

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Scuola di Dottorato in Scienze Molecolari

Indirizzo Scienze Chimiche

CICLO XXV

Tesi di dottorato:

*Auto-assemblaggio di nano-sistemi catalitici
a base di peptidi e nanoparticelle d'oro*

Direttore: Prof. ANTONINO POLIMENO

Supervisore: Ch.mo Prof. PAOLO MARIA SCRIMIN

Dottorando: DAVIDE ZARAMELLA

INDICE

RIASSUNTO	pag. 1
1. INTRODUZIONE	pag. 9
1.1 Introduzione alla catalisi supramolecolare.....	pag. 9
1.2 Approcci di <i>design</i> nella catalisi supramolecolare.....	pag. 11
1.2.1 <i>Recettori molecolari in cui il sito catalitico si trova vicino ad un sito di binding</i>	pag. 11
1.2.2 <i>Recettori molecolari che promuovono la reazione di due substrati simultaneamente complessati</i>	pag. 15
1.2.3 <i>Preparazione del backbone catalitico mediante interazioni supramolecolari</i> ...	pag. 24
1.3 Bio-macromolecole artificiali per catalisi asimmetrica.....	pag. 29
1.4 Nanoparticelle e peptidi nella catalisi supramolecolare.....	pag. 31
1.5 Introduzione al progetto di Dottorato.....	pag. 34
1.6 Riferimenti.....	pag. 36
2. Realizzazione e studio di un sistema catalitico auto-assemblante	pag. 41
2.1 Sintesi e caratterizzazione delle nanoparticelle Au-NR ₄ ⁺	pag. 42
2.1.1 <i>Sintesi di 8-trimetilammonio ottiliolo</i>	pag. 43
2.1.2 <i>Sintesi del colloide d'oro e passivazione con 8-trimetilammonio ottiliolo</i>	pag. 43
2.1.3 <i>Caratterizzazione di NR₄⁺-AuNPs</i>	pag. 45
2.2 Sintesi e caratterizzazione dei peptidi H ₀ -H ₃	pag. 49
2.3 Studi di <i>binding</i>	pag. 53
2.4 Studi cinetici.....	pag. 56
2.5 Studi meccanicistici.....	pag. 59

2.6 Parte Sperimentale.....	pag. 64
2.6.1 Sintesi delle nanoparticelle.....	pag. 65
2.6.2 Caratterizzazione delle nanoparticelle.....	pag. 68
2.6.3 Sintesi dei peptidi.....	pag. 70
2.6.4 Metodologie di purificazione e caratterizzazione dei peptidi.....	pag. 71
2.6.5 Studi di binding.....	pag. 72
2.6.6 Studi cinetici.....	pag. 75
2.6.7 Studi condotti a pH diversi.....	pag. 75
2.7 Riferimenti.....	pag. 76
3. Relazione Struttura-Attività del sistema catalitico auto-assemblante.....	pag. 77
3.1 Relazione Struttura-Attività del catalizzatore peptidico H ₁	pag. 77
3.1.1 Sintesi e caratterizzazione dei mutanti del peptide H ₁	pag. 78
3.1.2 Studi di binding sui mutanti del peptide H ₁	pag. 80
3.1.2 Studi cinetici sui mutanti del peptide H ₁	pag. 81
3.2 Relazione Struttura-Attività del substrato.....	pag. 83
3.3 Parte Sperimentale.....	pag. 86
3.3.1 Sintesi dei peptidi.....	pag. 86
3.3.2 Metodologie di purificazione e caratterizzazione dei peptidi.....	pag. 88
3.3.3 Studi Cinetici.....	pag. 89
3.4 Riferimenti.....	pag. 90
4. Auto-assemblaggio eterogeneo di un peptide catalitico con una libreria di peptidi modulatori.....	pag. 91
4.1 Sintesi e caratterizzazione della libreria peptidica.....	pag. 92
4.2 Studi cinetici sul sistema misto.....	pag. 98
4.3 Parte Sperimentale.....	pag. 100
4.3.1 Sintesi dei peptidi.....	pag. 100

4.3.2 Metodologie di purificazione e caratterizzazione dei peptidi.....	pag. 101
4.3.3 Studi Cinetici.....	pag. 102
4.4 Riferimenti.....	pag. 103
5. Studi di enantioselettività	pag. 105
5.1 Sintesi e caratterizzazione dei mutanti XHX.....	pag. 106
5.2 Studi di <i>binding</i> sui mutanti XHX.....	pag. 108
5.3 Studi cinetici di enantioselettività sui mutanti XHX.....	pag. 109
5.4 Parte Sperimentale.....	pag. 110
5.4.1 Sintesi dei peptidi.....	pag. 110
5.4.2 Metodologie di purificazione e caratterizzazione dei peptidi.....	pag. 112
5.4.3 Studi Cinetici.....	pag. 113
5.5 Riferimenti.....	pag. 114
6. CONCLUSIONI	pag. 115
6.1 Realizzazione e studio di un sistema catalitico auto-assemblante.....	pag. 115
6.2 Relazione Struttura Attività del sistema catalitico auto-assemblante	pag. 115
6.3 Auto-assemblaggio eterogeneo di un peptide catalitico con una libreria di peptidi modulatori	pag. 116
6.4 Studi di enantioselettività.....	pag. 116
7. PROSPETTIVE FUTURE	pag. 117
Pubblicazioni	pag. 121

RIASSUNTO

L'efficienza catalitica, i meccanismi e la complessità strutturale esibiti dagli enzimi sono da sempre stati un'inesauribile fonte d'ispirazione per i chimici impegnati nello sviluppo di nuovi catalizzatori^[1, 2]. Gli enzimi si sono evoluti come grandi e complesse strutture di centinaia di migliaia di Dalton in cui subunità anche lontane dal sito attivo possono profondamente influire sull'attività dell'enzima medesimo^[3]. La più bassa complessità strutturale dei sistemi catalitici artificiali basati sulla mimica enzimatica potrebbe essere un'importante ragione della loro efficienza tipicamente modesta. Questa consapevolezza ha diretto l'attenzione verso catalizzatori basati su *scaffolds* multivalenti come i dendrimeri^[4], le micelle^[5] e le nanoparticelle^[6] con l'intento di aumentare la complessità dei suddetti sistemi sintetici. La sfida fondamentale è rappresentata dalla realizzazione semplice e diretta di catalizzatori sintetici che siano paragonabili in dimensioni e complessità agli enzimi. La necessità di sintesi laboriose può essere superata sfruttando l'auto-assemblaggio per l'ottenimento di strutture multivalenti. In particolare, l'auto-assemblaggio di monostrati catalitici sulla superficie di nanoparticelle d'oro (AuNPs) per dare *clusters* d'oro protetti da monostrato (Au MPCs) sta emergendo come un'efficace strategia^[7, 8]. Tuttavia, l'eccessiva omogeneità chimica della struttura derivante intrinsecamente dal processo di auto-assemblaggio dei tioli rimane un problema analogo all'eccessiva semplicità dei modelli non nano-derivati^[9]. Tentativi di variegare la superficie delle nanoparticelle con tioli diversi mediante processi di *clusterizzazione* si sono dimostrati di difficile approccio; infatti, poiché la sintesi rimane basata sull'auto-assemblaggio, la composizione finale del sistema risulta troppo eterogenea in termini di decorazione delle superfici nanoparticellari. Ne conseguono enormi sforzi per la separazione e purificazione delle diverse specie. Per questa ragione negli ultimi anni si è fatto largo un nuovo approccio basato sulle nanoparticelle non come *tools* da impiegare in quanto tali, bensì come *scaffolds* dalla superficie omogenea ai quali far aderire molecole secondarie per ottenere sinergicamente l'effetto finale desiderato.

Rotello e collaboratori sono stati tra i primi pionieri in questo ambito con lo sviluppo di innovativi biosensori basati su nanoparticelle d'oro funzionalizzate con tioli cationici^[10]. Inspirandosi a questi lavori, recentemente, Prins *et al.* hanno sviluppato strutture eterofunzionalizzate, multivalenti basate sull'auto assemblaggio di piccoli ligandi sulla

superficie di nanoparticelle d'oro^[11, 12]. In questo modo è stato possibile dimostrare, con un approccio supramolecolare, come si possa finemente regolare la composizione della superficie delle nanoparticelle sfruttando le differenti affinità degli oligoanioni. Di conseguenza si è potuto superare in maniera semplice ed efficace il già citato problema dell'eccessiva omogeneità chimica legata ai sistemi supramolecolari e alle nanoparticelle d'oro funzionalizzate.

Quest'idea è stata ulteriormente sviluppata durante l'internato di dottorato^[13, 14]. Infatti, sfruttando la natura auto-assemblante degli oligo-anioni su sistemi nanoparticellari cationici, si è pensato di andare oltre il semplice controllo della composizione superficiale di ligandi e di realizzare un vero e proprio sistema nano-enzimatico artificiale di natura supramolecolare. Esso è composto da due elementi fondamentali:

1. Nanoparticelle d'oro passivate con tioli alchilici recanti in posizione Ω un gruppo trimetilammonico (8-Trimetilammonio ottitliolo \rightarrow NR₄⁺-AuNPs) in modo da generare una superficie cationica;
2. Oligo-peptidi anionici in grado di legarsi alla superficie delle nanoparticelle. Questi si caratterizzano per una coda C-terminale composta di tre residui di acido aspartico, per un'estremità N-terminale composta di un numero variabile d'Istidine (H₀-H₃), unite da un residuo di Triptofano (Ac-H_nWDDD-OH). Le quattro cariche negative dei residui di Acido aspartico garantiscono un *binding* efficiente alla superficie cationica, mentre i residui d'Istidina e il Triptofano permettono, rispettivamente, la catalisi e la misurabilità del peptide stesso in termini di concentrazione e *binding*.

Ciascuno dei due elementi preso singolarmente non è un efficiente catalizzatore. Infatti, solamente quando i peptidi si assemblano sulla superficie delle nanoparticelle, il sistema che ne scaturisce è in grado di accelerare l'idrolisi di un substrato modello come il *p*-Nitrofenil estere della *N*-CBz-(D)Fenilalanina di due ordini di grandezza rispetto al *background*. Oltretutto, la multivalenza della superficie nanoparticellare gioca un ruolo cruciale nella modulazione dell'attività catalitica non soltanto mantenendo substrato e catalizzatore in stretto contatto, ma generando un micro-ambiente dotato di un proprio pH locale che aumenta ulteriormente l'efficienza del sistema. Data la natura supramolecolare del sistema e ricordando quanto già visto per i lavori di Prins circa la regolazione della composizione della superficie cationica di nanoparticelle con oligoanioni, il sistema creato è finemente regolabile semplicemente dosando la quantità di componenti che si auto-assemblano sulla superficie delle nanoparticelle medesime.

Una volta ottenuto il sistema *lead* si è voluto scendere nel dettaglio per comprendere le intime peculiarità che lo caratterizzavano come importanza della natura del substrato, importanza della natura dell'emi-catalizzatore peptidico ed importanza della natura della superficie cationica.

La sequenza dell'emi-catalizzatore peptidico gioca un ruolo fondamentale nell'efficienza della catalisi con dei requisiti molto stringenti per quanto riguarda l'ordine dei singoli amminoacidi. Mutazioni a carico della sequenza H₁ (Ac-HWDDD-OH) concernenti l'ordine e alla lunghezza hanno permesso di concludere che il Triptofano ha un ruolo accessorio nel *binding* e che la sua posizione deve essere adiacente alla coda anionica C-terminale. L'Istidina deve occupare l'estrema posizione N-terminale perché la presenza di amminoacidi in detta posizione ingombrirebbe il residuo imidazolico diminuendo l'efficienza catalitica del sistema. L'allungamento della sequenza, a parità di ordine, si traduce ancora una volta in una diminuzione dell'attività in ragione di un minore effetto del pH locale, ma con ripercussioni molto inferiori rispetto all'ingombro sterico.

Analogamente ad un enzima naturale, tale sistema si è dimostrato avere dei precisi requisiti anche per quanto riguarda le caratteristiche dei substrati che ad esso si vanno a legare. Studi SAR sulla natura del substrato sono stati condotti utilizzando analoghi che presentassero modifiche alla natura e dimensioni del gruppo protettore dell' α -ammina e della catena laterale. I risultati ottenuti hanno permesso di concludere che, in generale, substrati più grandi e idrofobici hanno maggiore affinità per le nanoparticelle in ragione di un probabile nascondimento di superfici idrofobiche nel *core* alchilico. A parità d'idrofobicità le superfici aromatiche presentano una maggiore affinità e subiscono più facilmente idrolisi (si veda il caso di *N*-CBz-Leu-ONP e *N*-CBz-(L)Trp-ONP). Il gruppo protettore dell' α -ammina sembra rivestire un ruolo cruciale nella stabilizzazione del substrato: una riduzione delle sue dimensioni, con conseguente diminuzione dell'idrofobicità, si traduce in un'elevata tendenza all'idrolisi spontanea rendendo inutile il catalizzatore.

Tentativi di migliorare la catalisi con approccio supramolecolare sono stati condotti auto-assemblando il sistema in maniera mista con il peptide H₂ (Ac-HHWDDD-OH) e una libreria di peptidi (Ac-XXWDDD-OH, dove XX sono Leu, Phe, Ser e Arg nelle 4² combinazioni possibili) ritenuti essere modulatori dell'attività catalitica. I risultati ottenuti non sono stati in linea con le attese e questo probabilmente in relazione al fatto che il l'annullamento dell'effetto di pH non viene compensato dalle necessarie interazioni tra il sistema ed il substrato medesimo traducendosi in una diminuzione dell'attività.

Mutazioni a carico della sequenza H₁ mediante inserzione di coppie d'identici amminoacidi ai lati del residuo istidinico (Ac-~~X~~H~~X~~WDDD-OH) sono state condotte nel tentativo di ottenere un intorno chirale che permettesse una catalisi enantioselettiva. Nonostante la forte eterogeneità dei residui scelti (Leu, Phe, Ser, Tyr), il sistema non ha dato i risultati attesi. Dunque, a livello catalitico non sembra essere possibile discriminare gli enantiomeri, ma è auspicabile una discriminazione al momento del *binding* alla superfici cationica come ci hanno suggerito alcune evidenze sperimentali.

ABSTRACT

The catalytic efficiency, mechanistic pathways, and structural complexity displayed by enzymes make them a tremendous source of inspiration for chemists involved in catalyst development^[1, 2]. Nature has evolved enzymes as large multi-kilodalton complex structures in which even units that are remote from the actual active site may profoundly affect the activity of the enzyme^[3]. The much lower complexity of artificial enzyme mimics may be an important reason for their typical modest performances with respect to enzymes. This awareness has led to an interest in catalysts based on multivalent scaffolds, such as dendrimers^[4], micelles^[5], and nanoparticles^[6], with the idea of increasing the structural complexity of the synthetic system. A key challenge is straightforward access to synthetic catalysts that can match up to the size and complexity of enzymes. The necessity for multistep synthesis can be overcome by relying on self-assembly for the formation of the multivalent structure. In particular, the self-assembly of catalytic monolayers on the surface of gold nanoparticles (AuNPs) to give gold monolayer-protected clusters (AuMPCs) is emerging as an attractive strategy^[7, 8]. Nonetheless, although they rely on self-assembly, the composition of self-assembled monolayers (SAMs) on Au NPs is typically still of rather low complexity^[9]. Varying the surface composition by thiol clustering is a very difficult approach because this does not give a full control over the final composition, requires purification of each single NP system, and suffers from issues related to the characterization of mixed SAMs both in terms of composition and morphology. As a consequence, enormous efforts should be done to purify the different species coming from the synthesis. For that reason, in the recent years a new approach emerged by using nanoparticles not as direct tools, but as scaffolds to bind secondary molecules on.

Rotello and coworkers were the first to realize this pioneering idea showing the attractiveness of cationic Au MPCs as a construction element for the development of innovative biosensors^[10]. Inspired by those contributions, Prins et al. recently started to study the formation of heterofunctionalized multivalent structures relying on the self-assembly of small anionic peptides on the surface of Au MPCs^[11, 12]. The results showed that it is possible to control the peptide surface composition simply exploiting the different

affinities for the cationic monolayer. As a consequence, the low complexity of the surface can be overcome.

This concept has been further developed during the PhD-project^[13]. Based on the self-assembly of oligo-anions on a cationic surface, we went beyond the simple surface composition control and developed a true supramolecular nanoenzymatic system. It is composed by two fundamental elements:

1. Gold nanoparticles functionalized by alkyl thiols featuring a Trimethylammonium group in the Ω -position (8-Trimethylammonium octylthiol \rightarrow NR₄⁺-AuNPs) thus generating a cationic surface;
2. Anionic oligopeptides that bind the nanoparticles' surface. These feature a C-terminal tail with three Aspartic acid residues; an N-terminal tail composed by a variable number of Histidines (H₀-H₃); a central Tryptophane residue linking the two edges (Ac-H_nWDDD-OH). The four negative charges coming from the C-terminal tail give an efficient binding, while Histidine and Tryptophane allow, respectively, catalysis and signal output for peptide concentration and binding measurements.

Both of these constitutional elements are inefficient catalysts by themselves. Only when the peptides self-assemble on the cationic surface an active system is formed, which is able to accelerate the hydrolysis of *N*-CBz-(D)Phe-ONP by two orders of magnitude over the background. Importantly, the multivalent surface plays a crucial role in tuning the catalytic activity. The surface not only brings the substrate and catalyst in close proximity but also generates a microenvironment with an enhanced local pH that further activates the catalytic peptide. Given the supramolecular nature of the whole system and considering what has been written about the fine regulation of the surface composition, this system is highly adjustable simply by modulating the concentration of the constitutional elements that self-assemble on the surface.

Once we obtained the lead system we started to investigate the intrinsic features that characterized it like the importance of the chemical structure of the substrate, the peptide catalyst and the cationic surface.

The sequence of the peptide catalyst is very important for the efficiency of the catalytic system. Mutations on the H₁ sequence (Ac-HWDDD-OH) altering its order and length showed that Tryptophane has a subsidiary role in binding and its position should be next to the C-terminal tail. Histidine should occupy the N-terminal position because the presence of other residues in such position would reduce the catalytic efficiency of the

Imidazole residue. If the sequence is extended by insertion of a Glycine residue between the Tryptophane and the C-terminal tail, we still observe a lower hydrolysis rate, but not so drastic as the one observed by flipping the N-terminal sequence (steric hinderance).

Like a natural enzyme, this system has specific requirements for the substrate that undergoes hydrolysis. SAR studies have been performed on substrate analogs with different N_α -protecting groups and side chains. The results showed that large and hydrophobic substrates have a higher affinity for the nanoparticles and are hydrolyzed faster. This is presumably due to interactions between those hydrophobic surfaces and the hydrophobic part of the monolayer. The aromatic substrates are favoured respect to the alkyl ones which emerges from the comparison between the k_{obs} of *N*-CBz-Leu-ONP and *N*-CBz-(L)Trp-ONP: the latter is hydrolyzed much faster. The N_α -protecting group seems to have a crucial role in the substrate stabilization: diminishing its dimensions, thus diminishing hydrophobicity, results in a fast, spontaneous hydrolysis in simple buffer.

A significant effort was made to improve the catalytic performances of the system through a supramolecular approach. In particular a hybrid system was prepared by self-assembling peptide H₂ (Ac-HHWDDD-OH) and a library of non-catalytic peptides contemporarily on the monolayer surface (Ac-XXWDDD-OH, where XX are Leu, Phe, Ser and Arg in 4² possible combinations). The idea was that the second peptides would modulate the catalytic efficiency of the system. The results did not match the expectations which is presumably due to the fact that those peptides did not compensate the loss of the pH effect with additional interactions.

Mutations on the H₁ sequence (Ac-HWDDD-OH) by inserting identical flanking residues beside Histidine (Ac-XHXWDDD-OH) were studied with the scope of generating enantioselectivity. Although the variety of the flanking residues was large, (Leu, Phe, Ser, Tyr) no substrate enantioselectivity was observed. Despite this we had some experimental evidences that suggested that some enantioselectivity could be obtained by exploiting the binding of the substrate on the nanoparticles surface.

Riferimenti/References

- [1] Wiester, M.J., Ulmann, P.A. and Mirkin, C.A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 114.
- [2] Breslow, R. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 146.
- [3] Fersht, A. *Structure and Mechanism in Protein Structure, 3rd ed.*; Freeman: New York, **1999**.
- [4] Kofoed, J. and Reymond, J.L. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 656.
- [5] Mancin, F., Scrimin, P., Tecilla, P. and Tonellato, U. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 2150.
- [6] Astruc, D., Lu, F. and Aranzaes, J.R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 7852.
- [7] Schatz, A., Reiser, O. and Stark, W.J. *Chem.-Eur. J.* **2010**, *16*, 8950.
- [8] Roy, S. and Pericas, M.A. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2669.
- [9] Gentilini, C. and Pasquato, L. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 1403.
- [10] Bunz, U.H.F. and Rotello, V.M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3268.
- [11] Pieters, G., Cazzolaro, A., Bonomi, R. and Prins, L. *J. Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1916.
- [12] Stodulski, M. and Gulder, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2-6.
- [13] Zaramella, D., Scrimin, P. and Prins L.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8396–8399.
- [14] Zaramella, D., Scrimin, P. and Prins L.J. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 2011-2021.

1. INTRODUZIONE

1.1 Introduzione alla catalisi supramolecolare

Gran parte dell'ispirazione per il *design* di sistemi catalitici supramolecolari sorge dall'osservazione e comprensione della catalisi enzimatica^[1-3]. I modelli sintetici annoverano solamente alcune delle caratteristiche presenti nei sistemi biologici, sono più piccoli e strutturalmente più semplici degli enzimi. Nonostante ciò, la maggiore semplicità non limita gli aspetti che possono essere investigati; al contrario, in questo modo è possibile stimare l'importanza relativa dei singoli fattori che contribuiscono alla catalisi. Un ulteriore vantaggio viene poi dal fatto che gli elementi costitutivi del sistema possono essere sinteticamente manipolati per studiare una specifica proprietà, mentre nei sistemi biologici un tale approccio è di difficile realizzazione. Lo studio dei processi catalitici tramite questi sistemi, quindi, permette di spiegare le variazioni di efficienza in termini strutturali e meccanicistici facendo di questi modelli una risorsa indispensabile per la moderna chimica-fisica e organica.

L'ottenimento di suddetti modelli supramolecolari in grado di mimare le proprietà catalitiche di un enzima è possibile con diversi approcci. Ad esempio, molti di essi sono stati creati in modo da sfruttare l'energia di legame come *driving force* della catalisi. In questo contesto, si possono distinguere due tipi di sistemi:

1. recettori molecolari in cui il sito catalitico si trova vicino ad un sito di *binding* disegnato per legare selettivamente un reagente;
2. recettori molecolari che promuovono la reazione di due distinti reagenti, simultaneamente complessati formando un complesso multi-molecolare (ternario o superiore) tenuto assieme da interazioni deboli e reversibili.

Quando due porzioni reattive vengono tenute in stretto contatto, l'accelerazione osservata può essere ascritta all'aumento della concentrazione locale^[4]. Il vantaggio entropico di un'interazione intramolecolare rispetto ad un'interazione intermolecolare può essere quantificato misurando la molarità effettiva $EM = k_{intra}/k_{inter}$ ^[3]. Il valore di EM ci può suggerire come l'efficienza catalitica sia legata alla struttura in un sistema creato per tenere i gruppi reattivi in stretto contatto. Nonostante Page e Jenks abbiano stimato che la variazione di entropia per sistemi in soluzione possa raggiungere una molarità effettiva di

6×10^8 , raramente la vicinanza dei reattivi nei sistemi supramolecolari genera accelerazioni rilevanti rispetto agli enzimi ($EM < 10M$). Questa bassa efficienza è probabilmente dovuta al fatto che i reattivi medesimi non sono tenuti saldamente legati ed il conseguente apporto di entropia vibrazionale non viene sufficientemente compensato da energia di legame. Nella catalisi enzimatica, infatti, l'entropia è probabilmente uno dei fattori più rilevanti. Una volta legati all'enzima, i substrati fanno parte del medesimo complesso molecolare, così come i residui catalitici, e non si assiste, dunque, a dissipazione entropica nello stato di transizione.

Una caratteristica fondamentale degli enzimi è, appunto la loro capacità di legarsi e stabilizzare lo stato di transizione e/o gli intermedi di una particolare reazione e, dunque, il problema della catalisi può essere definito in termini di riconoscimento molecolare di questi ultimi. Si vedrà più avanti che molti modelli supramolecolari spesso sono inadeguati proprio a causa dello scarso *turnover* determinato da inibizione da prodotti che si legano stabilmente al catalizzatore. Nonostante la creazione di sistemi più sofisticati che abbiano anche una certa affinità per lo stato di transizione non sono ancora emersi catalizzatori supramolecolari estremamente efficienti^[5]. Sanders ha evidenziato che la “*paura dell'entropia*” ha spinto la sintesi dei catalizzatori supramolecolari verso la rigidità e la pre-organizzazione ottenendo strutture che, di fatto, in caso di mancato riconoscimento con lo stato di transizione, non si presentano essere degli efficienti sistemi catalitici in quanto inadatti agli accomodamenti nanometrici richiesti per la perfetta stabilizzazione di quest'ultimo. La costruzione di catalizzatori auto-assemblanti in cui tutti i motivi di riconoscimento (sia tra le subunità catalitiche che tra substrato e catalizzatore) sono cineticamente labili, potrebbe costituire un'approssimazione verosimile per risolvere il problema della rigidità dei sistemi suddetti^[6]; tutto ciò a patto che i legami che si formeranno compensino la forte perdita di entropia rotazionale e vibrazionale che si avrà passando da uno stato flessibile ad uno stato rigidamente costretto dalle geometrie dello stato di transizione.

Anche la desolvatazione dei reattivi è un meccanismo attraverso il quale gli enzimi ottengono accelerazione delle reazioni. Tale processo avviene in concomitanza all'inclusione di questi nel sito attivo determinando due processi che contemporaneamente favoriscono il decorso della reazione: da un lato, l'aumento di entropia del solvente dovuta, appunto, alla desolvatazione del sito attivo e dei substrati; dall'altro il contributo entalpico dovuto al legame tra substrati e catalizzatore.

1.2 Approcci di *design* nella Catalisi Supramolecolare

1.2.1 Recettori molecolari in cui il sito catalitico si trova vicino ad un sito di binding

I primi esempi di catalisi supramolecolare a due substrati sono emersi dal lavoro di Bender *et al.* che hanno studiato l'idrolisi di *m-tert*-Butilfenil acetato in presenza di Acido 2-benzimidazolacetico con α -ciclodestrine^[7]. Breslow, Knowles e altri hanno esteso ulteriormente l'utilizzo delle ciclodestrine come modelli enzimatici. In particolare, il gruppo di Breslow ha sintetizzato una β -ciclodestrina (Ciclosettaamilosio) recante due gruppi imidazolici per simulare una Ribonucleasi A^[8]. Più di recente, Kim *et al.* hanno fatto uso di β -ciclodestrine funzionalizzate con diversi poliaza-macro cicli^[9]. I complessi di zinco di queste molecole si sono mostrati avere un'attività di tipo carbossipeptidasico con la cavità idrofobica della ciclodestrina fungente da sito di *binding* per il residuo aromatico di *p*-Nitrofenilacetato ed il complesso metallico di Zinco (II) con il poliaza-macro ciclo come sito catalitico. La struttura toroidale delle ciclodestrine è piuttosto rigida e caratterizzata da 12 gruppi idrossilici sul lato superiore e 6 gruppi idrossilici primari sul lato inferiore. Nonostante l'anello sia leggermente più largo sul lato superiore, le β -ciclodestrine mostrano un *binding* selettivo del substrato dal lato inferiore. La geometria di *binding* del complesso posiziona il gruppo acetato del substrato in stretto contatto con una molecola d'acqua legata al complesso metallico di Zinco (II). I valori di EM riportati si aggirano attorno a 0.2/0.3 M e sono basati su misure di $k_{cat} = k_{intra}$, per la decomposizione del complesso binario mostrato in figura 1.1, e k_{inter} per la reazione del *p*-Nitrofenilacetato e del corrispondente complesso metallico di Zinco (II) con il poliaza-macro ciclo.

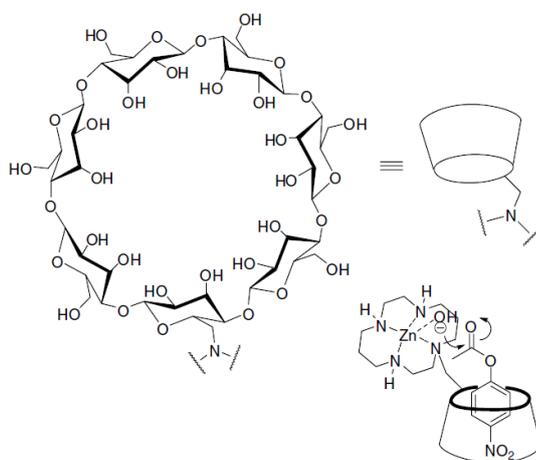


Figura 1.1: Struttura molecolare della β -ciclodestrina ed il corrispondente complesso binario con il *p*-Nitrofenilacetato.

Vi sono due assunzioni implicite alla base dell'affidabilità dei valori di EM calcolati: (a) la pK_a e la nucleofilicità dell'acqua rimangono invariate dopo il legame con il complesso metallico di Zinco (II) con il poliaza-macrociclo; (b) la reattività del substrato non varia in seguito alla complessazione.

Esempi recenti riguardanti questa metodologia possono essere ritrovati, ad esempio, nel lavoro di Rebek *et al.*^[10]. Il catalizzatore impiegato è un cavitando funzionalizzato con un complesso del tipo Zn-salene (Figura 1.2).

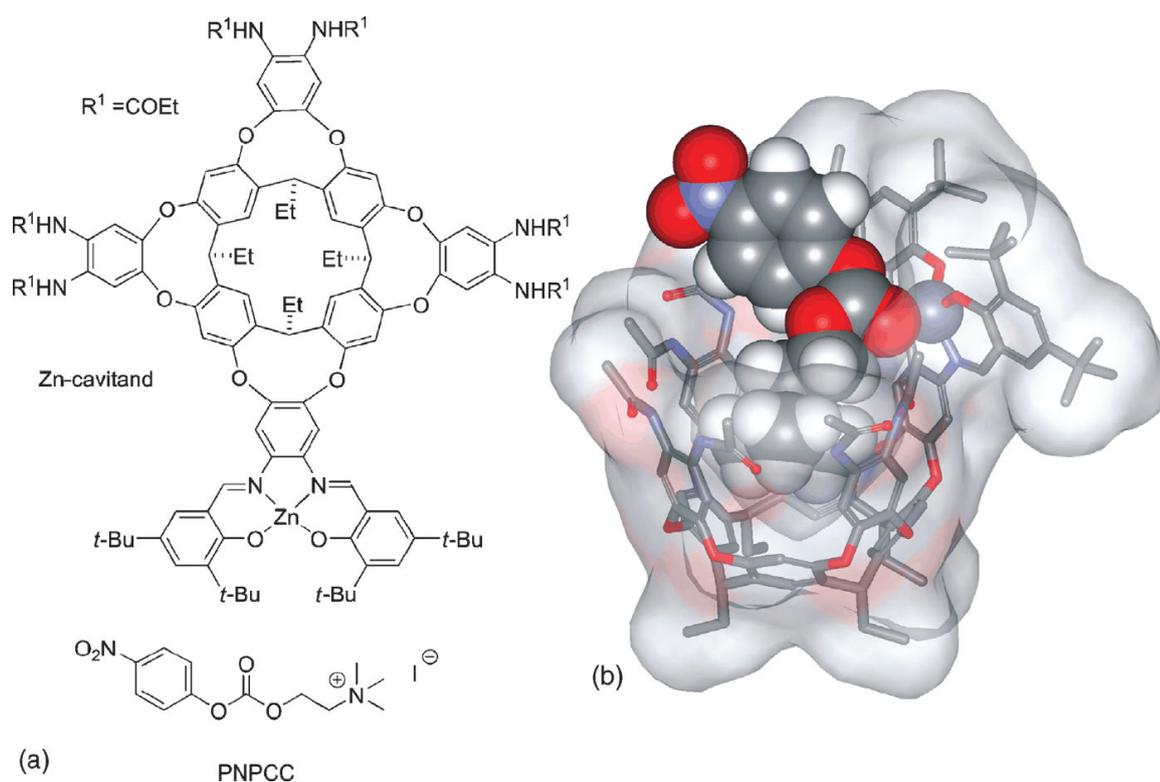


Figura 1.2: (a) Struttura molecolare del cavitando a base di zinco di Rebek e *p*-Nitrofenilcolina carbonato (PNPCC). (b) Struttura tridimensionale di minima energia del complesso attivato PNPCC*/Zn-cavitando: si osservi che le interazioni catione- π e C=O----Zn(II) avvengono simultaneamente.

Il cavitando adotta una conformazione a vaso stabilizzata da una “cerniera” di legami a idrogeno forniti da sei ammidi secondarie. La struttura del catalizzatore permette un lento scambio dinamico tra l'ospite (reattivo) libero e complessato, processo governato dal ripiegamento del cavitando medesimo.

Quando il reattivo utilizzato è il *p*-Nitrofenilcolina carbonato (PNPCC) lo zinco si comporta da acido di Lewis attivandone il gruppo carbonilico e rendendolo reattivo ai nucleofili esterni.

Studi cinetici hanno mostrato che l'idrolisi di PNPCC da parte dell'acqua presente nel Diclorometano commerciale tamponato con $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}/\text{EtN}(i\text{Pr})_2$ è catalizzata dalla presenza del cavitando suddetto. Nonostante la lentezza (30% di conversione in 5 ore), la conversione può essere accelerata di 50 volte aggiungendo un equivalente di cavitando.

Un altro esempio di catalizzatore supramolecolare in grado di orientare il substrato verso il centro reattivo è stato descritto da Crabtree e i suoi collaboratori (Figura 1.3)^[11].

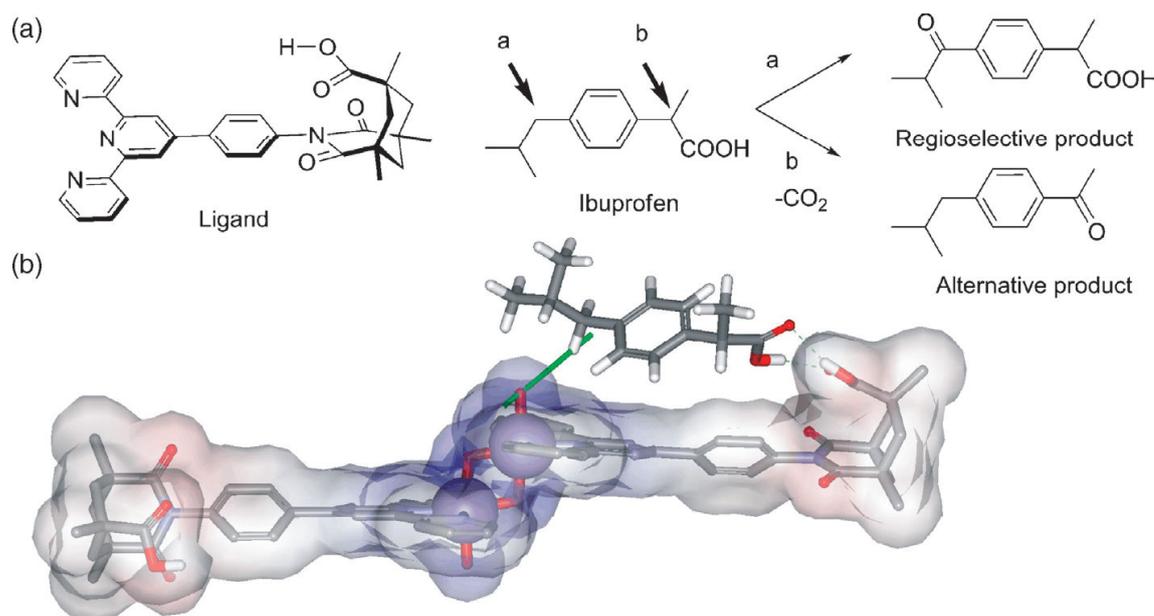


Figura 1.3: (a) Struttura molecolare del ligando di Crabtree e prodotti di ossidazione dell'Ibuprofene con il catalizzatore sintetico a base di di- μ -Oxo dimanganese. (b) Struttura tridimensionale di minima energia del catalizzatore supramolecolare in complesso con Ibuprofene.

Essi hanno combinato il riconoscimento molecolare tramite ponti a idrogeno e l'attivazione del legame C-H per ottenere una funzionalizzazione catalitica regioselettiva ad elevato *turnover* dei legami sp^3 lontani del gruppo di riconoscimento $-\text{COOH}$. Il catalizzatore contiene un *core* catalitico a base di di- μ -Oxo dimanganese e due identici ligandi simmetrici caratterizzati da un triacido di Kemp connesso ad un gruppo *tert*-piridinico mediante un *linker* fenilenico. Il triacido di Kemp possiede un noto ripiegamento ad U che orienta il gruppo $-\text{COOH}$ in maniera idonea al riconoscimento di un'ulteriore gruppo carbossilico.

Da studi di modellistica molecolare si è proposto una geometria del complesso con un substrato come l'Ibuprofene in cui i gruppi C-H di quest'ultimo (evidenziati in figura dalle frecce) dovrebbero trovarsi molto vicini al sito attivo e subire, quindi, ossidazione. Con un rapporto di 97.5:2.5 a favore del prodotto regioselettivo, i risultati sperimentali hanno

confermato tale ipotesi, evidenziando un incremento di 10 volte in regioselettività rispetto a un catalizzatore senza il gruppo $-\text{COOH}$. L'ossidazione di un acido carbossilico alchilico con il medesimo catalizzatore, ha permesso di ottenere non solo un'ossidazione regioselettiva, ma anche diastereoselettiva. Con rapporto dello 0.1% catalizzatore/substrato è stato rilevato un numero di *turnover* di 580 senza perdita di regioselettività.

Wärnmark *et al.*^[12] hanno descritto la formazione di un sistema catalitico supramolecolare dinamico caratterizzato da un complesso tra un salene-Mn(III) e una porfirina-Zn(II) tenuti assieme da ponti a idrogeno (Figura 1.4).

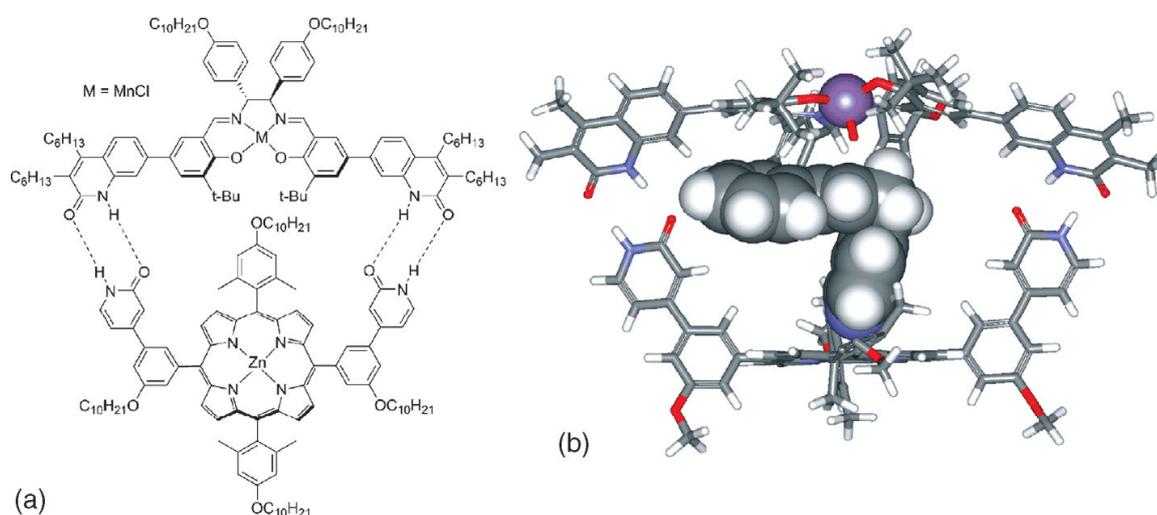


Figura 1.4: (a) Struttura molecolare dell'eterodimero supramolecolare usato da Wärnmark *et al.* e (b) rappresentazione della struttura tridimensionale di minima energia del complesso con il substrato. Le catene alchiliche sono ridotte a gruppi metilici per chiarezza.

La subunità salenica è il centro reattivo per l'eossidazione catalitica di olefine mentre la porfirina agisce da sito di *binding*. Il sistema non è in grado di distinguere tra addotti piridinici dello stirene e addotti fenilici. Gli autori hanno dimostrato, inoltre, che la catalisi procede parallelamente a carico di substrati legati e non tramite due distinte varianti del catalizzatore stesso.

In un lavoro legato al precedente, Nolte, Rowan *et al.*^[13] nel 2003 hanno descritto il complesso di un rotaxano in grado di mimare enzimi come le polimerasi in cui una reazione viene catalizzata più volte tenendo il polimero nascente strettamente legato. Il catalizzatore, costituito da una cavità di *binding* per il substrato e da un complesso porfirinico a base di Manganese (III) come centro catalitico, può ossidare alcheni complessati all'interno della cavità toroidale purché vi sia un ligando legato alla faccia esterna del toroide che attivi il nucleo porfirinico e che prevenga l'ossidazione all'esterno del rotaxano medesimo.

1.2.2 Recettori molecolari che promuovono la reazione di due substrati simultaneamente complessati

Il *design* di sistemi supramolecolari in grado di catalizzare reazioni bimolecolari è molto più arduo di quanto visto finora. Il catalizzatore, infatti, deve riconoscere entrambi i substrati, legarli saldamente e, soprattutto, deve orientarli in maniera efficace per la catalisi. Kirby^[2] ha coniato il termine di *matchmakers* per indicare i catalizzatori in grado di adempiere a queste funzioni. Inoltre, se il catalizzatore dimostra un'affinità maggiore per il prodotto di reazione che per i reagenti, sorge un ulteriore problema legato all'inibizione che ne scaturisce ed al conseguente, basso numero di *turnover*. In questi casi, pur non potendo parlare di catalisi in senso stretto (sarebbe richiesta una quantità equimolare di catalizzatore per una completa conversione), il "catalizzatore" funge comunque da accelerante per la reazione e ne può influenzare il risultato.

Sanders e collaboratori hanno disegnato e realizzato una serie di trimeri porfininici a base di Zinco (II) interessanti non solo perché in grado di accelerare una reazione tipo Diels-Alder di un diene piridin-sostituito e di un dienofilo, ma anche perché sono in grado di direzionare la stereochimica della reazione di cicloaddizione (Figura 1.5)^[14].

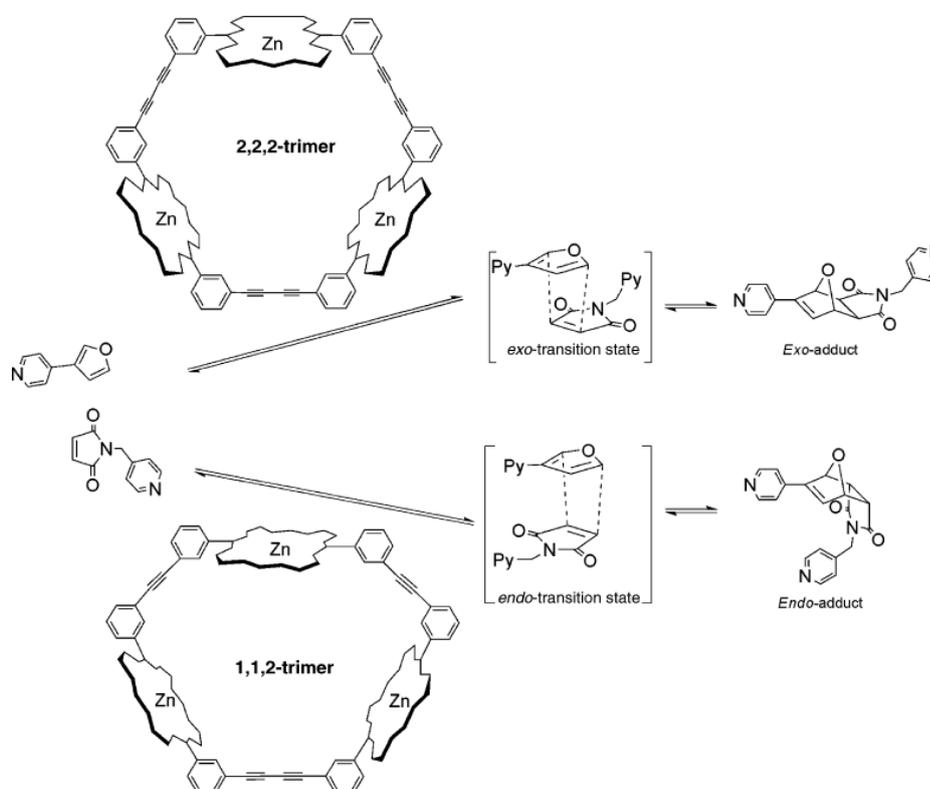


Figura 1.5: Stereochimica delle reazioni di Diels-Alder in presenza dei trimeri 2,2,2 e 1,1,2.

Il sistema ciclico può accomodare il diene ed il dienofilo all'interno della cavità tenendo i reagenti in stretto contatto ed abbassando, così, l'energia di attivazione. Il trimero 2,2,2-Porfirina, più largo, catalizza la formazione dell'addotto termodinamicamente favorito *eso* 1000 volte più velocemente dell'addotto *endo*. Quest'accelerazione corrisponde ad un valore di EM di 20 M, piuttosto alto per un sistema artificiale. In questo contesto è fondamentale il *binding* che è in grado di condurre la stereochimica di reazione verso il prodotto inatteso in quanto il prodotto *endo* sarebbe cineticamente favorito.

Il modello computazionale (Figura 1.6) mostra l'innesto perfetto dell'*eso*-addotto all'interno della cavità del 2,2,2-trimero.

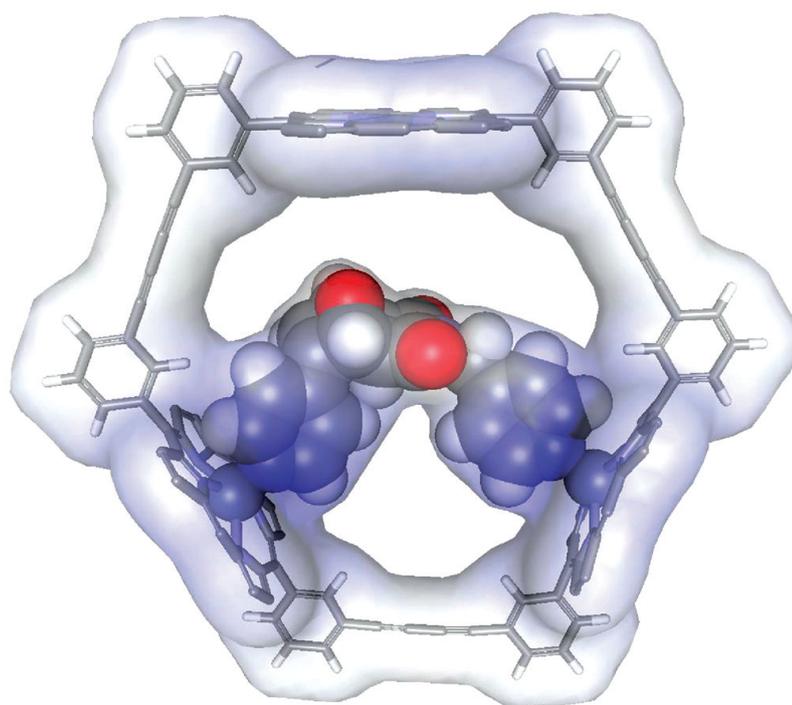


Figura 1.6: Struttura tridimensionale di minima energia del complesso fra l'*eso*-addotto ed il trimero 2,2,2-porfirinico (i sostituenti porfirinici sono stati omessi per chiarezza).

Daltrocanto, il trimero 1,1,2 mostra stereoselettività per l'*endo*-prodotto a 30°C che va via via perdendosi a temperature più elevate. La ragione di un tale comportamento può essere ricercata, da un lato, nell'intrinseca accelerazione (500 volte) che l'*endo*-addotto subisce, dall'altro, nella scarsa complementarità che a 30°C si osserva fra il trimero 1,1,2 e il prodotto *eso*. Infatti, data la maggiore flessibilità, il trimero 2,2,2 accoglie meglio lo stato di transizione che porta alla formazione del prodotto *eso*. Questo sistema catalitico ha trovato impiego anche in reazioni di trasferimento acilico^[15] ed in reazioni di tipo etero-Diels-Alder^[16].

Kelly e collaboratori hanno progettato un catalizzatore a due siti di *binding* in grado di accelerare una reazione S_N2 tra un'ammina alifatica primaria ed un alchilbromuro^[17]. Il costruito in questione (Figura 1.7) funge da stampo per i due reattivi che vi si legano mediante tre ponti a idrogeno a livello dei gruppi amminopiridonici.

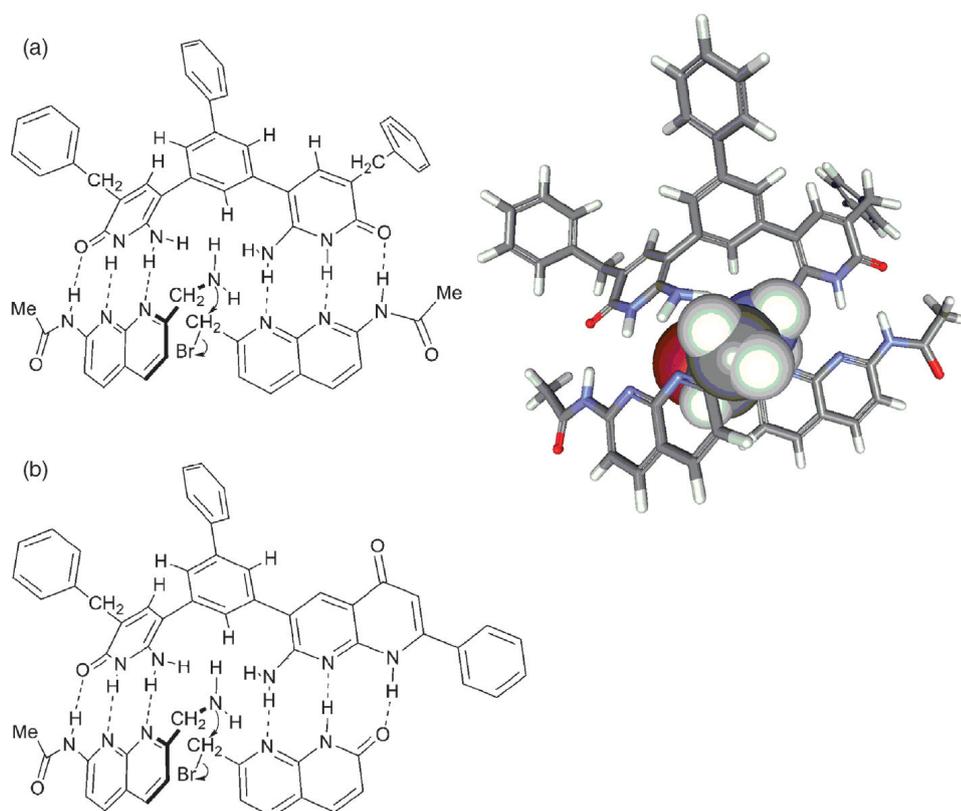


Figura 1.7: Rappresentazione della reazione nucleofila catalizzata dal costruito di Kelly; questa S_N2 avviene con motivi di riconoscimento catalizzatore-substrati simmetrici (a) o asimmetrici (b).

I reattivi scelti, Amminometil- e Brometilnaftilpiridina, si legano saldamente ($K > 10^4 \text{ M}^{-1}$) al catalizzatore e vanno incontro ad un'accelerazione di 6 volte per la S_N2 considerata. A causa della precipitazione del prodotto e del sale di bromo, il *turnover* non ha potuto essere dimostrato.

Una limitazione inevitabile del costruito di Kelly è l'identità dei due siti di *binding* con conseguente legame non produttivo di due identici substrati. Di conseguenza Kelly ha realizzato un nuovo recettore con due distinti *patterns* di *binding* che legassero selettivamente ciascuno dei due distinti substrati. Oltretutto, un ulteriore gruppo fenilico è stato introdotto nella molecola di catalizzatore per spingere il gruppo bromidrico verso il gruppo amminico. La velocità di reazione utilizzando questa variante del catalizzatore si è dimostrata essere doppia rispetto alla precedente evidenziando come la catalisi

supramolecolare possa condurre a sostanziali incrementi nelle velocità di reazione anche quando vi siano forti vincoli stereo-elettronici imposti da uno stato di transizione non lineare.

L'auto-replicazione è stato un obiettivo da sempre inseguito nella catalisi supramolecolare. Rebek *et al.* hanno descritto uno straordinario sistema auto-replicante caratterizzato da opportuni componenti tenuti assieme da legami a idrogeno e π -stacking^[18]. Queste interazioni coinvolgono, in un primo *step*, l'assemblaggio di un estere naftalenico ed un'ammina eterociclica (Figura 1.8).

