli equivalenti di $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ aggiunti a pH 8.0 (■, prima idrolisi, ● seconda idrolisi). $[tampone] = 5 \times 10^{-3}M$, $[BNP] = 2 \times 10^{-5}M$, $25^\circ C$.

Il profilo sigmoidale delle curve indica una buona cooperatività tra i centri metallici. Probabilmente delle specie bi- o tri- metalliche si formano spontaneamente sulla superficie delle nanoparticelle. I punti di flesso delle curve del primo e del secondo step sono rispettivamente a 0.5 e 0.8 equivalenti di ione metallico. Questo spostamento è probabilmente indica una maggior reattività dei siti polimetallici nei confronti dell'intermedio *p*-nitrofenilfosfato.

La buona cooperatività del sistema è stata confermata dall'andamento a saturazione del grafico di *figura 83*, dove si è diagrammata la reattività contro la concentrazione di substrato.

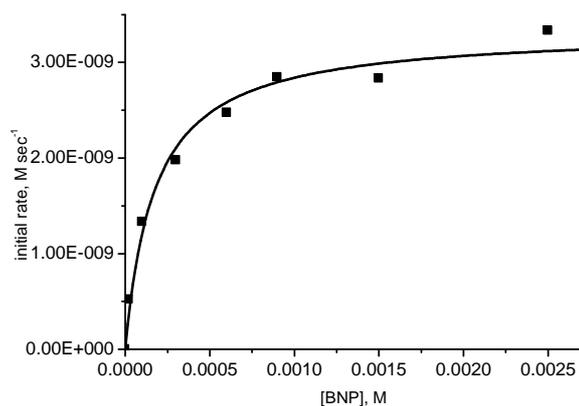


Figura 83: Velocità di idrolisi del BNP mediata da $NpCe(IV)$ in funzione della concentrazione di substrato. Condizioni: $[NpCe(IV)] = 5.0 \cdot 10^{-5} M$, $[tampono] = 5.0 \cdot 10^{-3} M$, $pH = 8.0$, $25^\circ C$.

Mediante fitting con l'equazione di Michaelis-Menten si è ottenuta la costante di affinità catalizzatore-substrato. Il valore particolarmente elevato ($5700 M^{-1}$) della costante di affinità supporta la natura multimetallica della specie attiva ed è comparabile a quella dei cluster di cerio ritenuti responsabili della reazione di idrolisi osservata in assenza di leganti.

Catalizzatore	$k_2 [s^{-1} M^{-1}]$	k_{rel}
OH^-	2.4×10^{-5a}	1
27-Ce(IV)	4.3×10^{-3b}	179
25-Ce(IV)₂	0.1^c	4167
Ce(IV) Brij/Palmitate ⁽⁵⁴⁾	0.6^e	25000
$NpCe(IV)$	0.93	38750
$(NH_4)_2Ce(NO_3)_6$	40^f	1.7×10^6

Tabella 7: Costanti cinetiche apparenti di secondo ordine (k_2) per l'idrolisi del BNP e reattività relative (k_{rel}) per alcune fosfatasi a base di Ce(IV) ($pH 7$, $40^\circ C$). ^a $35^\circ C$, ^b $25^\circ C$, ^c $37^\circ C$, ^d $25^\circ C$ $pH 7.5$, ^e $37^\circ C$ $pH 7$, ^f $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ in imidazolo 10mM a $pH 7$.

In *tabella 7* sono riportate le reattività di alcuni sistemi mono, bi e polimetallici di Ce(IV). Si può osservare che tutti i composti sono meno reattivi della soluzione di $(NH_4)_2Ce(NO_3)_6$: ciò è dovuto all'effetto della complessazione da parte di gruppi elettrondonatori (ammine e/o carbossilati) che diminuiscono l'entità della carica positiva dello ione metallico e impediscono la formazione degli ossocluster responsabili della reattività di questo ione. I complessi bimetallici mostrano una buona

cooperatività tra gli ioni metallici e, in genere, sono circa 10 volte maggiormente reattivi dei rispettivi sistemi monometallici. L'approccio supramolecolare, investigato mediante l'uso di micelle o, nel nostro caso, delle nanoparticelle d'oro passivate, ha dato i migliori risultati: una soluzione di Ce(IV) e Brij/Palmitato provoca un aumento della reattività di base di 25000 volte, mentre con le nanoparticelle d'oro ricoperte con il legante **49** da me studiate si è ottenuto un aumento di 38750 volte. Bisogna inoltre sottolineare che il complesso di riferimento **53·Ce(IV)** libero si è rivelato essere completamente non reattivo nell'idrolisi del substrato BNP.

3.8. Reattività esterolitica delle nanoparticelle d'oro passivate con il tiolo 50

Anche nel caso delle nanoparticelle ricoperte con il legante **50** non si è reso necessario l'inserimento di un secondo tiolo nel monostrato in quanto, sia le nanoparticelle ricoperte con il solo legante che con il complesso di Co(III) risultano essere solubili in acqua. E' quindi stato preparato solamente un campione di particelle d'oro dal diametro di circa 2 nm (**NpCo(III)**) ricoperte al 100% con l'unità legante.

La sintesi delle nanoparticelle ricoperte con il complesso di cobalto si è rivelata però molto difficoltosa in quanto lo ione Co(III) presenta una bassa costante di scambio dei leganti. La sintesi dei suoi complessi avviene normalmente facendo bollire una soluzione acquosa di un sale del metallo (solitamente $\text{Na}_3[\text{Co}(\text{CO}_3)_3] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) con l'opportuno legante⁽³⁸⁾. Questa procedura fornisce però il complesso di Co(III) con carbonato come controione. E' noto in letteratura che questo tipo di complessi sono cineticamente inerti allo scambio del carbonato e non sono quindi reattivi nell'idrolisi dei diesteri fosforici, al contrario dei rispettivi cloruri. Per la conversione del carbonato nel cloruro è necessario disciogliere più volte il carbonato in una soluzione di HCl concentrato e portare a secchezza. Questa procedura non è però compatibile con la presenza della nanoparticella d'oro passivata, poiché l'esposizione ad acidi forti porta alla degradazione del monostrato ed al rilascio dei tioli.

Un primo approccio sperimentato è stato quello di sintetizzare il complesso di Co(III) del legante ancora protetto con un gruppo acetile alla funzione tiolica, convertire il carbonato in cloruro (durante i passaggi in acido il gruppo acetile viene rimosso) e

successivamente utilizzare il complesso così preparato per passivare la superficie delle nanoparticelle. Questa strada purtroppo non ha dato l'esito sperato in quanto, il tiolo interagisce con lo ione Co(III) formando polimeri insolubili.

Ho quindi deciso di preparare delle nanoparticelle ricoperte con il legante **50**, che sono rivelate essere solubili in acqua, metallarle totalmente con un sale di Co(II), il quale al contrario del Co(III) scambia velocemente i leganti, e successivamente ossidare il metallo mediante semplici trattamenti con aria (precedentemente purificata dall'anidride carbonica)⁽⁴⁸⁾. Per questo motivo non è stato possibile studiare la reattività a diversi loading di metallo. La soluzione madre di nanoparticelle in acqua, mantenuta sotto azoto e a temperatura ambiente si è rivelata essere stabile per alcune settimane e la reattività molto riproducibile. Seguendo i protocolli riportati in letteratura, l'idrolisi del BNP in presenza della nanoparticelle ricoperte con il complesso Co(III)-Cyclen è stata condotta alla temperatura di 50°C, seguendo la formazione del prodotto *p*-nitrofenato a 400 nm, fino all'idrolisi di almeno il 90% del substrato.

3.8.1. Determinazione della reattività esterolitica nei confronti del BNP

Anche nel caso di queste nanoparticelle, nelle condizioni di reazione utilizzate ($[BNP] = 2 \cdot 10^{-5} M$, $[NpCo(III)] = 2.5 \cdot 10^{-5} M$) i profili cinetici rivelano il rilascio di entrambe le unità di *p*-nitrofenolo con il primo stadio circa 4 volte più veloce del secondo. Come conseguenza i dati degli esperimenti cinetici sono stati interpolati con un modello che prevede due reazioni di idrolisi consecutive.

Come composto di riferimento per la valutazione dell'effetto cooperativo dei centri metallici è stato sintetizzato il complesso di Co(III) del legante **54**, recante la stessa unità legante e una semplice catena alchilica composta da otto atomi di carbonio.

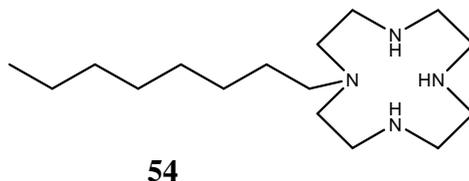


Figura 84: Struttura del legante di riferimento 54

I successivi esperimenti sono stati dedicati a valutare la dipendenza della velocità di reazione in funzione del pH. I profili ottenuti per il campione di nanoparticelle e per il

complesso del legante di riferimento **54**, nelle stesse condizioni sono riportati in *figura 85*.

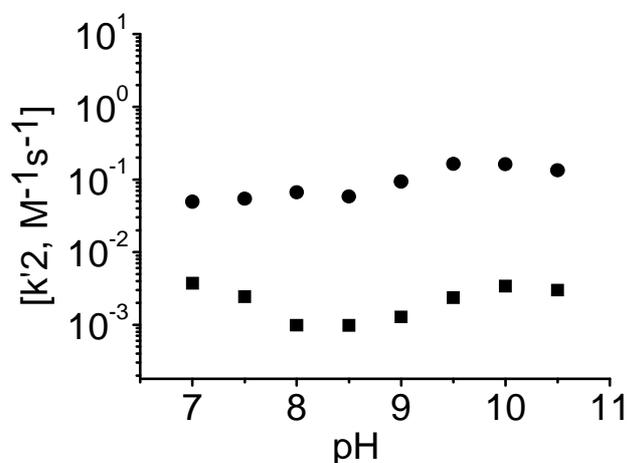


Figura 85: Dipendenza della velocità di reazione dal pH per le nanoparticelle $NpCo(III)$ (●) e per il complesso di riferimento **54** (○). Condizioni: $T=50^\circ C$, $[NpCo(III)]=5 \cdot 10^{-4} M$, $[tampono]=5 \cdot 10^{-3} M$, $[BNP]=2 \cdot 10^{-5} M$; $[54]=3 \cdot 10^{-4} M$, $T=50^\circ C$, $[tampono]=0.05 M$, $[BNP]=2 \cdot 10^{-4} M$.

I risultati ottenuti, confrontati a quelli del complesso di $Co(III)$ del legante di riferimento ottilciclen, confermano l'andamento delle particelle precedentemente studiate. Il profilo della reattività ottenuto, per le particelle $NpCo(III)$ e per il complesso **54**· $Co(III)$ mostra che la reattività non varia sostanzialmente al variare del pH. Il punto da sottolineare è comunque la maggior reattività delle nanoparticelle confrontate con il complesso libero: a pH 9 esse sono circa 40 volte più efficaci. La costante di pseudo secondo ordine osservata in queste condizioni è di $0.054 M^{-1}s^{-1}$, ben 30000 volte più della reazione non catalizzata.

3.8.2. Determinazione delle costanti di binding

Nel grafico riportato in *figura 87* è possibile osservare per il campione $NpCo(III)$ il tipico profilo a saturazione della velocità con l'aumento della concentrazione di substrato ed il rispettivo fitting effettuato con l'equazione di Michaelis-Menten.

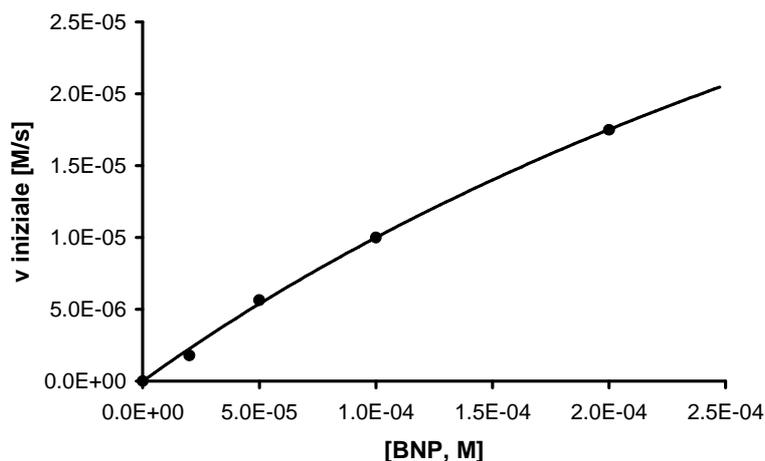


Figura 87: Velocità di idrolisi del BNP per $NpCo(III)$ in funzione della concentrazione di BNP. Condizioni: $[NpCo(III)] = 2.50 \cdot 10^{-5} M$, $[HEPES] = 5.0 \cdot 10^{-2} M$, $pH = 7.0$, $50 \text{ }^\circ C$. La costante di binding ottenuta (K_{BNP}) è $1.64 \cdot 10^4 M^{-1}$.

La costante di binding substrato-catalizzatore è risultato essere di $1.64 \cdot 10^3 M^{-1}$, se si tiene conto che l'affinità dei complessi di ciclen per il BNP è molto bassa, con valori della costante di binding dell'ordine di qualche unità, il valore misurato per le particelle risulta molto elevato e sembra indicare la partecipazione di più centri metallici nell'interazione con il substrato. Infatti, nel caso del composto di riferimento **54-Co(III)** la K_{BNP} non è misurabile, in quanto, fino alla concentrazione di 0.02 M di substrato l'andamento è risultato essere rettilineo.

Per ottenere maggiori informazioni sull'affinità dei siti reattivi per gli esteri fosforici ho deciso di determinare l'analoga costante di binding nei confronti del primo prodotto della reazione, il *p*-nitrofenilfosfato (MNP). In *figura 88* è possibile osservare il tipico profilo a saturazione della velocità con l'aumento della concentrazione di substrato ed il rispettivo fitting fornisce un valore della costante di binding di $1.77 \cdot 10^5 M^{-1}$, valore molto elevato e dovuto al carattere dianionico del fosfato.

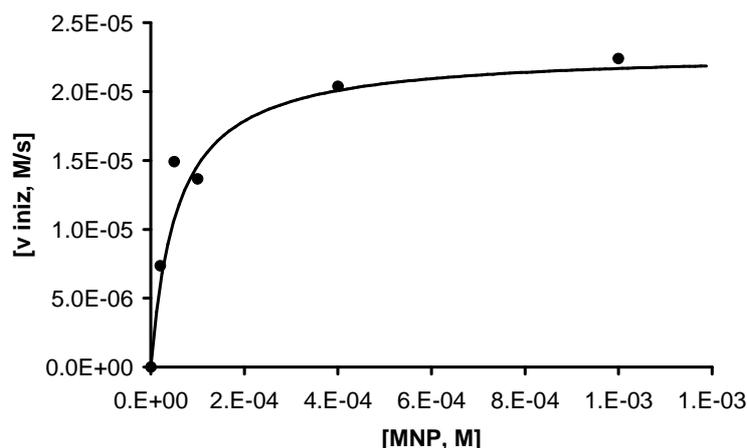


Figura 88: Velocità di idrolisi dell'MNP per $NpCo(III)$ in funzione della concentrazione di MNP. Condizioni: $[NpCo(III)] = 2.50 \cdot 10^{-5} M$, $[HEPES] = 5.0 \cdot 10^{-2} M$, $pH = 7.0$, $50^\circ C$.

3.8.3. Reattività nei confronti del DNA plasmidico delle nanoparticelle $NpCo(III)$

Visti gli ottimi risultati ottenuti sul DNA plasmidico con le nanoparticelle **AuNp2** ho deciso di effettuare lo stesso test per le nanoparticelle ricoperte con i complessi dello ione $Co(III)$. L'incubazione del DNA a $pH 7$ a $37^\circ C$ per 24 ore con il campione $NpCo(III)$ ha evidenziato un'ottima reattività. Come si può osservare in *figura 89*, alla concentrazione di unità metalliche di $4.4 \mu M$ si ottiene l'idrolisi di circa il 13% del DNA incubato.

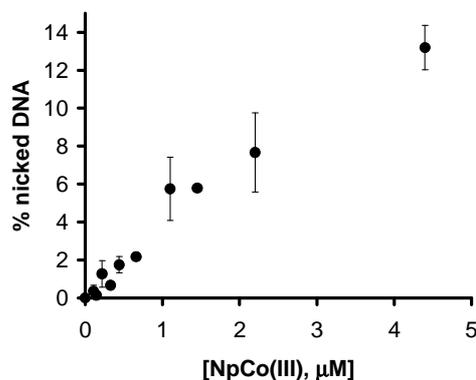


Figura 89: Idrolisi del DNA plasmidico pBR 322 dopo incubazione con concentrazioni variabili di $NpCo(III)$. $[DNA_{bp}] = 12 \mu M$. $[HEPES] = 20 mM$, $pH 7$, $37^\circ C$, 24 h.

Risultati

In queste condizioni la costante di pseudo primo ordine è di circa $4 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$, che corrisponde ad un'accelerazione di più di 5 ordini di grandezza rispetto alla reazione non catalizzata. Anche in questo caso la reattività del legante di confronto libero **54·Co(III)** è risultata essere nulla. Purtroppo non si è potuto aumentare la concentrazione di nanoparticelle in quanto a concentrazioni di nanoparticelle superiori a $5 \mu\text{M}$ si osserva la precipitazione di complessi DNA-nanoparticelle. Il risultato meno atteso, soprattutto visti i promettenti risultati delle nanoparticelle **AuNp2**, è dato dal fatto che non si osserva come prodotto la forma lineare, bensì solamente quella circolare. Nonostante ciò la semplice idrolisi del DNA plasmidico con questo campione è circa due volte più veloce di quelle ricoperte con i complessi di Zn(II).

4. Discussione

I dati presentati in questa prima parte della Tesi mostrano come si possano utilizzare diverse strategie nella realizzazione di sistemi artificiali per l'idrolisi di diesteri fosforici. Utilizzando un approccio di tipo biomimetico è stato possibile esplorare tre diverse strategie utilizzate in natura dagli enzimi:

- l'utilizzo di interazioni non covalenti e di gruppi funzionali organici per aumentare la reattività di agenti idrolitici basati su ioni metallici;
- la realizzazione di complessi bimetallici;
- la realizzazione di sistemi multifunzionali autoassemblati, formati nel nostro caso da nanoparticelle d'oro passivate con complessi di tioli organici recanti unità leganti per ioni metallici.

I risultati ottenuti dipingono un quadro di reattività piuttosto complesso e, se da un lato mostrano la difficoltà di progettare sistemi in grado di produrre una reattività in grado di avvicinarsi a quella degli enzimi, dall'altro indicano come sia possibile incrementare l'efficacia dei sistemi artificiali utilizzando sistemi in grado di mettere in gioco contemporaneamente diversi tipi diversi di effetti catalitici.

Anche se la reazione di idrolisi di diesteri fosforici catalizzata da complessi di ioni metallici è oggetto di studi da diversi anni, ci sono molti aspetti ancora da chiarire. Il meccanismo generalmente accettato è già stato esaminato nell'introduzione ma è utile, al fine di comprendere meglio le indicazioni che emergono dai risultati ottenuti, richiamarne brevemente i punti salienti. Esso prevede come primo passaggio la deprotonazione di una molecola d'acqua coordinata allo ione metallico (K_a), la successiva formazione di complesso metallo-substrato (K) e, finalmente, l'attacco nucleofilo (k') intracompleso dell'ossidrile sul substrato stesso con la contemporanea espulsione di un residuo alcolico. La deprotonazione del prodotto e la sua successiva dissociazione dal metallo completano il ciclo catalitico.

I passaggi chiave quindi sono due: la formazione del complesso metallo-substrato e l'attacco intramolecolare da parte del nucleofilo. Una delle ragioni dell'elevata stabilità dei diesteri fosforici verso le reazioni di idrolisi è proprio la repulsione elettrostatica tra il substrato e lo ione idrossido, entrambi carichi negativamente. Per questo motivo, il

primo stadio della reazione riveste una notevole importanza, perché porta l'ossidrilico in prossimità del substrato annullando la repulsione elettrostatica e trasformando la reazione da intermolecolare a intramolecolare. Lo ione metallico svolge un secondo ruolo fondamentale agendo come acido di Lewis: da un lato promuove la deprotonazione di una molecola d'acqua coordinata, consentendo così la formazione di un nucleofilo efficace anche a pH prossimi alla neutralità, dall'altro polarizza il substrato rendendolo più reattivo verso l'attacco del nucleofilo.

E' ormai chiaro come l'efficacia idrolitica di un singolo ione metallico non sia in grado di superare certi limiti ed anche l'utilizzo di leganti differenti porta a variazioni solo marginali della reattività dei sistemi. Diversi esempi pubblicati da numerosi gruppi di ricerca, indicano come sia possibile aumentare sensibilmente la reattività di complessi monometallici attraverso l'inserimento nella struttura del legante di gruppi organici in grado di cooperare positivamente all'attività catalitica. Analogamente ai gruppi funzionali degli amminoacidi presenti nel sito attivo degli enzimi, questi gruppi possono cooperare alla formazione del complesso metallo-substrato, stabilizzare lo stato di transizione, assistere l'uscita del frammento alcolico e fornire un nucleofilo più reattivo. Rimane però difficile individuare i gruppi più efficaci e progettare l'opportuna disposizione in modo da ottimizzare il loro apporto. I gruppi donatori di legami a idrogeno presenti nella 2-amminopiridina presentano questa caratteristica: nei complessi di Zn(II) dei leganti studiati, essi si trovano nella posizione ideale per formare due forti legami a idrogeno con l'atomo di ossigeno del substrato coordinato al metallo. Nonostante questo atomo di ossigeno benefici già dell'interazione con lo ione metallico, l'effetto di questi due legami a idrogeno intracomplexo è notevole e porta ad un aumento di reattività di due ordini di grandezza nel caso dell'idrolisi del BNP.

In studi precedenti svolti nel gruppo di ricerca in cui ho svolto il mio lavoro di tesi, erano stati effettuati diversi tentativi di introdurre nella struttura base del legante BAPA altri gruppi funzionali in grado di portare ad ulteriori benefici in termini di reattività: la trasformazione dei gruppi amminopiridinici in ammidi, uree e guanidini ha però portato solo alla drastica riduzione dell'efficacia idrolitica dei complessi di Zn(II). Infatti, da un lato questi gruppi erano posizionati in modo da potersi legare al metallo saturandolo coordinativamente, dall'altro la loro localizzazione nella struttura del complesso non li rendeva capaci di interagire positivamente con il substrato durante la reazione.

Queste considerazioni, e l'esame della struttura del sito attivo di diverse nucleasi, ha portato alla progettazione del legante **42**. In molti enzimi, tra cui le endonucleasi di tipo II, è infatti presente un gruppo amminico (protonato a pH fisiologico), appartenente alla catena laterale di una lisina, posizionato giusto dietro il nucleofilo attivo (una molecola d'acqua coordinata allo ione metallico). Il ruolo di questo gruppo amminico non è ancora stato chiarito, le ipotesi più accreditate propongono la stabilizzazione dello stato di transizione per effetto elettrostatico o tramite legami a idrogeno o l'assistenza alla deprotonazione del nucleofilo, ma la sua rimozione in studi di mutagenesi ha rivelato come esso sia di fondamentale importanza per la reattività dell'enzima.

I calcoli teorici effettuati sul complesso ternario **42**·Zn(II)·BNP dimostrano come il gruppo amminico primario del legante abbia la possibilità di svolgere entrambi i ruoli proposti per l'enzima, trovandosi nella posizione corretta per interagire sia con il gruppo alcolico del legante che con l'atomo di ossigeno non coordinato del substrato.

Il quadro di reattività ottenuto degli studi effettuati è molto interessante. Da un lato, l'inserimento del gruppo amminico ha portato effettivamente ad un aumento dell'acidità del gruppo alcolico coordinato al metallo. Dall'altro a questo aumento di acidità ha corrisposto una diminuzione di reattività ed il complesso si rivela meno efficace di quelli studiati in precedenza. Questo risultato poteva essere in qualche modo atteso, dal momento che la diminuzione della pKa del nucleofilo comporta necessariamente una riduzione della sua reattività.

Il confronto con il legante **41**, che fortunatamente dispone di un gruppo nucleofilo alcolico con la stessa acidità (nel complessodi Zn(II)) di quello del gruppo alcolico in **42**, e lo studio della reattività dei complessi nei confronti dagli altri due substrati rivela interessanti informazioni. I complessi di **41** e **42** hanno la stessa reattività, minore dei complessi di **40**, nei confronti del PNPA. Dal momento che questo substrato si scinde attraverso un meccanismo puramente nucleofilo, i risultati ottenuti indicano che il potere nucleofilo dell'alcolato del legante dipende essenzialmente dalla sua basicità. Nonostante ciò il complesso del legante **42** è risultato essere ben 15 volte maggiormente reattivo del complesso **41** nei confronti del BNP. Questo potrebbe indicare che il gruppo ammonio primario del legante **42** da un lato deprime la reattività del complesso rendendo il gruppo nucleofilo meno efficace e dall'altro stabilizzi lo stato di transizione, tramite legami a idrogeno o per effetto elettrostatico, compensando

parzialmente la minor efficacia del nucleofilo. Questo quadro sembra essere confermato dai valori di reattività nei confronti del substrato HPNP, la cui scissione idrolitica non prevede il ricorso a specie nucleofiliche coordinate allo ione metallico. Infatti, in questo caso, il complesso di **42** è risultato essere maggiormente reattivo degli altri due complessi di riferimento, grazie all'effetto stabilizzante esercitato dal gruppo ammonio, diventando il complesso monometallico di Zn(II) più efficace verso l'HPNP,

Per quanto riguarda il meccanismo di azione del gruppo Lys presente nel sito attivo degli enzimi idrolitici, i risultati ottenuti non permettono di formulare ipotesi definitive ma mettono in risalto alcuni punti meritevoli di ulteriore approfondimento. La presenza del gruppo amminico ha sicuramente un effetto positivo sulla reazione, probabilmente stabilizzando lo stato di transizione dianionico. D'altro canto l'interazione con il nucleofilo ne diminuisce la reattività in modo molto marcato proprio a causa della diminuzione di basicità. Contrariamente al consenso generale, il primo meccanismo potrebbe essere quindi quello corretto per il residuo di Lys delle nucleasi, anche se saranno necessari ulteriori studi per suffragare questa ipotesi.

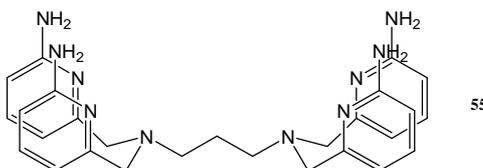
La seconda strada esplorata per migliorare la reattività dei sistemi a base del legante bis(metilamminopiridinil)ammina (**BAPA**) è la realizzazione di sistemi bimetallici. Come descritto nell'introduzione (*paragrafo 1.3.2.*) questo tipo di approccio, utilizzato negli enzimi naturali, permette di attivare in maniera più efficiente il substrato rendendolo maggiormente reattivo nei confronti del nucleofilo. Nei sistemi da me studiati, come nel caso di tutti i complessi bimetallici di Zn(II) proposti in letteratura come agenti idrolitici per il BNP, si è osservata una scarsa cooperatività tra i centri metallici e un conseguente uno scarso aumento della reattività rispetto ai rispettivi sistemi monometallici.

Le ragioni di questo risultato sono da ricercarsi con tutta probabilità nella saturazione dei siti di coordinazione degli ioni metallici, dovuta alla presenza del gruppo disolfuro o forse anche di ponti μ -idrossido, che impedisce la complessazione contemporanea del substrato e del nucleofilo. E' stato possibile dimostrare mediante spettroscopia $^1\text{H-NMR}$ la coordinazione del gruppo disolfuro allo ione metallico, che porta da un lato all'avvicinamento degli ioni Zn(II) ed alla necessaria pre-organizzazione del complesso e dall'altro all'occupazione di uno dei due siti di coordinazione ancora disponibili sugli ioni metallici.

Nei confronti del DNA plasmidico superavvolto si sono ottenuti dati inaspettati. I complessi di Zn(II) derivati dalla **BAPA**, come il complesso monometallico **39**, si sono infatti rivelati molto poco attivi verso questo substrato. La reattività dei derivati contenenti il gruppo disolfuro appare decisamente più elevata, anche se non sono chiare le origini di quest'effetto. In definitiva, però, i sistemi bimetallici realizzati sono sembrati caratterizzati da una scarsa efficacia.

L'uso delle nanoparticelle d'oro passivate con complessi di metalli di transizione come sistemi multivalenti preorganizzati per l'idrolisi di diesteri fosforici si è rivelato invece un approccio molto efficace. Per quanto riguarda il sistema basato sui leganti di tipo **BAPA** e Zn(II) in *tabella 8* sono riportati i valori di reattività e le costanti di binding dei complessi maggiormente reattivi ritrovati in letteratura: le diciture **[AuNpn·Zn(II)]** e **[AuNpn·Zn(II)]₂** indicano rispettivamente i siti mono e bimetallici dei campioni di nanoparticelle studiati.

Il legante **55**, la cui struttura è qui sotto riportata, è stato da me sintetizzato per valutare la reattività e la costante di binding di un sito bimetallico non preorganizzato.



catalizzatore	k_2 ($M^{-1}s^{-1}$)	K_{DMP} (M^{-1})	k_{rel}
OH ⁻	$2.4 \cdot 10^{-5}$ ^a	-	1
39 ·Zn(II)	0.012 ^b	$1.0 \cdot 10^2$	500
55 ·Zn(II) ₂	0.0055 ^b	$3.1 \cdot 10^2$	230
[AuNp1·Zn(II)]	0.11 ^b	$1.3 \cdot 10^2$	4583
[AuNp1·Zn(II)]₂	1.5 ^b	$2.2 \cdot 10^3$	62500
[AuNp2·Zn(II)]	0.45 ^b	$4.7 \cdot 10^4$ (K_{BNP})	18750
[AuNp2·Zn(II)]₂	1.4 ^b	$8.3 \cdot 10^{-2}$	58333
pseudoHis ·Zn(II)	0.0030 ^d	$3.7 \cdot 10^3$	125
BPAN ·Zn(II) ₂	$1.7 \cdot 10^{-4}$	-	7
QX-TACN ·Zn(II) ₂	$8.6 \cdot 10^1$ (K_{BNP})	-	175
	0.0042 ^e		

Tabella 8: costanti di secondo ordine apparenti (k_2) per l'idrolisi del BNP, costanti di binding del DMP e reattività relative (k_{rel}), pH 7, 40°C. ^a35°C, ^bpH 8, ^d50°C, ^epH 11

Analizzando i dati riportati in *tabella 8* si può osservare che la reattività dei siti bimetallici di entrambe le nanoparticelle analizzate è ben due ordini di grandezza maggiore di quella del legante di riferimento **39** ed ad altri cotalizzari monometallici riportati in letteratura. I valori delle costanti di binding confermano la struttura bimetallica della specie attiva: infatti valori di K_{DMP} dell'ordine delle centinaia è tipico dei sistemi monometallici,⁽³⁹⁾ mentre valori intorno a 2700 indicano la complessazione simultanea del substrato con due ioni metallici.⁽⁴⁰⁾ Nel caso del campione **AuNp2**, per il quale è stato possibile misurare anche K_{BNP} , si è potuto evidenziare un rilevante contributo di binding idrofobico in quanto K_{BNP} è circa 20 volte maggiore di K_{DMP} . Questo effetto è dovuto alla presenza nella struttura del BNP dei gruppi fenilici, assenti nell'inibitore, che potrebbero aumentare l'affinità del substrato per il monostrato passivante.

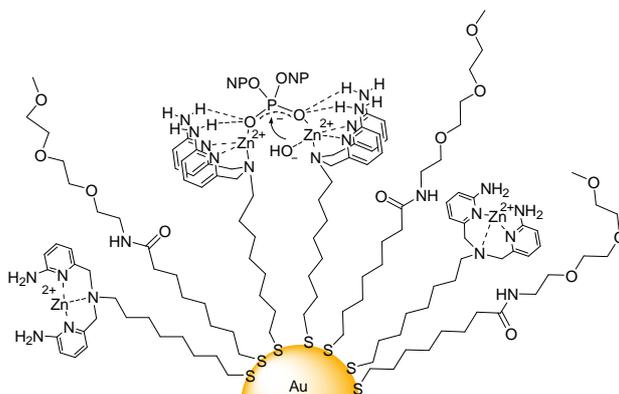


Figura 90: Possibile struttura dei siti mono e bimetallici per i campioni di nanoparticelle in esame.

Un dato curioso è la maggior reattività (circa quattro volte) dei siti monometallici di **AuNp2** rispetto a **AuNp1**. Questa discrepanza può essere dovuta al differente binding. Il valore più elevato di K_{DMP} osservato per i siti monometallici di **AuNp2** è probabilmente dovuto all'interazione contemporanea del substrato con un ione metallico e con un gruppo amminico adiacente protonato (*figura 91*). Se questo è il meccanismo la notevole differenza tra i due campioni è dovuta essenzialmente alla maggior quantità di leganti protonati presenti in **AuNp2** rispetto alle nanoparticelle **AuNp1**⁽³³⁾.

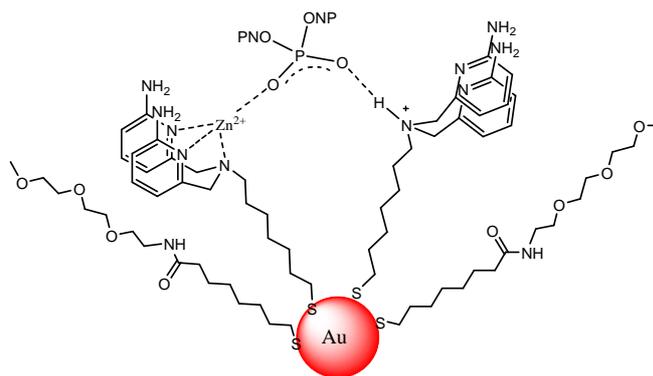


Figura 91: Possibile struttura del complesso $[AuNp2-Zn(II)]-BNP$.

La reale efficienza delle nanoparticelle d'oro si evidenzia nel confronto della reattività con il composto $55 \cdot Zn(II)_2$. In entrambi i casi due unità identiche si trovano in prossimità tra loro con una scarsa preorganizzazione; nel caso delle nanoparticelle passivate si è ottenuto un notevole aumento della reattività, mentre per il composto bimetallico $55 \cdot Zn(II)_2$ si ha addirittura il dimezzamento della k_2 .

Il risultato più sorprendente e inatteso è stato quello relativo alla reattività verso il DNA plasmidico superavvolto. Infatti le nanoparticelle **AuNp2** non solo sono in grado di promuovere l'idrolisi di questo substrato con discreta efficacia, ma danno come prodotto preferenziale la forma lineare, statisticamente sfavorita. Questo effetto è dovuto essenzialmente al carattere multivalente del sistema, che è in grado di promuovere più reazioni idrolitiche simultaneamente, probabilmente anche verso nucleotidi spazialmente lontani nella struttura del DNA.

Le nanoparticelle ricoperte con i complessi di Ce(IV), ione molto promettente nell'idrolisi di diesteri fosforici, si sono rivelate, nell'idrolisi dell'estere modello BNP, un ottimo sistema idrolitico. Esse, a pH 7 e temperatura 25°C, promuovono l'idrolisi di questo substrato con una costante del secondo ordine di $0.30 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, che si traduce in una diminuzione del tempo di semivita da 2000 anni ad alcune ore. Questo sistema, analogamente al precedente, è inoltre in grado di promuovere anche l'idrolisi dei monoesteri fosforici. Infatti i prodotti di idrolisi nei confronti del substrato BNP sono le due unità alcoliche e lo ione fosfato. Inoltre, contrariamente allo ione Ce(IV) in assenza di leganti organici (che forma gel polimerici come specie attiva), il sistema da me studiato si è rivelato essere stabile, solubile in acqua, molto riproducibile e con una buona reattività esterolitica. Dai dati cinetici ottenuti la reattività del sistema è dovuta

alla cooperazione tra i diversi centri metallici presenti nel monostrato organico, con un meccanismo analogo a quello ipotizzato per gli ossocluster presenti nei gel di cerio e per i complessi bimetallici. Sorprendentemente, la reattività delle nanoparticelle qui studiate non è molto superiore a quella dei sistemi micellari studiati da Moss. La grande tendenza del Ce(IV) a formare ossocluster lo rende capace di formare specie multimetalliche anche nel caso di sistemi dinamici come le micelle, rendendo meno evidente il vantaggio portato dall'utilizzo di sistemi non dinamici come le nanoparticelle. Inoltre, queste nanoparticelle sono risultate inefficaci nei confronti del DNA plasmidico.

Le nanoparticelle ricoperte con il complesso tetraazamacrociclico di Co(III), ione molto usato nell'idrolisi dei diesteri fosforici, si sono rivelate, nell'idrolisi del BNP e del DNA plasmidico, un buon sistema idrolitico. Nei confronti del substrato BNP la reattività delle nanoparticelle passivate è a circa 15 volte superiore a quella del complesso di riferimento **54·Co(III)**. Il vantaggio di reattività del sistema autoassemblato, nei confronti del legante libero, è risultato essere inferiore a quello ottenuto con i complessi di Zn(II) e Ce(IV), probabilmente a causa della bassa costante di associazione substrato-sito catalitico. Il contrario avviene invece con il prodotto del primo step della reazione (MNP), che risulta avere una alta costante di binding, misurata tramite una cinetica a saturazione tipo Michaelis-Menten.

Nei confronti del DNA plasmidico si è osservato invece un diverso comportamento: le nanoparticelle ricoperte con il complesso di Co(III) del ciclen presentano una reattività doppia rispetto a quelle ricoperte con il complesso di zinco. Infatti alla concentrazione di 4.5 μM di ione metallico si è osservata l'idrolisi del 13% del DNA plasmidico superavvolto. In questo caso, però, non si è osservata la formazione della forma lineare. Inoltre non è stato possibile esplorare la reattività a concentrazioni maggiori di catalizzatore in quanto si osserva la precipitazione di addotti DNA-nanoparticella.

