

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"



DIPARTIMENTO DI FARMACIA

Dottorato di Ricerca in Scienza del Farmaco

XXXI ciclo

*"Aptameri G-quadruplex ad attività anticoagulante, antiproliferativa e anti-HIV: progettazione, sintesi, caratterizzazione strutturale e valutazione dell'attività biologica"*

**Dott.ssa Teresa Amato**

**Tutor: Prof. Aldo Galeone**

**Coordinatore: Prof.ssa Maria Valeria D'Auria**

# INDICE

<b>INTRODUZIONE GENERALE</b>	5
<b>CAPITOLO 1</b>	
<b>APTAMERI</b>	
1.1	Processo di selezione: <i>SELEX</i> 9
1.1.1	Evoluzione del metodo <i>SELEX</i> 16
1.2	Vantaggi e svantaggi rispetto agli anticorpi 19
1.3	Stato dell'arte nell'industria farmaceutica 29
1.4	Miglioramento delle proprietà con l'introduzione di modifiche 33
1.4.1	Modifiche <i>in-SELEX</i> 35
1.4.2	Modifiche <i>post-SELEX</i> 36
1.4.2.1	<i>Truncation</i> 39
1.4.2.2	Miglioramento della resistenza alle nucleasi 40
1.4.2.3	Miglioramento della <i>clearance</i> renale 50
1.4.2.4	Modifiche volte a migliorare l'affinità e la selettività verso il target 53
1.4.3	Tossicità associata alle modifiche 55
	Bibliografia 57
<b>CAPITOLO 2</b>	
<b>STRUTTURE G-QUADRUPLEX</b>	
2.1	Caratteristiche strutturali 70
2.2	Significato biologico 82
	Bibliografia 85
<b>CAPITOLO 3</b>	
<b>APTAMERI CHE ADOTTANO STRUTTURE G-QUADRUPLEX</b>	
3.1	Quadro generale 88
3.2	Aptameri anticoagulanti formanti G-quadruplex 89

3.3	Aptameri antitumorali formanti G-quadruplex	90
3.4	Aptameri antivirali formanti G-quadruplex	92
	Bibliografia	94

## ***CAPITOLO 4***

### ***ATTIVITA' ANTICOAGULANTE DEL TBA***

4.1	Analoghi del TBA con migliori proprietà contenenti siti ad inversione di polarità: effetti strutturali dei residui extra alle estremità	97
4.1.1	Sezione sperimentale	100
	Bibliografia	123
4.2	Studio delle proprietà delle varianti del TBA con domini gemelli leganti la trombina	125
4.2.1	Sezione sperimentale	128
	Bibliografia	145

## ***CAPITOLO 5***

### ***APTAMERI AD ATTIVITA' ANTIPROLIFERATIVA***

5.1	Il duplice aspetto del TBA: studio delle proprietà anticoagulanti e antiproliferative attraverso semplici modifiche chimiche	147
5.1.1	Sezione sperimentale	150
	Bibliografia	173
5.2	Analoghi del TBA Backbone modificati dotati di attività antiproliferativa	176
5.2.1	Sezione sperimentale	178
	Bibliografia	196
5.3	Strutture G-quadruplex monomolecolari con siti ad inversione di polarità: nuove topologie e potenzialità	200
5.3.1	Sezione sperimentale	202
	Bibliografia	246

## **CAPITOLO 6**

### ***APTAMERI ANTI-INTEGRASI HIV***

6.1	Miglioramento dell'attività dell'aptamero anti-HIV-1 integrasi T30175 introducendo una timidina modificata nei loop	251
6.1.1	Sezione sperimentale	255
	Bibliografia	275

<b>CONCLUSIONI GENERALI</b>	278
-----------------------------	-----

## **INTRODUZIONE GENERALE**

Gli aptameri sono oligonucleotidi (ODN) sintetici, a DNA o RNA, relativamente piccoli che, in virtù dell'arrangiamento conformazionale assunto, sono in grado di legare con elevata affinità e specificità un'ampia gamma di bersagli. Essi sono identificati generalmente attraverso una tecnica combinatoriale definita SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) grazie alla quale, a partire da collezioni (*library*) complesse di acidi nucleici sintetici, è possibile isolare specifiche molecole dotate di elevata affinità per la molecola target. Grazie a queste caratteristiche, gli aptameri possono trovare applicazione sia in ambito terapeutico che diagnostico e rappresentano uno strumento potenzialmente utile in molti campi di ricerca. Tuttavia questi ligandi presentano grossi limiti d'impiego *in vivo* a causa della loro scarsa resistenza in ambiente biologico, bassa stabilità termica e bassa clearance renale. Al fine di affrontare tali limiti e chiarire le relazioni struttura-attività del complesso aptamero-target, gli ODN una volta selezionati, sono sottoposti a modifiche post-SELEX con lo scopo di ottenere analoghi dotati di affinità e specificità paragonabili o anche superiori ma con profili farmacocinetici migliori. Un largo numero di aptameri ricchi di G adotta strutture G-quadruplex. L'elevato polimorfismo delle G-quadruplex fornisce una varietà di stabili strutture dotate di specifici siti di riconoscimento sul corrispondente target. Numerosi aptameri formanti G-quadruplex rappresentano strumenti interessanti per il trattamento di malattie vascolari, tumorali e virali. In questo ambito, la mia attività di ricerca ha riguardato la sintesi di aptameri modificati formanti G-quadruplex dotati di potenziale attività farmacologica.

Un aptamero G-quadruplex di cui mi sono occupata durante la mia attività di dottorato è il TBA (Thrombin Binding Aptamer), un aptamero dotato di attività anticoagulante. Di questo ligando, è stata proposta una semplice modifica che

consiste nell'introduzione di un extra-residuo all'estremità 3' o in entrambe le estremità, attraverso legami fosfodiesterici 3'-3' o 5'-5'. Il vantaggio di questa modifica è che essa non solo non influenza i *loop* TT coinvolti nell'interazione con la proteina target ma rispetto al TBA, comporta simultaneamente un miglioramento della resistenza alle nucleasi, della stabilità termica e dell'interazione con la trombina. Una seconda modifica a carico dello stesso aptamero ha riguardato la sintesi di molecole dimeriche in cui le estremità 3' di due sequenze di TBA sono state legate tramite *linker* di vario tipo. Studi elettroforetici e di dicroismo circolare (CD) suggeriscono che i vari derivati formano due domini G-quadruplex indipendenti molto simili alla struttura originaria. Tuttavia misure di calorimetria isoterma di titolazione dell'interazione ligando/trombina (ITC, in collaborazione con l'Istituto di Biostrutture e Bioimmagini del CNR) hanno indicato affinità diverse in dipendenza dal tipo di *linker*, confermate dalle diverse attività anticoagulanti dei vari derivati, di cui alcune sono risultate migliori del TBA stesso. Un dato interessante è che i due aptameri dimerici con le migliori attività anticoagulanti sono anche risultati più resistenti del TBA alla degradazione in ambiente biologico. I risultati riguardanti queste ricerche sono discussi nel capitolo 4.

In base a precedenti studi, è stato messo in evidenza che il TBA possiede anche un'attività antiproliferativa contro linee cellulari cancerose. Tuttavia il suo potenziale sviluppo in tal senso è stato rallentato proprio dalla concomitante attività anticoagulante. Con lo scopo di preparare derivati del TBA con una minore o assente attività anticoagulante, ma che conservassero le proprietà antiproliferative, sono stati sintetizzati degli aptameri analoghi contenenti vari tipi di timidine. In particolare i derivati contenenti 5-idrossimetiluridina nelle posizioni 4 e 13 hanno perso l'attività anticoagulante conservando quella antiproliferativa verso due linee cellulari cancerose. Nell'ambito della stessa tematica di ricerca

sono stati preparati derivati del TBA contenenti siti di inversione della polarità e/o residui L. In base al tipo di sequenza i dati CD e NMR indicano che i derivati adottano strutture G-quadruplex destrorse o sinistrorse. Tutti gli analoghi del TBA hanno perso l'attività anticoagulante ma molti posseggono significative proprietà antiproliferative contro due linee cellulari cancerose ed una notevole resistenza in siero fetale bovino, che mima l'ambiente fisiologico. I risultati di questi studi sono descritti nel capitolo 5, sezioni 5.1 e 5.2.

L'introduzione di siti di inversione della polarità in conformazioni G-quadruplex è stata sfruttata anche per incrementare la loro variabilità strutturale. A questo scopo sono stati preparati e studiati tramite CD, NMR ed elettroforesi tre ODN contenenti quattro tratti di G con un numero variabile di residui (da 2 a 4) e tre siti di inversione della polarità. Due di questi sono in grado di formare strutture G-quadruplex monomolecolari parallele dotate di una eccezionale stabilità termica. Tutti gli ODN hanno mostrato una promettente attività antiproliferativa contro linee cellulari di cancro polmonare e al colon e per due in particolare è stata dimostrata una elevata resistenza in siero fetale bovino, come riportato nel capitolo 5, sezione 5.3.

Un altro aptamero G-quadruplex su cui si è concentrata la mia attività di ricerca è il T30175, in grado di inibire l'integrasi del virus HIV-1. Considerando che in lavori precedenti era stata messa in evidenza l'importanza dei *loop* per l'interazione con la proteina target, sono stati preparati dei derivati in cui ciascuna timidina del *loop* è stata sostituita con un residuo di 5-idrossimetiluridina, potenzialmente in grado di stabilire ulteriori contatti con la proteina target. Indagini strutturali basate su tecniche NMR, CD, elettroforetiche ed analisi termodinamiche (in collaborazione col Dip. di Scienze Chimiche) hanno indicato che la modifica non è in grado di alterare la capacità degli ODN di formare la struttura dimerica non covalente con G-quadruplex parallele, tipica della sequenza naturale. Tuttavia, alcuni aptameri

modificati hanno mostrato una migliore capacità di inibire l'HIV-integrasi rispetto all'aptamero originale (in collaborazione con l'Università di Cagliari). Inoltre studi di *molecular modelling*, condotti in collaborazione con la School of Pharmacy - University College London, hanno messo in evidenza la capacità delle timidine modificate di stabilire diversi contatti con la proteina target, come descritto nel capitolo 6.



## **CAPITOLO 1: APTAMERI**

### **1.1 Processo di selezione (SELEX)**

Dopo la loro scoperta, agli acidi nucleici è stata a lungo ascritta unicamente la funzione di trasmissione dell'informazione genetica. In effetti, l'idea che una sequenza di nucleotidi contenesse tutte le istruzioni su come un organismo può crescere, svilupparsi e replicarsi era già abbastanza sorprendente [1,2]. Solo dopo l'esplorazione dei meccanismi genetici molecolari furono fatti dei tentativi per cercare ulteriori possibili funzioni. All'inizio degli anni '90 fu rilevata una potente proprietà del RNA: corte molecole, note come ribozimi, erano in grado di ripiegare in complesse strutture tridimensionali capaci di legare specificamente target non nucleotidici riuscendo così a catalizzare reazioni [3], controllare l'espressione genica [4], comunicare le risposte cellulari [5] e mediare la sintesi proteica [6]. La loro superficie, perfettamente conformata per tale interazione, gli valse la definizione di *aptameri* dal latino "aptus" che significa associato, adatto e dal suffisso greco "meros" che significa porzione [7].

Oggi, in realtà, il termine aptameri è riservato esclusivamente a molecole di natura sintetica; si tratta di biomolecole relativamente corte, tipicamente oligonucleotidi che vanno da circa 15 a 70 nucleotidi o peptidi da 10 a 30 residui amminoacidici, la cui struttura tridimensionale conferisce loro la capacità di legarsi con elevata affinità e specificità ad un'ampia varietà di target biologici. Essi sono capaci di legarsi al target desiderato con valori di  $K_d$  nell'intervallo pico-nano molare e con una specificità tale da riuscire a distinguere tra target strettamente correlati. Per tali ragioni, gli aptameri nucleotidici sono considerati equivalenti agli anticorpi e definiti "anticorpi chimici" (*chemical antibodies*).

Gli aptameri nucleotidici sono molecole di acido nucleico (DNA o RNA) a singolo filamento capaci di ripiegarsi in distinte strutture tridimensionali in cui i siti di

legame sono complementari per forma e per carica al target desiderato. Essi sono stati generati, negli ultimi 3 decenni, contro bersagli chimici e biologici estremamente diversificati tra cui molecole organiche, altri acidi nucleici, cofattori, amminoacidi, peptidi, numerose proteine d'interesse farmaceutico quali fattori di crescita, enzimi, immunoglobuline fino ad arrivare a particelle virali, batteriche, intere cellule e perfino target appartenenti a cavie animali in vita [8] (Figura 1).

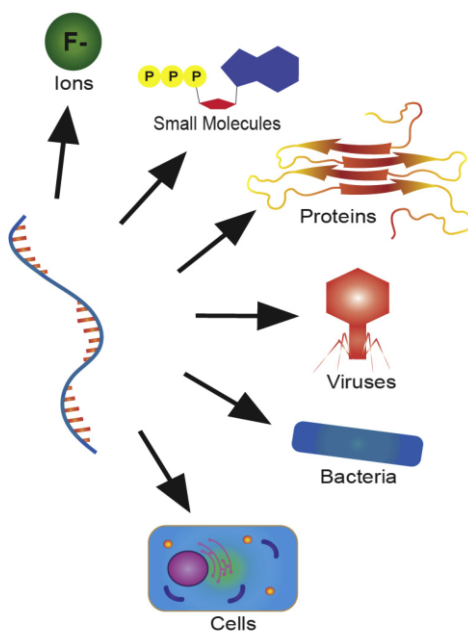


Figura 1. Versatilità degli aptameri: varietà dei target per i quali gli aptameri sono stati selezionati e per i quali hanno mostrato alta affinità e specificità.

Essi furono identificati attraverso una tecnica introdotta nel 1990 da 3 gruppi di ricerca indipendenti, coordinati rispettivamente da Gold, Robertson e Szostak. Turek and Gold selezionarono ligandi a RNA per la DNA polimerasi del batteriofago T4 e furono coloro che diedero al processo il nome di *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment* (SELEX) [9]. Nello stesso periodo Robertson e Joyce idearono un metodo simile di selezione *in vitro* per lo sviluppo di un enzima a RNA che interagisse specificamente con una molecola di DNA a singolo filamento [10]. Quasi contemporaneamente Ellington e Szostak dimostrarono il potere

evolutivo di questa procedura. Partendo da una collezione (*library*) casuale di  $10^{13}$  differenti sequenze, essi identificarono con successo molecole a RNA capaci di legare coloranti organici con alta affinità e specificità e coniarono per tali ligandi il termine *aptameri* [7]. Collettivamente, questi eleganti studi hanno portato al metodo per la generazione *in vitro* di aptameri ad alta affinità che tutt'oggi è in uso ed è noto come SELEX o "*in vitro* selection". Pertanto, gli aptameri a DNA o RNA sono identificati attraverso il metodo SELEX, un processo di selezione *in vitro* che, a partire dal suo avvento, è stato migliorato sia in termini di ottimizzazione dei costi che di efficienza e tempi richiesti per generare potenti ligandi. Ciò nonostante, i principi basilari che sottendono tale metodo restano per la maggior parte gli stessi anche per i nuovi protocolli di selezione (Figura 2).

Tale tecnica consente di isolare oligonucleotidi dotati di alta affinità e specificità verso il target desiderato mediante arricchimento esponenziale a partire da un'ampia *library* di sequenze nucleotidiche random. È un processo ripetitivo di selezione ed amplificazione in cui un ampio gruppo di molecole nucleotidiche sono spinte a legarsi al target desiderato sotto un insieme di definite condizioni. Le molecole che si legano al target sono separate da quelle non legate e successivamente amplificate per generare una nuova popolazione di molecole che è arricchita dei membri che condividono una proprietà funzionale comune. Gli acidi nucleici sono idealmente adatti a questo proposito perché possono ripiegarsi in forme con una funzione definita (fenotipi) e le loro sequenze (genotipi) possono essere riprodotte *in vitro* per produrre una progenie con caratteristiche simili alla sequenza genitrice [11]. La capacità di amplificare singole molecole con fenotipi desiderati e ottimizzare le loro funzioni mediante evoluzione diretta è una caratteristica distintiva, peculiare, che separa gli acidi nucleici dalle altre molecole organiche, la maggior parte delle quali non può replicarsi perché non hanno una connessione genotipo-fenotipo [12,13].

Tale metodo consiste nella ripetizione di cicli di **(i)** incubazione con il target **(ii)** ripartizione e **(iii)** amplificazione. Le sequenze più inclini a legarsi al target sono soggette a cicli ripetitivi di selezione per incrementare la popolazione di specie dotate di alta affinità finché quest'ultime non risultano prevalere all'interno della *library*. Durante tali cicli, gli aptameri più affini al target desiderato sono arricchiti, ovvero risultano presenti in percentuale via via crescente, mentre la complessità della *library* si riduce gradualmente fino al momento in cui il gruppo risulta arricchito di pochi specifici ligandi.

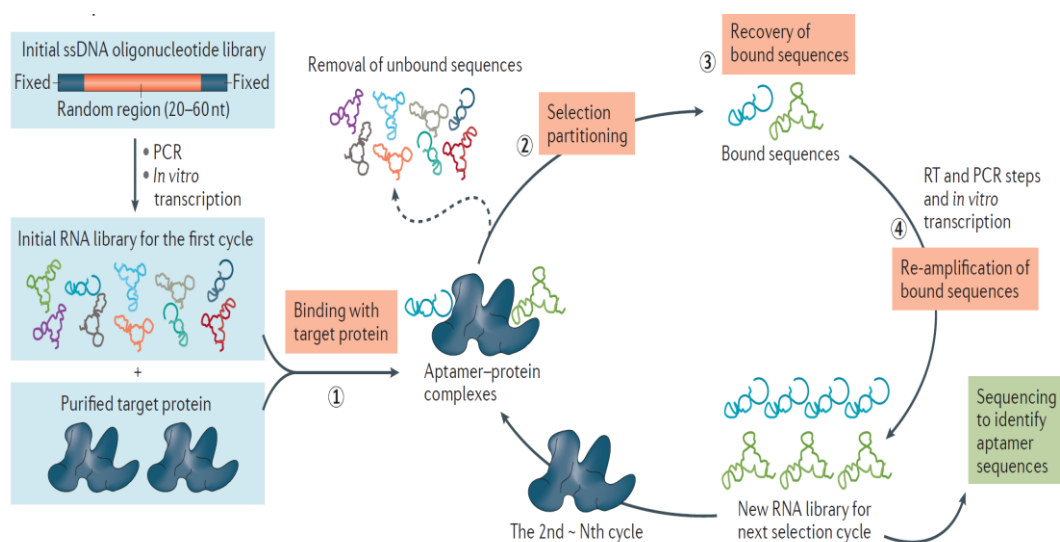


Figura 2. Rappresentazione schematica del metodo SELEX

Il principio alla base del metodo SELEX è mimare e stimolare lo sviluppo dei ligandi (Systematic Evolution of Ligands). Visto che lo sviluppo naturale è un processo lento e complesso, esso è stato migliorato artificialmente sia introducendo molti cicli di selezione (usualmente 10-15) sia amplificando esponenzialmente i ligandi mediante PCR dopo ciascun ciclo.

**(i)** Il primo ciclo di selezione inizia con la sintesi di una complessa *library* contenente un ampio numero di sequenze a singolo filamento di DNA o RNA con composizioni casuali. La *library* iniziale, la cui scelta rappresenta un aspetto cruciale per il successo del metodo SELEX, può derivare da sintesi chimica, DNA genomico [14] o fonti trascrittomiche [15]. Ciascuna sequenza presenta una regione centrale random affiancata, alle estremità 5' e 3', da una regione conservata (18-25 nucleotidi ognuna), complementare al primer predefinito che, legandosi ad esso, assicura l'amplificazione dell'intera sequenza. La lunghezza della regione centrale è normalmente di 20-40 nucleotidi fornendo così una *library* con un numero di sequenze compreso tra  $10^{12}$  e  $10^{15}$  che garantisce una sufficiente varietà strutturale per l'identificazione di ligandi con alta affinità. La progettazione e la qualità della *library* iniziale sono componenti chiave per il successo della SELEX visto che solo un'equa distribuzione dei 4 nucleotidi è in grado di rendere massima la variabilità della sequenza da esplorare [16]. La scelta della lunghezza della regione centrale random è dettata da regole empiriche e limitata dalla quantità di molecole nella *library* prima della selezione che teoricamente può arrivare fino a  $10^{15}$  diverse sequenze [17]. Le regioni centrali corte, 20 nucleotidi circa, assicurano la completa copertura della sequenza. Infatti più di una molecola per ciascuna sequenza sarà presente nella *library* iniziale a spese, tuttavia, delle possibili conformazioni che questa sequenza potrà assumere. Di contro, regioni centrali più ampie (in genere 40 nucleotidi) forniscono una più alta complessità di possibili strutture tridimensionali ma solo una piccola frazione di una particolare sequenza sarà rappresentata [18]. Per tali ragioni, la maggior parte degli esperimenti sono eseguiti con regioni random comprese tra 20 e 60 nucleotidi sebbene siano stati isolati anche aptameri di dimensioni inferiori o superiori a questo intervallo (da 8 a 228 nucleotidi) [19,20].

Tale *library* viene spesso sottoposta ad una selezione negativa e, successivamente, è incubata con il target d'interesse in appropriate condizioni. La selezione negativa consiste nel far passare l'iniziale gruppo di molecole attraverso una matrice in fase solida non funzionalizzata con il target. Le molecole che si legano alla matrice in maniera aspecifica verranno chiaramente trattenute mentre le sequenze non legate verranno raccolte e sottoposte ad incubazione col target d'interesse. La selezione negativa elimina le sequenze non specifiche che si legano ai componenti ambientali, [21] specialmente alla matrice in fase solida usata come supporto per la separazione o per immobilizzare il target. La selezione negativa rappresenta un passaggio cruciale in quanto consente di ridurre la complessità dell'iniziale *library* eliminando gli oligonucleotidi che si legano alla matrice anche in assenza del ligando. Gli aptameri risultanti esibiscono un'affinità di legame fino a 10 volte superiore rispetto a quelli generati dalla SELEX in assenza della selezione negativa. La *library* è poi incubata con il target selezionato, in genere di natura proteica [22]. L'incubazione avviene o con il target immobilizzato su un supporto solido, in modo da assicurare la separazione fisica dalle molecole che non si sono legate, oppure direttamente all'interno delle cellule così come avviene nel caso della cell-SELEX.