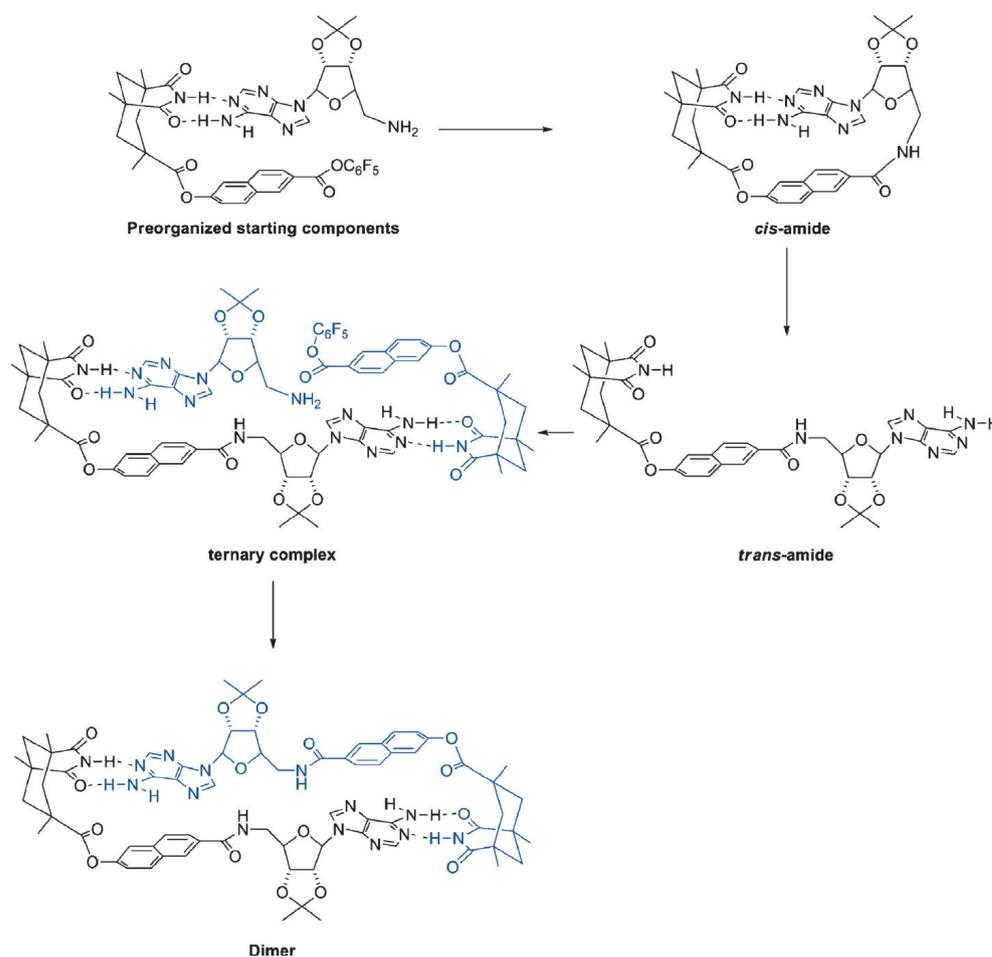


Figura 1.8: Il sistema auto-replicante di Rebek.

La *cis*-ammide risultante va incontro ad isomerizzazione verso il *trans*-isomero, meno teso. Questo composto può, dunque, legare nuovamente due substrati analoghi a quelli di partenza per formare un complesso ternario che, di nuovo, è pre-organizzato per effettuare un attacco nucleofilo al gruppo estereo per dare un dimero. L'unico inconveniente, a questo punto, è l'elevata stabilità del dimero che impedisce un nuovo ciclo di replicazione.

La catalisi di questo tipo è stata indotta anche per incapsulazione di molecole in cavità molecolari o recettori supramolecolari. In entrambi i casi la cavità dovrebbe essere larga a sufficienza per ospitare contemporaneamente i due substrati in modo da favorire la reazione tra di essi. D'altro canto, la catalisi non è solamente dovuta al *binding* che riduce l'entropia di attivazione, ma anche ad altri specifici meccanismi possono intervenire per favorire il processo. Ad esempio, la superficie interna della cavità potrebbe essere complementare allo stato di transizione e non allo stato fondamentale dei reattivi. In alcuni casi, l'incapsulazione dei reattivi determina un isolamento dal solvente eliminando il costo entalpico ed entropico della riorganizzazione di quest'ultimo attorno allo stato di transizione. Inoltre, l'incapsulazione può costituire un doppio vantaggio per la catalisi: da un lato può indurre tensioni nel recettore, dall'altro può indurre tensioni nei reattivi; tali tensioni, tendenzialmente, scompaiono in seguito alla reazione. Le tensioni possono essere regolate aggiustando le forze che tengono assieme il complesso recettoriale supramolecolare permettendo, ove possibile, di poter regolare la catalisi.

Uno dei primi studi di catalisi indotta per inclusione di reattivi in cavità molecolari viene dai lavori di Mock *et al.*^[19-21]. Gli autori hanno riportato che la cicloaddizione 1,3-dipolare intermolecolare tra un'azide ed un alchino, entrambi recanti un sostituito ammonico, viene notevolmente accelerata (10^5 volte \rightarrow EM= 1.6×10^4) e resa altamente regioselectiva in presenza di Cucurbit[6]uril (Figura 1.9).

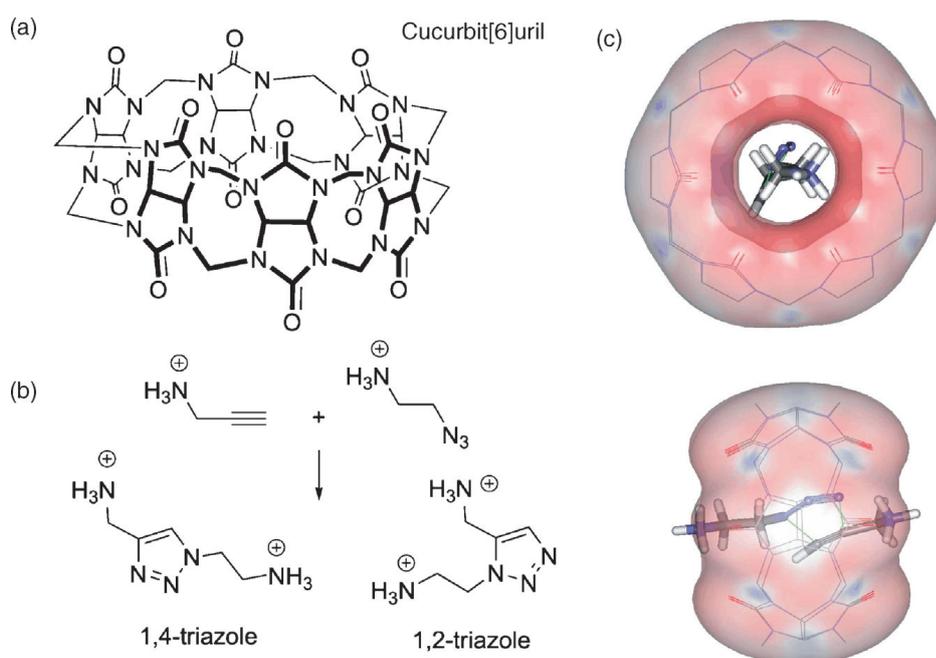


Figura 1.9: (a) Struttura del Cucurbit[6]uril; (b) Cicloaddizione 1,3-dipolare; (c) Reazione del complesso ternario con formazione di 1,4-triazolo.

Il volume della cavità di 164 \AA^3 fa sì che i reattivi si trovino ad una concentrazione di 10 M al suo interno e studi cinetici hanno mostrato comportamenti tipici quali saturazione del sistema, inibizione da substrato, lento rilascio del prodotto e, infine, presenza del complesso ternario attivato azide-alchino*Curcubit[6]urile. Il *binding* simultaneo dei due substrati mediante interazioni tra i gruppi ammoniacali ed i gruppi carbonilici (ed altri) all'interno della cavità fa sì che le porzioni reattive si vengano a trovare in una posizione geometricamente produttiva per la catalisi con la formazione esclusiva di un triazolo 1,4-sostituito. Gli autori hanno proposto che tale reazione avvenga non solo per riduzione dei vincoli entropici che consegue alla complessazione dei due reattivi, ma anche perché la geometria della cavità si adatta di più a quella dello stato di transizione piuttosto che a quella dei singoli reattivi. Nonostante ciò, recenti studi computazionali effettuati su questo sistema da parte di Maeras e Carlqvist^[22] hanno dimostrato che la *driving force* della catalisi è l'eliminazione del costo entropico che nasce dal mantenere i reattivi in un complesso ternario monomolecolare. Non è stato trovato alcun riscontro sulla stabilizzazione dello stato di transizione.

Analogamente, Rebek ha descritto un nuovo contenitore molecolare sintetico in grado di accelerare la reazione di cicloaddizione 1,3-dipolare tra un alchino e un'azide (Figura 1.10)^[23]. La capsula catalitica viene generata per dimerizzazione di due subunità di derivazione resorcinarenica e presenta una cavità approssimativamente cilindrica in grado di ospitare due differenti substrati aromatici. In particolare, per questa reazione sono stati scelti come substrati il Fenilacetilene e la Fenilazide. Questi ultimi si vengano a trovare con le porzioni reattive "faccia a faccia", mentre i sostituenti periferici aromatici interagiscono con il catalizzatore. In assenza della capsula i due reattivi reagiscono lentamente tra di loro per dare uguali quantità dei due regioisomeri. In presenza della cavità ($V = 450 \text{ \AA}^3$) i reattivi si vengano a trovare ad una concentrazione di 3.7 M e viene prodotto solamente l'isomero 1,4 in ragione anche del fatto che solo quest'ultimo riesce ad essere incapsulato. Assumendo l'ottenimento di una geometria produttiva e considerando la concentrazione locale, l'accelerazione ottenibile sarebbe di circa 240 volte corrispondente ad una EM di 120 M. Probabilmente, i reattivi nella capsula non sono posizionati secondo una geometria perfettamente adeguata allo stato di transizione e non ci sono ragioni per ritenere che quest'ultimo si leghi meglio dei reattivi stessi. Inoltre, ulteriori studi hanno dimostrato che il miglior ligando del complesso è il prodotto che gradualmente satura la capsula determinando inibizione del sistema.

Negli ultimi due esempi i valori calcolati di EM sono risultati maggiori della reale concentrazione dei reattivi incapsulati dimostrando come le capsule molecolari non si limitano ad accumulare substrati al loro interno, ma provvedono ad una corretta orientazione che prolunga il tempo d'interazione tra i reagenti stessi favorendo la catalisi^[24].

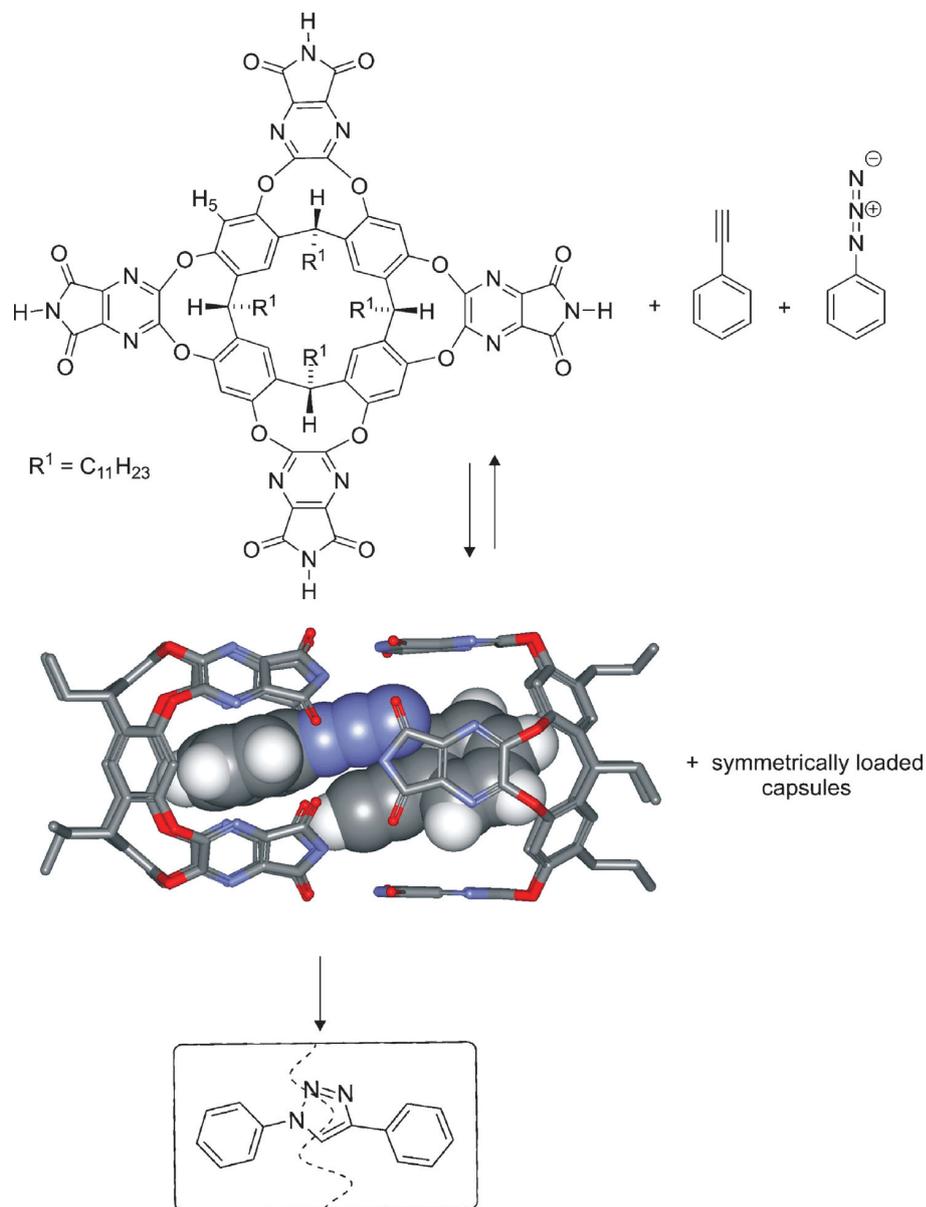


Figura 1.10: Rappresentazione della capsula di Rebek per la catalisi della cicloaddizione 1,3-dipolare tra un alchino e un'azide.

In netto contrasto con quanto visto per le cicloaddizioni 1,3-dipolari catalizzate da incapsulazione, i valori di EM calcolati per particolari reazioni di Diels-Alder ottenute con modelli come la *softball* di Rebek^[25] o il Ciclofano di Sanders^[26] sono più bassi della reale

concentrazione calcolata dai volumi delle cavità molecolari. Ciò è probabilmente in relazione ai più stringenti requisiti geometrici che le reazioni di Diels-Alder richiedono rispetto alle cicloaddizioni 1,3-dipolari trascorrendo un tempo significativamente più lungo alla ricerca della corretta orientazione.

Fujita *et al.*^[27] hanno usato una gabbia ottaedrica auto-assemblante di tipo $[M_6L_4]$ ($M=\{Pd^{II}(TMEDA)\}$, $L=\text{tris-(3-Piridil)triazina}$) per catalizzare ed imporre vincoli geometrici su reazioni di Diels-Alder a carico di antracene e maleimmide per ottenere una particolare regioselettività (Figura 1.11).

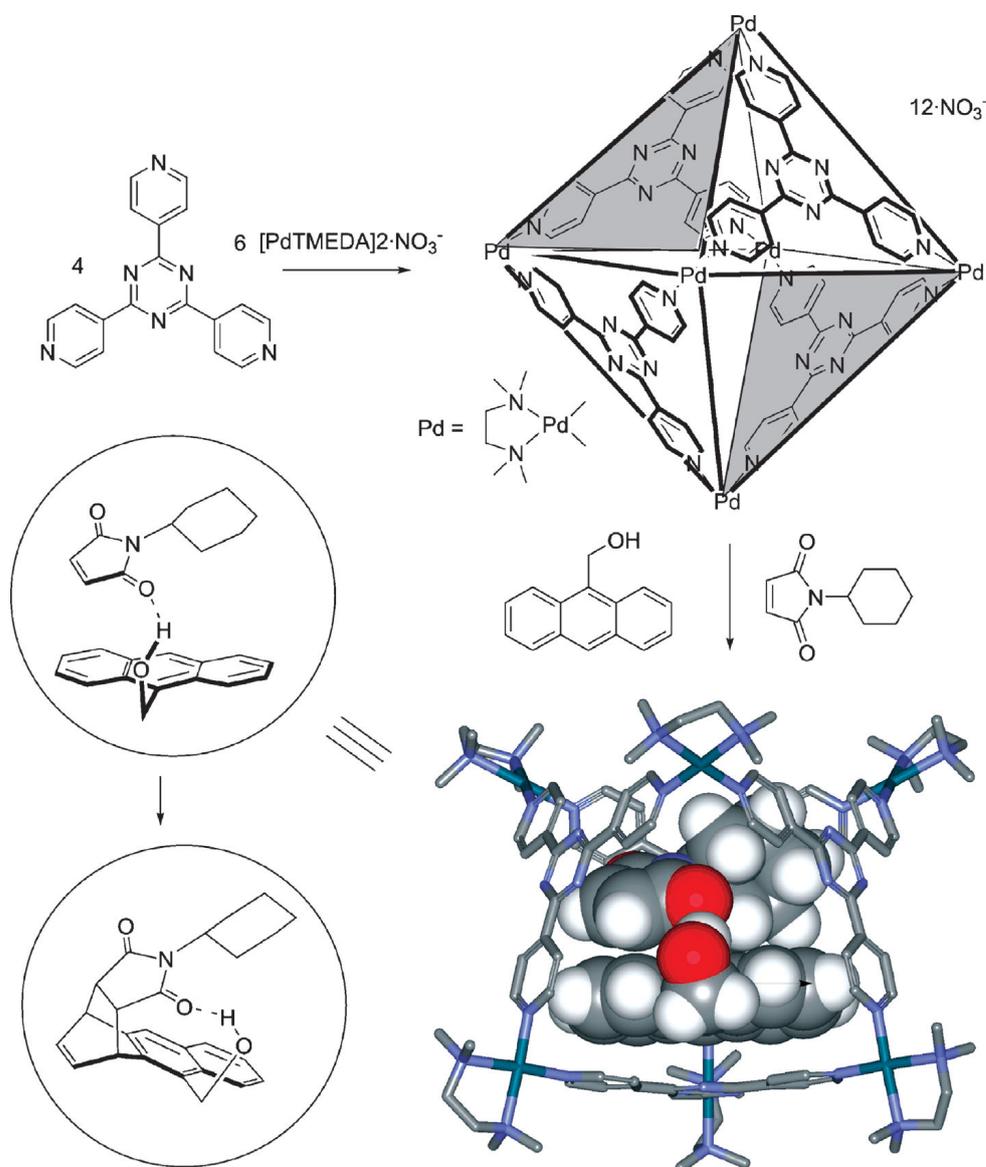


Figura 1.11: La gabbia auto-assemblante di Fujita preparata per semplice miscelazione di un ligando organico eso-tridentato con uno ione di Palladio (II) in rapporto 4:6. Viene mostrata la struttura tridimensionale di minima energia del complesso antracene-maleimmide*catalizzatore. Struttura del *syn*-1,4-isomero ottenuto dalla reazione.

Analogamente dalle cicloaddizioni vista sopra, nell'esempio di Fujita la *N*-Cicloesilmaleimide e diversi derivati antraceni adottano un'orientazione fissa nella capsula in maniera tale che la reazione possa avvenire solamente a carico delle posizioni 1 e 4 dell'antracene. Al contrario, in assenza del costrutto supramolecolare si otterrebbe un addotto in cui il ponte interessa le posizioni 9 e 10 dell'anello centrale in ragione di una maggiore densità elettronica π . In presenza della capsula tetraedrica la resa di reazione dopo 5 ore a 80°C era del 98% e solamente l'addotto *sin*-1,4 era stato formato; senza la capsula la resa scendeva al 44% e solamente l'addotto 9,10 veniva formato. Nonostante ciò, il sistema considerato non può essere definito propriamente catalitico in quanto il prodotto rimane legato alla capsula.

Raymond *et al.*^[28] hanno impiegato una struttura tetraedrica cava a base di ligandi per metalli (M_4L_6) non solo come *host* catalitico per diverse reazioni tra cui il riarrangiamento 3-aza di Cope di un catione allilico enammonico (Figura 1.12), ma anche per stabilizzare specie organiche altrimenti labili al suo interno^[29].

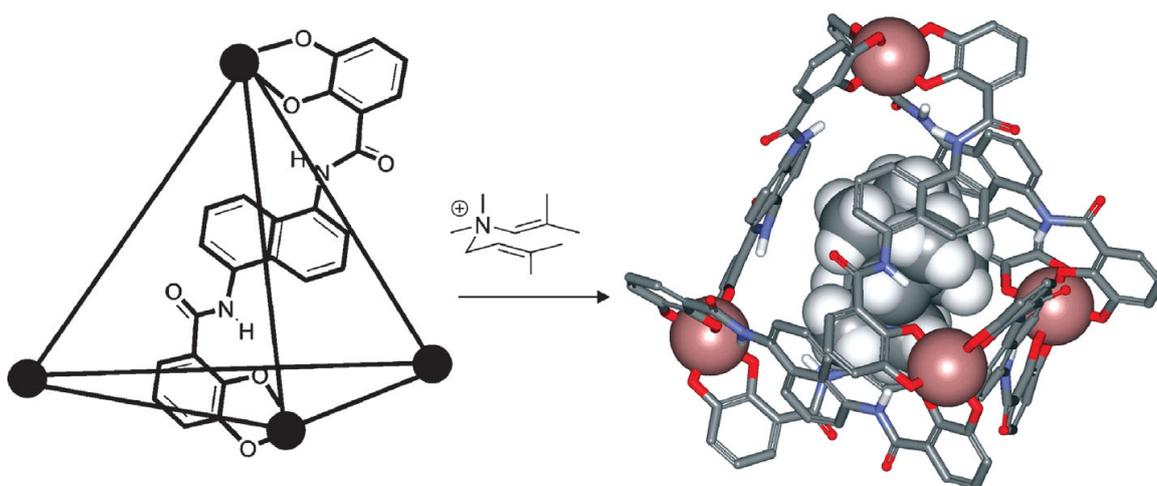


Figura 1.12: Rappresentazione schematica della gabbia M_4L_6 e struttura molecolare del substrato enammonico per la reazione 3-aza di Cope. Il complesso viene mostrato con la struttura tridimensionale di minima energia.

Il sistema descritto sopra ospita preferenzialmente specie cationiche in ragione della natura anionica della gabbia. Successivamente al *binding* si è osservata accelerazione nel riarrangiamento per tutti i substrati studiati in ragione di una riduzione delle barriere entropica ed entalpica. Diversamente dagli esempi precedenti, questo sistema agisce come un vero catalizzatore in quanto il rilascio del prodotto permette il *turnover*.

1.2.3 Preparazione del backbone catalitico mediante interazioni supramolecolari

Nei primi esempi di catalisi supramolecolare, veniva sfruttata una gamma vastissima d'interazioni non covalenti e reversibili come le interazioni elettrostatiche, i ponti a idrogeno, π -stacking, forze di Van der Waals ed interazioni idrofobiche per assemblare complessi molecolari tra i substrati e i catalizzatori. Questi ultimi erano macromolecole in quanto tali oppure complessi metallici della medesima molecola che, in ogni caso, annoveravano in una singola unità covalente tutti i motivi necessari al *binding* e alla catalisi.

Un approccio completamente diverso per ottenere catalisi tramite strategie supramolecolari è emerso negli ultimi anni. Le interazioni non covalenti descritte sopra possono essere impiegate per assemblare una moltitudine di catalizzatori supramolecolari costituiti da molecole diverse ciascuna delle quale può contenere uno o più gruppi funzionali richiesti dalla catalisi ed i *patterns* di riconoscimento per l'assemblaggio. Questo approccio ha reso possibile l'ottenimento di vaste librerie di ligandi supramolecolari con una sorprendente facilità rispetto alla classica chimica covalente in quanto il sistema catalitico si auto-assembla.

I primi esempi in questo senso ci vengono dal lavoro di Breit e collaboratori^[30] che hanno descritto la generazione *in situ* di una libreria di ligandi bidentati dalla coppia tautomeria 2-Piridone/2-Idrossipiridina. La dimerizzazione è guidata dai ponti a idrogeno che si formano ed è favorita in solventi aprotici. In aggiunta quando i monomeri contengono un gruppo elettron-donatore di fosforo (PPh₂), che può coordinare un centro metallico, la formazione del legante bidentato è favorita anche dalla chelazione (Figura 1.13). Questo sistema è stato impiegato per ottenere un catalizzatore a base di rodio per l'idroformilazione di differenti olefine terminali, compresi areni, alcoli, aldeidi, acetali, ammidi, esteri, eteri e carbammati. Il catalizzatore medesimo è stato generato per auto-assemblaggio dei tautomeri del 6-(Difenilfosfino)piridin-2(1H)one (6-DPPone) ed un precursore di rodio. Da notare che le reazioni sono state condotte a temperatura ambiente e a pressione atmosferica per ottenere aldeidi lineari in buona resa e con alta regioselettività^[31, 32]. Si osservi che le proprietà catalitiche del centro metallico sono conseguenza della struttura supramolecolare *in toto*. Infatti, studi di complessazione del 6-DDPone con altri ligandi hanno dimostrato la formazione di altri complessi polinucleari meno attivi in relazione alla natura dei co-ligandi e delle condizioni di complessazione^[33].

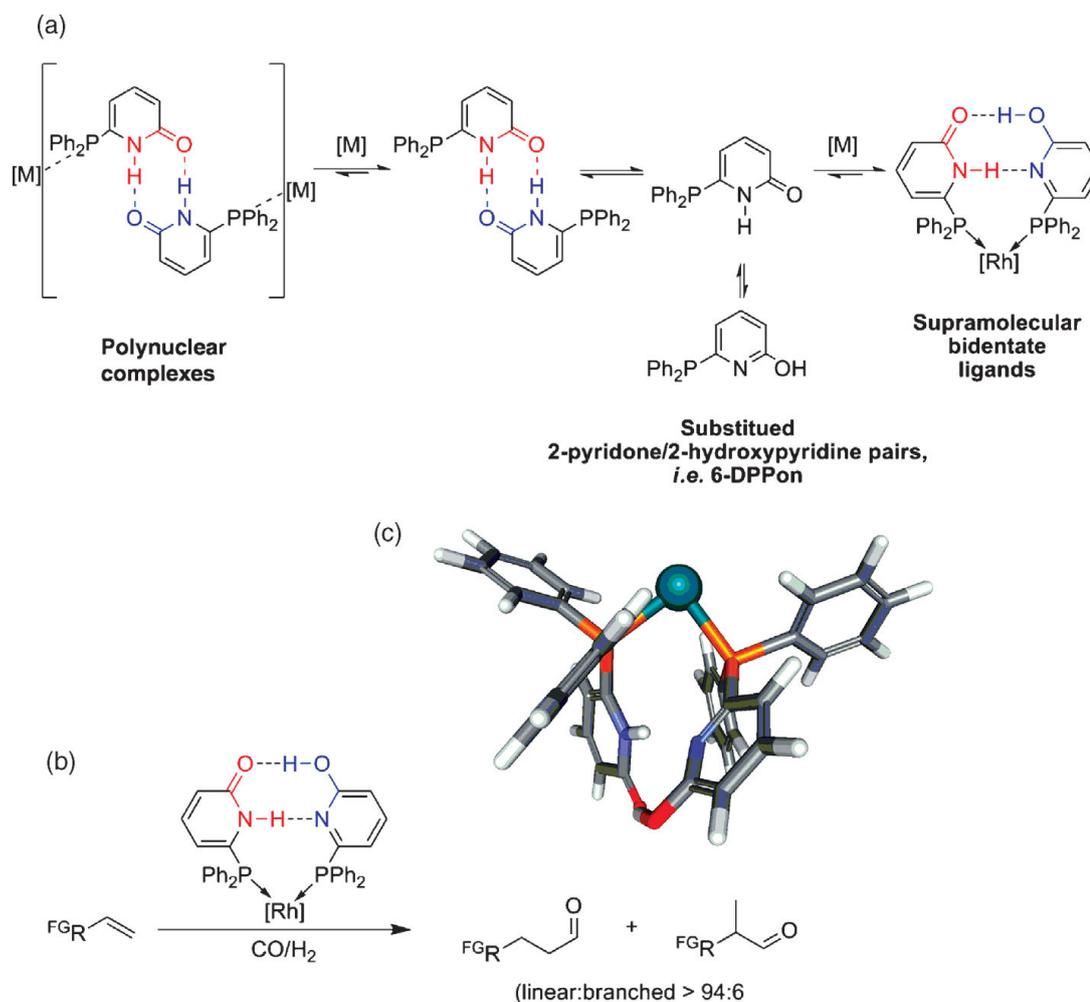


Figura 1.13: Generazione del catalizzatore supramolecolare a base di rodio per assemblaggio dei tautomeri piridina/idrossipiridone. (a) Modalità di auto-assemblaggio delle fosfine piridiniche. (b) Reazione di idroformilazione a carico di un alchene con il sistema in esame. (c) Struttura tridimensionale di minima energia del complesso.

Lo sviluppo di nuovi catalizzatori chirali altamente selettivi è una sfida sempre aperta. Breit e collaboratori hanno esteso la strategia supramolecolare vista sopra per ottenere dei derivati chirali asimmetrici bis-fosfo-sostituiti^[34]. Hanno anche ottenuto una libreria di ligandi chelanti eterodimerici basata sulla coppia Adenina-Timina (A-T), ben nota per essere (assieme a Guanina-Citosina) uno degli esempi più eclatanti nei sistemi viventi di sistema auto-assemblante^[35, 36]. I tautomeri impiegati nel lavoro precedente non permettevano di ottenere un sistema eterodimerico ben definito poiché l'unione di due differenti piridoni sostituiti avrebbe portato a una miscela statistica di dimeri omo- ed eterodimerici. Perciò, amminopiridina ed isochinolone sostituiti con fosfo-gruppi chirali (fosfino o fosfonite) sono stati impiegati come analoghi dell'Adenina e della Timina sfruttandone la definita modalità di assemblaggio (Figura 1.14).

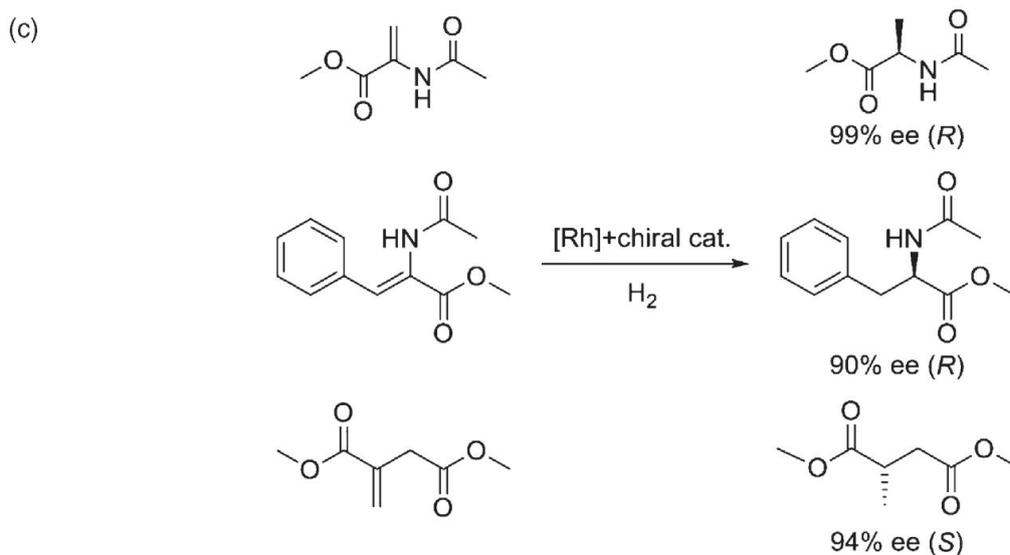
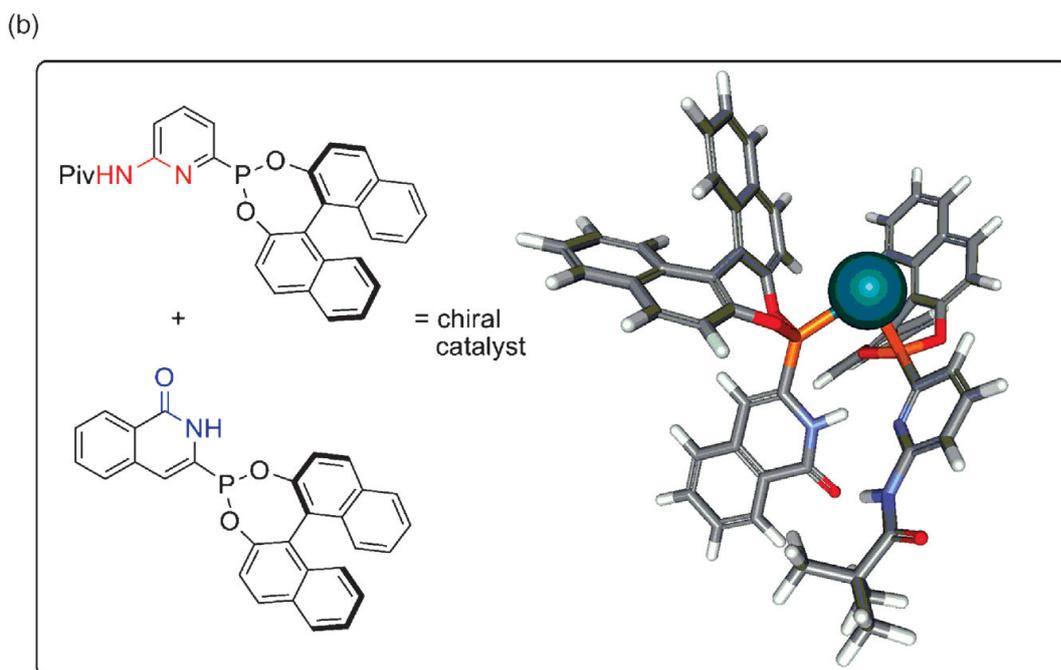
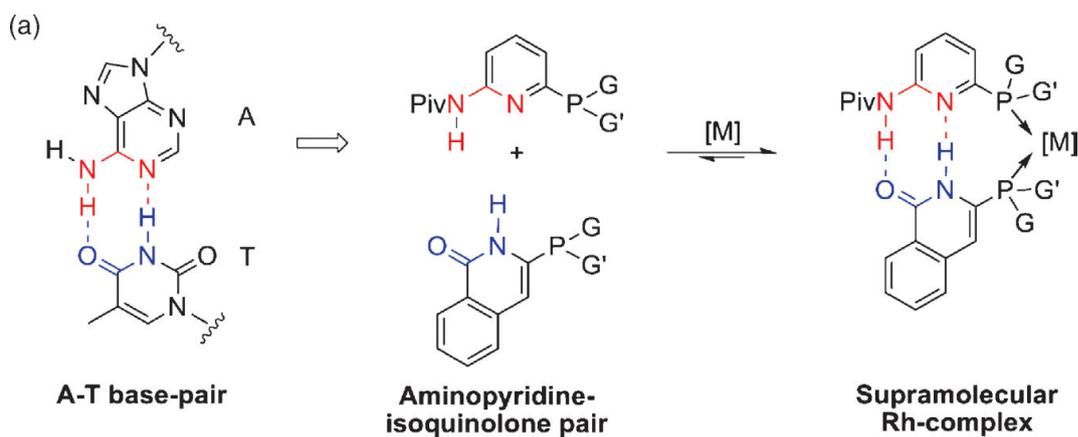


Figura 1.14: Generazione del catalizzatore supramolecolare asimmetrico. (a) Assemblaggio dei ligandi chelanti eterodimerici. (b) Struttura tridimensionale di minima energia del complesso rodio-fosfonite per l'idrogenazione asimmetrica. (c) Idrogenazione enantioselettiva di alcheni funzionalizzati.

I complessi di rodio risultanti sono stati testati nell'idrogenazione asimmetrica di olefine funzionalizzate ottenendo notevoli eccessi enantiomerici (fino al 99%) per composti come derivati dell'acido acrilico sostituito, l'Acido cinnamico e l'Acido itaconico.

Gli sviluppi della catalisi supramolecolare non sono limitati solamente all'utilizzo di metalli di transizione. Clarke e collaboratori hanno descritto la preparazione di una libreria di organocatalizzatori con relativo impiego in addizioni asimmetriche di Michael di chetoni a nitroalcheni^[37]. In particolare, essi hanno proposto l'uso di un catalizzatore formato da legami a idrogeno complementari tra una prima unità, contenente una funzione prolinica responsabile dell'enantioselettività, ed una seconda unità impiegata per ragioni steriche di influenza sul sito catalitico (Figura 1.15).

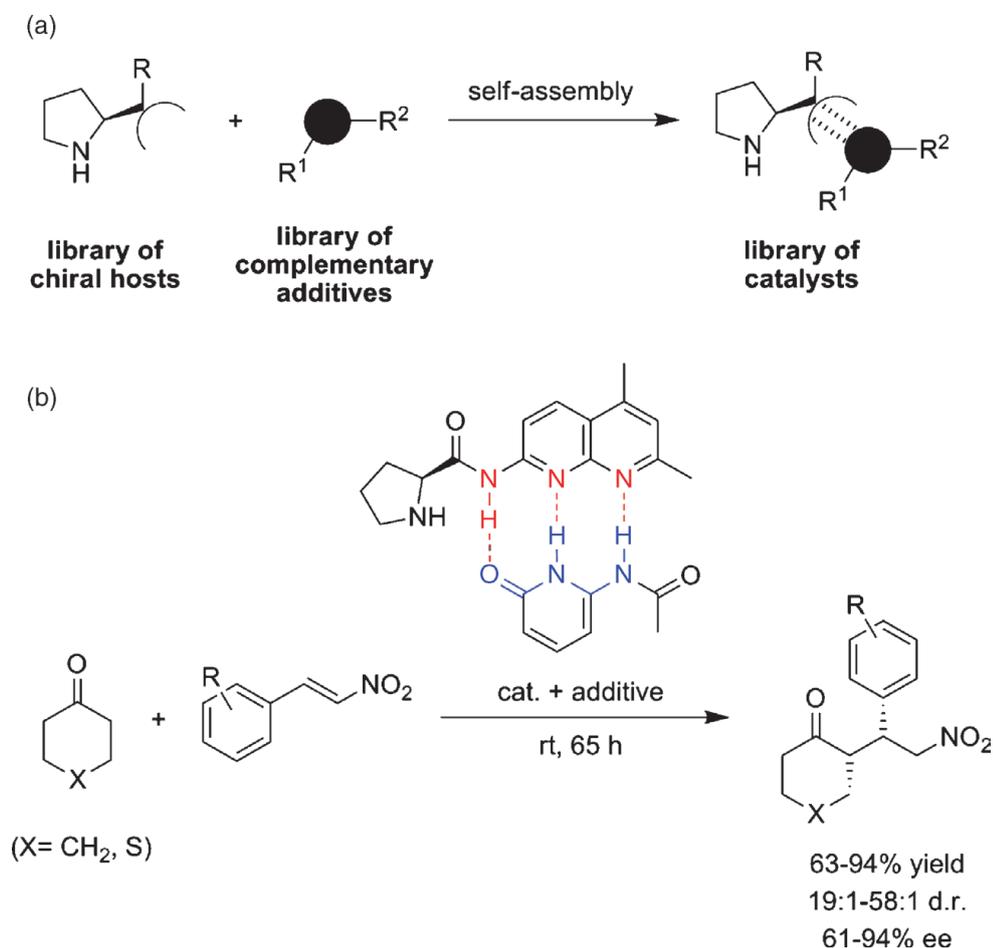


Figura 1.15: Il sistema catalitico proposto da Clarke. (a) Modalità di ottenimento della libreria di catalizzatori. (b) Reazione nitro-Michael asimmetrica.

Poiché le amidonaftiridine ed i piridoni erano noti per i loro *pattern* di riconoscimento altamente specifici, sono stati scelti come le unità complementari del sistema per ottenere

l'auto-assemblaggio mediato da ponti-idrogeno. E' stato osservato che qualsiasi catalizzatore risultante dalla combinazione di un'unità chirale ed un'unità achirale è più efficace del semplice catalizzatore a base prolinica in termini di diastereoselettività ed enantioselettività attestandosi come il miglior sistema per le reazioni di Michael fra chetoni esaciclici e nitroalcheni.

Analogamente a quanto visto per i ponti a idrogeno, anche l'auto-assemblaggio mediato da metalli è una strategia che è stata impiegata. Reek, van Leeuwen e collaboratori piuttosto di disegnare due *building blocks* complementari in grado di auto-assemblarsi hanno descritto, in un lavoro pionieristico del 2003^[38], un'elegante strategia per generare catalizzatori supramolecolari in cui le unità costituenti la struttura finale sono assemblate attorno ad una molecola template (Figura 1.6).

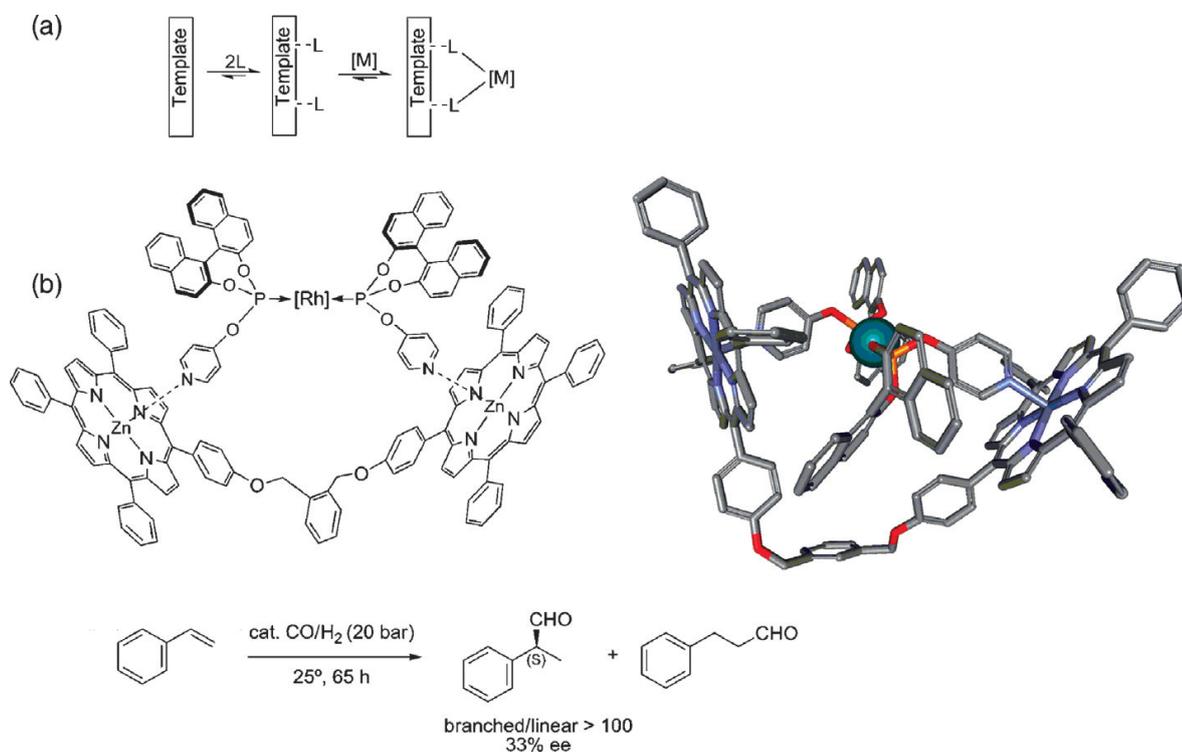


Figura 1.16: Il catalizzatore auto-assemblante al rodio sviluppato da Reek e van Leeuwen. (a) Rappresentazione schematica del processo di auto-assemblaggio. (b) Idroformilazione dello stirene con il catalizzatore in esame.

Il bisfosfito indicato in figura 1.16 è stato generato per legame di due unità piridin-fosfito su un template di bis-Zn(II)-porfirina. La preferenza di quest'ultimo per il gruppo piridinico elettron-donatore è stata fondamentale per la geometria dell'assemblaggio che ha

permesso di avere due gruppi fosfito liberi da impiegare, assieme al rodio, nell'idroformilazione catalitica di 1-Ottene e Stirene.

Con 1-Ottene il complesso supramolecolare mostrato mostra un'attività leggermente inferiore rispetto a quella osservata con il ligando monodentato, ma d'altro canto è molto più selettivo nel dare un prodotto lineare piuttosto che ramificato, confermando la natura di bidentata di ligando. In termini di enantioselettività, poi, pur avendo ottenuto risultati mediocri con l'idroformilazione dello Stirene (33% ee), questi sono stati comunque migliori di quelli ottenuti con il costruito monomero.

1.3 Bio-macromolecole artificiali per catalisi asimmetrica

Agli albori della catalisi asimmetrica, Whitesides escogitò un sistema catalitico supramolecolare basato sulla generazione di un enzima artificiale per incorporazione di una molecola contenente un metallo all'interno di una proteina^[39]. In questa mutazione proteica, Whitesides sfruttò un fortissimo legame non covalente tra una proteina, l'Avidina, ed una piccola molecola, la Biotina. Funzionalizzando quest'ultima con Rodio difosfina ottenne un nucleo metallico con elevata affinità per la proteina ($K \approx 10^{15} \text{ M}^{-1}$) ed inserito nell'ambiente chirale di quest'ultima. In questo modo è stato creato un enzima artificiale per l'idrogenazione asimmetrica degli alcheni. In particolare, Whitesides e collaboratori hanno dimostrato che l'idrogenazione di *N*-Acetammidoacrilato con il suddetto metallo enzima fornisce (*S*)-*N*-Acetammidoalanina in eccesso enantiomerico del 41% e con una totale conversione (Figura 1.17).

Per 20 anni questo approccio è stato ignorato finché nel 1999, Chan e collaboratori lo hanno riscoperto impiegando una difosfina chirale legata alla Biotina per studiare le proprietà catalitiche del complesso risultante nell'idrogenazione dell'Acido itaconico^[40]. Gli acidi metilsuccinici possono essere preparati con questa strategia a fronte di una modesta enantioselettività.

Ward e collaboratori hanno, invece, ottenuto un risultato straordinario nella stereoselettività dell'idrogenazione catalizzata da metallo-enzima utilizzando derivati dell'acetammidoacrilato e combinando la difosfina biotinilata con la variante Steptavidina (WT Sav) anziché la proteina modello Avidina (Figura 1.17)^[41]. Le rese si sono dimostrate quantitative e la stereoselettività ha raggiunto valori mai visti prima (94%) spingendo il gruppo di ricerca a sviluppare con successo anche una trans-idrogenasi artificiale^[42].

Feringa e collaboratori hanno sviluppato un sistema catalitico simile basato, questa volta, sul DNA, come bio-macromolecola in grado di fornire un ambiente chirale, e su un complesso di Rame (II) modificato con 9-Amminoacridina come nucleo metallico catalitico affine per il DNA. Il sistema ibrido così generato è in grado di catalizzare una reazione asimmetrica di Diels-Alder a carico del Ciclopentadiene con un dienofilo che si lega al nucleo di rame fornendo prodotti con diastereoselettività *endo-eso* (91:9) ed enantioselettività (90%) elevate^[43].

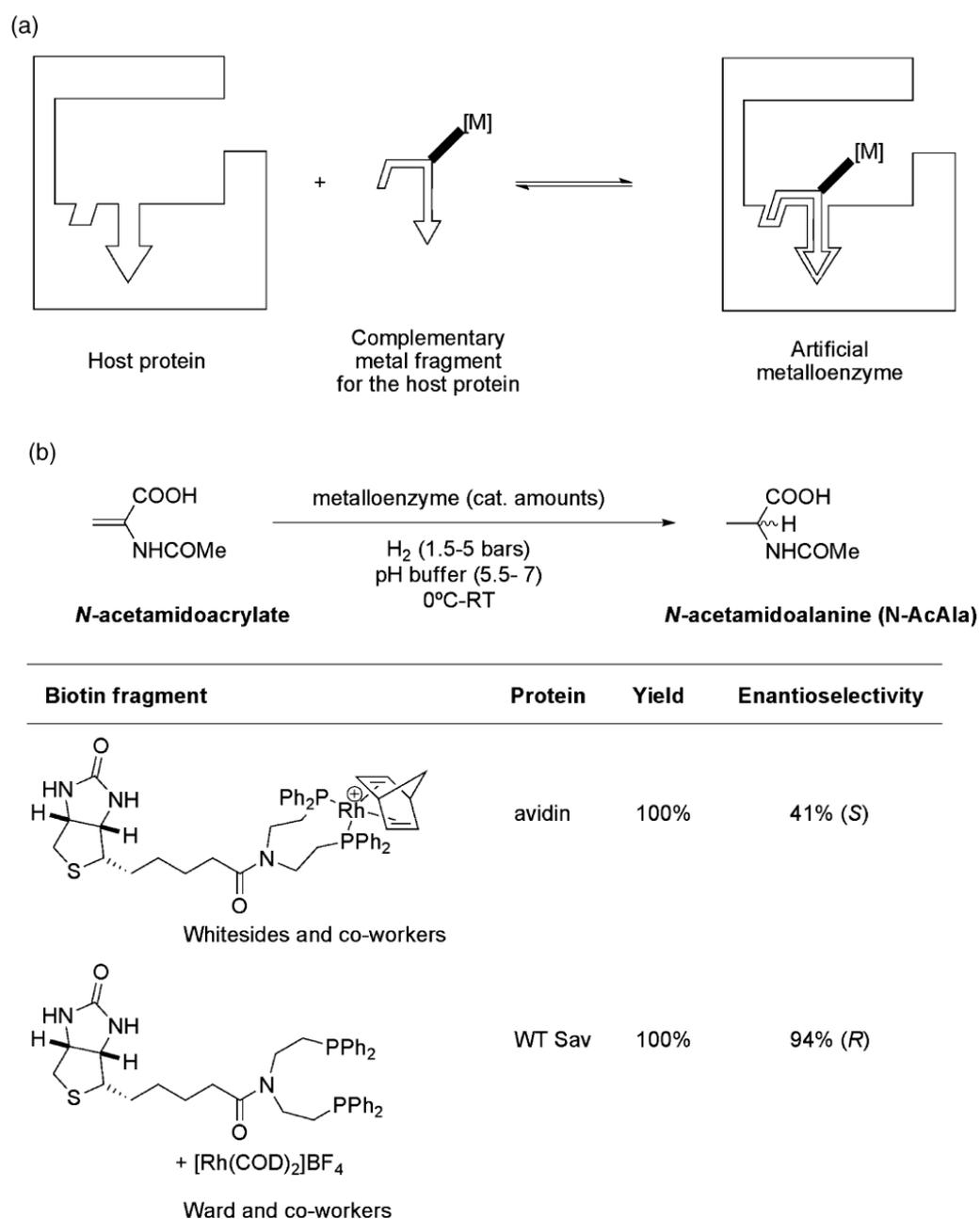


Figura 1.17: Metalloenzimi artificiali. (a) Strategia d'incorporazione di un nucleo metallico catalitico in una proteina. (b) Idrogenazione di un alchene basata sul sistema artificiale Biotina-(Strept)Avidina.

1.4 Nanoparticelle e peptidi nella catalisi supramolecolare

Nei primi anni '80, accanto alle classiche strategie di organo-catalisi, si affiancò un nuovo approccio basato sulla catalisi peptidica. Per cui, da un lato si estese il repertorio delle reazioni chimiche che potevano essere effettuate senza però, d'altro canto, perdere i vantaggi provenienti dall'utilizzo di piccole molecole. Data la diversità strutturale, il costo accessibile ed un'intrinseca modularità, i peptidi rappresentano una piattaforma catalitica versatile e relativamente semplice, specialmente nelle trasformazioni asimmetriche. Ad oggi, queste versioni minimaliste di enzimi possono essere trovate in diversi tipi di trasformazioni quali addizioni aldoliche, reazioni di trasferimento, ossidazioni e reazioni Morita-Baylis-Hillman^[44].

Nonostante ciò, l'efficienza globale di sistemi catalitici come questi non può essere paragonata a quella dei loro analoghi naturali. Una ragione possibile di questa disparità può essere legata alla minore complessità strutturale di questi rispetto alle articolate strutture che si ritrovano negli enzimi naturali. In questi ultimi, molti siti, anche lontani dal centro catalitico, possono giocare diversi ruoli importanti nel contesto della catalisi rendendo questa relazione finemente regolata fra la struttura e la funzione la chiave dell'efficienza degli enzimi^[45]. I complessi macromolecolari descritti sopra, possiedono dimensioni paragonabili a quelle di piccoli enzimi e sono in grado, come già detto, di mimare singole, particolari caratteristiche degli enzimi, come strutture cave, architetture asimmetriche ed effetti allosterici^[46]; tuttavia non sono in grado di combinare queste peculiarità in un unico *scaffold* molecolare.

Una soluzione a questo problema può essere offerta dal sempre crescente campo delle nanotecnologie dal quale, in particolare, le nanoparticelle sono emerse come un *hot spot* di fervido interesse. In ragione delle loro forma, delle loro proprietà dipendenti dalle dimensioni, dell'alta stabilità chimica e della facilità di funzionalizzazione della superficie, le nanoparticelle hanno trovato un vasto campo di applicazioni, dai dispositivi elettronici ai sensori, passando per la diagnostica, il *drug delivery* e la catalisi^[47]. L'approfondimento delle relazioni esistenti fra nanoparticelle e peptidi è ancora agli albori, ma l'interesse suscitato negli ultimi anni è stato notevole non solo nei campi sopra citati, ma anche nella sintesi stessa delle nanoparticelle^[48].

Uno dei primi esempi che hanno dimostrato la potenzialità delle nanoparticelle come sistemi catalitici unitamente a porzioni amminoacidiche è stato presentato nel 2000 da Frigeri e collaboratori^[49]. Essi hanno dimostrato come un nucleo metil-imidazolico

(reminescente un residuo istidinico) unito ad un *core* nanoparticellare d'oro sia in grado di idrolizzare 2,4-Dinitrofenilacetato ad una velocità 10 volte superiore rispetto al composto di riferimento 2-Metilistamina e con un'efficienza altrettanto superiore rispetto ad un sistema micellare di riferimento (Figura 1.18).