I risultati illustrati in questa relazione costituiscono un promettente punto di partenza per nuove investigazioni, che potrebbero da un lato fornire informazioni sul meccanismo della reazione e dall'altro portare a sistemi ancora più efficaci.

La realizzazione di sistemi basati sulla cooperazione con gruppi ausiliari organici richiederà di migliorare la capacità di progettare la struttura del legante in modo di ottenere il corretto posizionamento dei gruppi funzionali. Ancora più delicato appare il caso dei leganti bimetallici, in cui sarà necessario trovare il modo di pre-organizzare il sistema, mantenendo in due centri metalli ad una distanza prefissata, impedendo contemporaneamente la saturazione dei siti di coordinazione sul metallo da parte dei leganti o di ponti μ -idrossido.

L'approccio basato sulle nanoparticelle si presenta come il più efficace, con alcune possibilità suggestive come quella del doppio taglio della catena di DNA, ed il più semplice dal punto di vista sintetico. Rimane da affrontare il problema della precipitazione del DNA, che si verifica come ovvia conseguenza della neutralizzazione della carica risultante dall'interazione tra un polianione (il DNA) ed un policatione (la particella). In ogni caso, sarà possibile utilizzare le procedure sintetiche e di purificazione messe a punto in questa Tesi per preparare particelle funzionalizzate con proporzioni diverse di due o più tioli con diverse funzioni. Infatti in successive evoluzioni, diversi tioli contenenti altri gruppi funzionali organici (nucleofili, gruppi cationici, donatori di legami a idrogeno ecc) potranno essere introdotti per migliorare la reattività del sistema. Anche elementi di affinità, quali ad esempio gruppi intercalanti o piccoli frammenti di DNA o PNA, potrebbero essere aggiunti nel monostrato di tioli per conferire ai sistemi idrolitici selettività di sequenza. E' stato inoltre possibile esplorare la possibilità di sintetizzare tioli funzionalizzati con unità in grado di legare ioni metallici differenti dallo zinco e maggiormente reattivi⁽²⁴⁻²⁵⁻³⁹⁾ come Ce(IV) e Co(III) con i quali passivare la superficie delle nanoparticelle.

Il vantaggio principale dell'approccio basato sulle nanoparticelle è infatti quello della modularità: diversi gruppi funzionali possono essere preparati separatamente e poi assemblati sulla superficie delle nanoparticelle d'oro, dove essi possono organizzarsi spontaneamente per cooperare all'attività idrolitica. L'utilizzo di questa strategia potrà quindi dare un notevole impulso alla realizzazione di agenti idrolitici artificiali, consentendo la rapida preparazione ed investigazione di un numero elevato di sistemi diversi, capaci di raggiungere, in prospettiva, il loro efficace utilizzo in applicazioni di interesse pratico.

5. Parte sperimentale

5.1 Strumentazione

Lo spettrometro NMR utilizzato è un Bruker AC 250F operante a 250 MHz per spettri protonici e a 62.9 MHz per spettri al ^{13}C . I chemical shift sono riferiti al tetrametilsilano utilizzato come standard interno.

Gli spettri ^{31}P -NMR, ^{19}F -NMR e protonici dei leganti sono stati acquisiti con uno spettrofotometro Bruker AV 300 che per il fosforo opera a 121.5 MHz e per il fluoro a 282.4 MHz. Gli spostamenti chimici degli spettri sono riferiti all' H_3PO_4 in soluzione acquosa all'85% per il fosforo e al CFCl_3 per il fluoro, utilizzati come standard esterni.

La simbologia usata per descrivere i segnali spettrali è la seguente: s = singoletto, d = doppietto, t = tripletto, q = quartetto, qn = quintetto, st = sestetto, m = multipletto, b = allargato.

Gli spettrofotometri, utilizzati sia per la registrazione di spettri UV-VIS che per eseguire le misure cinetiche, sono Perkin-Elmer Lambda 5, Lambda 16 e Lambda 45 dotati di portacelle termostatate a circolazione d'acqua.

Le analisi ESI-MS sono effettuate con lo strumento LC/MSD Trap-SL & XCT della Agilent Technologies.

Le misure potenziometriche sono condotte con un titolatore automatico Metrohm 716 DMS Titrino interfacciato ad un personal computer.

Le analisi termogravimetriche sono state condotte con uno strumento SDT 2960 modello TA in un intervallo di temperatura da 30 a 800°C con una rampa di 20°C/min.

5.2 Materiali e soluzioni

5.3. Solventi e prodotti commerciali

I solventi e i prodotti commerciali generalmente vengono usati senza ulteriore purificazione e, quando necessaria, la purificazione e l'anidrifazione dei solventi è effettuata con tecniche standard.

Soluzione di $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ($4.850 \cdot 10^{-2}$ M): tampone ammoniacale (pH 10) ed indicatore EBT (miscela solida allo 0.1% con NaCl).

La soluzione di Ce(IV) è stata preparata appena prima delle misure cinetiche ed aggiunta subito dopo alla soluzione contenente le nanoparticelle passivate.

5.6. Soluzioni madre di leganti, complessi e substrati

Le soluzioni madre dei leganti in acqua, la cui concentrazione è circa 10^{-2} M, si preparano per pesata e poi vengono titolate per via spettrofotometrica con una soluzione contenente Cu(II) a titolo noto, introdotto come $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$.

I complessi vengono formati direttamente nelle cuvette aggiungendo ad una soluzione acquosa, tamponata al pH desiderato, quantità equimolari di legante e di metallo.

Le soluzioni madri di substrati, di concentrazioni $2 \cdot 10^{-2}$ M in acqua mQ, si preparano per pesata. Conservate in frigorifero rimangono inalterate per molti giorni.

5.7. Titolazioni spettrofotometriche

Le soluzioni madre dei leganti utilizzate nelle misure cinetiche sono titolate con una soluzione di $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ $3.933 \cdot 10^{-2}$ M. Vengono sfruttate le differenze degli spettri UV-VIS delle molecole libere o complessate, seguendo la comparsa di bande caratteristiche. Una cuvetta di quarzo viene riempita con aliquote di soluzione di tampone e di legante fino al volume totale di 2 mL, quindi si aggiungono piccole aliquote (3 o 4 μl) della soluzione standard di Cu(II). Dopo ogni aggiunta viene registrato lo spettro nella regione del visibile e si annotano i valori di assorbanza corrispondenti alla lunghezza d'onda di massimo assorbimento. Si riportano in grafico i valori di assorbanza, corretti per il fattore di diluizione, contro la concentrazione di Cu(II), e dall'intersezione delle due rette a diversa pendenza, date dall'interpolazione dei punti sperimentali, si ottiene il punto equivalente.

5.8. Titolazioni potenziometriche

Le costanti di acidità e di formazione dei complessi sono state determinate mediante titolazioni potenziometriche con NaOH a titolo noto.

Le misure sono state effettuate in presenza di NaCl 0.1 M. Prima di ogni esperimento l'elettrodo è stato calibrato contro l'elettrolita di supporto alla temperatura dell'esperimento titolando una soluzione di HCl 10^{-1} M, con questa operazione si controlla anche che il contenuto di CO₂ della soluzione di NaOH non sia superiore all'1.5%.

In un tipico esperimento 50 mL di una soluzione di analita $1\text{-}5\cdot 10^{-3}$ M e di NaCl 0.1 M vengono titolati con aliquote costanti (50-100 μ l) di NaOH 0.1 M in atmosfera di azoto (saturato del vapore acqueo di una soluzione di NaCl 0.1 M).

I valori delle pK_a vengono ricavati per interpolazione dei dati di pH ottenuti con il programma BEST.

5.9. Misure cinetiche

5.10. Preparazione degli esperimenti

Per i complessi molecolari gli esperimenti cinetici di idrolisi sono effettuati con il metodo delle velocità iniziali e vengono seguite a valori di pH compresi tra 6.0 e 11.0. Per $pH \geq 7.0$ si segue la formazione del p-nitrofenato a 400 nm, per $pH < 7.0$ si considera la formazione del p-nitrofenolo a 340 nm anziché a 317 nm (lunghezza d'onda del massimo di assorbimento del p-nitrofenolo), perché in questa zona i leganti presentano delle bande di forte assorbimento.

Per ogni valore di pH indagato si preparano tre cuvette di quarzo da 3.2 mL ($b = 1$ cm) introducendo 500 μ l di tampone 0.2 M, quantità equimolari di legante e metallo, tali che la concentrazione sia compresa tra $1\cdot 10^{-4}$ e $5\cdot 10^{-4}$ M, e acqua fino al volume finale di 1.980 mL.

Vengono quindi inserite nel portacelle termostato a $25\pm 0.1^\circ\text{C}$ o $40\pm 0.1^\circ\text{C}$. Dopo aver atteso almeno 10 minuti per permettere alle soluzioni di raggiungere l'equilibrio

termico, la reazione viene iniziata iniettando 20 μl della soluzione di substrato, pari a una concentrazione $2 \cdot 10^{-4}$ M.

Si sono eseguiti anche degli studi cinetici lavorando a pH 8.0 e in eccesso di substrato ($[\text{BNP}] = 5 \cdot 10^{-4} \div 3 \cdot 10^{-3}$ M, $[\text{legante}] = [\text{M}] = 5 \cdot 10^{-4}$ M).

Le nanoparticelle **AuNp1** e **AuNp2** sono solubili in metanolo e diventano solubili in acqua solamente in seguito all'aggiunta dello ione metallico. Per questo motivo nell'ambiente di reazione è presente una piccola quantità di metanolo (7%). La concentrazione di unità legante nelle soluzioni madri in metanolo di nanoparticelle sono state determinate mediante titolazioni spettrofotometriche con $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, in maniera analoga ai leganti liberi. Le concentrazioni ottenute sono in buon accordo con i dati osservati mediante misure cinetiche a concentrazione variabile di ione metallico.

Analogamente ai complessi liberi sono stati introdotti 20 μL di una soluzione madre di substrato (BNP o MNP) in 2 mL di soluzione termostata contenente il tampone, le nanoparticelle, lo ione metallico e, quando necessario, il dimetilfosfato nella quantità desiderata. Le reazioni sono state seguite fino all'idrolisi di più del 90% del substrato e le costanti cinetiche sono state determinate mediante regressione non lineare dei valori dell'assorbanza contro il tempo.

Nel caso delle nanoparticelle ricoperte con il legante per lo ione cerio e cobalto i campioni sono risultati essere completamente solubili in acqua. Le concentrazioni di unità legante sono state ottenute mediante integrazione dei segnali $^1\text{HNMR}$ del legante e di un opportuno standard, rispettivamente acetonitrile e nitrometano per le nanoparticelle contenenti l'unità legante per il Ce(IV) e per il Co(III). Gli esperimenti cinetici sono stato condotti in maniera analoga alle precedenti.

5.11. Calcolo delle costanti di pseudo-secondo ordine

Per i leganti non supportati sulle nanoparticelle i dati cinetici sono stati raccolti lavorando in eccesso di legante sono stati elaborati con il metodo delle velocità iniziali seguendo l'aumento di assorbanza fino a circa il 2% di idrolisi di BNP.

Dalla correlazione assorbanza contro tempo si ricavano, tramite il coefficiente di estinzione molare del *p*-nitrofenato, le velocità di reazione secondo l'equazione:

$$dc/dt = (dA/dt)/\varepsilon$$

Riportando le velocità contro la concentrazione di legante si ottengono dei profili lineari. La pendenza di tali profili divisa per la concentrazione di BNP fornisce le costanti di pseudo-secondo ordine k_2' .

Dalle costanti k_2' è possibile ottenere i valori di pK_a delle molecole di H_2O coordinate al metallo e/o dell'ossidrile del legante e il valore della costante di secondo ordine per la reazione tra la specie mono-deprotonata e il BNP, tramite il fitting delle costanti in funzione del pH eseguito con il programma Scientist, secondo l'equazione:

$$k_2' = k_2 \left(\frac{K_a'}{[H^+]} + 1 + \frac{[H^+]}{K_a''} \right)$$

Per quanto riguarda la determinazione delle costanti relative ai campioni di nanoparticelle si è utilizzata l'equazione descritta nel *paragrafo 3.5.1*.

Nel caso dell'idrolisi del fosfato MNP con le nanoparticelle passivate le cinetiche sono state fittate mediante l'equazione della cinetica del primo ordine (equazione 1).

$$A = A_{\text{inf}} e^{-k_2 t} \quad (1)$$

Nel caso dell'idrolisi del substrato BNP delle nanoparticelle d'oro passivate I profile cinetici rivelano il rilascio di entrambe le unità di *p*-nitrofenato, con il primo step più veloce del secondo. Per questo motivo le cinetiche sono state fittate con l'equazione 2, che prevede due reazioni consecutive:

$$A = A_{\text{inf}} \left(1 + \frac{k_{\psi} e^{-k_2 t} + (k_{\psi} - 2k_2) e^{-k_{\psi} t}}{2(k_2 - k_{\psi})} \right) \quad (2)$$

Dove k_{ψ} è la costante di primo ordine per l'idrolisi del BNP e k_2 è la costante di primo ordine per l'idrolisi del monoestere MNP. Quest'ultimo valore è stato confermato mediante l'idrolisi del substrato MNP. L'errore del fitting sulle costanti è risultata essere inferiore al 5%.

Nel caso degli esperimenti in presenza del dimetilfosfato è stata utilizzata l'equazione dell'inibizione competitiva derivata dall'equazione proposta da Williams e Mareque-Rivas (equazione 3)⁽⁴⁰⁾.

$$\frac{k_{\psi}}{k_0} = \frac{1}{1 + K_i[DMP]} \quad (3)$$

Dove k_0 è la velocità della reazione in assenza dell'inibitore e K_i è la costante di binding apparente del fosfato nei confronti del catalizzatore. Questa equazione è valida se la frazione di substrato legato al metallo è trascurabile. Tutti i dati sono fittati con il modello proposto tranne l'inibizione verso il campione **AuNp1**, dove l'equazione 3 non fitta correttamente i valori sperimentali. Questo effetto è dovuto alla coesistenza di siti mono e bimetallici, aventi differenti affinità verso l'inibitore. In questo caso è stata utilizzata l'equazione 4 così composta:

$$k_{\psi} = \frac{k_{\psi}^m}{1 + K_i^M[DMP]} + \frac{k_{\psi}^d}{1 + K_i^D[DMP]} + k_b \quad (4)$$

Dove k_{ψ}^m e k_{ψ}^d sono rispettivamente le componenti mono e bimetalliche sulla reattività in assenza dell'inibitore, K_i^m e K_i^d sono invece le costanti apparenti di binding di entrambi i siti. k_b invece rappresenta la velocità della reazione di base.

Gli esperimenti di saturazione con il substrato sono stati fittati mediante l'equazione di Michaelis-Menten (5):

$$v = \frac{k_{\max}[BNP]}{\frac{1}{K_{BNP}} + [BNP]} \quad (5)$$

Dove k_{\max} è costante cinetica limite nelle condizioni sperimentali e K_{BNP} è la costante di binding apparente substrato-catalizzatore.

Per le nanoparticelle **AuNp1** e **AuNp2** le cinetiche al variare della concentrazione di metallo sono state fittate usando un modello semplificato che tenesse conto della sovrapposizione delle reattività dei siti mono e bimetallici. È stato quindi assunto che la reattività ad ogni concentrazione di metallo fosse la somma di entrambi i contributi.

$$k_{\psi} = k_2^m[M] + k_2^d[D] \quad (6)$$

Dove k_2^m e k_2^d sono rispettivamente le costanti apparenti di secondo ordine per i siti mono e bimetallici, mentre $[M]$ e $[D]$ sono le loro concentrazioni.

Parte sperimentale

E' stato inoltre assunto che la costante di binding metallo-legante fosse molto alta e quindi come conseguenza, fino all'aggiunta di un equivalente di ione metallico, non sia presente lo ione metallico libero (come conseguenza l'interpolazione appare come una linea spezzata). Quindi la concentrazione di complesso ($[1 \cdot Zn(II)]$) è dato dalla seguente equazione:

$$[1 \cdot Zn(II)] = [1]_0 - \frac{([1]_0 - [Zn(II)]) - ABS([1]_0 - [Zn(II)])}{2} \quad (7)$$

Dove $[1]_0$ è la concentrazione di legante, $[Zn(II)]$ è la concentrazione di ione metallico e ABS è il modulo dell'argomento tra la parentesi rotonda. L'equazione 7 fornisce quindi $[1 \cdot Zn(II)] = [Zn(II)]$ quando $[Zn(II)] < [1]_0$ e $[1 \cdot Zn(II)] = [1]_0$ quando $[Zn(II)] > [1]_0$.

A causa delle repulsioni elettrostatiche, a basse concentrazioni di ione metallico si formeranno in prevalenza siti monometallici, mentre a loading maggiori si formano i siti bimetallici maggiormente reattivi. Solamente quando $[Zn(II)] = [1]_0$ si otterrà la quantità massima di siti bimetallici e quindi la massima reattività.

Questo comportamento può essere descritto dall'equazione 8:

$$[D] = \frac{N}{C(N-1)} \left([1 \cdot Zn(II)] - \frac{[1]_0}{N} \right) \quad (8)$$

Dove D sono i siti bimetallici, $1/N$ è la frazione di unità leganti che devono essere metallati prima della formazione dei siti bimetallici e $2/C$ è la massima frazione di leganti che può dare origine ai siti bimetallici. Il rapporto $N/(C(1-N))$ rappresenta quindi la frazione di siti bimetallici prima del cambio di pendenza della curva. L'equazione 8 è valida solamente per $[1 \cdot Zn(II)] > [1]_0/N$ in quanto $[D]$ deve essere zero quando $[1 \cdot Zn(II)] > [1]_0/N$. La concentrazione dei siti bimetallici può essere calcolata mediante l'equazione 9:

$$[D] = \frac{N}{C(N-1)} \cdot \frac{\left([1 \cdot Zn(II)] - \frac{[1]_0}{N} \right) - ABS \left([1 \cdot Zn(II)] - \frac{[1]_0}{N} \right)}{2} \quad (9)$$

Analogamente la concentrazione di unità monometalliche ($[M]$) è data dalla differenza tra la concentrazione di complesso $1 \cdot Zn(II)$ e la concentrazione dei siti bimetallici:

$$[M] = \frac{([1\text{-Zn(II)}] - [D]) - \text{ABS}([1\text{-Zn(II)}] - [D])}{2} \quad (10)$$

I fitting dei dati sperimentali in *figura 74* con le equazioni 6, 7, 9 e 10 con il programma Scientist 2.01 fornisce i valori riportati in *tabella 5*.

Per le nanoparticelle **NpCe(IV)** e per i complessi bimetallici le cinetiche al variare della concentrazione di metallo sono state fittate usando una semplice equazione di una sigmoide.

5.12. Studi del meccanismo tramite spettroscopie NMR

Si preparano soluzioni in cui $[L] = [\text{Zn(II)}] \sim 1 \cdot 10^{-3}$ M, [tampone EPPS pH 8.0] = 0.05 M. Si prelevano 900 μl di tale soluzione e si aggiungono 100 μl di D_2O , si iniettano in un tubo NMR e si aggiunge il volume calcolato della soluzione $2.00 \cdot 10^{-2}$ M di substrato. Si tiene il tubo NMR sigillato e in un bagno termostato e si registrano spettri ^{31}P -NMR e ^1H -NMR a tempi diversi.

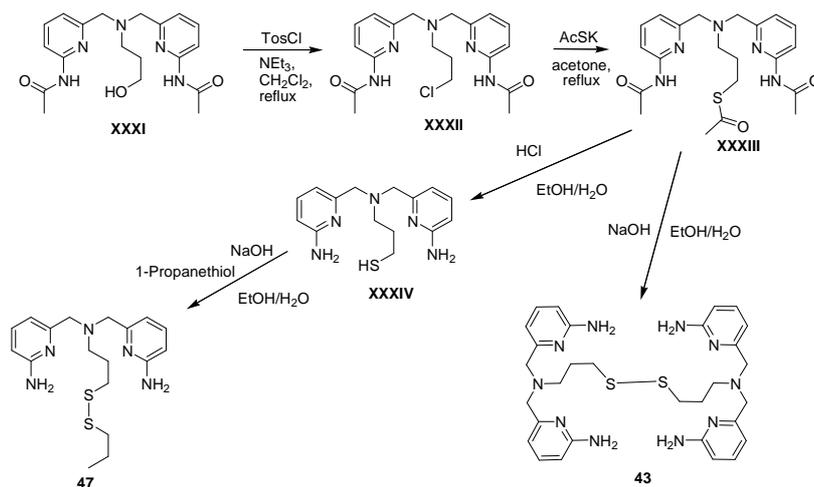
5.13. Esperimenti di idrolisi del DNA plasmidico

Gli esperimenti nei confronti del DNA sono stati effettuati nei confronti del plasmide pBR 322 (Fermentas) in tampone HEPES 20 mM a pH 7.0. La reazione è stata condotta incubando il DNA (24 μM in residui) alla temperature di 37°C in presenza di concentrazioni crescenti dei complessi per 24 ore e fermata mediante addizione di EDTA e SDS per una concentrazione rispettivamente di 0.06M e 1%. I prodotti della reazione sono stati separati su gel di agarosio in tampone TAE (40 mM TRIS, 20 mM, acido acetico e 1 mM EDTA) e visualizzati con etidio bromuro. La quantità relativa delle differenze forme sono state quantificate usando il Geliance 600 Imaging System (Perkin Elmer) interfacciato con un computer.

5.14. Sintesi

5.14.1. Sintesi di propil-(3-ammino-N-bis(6-ammino-2-piridilmetil)-propil) disolfuro (43) e bis(3-ammino-N-bis(6-ammino-2-piridilmetil)-propil) disolfuro (47)

I leganti **43** e **47** sono stati preparati secondo il seguente schema:



5.14.1.1. Sintesi di N-bis(6-acetilammido-2-piridilmetil)-3-cloro-propilammina (XXXII)

Il composto N-bis(6-acetilammido-2-piridilmetil)-3-idrossi-propilammina (**XXXI**) è stato preparato seguendo la procedura standard di letteratura⁽²⁹⁾. Ad una soluzione di questo composto (0.675 g, 1.80 mmol) in piridina anidra (8 mL) è stato aggiunto il tosilcloruro (0.673 g, 3.50 mmol). La reazione è stata mantenuta sotto agitazione e sotto azoto a temperatura ambiente per 24 ore. La piridina è stata evaporata e il crudo di reazione è stato disciolto in cloroformio e lavato più volte con acqua (4×50mL). La fase organica è stata anidrificata mediante Na₂SO₄ e tirata a secco. Sono stati ottenuti 0.403 g (57%) del derivato **XXXII** sotto forma di solido bianco.

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz), δ: 8.05 (d, 2H, 8 Hz), 7.85 (sb, 2H), 7.68 (t, 2H, 8 Hz), 7.17 (d, 2H, 8 Hz), 3.70 (s, 4H), 3.58 (t, 2H, 7 Hz), 2.70 (t, 2H, 7 Hz), 2.21 (s, 6H), 1.99 (qn, 2H, 7 Hz).

ESI-MS (m/z): 390.8 [16%, M+H⁺], 412.2 [100%, M+Na⁺].

5.14.1.2. Sintesi di N-bis(6-acetilammido-2-piridilmetil)-1-tioacetil-3-propilammine (XXXIII)

Il composto **XXXII** (0.403 g, 1.03 mmol) disciolto in acetone (30 mL) è stato fatto reagire con potassio tioacetato (0.240 g, 2.1 mmol). La miscela è stata fatta riflussare sotto azoto per 60 ore. Successivamente è stato evaporato il solvente e il solido è stato disciolto in CH₂Cl₂ (20 mL). La soluzione organica è stata quindi lavata con acqua (5 x 20 mL), anidrificata e tirata a secco. La miscela è stata purificata tramite cromatografia flash (eluente: CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 20:1:0.01). Sono stati ottenuti 0.386 g (90%) di prodotto sotto forma di olio arancione.

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz), δ: 8.08 (sb, 2H), 8.06 (d, 2H, 8 Hz), 7.67 (t, 2H, 8 Hz), 7.14 (d, 2H, 8 Hz), 3.68 (s, 4H), 2.89 (t, 2H, 7 Hz), 2.55 (t, 2H, 7 Hz), 2.32 (s, 3H), 2.22 (s, 6H), 1.86 (qn, 2H, 7Hz).

5.14.1.3. Sintesi di N-bis(6-ammino-2-piridilmetil)-3-tiol-propilammine (XXXIV)

Alla soluzione del composto **XXXIII** (0.386 g, 0.90 mmol) in etanolo e sotto azoto (20 mL) è stato aggiunto HCl conc (1.8 mL). La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 12 ore, il solvente è stato evaporato portando al prodotto desiderato sotto forma di solido marrone. (0.355 g, 95%)

¹H-NMR (CD₃OD, 250 MHz), δ: 7.80 (t, 2H, 8Hz), 6.87 (d, 2H, 8 Hz), 6.80 (d, 2H, 8 Hz), 3.83 (s, 4H), 2.61 (t, 2H, 7 Hz), 2.51 (t, 2H, 7 Hz), 1.74 (qn, 2H, 7 Hz).

5.14.1.4. Sintesi di propil-(3-ammino-N-bis(6-ammino-2-piridilmetil)-propil) disolfuro (47)

Alla soluzione del composto **XXXIV** (0.265 g, 0.88 mmol) in NaOH 0.1M H₂O/EtOH 1:1 (40 mL) è stato aggiunto l'1-propiltiolo (1.00 g, 13.1 mmol). La miscela è stata riflussata per 12 ore, dopo di che sono stati aggiunti 50 mL di cloroformio. La

Parte sperimentale

soluzione organica è stata lavata con una soluzione di NaHCO₃ al 10% (2 x 100 mL) e anidrificata con Na₂SO₄. Dopo evaporazione del solvente il prodotto è stato purificato tramite cromatografia flash (eluente: CH₂Cl₂/MeOH 20:1). Sono stati ottenuti 0.039 g (12%) del prodotto **47** come olio incolore.

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz), δ: 7.38 (t, 2H, 8 Hz), 6.83 (d, 2H, 8 Hz), 6.34 (d, 2H, 8 Hz), 3.62 (s, 4H), 2.68 (t, 2H, 7 Hz), 2.60 (t, 4H, 7 Hz), 1.87 (qn, 2H, 7 Hz), 1.66 (m, 2H, 7 Hz), 0.95 (t, 3H, 7 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, 62.9 MHz, ¹H disaccoppiato), δ: 158.1 (s), 158.0 (s), 112.9 (s), 107.0 (s), 60.4 (s), 52.9 (s), 41.2 (s), 36.9 (s), 26.9 (s), 22.7 (s), 13.3 (s).

ESI-MS (m/z): 378.2 [M+H⁺].

Analisi elementare, calc. per C₃₀H₄₀N₁₀S₂ (377.57): C 57.26, H 7.21, N 18.55, S 16.98; ottenuta: C 57.35, H 7.17, N 18.42, S 17.08 %.

5.14.2. Sintesi di bis(3-ammino-N-bis(6-ammino-2-piridilmetil)-propil) disulfuro (**43**)

Una soluzione del derivato **XXXIII** (0.170 g, 0.40 mmol) in NaOH 1M H₂O/EtOH 1:1 (75 mL) è stata reflussata per 12 ore. Dopo evaporazione dell'etanolo la soluzione è stata estratta con cloroformio e la fase organica è stata anidrificata mediante Na₂SO₄. Tramite evaporazione del solvente è stato ottenuto il prodotto desiderato **43** sotto forma di olio arancione (0.103g, 43%).

¹H-NMR (CD₃OD, 250 MHz), δ: 7.39 (t, 4H, 8 Hz), 6.78 (d, 4H, 8 Hz), 6.41 (d, 4H, 8 Hz), 3.53 (s, 8H), 2.58 (t, 4H, 7 Hz), 2.54 (t, 4H, 7 Hz), 1.81 (qn, 4H, 7 Hz).

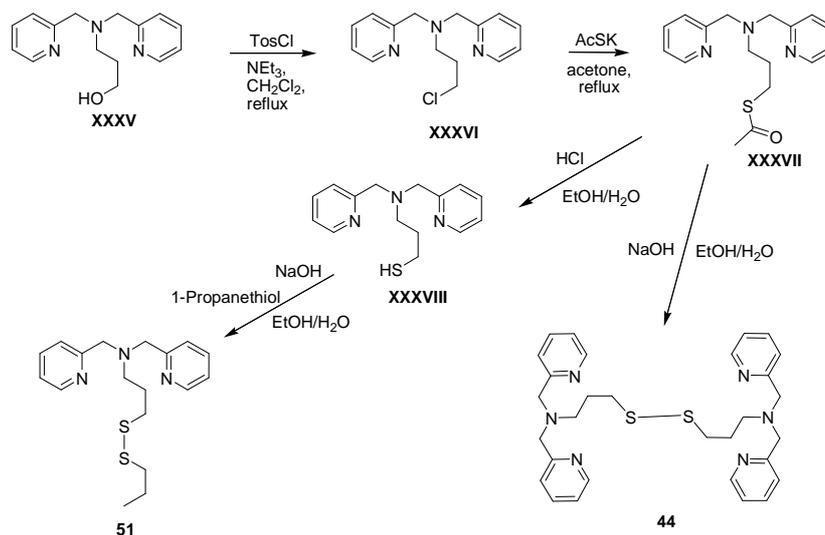
¹³C-NMR (CDCl₃, 62.9 MHz, ¹H disaccoppiato), δ: 160.3 (s), 158.4 (s), 139.5 (s), 112.9 (s), 108.2 (s), 61.1 (s), 53.8 (s), 37.3 (s), 27.7 (s).

APCI-MS (m/z): 605.4 [M+H⁺].

Analisi elementare, calc. per C₃₀H₄₀N₁₀S₂ (604.84): C 59.57, H 6.67, N 23.16, S 10.60; ottenuta: C 59.68, H 6.70, N 23.20, S 10.55 %.

5.14.3. Sintesi di propil-(3-ammino-N-bis(2-piridilmetil)-propil) disolfuro (44) e bis(3-ammino-N-bis(2-piridilmetil)-propil) disolfuro (51)

I leganti **44** e **51** sono stati preparati secondo il seguente schema:



5.14.3.1. Sintesi di N-bis(2-piridilmetil)-3-cloro-propilammina (XXXVI)

Il composto N-bis(2-piridilmetil)-3-idrossi-propilammina (**XXXV**), composto noto in letteratura è stato preparato secondo la procedura standard⁽²⁹⁾. Questo composto (4.00 g, 15.7 mmol) è stato disciolto in CH₂Cl₂ (40 mL) ed è stato riflussato per tre giorni con il tosilcloruro (6.000 g, 31.4 mmol) e trietilammina (5.10 mL, 36.0 mmol). Durante questo periodo il pH è stato controllato mediante cartina al tornasole e, quando necessario, aggiustato con trietilammina. Dopo raffreddamento la miscela è stata diluita con CH₂Cl₂ e lavata con una soluzione al 5% di NaHCO₃ (3 x 20 mL). La fase organica è stata quindi anidrificata con Na₂SO₄ e tirata a secco. Il prodotto è stato quindi purificato mediante cromatografia flash (eluente: CH₂Cl₂/MeOH 10:1). Sono stati ottenuti 0.440 g (7%) di prodotto **XXXVI** come olio giallo.

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz), δ: 8.41 (d, 2H, 8 Hz), 7.55 (t, 2H, 8 Hz), 7.40 (d, 2H, 8 Hz), 7.04 (t, 2H, 8 Hz), 3.72 (s, 4H), 3.46 (t, 2H, 7 Hz), 2.61 (t, 2H, 7 Hz), 1.87 (qn, 2H, 7Hz).

5.14.3.2. Sintesi di N-bis(2-piridilmetil)-1-tioacetil-3-propilammina (XXXVII)

Il composto **XXXVI** (0.472 g, 1.21 mmol) è stato disciolto in 40 mL di acetone e sono stati aggiunti 0.420 g (3.60 mmol) di potassio tioacetato. La miscela è stata mantenuta a refluxo sotto azoto per 60 ore, il solvente è stato evaporato e il solido disciolto in CH₂Cl₂ (20 mL). La soluzione organica è stata poi lavata con acqua (5 x 20 mL) e anidrificata con Na₂SO₄. Dopo l'evaporazione del solvente il prodotto è stato purificato tramite cromatografia flash (eluente: CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 10:1:0.01). Sono stati ottenuti 0.110 g (29%) del prodotto desiderato **XXXVII** sotto forma di olio marrone.

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz), δ: 8.43 (d, 2H, 8 Hz), 7.59 (t, 2H, 8 Hz), 7.43 (d, 2H, 8 Hz), 7.07 (t, 2H, 8 Hz), 3.72 (s, 4H), 2.78 (t, 2H, 7 Hz), 2.52 (t, 2H, 7 Hz), 2.19 (s, 3H), 1.72 (qn, 2H, 7 Hz).

ESI-MS (m/z): 315.0 [M+H⁺].

5.14.3.3. Sintesi di N-bis(2-piridilmetil)-3-tiol-propilammina (XXXVIII)

Il composto **XXXVII** (0.055 g, 0.17 mmol) è stato disciolto in etanolo (4 mL) e sono stati aggiunti 2 mL di HCl 6M. La miscela è stata mantenuta in agitazione a temperatura ambiente per tre ore. Con la semplice evaporazione del solvente è stato ottenuto il prodotto (0.071 g) come solido marrone.

¹H-NMR (CD₃OD, 250 MHz), δ: 8.88 (d, 2H, 8Hz), 8.61 (t, 2H, 8 Hz), 8.20 (d, 2H, 8 Hz), 8.05 (t, 2H, 8 Hz), 4.39 (s, 4H), 2.79 (t, 2H, 7 Hz), 2.46 (t, 2H, 7 Hz), 1.83 (qn, 2H, 7 Hz).

¹³C-NMR (CD₃OD, 62.9 MHz, ¹H disaccoppiato), δ: 153.2 (s), 147.6 (s), 142.1 (s), 127.9 (s), 126.8 (s), 56.0 (s), 53.4 (s), 30.1 (s), 21.67 (s).

5.14.3.4. Sintesi di propil-(3-ammino-N-bis(2-piridilmetil)-propil) disolfuro (51)

Alla soluzione del composto **XXXVIII** (0.048 g) in NaOH 0.3M H₂O/EtOH 1:1 (30 mL) è stato aggiunto l'1-propiltiolo (0.66 g, 8.7 mmol). La miscela è stata riflussata per 12 ore e successivamente sono stati aggiunti 50 mL di cloroformio. La soluzione organica è stata lavata con una soluzione al 10% di NaHCO₃ (2 x 100 mL) e anidrificata con Na₂SO₄. Dopo l'evaporazione del solvente il prodotto è stato purificato tramite cromatografia flash (eluente: CH₂Cl₂/MeOH 20:1). Sono stati ottenuti 0.036 g del prodotto desiderato **51** sotto forma di olio giallino.

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz), δ: 8.52 (d, 2H, 8 Hz), 7.67 (t, 2H, 8 Hz), 7.51 (d, 2H, 8 Hz), 7.15 (t, 2H, 8 Hz), 3.82 (s, 4H), 2.64 (m, 6H), 1.92 (qn, 2H, 7 Hz), 1.65 (m, 2H), 0.96 (t, 3H, 7 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, 62.9 MHz, ¹H disaccoppiato), δ: 159.8 (s), 149.2 (s), 136.6 (s), 123.1 (s), 122.2 (s), 60.6 (s), 53.0 (s), 41.3 (s), 36.9 (s), 27.0 (s), 22.7 (s), 13.3(s).

ESI-MS (m/z): 348.2 [M+H⁺].

ESI-MS (AcCN + HCOOH 0.1%) m/z: 374 [M-H]⁺.

Analisi elementare, calc. per C₁₈H₂₅N₃S₂ (357.54): C 62.21, H 7.25, N 12.09, S 18.45; ottenuta: C 62.35, H 7.17, N 12.38, S 18.23 %.

5.14.4. Sintesi di bis(3-ammino-N-bis(2-piridilmetil)-propil) disolfuro (44)

Il composto **XXXVII** (0.291 g, 0.92 mmol) è stato disciolto in NaOH 1M H₂O/EtOH 1:1 (40 mL) e mantenuto a riflussato per 16 ore. Successivamente è stato evaporato l'etanolo e il prodotto è stato estratto con cloroformio. La fase organica è stata poi anidrificata con Na₂SO₄ e tirata a secco, ottenendo 0.199 g di prodotto come solido marrone (76%).

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz), δ: 8.51 (d, 4H, 8 Hz), 7.66 (t, 4H, 8 Hz), 7.51 (d, 4H, 8 Hz), 7.15 (t, 4H, 8 Hz), 3.82 (s, 8H), 2.65 (t, 8H, 7 Hz), 1.89 (qn, 4H, 7 Hz).

Parte sperimentale

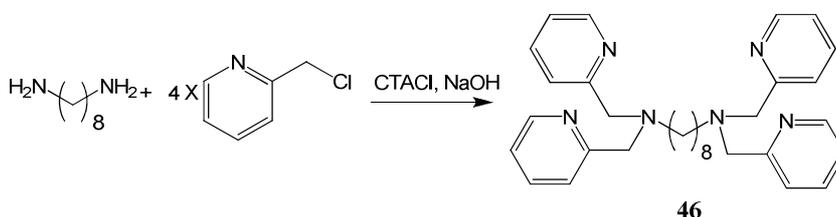
^{13}C -NMR (CDCl_3 , 62.9 MHz, ^1H disaccoppiato), δ : 159.5 (s), 148.8 (s), 136.3 (s), 122.8 (s), 121.9 (s), 60.3 (s), 52.6 (s), 36.4 (s), 26.6 (s).