**(ii)** Dopo l'incubazione, le sequenze legate al target sono separate da quelle che non si sono legate. Le strategie di separazione generalmente utilizzate si basano su vari tipi di matrici in fase solida: membrane di nitrocellulosa (filtrazione), resine cromatografiche (cromatografia di affinità) e infine separazione basata su particelle magnetiche (*magnetic beads*) e circuiti integrati (*chip*). La filtrazione si basa sulla differente ritenzione dei complessi aptamero-proteina e degli aptameri non legati: quando la miscela *library*-proteina target viene fatta passare attraverso un filtro di membrana di nitrocellulosa, i più larghi complessi aptamero-proteina sono ritenuti dalle membrane mentre i piccoli aptameri non legati e caratterizzati da debole affinità per la membrana, l'attraversano. Nella cromatografia di affinità la proteina

target è immobilizzata sulla superficie della resina, gli aptameri sono ritenuti in base alla loro affinità di legame mentre le sequenze non legate sono scartate. Nel caso delle *magnetic bead*, la proteina target è immobilizzata sulla superficie delle particelle che sono poi incubate con la *library*; la risultante miscela è sottoposta a precipitazione magnetica per recuperare le sequenze legate [23]. Nel corso dei cicli ripetuti, le condizioni di legame devono diventare progressivamente più stringenti in modo da aumentare la competizione e permettere solo ai più adatti di “sopravvivere” cioè di legare il target con elevata affinità.

**(iii)** Le sequenze legate sono eluite, raccolte ed amplificate grazie ai *primer* inclusi nelle sequenze, usando il metodo PCR per le molecole di DNA o RT-PCR per le sequenze a singolo filamento di RNA. L’eluizione avviene mediante lavaggio con una soluzione contenente una specie capace di competere con le sequenze leganti per il legame al target.

L’ ultimazione di queste tre fasi 3 comporta il completamento di un singolo ciclo di SELEX in seguito al quale si ottiene una *library* parzialmente arricchita degli aptameri leganti che verrà successivamente sottoposta ad un nuovo ciclo. A tale scopo, dopo l’amplificazione dalla quale si ottengono molecole di DNA o RNA a doppio filamento, tali molecole sono convertite attraverso vari metodi in singoli filamenti [24] che, quindi, costituiscono una nuova *library* per il successivo ciclo di SELEX. L’ efficienza di selezione nel corso dei cicli è assicurata modulando gradualmente l’ambiente di selezione che è una combinazione di condizioni sperimentali quali forza ionica, specie componenti la soluzione tampone, pH, concentrazione del target, temperatura, tempo di incubazione e proprietà intrinseche al target quali pI, carica, idrofilicità. L’obiettivo della tecnologia SELEX è far convergere la *library* in un gruppo di sequenze dotate della più alta affinità e specificità verso il target d’interesse. Pertanto, quando non si rileva più alcun arricchimento, il che si verifica solitamente dopo 7-20 cicli, gli aptameri isolati sono

clonati, sequenziati e caratterizzati. Il numero di cicli necessario per il raggiungimento di tale obiettivo dipende dalla natura e dalla concentrazione del ligando, dalla progettazione dell'iniziale *library*, dall'interazione target-aptamero e dall'efficienza dei metodi di ripartizione. Nella maggior parte dei casi vengono isolati aptameri con  $K_D$  nell'ordine delle nanomoli [25], tuttavia, talvolta possono legarsi al target così strettamente da rientrare nel range delle picomoli [26,27]. Le molecole selezionate sono clonate (sintetizzate) e sequenziate. L'analisi comparativa delle sequenze permette l'identificazione dei cloni che sono arricchiti o l'identificazione delle sequenze consenso che sono coinvolte nel riconoscimento del target. Le sequenze più promettenti sono sintetizzate mediante sintesi in fase solida e studiate ulteriormente. La caratterizzazione strutturale è importante per ottimizzare le caratteristiche degli aptameri. L'analisi computazionale può predire i nucleotidi importanti per l'interazione con il ligando mentre gli studi biofisici tramite NMR o cristallografia ai raggi X consentono di identificare i dettagli molecolari dell'interazione aptamero-target. Le analisi biofisiche, che sono tecniche decisive per stabilire la struttura terziaria, sono comunque limitate da condizioni tampone compatibili con i dati raccolti. I siti d'interazione tra l'aptamero e il suo target possono essere identificati da saggi biochimici. Informazioni sulla tasca di legame e sulle basi cruciali per l'interazione con il target sono fondamentali per l'ottimizzazione dell'aptamero; esse forniscono una guida per l'inserzione di modifiche volte ad incrementare l'affinità di legame, la resistenza alle nucleasi e la stabilità strutturale.

### **1.1.1 Evoluzione del metodo SELEX**

Gli aptameri identificati attraverso il metodo SELEX convenzionale, i quali esibiscono alta specificità, possono in realtà fallire nello stimolare o inibire i target *in vivo*. La percentuale di successo nell'identificare aptameri efficienti attraverso il



metodo convenzionale è inferiore al 30%. Inoltre, esso è caratterizzato da alti costi e lunghi tempi di realizzazione. Una grande quantità di reagenti e molecole target potrebbe essere sprecata per eseguire 5-20 cicli e ciascun ciclo di selezione può richiedere fino a qualche giorno per essere completato. Sebbene il metodo SELEX classico abbia dimostrato di essere uno strumento di selezione molto potente, molti sforzi sono stati fatti per ottimizzarlo (sia in termini di efficienza che di costi) e velocizzarlo apportando delle variazioni ampiamente usate oggi nella ricerca. Alcune di esse sono riportate in Tabella 1 [28,29].

Name	Property	Advantages
Counter SELEX	Introduce negative selection to exclude aptamers bind to negative target	Could discriminate highly similar structure to increase specificity
Toggle SELEX	Multiple positive selection targets	Could select aptamers bind to multiple targets
Capillary electrophoresis-SELEX	Separate aptamer–target complexes from free aptamers according to their electrophoretic mobility with capillary electrophoresis	Could effectively identify high affinity aptamers in four rounds
Cell SELEX	Select against whole cells	No prior target knowledge required
<i>In vivo</i> SELEX	generate aptamers in living organisms	No prior target knowledge required Suitable for cancer therapy as tumors have high varieties and <i>in vitro</i> selection may not work
<i>In silico</i> SELEX	Employ computational docking	Could be used to predict aptamer affinity, specificity, 3D structure and aptamer-target interaction by computer prior to experimental characterization
SELEX with high-throughput sequencing	Could use high-through sequencing after each round of selection.	Could be used for selection of a large number of aptamers. Could identify aptamers in two to three rounds of SELEX and could perform comprehensive characterization of identified aptamers.

Tabella 1. Lista dei metodi SELEX modificati che sono comunemente utilizzati.

Il metodo **Counter SELEX**, usando target analoghi, permette di escludere le sequenze che riconoscono altri target incrementando così la selettività degli aptameri [30,31].

Il metodo **Toggle SELEX** consiste nel cambiare target durante il processo di selezione permettendo così di selezionare aptameri con differenti livelli di specificità. Un'importante considerazione per lo sviluppo degli aptameri riguarda il

tipo di target usato durante il processo di selezione. Esso dovrebbe essere identico a quello “naturale” e in particolare nel caso di una proteina, essa dovrebbe essere molto simile a quella presente *in vivo*. Il metodo SELEX classico, in cui i target sono rappresentati dalle proteine, presenta alcuni vantaggi: gli step di selezione possono essere eseguiti in una provetta senza il coinvolgimento di una tecnologia sofisticata; le condizioni di selezione o “pressione evolutiva” sono facilmente regolabili e i target possono essere proteine intracellulari o extracellulari [32]; esso può essere applicato a proteine purificate (talvolta sono difficili da ottenere e il processo è molto lungo), a proteine presenti sulla superficie delle cellule o perfino all’interno di animali in vita. Tuttavia, non può essere applicato a proteine sconosciute, a proteine insolubili, a complessi multiproteici o alle proteine che funzionano solo nella conformazione nativa [33]. Infatti, gli aptameri selezionati usando proteine non nella conformazione nativa, talvolta, non sono in grado di interagire con la proteina nella conformazione nativa. Per risolvere queste limitazioni, sono state sviluppate le strategie *Cell SELEX* ed *In Vivo SELEX* i cui target sono rappresentati, rispettivamente, da cellule e animali in vita.

Il metodo ***Cell SELEX*** è capace di generare aptameri che riconoscono proteine di superficie o intracellulari nella loro conformazione nativa [34-36]. Un limite di questa tecnica è rappresentato dal fatto che gli aptameri sono propensi a legare cellule morte in maniera aspecifica, impedendo così l’effettivo arricchimento delle sequenze specifiche per il target o portando perfino al fallimento della SELEX. Una modifica di tale tecnica ha condotto alla ***FACS-SELEX*** (fluorescence-activated cell sorting) che ha permesso di superare questo limite in quanto è in grado di eliminare le cellule morte che legano in maniera non specifica gli acidi nucleici [37].

Come già detto, gli aptameri selezionati *in vitro* non necessariamente funzionano *in vivo*, per tale ragione è stata sviluppata una strategia definita ***In vivo SELEX*** che permette di generare aptameri in modelli animali contenenti il target d’interesse.

La *library* è somministrata all'animale per via intravenosa, si preleva il tessuto o l'organo patologico d'interesse e si estraggono le sequenze legate per poi sottoporle ad amplificazione [38].

L'uso delle matrici in fase solida summenzionate è caratterizzato da assorbimento aspecifico (di sequenze non legate) sulla superficie della matrice. Ciò riduce l'efficienza della separazione e porta alla necessità di cicli multipli oltre che di vari step di selezione negativa. Inoltre, l'immobilizzazione può influenzare negativamente la struttura della proteina riducendo così la rilevanza biologica delle sequenze selezionate [23]. Un'alternativa ai metodi basati sulla superficie (particolarmente adatti ai target proteici) è rappresentata dalle seguenti tecniche di separazione: elettroforesi capillare (CE) [39-41], microscopia a forza atomica (AFM) [42,43], citometria a flusso [44,45] microfluidica [46,47] e risonanza plasmonica di superficie (SPR). Esse sono state adottate con successo nella procedura SELEX classica per accelerare l'identificazione di aptameri ad alta affinità. Gli aptameri usati nei laboratori di ricerca possono anche essere ottenuti mediante "rational design". Questo comporta la riprogettazione di aptameri già definiti per modificare le loro proprietà o conferire nuove caratteristiche [48,49].

### **1.2 Vantaggi e svantaggi rispetto agli anticorpi**

Gli aptameri a DNA e RNA sono funzionalmente simili ma ciascuno presenta i propri vantaggi. Rispetto agli aptameri a DNA, quelli a RNA sono chimicamente instabili a causa della presenza in posizione 2' dello zucchero ribosio di un gruppo ossidrilico (-OH) reattivo (Figura 3). Questo gruppo viene facilmente deprotonato in soluzione acquosa, specialmente in soluzione alcalina, portando alla formazione dell'anione 2'-O<sup>-</sup> che può agire da nucleofilo e attaccare l'atomo di P del legame fosfodiesterico provocando l'idrolisi delle molecole di RNA [50]. Inoltre, è stato appurato che, negli

aptameri a RNA, in seguito alla rimozione del gruppo -OH, si riscontra un aumento della resistenza alle nucleasi [51,52].

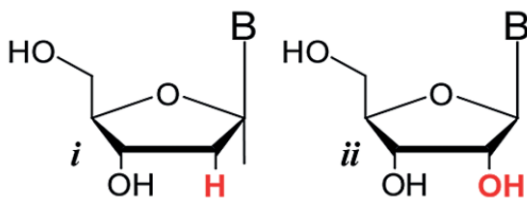


Figura 3: (i) ribonucleotide (ii) desossiribonucleotide

Gli aptameri a DNA in posizione 2' dello zucchero deossiribosio presentano il legame C-H, questa differenza chimica conferisce loro un intrinseco vantaggio in termini di minore reattività e maggiore stabilità. Infatti, sono più stabili degli aptameri naturali a RNA sia nel siero fetale bovino al 10% (FBS: fetal bovine serum) che nel siero umano [53]. Questa è la ragione per cui modifiche chimiche aggiuntive sono solitamente apportate agli aptameri a RNA in modo da migliorarne la stabilità. Un altro potenziale vantaggio degli aptameri a DNA è il loro processo di selezione relativamente semplice. La selezione di aptameri a RNA, a differenza di quelli a DNA, richiede trascrizione inversa e trascrizione *in vitro* ad ogni ciclo di selezione [54-56]. Inoltre, una volta selezionati, il costo di produzione degli aptameri a DNA è più basso di quello degli aptameri a RNA. Tuttavia bisogna notare che gli aptameri a RNA mostrano interazioni intramolecolari RNA-RNA più forti. Inoltre, sia la reattività che l'appaiamento delle basi del tipo non Watson-Crick rendono quest'ultimi inclini a formare un numero maggiore di diverse e complesse strutture [57,58]. Questo rappresenta un vantaggio per la selezione di aptameri dotati di alta affinità e specificità a partire da *library* a RNA [59]. Per tale ragione, gli aptameri a DNA sono usualmente selezionati da *library* contenenti regioni casuali più lunghe in modo da ottenere strutture più complesse. È necessario sottolineare, comunque, che tra i 2 tipi di aptameri non sono state osservate significative differenze in termini di capacità di legame e specificità. Gli aptameri tendono, tipicamente, ad assumere

strutture ben definite grazie alla loro propensione a formare coppie di basi complementari. Essi si ripiegano in varie strutture secondarie (*stem, loop, bulge, pseudoknot, G-quadruplex* e *kissing hairpin* [60] che, a loro volta, possono dar luogo a strutture complesse uniche, capaci di riconoscimento molecolare specifico dei loro target. Quando si lega al target, un aptamero recluta il pieno arsenale di interazioni disponibili per il riconoscimento molecolare. Le interazioni tridimensionali coinvolte, che includono interazioni idrofobiche ed elettrostatiche, legami idrogeno, forze di van der Waals, complementarità di forma (*shape complementarity*) e impilamento delle basi, sono essenziali per l'affinità e la specificità di legame degli aptameri [61].

Gli aptameri nucleotidici, spesso definiti “anticorpi chimici”, sono funzionalmente comparabili agli anticorpi tradizionali. Infatti, analogamente al modo in cui gli anticorpi si legano agli antigeni, così la specifica interazione tridimensionale aptamero-target guida la formazione del complesso [62].

- Questa complessità conferisce agli aptameri un'alta affinità di legame, comparabile a quella degli anticorpi (Kd usualmente nel range 0.1 a 50 nM) e una specificità addirittura più alta. Infatti, sono in grado di distinguere tra molecole strettamente correlate quali isomeri conformazionali [63], target contenenti differenti gruppi funzionali [31,64] o persino una mutazione a carico di un amminoacido [65]. Sebbene anche gli anticorpi mostrino un'alta selettività, in realtà, come appena detto, risulta comunque più bassa di quella degli aptameri in quanto gli antigeni possono presentare epitopi multipli che permettono a differenti anticorpi di legarsi allo stesso antigene.

- La propensione degli aptameri a formare coppie di basi complementari conferisce un ulteriore vantaggio. Infatti, la funzione degli aptameri può essere modulata o perfino completamente disattivata *in vivo* usando come antidoto un oligonucleotide complementare all'aptamero d'interesse (antisense) il quale,

legandosi ad esso, ne interrompe la funzione. Pertanto, attraverso un oligonucleotide razionalmente progettato è possibile effettuare il preciso controllo dell'effetto terapeutico di un aptamero [66] (Figura 4).

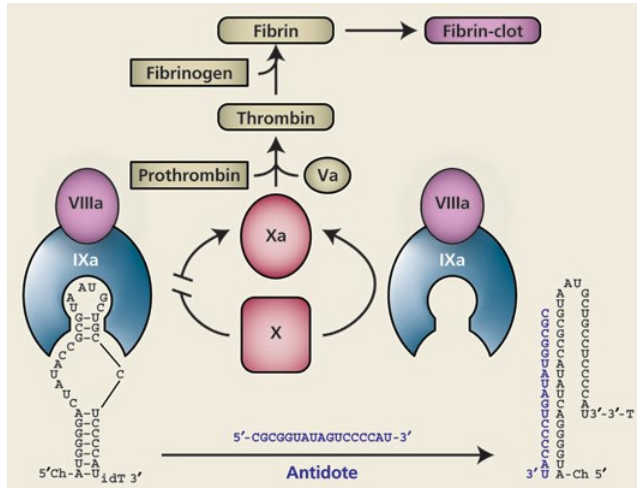


Figura 4: Esempio di un aptamero con proprietà anticoagulanti la cui attività è modulata da un oligonucleotide (antidoto) complementare ad un tratto della sequenza dell'aptamero.

In realtà, se confrontati con i loro equivalenti proteici, gli aptameri possiedono molte altre caratteristiche interessanti.

- Rispetto agli ingombranti anticorpi (150-180 KDa, ~10-15 nm di diametro) gli aptameri hanno dimensioni minori (6-30 KDa, ~1-2 nm di diametro) e una struttura più flessibile. Tali caratteristiche permettono loro di legarsi a target più piccoli o a domini di legame nascosti che risultano inaccessibili ai più grandi anticorpi, con evidenti vantaggi terapeutici [67,68]. Sempre in virtù delle loro maggiori dimensioni, gli anticorpi mostrano una minore velocità di penetrazione e di assorbimento tissutale che risultano particolarmente evidenti nel caso di tumori solidi e che ne possono compromettere l'efficacia terapeutica.
- Gli aptameri nucleotidici possono essere somministrati per iniezione intravenosa o sottocutanea mentre la maggior parte degli anticorpi terapeutici sono somministrati per infusione intravenosa e sono necessari grandi volumi data la loro

scarsa solubilità. Gli aptameri, invece, grazie ad una buona solubilità (>150 mg/ml) ed un più basso peso molecolare, risultano vantaggiosi per la penetrazione nei tumori e per la clearance ematica. La biodisponibilità degli aptameri attraverso la somministrazione sottocutanea è risultata superiore all'80% nelle scimmie [69]. Per tali ragioni, per il rilascio sistemico di agenti terapeutici basati sugli acidi nucleici, la somministrazione sottocutanea è considerata un'efficace strategia.

- Gli aptameri possono interagire con un'ampia gamma di bersagli mentre i potenziali target degli anticorpi sono limitati a molecole immunogeniche.
- Tra i vantaggi ascrivibili agli aptameri come agenti terapeutici c'è anche una più bassa o assente immunogenicità, infatti, non ci sono lavori scientifici che dimostrino tossicità o immunogenicità degli aptameri. Misure biochimiche hanno dimostrato che alte dosi di aptameri (10 mg/kg ogni giorno per 90 giorni) non sono tossiche per diversi animali da laboratorio [70] mentre l'efficacia di molti anticorpi monoclonali può essere severamente limitata dalle risposte immunitarie contro gli anticorpi stessi. È piuttosto difficile provocare una risposta anticorpale contro gli aptameri, molto probabilmente, perché la risposta immunitaria non riconosce i frammenti di acido nucleico come entità estranee [71], e quindi, non stimolano una risposta immunitaria negativa, probabilmente anche a causa delle dimensioni relativamente ridotte [72]. Il Pegaptanib, il primo aptamero approvato dalla FDA (Food and Drug Administration) per il trattamento della degenerazione maculare legata all'età non ha mostrato immunogenicità né negli studi preclinici in animali, né negli studi clinici in pazienti (Figura 5).

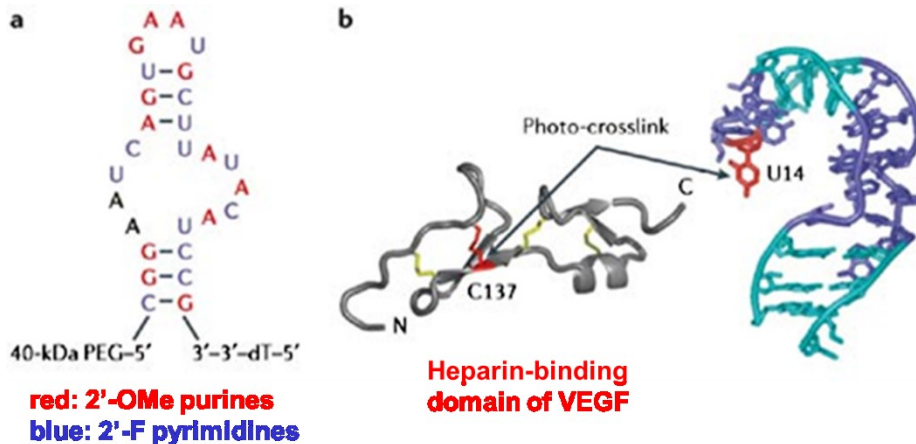


Figura 5. Pegaptanib: un aptamero per il trattamento della degenerazione maculare vascolare legata all'età.