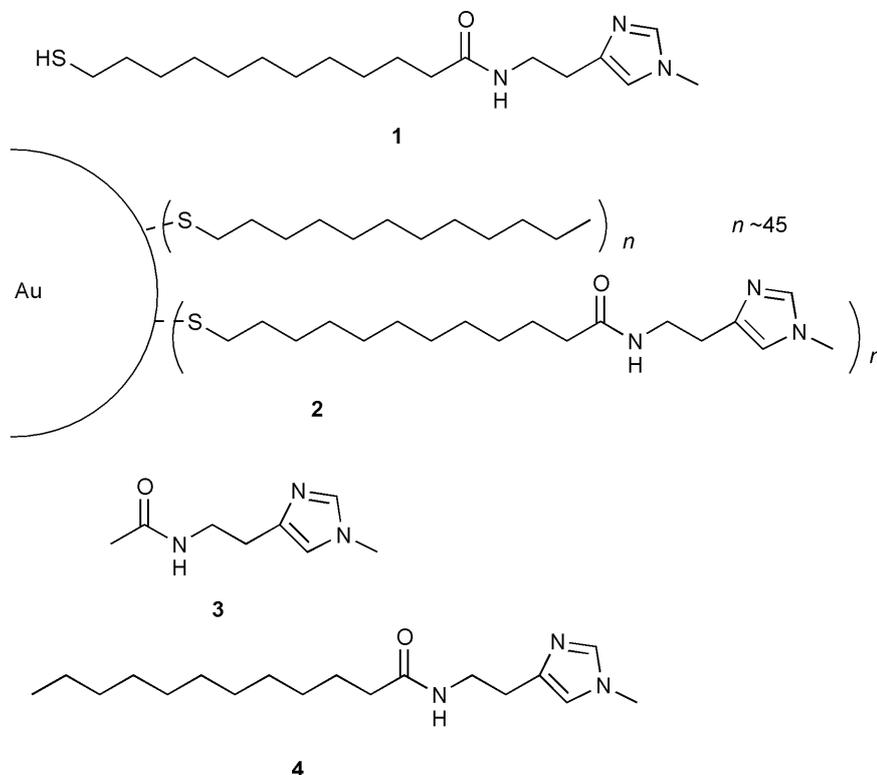


Figura 1.18: I diversi composti del sistema di Frigeri e collaboratori. (1) Tiolo metilistidinico; (2) Schema della nanoparticella impiegata come catalizzatore; (3) Composto di riferimento 2-Metilistamina; (4) Dodecanoil-*N*-metilistamina come *building block* del sistema micellare utilizzato come confronto.

Il sistema catalitico presentato non solo procede in condizioni di *turnover*, ma mostra cooperatività fra i residui metilimidazolici incrementando ulteriormente le analogie con i sistemi enzimatici naturali. I risultati di questo lavoro, pertanto, sono stati tra i primi a sottolineare le potenzialità delle nanoparticelle come sistemi catalitici facendone una valida alternativa a sistemi analoghi quali micelle e dendrimeri in relazione ad una maggiore semplicità di sintesi, manipolazione e ad una maggiore inerzia alle condizioni d'impiego.

Scrimin e collaboratori hanno sviluppato un interessante sistema catalitico nanoenzimatico in grado di mimare l'attività di una *trans*-fosforilasi^[50]. Un *core* nanoparticellare d'oro è stato funzionalizzato con tioli recanti in posizione Ω un gruppo Triazaciclononano. Tale gruppo viene attivato da uno ione Zinco (II) ed è in grado di catalizzare l'idrolisi e la ciclizzazione del substrato 2-Idrossipropil *p*-nitrofenil fosfato (HPNP), un analogo dell'RNA (Figura 1.19).

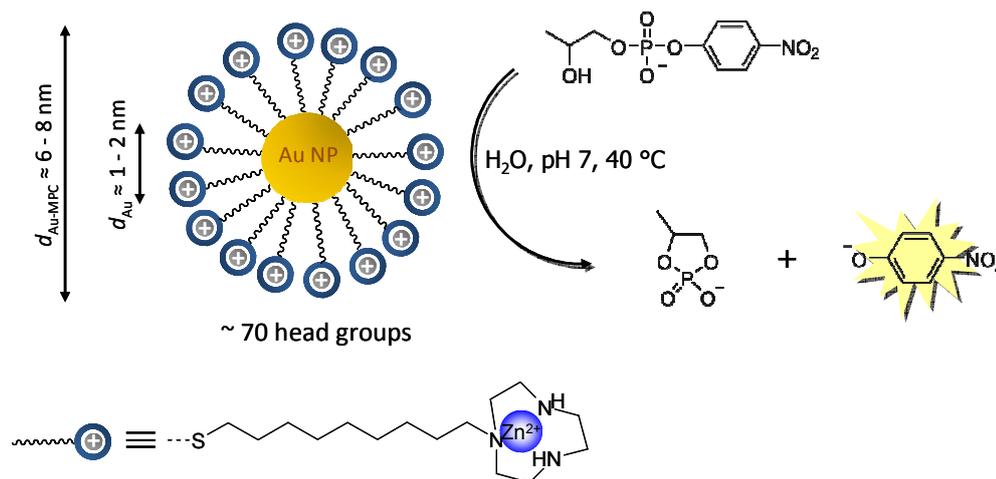


Figura 1.19: Il sistema nano-enzimatico a carattere trans-fosforilasi ideato da Scrimin e collaboratori.

Questo lavoro è sorprendente non solo per il carattere catalitico intrinseco, ma perché somma tre caratteristiche degli enzimi: agisce su un substrato potenzialmente naturale; la sua azione è regolabile in funzione dello zinco aggiunto (il sistema è inerte senza lo ione); il sito catalitico si genera per cooperazione di due gruppi triazaciclononano adiacenti.

Recentemente Wennemers e collaboratori hanno dimostrato come, accanto alla nucleazione, anche le dimensioni di nanoparticelle d'argento possono essere definite molto efficientemente dall'uso di peptidi elicoidali conformazionalmente stabili. Una rigida ossatura di oligoproline che presenta una funzione aldeidica ogni tre residui, agisce da "righello molecolare" con i gruppi aldeidici come riducenti per Ag^+ e, al contempo come regolatori delle dimensioni delle nanoparticelle nascenti (Figura 1.20)^[51].

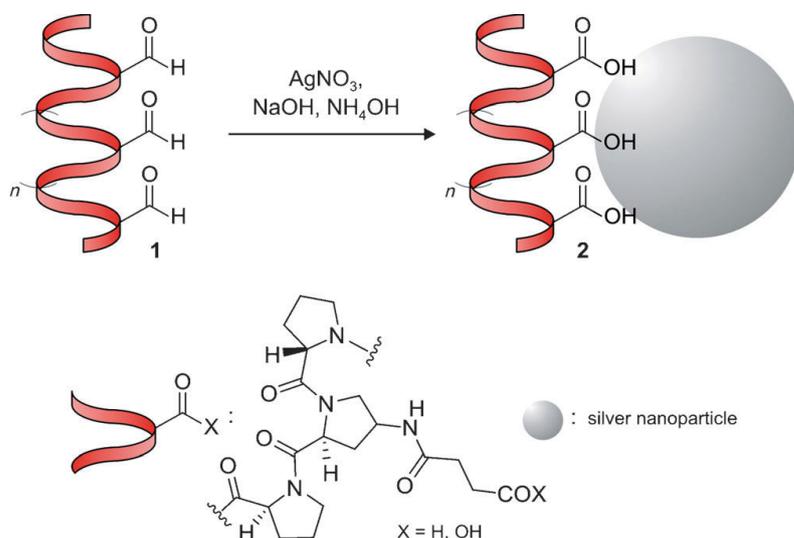


Figura 1.20: Formazione dimensionalmente controllata da peptidi di nanoparticelle d'argento.

Poiché il diametro delle nanoparticelle così ottenute è in stretta relazione con la lunghezza del peptide, è stato possibile concludere che questi “additivi” sono in grado di controllare le dimensioni delle nanoparticelle medesime per trasferimento delle proprie proporzioni molecolari.

1.5 Introduzione al progetto di Dottorato

Gli esempi citati sopra, per quanto eleganti ed efficaci, di fatto non riescono a dimostrare di aver nettamente superato i limiti della catalisi supramolecolare “classica”. Infatti, l’eccessiva omogeneità chimica della struttura derivante intrinsecamente dal processo di auto-assemblaggio dei tioli rimane un problema analogo all’eccessiva semplicità dei modelli non nano-derivati^[52]. Tentativi di variegare la superficie delle nanoparticelle con tioli diversi mediante processi di *clusterizzazione* si sono dimostrati di difficile approccio; infatti, poiché la sintesi rimane basata sull’auto-assemblaggio, la composizione finale del sistema risulta troppo eterogenea in termini di decorazione delle superfici nanoparticellari. Ne conseguono enormi sforzi per la separazione e purificazione delle diverse specie. Per questa ragione negli ultimi anni si è fatto largo un nuovo approccio basato sulle nanoparticelle non come *tools* da impiegare in quanto tali, bensì come *scaffolds* dalla superficie omogenea ai quali far aderire molecole secondarie per ottenere sinergicamente l’effetto finale desiderato.

Rotello e collaboratori sono stati tra i primi pionieri in questo ambito con lo sviluppo di innovativi biosensori basati su nanoparticelle d’oro funzionalizzate con tioli cationici^[53]. Inspirandosi a questi lavori, recentemente, Prins *et al.* hanno sviluppato strutture eterofunzionalizzate, multivalenti basate sull’auto assemblaggio di piccoli ligandi sulla superficie di nanoparticelle d’oro (Figura 1.21)^[54]. In questo modo è stato possibile dimostrare, con un approccio supramolecolare, come si possa finemente regolare la composizione della superficie delle nanoparticelle sfruttando le differenti affinità degli oligoanioni. Di conseguenza si è potuto superare in maniera semplice ed efficace il già citato problema dell’eccessiva omogeneità chimica legata ai sistemi supramolecolari e alle nanoparticelle d’oro funzionalizzate.

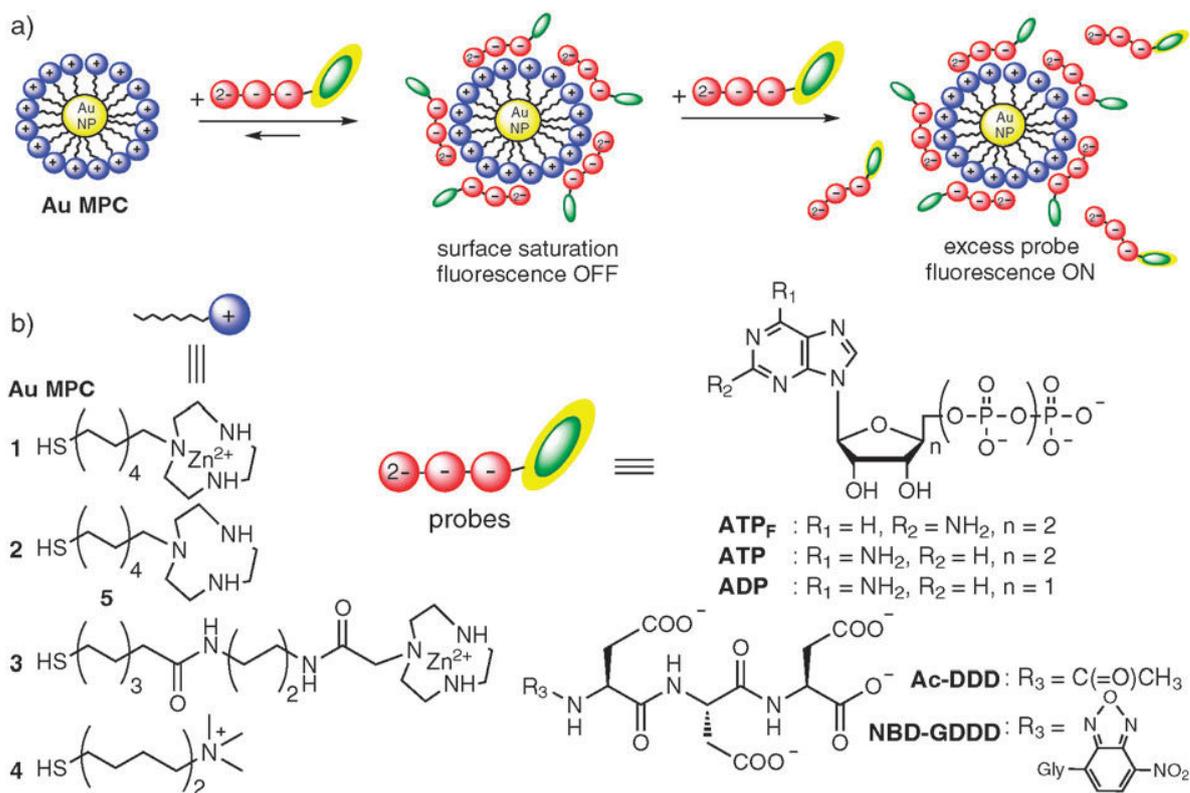


Figura 1.21: Rappresentazione schematica del sistema supramolecolare di scambio di oligoanioni ideato da Prins *et al.*

1.6 Riferimenti

- [1] Fersht, A. *Enzyme Structure and Mechanism*. W.H. Freeman and Company, Reading and San Francisco, **1977**.
- [2] Kirby, A.J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 707–724.
- [3] Cacciapaglia, R., Di Stefano, S., Mandolini, L. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 113–122.
- [4] (a) Mulder, A., Auletta, T., Sartori, A., Del Ciotto, S., Casnati, A., Ungaro, R., Huskens, J. and Reinhoudt, D.N. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6627–6636;
(b) Huskens, J., Mulder, A., Auletta, T., Nijhuis, C.A., Ludden, M.J.W. and Reinhoudt, D.N. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6784–6797.
- [5] Sanders, J.K.M. *Chem.–Eur. J.* **1998**, *4*, 1378–1383.
- [6] Jonsson, S., Odille, F.G.J., Norrby, P.-O. and Warnmark, K. *Chem. Commun.* **2005**, 549–551.
- [7] Komiyama, M., Breaux, E.J. and Bender, M.L. *Bioorg. Chem.* **1977**, *6*, 127–136.
- [8] Breslow, R., Doherty, J.B., Guillot, G. and Lipsey, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 3227–3229.
- [9] Kim, D.H. and Lee, S.S. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 647–652.
- [10] (a) Richeter, S. and Rebek, J. Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16280–16281;
(b) Zelder, F.H. and Rebek, J. Jr. *Chem. Commun.* **2000**, 753–754;
(c) Purse, B.W. and Rebek, J. Jr. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *102*, 10777–10782.
- [11] Das, S., Incarvito, C.D., Crabtree, R.H. and Brudvig, G.W. *Science* **2006**, *312*, 1941–1943.
- [12] (a) Jonsson, S., Odille Fabrice, G.J., Norrby, P.-O. and Warnmark, K. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1927–1948;
(b) Jonsson, S., Odille Fabrice, G.J., Norrby, P.-O. and Warnmark, K. *Chem. Commun.* **2005**, 549–551.
- [13] Thordarson, P., Bijsterveld, E.J.A., Rowan, A.E. and Nolte, R.J.M. *Nature* **2003**, *424*, 915–918.
- [14] (a) Walter, C.J., Anderson, H.L. and Sanders, J.K.M. *Chem. Commun.* **1993**, 458–460;
(b) Walter, C.J. and Sanders, J.K.M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 217–219;
(c) Clyde-Watson, Z., Vidal-Ferran, A., Twyman, L.J., Walter, C.J., McCallien, D.W.J., Fanni, S., Bampos, N., Stephen Wylie, R. and Sanders, J.K.M. *New J. Chem.* **1998**, *22*, 493–502;

- (d) Clyde-Watson, Z., Bampos, N. and Sanders, J.K.M. *New J. Chem.* **1998**, *22*, 1135–1138.
- [15] Mackay, L.G., Wylie, R.S. and Sanders, J.K.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3141–3142.
- [16] Marty, M., Clyde-Watson, Z., Twyman, L.J., Nakash, M. and Sanders, J.K.M. *Chem. Commun.* **1998**, 2265–2266.
- [17] (a) Kelly, T.R., Zhao, C. and Bridger, G.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3744–3745;
(b) Kelly, T.R., Bridger, G.J. and Zhao, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8024–8034.
- [18] (a) Tjivikua, T., Ballester, P. and Rebek, J. Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1249–1250;
(b) Nowick, J.S., Feng, Q., Tjivikua, T., Ballester, P. and Rebek, J. Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8831–8839.
- [19] Mock, W.L. *Top. Curr. Chem.* **1995**, *175*, 1–24.
- [20] Mock, W.L., Irra, T.A., Wepsiec, J.P. and Adhya, M. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 5302–5308.
- [21] Mock, W.L., Irra, T.A., Wepsiec, J.P. and Manimaran, T.L. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3619–3620.
- [22] Carlqvist, P. and Maseras, F. *Chem. Commun.* **2007**, 748–750.
- [23] Chen, J. and Rebek, J. Jr. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 327–329.
- [24] Menger, F.M. *Acc. Chem. Res.* **1985**, *18*, 128–134.
- [25] (a) Kang, J., Santamaria, J., Hilmersson, G. and Rebek, J. Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7389–7390;
(b) Kang, J., Hilmersson, G., Santamaria, J. and Rebek, J. Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3650–3656.
- [26] Brisig, B., Sanders, J.K.M. and Otto, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 1270–1273.
- [27] Yoshizawa, M., Tamura, M. and Fujita, M. *Science* **2006**, *312*, 251–254.
- [28] Fiedler, D., van Halbeek, H., Bergman, R.G. and Raymond, K.N. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10240–10252.
- [29] Dong, V.M., Fiedler, D., Carl, B., Bergman, R.G. and Raymond, K.N. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14464–14465.
- [30] Breit, B. and Seiche, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6608–6609.
- [31] Seiche, W., Schuschkowski, A. and Breit, B. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 1488–1494.
- [32] Breit, B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 6816–6825.

- [33] Birkholz, M.-N., Dubrovina, N.V., Jiao, H., Michalik, D., Holz, J., Paciello, R., Breit, B. and Boerner, A. *Chem.–Eur. J.* **2007**, *13*, 5896–5907.
- [34] Weis, M., Waloch, C., Seiche, W. and Breit, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4188–4189.
- [35] Breit, B. and Seiche, W. *Pure Appl. Chem.* **2006**, *78*, 249–256.
- [36] Breit, B. and Seiche, W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 1640–1643.
- [37] Clarke, M.L. and Fuentes, J.A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 930–933.
- [38] Slagt, V.F., van Leeuwen, P.W.N.M. and Reek, J.N.H. *Chem. Commun.* **2003**, 2474–2475.
- [39] Wilson, M.E. and Whitesides, G.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 306–307.
- [40] Lan, J., Li, J., Liu, Z., Li, Y. and Chan, A.S.C. *Tetrahedron: Asymmetry.* **1999**, *10*, 1877–1885.
- [41] (a) Skander, M., Humbert, N., Collot, J., Gradinaru, J., Klein, G., Loosli, A., Sauser, J., Zocchi, A., Gilardoni, F. and Ward, T.R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14411–14418;
(b) Skander, M., Malan, C., Ivanova, A. and Ward, T.R. *Chem. Commun.* **2005**, 4815–4817;
(c) Ward, T.R. *Chem.–Eur. J.* **2005**, *11*, 3798–3804;
(d) Letondor, C. and Ward, T.R. *Chem. Bio. Chem.* **2006**, *7*, 1845–1852.
- [42] (a) Letondor, C., Humbert, N. and Ward, T.R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 4683–4687;
(b) Letondor, C., Pordea, A., Humbert, N., Ivanova, A., Mazurek, S., Novic, M. and Ward, T.R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8320–8328.
- [43] Roelfes, G. and Feringa, B.L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 3230–3232.
- [44] (a) Breslow, R. *Chem. Biol.* **1998**, *5*, R27-R28;
(b) Miller, S.J. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 601-610;
(c) Wennemers, H. *Chem. Comm.* **2011**, *47*, 12036-12041.
- [45] Fersht, A. *Structure and Mechanism in Protein Structure*; 3 ed.; W.H.Freeman and Company: New York, **1999**.
- [46] (a) Breslow, R. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 146-153;
(b) Wiester, M.J., Ulmann, P.A. and Mirkin, C. *Angew. Chem. int. Ed.* **2011**, *123*, 118-142.
- [47] (a) Daniel, M.-C. and Astruc, D. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293-346;
(b) Astruc, D., Lu, F. and Ruiz Aranzaes, J.R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *117*, 8062-8083;
(c) Rosi, N.L. and Mirkin C.A. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1547-1562;

- (d) Giljohann, D.A., Seferos, D.S., Daniel, W.L., Massich, M.D., Patel, M.C. and Mirkin C.A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *122*, 3352-3366;
- (e) Shemetov A.A., Nabiev, A. and Sukhanova, A. *ACS Nano* **2012**, *6*, 4585-4602 (e riferimenti ivi compresi).
- [48] Dickerson, M.B., Sandhage, K.H. and Naik, R.R. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 4935-4978.
- [49] Pasquato, L., Rancato, F., Scrimin, P., Mancin, F. and Frigeri, C. *Chem. Commun.*, **2000**, 2253–2254.
- [50] Manea, F., Houillon, F.B., Pasquato, L. and Scrimin, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6165–6169.
- [51] Upert, G., Bouillère, F. and Wennemers, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4231-4234.
- [52] Gentilini, C. and Pasquato, L. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 1403.
- [53] Bunz, U.H.F. and Rotello, V.M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3268.
- [54] Pieters, G., Cazzolaro, A., Bonomi, R. and Prins, L. J. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1916.

2. Realizzazione e studio di un sistema catalitico auto-assemblante

Il lavoro di Prins precedentemente descritta è stata ulteriormente sviluppata durante l'internato di dottorato. Infatti, sfruttando la natura auto-assemblante degli oligoanioni su sistemi nanoparticellari cationici, si è pensato di andare oltre il semplice controllo della composizione superficiale di ligandi e di realizzare un vero e proprio sistema nanoenzimatico artificiale di natura supramolecolare. Esso è composto da due elementi fondamentali:

1. Nanoparticelle d'oro passivate con tioli alchilici recanti in posizione Ω un gruppo trimetilammonico (8-Trimetilammonio ottiltiolo \rightarrow NR_4^+ -AuNPs) in modo da generare una superficie cationica;
2. Oligopeptidi anionici in grado di legarsi alla superficie delle nanoparticelle. Questi si caratterizzano per una coda C-terminale composta di tre residui di Acido aspartico, per un'estremità N-terminale composta di un numero variabile d'Istidine ($\text{H}_0\text{-H}_3$), unite da un residuo di Triptofano. Le quattro cariche negative dei residui di Acido aspartico garantiscono un *binding* efficiente alla superficie cationica, mentre i residui d'Istidina e il Triptofano permettono, rispettivamente, la catalisi e la misurabilità del peptide stesso in termini di concentrazione e *binding*.

Ciascuno dei due elementi preso singolarmente non è un efficiente catalizzatore. Come si vedrà più avanti, infatti, i peptidi sono totalmente inerti nella catalisi, mentre le nanoparticelle svolgono un mediocre ruolo catalitico in ragione di un pH locale più elevato. Quando, però, i peptidi si assemblano sulla superficie delle nanoparticelle, il sistema che ne scaturisce è in grado di accelerare l'idrolisi di un substrato modello come il p-Nitrofenil estere della N-CBz-(D)fenilalanina di due ordini di grandezza rispetto al *background*. L'auto-assemblaggio è un requisito fondamentale per la catalisi in quanto i peptidi non sono catalitici di per sé. Oltretutto, la multivalenza della superficie nanoparticellare gioca un ruolo cruciale nella modulazione dell'attività catalitica non soltanto mantenendo substrato e catalizzatore in stretto contatto, ma generando un microambiente dotato di un proprio pH locale (v. oltre) che aumenta ulteriormente l'efficienza del sistema (Figura 2.1). Data la natura supramolecolare del sistema e ricordando quanto già visto per i lavori di Prins *et al.* circa la regolazione della composizione della superficie

cationica di nanoparticelle con oligoanioni, il sistema creato è finemente regolabile semplicemente dosando la quantità di componenti che si auto-assemblano sulla superficie delle nanoparticelle medesime^[1].

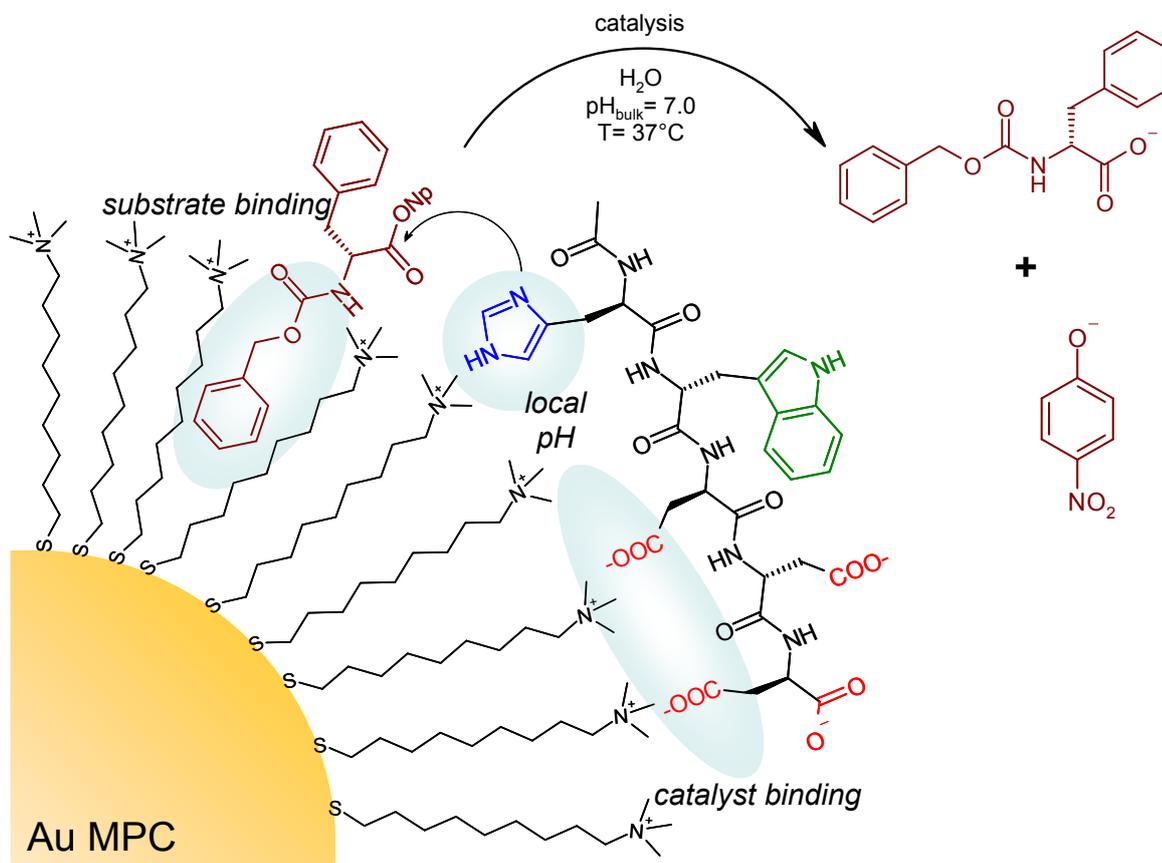


Figura 2.1: Rappresentazione schematica del sistema catalitico sviluppato durante l'internato di dottorato (Zaramella, D., Scrimin, P. and Prins L.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8396–8399).

2.1 Sintesi e caratterizzazione delle nanoparticelle Au-NR₄⁺

Le nanoparticelle utilizzate (NR₄⁺-AuNPs) sono essenzialmente costituite da un *core* di oro metallico e da uno monostrato organico di natura alchilica recante alle posizioni estreme una funzione tiolica ed una trimetilammonica. Di conseguenza, la realizzazione di dette nanoparticelle procede inizialmente in maniera parallela con la sintesi del tiolo e del colloide d'oro; in un secondo momento, queste due componenti verranno unite per ottenere il prodotto finale.

2.1.1 Sintesi di 8-Trimetilammonio ottiliolo

8-Trimetilammonio ottiliolo presenta un'estremità tiolica che interagirà con la superficie metallica del *core* d'oro, mentre, all'estremità opposta, un'ammonio quaternario, fornirà una superficie cationica che permetterà il *binding* dei ligandi peptidici. Le due estremità sono separate da una catena alchilica a 8 atomi di carbonio. La sintesi ha luogo in tre passaggi, riportati in figura 2.2 qui di seguito:

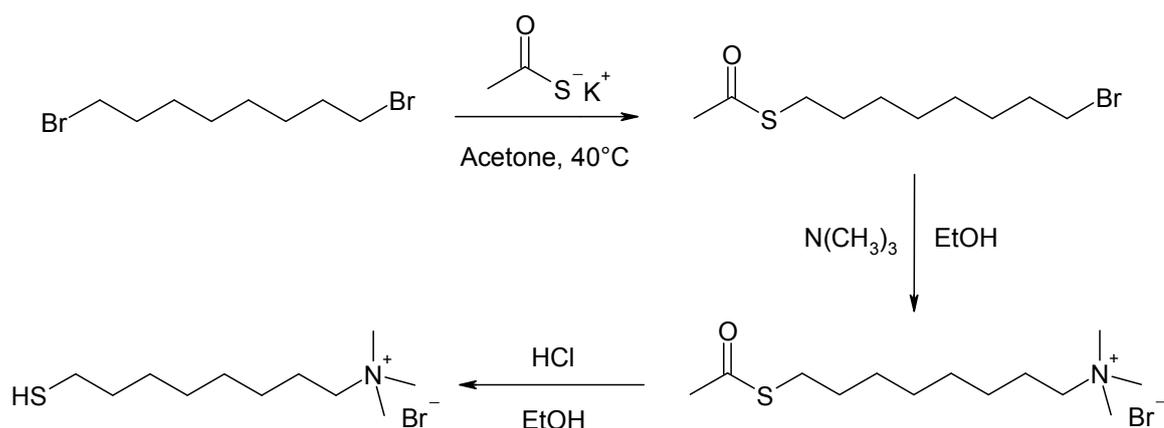


Figura 2.2: Schema di sintesi per l'8-Trimetilammonio ottiliolo.

Il primo *step* porta alla formazione di 8-Tioacetil-ottilbromuro per sostituzione nucleofila del Potassio tioacetato su uno dei bromuri del 1,8-Dibromottano: è opportuno gocciolare molto lentamente il Potassio tioacetato nell'1,8-Dibromottano sciolto in Acetone al fine di essere sempre in difetto del primo per evitare formazione di prodotti di-sostituiti. Lo *step* successivo prevede la sintesi di 8-Tioacetil-1-trimetilammoniottano per sostituzione nucleofila al carbonio in posizione 1 con Trimetilammina. Infine, il prodotto desiderato 8-Trimetilammonio ottiliolo viene ottenuto per idrolisi in HCl 3 M/EtOH del tioacetile ottenendo, quindi, il tiolo libero.

2.1.2 Sintesi del colloide d'oro e passivazione con 8-Trimetilammonio ottiliolo

La scelta della via sintetica da seguire per la formazione dei colloidi d'oro è dettata da alcune esigenze. Innanzitutto, si desiderano nanoparticelle dalle dimensioni ridotte di 1.5-2.0 nm: ciò permette di ottenere un rapporto componente organica/inorganica massimizzato, ottenendo un sistema cationico multivalente estremamente denso. E', dunque, necessario avvalersi di un metodo sintetico che consenta il controllo e la modulazione delle dimensioni dei *cluster* d'oro. Si vuole, inoltre, che la sintesi porti a

2. Realizzazione e studio di un sistema catalitico auto-assemblante

formazione dei colloidi stabili nel tempo e solubili in acqua, mezzo in cui si eseguiranno gli esperimenti. Per tali ragioni si è scelto di seguire la via sintetica proposta dal gruppo del professor Scrimin^[2], a cui sono state apportate lievi, ma non sostanziali modifiche. Diversamente dalla classica sintesi proposta da Brust e Schiffrin^[3], la quale porta a nanoparticelle solubili in solvente organico, tale metodica prevede di portare a formazione dei colloidi passivati transitoriamente con Diotttilammina e di passivarli solo successivamente con il tiolo che ne medierà la solubilità in H₂O. Si riporta, quindi, un breve schema riassuntivo della procedura seguita:

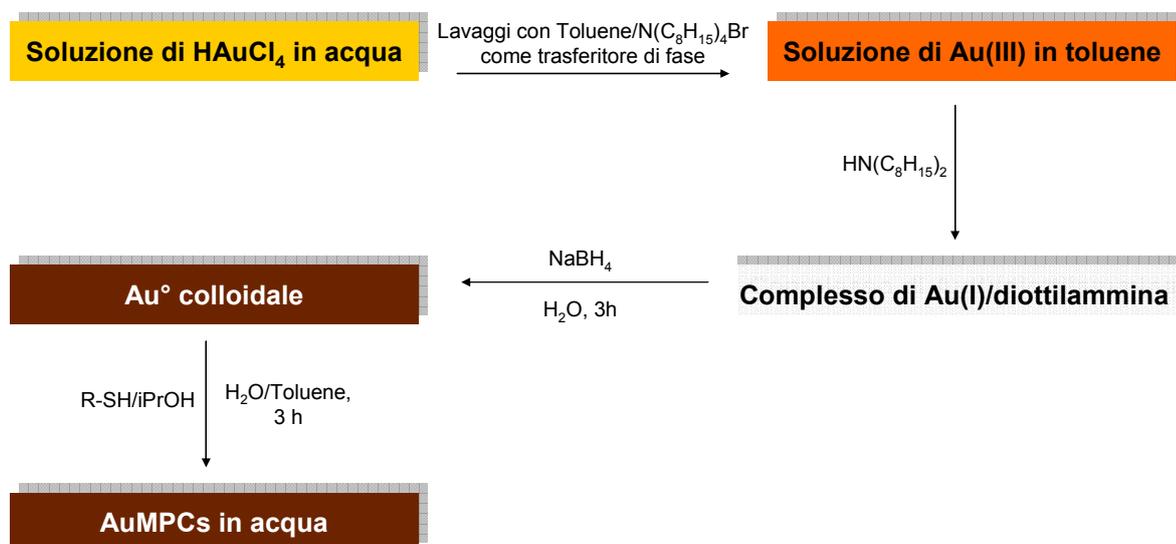


Figura 2.3: Schema a blocchi della sintesi di nanoparticelle passivate con tioli secondo la procedura descritta da Scrimin.

Per soddisfare il requisito dimensionale, la sintesi prevede l'aggiunta di una precisa quantità di Diotttilammina alla soluzione di Au(III) in toluene, ottenuta per trasferimento di fase con Tetraottilammonio bromuro. Due sono i ruoli svolti dalla Diotttilammina: (a) consentire il controllo della dimensione dei *clusters*; (b) stabilizzare temporaneamente i colloidi prima di passivarli con il tiolo. Il meccanismo mediante il quale il rapporto diotttilammina/oro controlla il diametro delle nanoparticelle è ormai qualitativamente noto^[4]; si imputa, infatti, tale fenomeno alla natura debole dei legami che le ammine sono in grado di formare con la superficie metallica determinando un equilibrio dinamico tale da consentire il controllo sulle dimensioni del nucleo in accrescimento. La relativa stabilità nel tempo dei colloidi si spiega, invece, chiamando in causa più ragioni.

1. L'ingombro sterico della Diottilammina costituisce una barriera fisica che impedisce il contatto diretto tra due superfici metalliche.
2. La sua presenza può determinare una variazione della carica superficiale del *cluster*.
3. Può contribuire ad abbassare l'energia libera e, quindi, la reattività dei colloid.

E' intuibile che i *clusters* ottenuti saranno polidispersi in un *range* di dimensioni la cui distribuzione deve essere il più possibile ridotta; per far ciò il riducente (NaBH_4) è aggiunto massivamente permettendo di avere una rapida nucleazione di Au^0 seguita da un lento ed uniforme accrescimento di tali nuclei. Il passo successivo consta della rimozione del riducente e della passivazione delle nanoparticelle ottenute con la soluzione del tiolo in *iso*-Propanolo. La quantità totale di tiolo introdotta deve essere doppia rispetto a quella stechiometricamente richiesta (si veda "Parte Sperimentale" in fondo al capitolo), al fine di garantire la copertura totale delle nanoparticelle.

Sono successivamente operati lavaggi della soluzione acquosa di nanoparticelle d'oro con diversi solventi organici al fine di rimuovere reagenti in eccesso ancora presenti nella soluzione acquosa anche se non direttamente legati alla superficie metallica (soprattutto Tetraottilammonio bromuro). Successivamente, tutti i campioni vengono purificati ulteriormente per gel filtrazione su colonna Sephadex G-25.

2.1.3 Caratterizzazione di NR_4^+ -AuNPs

Prima di procedere all'analisi del sistema catalitico, è necessario procedere ad una caratterizzazione accurata delle nanoparticelle. Le analisi effettuate sono volte ad ottenere informazioni sia per quanto riguarda la frazione inorganica, rappresentata dal *core* d'oro (caratterizzazione dimensionale mediante microscopia TEM), che per quanto riguarda la componente organica (analisi $^1\text{H-NMR}$); inoltre è utile conoscere il rapporto tra le due attraverso analisi termogravimetrica (TGA).

a) Analisi dimensionale

E' stata condotta un'analisi TEM per valutare le dimensioni dei *core* d'oro. Queste si sono dimostrate essere compatibili con la quantità di Diottilammina usata per modulare il diametro della nanoparticelle (1.8 ± 0.4 nm). In figura 2.4 sono riportate

alcune delle immagini ottenute complete dalla relativa distribuzione delle dimensioni.

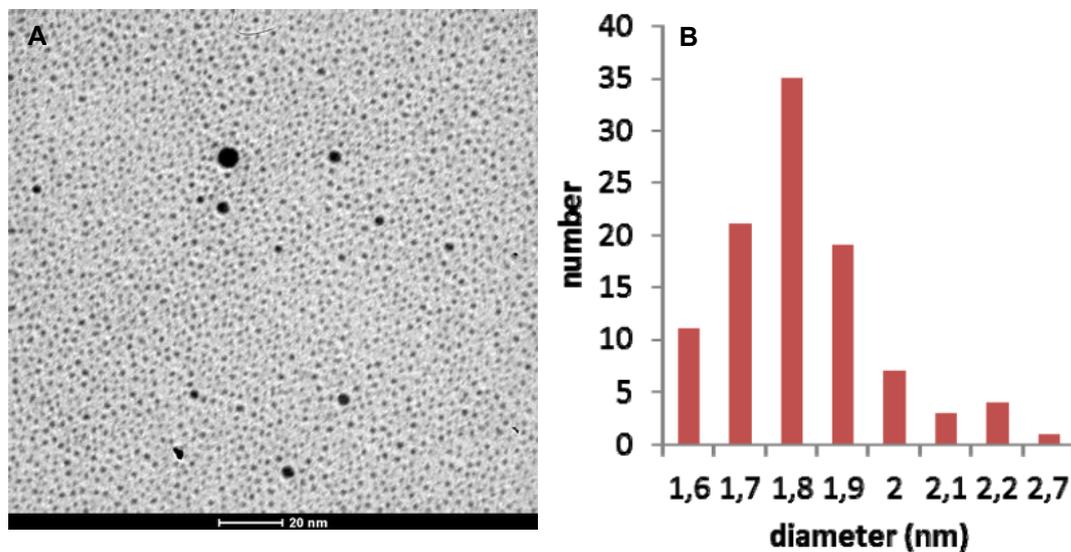


Figura 2.4: Analisi dimensionale delle nanoparticelle sintetizzate (NR_4^+ -AuNPs). A) Immagine TEM; B) Grafico della distribuzione delle dimensioni.

Una prova ulteriore delle dimensioni osservate con la microscopia elettronica a trasmissione viene dall'analisi UV-Vis: l'assenza di banda plasmonica a 520 nm conferma ulteriormente che le dimensioni sono al di sotto dei 3 nm (Figura 2.5).

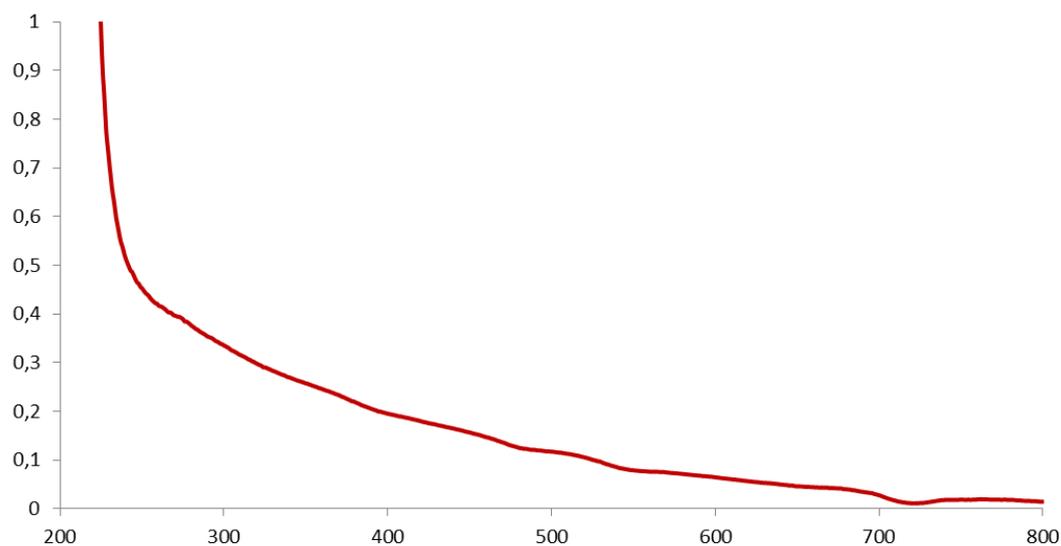


Figura 2.5: Spettro UV-Vis delle nanoparticelle sintetizzate. $[\text{NR}_4^+\text{-AuNPs}] = 20 \mu\text{M}$ (riferita alle teste ammoniche); 10 mM HEPES pH 7.0.

Infine, studi di *light scattering* hanno definitivamente dimostrato la distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle confermando quanto già osservato con le analisi precedenti (Figura 2.6).

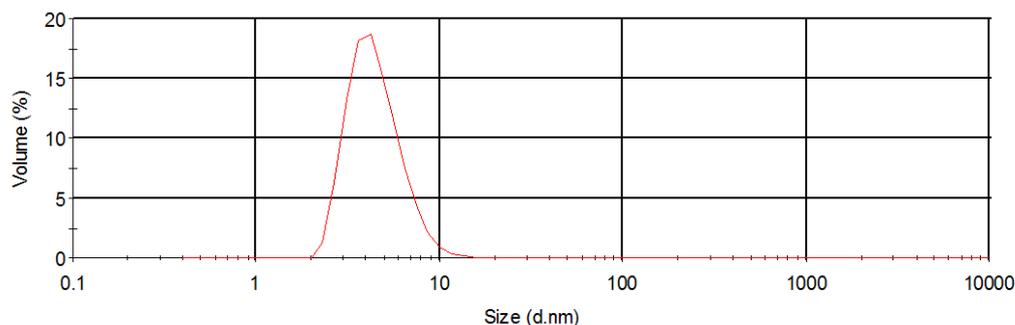


Figura 2.6: Analisi DLS in acqua delle nanoparticelle sintetizzate (NR_4^+ -AuNPs).

b) Analisi $^1\text{H-NMR}$

Al fine di caratterizzare completamente la componente organica del sistema sintetizzato, si scioglie una quantità nota di nanoparticelle in Metanolo deuterato o acqua deuterata e si procede all'acquisizione dei seguenti spettri $^1\text{H-NMR}$:

1. Spettro in assenza di gradiente di campo;
2. Spettro acquisito imponendo un gradiente di campo (LEDBP, Low Eddy Currents Distortion Bipolar gradient Pulses);

La prima analisi consente di acquisire degli spettri in cui compaiono i picchi identificativi di tutte le molecole presenti nel campione, permettendo già a questo livello di poter distinguere i segnali delle molecole libere in soluzione da quelli delle molecole legate alle nanoparticelle. Infatti, mentre i picchi delle molecole libere in soluzione appaiono stretti come nella norma, i segnali protonici delle molecole legate alle nanoparticelle risultano vistosamente allargati; tale fenomeno è tanto più evidente quanto più il protone è prossimo alla superficie metallica. Questo fenomeno è dovuto a diversi motivi:

- all'allungamento del tempo di rilassamento *spin-spin*;
- all'eterogeneità dei vari siti di legame oro-tiolo nelle diverse parti del colloide che fa sì che ciascun protone sia rappresentato da una distribuzione di *chemical shifts*;
- al gradiente di densità dei leganti tiolici muovendosi dal *core* d'oro verso l'interfaccia nanoparticella-solvente.

Oltre ai picchi allargati relativi ai tioli legati alle nanoparticelle, tale analisi può facilmente rivelare la presenza residua di reagenti usati in sede di sintesi (Diottilammina e Tetraottilammonio bromuro), permettendo, così, una valutazione immediata della purezza delle nanoparticelle. Osservando lo spettro superiore riportato in figura 2.7 si può immediatamente capire che il *batch* sintetizzato, pur presentato picchi stretti, può essere considerato pulito. Infatti, poiché la quantità d'impurezze è relativa agli integrali dei segnali ottenuti, è intuibile che si segnali ristretti continuo per una quantità di contaminante molto bassa rispetto ai picchi allargati.

Con la seconda analisi si confermano le informazioni acquisite dagli spettri precedenti. In un'analisi NMR tradizionale il campo magnetico B_0 , parallelo al vettore di magnetizzazione, viene mantenuto costante. In questo caso, invece, si impone un gradiente monodimensionale del campo B_0 in una sequenza particolare d'impulsi. Questa successione consente di registrare selettivamente solo i segnali di quelle molecole che, avendo elevate dimensioni, diffondono a bassa velocità e, quindi, rispondono più lentamente alle variazioni del campo magnetico. Dal confronto tra questo spettro e quello senza gradiente si individuano quali molecole siano effettivamente legate alla nanoparticella e quali, invece, siano presenti nella soluzione come impurezze. Osservando lo spettro inferiore riportato in figura 2.7 non solo si confermano i sospetti relativi alle impurezze presenti rilevate con l'analisi non a gradiente, ma si conferma quanto appena spiegato: molecole non legate e, perciò, più mobili (come il segnale del solvente), scompaiono con l'analisi a gradiente.

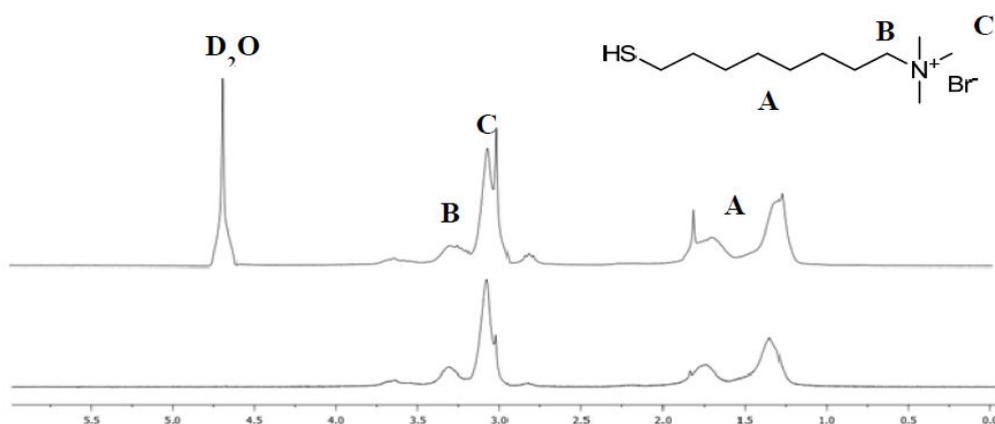


Figura 2.7: Spettro $^1\text{H-NMR}$ delle nanoparticelle sintetizzate (NR_4^+ -AuNPs). Il profilo superiore mostra uno spettro senza gradiente di campo; il profilo inferiore mostra uno spettro con gradiente di campo.

c) Analisi termogravimetrica TGA

L'analisi termogravimetrica consente di quantificare con buona approssimazione la massa della porzione organica rispetto al peso totale della nanoparticella. In particolare il campione viene sottoposto a combustione per incremento graduale della temperatura facendo sì che la componente organica si ossidi a CO_2 , NO_x e SO_2 lasciando solamente la componente inorganica di natura metallica (Figura 2.8).

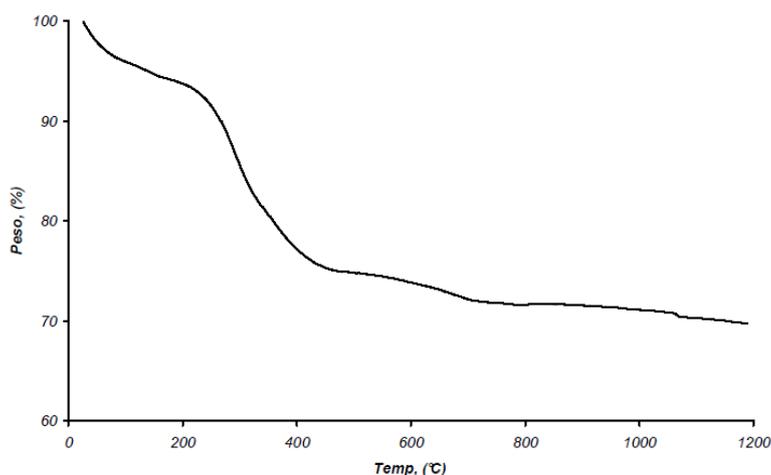


Figura 2.8: Analisi termogravimetrica delle nanoparticelle sintetizzate (NR_4^+ -AuNPs).

Come si può vedere, dopo un'iniziale perdita di peso di circa il 5% dovuta a tracce residue di solvente si osserva un calo drastico del peso da 95% a 70% rimanendo, poi, stabile a questo valore. Ciò dimostra che la componente organica delle nanoparticelle sintetizzate vale per poco più del 20% in peso.

2.2 Sintesi e caratterizzazione dei peptidi H_0 - H_3

I peptidi impiegati in questo lavoro hanno sequenza generale $\text{Ac-H}_n\text{WDDD-OH}$ dove $0 \leq n \leq 3$ da cui consegue la nomenclatura H_0 - H_3 . Come vedremo più avanti, questa sequenza modello è stata scelta per rispondere a determinati requisiti decisi a priori. L'Istidina è un amminoacido noto per le proprietà catalitiche^[5, 6] ed è, quindi, stata scelta come “testa” catalitica del nostro sistema supramolecolare. Ovviamente, il peptide H_0 , mancante di questa, è impiegato come peptide inerte agente da *blank*. Il Triptofano è un ammino-acido peculiare in quanto non solo è un valido *probe* in assorbanza che permette una quantificazione spettrofotometrica dei peptidi ($\epsilon_{280} = 5500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), ma è anche un

2. Realizzazione e studio di un sistema catalitico auto-assemblante

valido *probe* di fluorescenza ($\lambda_{em} = 360$ nm; $\Phi_f = 0.2$) e, perciò, è in grado di permettere le misure di *binding* dei peptidi sulle nanoparticelle (v. oltre). La coda *C*-terminale tricarbossilica permette, con le sue 4 cariche negative (3 delle catene laterali più 1 derivante dal carbossile *C*-terminale), di garantire un *binding* efficiente alla superficie cationica delle nanoparticelle.

La sintesi di questi peptidi è stata effettuata con classiche procedure di sintesi su fase solida^[7], utilizzando una resina di Wang come supporto. Il protocollo sintetico scelto è basato sulla chimica ortogonale del Fmoc (Figura 2.9).

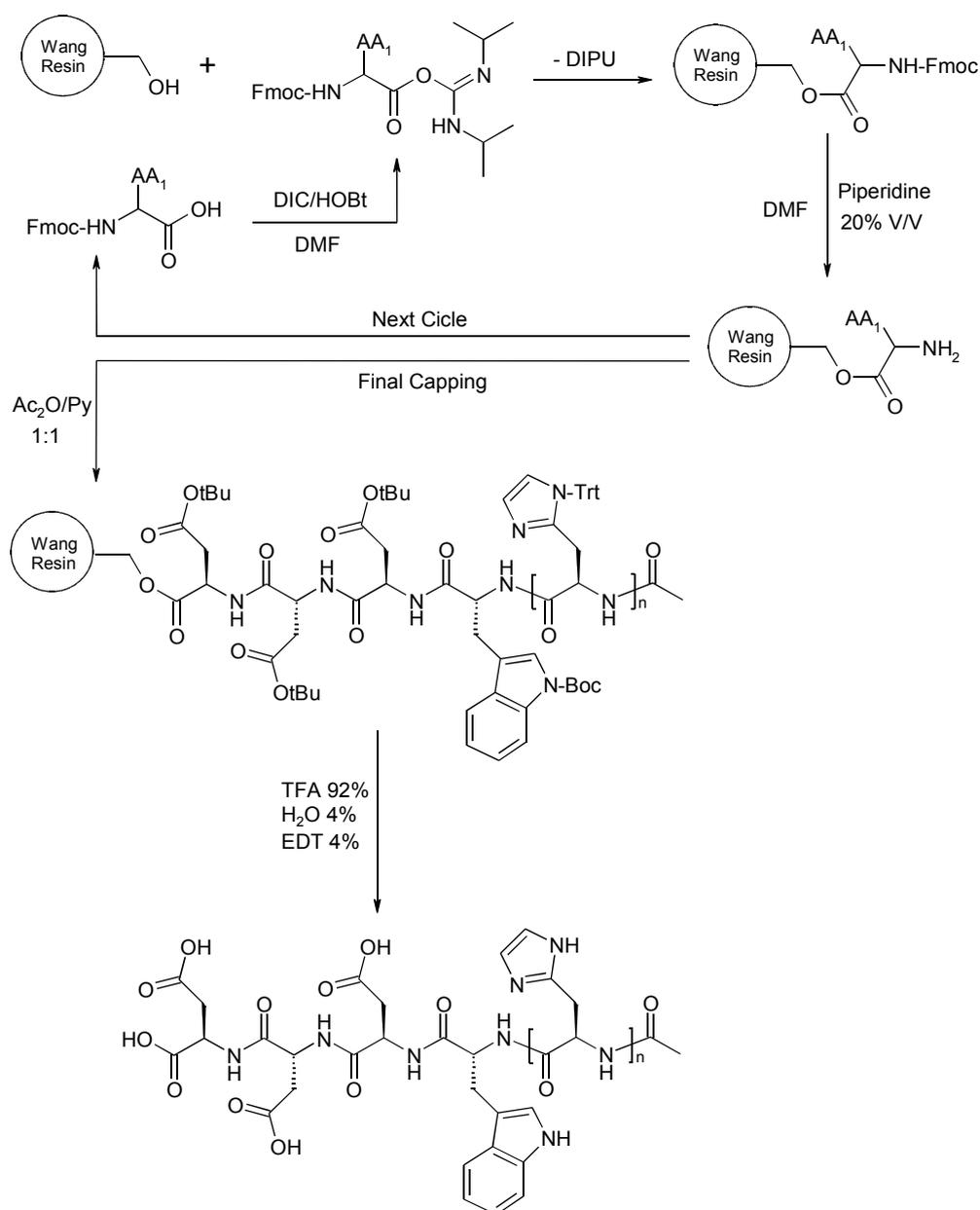


Figura 2.9: Schema generale della sintesi su fase solida dei peptidi H₀-H₃ secondo il protocollo sintetico Fmoc.