ESI-MS (m/z): 567.9 [$\text{M}+\text{Na}^+$].

Analisi elementare, calc. per $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{S}_2$ (544.78): C 66.14, H 6.66, N 15.43, S 11.17; ottenuta: C 66.31, H 6.75, N 15.05, S 11.90 %.

5.14.5. Sintesi di N,N'-bis(2-piridilmetil)-1,8-diottilammina (46)

Il legante **46** è stato preparato seguendo il seguente schema:



Alla soluzione del cloruro alchilico 2-clorometilpiridina cloroidrato (4.55 g, 27.7 mmol) in NaOH 5M (30 mL) è stata aggiunto l'1,8-diamminooctano (1.000 g, 6.93 mmol) e l'esadeciltrimetilammonio cloruro (0.44 g, 0.14 mmol). La miscela è stata poi agitata per 20 ore ed estratta con CH_2Cl_2 (3 x 20 mL). La soluzione organica è stata lavata con una soluzione satura di NaCl (2 x 60 mL), acqua (2 x 60 mL) e anidrificata con Na_2SO_4 . Dopo aver evaporato il solvente il prodotto è stato purificato tramite cromatografia flash (eluente: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10:0.5). Sono stati ottenuti 2.902 g (82%) del composto **46** come solido bianco.

^1H -NMR (CDCl_3 , 250 MHz), δ : 8.33 (d, 4H, 8 Hz), 7.46 (t, 4H, 8 Hz), 7.38 (d, 4H, 8 Hz), 6.94 (t, 4H, 8 Hz), 3.65 (s, 8H), 2.36 (t, 4H, 7 Hz), 1.36 (m, 4H), 1.02 (m, 8H).

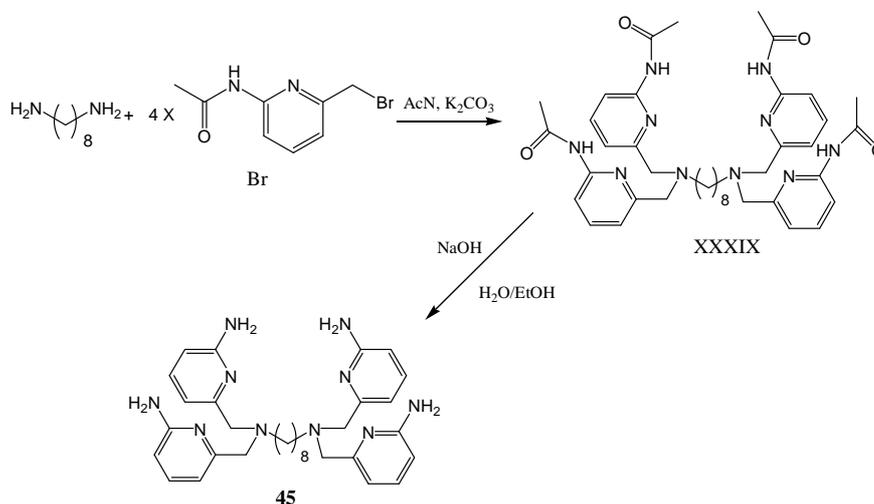
^{13}C -NMR (CDCl_3 , 62.9 MHz, ^1H disaccoppiato), δ : 159.9 (s), 148.7 (s), 136.1 (s), 122.6 (s), 121.6 (s), 60.3 (s), 54.2 (s), 29.2 (s), 27.0 (s), 26.8 (s).

ESI-MS (m/z): 509.4.0 [100%, $\text{M}+\text{H}^+$], 531.2 [59%, $\text{M}+\text{Na}^+$].

Analisi elementare, calc. per $\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{N}_6$ (508.70): C 75.55, H 7.93, N 16.52; ottenuta: C 75.76, H 7.70, N 16.58 %.

5.14.6. Sintesi di N,N'-bis(6-ammino-2-piridilmetil)-1,8-diottilammina (45)

Il legante **45** è stato preparato secondo il seguente schema:



5.14.6.1. Sintesi di N,N'-bis(6-acetilammido-2-piridilmetil)-1,8-diottilammina (XXXIX)

Ad una soluzione di 1,8-diamminooctano (0.210 g, 1.46 mmol) in acetonitrile (20 mL) è stato aggiunto il composto **Br** (1.500 g, 6.55 mmol), precedentemente preparato seguendo la procedura standard di letteratura⁽²⁹⁾, e il K₂CO₃ (1.143 g, 8.27 mmol). La soluzione è stata riflussata sotto azoto per 3 ore e poi filtrata su gooch. Il prodotto è stato poi purificato mediante cromatografia flash (eluente: CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 10:1:0.01). Sono stati ottenuti 0.407 g (38%) di prodotto come olio giallo.

¹H-NMR (CDCl₃ 250 MHz), δ: 8.93 (s, 4H), 8.05 (d, 4H, 8 Hz), 7.63 (t, 4H, 8 Hz), 7.19 (d, 4H, 8 Hz), 3.46 (s, 8H), 4.11 (t, 4H, 7 Hz), 2.18 (s, 12H), 1.45 (m, 4H), 1.15 (m, 8H).

5.14.6.2. Sintesi di N,N' -bis(6-ammino-2-piridilmetil)-1,8-diottilammina (45)

Il composto **XXXIX** (0.407 g, 0.55 mmol) disciolto in NaOH 5M H₂O/EtOH 1:1 (45 mL) è stato fatto riflussare per 7 ore. E' stato poi evaporato l'etanolo e la soluzione acquosa estratta con cloroformio. Si anidrifica e si tira a secco ottenendo 0.302 g di prodotto come olio giallo (97%).

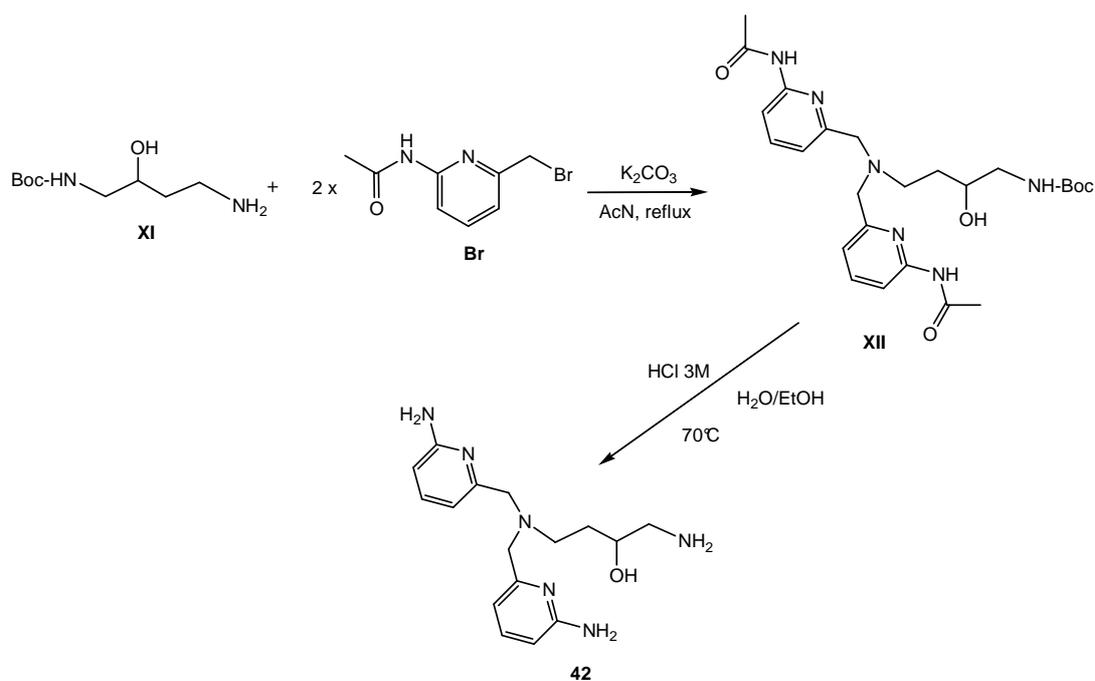
¹H-NMR (CD₃OD, 250 MHz), δ : 7.38 (t, 4H, 8 Hz), 6.82 (d, 4H, 8 Hz), 6.40 (d, 4H, 8 Hz), 3.53 (s, 8H), 2.45 (t, 4H, 7 Hz), 1.47 (m, 4H), 1.17 (m, 8H).

¹³C-NMR (CDCl₃, 62.9 MHz, ¹H disaccoppiato), δ : 158.8 (s), 158.2 (s), 138.1 (s), 112.6 (s), 106.7 (s), 60.5 (s), 54.3 (s), 29.4 (s), 27.3 (s), 26.9 (s).

Analisi elementare, calc. per C₃₂H₄₄N₁₀ (568.76): C 67.58, H 7.80, N 24.63; ottenuta: C 67.71, H 7.67, N 24.55%.

5.14.7. Sintesi di N -bis(6-ammino-2-piridilmetil)-1-ammino-2-idrossi-4-butilammina (42)

Il legante **42** è stato preparato secondo il seguente schema:



5.14.7.1. Sintesi di N-bis(6-acetilammido-2-piridilmetil)-1-ammino-2-idrossi-4-butilammina (XII)

L 1-N-terbutilossicarbonil-(1,4)-diamminobutan-2-olo (XI), è un composto noto ed è stato preparato secondo metodi di letteratura⁽³⁵⁾. Questo composto (0.245 g, 1.20 mmol) è stato disciolto in acetonitrile anidro (10 mL) e successivamente sono stati aggiunti il potassio carbonato anidro (0.397g, 2.87mmol) e l'N-(6-bromometil-2-piridinil)-acetammide (7, 0.550 g, 2.40 mmol). La reazione è stata poi riflussata sotto azoto per due ore. Dopo raffreddamento la sospensione è stata filtrata ed il solido lavato con acetonitrile. Il solvente è stato poi evaporato e la miscela è stata purificata tramite cromatografia flash (eluente: CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 20:3:0.1). Si sono ottenuti 0.244 g (41%) del prodotto XII sotto forma di olio giallino.

¹H-NMR (CD₃OD, 250 MHz), δ: 7.93 (d, 2H, 8 Hz), 7.65 (t, 2H, 8 Hz), 7.13 (d, 2H, 8 Hz), 3.66 (m, 4H), 3.67 (m, 1H), 3.62 (t, 2H, 7 Hz), 3.27 (m, 1H), 3.04 (m, 2H), 2.73 (m, 1H), 3.16 (s, 6H), 1.65 (m, 2H), 1.40 (s, 9H).

ESI-MS (m/z): 501.3 [100%, M+H⁺], 523.2 [33%, M+Na⁺].

5.14.7.2. Sintesi di N-bis(6-ammino-2-piridilmetil)-1-ammino-2-idrossi-4-butilammina (42)

0.101 g (0.202 mmol) del derivato XII sono stati disciolti in etanolo (4 mL). Successivamente sono stati aggiunti 4 mL di una soluzione 6 M di HCl e si è mantenuta la soluzione a 70°C per tre ore. In seguito ad evaporazione del solvente è stato ottenuto il prodotto desiderato 0.095 g (95%) sotto forma di olio marrone.

¹H-NMR (CD₃OD, 250 MHz), δ: 7.88 (dd, 2H, 7 Hz/8 Hz), 7.05 (d, 2H, 8 Hz), 7.02 (d, 2H, 7 Hz), 4.20 (s, 4H), 3.93 (m, 1H), 2.98 (m, 4H), 1.95 (m, 2H).

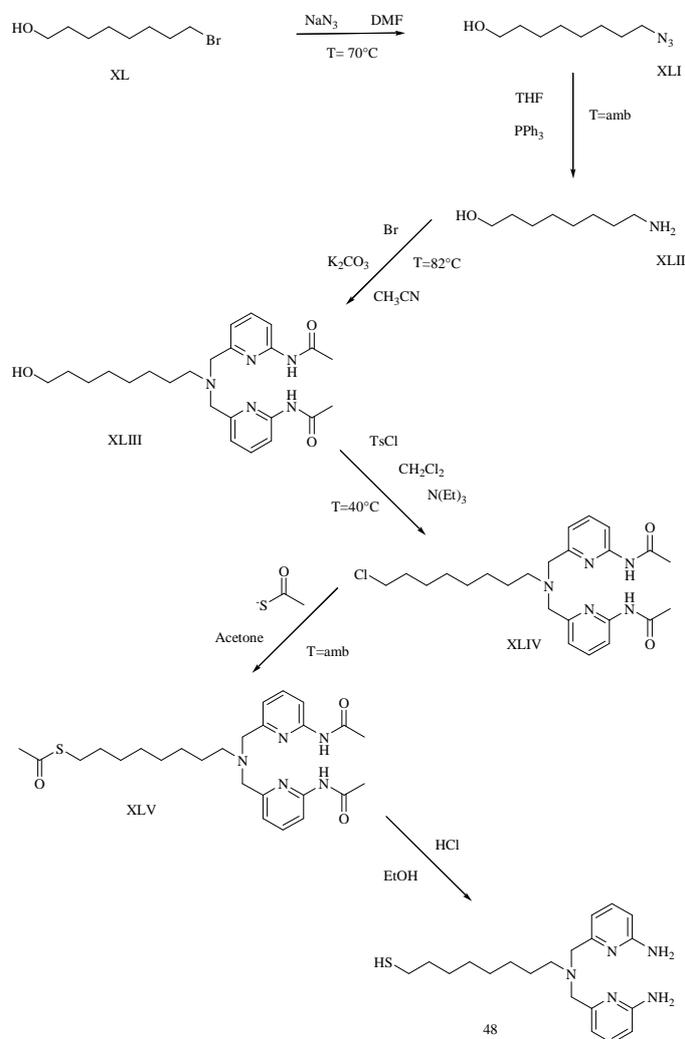
¹³C-NMR (CH₃OD, 62.9 MHz, ¹H disaccoppiato), δ: 156.76, 145.44, 144.21, 144.95, 144.83, 66.86, 55.81, 51.95, 46.22, 31.04.

ESI-MS (m/z): 317.3 [100%, M+H⁺], 339.3 [37%, M+H⁺].

Analisi elementare, calc. per C₁₆H₂₄N₆O · 4HCl: C 41.57, H 6.11, N 18.18; ottenuta: C 41.42, H 6.02, N 18.05 %.

5.14.8. Sintesi di 8-(bis((6-amminopiridin-2-il)metil)ammino)-1-ottantiolo (48)

Lo schema di sintesi seguito è il seguente:



5.14.8.1. Sintesi di 8-azido-1-ottantiolo (XLI)

In un pallone da 100 mL munito di agitatore magnetico e bagno ad olio riscaldato, si introduce il composto **XL** (1.00 g, 4.78 mmol), 10 mL di DMF e successivamente la NaN_3 (0.621 g, 9.56 mmol). Poi si porta la soluzione in agitazione e alla temperatura di 70°C per 16 ore. Si evapora poi il solvente e il residuo viene ripreso con 10 mL di H_2O . La soluzione viene poi estratta con tre frazioni da 10 mL di CH_2Cl_2 . Si anidrifca con Na_2SO_4 , si filtra e si tira a secco.

Si ottengono 0.543 g di olio giallo, con una resa del 66.5%.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz) δ : 3.60 (t, 2H, 7Hz); 3.26 (t, 7Hz); 2.66 (sb, 1H); 1.57 (m, 4H); 1.33 (sb, 8H).

5.14.8.2. Sintesi di 8-ammino-1-ottanolo (XLII)

In un pallone da 100 mL dotato di agitatore magnetico, si introducono: il composto **XLI** (0.543 g, 3.18 mmol), il THF (38 mL) e la trifenilfosfina (0.934 g, 3.56 mmol), ottenendo una soluzione trasparente con riflessi gialli. Si lascia la soluzione in agitazione con atmosfera inerte di N_2 a temperatura ambiente. Dopo 65 ore sono stati aggiunti 3 mL di H_2O e si osserva la formazione di un precipitato bianco. Il solvente viene evaporato all'evaporatore rotante. Il solido bianco ottenuto viene ripreso con 35 mL di H_2O e 20 mL di toluene. La fase organica viene separata ed estratta con frazioni da 20 mL di H_2O per 8 volte. Le fasi acquose vengono riunite e l'acqua evaporata, ottenendo 0.442 g di solido bianco con una resa del 96%.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz) δ : 3.45 (t, 2H, 7Hz); 2.54 (m, 5H); 1.21 (m, 12H).

5.14.8.3 Sintesi di N,N'-(bis-(6-acetammido-2-piridinilmetil))-6-idrossi ottilamina (XLIII)

In pallone da 100 mL, munito di agitatore magnetico e bagno ad olio, si introducono il composto **XLII** (0.442 g, 3.05 mmol) e acetonitrile fino a completo discioglimento. Successivamente si introduce il bromuro alchilico **Br** (1.396 g, 6.10 mmol) e il K_2CO_3 (0.97 g, 7.02 mmol). Si porta la sospensione a riflusso a 80°C , dotando il pallone di refrigerante e di atmosfera inerte di N_2 . Dopo 2 ore e mezza si raffredda, si filtra il solido su gooch e lo si lava con acetonitrile. Si evapora il solvente ottenendo un olio giallo che viene purificato tramite cromatografia flash (eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_3=20:1:0.1$). Si ottengono 0.613 g di prodotto sotto forma di un olio giallo (45.6 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz) δ : 8.91 (s, 2H); 8.03 (d, 2H, 8Hz); 7.64 (t, 2H, 8Hz); 7.20 (d, 2H, 8Hz); 3.64 (s, 4H); 2.45 (t, 2H, 7Hz); 2.18 (s, 6H); 1.36 (m, 14H).

5.14.8.4. Sintesi di N-8-(bis((6-acetamidopiridin-2-il)metil)ammino) ottilietantioato (XLV)

In un pallone da 250 mL, dotato di agitatore magnetico e bagno ad olio con mantello riscaldante, si introduce il composto **XLIII** (0.613 g, 1.39 mmol) e lo si scioglie in 80 mL di CH_2Cl_2 . Si aggiunge poi il tosilcloruro (0.530 g, 2.78 mmol) e si lascia la reazione in agitazione a 40°C . Raggiunta la temperatura, si aggiungono 0.387 mL (2.78 mmol) di $\text{N}(\text{Et})_3$. La soluzione appare trasparente con dei riflessi gialli. Si controlla con una cartina al tornasole che la soluzione sia basica e si esegue questo controllo più volte durante la reazione aggiungendo $\text{N}(\text{Et})_3$ quando necessario.

Dopo 70 ore viene fermato il reflusso e la soluzione si presenta di colore rosso. Si aggiungono 40 mL di CHCl_3 e si esegue un'estrazione della soluzione con 3 dosi da 20 mL di soluzione acquosa al 5% di NaHCO_3 . La fase organica viene anidrificata con Na_2SO_4 , filtrata e tirata a secco. Si ottiene un olio rosso dal peso di 1.015g.

Si esegue una TLC (eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH} = 10:1$). Questa mostra la presenza di diversi prodotti e reagenti, con diverse macchie sovrapposte. Alla caratterizzazione con $^1\text{H-NMR}$ si osserva come nel prodotto sia presente il composto **XLIV**, il corrispondente composto tosilato e il tosilcloruro libero. Il prodotto è quindi una miscela, che non viene separata ma utilizzata come tale nella reazione successiva.

Poiché si utilizza una miscela di prodotti, è necessario lavorare con un eccesso di potassio tioacetato, per essere certi che avvenga la reazione anche in presenza di tosilcloruro. Ciò permette di evitare una separazione cromatografica prima di eseguire la tioacetilazione. Per quantificare questo eccesso, si fa riferimento alle moli del prodotto **8** utilizzate nel passaggio precedente.

Nel pallone contenente la miscela si aggiungono 60 mL di acetone e si pone in agitazione alla temperatura di 56°C . Quando la miscela è completamente sciolta si aggiunge il potassio tioacetato. La reazione viene fermata dopo 33 ore eliminando il solvente tramite evaporatore rotante. Si ottiene un olio denso rosso scuro. Nel pallone

vengono aggiunti 20 mL di H₂O e 20 mL di CH₂Cl₂. Le due fasi vengono separate e quella acquosa viene estratta più volte con frazioni da 20 mL di CH₂Cl₂.

Le fasi organiche riunite vengono anidificate con Na₂SO₄, filtrate e evaporate con un evaporatore rotante, ottenendo un olio denso rosso scuro.

Si esegue una cromatografia flash (eluente CH₂Cl₂:CH₃OH = 10:1) ottenendo 0.340 g di prodotto **XLV** (49%) come olio marrone.

¹H-NMR (CD₃OD, 250 MHz) δ: 8.28 (sb, 2H); 8.02 (d, 2H, 8Hz); 7.64 (t, 2H, 8Hz); 7.19 (d, 2H, 8Hz); 3.64 (s, 4H -); 2.83 (t, 2H, 7Hz); 2.49 (t, 2H, 7Hz); 2.30 (s, 3H); 2.17 (s, 6H); 1.35 (m, 12H).

5.14.8.5. Sintesi 8-(bis((6-amminopiridin-2-il)metil)ammino)-1-ottantiolo (48)

In un pallone da 10 mL si discioglie il composto **XLV** (0.038 g, 0.076 mmol) in 0.8 mL di etanolo e gli si aggiungono 0.8 mL di una soluzione di HCl 6M. Si porta poi la soluzione a 65°C per 3 ore. Mediante evaporazione del solvente si ottengono 36 mg di prodotto (99%) sotto forma di olio marrone.

¹H-NMR (CD₃OD, 250 MHz) δ: 7.65 (t, 2H, 8Hz); 6.78(d, 4H, 8Hz); 4.86 (sb, 4H); 4.00 (s, 4H); 2.62 (t, 2H, 7Hz); 2.23 (t, 2H); 1.30 (m, 12H).

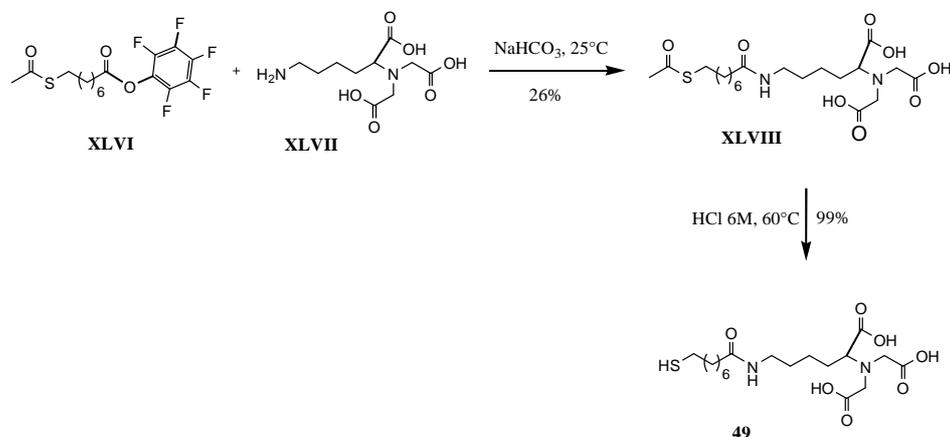
¹³C-NMR (CD₃OD, 250 MHz) (disaccoppiato) δ: 159.30; 148.87; 136.28; 122.73; 121.66; 64.15; 60.04; 57.26; 54.32; 52.38; 36.15; 26.38; 18.19.

ESI-MS (AcN + HCOOH 0.1%) m/z: 374 [M-H]⁺.

Analisi elementare, calc. per C₂₀H₃₁N₅S (373.56): C 64.30, H 8.36, N 18.75, S 8.58; ottenuta: C 64.42, H 8.40, N 18.68, S 8.54 %.

5.14.9. Sintesi del tiolo **49**

Il tiolo **49** è stato sintetizzato mediante la seguente strategia:



5.14.9.1. N-[N_α,N_α-Bis(carbossimetil)-L-Lisina]8-(tioacetil)ottilammide (XLVIII)

Ad una soluzione acquosa di Bis(carbossimetil)-L-Lisina (0.500 g, 1.79 mmol) e 0.501 g di NaHCO_3 (5.96 mmol) sono stati aggiunti all'estere attivato **XLVI** (0.578 g, 1.5 mmol) in 1 mL di acetone e 10 mL di etanolo. Dopo 30 ore a in atmosfera di azoto è stato evaporato l'etanolo e sono stati aggiunti 5 mL di acqua. Il precipitato bianco è stato poi filtrato. Il prodotto è stato poi precipitato mediante acidificazione a pH 3 con HCl 1M. Dopo lavaggi con acqua fredda (3 x 5 mL) e acetone (2 mL), il prodotto è stato seccato ottenendo 0.180 g di solido giallino (26%).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 300 MHz), δ : 7.67 (br, 1H), 3.32 (m, 5H), 2.98 (q, 2H, 6 Hz), 2.81 (t, 2H, 7 Hz), 2.31 (s, 3H), 2.01 (t, 2H, 7 Hz), 1.48 (m, 6H), 1.25 (m, 10H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 62.9 MHz, ^1H disaccoppiato), δ : 197.75, 176.40, 176.06, 175.98, 66.79, 55.51, 40.19, 37.21, 30.81, 30.67, 30.21, 30.07, 29.95, 29.76, 27.08, 24.90.

ESI-MS (m/z): 463.2 [100%, $\text{M}+\text{H}^+$], 485.2 [42%, $\text{M}+\text{Na}^+$].

5.14.9.2. N-[N_α,N_α-Bis(carbossimetil)-L-Lisina]-8-Mercaptoottilammide (49)

0.020 g (0.043 mmol) del composto protetto sono stati disciolti in acqua (1.5 mL), dopodiché sono stati aggiunti 1.5 mL di una soluzione 6 M di HCl e la miscela portata a 60°C per 3 ore. La reazione è stata poi portata a temperatura ambiente e tirata a secco mediante rotovapor ottenendo 0.019 g (99%) di prodotto sottoforma di olio giallo.

¹H-NMR (CD₃OD, 250 MHz), δ: 4.25-4.50 (m, 5H), 3.45 (br, 2H), 2.48 (t, 2H, 7 Hz), 2.43 (t, 2H, 7 Hz), 2.06 (br, 2H), 1.66 (m, 8H), 1.35 (m, 6H).

¹³C-NMR (CD₃OD, 62.9 MHz, ¹H disaccoppiato), δ: 178.24, 170.36, 168.92, 68.21, 55.29, 41.12, 35.89, 35.16, 30.12, 29.79, 29.32, 29.24, 27.90, 27.25, 25.05, 24.74.

ESI-MS (m/z): 421.3 [100%, M+H⁺], 443.2 [12%, M+Na⁺].

Analisi elementare, calc. per C₁₉H₃₄N₂O₇S·HCl (471.00): C 48.45, H 7.49, N 5.95, S 6.81; trovata: C 48.52, H 7.56, N 5.82, S 6.88 %.

5.14.10. N-Acetil-Bis(carbossimetil)-L-Lisina (53)

Ad una soluzione acquosa (5 mL) di Bis(carbossimetil)-L-Lisina (0.100 g, 0.357 mmol) e 0.247 g di K₂CO₃ (1.785 mmol) è stata aggiunta anidride acetica (0.415 g, 4.070 mmol) in 1 mL di acetone e 10 mL di etanolo. Dopo 30 ore sotto atmosfera di azoto l'etanolo è stato evaporato e sono stati aggiunti 10 mL di HCl 1M. La soluzione è stata quindi tirata a secco fornendo 0.302 g di solido bianco (78%).

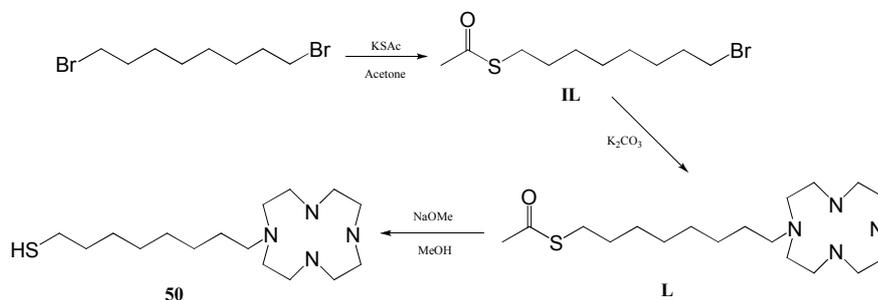
¹H-NMR (D₂O, 300 MHz), δ: 4.49 (m, 5H), 3.35 (t, 2H, 7 Hz), 2.17 (m, 2H), 1.71 (m, 4H).

¹³C-NMR (CD₃OD, 62.9 MHz, ¹H disaccoppiato), δ: 174.88, 171.18, 169.83, 68.04, 55.33, 39.91, 28.67, 27.37, 23.82, 22.71.

ESI-MS (m/z): 304.3 [62%, M+H⁺], 342.0 [100%, M+K⁺].

5.14.11. Sintesi del tiolo 50

Il composto **50** è stato sintetizzato mediante la seguente strategia sintetica:



5.14.11.1. Sintesi di 8-tioacetil-ottilbromuro (IL)

Ad una soluzione di 1,8-dibromooottano (4.35 g, 15.99 mmol) in acetone (40 mL) sono stati aggiunti 1.826 g (15.99 mmol) di potassio tioacetato. La reazione viene fermata dopo 15 ore eliminando il solvente tramite evaporatore rotante. Si ottiene un olio giallo. Nel pallone vengono aggiunti 20 mL di H₂O e 20 mL di CH₂Cl₂. Le due fasi vengono separate e quella acquosa viene estratta più volte con frazioni da 20 mL di CH₂Cl₂. Le fasi organiche riunite vengono anidificate con Na₂SO₄, filtrate e evaporate con un evaporatore rotante.

Si esegue una cromatografia flash (eluente CH₂Cl₂) ottenendo 1.75 g di prodotto (41%) come olio giallino.

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz), δ: 3.39 (t, 2H, 7Hz), 2.85 (t, 2H, 7 Hz), 2.31 (s, 3H), 1.84 (qn, 2H, 7Hz), 1.55 (m, 2H), 1.35 (m, 8H).

5.14.11.2. Sintesi di 8-tioacetil-ottilciclen (L)

Ad una soluzione di 8-tioacetil-ottilbromuro (0.110 g, 0.39 mmol) in acetonitrile (20 mL) sono stati aggiunti 0.2 g (1.16 mmol) di ciclen e 0.163 g (1.20 mmol) di carbonato di potassio. La reazione viene mantenuta alla temperatura di 82°C per tre ore e fermata mediante filtrazione su gooch. Per la purificazione del prodotto si esegue una cromatografia flash (eluente CH₂Cl₂:MeOH:NH₃/10:2:0.01) ottenendo 0.139 g di prodotto (98%) sotto forma di olio giallino.

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 250 MHz), δ : 2.83 (t, 2H, 7Hz), 2.76 (t, 4H, 7Hz), 2.56 (m, 12H), 2.37 (t, 2H, 7Hz), 2.30 (s, 3H), 1.41 (m, 12H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 62.9 MHz, ^1H disaccoppiato), δ : 196.8, 54.39, 51.16, 46.69, 45.66, 44.85, 30.52, 29.32, 29.13, 28.99, 28.59, 28.34, 27.25, 26.99.

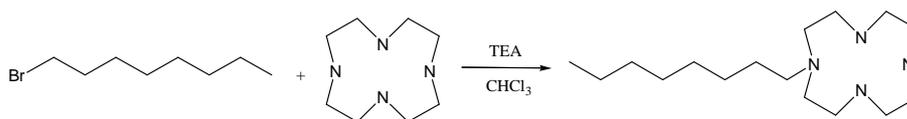
ESI-MS (m/z): 359.3 [100%, $\text{M}+\text{H}^+$], 180.2 [22%, $\text{M}+2\text{H}^+$].

5.14.11.3. Sintesi di 8-tiol-ottilciclen (50)

Ad una soluzione di 8-tioacetil-ottilciclen (0.139 g, 0.405 mmol) in metanolo (2 mL) sono stati aggiunti 0.486 mL di una soluzione 1M di NaOMe in MeOH e si è mantenuta la soluzione sotto agitazione a temperatura ambiente con tubo a calcio cloruro per 30 minuti. Dopo questo tempo si è portata la soluzione a neutralità con una soluzione di HBr 6M. Viene quindi evaporato il solvente all'evaporatore rotante ottenendo 0.142 g di solido giallino che viene utilizzato subito dopo per la ricopertura delle nanoparticelle.

ESI-MS (m/z): 317.3 [100%, $\text{M}+\text{H}^+$].

5.14.12. Sintesi di ottilciclen (52)



Ad una soluzione di ciclen (0.150 g, 0.871 mmol) in cloroformio (15 mL) sono stati aggiunti 0.036 g (0.174 mmol) di ottilbromuro e 17.18 μL (0.209 mmol) di trietilammina. La reazione viene mantenuta a riflusso per 15 ore. Mediante semplici lavaggi con una soluzione 1M di NaOH ($3 \times 5\text{mL}$) e con acqua si sono ottenuti 0.043 g di prodotto sotto forma di solido bianco (87 %)⁽⁵³⁾.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz), δ : 2.75 (m, 4H), 2.53 (m, 12H), 2.36 (t, 2H, 7Hz), 1.40 (m, 2H), 1.22 (m, 10H), 0.83 (t, 3H, 7Hz).

ESI-MS (m/z): 284.5 [100%, $\text{M}+\text{H}^+$].

5.14.13. Sintesi di 52·Co(III)

Ad una soluzione di ciclen (0.043 g, 0.151 mmol) in acqua mQ (25 mL) sono stati aggiunti 0.036 g (0.151 mmol) di $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$. Sotto agitazione è stata poi fatta gorgogliare aria precedentemente purificata dall'anidride carbonica mediante una soluzione di NaOH per una notte. E' stato poi evaporato il solvente ottenendo un solido rosso-violaceo.

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 250 MHz), δ : 3.22 (m, 18H), 1.66 (m, 2H), 1.18 (m, 10H), 0.73 (m, 3H).

ESI-MS (m/z): 343.3 [100%, Ciclen+Co].

Analisi elementare, calc. per $\text{C}_{16}\text{H}_{37}\text{Cl}_2\text{CoN}_4\text{O}$ (431.30): C 44.55, H 8.65, N 12.99; trovata: C 39.61, H 7.63, N 11.32 %.

UV-Vis⁽⁴⁶⁾ (30% HCl): $\lambda(541 \text{ nm}) \epsilon = 123$, $\lambda(388 \text{ nm}) \epsilon = 187$.

5.15. Sintesi e caratterizzazione delle nanoparticelle d'oro

Tutta la vetreria prima di essere utilizzata viene lavata con acquaregia e risciacquata con acqua milliQ con lo scopo di eliminare eventuali tracce di metalli presenti. L'acido tetracloroaurico, essendo estremamente igroscopico, viene pesato in glove-box (100 mg, 0.281 mmol) dentro un vaial in vetro e viene poi disciolto in circa 5 mL di H_2O ottenendo una soluzione gialla.

In una beuta da 500 mL vengono inseriti 250 mL di toluene e vengono posti a degasare in una vaschetta ad ultrasuoni per qualche minuto. Successivamente al toluene vengono addizionati 5.48 g (10.02 mmol) di tensioattivo (TOABr) e la soluzione ottenuta viene separata in due frazioni uguali. Nella prima frazione si sciolgono 3.36 g (13.91 mmol) di diottilammina, mentre con la seconda frazione si eseguono tre estrazioni della soluzione acquosa di acido tetracloroaurico. Già dopo il primo lavaggio la fase acquosa diventa incolore, mentre la fase organica assume una colorazione rossa.

In un pallone da 500 mL, munito di agitatore magnetico e di ambiente inerte di N_2 , si riuniscono le fasi organiche di lavaggio e si aggiunge sotto vigorosa agitazione la soluzione di diottilammina. Dopo qualche minuto la soluzione diventa incolore, tuttavia

si lascia in agitazione vigorosa per 30 minuti a temperatura ambiente. Passato questo tempo alla soluzione organica viene addizionata una soluzione di NaBH_4 (93 mg, 2.46 mmol) in 4.2 mL di acqua mQ, eseguendo l'aggiunta in pochi secondi. La soluzione diventa immediatamente di colorazione marrone-rossiccia molto intensa e la si lascia in agitazione per 5 ore.

Per eseguire la ricopertura delle nanoparticelle stabilizzate con diottilammina si separa la piccola quantità d'acqua e si aggiungono i tioli disciolti nella minima quantità di isopropanolo, DMF o toluene. La ricopertura deve avvenire entro 24 ore dalla sintesi delle nanoparticelle e, in questo periodo, devono essere conservate in atmosfera di azoto. La purificazione delle nanoparticelle passivate con i tioli organici varia notevolmente con la composizione del monostrato e verrà illustrata caso per caso nei paragrafi seguenti.

5.15.1. Sintesi delle nanoparticelle AuNp1 e AuNp2

Il tiolo contenente l'unità legante viene sciolto in una soluzione 1:1 isopropanolo/DMF, mentre il tiolo contenente il gruppo trietilenglicolico viene sciolto in isopropanolo. La soluzione di nanoparticelle di Au in toluene viene divisa in due parti uguali ponendo le tre frazioni in tre palloni da 100 mL dotati di agitatore magnetico. Le due frazioni di nanoparticelle vengono ricoperte con diversi rapporti dei due tioli, e in particolare rispettivamente con un rapporto 1:10 e 4:6 per i campioni AuNp1 e AuNp2. L'aggiunta delle due soluzioni deve avvenire contemporaneamente e nel più breve tempo possibile. Oltre al rapporto tra i due tioli organici bisogna considerare la quantità di tioli da aggiungere. In base alla formula minima per le nanoparticelle del diametro di 2 nm⁽⁴⁷⁾ ($\text{Au}_{201}\text{RSH}_{72}$) è possibile calcolare la quantità stechiometrica di tiolo necessario, nonostante ciò è stato necessario aggiungere un eccesso di tioli in modo da garantire la completa ricopertura della superficie delle nanoparticelle. L'eccesso utilizzato è stato di 2 volte la quantità stechiometrica.