- La generazione degli anticorpi coinvolge una procedura di selezione *in vivo* piuttosto laboriosa, costosa e lunga (6 mesi o più) mentre gli aptameri vengono isolati attraverso una procedura di selezione *in vitro* entro un periodo di tempo relativamente corto (2-8 settimane o anche periodi più brevi a seconda della tecnica SELEX considerata).
- Gli aptameri hanno numerosi vantaggi in termini di produzione, infatti, una volta che una molecola aptamerica è stata ottenuta (attraverso la SELEX) e sequenziata, essa può essere prodotta in grandi quantità e a basso costo. Gli aptameri terapeutici sono sintetizzati chimicamente e, pertanto, la loro produzione si può realizzare su larga scala, come richiesto dalle esigenze di mercato. La produzione, infatti, avviene attraverso la sintesi chimica in fase solida (chimica del fosorammidito): una procedura non basata sull'uso di animali, controllabile, completamente *in vitro*, che richiede da 2 giorni a 2 settimane a seconda che si debbano sintetizzare milligrammi o grammi, che non comporta alcun o al massimo un basso rischio di contaminazione virale o batterica, che richiede bassi costi per la produzione di aptameri a DNA e costi più elevati per RNA lunghi (>60 nucleotidi) e con speciali modifiche. Tale tecnica essendo *in vitro* è, come suddetto, soggetta ad un efficace controllo. Infatti,



le condizioni di selezione possono essere opportunamente regolate a seconda delle esigenze. Questa strategia, inoltre, consente di utilizzare soluzioni tampone e temperature non fisiologiche. Tale tecnica consente di effettuare facilmente modifiche chimiche *ad hoc* che possono incrementare la stabilità chimica e biologica degli aptameri e portare la produzione a costi ben al di sotto di quelli degli anticorpi. Altri vantaggi, non di poco conto, sono associati alla produzione degli aptameri. In particolare, consentono di utilizzare gli standard delle norme di buona fabbricazione (*good manufacturing practice*). Al contrario, la produzione degli anticorpi avviene *in vivo*, comincia nei topi e può richiedere molte differenti linee cellulari, con tempi di realizzazione di 3 mesi per 5-20 grammi. Inoltre, prevede costi alti per cellule provenienti da mammiferi e costi più bassi per cellule provenienti da piante o animali transgenici. Essendo *in vivo*, la produzione degli anticorpi è maggiormente esposta sia al rischio di contaminazioni che di significative variazioni da lotto a lotto. Quest'ultimi aspetti rendono difficile la commercializzazione di farmaci basati sugli anticorpi e assillano i ricercatori che sono sempre alla ricerca della riproducibilità dei dati [73]. Gli aptameri, invece, facendo ricorso ad una procedura chimica sintetica, sono completamente prodotti *in vitro* il che comporta, come già detto, un assente o basso rischio di contaminazione e un assente o bassa variazione da lotto a lotto.

- Gli aptameri mostrano una notevole stabilità: (a) possono essere liofilizzati per conservazioni a lungo termine (anche più di 1 anno) e per trasporto a temperatura ambiente (b) risultano stabili in un ampio intervallo di pH (~4-9) (c) sono resistenti sia alle alte temperature (anche fino a 95°C) sia a numerosi cicli di denaturazione e rinaturazione, dato che la denaturazione è un processo reversibile. Quest'ultima caratteristica consente un facile controllo dei loro processi di ripiegamento (*folding*). Infatti, sebbene gli aptameri possano perdere la loro conformazione durante prolungati periodi di conservazione a temperatura ambiente, questo

comportamento non influenza la loro funzione in quanto essi sono in grado di recuperare la conformazione funzionale tramite una semplice procedura di *annealing* (riscaldamento e raffreddamento) in un appropriato tampone. Gli anticorpi, invece, essendo delle proteine, sono molto sensibili alle variazioni di temperatura (perfino a temperatura ambiente o a 37°C) e la denaturazione è un processo irreversibile. Hanno una durata di conservazione limitata: vengono facilmente denaturati o degradati se esposti ad errate condizioni di conservazione o trasporto per le quali è richiesta (per evitare la denaturazione) una catena continua del freddo [74]. Tutto questo comporta costi di trasporto superiori a quelli richiesti dagli aptameri.

- Nel caso degli aptameri, la coniugazione con altre molecole e/o altre modifiche chimiche risultano processi convenienti e controllabili che possono riguardare sia lo scheletro zucchero-fosfato che le basi. Gli aptameri possono essere razionalmente modificati senza che vi sia perdita di affinità di legame. Anzi, la facilità con cui vengono modificati chimicamente permette un efficace controllo della *clearance* renale e dell'emivita [75]. Per gli anticorpi, invece, la coniugazione e/o eventuali altre modifiche chimiche risultano incontrollabili e limitate ad alcuni tipi di reazioni chimiche. Inoltre, nella maggior parte dei casi, tali modifiche provocano conseguenze negative come ad esempio perdita di attività.

Tutte queste proprietà rendono gli aptameri superiori per le applicazioni diagnostiche e terapeutiche offrendo una maggiore sensibilità, riproducibilità e costi minori. Tuttavia gli aptameri, rispetto agli anticorpi, presentano anche alcuni svantaggi che ostacolano le loro applicazioni *in vivo* come agenti terapeutici e diagnostici.

- Gli aptameri non modificati sono vulnerabili alla rapida degradazione nel siero ad opera delle endo- ed esonucleasi, che si traduce in una limitata emivita *in vivo*: ~10 min per le molecole non modificate [76]. Ad esempio il TBA, un noto aptamero a

DNA che lega la trombina, ha mostrato *in vivo* un'emivita di circa 108 s [77] mentre un aptamero a RNA che riconosce il fattore di crescita dei cheratinociti è degradato nel siero umano per il 90% in pochi secondi [78]. Invece gli anticorpi *in vivo* risultano più resistenti e non influenzati da tale degradazione.

- La temperatura è un parametro addizionale che può avere un impatto negativo sull'efficienza di legame degli aptameri e può accelerare la loro degradazione ad opera delle nucleasi [79]. Gli aptameri formano complesse strutture secondarie e terziarie con cui sono capaci di legare i loro target. Un incremento della temperatura (per esempio a 37°C) può distruggere queste strutture e impedire il legame, come esemplificato dall'aptamero termolabile che lega la cocaina [80-82].
- A causa delle piccole dimensioni, gli aptameri (non modificati) risultano più suscettibili degli anticorpi alla filtrazione renale che, infatti, avviene più velocemente comportando un più breve tempo di circolazione *in vivo* (breve emivita): ~30 min per i derivati non coniugati a fronte di un tempo di circolazione perfino superiore ad 1 mese nel caso degli anticorpi. In effetti i reni sono in grado di eliminare rapidamente sostanze con un peso molecolare < 50 kDa.
- Informazioni tossicologiche riguardanti gli aptameri negli esseri umani sono molto limitate [83,84]. Sebbene effetti avversi correlati agli aptameri siano eventi rari nelle valutazioni cliniche fino ad oggi effettuate, in realtà, una potenziale tossicità può derivare da effetti dovuti alla loro natura anionica, da un inaspettato accumulo nei tessuti, da coniugazione o intense modifiche chimiche o da un'attivazione immunitaria aspecifica, in particolare, a seguito di continue o ripetute somministrazioni [85-87]. Molecole con elevata carica negativa, come gli acidi nucleici, sono inclini ad interazioni non specifiche con le proteine ematiche. Questo può tradursi in un alto assorbimento da parte di tessuti ed organi diversi dal target ambito causando effetti collaterali indesiderati e una ridotta efficacia terapeutica [88,89]. Le modifiche chimiche hanno dimostrato di essere un'arma a

doppio taglio dato che i nucleotidi non naturali possono causare effetti chimici tossici o diventare immunogenici.

Fattori quali la degradazione ad opera delle nucleasi, la filtrazione renale e l'assorbimento irreversibile da parte dei tessuti, considerati nel loro insieme, fanno sì che gli aptameri non modificati presentino una "clearance" plasmatica totale piuttosto alta che rappresenta un serio problema per le applicazioni terapeutiche e diagnostiche *in vivo*.

- Bassi valori di  $K_d$  e alta specificità sono parametri cruciali soprattutto per le applicazioni terapeutiche e per la costruzione di sistemi di rilascio dei farmaci. Purtroppo, non tutti gli esperimenti di selezione forniscono aptameri dotati di entrambe le caratteristiche. Per esempio, possono sorgere difficoltà nell'isolare aptameri dotati di alta affinità di legame perché gli acidi nucleici sono biopolimeri carichi negativamente e privi di funzionalità (functionality-deprived) la cui propensione a legare tasche idrofobiche o target proteici privi di regioni cationiche è intrinsecamente inferiore a quella degli anticorpi [90,91]. Anche altri composti sono noti per essere dei target problematici negli esperimenti di selezione degli aptameri, si tratta delle glicoproteine o dei singoli enantiomeri di piccole molecole organiche [16,92]. Selettività limitata o perturbazioni nella specificità possono sorgere a causa del cambio di ambiente. Infatti, un aptamero riconoscerà il suo target più prontamente nel tampone usato durante gli esperimenti di selezione *in vitro* che nell'affollato ambiente cellulare. Infine, potrebbe accadere che esperimenti di selezione che favoriscono i ligandi ad alta affinità, spesso, danno luogo a specie con una selettività limitata (e viceversa). Un'elevata specificità può essere ottenuta includendo uno o più step di selezione negativa allo scopo di eliminare i composti che presentano somiglianze chimiche e/o strutturali con il target desiderato. Tuttavia, in questo modo, potrebbero essere escluse specie con elevata capacità di legare il target. Bassi valori di  $K_d$  per target più problematici e le

alterazioni nella specificità sono problemi importanti per numerose applicazioni pratiche degli aptameri.

- Il repertorio di interazioni fornito agli aptameri dalle 5 basi naturali (timina, uracile, citosina, adenina e guanina) è piuttosto scarso. Negli anticorpi, invece, la diversità strutturale e funzionale è supportata da 22 amminoacidi.

### ***1.3 Stato dell'arte nell'industria farmaceutica***

I vantaggi su menzionati rendono gli aptameri uno strumento ideale per le applicazioni terapeutiche [93] e diagnostiche. Queste caratteristiche conferiscono loro la capacità di competere efficacemente con i più diffusi e ampiamente usati anticorpi per diventare gli agenti dominanti. I recenti avanzamenti tecnologici (nanotecnologie, microfluidica, *microarray* ed altre applicazioni) stanno dimostrando che si tratta di potenti molecole multifunzionali e versatili caratterizzate da un eccezionale ed ampio intervallo di applicazioni mediche e analitiche, come esemplificato in parte in Figura 6 [94]. Essi stanno cominciando ad inserirsi come strumenti preziosi nella diagnostica per immagini, in ambito informatico, in ambito biofisico per la costruzione ad esempio di biosensori elettrochimici. Anche le nanotecnologie rappresentano un campo interessato all'utilizzo degli aptameri per lo sviluppo di nanodispositivi, ad esempio come componenti negli esperimenti di *microarray*, microfluidica ed *ELISA sandwich assay*.

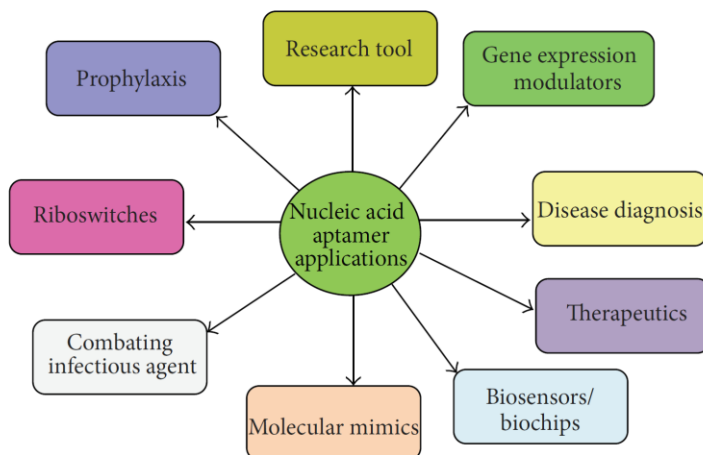


Figura 6: Potenziali applicazioni degli acidi nucleici aptamerici.

Nell'ambito della ricerca sugli aptameri, le applicazioni terapeutiche rappresentano il ramo più estensivamente e dettagliatamente investigato [32,95,96]. Gli agenti terapeutici basati sugli aptameri sfruttano, tipicamente, una delle seguenti 3 strategie: (i) un aptamero può fungere da antagonista per bloccare le interazioni dei target associati alla processo patologico quali ad esempio proteina-proteina o recettore-ligando ed è questa la modalità d'azione adottata dalla maggior parte di essi (Figura 7) [97] (ii) può agire da agonista per attivare la funzione dei recettori target [98,99] oppure (iii) un aptamero (cell-type-specific) specifico per un tipo di cellula può essere usato come trasportatore per il rilascio di altri agenti terapeutici al tessuto o alle cellule target [100].

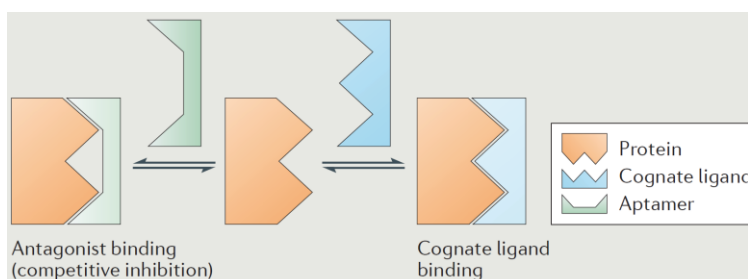


Figura 7: Meccanismo d'azione degli agonisti aptamerici

Nonostante le notevoli potenzialità e i numerosi vantaggi, in realtà, il successo clinico e commerciale degli aptameri procede ancora a ritmo piuttosto lento. Ad oggi, solo una quantità limitata di aptameri ha intrapreso gli studi clinici e solo uno ha ricevuto l'approvazione per uso clinico. In particolare, il primo e unico farmaco aptamerico approvato nel 2004 dalla Food and Drug Administration (FDA) per il trattamento della degenerazione maculare legata all'età (AMD) è il Macugen (pegaptanib sodium) [101] mentre altri 10 aptameri sono attualmente sottoposti a diverse fasi di test clinici per il trattamento di varie patologie quali la degenerazione maculare, il cancro, l'infiammazione e le alterazioni della coagulazione (Tabella 2). Il Macugen è un aptamero modificato a RNA che lega specificamente il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) impedendo il legame di quest'ultimo al suo recettore e inibendo così la crescita dei vasi sanguigni. Sia il Macugen, come appena illustrato, che i 10 sopra menzionati agiscono da antagonisti. In aggiunta a questi aptameri, altri 100 circa sono in attesa di essere approvati per la valutazione nei test clinici.

Therapeutic Purpose	Name	Target	Form	Modification	Status
Macular degeneration	Pegaptanib	Vascular endothelial growth factor (VEGF)	RNA	2'-fluoro pyrimidines, 2'-O-methyl purines, 3'-inverted dT, PEGylated	Approved for age-related macular degeneration (wet AMD)
	ARC1905	Complement component 5	RNA	3'-inverted dT, PEGylated	Phase I completed
	E10030	Platelet-derived growth factor (PDGF)	DNA	2'-fluoro pyrimidines, 2'-O-methyl purines 3'-inverted dT	Phase III await
Cancer	AS1411	Nucleolin	RNA	G-rich, PEGylated	Phase II on-going
	NOX-A12	The chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (CXCL-12)	L-RNA	L-form, PEGylated	Phase II on-going
	REG1	Coagulation factor IXa	RNA	3'-inverted dT, PEGylated	Phase III await
Coagulation	ARC1779	von Willebrand factor (vWF) A1 domain	DNA	3'-inverted dT, PEGylated	Phase II on-going
	NU172	Thrombin	DNA	Unmodified DNA	Phase II on-going
	BAX499	Tissue factor pathway	RNA	3'-inverted dT, PEGylated	Phase I on-going
Inflammation	NOX-H94	Hepcidin	L-RNA	L-form, PEGylated	Phase II on-going
	NOX-E36	The chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2)	L-RNA	L-form, PEGylated	Phase II on-going

Tabella 2. Aptameri nucleotidici che hanno completato o per i quali sono in corso gli studi clinici

La comprensione dell'attuale scarso successo clinico e commerciale degli aptameri non prevede una risposta semplice. Esso può essere ascritto a diversi fattori tra cui

un certo grado di esitazione nel puntare su un nuovo tipo di prodotto e una travolgente dominazione sul mercato da parte degli anticorpi sin dalla loro introduzione risalente al 1975 [102]. Quest'ultimo aspetto può essere spiegato considerando che i brevetti riguardanti la tecnologia SELEX sono recenti ed esclusivi (il primo brevetto è scaduto nel 2011 [76] mentre, nel caso degli anticorpi, le protezioni sono scadute e non vi è più alcun brevetto in corso. Gli investimenti (sostegno alla ricerca e allo sviluppo) destinati agli aptameri sono insufficienti mentre nel caso degli anticorpi vi è un abbondante supporto da parte di investitori interessati e delle istituzioni coinvolte nella formazione e ricerca; le infrastrutture commerciali sono ben sviluppate con conseguente aumento rapido e sostenuto della quota di mercato. Un altro ostacolo all'affermazione degli aptameri sembrerebbe essere rappresentato dal "problema trombina": molti sforzi sono stati concentrati su aptameri noti, tra cui il TBA (thrombin binding aptamer), per individuare nuove strategie di progettazione piuttosto che focalizzare le energie sull'isolamento di nuovi aptameri [103]. Altre cause sono riconducibili ai limiti associati al metodo SELEX convenzionale [104] e alla scarsa conoscenza delle proprietà farmacocinetiche, farmacodinamiche e delle formulazioni medicinali di tali biomolecole. Tuttavia, gli ostacoli più ardui allo sviluppo degli aptameri sono rappresentati dalla limitata diversità chimica, dalla scarsa selettività e dalla bassa stabilità biologica. Gli acidi nucleici non modificati, infatti, sono fortemente inclini alla degradazione ad opera delle nucleasi e alla filtrazione renale, con conseguente scarsa biodisponibilità.

Superare queste sfide e sfruttare a pieno le caratteristiche uniche degli aptameri è vitale per il loro successo come agenti terapeutici e non solo. Gli aptameri non solo possiedono la flessibilità delle piccole molecole (che permette loro di interagire con siti di legame non accessibili agli ingombranti anticorpi) ma possiedono anche l'alta specificità degli anticorpi che permette una terapia mirata non ottenibile con le



piccole molecole. Questi vantaggi, unici, potrebbero riempire una nicchia di mercato quale ad esempio il trattamento virale e batterico, l'immunoterapia del cancro, le antitossine o la somministrazione mirata dei farmaci. Gli avanzamenti tecnologici continuano a rivelare la promettente funzionalità e il vasto potenziale terapeutico degli aptameri ma hanno permesso anche di migliorarne l'efficienza di selezione, la sintesi, la formulazione, l'affinità, la specificità e la biodisponibilità. Il superamento di molti dei problemi che fin'ora hanno limitato l'uso degli aptameri, associato a fattori quali la richiesta da parte del mercato di trattamenti economici e la scadenza del brevetto SELEX, forniscono una forte spinta allo sviluppo degli aptameri terapeutici il cui futuro sembra estremamente promettente. Se la ricerca darà più spazio allo sviluppo razionale degli aptameri, è prevedibile lo sviluppo di una nuova generazione di terapeutici con funzioni biologiche e profili aptamerici superiori.

#### ***1.4 Miglioramento delle proprietà con l'introduzione di modifiche***

Gli aptameri non modificati sono dotati di straordinarie proprietà di legame, tuttavia, la potenza terapeutica è decisamente limitata dalle loro intrinseche caratteristiche fisico-chimiche. Tali caratteristiche possono influenzare le proprietà farmacocinetiche portando ad instabilità metabolica, rapida filtrazione renale, rapida distribuzione dal plasma ai tessuti (ad esempio fegato o milza), attivazione non specifica del sistema immunitario ed effetti polianionici. La suscettibilità alla degradazione ad opera delle nucleasi e alla rapida filtrazione renale ne limita fortemente l'uso in ambito clinico. Molti aptameri, sebbene dotati di potente attività, presentano un'inaccettabile biodisponibilità *in vivo*. L'introduzione di modifiche chimiche per la stabilizzazione contro le nucleasi è stata determinante per l'avanzamento di quegli aptameri che sono attualmente sottoposti a valutazione clinica. Senza queste modifiche, gli acidi desossiribonucleico (2'H) e

ribonucleico (2'OH) sono altamente suscettibili alla degradazione ad opera delle nucleasi con il primo che mostra un'emivita nel siero di circa 1h [105] e il secondo solo di pochi minuti [106].

Altrettanto importante è il fatto che molte di queste modifiche rendono gli aptameri anche non immunogenici [107-109]. Questo dell'immunogenicità è un problema significativo per gli acidi nucleici (DNA e RNA) non modificati. Essi possono attivare risposte innate attraverso l'interazione con i recettori TLR (*Toll-Like Receptors*) in particolare con i recettori 7,8,9,3.

L'affinità di legame e la specificità degli acidi nucleici non modificati risultano insufficienti, talvolta, per l'utilizzo come agenti terapeutici. Tale carenza (rif) potrebbe essere attribuita allo scarso repertorio di interazioni fornito dalle 5 basi naturali.

A tutto questo va aggiunto che la generazione di aptameri di alta qualità attraverso il metodo SELEX convenzionale è, come già detto, generalmente inferiore al 30%.

Sono state progettate diverse strategie per mitigare le summenzionate carenze in modo da accrescere la loro efficienza terapeutica e diagnostica. Ad esempio, le variazioni di affinità di legame dovute ad alterazioni conformazionali o farmacocinetiche causate da un differente ambiente, sono state affrontate dallo sviluppo del metodo In vivo SELEX [38].

Un'altra strategia molto allettante per migliorare le proprietà degli aptameri è rappresentata dall'introduzione di modifiche chimiche. Tali modifiche possono essere tese a migliorare la degradazione ad opera delle nucleasi, la clearance renale, la stabilità termica, l'affinità di legame, il legame a target non desiderati (*off-target binding*) e altri problemi di specificità quale ad esempio il miglioramento del legame a target più difficili [110, 111-114]. Potremmo riassumere dicendo che il bisogno di modificare chimicamente gli aptameri deriva dalla scarsa stabilità biologica e dallo scarso repertorio di interazioni fornito dalle 5 basi naturali. I siti su

cui possono essere apportate tali modifiche sono: (i) l'anello dello zucchero, (ii) il legame fosfodiesterico e/o (iii) le basi azotate. Tuttavia, lo scheletro zuccherofosfato rappresenta il sito più comunemente utilizzato per introdurre delle variazioni, in particolare, gli aptameri a RNA sono usualmente modificati alla posizione 2' dei nucleosidi mentre in quelli a DNA le modifiche riguardano solitamente il gruppo fosfato. Ciascuna modifica ha le proprie caratteristiche e può essere complementare ad altre. Infatti, generalmente l'ottimizzazione di un dato aptamero prevede la combinazione di modifiche multiple. Le modifiche possono essere incorporate negli aptameri (i) attraverso la sintesi automatizzata in fase solida dopo selezione *in vitro* partendo da una *library* di sequenze naturali e/o (ii) durante il processo SELEX attraverso l'inclusione di nucleotidi modificati (dN\*TPs) direttamente nel protocollo SELEX. Chiaramente, gli aptameri ottenuti attraverso la strategia *in-SELEX* possono essere ulteriormente modificati attraverso l'ottimizzazione *post-SELEX* come mostrato dall'unico farmaco aptamerico commercializzato, il pegaptanib.