Brevemente, la strategia di sintesi prevede l'ancoraggio dell'amminoacido C-terminale del peptide mediante la sua funzione carbossilica alla resina polistirenica di Wang; la rimozione del Fmoc dalla funzione amminica primaria con Piperidina; l'attacco nucleofilo di tale ammina al gruppo carbonilico attivato come estere uronico del nuovo amminoacido entrante. Al termine della sintesi il peptide viene rimosso dalla resina mediante idrolisi acida per Acido trifluoroacetico (TFA) e mantenuto per un'ora e mezza nel medesimo ambiente per rimuovere i gruppi protettori dalle catene laterali in presenza di *scavengers* nucleofili quali acqua, tioli o blandi donatori di idruro come i silani.

Successivamente, la bontà della sintesi viene valutata con il sistema analitico RP-UHPLC Agilent Infinity 1200 con auto-campionatore accoppiato ad un analizzatore di massa di tipo ESI-SQP. Con tale sistema si sono ottenuti cromatogrammi a 226 e 280 nm grazie al *detector* di tipo *Diode Array*. A ciascun picco si è poi associato in picco TIC dell'analizzatore quadrupolare singolo. Ogni crudo è stato poi purificato, a prescindere dalla resa sintetica, con un sistema RP-HPLC preparativo; il picco corrispondente alla specie desiderata è stato poi liofilizzato e disciolto in acqua per ottenere una *stock solution*. Una parte di quest'ultima è diluita di 10 volte e sottoposta nuovamente ad analisi RP-UHPLC in presenza di uno standard interno di Ac-Trp-OEt per determinarne la concentrazione mediante confronto fra l'area del picco cromatografico dello standard e l'area del picco relativo ai campioni. Di seguito si riportano i risultati relativi alla caratterizzazione dei quattro peptidi (Tabella 2.1 e figura 2.10).

Sequence	Theoretical _{mono} M.W. (Da)	Experimental M.W. (Da)	Δm (Da)
Ac-WDDD-OH (H_0)	591.170	591.195	+0.025
Ac-HWDDD-OH (H_1)	728.229	728.253	+0.024
Ac-HHWDDD-OH (H_2)	865.288	865.336	+0.048
Ac-HHHWDDD-OH (H_3)	1002.347	1002.406	+0.059

Tabella 2.1: Valori di massa teorici e sperimentali per i peptidi sintetizzati; a destra viene mostrata la loro differenza.

Si osservi che i valori di massa sperimentale tabulati non sono quelli riportati nei grafici sottostanti. La ragione è che il sistema SQP utilizzato è sensibile solamente fino alla prima cifra decimale. E' stata, perciò, eseguita un'analisi separata con sistema ESI/TOF sensibile fino alla quarta cifra decimale i cui risultati sono stati riportati in tabella.

2. Realizzazione e studio di un sistema catalitico auto-assemblante

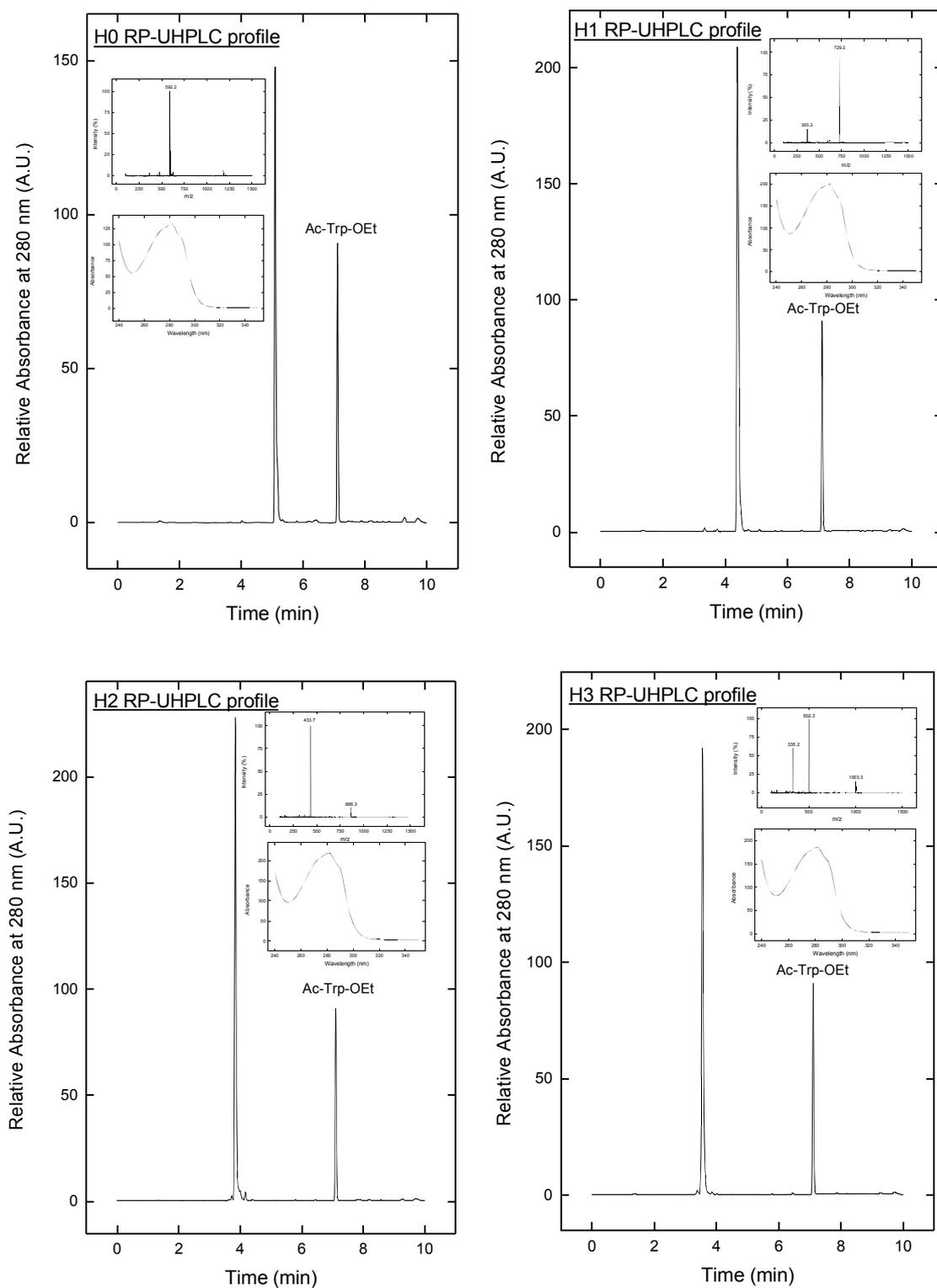


Figura 2.10: Caratterizzazione RP-UHPLC/MS-SQP dei peptidi sintetizzati. Viene mostrato il cromatogramma a 280 nm in presenza dello standard interno Ac-Trp-OEt. Nei due riquadri sono mostrati lo spettro di assorbimento e lo spettro m/z relativi al picco cromatografico. Gradiente in CH₃CN dal 2 al 32% in 10 minuti. 0.1% HCOOH. Flusso 0.2 ml/min.

2.3 Studi di *Binding*

La misura del *binding* dei peptidi alle nanoparticelle è stata eseguita tramite studi di *quenching* di fluorescenza^[8]. I peptidi, infatti, data la presenza del Triptofano, se vengono irradiati ad una lunghezza d'onda di 280 nm, emettono a 360 nm con resa quantica Φ pari a circa il 20% dell'energia assorbita. Quando, però, si vengono a trovare in prossimità di una superficie d'oro come quella delle nanoparticelle in caso di *binding*, subiscono *quenching* (smorzamento) dell'emissione di fluorescenza. In pratica, ciò che si osserva è un iniziale *plateau* della fluorescenza dovuto al *binding* dei peptidi sulle nanoparticelle con conseguente *quenching* della fluorescenza del Triptofano; successivamente, la fluorescenza aumenta in ragione di un'avvenuta saturazione delle nanoparticelle e conseguente presenza di Triptofano libero in soluzione. Dalle isoterme di *binding* si sono ottenuti i valori di saturazione della superficie secondo una procedura già descritta in letteratura (Fig. 2.11)^[9].

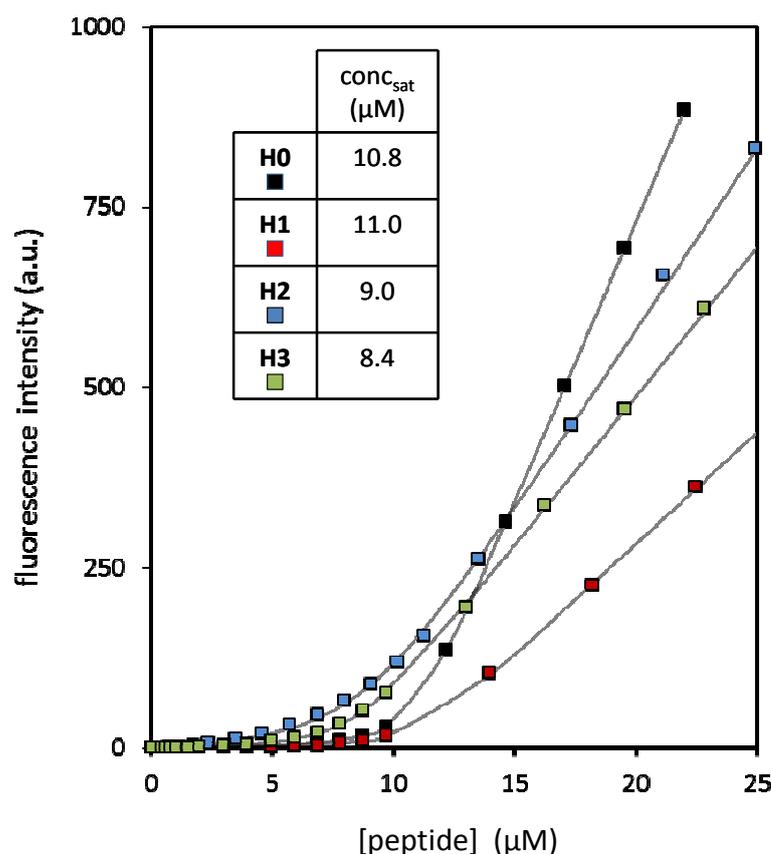


Figura 2.11: Variazione nell'emissione di fluorescenza per i quattro peptidi considerati (H₀-H₃) in presenza di 60 μM di nanoparticelle (concentrazione riferita alle teste ammoniche). 10 mM HEPES, pH 7.0, 10% CH₃CN. T= 37°C. λ_{ex} = 280 nm, λ_{em} = 360 nm; slits 5/20 nm.

I profili ottenuti sono indicativi della formazione di complessi stabili tra le nanoparticelle e i peptidi. I valori di C_{sat} mostrano un *trend* discendente all'aumentare del numero delle Istidine; tale fenomeno può essere ascritto alla pK_a del residuo imidazolico pari a 6.0. A pH 7.0 il 10% delle Istidine si trova protonato: è evidente che al crescere del numero di Istidine nel contesto del medesimo peptide, aumenterà la probabilità di avere una carica netta che sia minore di 4⁻. Inoltre, all'allungarsi della sequenza possono anche aumentare i fenomeni di ripiegamento strutturale che potrebbero determinare interazioni intramolecolari fra la coda C-terminale di Acidi aspartici e le Istidine stesse.

Le differenti pendenze osservate, dopo la saturazione del sistema (e, quindi, con Triptofano libero in soluzione) sono dovute alle caratteristiche intrinseche dei singoli peptidi e principalmente ascrivibili alla presenza dei residui d'Istidina. Studi di emissione di fluorescenza condotti a parità di concentrazione dei quattro peptidi hanno, infatti, dimostrato un comportamento peculiare di ciascuno di essi (Figura 2.12/A).

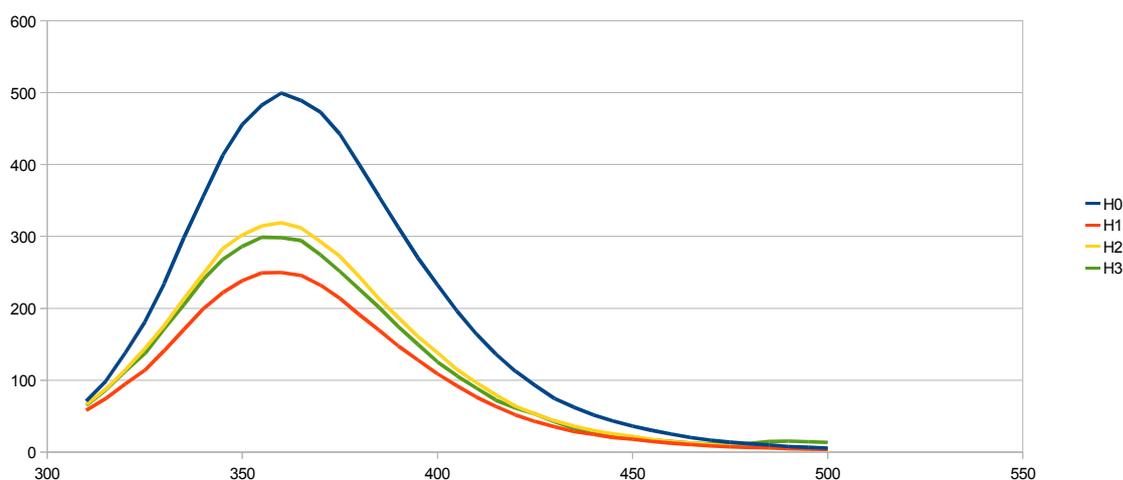


Figura 2.12/A: Confronto fra gli spettri di emissione dei peptidi considerati (H_0 - H_3). 10 μ M peptidi. 10 mM HEPES, pH 7.0, 10% CH_3CN ; $T = 37^\circ\text{C}$. $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm. *Slits* 5/20.

Come già anticipato, è probabile che le differenze osservate siano imputabili alla presenza dell'Istidina, visto e considerato che è l'unico elemento di distinzione tra i peptidi. In particolare, l'Istidina sembra avere un'intrinseca capacità di influenzare la fluorescenza smorzandola. H_1 si dimostra essere il peptide intrinsecamente meno emittente; H_2 e H_3 hanno valori molto simili tra di loro con H_2 leggermente più emittente. Tutto ciò si traduce perfettamente nelle differenti pendenze osservate nelle isoterme di *binding* viste sopra: a pH 7.0 H_0 , il peptide più emittente, ha una pendenza maggiore; H_1 , il peptide meno

emittente ha una pendenza molto meno marcata; H₂ e H₃ emettono molto similmente, con una leggera predominanza del primo, quest'ultima confermata dalla debole "deriva" della sua pendenza rispetto a quella di H₃.

A conferma di quanto ipotizzato, i medesimi spettri sono stati registrati a differenti pH ed hanno confermato che l'Istidina è la responsabile delle variazioni osservate: il peptide H₀, che ne è privo, è insensibile alle variazioni di pH, mentre i peptidi H₁-H₃ risentono in maniera più o meno marcata di detta variazione (Figura 2.12/B).

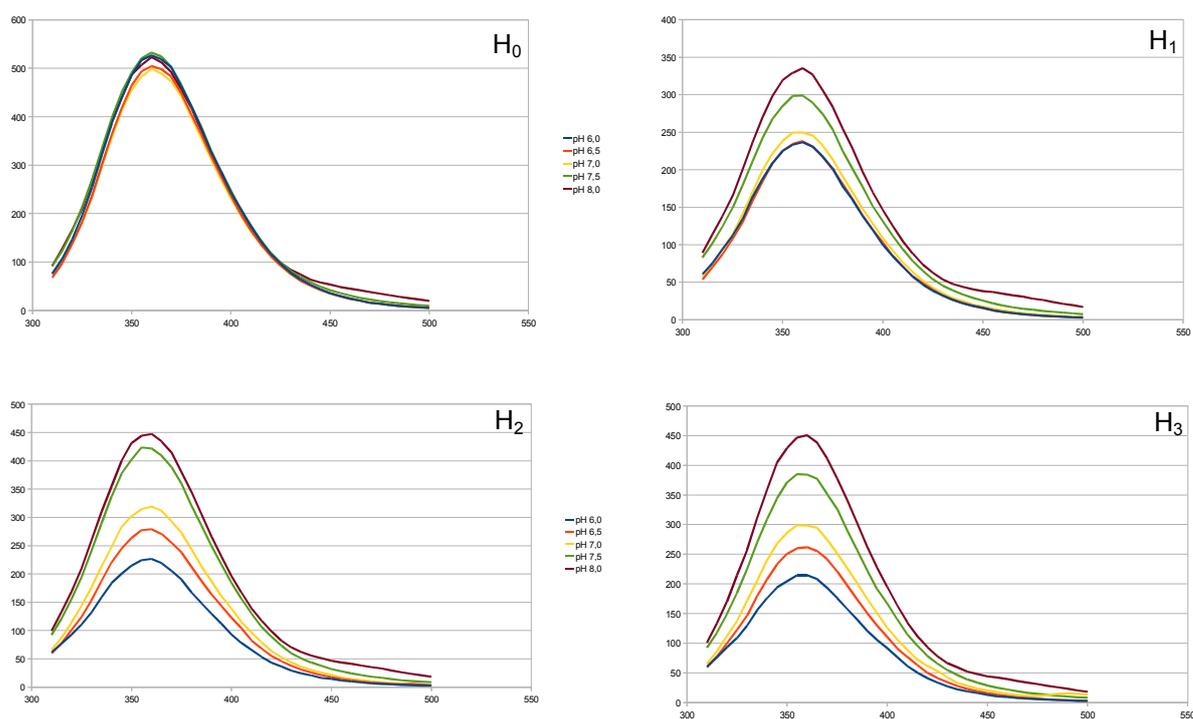


Figura 2.12/B: Confronto fra gli spettri di emissione dei peptidi considerati (H₀-H₃) a diversi pH. 10 μ M peptidi. 10 mM MES per pH 6.0 e pH 6.5; 10 mM HEPES per pH 7.0, 7.5, 8.0; 10% CH₃CN; T= 37°C. λ_{ex} = 280 nm. Slits 5/20.

2.4 Studi Cinetici

Dopo questi studi preliminari, il potere catalitico del sistema è stato saggiato nei confronti di un substrato modello come la *N*-CBz-(D)Phe-ONP, un *p*-nitrofenilestere del (D)-enantiomero della Fenilalanina. Data la bassa solubilità del substrato si è dovuto operare a concentrazioni ridotte (10 μM) ed in presenza di 10% di Acetonitrile (presente anche in tutti gli studi già descritti sopra). Gli esperimenti sono stati condotti in tampone 10 mM HEPES, pH 7.0 a 37°C in presenza di 60 μM nanoparticelle (riferita alle teste ammoniche) e peptidi H₀-H₃ alle loro rispettive C_{sat} . Le cinetiche sono state seguite a 400 nm per monitorare il rilascio di *p*-Nitrofenato.

I risultati sono stati subito incoraggianti poiché hanno dimostrato subito che i complessi peptide/nanoparticella sono più attivi della reazione di *background* (decomposizione spontanea del substrato in soluzione) e della reazione in presenza di soli peptidi di due ordini di grandezza (Figura 2.13a, b; Figura 2.14).

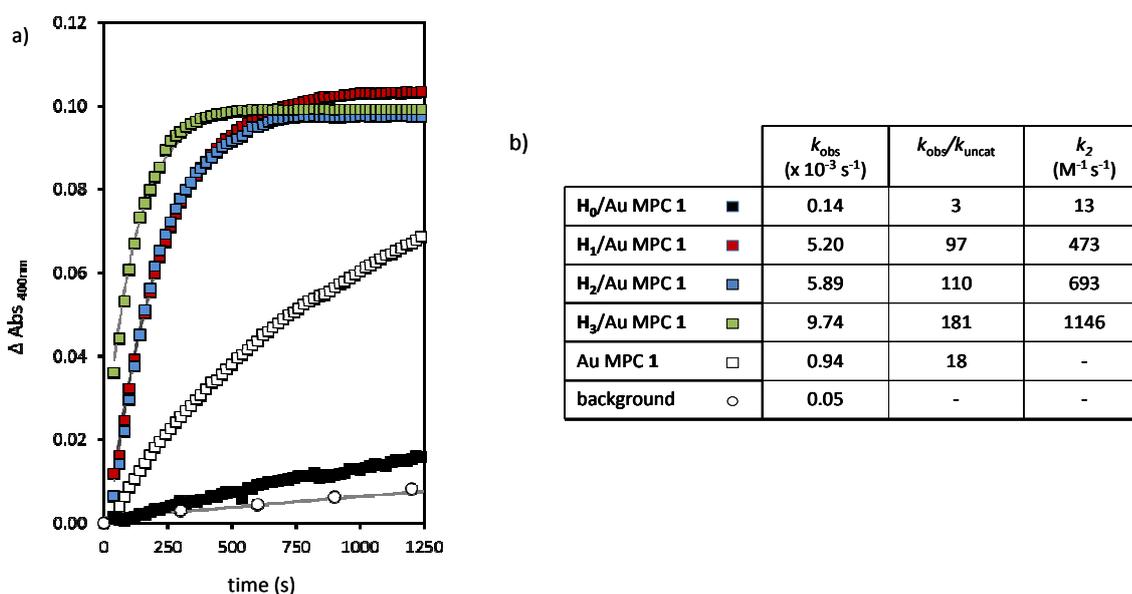


Figura 2.13: (a) Variazione di assorbanza a 400 nm in seguito all'aggiunta di 10 μM di *N*-CBz-(D)Phe-ONP ad una soluzione di NR₄⁺-AuNPs (□), H₀/NR₄⁺-AuNPs (■), H₁/NR₄⁺-AuNPs (■), H₂/NR₄⁺-AuNPs (■), H₃/NR₄⁺-AuNPs (■). Viene mostrata anche la reazione di *background* relativa al solo substrato (○). [NR₄⁺-AuNPs]= 60 μM (riferita alle teste ammoniche); [H₀] = 11 μM , [H₁] = 11 μM , [H₂] = 8.5 μM , [H₃] = 8.5 μM . 10 mM HEPES pH 7.0, 10% CH₃CN; T= 37°C. (b) Costanti osservate, k_{obs} , per i differenti sistemi analizzati; $k_{\text{obs}}/k_{\text{uncat}}$ e k_{obs} corrette per la concentrazione dei peptidi H₀-H₃ ($k_2 = \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$).

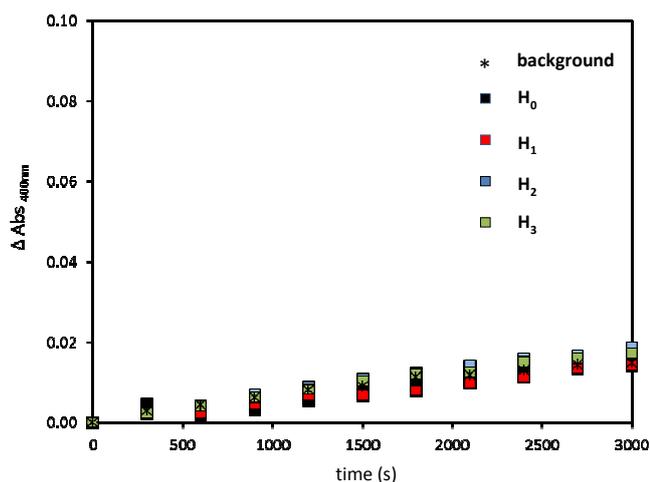


Figura 2.14: Variazione di assorbanza a 400 nm in seguito all'aggiunta di 10 μM di *N*-CBz-(D)Phe-ONP ad una soluzione contenente H₀ (■), H₁ (■), H₂ (■), H₃ (■). Viene mostrata anche la reazione di *background* relativa al solo substrato (*). [H₀] = 11 μM , [H₁] = 11 μM , [H₂] = 8.5 μM , [H₃] = 8.5 μM . 10 mM HEPES pH 7.0, 10% CH₃CN; T= 37°C.

Il fatto che ci sia una relazione crescente fra il numero d'Istidine contenuto nei peptidi e le costanti osservate è indicativo del fatto che l'effetto catalitico nasce proprio da queste. Ciò è più correttamente dimostrato normalizzando i valori di k_{obs} per la concentrazione di ciascun peptide così da rendere i valori delle costanti direttamente confrontabili. *Plottando* i valori di k_2 così ottenuti contro il rispettivo numero d'Istidine si ottiene una relazione lineare che dimostra, diversamente dagli esempi visti fino ad ora, che non esista cooperatività fra i residui d'Istidina poiché, in tal caso, si sarebbe ottenuta una sigmoide (Figura 2.15). Visto questo risultato, da questo punto in avanti del lavoro si utilizzerà solamente il sistema composto dal peptide H₁ (eventualmente H₀ per esperimenti di controllo) poiché non c'è alcun considerevole vantaggio nell'utilizzo di sistemi poli-istidinici poiché il guadagno è semplicemente lineare e legato, perciò, al numero d'Istidine.

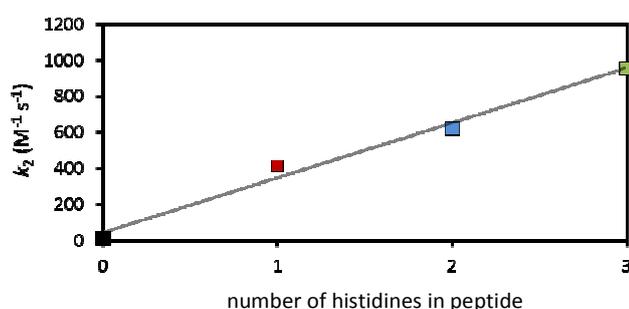


Figura 2.15: Relazione fra k_2 e numero d'Istidine per i sistemi H₀/NR₄⁺-AuNPs (■), H₁/NR₄⁺-AuNPs (■), H₂/NR₄⁺-AuNPs (■), H₃/NR₄⁺-AuNPs (■).

Un'ultima osservazione va fatta riguardo al fatto che i peptidi utilizzati in quanto tali non determinino un effetto catalitico diverso dal *background*: ciò dimostra che la catalisi avviene per auto-assemblaggio del catalizzatore *in situ* e non per azione dei singoli componenti confermando, ancora una volta, la natura supramolecolare del nostro sistema.

La scarsa solubilità del substrato non ci ha permesso di lavorare in eccesso di quest'ultimo e, almeno da un punto di vista diretto, non si sono potute dimostrare le eventuali condizioni di *turnover* del sistema. Per ovviare al problema, al sistema H_1/NR_4^+ -AuNPs è stato aggiunto sequenzialmente il substrato *N*-CBz-(D)Phe-ONP per quattro volte ad una concentrazione di 10 μM attendendo il *plateau* cinetico tra un'aggiunta e l'altra: la maggiore solubilità dei prodotti ci ha così permesso di superare il suddetto problema (Figura 2.16).

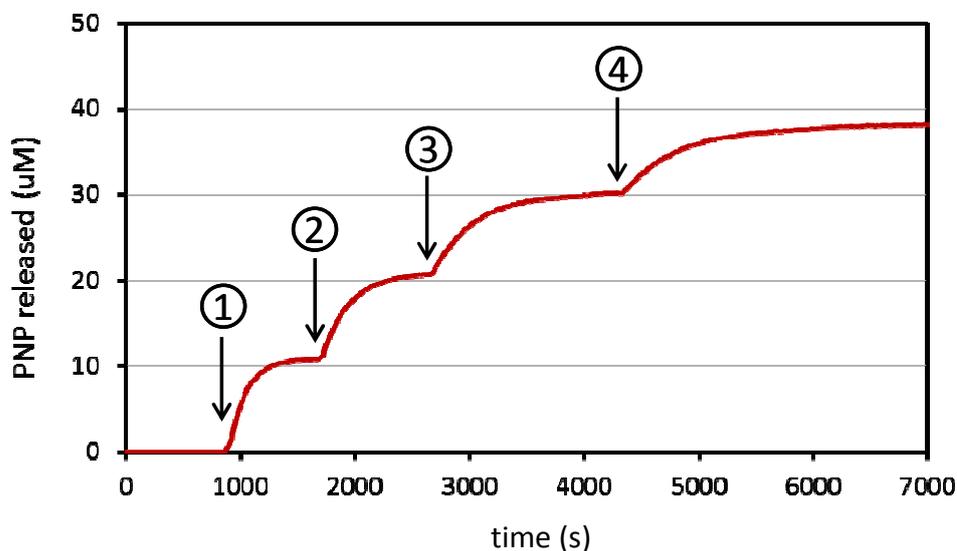


Figura 2.16: Quantità di PNP rilasciato (μM) in seguito a 4 aggiunte consecutive di *N*-CBz-(D)Phe-ONP (10 μM) ad una soluzione di H_1/NR_4^+ -AuNPs in funzione del tempo. $[NR_4^+\text{-AuNPs}] = 60 \mu\text{M}$ (riferita alle teste ammoniche), $[H_1] = 5.5 \mu\text{M}$ (v. oltre); 10 mM HEPES, pH 7.0, 10% CH_3CN ; $T = 37^\circ\text{C}$.

Il fatto che H_1 si trovasse ad una concentrazione di 5.5 μM (v. oltre) e che il rilascio di PNP abbia raggiunto i 40 μM (8 volte la concentrazione di catalizzatore) dimostra senza ombra di dubbio che il sistema da noi realizzato lavora in condizioni di *turnover*. Come si vedrà più avanti ed analogamente a quanto già visto per altri sistemi supramolecolari, la lieve diminuzione in attività conseguente ad ogni aggiunta è dovuta ad accumulo di prodotti in prossimità della superficie cationica.

2.5 Studi Meccanicistici

Abbiamo già osservato come le Istidine siano fondamentali affinché questo sistema eserciti il suo potere catalitico. Tuttavia esse non possono essere il solo motivo con cui giustificare gli effetti osservati per due ragioni:

1. Le nanoparticelle “nude” si sono dimostrate attive di 20 volte rispetto al *background*.
2. I peptidi (e le Istidine in essi contenute) non sono attivi in quanto tali.

Queste due osservazioni devono essere in qualche modo correlate; in altre parole deve esistere una relazione che faccia sì che le nanoparticelle (poco attive) ed i peptidi (per nulla attivi), una volta combinati assieme, risultino in un sistema estremamente attivo.

Studi preliminari hanno dimostrato che l'effetto osservato per le teste ammoniche sulla superficie delle nanoparticelle non è dovuto intrinsecamente alla natura chimica del gruppo; l'aggiunta di Tetrametilammonio cloruro ad una concentrazione pari a quella delle nanoparticelle (riferita, appunto, alle teste ammoniche), infatti, non ha portato ad alcun effetto diverso dalla reazione di *background* (Figura 2.17).

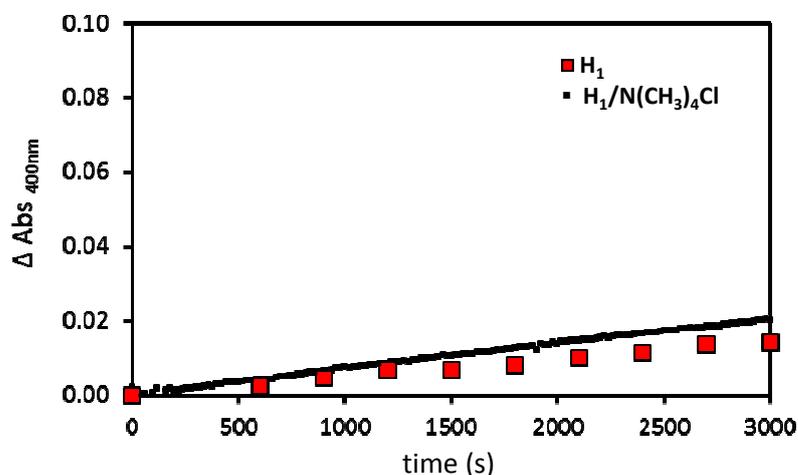


Figura 2.17: Variazione di assorbanza a 400 nm in seguito all'aggiunta di 10 μM *N*-CBz-(D)Phe-ONP ad una soluzione di H_1 (■) e $\text{H}_1/\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{Cl}$ (•). $[\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{Cl}] = 60 \mu\text{M}$; $[\text{H}_1] = 11 \mu\text{M}$. 10 mM HEPES pH 7.0, 10% CH_3CN ; $T = 37^\circ\text{C}$.

In figura sono confrontate la reazione in presenza di H_1 (pari alle reazioni di *background*) e la reazioni in presenza $\text{H}_1/\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{Cl}$ che dovrebbe simulare la reazione vista in figura 2.13a in presenza di H_1/NR_4^+ -AuNPs. Il fatto che in presenza di Tetrametilammonio cloruro non si osservi la medesima reattività vista per il sistema di confronto conferma che

la ragione dell'effetto catalitico delle nanoparticelle non è ascrivibile alla natura chimica del gruppo.

Risultati analoghi sono stati ottenuti in lavori riguardanti micelle cationiche e la ragione dell'effetto catalitico è stata ascritta al maggiore pH locale sulla superficie^[10-12]. Per dimostrare che anche nel nostro caso fosse questa la ragione si è dovuto pensare ad uno studio di pH che coinvolgesse un indicatore capace di legarsi efficientemente alla superficie delle nanoparticelle e che presentasse un punto di viraggio centrato nella regione neutro-alcalina. In questo modo, se sulla superficie delle nanoparticelle ci fosse un pH diverso da quello di *bulk*, si potrebbe quantificare, previa retta di taratura, con semplici metodologie spettrofotometriche. Il Blu di bromotimolo (BTB) si presta particolarmente a questo scopo poiché passando da pH neutro a pH debolmente alcalino ($pK_a = 7.1$) guadagna due cariche negative esponendo un gruppo solfone ed un gruppo fenato (Figura 2.18a). Tali cariche non solo sono sufficienti per avere *binding*, ma si possono eventualmente generare solamente sulla superficie delle nanoparticelle dove si sospetta che il pH sia più alcalino di quello di *bulk*. Studi spettrofotometrici preliminari in funzione del pH hanno mostrato che il BTB presenta un picco di assorbanza a 618 nm che aumenta all'aumentare del pH. Da questi studi è stato possibile ricavare una retta di taratura che mettesse in relazione l'assorbanza ed il pH (Figura 2.18a, b).

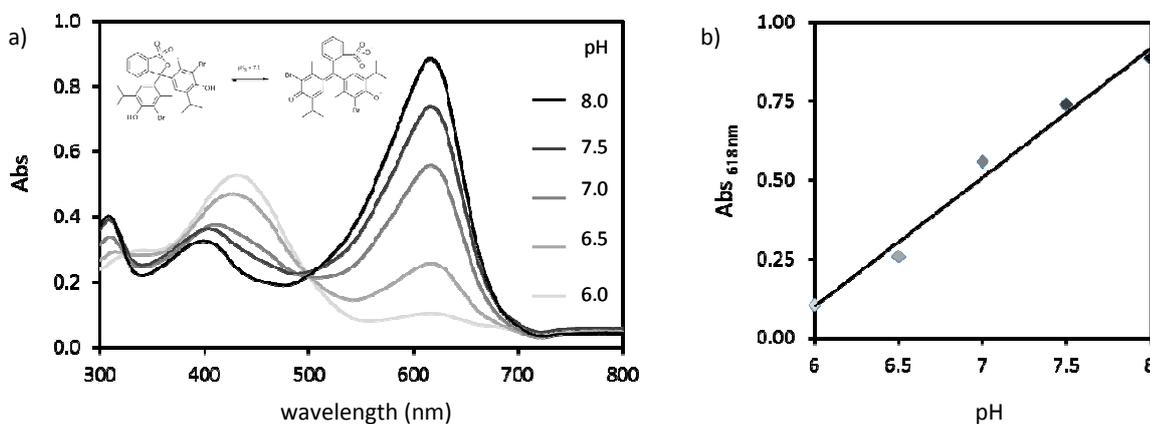


Figura 2.18: (a) Spettri di assorbimento di 30 μM Blu di bromotimolo (BTB) in funzione del pH e (in alto a sinistra) equilibrio di dissociazione della molecola. Tamponi 10 mM MES pH 6.0 e 6.5; 10 mM HEPES pH 7.0, 7.5 e 8.0. Per avere un corretto confronto con le condizioni sperimentali normalmente impiegate si è anche aggiunto CH₃CN al 10% lavorando a 37°C (b) Retta di taratura del BTB a 618 nm in funzione del pH.

Successivamente è stato ripetuto l'esperimento confrontando lo spettro di assorbimento del BTB in tampone a pH 7.0 e del BTB nelle medesime condizioni, ma in presenza di nanoparticelle (Figura 2.19).

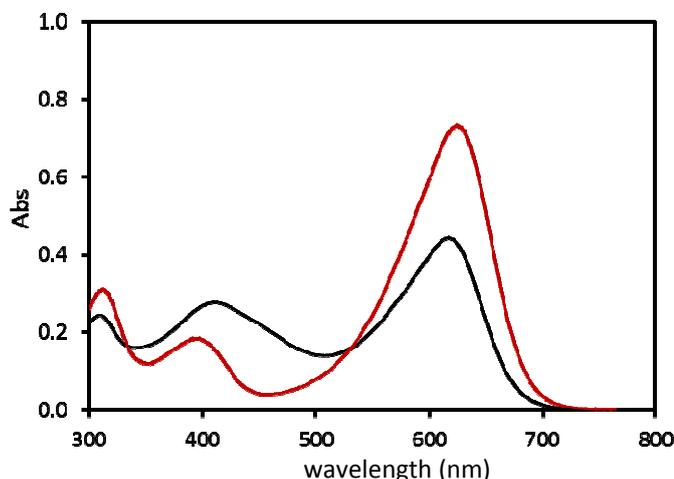


Figura 2.19: Spettri di assorbimento di 30 μM Blu di bromotimolo (BTB) in tampone 10 mM HEPES pH 7.0 (-) ed in presenza di 60 μM NR_4^+ -AuNPs (-). Per avere un corretto confronto con le condizioni sperimentali normalmente impiegate si è anche aggiunto CH_3CN al 10% lavorando a 37°C.

Lo spettro ottenuto in presenza di nanoparticelle ha dimostrato incontrovertibilmente che sulla loro superficie il pH locale è più alcalino rispetto al pH di *bulk* in ragione di un aumento di assorbanza di 0.29 unità. In particolare, data la retta di taratura precedentemente calcolata, è stato possibile associare al valore di assorbanza ottenuto un pH di 7.7. Un'evidenza indiretta di tale fenomeno si era già avuta considerando la soppressione dell'attività delle nanoparticelle saturate con il peptide inerte H_0 (Figura 2.13a) il quale, ricoprendo la superficie, annulla l'effetto locale di pH.

Queste evidenze sono state ulteriormente confermate da un elegante esperimento nel quale in due distinte cuvette venivano aggiunti H_0 oppure H_1 300 secondi dopo aver aggiunto 10 μM di substrato ad una soluzione di sole nanoparticelle (Figura 2.20). Rispetto ad una terza cuvetta di controllo sulla quale non è stata operata alcuna aggiunta i profili ottenuti indicano chiaramente l'effetto accelerante di H_1 e l'effetto inibente di H_0 sulla catalisi. Inoltre, questo esperimento mostra un aspetto fondamentale della catalisi supramolecolare: la possibilità di modulare l'attività *in situ* in funzione del tipo di ligandi adoperati.

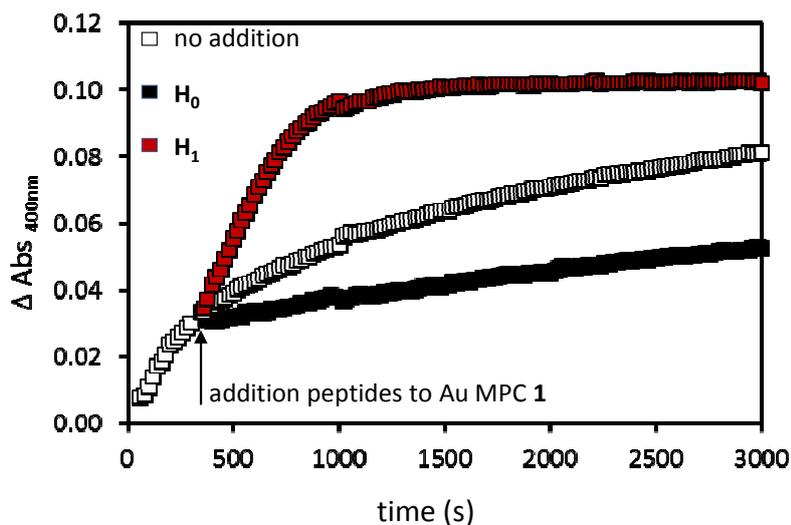


Figura 2.20: Variazione dell'assorbanza a 400 nm in funzione del tempo per gli esperimenti in cui H_0 ($11\mu\text{M}$, ■) o H_1 ($11\mu\text{M}$, ■) sono aggiunti 300 secondi dopo aver mescolato $\text{NR}_4^+\text{-AuNPs}$ ($60\mu\text{M}$, □) ed il substrato $N\text{-CBz-(D)Phe-ONP}$ ($10\mu\text{M}$). 10 mM HEPES , $\text{pH } 7.0$, $10\% \text{ CH}_3\text{CN}$, $T=37^\circ\text{C}$.

Come già osservato in precedenza circa la relazione lineare tra k_2 e numero di Istidine ed unitamente alle nuove evidenze riguardanti il pH locale, la cooperazione tra Istidine non sembra essere la ragione del guadagno catalitico del sistema diversamente da quanto osservato per sistemi multivalenti poli-istidinici analoghi^[13, 14]. Questo scaturisce principalmente dal fatto che la cooperatività richiederebbe la contemporanea coesistenza di residui istidinici protonati e non, situazione che, a $\text{pH } 7.7$ e con una pK_a del residuo amminoacidico di 6.0 , non può realizzarsi. Ciò è stato dimostrato misurando la cinetica d'idrolisi di $N\text{-CBz-(D)Phe-ONP}$ in funzione della concentrazione di H_1 (da 0 a $11\mu\text{M}$) in presenza di $\text{NR}_4^+\text{-AuNPs}$. In caso di cooperatività positiva si otterrebbe un profilo sigmoidale corrispondente alla formazione esponenziale di siti catalitici composti da due residui imidazolici^[15, 16]. Il profilo ottenuto toglie ogni dubbio dimostrando l'assenza di cooperatività e, al contrario, evidenziando un forte incremento di attività che raggiunge valori di massimo già a concentrazioni sub-saturanti ($4\mu\text{M}$; v. $[\text{H}_1]$ per l'esperimento in figura 2.16) e declinando poi lentamente a mano a mano che il sistema viene saturato (Figura 2.21, ■). Evidentemente, il massimo potere catalitico non si ottiene in condizioni di saturazione, ma piuttosto in una situazione in cui il residuo istidinico si trova isolato sulla superficie. Tutto ciò mette in evidenza il contributo positivo della superficie cationica delle nanoparticelle che contribuisce sinergicamente alla catalisi. Il pH locale, infatti, contribuisce al mantenimento dei residui imidazolici in forma deprotonata (nucleofila) e, a mano a mano che la superficie viene saturata dai gruppi carbossilato, il pH scende per

spiazzamento dei gruppi ossidrilici^[12], determinando il declino dell'attività catalitica in relazione alla riduzione dei residui imidazolici deprotonati.

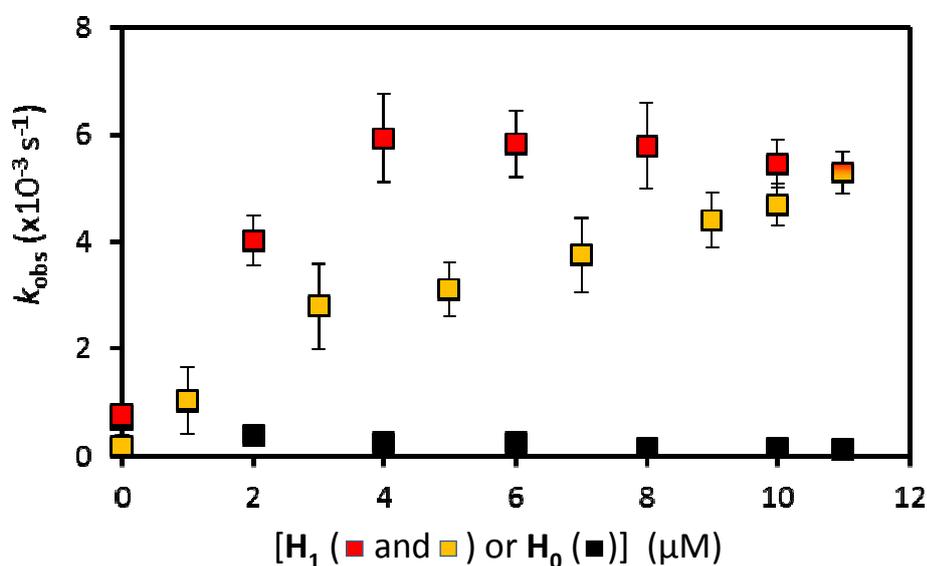


Figura 2.21: Costanti osservate (k_{obs}) in funzione della concentrazione di peptide H₁ (■ e ■) oppure H₀ (■) in presenza di NR₄⁺-AuNPs (60 μM, riferita alle teste ammoniche) e *N*-CBz-(D)Phe-ONP (10 μM). I simboli gialli indicano che l'esperimento è stato condotto a concentrazione totale costante di 11 μM data dalla somma di H₁+H₀ (concentrazione in ascissa riferita ad H₁). 10 mM HEPES, pH 7.0, 10% CH₃CN, T= 37°C.

Evidenze di quest'ipotesi sono state ottenute con un esperimento analogo nel quale, però, la differenza in concentrazione per raggiungere la saturazione di 11 μM per H₁ veniva fornita compensando con H₀ (Figura 2.21, ■). In questo caso la relazione ottenuta fra k_{obs} e concentrazione di H₁ è lineare e con una pendenza che per valori di concentrazione inferiori a 4 μM è inferiore a quella osservata nel sistema non compensato. Ciò dimostra il contributo attivo della componente superficiale delle nanoparticelle nel mantenere gli imidazoli deprotonati.

Un'ultima, importante informazione, circa la relazione tra catalizzatore e substrato viene dalla misura delle velocità iniziali in funzione della concentrazione di *N*-CBz-(D)Phe-ONP. Nonostante la scarsa solubilità del substrato ci abbia permesso di esplorare un *range* limitato di concentrazioni (1-10 μM), la mancata linearità del *plot* ottenuto ci ha suggerito la possibilità di un evento di *binding* fra il substrato e le nanoparticelle (Figura 2.22).

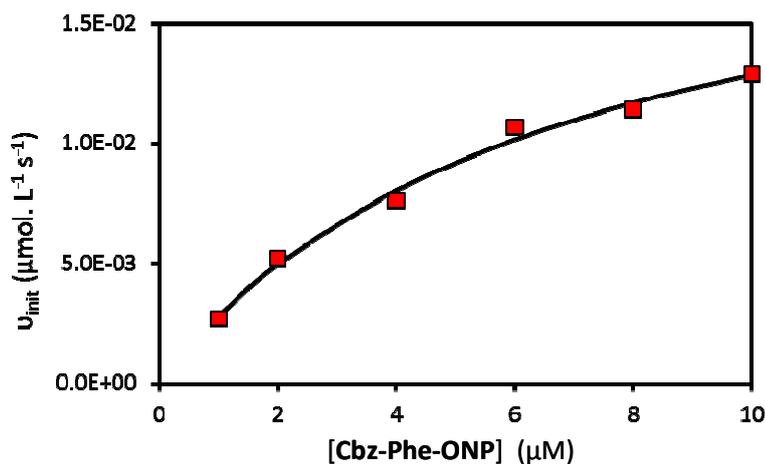


Figura 2.22: Velocità iniziali in funzione della concentrazione di *N*-Cbz-(D)Phe-ONP. $[\text{NR}_4^+ \text{-AuNPs}] = 60 \mu\text{M}$ (riferita alle teste ammoniche); $[\text{H}_1] = 11 \mu\text{M}$; 10 mM HEPES, pH 7.0, 10% CH_3CN , $T = 37^\circ\text{C}$.

Si è ipotizzato che il *binding* sia guidato dalle interazioni idrofobiche sussistenti fra il substrato apolare ed il *core* alchilico delle nanoparticelle (v. oltre). Interazioni di questo tipo sono state già messe in luce da Mancin *et al.*^[17]. Il *binding* contemporaneo del peptide H_1 e del substrato si traduce in un'elevata EM che, unitamente al pH locale, sembra essere la principale ragione dell'effetto catalitico osservato.

2.6 Parte Sperimentale

I reagenti disponibili in commercio (Sigma-Aldrich, Fluka, Across) e i solventi sono stati utilizzati senza ulteriore purificazione, dove non diversamente specificato.

I solventi ed i reagenti anidri commercialmente disponibili sono stati utilizzati tal quali senza ulteriore purificazione (Diclorometano (Fluka), Acetonitrile (Fluka), 2-Propanolo (Fluka), Metanolo (Fluka)).

Per la registrazione degli spettri NMR si sono utilizzati i solventi deuterati reperibili in commercio.

Le purificazioni mediante cromatografia flash sono state condotte utilizzando gel di silice Macherey-Nagel 60 con granulometria 230-400 mesh. Per la cromatografia su strato sottile (TLC) si sono utilizzate lastre Macherey-Nagel 40x80 mm poligram SIL G/UV₂₅₄ e poligram ALOX N/UV₂₅₄.

Gli amminoacidi e gli attivatori impiegati nella sintesi peptidica sono stati acquistati puri ed impiegati come tali da IRIS Biotech (Iris Biotech GmbH, Waldershofer Str. 49-51, D-95615 Marktredwitz, Germany).

I tamponi utilizzati negli esperimenti cinetici e spettrofotometrici sono prodotti commerciali e non sono stati ulteriormente purificati: HEPES (Acido *N*-(2-idrossietil)-piperazin-*N'*-2-etansolfonico), $pK_a = 7.2$; MES (Acido 2-(*N*-morfolino)etansolfonico), $pK_a = 6.1$.

L'acqua impiegata è prodotta da un impianto MilliQ (*Millipore*) modello A10; con essa sono stati preparati gli eluenti acquosi usati in cromatografia ed i tamponi. Per la filtrazione delle soluzioni tampone sono stati usati filtri in cellulosa rigenerata con diametro dei pori 0.22 μm prodotti sempre da Millipore (Watford, Irlanda).

2.6.1 Sintesi delle nanoparticelle

a) Sintesi di 8-Trimetilammonio ottitliolo

Le nanoparticelle utilizzate (NR_4^+ -AuNPs) sono essenzialmente costituite da un *core* di oro metallico e da uno monostrato organico di natura alchilica recante alle posizioni estreme una funzione tiolica ed una trimetilammonica. Di conseguenza, la realizzazione di dette nanoparticelle procede inizialmente in maniera parallela con la sintesi del tiolo e del colloide d'oro; in un secondo momento, queste due componenti verranno unite per ottenere il prodotto finale.

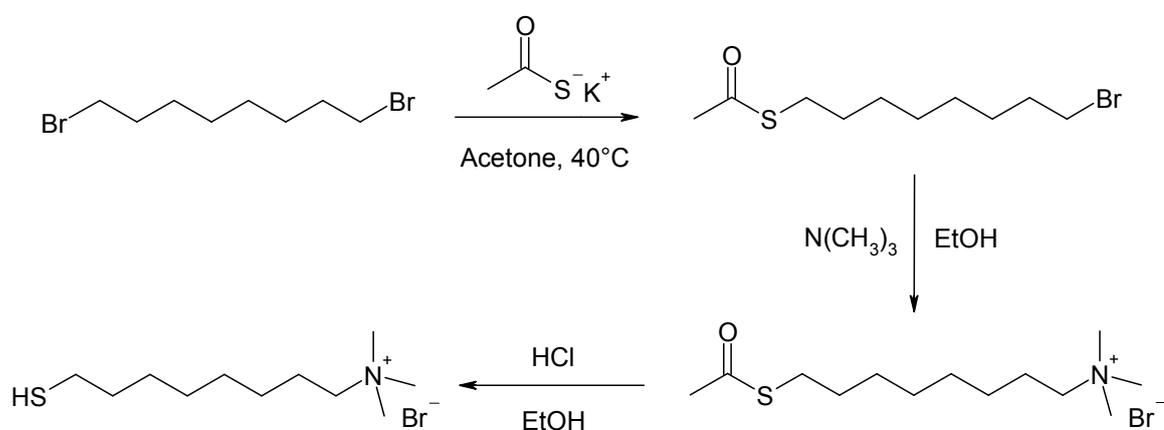


Figura 2.23: Schema di sintesi per l'8-Trimetilammonio ottitliolo.