Le soluzioni sono lasciate in vigorosa agitazione per tutta la notte, tuttavia dopo pochi minuti si osserva la formazione di un precipitato scuro, fino all'ottenimento di una soluzione di toluene perfettamente limpida. A questo punto si ottiene il precipitato perfettamente adeso alla superficie interna del pallone. Le particelle AuNp1 e AuNp2

Parte sperimentale

vengono lavate direttamente nel pallone di reazione mediante una serie di estrazioni solido-liquido con toluene, n-esano e acetato di etile, utilizzando frazioni da 30 mL ciascuna per ogni solvente. Dopo questi trattamenti le nanoparticelle risultano solubili in metanolo oppure in soluzioni acqua/metanolo.

Gli spettri UV-Vis sono quelli tipici di nanoparticelle d'oro di dimensioni nanometriche, con un intenso assorbimento non strutturato in tutto l'intervallo del visibile che decresce al crescere della lunghezza d'onda. La presenza di particelle di dimensioni nanometriche è confermata dall'analisi al microscopio a trasmissione elettronica (*figura 90*): il diametro medio è risultato essere di 1.9 ± 0.7 nm.

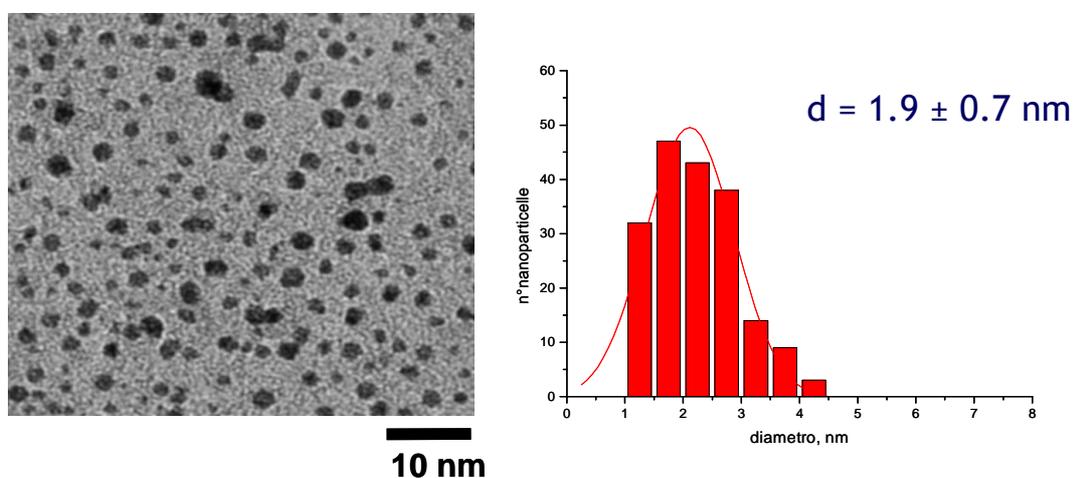


Figura 90: Immagine TEM e distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle AuNp2.

Per quanto riguarda la composizione del monostrato organico della superficie delle particelle è stata investigata mediante $^1\text{H-NMR}$: gli spettri (*figura 91*) mostrano il tipico allargamento anisotropico dei segnali, che si riscontra per molecole legate a colloidi (a causa della bassa velocità di rivoluzione). In ogni caso i campioni risultano puri ed esenti di contaminanti a basso peso molecolare. Il rapporto tra gli integrali dei segnali a 2.20 e 2.48 ppm, appartenenti rispettivamente al tiolo **52** ed al tiolo **48**, permette di determinare la composizione del monostrato, che è risultata essere rispettivamente del 10 e del 40 % in unità legante.

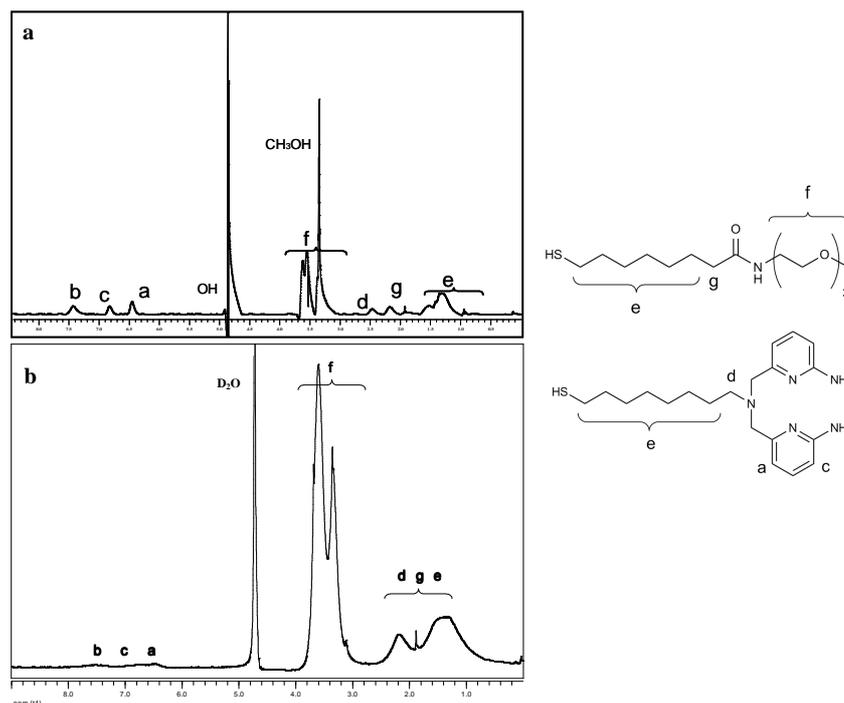


Figura 91: Spettro $^1\text{H-NMR}$ 300MHz di a)nanoparticelle AuNp2 in CD_3OD in soluzione satura e b) nanoparticelle AuNp1 in D_2O .

5.15.2. Sintesi e caratterizzazione delle nanoparticelle NpCe(IV)

La sintesi e la ricopertura delle nanoparticelle è stata condotta in maniera analoga alla precedente. In questo caso la purificazione si è rivelata maggiormente laboriosa in quanto il tiolo (e quindi le nanoparticelle ricoperte) è solubile in toluene e le particelle passivate non precipitano da questo solvente. Dopo la ricopertura si è allontanato il solvente e il campione è stato disciolto in 3 mL di metanolo. In seguito a due colonne ad esclusione dimensionale (Sephadex LH-60) in metanolo si sono ottenute le nanoparticelle esenti da inquinanti (17.5 mg) solubili in acqua.

Anche in questo caso l'analisi TEM (*figura 92*) fornisce dimensioni simili alle precedenti ed il diametro medio è risultato essere di 2.3 ± 0.8 nm.

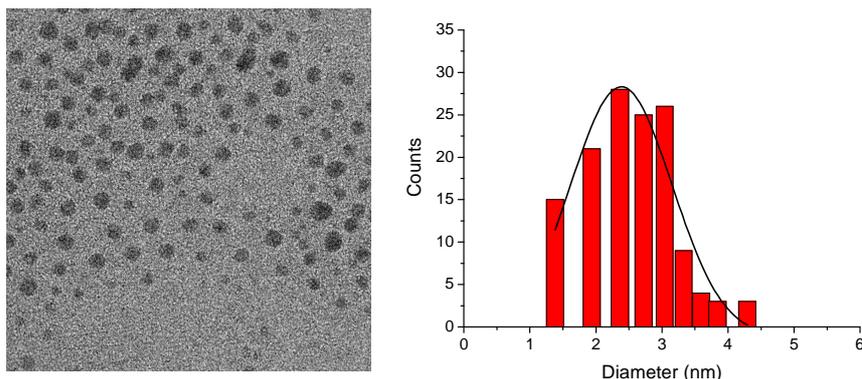


Figura 92: Immagine TEM e distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle NpCe(IV).

L'analisi $^1\text{H-NMR}$ conferma la ricopertura delle nanoparticelle con il legante desiderato e, mediante l'aggiunta di uno standard (acetonitrile), si è ottenuto un primo valore indicativo della concentrazione dell'unità legante (*figura 93*).

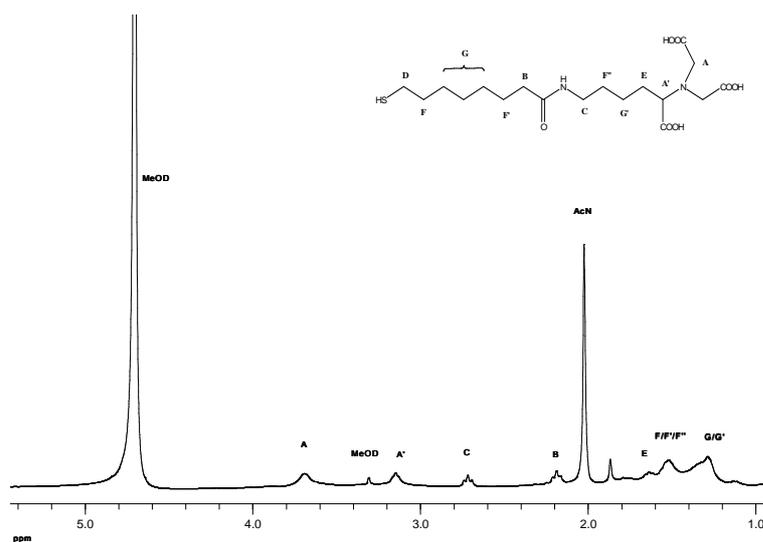


Figura 93: Spettro $^1\text{H-NMR}$ 300MHz in CD_3OD delle nanoparticelle NpCe(IV).

5.15.3. Sintesi e caratterizzazione delle nanoparticelle NpCo(III)

La sintesi e la ricopertura delle nanoparticelle è stata condotta in maniera analoga alle precedenti. In questo caso la purificazione si è rivelata particolarmente laboriosa in quanto, come illustrato nel capitolo precedente, si è dovuto purificare il campione di nanoparticelle ricoperte con il legante, effettuare la completa metallazione con lo ione Co(II), ossidare il centro metallico e successivamente purificare nuovamente le

nanoparticelle dal metallo in eccesso. Dopo la ricopertura delle nanoparticelle con il tiolo recante l'unità legante si sono aggiunti nella soluzione in toluene 5 mL di acqua mQ. Si osserva il rapido passaggio delle nanoparticelle nella fase acquosa, che diventa di colore marrone scuro. Si sono effettuati quindi più lavaggi della fase acquosa con alcuni solventi organici quali etere etilico (tre lavaggi), toluene (tre lavaggi) ed etile acetato (5 lavaggi). Successivamente mediante eluizione con una colonna ad esclusione dimensionale Sephadex G-25 usando acqua mQ come eluente si sono ottenute le nanoparticelle desiderate esenti da inquinanti molecolari in soluzione. Dagli spettri riportati in *figura 94* si possono osservare chiaramente i picchi allargati relativi allo spacer a 1.2-1.8 ppm (S) e quelli appartenenti al macrociclo attorno ai 3 ppm (Cy). Il campione così ottenuto si è quindi disciolto in 10 mL di acqua mQ e, sotto agitazione, si sono aggiunti 0.030 g (0.127 mmol) di $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (due equivalenti rispetto allo stechiometrico). L'ossidazione a Co(III) è stato condotto mediante gorgogliamento di aria per un notte⁽⁴⁸⁾ precedentemente purificata dall'anidride carbonica con una soluzione 6 M di NaOH. In seguito ad una nuova colonna ad esclusione dimensionale (Sephadex G-25) in acqua mQ si sono ottenute le nanoparticelle metallate con lo ione Co(III) esenti da inquinanti (12 mg) solubili in acqua. Dal confronto dello spettro del campione finale (*figure 94 e 95*) con quello delle particelle non metallate si può notare la variazione dei segnali a circa 3 ppm, relativi al ciclen e al metilene in alfa dello spacer, dovuta alla presenza del metallo. La conversione del metallo nello stato di ossidazione (III) rende il complesso non paramagnetico, quindi osservabile all'NMR.

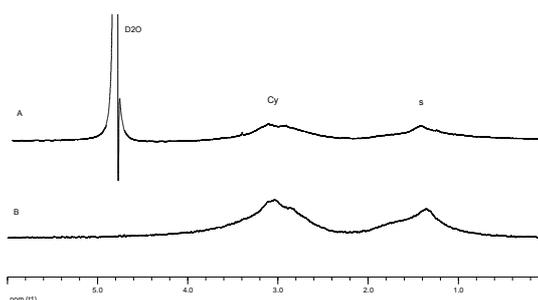


Figura 94: Spettro $^1\text{H-NMR}$ 300MHz in D_2O delle nanoparticelle NpCo(III) non metallate (A) e spettro diffusion filter per lo stesso campione (B).

Parte sperimentale

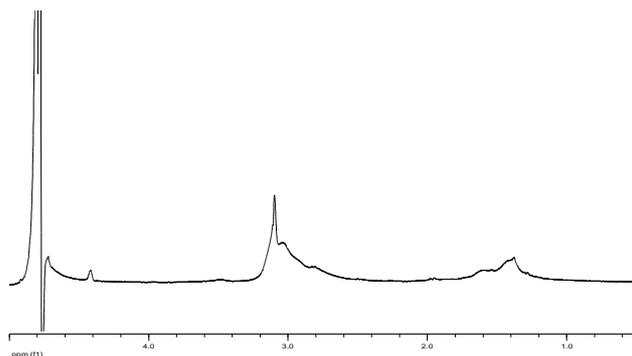


Figura 95: Spettro $^1\text{H-NMR}$ 300MHz in D_2O delle nanoparticelle NpCo(III) metallate.

Anche in questo caso l'analisi TEM (*figura 96*) fornisce dimensioni simili alle precedenti ed il diametro medio è risultato essere di 2.4 ± 0.8 nm.

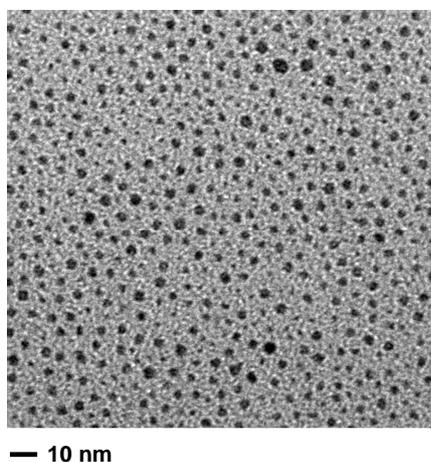


Figura 96: Immagine TEM e distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle NpCo(III) .

L'analisi $^1\text{H-NMR}$ conferma la ricopertura delle nanoparticelle con il legante desiderato ma non è in grado di fornire informazioni quantitative a riguardo della concentrazione del campione di nanoparticelle e del complesso di cobalto. Per ottenere queste informazioni è stata eseguita la mineralizzazione del campione in HCl/HNO_3 e successivamente sono state determinate le concentrazioni di oro e cobalto tramite assorbimento atomico secondo procedura standard⁽⁴⁹⁾. Si è quindi ottenuto il valore della concentrazione di complesso e del rapporto oro/tiolo, che può essere confrontato con i dati ritrovati in letteratura per nanoparticelle aventi lo stesso diametro⁽⁴⁷⁾. Per ottenere un'ulteriore conferma della esatta composizione del campione è stata eseguita un'analisi termogravimetrica (TGA) che fornisce il rapporto tra la parte organica e quella inorganica del campione. I dati sono riportati in *tabella 9* e sono tutti in buon

accordo tra loro e con i valori delle nanoparticelle ritrovate in letteratura aventi queste dimensioni.

Valore [unità] (tecnica)	Teorico	Sperimentale
Rapporto Au/Co [mol/mol] (AA)	2.33	2.07
Concentrazione Au [ppm] (AA)	2.00	2.43
Concentrazione Co [ppm] (AA)	2.00	2.12
Rapporto Org/Inorg [m/m] (TGA)	0.35	0.37

Tabella 9: Valori della composizione delle nanoparticelle **NpCo(III)** ottenuti tramite assorbimento atomico (AA) e analisi TGA e rispettivi valori teorici.

Parte 2: Nanoparticelle d'oro passivate come analoghi sintetici del batterio *Neisseria Meningitidis*

6. Introduzione

6.1. Multivalenza

Il concetto di “legante o sistema multivalente”, introdotto nella prima parte di questa Tesi, ha trovato grande importanza negli ultimi anni in seguito agli sviluppi nel campo delle scienze biochimiche. Il progresso legato dei metodi di analisi in campo biologico ha permesso una comprensione sempre migliore dei meccanismi che consentono ad ogni organismo di modulare le proprie funzioni in base agli stimoli esterni dell’ambiente in cui si trova⁽⁵⁰⁾. In particolare, ciò che sembra emergere in maniera sempre più evidente, è che molteplici attività complesse che avvengono a livello cellulare sono governate da meccanismi di tipo cooperativo, in cui molteplici interazioni deboli aventi per oggetto diverse copie della stessa molecola generano come risultato un’interazione forte e selettiva.. Dalla conoscenza sempre più completa di questi meccanismi nasce, nel campo della sintesi, la necessità di realizzare composti in grado di interagire in modo cooperativo con il sistema bersaglio. I sistemi multivalenti tentano quindi di soddisfare questa necessità.

Con il termine di “legante multivalente” si intende una struttura centrale (*scaffold*) a cui sono legate più copie della molecola responsabile dell’attività. Questa può essere un carboidrato, un peptide, una proteina o una molecola di altra natura a seconda del recettore bersaglio. Se le molecole periferiche sono responsabili dell’interazione con il target, la struttura centrale determina invece caratteristiche del legante come l’architettura, la forma e la funzionalizzazione (facilità di legare le molecole attive, numero ed orientamento di queste). Il metodo generalmente più utilizzato per ottenere composti di questo tipo è quello di realizzare per sintesi uno *scaffold* che permetta, in un secondo momento, la polifunionalizzazione.

Esempi di *scaffold* utilizzati per la creazione di sistemi multivalenti sono micelle, polimeri, dendrimeri e nanoparticelle passivate,. Le nanoparticelle passivate con composti organici sono probabilmente il sistema più idoneo per questi scopi in quanto, a differenza delle micelle sono maggiormente stabili in condizioni fisiologiche e, al

contrario di polimeri e sistemi dendrimerici, presentano sintesi e purificazioni più semplici.

6.1.1. Nanoparticelle d'oro passivate come sistemi multivalenti autoassemblati

Come si è accennato nel precedente paragrafo, usualmente un sistema multivalente viene realizzato per sintesi covalente mediante la funzionalizzazione di una opportuna piattaforma (scaffold) dotata di siti di reazione multipli cui legare le molecole responsabili dell'interazione con il target desiderato. In genere reazioni di polifunionalizzazione presentano il problema della non completa modificazione dei gruppi funzionali interessati, per cui sono necessarie condizioni di reazione piuttosto drastiche e tediose separazioni delle miscele ottenute per l'ottenimento dei prodotti desiderati. Esempi sono costituiti dai sistemi basati su polimeri o dendrimeri. Se la formazione del sistema multivalente avvenisse però attraverso un processo spontaneo di autoassemblaggio dei singoli componenti il problema sintetico sarebbe estremamente semplificato in quanto si ridurrebbe alla sintesi delle unità monomeriche. In natura esistono vari esempi di strutture complesse autoassemblate. Tra queste le più note sono probabilmente le membrane cellulari costituite da aggregati spontanei di fosfolipidi. Un esempio di sistema artificiale è costituito da aggregati nanometrici di particelle di oro ricoperti da un monostrato di leganti organici. Questi sistemi sono di realizzazione relativamente semplice in quanto, una volta preparato il nucleo d'oro della dimensione opportuna, la sua ricopertura con molecole organiche dotate di un gruppo tiolico avviene in maniera spontanea sfruttando l'interazione tra i tioli e gli atomi d'oro della superficie del nano sistema⁽⁵⁴⁾.

Le nanoparticelle di oro, quindi, costituiscono una struttura ideale per la realizzazione di strutture multivalenti⁽⁵⁵⁾. La loro sintesi relativamente semplice e standardizzabile costituisce un aspetto assai attraente e la loro geometria simil-sferica garantisce una distribuzione uniforme delle molecole attive sulla superficie. Inoltre la funzionalizzazione non richiede processi complessi e permette di arrivare fino a rapporti di 1000 molecole attive per ogni nanoparticella. Queste sono caratteristiche decisamente importanti per quanto riguarda l'aspetto cooperativo e di "somma dei contributi" di molti meccanismi biologici.

6.2. Multivalenza e sistema immunitario

Come esempio dell'utilità di un sistema multivalente si può considerare il processo fisiologico che porta all'attivazione dei macrofagi in seguito all'interazione con anticorpi legati a batteri o virus (*figura 97*).

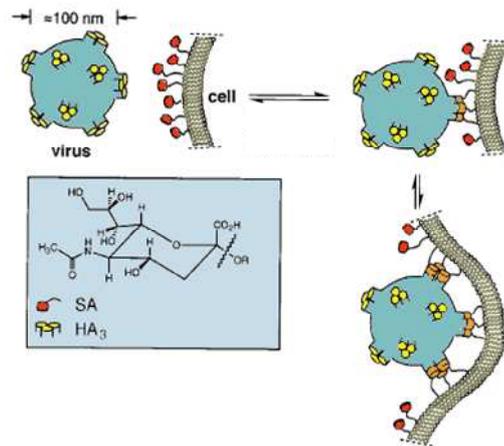


Figura 97: Meccanismo della fagocitosi da parte di un macrofago.

Il processo di fagocitosi da parte di cellule specifiche costituisce il punto di partenza dell'intero meccanismo di attivazione della risposta immunitaria cellulare. Tale processo viene stimolato dagli anticorpi ed altre proteine del plasma. Infatti, tra le funzioni effettrici delle immunoglobuline circolanti c'è quella di legarsi a strutture esogene per facilitare il compito delle cellule fagocitarie specializzate (*opsonizzazione*). Il contatto tra un anticorpo legato ad un patogeno ed un macrofago è mediato da un particolare recettore, situato sulla membrana del macrofago, che è in grado di legare alcune porzioni dell'anticorpo. La formazione di questi legami è in grado di stimolare l'attività fagocitaria del macrofago, ma tale stimolazione non avviene nel caso in cui un singolo anticorpo si leghi ad un recettore. Se così fosse si avrebbe attivazione del macrofago anche in seguito al legame con singoli anticorpi liberi, cosa inutile ai fini dell'attività immunitaria. L'attivazione del macrofago avviene solamente in seguito al legame contemporaneo di diversi anticorpi tramite diversi recettori. Una situazione di questo tipo può essere dovuta solamente alla presenza nelle vicinanze della cellula fagocitaria di una struttura esogena opsonizzata da numerosi anticorpi. Per destare l'attività del macrofago è necessaria quindi la cooperazione di stimoli molteplici; solamente infatti l'attivazione di diversi recettori porta ad un cross-linking degli stessi e

all'attivazione del meccanismo che determina la fagocitosi. È chiaro quindi che la "densità" di molecole di antigene sulla superficie della cellula patogena determina il legame di quantità maggiori o minori di immunoglobuline alla cellula; ed un numero maggiore di anticorpi legati alla superficie si traduce in una attivazione più pronta delle cellule fagocitarie. Una struttura sintetica che voglia inserirsi in questo processo deve quindi avere la possibilità di presentare sulla propria superficie una gran quantità di antigeni, in maniera da risultare più facilmente opsonizzabile e quindi "riconoscibile" dalle cellule fagocitarie. Una nanoparticella, grazie alla struttura simil-sferica e al suo elevato grado di funzionalizzazione, possiede le giuste caratteristiche di accessibilità e riconoscibilità da parte del sistema immunitario, risultando quindi uno *scaffold* ideale per la creazione di strutture sintetiche che simulino la struttura di un agente microbico patogeno.

6.3. Nanoparticelle passivate come antigeni

La possibilità di funzionalizzarne la superficie di nanoparticelle con molecole in grado di generare una risposta immunitaria apre la strada a diverse applicazioni in campo biomedico, come quello della immunizzazione.

Il concetto che costituisce la base dei vaccini di nuova generazione è quello di creare strutture sintetiche che vengano riconosciute dal sistema immunitario come agenti patogeni, pur non presentando alcun pericolo per l'organismo ospite. Lo sviluppo crescente delle tecniche di analisi di architettura molecolare ha permesso di progredire enormemente nella conoscenza della struttura biologica di molti patogeni, e proprio da qui nasce questa nuova strategia nella realizzazione di vaccini artificiali.

Tra le classi di antigeni riconosciuti come componenti della struttura batterica quella dei polisaccaridi è attualmente molto studiata. I carboidrati, infatti, possiedono una grande varietà di possibili variazioni strutturali: stereocentri multipli, legami anomeric, dimensioni dell'anello e possibili sostituzioni chimiche. Queste peculiari caratteristiche della loro struttura, insieme alla loro collocazione sulla superficie cellulare, li rendono i principali partecipanti al processo di riconoscimento intercellulare. Nanoparticelle funzionalizzate sulla superficie con opportuni derivati

saccaridi potrebbero quindi essere in grado di simulare la membrana batterica agendo da vaccini artificiali.

Nella realizzazione di questi sistemi, un fattore particolarmente importante è quello che riguarda la funzionalizzazione del nucleo metallico. La normale struttura di un batterio prevede la presenza di lunghe catene polisaccaridiche (glicolipidi e glicoproteine) con siti di legame multipli e ramificazioni della catena (*figura 98*).

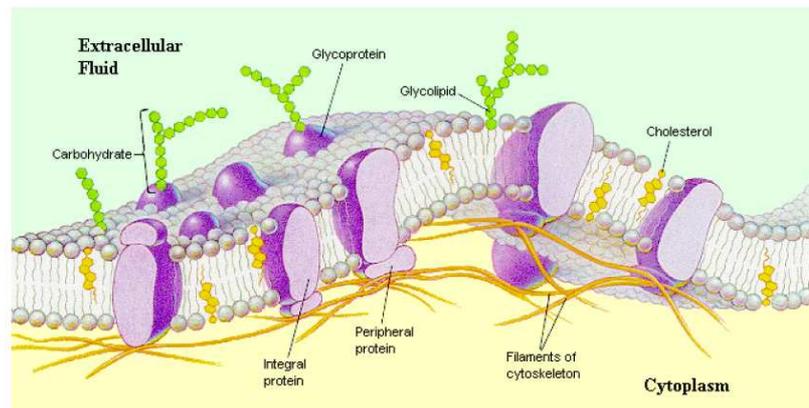


Figura 98: Struttura della parete cellulare batterica.

Una struttura cellulare di questo tipo genera la multivalenza necessaria al riconoscimento. Le nanoparticelle, invece, vengono funzionalizzate generalmente con oligosaccaridi (viste le difficoltà sintetiche di ottenere catene saccaridiche di dimensioni elevate), ma l'elevata quantità di molecole legabili alla superficie permette di ottenere comunque l'effetto di cooperazione necessario al riconoscimento. Un altro aspetto particolarmente interessante è la natura globulare e polivalente della superficie di una nanoparticelle glicoconjugata; una struttura di questo tipo mima in maniera particolarmente verosimile la rete di polisaccaridi che riveste la parete cellulare dei batteri.

6.4. Batterio *Neisseria Meningitidis* e relativi oligosaccaridi

Il batterio *Neisseria Meningitidis* è responsabile dell'insorgere della meningite, con diffusione in tutti e cinque i continenti, in bambini ed adulti. Il tasso di mortalità, senza una adeguata terapia antibiotica è estremamente alto, e l'infezione può comunque causare danni neurologici gravi e permanenti⁽⁵⁶⁾.

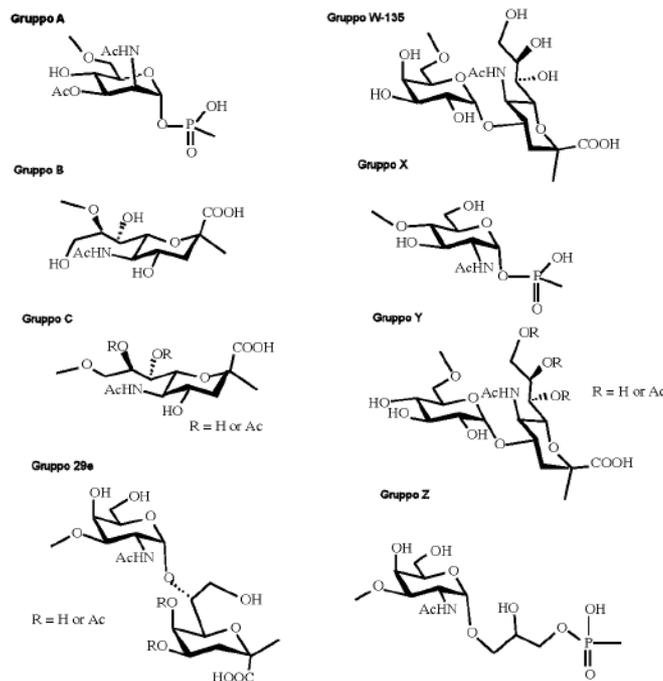


Figura 99: Polisaccaridi capsulari.

Il *Neisseria Meningitidis* è un organismo Gram-negativo ed è stato classificato in diversi tipi sulla base della struttura del polisaccaride capsulare (A, B, C, 29e, W-135, X, Y e Z) (figura 99). Il polisaccaride presente nella capsula batterica del gruppo A è formato da monomeri di N-acetil mannosammina 1-fosfato, mentre quelli dei gruppi B e C sono omopolimeri di acido sialico con legami α -2-8. Data la loro importanza da un punto di vista epidemiologico, diversi studi sono stati dedicati a ricostruirne la struttura. Una volta ottenute delle strutture sintetiche adeguate, sono state utilizzate per la realizzazione di vaccini per la prevenzione dell'insorgere della malattia, ma l'efficacia della sensibilizzazione nei confronti di questi gruppi è risultata scarsa. Le ragioni di questa modesta immunogenicità nell'uomo sono essenzialmente di due tipi: da un lato il legame che unisce i monomeri risulta estremamente labile, sia in ambiente moderatamente acido che per effetto dell'idrolisi da parte di enzimi e dall'altro gli acidi polisialici possono non essere riconosciuti come esogeni dall'organismo, a causa della produzione, durante i primi momenti della vita fetale, di polimeri simili all'acido sialico.

Le strategie scelte per ovviare a questo problema hanno inizialmente riguardato la produzione di complessi di coniugazione di vari analoghi con proteine, ma anche in questo caso il risultato era stato molto modesto.

La ricerca si è quindi mossa verso modificazioni della struttura del polimero in associazione a strategie di glicoconiugazione. Esempi di questo tipo di approccio sono gli studi svolti da G. Boons ed altri che, una decina di anni fa, avevano messo a punto una metodologia di sintesi per realizzare un glicopeptide basato sulla struttura delle proteine di membrana del *Neisseria Meningitidis*-gruppo B (figura 100). In questo lavoro si era studiato un composto formato da un oligosaccaride (4 unità) come antigene, una catena alchilica come braccio spaziatore, ed un peptide (basato sulle strutture di una proteina e di un lipopeptide di membrana) con funzione di immunostimolatore⁽⁵⁷⁾.

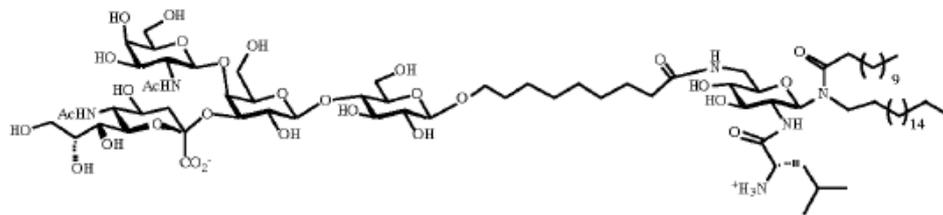


Figura 100: Struttura proposta da Boons come vaccino per *N. Meningitidis*-gruppo B

Strutture di questo tipo si sono dimostrate molto più efficaci di quelle derivanti dalla più usata coniugazione con vettori proteici.

7 Scopo

Vista l'esperienza maturata nel campo della preparazione di nanoparticelle d'oro ricoperte con molecole organiche, che aveva portato alla preparazione dei diversi tipi di nanoparticelle illustrate nel capitolo precedente, mi è sembrato interessante estendere l'utilizzo dei sistemi realizzati ad altri settori. Lo scopo del lavoro presentato in questo capitolo è quello di inserirsi nel panorama della ricerca sui complessi glicoconjugati per la produzione di vaccini contro il *Neisseria Meningitidis*.

Il punto di partenza è stato l'ottenimento, da parte del prof. L. Lay dell'università di Milano, di una nuova molecola oligosaccaridica in grado di provocare una risposta immunitaria come analogo della struttura del glicocalice del batterio della meningite⁽⁵⁸⁾. Gli studi svolti hanno portato alla sintesi di derivati della N-acetilmannosammina, presente nella struttura del glicocalice del gruppo batterico A. Il principale problema nella realizzazione di glicoconjugati di tale struttura è la scarsa stabilità chimica del ponte fosfodiesterico che lega i monomeri. L'eccessiva labilità che deriva da questo gruppo rende difficile la realizzazione di composti stabili in ambiente biologico. La sintesi chimica di composti contenenti analoghi del ponte fosfodiesterico, in particolare fosfonati (*figura 101*) si è rivelata una scelta in grado di aumentare la stabilità della componente saccaridica. L'obiettivo del mio lavoro è stato quello di verificare la possibilità di utilizzare questi derivati in associazione a vettori originali per la somministrazione.

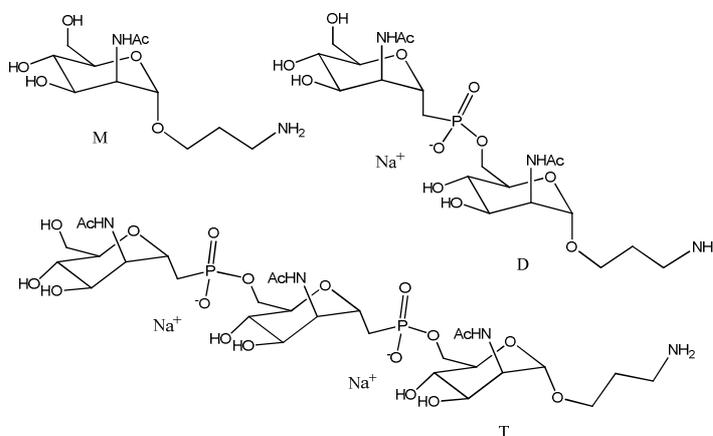


Figura 101: Struttura dei derivati della N-Acetilmannosammina utilizzati.

Scopo

In particolare, per la funzionalizzazione delle nanoparticelle d'oro sono stati utilizzati derivati di mono, di e trisaccaridi. Questi derivati sono stati dotati di una catena spaziatrice terminante con un gruppo tiolico, che permettesse il legame delle unità saccaridi che con la superficie delle nanoparticelle. Sono quindi stati sintetizzati i derivati MSH, DSH e TSH (*figura 101*) ed utilizzati per la passivazione di nanoparticelle d'oro di dimensioni diverse e coperte da monostrati di composizione differente

8. Risultati

8.1. Sintesi

8.1.1. Sintesi dei derivati MSH, DSH e TSH

Studi di letteratura condotti sulle nanoparticelle d'oro ricoperte da un monostrato organico hanno dimostrato che la loro stabilità è legata alle caratteristiche dei tioli costituenti. In particolare si è osservato che la stabilità aumenta con il crescere delle unità metileniche che separano la funzione tiolica dai gruppi funzionali posti all'altra estremità. Questo è apparentemente dovuto al maggiore isolamento del nocciolo d'oro dal solvente che impedisce il distacco dei tioli dal monostrato, una delle cause principali della loro instabilità. Per questa ragione si è pensato di utilizzare una catena spaziatrice costituita da sette unità metileniche alla cui estremità vi fosse una funzione acido carbossilico per la coniugazione con le unità saccaridiche mediante un legame ammidico. Si è quindi partiti dall'acido ω -bromoottanoico, prodotto commerciale, che è stato tioacetilato per reazione con potassio tioacetato. Successivamente la funzione carbossilica è stata attivata mediante la formazione dell'estere con il pentafluorofenolo per procedere poi con la formazione dell'ammide mediante reazione con l'unica ammina libera del derivato saccaridico. La rimozione dell'acetile dal tiolo terminale è stata eseguita mediante idrolisi basica con metossido di sodio subito prima della ricopertura delle nanoparticelle per evitare ossidazione del tiolo stesso a disolfuro. La procedura di sintesi sopra descritta è riportata in *figura 102*.

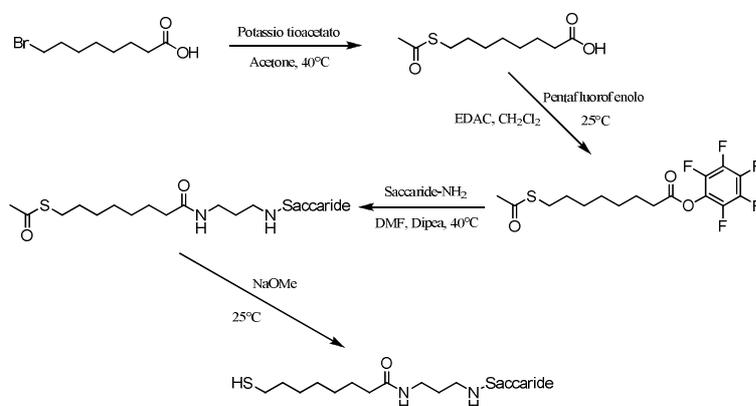


Figura 102: Procedura di sintesi utilizzata per i derivati MSH, DSH e TSH.