#### **1.4.1 Modifiche *in-SELEX***

Due differenti strategie possono essere applicate per incorporare nucleotidi modificati negli aptameri: *in-SELEX* e *post-SELEX*. Nella strategia *in-SELEX*, gli aptameri con le modifiche desiderate sono isolati direttamente dalle *library* a DNA o RNA contenenti i nucleotidi modificati che devono essere compatibili con le DNA o RNA polimerasi [115-116]. La limitata funzionalità chimica dei polimeri genetici naturali (DNA e RNA) spiega, generalmente, la dominazione delle proteine sugli acidi nucleici come *scaffold* per recettori e catalizzatori biologici [11]. Quando confrontati con gli anticorpi, gli aptameri hanno poche unità monomeriche da utilizzare per mediare il riconoscimento del target (5 basi contro 22 amminoacidi). Questo punto debole è compensato dall'utilizzo di *library* aptameriche molto

ampie. Con le 5 basi azotate naturali è possibile ottenere  $5^n$  sequenze oligonucleotidiche (dove  $n$  indica il numero di nucleobasi). Si potrebbe pensare che *library* di queste dimensioni permettano di generare aptameri per qualunque tipo di target. In realtà, molti target si sono rivelati resistenti alla selezione aptamerica. Con l'obiettivo di incrementare le probabilità di generare aptameri per queste molecole problematiche, i ricercatori hanno cercato di espandere il codice genetico al di là delle 5 basi naturali. La sintesi di *library* con acidi nucleici recanti una più ampia gamma di gruppi chimici sembra essere una soluzione a questo problema. La compatibilità dei substrati nucleotidici con le polimerasi usate nel processo SELEX è un problema di primaria importanza. Usualmente, i derivati NTPs e dNTPs di nuova sintesi sono selezionati sulla base della loro compatibilità con le polimerasi commercialmente disponibili. Un'interessante prospettiva è rappresentata dalle polimerasi capaci di utilizzare substrati non naturali che possono essere costruite artificialmente tramite tecniche di ingegneria genetica.

#### **1.4.2 Modifiche post-SELEX**

Questo approccio consiste nel modificare gli aptameri precedentemente selezionati con gruppi funzionali che non erano presenti nella selezione originaria [117]. Una volta che le sequenze aptameriche sono state identificate mediante SELEX, le modifiche chimiche possono essere inserite alle posizioni interne e/o alle estremità 3' e 5' attraverso la sintesi di oligonucleotidi in fase solida [118]. Nella sintesi automatizzata di oligonucleotidi in fase solida, i monomeri fosforamiditi modificati attivati sono aggiunti alla crescente catena oligonucleotidica cominciando dal primo nucleoside immobilizzato sul supporto solido (Figura 8) [129-120]. Dopo il completamento della sintesi, gli oligonucleotidi sono staccati dal supporto e i gruppi protettori delle basi azotate sono rimossi mediante trattamento con una soluzione

acquosa di ammoniaca. La successiva purificazione mediante HPLC o elettroforesi su gel fornirà le sequenze oligonucleotidiche pure.

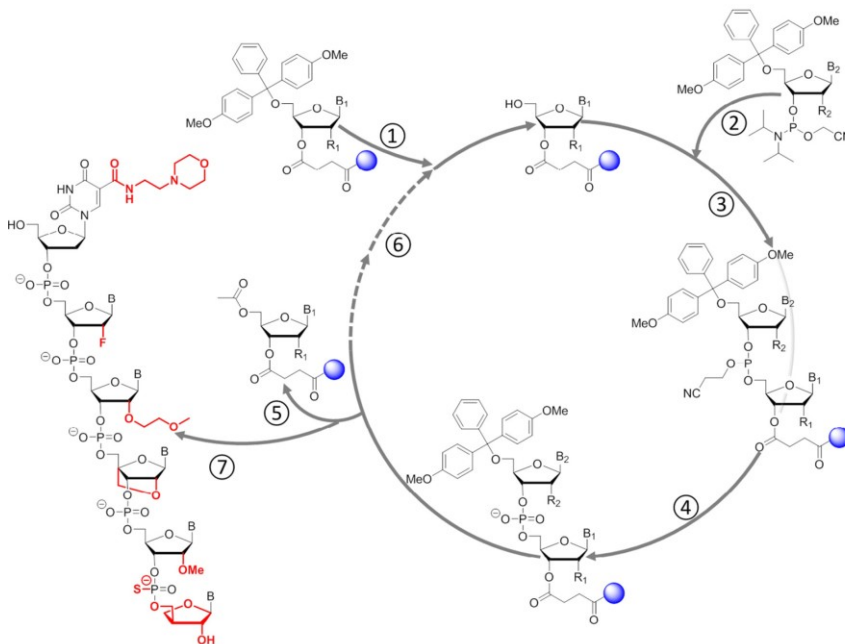


Fig. 8. Gli step cruciali della sintesi automatizzata in fase solida degli oligonucleotidi. Step1: il ciclo sintetico comincia con la rimozione del gruppo protettore 5'-dimetossitrite (5'-DMTr) dal primo nucleoside legato al supporto solido (ad esempio CPG ossia *controlled porous glass*) attraverso un *linker* succinilico; step2: il monomero fosoramidito in ingresso (modificato o non) è attivato solitamente con tetrazolo; step3: attacco nucleofilo del gruppo 5'-OH libero sull'atomo di fosforo del monomero in ingresso precedentemente attivato e conseguente accoppiamento (*coupling*); step4: ossidazione da triestere fosfito ( $P^{III}$ ) a triestere fosfato ( $P^V$ ) mediante una soluzione di iodio; step5: i gruppi 5'-OH che non hanno reagito (1-2%) sono bloccati (*capped*) con una miscela di anidride acetica e N-metil-imidazolo in modo da impedire che possano reagire con i successivi fosoramiditi aggiunti; step6: il nuovo ciclo comincia con la detrilitazione dell'ultimo nucleotide aggiunto; step7: terminata la sintesi, l'oligonucleotide è staccato dal supporto solido e i gruppi protettori delle ammine esocicliche delle nucleobasi sono rimossi mediante trattamento con ammoniaca.

Come menzionato sopra, il principale obiettivo nello sviluppo di aptameri modificati è l'incremento sia della biodisponibilità che della diversità strutturale. Le modifiche *post-SELEX* permettono di perseguire entrambi gli obiettivi. Tuttavia, la maggior parte di queste modifiche è progettata per migliorare la stabilità biologica poiché le modifiche che conducono ad una migliore attività funzionale sono più difficili da

predire. Poiché l'affinità e/o la specificità e la funzione di un aptamero sono sensibili alla sua struttura, le modifiche *post-SELEX* sono accompagnate dal rischio di indurre alterazioni delle proprietà e della conformazione iniziale dell'aptamero compromettendo così l'affinità di legame. Quando si progetta di modificare un aptamero, è cruciale che la conformazione iniziale non sia perturbata in modo da non influenzarne le proprietà di legame. Le regioni dell'aptamero coinvolte nel legame con il ligando sono spesso localizzate nelle zone in cui prevale l'accoppiamento delle basi (*stem*) e consentono all'aptamero di legarsi con alta affinità e specificità attraverso interazioni intermolecolari quali legami ad idrogeno, interazioni elettrostatiche e di van der Waals. Qualsiasi cambiamento strutturale capace di modificare le regioni dell'aptamero coinvolte nell'interazione può influenzare l'affinità di legame e alterare la specificità e/o la stabilità dell'aptamero. Per tali ragioni è necessario adattare precisamente le modifiche alla funzione desiderata [121]. Sfortunatamente, regole universalmente valide per tutti gli aptameri non sono disponibili, per cui spesso è necessario [122] valutare un ampio numero di analoghi modificati. Per ovviare a tale problema si può scegliere di utilizzare la strategia *in-SELEX* cominciando così la procedura di selezione utilizzando aptameri modificati.

I percorsi sintetici per modificare gli acidi nucleici hanno mostrato una notevole flessibilità e coinvolgono un ampio range di trasformazioni strutturali e funzionali. Un largo numero di monomeri fosforamidito sintetici modificati è commercialmente disponibile per l'assemblaggio automatizzato di acidi nucleici non naturali. Inoltre, questa strategia è molto conveniente soprattutto per la produzione di aptameri su larga scala. Tuttavia, i potenziali vantaggi della sintesi chimica svaniscono quando si affronta la necessità di acidi nucleici di maggiori dimensioni e in maggiore quantità. Infatti la sintesi degli oligonucleotidi in fase solida è ristretta a sequenze piuttosto corte (inferiori a 100 nucleotidi). I lunghi ed

incerti studi SAR (relazione struttura-attività), richiesti per identificare aptameri modificati con valori di  $K_d$  simili a quelli delle controparti non modificate, insieme all'intolleranza di taluni gruppi funzionali per le condizioni non modificabili di alcuni step sintetici, rappresentano limiti non trascurabili. In questo quadro la strategia *in-SELEX* può risultare particolarmente conveniente dal momento che gli aptameri risultanti non necessitano di successivi studi SAR.

#### **1.4.2.1 Truncation**

Gli aptameri identificati attraverso il processo SELEX sono composti, usualmente, da regioni random di 20-50 nucleotidi affiancate, in entrambe le estremità, da regioni conservate necessarie per l'*annealing* al primer e successiva amplificazione mediante PCR. Non tutte le regioni dell'aptamero sono coinvolte nel legame col target. Ellington e collaboratori hanno valutato l'influenza delle regioni conservate piuttosto che di quelle random eseguendo delle analisi bioinformatiche [123]. Come suggerito dai loro risultati, le regioni costanti, generalmente, non contribuiscono o limitano le proprietà di legame degli aptameri e sono coinvolte solo marginalmente nella struttura generale. Pertanto, gli aptameri subiscono solitamente una riduzione significativa delle dimensioni (*truncation*) lasciando solo i motivi attivi nell'interazione con il target. In tal modo vengono ridotte sia le dimensioni complessive che i costi degli aptameri. È indubbio, infatti, che sequenze più lunghe comportino maggiori costi di sintesi. Zheng e collaboratori hanno trovato che era vantaggioso minimizzare la lunghezza degli aptameri perché le sequenze più corte hanno, rispetto alle sequenze più lunghe, uguali o migliori affinità e specificità verso il target [124,125,126]. La *truncation*, per poter essere eseguita, richiede la conoscenza delle sequenze coinvolte nella formazione della conformazione attiva dell'aptamero. Tali informazioni possono essere acquisite attraverso differenti metodi tra cui strumenti bioinformatici, NMR, *footprinting* e

frammentazione parziale degli aptameri [127-130]. Gli strumenti bioinformatici disponibili possono aiutare nell'allineamento di sequenze e nella classificazione in famiglie, nel predire le strutture secondarie e terziarie, nel localizzare le sequenze conservate e nell'eseguire analisi di modellistica molecolare (*docking*) con vari target.

#### 1.4.2.2 Miglioramento della resistenza alle nucleasi

Come mostrato in Tabella 3, oggi sono disponibili diverse strategie e modifiche chimiche per migliorare la stabilità degli aptameri alle endogene ed ubiquitarie nucleasi. Tra queste modifiche, quelle maggiormente utilizzate in tal senso sono state la sostituzione in posizione 2' con un atomo di F, con un gruppo amminico (NH<sub>2</sub>) o con un O-metile ed il blocco dell'estremità 3' tramite una timidina invertita.

Modification Sites	Strategy
ends of nucleic acid chain	terminal 3'-3' or 5'-5' internucleotide linkage <sup>1</sup> , 3'-biotin conjugates;
sugar ring of nucleoside	2'-fluoro, 2'-O-methyl and 2'-amino-substitutions <sup>1</sup> , locked nucleic acid (LNA), unlocked nucleic acid (UNA) and 2'-deoxy-2'-fluoro-D-arabinonucleic acid (2'-F ANA);
phosphodiester linkage	methylphosphonate or phosphorothioate, replaced by triazole;
mirror image	L-enantiomeric oligonucleotide aptamers (Spiegelmers)

Tabella 3: Modifiche chimiche volte ad incrementare la resistenza alle nucleasi

- Legame internucleotidico 3'-3' e 5'-5' alle estremità

Le inversioni alle estremità 3'-3' e 5'-5' (Figura 9) furono testate nel 1991 da Seliger ed altri [131]. Il *capping* all'estremità 3' con una timidina invertita è stata una strategia molto usata tra gli aptameri attualmente sottoposti a studi clinici [132,133]. Tale modifica incrementa la stabilità termica e la resistenza alle 3'-esonucleasi presenti nel siero umano. La sintesi degli aptameri modificati con una



timidina invertita in 3' (Figura 10) necessita di un supporto CPG modificato in cui il primo nucleoside è legato attraverso il gruppo 5' ossidrilico e l'allungamento della catena avviene nella direzione standard 3'→5' [131,134,135].

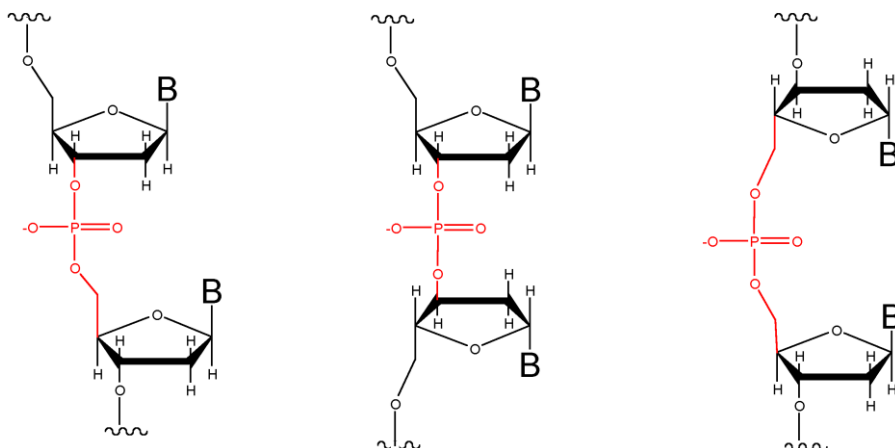


Figura 9: Scheletro zucchero-fosfato con giunzioni 3'-5', 3'-3' e 5'-5' a confronto.

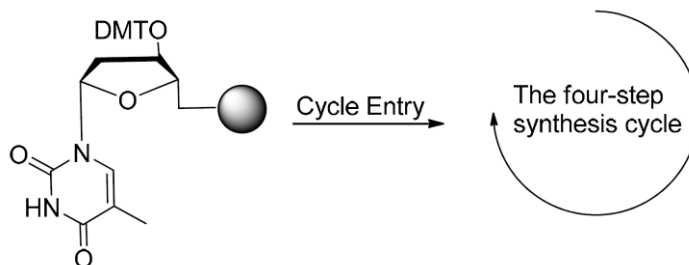


Fig. 10: Sintesi in fase solida degli aptameri modificati con timidina invertita in 3'.

- Complessi coniugati alla biotina all'estremità 3'.

La coniugazione dell'estremità 3' con la biotina sembra resistere all'attività delle 3'-esonucleasi in maniera simile all'introduzione di una timidina invertita. Dougan ed altri hanno studiato i coniugati 3'-biotina-streptavidina del TBA e hanno riscontrato che essi resistono alle 3'-esonucleasi presenti nel sangue di topi e conigli. Tali coniugati, grazie alle maggiori dimensioni, rallentano anche il livello di clearance nei sistemi di circolazione *in vivo* [136] (Figura 11).

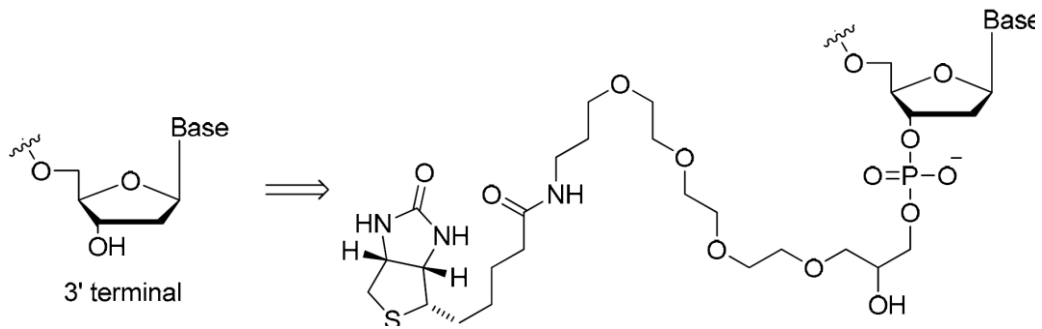


Figura 11: Struttura dei complessi coniugati con biotina all'estremità 3'

- Modifiche sullo zucchero

Gli zuccheri ribosio e deossiribosio possono essere modificati per migliorare la resistenza alle nucleasi introducendo in posizione 2' un atomo di Fluoro (2'-F), un gruppo amminico (2'-NH<sub>2</sub>) o un gruppo metossilico (2'-OMe) (Figura 12). Sebbene sia i derivati 2'-F che i 2'-NH<sub>2</sub> siano efficaci nel migliorare l'emivita nel siero, in realtà, i derivati 2'-F sono di gran lunga preferiti grazie ad un guadagno entropico nel legame dovuto alla ridotta flessibilità dello scheletro zucchero-fosfato, ad una migliore efficienza di *coupling* durante la sintesi in fase solida e all'eliminazione di un ulteriore step di deprotezione durante la purificazione [137]. Essi danno luogo a derivati con un'emivita nel siero di circa 90 h e contrariamente agli ammino derivati, ad aptameri con migliori affinità di legame [138,139]. Non sono stati ancora riportati dati relativi a tossicità ben definite riconducibili ai 2'-F derivati [140]. I derivati 2'-NH<sub>2</sub> incrementano fortemente l'emivita nel siero, da 10 s per gli aptameri non modificati fino ad arrivare, in alcuni casi, a 170 h circa. Tuttavia, non sono quasi più utilizzati anche a causa della loro preferenza per la conformazione C2'-endo del ribosio (DNA-like) che influenza negativamente la stabilità termodinamica dell'accoppiamento delle basi compromettendo così l'affinità per il target [141].

I più ingombranti 2'-metossi derivati sono stati i primi e i più largamente utilizzati grazie all'incrementata resistenza alle nucleasi, all'alta temperatura di fusione (*melting*), come testimoniato da alcuni aptameri attualmente in studio clinico, [142,143] ma soprattutto perché sono basi naturalmente presenti nei nucleotidi, sono più resistenti dei 2'-F e sono più convenienti economicamente sia dei 2'-F che dei 2'-NH<sub>2</sub> derivati.

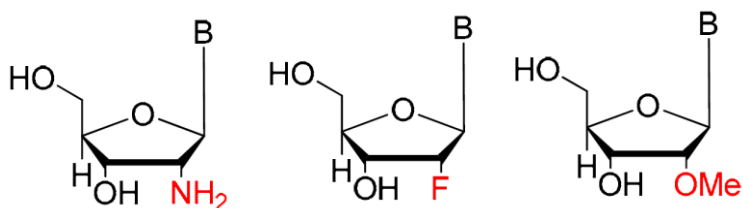


Figura 12: Sostituzioni in posizione 2'

Gli zuccheri ribosio e deossiribosio possono essere interessati anche da altri tipi di modifiche quali LNA, UNA E 2'-F ANA (Figura 13). Gli LNA (*Locked Nucleic Acid*) sono analoghi ribonucleotidici in cui lo zucchero è mantenuto nella configurazione C3'-endo da un legame metilenico tra l'O in 2' e il C in 4' dell'anello dello zucchero. Sono tra gli analoghi più noti e di maggiore successo in quanto l'introduzione di tali unità, che possono dar luogo alle coppie di basi più stabili, incrementa straordinariamente sia la stabilità termica che la resistenza alle nucleasi. Essa, inoltre, generalmente fornisce derivati con una bassa citotossicità [144,145-147,148]. Tuttavia, nonostante l'aumento della stabilità, le costrizioni conformazionali imposte dagli LNA potrebbero obbligare a relegare tali modifiche alle sole regioni con appaiamenti delle basi. Come per le altre modifiche, anche le unità LNA, per poter essere introdotte nelle sequenze aptameriche durante la fase di ottimizzazione post-SELEX, richiedono degli studi relazione-attività (SAR). Durante gli studi SAR, le unità LNA sono inserite nelle sequenze in vari siti quali *stem* (le regioni appaiate) o *loop* (le regioni libere ad ansa) e di volta in volta viene valutato l'impatto di queste

alterazioni sull'affinità di legame. I derivati con le migliori affinità di legame sono sottoposti ad ulteriori saggi *in vivo* [148,149].

Anche altri analoghi nucleotidici modificati sullo zucchero sono stati utilizzati con successo durante le modifiche post-SELEX degli aptameri. Tra questi, la modifica con residui UNA (*Unlocked Nucleic Acid*) ha rappresentato un candidato eccellente. I residui UNA sono analoghi aciclici del RNA in cui il legame tra i C 2' e 3' dello zucchero è assente, rendendo gli aptameri più flessibili [150]. Questa distintiva caratteristica strutturale conferisce un'incrementata flessibilità alle sequenze contenenti UNA (UNAs) rispetto alle sequenze di RNA non modificate ma è anche responsabile di una diminuzione notevole della stabilità termica [151]. A differenza degli LNA che stabilizzano la struttura, gli UNA hanno un'influenza non prevedibile sulla stabilità termodinamica degli aptameri. Grazie alla loro flessibilità, gli UNA potrebbero alleviare la tensione nelle regioni *loop* di piccole dimensioni. Pasternak ed altri hanno trovato che l'introduzione di UNA nelle regioni dei *loop* del TBA, incrementa la sua stabilità termodinamica mentre modifiche a carico dei quartetti di G non favoriscono la formazione delle quadruplex. Non è certo se la modifica con UNA possa avere qualche effetto protettivo sulla degradazione ad opera delle nucleasi. Essi hanno anche dimostrato che gli UNA potrebbero essere sostituiti in molte posizioni senza influenzare l'affinità e l'attività anticoagulante del TBA [152]. È stato visto che modifiche in posizione 2' dell'anello dello zucchero porterebbero a diversi effetti sulla stabilità termica.