1,8-Dibromottano (4.350 g, 15,99 mmol) viene dissolto in 40 mL di acetone. Viene addizionato Potassio tioacetato (1.826 g, 15.99 mmol) e la miscela è mantenuta a 40°C per una notte, sotto flusso di N₂. Dopo evaporazione del solvente, il solido giallo ottenuto è dissolto in Diclorometano ed estratto con acqua (3 x 40mL). La fase organica è anidrificata con Na₂SO₄: dopo evaporazione del solvente, il crudo di reazione è purificato tramite *flash chromatography* (gel di silice; eluente: CH₂Cl₂ R_f = 0.7). Vengono ottenuti 1.750 g di prodotto 16 (Resa=41%).

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz), δ: 3.32 (t, 2H, 8Hz); 2.78 (t, 2H, 8Hz); 2.24 (s, 3H); 1.77 (qn, 2H, 8 Hz); 1.48 (qn, 2H, 8Hz); 1.24 (br, 8H) [*vedi oltre per le tecniche e le strumentazioni impiegate*].

8-Tioacetil-ottilbromuro ottenuto dalla reazione precedente (0.500 g, 1.87 mmol) viene sciolto in CH₃CN (10 mL). Viene successivamente aggiunta una soluzione di Trimetilammina in Etanolo al 30% p/p (0.35 g, 1.87 mmol) e la reazione viene condotta in un tubo sigillato a 82°C per tutta la notte. Dopo evaporazione del solvente si purifica il prodotto ottenuto per flash chromatography (gel di silice, eluente: CH₂Cl₂, poi Metanolo). Vengono ottenuti come solido bianco 0.490g (resa=81%) di prodotto.

¹H-NMR (CD₃OD, 250 MHz), δ: 3.57 (t, 2H, 8Hz); 3.37 (s, 9H); 3.05 (t, 2H, 8Hz); 2.52 (s, 3H); 1.97 (br, 2H); 1.77 (qn, 2H, 8Hz); 1.58 (br, 8H).

ESI-IT (m/z): 246.3 [100%, M⁺].

Il prodotto dalla reazione precedente (0.200 g, 0.62 mmol) viene sciolto in EtOH (2 mL). Viene aggiunto HCl 6M (2 mL) e la reazione viene condotta sotto flusso di N₂ a 78°C per 3 ore. Dopo evaporazione del solvente vengono ottenuti 0.145 g di prodotto come solido bianco (Resa= 98%).

¹H-NMR (CD₃OD, 250 MHz), δ: 3.39 (m, 2H); 3.17 (s, 9H); 2.50 (t, 2H, 8Hz); 1.82 (br, 2H); 1.61 (qn, 2H, 8Hz); 1.40 (m, 8H).

ESI-IT (m/z): 204.2 [100%, M⁺].

b) Sintesi del colloide d'oro e passivazione con 8-Trimetilammonio otttilio

Per la sintesi delle nanoparticelle si è seguito il protocollo sviluppato nei nostri laboratori, apportando alcune piccole modifiche. Prima di procedere alla descrizione della procedura di sintesi è doveroso precisare che tutta la vetreria, prima di essere utilizzata,

deve essere lavata con acqua regia (miscela di HCl /HNO₃, 3:1) e che ogni operazione descritta deve essere effettuata in atmosfera inerte.

Si preparano due soluzioni:

- La prima sciogliendo 150 mg di H₂AuCl₄ x 3H₂O precedentemente pesati in atmosfera inerte, in una quantità minima di H₂O mQ;
- La seconda sciogliendo 8.25 g di TOABr in 375 ml di toluene precedentemente degasato.

Si eseguono tre estrazioni della soluzione acquosa con 3x15 mL della soluzione in toluene così da trasferire Au(III) nella fase organica (la soluzione acquosa gialla si decolora lentamente e la fase organica diventa arancio acceso). Alla soluzione di TOABr rimanente viene aggiunta una precisa quantità di Diottilammina (6.45 mL), tale da ottenere nanoparticelle del diametro desiderato (pari a 2 nm). L'ammontare totale di reagente da impiegare viene calcolato sulla base della relazione tra dimensioni del *core* e quantità di Diottilammina usata in sede di sintesi (Figura 2.24).

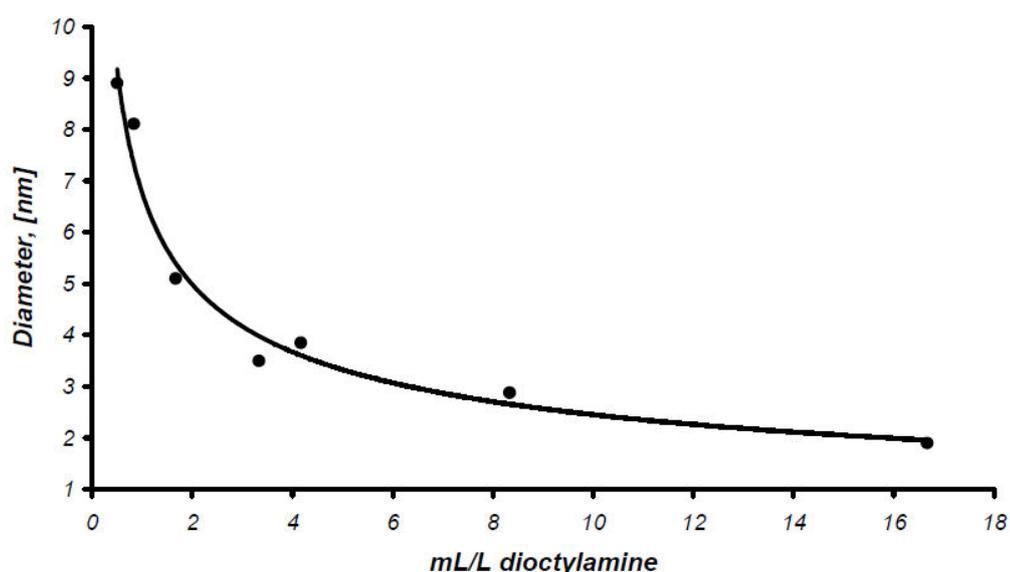


Figura 2.24: Relazione fra la concentrazione di Diottilammina impiegata e diametro del *core* delle nanoparticelle.

La soluzione così ottenuta viene aggiunta sotto vigorosa agitazione alle fasi organiche riunite, ottenute dalle estrazioni. Dopo un'attesa di 30 minuti, tempo necessario affinché la soluzione si decolori completamente, si introduce nella miscela di reazione, il più rapidamente possibile e mantenendo sempre una sostenuta e costante agitazione, una soluzione di 69.1 mg di NaBH₄ in H₂O mQ. La colorazione della miscela di reazione passa immediatamente da trasparente a marrone scuro, motivata dalla formazione dei colloidali di

Au desiderati. Si lascia procedere la reazione per 3 ore, quindi si separano le due fasi; la fase organica ottenuta deve essere sottoposta a copertura entro le 24 ore successive (le nanoparticelle devono essere conservate in atmosfera inerte, a temperatura ambiente).

La copertura dei colloidali così ottenuti avviene per semplice aggiunta di una soluzione in 2-Propanolo del tiolo sintetizzato (8-Trimetilammonio ottiltiolo): la quantità totale di tiolo introdotta deve essere doppia rispetto a quella stechiometricamente richiesta (calcolata sulla base della formula minima $\text{Au}_{214}\text{RSH}_{92}$), al fine di garantire che la copertura delle nanoparticelle avvenga in modo completo.

Sotto vigorosa agitazione, si aggiunge la soluzione del tiolo al colloide d'oro; dopo circa 15 minuti, si assiste alla formazione di un precipitato nero, con contemporanea decolorazione progressiva della fase organica. Si protrae l'agitazione per 3 ore, a seguito delle quali si provvede all'aggiunta di qualche mL di H_2O mQ; si fa proseguire la reazione per un'ulteriore ora. Si separa poi la fase acquosa e si procede ad eseguire i seguenti lavaggi:

- 2x10mL di Toluene;
- 5x10 mL di Acetato di etile;
- 3x10mL di Etere etilico.

Si allontanano gli eventuali solventi organici presenti all'evaporatore rotante, quindi, sempre per evaporazione a pressione ridotta, si elimina anche l'acqua. E' necessario realizzare questo passaggio con cautela, in modo da non asportare completamente l'acqua di solvatazione dei *clusters* di Au: in questo modo si possono ottenere nanoparticelle dall'aspetto ceroso, che mantengono ancora una buona solubilità in acqua.

Prima dell'uso, le nanoparticelle sono purificate ulteriormente per gel filtrazione su colonna Sephadex G-25.

2.6.2 Caratterizzazione delle nanoparticelle

a) Spettri NMR

Per la registrazione degli spettri NMR è stato utilizzato lo spettrometro Bruker Avance 300 (^1H : 300.13 MHz). Gli spettri ^1H -NMR sono stati registrati a 25°C , i *chemical shifts* (δ) dei segnali sono riportati in ppm rispetto al segnale del solvente non deuterato presente come impurezza nel solvente deuterato [per gli spettri protonici: CDCl_3 : 7.26 ppm; D_2O : 4.68 ppm; CD_3OD : 3.31 ppm]. Le costanti di accoppiamento (J) sono espresse

in Hertz, la molteplicità dei segnali è stata indicata in accordo a quanto segue: **s**: singoletto; **d**: doppietto; **t**: tripletto; **q**: quartetto; **m**: multipletto; **dd**: doppietto di doppietti; **br**: banda allargata; **sa**: singoletto allargato.

b) Spettri con gradiente di campo

Per la registrazione degli spettri con gradiente di campo si è utilizzato lo strumento Bruker Avance 300 (^1H : 300.13 MHz), imponendo un gradiente di campo (*pulse program*: 1edbgp2s1d). Il confronto tra gli spettri NMR senza gradiente e quelli raccolti imponendo il gradiente di campo ha permesso di verificare quali molecole fossero effettivamente legate alle nanoparticelle e quali invece fossero presenti come impurezza nella soluzione.

c) Spettri NMR dopo l'aggiunta di I_2

Si è proceduto ad aggiungere una punta di spatola di I_2 nei tubi NMR usati per le analisi precedenti: dopo 24 ore, tramite lo strumento Bruker Avance 300, (^1H : 300.13 MHz), si sono acquisiti gli spettri ^1H -NMR tradizionali, senza gradiente, relativi a tali prodotti, come ulteriore metodo di caratterizzazione delle nanoparticelle sintetizzate. Questa metodica consente, infatti, di distruggere le nanoparticelle e di calcolare via integrale la quantità di tiolo sul *monolayer* (dopo l'azione dello I_2 , esso sarà probabilmente disolfuro).

d) Spettri di massa

Gli spettri ESI-MS sono stati registrati utilizzando un LC/MS Agilent serie 1100 operante in condizione di infusione in flusso del campione, con ionizzazione di tipo *elettrospray* (ESI) ed analizzatore di massa a trappola ionica (IT).

e) Spettrofotometria UV/Vis

Per la registrazione degli spettri UV/Vis è stato utilizzato lo spettrofotometro Varian Cary 100, equipaggiato con porta-celle termostatato a circolazione d'acqua. Per le misure si sono usate celle di quarzo HELLMA con cammino ottico di 10 mm. Gli spettri si intendono registrati a 25°C.

f) Analisi TEM

Le immagini TEM sono state registrate con un microscopio elettronico Jeol 300 PXTEM.

g) Analisi Termogravimetrica

L'analisi termogravimetrica è stata condotta mediante strumento SDT, modello 2960. Il campione è stato sottoposto in N₂ ad un riscaldamento da 25 a 1200°C, la temperatura è stata fatta variare ad una velocità di 20°C al minuto.

2.6.3 Sintesi dei peptidi

La sintesi dei peptidi descritti in questo capitolo è stata eseguita su fase solida utilizzando un sintetizzatore Zinsser modello Sophas in grado di sintetizzare parallelamente fino a 96 peptidi. Come supporto è stata utilizzata una resina di Wang o HMP della Novabiochem (Läufelfingen, Svizzera) derivatizzata 0.8 mmol/g. Gli amminoacidi utilizzati sono protetti al gruppo α -amminico con 9-Fluorenilmetilossicarbonile (Fmoc) e sono stati acquistati da IRIS Biotech (Iris Biotech GmbH, Waldershof Str. 49-51, D-95615 Marktredwitz, Germany).

Di seguito si riporta un elenco dei reattivi impiegati e le relative quantità:

Solvente:	DMF.
Soluzione Deprotettore:	20% piperidina in DMF.
Resina:	100 mg/peptide WANG RESIN 0.8 mmol/g.
Attivatore:	DIC/HOBt per il primo <i>coupling</i> ; HBTU per i successivi.
Amminoacidi:	N α -Fmoc-protetti, in eccesso di 5 volte, protetti in catena laterale da gruppi acido-labili.
Miscela di <i>capping</i>:	1:1 (V/V) Ac ₂ O:Pyr.

REATTIVO	MW (Da)	mmol/coupling	mg/coupling
Fmoc-(L)Asp(OtBu)-OH	411.45	0.4	164.6
Fmoc-(L)Trp(Boc)-OH	526.58	0.4	210.6
Fmoc-(L)His(Mtt)-OH	633.71	0.4	253.48
DIC	126.20 ($\rho = 0.806$ g/ml)	0.4	63 μ L
HOBt	135.12	0.4	54.0
HBTU	379,35	0.4	151.7

Una volta conclusa la sintesi, si esegue il *cleavage* della peptidil-resina. Tale reazione, essendo esotermica, viene favorita dall'estemporaneo raffreddamento in ghiaccio della miscela di sblocco per 5 minuti. Quest'ultima è composta da TFA 92% (V/V), EDT 2.5% (V/V), TIPS 3% /V/V) e H₂O 2.5% (V/V). La miscela di sblocco viene utilizzata in quantità tale da ottenere una concentrazione di resina pari a 33 mg/ml. Il TFA crea l'ambiente acido necessario per il distacco del peptide dalla resina, mentre EDT, TIPS ed acqua funzionano da *scavengers* neutralizzando le specie reattive (carbocationi) createsi durante lo sblocco. La reazione di sblocco prosegue per 90 minuti sotto costante agitazione, quindi si esegue la precipitazione del peptide in Dietiletere mantenuto a 0°C al fine di minimizzarne la solubilità. Si eseguono, infine, ulteriori lavaggi con altro etere freddo in modo da eliminare eventuali sottoprodotti co-precipitati con il peptide. Il precipitato ottenuto è essiccato in corrente d'azoto, sciolto nuovamente in una quantità minima d'acqua (eventualmente si aggiunge CH₃CN per favorire la solubilizzazione) ed è, quindi, pronto per le caratterizzazioni.

2.6.4 Metodologie di purificazione e caratterizzazione dei peptidi

a) Purificazione RP-HPLC preparativa

Le purificazioni RP-HPLC sono state eseguite con apparato preparativo Shimadzu LC-8A equipaggiato con *detector* UV Shimadzu SPD-20A. La colonna scelta è una Phenomenex Jupiter Proteo C18 (4 μ m, 90Å, 250 x 21.2 mm) utilizzata ad un flusso di 17 mL/min. Gli eluenti impiegati sono H₂O + 0.1% CF₃COOH (A) e CH₃CN + 0.1%

CF₃COOH (B). La purificazione è stata condotta con un gradiente 5-45% di B in 30 min ad una lunghezza d'onda $\lambda_{\text{det}} = 226$ nm.

b) Caratterizzazione RP-UHPLC

Le analisi RP-UHPLC hanno permesso non solo di definire il grado di purezza e la massa dei peptidi sintetizzati, ma anche la concentrazione delle soluzioni dei peptidi grazie all'utilizzo dello *standard* interno Ac-Trp-OEt.

Lo strumento è un sistema UHPLC Agilent Infinity 1290 accoppiato ad un analizzatore di massa quadrupolare SQP Agilent 6130. La colonna impiegata è un'Agilent Zorbax RRHP Eclipse Plus C18 (2.1 x 100 mm, 1.8 μm) tenuta ad una temperatura costante di 40°C. Il flusso utilizzato è 0.2 mL/min. Gli eluenti sono H₂O + 0.1% HCOOH (A) e CH₃CN + 0.1% HCOOH (B). Il gradiente usato è 2-32% di B in 10. Il *Diode Array Detector* (DAD) ha permesso un'analisi a due lunghezze d'onda (226 e 280 nm) ed una contemporanea scansione dello spettro da 350 a 240 nm. Assieme ai peptide è stato co-iniettato Ac-Trp-OEt ad una [C]_f nota di 180 μM per determinare direttamente la concentrazione dei peptidi che vengono miscelati 1:10 con la soluzione dello *standard*. Dal confronto delle aree sottese dai picchi cromatografici è stato possibile risalire alla concentrazione.

c) Determinazione della massa esatta

La massa esatta dei peptidi è stata determinata con spettrofotometro Mariner ESI-TOF mediante infusione diretta del campione ad un flusso di 0.05 ml/min. La fase mobile scelta è una miscela 1:1 di H₂O e CH₃CN contenente 0.1% di HCOOH. Gli spettri m/z sono stati, perciò, acquisiti in positivo ottenendo gli ioni 1⁺ o 2⁺.

2.6.5 Studi di binding

Tutti gli studi di *binding* sono stati condotti su fluorimetro Varian Cary Eclipse eccitando a 280 nm ed andando a misurare l'emissione di fluorescenza a 360 nm. Le *slits* utilizzate sono 5/20 nm. Gli esperimenti sono stati condotti in tampone HEPES 10 mM, pH 7.0 aggiungendo un 10% V/V di CH₃CN per simulare le condizioni sperimentali cinetiche. La temperatura è stata regolata a 37°C. In cuvetta viene utilizzato un volume finale di 3 ml contenente una concentrazione di 60 μM NR₄⁺-AuNPs riferita alle teste ammoniche. Tale

concentrazione è ottenibile utilizzando uno 0.5% V/V (15 μL) della soluzione *stock* di nanoparticelle. A questa soluzione, dopo misurazione del bianco, vengono aggiunte di volta in volta quantità crescenti del peptide in esame. Generalmente si usano soluzioni 300 μM e si aggiungono i seguenti volumi: 2 μL x 5; 5 μL x 2; 10 μL x 10. Alla fine il volume aggiunto raggiunge i 120 μL determinando una diluizione finale del 4%. Tale diluizione deve essere di volta in volta considerata al momento dell'elaborazione dei dati. Infatti:

$$Fluo_{corr} = Fluo_{exp} \times (V_{add}/V_{init})$$

Perciò, la fluorescenza corretta è pari alla fluorescenza sperimentale moltiplicata per il rapporto tra il volume raggiunto all'aggiunta in esame e il volume iniziale.

La determinazione della concentrazione di saturazione è stata fatta in due modi: a) per estrapolazione della regione lineare della curva di titolazione e b) per *fitting* della curva su un modello di *binding*. Entrambi i modi portano a valori molto simili. In figura 2.25 sottostante viene mostrato un esempio generale di titolazione.

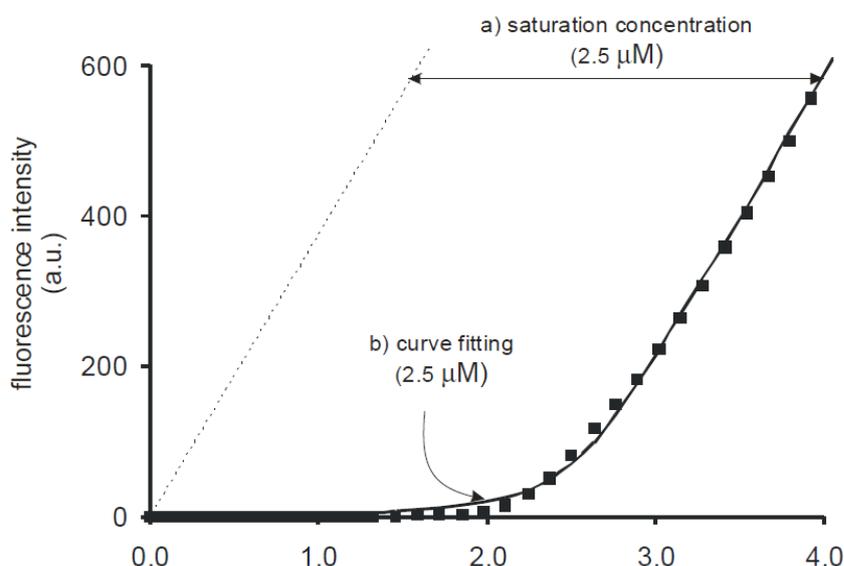


Figura 2.25: Grafico illustrativo per la determinazione della C_{sat} per il *binding* dei peptidi sulle nanoparticelle con metodologia di estrapolazione o per *fitting*.

a) Estrapolazione

Una volta raggiunta la saturazione delle nanoparticelle, il fluoroforo rimane in soluzione determinando un incremento lineare dell'intensità di fluorescenza. La retta ottenuta dalla regione lineare ha equazione generale:

$$Fluo = a[C] - b$$

Estrapolando il valore di [C] per Fluo uguale a 0 si ottiene il valore di C_{sat} pari a b/a .

b) Fitting

I punti sperimentali sono stati interpolati con un modello di *binding* 1:1 utilizzando il programma Micromath Scientist per piattaforma Windows, versione 2.01. Di seguito riportiamo la stringa di programmazione impiegata:

```
// MicroMath Scientist Model File
IndVars: Fluo0
DepVars: Fi, Fluo, NPs, NPsFluo
Params: x, K, NPs0
NPFluo=K*NPs*Fluo
Fluo=Fluo0-NPsFluo
NPs=NPs0-NPsFluo
Fi=x*Fluo
// constraints
0<Fluo<Fluo0
0<NPs<NPs0
0<NPsFluo<NPs0
***
```

2.6.6 Studi cinetici

Tutti gli studi cinetici sono stati condotti nelle medesime condizioni:

- $[\text{NR}_4^+ \text{-AuNPs}] = 60 \mu\text{M}$ (concentrazione riferita ai gruppi ammoniacali);
- $[\text{H}_0] = 11.0 \mu\text{M}$ per tutti gli esperimenti;
- $[\text{H}_1] = 11.0 \mu\text{M}$ oppure $4.75 \mu\text{M}$ in ragione delle evidenze meccanicistiche ottenute;
- $[\text{H}_2] = 9.0 \mu\text{M}$;
- $[\text{H}_3] = 8.4 \mu\text{M}$;

Tutte le soluzioni *stock* dei suddetti peptidi sono in tampone HEPES 10 mM, pH 7.0. Allo stesso modo, gli esperimenti sono condotti in tampone HEPES 10 mM, pH 7.0 aggiunto di un 9% di acetonitrile. La temperatura è regolata a 37°C. Lavorando con un volume finale di 1 ml, si aggiungono, 900 μl di tampone e 90 μl di solvente organico. I rimanti 10 μl vengono dalle soluzioni *stock* del substrato 1 mM in Acetonitrile ottenendo quindi una $[\text{Substrato}]_t = 10 \mu\text{M}$.

Gli esperimenti cinetici sono stati condotti su spettrofotometro Varian Cary 100 misurando l'assorbanza a 400 nm. In particolare prima dell'aggiunta del substrato, si misura il segnale di base per 5 minuti in modo da avere un *blank* esatto da poter sottrarre. Una volta aggiunto il substrato le cinetiche sono condotte mediamente per un'ora ad eccezione degli esperimenti in cui si effettuano aggiunte multiple.

Le curve cinetiche ottenute sono elaborate con il programma Origin Pro 8.0 applicando il seguente modello di *fitting*:

$$y = A_1 - A_2^{-kx}$$

Il valore di k corrisponde alle k_{obs} riportate.

2.6.7 Studi condotti a pH diversi

Gli studi di fluorescenza intrinseca in funzione del pH condotti a carico dei peptidi H₀-H₃ e gli studi meccanicistici con Blu di bromotimolo sono stati eseguiti con due tipologie di tamponi. Per pH acidi si è utilizzato tampone MES (Acido 2-(*N*-morfolino)etansolfonico) 10 mM regolato con NaOH a pH 6.0 e 6.5; per i pH neutro-alcalini si è utilizzato tampone HEPES (Acido 2-[4-(2-idrossietil)piperazin-1-il]etansolfonico) 10 mM regolato con NaOH a pH 7.0, 7.5, 8.0.

Lo strumento impiegato per gli studi di fluorescenza in funzione del pH è il fluorimetro Varian Cary Eclipse eccitando a 280 nm e misurando l'intensità di fluorescenza da 310 a 500 nm impiegando *slits* 5/20 nm.

Lo strumento impiegato per gli studi meccanicistici di pH con Blu di bromotimolo è lo spettrofotometro Varian Cary 100 andando a misurare l'assorbanza da 300 a 800 nm.

2.7 Riferimenti

- [1] Zaramella, D., Scrimin, P. and Prins L.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8396–8399.
- [2] Manea, F., Bindoli, C., Polizzi, S., Lay L. and Scrimin, P. *Langmuir* **2008**, *24*, 4120-4124.
- [3] Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. and Whyman, R. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1994**, 801-802.
- [4] Manna, L., Scher, E. and Alivisator, A.P. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122-127.
- [5] Pasquato, L., Rancan, F., Scrimin, P., Mancin, F. and Frigeri, C. *Chem. Commun.* **2000**, 2253.
- [6] Bonomi, R., Cazzolaro, A. and Prins, L.J. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 445.
- [7] Merrifield, R., B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
- [8] Dulkeith, E., Morteani, A. C., Niedereichholz, T., Klar, T. A., Feldmann, J., Levi, S. A., Van Veggel, F., Reinhoudt, D. N., Moller, M. and Gittins, D. I. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89*.
- [9] Pieters, G., Cazzolaro, A., Bonomi, R. and Prins, L. *J. Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1916.
- [10] Fornasier, R. and Tonellato, U. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *76*, 1301.
- [11] Bunton, C.A., Nome, F., Quina, F.H. and Romsted, L.S. *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 357.
- [12] Guler, M.O. and Stupp S.I. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12082.
- [13] Delort, E., Darbre, T. and Reymond, J.L. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15642.
- [14] Zaupa, G., Mora, C., Bonomi, R., Prins, L.J. and Scrimin, P. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 4879.
- [15] Zaupa, G., Scrimin, P. and Prins, L.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5699.
- [16] Pengo, P., Polizzi, S., Pasquato, L. and Scrimin, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1616.
- [17] Guarino, G., Rastrelli, F. and Mancin, F. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1523.

3. Relazione Struttura Attività del sistema catalitico auto-assemblante

Una volta ottenuto il sistema *lead* si è voluto scendere nel dettaglio per comprendere le intime peculiarità che lo caratterizzavano come importanza della natura del substrato, importanza della natura dell'emi-catalizzatore peptidico ed importanza della natura della superficie cationica^[1]. Analogamente ad un enzima naturale, tale sistema si è dimostrato avere dei precisi requisiti per quanto riguarda le caratteristiche dei substrati che ad esso si vanno a legare. Substrati piccoli ed idrosolubili si legano meno e sono scarsamente idrolizzati; substrati grandi e dotati di porzioni idrofobiche (meglio se aromatiche) si comportano da *binders* efficienti e subiscono molto più facilmente l'idrolisi. Inoltre, nonostante gli sforzi, il sistema non si è dimostrato poter discriminare fra gli enantiomeri del medesimo substrato aprendo le porte ad un'ulteriore sfida: l'enantioselettività.

Anche la sequenza dell'emi-catalizzatore peptidico gioca un ruolo fondamentale nell'efficienza della catalisi con dei requisiti molto stringenti per quanto riguarda l'ordine dei singoli ammino-acidi.

Infine, studi molto recenti hanno anche dimostrato l'importanza della natura della superficie cationica. Poiché alcune evidenze hanno suggerito una certa affinità dei substrati per la superficie delle nanoparticelle, è auspicabile l'ottenimento dell'enantioselettività agendo selettivamente sul *binding*.

3.1 Relazione Struttura-Attività del catalizzatore peptidico H₁

Dopo i risultati riguardanti il funzionamento del sistema catalitico supramolecolare *in toto* si è reso necessario indagare le intrinseche peculiarità dei componenti del sistema. In particolare, il peptide catalitico Ac-HWDDD-OH (H₁), divenuto ormai il peptide di riferimento, è stato caratterizzato dal punto di vista della Relazione Struttura Attività. Si è già visto come l'aumento del numero d'Istidine influenzi solamente in termini lineari l'incremento di attività catalitica. Ciò rende superfluo lavorare con peptidi poli-istidinici non solo perché il rapporto tra k_2 e numero d'Istidine è pari a quello del peptide con residuo unitario, ma anche perché all'aumentare del numero di residui diminuisce l'affinità del peptide per le nanoparticelle. Restano, tuttavia, insoluti gli aspetti riguardanti l'effetto

del Triptofano, l'ordine della sequenza *N*-terminale e la distanza del residuo d'Istidina dalla superficie cationica. Si è reso, quindi, necessario sintetizzare una serie di mutanti che andassero a incidere su queste particolari caratteristiche: H₁r, H₁G e H₁Gr (Figura 3.1).

3.1.1 Sintesi e caratterizzazione dei mutanti del peptide H₁

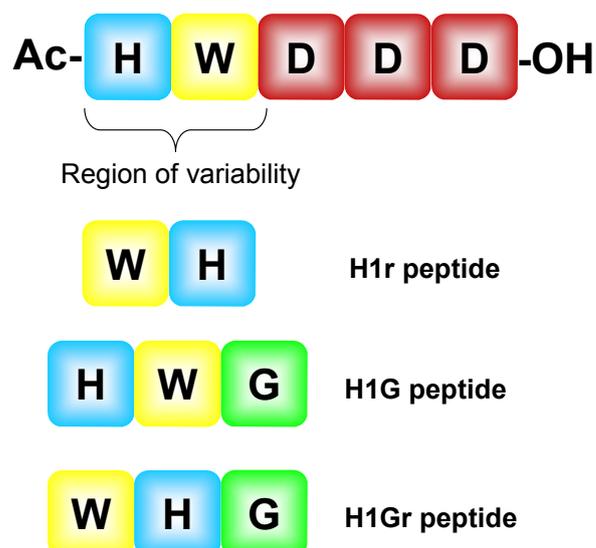


Figura 3.1: Schema dei mutanti strutturali del peptide H₁: H= Istidina; W= Triptofano; D= Acido aspartico; G= Glicina.

Il protocollo sintetico utilizzato è quello già descritto in precedenza per la sintesi dei peptidi H₀-H₃^[2]. Al termine della sintesi i peptidi sono stati rimossi dalla resina e deprotetti mediante idrolisi acida per Acido trifluoroacetico (TFA) al 95% in presenza di un 5% di acqua come *scavenger* per i carbocationi *terz*-butilici generatisi dell'idrolisi dei gruppi protettori delle catene laterali (Istidina e Triptofano Boc-protetti; Acido aspartico tBu-protetto). L'isolamento e la purificazione dei peptidi sono stati compiuti, rispettivamente, per precipitazione in etere dietilico freddo e per cromatografia HPLC a fase inversa. Di seguito sono riportati i cromatogrammi e gli spettri *m/z* con relativa tabella delle masse dei tre mutanti sintetizzati (Figure 3.2 e tabella 3.1)

3. Relazione Struttura-Attività del sistema catalitico auto-assemblante

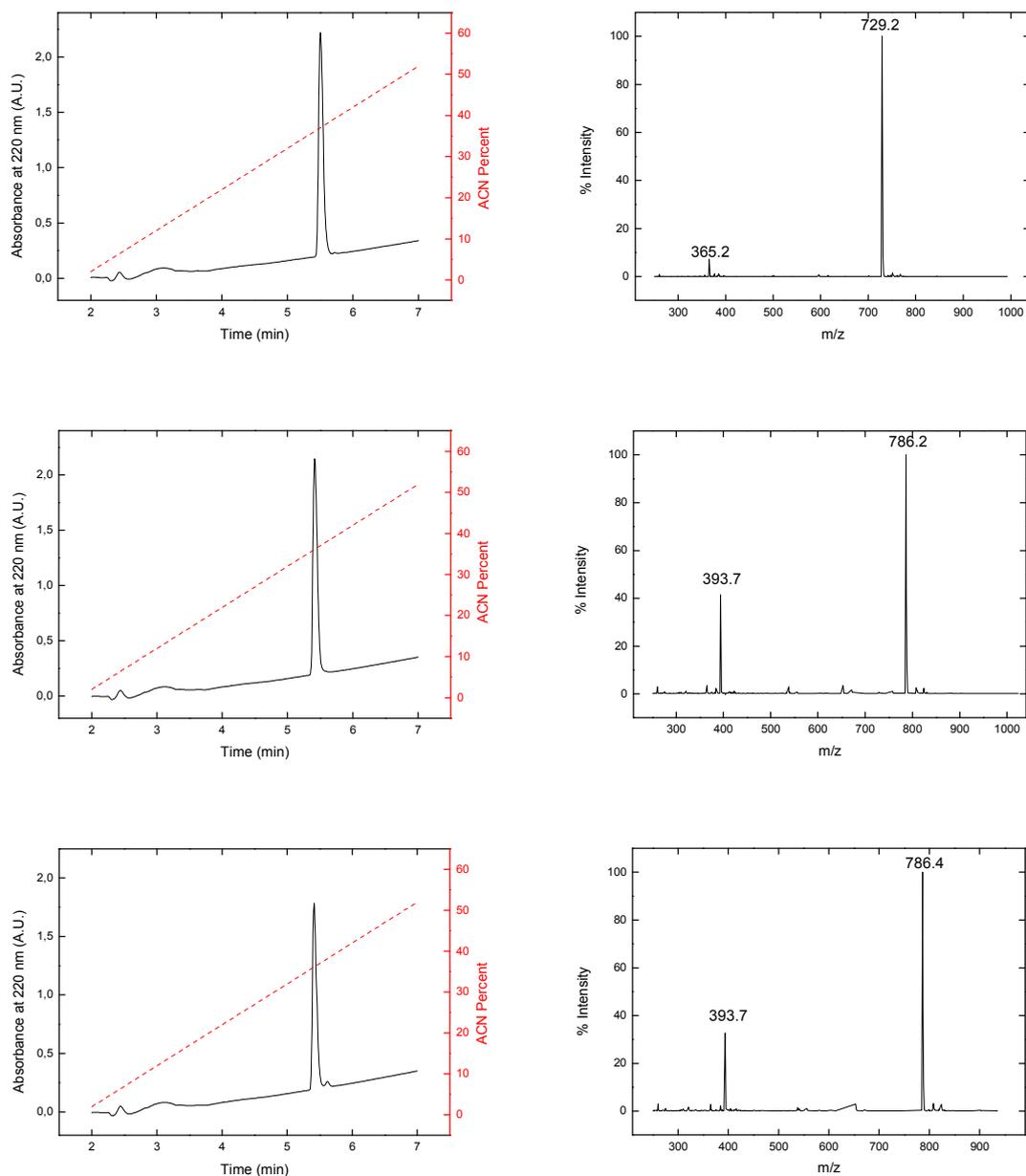


Figura 3.2: Caratterizzazione RP-UHPLC (sinistra) e MS/SQP (destra) dei peptidi sintetizzati. **In alto** H_{1r}; **al centro** H_{1G}; **in basso** H_{1Gr}. Viene mostrato il cromatogramma a 220 nm unitamente alla rampa di gradiente utilizzata. Gradiente in CH₃CN dal 2 al 52% in 5 minuti. 0.1% HCOOH. Flusso 0.2 ml/min.

Sequence	Theoretical _{mono} M.W. (Da)	Experimental M.W. (Da)	Δm (Da)
<i>Ac-WHDDD-OH (H_{1r})</i>	728.229	728.205	-0.024
<i>Ac-HWGDDD-OH (H_{1G})</i>	758.251	785.236	-0.015
<i>Ac-WHGDDD-OH (H_{1Gr})</i>	758.251	785.362	+0.111

Tabella 3.1: Valori di massa teorici e sperimentali per i peptidi sintetizzati; a destra viene mostrata la loro differenza.

Si osservi che i valori di massa sperimentale tabulati non sono quelli riportati nei grafici sopra. La ragione è che il sistema SQP utilizzato è sensibile solamente fino alla prima cifra decimale. E' stata, perciò, eseguita un'analisi separata con sistema ESI/TOF sensibile fino alla quarta cifra decimale i cui risultati sono stati riportati in tabella.

3.1.2 Studi di binding sui mutanti del peptide H₁

Prima di procedere con gli esperimenti di cinetica d'idrolisi, è stato necessario conoscere la concentrazione alla quale questi peptidi saturano la superficie delle nanoparticelle (C_{sat}). Si è eseguita una titolazione fluorimetrica in 10 mM tampone HEPES, pH 7.0 e 10% CH₃CN a una concentrazione di nanoparticelle di 60 μ M (riferita alle teste ammoniche) aggiungendo, dopo la misurazione del bianco, aliquote di una soluzione *stock* del peptide in esame. Ciò che si osserva è un iniziale *plateau* della fluorescenza dovuto al *binding* dei peptidi sulle nanoparticelle con conseguente *quenching* della fluorescenza del Triptofano; successivamente, la fluorescenza aumenta in ragione di un'avvenuta saturazione delle nanoparticelle e conseguente presenza di Triptofano libero in soluzione. Dalle isoterme di *binding* si sono ottenuti i valori di saturazione della superficie secondo una procedura già descritta in letteratura (Figura 3.3 e tabella 3.2)^[3].

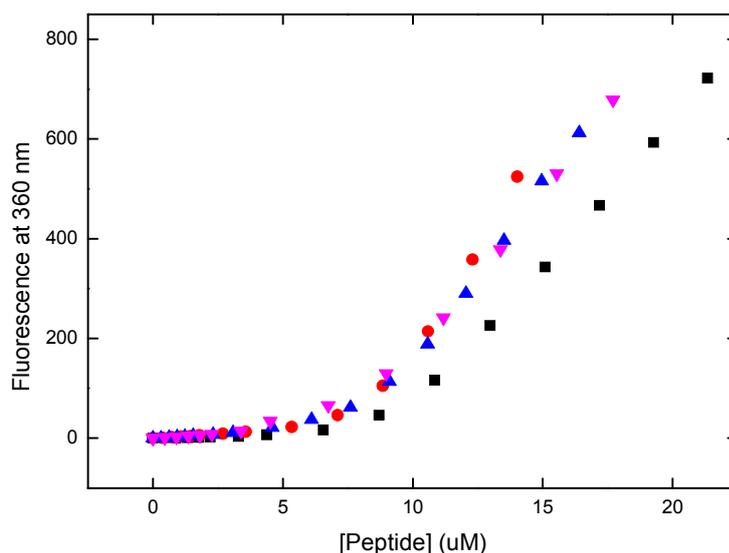


Figura 3.3: Fluorescenza a 360 nm in funzione dell'aggiunta di peptidi a 60 μ M di nanoparticelle d'oro (riferita alle teste ammoniche). 10 mM tampone HEPES, pH 7.0, 10% CH₃CN. T= 37°C. λ_{ex} = 280 nm; λ_{em} = 360 nm. *Slits* 5/20 nm. ■ H1; ● H1r; ▲ H1G; ▼ H1Gr.

3. Relazione Struttura-Attività del sistema catalitico auto-assemblante

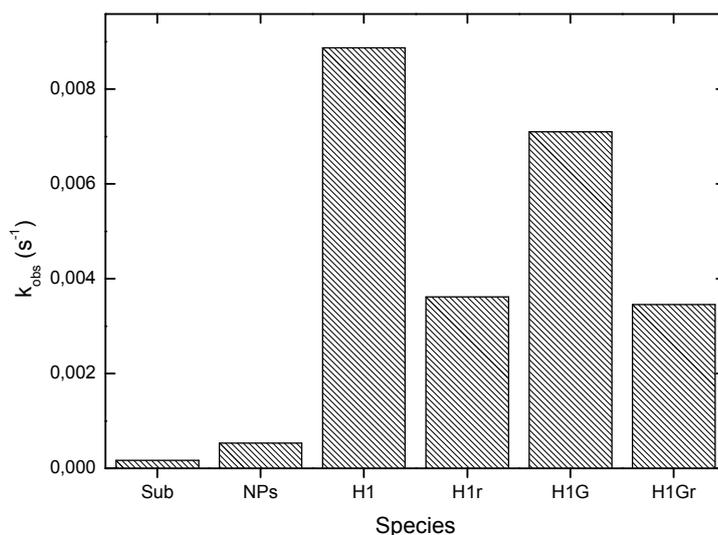
	H ₁ ■	H ₁ r ●	H ₁ G ▲	H ₁ Gr ▼
[C] _{sat} (μM)	9.5 ± 0.20	8.6 ± 0.15	8.5 ± 0.20	7.8 ± 0.18

Tabella 3.2: Valori di C_{sat} per il *binding* dei peptidi a 60 μM di nanoparticelle d'oro. Si osservi la differenza di C_{sat} rilevata per H₁ rispetto al valore finora utilizzato (11 μM): ciò è dovuto al differente *batch* di nanoparticelle utilizzato. 10 mM tampone HEPES, pH 7.0, 10% CH₃CN. T= 37°C.

La prima doverosa osservazione va fatta in merito alla diversa C_{sat} trovata per H₁ rispetto al valore fino ad ora impiegato (11 μM): ciò è dovuto al differente *batch* di nanoparticelle utilizzato ed anche a piccole imprecisioni nella determinazione della concentrazione delle teste ammoniche. Già da questi primi studi si possono trarre alcune conclusioni in merito al ruolo del Triptofano. Esso sembra essere implicato in maniera sussidiaria nel *binding* alle nanoparticelle. Infatti, osservando le curve contestualmente ai valori di C_{sat} tabulati, si rileva come l'affinità sia molto simile tra i peptidi, ma che la C_{sat} venga, in un qualche modo modificata in relazione alla posizione del medesimo Triptofano: maggiore la distanza di questo ammino-acido dalla superficie e minore la C_{sat} del peptide *in toto*. Ciò è nettamente confermato dai peptidi H₁r e H₁G che, pur avendo sequenze differenti, vedono il Triptofano alla stessa distanza dalla coda C-terminale e dimostrano, infatti, la medesima C_{sat} . A ulteriore conferma, il peptide H₁Gr, che presenta il Triptofano traslato di due posizioni rispetto alla coda C-terminale, risulta essere il peptide con la minore C_{sat} .

3.1.3 Studi cinetici sui mutanti del peptide H₁

L'efficienza catalitica dei nuovi peptidi è stata saggiata in esperimenti di cinetica in cui concentrazioni pari a $C_{\text{sat}}/2$ degli stessi peptidi sono aggiunte a 60 μM di nanoparticelle. L'utilizzo di concentrazioni sub-saturanti è motivato da quanto già visto sopra in figura 2.21. Il sistema è auto-assemblato in 10 mM HEPES pH 7.0 e 10% CH₃CN per favorire la solubilizzazione del substrato. La temperatura è regolata a 37 °C. Il substrato *N*-CBz-(D)Phe-ONP viene aggiunto dopo un'iniziale misurazione dell'assorbanza di base ad una concentrazione di 10 μM e monitorando il rilascio di *p*-Nitrofenato ($\lambda_{\text{max}} = 400 \text{ nm}$; $\epsilon_{400} = 10000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Al termine degli esperimenti, dalle curve ottenute si calcolano i valori di k_{obs} e si confrontano con i valori del sistema contenente il peptide H₁ (Figura 3.4 e tabella 3.3).



	Background	NPs	H1	H1r	H1G	H1Gr
$k_{obs} \times 10^{-3} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	0.16 ± 0.015	0.53 ± 0.006	8.88 ± 0.051	3.61 ± 0.019	7.10 ± 0.042	3.46 ± 0.012
Ratio ($k_{obs} \times / k_{obs \text{ H1}}$)	0.018	0.060	1	0.407	0.799	0.309

Figura 3.4 e tabella 3.3: k_{obs} per l'idrolisi di 10 μM *N*-CBZ-(D)Phe-ONP. In tabella viene anche mostrato il rapporto tra k_{obs} dei mutanti ed H₁ medesimo. Come riferimento sono riportate le k_{obs} del *background* del solo substrato e del medesimo substrato in presenza delle nanoparticelle. [NR₄⁺-AuNPs]= 60 μM (riferita alle teste ammoniche). [H₁]= 4.75 μM ; [H_{1r}]= 4.3 μM ; [H_{1G}]= 4.25 μM ; [H_{1Gr}]= 3.9 μM . 10 mM tampone HEPES, pH 7.0, 10% CH₃CN. T= 37°C.

Da quanto emerso risulta chiaro che la posizione dell'Istidina è cruciale per le proprietà catalitiche del peptide stesso. Infatti, sembra necessario che essa si trovi il più possibile vicina alla superficie cationica costituita dai gruppi ammoniacali e, d'altro canto, il più possibile libera da impedimenti sterici. Il peptide H_{1r}, ad esempio, pur avendo l'Istidina più vicina al monostato carico dimostra un'efficienza catalitica più che dimezzata rispetto a H₁ e ciò è probabilmente dovuto all'ingombro del residuo indolico in posizione *N*-terminale. Analogamente, H_{1G} presenta una k_{obs} di poco inferiore rispetto a H₁ perché, anche se il residuo di Glicina allontana l'Istidina dalla superficie (minore influenza del pH locale), quest'ultima non è stericamente ingombrata come nel caso di H_{1r}. H_{1Gr}, che somma entrambi gli aspetti negativi per la catalisi, ha una k_{obs} simile a quella osservata per H_{1r} e ciò suggerisce la maggior influenza dell'ingombro sterico rispetto alla distanza dalla superficie della nanoparticella.

3.2 Relazione Struttura-Attività del substrato

Come già visto in figura 2.22, il substrato *N*-CBz-(D)Phe-ONP si dimostra intrinsecamente affine al sistema catalitico al punto da poter ipotizzare un evento di *binding*. Si è, quindi, reso necessario esplorare le intrinseche peculiarità che fanno del substrato un valido elemento del sistema prendendo come riferimento l'ormai noto *p*-nitrofenil estere della (D)Fenilalanina *N*-CBz-protetta. In particolare, ci si è concentrati su due aspetti fondamentali: natura e dimensioni della catena laterale e natura e dimensioni del gruppo protettore dell' α -ammina (Figura 3.5).

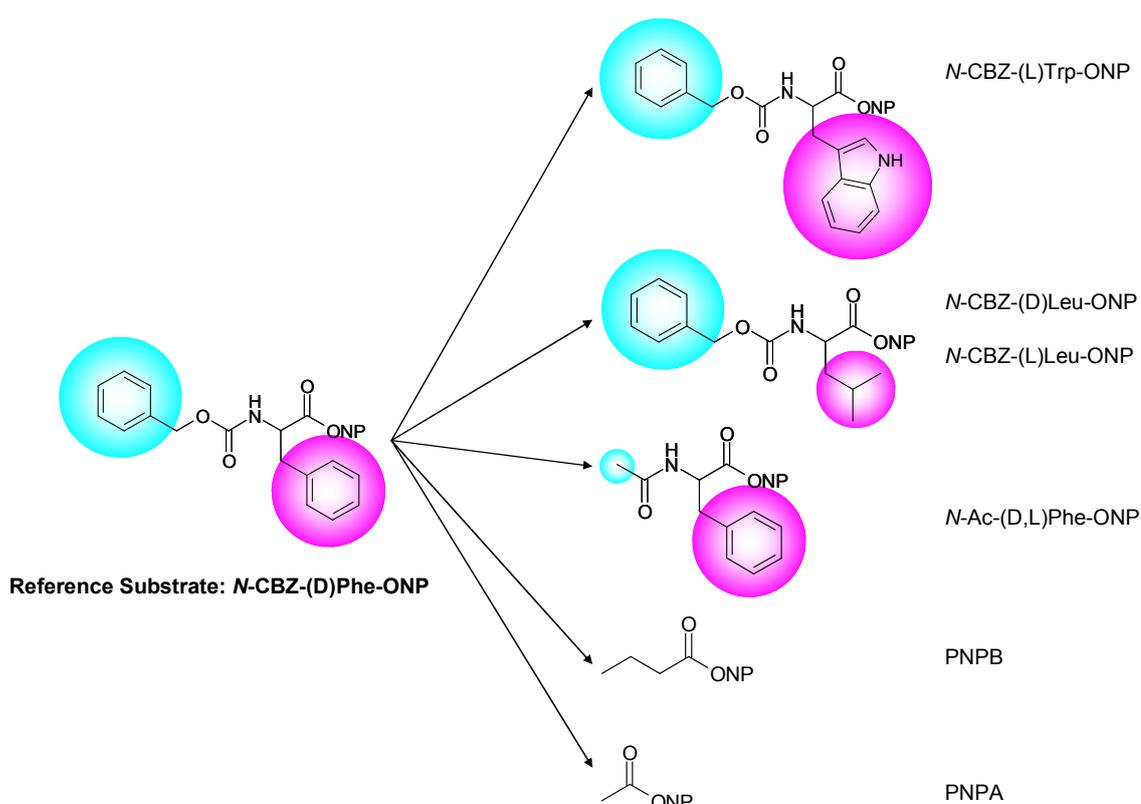


Figura 3.5: Schema rappresentativo dei substrati impiegati per lo studio SAR. Si osservi la progressiva variazione nella natura e nelle dimensioni della catena laterale e del gruppo protettore dell' α -ammina passando da Triptofano a PNPA.

Come si può vedere, rispetto al substrato di riferimento, tali variazioni sono state prese in considerazione sia singolarmente, come nei casi dei substrati derivati da Triptofano, Leucina e Fenilalanina, che contemporaneamente, come per PNPB e PNPA. Per quanto riguarda il substrato di derivazione leucinica la scelta di due enantiomeri è stata fatta per valutare preliminarmente se il sistema potesse esibire una certa enantioselettività.

3. Relazione Struttura-Attività del sistema catalitico auto-assemblante

Analogamente a quanto visto in precedenza sono stati eseguiti esperimenti cinetici per ottenere le k_{obs} di detti substrati sia in quanto tali, che in presenza del peptide H₁, delle nanoparticelle e del peptide H₁ legato alle nanoparticelle; inoltre, come ulteriore controllo è stato anche saggiato il sistema H₀/NR₄⁺-AuNPs (Figura 3.6 e tabella 3.4).

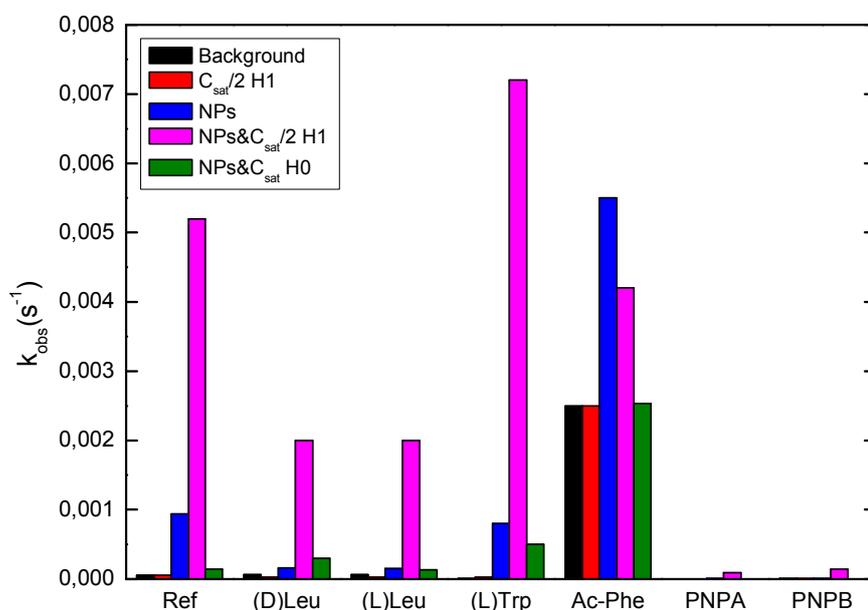


Figura 3.6: k_{obs} per le cinetiche d'idrolisi di sei differenti substrati. ■ background; ■ substrato/H₁; ■ substrato/NR₄⁺-AuNPs; ■ substrato/NR₄⁺-AuNPs/H₁; ■ substrato/NR₄⁺-AuNPs/H₀. [NR₄⁺-AuNPs]= 60 μM (riferita alle teste ammoniche). [H₁]= 4.75 μM. [H₀]= 11 μM. [Substrati]= 10 μM. 10 mM HEPES, pH 7.0, 10% CH₃CN. T= 37°C.

Substrate	k_{obs} Values (s ⁻¹)				
	Background	H1	NPs	NPs/H1	NPs/H0
<i>N</i> -CBZ-(<i>D</i>)Phe-ONP (Ref.)	0.05 E-03	0.05 E-03	0.94 E-03	8.9 E-03	0.14 E-03
<i>N</i> -CBZ-(<i>D</i>)Leu-ONP	0.06 E-03	0.03 E-03	0.16 E-03	2.0 E-03	0.30 E-03
<i>N</i> -CBZ-(<i>L</i>)Leu-ONP	0.06 E-03	0.03 E-03	0.15 E-03	2.0 E-03	0.13 E-03
<i>N</i> -CBZ-(<i>L</i>)Trp-ONP	0.009 E-03	0.03 E-03	0.8 E-03	7.2 E-03	0.50 E-03
<i>N</i> -Ac-(<i>D,L</i>)Phe-ONP	2.5 E-03	2.5 E-03	5.5 E-03	4.2 E-03	2.53 E-03
PNPA	0.002 E-03	-	0.01 E-03	0.09 E-03	-
PNPB	0.008 E-03	0.008 E-03	0.01 E-03	0.14 E-03	-

Tabella 3.4: valori di k_{obs} per tutti i substrati considerati e nelle differenti condizioni. Per confronto sono presentati anche i valori del substrato di riferimento *N*-CBZ-(*D*)Phe-ONP. Ove non riportati, i valori di k_{obs} non sono stati ottenibili dato il valore estremamente basso e l'incertezza.