8.1.2. Sintesi e purificazione delle nanoparticelle passivate

La sintesi delle nanoparticelle è stata condotta in maniera analoga a quanto descritto nel *paragrafo 3.3*. Sono state preparate nanoparticelle coperte da tre saccaridi (monomero, MSH; dimero, DSH; e trimero, TSH), con diametri diversi (2, 3.5, 5 nm) e con diversi tioli nel monostrato stabilizzante. In particolare sono state sintetizzate nanoparticelle dal diametro di 5 nm, chiamate M5, D5 e T5 ricoperte rispettivamente con i tioli MSH, DSH e TSH. Per valutare gli effetti della dimensione della nanoparticella, sono stati sintetizzati i campioni di nanoparticelle M2 e M 3.5, dai diametri rispettivamente di 2 e 3.5 nm ricoperte con il tiolo MSH. Per valutare l'effetto della composizione del monostrato e della densità superficiale di unità attive, sono stati preparati i campioni 75M5 e 50M5, dalle dimensioni di 5 nm e contenenti rispettivamente il 75% e il 50% di tiolo MSH insieme al tiolo idrofilo **52**.

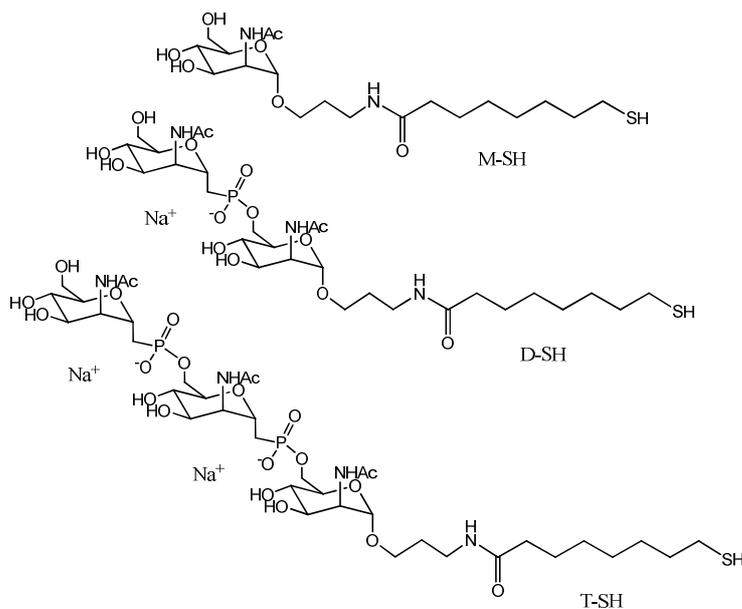


Figura 103: Strutture dei derivati saccaridici derivatizzati con il gruppo tiolico utilizzati per la ricopertura delle nanoparticelle d'oro.

Come illustrato in precedenza l'ottenimento di nanoparticelle con diversi diametri è possibile mediante la variazione del rapporto Au(III)/diottilammina nella fase di sintesi delle particelle ⁽³⁶⁾.

Una volta aggiunto/i i diversi tioli alla soluzione in toluene di nanoparticelle stabilizzate da diottilammina, si osserva la precipitazione delle nanoparticelle ricoperte sotto forma di un solido nero. Si aggiunge quindi una piccola quantità di acqua e le

nanoparticelle, avendo un carattere idrofilico, si sciolgono rapidamente nella fase acquosa e vengono purificate mediante estrazioni con aliquote di etere etilico, toluene ed acetato di etile. Una ulteriore purificazione prevede la precipitazione delle nanoparticelle da acqua mediante aggiunta di THF. Le nanoparticelle ottenute sono state caratterizzate tramite $^1\text{HNMR}$, TEM e TGA.

8.2. Test di attività biologica

Le nanoparticelle funzionalizzate con i derivati saccaridici sono state sottoposte a test competitivo ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay) di affinità nel laboratorio della Prof. Lombardi. Senza entrare nei dettagli dell'esperimento, va sottolineato che questo test è indice dell'interazione antigene-anticorpo. Nel nostro caso il test mette in evidenza la capacità degli epitopi saccaridici di competere con il polisaccaride naturale di riferimento (MEN A) per la complessazione agli anticorpi di questo stesso frammento.

In *figura 104* sono riportati i risultati ottenuti per le nanoparticelle M5, D5 e T5, aventi il diametro di 5 nm e completamente funzionalizzate rispettivamente con il mono, di e trisaccaride. L'attività di questi campioni è stata comparata con le rispettive unità saccaridiche libere M, D e T.

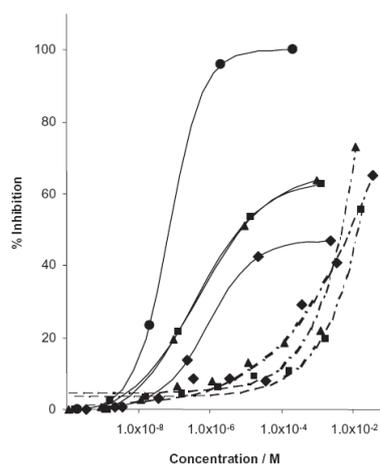


Figura 104: Test ELISA: Inibizione percentuale del binding di Men A verso l'anticorpo monoclonale di topo con i campioni in esame M5 (◆), D5 (■) e T5 (▲) linee continue e M (◆), D (■) e T (▲) linee tratteggiate. ● = Men A. Le concentrazioni sono espresse in unità saccaridica.

Risultati

Dai profili di *figura 104* si può osservare che nessun campione è in grado di inibire completamente il binding del Men A verso il suo specifico anticorpo. I valori di IC_{50} di tutti i campioni sono stati riportati nella *tabella 10*. Essi sono stati determinati dal punto di flesso delle curve sigmoidali dei test ELISA. Questi dati rivelano che le nanoparticelle passivate sono molto più attive dei rispettivi oligomeri e sono in grado di diminuire il valore di IC_{50} di almeno due ordini di grandezza.

Confrontando tra loro i valori di IC_{50} dei tre campioni di nanoparticelle aventi lo stesso diametro e diversa ricopertura (MSH, DSH e TSH) si può osservare che c'è una scarsa dipendenza dalla composizione del monolayer. L'anticorpo è quindi in grado di riconoscere la superficie globale del monostrato e non le singole subunità.

Campione	IC_{50} [M]	Inibizione massima [%]
Men A	$2.8 \cdot 10^{-8}$	100
M5	$8.7 \cdot 10^{-7}$	47
D5	$7.8 \cdot 10^{-7}$	63
T5	$1.5 \cdot 10^{-6}$	64
75M5	$3.2 \cdot 10^{-6}$	30
50M5	$6.9 \cdot 10^{-6}$	39
M2	$3.7 \cdot 10^{-6}$	52
M3.5	$1.3 \cdot 10^{-6}$	60

Tabella 10: Risultati dei test ELISA.

Questo effetto è confermato dalle attività delle nanoparticelle con una decrescente quantità di monosaccaride (campioni 75M5 e 50M5). In questo caso, infatti il valore di IC_{50} decresce con l'aumentare di unità MSH nel monolayer organico. Questo valore, infatti, passando dal campione M5 a 50M5 aumenta di quasi un ordine di grandezza, confermando la natura multivalente dell'interazione. Quindi maggiore è la densità di saccaridi nel monostrato maggiore sarà l'interazione con l'anticorpo e minore è il valore di IC_{50} rivelato (*figura 105*).

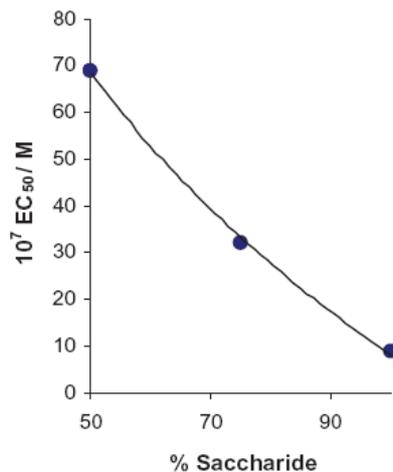


Figura 105: Dipendenza del valore do IC_{50} dalla percentuale di composto *M* nel monostrato.

E' stato inoltre determinato l'effetto della dimensione delle nanoparticelle. Nanoparticelle aventi un maggior diametro sono maggiormente attive di quelle più piccole. Questo comportamento può esser dovuto al minor raggio di curvatura delle nanoparticelle aventi dimensioni maggiori e quindi alla maggior vicinanza dei saccaridi. L'anticorpo è in grado quindi di riconoscere in maniera più efficace i monostrati maggiormente organizzati.

9. Parte sperimentale

9.1. Strumentazione

Lo spettrometro NMR utilizzato è un Bruker AC 250F operante a 250 MHz per spettri protonici e a 62.9 MHz per spettri al ^{13}C . I chemical shift sono riferiti al tetrametilsilano utilizzato come standard interno.

La simbologia usata per descrivere i segnali spettrali è la seguente: s = singoletto, d = doppietto, t = tripletto, q = quartetto, qn = quintetto, st = sestetto, m = multipletto, b = allargato.

Le analisi ESI-MS sono effettuate con lo strumento LC/MSD Trap-SL & XCT della Agilent Technologies.

Le analisi termogravimetriche sono state condotte con uno strumento SDT 2960 modello TA in un intervallo di temperatura da 30 a 800°C con una rampa di 20°C/min.

9.2. Materiali e soluzioni

9.2.1. Solventi e prodotti commerciali

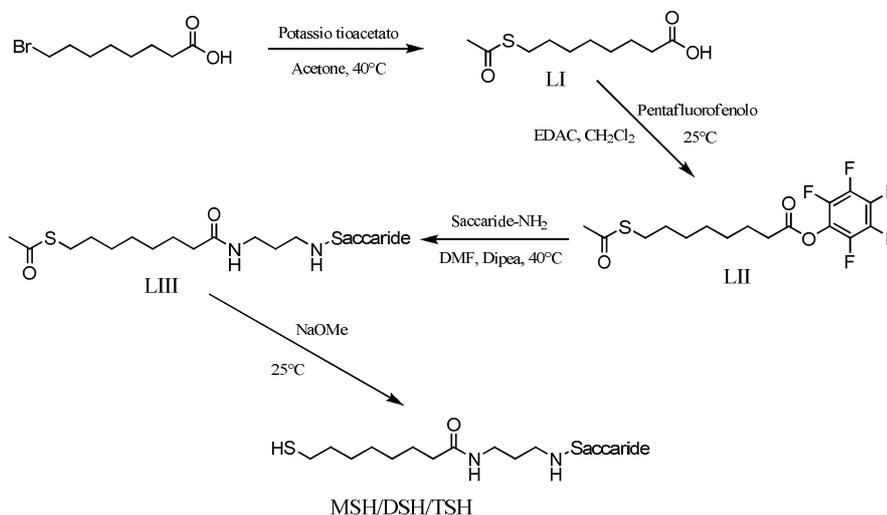
I solventi e i prodotti commerciali generalmente vengono usati senza ulteriore purificazione e, quando necessaria, la purificazione e l'anidrifazione dei solventi è effettuata con tecniche standard.

Le soluzioni madri di campioni vengono preparate utilizzando acqua deionizzata filtrata con sistema MILLI-Q della Millipore (H_2O mQ).

Il gel di silice utilizzato per le colonne cromatografiche flash è Machery-Nagel ed ha granulometria 230-400 mesh. Per la cromatografia su strato sottile sono state utilizzate lastre di gel di silice Merck tipo 60 F₂₅₄.

9.3. Sintesi

I saccaridi MSH e TSH sono stati sintetizzati seguendo la procedura di letteratura per la sintesi del tiolo DSH⁽⁵⁹⁾ ed è la seguente:



9.3.1. 8-tioacetil pentafluorofenil ottanoato (LII)

L'acido 8-bromoottanoico (2.00 g, 8.96 mmol) è stato sciolto in acetone (60 mL) e sono stati aggiunti 2.25 g (19.72 mmol) di potassio tioacetato. La reazione è stata mantenuta a riflusso per 48 ore. E' stato poi evaporato il solvente ed il solido disciolto in CH₂Cl₂ (20 mL). La soluzione organica è stata lavata con acqua (5 x 20 mL) ed anidrificata con Na₂SO₄. Evaporando il solvente si ottengono 1.917 g (98%) di acido 1-(tioacetil)ottanoico (LI) sotto forma di olio arancione. ¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz), δ: 2.83 (t, 2H, 7 Hz), 2.31 (t, 2H, 7 Hz), 2.29 (s, 3H), 1.59 (m, 4H), 1.30 (m, 6H).

L'acido 1-(tioacetil)ottanoico ottenuto (1.917 g, 8.78 mmol) è stato disciolto in CH₂Cl₂ (60 mL) e sono stati aggiunti 2.101 g (11.414 mmol) di pentafluorofenolo e 2.188 g (11.414 mmol) di EDAC·HCl. La miscela è stata mantenuta in agitazione sotto azoto per 12 ore. La soluzione organica è stata lavata con acqua (5 x 20 mL) e anidrificata con Na₂SO₄. L'estere attivo desiderato è stato poi purificato tramite cromatografia flash (eluente: CH₂Cl₂/Etere di petrolio 1:1). Sono stati ottenuti 1.344 g (39%) di prodotto sottoforma di olio giallino.

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz), δ: 2.82 (t, 2H, 7 Hz), 2.62 (t, 2H, 7 Hz), 2.27 (s, 3H), 1.72 (qn, 2H, 7 Hz), 1.54 (qn, 2H, 7 Hz), 1.34 (m, 6H).

9.3.2. Sintesi dei tioli MSH e TSH

Ad una soluzione in DMF (4 mL) contenente l'8-tioacetilpentafluorofenilottanoato **LII** (159 mg, 0.409 mmol) sono stati aggiunti sotto azoto 0.34 mmol delle ammine (M, D o T) e DIPEA (53 mg, 0.41 mmol). Si è mantenuta la reazione a 40°C sotto azoto per una notte. Il solvente è stato rimosso all'evaporatore rotante e il prodotto isolato tramite triturazione con diclorometano/etere di petrolio. Mediante centrifugazione si sono ottenuti i tioli protetti con rese del 50/60 %. La deprotezione è avvenuta mediante la reazione in metanolo con 1.2 equivalenti di NaOMe a temperatura ambiente per un ora. Dopo questo periodo il pH è stato portato a 5 con HBr e il solvente evaporato ottenendo i prodotti desiderati sotto forma di solidi bianchi con resa quantitativa.

MSH:

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, D_2O) δ : 4.70 (s, 1H), 4.49 (br d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 3.88 (m, 2H), 3.85–3.50 (m, 3H), 3.40–3.25 (m, 4H), 2.53 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.24 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.09 (s, 3H), 1.78 (qn, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.63(m, 4H), 1.45–1.35 (m, 6H).

ESI-MS+(H_2O +HCOOH 0.1%) m/z : calc. ($\text{M}+\text{H}^+$) 437.22, trovato 437.2; calc. 459.21 ($\text{M}+\text{Na}^+$), trovato 459.2.

TSH:

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, D_2O) δ : 4.53 (br t, $J = 4.5$ Hz, 1H), 4.47 (m, 1H), 4.40 (m, 1H), 4.3–3.95 (m, 9H), 3.9–3.8 (m, 4H), 3.75–3.60 (m, 6H), 3.55 (m, 1H), 3.13 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.55 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.3–1.9 (m, 6H), 2.09 (s, 3H), 2.07 (s, 6H), 1.79 (qn, $J = 6.3$ Hz, 2H), 1.60 (m, 4H), 1.4–1.2 (m, 6H).

ESI-MS- (H_2O) m/z : calc. ($\text{M}+\text{H}^+$) 997.34, trovato 997.4.

9.4. Caratterizzazione delle nanoparticelle d'oro passivate

Gli spettri UV-Vis delle particelle dal diametro di 2 nm sono quelli tipici di nanoparticelle d'oro di dimensioni nanometriche, con un intenso assorbimento non strutturato in tutto l'intervallo del visibile che decresce al crescere della lunghezza d'onda, mentre per i campioni M5 e M3.5 si può osservare la presenza della banda plasmonica a circa 500 nm. La presenza di particelle di dimensioni nanometriche è

Parte sperimentale

confermata dall'analisi al microscopio a trasmissione elettronica (*figure 106-108*): il diametro medio è risultato essere di 1.9 ± 0.3 nm per i campioni da 2 nm, 3.4 ± 0.3 nm per i campioni da 3.5 nm e 5.2 ± 0.3 nm per i campioni da 5 nm.

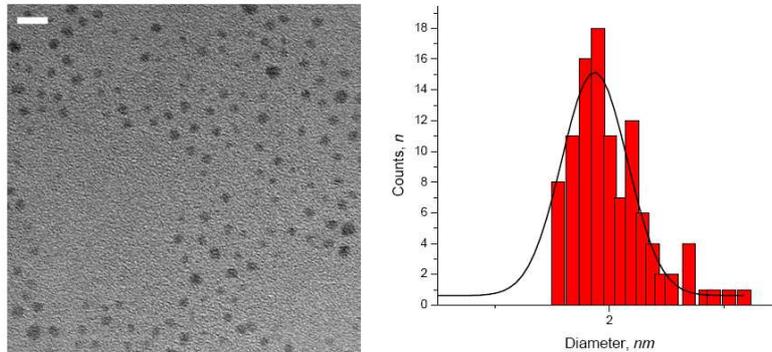


Figura 106: Immagine TEM e distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle M2 (la barra corrisponde a 6 nm).

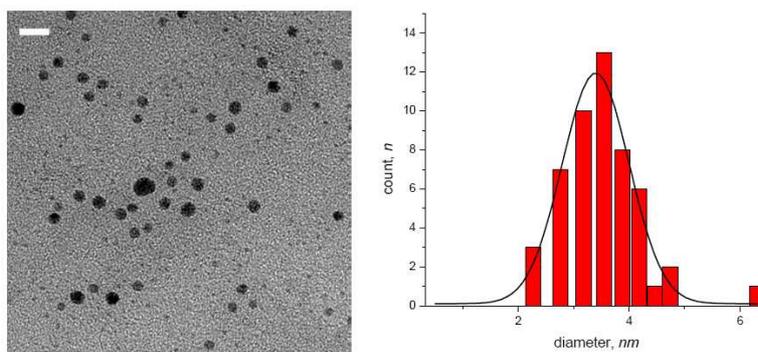


Figura 107: Immagine TEM e distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle M3.5 (la barra corrisponde a 6 nm).

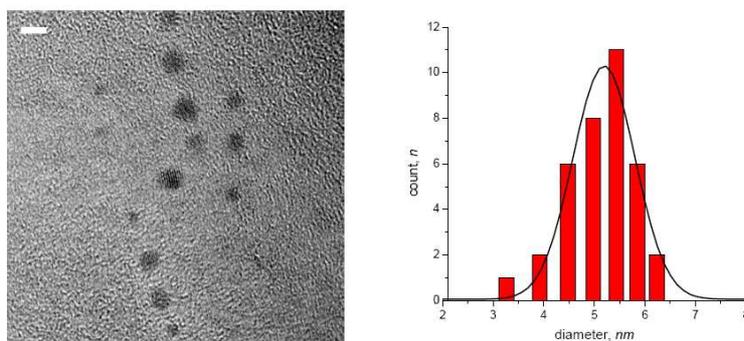


Figura 108: Immagine TEM e distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle M5 (la barra corrisponde a 6 nm).

Per quanto riguarda la composizione del monostrato organico della superficie delle particelle è stata investigata mediante $^1\text{H-NMR}$: gli spettri (*figura 109*) mostrano il tipico allargamento anisotropico dei segnali, che si riscontra per molecole legate a colloidali (a causa della bassa velocità di rivoluzione). In ogni caso i campioni risultano puri ed esenti di contaminanti a basso peso molecolare (ad eccezione di un singoletto a circa 1.7 ppm attribuito all'acetato di sodio).

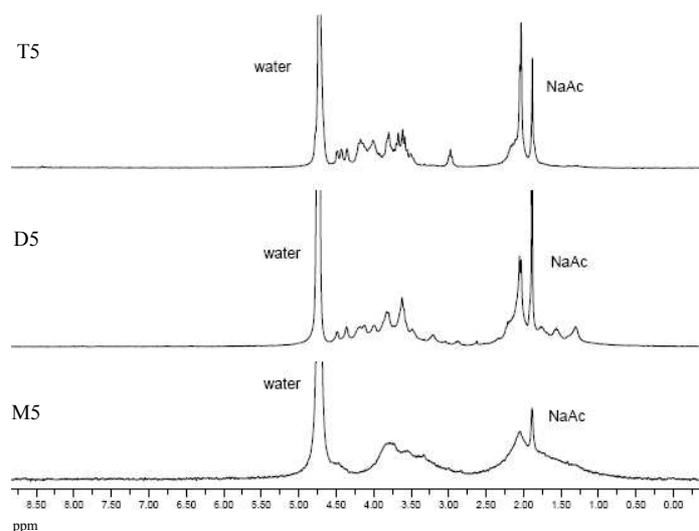


Figura 109: Spettri $^1\text{HNMR}$ (300 MHz, D_2O) dei campioni di nanoparticelle passivate.

L'assenza di specie molecolari libere è stata verificata tramite spettri NMR diffusion filter (LEDBP), nei quali è possibile osservare esclusivamente i protoni del monostrato organico della nano particella in quanto posseggono un basso coefficiente di diffusione (*figura 110*).

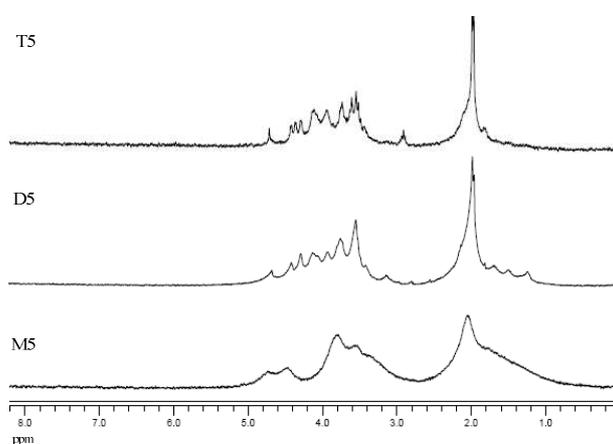


Figura 110: Spettri $^1\text{HNMR}$ diffusion filter (300 MHz, D_2O) dei campioni di nanoparticelle passivate: mixing time 0.2 s, $T = 28^\circ\text{C}$.

Parte sperimentale

Dal confronto tra gli spettri di *figura 109* e *110* si può osservare che (ad eccezione dell'inquinante sodio acetato e del solvente) sono assenti composti non legati alla nanoparticella.

Per quanto riguarda i campioni di nanoparticelle con monostrati misti (75M5 e 50M5) non è stato possibile determinare l'esatta composizione tramite integrazione dei segnali dei normali spettri NMR in quanto i picchi dei due tioli risultano essere sovrapposti tra loro. E' stato quindi necessario eseguire (su una piccola aliquota di campione) il distacco dei tioli dal monolayer mediante iodio con l'ottenimento di spettri di più facile interpretazione ed integrazione (*figura 111*).

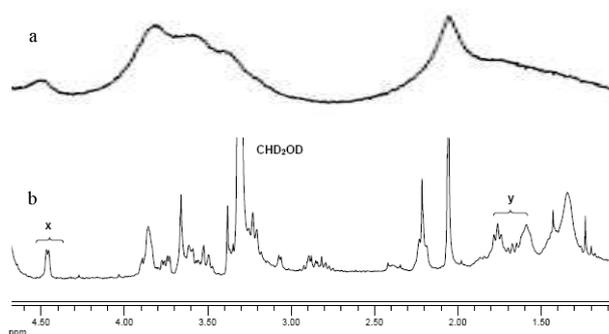


Figura 111: Spettri ^1H NMR delle nanoparticelle 75M5 prima (a) e dopo (b) la degradazione mediante iodio. L'integrazione dei picchi x e y fornisce la composizione del monolayer.

Per ottenere un'ulteriore conferma dell'esatta composizione e dimensione delle nanoparticelle sono state eseguite analisi termogravimetriche (TGA) che forniscono il rapporto tra la parte organica e quella inorganica. In *figura 112* è riportato un tipico profilo termogravimetrico per un campione di nanoparticelle passivate. Si può osservare che la maggior parte del processo degradativo avviene tra i 200 e i 400 °C, temperatura usuale per i comuni composti organici. La lettura della massa per la determinazione del rapporto oro/parte organica è stata effettuata alla temperatura di 700 °C.

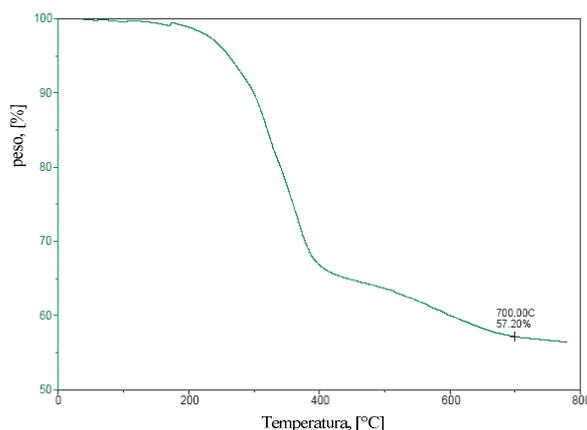


Figura 112: Profilo termogravimetrico per il campione M5. Velocità di scansione 20°C/min sotto azoto.

I dati ottenuti con le varie tecniche sono riportati in *tabella 11* e sono tutti in buon accordo tra loro e con i valori delle formule minime delle nanoparticelle ritrovate in letteratura aventi queste dimensioni.

Campione	Composizione [%] (Integrazione segnali $^1\text{HNMR}$)	Diametro [nm] (TEM)	% Parte organica (Integrazione picchi $^1\text{HNMR}$ con standard interno)	% Parte organica (TGA)
M5	100	5.1±0.9	20	19
D5	100	5.3±0.8	21	-
T5	100	5.2±0.9	22	-
75M5	74	5.2±0.8	18	-
50M5	49	5.1±0.7	18	-
M2	100	1.9±0.3	45	43
M3.5	100	3.4±0.6	31	-

Tabella 11: Valori della composizione e delle dimensioni delle nanoparticelle ottenuti tramite le tecniche descritte.

Tutte le nanoparticelle in esame sono risultate essere completamente solubili in acqua. Le soluzioni madri sono state preparate in acqua mQ e le concentrazioni di unità saccaridica sono state determinate tramite integrazione dei picchi $^1\text{HNMR}$ di una piccola aliquota di soluzione madre liofilizzata, disciolta in D_2O e addizionata di una quantità nota di nitrometano usato come standard interno. Le soluzioni madri risultano essere stabili in soluzione acquosa per molte settimane.

10. Bibliografia

1. Peter, K.; Vollhardt, C.; “*Chimica Organica*”, Zanichelli, 1990, 3
2. Breslow, R.; *Chem. Soc. Rev.* **1972**, 1, 553
3. Dugas, H.; Penney, C.; “*Bioorganic Chemistry*”, Springer-Verlag, New York, 1981
4. Lehninger, A. L.; “*Principles of Biochemistry*”, Worth Publ. New York, 1982
5. Williams, N. H.; Takasaki, B.; Wall, M.; Chin, J.; *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 485
6. Wilcox, D. E.; *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2435-2458
7. Strater, N.; Lipscomb, W.N.; Klabunde, T., Krebs, B.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 2024-2055
8. Lippard, J. S.; Berg, M. J.; “*Principles of Bioorganic Chemistry*”, University Science Books: Mill Valley, California, 1994, cap. 10, pp. 257-281
9. Hegg., E. L.; Burstyn, J. N.; *Coordination Chemistry Reviews* **1998**, 173, 133-165
10. Pingoud., A.; Fuxreiter., M.; Pingoud., V.; Wende., W.; *Cell. Mol. Life Science* **2005**, 62, 685-707
11. a) Suh., J.; *Bioorg. Chem.* **1990**, 18, 345-360. b) Chin., J.; *Acc. Res.* **1991**, 24, 145
12. Chin., J.; Banaszczyk., M.; Jubian., V.; Zou., X.; *JACS*, **1989**, 111, 186-190
13. Bertini., I.; Gray., H. B.; Lippard., S. J.; University Science Book, Mill Valley, 1994, 455-504
- 14a. Westheimer., F.H.; *Science* **1987**, 235, 1173-1178
- 14b. a) Hendry, P.; Sargeson, A. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 2521-2527. b) Norman, P. R.; Cornelius, R. D.; *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 2356-2361.
15. a) Chin, J.; Zou, X.; *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 110, 223-225. b) Chin, J.; Banaszczyk, M.; Jubian, V.; Zou, X.; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 186-190.

Bibliografia

16. Gellman, S. H.; Petter, R.; Breslow, R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2388-2394.
17. Deal, A. K.; Hengge, C. A.; Burstyn, N. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1713-1718.
18. Komiyama, M.; Takeda, N.; Shingekawa, H. *Chem. Commun.* **1999**, *16*, 1443.
19. Wall, M.; Hynes, C. R.; Chin, J.; *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1993**, *32*, 1663
20. Young, M. J.; Chin, J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10577.
21. a) Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Bianchi, A.; Fusi, B.; *Inorg. Chem.*, **1997**, *36*, 2784-2790. b) Bencini, A.; Bianchi, A.; Berni, E.; *Inorg. Chem.*, **1999**, *38*, 6323, 6325. c) B. Bauer-Siebenlist, F. Meyer, E. Farkas, D. Vidovic, J. A. Cuesta-Seijo, R. Herbst-Irmer and H. Pritzkow, *Inorg. Chem.*, **2004**, *43*, 4189-4202; d) B. Bauer-Siebenlist, F. Meyer, E. Farkas, D. Vidovic and S. Dechert, *Chem.-Eur. J.*, **2005**, *11*, 4349-4360; e) F. Meyer, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2006**, 3789-3800. f) M. Arca, A. Bencini, E. Berni, C. Caltagirone, F. A. Devillanova, F. Isaia, A. Garau, C. Giorgi, V. Lippolis, A. Perra, L. Tei and B. Valtancoli, *Inorg. Chem.*, **2003**, *42*, 6929-6939.
22. Sissi, C.; Rossi, P.; Felluga, F.; Formaggio, F.; Palombo, M.; Tecilla, P.; Toniolo, C.; Scrimin, P.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 3169-3170.
23. Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Bonaccini, C et al. *Inorg. Chem.*, **2008**, *47*, *12*, 5473-5484.
24. Komiyama, M.; Takeda, N.; Shigekawa, H.; *Chem. Comm.* **1999**, 1443-1451.
25. Maldonado, A.; Yatsimirsky, A.; *Org. Bioorg. Chem.* **2005**, *3*, 2859-2868.
26. Kovari, E.; Kramer, R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12704.
27. Wall, M.; Linkletter, B.; Williams, D.; Lebus, A.; Hynes, R. A.; Chin, J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4710-4711.
28. Young, M. J.; Wahnou, D.; Hynes, C. R.; Chin, J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9441-9447.

29. a) Livieri, M.; Mancin, F.; Tonellato, U.; Chin, J.; *Chem. Comm.* **2004**, 2862-2863. b) Livieri, M.; Mancin, F.; Sacelli, G.; Tonellato, U.; Chin, J.; *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 2246-2256.
30. a) Feng, G. Q., Natale, D., Prabakaran, R.; et al.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 42, 7056-7059. b) Linjalahti, H.; Feng, G.Q.; Mareque-Rivas J.C. et al. *JACS*, **2008**, 130, 13, 4232. c) Feng, G.Q.; Mareque-Rivas, J. C.; Williams, N. H., *Chem. Comm.* **2006**, 1845-1847
31. Lindoy, L.F.; Atkinson, I.M.; "Self-assembly in supramolecular systems", RCS monography in supramolecular chemistry.
32. Shenhar, R., Rotello, V.M.; *Acc. Chem. Res.*, **2003**, 36, 549-561.
33. Manea, F.; Bodar Houillon, F.; Pasquato, L.; Scrimin, P.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 6165–6169.
35. Nouvet, A.; Binard, M.; Lamaty, F.; Martinez, J.; Labaro, R.; *Tetrahedron*, **1999**, 55, 4685-4698
36. Manea, F.; Bindoli, C.; Lay, L.; Polizzi, S.; Scrimin, P.; *Langmuir*, **2008**, 24, 4120.
37. Xu, C.; Xu, K.; Gu, H.; Guo, Z.; Zheng, R.; Xu, B.; *JACS*, **2004**, 126, 3392-3393.
38. a) Buckingham, D.; Jones, D.; *Inorg. Chem.*, **1965**, 4, 10, 1387-1392. b) Kim, J. H.; Chin, J.; *JACS*, **1992**, 114, 9792-9795.
39. Franklin, J.S.; *Current. Op. in Chem. Biol.* **2001**, 5, 201-208.
40. Feng, G.Q.; Mareque-Rivas, J. C.; de Rosales, R.T.M.; Williams, N. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 13470-13471.
41. De Rosch, M. A.; Trogler, W.C.; *Inorg. Chem.*, **1990**, 29, 2409–2416.
42. Chin, J.; Banaszczyk, M. V.; X. Zou.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 186–190.
43. Koike, T.; Kimura, E.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 8935–8941.
44. Breslow, R.; Berger, D.; Huang, D.; *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 3686-3687

Bibliografia

45. a) Kimura, E.; Kodama, Y.; Koike, T.; Shiro, M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8304-8311.
46. Collman., J.P.; Schluder., P.; *Inorg. Chem.*, **1966**, *5*, 8, 1380-1384.
47. Hostetler, M. J.; Wingate, J. E.; Zhong, C.-J.; Harris, J. E.; Vachet, R. W.; Clark, M. R.; Londono, J. D.; Green, S. J.; Stokes, J. J.; Wignall, G. D.; Glish, G. L.; Porter, M. D.; Evans, N. D.; Murray, R. W.; *Langmuir* **1998**, *14*, 17-30.
48. a) Koyama., H.; Yoshino., T.; *Bull. of the Chem. Soc. of Jpn*, **1972**, *45*, 481-484.
b) Hung., Y.; Busch., D.H.; *JACS*, **1977**, 4977-4984. c) Basolo., F.; *JACS*, **1948**, *70*, 2684-2689.
49. Harrison., W.W.; *Anal. Chem.*, **1965**, *37*, 1168-1169.
50. Kiessling., L.; Gestwicki., J.; Strong., L.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 2348-2368.
52. Pengo, P.; Polizzi, S.; Battagliarin, M.; Pasquato, L.; Scrimin, P. *J. Mater. Chem.* **2003**, *13*, 2471-2478.
53. Massue., J.; Plush., S.E.; Bonnet., C.S., Moore., D.A.; Gunnlaugsson., T.; *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 8052-8055.
54. Brust., M.; Walker., M.; Bethell., D.; Schiffrin., D.; Whymann., R.; *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **1994**, 801-802.
55. Fantuzzi., G.; Pengo., P.; Gomilla., R.; Hunter., C.A.; Pasquato., L.; Scrimin., P.; *Chem. Comm.*, **2003**, 1004-1006.
56. Girard., M.; Preziosi., M.; Aguado., M.; Kieny., M.; *Vaccine*, **2006**, 4692-4700.
57. Reichel., F.; Ashton., P.; Boons., G.; *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **1997**, 2087-2088.
58. Torres., S.M.; Draghetti., V.; Panza., L.; Lay., L.; Russo., G.; *Synlett*, **2005**, *7*, 1147-1151.
59. Manea., F.; Bindoli., C.; Lay., L.; Polizzi., S.; Scrimin., P.; *Langmuir*, **2008**, *24*, 4120.