Peng ed altri hanno scoperto che, sia nell'aptamero fosforotioato anti-HIV che nel TBA, la sostituzione delle guanine (G) che adottano conformazione anti con 2'-F-ANA-G permette di mantenere la conformazione G-quadruplex mentre la sostituzione delle guanine con conformazione sin non è favorevole. È da sottolineare che 2 TBA 2'-F-ANA modificati (PG13 e PG14) hanno mostrato un'affinità di legame 4 volte superiore e una resistenza alle nucleasi fino a 7 volte

superiore. Dunque la modifica con l'acido 2'-deossi-2'-fluoro-D-arabinonucleico (2'-F ANA) è adatta per migliorare le proprietà chimico-fisico e biologiche delle G-quadruplex [153].

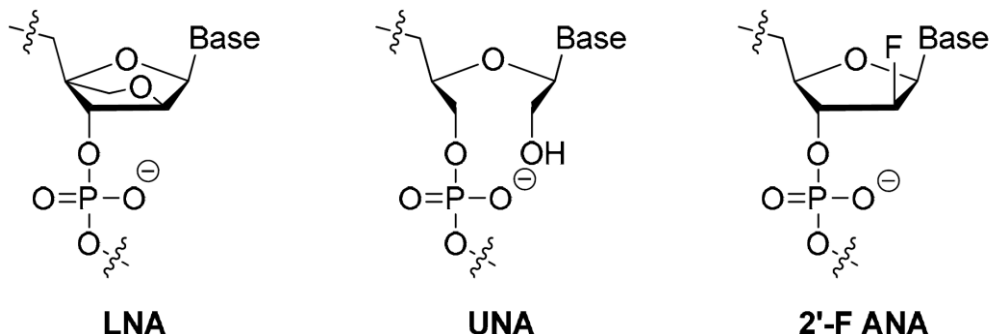


Figura 13: Strutture di *Locked nucleic acid* (LNA), *unlocked nucleic acid* (UNA) e *2'-deoxy-2'-fluoro-D-arabinonucleic acid* (2'-F ANA).

- La sostituzione del legame fosfodiesterico degli aptameri a DNA o RNA con gli analoghi fosforotioato (PS) o metilfosfonato è una strategia comunemente usata per incrementare la resistenza alle nucleasi (Figura 14). In questi analoghi un atomo di O dell'unità fosfato che non impegnato nel legame estereo è sostituito rispettivamente con un atomo di zolfo o con un gruppo metilico.

La maggior parte degli aptameri sottoposti a studi clinici presenta all'interno dello scheletro sostituzioni con gruppi tiofosfato (PS) [154]. Sfortunatamente, tale sostituzione può causare un decremento della stabilità termica. Inoltre, all'aumentare del numero di sostituzioni tiofosfato, gli oligonucleotidi presentano, rispetto a quelli non modificati, una maggiore tendenza ad interazioni non specifiche con proteine diverse dal target desiderato con conseguente aumento della tossicità [155]. Tuttavia, attraverso questa modifica è possibile ottenere un miglioramento del legame al target d'interesse [156]. Per tali ragioni, il numero di gruppi tiofosfato deve essere ottimizzato in modo da ridurre le interazioni non specifiche e migliorare unicamente quelle favorevoli. I legami PS sono legami chirali per cui è necessario scegliere con cura il posizionamento visto che la sintesi chimica

conduce ad una miscela enantiomerica che potrebbe influenzare negativamente la funzione.

Studi termodinamici hanno rilevato che la perdita della carica negativa dello scheletro fosfato derivante dall'introduzione dell'analogo metilfosfonato, destabilizza la struttura G-quadruplex. Anche il raggio ionico degli atomi che costituiscono lo scheletro oligonucleotidico ha un notevole impatto sulla stabilizzazione delle strutture G-quadruplex.

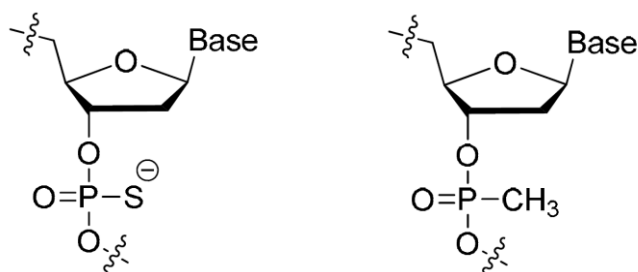


Figura 14: Struttura dei legami fosforotioato (PS) e metilfosfonato.

Più recentemente, per stabilizzare lo scheletro zucchero-fosfato sono stati impiegati i legami fosforoditioati (PS<sub>2</sub>) (Figura 15). La sostituzione di entrambi gli atomi di O non impegnati nella connessione tra nucleotidi adiacenti con atomi di zolfo dà luogo alla formazione di un legame fosforoditioato in cui, similmente alle sequenze naturali, l'atomo di P è achirale. Questo elimina il problema della miscela diastereoisomerica che si crea, invece, con i fosforomonotioati [157]. Yang e collaboratori hanno dimostrato che un singolo legame fosforoditioato (PS<sub>2</sub>) inserito nello scheletro fosfordiestereo può aumentare marcatamente l'affinità di legame di circa 1000 volte [158]. In esperimenti con due diversi aptameri (anti-trombina e VEGF), essi hanno mostrato che un semplice test in cui ciascun legame fosfordiestereo è individualmente sostituito con PS<sub>2</sub> può rivelare la sostituzione responsabile di tale straordinario incremento. Data la semplicità di questi esperimenti, questa tecnica rappresenta un potente approccio per migliorare l'affinità di legame degli aptameri.

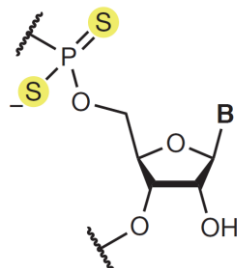


Figura 15. Struttura del legame fosforoditioato

Anche la sostituzione del legame fosfordiestereo con derivati triazolici ha mostrato di essere una strategia molto promettente [159-162]. Gli analoghi triazolici possono essere ottenuti attraverso sintesi automatizzata in fase solida utilizzando blocchi dinucleosidici modificati [163] o mediante “*click reaction*” tra l’azide e i nucleosidi recanti l’alchino [164,165]. In Figura 16 sono mostrati 3 tipi di promettenti modifiche internucleotidiche triazoliche [166].

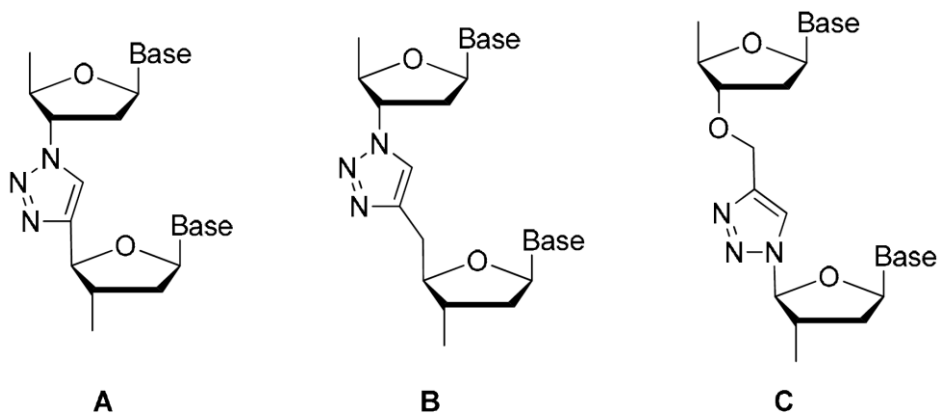


Figura 16: Frammenti di analoghi oligonucleotidici con differenti tipi di modifiche internucleotidiche triazoliche.

Varizhuk ed altri hanno sintetizzato alcuni nuovi analoghi oligonucleotidici con legami internucleotidici triazolici attraverso la “*click reaction*” mostrata in figura 17. Questi analoghi conferiscono capacità di ibridizzazione al DNA simili a quelle degli oligonucleotidi originali ed incrementata resistenza alle nucleasi [167].

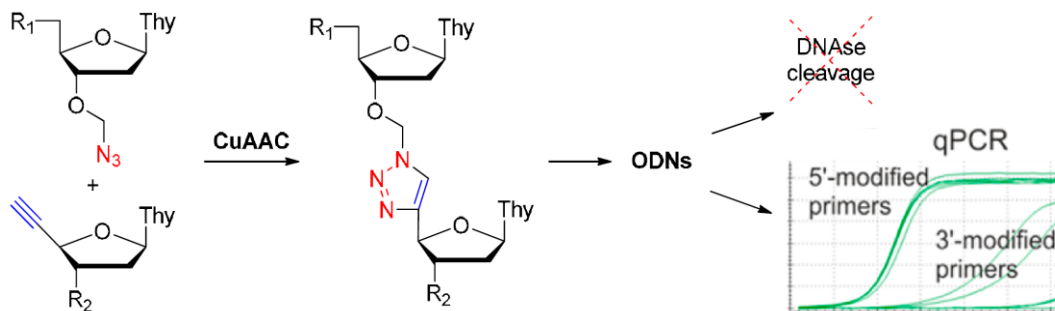


Figura 17: Sintesi di analoghi oligonucleotidici legati da internucleosidi triazolici.

- Un'altra interessante ed importante modifica degli aptameri è basata sulla cosiddetta strategia *Spiegelmers* [168]. Gli oligonucleotidi naturali sono tutti in forma D. Un'inversione di configurazione di tutti i centri chirali porta all'immagine speculare ovvero agli oligonucleotidi in forma L (Figura 18). Gli aptameri nucleotidici costituiti da enantiomeri di tipo L sono noti anche come *Spiegelmers* o *mirror aptamers*. L'incorporazione di nucleotidi di tipo L, pur conservando l'affinità per il target, conferisce agli aptameri alta resistenza alle nucleasi e assenza di attività immunogenica visto che l'immagine speculare degli acidi nucleici non è riconosciuta né dalle nucleasi (e dagli enzimi in generale) né dal sistema immunitario [169]. Non danno ibridizzazione né influenzano gli acidi nucleici presenti naturalmente nelle cellule. Le intrinseche e potenti proprietà di questi acidi nucleici modificati sono rispecchiate da 3 aptameri *Spiegelmers* attualmente sottoposti a studi clinici e da un quarto in studio pre-clinico [93,110,170]. Fino alla recente costruzione di D-polimerasi capaci di riconoscere nucleosidi trifosfato L-modificati [171,172], gli aptameri nucleotidici costituiti da enantiomeri di tipo L sono stati sintetizzati chimicamente sulla base delle sequenze aptameriche in forma D [173]. La strategia di produzione degli *Spiegelmers* inizia dalla selezione di D-aptameri mediante SELEX convenzionale usando target sintetici che sono enantiomeri del target desiderato e si prosegue con la conversione *post-SELEX* nel



corrispondente oligonucleotide di tipo L usando L-fosforoammiditi (Figura 19). Tale tecnologia richiede la preparazione dell'enantiomero del target d'interesse e questo ne limita l'uso pratico solo ad alcune macromolecole biologiche quali, ad esempio, peptidi di dimensioni ridotte [174].

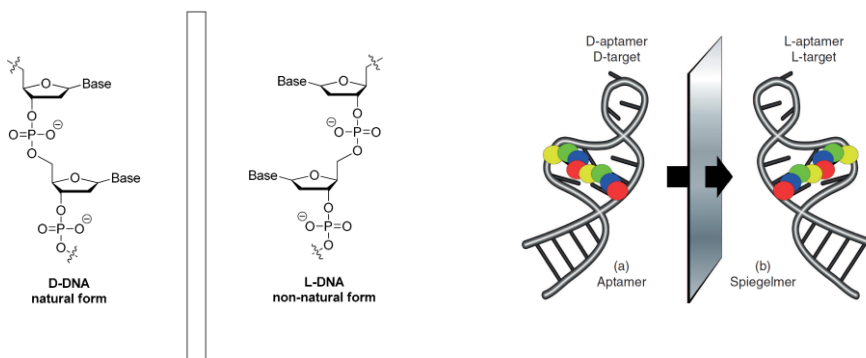


Figura 18: Struttura di L-deossioligonucleotidi (L-DNA)

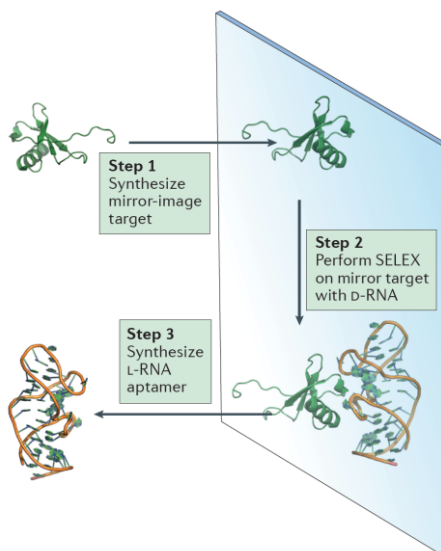


Figura 19. Strategia usata per isolare aptameri a RNA in forma L (spiegelmers) mediante selezione in vitro.

### 1.4.2.3 Miglioramento della clearance renale

Modification Sites	Strategy
ends of nucleic acid chain	5'-end with cholesterol; 5'-end with dialkyl lipids; 5'-end PEGylation <sup>1</sup>

Tabella 4: Modifiche chimiche volte a ridurre la *clearance* renale

La generazione di aptameri con una buona biodisponibilità è un obiettivo di cruciale importanza per eventuali applicazioni in terapia. Le modifiche sopra riportate migliorano l'emivita e quindi la biodisponibilità in quanto sono in grado di ridurre la degradazione ad opera delle nucleasi. Gli aptameri sono composti, tipicamente, da 40-80 nucleotidi. Tali lunghezze producono aptameri con una massa media che oscilla tra 6 e 30 KDa e con dimensioni di circa 5nm. Rispetto agli ingombranti anticorpi, gli aptameri mostrano alcuni dei vantaggi già menzionati in virtù delle loro piccole dimensioni. Tuttavia, proprio a causa di quest'ultime, essi sono soggetti a rapida escrezione mediante filtrazione glomerulare (il cui *cut-off* di filtrazione è 30-50 KDa) con conseguente alta *clearance* renale e bassa biodisponibilità.

Le tipiche modifiche riguardanti il gruppo fosfato o le basi azotate quali ad esempio 2'-F o 2'-OMe non sono sufficienti a moderare la rapida *clearance* renale degli aptameri [93]. La sostituzione del gruppo fosfato con fosforotioato prolunga il tempo di permanenza prevenendo la rapida *clearance* renale attraverso il legame non specifico alle proteine del plasma [175-177]. Tuttavia, non sono disponibili precisi dati farmacocinetici e di biodistribuzione che paragonino gli aptameri non modificati a quelli modificati con legami fosforotioato [178].

Per eludere la filtrazione renale ed estendere il tempo di circolazione nel flusso sanguigno si utilizzano diversi metodi inclusi il legame dell'estremità 3' con biotina, streptavidina, timidina invertita, or varie modifiche all'estremità 5' (ammina, fosfato, PEG, colesterolo, acidi grassi e proteine) che possono anche proteggere gli

aptameri dall'azione delle esonucleasi. Dopo tali modifiche, l'emivita degli aptameri può essere facilmente estesa da pochi minuti ad alcuni giorni o perfino settimane. Una delle strategie più comunemente utilizzate a tale scopo è la coniugazione con porzioni ingombranti in modo che le dimensioni degli aptameri superino il limite soglia di massa molecolare dei glomeruli renali pari a circa 30-50 KDa. Il glicole polietilenico (PEG) è il più utilizzato, tuttavia, sono da considerare anche la coniugazione con il colesterolo, con liposomi [179-181], con proteine [182,183], con dendrimeri [184], con nanoparticelle organiche e inorganiche [185,186]. Un'ulteriore strategia prevede degli aptameri multimerizzati ossia molecole polivalenti con una massa superiore al limite soglia dei glomeruli renali [187-189].

- Tra le modifiche chimiche apportate agli aptameri con l'obiettivo di migliorare la clearance renale, la strategia indubbiamente più nota e più comunemente utilizzata è rappresentata dall'aggiunta all'estremità 5' del glicole polietilenico (PEG), un polimero di circa 40KDa [190,191] (Figura 20). Il PEG è un polimero anfifilico, non tossico che riduce l'aggregazione ed incrementa la solubilità dei coniugati. È stato ampiamente usato in numerose formulazioni per prolungare il tempo di circolazione ed incrementare la biodisponibilità *in vivo* dei farmaci, limitando il tasso di filtrazione ed estendendo l'emivita fino a 24-48 h [192,193]. Gli aptameri privi di tale porzione, vengono rapidamente filtrati con un'emivita di pochi minuti [194,195]. Sebbene il rallentamento della filtrazione renale possa essere ottenuto anche mediante l'aggiunta di porzioni idrofobiche quali colesterolo o lipidi diacetilati, in realtà, il PEG ha dimostrato di essere l'approccio maggiormente utilizzato rallentando la *clearance* da 3 a 50 h in relazione alle dimensioni di PEG. Il Pegaptanib (o Macugen) è indubbiamente il miglior esempio di aptamero PEGilato. In esso, l'aggiunta all'estremità 5' dell'unità PEG di 40 KDa ha notevolmente incrementato il tempo di permanenza in circolo, l'emivita plasmatica e l'inibizione

della perdita vascolare sebbene a spese di un lieve decremento (4 volte) nell'affinità di legame. Questo esempio illustra chiaramente che la scelta del peso molecolare del PEG è un parametro cruciale ed è il risultato di un compromesso tra un'alterazione delle proprietà farmacocinetiche, una ridotta affinità di legame per il target e dei tempi di permanenza *in vivo* migliorati.

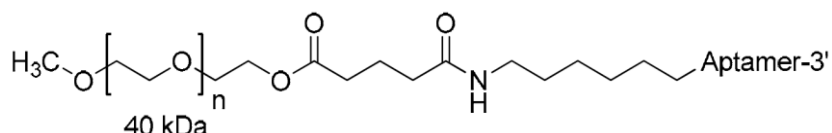


Fig. 20: Esempio di coniugazione all'estremità 5' con il glicole polietilenico (PEG)

- Il colesterolo può essere derivatizzato all'estremità 5' di un aptamero per formare un coniugato colesterolo-oligonucleotide (cholODN) (Figura 21). Gli aptameri coniugati al colesterolo non mostrano tossicità né *in vitro* né *in vivo*, non inducono alcuna alterazione nella risposta immunitaria innata, non influenzano la vitalità cellulare e la somministrazione risulta ben tollerata nei modelli animali. Mostrano dose dipendenza, risultano più resistenti alle nucleasi e hanno un tasso di clearance circa 9 volte più basso rispetto agli aptameri non modificati [196]. Tuttavia la riduzione della clearance renale appare inferiore a quella ottenuta utilizzando il PEG.

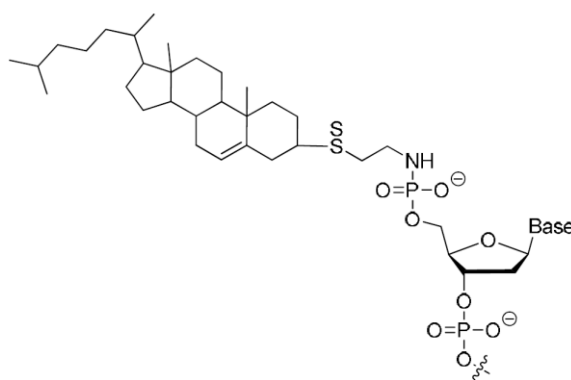


Figura 21: Il colesterolo può essere derivatizzato all'estremità 5' di un aptamero per formare un coniugato colesterolo-oligonucleotide.

- Willis ed altri hanno riportato la preparazione e le proprietà funzionali dell'aptamero (resistente alle nucleasi) che lega il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) dopo averlo collegato ad un liposoma a doppio strato (*liposome bilayers*) attraverso un gruppo lipidico. Paragonato a quello originale, il risultante aptamero ha mantenuto l'alta affinità di legame al VEGF mentre il tempo di permanenza nel plasma (biodisponibilità) è considerevolmente aumentato [197]. Utilizzando il metodo del fosforamidito in fase solida, essi hanno preparato l'aptamero legante VEGF modificato con il dialchilglicerolo (DAG) in cui 2 catene idrocarburiche sature non ramificate a 18 atomi di C sono legate attraverso un *linker* rappresentato dal glicole tetraetilenico. Il fosforamidito DAG viene sintetizzato in 7 step ed è poi introdotto all'estremità 5' dell'aptamero (Figura 22). In seguito, l'aptamero modificato con il DAG è incorporato nel liposoma a doppio strato dando luogo ad un aptamero che mostra *in vitro* una migliore attività inibitoria della proliferazione cellulare indotta da VEGF mentre *in vivo* mostra un incremento della permeabilità vascolare [198].

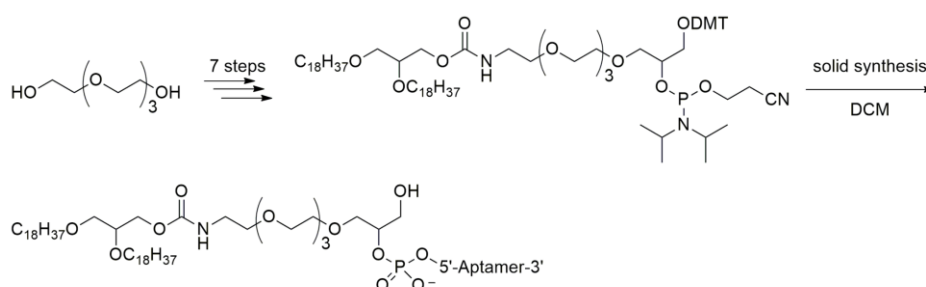


Figura 22. Schema di sintesi dell'aptamero legante VEGF modificato con il dialchilglicerolo (DAG)

#### 1.4.2.4 Modifiche volte a migliorare l'affinità di legame e la selettività verso il target

- L'ottenimento di aptameri con più alta affinità e con una più lenta velocità di dissociazione del complesso può essere realizzato mediante l'aggiunta di gruppi in grado di formare legami reversibili o irreversibili. La posizione 5 delle pirimidine e

la posizione 8 delle purine possono essere modificate mediante l'introduzione di un'ampia varietà di gruppi: idrofilici, idrofobici, dotati di carica e perfino gruppi che hanno una nota affinità con il target (Figura 23). Ad esempio si può introdurre un gruppo carico positivamente se si è in presenza di un target contenente gruppi acidi e similmente un gruppo idrofobico per target con gruppi idrofobici. Tuttavia, prima di scegliere le funzionalità da introdurre è necessario conoscere i siti del target in contatto con l'aptamero. Tali dati possono essere ottenuti mediante *footprinting* chimico tradizionale, mediante spettroscopia NMR o cristallografia ai raggi-X. Lee ed altri hanno introdotto il derivato 5-(N-benzilcarbossiammide)-dUTP (abbreviato come 5-BzdU) nell'aptamero AS1411 che lega specificamente la proteina nucleolina espressa nelle cellule cancerose. I risultati hanno mostrato un'affinità più alta di circa 2.5 volte per le cellule cancerose ma nessuna attività significativa per le cellule normali sane [199].