Ciò che emerge immediatamente è l'elevata instabilità del substrato *N*-Ac-(D,L)Phe-ONP anche in assenza di qualsiasi catalizzatore a fronte di una relativa stabilità degli altri substrati in quanto tali o in presenza del peptide H₁. Poiché la sola differenza con il substrato di riferimento *N*-CBz-(D)Phe-ONP è il gruppo protettore dell' α -ammina, quest'ultimo sembra essere cruciale per la stabilità all'idrolisi della molecola.

D'altro canto emerge una forte inerzia chimica di PNPB e PNPA anche in presenza di nanoparticelle o nanoparticelle e H₁. Questo conferma definitivamente le ipotesi di lavoro riguardanti la necessità di un substrato idrofobico per avere un'interazione positiva con il catalizzatore. A riprova di una tale assunzione vi è il fatto che PNPB, più lipofilo di PNPA, viene idrolizzato più velocemente del suo omologo inferiore.

Inoltre, sempre a tal proposito, si osservi il caso dei substrati *N*-CBz-(L)Trp-ONP e *N*-CBz-Leu-ONP: il primo è idrolizzato più efficacemente in presenza di nanoparticelle (k_{obs} = 0.8 E-03 vs 0.15 E-03) e ciò probabilmente in relazione alla presenza di una catena laterale più ingombrante e planare, in grado, quindi, di intercalarsi nel *core* alchilico delle nanoparticelle.

Infine, il sistema non si dimostra enantioselettivo per gli enantiomeri di *N*-CBz-Leu-ONP che mostrano curve d'idrolisi perfettamente sovrapposte.

Il substrato *N*-CBz-(L)Trp-ONP ha permesso uno studio più dettagliato del sistema in quanto la sua idrolisi porta alla formazione del cromoforo *p*-Nitrofenato e del fluoroforo *N*-CBz-(L)Trp-OH: è, quindi, un substrato contemporaneamente cromogenico e fluorogenico. Tra l'altro, la fluorescenza è visibile solamente a seguito dell'idrolisi in ragione del *quenching* che il fluoroforo subisce quando si trova unito al *p*-Nitrofenile. In questo modo, è stato possibile monitorare l'idrolisi di detto substrato sia misurando l'emissione di fluorescenza a 360 nm che l'assorbimento a 400 nm. Sono stati condotti 4 cicli catalitici aggiungendo di volta in volta 10 μ M del substrato. I profili risultanti in figura 3.7a sono sovrapposti e, unitamente al *turnover* osservato, dimostrano ancora una volta l'effettivo potere catalitico del sistema. Il fatto che si osservino valori di k_{obs} leggermente più bassi per la cinetica seguita tramite fluorescenza rispetto a quelli misurati per assorbanza potrebbe essere una prova del *binding* del fluoroforo al monostrato cationico. Questo spiegherebbe la diminuzione costante che si osserva nelle costanti passando da un ciclo cinetico al successivo (vedi anche figura 2.16). Perciò è stato eseguito uno studio di *binding* di *N*-CBz-(L)Trp-OH (ottenuto per idrolisi in NaOH 1 M e successiva purificazione RP-HPLC) analogo a quelli già visti: la curva ottenuta devia dalla linearità nel *range* 0-10 μ M il che è indicativo di una qualche debole interazione in ragione,

presumibilmente, della carica negativa e della catena laterale idrofobica (Figura 3.7b). Tutto ciò va a discapito dell'interazione tra il catalizzatore ed il substrato di partenza risultando nel calo dei valori di k_{obs} già discusso.

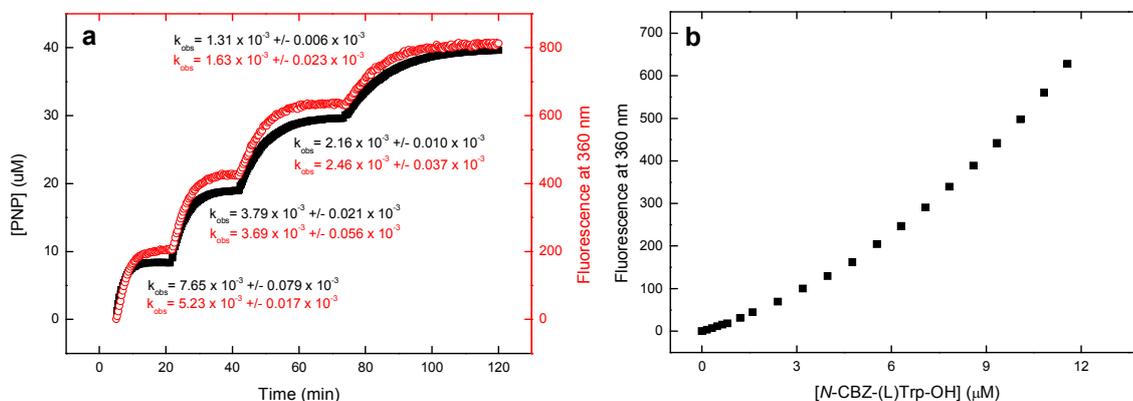


Figura 3.7: **a)** Variazioni nell'assorbanza a 400 nm (nero) e nell'intensità di fluorescenza a 360 nm (rosso) in seguito a quattro aggiunte consecutive di substrato *N*-CBz-(L)Trp-ONP ($4 \times 10 \mu\text{M}$) ad una soluzione di NR_4^+ -AuNPs. $[\text{NR}_4^+\text{-AuNPs}] = 60 \mu\text{M}$ (riferita alle teste ammoniche). $[\text{H}_1] = 4.75 \mu\text{M}$. 10 mM HEPES, pH 7.0, 10% CH_3CN . $T = 37^\circ\text{C}$. $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$. Slits 5/20 nm. **b)** Intensità di fluorescenza a 360 nm per *N*-CBz-(L)Trp-OH in presenza di NR_4^+ -AuNPs (60 μM). 10 mM HEPES, pH 7.0, 10% CH_3CN . $T = 37^\circ\text{C}$. $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$. Slits 5/10 nm.

3.3 Parte Sperimentale

Per informazioni circa reagenti e strumentazione di faccia riferimento alla sezione 2.6 a pagina 64. Ci si limiterà in questa sezione a descrivere la sintesi dei mutanti del peptide H_1 .

3.3.1 Sintesi dei peptidi

La sintesi dei peptidi descritti in questo capitolo è stata eseguita su fase solida utilizzando un sintetizzatore Zinsser modello Sophas in grado di sintetizzare parallelamente fino a 96 peptidi. Come supporto è stata utilizzata una resina di Wang o HMP della Novabiochem (Läufelfingen, Svizzera) derivatizzata 0.8 mmol/g. Gli aminoacidi utilizzati sono protetti al gruppo α -amminico con 9-Fluorenilmetilossicarbonile (Fmoc) e sono stati acquistati da IRIS Biotech (Iris Biotech GmbH, Waldershofener Str. 49-51, D-95615 Marktredwitz, Germany).

Di seguito si riporta un elenco dei reattivi impiegati e le relative quantità:

Solvente:	DMF.
Soluzione Deprotettore:	20% piperidina in DMF.
Resina:	100 mg/peptide WANG RESIN 0.8 mmol/g.
Attivatore:	DIC/HOBt per il primo <i>coupling</i> ; HBTU per i successivi.
Amminoacidi:	N_{α} -Fmoc-protetti, in eccesso di 5 volte, protetti in catena laterale da gruppi acido-labili.
Miscela di <i>capping</i>:	1:1 (V/V) Ac ₂ O:Pyr.

REATTIVO	MW (Da)	mmol/ <i>coupling</i>	mg/ <i>coupling</i>
Fmoc-(L)Asp(OtBu)-OH	411.45	0.4	164.6
Fmoc-(L)Trp(Boc)-OH	526.58	0.4	210.6
Fmoc-(L)His(Mtt)-OH	633.71	0.4	253.48
Fmoc-(L)Gly-OH	297.31	0.4	118.9
DIC	126.20 ($\rho = 0.806$ g/ml)	0.4	<u>63 μL</u>
HOBt	135.12	0.4	54.0
HBTU	379,35	0.4	151.7

Una volta conclusa la sintesi, si esegue il *cleavage* della peptidil-resina. Tale reazione, essendo esotermica, viene favorita dall'estemporaneo raffreddamento in ghiaccio della miscela di sblocco per 5 minuti. Quest'ultima è composta da TFA 92% (V/V), EDT 2.5% (V/V), TIPS 3% /V/V) e H₂O 2.5% (V/V). La miscela di sblocco viene utilizzata in quantità tale da ottenere una concentrazione di resina pari a 33 mg/ml. Il TFA crea l'ambiente acido necessario per il distacco del peptide dalla resina, mentre EDT, TIPS ed acqua funzionano da *scavengers* neutralizzando le specie reattive (carbocationi) createsi durante lo sblocco. La reazione di sblocco prosegue per 90 minuti sotto costante agitazione, quindi si esegue la precipitazione del peptide in Dietiletere mantenuto a 0°C al fine di minimizzarne la solubilità. Si eseguono, infine, ulteriori lavaggi con altro etere freddo in modo da eliminare eventuali sottoprodotti co-precipitati con il peptide. Il precipitato ottenuto è essiccato in corrente d'azoto, sciolto nuovamente in una quantità minima d'acqua (eventualmente si aggiunge CH₃CN per favorire la solubilizzazione) ed è, quindi, pronto per le caratterizzazioni.

3.3.2 Metodologie di purificazione e caratterizzazione dei peptidi

a) Purificazione RP-HPLC preparativa

Le purificazioni RP-HPLC sono state eseguite con apparato preparativo Shimadzu LC-8A equipaggiato con *detector* UV Shimadzu SPD-20A. La colonna scelta è una Phenomenex Jupiter Proteo C18 (4 μ m, 90Å, 250 x 21.2 mm) utilizzata ad un flusso di 17 mL/min. Gli eluenti impiegati sono H₂O + 0.1% CF₃COOH (A) e CH₃CN + 0.1% CF₃COOH (B). La purificazione è stata condotta con un gradiente 5-45% di B in 30 min ad una lunghezza d'onda $\lambda_{\text{det}} = 226$ nm.

b) Caratterizzazione RP-UHPLC

Le analisi RP-UHPLC hanno permesso contemporaneamente di definire il grado di purezza e la massa dei peptidi sintetizzati.

Lo strumento è un sistema UHPLC Agilent Infinity 1290 accoppiato ad un analizzatore di massa quadrupolare SQP Agilent 6130. La colonna impiegata è un'Agilent Zorbax RRHP Eclipse Plus C18 (2.1 x 100 mm, 1.8 μ m) tenuta ad una temperatura costante di 40°C. Il flusso utilizzato è 0.4 ml/min. Gli eluenti sono H₂O + 0.1% HCOOH (A) e CH₃CN + 0.1% HCOOH (B). Il gradiente usato è 2-52% in 5 minuti. Il *Diode Array Detector* (DAD) ha permesso un'analisi a due unghesse d'onda (226 e 280 nm) ed una contemporanea scansione dello spettro da 350 a 240 nm.

c) Determinazione della massa esatta

La massa esatta dei peptidi è stata determinata con spettrofotometro Mariner ESI-TOF mediante infusione diretta del campione ad un flusso di 0.05 ml/min. La fase mobile scelta è una miscela 1:1 di H₂O e CH₃CN contenente 0.1% di HCOOH. Gli spettri m/z sono stati, perciò, acquisiti in positivo ottenendo gli ioni 1⁺ o 2⁺.

d) Determinazione spettrofotometrica della concentrazione dei peptidi

Ove non è stato possibile determinare la concentrazione dei peptidi mediante analisi UHPLC con standard interno si è dovuto determinare la concentrazione per via diretta mediante spettrometria UV-Vis. Tutti i peptidi sintetizzati, infatti, contengono un cromoforo, il Triptofano, che assorbe con un picco di massimo a 280 nm e con un coefficiente di estinzione molare di $5500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Sono stati registrati gli spettri da 350 a 240 nm con un velocità di scansione di 600 nm/min. Il solvente di analisi è l'acqua.

3.3.3 Studi cinetici

Tutti gli studi cinetici sono stati condotti nelle medesime condizioni:

- $[\text{NR}_4^+ \text{-AuNPs}] = 60 \text{ } \mu\text{M}$ (concentrazione riferita ai gruppi ammoniacali);
- $[\text{H}_0] = 11.0 \text{ } \mu\text{M}$ per tutti gli esperimenti;
- $[\text{H}_1] = 4.75 \text{ } \mu\text{M}$;
- $[\text{H}_{1r}] = 4.3 \text{ } \mu\text{M}$;
- $[\text{H}_1\text{G}] = 4.25 \text{ } \mu\text{M}$;
- $[\text{H}_1\text{Gr}] = 3.9 \text{ } \mu\text{M}$;

Tutte le soluzioni *stock* dei suddetti peptidi sono in tampone HEPES 10 mM, pH 7.0. Allo stesso modo, gli esperimenti sono condotti in tampone HEPES 10 mM, pH 7.0 aggiunto di un 9% di acetonitrile. La temperatura è regolata a 37°C. Lavorando con un volume finale di 1 ml, si aggiungono, 900 μl di tampone e 90 μl di solvente organico. I rimanti 10 μl vengono dalle soluzioni *stock* dei substrati 1 mM in Acetonitrile ottenendo quindi una $[\text{Substrato}]_t = 10 \text{ } \mu\text{M}$.

Gli esperimenti cinetici sono stati condotti su spettrofotometro Varian Cary 100 misurando l'assorbanza a 400 nm. In particolare prima dell'aggiunta del substrato, si misura il segnale di base per 5 minuti in modo da avere un *blank* esatto da poter sottrarre. Una volta aggiunto il substrato le cinetiche sono condotte mediamente per un'ora ad eccezione degli esperimenti in cui si effettuano aggiunte multiple.

Le curve cinetiche ottenute sono elaborate con il programma Origin Pro 8.0 applicando il seguente modello di *fitting*:

$$y = A_1 - A_2 e^{-kx}$$

Il valore di k corrisponde alle k_{obs} riportate.

3.4 Riferimenti

- [1] Zaramella, D., Scrimin, P. and Prins L.J. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 2011-2021.
- [2] Merrifield, R., B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
- [3] Pieters, G., Cazzolaro, A., Bonomi, R. and Prins, L.J. *J. Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1916.

4. Auto-assemblaggio eterogeneo di un peptide catalitico con una libreria di peptidi modulatori

Da quanto emerso sino ad ora (v. pagg. 62-63 e figura 2.21) il sistema da noi realizzato è efficiente anche in condizioni di sub-saturazione. In tali condizioni si osserva un effetto positivo dovuto al pH locale. Il sistema così realizzato, pur nella sua complessità, non può certo essere paragonato ai sistemi naturali con il loro *network* d'interazioni tra domini anche diversi e lontani tra loro. Si è perciò deciso, traendo ispirazione dagli enzimi, di articolare maggiormente il sistema da noi creato variegando la superficie cationica. In particolare, nella serie di esperimenti che seguono si è pensato di accostare ad un peptide catalitico un secondo peptide, proveniente da una libreria, che, in un qualche modo, possa modulare l'attività catalitica del sistema *in toto*. Se le aspettative venissero attese, si otterrebbe un sistema estremamente regolabile non solo in base alla quantità di catalizzatore auto-assemblante, ma anche in base alla qualità dei “modulatori” che vanno ad interagire con il catalizzatore medesimo. Tutto ciò renderebbe il nostro sistema un vero analogo artificiale degli enzimi con ampie possibilità di regolazione.

Si è deciso, perciò, di sintetizzare una libreria di 16 peptidi che possano in un qualche modo fungere da perturbatori dell'intorno catalitico di H₂ (la scelta di questo peptide è dovuta al fatto che in quel determinato periodo ci si stava concentrando su tale peptide). Per semplicità, si è operato con uno schema a matrice scegliendo quattro amminoacidi modello ed esplorando tutte le combinazioni possibili che risultano elongando di due unità la porzione N-terminale di H₀ (Tabella 4.1):

	L	F	S	R
L	LL	LF	LS	LR
F	FL	FF	FS	FR
S	SL	SF	SS	SR
R	RL	RF	RS	RR

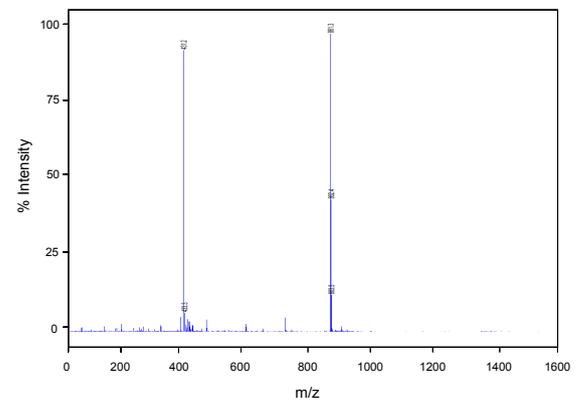
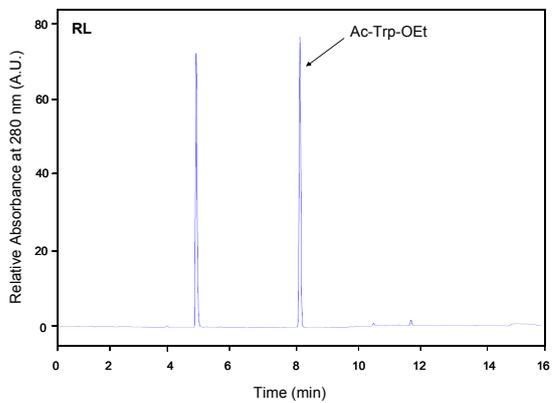
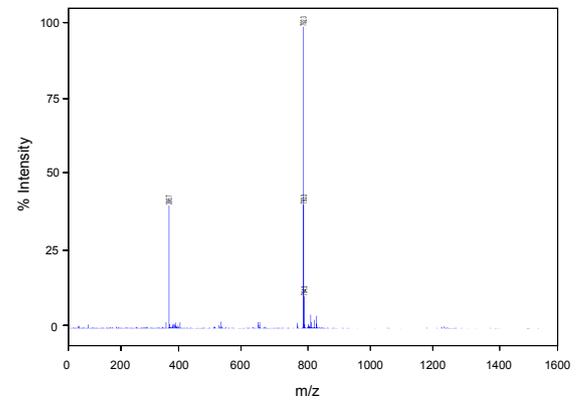
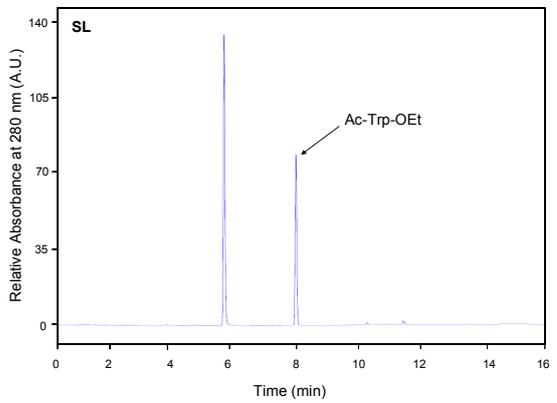
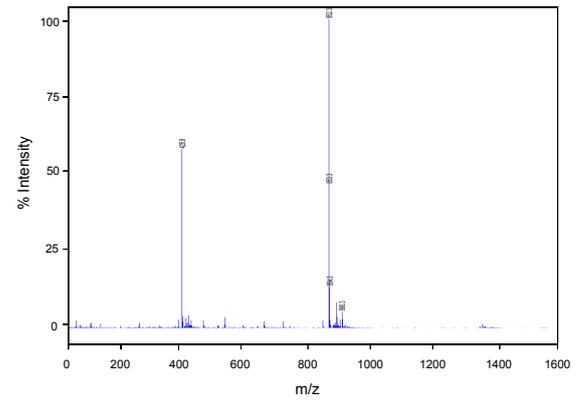
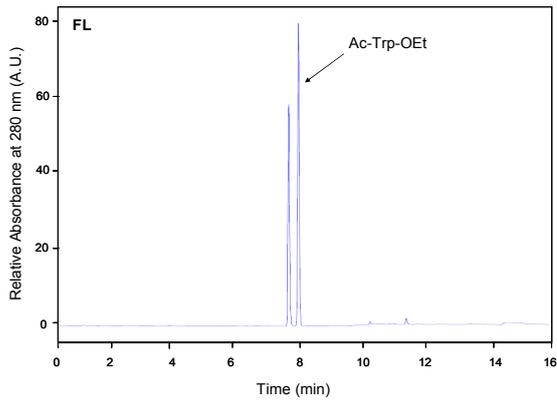
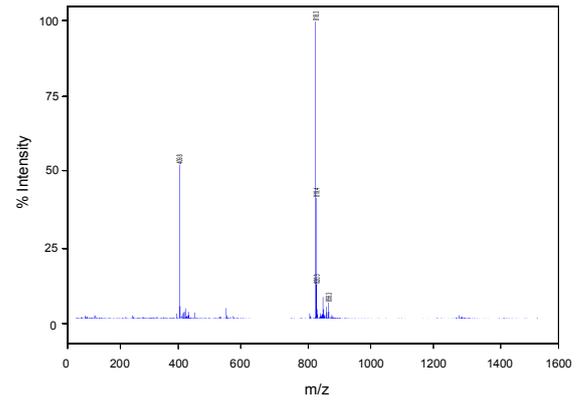
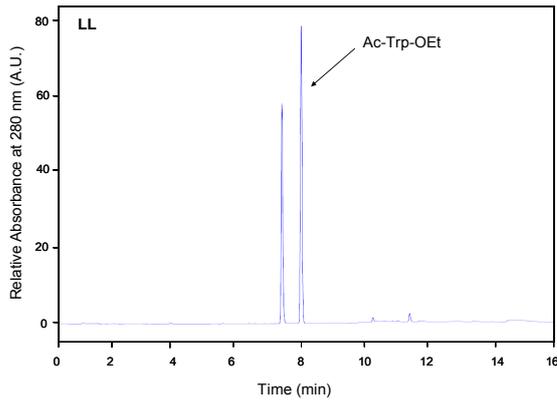
Tabella 4.1: Matrice delle possibili combinazioni sintetiche per i peptidi risultanti elongando la porzione *N*-terminale di Ac-WDDD-OH. A sinistra l'ammino-acido *N*-terminale; a destra l'ammino-acido in posizione 2, accanto al Triptofano.

La Leucina (L) è stata scelta come modello di amminoacido lipofilo a catena alchilica; analogamente, la Fenilalanina (F) è stata scelta come amminoacido lipofilo a catena aromatica; la Serina (S) è un modello di amminoacido polare; infine, l'Arginina (R) è, da un lato un modello di amminoacido ionico (cationico), ma, al contempo, fornisce un controllo in quanto, i peptidi che la conterranno probabilmente avranno una bassa affinità per la superficie cationica delle nanoparticelle e, di fatto, non si osserverà alcun effetto.

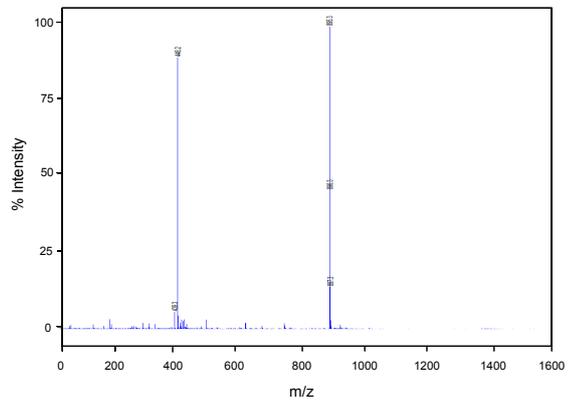
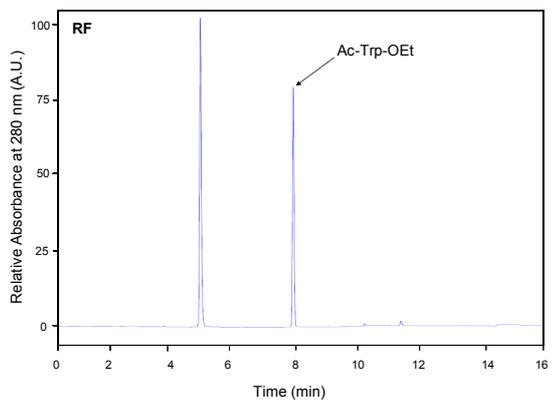
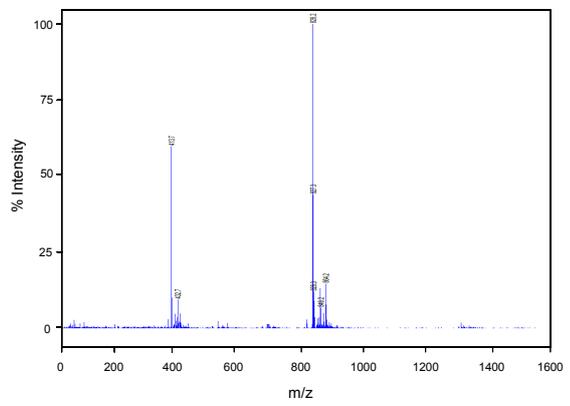
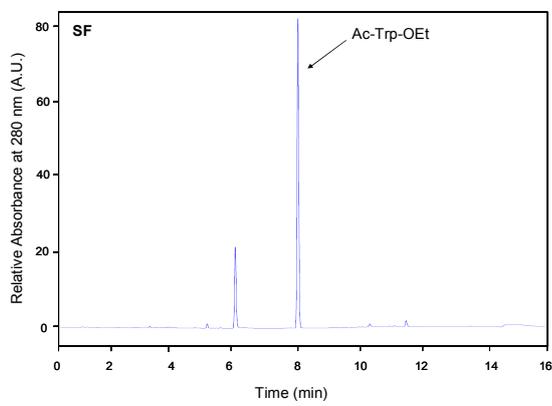
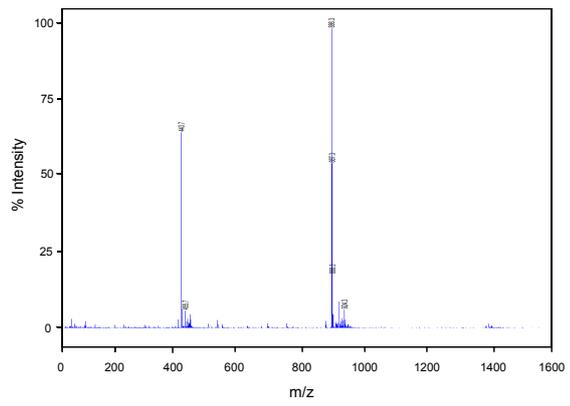
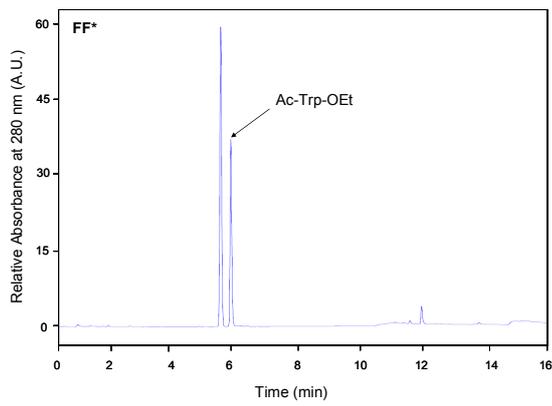
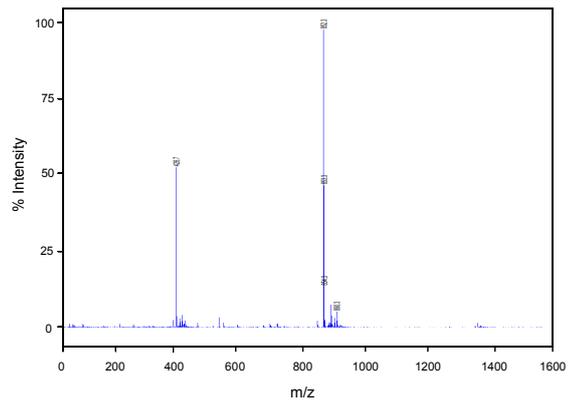
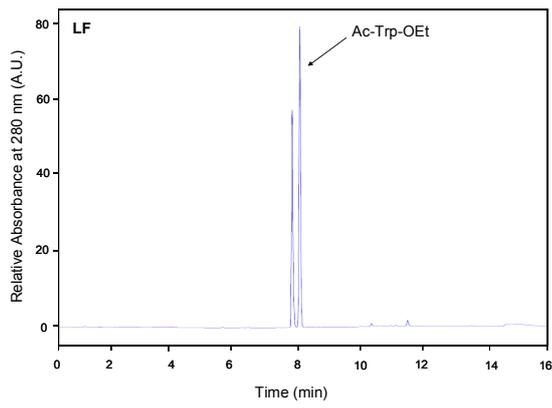
4.1 Sintesi e caratterizzazione della libreria peptidica

La sintesi e la purificazione di tali peptidi sono state effettuate secondo le modalità già descritte in precedenza^[1]. La bontà della sintesi viene valutata con il sistema analitico RP-UHPLC Agilent Infinity 1200 con auto-campionatore accoppiato ad un analizzatore di massa di tipo ESI-SQP. Ogni crudo è stato poi purificato, a prescindere dalla resa sintetica, con un sistema RP-HPLC preparativo; il picco corrispondente alla specie desiderata è stato poi liofilizzato e disciolto in acqua per ottenere una *stock solution*. Una parte di quest'ultima è diluita di 10 volte e sottoposta nuovamente ad analisi RP-UHPLC in presenza di uno standard interno di Ac-Trp-OEt per determinarne la concentrazione mediante confronto fra l'area del picco cromatografico dello standard e l'area del picco relativo ai campioni. Di seguito si riportano i risultati relativi alla caratterizzazione dei sedici peptidi (Figura 4.1 e tabella 4.2).

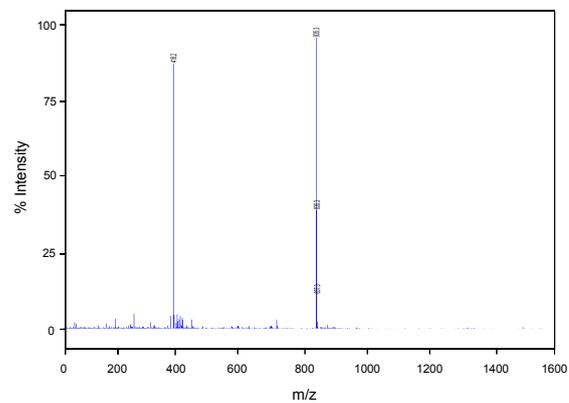
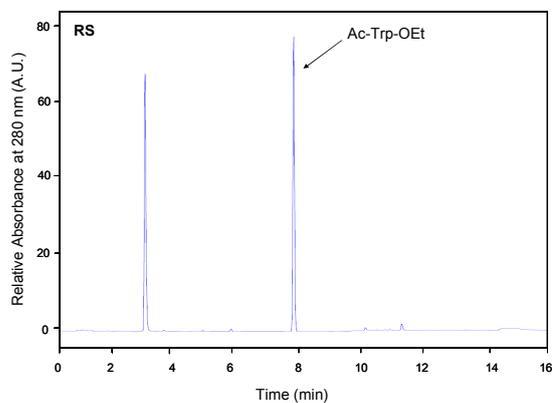
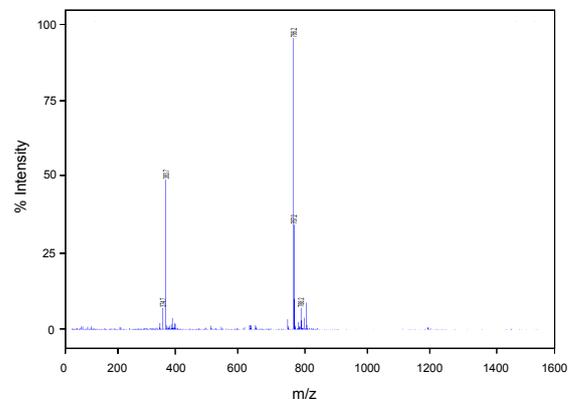
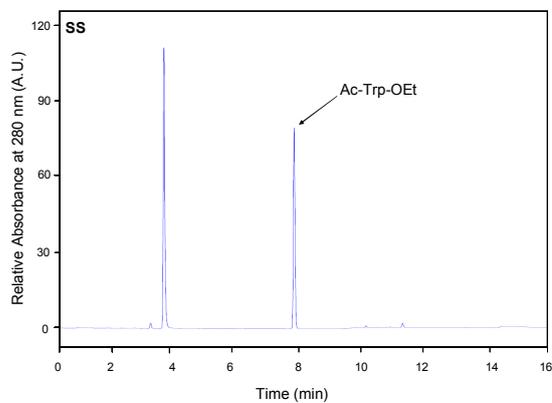
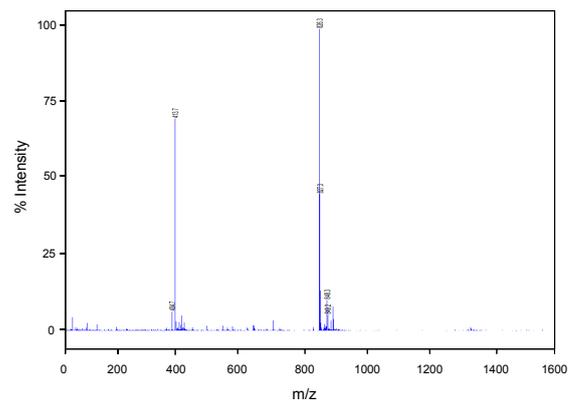
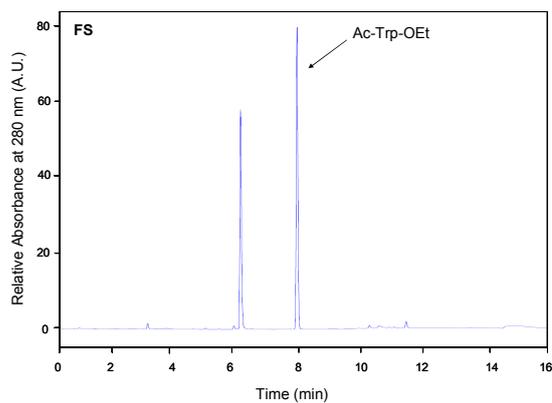
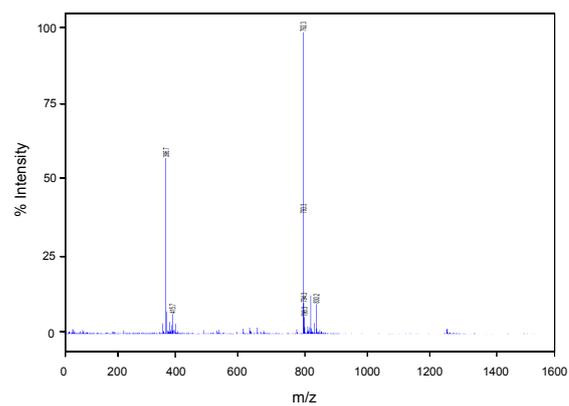
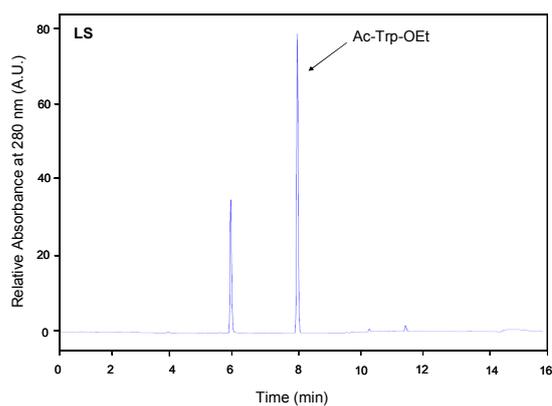
4. Auto-assemblaggio eterogeneo di un peptide catalitico con una libreria di peptidi modulatori



4. Auto-assemblaggio eterogeneo di un peptide catalitico con una libreria di peptidi modulatori



4. Auto-assemblaggio eterogeneo di un peptide catalitico con una libreria di peptidi modulatori



4. Auto-assemblaggio eterogeneo di un peptide catalitico con una libreria di peptidi modulatori

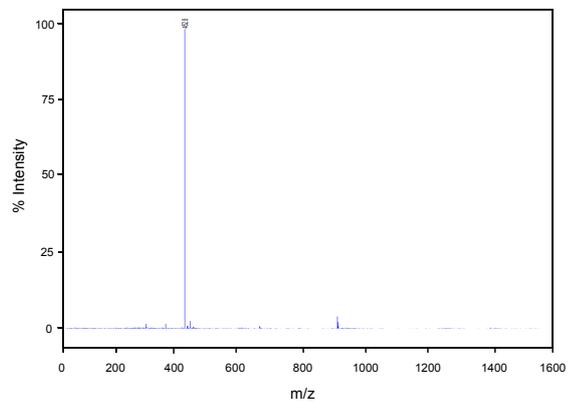
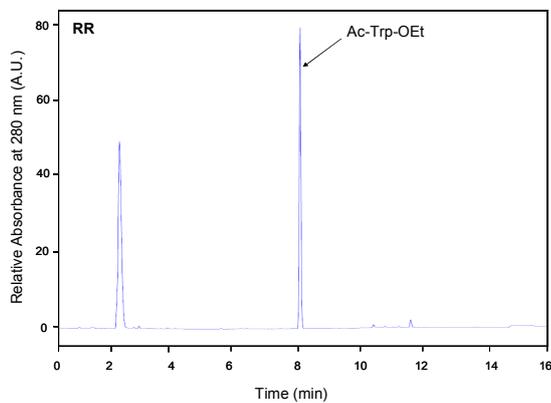
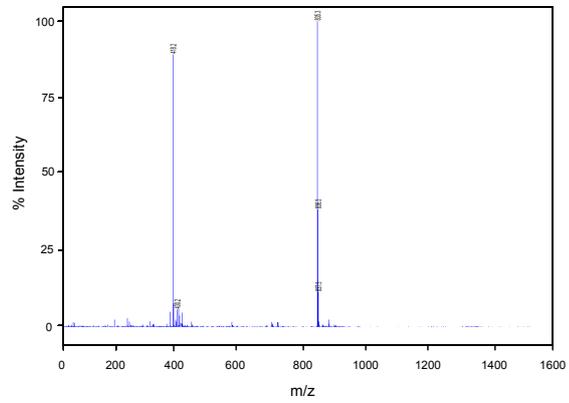
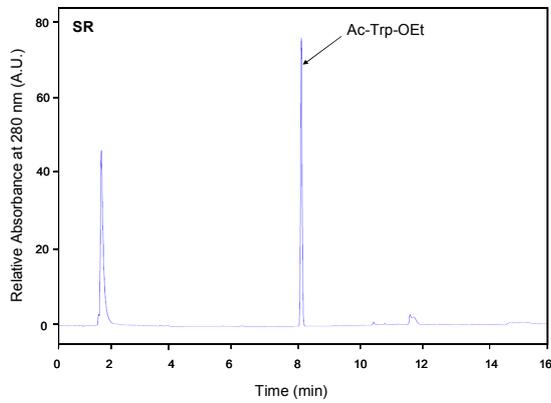
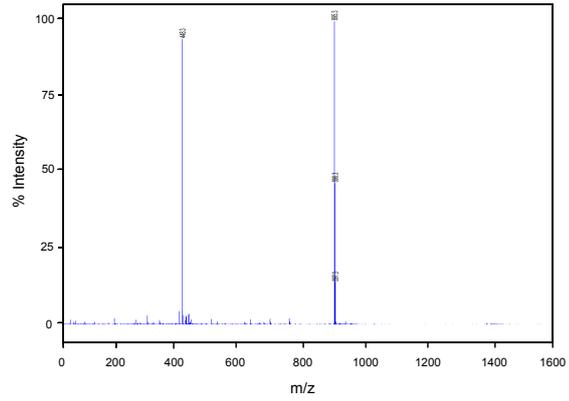
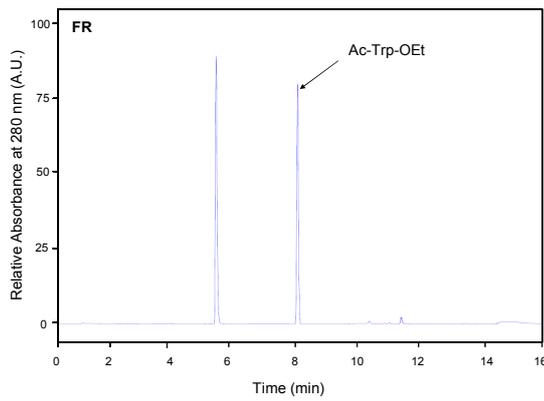
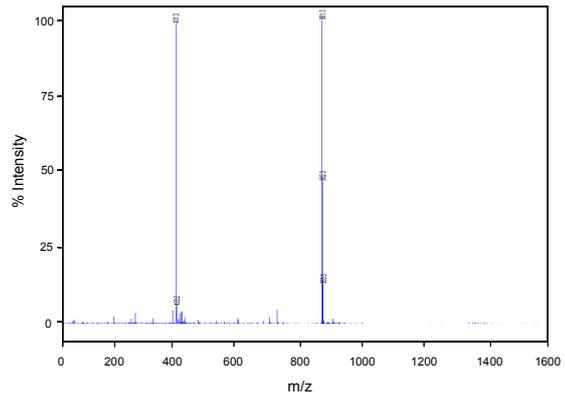
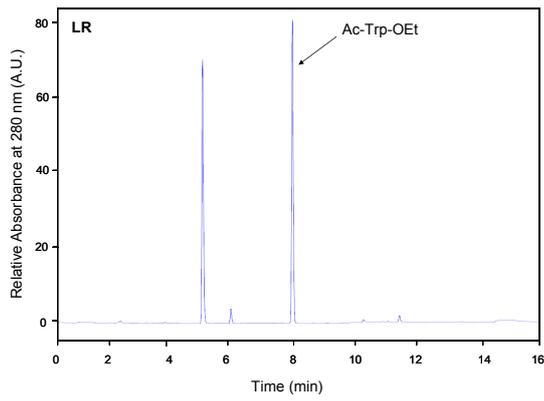


Figura 4.1 alla pagine precedenti: Caratterizzazione RP-UHPLC/MS-SQP dei peptidi sintetizzati. A destra viene mostrato il cromatogramma a 280 nm in presenza di 180 μ M di standard interno Ac-Trp-OEt; a sinistra viene mostrato lo spettro m/z. Gradiente in CH₃CN dal 2 al 52% in 10 minuti. 0.1% HCOOH. Flusso 0.2 ml/min. * A causa di un problema di co-eluzione e solubilità, il peptide FF è stato sottoposto ad una nuova analisi con diverso gradiente (CH₃CN, 2-62% in 10 minuti) e con metà della concentrazione di standard interno Ac-Trp-OEt (90 μ M).

Sequence	Theoretical _{mono} M.W. (Da)	Experimental M.W. (Da)	Δ m (Da)
<i>Ac-LLWDDD-OH (LL)</i>	817.338	817.332	+0.006
<i>Ac-FLWDDD-OH (FL)</i>	851.323	851.319	+0.004
<i>Ac-SLWDDD-OH (SL)</i>	791.286	791.293	-0.007
<i>Ac-RLWDDD-OH (RL)</i>	860.355	860.367	-0.012
<i>Ac-LFWDDD-OH (LF)</i>	851.323	851.315	+0.008
<i>Ac-FFWDDD-OH (FF)</i>	885.307	885.299	+0.008
<i>Ac-SFWDDD-OH (SF)</i>	825.271	825.264	+0.007
<i>Ac-RFWDDD-OH (RF)</i>	894.340	894.335	+0.005
<i>Ac-LSWDDD-OH (LS)</i>	791.286	791.297	-0.011
<i>Ac-FSWDDD-OH (FS)</i>	825.271	825.25	+0.021
<i>Ac-SSWDDD-OH (SS)</i>	765.234	765.222	+0.012
<i>Ac-RSWDDD-OH (RS)</i>	834.303	834.313	-0.01
<i>Ac-LRWDDD-OH (LR)</i>	860.355	860.369	-0.014
<i>Ac-FRWDDD-OH (FR)</i>	894.340	894.345	-0.005
<i>Ac-SRWDDD-OH (SR)</i>	834.303	834.31	-0.007
<i>Ac-RRWDDD-OH (RR)</i>	903.372	903.357	+0.015

Tabella 4.2: Valori di massa teorici e sperimentali per i peptidi sintetizzati; a destra viene mostrata la loro differenza.

Si osservi che i valori di massa sperimentale tabulati non sono quelli riportati nei grafici sopra. La ragione è che il sistema SQP utilizzato è sensibile solamente fino alla prima cifra decimale. E' stata, perciò, eseguita un'analisi separata con sistema ESI/TOF sensibile fino alla quarta cifra decimale i cui risultati sono stati riportati in tabella.

4.2 Studi cinetici sul sistema misto

L'efficienza catalitica del sistema ottenuto è stata saggiata su un nuovo *batch* di nanoparticelle miscelando concentrazioni sub saturanti di H₂ e dei nuovi peptidi in modo da raggiungere la C_{sat}. In questi esperimenti di cinetica è stata impiegata una [NR₄⁺-AuNPs] pari a 100 μM riferita alle teste ammoniche. A questa concentrazione, la C_{sat} del sistema riferita ad H₂ risulta di 15 μM; H₂ è stato impiegato a 3 μM, mentre i peptidi sintetizzati sono stati impiegati per i rimanenti 12 μM. Il sistema è auto-assemblato in 10 mM HEPES pH 7.0 e 10% CH₃CN per favorire la solubilizzazione del substrato. La temperatura è regolata a 37 °C. Il substrato *N*-CBz-(D)Phe-ONP viene aggiunto dopo un'iniziale misurazione dell'assorbanza di base ad una concentrazione di 10 μM e monitorando il rilascio di *p*-Nitrofenato (λ_{\max} = 400 nm; ϵ_{400} = 10000 M⁻¹cm⁻¹). Al termine degli esperimenti, dalle curve ottenute si calcolano i valori di k_{obs} e si confrontano con i valori del sistema contenente il peptide H₂ (Figura 4.2).

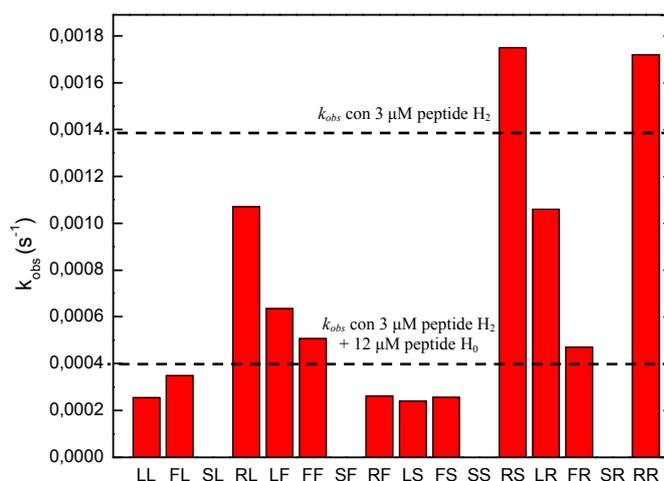


Figura 4.2: k_{obs} per l'idrolisi di 10 μM *N*-CBz-(D)Phe-ONP. Come riferimento sono riportate le k_{obs} del sistema in presenza di 3 μM del solo peptide H₂ ed in presenza di 3 μM H₂ + 12 μM H₀. [NR₄⁺-AuNPs]= 100 μM (riferita alle teste ammoniche). [H₂]= 3 μM; [peptidi]= 12 μM. 10 mM tampone HEPES, pH 7.0, 10% CH₃CN. T= 37°C.

Ad una prima analisi, i risultati sembrano essere notevolmente eterogenei. Innanzitutto i peptidi modulatori che recano una Serina in posizione *N*-terminale (SL, SF ed SS) comportano precipitazione del sistema in ragione di probabili interazioni mediate da legami a idrogeno che questo amminoacido realizza grazie al proprio gruppo idrossimetilico. D'altro canto la maggior parte dei peptidi modulatori contenenti residui

idrofobici sembra non avere alcun effetto rispetto al sistema di riferimento (3 μM peptide H_2 con 12 μM peptide H_0). Ecco dunque che le k_{obs} di LL, FL, LF, FF, RF, LS, SF ed RF si aggirano tutte attorno a 0.4×10^{-3} . I peptidi contenenti Arginina sembrano, invece, avere una marcata attività rispetto al sistema di riferimento. Inizialmente questo risultato era stato considerato sorprendente. Tuttavia, ricordando quanto detto in precedenza, i peptidi contenenti Arginina si sono dimostrati, secondo le aspettative, poco affini per il monostrato cationico (Figura 4.3).

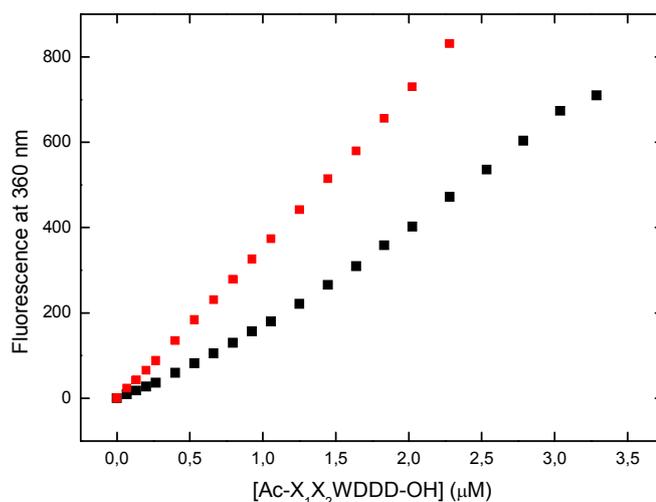


Figura 4.3: Variazione nell'emissione di fluorescenza per Ac-LRWDDD-OH (■) ed Ac-RRWDDD-OH (●) in presenza di 100 μM di nanoparticelle (concentrazione riferita alle teste ammoniache). 10 mM HEPES, pH 7.0, 10% CH_3CN . $T = 37^\circ\text{C}$. $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 360 \text{ nm}$; *slits* 5/20 nm.

In figura viene riportata l'analisi di *binding* per fluorescenza dei peptidi LR ed RR che in dagli studi cinetici sembravano avere k_{obs} rispettivamente pari a 1.0×10^{-3} e 1.6×10^{-3} . Dato il *binding* nullo o quasi di questi due peptidi è presumibile che l'effetto sia solamente dovuto al solo peptide H_2 e all'effetto positivo che il pH locale determinato dai gruppi ammoniacali ha sui residui imidazolici. I valori di k_{obs} sono, infatti, paragonabili al sistema di riferimento con 3 μM del solo peptide H_2 .

In conclusione, quindi, non è stato possibile migliorare il sistema secondo l'approccio descritto. Una possibile ragione può risiedere nel fatto che i peptidi ritenuti essere modulatori, di fatto non interagiscono con il peptide catalizzatore e si limitano a ricoprire la superficie residua andando ad abbassare il pH locale riducendo il suo effetto positivo sui residui imidazolici.

4.3 Parte Sperimentale

Ci si limiterà in questa sezione a descrivere la sintesi della libreria peptidica.

4.3.1 Sintesi dei peptidi

La sintesi dei peptidi descritti in questo capitolo è stata eseguita su fase solida utilizzando un sintetizzatore Zinsser modello Sophas in grado di sintetizzare parallelamente fino a 96 peptidi. Come supporto è stata utilizzata una resina di Wang o HMP della Novabiochem (Läufelfingen, Svizzera) derivatizzata 0.8 mmol/g. Gli amminoacidi utilizzati sono protetti al gruppo α -amminico con 9-Fluorenilmetilossicarbonile (Fmoc) e sono stati acquistati da IRIS Biotech (Iris Biotech GmbH, Waldershofer Str. 49-51, D-95615 Marktredwitz, Germany).

Di seguito si riporta un elenco dei reattivi impiegati e le relative quantità:

Solvente:	DMF.
Soluzione Deprotettore:	20% piperidina in DMF.
Resina:	100 mg/peptide WANG RESIN 0.8 mmol/g.
Attivatore:	DIC/HOBt per il primo <i>coupling</i> ; HBTU per i successivi.
Amminoacidi:	N_{α} -Fmoc-protetti, in eccesso di 5 volte, protetti in catena laterale da gruppi acido-labili.
Miscela di <i>capping</i>:	1:1 (V/V) Ac ₂ O:Pyr.

REATTIVO	MW (Da)	mmol/ <i>coupling</i>	mg/ <i>coupling</i>
Fmoc-(L)Asp(OtBu)-OH	411.45	0.4	164.6
Fmoc-(L)Trp(Boc)-OH	526.58	0.4	210.6
Fmoc-(L)Leu-OH	353.41	0.4	141.4
Fmoc-(L)Phe-OH	387.43	0.4	155.0
Fmoc-(L)Ser(tBu)-OH	383.44	0.4	153.4
Fmoc-(L)Arg(Pbf)-OH	648.77	0.4	259.5
DIC	126.20 ($\rho = 0.806$ g/ml)	0.4	<u>63 μL</u>
HOBt	135.12	0.4	54.0
HBTU	379,35	0.4	151.7

Una volta conclusa la sintesi, si esegue il *cleavage* della peptidil-resina. Tale reazione, essendo esotermica, viene favorita dall'estemporaneo raffreddamento in ghiaccio della miscela di sblocco per 5 minuti. Quest'ultima è composta da TFA 92% (V/V), EDT 2.5% (V/V), TIPS 3% (V/V) e H₂O 2.5% (V/V). La miscela di sblocco viene utilizzata in quantità tale da ottenere una concentrazione di resina pari a 33 mg/ml. Il TFA crea l'ambiente acido necessario per il distacco del peptide dalla resina, mentre EDT, TIPS ed acqua funzionano da *scavengers* neutralizzando le specie reattive (carbocationi) creati durante lo sblocco. La reazione di sblocco prosegue per 90 minuti sotto costante agitazione, quindi si esegue la precipitazione del peptide in Dietiletere mantenuto a 0°C al fine di minimizzarne la solubilità. Si eseguono, infine, ulteriori lavaggi con altro etere freddo in modo da eliminare eventuali sottoprodotti co-precipitati con il peptide. Il precipitato ottenuto è essiccato in corrente d'azoto, sciolto nuovamente in una quantità minima d'acqua (eventualmente si aggiunge CH₃CN per favorire la solubilizzazione) ed è, quindi, pronto per le caratterizzazioni.