Multivalent, Saccharide-Functionalized Gold Nanoparticles as Fully Synthetic Analogs of Type A *Neisseria meningitidis* Antigens**

By Flavio Manea, Cristiano Bindoli, Silvia Fallarini, Grazia Lombardi, Laura Polito, Luigi Lay, Renato Bonomi, Fabrizio Mancin, and Paolo Scrimin*

Several pathogenic bacteria present coats (capsules) of saccharides that modulate their interaction with cells and proteins, including antibodies. Because polysaccharides are typical T-independent antigens they are poor immunogens, especially in infants and young children. Moreover, they do not establish long-term immunological memory.^[1] The conjugation with a protein carrier turns polysaccharides into T-dependent antigens, which is very effective for vaccine formulations.^[2–6]

Systems (molecules or surfaces) that present several copies of identical units are dubbed multivalent. Multivalent interactions^[7] are characterized by the simultaneous binding of multiple ligands on one biological entity to multiple receptors on another. These interactions have a number of characteristics that monovalent interactions do not have. In particular, multivalent interactions can be collectively much stronger than the corresponding monovalent interactions, and they can provide the basis for mechanisms that are fundamentally different from those available in monovalent systems. The antibody–polysaccharide interaction is one of these multivalent interactions,^[8,9] and it has been shown that synthetic, monovalent saccharides perform very poorly in vaccine formulations when compared to multivalent systems.^[10] For this reason scientists involved in the preparation of synthetic vaccines^[11,12] are currently designing clusters of saccharides^[13] to boost the interaction with antibodies. Multivalent saccharide-based systems have been obtained by functionalizing branched scaffolds,^[13,14] dendrimers,^[15] and organic^[16] and

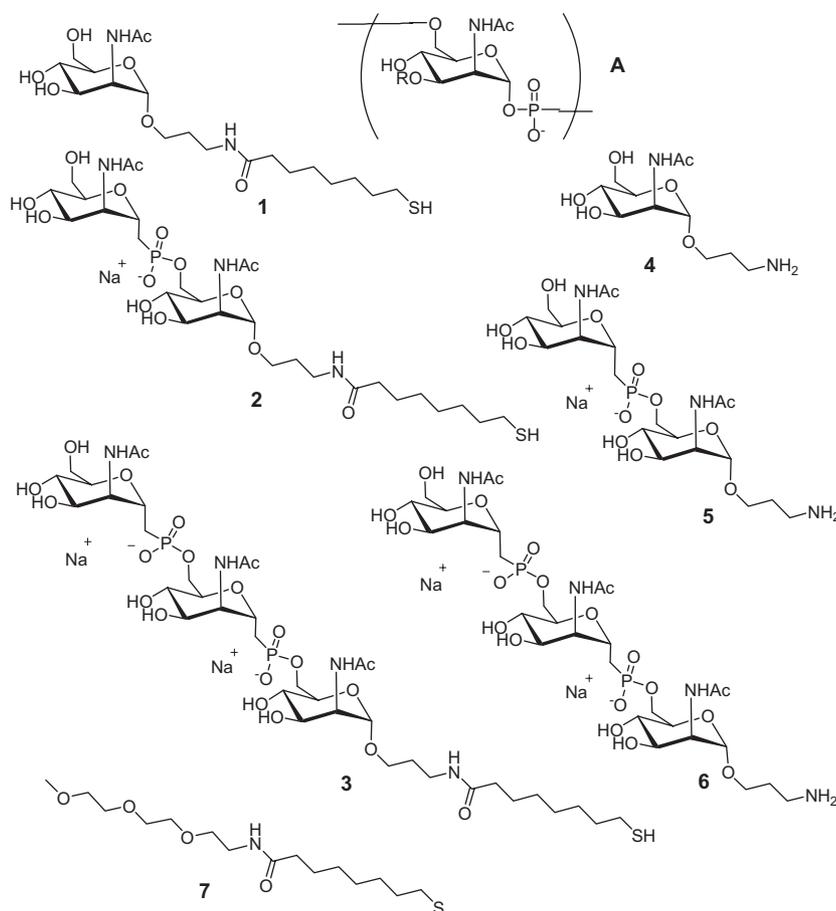
metal nanoparticles. Among the latter, gold nanoparticles (glyconanoparticles) are receiving considerable attention.^[17–23] Compared to other multivalent systems those based on gold nanoparticles (gold clusters protected by a monolayer of organic molecules, Au–MPC) have the enormous advantage of being (at least in principle) very easily accessible, as they are obtained through a self-assembly process once the constituent monomers have been prepared.^[24] Typically these monomers are connected to a thiolated tether that provides the strong interaction with the surface of the metal cluster.^[25]

Among the saccharide-coated bacteria, *Neisseria meningitidis* is responsible for severe epidemics in the sub-Saharan region of Africa (the so-called “meningitis belt”). Annual incidence of the disease in this area may reach peaks as high as 1% of the population. From the chemical composition of the polysaccharide capsule of the bacteria 13 serogroups can be defined, with 90% of the infection caused by serotypes A, B, C, Y, and W135. Group A (Men A, see formula A in Scheme 1 for the structure of the repeating unit in the capsular polysaccharide) appears to be the most noxious strain. Literature data clearly demonstrate that resistance to bacterial infection is mediated by the production of specific antibodies against the bacterial capsular polysaccharides (CPSs). Vaccines containing purified CPSs, as antigenic materials, conjugated to a carrier protein (i.e., tetanus toxoid, diphtheria toxin) have been shown to be effective in inducing immune response. A large-scale vaccination campaign has been recently launched against serotype C (Men C) in European countries to control hyperendemic serogroup C meningococcal disease.^[26] One of the main problems in the preparation of these glycoconjugates is the difficulty in obtaining CPS fragments of acceptable purity, so that their chemical synthesis appears to be a valuable option. They are, however, susceptible to hydrolytic degradation, making the synthesis of a fully synthetic glycoconjugate vaccine a difficult endeavor.

To overcome this problem synthetic analogs are pursued and, in this regard, some of us have recently reported^[27] the synthesis of chemically modified saccharide fragments of Men A CPS, in which the phosphodiester bridge connecting the glycosidic units has been substituted with a phosphonate as a hydrolytically more stable moiety. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) experiments performed using anti-Men A human polyclonal antibodies showed promising results. However, these synthetic analogs were lacking the key

[*] Prof. P. Scrimin, Dr. F. Manea, Dr. C. Bindoli, Dr. R. Bonomi
Dr. F. Mancin
Department of Chemical Sciences
University of Padova
Via F. Marzolo, 1, 35131 Padova (Italy)
E-mail: paolo.scrimin@unipd.it
Dr. S. Fallarini, Prof. G. Lombardi
Department SCAFF
University of East Piedmont
Via Bovio, 6, 28100 Novara (Italy)
Dr. L. Polito, Dr. L. Lay
Department of Organic and Industrial Chemistry and CISI
University of Milan
Via Venezian, 21, 20133 Milano (Italy)

[**] This work was supported by MUR via contract 2006039071 (PRIN 2006 to P.S.). The authors are indebted to Prof. A. Marigo and Dr. V. Causin for TGA analyses. Supporting Information is available online from Wiley InterScience or from the author.



Scheme 1. Structure of the repeating unit of the capsular polysaccharide of type A *Neisseria meningitidis* (A, R = H or Ac) thiolated saccharides (1-3) and monomeric ones (4-6) used in this study.

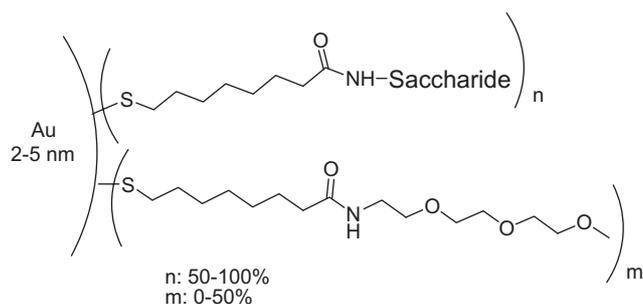
feature of multivalency for a really strong interaction with the protein as no more than three glycosidic units were present in their structure. For this reason we decided to prepare a multivalent, chemically stable polysaccharide equivalent, and selected gold nanoparticles as templates for the self-assembly of the phosphono analogs of natural Men A. This choice was motivated by two considerations: the obvious advantage of the self-assembly process over a fully synthetic approach and the possibility to obtain, easily, multivalent systems of different size and monomer composition, taking advantage of the straightforward protocol we have recently reported^[28] for the preparation of water-soluble, monolayer-protected^[29] gold nanoparticles.

Accordingly, thiolated derivatives 1-3 were prepared by connecting the corresponding mono-, di-, and trisaccharides 4-6^[27] to 8-mercapto octanoic acid via trivial amide bond formation and subsequently used for the passivation of the gold nanoparticles following our procedure.^[28] In this way we prepared nanoparticles of different size (5, 3.5, and 2 nm in diameter) by using thiol 1; different sugar composition (mono-, di-, and trisaccharides) by using thiols 1-3 and 5 nm size

nanoparticles; and different saccharide percentage on the covering surface (100%, 75%, 50%) by mixing thiol 1 with polyether-functionalized thiol 7 and using 5 nm diameter nanoparticles. The collection of saccharides studied and the nanoparticles prepared are reported in Schemes 1 and 2. All nanoparticles were fully soluble in water and proved stable for several days in this solvent. The obtained collection of glyconanoparticles was characterized for their size (by transmission electron microscopy (TEM)) and monolayer purity and composition (¹H NMR). Stock solutions of the nanoparticles were subjected to NMR analysis using an internal standard to determine the concentration. The data matched well with the percentage of organic component obtained from the thermogravimetric analysis (TGA). All of these data are reported in Table 1, while details of the characterization are reported in the Supporting Information.

Furthermore, in order to ascertain that the thiols were fully bound to the nanoparticles, we have run ¹H-NMR spectra using a low eddy currents distortion bipolar gradient pulses (LEDBP) sequence that allows one to differentiate molecules present in solution on the basis of their diffusion coefficient. Obviously, those not bound to the nanoparticles diffuse faster than those bound. The analysis revealed that, after purification, no unbound thiols (or other additives) were present in solution.

The different components of this collection of fully synthetic glyconanoparticles were tested for their ability to compete with natural Men A for binding to anti-Men A mouse polyclonal antibodies in ELISA. In a typical experiment (see Experimental for details) the inhibition by the different glyconanoparticle preparations of the binding between Men A coated onto the ELISA plates and anti-Men A specific antibodies was measured. To rule out the possibility



Scheme 2. Saccharide-functionalized Au-MPCs (8-14, see Table 1) used as synthetic antigens.

Table 1. Characterization of Au-MPCs passivated with thiols **1-3** and **7**.

Au-MPC	Thiol composition [a] (relative %)	Size [b] [nm]	% Organic [c] (Au:S)
8	1 (100)	5.1 ± 0.9	20, 19[d] (9.5)
9	1/7 (74/26)	5.2 ± 0.8	18
10	1/7 (49/51)	5.1 ± 0.7	18
11	1 (100)	3.4 ± 0.6	31 (5.2)
12	1 (100)	1.9 ± 0.3	45, 43 [d] (3.1)
13	2 (100)	5.3 ± 0.8	21
14	3 (100)	5.2 ± 0.9	22

[a] From ¹H NMR analysis of the organic component after decomposition of the nanoparticles by treating them with I₂. [b] Diameter, from TEM analysis. [c] From ¹H NMR integrals using an internal standard, unless otherwise noted. [d] From TGA analysis.

that saccharide monomers bound nonspecifically to the plate surface, thus giving false high 50% inhibition (IC₅₀) values, we performed control experiments in which the surface-adsorbed Type A polysaccharide had been substituted with compounds having similar structures, but that were not recognized by the specific anti-Men A antibody. This was done by coating the ELISA plates with colominic acid, a polysaccharide from *Escherichia coli*, or *Streptococcus pneumoniae* (F19) polysaccharide. The obtained results (see Supporting Information, Figure S10) indicate that no nonspecific binding occurs under the experimental conditions used.^[30]

Figure 1 shows the data obtained for the 5 nm nanoparticles **8**, **13**, and **14**, functionalized with 100% of the thiols bearing the monomeric, dimeric, and trimeric saccharides (thiols **1-3**). For comparison, activity data obtained with oligomers **4-6** are also reported. It was not surprising to observe that, although to a different extent, all glyconanoparticles were unable to fully inhibit the binding of Men A to its specific antibodies (100% inhibition). This could be ascribed either to immunological characteristics of the polyclonal antibodies we used, or to intrinsic properties of the new synthetic compounds. The IC₅₀ values reported in Table 2 were determined from the inflection of the inhibition curve in the competitive ELISA experiments, and they indicate that the glyconanoparticles have higher affinity than oligomers for binding to the specific antibodies.

Analysis of Figure 1 reveals that the multivalent glyconanoparticles **8**, **13**, and **14** are more potent than oligomers **4-6**, with a decrease in the IC₅₀ values of two orders of magnitude. The similar biological effect of the three glyconanoparticles passivated with the mono-, di-, and trisaccharides indicates that there is no advantage in the functionalization of the monolayer with the oligomeric sugars compared with the monomeric one, as the antibodies do not appear to recognize the number of saccharides per thiolated unit but the whole glycosidic surface of the nanoparticle. This is further confirmed by the decreased activity of the glyconanoparticles following the decrease in the percentage of glycosidic units in the passivating monolayer. Note that the reported IC₅₀ values refer to the concentration of the thiolated units and not to that of the nanoparticles. Accordingly, the decrease in IC₅₀ (almost one order of

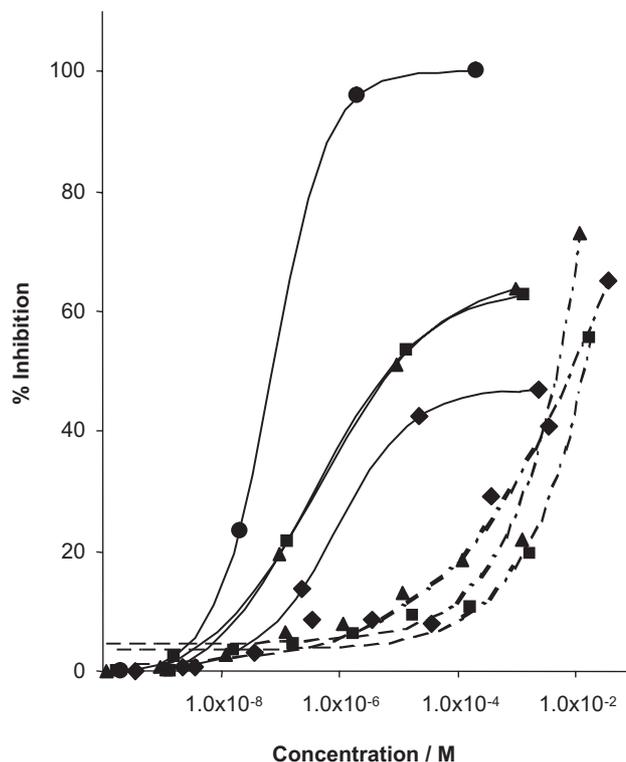


Figure 1. Inhibition (%) of the binding of Men A to mouse polyclonal antibodies in competitive ELISA experiments with Au-MPCs **8**, **13**, **14** and saccharides **4-6**. Concentrations refer to the saccharide component in the nanoparticles. Key to symbols: Men A (circles, solid line); **8** (diamonds, solid line); **13** (squares, solid line); **14** (triangles, solid line); **4** (diamonds, dashed line); **5** (squares, dashed line); **6** (triangles, dashed line).

magnitude) on going from 50% to 100% saccharide composition (Fig. 2) in the covering monolayer provides strong evidence of the multivalent nature of the interaction with the antibodies. In fact, at an identical nominal concentration of saccharide in solution, the concentration in the monolayer increases with composition and it is with the monolayer that the antibodies interact. The results indicate that a more dense composition of saccharides on the monolayer surface favors

Table 2. Results of competitive ELISA assays.

System (composition [a]/size [b])	IC ₅₀ [M]	Maximum inhibition [%]
Men A	2.8 × 10 ⁻⁸ [c]	100
8 (100 [d]/5)	8.7 × 10 ⁻⁷	47
9 (75 [d]/5)	3.2 × 10 ⁻⁶	30
10 (50 [d]/5)	6.9 × 10 ⁻⁶	39
11 (100 [d]/3.5)	1.3 × 10 ⁻⁶	60
12 (100 [d]/2)	3.7 × 10 ⁻⁶	52
13 (100 [e]/5)	7.8 × 10 ⁻⁷	63
14 (100 [f]/5)	1.5 × 10 ⁻⁶	64

[a] As percentage of saccharide-functionalized thiol and thiol **7**, as determined by ¹H NMR analysis of the decomposed nanoparticles after treatment with I₂. [b] In nanometers; for the precise size see Table 1. [c] Assuming an average of 15 glycosidic units per polymer. [d] Thiol **1**. [e] Thiol **2**. [f] Thiol **3**.

this interaction, lowering the IC_{50} . In this regard also the maximum inhibition attained appears to favor the 100% functionalized nanoparticles, although the trend seems to be less clear, likely due to the fact that we are using poly- and not monoclonal antibodies.

The dependence of the activity on the size of the glyconanoparticles is also interesting: larger nanoparticles perform better than smaller ones. One possible explanation is that because of the higher radius of the larger nanoparticles the curvature of their surface is smaller and, consequently, the packing of the glycosidic units is higher than in the smaller systems. Thus, the antibodies better recognize a tightly packed surface than a loosely organized one, lending further support to a binding process driven by the recognition of the surface of the glyconanoparticle. On the contrary, as has been demonstrated,^[31] a binding process occurring with insertion into the monolayer covering the gold cluster is favored with smaller nanoparticles than with larger ones, that is, a trend opposite to what we observe in this case.

In conclusion, we have shown that the spontaneous self-assembly of thiolated glycosides, structurally resembling the monomeric units of Men A, the serotype A of *Neisseria Meningitidis*, provides very effective antigens analogs that bind to mouse polyclonal antibodies specific for this bacterium. In competitive ELISA experiments the nanoparticles appear to be almost two orders of magnitude more potent than the oligomeric saccharides. This activity appears to be related to the multivalent nature of the nanoparticles, as supported by the decrease of the IC_{50} by increasing the concentration of the saccharides on the monolayer covering the gold nanoparticles. The advantage of the self-assembly process versus the covalent oligomerization is also highlighted by the absence of any relevant advantage of covering the nanoparticles with dimeric and trimeric saccharides over monomeric ones. Studies aimed at exploiting these systems as synthetic antigens for immunostimulation are under way in our laboratories.

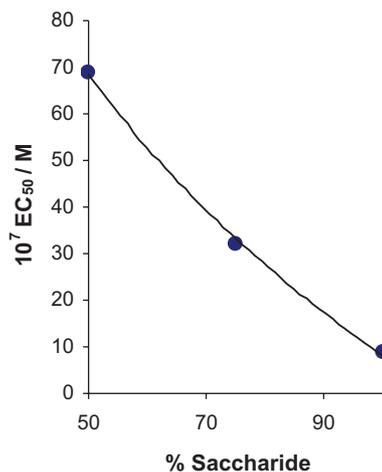


Figure 2. Dependence of IC_{50} on the percentage of saccharide **1** covering 5 nm Au-MPCs. (Note that the IC_{50} values refer to the concentration of saccharide and not to that of the nanoparticle).

Experimental

General: TEM images for nanoparticles size determination were recorded on a copper grid using a Jeol 300PX instrument. Thiols **2** [28] and **7** [24], and saccharides **4-6** [27] were prepared following literature procedures. Nanoparticles **8-14** were prepared following the procedure reported in Ref. [28]. NMR spectra were recorded on Bruker AC-300 or AC-250 spectrometers. 1H NMR spectra of the glyconanoparticles and of the organic component of the decomposed nanoparticles after treatment with I_2 are reported in the Supporting Information. TGA traces were recorded by exploring a 30–800 °C interval using a temperature ramp of 20 °C min^{-1} under nitrogen, using a SDT 2960 model TA instrument.

Procedure for the Synthesis of Thiols 1 and 3: To a 4 mL solution of *N,N*-dimethyl formamide (DMF) containing 8-thioacetyl pentafluorophenyl octanoate (159 mg, 0.409 mmol) were added, under a N_2 stream, 0.34 mmol of saccharides **4** or **6** and diisopropylethylamine (53 mg, 0.41 mmol). The temperature was raised to 40 °C and the reaction mixture was left to stir overnight. The solvent was then removed under reduced pressure and the crude purified by trituration (twice) with dichloromethane/petroleum ether. Centrifugation and vacuum drying gave thioacetylated derivatives **1** and **3** in 50–60% yield. These compounds (0.0059 mmol) were dissolved in 2 mL of methanol, treated with 30 μ L of a solution of 10 mg of Na in methanol, and stirred for 1 h under nitrogen. After this period of time the pH of the solution was adjusted to 5 with aqueous HBr and the solvent was evaporated to give quantitatively **1** or **3**.

8-Mercaptoottanoylamidopropyl 2-acetamido-2-deoxy- β -D-mannopyranoside (1): 1H NMR (250 MHz, D_2O) δ : 4.70 (s, 1H), 4.49 (br d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 3.88 (m, 2H), 3.85–3.50 (m, 3H), 3.40–3.25 (m, 4H), 2.53 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.24 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.09 (s, 3H), 1.78 (qn, $J = 6.5$ Hz, 2 H), 1.63 (m, 4H), 1.45–1.35 (m, 6H).

ESI-MS+ ($H_2O + HCOOH$ 0.1%) m/z : calcd. ($M + H^+$) 437.22, found 437.2; calcd. 459.21 ($M + Na^+$), found 459.2.

8-Mercaptoottanoylamidopropyl [(2-acetamido-2-deoxy- β -D-mannopyranosidyl) C-(2-acetamido-2-deoxy- α -D-mannopyranosyl)methane-phosphonyl] C-(2-acetamido-2-deoxy- α -D-mannopyranosyl)methane-phosphonate, disodium salt (3): 1H NMR (250 MHz, D_2O) δ : 4.53 (br t, $J = 4.5$ Hz, 1H), 4.47 (m, 1H), 4.40 (m, 1H), 4.3–3.95 (m, 9H), 3.9–3.8 (m, 4H), 3.75–3.60 (m, 6H), 3.55 (m, 1H), 3.13 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.55 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.3–1.9 (m, 6H), 2.09 (s, 3H), 2.07 (s, 6H), 1.79 (qn, $J = 6.3$ Hz, 2H), 1.60 (m, 4H), 1.4–1.2 (m, 6H).

ESI-MS- (H_2O) m/z : calcd. ($M + H^+$) 997.34, found 997.4.

Nanoparticle Stock Solution Titration: Stock solutions of Au-MPC were prepared by dissolving the appropriate amount of material into milliQ water. An aliquot of that solution was lyophilized and dissolved in D_2O containing nitromethane as an internal standard. Concentration of the saccharide was determined by comparison of the integrals of the broad signals of selected regions of the spectrum with the singlet of nitromethane. The reliability of the evaluation was assessed by decomposition of a nanoparticle solution with I_2 and analysis of the integrals of the much sharper NMR spectrum after centrifugation of the supernatant. Comparison with the TGA data (if performed, see Table 1) indicated reproducibility within 15%.

Competitive ELISA: Flat-bottomed plates were incubated overnight at 4 °C with a mixture of Men A CPS (1 mg mL^{-1}) and methylated serum albumin (1 mg mL^{-1}). A solution of 5% fetal bovine serum in phosphate buffered saline supplemented with Brij 35 (0.1%) and sodium azide (0.05%) was applied to the plates for blocking non-specific binding sites. The plates were incubated overnight at 4 °C with a solution (1:400) of mouse anti-Men A, used as reference serum. This serum was obtained from mice vaccinated with antimeningococcal A + C + W135 + Y polysaccharide vaccine. When saccharide or glyconanoparticles competitors were tested, they were added to each well just before the addition of the reference serum. The plates were then incubated with alkaline phosphatase-conjugated antibody to mouse IgG, stained with *p*-nitrophenylphosphate, and the absorbance was measured at 405 nm with an Ultramark microplate

reader. Experiments were repeated in triplicate. Control experiments to verify unspecific binding were performed by coating the ELISA plates with Colomic Acid from *Escherichia coli* (Sigma) or *Streptococcus pneumoniae* (F19) polysaccharide (a generous gift from Sanofi-Aventis).

Received: March 17, 2008

Revised: July 6, 2008

Published online: August 5, 2008

- [1] a) A. González-Fernández, J. Faro, C. Fernández, *Vaccine* **2008**, *26*, 292. b) S. Segal, A. J. Pollard, *Br. Med. Bull.* **2004**, *72*, 65.
- [2] H. J. Jennings, in *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Vol. 41 (Eds: R. S. Tipson, D. Horton), Academic Press, New York, NY **1983**, p. 155–208.
- [3] a) V. Pozsgay, in: *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Vol. 56 (Eds: R. S. Tipson, D. Horton), Academic Press, New York, NY **2000**, p. 153–199. b) N. Ravenscroft, C. Jones, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2000**, *3*, 222.
- [4] G. Ada, D. Isaacs, *Clin. Microbiol. Infect.* **2003**, *9*, 79.
- [5] B. Kuberan, R. J. Linhardt, *Curr. Org. Chem.* **2000**, *4*, 653.
- [6] S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7624.
- [7] M. Mammen, S. K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754.
- [8] J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555.
- [9] P.-H. Liang, S.-K. Wang, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11177.
- [10] I. J. Krauss, J. G. Jpyce, A. C. Finnefrock, H. C. Song, V. Y. Dudkin, X. Geng, J. D. Warren, M. Chastain, J. W. Shiver, S. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11042.
- [11] S. J. Danishefsky, J. R. Allen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 836.
- [12] V. Verez-Bencomo, V. Fernandez-Santana, E. Hardy, M. E. Toledo, M. C. Rodriguez, L. Heynngnezz, A. Rodriguez, A. Baly, L. Herrera, M. Izquierdo, A. Villar, Y. Valdes, K. Cosme, M. L. Deler, M. Montane, E. Garcia, A. Ramos, A. Aguilar, E. Medina, G. Torano, I. Sosa, I. Hernandez, R. Martinez, A. Muzachio, A. Carmenates, L. Costa, F. Cardoso, C. Campa, M. Diaz, R. Roy, *Science* **2004**, *305*, 522.
- [13] Y. Singh, G. T. Dolphin, J. Razkin, P. Dumy, *Chem. Bio. Chem* **2006**, *7*, 1298.
- [14] J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oejten, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922.
- [15] M. L. Wolfenden, M. J. Cloninger, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 958.
- [16] O. C. Farokhzad, J. Cheng, B. A. Teply, I. Sherifi, S. Jon, P. W. Kantoff, J. P. Richie, R. Langer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 6315.
- [17] a) R. Ojeda, J. L. de Paz, A. G. Barrientos, M. Martín-Lomas, S. Penades, *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 448. b) J. M. de la Fuente, A. G. Barrientos, T. C. Rojas, J. Rojo, J. Canada, A. Fernandez, S. Penades, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2258.
- [18] J. M. de la Fuente, S. Penades, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1760*, 636.
- [19] S. A. Svarovsky, Z. Szekely, J. J. Barchi, Jr., *Tetrahedron Asymm.* **2005**, *16*, 587.
- [20] H. Otsuka, Y. Akiyama, Y. Nagasaki, K. Kataoka, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8226.
- [21] C.-C. Lin, Y.-C. Yeh, C.-Y. Yang, C.-L. Chen, G.-F. Chen, C.-C. Chen, Y.-C. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3508.
- [22] D. C. Hone, A. H. Haines, D. A. Russell, *Langmuir* **2003**, *19*, 7141.
- [23] C.-S. Tsai, T.-B. Yu, C.-T. Chen, *Chem. Commun.* **2005**, 4273.
- [24] P. Pengo, S. Polizzi, M. Battagliarin, L. Pasquato, P. Scrimin, *J. Mater. Chem.* **2003**, *13*, 2471.
- [25] a) P. Pengo, L. Baltzer, L. Pasquato, P. Scrimin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 400. b) P. Pengo, S. Polizzi, L. Pasquato, P. Scrimin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1616. c) F. Manea, F. Bodar Houillon, L. Pasquato, P. Scrimin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6165. d) P. Pengo, Q. B. Broxterman, B. Kaptein, L. Pasquato, P. Scrimin, *Langmuir* **2003**, *19*, 2521. e) L. Pasquato, F. Rancan, P. Scrimin, F. Mancin, C. Frigeri, *Chem. Commun.* **2000**, 2253. f) L. Pasquato, P. Pengo, P. Scrimin, *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 3481.
- [26] M. D. Snape, A. J. Pollard, *Lancet Infect. Dis.* **2005**, *5*, 21.
- [27] M. I. Torres-Sanchez, C. Zaccaria, B. Buzzi, G. Miglio, G. Lombardi, L. Polito, G. Russo, L. Lay, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 6623.
- [28] F. Manea, C. Bindoli, L. Lay, S. Polizzi, P. Scrimin, *Langmuir* **2008**, *24*, 4120.
- [29] We have used the term “monolayer” rather than “monoshell” despite the fact that our thiols are probably not well packed, as one might assume is the case with a monolayer. We prefer to maintain the term “monolayer” as it is common practice in this sort of nanoparticles.
- [30] We could not perform experiments with Type Y polysaccharide because the antibody used for the ELISA experiments is an anti-mouse MenACWY and, therefore, can also recognize Type Y saccharides.
- [31] M. Lucarini, P. Franchi, G. F. Pedulli, C. Gentilini, S. Polizzi, P. Pengo, P. Scrimin, L. Pasquato, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16384.

Phosphate Diester and DNA Hydrolysis by a Multivalent, Nanoparticle-Based Catalyst

Renato Bonomi,[†] Francesco Selvestrel,[†] Valentina Lombardo,[‡] Claudia Sissi,[‡] Stefano Polizzi,[§] Fabrizio Mancin,^{*,†} Umberto Tonellato,[†] and Paolo Scrimin^{*,†}

Dipartimento di Scienze Chimiche and CNR-ITM, Università di Padova, Padova, Italy, Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Padova, Padova, Italy, and Dipartimento di Chimica Fisica, Università di Venezia, Venice, Italy

Received March 11, 2008; E-mail: fabrizio.mancin@unipd.it; paolo.scrimin@unipd.it

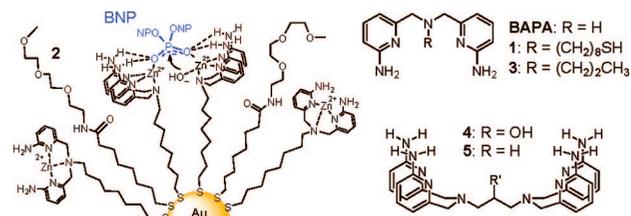
DNA phosphodiester bonds are hardly hydrolyzed under neutral conditions and represent a real challenge for chemists but not for enzymes, which succeed in this task exploiting a perfect organization of metal ions and organic groups in their active sites.¹ Synthetic catalysts for DNA hydrolysis with good activity have been obtained by using Ce(IV), Cu(II), and Fe(III) complexes, but Zn(II)-based agents are generally less efficient.¹ Zn(II) is the metal ion preferred by hydrolytic enzymes, and it is nontoxic, redox inactive, and bioavailable. Hence, efficient Zn(II)-based catalysts would constitute a remarkable achievement particularly for biomedical applications.^{1a,b} It is common wisdom that good catalysts for phosphate cleavage require properly designed multinuclear catalytic sites. We describe here a new catalyst obtained by self-assembling multiple copies of the thiolated ligand **1** (Chart 1) on the surface of monolayer-protected gold nanoparticles (MPGNs).² High activity and a new mode of action arise from the multivalent nature of the catalyst.³

Zn(II) complexes of BAPA (Chart 1) derivatives efficiently elicit the cooperation between metal Lewis acid activation and hydrogen bonding to achieve increased hydrolytic activity toward phosphate diesters.^{4,5} For this reason, thiol **1** was selected as a Zn(II)-ligand for the preparation of the hydrolytic MPGNs. Thiol **2**, bearing a tri(ethyleneglycol) unit, was also introduced in the coating monolayers to improve water solubility of the nanoparticles. MPGNs (1.8 ± 0.7 nm gold core diameters) were prepared following our recently reported two-step protocol.^{2d} Two different **1** to **2** ratios were realized in the coating monolayer (1:9 and 4:6) corresponding to the average formulas Au₂₀₁1.7₂₆₄ (**1**_{0.1}-MPGN) and Au₂₀₁1.28₂₄₃ (**1**_{0.4}-MPGN), respectively (see Supporting Information, SI).

Incubation of **1**-MPGN-Zn(II) with the DNA model substrate bis-*p*-nitrophenyl phosphate (BNP) in 93:7 water/methanol buffered solutions at 40 °C resulted in substrate cleavage with the concomitant formation of *p*-nitrophenolate and *p*-nitrophenyl phosphate (MNP). The influence of pH on the reactivity is very small for both **1**_{0.4}-MPGN-Zn(II) and reference **3**-Zn(II) in the interval 7–9.5 (SI, Figure S5), indicating that the catalytically relevant nucleophile, likely a metal bound hydroxide, is fully formed under these conditions.⁶ The reactivity gain due to the confinement of the Zn(II) complexes on the nanoparticle monolayer is remarkable: at pH 7, **1**_{0.4}-MPGN-Zn(II) hydrolyzes BNP 100 times faster than **3**-Zn(II) at the same concentration (50 μM) of the metal complex. The observed rate constant is 3.6 × 10⁻⁵ s⁻¹ with a 300 000-fold acceleration over the background reaction.⁷

Figure 1a reports the reactivity of **1**-MPGN at pH 8.0 as a function of Zn(II) added. The reactivity levels off immediately after the addition of 1 equiv of Zn(II), indicating full binding of the metal ions to the **1** units.⁸ The nonmonotonic increase of the reaction

Chart 1. Ligands and MPGN Schematic Structure (NP: *p*-Nitrophenyl)



rate toward saturation suggests the presence of two different active species, depending on the Zn(II) loading of the nanoparticles. Plausibly, these two species can be identified as monometallic and dimetallic sites spontaneously formed at the nanoparticles surface, the first being predominant at low metal loadings, due to electrostatic repulsion, and the latter forming when a larger amount of metal complexes are formed.

The kinetic profiles could be fitted with a model assuming the contribution of both of the species each with different reactivity and present in different amounts (see SI). The relevant parameters obtained are reported in Table 1 together with the affinity constants of the reactive species for phosphate diesters determined by competitive inhibition experiments with dimethyl phosphate (K_{DMP})^{4,7} and, when possible, by Michaelis–Menten kinetics with BNP (K_{BMP} , see SI).¹³ Analysis of the data summarized in Table 1 unveils several aspects of the reactivity of the MPGN. As can be expected (entries 5 and 7), the probability to form dimetallic sites on the particles at full metal loading depends on the relative concentration of ligand units in the monolayer. Thus, in the case of **1**_{0.4}-MPGN 91% of **1** units can form dimetallic sites, while only a small fraction (30%) can do the same in the less concentrated monolayer of **1**_{0.1}-MPGN. The reactivity of such dimetallic sites is 2 orders of magnitude larger than that of the monomeric reference complex **3**-Zn(II) (compare entries 2, 5, and 7). In systems where precom-

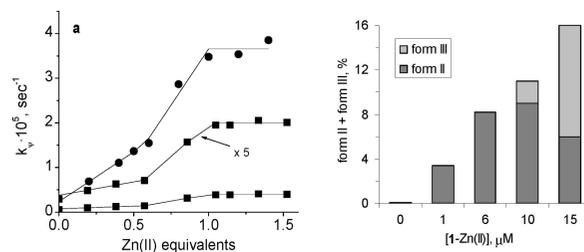


Figure 1. (a) Rates of BNP cleavage by **1**_{0.1}-MPGN (■, [I] = 1.0 × 10⁻⁵ M) and **1**_{0.4}-MPGN (●, [I] = 5.0 × 10⁻⁵ M) as a function of the equivalents of Zn(II) added at pH 8.0 (line: best fit of the data, SI). [HEPES] = 50 mM, [BNP] = 2 × 10⁻⁵ M, 40 °C; (b) Extent of pBR 322 plasmid DNA forms II and III produced after cleavage with different concentrations of **1**_{0.4}-MPGN-Zn(II). [DNA_{bp}] = 12 μM. [HEPES] = 20 mM, pH 7, 37 °C, 24 h.

[†] Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Padova.

[‡] Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Padova.

[§] Dipartimento di Chimica Fisica, Università di Venezia.

Table 1. Apparent Second-Order Rate Constants (k_2) for BNP Cleavage, DMP Binding Constants (K_{DMP}), and Relative Reactivity (k_{rel}) for Different Zn(II)-Based Agents (pH 7, 40 °C unless otherwise noted)

entry	catalyst	k_2 ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$)	K_{DMP} (M^{-1})	k_{rel}	ref
1	OH^-	2.4×10^{-5a}	—	1	9
2	3-Zn(II)	0.012^b	1.0×10^2	500	c
3	5-Zn(II) ₂	0.0055^b	3.1×10^2	230	c
4	1 _{0,1} -MPGN-Zn(II)	0.11^b	1.3×10^2	4583	c
5	[1 _{0,1} -MPGN-Zn(II)] ₂	1.5^b	2.2×10^3 (4.7×10^4) ^d	62 500	c
6	1 _{0,4} -MPGN-Zn(II)	0.45^b	8.3×10^2	18 750	c
7	[1 _{0,4} -MPGN-Zn(II)] ₂	1.4^b	3.7×10^3	58 333	c
8	pseudoHis-Zn(II)	0.0030^e	n. d.	125	10
9	BPAN-Zn(II) ₂	1.7×10^{-4}	8.6×10^1 ^d	7	11
10	QX-TACN-Zn(II) ₂	0.0042^f	n. d.	175	12

^a 35 °C. ^b pH 8. ^c This work. ^d K_{BNP} . ^e 50 °C. ^f pH 11.

plexation of the substrate occurs, both binding and intrinsic reactivity of the catalytic site contribute to the second-order rate constant. K_{DMP} values reveal that in the present case most of the reactivity gain derives from enhanced binding.¹⁴ Incidentally, such a high affinity for DMP further supports the dimetallic nature of these sites since the K_{DMP} values determined are much larger than those, lower than 100 M^{-1} , usually measured for monometallic Zn(II) complexes⁴ and similar to that of $2.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (pH 7, 25 °C) reported for the dimetallic complex 4-Zn(II)₂.^{4c} Moreover, in the case of 1_{0,1}-MPGN, for which the binding constants for both DMP and BNP could be obtained, a relevant hydrophobic contribution to binding is evident ($K_{\text{BNP}} = 20K_{\text{DMP}}$).

Remarkably, also the activity of the mononuclear sites on 1-MPGN (entries 4 and 6) is considerably larger than that of reference 3-Zn(II). In this case too, for both 1_{0,1}-MPGN and 1_{0,4}-MPGN nanoparticles, the data indicate a relevant contribution to the activity due to enhanced binding. The more pronounced effect observed with 1_{0,4}-MPGN could be the result of a combined interaction of the substrate with a monometallic complex and adjacent ammonium ions of protonated, uncomplexed ligands.

Comparison of the reactivity of 1-MPGN with binuclear complex 5-Zn(II)₂ (entry 3) gives full account of the effectiveness of the nanoparticles-based catalyst. In both cases two BAPA-Zn(II) units are held in proximity with a poorly preorganized arrangement, but while nanoparticles show high reactivity, 5-Zn(II)₂ is even less efficient than the mononuclear counterpart 3-Zn(II). Inspection of entries 8–10, summarizing the reactivity of the most efficient Zn-based catalysts for BNP so far reported, reveals that such behavior is not uncommon with binuclear Zn(II) complexes, which usually behave quite poorly with this substrate even in the case of preorganized systems.^{1c} It is thus very remarkable that the spontaneous and flexible organization of the reactive sites on the 1-MPGN monolayer forms binuclear Zn(II)-based catalytic sites with high activity.