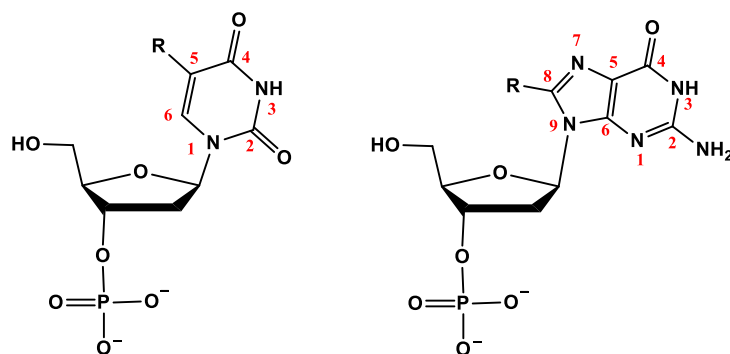


Figura 23. Posizioni modificabili sull'anello pirimidinico e purinico, rispettivamente 5 e 8.

- Modifiche basate sulla struttura cristallina. Da pochi anni sono in corso molti studi sulla cristallizzazione e sull'analisi per diffrazione ai raggi X di aptameri o di complessi aptamero-enzima [200-203]. Le informazioni strutturali che ne derivano consentono di modificare con successo gli aptameri confermando che si tratta di un metodo efficace per lo sviluppo di aptameri dotati di più alta affinità e selettività.

- Ottimizzazione degli aptameri basata sulla spettroscopia NMR. Informazioni strutturali ad alta risoluzione dei complessi aptamero-ligando aiutano nel rilevare gli aspetti fondamentali del ripiegamento degli acidi nucleici e dell'interazione tra un acido nucleico e una piccola molecola. Informazioni strutturali degli aptameri e dei complessi aptamero-ligando costituiscono il punto di partenza per le modifiche chimiche dirette a migliorarne la funzione.

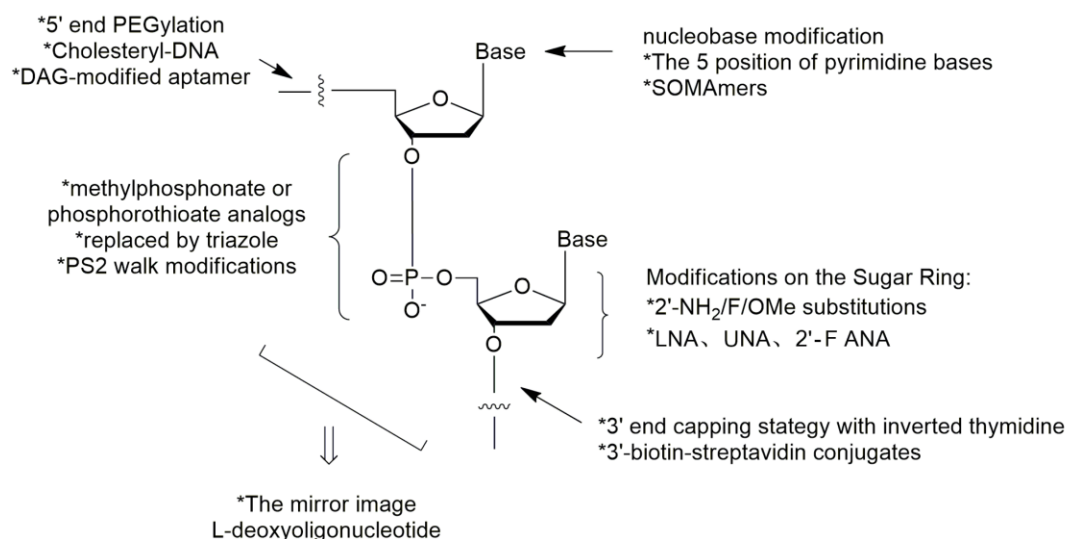


Figura 24. Riassunto delle modifiche chimiche apportabili agli acidi nucleici aptamerici

In figura 24 sono riportate le principali modifiche di cui abbiamo sopra discusso e i siti potenzialmente interessati. Molte altre modifiche sono possibili e molti altri studi sono richiesti per caratterizzare e valutare gli effetti stabilizzanti di ciascuna modifica e delle future strategie di ottimizzazione.

### 1.4.3 Tossicità associata alle modifiche

Le modifiche chimiche hanno dimostrato di essere un'arma a doppio taglio in quanto gli aptameri modificati, oltre a migliorare alcune caratteristiche, possono

anche causare effetti tossici e risultare immunogenici. Ad esempio, negli acidi nucleici modificati con LNA è stata osservata una grave epatotossicità [204].

Gli aptameri sono molecole di sintesi ed alcune sequenze possono interagire coi pattern dei recettori del sistema immunitario (PRR). Gli aptameri contenenti CpG in sequenza possono incrementare la produzione di alcune citochine antinfiammatorie e regolare i geni legati all'immunità. Inoltre, gli aptameri a RNA possono indurre delle risposte immunitarie controllando l'attivazione dei PRR. Per esempio, gli aptameri a RNA contenenti residui 2'-F pirimidinici possono incrementare l'attività del gene 1 inducibile dall'acido retinoico (RIG-1) ed aumentare la morte cellulare e l'espressione dell'interferone- $\beta$  nelle cellule cancerose umane, rispetto agli aptameri non modificati. Un dato interessante è che gli aptameri a RNA che contengono residui 2'-O-metil pirimidinici non riescono ad indurre una risposta immunitaria paragonabile a quella ottenuta con residui 2'-F pirimidinici.

Molecole altamente lipofile spesso portano ad un assorbimento non specifico da parte del fegato che può scatenare una potenziale epatotossicità [205]. Effetti avversi possono essere anche associati alle formulazioni: nella fase 3 di studio del farmaco REG1, sono state riscontrate serie risposte allergiche al gruppo PEG a causa della presenza di preesistenti anticorpi contro tale gruppo; questo ha sollevato problemi di sicurezza riguardanti l'uso di agenti PEGilati in pazienti con malattie acute [206,207]. Per tali ragioni, le modifiche devono essere impiegate con cautela e sono necessari modelli standardizzati *in vitro* e *in vivo* per valutare la tossicità e l'immunogenicità degli aptameri prima che siano sottoposti a valutazione clinica.



## **Bibliografía**

- [1] Venter, J. C. *et al.* The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304–1351 (2001).
- [2] Lander, E. S. *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860–921 (2001).
- [3] Doudna, J. A. & Cech, T. R. The chemical repertoire of natural ribozymes. *Nature* **418**, 222–228 (2002).
- [4] Sonenberg, N. & Hinnebusch, A. G. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* **136**, 731–745 (2009).
- [5] Zovoilis, A., Cifuentes-Rojas, C., Chu, H. P., Hernandez, A. J. & Lee, J. T. Destabilization of B2 RNA by EZH2 activates the stress response. *Cell* **167**, 1788–1802 (2016).
- [6] Moore, P. B. & Steitz, T. A. The involvement of RNA in ribosome function. *Nature* **418**, 229–235 (2002).
- [7] A. D. Ellington and J. W. Szostak, “*In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands,” *Nature*, vol. 346, no. 6287, pp. 818–822, 1990.
- [8] D. H. J. Bunka and P. G. Stockley, “Aptamers come of age—at last,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 4, no. 8, pp. 588–596, 2006.
- [9] C. Tuerk and L. Gold, “Systemic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase,” *Science*, vol. 249, no. 4968, pp. 505–510, 1990.
- [10] Robertson, D. L. & Joyce, G. F. Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature* **344**, 467–468 (1990).
- [11] Wilson, D. S. & Szostak, J. W. In vitro selection of functional nucleic acids. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 611–647 (1999).
- [12] Szostak, J. W. In vitro genetics. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 89–93 (1992).
- [13] Joyce, G. F. *In vitro* evolution of nucleic acids. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 331–336 (1994).
- [14] M.M. Vu, N.E. Jameson, S.J. Masuda, D. Lin, R. Larralde-Ridaaura, A. Lupták, Convergent evolution of adenosine aptamers spanning bacterial, human, and random sequences revealed by structure-based bioinformatics and genomic SELEX, *Chem. Biol.* **19** (2012) 1247–1254.
- [15] Y. Fujimoto, Y. Nakamura, S. Ohuchi, HEXIM1-binding elements on mRNAs identified through transcriptomic SELEX and computational screening, *Biochimie* **94** (2012) 1900–1909.
- [16] M. Blind, M. Blank, Aptamer selection technology and recent advances, *Mol. Ther.–Nucleic Acids* **4** (2015) 7.
- [17] R. Knight, M. Yarus, Analyzing partially randomized nucleic acid pools: straight dope on doping, *Nucleic Acids Res.* **31** (2003) 9.
- [18] T.E. Velez, J. Singh, Y. Xiao, E.C. Allen, O.Y. Wong, M. Chandra, S.C. Kwon, S.K. Silverman, Systematic evaluation of the dependence of deoxyribozyme catalysis on random region length, *ACS Comb. Sci.* **14** (2012) 680–687.
- [19] Y.S. Kwon, N.H.A. Raston, M.B. Gu, An ultra-sensitive colorimetric detection of tetracyclines using the shortest aptamer with highly enhanced affinity, *Chem. Commun.* **50** (2014) 40–42.

- [20] Y.F. Li, C.R. Geyer, D. Sen, Recognition of anionic porphyrins by DNA aptamers, *Biochemistry* 35 (1996) 6911–6922.
- [21] Ellington, A. D. & Szostak, J. W. Selection *in vitro* of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. *Nature* 355, 850–852 (1992).
- [22] Kulbachinskiy, A. V. Methods for selection of aptamers to protein targets. *Biochemistry (Mosc.)* 72, 1505–1518 (2007).
- [23] S.C. Gopinath, Methods developed for SELEX, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 171–182.
- [24] Marimuthu, C.; Tang, T.H.; Tominaga, J.; Tan, S.C.; Gopinath, S.C. Single-stranded DNA (ssDNA) production in DNA aptamer generation. *Analyst* 2012, 137, 1307–1315.
- [25] Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B. SELEX — a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol Eng* 2007;24(4):381–403. [Oct].
- [26] Mosing RK, Mendonsa SD, Bowser MT. Capillary electrophoresis-SELEX selection of aptamers with affinity for HIV-1 reverse transcriptase. *Anal Chem* 2005;77(19): 6107–12. [Oct 1].
- [27] Ruckman J, Green LS, Beeson J, Waugh S, Gillette WL, Henninger DD, et al. 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. *J Biol Chem* 1998;273(32):20556–67. [Aug 7].
- [28] Kang, S.; Hah, S.S. Improved ligand binding by antibody-aptamer pincers. *Bioconjug. Chem.* 2014, 25, 1421–1427.
- [29] Darmostuk, M.; Rimpelova, S.; Gbelcova, H.; Ruml, T. Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. *Biotechnol. Adv.* 2015, 33, 1141–1161.
- [30] Geiger, A., Burgstaller, P., von der Eltz, H., Roeder, A. & Famulok, M. RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity. *Nucleic Acids Res.* 24, 1029–1036 (1996).
- [31] Jenison, R. D., Gill, S. C., Pardi, A. & Polisky, B. High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science* 263, 1425–1429 (1994).
- [32] Nimjee, S. M., Rusconi, C. P. & Sullenger, B. A. Aptamers: an emerging class of therapeutics. *Annu. Rev. Med.* 56, 555–583 (2005).
- [33] Pestourie, C. et al. Comparison of different strategies to select aptamers against a transmembrane protein target. *Oligonucleotides* 16, 323–335 (2006).
- [34] Ara, M.N.; Hyodo, M.; Ohga, N.; Hida, K.; Harashima, H. Development of a novel DNA aptamer ligand targeting to primary cultured tumor endothelial cells by a cell-based SELEX method. *PLoS ONE* 2012, 7, e50174.
- [35] Wang, Y.; Luo, Y.; Bing, T.; Chen, Z.; Lu, M.; Zhang, N.; Shangguan, D.; Gao, X. DNA aptamer evolved by cell-SELEX for recognition of prostate cancer. *PLoS ONE* 2014, 9, e100243.
- [36] Meyer, S.; Maufort, J.P.; Nie, J.; Stewart, R.; McIntosh, B.E.; Conti, L.R.; Ahmad, K.M.; Soh, H.T.; Thomson, J.A. Development of an efficient targeted cell-SELEX procedure for DNA aptamer reagents. *PLoS ONE* 2013, 8, e71798.
- [37] G. Mayer, M.S. Ahmed, A. Dolf, E. Endl, P.A. Knolle, M. Famulok, Fluorescenceactivated cell sorting for aptamer SELEX with cell mixtures, *Nat. Protoc.* 5 (2010) 1993–2004.

- [38] Mi, J. et al. In vivo selection of tumor-targeting RNA motifs. *Nat. Chem. Biol.* 6, 22–24 (2010). The first published RNA aptamers in vivo isolated from mice bearing liver tumours. The target protein of the selected aptamer is p68, an RNA helicase.
- [39] Drabovich, A. P., Berezovski, M., Okhonin, V. & Krylov, S. N. Selection of smart aptamers by methods of kinetic capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 78, 3171–3178 (2006).
- [40] Yufa, R. et al. Emulsion PCR significantly improves nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures-based aptamer selection: allowing for efficient and rapid selection of aptamer to unmodified ABH2 protein. *Anal. Chem.* 87, 1411–1419 (2015).
- [41] Mosing, R. K., Mendonsa, S. D. & Bowser, M. T. Capillary electrophoresis-SELEX selection of aptamers with affinity for HIV-1 reverse transcriptase. *Anal. Chem.* 77, 6107–6112 (2005).
- [42] Miyachi, Y., Shimizu, N., Ogino, C. & Kondo, A. Selection of DNA aptamers using atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res.* 38, e21 (2010).
- [43] Peng, L., Stephens, B. J., Bonin, K., Cubicciotti, R. & Guthold, M. A combined atomic force/fluorescence microscopy technique to select aptamers in a single cycle from a small pool of random oligonucleotides. *Microsc. Res. Tech.* 70, 372–381 (2007).
- [44] Raddatz, M. S. et al. Enrichment of cell-targeting and population-specific aptamers by fluorescence-activated cell sorting. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 5190–5193 (2008).
- [45] Mayer, G. et al. Fluorescence-activated cell sorting for aptamer SELEX with cell mixtures. *Nat. Protoc.* 5, 1993–2004 (2010).
- [46] Huang, C. J., Lin, H. I., Shiesh, S. C. & Lee, G. B. Integrated microfluidic system for rapid screening of CRP aptamers utilizing systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). *Biosens. Bioelectron.* 25, 1761–1766 (2010).
- [47] Cho, M. et al. Quantitative selection of DNA aptamers through microfluidic selection and highthroughput sequencing. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 15373–15378 (2010).
- [48] Sook Bang G, Cho S, Lee N, Lee BR, Kim JH, Kim BG. Rational design of modular allosteric aptamer sensor for label-free protein detection. *Biosens Bioelectron* 2013;39(1): 44–50 [Jan 15].
- [49] Umehara T, Fukuda K, Nishikawa F, Kohara M, Hasegawa T, Nishikawa S. Rational design of dual-functional aptamers that inhibit the protease and helicase activities of HCV NS3. *J Biochem* 2005;137(3):339–47. [Mar].
- [50] Barciszewski, J.; Clark, B.F.C. *RNA Biochemistry and Biotechnology*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2012.
- [51] Adler, A.; Forster, N.; Homann, M.; Goring, H.U. Post-SELEX chemical optimization of a trypanosome-specific RNA aptamer. *Comb. Chem. High Throughput Screening* 2008, 11, 16–23.
- [52] Wilson, C.; Keefe, A.D. Building oligonucleotide therapeutics using non-natural chemistries. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2006, 10, 607–614.
- [53] Zhu, Q.; Shibata, T.; Kabashima, T.; Kai, M. Inhibition of HIV-1 protease expression in T cells owing to DNA aptamer-mediated specific delivery of siRNA. *Eur. J. Med. Chem.* 2012, 56, 396–399.
- [54] Wilson, D.S.; Szostak, J.W. In vitro selection of functional nucleic acids. *Annu. Rev. Biochem.* 1999, 68, 611–647.

- [55] Bock, L.C.; Griffin, L.C.; Latham, J.A.; Vermaas, E.H.; Toole, J.J. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature* 1992, 355, 564–566.
- [56] Hernandez, L.I.; Machado, I.; Schafer, T.; Hernandez, F.J. Aptamers Overview: Selection, Features and Applications. *Curr. Top. Med. Chem.* 2015, 15, 1066–1081.
- [57] Fohrer, J.; Hennig, M.; Carlomagno, T. Influence of the 21-hydroxyl group conformation on the stability of A-form helices in RNA. *J. Mol. Biol.* 2006, 356, 280–287.
- [58] Schneider, B.; Morávek, Z.; Berman, H.M. RNA conformational classes. *Nucleic Acids Res.* 2004, 32, 1666–1677.
- [59] Sun, H.; Zhu, X.; Lu, P.Y.; Rosato, R.R.; Tan, W.; Zu, Y. Oligonucleotide Aptamers: New Tools for Targeted Cancer Therapy. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 2014, 3, e182.
- [60] Mayer, G. The chemical biology of aptamers. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 2672–2689 (2009).
- [61] Gelinas, A. D., Davies, D. R. & Janjic, N. Embracing proteins: structural themes in aptamer–protein complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 36, 122–132 (2016).
- [62] Gold, L. Oligonucleotides as research, diagnostic, and therapeutic agents. *J. Biol. Chem.* 270, 13581–13584 (1995).
- [63] Geiger, A., Burgstaller, P., von der Eltz, H., Roeder, A. & Famulok, M. RNA aptamers that bind L arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity. *Nucleic Acids Res.* 24, 1029–1036 (1996).
- [64] Sassanfar, M. & Szostak, J. W. An RNA motif that binds ATP. *Nature* 364, 550–553 (1993).
- [65] Chen, L. et al. The isolation of an RNA aptamer targeting to p53 protein with single amino acid mutation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 112, 10002–10007 (2015). The first published RNA aptamer specific to a single-amino-acid mutation.
- [66] Rusconi, C. P. et al. Antidote-mediated control of an anticoagulant aptamer in vivo. *Nat. Biotechnol* 22, 1423–1428 (2004).
- [67] Keefe, A. D., Pai, S. & Ellington, A. D. Aptamers as therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 537–550 (2010).
- [68] Nimjee, S. M., Rusconi, C. P. & Sullenger, B. A. Aptamers: an emerging class of therapeutics. *Annu. Rev. Med.* 56, 555–583 (2005).
- [69] C. E. Tucker, L. Chen, M. B. Judkins, J. A. Farmer, S. C. Gill, and D. W. Drolet, “Detection and plasma pharmacokinetics of an anti-vascular endothelial growth factor oligonucleotide aptamer (NX1838) in rhesus monkeys,” *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, vol. 732, no. 1, pp. 203–212, 1999.
- [70] F.C. Richardson, B. C. Tennant, D. J. Meyer et al., “Anevaluation of the toxicities of 2<sup>3</sup>-fluorouridine and 2<sup>3</sup>- fluorocytidine-HCl in F344 rats and woodchucks (*Marmota monax*),” *Toxicologic Pathology*, vol. 27, no. 6, pp. 607–617, 1999.
- [71] P. S. ShannonPendergrast, H. N. NicholasMarsh, D. Grate, J.M. Healy, and M. Stanton, “Nucleic acid aptamers for target validation and therapeutic applications,” *Journal of Biomolecular Techniques*, vol. 16, no. 3, pp. 224–234, 2005.
- [72] Keefe, A.D.; Pai, S.; Ellington, A. Aptamers as therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, 9, 537–550.
- [73] Marx, V. Finding the right antibody for the job. *Nat. Methods* **10**, 703–707 (2013).