4.3.2 Metodologie di purificazione e caratterizzazione dei peptidi

a) Purificazione RP-HPLC preparativa

Le purificazioni RP-HPLC sono state eseguite con apparato preparativo Shimadzu LC-8A equipaggiato con *detector* UV Shimadzu SPD-20A. La colonna scelta è una Phenomenex Jupiter Proteo C18 (4µm, 90Å, 250 x 21.2 mm) utilizzata ad un flusso di 17 mL/min. Gli eluenti impiegati sono H₂O + 0.1% CF₃COOH (A) e CH₃CN + 0.1% CF₃COOH (B). La purificazione è stata condotta con un gradiente 5-45% di B in 30 min ad una lunghezza d'onda $\lambda_{\text{det}} = 226$ nm.

b) Caratterizzazione RP-UHPLC

Le analisi RP-UHPLC hanno permesso non solo di definire il grado di purezza e la massa dei peptidi sintetizzati, ma anche la concentrazione delle soluzioni dei peptidi grazie all'utilizzo dello *standard* interno Ac-Trp-OEt.

Lo strumento è un sistema UHPLC Agilent Infinity 1290 accoppiato ad un analizzatore di massa quadrupolare SQP Agilent 6130. La colonna impiegata è un'Agilent Zorbax RRHP

Eclipse Plus C18 (2.1 x 100 mm, 1.8 μm) tenuta ad una temperatura costante di 40°C. Il flusso utilizzato è 0.2 ml/min. Gli eluenti sono $\text{H}_2\text{O} + 0.1\% \text{HCOOH}$ (A) e $\text{CH}_3\text{CN} + 0.1\% \text{HCOOH}$ (B). Il gradiente usato è 2-52% in 10 minuti. Alternativamente, per il solo peptide FF, il gradiente è 2-62% in 10 min. Il *Diode Array Detector* (DAD) ha permesso un'analisi a due lunghezze d'onda (226 e 280 nm) ed una contemporanea scansione dello spettro da 350 a 240 nm. Ove le condizioni lo permettono assieme ai peptide è stato co-iniettato Ac-Trp-OEt ad una $[\text{C}]_f$ nota di 180 μM per determinare direttamente la concentrazione dei peptidi che vengono miscelati 1:10 con la soluzione dello *standard*. Per il peptide FF, Ac-Trp-OEt è stato introdotto ad una $[\text{C}]_f$ nota di 90 μM . Dal confronto delle aree sottese dai picchi cromatografici è stato possibile risalire alla concentrazione.

c) Determinazione della massa esatta

La massa esatta dei peptidi è stata determinata con spettrofotometro Mariner ESI-TOF mediante infusione diretta del campione ad un flusso di 0.05 ml/min. La fase mobile scelta è una miscela 1:1 di H_2O e CH_3CN contenente 0.1% di HCOOH . Gli spettri m/z sono stati, perciò, acquisiti in positivo ottenendo gli ioni 1^+ o 2^+ .

4.3.3 Studi cinetici

Tutti gli studi cinetici sono stati condotti nelle medesime condizioni:

- $[\text{NR}_4^+ \text{-AuNPs}] = 100 \mu\text{M}$ (concentrazione riferita ai gruppi ammoniacali);
- $[\text{H}_0] = 12 \mu\text{M}$;
- $[\text{H}_2] = 3 \mu\text{M}$;
- $[\text{Modulatori}] = 12 \mu\text{M}$;

Tutte le soluzioni *stock* dei suddetti peptidi sono in tampone HEPES 10 mM, pH 7.0. Allo stesso modo, gli esperimenti sono condotti in tampone HEPES 10 mM, pH 7.0 aggiunto di un 9% di acetonitrile. La temperatura è regolata a 37°C. Lavorando con un volume finale di 1 ml, si aggiungono, 900 μl di tampone e 90 μl di solvente organico. I rimanti 10 μl vengono dalle soluzioni *stock* del substrato 1 mM in Acetonitrile ottenendo quindi una $[\text{Substrato}]_f = 10 \mu\text{M}$.

Gli esperimenti cinetici sono stati condotti su spettrofotometro Varian Cary 100 misurando l'assorbanza a 400 nm. In particolare prima dell'aggiunta del substrato, si misura il segnale di base per 5 minuti in modo da avere un *blank* esatto da poter sottrarre. Una volta

aggiunto il substrato le cinetiche sono condotte mediamente per un ora ad eccezione degli esperimenti in cui si effettuano aggiunte multiple.

Le curve cinetiche ottenute sono elaborate con il programma Origin Pro 8.0 applicando il seguente modello di *fitting*:

$$y = A_1 - A_2^{-kx}$$

Il valore di k corrisponde alle k_{obs} riportate.

4.4 Riferimenti

[1] Merrifield, R., B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149–2154.

5. Studi di enantioselettività

Secondo quanto già visto nell'introduzione di questa Tesi, uno sforzo molto consistente nella catalisi supramolecolare viene investito nella realizzazione di sistemi che esibiscano enantioselettività o diastereoselettività. Anche nel nostro caso sono stati fatti numerosi sforzi in merito: il fatto stesso di impiegare substrati enantiomericamente puri ha evidenziato sin da subito l'intenzione di procedere verso l'ottenimento di un sistema enantioselettivo. Già a partire dai primi studi e secondo quanto visto nel capitolo precedente si è già tentato un approccio nettamente supramolecolare variegando la superficie delle nanoparticelle con peptidi (Ac-XXWDDD-OH, dove XX sono Leu, Phe, Ser e Arg nelle 4² combinazioni possibili) aventi il ruolo di "modulatori" dell'intorno chimico di H₂. Tale approccio non ha dato i risultati sperati in relazione anche di quanto si è scoperto successivamente: il residuo istidinico deve operare in condizioni di basso ingombro sterico ed il più possibile in prossimità del monostrato cationico. Chiaramente la presenza di peptidi non catalitici che non avessero neppure influenza sul *binding* del substrato (abbiamo già visto che questo è un fenomeno che avviene intrinsecamente a carico delle nanoparticelle) è risultata un ostacolo alla catalisi e, perciò, questa via è stata abbandonata.

Si è perciò deciso di affrontare il problema da un altro punto di vista: si è deciso di sintetizzare una nuova serie di mutanti derivati da H₁ che presentassero la medesima successione di ammino-acidi, ma che vedessero l'Istidina fiancheggiata da due residui ammino-acidici identici che potessero determinare la formazione di un intorno chirale (Figura 5.1)^[1]. Questo approccio è basato sull'assunto che negli enzimi naturali la chiralità e l'enantioselettività non si generano solamente attorno ad un singolo atomo, ma possono scaturire dall'intorno chimico^[2].

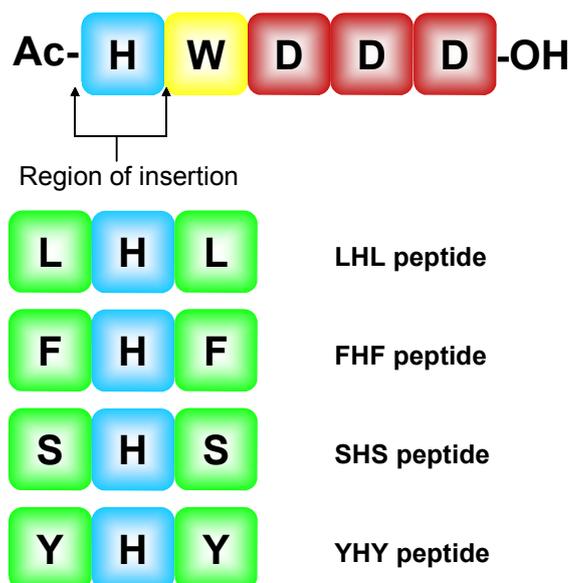


Figura 5.1: Schema dei mutanti del peptide H₁ supposti avere proprietà enantioselettive: H= Istidina; W= Triptofano; D= Acido aspartico; L= Leucina; F= Fenilalanina; S= Serina; Y= Tirosina.

La scelta sul tipo di ammino-acidi da inserire nella catena è stata fatta in modo da avere intorno molto diversi in termini di proprietà chimiche: aromatici (Phe), alifatici (Leu), polari (Ser) e aromatici-polari (Tyr). Naturalmente, secondo quanto visto sopra circa l'ingombro sterico a carico dell'Istidina, ci si attende un'efficienza catalitica minore. Tuttavia, se le aspettative venissero attese avremmo una discriminazione tra due enantiomeri di un medesimo substrato.

5.1 Sintesi e caratterizzazione dei peptidi XHX

La sintesi e la purificazione di tali peptidi sono state effettuate secondo le modalità già descritte in precedenza^[3] e di seguito sono riportati i risultati relativi alla loro purificazione e caratterizzazione (Figura 5.2 e tabella 5.1).

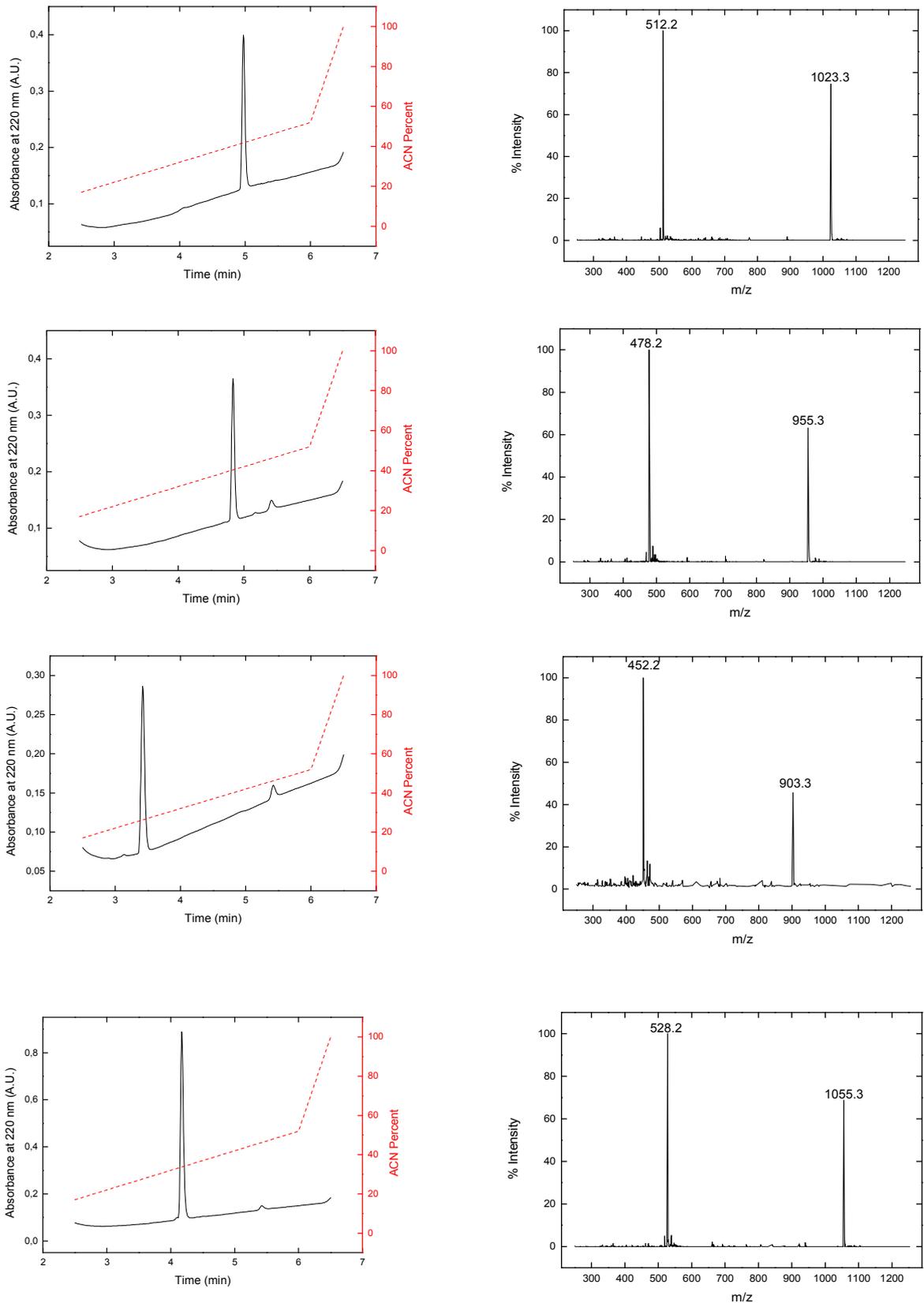


Figura 5.2: Caratterizzazione RP-UHPLC (sinistra) e MS/SQP (destra) dei peptidi sintetizzati. **In alto** FHF; **al centro in alto** LHL; **al centro in basso** SHS; **in basso** YHY. Viene mostrato il cromatogramma a 220 nm unitamente alla rampa di gradiente utilizzata. Gradiente in CH₃CN dal 2 al 52% in 5 minuti. 0.1% HCOOH. Flusso 0.4 ml/min.

Sequence	Theoretical _{mono} M.W. (Da)	Experimental M.W. (Da)	Δm (Da)
Ac-FHFWD ₃ -OH (FHF)	1022.366	1022.358	-0.008
Ac-LHLWD ₃ -OH (LHL)	954.397	954.307	-0.090
Ac-SHSWD ₃ -OH (SHS)	902.293	902.302	+0.009
Ac-YHYWD ₃ -OH (YHY)	1054.356	1054.310	-0.046

Tabella 5.1: Valori di massa teorici e sperimentali per i peptidi sintetizzati; a destra viene mostrata la loro differenza.

Si osservi che i valori di massa sperimentale tabulati non sono quelli riportati nei grafici sopra. La ragione è che il sistema SQP utilizzato è sensibile solamente fino alla prima cifra decimale. E' stata, perciò, eseguita un'analisi separata con sistema ESI/TOF sensibile fino alla quarta cifra decimale i cui risultati sono stati riportati in tabella.

5.2 Studi di binding sui mutanti XHX

Ancora una volta, prima di qualsiasi esperimento di cinetica, si è reso necessario determinare le C_{sat} di tali peptidi per le nanoparticelle mediante studio di *binding* per fluorescenza secondo le modalità viste sopra (Figura 5.3 e tabella 5.2).

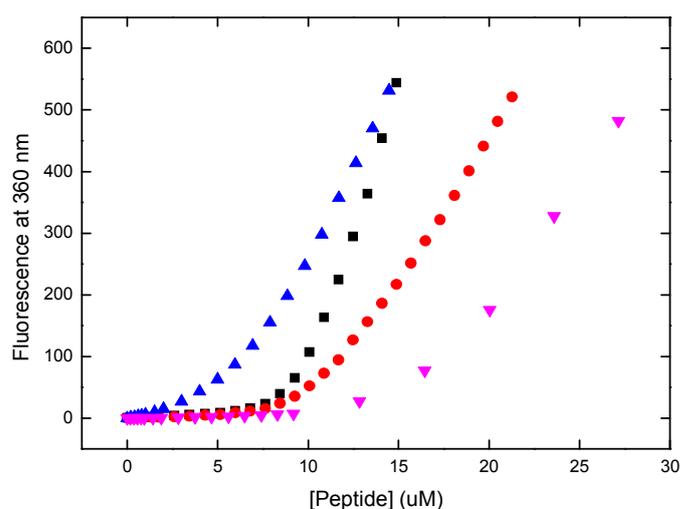


Figura 5.3: Fluorescenza a 360 nm in funzione dell'aggiunta di peptidi a 60 μM NR_4^+ -AuNPs (riferita alle teste ammoniche). 10 mM HEPES, pH 7.0, 10% CH_3CN . $T = 37^\circ\text{C}$. $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 360$ nm. Slits 5/20 nm.
 ■ LHL; ● FHF; ▲ SHS; ▼ YHY.

	LHL ■	FHF ●	SHS ▲	YHY ▼
$[C]_{\text{sat}} (\mu\text{M})$	8.6 ± 0.3	9.1 ± 0.2	4.4 ± 0.2	15.9 ± 0.2

Tabella 5.2: Valori di C_{sat} per il *binding* dei peptidi a $60 \mu\text{M NR}_4^+$ -AuNPs (riferita alle teste ammoniche). 10 mM HEPES, pH 7.0, 10% CH_3CN . $T = 37^\circ\text{C}$. $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$. Slits 5/20 nm.

Osservando nuovamente le curve contestualmente ai valori di C_{sat} tabulati, possiamo osservare che i mutanti LHL e FHF presentano valori di C_{sat} simili tra loro e prossimi a quelli visti per H_1 anche se il primo dei due sembra essere più affine del secondo. SHS mostra, invece, un'affinità ridotta probabilmente a causa di una minore interattività con il *core* alchilico in ragione della sua maggiore polarità. YHY, infine, presenta la più elevata C_{sat} a fronte di un'altrettanto elevata affinità e questo è presumibilmente dovuto alla presenza di altre due superfici aromatiche planari che, come già visto in precedenza, sembrano avere un ruolo accessorio nel *binding*.

5.3 Studi cinetici di enantioselettività sui mutanti XHX

Studi cinetici d'idrolisi enantioselettiva dei *p*-nitrofenil esteri di (D) e (L)Fenilalanina *N*-CBz-protetta sono stati condotti secondo le modalità e nelle condizioni già descritte in precedenza (Figura 5.4).

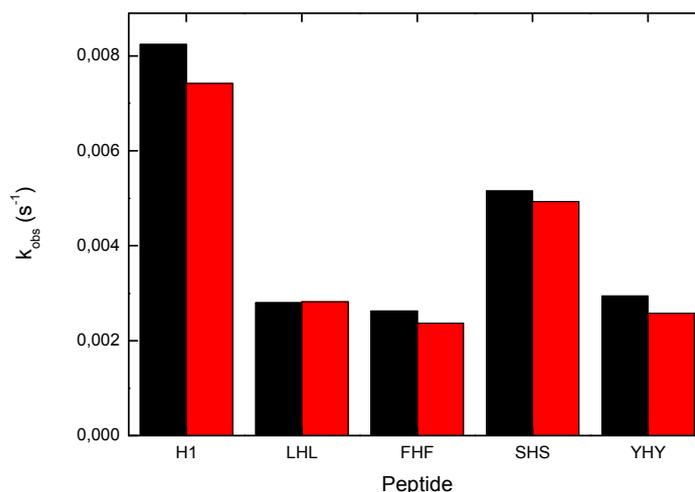


Figura 5.4: Istogramma raffigurante le k_{obs} per l'idrolisi di $10 \mu\text{M}$ dei due enantiomeri di *N*-CBZ-Phe-ONP. ■ (D)enantiomero; ■ (L)enantiometro. $[\text{NR}_4^+\text{-AuNPs}] = 60 \mu\text{M}$ (riferita alle teste ammoniche). $[\text{H}_1] = 4.75 \mu\text{M}$; $[\text{LHL}] = 4.85 \mu\text{M}$; $[\text{FHF}] = 5.3 \mu\text{M}$; $[\text{SHS}] = 4.25 \mu\text{M}$; $[\text{YHY}] = 7.95 \mu\text{M}$. 10 mM tampone HEPES, pH 7.0, 10% CH_3CN . $T = 37^\circ\text{C}$.

I risultati, purtroppo, non sono in linea con le attese se non per la diminuzione di efficienza catalitica in ragione di un aumentato ingombro sterico a carico dell'Istidina. Nessun peptide mostra enantioselettività; si osserva solamente un debolissimo *trend* a favore dell'enantiomero (D) che non può in alcun modo definirsi enantioselettività. Una possibile spiegazione di un tale insuccesso può risiedere intrinsecamente nel *design* dei peptidi; la presenza totale di ammino-acidi della serie (L) potrebbe far sì che il residuo d'Istidina si venga a trovare sul piano opposto rispetto ai due residui che la fiancheggiano vanificando, di fatto, il tentativo di generare un intorno chirale. Sarà opportuno, quindi, pensare a sequenze in cui i residui che fiancheggiano l'Istidina si trovino in configurazione opposta rispetto a questa.

Un'ulteriore spiegazione può risiedere in quanto già osservato sino ad ora: il substrato sembra legarsi alla nanoparticella mediante intercalazione dei gruppi idrofobici nel *core* alchilico. A livello catalitico, perciò, non è possibile discriminare gli enantiomeri, ma è auspicabile una discriminazione al momento del *binding* che precede la medesima catalisi. Nel nostro caso, una tale discriminazione non avviene a causa di una mancata chiralità dei tioli legati alle nanoparticelle.

5.4 Parte Sperimentale

Per informazioni circa reagenti e strumentazione di faccia riferimento alla sezione 2.6 a pagina 64. Ci si limiterà a descrivere la sintesi dei mutanti *XHX* del peptide *H₁*.

5.4.1 Sintesi dei peptidi

La sintesi dei peptidi descritti in questo capitolo è stata eseguita su fase solida utilizzando un sintetizzatore Zinsser modello Sophas in grado di sintetizzare parallelamente fino a 96 peptidi. Come supporto è stata utilizzata una resina di Wang o HMP della Novabiochem (Läufelfingen, Svizzera) derivatizzata 0.8 mmol/g. Gli amminoacidi utilizzati sono protetti al gruppo α -amminico con 9-Fluorenilmetilossicarbonile (Fmoc) e sono stati acquistati da IRIS Biotech (Iris Biotech GmbH, Waldershof Str. 49-51, D-95615 Marktredwitz, Germany).

Di seguito si riporta un elenco dei reattivi impiegati e le relative quantità:

Solvente:	DMF.
Soluzione Deprotettore:	20% piperidina in DMF.
Resina:	100 mg/peptide WANG RESIN 0.8 mmol/g.
Attivatore:	DIC/HOBt per il primo <i>coupling</i> ; HBTU per i successivi.
Amminoacidi:	N_α -Fmoc-protetti, in eccesso di 5 volte, protetti in catena laterale da gruppi acido-labili.
Miscela di <i>capping</i>:	1:1 (V/V) Ac ₂ O:Pyr.

REATTIVO	MW (Da)	mmol/ <i>coupling</i>	mg/ <i>coupling</i>
Fmoc-(L)Asp(OtBu)-OH	411.45	0.4	164.6
Fmoc-(L)Trp(Boc)-OH	526.58	0.4	210.6
Fmoc-(L)His(Mtt)-OH	633.71	0.4	253.48
Fmoc-(L)Leu-OH	353.41	0.4	141.4
Fmoc-(L)Phe-OH	387.43	0.4	155.0
Fmoc-(L)Ser(tBu)-OH	383.44	0.4	153.4
Fmoc-(L)Tyr(tBu)-OH	459.53	0.4	183.8
DIC	126.20 ($\rho = 0.806$ g/ml)	0.4	<u>63 μL</u>
HOBt	135.12	0.4	54.0
HBTU	379,35	0.4	151.7

Una volta conclusa la sintesi, si esegue il *cleavage* della peptidil-resina. Tale reazione, essendo esotermica, viene favorita dall'estemporaneo raffreddamento in ghiaccio della miscela di sblocco per 5 minuti. Quest'ultima è composta da TFA 92% (V/V), EDT 2.5% (V/V), TIPS 3% /V/V) e H₂O 2.5% (V/V). La miscela di sblocco viene utilizzata in quantità tale da ottenere una concentrazione di resina pari a 33 mg/ml. Il TFA crea l'ambiente acido necessario per il distacco del peptide dalla resina, mentre EDT, TIPS ed acqua funzionano da *scavengers* neutralizzando le specie reattive (carbocationi) creati durante lo sblocco. La reazione di sblocco prosegue per 90 minuti sotto costante agitazione, quindi si esegue la precipitazione del peptide in Dietiletere mantenuto a 0°C al fine di minimizzarne la solubilità. Si eseguono, infine, ulteriori lavaggi con altro etere freddo in modo da eliminare eventuali sottoprodotti co-precipitati con il peptide. Il

precipitato ottenuto è essiccato in corrente d'azoto, sciolto nuovamente in una quantità minima d'acqua (eventualmente si aggiunge CH₃CN per favorire la solubilizzazione) ed è, quindi, pronto per le caratterizzazioni.

5.4.2 Metodologie di purificazione e caratterizzazione dei peptidi

a) Purificazione RP-HPLC preparativa

Le purificazioni RP-HPLC sono state eseguite con apparato preparativo Shimadzu LC-8A equipaggiato con *detector* UV Shimadzu SPD-20A. La colonna scelta è una Phenomenex Jupiter Proteo C18 (4µm, 90Å, 250 x 21.2 mm) utilizzata ad un flusso di 17 mL/min. Gli eluenti impiegati sono H₂O + 0.1% CF₃COOH (A) e CH₃CN + 0.1% CF₃COOH (B). La purificazione è stata condotta con un gradiente 5-45% di B in 30 min ad una lunghezza d'onda $\lambda_{\text{det}} = 226$ nm.

b) Caratterizzazione RP-UHPLC

Le analisi RP-UHPLC hanno permesso di definire contemporaneamente il grado di purezza e la massa dei peptidi sintetizzati.

Lo strumento è un sistema UHPLC Agilent Infinity 1290 accoppiato ad un analizzatore di massa quadrupolare SQP Agilent 6130. La colonna impiegata è un'Agilent Zorbax RRHP Eclipse Plus C18 (2.1 x 100 mm, 1.8 µm) tenuta ad una temperatura costante di 40°C. Il flusso utilizzato è 0.4 ml/min. Gli eluenti sono H₂O + 0.1% HCOOH (A) e CH₃CN + 0.1% HCOOH (B). Il gradiente usato è 2-52% in 5 minuti. Il *Diode Array Detector* (DAD) ha permesso un'analisi a due lunghezze d'onda (226 e 280 nm) ed una contemporanea scansione dello spettro da 350 a 240 nm.

c) Determinazione della massa esatta

La massa esatta dei peptidi è stata determinata con spettrofotometro Mariner ESI-TOF mediante infusione diretta del campione ad un flusso di 0.05 ml/min. La fase mobile scelta è una miscela 1:1 di H₂O e CH₃CN contenente 0.1% di HCOOH. Gli spettri m/z sono stati, perciò, acquisiti in positivo ottenendo gli ioni 1⁺ o 2⁺.

d) Determinazione spettrofotometrica della concentrazione dei peptidi

Ove non è stato possibile determinare la concentrazione dei peptidi mediante analisi UHPLC con standard interno (peptidi mutanti di H₁ e serie XHX) si è dovuto determinare la concentrazione per via diretta mediante spettrometria UV-Vis. Tutti i peptidi sintetizzati, infatti, contengono un cromoforo, il Triptofano, che assorbe con un picco di massimo a 280 nm e con un coefficiente di estinzione molare di 5500 M⁻¹cm⁻¹. Sono stati registrati gli spettri da 350 a 240 nm con un velocità di scansione di 600 nm/min. Il solvente di analisi è l'acqua.

5.4.3 Studi cinetici

Tutti gli studi cinetici sono stati condotti nelle medesime condizioni:

- [NR₄⁺-AuNPs]= 60 μM (concentrazione riferita ai gruppi ammoniacali);
- [H₁]= 4.75 μM;
- [LHL]= 4.75 μM;
- [FHF]= 5.3 μM;
- [SHS]= 4.25 μM;
- [YHY]= 7.95 μM;

Tutte le soluzioni *stock* dei suddetti peptidi sono in tampone HEPES 10 mM, pH 7.0. Allo stesso modo, gli esperimenti sono condotti in tampone HEPES 10 mM, pH 7.0 aggiunto di un 9% di acetonitrile. La temperatura è regolata a 37°C. Lavorando con un volume finale di 1 ml, si aggiungono, 900 μl di tampone e 90 μl di solvente organico. I rimanti 10 μl vengono dalle soluzioni *stock* del substrato 1 mM in Acetonitrile ottenendo quindi una [Substrato]_f= 10 μM.

Gli esperimenti cinetici sono stati condotti su spettrofotometro Varian Cary 100 misurando l'assorbanza a 400 nm. In particolare prima dell'aggiunta del substrato, si misura il segnale di base per 5 minuti in modo da avere un *blank* esatto da poter sottrarre. Una volta aggiunto il substrato le cinetiche sono condotte mediamente per un ora ad eccezione degli esperimenti in cui si effettuano aggiunte multiple.

Le curve cinetiche ottenute sono elaborate con il programma Origin Pro 8.0 applicando il seguente modello di *fitting*:

$$y = A_1 - A_2^{-kx}$$

Il valore di k corrisponde alle k_{obs} riportate.

5.5 Riferimenti

[1] Zaramella, D., Scrimin, P. and Prins L.J. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 2011-2021.

[2] Davey, S. *Nature Chemistry*. **2008**, *72*, 1038.

[3] Merrifield, R., B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.

6. CONCLUSIONI

6.1 Realizzazione e studio di un sistema catalitico auto-assemblante

In conclusione, è stato sviluppato un nuovo sistema catalitico supramolecolare formato mediante auto-assemblaggio di piccoli peptidi (Ac-H_nWDDD-OH, con $0 \leq n \leq 3$) sulla superficie di nanoparticelle NR₄⁺-AuNPs. L'auto-assemblaggio è un requisito fondamentale per la catalisi dal momento che i peptidi non si dimostrano cataliticamente attivi in assenza delle nanoparticelle. Il sistema assemblato aumenta la cinetica d'idrolisi di *p*-nitrofenil esteri di due ordini di grandezza rispetto al *background*.

Studi meccanicistici hanno dimostrato che la superficie cationica multivalente non solo è essenziale per mantenere il substrato ed il catalizzatore in prossimità tra di loro, ma, soprattutto, genera un intorno chimico che aumenta la reattività dell'unità catalitica. Diversamente da quanto osservato per sistemi simili, infatti, non c'è cooperatività fra i residui imidazolici dei peptidi catalizzatori, ma l'aumento dell'efficienza catalitica scaturisce da un'interazione positiva fra questi ultimi ed il pH locale più alcalino.

6.2 Relazione Struttura Attività del sistema catalitico auto-assemblante

Il sistema *in toto* è stato caratterizzato dal punto di vista del semi-catalizzatore peptidico H₁ (Ac-HWDDD-OH: peptide di riferimento) e del substrato (*N*-CBz-(D)Phe-ONP: substrato di riferimento). In particolare, ci si è concentrati su studi SAR per comprendere le intime peculiarità che facessero dei due elementi dei buoni costituenti del sistema catalitico.

Mutazioni a carico della sequenza H₁ concernenti l'ordine e alla lunghezza hanno permesso di concludere che il Triptofano ha un ruolo accessorio nel *binding* e che la sua posizione deve essere adiacente alla coda anionica C-terminale. L'Istidina deve occupare l'estrema posizione *N*-terminale perché la presenza di amminoacidi in detta posizione ingomberebbe il residuo imidazolico diminuendo l'efficienza catalitica del sistema. L'allungamento della sequenza, a parità di ordine, si traduce ancora una volta in una diminuzione dell'attività in ragione di un minore effetto del pH locale, ma con ripercussioni molto inferiori rispetto all'ingombro sterico.

Studi SAR sulla natura del substrato sono stati condotti utilizzando analoghi che presentassero modifiche alla natura e dimensioni del gruppo protettore dell' α -ammina e

della catena laterale. I risultati ottenuti hanno permesso di concludere che, in generale, substrati più grandi e idrofobici hanno maggiore affinità per le nanoparticelle in ragione di un probabile nascondimento di superfici idrofobiche nel *core* alchilico. A parità d'idrofobicità le superfici aromatiche presentano una maggiore affinità e subiscono più facilmente idrolisi (si veda il caso di *N*-CBz-Leu-ONP e *N*-CBz-(L)Trp-ONP). Il gruppo protettore dell' α -ammina sembra rivestire un ruolo cruciale nella stabilizzazione del substrato: una riduzione delle sue dimensioni, con conseguente diminuzione dell'idrofobicità, si traduce in un'elevata tendenza all'idrolisi spontanea rendendo inutile il catalizzatore.

Infine l'utilizzo di un substrato come *N*-CBz-(L)Trp-ONP la cui idrolisi può essere misurata sia tramite UV-Vis (prodotto *p*-Nitrofenato) che tramite fluorescenza (prodotto *N*-CBz-(L)Trp-OH), ha fatto luce sul meccanismo di inibizione da prodotto dimostrando competizione del prodotto fluorescente con il substrato in ragione di una carica negativa in più.

6.3 Auto-assemblaggio eterogeneo di un peptide catalitico con una libreria di peptidi modulatori

Tentativi di migliorare la catalisi con approccio supramolecolare sono stati condotti auto-assemblando in maniera mista il peptide H₂ (Ac-HHWDDD-OH) e una serie combinatoriale di peptidi peptidi (Ac-XXWDDD-OH, dove XX sono Leu, Phe, Ser e Arg nelle 4² combinazioni possibili) ritenuti essere modulatori dell'attività catalitica. I risultati ottenuti non sono stati in linea con le attese e questo probabilmente in relazione al fatto che il l'annullamento dell'effetto di pH non viene compensato dalle necessarie interazioni tra il sistema ed il substrato medesimo traducendosi in una diminuzione dell'attività.

6.4 Studi di enantioselettività

Mutazioni a carico della sequenza H₁ mediante inserzione di coppie d'identici ammino-acidi ai lati del residuo istidinico (Ac-XXWDDD-OH) sono state condotte nel tentativo di ottenere un intorno chirale che permettesse una catalisi enantioselettiva. Nonostante la forte eterogeneità dei residui scelti (Leu, Phe, Ser, Tyr), il sistema non ha dato i risultati attesi. A livello catalitico, quindi, non è possibile discriminare gli enantiomeri, ma è auspicabile una discriminazione al momento del *binding* che precede la medesima catalisi. Nel nostro caso, una tale discriminazione non avviene a causa di una mancata chiralità dei tioli legati alle nanoparticelle.

7. PROSPETTIVE FUTURE

La sfida conclusiva del sistema catalitico finora discusso rimane la sua enantioselettività. E' chiaro che ottenere una macchina artificiale in grado di poter discriminare totalmente tra due enantiomeri di un medesimo substrato farebbe del nostro sistema, un vero e proprio enzima artificiale. I risultati in nostro possesso ci suggeriscono che a livello catalitico non è possibile una selezione chirale, ma lasciano ben sperare che a livello di *binding* una tale selezione possa avvenire. Le nanoparticelle finora utilizzate sono passivate da una catena alchilica di Nonano alle cui estremità si trovano un gruppo solfuro e un gruppo trimetilammonico. E' evidente che una tale struttura non è chirale e che, se il *binding* del substrato avviene per intercalazione nel *core* alchilico, non ci può essere enantioselettività.

In base a questi presupposti i nostri sforzi si stanno ora concentrando sulla sintesi di nanoparticelle passivate con tioli chirali. L'approccio adottato è, al momento, quello più semplice: tripeptidi aventi, da un lato, un residuo di Cisteina, dall'altro un residuo cationico come l'Arginina; centralmente a questa sequenza si pone un residuo di Triptofano che, da un lato, permette agevolmente la misurabilità del peptide stesso in termini di concentrazione, dall'altro genera il *core* idrofobico che, secondo le nostre aspettative, dovrebbe favorire il *binding* del substrato (Figura 7.1).

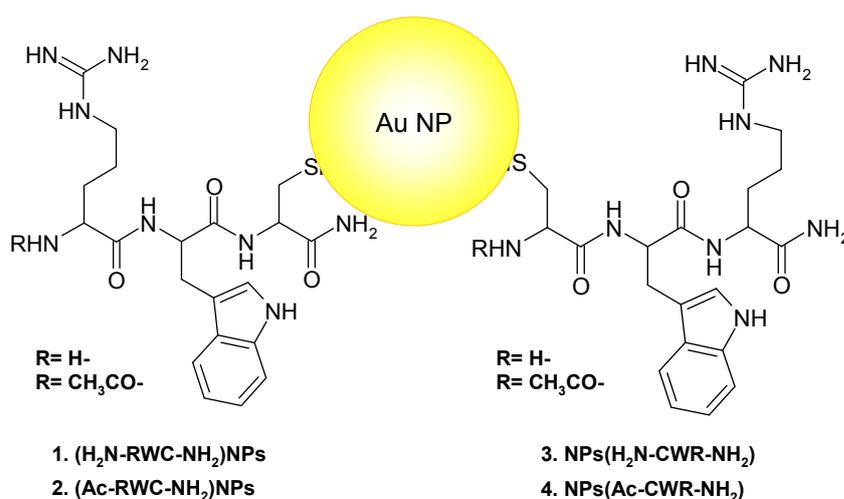


Figura 7.1: Schema delle nanoparticelle chirali sintetizzate. La raffigurazione non mostra l'effettiva composizione del monostrato che non è mista, bensì caratterizzata da uno solamente dei quattro possibili tioli ottenibile dalle due sequenze generiche: a sinistra *N*-RWC-NH₂, a destra *N*-CWR-NH₂.

Come si può vedere, a livello sintetico, sono state esplorate tutte le possibili combinazioni in ragione di un'ottimizzazione dei risultati sia dal punto di vista della qualità delle nanoparticelle che dal punto di vista del *binding* del peptide H₁:

1. H₂N-CWR-NH₂
2. Ac-CWR-NH₂
3. H₂N-RWC-NH₂
4. Ac-RWC-NH₂

Per ovvi motivi legati alla carica globale, tutti i peptidi sono stati sintetizzati come ammidi C-terminali. Il peptide 1 è l'unico ad essere un legante bidentato per le nanoparticelle poiché, oltre al tiolo, possiede un'ammina libera. Il peptide 2, analogo del peptide 4, data la protezione totale di ammina N-terminale e carbossile C-terminale possiede una singola carica positiva ed un singolo legante delle nanoparticelle. Il peptide 3, similmente al peptide 1, è l'unico ad avere due potenziali cariche positive provenienti dall'ammina e dal gruppo guanidinico.

Parallelamente, si è anche deciso, in base a quanto osservato sopra, di riprendere l'approccio dei *flanking peptides* mutanti di H₁: Ac-XHXWDDD-OH. Questo approccio si basava sull'assunto che l'enantioselettività potrebbe scaturire dall'intorno chirale del centro catalitico. Tuttavia, come già detto, la serie precedente presentava ammino-acidi interamente della serie (L) il che vanificava i nostri sforzi perché i due residui fiancheggianti l'Istidina si venivano formalmente a trovare dalla parte opposta del piano non ottenendo l'intorno chirale. Si è deciso, quindi, di sintetizzare un peptide modello con sequenza Ac-FHFWDDD-OH ((D)-FHF) in cui i due residui di Fenilalanina presentino configurazione di tipo (D) (Figura 7.2). In questo modo si potrà tentare di vedere se l'enantioselettività sia possibile mediante questo approccio.

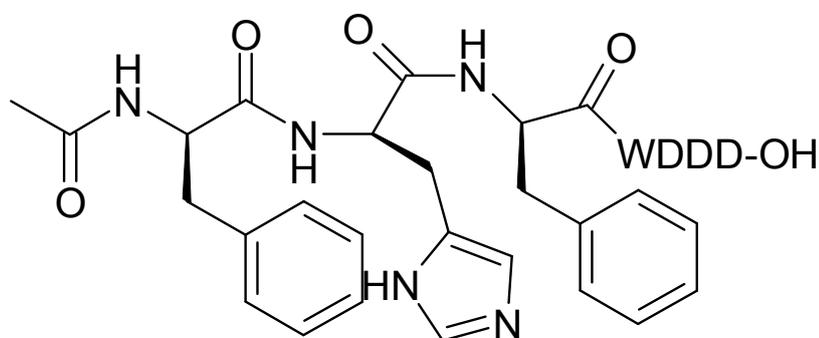


Figura 7.2: Struttura molecolare del peptide Ac-FHFWDDD-OH ((D)-FHF) avente i residui di Fenilalanina in configurazione (D).

Studi preliminari sono stati condotti combinando questi nuovi prodotti sintetici. In particolare sono state effettuate cinetiche d'idrolisi a carico dei due enantiomeri della *N*-CBz-Phe-ONP in condizioni analoghe a quelle già ampiamente descritte nel capitolo 3. Tali cinetiche sono state condotte sia utilizzando il peptide H₁ che il nuovo peptide (D)-FHF, entrambi auto-assemblati su due *batches* delle nuove nanoparticelle chirali. I risultati, per quanto preliminari, sono esaltanti come testimoniano i valori riportati in tabella 7.1.

	Ac-CWR-NH ₂ NPs ($k_{obs} \times 10^{-3}$)			Ac-RWC-NH ₂ NPs ($k_{obs} \times 10^{-3}$)		
	-	H1	(D)FHF	-	H1	(D)FHF
<i>N</i>-CBZ-(D)Phe-ONP	0.054	0.081	0.115	0.028	0.065	0.270
<i>N</i>-CBZ-(L)Phe-ONP	0.059	0.083	0.097	0.047	0.029	0.159

Tabella 7.1: Costanti osservate (k_{obs}) per l'idrolisi degli enantiomeri della *N*-CBz-Phe-ONP (10 μ M) in presenza di due tipologie di nanoparticelle: NPs-Ac-CWR-NH₂ (colonna rossa di sinistra) e Ac-RWC-NH₂-NPs (colonna azzurra di destra). Per ciascuno dei due tipi gli esperimenti sono stati condotti sulle nanoparticelle nude (colonna di sinistra), sulle nanoparticelle semi-saturate da H₁ (colonna centrale) e sulle nanoparticelle semi-saturate con (D)FHF (colonna di destra). [NPs] \approx 60 μ M (riferita alla concentrazione che viene semi-saturata da 4.75 μ M di H₁). [H₁]= 4.75 μ M. [(D)FHF]= 5.3 μ M. 10 mM HEPES, pH 7.0, 10% CH₃CN. T= 37°C.

Per quanto i valori di k_{obs} siano più bassi di quelli osservati con il precedente sistema di almeno un ordine di grandezza ($k_{obsNR4+-AuNPs} = 0.94 \times 10^{-3}$; $k_{obsNR4+-AuNPs/H1} = 5.2 \times 10^{-3}$) vi sono alcune fondamentali osservazioni da fare.

Innanzitutto le nanoparticelle passivate con Ac-CWR-NH₂ non sembrano essere enantioselettive, mentre le nanoparticelle passivate del peptide reciproco Ac-RWC-NH₂ esibiscono enantioselettività al 50% per l'enantiomero (L). Già di per sé questo è un risultato straordinario.

Ancora più straordinaria è l'osservazione che, a seguito dell'assemblaggio dei peptidi H₁ o (D)FHF, l'enantioselettività si inverte a favore dell'enantiomero (D) per un valore, ancora una volta, del 50%.

E' anche fondamentale notare come H_1 sia meno attivo di (D)FHF nonostante quanto detto sopra circa l'ingombro sterico a carico dell'Istidina. Evidentemente, non solo la chiralità gioca un ruolo fondamentale nell'ostacolare i processi di catalisi, ma può addirittura intervenire in maniera opposta aumentando il potere catalitico del peptide stesso.

Questi risultati, per quanto preliminari, non solo gettano nuovi spunti di riflessione sul legame tra la struttura e la funzione dei peptidi impiegati, ma sembrano anche essere un incoraggiante punto di partenza per ottenere quella catalisi enantioselettiva che ormai da tempo sfugge al controllo del nostro sistema catalitico supramolecolare.

Self-Assembly of a Catalytic Multivalent Peptide–Nanoparticle Complex

Davide Zaramella, Paolo Scrimin,* and Leonard J. Prins*

Department of Chemical Sciences, University of Padova, Via Marzolo 1, 35131 Padova, Italy

S Supporting Information

ABSTRACT: Catalytically active peptide–nanoparticle complexes were obtained by assembling small peptide sequences on the surface of cationic self-assembled monolayers on gold nanoparticles. When bound to the surface, the peptides accelerate the transesterification of the *p*-nitrophenyl ester of *N*-carboxybenzylphenylalanine by more than 2 orders of magnitude. The gold nanoparticle serves as a multivalent scaffold for bringing the catalyst and substrate into close proximity but also creates a local microenvironment that further enhances the catalysis. The supramolecular nature of the ensemble permits the catalytic activity of the system to be modulated in situ.

The catalytic efficiency, mechanistic pathways, and structural complexity displayed by enzymes make them a tremendous source of inspiration for chemists involved in catalyst development.^{1,2} Nature has evolved enzymes as large multi-kilodalton complex structures in which even units that are remote from the actual active site may profoundly affect the activity of the enzyme.³ The much lower complexity of artificial enzyme mimics may be an important reason for their typical modest performances with respect to enzymes. This awareness has led to an interest in catalysts based on multivalent scaffolds, such as dendrimers,⁴ micelles,⁵ and nanoparticles,⁶ with the idea of increasing the structural complexity of the synthetic system. A key challenge is straightforward access to synthetic catalysts that can match up to the size and complexity of enzymes. The necessity for multistep synthesis can be overcome by relying on self-assembly for the formation of the multivalent structure. In particular, the self-assembly of catalytic monolayers on the surface of gold nanoparticles (Au NPs) to give gold monolayer-protected clusters (Au MPCs) is emerging as an attractive strategy.^{7,8} Nonetheless, although they rely on self-assembly, the composition of self-assembled monolayers (SAMs) on Au NPs is typically still of rather low complexity.⁹ This mainly originates from the use of synthetic protocols for mixed SAM formation (e.g., place exchange), which do not give full control over the final composition, require purification of each single NP system, and suffer from issues related to the characterization of mixed SAMs both in terms of composition and morphology. For that reason, we recently started to study the formation of heterofunctionalized multivalent structures relying on the self-assembly of small peptides on the surface of Au MPCs.¹⁰ Those studies extended the seminal contributions by Rotello and co-workers, which

amply demonstrated the attractiveness of cationic Au MPCs as a construction element for the development of innovative biosensors.^{11–13} Here we now show that the self-assembly of histidine-containing peptides **H**₁–**H**₃ on the surface of Au MPC **1** triggers their esterolytic activity (Figure 1), resulting in

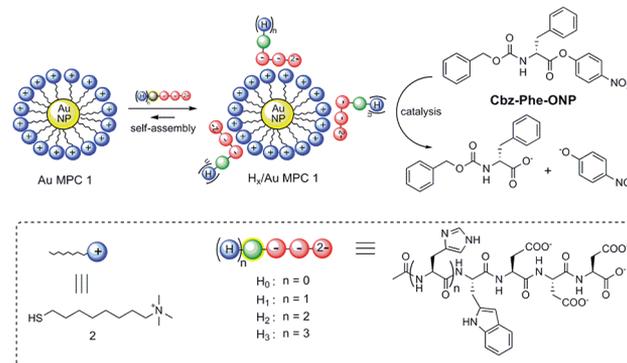


Figure 1. Self-assembly of peptides **H**₀–**H**₃ on the surface of Au MPC **1**, resulting in the formation of **H**_{*x*}/Au MPC **1** complexes that (for *x* = 1–3) can catalyze the transesterification of the substrate **Cbz-Phe-ONP**.

nanostructures that can induce a more than 100-fold rate acceleration. Self-assembly is a prerequisite for catalysis, as the peptides are not catalytically active at all in the absence of the Au MPCs. Importantly, the multivalent surface plays a crucial role in tuning the catalytic activity. The surface not only brings the substrate and catalyst in close proximity but also generates a microenvironment with an enhanced local pH that further activates the catalytic peptide.

We previously showed that the (covalent) insertion of imidazole residues in a SAM generates nanosystems that act as transesterification catalysts.¹⁴ It occurred to us that cationic Au MPCs would be an excellent multivalent platform for bringing such catalytic units together through self-assembly. Peptides **H**₁–**H**₃ were designed taking into consideration three issues: (a) the presence of three aspartic acid residues for binding to Au MPCs **1**, (b) the presence of a fluorescent tryptophan residue to verify the binding, and (c) the presence of one or more histidine residues for catalysis. Peptide **H**₀ lacking histidine units was added as an inert reference compound. Au MPCs **1** (1.8 ± 0.3 nm diameter) containing trimethylammonium headgroups were prepared and characterized as described

Received: March 21, 2012

Published: May 4, 2012

previously.^{10,15} Binding of peptides to Au MPCs **1** was studied using fluorescence titrations, relying on the ability of the Au NPs to quench the fluorescence of bound fluorophores.¹⁶ Thus, the fluorescence intensity of tryptophan emission was measured as a function of the amount of peptide H_0-H_3 added to a solution of Au MPC **1** ($[headgroup] = 60 \mu M$) in water buffered at pH 7.0. The obtained profiles (Figure 2) are

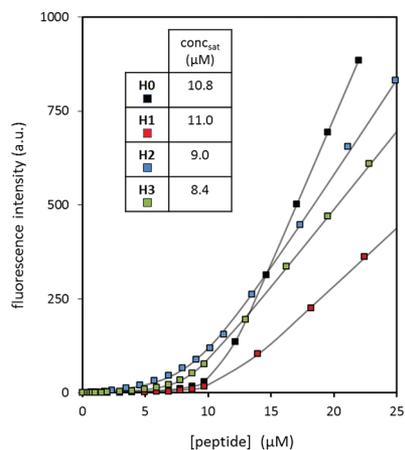


Figure 2. Tryptophan fluorescence intensity at 360 nm as a function of the concentration of peptides H_0-H_3 in the presence of Au MPC **1** ($[headgroup] = 60 \mu M$). Conditions: pH 7.0; [HEPES] = 10 mM; $H_2O/CH_3CN = 90:10$; $T = 37^\circ C$). The solid lines represent best fits to a binding model used to determine the surface saturation concentration ($conc_{sat}$) values shown in the inset.¹¹ The slightly different slopes in the linear parts of the curves result from the different intrinsic fluorescence properties of the tryptophan residues in H_0-H_3 (see the SI).

indicative of strong complex formation between the peptides and Au MPC **1**. From the binding isotherms, a surface saturation concentration ($conc_{sat}$) was determined using a procedure reported previously.¹⁰ The surface saturation concentration defines the maximum loading of the peptide on the Au MPC surface (Figure 2 inset).¹⁷

Subsequently, we tested the catalytic activity of the obtained systems in the transesterification of the *p*-nitrophenyl ester of *N*-carboxybenzylphenylalanine (**Cbz-Phe-ONP**).¹⁸ Kinetic experiments were performed by adding the substrate ($10 \mu M$) to a solution of Au MPC **1** and the peptides H_1-H_3 at their respective surface saturation concentrations in 9:1 H_2O/CH_3CN buffered at pH 7.0 at $37^\circ C$. The presence of 10% CH_3CN was required for solubilization of the substrate. The kinetics of hydrolysis were followed by measuring the increase in absorbance at 400 nm originating from the release of the *p*-nitrophenolate anion (PNP). We were excited to observe that all of the complexes $H_{1-3}/Au MPC 1$ gave rise to rate accelerations of at least 2 orders of magnitude for the cleavage of **Cbz-Phe-ONP** relative to the background reaction (Figure 3a,b). The observed change in absorbance of 0.1 units at 400 nm corresponded to that expected for the complete hydrolysis of $10 \mu M$ substrate. Importantly, the addition of any one of the peptides H_1-H_3 at the same concentrations but in the absence of Au MPC **1** did not result in any rate acceleration over the background (see the SI). The obtained rate constants were corrected for the surface saturation concentration in order to compare the contributions to catalysis by the various peptides. A plot of the obtained second-order rate constants as a function of the number of histidines present in the catalyst gave a

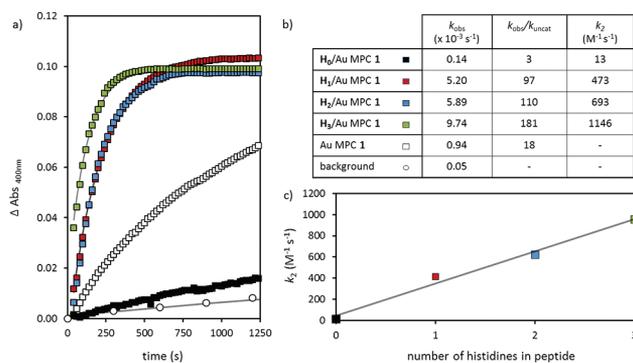


Figure 3. (a) Changes in the absorbance at 400 nm upon the addition of **Cbz-Phe-ONP** ($10 \mu M$) to solutions of Au MPC **1** (□), $H_0/Au MPC 1$ (black ■), $H_1/Au MPC 1$ (red ■), $H_2/Au MPC 1$ (blue ■), and $H_3/Au MPC 1$ (green ■). Included also are data for the background hydrolysis of **Cbz-Phe-ONP** at the same concentration (○). Solid lines represent the best fits to a kinetic model (see the SI). Conditions: $[Au MPC 1 headgroup] = 60 \mu M$; $[H_0] = 11 \mu M$, $[H_1] = 11 \mu M$, $[H_2] = 8.5 \mu M$, $[H_3] = 8.5 \mu M$; [HEPES] = 10 mM; $H_2O/CH_3CN = 90:10$; pH 7.0; $T = 37^\circ C$. (b) Observed rate constants (k_{obs}), rate accelerations relative to background (k_{obs}/k_{unecat}), and rate constants corrected for the surface saturation concentration of peptide H_0-H_3 (k_2). (c) Plot of the second-order rate constant k_2 as a function of the number of histidines present in peptides H_0-H_3 .

straight line (Figure 3c). This shows that the histidine residues are indeed at the origin of the catalytic effect. Furthermore, the linear correlation indicates that the catalysis does not originate from the cooperative action between two histidine residues in the same probe.