The encouraging results obtained with BNP prompted us to exploit 1-MPGN multivalency in the cleavage of a multivalent substrate like DNA. Considerable activity was indeed observed. Incubation of pBR 322 plasmid DNA with 1_{0,4}-MPGN-Zn(II) at pH 7.0 and 37 °C for 24 h resulted in its significant cleavage (Figure 1B), whereas no reaction at all was observed with monomeric 3-Zn(II) (SI). The pseudo-first-order rate constant estimated at the maximum $15 \mu\text{M}$ Zn(II) complex concentration accessible¹⁵ is $2 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, a 5 orders of magnitude rate acceleration over uncatalyzed DNA hydrolysis.¹⁶ Such a result appears even more remarkable if one considers that, for simple geometric reasons, only a fraction of the Zn(II) complexes present on a single nanoparticle can interact with the bound substrate. Most important, the amount of linear DNA (form III) formed is 50% larger than that of nicked DNA (form II). More than 100 single strand cleavage events are needed to obtain linearization in the case of a random process.¹⁷

Thus, the formation of an amount of linear form largely exceeding the nicked one in the early stages of the reaction indicates that 1_{0,4}-MPGN-Zn(II) preferentially performs double strand cleavage.

The use of nanoparticles bearing an array of active units implies trading preorganization and rational design for flexibility and self-organization. The gain obtained on activity is impressive. The most effective Zn(II)-based catalyst so far reported provides a 36 000-fold acceleration for the cleavage of BNP at pH 7 and 3.6 mM complex concentration (Table 1, entry 8).^{1c,10} 1_{0,4}-MPGN-Zn(II) at only $50 \mu\text{M}$ Zn(II) complex concentration produces a 300 000-fold rate acceleration (pH 7, 40 °C). The second-order rate constants measured for the dimetallic sites in the nanoparticles well compare with those observed for the most reactive lanthanide and Co(III) complexes.^{7,9} The activity against DNA is less impressive but characterized by an unprecedented ability to perform double strand cleavage. Such behavior is typical of enzymes but extremely difficult to attain with artificial systems^{1c} and can be ascribed to the multivalent nature of the nanoparticle-based catalyst. In fact, in the contact area between DNA and the nanoparticle surface, several reactive sites are present so that contemporaneous attack on both strands is possible.

Acknowledgment. Financial support by MUR (Contracts 2006034123 and 2006039071) is gratefully acknowledged.

Supporting Information Available: Synthesis; characterization of 1, 5, and 1-MPGN; and kinetic experiments. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- (1) (a) Komiyama, M.; Takeda, N.; Shigekawa, H. *Chem. Commun.* **1999**, 1443–1451. (b) Niittymaki, T.; Lonnberg, H. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 15–25. (c) Mancin, F.; Tecilla, P. *New J. Chem.* **2007**, *31*, 800–817.
- (2) (a) Pasquato, L.; Rancan, F.; Scrimin, P.; Mancin, F.; Frigeri, C. *Chem. Commun.* **2000**, 2253–2254. (b) Manea, F.; Houillon, F. B.; Pasquato, L.; Scrimin, P. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 6165–6169. (c) Pengo, P.; Baltzer, L.; Pasquato, L.; Scrimin, P. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 400–404. (d) Manea, F.; Bindoli, C.; Polizzi, S.; Lay, L.; Scrimin, P. *Langmuir* **2008**, *24*, 4120–4124.
- (3) (a) Martin, M.; Manea, F.; Fiammengo, R.; Prins, L. J.; Pasquato, L.; Scrimin, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6982–6983. (b) Zaupa, G.; Prins, L. J.; Scrimin, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5699–5709.
- (4) (a) Feng, G. Q.; Mareque-Rivas, J. C.; de Rosales, R. T. M.; Williams, N. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13470–13471. (b) Feng, G. Q.; Mareque-Rivas, J. C.; Williams, N. H. *Chem. Commun.* **2006**, 1845–1847. (c) Feng, G. Q.; Natale, D.; Prabhakaran, R.; Mareque-Rivas, J. C.; Williams, N. H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 7056–7059.
- (5) (a) Livieri, M.; Mancin, F.; Tonellato, U.; Chin, J. *Chem. Commun.* **2004**, 2862–2863. (b) Livieri, M.; Mancin, F.; Saielli, G.; Chin, J.; Tonellato, U. *Chem.—Eur. J.* **2007**, *13*, 2246–2256.
- (6) pK_a of the Zn-bound water molecules in complex 3-Zn(II) are 8.0 and 10.2 at 25 °C (ref 5). Lower values may be expected for 1_{0,4}-MPGN-Zn(II) due to electrostatic effects, as in metallolocalles; see: Bunton, C. A.; Scrimin, P.; Tecilla, P. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1996**, 419–213.
- (7) The rate estimated for the spontaneous hydrolysis of BNP at pH 7.0 and 40 °C is $1.1 \times 10^{-10} \text{ s}^{-1}$; see Chin, J.; Banaszczuk, M.; Jubian, V.; Zou, X. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 186–190.
- (8) Apparent Zn(II) binding constant for ligand 3 at pH 8 is $10^{6.5}$ at 25 °C (data from ref 5), which ensures more than 90% complex formation.
- (9) Yatsimirsky, A. K. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249*, 1997–2011.
- (10) Ichikawa, K.; Tarnai, M.; Uddin, M. K.; Nakata, K.; Sato, S. *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *91*, 437–450.
- (11) Kaminskaja, N. V.; He, C.; Lippard, S. J. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 3365.
- (12) Arca, M.; Bencini, A.; Berni, E.; Caltagirone, C.; Devillanova, F. A.; Isaia, F.; Garau, A.; Giorgi, C.; Lippolis, V.; Perra, A.; Tei, L.; Valtancoli, B. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 6929–6939.
- (13) Precipitation of the nanoparticles in the presence of an excess of the lipophilic BNP was observed with 1_{0,4}-MPGN.
- (14) For cooperation in substrate binding and catalysis by functional units arranged on a surface see: (a) Major, R. C.; Zhu, X.-Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8454–8455. (b) Basabe-Desmonts, L.; Reinhoudt, D. N.; Crego-Calama, M. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 993–1017; see also ref 3.
- (15) DNA precipitation occurs when the overall concentration of metal complex exceeds that of the DNA ($24 \mu\text{M}$ in residues).
- (16) Uncatalyzed rate (pH 7.0 and 37 °C): $1 \times 10^{-11} \text{ s}^{-1}$; see: Hettich, R.; Schneider, H.-J. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5638–5647.
- (17) Branum, M. E.; Tipton, A. K.; Zhu, S.; Que, L., Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *123*, 1998–1904.

JA801794T

Insights on Nuclease Mechanism: The Role of Proximal Ammonium Group on Phosphate Esters Cleavage

Renato Bonomi, Giacomo Saielli, Umberto Tonellato, Paolo Scrimin, and Fabrizio Mancin*
Dipartimento di Scienze Chimiche and CNR-ITM, Università di Padova, via Marzolo 1, I-35131 Padova, Italy

Received April 24, 2009; E-mail: fabrizio.mancin@unipd.it

Nucleases, enzymes hydrolyzing phosphodiester bonds in nucleic acids, play a fundamental role in the processing of genetic information. Moreover, they achieve record-level rate accelerations (up to 10^{18}) in the cleavage of one of the most stable bonds in nature.^{1,2} As in most cases of enzymatic catalysis, mechanisms of action of nucleases are still not fully understood and their better comprehension, also obtained through model studies, could give important information on chemical reactivity. A crucial role in most nucleases is played by at least one metal ion (Mg(II), Ca(II), and Zn(II)) present in the active site, which activates the fissile phosphate group toward nucleophilic attack and favors the deprotonation of a coordinated water molecule or alcoholic hydroxyl (Ser) to provide a reactive nucleophile.^{1,2} However, fundamental contributions are also provided by other functional groups present in the active site. In several metallonucleases a key residue is a highly conserved Lys group located just behind the water molecule best placed to attack the phosphate.² Early hypotheses suggested that the positively charged Lys ammonium group could stabilize the developing negative charge on the transition state.^{2,3} More recently, it has been proposed that the role of this group may be that of cooperating with the metal ion in helping the deprotonation of the attacking water molecule.³ An unanswered question that arises when these two mechanisms are considered concerns the effect of the pK_a decrease of the attacking nucleophile on its reactivity. Undoubtedly metal coordination increases the amount of nucleophile available at physiological pH, but what about its reactivity? And is further activation by external charged centers needed, or could it be detrimental for reactivity?

Measuring β_{nuc} values of nucleophiles toward metal-activated phosphates is hampered by the difficulty in dissecting this contribution to activity from other ones.⁴ We reasoned that, in the case of metal-bound alkoxide nucleophiles, such as our previously studied and highly reactive Zn(II) complex **1** (Chart 1),^{5a,b} chemical modification of the alcoholic arm could allow modulation of its acidity and evaluation of its effect on reactivity. The high hydrolytic activity of complexes based on the bis(2-amino-pyridinyl-6-methyl)amine (BAPA)^{5,6} should allow easy investigation of the substituent effect. Thus, we designed **2**, where an ammonium group is located behind the active nucleophile similarly to the Lys group in nucleases, and **3**, where the electron-withdrawing CF_3 group is

Chart 1. Complexes and Substrates Used (for Each Substrate, the Most Accepted Mechanism of Its Metal Ion-Promoted Cleavage Is Reported)

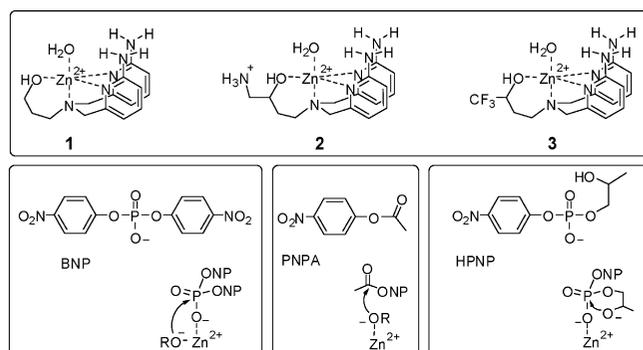


Table 1. Ligand (pK^{a}) and Zn(II) Complexes (pK^{a}) Deprotonation Constants and Zn(II) Complexation Constants ($\log K_f$) for **1–3** As Obtained from Potentiometric Titrations (NaCl 0.1 M, 25 °C, Errors Are within 5%)

complex	H_mL^{3+}				$[(\text{L})\text{Zn}]^{2+}$			
	pK^1	pK^2	pK^3	pK^4	$\log K_f$	pK^{a}	pK^{a}	pK^{a}
1 ^a	—	7.72	5.33	1.95	6.68	7.94	9.96	—
2	9.09 ^b	7.13	5.36	<2	6.08	7.64	8.07	9.44 ^b
3 ^c	10.72 ^d	7.23	5.49	<2	6.00	7.86	8.16	—

^a Data from ref 5b. ^b Ammonium group. ^c NaClO₄ 0.1 M. ^d Alcoholic group.

introduced to mimic the effects of the ammonium group on the acidity of the alcoholic residue but without concomitant electrostatic effects due to the positive charge. Although Zn(II) is not the most diffused divalent ion in nucleases as compared to Mg(II) and Ca(II), it allows realization of stable complexes with a well-defined geometry that allow us to draw sound conclusions from their study.

Potentiometric titrations confirmed the similarity of the pK_a of the two alcoholic groups of **2** and **3**. Table 1 reports for the complex formation constants ($\log K_f$) and the pK_a of the metal-bound species (pK^{a}). The ionization behavior of the complexes is quite complex. Previous investigation with **1** led to attributing the two deprotonation events observed respectively to a metal-bound water molecule (pK^1_a) and to the alcoholic group (pK^2_a).^{5b} In **2**, as proposed for the Lys residue in enzymes, the presence of the ammonium strongly affects the acidity of the neighboring metal-bound alcoholic hydroxyl, lowering the pK^2_a by ~ 2 units. Likely, such increased acidity is due to intramolecular H-bonding or electrostatic stabilization of the deprotonated alcoholic residue. The acidity of the alcoholic group in **3** is close to that for **2**, confirming the effects of the CF_3 group on the alcoholic residue are similar to those of the ammonium.

The possibility of **2** to mimic a nuclease active site is also confirmed by DFT calculation on its complex with the DNA model substrate bis-*p*-nitrophenyl phosphate (BNP, Chart 1). The minimized structure (Figure 1 (left), details in Supporting Information (SI)) reveals an extended network of intracomplex interactions. Besides the expected intramolecular H-bonds between the pyridine amino groups and the phosphate oxygen bound to Zn^{2+} , two other relevant H-bonds, both from the NH_3^+ group, are detected.

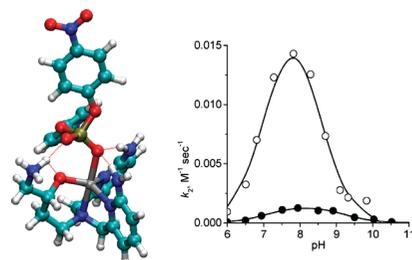


Figure 1. (Left) Solution-phase (PCM model) optimized structure of **2**-BNP in its monodeprotonated form (H-bonds evidenced by dashed red lines; colors: Zn, gray; P, yellow; C, cyan; O, red; N, blue; H, white). (Right) pH dependence of second-order rate constant for the reaction between BNP and Zn^{2+} complexes **2** (○) and **3** (●) at 25 °C ([buffer] = 5.0×10^{-2} M).

Table 2. Kinetic pK_a Values^a (pK_a^c) and Second-Order Rate Constants (k_{SUB}) for Reaction of Monodeprotonated Zn^{2+} Complexes with BNP, PNPA, and HPNP^b

complex	pK_a^c	pK_a^c	k_{BNP}^c ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_{PNPA}^c ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_{HPNP}^c ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
1 ^c	7.9	10.2	0.097	1.20	0.26
2	7.3	8.4	0.022	0.26	0.70
3	7.7	8.6	0.0015	0.34	0.22

^a From the fitting of BNP profiles. ^b 25 °C, [buffer] = 5.0×10^{-2} M, errors are within 10%. ^c Data from ref 5b.

The first points to the alkoxyde group, and the second to the phosphate peripheral oxygen not bound to the metal ion. The presence of these two H-bonds indicates that the ammonium group can, in principle, participate in the reaction playing both roles proposed for the Lys residue in enzymes: assistance to nucleophile deprotonation and transition state stabilization.

Figure 1 (right) reports the pH dependence of the apparent second-order rate constants for the cleavage of BNP in the presence of **2** and **3**. The profiles are bell-shaped, as previously reported for **1**, indicating that the reactive species are the monodeprotonated complexes.^{5,6b} The reactivity maximum is reached at \sim pH 8 for both Zn complexes which is in line with the pK_a values of the metal-bound species (maximum activity at pH 9 was, on the contrary, observed for **1**).⁵ The pH profiles were fitted with a kinetic model involving two deprotonation equilibria for the metal complex (eq 1, SI). The pK_a values obtained are in good agreement with those determined from potentiometric titrations. The second-order rate constants for the reaction of BNP with the monodeprotonated complexes are reported in Table 2. Both **2** and **3** are less reactive than parent **1**, but **2** is sensibly more reactive than **3**. Such differences are not related to different substrate affinities. In fact, competitive inhibition experiments carried out with dimethyl phosphate (DMP) yield almost identical binding constants: 72, 75, and 78 M^{-1} respectively for **1**, **2**, and **3**. Finally, the solvent kinetic isotope effect (skie, $k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}}$) measured for reaction with **2** is 0.8 (SI). Similar skie's have been reported for intramolecular nucleophilic attack of Zn(II)-bound methoxide on phosphate triesters^{7a} and support nucleophilic catalysis with no movement of protons in the rate-determining step.^{7b}

The major effects of the ammonium group in **2** are hence the shift of the optimum reactivity toward lower pH values and a reactivity decrease with respect to **1**. However, the reactivity of **2** is 15-fold larger than that of **3** notwithstanding the similar pK_a 's of the alcoholic groups. This suggests the role played by the ammonium group is subtler than a simple nucleophilicity decrease due to the reduced basicity of the nucleophile.

Valuable insights into the mode of action of the two complexes were provided by the study of their reactivity toward two additional substrates: *p*-nitrophenyl acetate (PNPA) and 2-hydroxypropyl-*p*-nitrophenyl phosphate (HPNP, Chart 1). PNPA is cleaved by hydrolytic metal complexes with sole nucleophilic catalysis (Chart 1);⁸ hence the reactivity toward this substrate yields information on the nucleophilicity of the alkoxide.^{8b} The second-order rate constants for the monodeprotonated complexes (Table 2) indicate a similar nucleophilicity for both **2** and **3** and a lower activity with respect to **1**, as expected based on the pK_a values.

HPNP reaction with metal complexes is an intramolecular transesterification where the nucleophile is the substrate's hydroxyl groups (Chart 1). As a consequence, HPNP reactivity is not affected by the activity (or even by the absence) of metal-bound nucleophiles and provides a good indication of the ability of the catalyst to stabilize the reaction transition state.^{6,9} Note that, with this substrate (Table 2), the presence of the ammonium group leads to the larger reactivity of **2** compared to **1** and **3**. Since ground state effects can be ruled out based on the DMP binding

values obtained and general acid catalysis by the ammonium group is excluded by the skie effect observed, stabilization of the developing negative charge in the transition state by electrostatic or H-bonding interaction with the ammonium group must be the key point.

In summary, the ammonium group in **2** produces several effects, and not all positive, on the reactivity toward phosphate diesters. First, as proposed for the Lys residue in enzymes, it helps the formation of the alkoxyde nucleophile by decreasing its pK_a by 2 orders of magnitude. Thus, the maximum reactivity pH is shifted closer to physiological values. The important point that emerges from the results reported here, and that is apparently underestimated when enzyme mechanisms are discussed, is that this pK_a benefit is heavily paid in terms of reactivity loss as demonstrated by the 65-fold lower reactivity of **3** with respect to **1**. The second effect of the ammonium group, again in line with the proposed enzymatic mechanism, is the increased activity of the system, due to the electrostatic effects exerted by its positive charge in stabilizing the reaction transition state.¹⁰ In the model system studied here, electrostatic stabilization brings about a substantial benefit with HPNP, producing the most active monometallic Zn^{2+} complex toward this substrate so far reported.¹¹ However with BNP this effect is not strong enough to compensate for the reactivity decrease due to nucleophile deactivation. For the Lys groups in enzymes, if the two roles proposed, i.e., decreased basicity of the nucleophile and stronger transition state stabilization, were mutually exclusive, the second should be preferred since it is the only one producing a net positive effect. However, in a less polar environment such as the active site of the enzymes, electrostatic interaction can be much stronger.¹² If this were the case, the combined effect of both contributions could lead to a substantial reactivity gain at physiological pH.

Supporting Information Available: Cartesian coordinates, synthesis of the ligands, and kinetic details. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- (1) (a) Cowan, J. A. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1067–1088. (b) Jedrzejak, M. J.; Setlow, P. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 608–618. (c) Weston, J. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2151–2174.
- (2) (a) Dupureur, C. M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *2*, 250–255. (b) Pingouda, A.; Fuxreiter, M.; Pingouda, V.; Wende, W. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *685*–707.
- (3) Horton, N. C.; Newberry, K. J.; Perona, J. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 13489–13494.
- (4) Bonfá, L.; Gatos, M.; Mancin, F.; Tecilla, P.; Tonellato, U. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 3943–3949.
- (5) (a) Livieri, M.; Mancin, F.; Tonellato, U.; Chin, J. *Chem. Commun.* **2004**, 2862–2863. (b) Livieri, M.; Mancin, F.; Saielli, G.; Chin, J.; Tonellato, U. *Chem.—Eur. J.* **2007**, *13*, 2246–2256. (c) Bonomi, R.; Selvestrel, F.; Lombardo, V.; Sissi, C.; Polizzi, S.; Mancin, F.; Tonellato, U.; Scrimin, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15744–15745.
- (6) See also: (a) Feng, G. Q.; Mareque-Rivas, J. C.; de Rosales, R. T. M.; Williams, N. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13470–13471. (b) Feng, G. Q.; Mareque-Rivas, J. C.; Williams, N. H. *Chem. Commun.* **2006**, 1845–1847. (c) Feng, G. Q.; Natale, D.; Prabakaran, R.; Mareque-Rivas, J. C.; Williams, N. H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 7056–7059. (d) Linjalathi, H.; Feng, G. Q.; Mareque-Rivas, J. C.; Mikkola, S.; Williams, N. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4232–4233.
- (7) (a) Maxwell, C.; Neverov, A. A.; Brown, R. S. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 4329–4336. (b) Piatek, A. M.; Gray, M.; Anslyn, E. V. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12704–12709.
- (8) (a) Berreau, L. M. *Adv. Phys. Org. Chem.* **2006**, *41*, 79–181. (b) Koike, T.; Kimura, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8935–8941.
- (9) Morrow, J. R.; Amyes, T. L.; Richard, J. P. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 539–548, and references therein.
- (10) Examples of the effect of positively charged groups in hydrolytic agents: (a) Kovari, E.; Kramer, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12704–12709. (b) Ait-Haddou, H.; Sumaoka, J.; Wiskur, S. L.; Folmer-Andersen, J. F.; Anslyn, E. V. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 4014–4016. (c) Gasparini, G.; Prins, L. J.; Scrimin, P. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 2475–2479.
- (11) Mancin, F.; Tecilla, P. *New J. Chem.* **2007**, *31*, 800–817.
- (12) Hydrolytic activity of metal complexes in low dielectric constant media is highly increased due to enhanced electrostatic interactions, see: Brown, R. S.; Neverov, A. A. *Adv. Phys. Org. Chem.* **2007**, *42*, 271–331, and references therein.

JA9033236



Pergamon

TETRAHEDRON

Phosphate diesters and DNA hydrolysis by dinuclear Zn(II) complexes featuring a disulfide bridge and H-bond donors

Valentina Lombardo,^a Renato Bonomi,^b Claudia Sissi^{a,*} and Fabrizio Mancin^{b,*}

^a *Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Padova, via Marzolo 5, I-35131 Padova, Italy.*

^b *Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Padova, via Marzolo 1, I-35131 Padova, Italy*

Abstract— The dinuclear ligand **1** based on the bis-(2-amino-pyridinyl-6-methyl)amine (BAPA) metal binding unit and featuring a two-atom disulfide bridge was synthesized and studied as hydrolytic catalysts for phosphate diesters. The Zn(II) complexes of BAPA are known to elicit the cooperation between the metal ion and the hydrogen-bond donating amino groups to greatly increase the rate of cleavage of phosphate diesters. The reactivity of the dinuclear complex **1**·Zn(II)₂ toward bis-*p*-nitrophenyl phosphate and plasmid DNA was investigated and compared with that of reference complexes devoid of the disulfide bridge or of the hydrogen-bond donating amino groups. The dimetallic Zn(II) complex produces remarkable accelerations of the rate of cleavage of both the substrates accompanied by significant differences. In the case of BNP, the presence of the disulfide bridge does not lead to the improvement of the cooperative action of the two metal ions expected as the result of better preorganization. On the other hand, in the case of DNA the complex **1**·Zn(II)₂ is much more reactive than the corresponding reference devoid of the disulfide bridge. Hence, different requisites must be fulfilled by a good catalyst for the cleavage of the two substrates. Moreover, binding studies with DNA indicated that the presence of two metal ions in the complex or of the pyridine amino groups, but not of the disulfide bridge, results into an enhanced affinity of the complexes toward this substrate. © 2010 Elsevier Science. All rights reserved

1. Introduction

DNA phosphodiester bonds are hardly hydrolyzed under neutral conditions and still represent a challenge for chemists.¹ However, enzymes can reduce the half-life time of this reaction from 30 million years to some milliseconds, bringing about a 1×10^{17} -fold rate acceleration.² Such astonishing reactivity is the result of a perfect organization of metal ions and organic groups in the active sites of the enzymes.³ Research on artificial hydrolytic agents for DNA cleavage have attracted a considerable effort over the last two decades both for the intellectual challenge represented to design a catalyst capable to rival enzymes' reactivity but also for the important potential applications of such systems, which span from detoxification of pesticides and chemical weapons, to the realization of artificial restriction enzymes for molecular biology and of anti-DNA drugs.¹

Synthetic catalysts with good activity have been obtained by using complexes of transition metal ions with high Lewis acidity such as Ce(IV), Co(III), Cu(II), and Fe(III),^{1a,e} up to Komiyama's ARCUT system, based on the Ce(IV)/EDTA complex and pseudo-complementary PNA strands, which recently allowed the first reports of DNA manipulation with man-made restriction agents.⁴ In these systems, the metal ions can play several roles, mainly

acting as a Lewis acid: they provide the nucleophile for the reaction by facilitating the deprotonation of a coordinated water molecule, activate the phosphate group toward nucleophilic attack, stabilize the developing negative charge on the transition state and, in principle, may help the departure of the leaving group.

Still, the reactivity of enzymes is unmatched. First examples of hydrolytic agents were monometallic complexes of transition metal ions with high Lewis acidity.^{1a} In these systems, the role of the ligand is more or less to keep the hydroxide form of the complex in solution. Several studies have been devoted to elucidate the effect of the ligand structure in modulating and possibly enhancing the reactivity of the metal centre⁵ but it is quite clear that the desired acceleration cannot be reached with simple mononuclear complexes.⁶ The following step to increase the reactivity of artificial hydrolytic agents has been the use of bimetallic complexes, as occurs in several phosphatases and nucleases. In this case, the ligand must keep the two metal centers at the right distance to obtain the maximum cooperation.⁷ Model studies performed with kinetically inert Co(III) complexes have demonstrated that accelerations up to 10^{12} -fold are achievable with this strategy.⁷ However, when complexes of labile metal ions are used, complications arise from the formation of μ -hydroxo bridges between the two metal centers, which are poorly reactive and saturate the free binding sites on the

* Corresponding authors. Tel.: +39 049 8275666; fax: +39 049 8275239; e-mail: fabrizio.mancin@unipd.it (F. Mancin), Claudia.sissi@unipd.it (C. Sissi).

metal disfavoring the interaction with the substrate.^{8,9,10} This is particularly true in the case of Zn(II), which is one of the metal ions preferred by hydrolytic enzymes. Some Zn(II) features, such as low toxicity, bioavailability and absence of relevant redox chemistry, make it a very attractive candidate for the development of artificial agents.^{1c} However, bimetallic Zn(II) complexes have so far shown poor performances both with model substrates and DNA.

Another approach, again inspired by Nature, is the use of organic groups appropriately located in the structure of the ligand, as co-factors to increase the reactivity of the metal complex.¹¹ Such groups can act as general bases, general acids, nucleophiles, or hydrogen bond donors similar to the amino acid residues present in the active site of nuclease enzymes. Several examples demonstrate that high activity can be achieved by such strategy in the cleavage of model substrates and RNA oligonucleotides, but reactivity on DNA is still not reported.

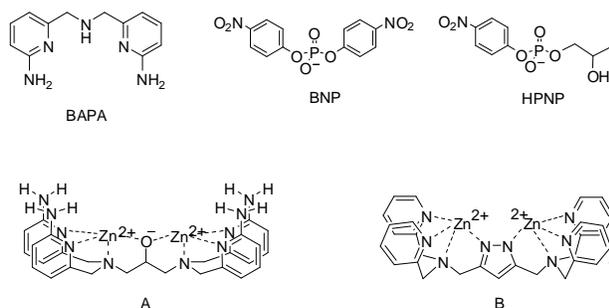


Chart 1. Activated phosphate esters and literature catalysts

Recently, we¹² and the groups of Williams and Mareque-Rivas¹³ reported that Zn(II) complexes based on the bis-(2-amino-pyridinyl-6-methyl)amine unit (BAPA, Chart 1), are very active in promoting the cleavage of activated phosphate diesters, such as bis-*p*-nitrophenyl phosphate (BNP, Chart 1) and hydroxypropyl-*p*-nitrophenyl phosphate (HPNP, Chart 1). In the ultimate example proposed by Williams and Mareque-Rivas, the bimetallic complex A (Chart 1) produces million-fold accelerations of the cleavage of both HPNP and RNA dinucleotides at pH 7.^{13b} The source of this high reactivity is the ability of the complex to activate the substrate toward the nucleophilic attack using both double metal activation and four hydrogen bonds. Transposition of such high reactivity to DNA would be highly desirable. With this in mind, we explored, and here report, a new way to assemble binuclear Zn(II) complexes containing the BAPA units and investigated their reactivity toward model substrate BNP and plasmid DNA.

2. Results

2.1. Ligand design and synthesis

Spatial organization of the bimetallic structure has been shown to be crucial in determining the hydrolytic activity and the best results have been reported with rigid structures that employ bridging groups in the ligand structure to keep the metal ions in a precise arrangement.¹ Among these, one-atom bridging units such as phenolate and alkoxide (i.e. complex A, Chart 1) are very popular and found in many of the best performing RNA cleaving systems.^{13,14} However, their efficiency in promoting the hydrolysis of DNA and its models is apparently lower, at least when Zn(II) is used as metal centre. The studies of Meyer on di-zinc(II) complexes based on the pyrazolate linking unit (Chart 1) indicate that the greater intermetallic distance, allowed by this two-atom bridging group, disfavors the formation μ -hydroxo bridges leading to an increased reactivity of the hydrolytic complex toward BNP.¹⁰

On these bases, we found the disulfide group quite appealing as a new bridging unit for the preparation of bimetallic complexes.¹⁵ The disulfide group, in fact, forms spontaneously when thiol derivatives are exposed to air in basic conditions. This reactivity, usually considered as a drawback in handling of thiols, reduces the problem of preparing binucleating ligands to the simpler synthesis of thiol containing mononuclear ligands.

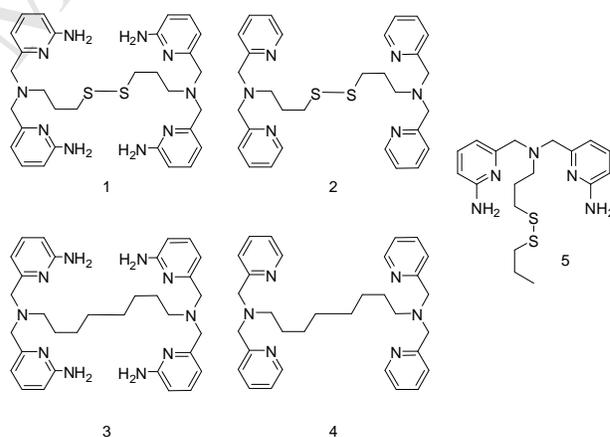
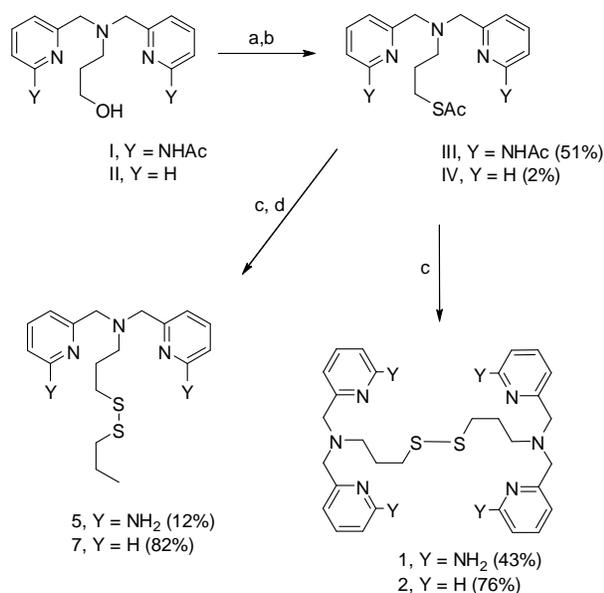


Chart 2. Ligands studied in this work

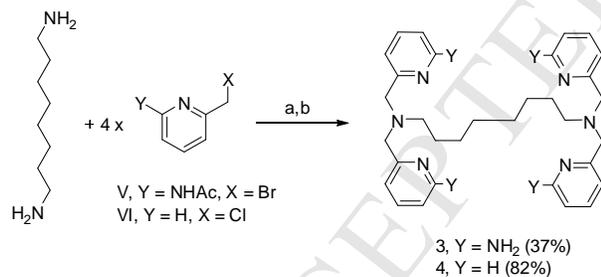
With this in mind, compound **1** was designed as binuclear ligand based on the BAPA structure and containing the disulfide group as two-atoms bridging unit. Synthesis of **1** was performed (Scheme 1) from previously reported derivative **I**^{12d} through tosylation of the hydroxyl group and substitution of the tosylate with thioacetate. Removal of the protecting acetyl form **II** in basic conditions provides **1**. Ligand **2**, devoid of the pyridine amino groups, was prepared in a similar way from previously described **III**.^{12d} Ligands **3** and **4**, in which the disulfide bridging group is not present, were prepared (Scheme 2) by reaction of 1,8-diaminooctane respectively with compound **V** and picolyl

chloride. Finally, the model mononuclear ligand **5** was prepared (Scheme 1) by deprotection of **II** in the presence of a large excess of propyl-1-thiol.



Scheme 1. Synthesis of ligands **1**, **2**, **5** and **7**: a) Tosyl chloride, triethylamine, CH₂Cl₂, r.t., 24 h; b) Potassium thioacetate, acetone, reflux, 2 d; c) HCl, EtOH/H₂O 1:1, r.t., 16 h; d) propanethiol, NaOH, EtOH/H₂O 1:1, reflux, 16 h; e) NaOH, EtOH/H₂O 1:1, reflux, 16 h.

All the above ligands are sparingly soluble in water in their neutral form and this prevented the investigation of the Zn(II) binding through potentiometric titrations.



Scheme 2. Synthesis of ligands **3** and **4**: a) For **3**, K₂CO₃, CH₃CN, reflux, 16 h; for **4**: NaOH, CTACl, water, r.t., 20 h; b) HCl, EtOH/H₂O 1:1, r.t., 16 h (only in the case of **4**)

However, in the case of ligand **5**, we could study the formation of the Zn(II) complex through ¹H-NMR investigation (Figure 1). As usual for BAPA based ligands,^{12c} formation of the Zn(II) complex causes significant changes on the resonances of the ligand protons: pyridine H2 is downfield shifted while the resonances of H1 and H3 melt into a single signal. The methylene protons H4 of the pyridinylmethyl moieties experience the most important variation: their signal is downfield shifted and split into an AB system, reasonably, as a consequence of the loss of conformational flexibility of this portion of the

complex. Much more significant are the changes of the signal relative to the disulfide arm, which show a significant modification of the shape and, to a minor extent, of the chemical shift of the signals relative to the methylene groups. Hence, also the disulphide group binds to the Zn(II) ion and **5** acts, at least at neutral pH, as a tetradentate ligand.

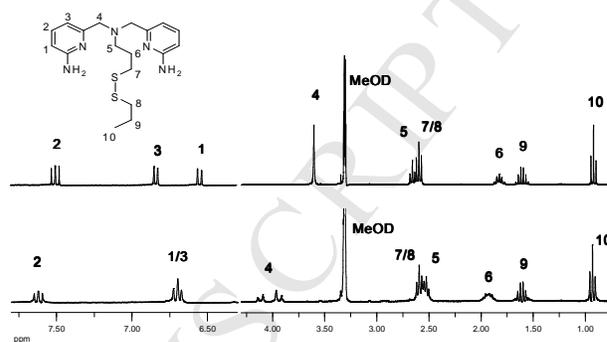


Figure 1. ¹H NMR spectra of **5** (upper trace) and **5**·Zn(II) (lower trace) at 1.0 mM in MeOD at 28°C

2.2. Reactivity toward BNP

Incubation of the Zn(II) complexes of **1**, **3**, **4**, **5** with BNP (Chart 1) in water at 40° C results into substrate hydrolysis, while **2**·Zn(II)₂ was found to be completely unreactive. The kinetic studies were performed by monitoring the increase of the *p*-nitrophenoxide absorbance at 400 nm, using the initial rates method. Apparent second order rate constants were obtained at each pH value by the linear fit of the pseudo-first order rate constants versus complex concentration data. The pH dependences of the apparent second order rate constants are reported in Figure 2.

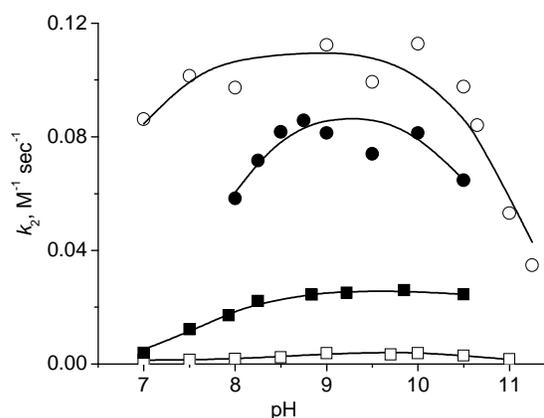


Figure 2. pH dependence of the apparent second-order rate constants (k_2') for the reaction between BNP and Zn(II) complexes of ligands **3** (○), **1** (●), **5** (■), **4** (□) at 40°C ([ligand] = 0.5–2.0 × 10⁻⁴ M, [BNP] = 2.0 × 10⁻⁴ M, [buffer] = 5.0 × 10⁻² M). The lines represent the best fit of the experimental data as described in the text.

The reactivity of all the complexes increases with the pH up to a maximum around pH 8-9 followed by a decrease, above pH 10. This behavior is diagnostic of the deprotonation of two acidic functions of the complexes, the first deprotonation event leading to a reactivity increase and the second to the opposite effect. Fitting of the pH profiles with a kinetic model involving two deprotonation equilibria (see Experimental Part) allowed the determination of the pK_a values of the reacting species and of the second-order rate constants for the reactive mono-deprotonated metal complex. Comparison of the second order rate constants of Table 3 reveals the reactivity order of the complexes: $3\text{-Zn(II)}_2 \approx 1\text{-Zn(II)}_2 > 5\text{-Zn(II)} > 4\text{-Zn(II)}_2$.

Table 1. Metal coordinated water molecule acidity constants (pK_a) and second order rate constants (k_2) for the reaction of BNP with the Zn(II) complexes of ligands **1-5** in water at 40 °C.