- [74] Jayasena, S.D. Aptamers: An emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin. Chem.* **1999**, *45*, 1628–1650.
- [75] Zhou, J. & Rossi, J. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 181–202 (2017).
- [76] C. Tuerk, L. Gold, *Nucleic Acid Ligands*, 1991.
- [77] L.C. Griffin, G.F. Tidmarsh, L.C. Bock, J.J. Toole, L.L.K. Leung, In vivo anticoagulant properties of a novel nucleotide-based thrombin inhibitor and demonstration of regional anticoagulation in extracorporeal circuits, *Blood* **81** (1993) 3271–3276.
- [78] N.C. Pagnatis, C. Bell, Y.F. Chang, S. Jennings, T. Fitzwater, D. Jellinek, C. Dang, Potent 2'-amino-, and 2'-fluoro-2'-deoxyribonucleotide RNA inhibitors of keratinocyte growth factor, *Nat. Biotechnol.* **15** (1997) 68–73.
- [79] K. Matsunaga, M. Kimoto, C. Hanson, M. Sanford, H.A. Young, I. Hirao, Architecture of high-affinity unnatural-base DNA aptamers toward pharmaceutical applications, *Sci. Rep.* **5** (2015) 7.
- [80] R.W. Harkness, S. Slavkovic, P.E. Johnson, A.K. Mittermaier, Rapid characterization of folding and binding interactions with thermolabile ligands by DSC, *Chem. Commun.* **52** (2016) 13471–13474.
- [81] A.A. Shoara, O. Reinstein, O.A. Borhani, T.R. Martin, S. Slavkovic, Z.R. Churcher, P.E. Johnson, Development of a thermal-stable structure-switching cocaine-binding aptamer, *Biochimie* (2017) <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.1008.1010>.
- [82] O. Reinstein, M. Yoo, C. Han, T. Palmo, S.A. Beckham, M.C.J. Wilce, P.E. Johnson, Quinine binding by the cocaine-binding aptamer. Thermodynamic and hydrodynamic analysis of high-affinity binding of an off-target ligand, *Biochemistry* **52** (2013) 8652–8662.
- [83] Choi, D. Y. et al. Sustained elevated intraocular pressures after intravitreal injection of bevacizumab, ranibizumab, and pegaptanib. *Retina* **31**, 1028–1035 (2011).
- [84] Steffensmeier, A. C., Azar, A. E., Fuller, J. J., Muller, B. A. & Russell, S. R. Vitreous injections of pegaptanib sodium triggering allergic reactions. *Am.J. Ophthalmol.* **143**, 512–513 (2007).
- [85] Agrawal, S., Joshi, M. & Christoforidis, J. B. Vitreous inflammation associated with intravitreal anti-VEGF pharmacotherapy. *Mediators Inflamm.* **2013**, 943409 (2013).
- [86] Falavarjani, K. G. & Nguyen, Q. D. Adverse events and complications associated with intravitreal injection of anti-VEGF agents: a review of literature. *Eye (Lond.)* **27**, 787–794 (2013).
- [87] Boyer, D. S., Goldbaum, M., Leys, A. M., Starita, C. & V.I.S.I.O.N. Study Group. Effect of pegaptanib sodium 0.3 mg intravitreal injections (Macugen) in intraocular pressure: posthoc analysis from V.I.S.I.O.N. study. *Br. J. Ophthalmol.* **98**, 1543–1546 (2014).
- [88] Henry, S. P. et al. Activation of the alternative pathway of complement by a phosphorothioate oligonucleotide: potential mechanism of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **281**, 810–816 (1997).
- [89] Farman, C. A. & Kornbrust, D. J. Oligodeoxynucleotide studies in primates: antisense and immune stimulatory indications. *Toxicol. Pathol.* **31**, S119–S122 (2003).

- [90] I. Hirao, M. Kimoto, K.H. Lee, DNA aptamer generation by ExSELEX using genetic alphabet expansion with amini-hairpin DNA stabilization method, *Biochimie* (2017) <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.1009.1007>.
- [91] A.D. Gelinias, D.R. Davies, T.E. Edwards, J.C. Rohloff, J.D. Carter, C. Zhang, S. Gupta, Y. Ishikawa, M. Hirota, Y. Nakaishi, T.C. Jarvis, N. Janjic, Crystal structure of interleukin-6 in complex with a modified nucleic acid ligand, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 8720–8734.
- [92] M.Y. Li, N. Lin, Z. Huang, L.P. Du, C. Altier, H. Fang, B.H. Wang, Selecting aptamers for a glycoprotein through the incorporation of the boronic acid moiety, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) (12636–+).
- [93] J.H. Zhou, J. Rossi, Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges, *Nat. Rev. Drug Discov.* 16 (2017) 181–202.
- [94] Radom F, Jurek PM, Mazurek MP, Otlewski J, Jelen F. Aptamers: molecules of great potential. *Biotechnol Adv.* 2013;31(8):1260–74.
- [95] Bunka DH, Platonova O, Stockley PG. Development of aptamer therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* 2010;10(5):557–62. [Oct].
- [96] Ng, E. W. et al. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 123–132 (2006).
- [97] Esposito CL, Catuogno S, de F V, Cerchia L. New insight into clinical development of nucleic acid aptamers. *Discov Med* 2011;11(61):487–96. [Jun].
- [98] Dollins CM, Nair S, Boczkowski D, Lee J, Layzer JM, Gilboa E, et al. Assembling OX40 aptamers on a molecular scaffold to create a receptor-activating aptamer. *Chem Biol* 2008;15(7):675–82. [Jul 21].
- [99] McNamara JO, Kolonias D, Pastor F, Mittler RS, Chen L, Giangrande PH, et al. Multivalent 4-1BB binding aptamers costimulate CD8+ T cells and inhibit tumor growth in mice. *J Clin Invest* 2008;118(1):376–86. [Jan].
- [100] Zhou, J. & Rossi, J. J. Cell-type-specific, aptamerfunctionalized agents for targeted disease therapy. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 3, e169 (2014).
- [101] Drolet, D. W., Green, L. S., Gold, L. & Janjic, N. Fit for the eye: aptamers in ocular disorders. *Nucleic Acid Ther.* 26, 127–146 (2016). A comprehensive review about the development and current progress of three aptamers in ophthalmology.
- [102] Kohler, G.; Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975, 256, 495–497.
- [103] G.S. Baird, Where are all the aptamers?, *Am J. Clin. Pathol.* 134 (2010) 529–531.
- [104] M.T. Bowser, SELEX: just another separation?, *Analyst* 130 (2005) 128–130
- [105] Dass, CR, Saravolac, EG, Li, Y and Sun, LQ (2002). Cellular uptake, distribution, and stability of 10-23 deoxyribozymes. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 12: 289–299.
- [106] Morrissey, DV, Blanchard, K, Shaw, L, Jensen, K, Lockridge, JA, Dickinson, B et al. (2005). Activity of stabilized short interfering RNA in a mouse model of hepatitis B virus replication. *Hepatology* 41: 1349–1356.
- [107] Manoharan, M, Akinc, A, Pandey, RK, Qin, J, Hadwiger, P, John, M et al. (2011). Unique gene-silencing and structural properties of 2'-fluoro-modified siRNAs. *Angew Chem Int Ed Engl* 50: 2284–2288.

- [108] Cekaite, L, Furset, G, Hovig, E and Sioud, M (2007). Gene expression analysis in blood cells in response to unmodified and 2'-modified siRNAs reveals TLR-dependent and independent effects. *J Mol Biol* 365: 90–108.
- [109] Judge, AD, Bola, G, Lee, AC and MacLachlan, I (2006). Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. *Mol Ther* 13: 494–505.
- [110] S. Diafa, M. Hollenstein, Generation of aptamers with an expanded chemical repertoire, *Molecules* 20 (2015) 16643–16671.
- [111] T. Chen, N. Hongdilokkul, Z.X. Liu, D. Thirunavukarasu, F.E. Romesberg, The expanding world of DNA and RNA, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 34 (2016) 80–87.
- [112] S.M. Nimjee, R.R. White, R.C. Becker, B.A. Sullenger, Aptamers as therapeutics, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 57 (2017) 61–79.
- [113] F. Pfeiffert, M. Rosenthal, J. Siegl, J. Ewers, G. Mayer, Customised nucleic acid libraries selection for enhanced aptamer and performance, *Curr. Opin. Biotechnol.* 48 (2017) 111–118.
- [114] J. Aschenbrenner, A. Marx, DNA polymerases and biotechnological applications, *Curr. Opin. Biotechnol.* 48 (2017) 187–195.
- [115] Jager, S. et al. A versatile toolbox for variable DNA functionalization at high density. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 15071–15082 (2005).
- [116] Hirao, I. et al. An unnatural hydrophobic base pair system: site-specific incorporation of nucleotide analogs into DNA and RNA. *Nat. Methods* 3, 729–735 (2006).
- [117] Eaton, B. E. et al. Post-SELEX combinatorial optimization of aptamers. *Bioorg. Med. Chem.* 5, 1087–1096 (1997).
- [118] S.J. Ni, H.Z. Yao, L.L. Wang, J. Lu, F. Jiang, A.P. Lu, G. Zhang, Chemical modifications of nucleic acid aptamers for therapeutic purposes, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 21.
- [119] M. Taskova, A. Mantsiou, K. Astakhova, Synthetic nucleic acid analogues in gene therapy: an update for peptide-oligonucleotide conjugates, *ChemBiochem* 18 (2017) 1671–1682.
- [120] S. Roy, M. Caruthers, Synthesis of DNA/RNA and their analogs via phosphoramidite and H-phosphonate chemistries, *Molecules* 18 (2013) 14268–14284.
- [121] Lee, Y., Urban, J. H., Xu, L., Sullenger, B. A. & Lee, J. 2'-fluoro modification differentially modulates the ability of RNAs to activate pattern recognition receptors. *Nucleic Acid Ther.* 26, 173–182 (2016).
- [122] Aaldering, L. J. et al. Smart functional nucleic acid chimeras: enabling tissue specific RNA targeting therapy. *RNA Biol.* 12, 412–425 (2015).
- [123] Cowperthwaite MC, Ellington AD. Bioinformatic analysis of the contribution of primer sequences to aptamer structures. *JMol Evol.* 2008;67(1):95–102.
- [124] Zheng X, Hu B, Gao SX, Liu DJ, Sun MJ, Jiao BH, et al. Asaxitoxin-binding aptamer with higher affinity and inhibitory activity optimized by rational site-directed mutagenesis and truncation. *Toxicon.* 2015; 101:41–7.
- [125] Gao S, Hu B, Zheng X, Cao Y, Liu D, Sun M, et al. Gonyautoxin 1/4 aptamers with high-affinity and high-specificity: from efficient selection to aptasensor application. *Biosens Bioelectron.* 2016;79: 938–44.

- [126] S. Gao, X. Zheng, B. Jiao, L. Wang, Post-SELEX optimization of aptamers, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 4567–4573.
- [127] H.A. Alhadrami, R. Chinnappan, S. Eissa, A.A. Rahamn, M. Zourob, High affinity truncated DNA aptamers for the development of fluorescence based progesterone biosensors, *Anal. Biochem.* 525 (2017) 78–84.
- [128] W.M. Rockey, F.J. Hernandez, S.Y. Huang, S. Cao, C.A. Howell, G.S. Thomas, X.Y. Liu, N. Lapteva, D.M. Spencer, J.O. McNamara, X. Zou, S.J. Chen, P.H. Giangrande, Rational truncation of an RNA aptamer to prostate-specific membrane antigen using computational structural modeling, *Nucleic Acid Ther.* 21 (2011) 299–314.
- [129] S. Gao, B. Hu, X. Zheng, Y. Cao, D. Liu, M. Sun, B. Jiao, L. Wang, Gonyautoxin  $\gamma$  aptamers with high-affinity and high-specificity: from efficient selection to aptasensor application, *Biosens. Bioelectron.* 79 (2016) 938–944.
- [130] M.C. Cowperthwaite, A.D. Ellington, Bioinformatic analysis of the contribution of primer sequences to aptamer structures, *J. Mol. Evol.* 67 (2008) 95–102.
- [131] Ortigao, J.R.; Rosch, H.; Montenarh, M.; Frohlich, A.; Seliger, H. Oligonucleotide analogs with terminal 30, 30-and 50, 50-internucleotidic linkages as antisense inhibitors of viral replication. *Antisense Res. Dev.* 1991, 1, 380.
- [132] Fine, S.L.; Martin, D.F.; Kirkpatrick, P. Pegaptanib sodium. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005, 4, 187–188.
- [133] Gupta, S.; Hirota, M.; Waugh, S.M.; Murakami, I.; Suzuki, T.; Muraguchi, M.; Shibamori, M.; Ishikawa, Y.; Jarvis, T.C.; Carter, J.D.; et al. Chemically modified DNA aptamers bind interleukin-6 with high affinity and inhibit signaling by blocking its interaction with interleukin-6 receptor. *J. Biol. Chem.* 2014, 289, 8706–8719.
- [134] Shum, K.T.; Tanner, J.A. Differential inhibitory activities and stabilisation of DNA aptamers against the SARS coronavirus helicase. *Chembiochem* 2008, 9, 3037–3045.
- [135] Shaw, J.P.; Kent, K.; Bird, J.; Fishback, J.; Froehler, B. Modified deoxyoligonucleotides stable to exonuclease degradation in serum. *Nucleic Acids Res.* 1991, 19, 747–750.
- [136] Dougan, H.; Lyster, D.M.; Vo, C.V.; Stafford, A.; Weitz, J.I.; Hobbs, J.B. Extending the lifetime of anticoagulant oligodeoxynucleotide aptamers in blood. *Nucl. Med. Biol.* 2000, 27, 289–297.
- [137] Ruckman, J, Green, LS, Beeson, J, Waugh, S, Gillette, WL, Henninger, DD et al. (1998). 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. *J Biol Chem* 273: 20556–20567.
- [138] R. Padilla, R. Sousa, Efficient synthesis of nucleic acids heavily modified with noncanonical ribose 2'-groups using a mutant T7 RNA polymerase (RNAP), *Nucleic Acids Res.* 27 (1999) 1561–1563.
- [139] A. Sabahi, J. Guidry, G.B. Inamati, M. Manoharan, P. Wittung-Stafshede, Hybridization of 2'-ribose modified mixed-sequence oligonucleotides: thermodynamic and kinetic studies, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) 2163–2170.



- [140] F.C. Richardson, C. Zhang, S.R. Lehrman, H. Koc, J.A. Swenberg, K.A. Richardson, R.A. Bendele, Quantification of 2'-fluoro-2'-deoxyuridine and 2'-fluoro-2'- deoxycytidine in DNA and RNA isolated from rats and woodchucks using LC/MS/MS, *Chem. Res. Toxicol.* 15 (2002) 922–926.
- [141] H. Aurup, T. Tuschl, F. Benseler, J. Ludwig, F. Eckstein, Oligonucleotide duplexes containing 2'-amino-2'-deoxycytidines: thermal stability and chemical reactivity, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 20–24.
- [142] Padilla, R.; Sousa, R. Efficient synthesis of nucleic acids heavily modified with non-canonical ribose 20-groups using a mutant T7 RNA polymerase (RNAP). *Nucleic Acids Res.* 1999, 27, 1561–1563.
- [143] Ruckman, J.; Green, L.S.; Beeson, J.; Waugh, S.; Gillette, W.L.; Henninger, D.D.; Claesson-Welsh, L.; Janjic, N. 20-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 20556–20567.
- [144] S.K. Singh, P. Nielsen, A.A. Koshkin, J. Wengel, LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition, *Chem. Commun.* (1998) 455–456.
- [145] S.K. Singh, J. Wengel, Universality of LNA-mediated high-affinity nucleic acid recognition, *Chem. Commun.* (1998) 1247–1248.
- [146] C. Wahlestedt, P. Salmi, L. Good, J. Kela, T. Johnsson, T. Hokfelt, C. Broberger, F. Porreca, J. Lai, K.K. Ren, M. Ossipov, A. Koshkin, N. Jakobsen, J. Skouv, H. Oerum, M.H. Jacobsen, J. Wengel, Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 5633–5638.
- [147] S.Z. Glud, J.B. Bramsen, F. Dagnaes-Hansen, J. Wengel, K.A. Howard, J.R. Nyengaard, J. Kjems, Naked siLNA-mediated gene silencing of lung bronchoepithelium EGFP expression after intravenous administration, *Oligonucleotides* 19 (2009) 163–168.
- [148] K.S. Schmidt, S. Borkowski, J. Kurreck, A.W. Stephens, R. Bald, M. Hecht, M. Friebe, L. Dinkelborg, V.A. Erdmann, Application of locked nucleic acids to improve aptamer in vivo stability and targeting function, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 5757–5765.
- [149] F. Darfeuille, J.B. Hansen, H. Orum, C.D. Primo, J.J. Toulme, LNA/DNA chimeric oligomers mimic RNA aptamers targeted to the TAR RNA element of HIV-1, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 3101–3107.
- [150] Campbell, M.A.; Wengel, J. Locked vs. unlocked nucleic acids (LNA vs. UNA): Contrasting structures work towards common therapeutic goals. *Chem. Soc. Rev.* 2011, 40, 5680–5689.
- [151] A. Pasternak, J. Wengel, Thermodynamics of RNA duplexes modified with unlocked nucleic acid nucleotides, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) 6697–6706.
- [152] Pasternak, A.; Hernandez, F.J.; Rasmussen, L.M.; Vester, B.; Wengel, J. Improved thrombin binding aptamer by incorporation of a single unlocked nucleic acid monomer. *Nucleic Acids Res.* 2011, 39, 1155–1164.
- [153] Peng, C.G.; Damha, M.J. G-quadruplex induced stabilization by 20-deoxy-20-fluoro-D-arabinonucleic acids (20F-ANA). *Nucleic Acids Res.* 2007, 35, 4977–4988.

- [154] Yamamoto T, Nakatani M, Narukawa K, Obika S. Antisense drug discovery and development. *Future Med Chem.* 2011;3(3):339–65.
- [155] T. Iannitti, J.C. Morales-Medina, B. Palmieri, Phosphorothioate oligonucleotides: effectiveness and toxicity, *Curr. Drug Targets* 15 (2014) 663–673.
- [156] King DJ, Ventura DA, Brasier AR, Gorenstein DG. Novel combinatorial selection of phosphorothioate oligonucleotide aptamers. *Biochemistry.* 1998;37(47):16489–93.
- [157] J. Nielsen, W.K.D. Brill, M.H. Caruthers, Nucleotide chemistry 22. Synthesis and characterization of dinucleoside phosphorodithioates, *Tetrahedron Lett.* 29 (1988) 2911–2914.
- [158] Abeydeera, N. D. et al. Evoking picomolar binding in RNA by a single phosphorodithioate linkage. *Nucleic Acids Res.* 44, 8052–8064 (2016).
- [159] El-Sagheer, A.H.; Brown, T. Click chemistry with DNA. *Chem. Soc. Rev.* 2010, 39, 1388–1405.
- [160] Mutisya, D.; Selvam, C.; Kennedy, S.D.; Rozners, E. Synthesis and properties of triazole-linked RNA. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011, 21, 3420–3422.
- [161] Sau, S.P.; Hrdlicka, P.J. C20-pyrene-functionalized triazole-linked DNA: Universal DNA/RNA hybridization probes. *J. Org. Chem.* 2012, 77, 5–16.
- [162] El-Sagheer, A.H.; Brown, T. Click nucleic acid ligation: Applications in biology and nanotechnology. *Acc. Chem. Res.* 2012, 45, 1258–1267.
- [163] Chandrasekhar, S.; Srihari, P.; Nagesh, C.; Kiranmai, N.; Nagesh, N.; Idris, M.M. Synthesis of readily accessible triazole-linked dimer deoxynucleoside phosphoramidite for solid-phase oligonucleotide synthesis. *Synthesis* 2010, 2010, 3710–3714.
- [164] Nuzzi, A.; Massi, A.; Dondoni, A. Model studies toward the synthesis of thymidine oligonucleotides with triazole internucleosidic linkages via iterative Cu(I)-promoted azide–alkyne ligation chemistry. *Mol. Inform.* 2007, 26, 1191–1199.
- [165] Lucas, R.; Zerrouki, R.; Granet, R.; Krausz, P.; Champavier, Y. A rapid efficient microwave-assisted synthesis of a 30,50-pentathymidine by copper (I)-catalyzed [3 + 2] cycloaddition. *Tetrahedron* 2008, 64, 5467–5471.
- [166] Varizhuk, A.M.; Kaluzhny, D.N.; Novikov, R.A.; Chizhov, A.O.; Smirnov, I.P.; Chuvilin, A.N.; Tatarinova, O.N.; Fisunov, G.Y.; Pozmogova, G.E.; Florentiev, V.L. Synthesis of triazole-linked oligonucleotides with high affinity to DNA complements and an analysis of their compatibility with biosystems. *J. Org. Chem.* 2013, 78, 5964–5969.
- [167] Kuwahara, M. & Sugimoto, N. Molecular evolution of functional nucleic acids with chemical modifications. *Molecules* 15, 5423–5444 (2010).
- [168] A. Vater, S. Klussmann, Turningmirror-image oligonucleotides into drugs: the evolution of Spiegelmer therapeutics, *Drug Discov. Today* 20 (2015) 147–155.
- [169] D. Oberthur, J. Achenbach, A. Gabdulkhakov, K. Buchner, C. Maasch, S. Falke, D. Rehders, S. Klussmann, C. Betzel, Crystal structure of a mirror-image L-RNA aptamer (Spiegelmer) in complex with the natural L-protein target CCL2, *Nat. Commun.* 6 (2015) 11.
- [170] B.M. Putzer, M. Solanki, O. Herchenroder, Advances in cancer stem cell targeting: how to strike the evil at its root, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 120 (2017) 89–107.