Regrettably, the low solubility of the substrate did not permit us to perform catalytic experiments using large excesses of substrate. To show that the catalytic system $H_1/Au MPC 1$ indeed works under turnover conditions, this problem was solved by sequentially adding batches of **Cbz-Phe-ONP** substrate at the saturation concentration of $10 \mu M$. The amount of PNP released was measured as a function of time after each addition, yielding the profile depicted in Figure 4. Since H_1 was present at a concentration of $5 \mu M$ (see below), the total release of $40 \mu M$ PNP shows that $H_1/Au MPC 1$ indeed operates under turnover conditions. The slight decrease in reactivity observed after each addition presumably originates from competitive binding of the reaction products. The

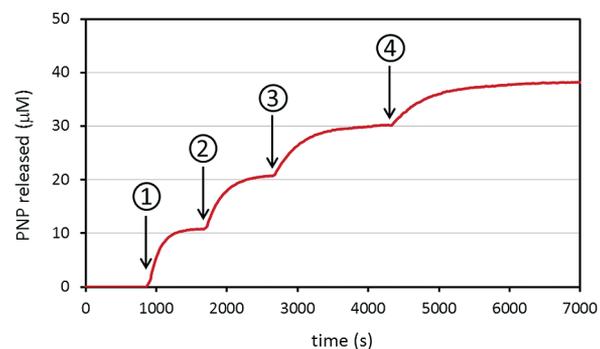


Figure 4. Amounts of PNP released upon four consecutive additions of **Cbz-Phe-ONP** substrate ($10 \mu M$) to a solution of $H_1/Au MPC 1$ as a function of time. Conditions: $[Au MPC 1 headgroup] = 60 \mu M$; $[H_1] = 5 \mu M$; [HEPES] = 10 mM; $H_2O/CH_3CN = 90:10$; pH 7.0; $T = 37^\circ C$.

experiments also show that there is no accumulation of intermediates during the reaction.

To understand the origin of the catalytic effect, a series of experiments were performed. Interestingly, it was observed that the simple addition of Au MPC 1 to **Cbz-Phe-ONP** also resulted in a 20-fold enhancement in the hydrolysis rate (□ in Figure 3a), which points at a catalytic role of the cationic headgroups. The addition of tetramethylammonium chloride at the same concentration had no effect at all (see the SI). Similar effects have also been observed in cationic micelles and ascribed to an increase in the local pH where the substrate binds.^{19–21} Experimental evidence that the pH at the monolayer surface is indeed higher than the bulk pH was obtained by adding the pH indicator bromothymol blue (30 μM) to a solution of Au MPC 1 under the exact conditions of the catalytic experiments (i.e., pH 7.0). Bromothymol blue ($pK_a = 7.1$) has two negative charges under basic conditions. This, combined with the presence of a large hydrophobic aromatic portion, was expected to generate a significant binding affinity for Au MPC 1. Comparison of the absorption spectra in the presence and absence of Au MPC 1 indeed showed a significant increase of 0.29 units in the absorption maximum at 620 nm, corresponding to an apparent local pH of 7.7 (see the SI). Importantly, the catalytic effect of Au MPC 1 is to a large extent suppressed upon addition of the reference peptide **H**₀ at the surface saturation concentration of 11.0 μM (■ in Figure 3a). Thus, the reference compound **H**₀ neutralizes the effect of the trimethylammonium groups on the pH. These observations were confirmed by an experiment in which peptides **H**₀ and **H**₁ were added 300 s after mixing Au MPC 1 and the substrate (Figure 5a). Relative to the control (no addition), the resulting profiles clearly indicate the accelerating effect of **H**₁ and the inhibitory effect of **H**₀ on the catalysis. In addition, this experiment also illustrates an important aspect of supramolecular catalysts, which is the ability to modulate the activity in situ as a function of the type of components added.

The high local pH indicates that cooperativity between imidazoles localized on different probes, as is frequently observed in multivalent imidazole-containing catalysts,^{14,22,23} is unlikely to be the source of the observed catalytic activity, as this would require both protonated and unprotonated imidazoles. This was indeed confirmed by measuring the rate of hydrolysis of **Cbz-Phe-ONP** as a function of the amount of **H**₁ added to Au MPC 1 over the range from 0 to 11 μM. In the case of positive cooperativity, an exponential profile would be expected, corresponding to the exponential formation of catalytic sites composed of two imidazoles.^{24,25} Rather, the obtained profile was exactly the opposite of that, showing a strong increase in k_{obs} at low **H**₁ concentrations (up to 4 μM) and constant values afterward (red ■ in Figure 5b). Evidently, the highest catalytic activity *per histidine residue* is obtained not at maximum surface saturation of Au MPC 1 by **H**₁ but rather in a situation in which the peptide is isolated on the surface. Thus, the obtained profile indicates an active contribution of the cationic SAM to the catalysis. Indeed, the results are fully consistent with the hypothesis that the presence of a higher local pH on the SAM affects the concentration of deprotonated nucleophilic imidazole. As the peptide covers the surface, its carboxylates replace the OH[−] counterions of the ammonium headgroups, thus decreasing the local pH.²¹ This in turn increases the concentration of protonated imidazole. Evidence for this hypothesis was obtained by an analogous experiment in which the contribution of the monolayer was suppressed by

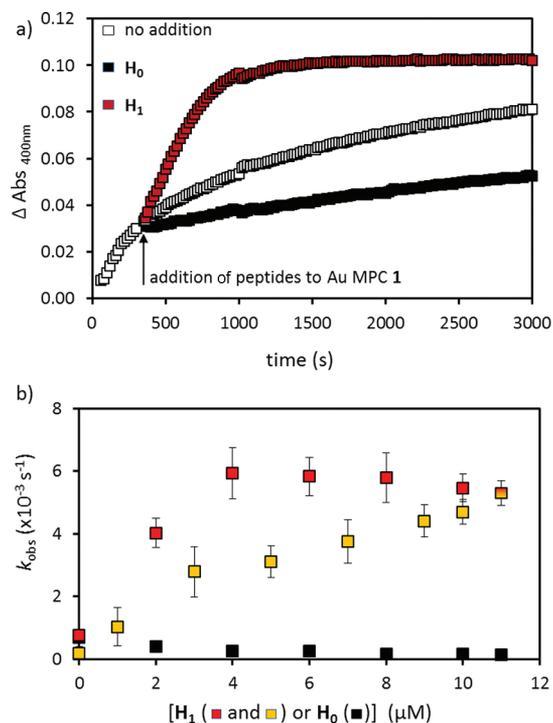


Figure 5. (a) Changes in the absorbance at 400 nm as functions of time for the experiments in which either **H**₀ (11 μM, black ■) or **H**₁ (11 μM, red ■) was added 300 s after mixing of Au MPC 1 (60 μM, □) and **Cbz-Phe-ONP** (10 μM). Conditions: [HEPES] = 10 mM; H₂O/CH₃CN = 90:10; pH 7.0; $T = 37^\circ\text{C}$. (b) Observed rate constants (k_{obs}) as functions of the concentrations of peptide **H**₁ (red and yellow ■) or **H**₀ (black ■) at a constant concentration of Au MPC 1 (60 μM) and **Cbz-Phe-ONP** (10 μM). The yellow symbols were obtained in the experiment performed with [**H**₀] + [**H**₁] held constant at 11 μM. Conditions: [HEPES] = 10 mM; H₂O/CH₃CN = 90:10; pH 7.0; $T = 37^\circ\text{C}$.

performing the measurements in the presence of a compensating amount of **H**₀ (i.e., [**H**₀] + [**H**₁] held constant at 11 μM; yellow ■ in Figure 5b). In this case, the increase in k_{obs} as a function of [**H**₁] was linear over the full interval explored, but the slope was smaller than that observed in the first part of the previous plot, accounting for a lower deprotonated imidazole concentration in this case. Also, the observation that the reaction rate decreased when the pH was lowered (see the SI) is consistent with this explanation, since a cooperative mechanism would have led to an increase in the rate resulting from the presence of both protonated and nonprotonated imidazoles. Similar changes in the reactivity of imidazoles because of a different local chemical environment have also been observed in other multivalent systems.^{26,27}

The above experiment indicates that the increase in local pH due to the cationic monolayer can explain the higher activity of **H**₁ at lower surface loadings but not at the surface saturation concentration, where this effect is largely suppressed. A final piece of information came from measurements of the initial reaction rate as a function of **Cbz-Phe-ONP** concentration (Figure 6). Although the solubility of the substrate permitted only a relatively small range (1–10 μM) to be studied, the nonlinearity of the plot of the initial rate versus substrate concentration gave clear evidence of substrate binding to Au MPC 1. We hypothesize that this binding is driven by hydrophobic interactions between the highly apolar substrate and the hydrophobic part of the monolayer. Interactions of this

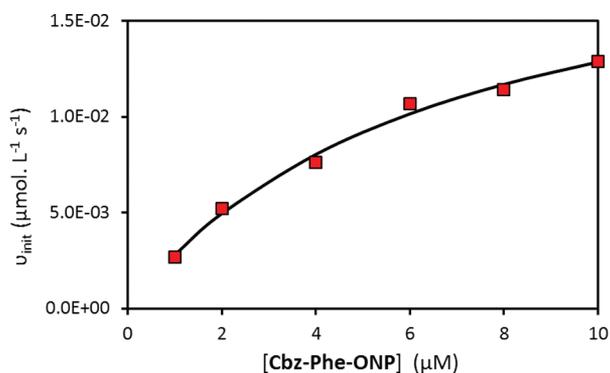


Figure 6. Initial rate as a function of the concentration of Cbz-Phe-ONP. Conditions: [Au MPC 1 headgroup] = 60 μM; [H_1] = 10 μM; [HEPES] = 10 mM; H₂O/CH₃CN = 90:10; pH 7.0; T = 37 °C.

type between small molecules and SAMs have also been reported by Mancin and co-workers.²⁸ The contemporaneous binding of both H_1 and the substrate on the multivalent surface of Au MPC 1 at low micromolar concentrations results in an enormous increase in the effective molarity, which, along with the above-mentioned pH effect, appears to be the main reason for the observed high catalytic activity.

In conclusion, we have developed a supramolecular catalytic system formed through the self-assembly of small peptides on the surface of Au MPCs. Self-assembly is a prerequisite for the catalysis, since the catalytic peptides do not display any activity in the absence of Au MPCs. Assembly on the surface of Au MPC 1 results in a rate acceleration of at least 2 orders of magnitude in a transesterification reaction. The multivalent surface is essential for bringing the substrate and catalyst into close proximity but, importantly, also generates a local chemical environment that enhances the reactivity of the catalytic unit. In this way, the system mimics some of the key features of enzymes. The system presented here allows for a series of exciting possibilities, such as the possibility of fine-tuning the catalytic properties simply by altering the catalytic peptide sequence or the possibility of turning the catalytic activity on or off in situ as a result of the addition of inhibitors/activators. In our opinion, this approach has the potential to be exploited for the development of synthetic systems able to match up to the complexity displayed by enzymes simply by combining various small fragments.

■ ASSOCIATED CONTENT

Ⓢ Supporting Information

Synthesis and characterization of H_0 – H_3 , procedures for the kinetic experiments, background rates and control experiments, titration with bromothymol blue, and reaction rate as a function of pH. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

paolo.scrimin@unipd.it; leonard.prins@unipd.it

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

Alessandro Cazzolaro is gratefully acknowledged for the synthesis of Au MPC 1. Financial support from the ERC

(StG-239898), COST (CM0703 and CM0905), and MIUR is acknowledged.

■ REFERENCES

- (1) Wiester, M. J.; Ulmann, P. A.; Mirkin, C. A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 114.
- (2) Breslow, R. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 146.
- (3) Fersht, A. *Structure and Mechanism in Protein Structure*, 3rd ed.; Freeman: New York, 1999.
- (4) Kofoed, J.; Reymond, J. L. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 656.
- (5) Mancin, F.; Scrimin, P.; Tecilla, P.; Tonellato, U. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 2150.
- (6) Astruc, D.; Lu, F.; Aranzas, J. R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 7852.
- (7) Schatz, A.; Reiser, O.; Stark, W. J. *Chem.—Eur. J.* **2010**, *16*, 8950.
- (8) Roy, S.; Pericas, M. A. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2669.
- (9) Gentilini, C.; Pasquato, L. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 1403.
- (10) Pieters, G.; Cazzolaro, A.; Bonomi, R.; Prins, L. *J. Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1916.
- (11) Bunz, U. H. F.; Rotello, V. M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 3268.
- (12) De, M.; Ghosh, P. S.; Rotello, V. M. *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 4225.
- (13) Shenhar, R.; Rotello, V. M. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 549.
- (14) Pasquato, L.; Rancan, F.; Scrimin, P.; Mancin, F.; Frigeri, C. *Chem. Commun.* **2000**, 2253.
- (15) Bonomi, R.; Cazzolaro, A.; Prins, L. *J. Chem. Commun.* **2011**, *47*, 445.
- (16) Dulkeith, E.; Morteani, A. C.; Niedereichholz, T.; Klar, T. A.; Feldmann, J.; Levi, S. A.; van Veggel, F.; Reinhoudt, D. N.; Moller, M.; Gittins, D. I. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89*, No. 203002.
- (17) The curvature of the binding isotherms measured for H_2 and H_3 indicated a slightly lower affinity of these peptides for Au MPC 1 attributed to the presence of the (protonated) imidazoles. It was calculated that upon the addition of 8.5 μM H_2 and H_3 , ~15% of these peptides were not bound. For H_0 and H_1 (at 11 μM) these values were 5 and 8%, respectively.
- (18) All studies were performed on enantiomerically pure D-Cbz-Phe-ONP. Kinetics with the L enantiomer revealed no significant enantioselectivity.
- (19) Tonellato, U. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1977**, 821.
- (20) Fornasier, R.; Tonellato, U. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* **1980**, *76*, 1301.
- (21) For an overview of ion distributions at the interface of association colloids, see: Bunton, C. A.; Nome, F.; Quina, F. H.; Romsted, L. S. *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 357.
- (22) Guler, M. O.; Stupp, S. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12082.
- (23) Delort, E.; Darbre, T.; Reymond, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15642.
- (24) Zaupa, G.; Mora, C.; Bonomi, R.; Prins, L. J.; Scrimin, P. *Chem.—Eur. J.* **2011**, *17*, 4879.
- (25) Zaupa, G.; Scrimin, P.; Prins, L. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5699.
- (26) Pengo, P.; Polizzi, S.; Pasquato, L.; Scrimin, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1616.
- (27) Javor, S.; Delort, E.; Darbre, T.; Reymond, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13238.
- (28) Guarino, G.; Rastrelli, F.; Mancin, F. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1523.

Article

Catalysis of Transesterification Reactions by a Self-Assembled Nanosystem

Davide Zaramella, Paolo Scrimin * and Leonard J. Prins *

Department of Chemical Sciences, University of Padova, Via Marzolo 1, 35131 Padova, Italy;
E-Mail: davide.zaramella@studenti.unipd.it

* Authors to whom correspondence should be addressed; E-Mails: paolo.scrimin@unipd.it (P.S.); leonard.prins@unipd.it (L.J.P.); Tel. +39-049-827-5276 (P.S.); +39-049-827-5256 (L.J.P.); Fax: +39-049-827-5250 (P.S. & L.J.P.).

Received: 30 November 2012 / Accepted: 14 January 2013 / Published: 21 January 2013

Abstract: Histidine-containing peptides self-assemble on the surface of monolayer protected gold nanoparticles to form a catalytic system for transesterification reactions. Self-assembly is a prerequisite for catalysis, since the isolated peptides do not display catalytic activity by themselves. A series of catalytic peptides and substrates are studied in order to understand the structural parameters that are of relevance to the catalytic efficiency of the system. It is shown that the distance between the His-residue and the anionic tail does not affect the catalytic activity. On the other hand, the catalytic His-residue is sensitive to the chemical nature of the flanking amino acid residues. In particular, the presence of polar Ser-residues causes a significant increase in activity. Finally, kinetic studies of a series of substrates reveal that substrates with a hydrophobic component are very suitable for this catalytic system.

Keywords: supramolecular catalysis; peptides; nanoparticles; self-assembly

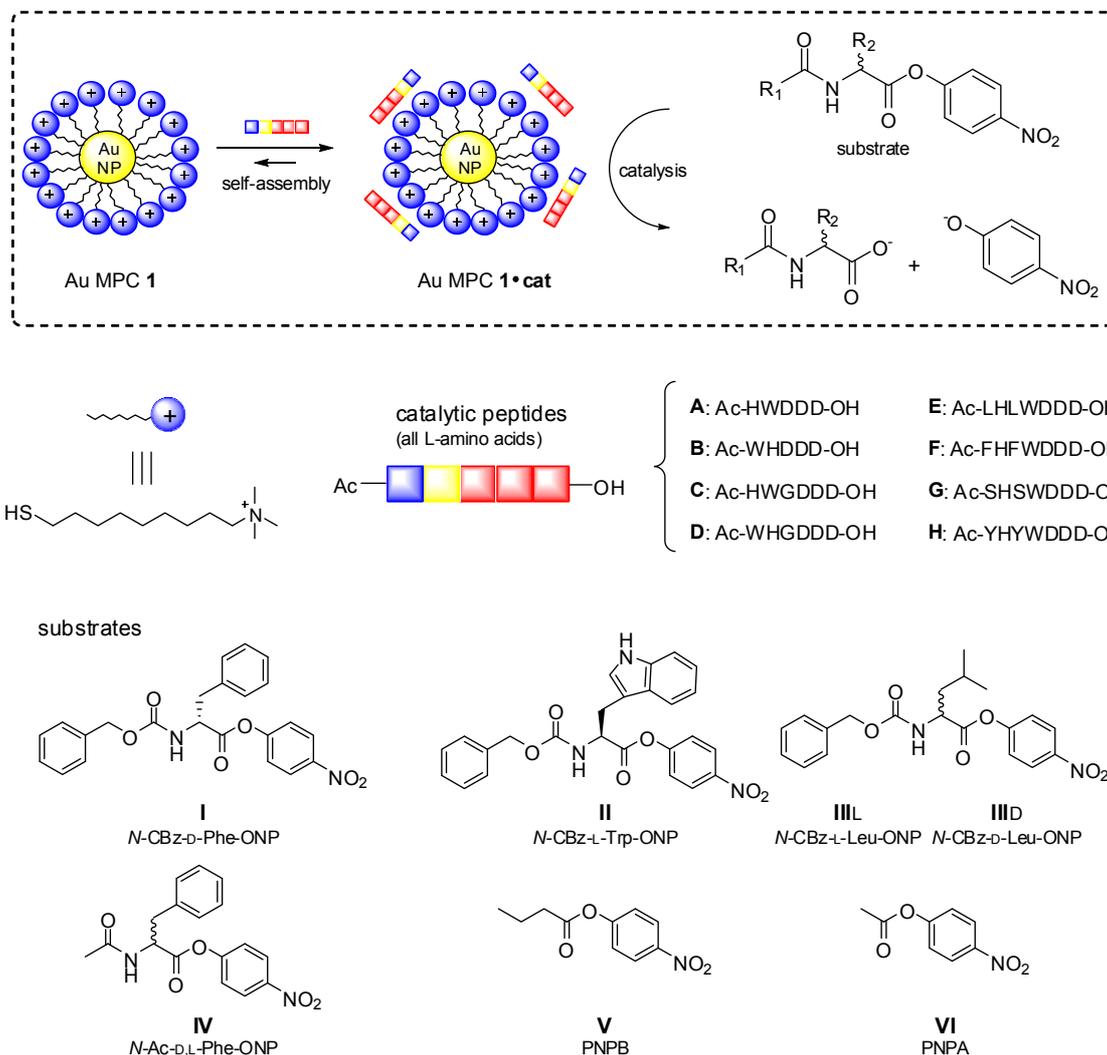
1. Introduction

Supramolecular catalysis implies the use of supramolecular chemistry for catalyst development [1–4]. Approaches include the use of recognition motifs to drive active catalyst formation or to change the coordination sphere around a catalytic center [5–7]. Noncovalent interactions are also used to self-assemble molecular capsules to create a confined molecular space, which can affect reactions occurring in the interior [8]. The main advantage of using supramolecular chemistry is that, because

relying on self-assembly, the access to the catalyst is very straightforward. This then facilitates the preparation of catalyst libraries and systems of a high complexity. Complex catalytic systems are of interest, because these may manifest features that are common to enzymes, but more difficult to observe in a synthetic system [9,10]. Such phenomena include multivalency, cooperativity and allostery, which are often fundamental in biological regulatory pathways. Examples of complex self-assembled catalytic systems are micellar systems [11] and self-assembled monolayers on gold nanoparticles [12,13]. The advantage of micelles is their spontaneous formation *in situ*, whereas gold nanoparticle-based systems require a purification step to remove reagents and excess of thiols. On the other hand, the multivalent nature of nanoparticle-based systems is maintained even at low concentrations where micellar systems fall apart. Recently, we have initiated a hybrid approach aimed at combining the positive aspects of both systems by assembling small molecules on the surface of monolayer protected gold nanoparticles [14]. Inspired by contributions of Rotello and co-workers [15–18], we found that anionic peptides and phosphates bound quantitatively to cationic monolayers even at low micromolar concentrations under physiologically relevant conditions [19]. It was shown that complex surfaces could be simply generated by co-assembling different small molecules on the monolayer surface [20].

One of our main targets is to use this approach for the formation of complex catalytic systems. Previously, we have shown that the system obtained through the self-assembly of peptide **A** on the monolayer surface of Au MPC **1** catalyses the hydrolysis of substrate **I** (CBz-D-Phe-ONP) (Figure 1) [21]. The rate of hydrolysis is accelerated by nearly two orders of magnitude compared to the background rate (*i.e.*, using the same concentration of peptide **A**, but in the absence of Au MPC **1**). Detailed kinetic studies revealed the following information on the origin of the catalytic effect. First, the linear increase in second-order rate constant as a function of the number of histidines present in an analogous series of peptides revealed that, contrary to what is frequently observed in other multivalent imidazole-based esterolytic catalysts, cooperativity between imidazoles does not appear to play a role in this system. This may be related to the fast exchange kinetics of the systems' components. This was confirmed by the absence of a bell shaped curve in pH-dependent studies, which is typical for a cooperative mechanism involving a nucleophilic and protonated imidazole [22]. Second, the major origin of catalysis was assigned to the increase in effective concentration resulting from the co-localization of the substrate and the catalyst on the surface of Au MPC **1**. Binding of peptide **A** could be detected directly through fluorescence titration experiments; the affinity of substrate **I** emerged in an indirect manner from the observation that the system displayed Michaelis-Menten saturation behavior with respect to the substrate concentration. Finally, apart from bringing substrate and catalyst in close proximity, the cationic monolayer played an additional role of causing a local higher pH, thus causing an increase of the concentration of deprotonated imidazole, which is the catalytic species. The latter emerged from the nonlinear decrease in rate upon diluting the concentration of **A** on the surface. These experiments provided insight in the functioning of this catalytic system, but were based only on a single couple of catalyst and substrate. Here, we extend our studies towards other catalytic peptides and substrates with the main goal of determining the scope of the system. In particular, we were interested to determine the effect of structural changes in both catalyst and substrate on the catalytic efficiency. The outcome could then confirm and further improve our understanding of the system and set its boundaries.

Figure 1. Schematic representation of the catalytic system and structures of catalysts and substrates.



2. Results and Discussion

2.1. Structural Modifications in the Catalytic Peptide

Our first interest was in investigating to which extent the catalytic efficiency of peptide **A** was affected by small structural changes, in particular regarding the distance between the anionic tail and the His-residue. For that reason, two analogues of **A** were synthesized with the His-residue immediately attached to the DDD-fragment (**B**) or separated by two amino acids (**C**). In all sequences, also, a Trp-residue was added as a fluorescent probe to facilitate detection of peptide binding to the nanoparticles. Peptide **D** was added to study whether the Trp-spacer in the original peptide **A** was of importance. All peptides were synthesized on solid support using Fmoc-chemistry and, after cleavage, purified by RP-HPLC and characterized by UPLC and MS (see Supporting Information).

The complexation of peptides **A–D** on the monolayer surface of Au MPC **1** was studied by fluorescence titrations as described before under identical experimental conditions ($[R-N(CH_3)_3^+] = 60 \pm 10 \mu\text{M}$; $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN} = 90:10$; $[\text{HEPES}] = 10 \text{ mM}$; $\text{pH} = 7.0$; $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$) [21].

Also previously studied, peptide **A** was added in order to have a data set performed with the same batch of nanoparticles [21]. The resulting binding isotherms (Figure 2a) reveal that all peptides bind the cationic monolayer under saturation conditions. Surface saturation concentrations (SSCs) were determined as reported before and are listed in Table 1 [21]. All peptides have similar SSCs in the range between 7.8 (**D**) and 9.5 (**A**) [23]. Subsequently, kinetic studies were performed to determine the efficiency of the catalytic systems in accelerating the hydrolysis of the substrate **I** (Figure 2b). Kinetic experiments were performed by adding the substrate (10 μM) to a solution of Au MPC **1** and the peptides **A–D** in a $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (9:1) mixture buffered at pH 7.0 at 37 $^\circ\text{C}$. Peptides **A–D** were present at concentrations corresponding to 50% of their respective surface saturation concentrations, since we had previously shown that these conditions were favorable for catalysis (see above) [21]. From the kinetic profiles pseudo-first order rate constants, k_{obs} , were obtained by fitting the experimental data to an appropriate model. In order to permit a direct comparison between the different peptides, the k_{obs} -values were corrected for the peptide-concentration to yield the second order rates constants, k_2 (Table 1). It is noted that in the absence of Au MPC **1**, none of the peptides displayed any significant activity (data not shown). Analysis of the data shows that the distance between the His-residue and the anionic tail is not crucial with peptides **A** and **C**, having nearly identical rate constants ($k_{2,\text{A}} = 2.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ and $k_{2,\text{C}} = 1.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$). In fact, peptide **B**, which does not even have a spacer between the His-residue and the DDD-tail, has a second-order rate constant that is the lowest ($k_{2,\text{B}} = 0.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$). Rather, the sequence order of the catalytic peptide seems of more importance, *i.e.*, the presence of a Trp-residue preceding the His-residue (HisTrp as in **A** and **C** compared to TrpHis in **B** and **D**). Previous studies have recently demonstrated that hydrophobic units (such as Trp) present in the probes can be involved in binding to the monolayer, because of interactions with the hydrophobic interior part of the monolayer [24,25]. The obtained data suggest that such an interaction may favor catalytic activity by affecting the relative position of the His-residue compared to the cationic head groups. It is noted, though, that the observed effect on catalytic activity is relatively small.

We next proceeded with the synthesis and study of a series of peptides aimed at determining whether the catalytic activity of the His-residue could be affected by flanking residues. For that purpose, peptides **E–H** were synthesized with the consensus sequence Ac-XHXWDDD-OH (Figure 1). The His-residue was positioned between Leu (**E**)-, Phe (**F**)-, Ser (**G**)- and Tyr (**H**)-residues in order to explore different local chemical environments. All peptides were synthesized on solid support using Fmoc-chemistry and, after cleavage, purified by RP-HPLC and characterized by UPLC and MS (see Supporting Information). As before, the complexation of peptides **E–H** on the monolayer surface of Au MPC **1** was studied by fluorescence titrations (Figure 3a). From the obtained curves, it is immediately evident that the chemical nature of the catalytic tail significantly affects the SSC (Table 2). The highest SSC ($15.9 \pm 0.2 \mu\text{M}$) is observed for peptide **H** containing two Tyr-residues. Peptides **E** and **F** have intermediate SSC values of $8.6 \pm 0.2 \mu\text{M}$ and $9.1 \pm 0.2 \mu\text{M}$, respectively, whereas peptide **G** with polar Ser-residues has a significantly lower SSC ($4.4 \pm 0.2 \mu\text{M}$). The shallow curve observed for peptide **G** is a sign of the lower affinity of this peptide for the monolayer surface. Kinetic experiments were performed as described earlier using substrate **I** (Figure 3b), and the results are given in Table 2. The obtained data (k_2 -value, *i.e.*, corrected for the peptide concentration) clearly show an effect of the peptide sequence on catalytic activity. In particular, a higher activity is observed for the

His-residue in peptide **G** surrounded by Ser-residues. Tentatively, this might be explained by an enhanced stabilization of the polar transition state of the reaction by the polar peptide sequence. One could argue that the lower SSC of peptide **G** causes an enhanced activity of the system, because of a lesser inhibition of the intrinsic catalytic activity of Au MPC **1**. However, the intrinsic activity of Au MPC **1** ($k_{\text{obs}} = 1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, see below) is too low to explain the observed difference.

Figure 2. (a) Tryptophan fluorescence intensity at 360 nm as a function of the concentration of peptides **A–D** in the presence of Au MPC **1** ([headgroup] = $60 \pm 5 \mu\text{M}$). Conditions: pH 7.0; [HEPES] = 10 mM; H₂O/CH₃CN = 90:10; T = 37 °C; (b) Changes in the absorbance at 400 nm upon the addition of substrate **I** to a solution of Au MPC **1** and either one of the peptides **A–D**. Conditions: Au MPC **1** [headgroup] = $60 \pm 5 \mu\text{M}$; [A] = 4.8 μM , [B] = 4.3 μM , [C] = 4.3 μM , [D] = 3.9 μM ; [HEPES] = 10 mM; H₂O/CH₃CN = 90:10; pH 7.0; T = 37 °C.

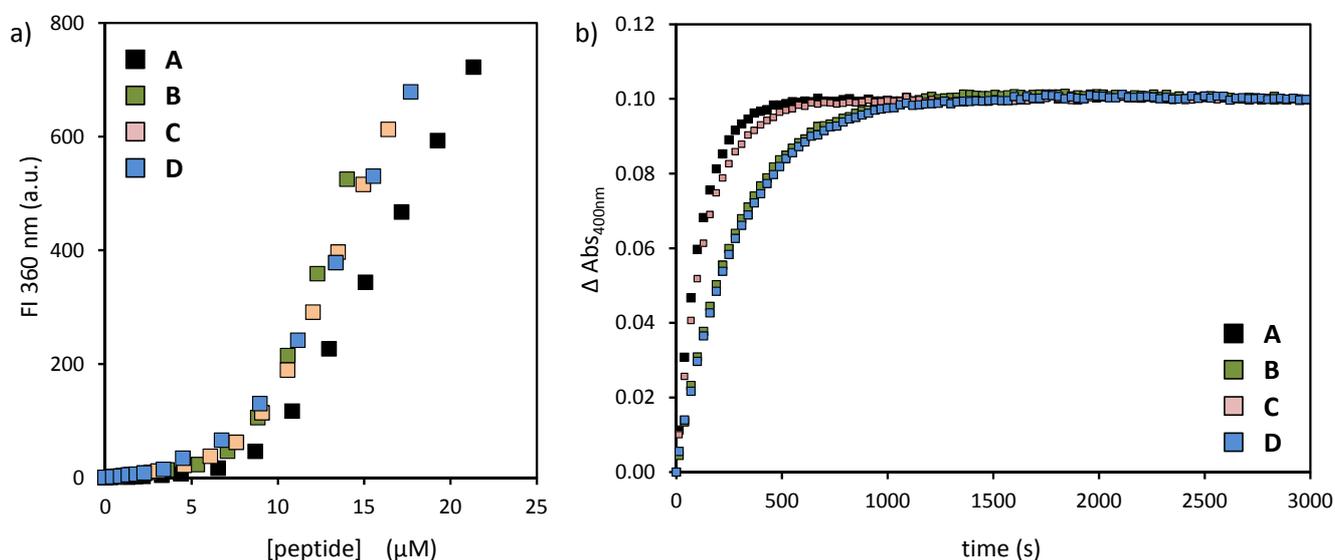


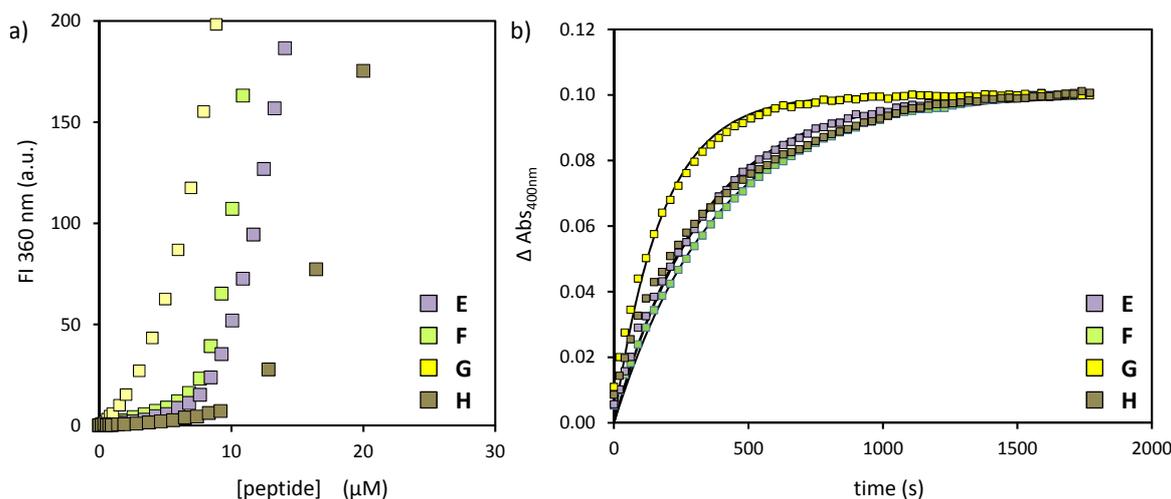
Table 1. Surface saturation concentrations (SSC), observed rate constants, k_{obs} , and second order rate constants, k_2 , for peptides **A–D**, as determined from Figure 2.

peptide	SSC (μM)	$k_{\text{obs}} (\times 10^{-3} \cdot \text{s}^{-1})$	$k_2 (\times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$
A	9.5 ± 0.3	8.9	2.1
B	8.6 ± 0.2	3.6	0.8
C	8.5 ± 0.2	7.1	1.7
D	7.8 ± 0.2	3.5	0.9

Table 2. Surface saturation concentrations (SSC), observed rate constants, k_{obs} and second order rate constants k_2 for peptides **E–H** as determined from Figure 2.

peptide	SSC (μM)	$k_{\text{obs}} (\times 10^{-3} \cdot \text{s}^{-1})$	$k_2 (\times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$
E	8.6 ± 0.3	3.0	620
F	9.1 ± 0.2	2.6	490
G	4.4 ± 0.2	5.6	1310
H	15.9 ± 0.2	3.0	380

Figure 3. (a) Tryptophan fluorescence intensity at 360 nm as a function of the concentration of peptides **A–D** in the presence of Au MPC **1** ([headgroup] = 60 ± 5 μM). Conditions: pH 7.0; [HEPES] = 10 mM; H₂O/CH₃CN = 90:10; T = 37 °C; (b) Changes in the absorbance at 400 nm upon the addition of **I** (10 μM) to a solution of Au MPC **1** and either one of the peptides **E–H**. Conditions: Au MPC **1** [headgroup] = 60 ± 5 μM ; [**E**] = 4.85 μM , [**F**] = 5.30 μM , [**G**] = 4.25 μM , [**H**] = 7.95 μM ; [HEPES] = 10 mM; H₂O/CH₃CN = 90:10; pH 7.0; T = 37 °C.



2.2. Substrate Variation

A series of substrates were tested in order to assess the relation between substrate structure and catalytic efficiency. Apart from the reference substrate used so far (**I**), substrates **II–VI** were selected. All substrates are *p*-nitrophenyl activated carboxylic acids, which ensures reactivity and permits a straightforward measurement of the reaction kinetics by UV-Vis spectroscopy. In addition, the transesterification reaction of **II** can also be studied by fluorescence, since hydrolysis removes the *p*-nitrophenyl group, which is a quencher of the Trp-fluorescence. Both substrates **II** and **III** provide information on the importance of the side chain substituent. In addition, both the D- and L-enantiomers of **III** (**III_L** and **III_D**) were studied in order to detect possible enantioselectivity. Substrate **IV** carries an acetyl group instead of the CBz-group and, finally, substrates **V** and **VI** are simple, non-peptidic substrates of different polarity. Catalytic peptide **A** was used as the reference catalyst.

First, the background hydrolysis rate was measured for each new substrate by measuring the increase in absorption at 400 nm as a function of time of a solution of the respective substrate (10 μM) in a 9:1 H₂O:CH₃CN mixture buffered at pH = 7.0 at 37 °C ([HEPES] = 10 mM) (Figure 4a). The concentration of 10 μM is set to avoid solubility problems. None of the substrates showed significant degrees of hydrolysis over a period of 1 hour, except for substrate **IV**, which was completely hydrolyzed within 30 min ($k_{\text{obs}} = 2.5 \times 10^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$). For the other substrates, first-order rate constants were determined by fixing the known end value of 10 μM (Table 3). The addition of catalyst **A** (4.8 μM) without nanoparticles did not significantly affect the hydrolysis rate of the substrates (Figure 4b). On the other hand, similar as in our previous studies [21], in all cases the addition of Au MPC **1** by itself caused a rate acceleration (except for substrates **V** and **VI**), but this intrinsic contribution could be suppressed by saturating the monolayer surface with catalytically inert peptide Ac-WDDD-OH

(11 μM) (Table 3) (Figure 4c). The latter situation serves as a reference system to assess the actual rate acceleration originating from the catalytic peptide **A** on the surface of Au MPC **1** (Figure 4d). The addition of catalyst **A** (4.8 μM corresponding to 50% of the SSC) in the presence of Au MPC **1** resulted for all substrates in a significant rate acceleration (Table 3).

Figure 4. Amount of released *p*-nitrophenol as a function of time upon the addition of substrates **II–VI** to solutions of (a) background; (b) peptide **A** (4.8 μM); (c) Au MPC **1** ([headgroup] = 60 ± 5 μM and (d) Au MPC **1**•**A** ([headgroup] = 60 ± 5 μM ; [**A**] = 4.8 μM). Other conditions: [HEPES] = 10 mM; H₂O/CH₃CN = 90:10; pH 7.0; T = 37 °C.

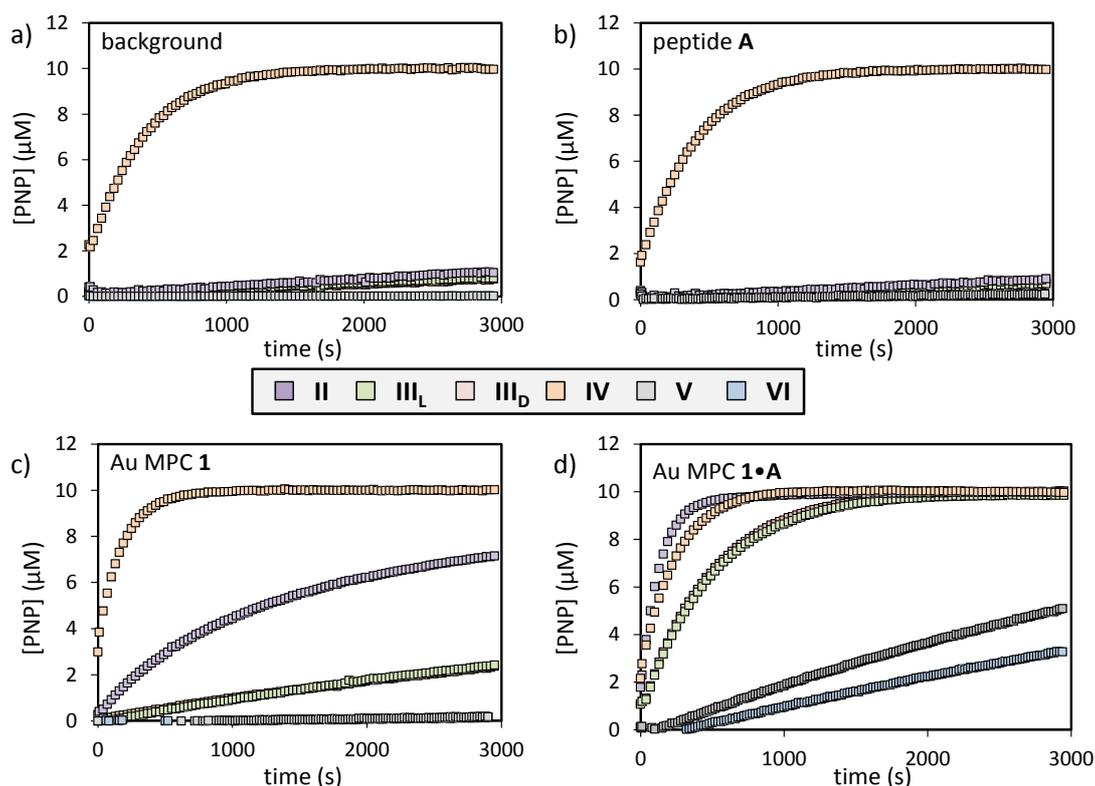


Table 3. Rate constants (k_{obs}) for substrates **I–IV**. Only the pseudo-first order rate constants are reported, since all studies were performed at a constant concentration of **A**.

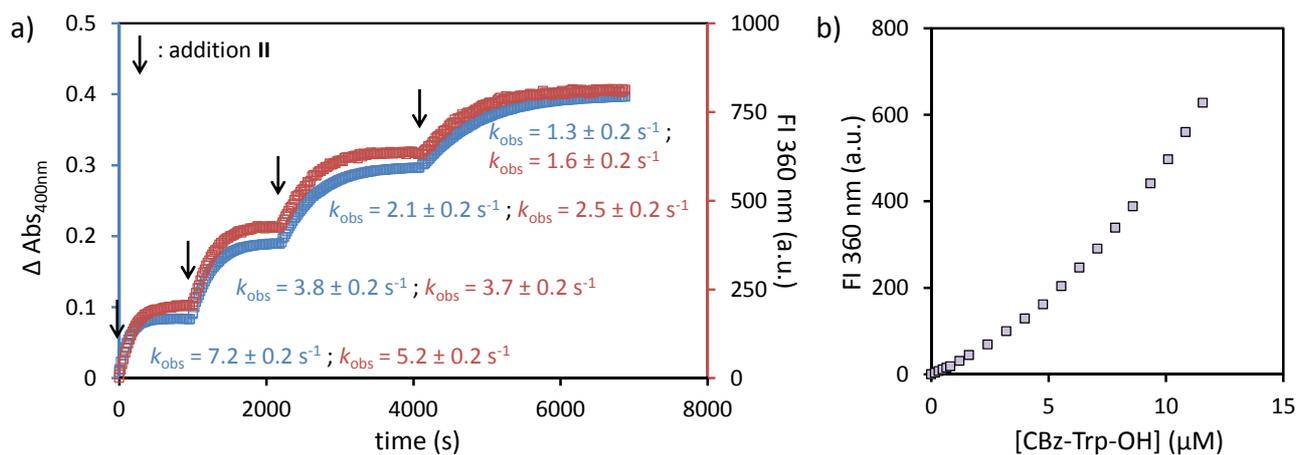
substrate	background ($\times 10^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$)	catalyst A ($\times 10^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$)	Au MPC 1 ($\times 10^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$)	Au MPC 1 • A ($\times 10^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$)	Au MPC 1 •WDDD ($\times 10^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$)	Ratio ^a
I	0.05	0.05	1.0	8.9	0.3	30
II	0.01	0.03	0.9	7.2	0.4	18
III_L	0.05	0.04	0.2	2.0	0.1	20
III_D	0.05	0.04	0.2	2.0	0.1	20
IV	2.5	2.5	5.5	4.2	2.5	1.7
V	0.01	-	0.01	0.1	0.01	10 ^b
VI	0.01	0.01	0.01	0.2	0.01	20 ^b

a: The ratio refers to the observed rate acceleration between the catalytic system Au MPC **1**•**A** and Au MPC **1**•WDDD (*i.e.*, columns 5 and 6, respectively); b: This ratio is mainly determined by the very low rate constant determined for Au MPC **1**•WDDD.

First of all, the data obtained for substrate **IV** show that the CBz-protecting group serves to prevent a rapid auto-hydrolysis of the substrate. However, even for substrate **IV**, a catalytic effect of Au MPC **1•A** is observed ($k_{\text{obs,1•A}} = 4.2 \times 10^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ against $k_{\text{obs,1•WDDD}} = 2.5 \times 10^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$), although relatively small. The observation that the strongest rate enhancement is observed for substrates **I–III** suggests that the CBz-group plays a role in binding of the substrate to the monolayer. Indeed, the rate acceleration observed for substrate **IV** lacking the CBz-group is much lower even if just Au MPC **1** is added. Although structurally very simple, the small substrates **V** and **VI** are interesting, because their hydrolysis is not catalyzed at all by Au MPC **1** alone, suggesting a much lower affinity of these substrates for the monolayer. In the presence of the catalytic system, Au MPC **1•A**, a rate acceleration is observed, but the absolute rates are still much lower compared to the larger apolar substrates **I–IV**. Nonetheless, also in this case, the effect is stronger on substrate **VI**, which has a larger hydrophobic tail compared to **III**. In summary, the catalytic activity of Au MPC **1•A** is not restricted to substrate **I**, but appears to be general for substrates with a significant hydrophobic component. The identical rate constants obtained for enantiomeric substrates **III_L** and **III_D** show that the system is not enantioselective at all.

More information on the catalytic system was obtained from a detailed study of substrate **II**. As stated before, the hydrolysis kinetics of substrate **II** can be followed simultaneously by UV-Vis and fluorescence spectroscopy, because hydrolysis results in the formation of a chromogenic (*p*-nitrophenolate) and fluorogenic (CBz-Tryp-OH) product. Thus, the hydrolysis of substrate **II** was followed simultaneously by monitoring the fluorescence intensity at 360 nm (CBz-Tryp-OH) and the UV absorption at 400 nm (*p*-nitrophenol). Four catalytic cycles were performed by sequentially adding 10 μM of substrate **II**. As illustrated in Figure 5a, the kinetic profiles give a perfect match, which, together with the observed turnover of the system, is definitive proof of the catalytic activity of Au MPC **1•A**. The slightly lower rate constants obtained from the fluorescence trace may be a result of product binding to the monolayer. In fact, it is observed that the rate constants show a constant drop after each cycle. This is indicative of the accumulation of an inhibitor in the system, which disfavors formation of the catalytic system composed of Au MPC **1**, catalytic peptide **A** and substrate **II**. The most likely candidate is the carboxylic acid, CBz-Tryp-OH, as it combines a negative charge with a hydrophobic unit. Indeed, a direct fluorescence titration of CBz-Tryp-OH to Au MPC **1** yielded a curve that deviates from linearity in the 0–10 μM concentration regime, which indicates some weak affinity for the monolayer (Figure 5b). Most likely, the accumulation of the reaction product CBz-Tryp-OH in the system affects the equilibrium between Au MPC **1** and substrate **II**, as the latter is the weakly bound component in the system.

Figure 5. (a) Changes in the absorbance at 400 nm (blue) and the tryptophan fluorescence intensity at 360 nm (red) upon four consecutive additions of substrate **II** ($4 \times 10 \mu\text{M}$) to a solution of Au MPC **1•A**. Conditions: Au MPC **1** [headgroup] = $60 \pm 5 \mu\text{M}$; [**A**] = $4.8 \mu\text{M}$; [HEPES] = 10 mM; $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN} = 90:10$; pH 7.0; $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$. $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$; slits 5/10. (b) Tryptophan fluorescence intensity at 360 nm as a function of the concentration of CBz-(L)-Trp-OH in the presence of Au MPC **1** ([headgroup] = $60 \pm 5 \mu\text{M}$). Conditions: pH 7.0; [HEPES] = 10 mM; $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN} = 90:10$; $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$.



3. Conclusions

The data presented here give a broader insight into the functioning of the self-assembled catalytic system that we have reported earlier. In particular, a series of catalytic peptides and substrates give insight into the structural parameters that are relevant to the catalytic performance. Whereas the distance between His-residue and the anionic tail is of less relevance, the sequence order induces some changes in the activity. Of more importance is that the activity of the catalytic His-residue can be modulated through the insertion of flanking residues. Compared to apolar residues, the presence of two polar Ser-residues as neighboring units causes a significant increase in rate. This is an important result, as it is another example of controlling the properties of a complex supramolecular catalytic system simply through small structural changes in the building blocks. The kinetic studies of a series of substrates reveal that, in particular, substrates with a hydrophobic component are very suitable for this catalytic system. This confirms our initial assumption that hydrophobic interactions with the hydrophobic part of the monolayer drive substrate binding, which causes an increase in effective concentration. The simultaneous study of the hydrolysis of substrate **II** by UV-Vis and fluorescence spectroscopy gave unequivocal evidence of the catalytic activity of our system. Binding studies of the reaction product revealed that competition between the carboxylate and the substrate are probably at the origin of the reduced efficiency of the system after multiple turnovers. On the other hand, so far, we have not yet been able to detect enantioselective hydrolysis, which remains a future challenge for this system.

Acknowledgments

Financial support from the ERC (StG 239898), COST (CM0703 and CM0905) and MIUR is acknowledged.

Supporting Information

Supporting information regarding instrumentation, experimental protocols and characterization data for peptides **B–H** is available.

References and Notes

1. Van Leeuwen, P.W.N.M. *Supramolecular Catalysis*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2008.
2. Gasparini, G.; Dal Molin, M.; Prins, L.J. Dynamic approaches towards catalyst discovery. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 2429–2440.
3. Meeuwissen, J.; Reek, J.N.H. Supramolecular catalysis beyond enzyme mimics. *Nature Chem.* **2010**, *2*, 615–621.
4. Wiester, M.J.; Ulmann, P.A.; Mirkin, C.A. Enzyme mimics based upon supramolecular coordination chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 114–137.
5. Breit, B. Supramolecular approaches to generate libraries of chelating bidentate ligands for homogeneous catalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6816–6825.
6. Sandee, A.J.; Reek, J.N.H. Bidentate ligands by supramolecular chemistry—The future for catalysis? *Dalton Trans.* **2006**, 3385–3391.
7. Wilkinson, M.J.; van Leeuwen, P.; Reek, J.N.H. New directions in supramolecular transition metal catalysis. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2371–2383.
8. Koblenz, T.S.; Wassenaar, J.; Reek, J.N.H. Reactivity within a confined self-assembled nanospace. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 247–262.
9. Sanders, J.K.M. Supramolecular catalysis in transition. *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 1378–1383.
10. Prins, L.J.; Mancin, F.; Scrimin, P. Multivalent cooperative catalysts. *Curr. Org. Chem.* **2009**, *13*, 1050–1064.
11. Mancin, F.; Scrimin, P.; Tecilla, P.; Tonellato, U. Amphiphilic metalloaggregates: Catalysis, transport and sensing. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 2150–2165.
12. Schatz, A.; Reiser, O.; Stark, W.J. Nanoparticles as semi-heterogeneous catalyst supports. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 8950–8967.
13. Pieters, G.; Prins, L.J. Catalytic self-assembled monolayers on gold nanoparticles. *New. J. Chem.* **2012**, *36*, 1931–1939.
14. Bonomi, R.; Cazzolaro, A.; Prins, L.J., Assessment of the morphology of mixed SAMs on Au nanoparticles using a fluorescent probe. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 445–447.
15. You, C.C.; Miranda, O.R.; Gider, B.; Ghosh, P.S.; Kim, I.B.; Erdogan, B.; Krovi, S.A.; Bunz, U.H.F.; Rotello, V.M. Detection and identification of proteins using nanoparticle-fluorescent polymer ‘chemical nose’ sensors. *Nature Nanotechnol.* **2007**, *2*, 318–323.
16. Ghosh, P.S.; Verma, A.; Rotello, V.M. Binding and templation of nanoparticle receptors to peptide alpha-helices through surface recognition. *Chem. Commun.* **2007**, *47*, 2796–2798.

17. De, M.; Ghosh, P.S.; Rotello, V.M. Applications of nanoparticles in biology. *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 4225–4241.
18. De, M.; Rana, S.; Akpınar, H.; Miranda, O.R.; Arvizo, R.R.; Bunz, U.H.F.; Rotello, V.M. Sensing of proteins in human serum using conjugates of nanoparticles and green fluorescent protein. *Nature Chem.* **2009**, *1*, 461–465.
19. Bonomi, R.; Cazzolaro, A.; Sansone, A.; Scrimin, P.; Prins, L.J. Detection of enzyme activity through catalytic signal amplification with functionalized gold nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2307–2312.
20. Pieters, G.; Cazzolaro, A.; Bonomi, R.; Prins, L.J. Self-assembly and selective exchange of oligoanions on the surface of monolayer protected au nanoparticles in water. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1916–1918.
21. Zaramella, D.; Scrimin, P.; Prins, L.J. Self-assembly of a catalytic multivalent peptide-nanoparticle complex. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8396–8399.
22. Guarise, C.; Manea, F.; Zaupa, G.; Pasquato, L.; Prins, L.J.; Scrimin, P. Cooperative nanosystems. *J. Pep. Sci.* **2008**, *14*, 174–183.
23. The SSC and k_{obs} values for peptide **A** are slightly different than reported before (9.5 against 11 μM for SSC; 8.9×10^{-3} against $6.0 \times 10^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ for k_{obs}), which is ascribed to the use of a different batch of Au MPC **1** and slight variations in the head group concentration).
24. Pezzato, C.; Lee, B.; Severin, K.; Prins, L.J. Pattern-based sensing of nucleotides using functionalized gold nanoparticles. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 469–471.
25. Pieters, G.; Pezzato, C.; Prins, L.J. Controlling supramolecular complex formation on the surface of a monolayer protected gold nanoparticle in water. *Langmuir* **2013**, doi:10.1021/la304316z.

© 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

*Hanno contribuito attivamente alla realizzazione di questo lavoro
il Prof. Leonard Jan Prins ed
il Dott. Alessandro Cazzolaro
ai quali vanno i miei più sinceri ringraziamenti.*

*Ringrazio anche, per l'opportunità concessami,
il Ch.mo Prof. Paolo Maria Scrimin, mio supervisore.*

Un sentito grazie alla mia commissione triennale per i preziosi consigli:

*Prof. Andrea Tapparo,
Prof.ssa Barbara Gatto e
Dott. Marco Crisma.*

*Un doveroso grazie ai Direttori della SDSM che si sono avvicendati durante i tre anni di
dottorato:*

*Prof. Maurizio Casarin e
Prof. Antonino Polimeno.*

*Infine, "last but not least", uno speciale ringraziamento va a tutti i miei colleghi che
hanno fatto di questi tre anni non solo una straordinaria esperienza formativa, ma anche
e soprattutto umana.*

A VOI TUTTI, GRAZIE: QUESTA TESI E' ANCHE VOSTRA!