Complex	pK_a^1	pK_a^2	$k_2, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
1-Zn(II) ₂	7.7	10.9	0.09
3-Zn(II) ₂	6.5	11.0	0.11
4-Zn(II) ₂	8.7	10.7	0.005
5-Zn(II)	7.6	> 11	0.026

However, if it is considered that the amount of Zn^{2+} is double in the case of bimetallic complex, the cooperativity between the two metal centers in 1-Zn(II)_2 appears to be quite limited. This picture is confirmed by a kinetic experiment performed using a fixed concentration of **1** ligand and increasing amounts of metal ion (Figure 3). The rate profile describes a smooth sigmoidal curve reaching a plateau for a ligand to metal ion ratio around 2. The reaction rate observed after the introduction of the second metal ion is approximately 2.9 times larger than that observed in the presence of one equivalent of Zn(II), indicating again that the effect of the two complexed subunits is more than additive but the synergic action of the two metal ions is not very efficient. A different profile (not shown) was however observed with ligand **3**: in this case the kinetic data describe an almost linear curve up to 2 equivalents of added metal ion then going to plateau reactivity.

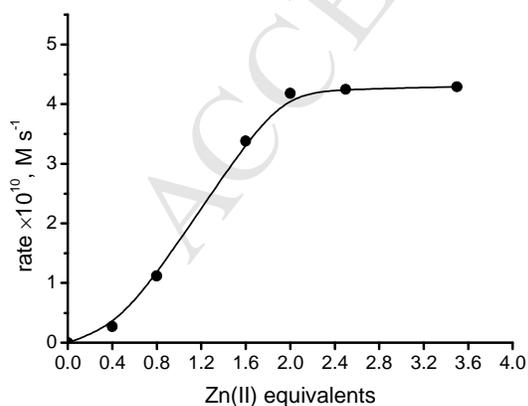


Figure 3. Kinetic profile for the BNP cleavage as a function of the Zn(II) to **1** ratio, in HEPES buffer 0.05 M, pH 9.0. $[\mathbf{1}] = 2.0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{BNP}] = 4.0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, 40 °C.

Finally, saturation kinetics were obtained measuring the reactivity of the complexes 1-Zn(II)_2 , 3-Zn(II)_2 and 5-Zn(II) in the presences of increasing amounts of BNP at pH 9.0. This behavior is in line with the accepted mechanism of the metal catalyzed hydrolysis of phosphate diesters, which involves a pre-complexation step of the substrate to the metal complex. Analysis of data with a Michaelis-Menten like equation allowed to estimate the binding constants of the substrate to the catalyst (K_b) of $2.7 \cdot 10^3$, $4.3 \cdot 10^3$ and $8.4 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$ respectively for 1-Zn(II)_2 , 3-Zn(II)_2 and 5-Zn(II) .

2.3. Cleavage of Plasmid DNA

Incubation of plasmid DNA pBR 322 with the Zn(II) complex of ligands **1-5** at pH 7 for 24 hours at 37 °C results in different degrees of cleavage of DNA form I to form II (relaxed circular) depending on the structure of the ligand (Figure 4). Surprisingly enough, the order of reactivity is quite different than that observed in the case of BNP cleavage. With plasmid DNA, in fact, the reactivity order is $1\text{-Zn(II)}_2 > 5\text{-Zn(II)} \approx 3\text{-Zn(II)}_2$, while 4-Zn(II)_2 is substantially unreactive. A peculiar behaviour is observed for 2-Zn(II)_2 which produces a remarkable (about 20%) cleavage at low concentrations (10 μM) but becomes less reactive at higher concentrations.

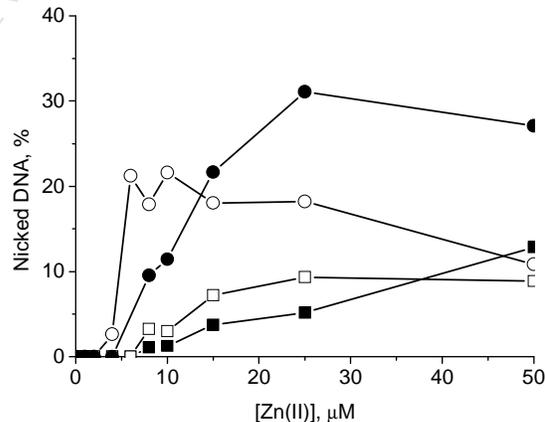


Figure 4. Extent of pBR 322 plasmid DNA form II (nicked) produced after cleavage with different concentrations Zn(II) complexes of ligands **1** (●), **2** (○), **3** (□) and **5** (■). $[\text{DNA}_{\text{pp}}] = 12 \mu\text{M}$. $[\text{HEPES}] = 20 \text{ mM}$, pH 7, 37°C, 24 h, complex concentration is expressed as total Zn(II) concentration (the lines connecting the data point are for a clearer inspection).

Control experiments performed in the presence of radical scavengers DMSO and isopropanol revealed that these additives have no effect on the extent of plasmid DNA cleavage by the Zn(II) complexes, ruling out the involvement of diffusible radical species. Moreover, the Ellmann test confirmed that the complexes containing the disulfide unit are not cleaved, in the conditions used for the

DNA cleavage experiments, to form thiol containing species, while the presence of diethyl disulfide does not affect the reactivity of the complexes not containing the disulfide group.

Binding of the Zn(II) complexes to DNA was investigated by following the modification of the circular dichroism (CD) spectra of linear calf thymus DNA after the additions of increasing concentrations of metal complex. In all the cases, a decrease of the dichroic signal, particularly of the 275 nm band, is observed, indicating that the interaction of the complexes with the DNA leads to a destabilization of the double-helix structure. Such effects are expected in the case of a predominant electrostatic interaction between the negatively charged DNA backbone and the positively charged complexes, which results into a partial charge neutralization of DNA. Unfortunately, precipitation of DNA in the presence of high metal complex concentrations and the overlap of the DNA dichroic bands with the ligand-induced dichroic bands hampered the quantitative determination of the affinity constants of the different complexes for DNA. However, if the amplitude of signal variation is taken as an approximate indication of the binding strengths, the DNA affinity order is: $1\text{-Zn(II)}_2 \approx 3\text{-Zn(II)}_2 > 2\text{-Zn(II)}_2 > 4\text{-Zn(II)}_2$.

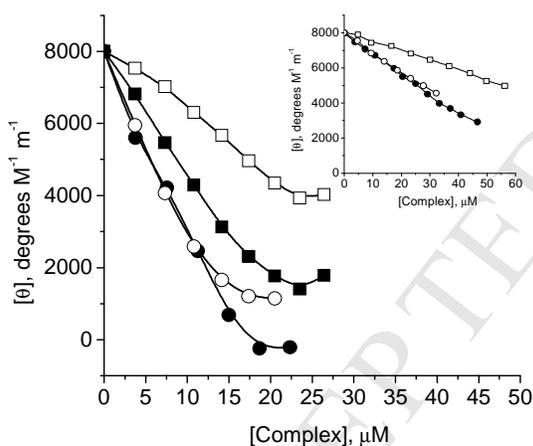


Figure 5. DNA molar ellipticity ($[\theta]$) at 275 nm as a function of the Zn(II) complexes of ligands 1 (●), 2 (○), 3 (■) and 4 (□). Inset: DNA molar ellipticity ($[\theta]$) at 275 nm as a function of the Zn(II) complexes of ligands 5 (●), 6 (○) and 7 (□). $[\text{ctDNA}_{\text{bp}}] = 180 \mu\text{M}$. $[\text{HEPES}] = 20 \text{ mM}$, pH 7, 25°C, 24 h, complex concentration is expressed as total Zn(II) concentration.

In order obtain to better insight into the reasons for the different affinities of the ligands for DNA, monometallic Zn(II) complexes 6-Zn(II) and 7-Zn(II) (Chart 3) were investigated and compared with 5-Zn(II) . When the comparison is restricted to mononuclear complexes, affinity order for DNA emerging from circular dichroism experiments is $5\text{-Zn(II)} \approx 6\text{-Zn(II)} > 7\text{-Zn(II)}$.

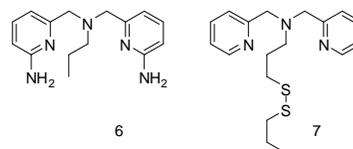


Chart 3. Reference ligands used in CD experiments

3. Conclusions

When the literature on artificial hydrolytic catalysts for DNA and model phosphate diesters is examined, one is surprised by the lack of efficient bimetallic Zn(II)-based systems. This appears in striking contrast with natural systems, which often use two Zn(II) ions in the active sites of several nuclease enzymes. The studies of Bencini⁹ and Meyer¹⁰ have quite clearly pointed out that the source of such low efficiency lies in the formation of μ -hydroxo bridges that are poor nucleophiles and, on the other hand, block the available binding sites on the metal ions preventing the binding of the substrate.

The reactivity here reported for 1-Zn(II)_2 and 3-Zn(II)_2 toward the model substrate BNP confirms such a scenario. The two complexes are indeed highly reactive toward BNP, producing in the case of 3-Zn(II)_2 a 40000-fold rate acceleration over the background reaction at pH 7 and 40 °C,¹⁶ and at a complex concentration as low as 50 μM . However, both the bimetallic complexes are only 3-4 fold more reactive than the monometallic reference 5-Zn(II) , indicating that cooperative action of the two metal centres is limited. This was expected for complex 3-Zn(II)_2 , where the non-bridging spacer produces very little pre-organization of the structure.¹⁷ It is more surprising in the case 1-Zn(II)_2 , which is even slightly less reactive than 3-Zn(II)_2 .

Some insight into the causes of such low reactivity come from the analysis of the behavior of the other two dinuclear complexes studied, 2-Zn(II)_2 and 4-Zn(II)_2 . Here the difference is dramatic: the reactivity of the 2-Zn(II)_2 , which contains the disulfide bridge, is not only much lower than that of the bridging group devoid 4-Zn(II)_2 , but virtually absent. This indicates that the presence of the disulfide bridge is potentially detrimental for the reactivity of the system, probably because the arrangement of the two Zn(II) ions realized in the complex still allows for the formation of unreactive μ -hydroxo bridges. On these bases, the similar reactivity of complexes 1-Zn(II)_2 and 3-Zn(II)_2 , accompanied by a similar affinity for the substrate as indicated by the BNP binding constants measured, could be attributed to the lack of or to a weak coordination of both the Zn(II) ions to the sulfur atoms of the bridge that would make 1 and 3 structurally equivalent.

Unfortunately, the solubility of the bimetallic complexes was too low to allow the investigation of their structures. In the case of monometallic 5-Zn(II) , coordination of sulfur to Zn(II) is supported by the NMR spectral changes, and the same occurs with similar ligands featuring a thioether arm

studied by Berreau and co-workers.¹⁸ Also the absence of reactivity observed with 2-Zn(II)_2 supports the coordination of the Zn(II) ions to the sulfur atoms of the bridge. However, in the case of 1-Zn(II)_2 , steric hindrance between the pyridine amino groups, as emerges by inspection of molecular models, could disfavor the interaction between the metal ions and the disulfide bridge.

Differently from the behavior observed with the model substrate BNP, reactivity toward plasmid DNA is quite interesting. In fact, not only is the bimetallic complex 1-Zn(II) substantially more reactive, at low concentrations, than the mononuclear counterpart but this time it is also much more reactive than complex 3-Zn(II)_2 (and the same occurs if 2-Zn(II)_2 and 4-Zn(II)_2 are compared). With DNA, hence, the presence of the disulfide group produces an important effect on the reactivity. Binding experiments give some further hint: first, DNA affinity of bimetallic complexes is, as expected, generally higher than that of monometallic one; second, the presence, of the pyridine amines in the ligand substantially increases DNA affinity while insertion of the disulfide group has no sensible effects. Hence, the greater reactivity of 1-Zn(II)_2 compared with 3-Zn(II)_2 is not due to higher affinity but must be attributed to some effect of the disulphide bridge either on the geometry of the complex when bound to DNA or on the metal properties.

In conclusion, the use of disulfide bridges appears as an interesting strategy to the easy preparation and modification of bimetallic complexes. In perspective, mixed binuclear ligands featuring two different binding units or catalyst selection by the dynamic combinatorial approach can be envisaged using this structural element. Moreover, the complexes herein reported are quite reactive toward BNP and DNA, where they rank among the few Zn-based bimetallic complexes capable to promote DNA cleavage.¹ This confirms that the use of BAPA-based ligands is a promising strategy for the realization of efficient hydrolytic catalysts for phosphate esters and also with DNA. However, the results obtained indicate that the simple use of a two atom bridge is not sufficient to overcome the difficulty to find the right spatial arrangements of the metal ions and achieve optimum cooperative action: a further design effort is needed to achieve the optimum geometry.

4. Experimental Section

4.1. General

Solvents were purified by standard methods. All commercially available reagents and substrates were used as received. TLC analyses were performed using Merck 60 F₂₅₄ precoated silica gel glass plates. Column chromatography was carried out on Macherey-Nagel silica gel 60 (70-230 mesh). NMR spectra were recorded using a Bruker AC250F spectrometer operating at 250 MHz for ¹H and 62.9 MHz for ¹³C and a Bruker AV300 operating at 300 MHz for ¹H. Chemical shifts are reported relative to

internal Me₄Si. Multiplicity is given as follow: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, qn = quintet, m = multiplet, br = broad peak. ESI-MS mass spectra were obtained with an Agilent Technologies LC/MSD Trap SL mass spectrometer. UV-Visible spectra and kinetic traces were recorded on Perkin Elmer Lambda 16 and Lambda 45 spectrophotometers equipped with thermostated multiple cell holders. Zn(NO₃)₂ and Cu(NO₃)₂ were analytical grade products (Aldrich). Metal ion stock solutions were titrated against EDTA following standard procedures. The buffer components were used as supplied by the manufacturers: acetic acid (Aldrich), 2-morpholinoethanesulfonic acid (MES, Fluka), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES, Sigma), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinepropanesulfonic acid (EPPES, Sigma), 2-[cyclohexylamino]ethanesulfonic acid (CHES, Sigma), 3-[N-cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid (CAPS, Sigma). The substrate bis-*p*-nitrophenyl phosphate sodium salt (BNP) is an Aldrich product, used as received. Ligands **1-5** and **7** were prepared as described in the following paragraphs, synthesis of ligand **6** was previously reported.^{12d} Concentrations of ligands **1-7** (prepared) stock solutions in methanol in were determined by spectroscopic titrations with Cu(NO₃)₂ monitoring the increase of the Cu(II) absorption band (*d-d* transition) at 700 nm.

4.2. DNA cleavage experiments

DNA cleavage experiments were performed using pBR 322 (Fermentas) in 20 mM HEPES, pH 7.0. Reactions were performed incubating DNA (12 μM base pairs) at 37°C in the presence/absence of increasing amount of Zn(II) complexes for 24 hours and stopped by addition of EDTA and SDS to a final concentration of 0.06 M and 1% respectively. Reaction products were resolved on a 1% agarose gel in TAE buffer (40 mM TRIS base, 20 mM, acetic acid, 1 mM EDTA) and visualized by ethidium bromide staining. The relative amounts of different plasmid structures were quantified using a Geliance 600 Imaging System (Perkin Elmer) interfaced to a PC workstation.

4.3. CD experiments

CD measurements were performed using Jasco J-810 spectropolarimeter equipped with a thermostated cell holder. CD spectra were recorded in HEPES 20 mM pH 7.0 using a 1 cm pathlength quartz cells. Titrations were performed by addition of increasing complex concentrations to a calf thymus DNA solution 180 μM (base pairs) in HEPES 20 mM pH 7.0 at 25°C. For each measurement 2 scans were run in the 220-350 nm range and recorded with 0.1-nm step resolution. Each measurement was repeated at least in triplicate in independent experiments. At the end of each measurement, observed ellipticities were converted to mean residue ellipticity [θ] = deg × cm² × d mol⁻¹.

4.4. Kinetic Measurements

The kinetic traces were recorded on Perkin Elmer Lambda 16 and Lambda 45 spectrophotometers equipped with a

thermostated multiple cell holders. Reaction temperature was maintained at 25.0 ± 0.1 °C or 40.0 ± 0.1 °C. The reactions were started by adding 20 μ L of a 2.0×10^{-3} M solution of substrate (BNP) to a 2 mL solution containing the appropriate buffer (0.05 M), $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, and ligands **1-5** in the desired amount, and monitored by following the absorption of *p*-nitrophenoxide at 400 nm or *p*-nitrophenol at 340 nm. Reactions were followed up to about 5% of substrate hydrolysis. The pseudo-first order rate constants (k_p) were obtained from the slope of the absorbance versus time data (the fit error was always less than 1%) divided by the molar absorptivity of the *p*-nitrophenoxide and the concentration of substrate. Each experiment was performed in triplicate and the errors on the rate constants is always below 10%. Apparent pH dependent second order rate constants (k'_2) were obtained by linear regression fitting of the k_p versus metal complex concentration data. Kinetic K_a^n values and second-order rate constants (k_2) for the mono-deprotonated complexes were obtained by non-linear regression analysis of the apparent second-order rate constants vs. pH data according to the equation: $k'_2 = k_2 \cdot (K_a^1/[H^+] + 1 + [H^+]/K_a)$. BNP rate saturation experiments with Zn(II) complexes were fitted according to the Michealis-Menten equation: $rate = k_{max} \cdot [\text{BNP}] / (1/K_{BNP} + [\text{BNP}])$, where k_{max} is the limiting reaction rate in the experimental conditions and K_{BNP} is the apparent binding constant of the substrate to the catalyst.

4.4.1. *N*-Bis(6-acetylamido-2-pyridylmethyl)-1-acetylsulfanyl-3-propylamine (**III**)

N-Bis(6-acetylamido-2-pyridylmethyl)-3-hydroxy-propylamine (**I**), was prepared as previously reported.^{12d} To a stirred solution of compound **I** (0.675 g, 1.80 mmol) in dry pyridine (8 mL) were added *p*-toluenesulfonyl chloride (0.673 g, 3.50 mmol) and triethylamine (0.421 g, 4.16 mmol). The reaction mixture was stirred under N_2 at room temperature for 24 hours. The pyridine was evaporated, the crude product was dissolved in chloroform and washed with water (4×50 mL). The organic phase was dried over Na_2SO_4 and evaporated. 0.403 g (12.1257%) of *N*-bis(6-acetylamido-2-pyridylmethyl)-3-chloro-propylamine were obtained as a white solid. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz), δ : 8.05 (d, 2H, 8 Hz), 7.85 (sb, 2H), 7.68 (t, 2H, 8 Hz), 7.17 (d, 2H, 8 Hz), 3.70 (s, 4H), 3.58 (t, 2H, 7 Hz), 2.70 (t, 2H, 7 Hz), 2.21 (s, 6H), 1.99 (qn, 2H, 7 Hz). ESI-MS (m/z): 390.8 [16%, $\text{M}+\text{H}^+$], 412.2 [100%, $\text{M}+\text{Na}^+$]. The above compound (0.403 g, 1.03 mmol) was dissolved in acetone (30 mL) and potassium tioacetate (0.240 g, 2.1 mmol) was added. The mixture was refluxed under nitrogen for 60 hours, the solvent was evaporated and the solid residue dissolved in CH_2Cl_2 (20 mL). The organic solution was extracted with water (5×20 mL) and dried with Na_2SO_4 . After solvent evaporation, the crude product was purified by flash chromatography (silica gel, eluent: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ 20:1:0.01). 0.386 g (90%) of **III** were obtained as a orange oil. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz), δ : 8.08 (sb, 2H), 8.06 (d, 2H, 8 Hz), 7.67 (t, 2H, 8 Hz), 7.14 (d, 2H, 8 Hz), 3.68 (s, 4H), 2.89 (t, 2H, 7 Hz), 2.55 (t, 2H, 7 Hz), 2.32 (s, 3H), 2.22 (s, 6H), 1.86 (qn, 2H, 7Hz).

4.4.2. Bis(3-amino-*N*-bis(6-amino-2-pyridylmethyl)-propyl) disulfide (**1**)

Compound **III** (0.170 g, 0.40 mmol) was dissolved in a 1 M NaOH solution in $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ 1:1 (75 mL) and refluxed for 16 hours under stirring. After this time, ethanol was evaporated and the resulting aqueous solution was extracted with chloroform. The organic phase was dried with Na_2SO_4 and the solvent evaporated. 0.103 g of **1** were obtained as a orange oil (43%). $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 250 MHz), δ : 7.39 (t, 4H, 8 Hz), 6.78 (d, 4H, 8 Hz), 6.41 (d, 4H, 8 Hz), 3.53 (s, 8H), 2.58 (t, 4H, 7 Hz), 2.54 (t, 4H, 7 Hz), 1.81 (qn, 4H, 7 Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 62.9 MHz), δ : 160.3, 158.4, 139.5, 112.9, 108.2, 61.1, 53.8, 37.3, 27.7. APCI-MS (m/z): 605.4 [$\text{M}+\text{H}^+$]. Elemental analysis, calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{N}_{10}\text{S}_2$ (604.84): C 59.57, H 6.67, N 23.16, S 10.60; found: C 59.68, H 6.70, N 23.20, S 10.55 %.

4.4.3. Propyl-(3-amino-*N*-bis(6-amino-2-pyridylmethyl)-propyl) disulfide (**5**)

Compound **III** (0.386 g, 0.90 mmol) was dissolved in ethanol (20 mL) and concentrated HCl (1.8 mL) was added. The mixture was stirred at room temperature for 12 hours and the solvent was evaporated to obtain the corresponding thiol as a brown solid (0.355 g, 95%). $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 250 MHz), δ : 7.80 (t, 2H, 8Hz), 6.87 (d, 2H, 8 Hz), 6.80 (d, 2H, 8 Hz), 3.83 (s, 4H), 2.61 (t, 2H, 7 Hz), 2.51 (t, 2H, 7 Hz), 1.74 (qn, 2H, 7 Hz). The above thiol (0.265 g, 0.88 mmol) was dissolved in a 0.1 M NaOH solution in $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ 1:1 (40 mL) and 1-propanethiol (1.00 g, 13.1 mmol) was added under stirring. The mixture was refluxed under nitrogen for 12 hours, and then 50 mL of chloroform were added. The organic solution was separated, extracted with 10% NaHCO_3 (2×100 mL) and dried with Na_2SO_4 . After solvent evaporation, the crude product was purified by flash chromatography (silica gel, eluent: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 20:1). 0.039 g (12%) of **5** were obtained as a colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz), δ : 7.38 (t, 2H, 8 Hz), 6.83 (d, 2H, 8 Hz), 6.34 (d, 2H, 8 Hz), 3.62 (s, 4H), 2.68 (t, 2H, 7 Hz), 2.60 (t, 4H, 7 Hz), 1.87 (qn, 2H, 7 Hz), 1.66 (m, 2H, 7 Hz), 0.95 (t, 3H, 7 Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 62.9 MHz), δ : 158.1, 158.0, 112.9, 107.0, 60.4, 52.9, 41.2, 36.9, 26.9, 22.7, 13.3. ESI-MS (m/z): 378.2 [$\text{M}+\text{H}^+$]. Elemental analysis, calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{N}_{10}\text{S}_2$ (377.57): C 57.26, H 7.21, N 18.55, S 16.98; found: C 57.35, H 7.17, N 18.42, S 17.08 %.

4.4.4. *N*-Bis(2-pyridylmethyl)-1-acetylsulfanyl-3-propylamine (**IV**)

N-Bis(2-pyridylmethyl)-3-hydroxy-propylamine (**II**) was prepared as previously reported.^{12d} **II** (4.00 g, 15.7 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (40 mL). Tosyl chloride (6.000 g, 31.4 mmol) and triethylamine (5.10 mL, 36.0 mmol) were added and the resulting mixture was refluxed for 3 days. During this time, the pH of the mixture was controlled with pH paper and adjusted to 9-10 with triethylamine. The reaction mixture was allowed to cool, diluted with CH_2Cl_2 and extracted with 5% NaHCO_3 (3×20 mL). The organic phase was dried with Na_2SO_4 and evaporated. The crude product was purified by flash chromatography (silica gel, eluent: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10:1). 0.440 g (7%) of *N*-bis(2-pyridylmethyl)-3-chloro-propylamine were obtained as a

yellow oil. ¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz), δ: 8.41 (d, 2H, 8 Hz), 7.55 (t, 2H, 8 Hz), 7.40 (d, 2H, 8 Hz), 7.04 (t, 2H, 8 Hz), 3.72 (s, 4H), 3.46 (t, 2H, 7 Hz), 2.61 (t, 2H, 7 Hz), 1.87 (qn, 2H, 7Hz). The above compound (0.472 g, 1.21 mmol) was dissolved in acetone (40 mL) and potassium tioacetate (0.420 g, 3.60 mmol) was added. The mixture was refluxed under nitrogen for 60 hours, the solvent was evaporated and the solid residue dissolved in CH₂Cl₂ (20 mL). The organic solution was extracted with water (5 x 20 mL) and dried with Na₂SO₄. After solvent evaporation, the crude product was purified by flash chromatography (silica gel, eluent: CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 10:1:0.01). 0.110 g (29%) of **IV** were obtained as a brown oil. ¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz), δ: 8.43 (d, 2H, 8 Hz), 7.59 (t, 2H, 8 Hz), 7.43 (d, 2H, 8 Hz), 7.07 (t, 2H, 8 Hz), 3.72 (s, 4H), 2.78 (t, 2H, 7 Hz), 2.52 (t, 2H, 7 Hz), 2.19 (s, 3H), 1.72 (qn, 2H, 7 Hz). ESI-MS (m/z): 315.0 [M+H⁺].

4.4.5. Propyl-(3-amino-N-bis(2-pyridylmethyl)-propyl) disulfide (**7**)

Compound **IV** (0.055 g, 0.17 mmol) was dissolved in ethanol (4 mL) and 6 M HCl (2 mL) was added. The mixture was stirred at room temperature for 3 hours, and the solvent was evaporated to obtain the desired thiol as a brown solid (0.063 g, 97%). ¹H-NMR (CD₃OD, 250 MHz), δ: 8.88 (d, 2H, 8Hz), 8.61 (t, 2H, 8 Hz), 8.20 (d, 2H, 8 Hz), 8.05 (t, 2H, 8 Hz), 4.39 (s, 4H), 2.79 (t, 2H, 7 Hz), 2.46 (t, 2H, 7 Hz), 1.83 (qn, 2H, 7 Hz). ¹³C-NMR (CD₃OD, 62.9 MHz), δ: 153.2, 147.6, 142.1, 127.9, 126.8, 56.0, 53.4, 30.1, 21.67. The above compound (0.048 g, 0.126 mmol) was dissolved into a 0.3M NaOH solution of H₂O/EtOH 1:1 (30 mL), 1-propanethiol (0.66 g, 8.7 mmol) was added and the mixture was refluxed for 16 hours. After this time 50 mL of chloroform were added and the organic solution was extracted with 10% NaHCO₃ (2 x 100 mL) and dried with Na₂SO₄. After solvent evaporation, the crude product was purified by flash chromatography (silica gel, eluent: CH₂Cl₂/MeOH 20:1). 0.036 g of **7** (82%) were obtained as a yellowish oil. ¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz), δ: 8.52 (d, 2H, 8 Hz), 7.67 (t, 2H, 8 Hz), 7.51 (d, 2H, 8 Hz), 7.15 (t, 2H, 8 Hz), 3.82 (s, 4H), 2.64 (m, 6H), 1.92 (qn, 2H, 7 Hz), 1.65 (m, 2H), 0.96 (t, 3H, 7 Hz). ¹³C-NMR (CDCl₃, 62.9 MHz), δ: 159.8, 149.2, 136.6, 123.1, 122.2, 60.6, 53.0, 41.3, 36.9, 27.0, 22.7, 13.3. ESI-MS (m/z): 348.2 [M+H⁺]. Elemental analysis, calcd. for C₁₈H₂₅N₃S₂ (357.54): C 62.21, H 7.25, N 12.09, S 18.45; found: C 62.35, H 7.17, N 12.38, S 18.23 %.

4.4.6. Bis(3-amino-N-bis(2-pyridylmethyl)-propyl) disulfide (**2**)

Compound **IV** (0.291 g, 0.92 mmol) was dissolved in a 1 M NaOH solution in H₂O/EtOH 1:1 (40 mL) and refluxed under stirring for 16 hours. After this time ethanol was evaporated and the resulting aqueous solution was extracted with chloroform. The organic phase was dried with Na₂SO₄ and the solvent evaporated to obtain 0.199 g of product (**4**) as a brown solid (76%). ¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz), δ: 8.51 (d, 4H, 8 Hz), 7.66 (t, 4H, 8 Hz), 7.51 (d, 4H, 8 Hz), 7.15 (t, 4H, 8 Hz), 3.82 (s, 8H), 2.65 (t, 8H, 7 Hz), 1.89 (qn, 4H, 7 Hz). ¹³C-NMR (CDCl₃, 62.9 MHz), δ: 159.5, 148.8, 136.3, 122.8, 121.9, 60.3, 52.6, 36.4, 26.6.

ESI-MS (m/z): 567.9 [M+Na⁺]. Elemental analysis, calcd. for C₃₀H₃₆N₆S₂ (544.78): C 66.14, H 6.66, N 15.43, S 11.77; found: C 66.31, H 6.75, N 15.05, S 11.90 %.

4.4.7. N,N,N',N'-Tetra(6-amino-2-pyridylmethyl)-1,8-dioctylamine (**3**)

Compound **V** (1.500 g, 6.55 mmol), prepared as previously reported,^{12d} and K₂CO₃ (1.143 g, 8.27 mmol) were added to a solution of 1,8-diaminooctane (0.210 g, 1.46 mmol) in acetonitrile (20 mL). The mixture was stirred for 3 hours under nitrogen at reflux, then insoluble salt were removed by filtration. After solvent evaporation, the crude product was purified by flash chromatography (silica gel, eluent: CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 10:1:0.01). 0.407 g (38%) of acetyl protected **3** were obtained as a yellow oil. ¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz), δ: 8.93 (s, 4H), 8.05 (d, 4H, 8 Hz), 7.63 (t, 4H, 8 Hz), 7.19 (d, 4H, 8 Hz), 3.46 (s, 8H), 4.11 (t, 4H, 7 Hz), 2.18 (s, 12H), 1.45 (m, 4H), 1.15 (m, 8H). The above compound (0.407 g, 0.55 mmol) was dissolved a 5 M NaOH in H₂O/EtOH 1:1 (45 mL). The reaction mixture was refluxed for 7 hours. After this time, ethanol was evaporated and the resulting aqueous solution was extracted with chloroform. The organic phase was dried with Na₂SO₄ and the solvent evaporated. 0.302 g (97%) of **3** were obtained as a orange oil (43%). ¹H-NMR (CD₃OD, 250 MHz), δ: 7.38 (t, 4H, 8 Hz), 6.82 (d, 4H, 8 Hz), 6.40 (d, 4H, 8 Hz), 3.53 (s, 8H), 2.45 (t, 4H, 7 Hz), 1.47 (m, 4H), 1.17 (m, 8H). ¹³C-NMR (CDCl₃, 62.9 MHz), δ: 158.8, 158.2, 138.1, 112.6, 106.7, 60.5, 54.3, 29.4, 27.3, 26.9. Elemental analysis, calcd. for C₃₂H₄₄N₁₀ (568.76): C 67.58, H 7.80, N 24.63; found: C 67.71, H 7.67, N 24.55.

4.4.8. N,N,N',N'-tetra(2-pyridylmethyl)-1,8-dioctylamine (**4**)

To a stirred solution of 2-chloromethyl pyridine hydrochloride (4.55 g, 27.7 mmol) in NaOH 5M (30 mL) were added 1,8-diaminooctane (1.00 g, 6.93 mmol) and hexadecyltrimethylammonium chloride (0.44 g, 0.14 mmol). The mixture was stirred for 20 hours and the solution was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 20 mL). The organic yellow solution was washed with brine (2 x 60 mL), water (2 x 60 mL) and dried with Na₂SO₄. After solvent evaporation, the crude product was purified by flash chromatography (silica gel, eluent: CH₂Cl₂/MeOH 10:0.5). 2.902 g (82%) of **4** were obtained as a white solid. ¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz), δ: 8.33 (d, 4H, 8 Hz), 7.46 (t, 4H, 8 Hz), 7.38 (d, 4H, 8 Hz), 6.94 (t, 4H, 8 Hz), 3.65 (s, 8H), 2.36 (t, 4H, 7 Hz), 1.36 (m, 4H), 1.02 (m, 8H). ¹³C-NMR (CDCl₃, 62.9 MHz), δ: 159.9, 148.7, 136.1, 122.6, 121.6, 60.3, 54.2, 29.2, 27.0, 26.8. ESI-MS (m/z): 509.40 [100%, M+H⁺], 531.2 [59%, M+Na⁺]. Elemental analysis, calcd. for C₃₂H₄₀N₆ (508.70): C 75.55, H 7.93, N 16.52; found: C 75.76, H 7.70, N 16.58.

Acknowledgments

The authors thank Marco Pedroni for preliminary experiments. CS and VL were supported by University of Padova (grant # CPDA078422/07).

Reference

- Recent reviews: a) Mancin, F.; Tecilla, P. in *Metal Complex-DNA Interactions*; Hadjiliadis, N.; Sletten, E., Eds.; Wiley: Chichester, 2009, pp 369–394; b) Gahan, L. R.; Smith, S. J.; Neves, A.; Schenk, G. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2009**, 2745–2758; c) Mancin, F.; Tecilla, P. *New J. Chem.* **2007**, *31*, 800–817; d) Niittymaki, T.; Lonnberg, H. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 15–25; e) Mancin, F.; Scrimin, P.; Tecilla, P.; Tonellato, U. *Chem. Commun.* **2005**, 2540–2548.
- Schroeder, G. K.; Lad, C.; Wyman, P.; Williams, N. H.; Wolfenden, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 4052–4055.
- a) Dupureur, C. M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 250–255; b) Weston, J. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2151–2174.
- Katada, H.; Komiyama, M. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1279–1288.
- a) Mathews, R. A.; Rossiter, C. S.; Morrow, J. R.; Richard, J. P. *Dalton Trans.* **2007**, 3804–3811; b) Bonfa, L.; Gatos, M.; Mancin, F.; Tecilla, P.; Tonellato, U. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 3943–3949; c) Itoh, T.; Hisada, H.; Usui, Y.; Fujii, Y. *Inorg. Chim. Acta* **1998**, *283*, 51–60; d) Fujii, Y.; Itoh, T.; Onodera, K.; Tada, T. *Chem. Lett.* **1995**, 305–306.
- Morrow, J. *Comm. Inorg. Chem.* **2008**, *29*, 169–188.
- Williams, N. H.; Takasaki, B.; Wall, M.; Chin, J. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 485–493.
- a) Chapman, W. H.; Breslow, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5462–5469; b) Mancin, F.; Rampazzo, E.; Tecilla, P.; Tonellato, U. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 281–288.
- a) Arca, M.; Bencini, A.; Berni, E.; Caltagirone, C.; Devillanova, F. A.; Isaia, F.; Garau, A.; Giorgi, C.; Lippolis, V.; Perra, A.; Tei, L.; Valtancoli, B. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 6929–6939; b) Bencini, A.; Berni, E.; Bianchi, A.; Fedi, V.; Giorgi, C.; Paoletti, P.; Valtancoli, B. *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 6323–6325; c) Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Bianchi, A.; Fusi, V.; Giorgi, C.; Paoletti, P.; Valtancoli, B.; Zanchi, D. *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 2784–2790.
- a) Meyer, F. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, 3789–3800; b) Bauer-Siebenlist, B.; Meyer, F.; Farkas, E.; Vidovic, D.; Dechert, S.; *Chem.-Eur. J.* **2005**, *11*, 4349–4360; c) Bauer-Siebenlist, B.; Meyer, F.; Farkas, E.; Vidovic, D.; Cuesta-Seijo, J. A.; Herbst-Irmer, R.; Pritzkow, H. *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 4189–4202.
- See: a) Natale, D.; Mareque-Rivas, J. C. *Chem. Commun.* **2008**, 425–437; b) Kramer, R. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *182*, 243–261, and reference therein.
- a) Bonomi, R.; Saielli, G.; Tonellato, U.; Scrimin, P.; Mancin, F. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 11278–11279; b) Bonomi, R.; Selvestrel, F.; Lombardo, V.; Sissi, C.; Polizzi, S.; Mancin, F.; Tonellato, U.; Scrimin, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15744–15745; c) Livieri, M.; Mancin, F.; Saielli, G.; Chin, J.; Tonellato, U. *Chem.-Eur. J.* **2007**, *13*, 2246–2256; d) Livieri, M.; Mancin, F.; Tonellato, U.; Chin, J. *Chem. Commun.* **2004**, 2862–2863.
- a) Linjalahti, H.; Feng, G. Q.; Mareque-Rivas, J. C.; Mikkola, S.; Williams, N. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4232–4233; b) Feng, G. Q.; Natale, D.; Prabakaran, R.; Mareque-Rivas, J. C.; Williams, N. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7056–7059; c) Feng, G. Q.; Mareque-Rivas, J. C.; Williams, N. H. *Chem. Commun.* **2006**, 1845–1847; d) Feng, G. Q.; Mareque-Rivas, J. C.; de Rosales, R. T. M.; Williams, N. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13470–13471.
- a) Morrow, J. R.; Amyes, T. L.; Richard, J. P. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 539–548; b) O'Donoghue, A.; Pyun, S. Y.; Yang, M. Y.; Morrow, J. R.; Richard, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1615–1621; c) Iranzo, O.; Kovalevsky, A. Y.; Morrow, J. R.; Richard, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1988–1993.
- Gavrilova, A. L.; Bosnich, B. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 349–383 and references therein.
- The rate estimated for the spontaneous hydrolysis of BNP at pH 7.0 and 40 °C is $1.1 \times 10^{-10} \text{ s}^{-1}$; see Chin, J.; Banaszczyk, M.; Jubian, V.; Zou, X. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 186–190.
- Iranzo, O.; Elmer, T.; Richard, J. P.; Morrow, J. R. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 7737–7746.
- Garner, D. K.; Fitch, S. B.; McAlexander, L. H.; Bezold, L. M.; Arif, A. M.; Berreau, L. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9970–9971.