- [171] Z.M. Wang, W.L. Xu, L. Liu, T.F. Zhu, A synthetic molecular system capable of mirror-image genetic replication and transcription, *Nat. Chem.* 8 (2016) 698–704.
- [172] A. Pech, J. Achenbach, M. Jahnz, S. Schulzchen, F. Jarosch, F. Bordusa, S. Klussmann, A thermostable D-polymerase for mirror-image PCR, *Nucleic Acids Res.* 45 (2017) 3997–4005.
- [173] Hoellenriegel, J.; Zboralski, D.; Maasch, C.; Rosin, N.Y.; Wierda, W.G.; Keating, M.J.; Kruschinski, A.; Burger, J.A. The Spiegelmer NOX-A12, a novel CXCL12 inhibitor, interferes with chronic lymphocytic leukemia cell motility and causes chemosensitization. *Blood* 2014, 123, 1032–1039.
- [174] Vater, A. & Klussmann, S. Toward third-generation aptamers: Spiegelmers and their therapeutic prospects. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 6, 253–261 (2003).
- [175] R.Z. Yu, T.W. Kim, A. Hong, T.A. Watanabe, H.J. Gaus, R.S. Geary, Cross-species pharmacokinetic comparison from mouse to man of a second-generation antisense oligonucleotide, ISIS 301012, targeting human apolipoprotein B-100, *Drug Metab. Dispos.* 35 (2007) 460–468.
- [176] R.S. Geary, D. Norris, R. Yu, C.F. Bennett, Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 87 (2015) 46–51.
- [177] R.L. Juliano, The delivery of therapeutic oligonucleotides, *Nucleic Acids Res.* 44 (2016) 6518–6548.
- [178] S. Gupta, D.W. Drolet, S.K. Wolk, S.M. Waugh, J.C. Rohloff, J.D. Carter, W.S. Mayfield, M.R. Otis, C.R. Fowler, T. Suzuki, M. Hirota, Y. Ishikawa, D.J. Schneider, N. Janjic, Pharmacokinetic properties of DNA aptamers with base modifications, *Nucleic Acid Ther.* 27 (2017) 345–353.
- [179] M.C. Willis, B. Collins, T. Zhang, L.S. Green, D.P. Sebesta, C. Bell, E. Kellogg, S.C. Gill, A. Magallanez, S. Knauer, R.A. Bendele, P.S. Gill, N. Janjic, Liposome anchored vascular endothelial growth factor aptamers, *Bioconjug. Chem.* 9 (1998) 573–582.
- [180] M.N. Ara, T. Matsuda, M. Hyodo, Y. Sakurai, H. Hatakeyama, N. Ohga, K. Hida, H. Harashima, An aptamer ligand based liposomal nanocarrier system that targets tumor endothelial cells, *Biomaterials* 35 (2014) 7110–7120.
- [181] Z.H. Cao, R. Tong, A. Mishra, W.C. Xu, G.C.L. Wong, J.J. Cheng, Y. Lu, Reversible cellspecific drug delivery with aptamer-functionalized liposomes, *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (2009) 6494–6498.
- [182] K. Heo, S.W. Min, H.J. Sung, H.G. Kim, H.J. Kim, Y.H. Kim, B.K. Choi, S. Han, S. Chung, E.S. Lee, J. Chung, I.H. Kim, An aptamer-antibody complex (oligobody) as a novel delivery platform for targeted cancer therapies, *J. Control. Release* 229 (2016) 1–9.
- [183] R.W. Wang, D.Q. Lu, H.R. Bai, C. Jin, G.B. Yan, M. Ye, L.P. Qiu, R.S. Chang, C. Cui, H. Liang, W.H. Tan, Using modified aptamers for site specific protein-aptamer conjugations, *Chem. Sci.* 7 (2016) 2157–2161.
- [184] J. Zhou, B. Soontornworajit, J. Martin, B.A. Sullenger, E. Gilboa, Y. Wang, A hybrid DNA aptamer-dendrimer nanomaterial for targeted cell labeling, *Macromol. Biosci.* 9 (2009) 831–835.

- [185] A. Latorre, C. Posch, Y. Garcimartin, A. Celli, M. Sanlorenzo, I. Vujic, J. Ma, M. Zekhtser, K. Rappersberger, S. Ortiz-Urda, A. Somoza, DNA and aptamer stabilized gold nanoparticles for targeted delivery of anticancer therapeutics, *Nanoscale* 6 (2014) 7436–7442.
- [186] W.J. Niu, X.G. Chen, W.H. Tan, A.S. Veige, N-heterocyclic carbene-gold(I) complexes conjugated to a leukemia-specific DNA aptamer for targeted drug delivery, *Angew. Chem. Int. Ed.* 55 (2016) 8889–8893.
- [187] Musumeci, D. & Montesarchio, D. Polyvalent nucleic acid aptamers and modulation of their activity: a focus on the thrombin binding aptamer. *Pharmacol. Ther.* 136, 202–215 (2012).
- [188] Soule, E. E., Bompiani, K. M., Woodruff, R. S. & Sullenger, B. A. Targeting two coagulation cascade proteases with a bivalent aptamer yields a potent and antidote-controllable anticoagulant. *Nucleic Acid Ther.* 26, 1–9 (2016).
- [189] Kim, Y., Dennis, D. M., Morey, T., Yang, L. & Tan, W. Engineering dendritic aptamer assemblies as superior inhibitors of protein function. *Chem. Asian J.* 5, 56–59 (2010).
- [190] J.M. Healy, S.D. Lewis, M. Kurz, R.M. Boomer, K.M. Thompson, C. Wilson, T.G. McCauley, Pharmacokinetics and biodistribution of novel aptamer compositions, *Pharm. Res.* 21 (2004) 2234–2246.
- [191] R.M. Boomer, S.D. Lewis, J.M. Healy, M. Kurz, C. Wilson, T.G. McCauley, Conjugation to polyethylene glycol polymer promotes aptamer biodistribution to healthy and inflamed tissues, *Oligonucleotides* 15 (2005) 183–195.
- [192] S.R. Watson, Y.F. Chang, D. O'Connell, L. Weigand, S. Ringquist, D.H. Parma, Anti-Lselectin aptamers: binding characteristics, pharmacokinetic parameters, and activity against an intravascular target in vivo, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 10 (2000) 63–75.
- [193] K. Haruta, N. Otaki, M. Nagamine, T. Kayo, A. Sasaki, S. Hiramoto, M. Takahashi, K. Hota, H. Sato, H. Yamazaki, A novel PEGylation method for improving the pharmacokinetic properties of anti-interleukin-17A RNA aptamers, *Nucleic Acid Ther.* 27 (2017) 36–44.
- [194] Healy, JM, Lewis, SD, Kurz, M, Boomer, RM, Thompson, KM, Wilson, C et al. (2004). Pharmacokinetics and biodistribution of novel aptamer compositions. *Pharm Res* 21:2234–2246.
- [195] Watson, SR, Chang, YF, O'Connell, D, Weigand, L, Ringquist, S and Parma, DH (2000). Anti-L-selectin aptamers: binding characteristics, pharmacokinetic parameters, and activity against an intravascular target in vivo. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 10: 63–75.
- [196] Healy, J.M.; Lewis, S.D.; Kurz, M.; Boomer, R.M.; Thompson, K.M.; Wilson, C.; McCauley, T.G. Pharmacokinetics and biodistribution of novel aptamer compositions. *Pharm. Res.* 2004, 21, 2234–2246.
- [197] Willis, M.C.; Collins, B.D.; Zhang, T.; Green, L.S.; Sebesta, D.P.; Bell, C.; Kellogg, E.; Gill, S.C.; Magallanez, A.; Knauer, S.; et al. Liposome-anchored vascular endothelial growth factor aptamers. *Bioconjug. Chem.* 1998, 9, 573–582.
- [198] Green, L.S.; Jellinek, D.; Bell, C.; Beebe, L.A.; Feistner, B.D.; Gill, S.C.; Jucker, F.M.; Janjic, N. Nuclease-resistant nucleic acid ligands to vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Chem. Biol.* 1995, 2, 683–695.

- [199] Lee KY, Kang H, Ryu SH, Lee DS, Lee JH, Kim S. Bioimaging of nucleolin aptamer-containing 5-(N-benzylcarboxyamide)-2'- deoxyuridine more capable of specific binding to targets in cancer cells. *J Biomed Biotechnol.* 2010.
- [200] Forster, C.; Brauer, A.B.; Brode, S.; Schmidt, K.S.; Perbandt, M.; Meyer, A.; Rypniewski, W.; Betzel, C.; Kurreck, J.; Furste, J.P.; et al. Comparative crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of locked nucleic acid and RNA stems of a tenascin C-binding aptamer. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 2006, 62 Pt 7, 665–668.
- [201] Forster, C.; Oberthuer, D.; Gao, J.; Eichert, A.; Quast, F.G.; Betzel, C.; Nitsche, A.; Erdmann, V.A.; Furste, J.P. Crystallization and preliminary X-ray diffraction data of an LNA 7-mer duplex derived from a ricin aptamer. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 2009, 65 Pt 9, 881–885.
- [202] Gelinias, A.D.; Davies, D.R.; Edwards, T.E.; Rohloff, J.C.; Carter, J.D.; Zhang, C.; Gupta, S.; Ishikawa, Y.; Hirota, M.; Nakaishi, Y.; et al. Crystal structure of interleukin-6 in complex with a modified nucleic acid ligand. *J. Biol. Chem.* 2014, 289, 8720–8734.
- [203] Hottin, A.; Marx, A. Structural insights into the processing of nucleobase-modified nucleotides by DNA polymerases. *Acc. Chem. Res.* 2016, 49, 418–427.
- [204] Swayze, E. E. et al. Antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid improve potency but cause significant hepatotoxicity in animals. *Nucleic Acids Res.* 35, 687–700 (2007).
- [205] Waring, M. J. Lipophilicity in drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 5, 235–248 (2010).
- [206] Lincoff, A. M. et al. Effect of the REG1 anticoagulation system versus bivalirudin on outcomes after percutaneous coronary intervention (REGULATE-PCI): a randomised clinical trial. *Lancet* 387, 349–356 (2016).
- [207] Ganson, N. J. et al. Pre-existing anti-polyethylene glycol antibody linked to first-exposure allergic reactions to pegnivacogin, a PEGylated RNA aptamer. *J. Allergy Clin. Immunol.* 137, 1610–1613.e7 (2016).

## CAPITOLO 2: STRUTTURE G-QUADRUPLEX

### 2.1 Caratteristiche strutturali

La forma predominante del DNA nel genoma è la classica struttura a doppia elica di tipo B [1], tuttavia, in dipendenza della sequenza e delle condizioni ambientali, il DNA può adottare un'incredibile varietà di strutture secondarie quali ad esempio strutture *duplex* A, Z, cruciformi, *hairpin*, a tripla elica (*triplex*) e a quadrupla elica (*quadruplex*) (Figura 1).

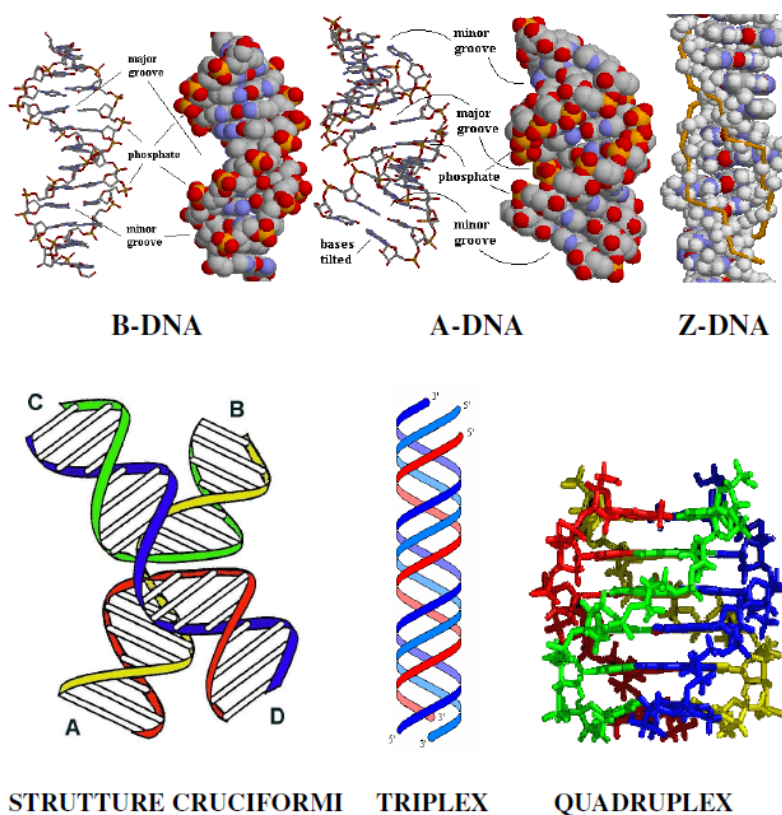


Figura 1. Strutture secondarie del DNA

Le G-quadruplex rappresentano un'inusuale organizzazione secondaria di sequenze di acidi nucleici. Si tratta di strutture a quattro filamenti adottate da sequenze ricche di guanine (G). I "mattoni" alla base della costruzione di tali strutture sono i

quartetti di deossiguanosine (dG) o tetradi di G. Un singolo quartetto di G è una struttura macrociclica planare costituita da 4 guanine che interagiscono tra loro attraverso una serie di legami idrogeno. Ciascuna base guaninica funge allo stesso tempo sia da donatore che da accettore di due legami (legami di tipo Hoogsteen) [2] tra l'N1-H e l'N2-H di una guanina e l'N7 e l'O6 del residuo adiacente (Figura 2). La disposizione quadrata planare crea una cavità centrale cilindrica.

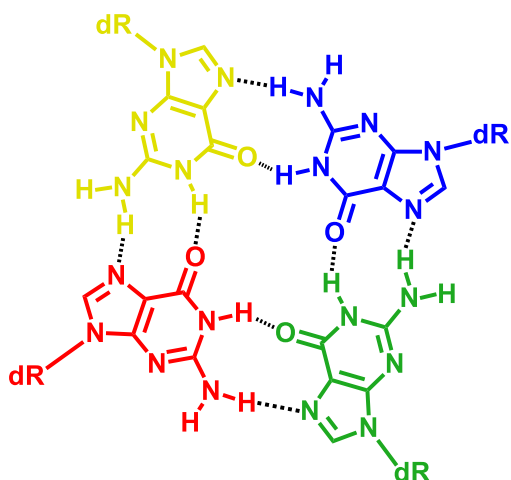


Figura 2. Tetrade di guanine.

Dalla sovrapposizione di due o più tetradi si ottiene una struttura G-quadruplex con un aspetto simile alla doppia elica di DNA, caratterizzata da una torsione d'elica destrorsa, stabilizzata dalla presenza di una serie di tetradi di guanine sovrapposte a una distanza di 3.3 Å l'una dall'altra [3-5]. Al contrario, un importante fattore di instabilità delle quadruplex deriva dalla disposizione degli otto O-6 carbonilici delle guanine rivolti verso il centro della tetrade. La stabilità di tali strutture è pertanto altamente dipendente dalla presenza di cationi che, localizzandosi al centro della tetrade, contribuiscono a diminuire la repulsione elettrostatica generata [6]. Come appena detto la cavità centrale tra due piani di G è delimitata dagli otto ossigeni carbonilici (O-6) che possono partecipare a precisi legami di coordinazione di cationi (Figura 3).

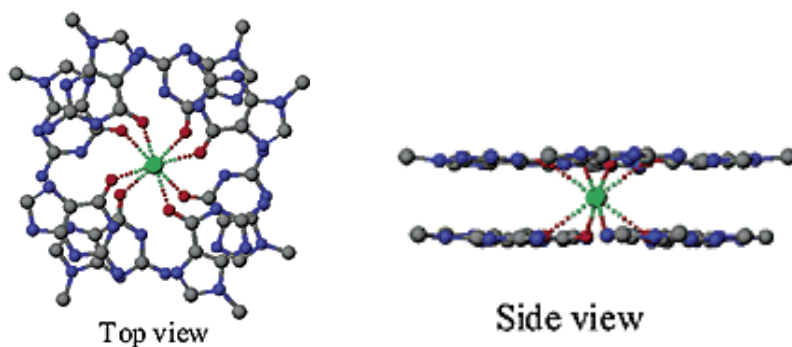


Figura 3. Tetrade di G con catione.

I cationi più efficaci nella stabilizzazione di strutture G-quadruplex sono  $K^+$  e  $Na^+$ ; ciascun controione presenta una precisa geometria di coordinazione, in particolare nel caso di  $K^+$  si osserva una geometria di coordinazione di tipo antipiramidale bipiramidale con il coinvolgimento di due piani di G per un totale di otto ossigeni carbonilici equamente coordinanti il catione centrale [7]. È ormai ben noto che la coordinazione di ioni potassio [8], e più raramente ioni sodio [9] e stronzio [10], aumenta la stabilità di tali strutture sia cineticamente sia termodinamicamente [11]. La capacità del potassio di stabilizzare strutture G-quadruplex è correlata alle dimensioni del suo raggio ionico. Potassio e stronzio hanno raggi ionici simili, di circa 1.3 Å, e si adattano perfettamente alle cavità tra tetradi di guanine. In generale, il raggio ionico è un parametro atto a descrivere la capacità dei vari cationi di stabilizzare le tetradi di G. Nella serie dei metalli alcalini l'ordine di stabilizzazione è  $K^+ \gg Na^+ > Rb^+ > NH_4^+ > Cs^+ \gg Li^+$ , mentre per i metalli alcalino-terrosi è  $Sr^{2+} \gg Ba^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$ . Gli ioni litio non favoriscono la formazione di nessun tipo di struttura quadruplex [12]. Fatta eccezione per la serie dei metalli alcalino terrosi, non è ancora nota la capacità di stabilizzazione delle G-quadruplex da parte di cationi multivalenti. Inoltre, va tenuto presente che nel nucleo delle cellule viventi i cationi liberi predominanti sono quattro tipi, presenti nelle seguenti



concentrazioni approssimative:  $K^+$  (150 mM),  $Na^+$  (5 mM),  $Mg^{2+}$  (0.5 mM), e  $Ca^{2+}$  (0.2  $\mu$ M). Tutti gli altri cationi hanno concentrazioni fisiologiche nell'ordine subnanomolare, quindi le strutture G-quadruplex legano preferenzialmente ioni  $K^+$  o  $Na^+$ , forme cationiche che predominano nelle cellule. In generale la selettività delle G-quadruplex verso ioni  $K^+$  piuttosto che  $Na^+$  è stata spesso attribuita alla migliore capacità di  $K^+$  di adattarsi alla cavità centrale delineata dalle tetrad di G. Tuttavia la teoria dell'adattamento ottimale non spiega completamente tale selettività, suggerendo anche l'implicazione di fattori elettronici [13]. Successivamente è stato dimostrato che la scelta di coordinare ioni  $K^+$  piuttosto che  $Na^+$  è correlata alle relative energie libere di idratazione [14]. Entrambi i cationi, infatti, ben si adattano alla cavità centrale delle strutture quadruplex, ma è più facile deidratare ioni  $K^+$  [15]. In conclusione, senza un catione legato, l'arrangiamento ciclico del quartetto di G risulterebbe elettronicamente sfavorito, per cui un catione ottacoordinato che instauri interazioni catione-dipolo con otto diverse guanine, è essenziale per la formazione e la stabilizzazione dei quartetti di G. Ovviamente, le repulsioni elettrostatiche che ci si aspetterebbe tra i cationi nella cavità centrale sono minimizzate dalla presenza degli atomi di ossigeno carbonilici e degli anelli aromatici. Le interazioni catione-dipolo stabilizzano tali strutture più di qualunque altra interazione non covalente presente. Dati sperimentali e teorici mostrano che le interazioni catione-dipolo sono essenziali per la formazione di legami idrogeno e l'instaurarsi di forze di *stacking* tra le basi. La coordinazione di cationi, infatti, riducendo la repulsione tra gli ossigeni carbonilici nella cavità centrale, aumenta la forza dei legami idrogeno e promuove lo *stacking* tra i quartetti di G.

Lo *stacking* tra le basi è guidato da interazioni elettrostatiche e di van der Waals [16,17]. Tale tipo di interazione è considerata in primo luogo un effetto dipolo, legato alla presenza di un'ampia superficie aromatica polarizzabile; il dipolo si

instaura probabilmente per interazione tra atomi parzialmente carichi positivamente, presenti alla periferia di una base, e la nube di elettroni  $\pi$ , localizzata al centro. Le basi azotate danno interazioni di *stacking* maggiori rispetto ai comuni sistemi aromatici, in quanto i gruppi N-H e C=O, più polarizzati dei classici legami C-H presenti nei comuni idrocarburi planari, aumentano la densità di carica positiva rispettivamente sull'atomo di idrogeno e sull'atomo di carbonio. In secondo luogo, calcoli teorici e sperimentali hanno suggerito che in tali interazioni siano coinvolti effetti idrofobici "non classici" [16,17]. Questi effetti derivano dalla disponibilità di un'ampia superficie di *stacking* aromatica contenente atomi polarizzabili [17] e dal rilascio di molecole d'acqua, debolmente legate alla superficie aromatica, al momento dell'impilamento. Dunque varie interazioni non covalenti (legami idrogeno, interazioni cationedipolo e interazioni di van der Waals) collaborano a definire la struttura, la dinamica e la funzione di questi complessi macromolecolari.

### Polimorfismo delle strutture G-quadruplex

Le strutture G-quadruplex sono caratterizzate da un elevato polimorfismo [18]. Esse differiscono per la stechiometria dei filamenti, il loro relativo orientamento e la conformazione glicosidica delle guanine coinvolte nelle tetradi. In base al numero di filamenti che si associano a formare la struttura, esse possono essere distinte in G-quadruplex mono [19], bi [20] o tetramolecolari [21] (Figura 4).

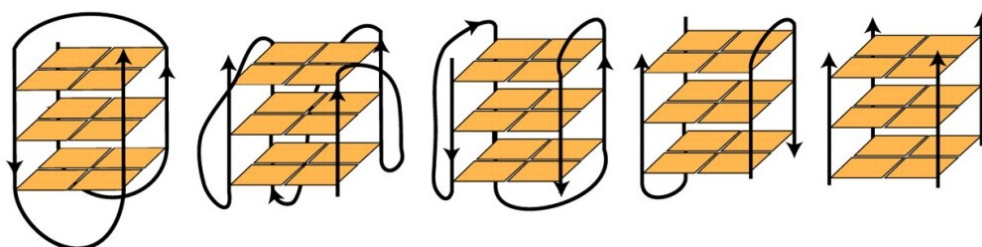


Figura 4. Variazioni stechiometriche di strutture G-quadruplex.

Quando nella sequenza è presente un'unica ripetizione di G, l'unica possibilità è l'associazione di quattro filamenti con la conseguente formazione di G-quadruplex tetramolecolari con quattro filamenti paralleli, altamente simmetriche. G-quadruplex bimolecolari, o dimeriche, derivano invece dall'associazione di due filamenti aventi ciascuno almeno due tratti di guanine. Infine, un singolo filamento oligonucleotidico ricco di guanine può ripiegarsi in modo da formare una struttura G-quadruplex monomolecolare.

Un ulteriore fonte di variazione strutturale delle strutture G-quadruplex è rappresentata dall'orientamento relativo dei filamenti formanti la struttura i quali possono avere diverse polarità. Indipendentemente dal fatto che siano o meno parte della medesima molecola, i filamenti costituenti una G-quadruplex si possono disporre in quattro modi diversi. Essi possono essere tutti paralleli, tre paralleli ed uno antiparallelo, paralleli adiacentemente o tutti antiparalleli (Figura 5). La polarità dei filamenti è stata determinata per diverse sequenze. Brevi sequenze oligonucleotidiche con tratti di G adottano preferenzialmente strutture quadruplex con quattro filamenti paralleli, come dimostrato da studi di NMR [22,23] e di cristallografia [24]. La struttura, determinata con l'impiego della spettroscopia NMR, della sequenza telomerica ripetuta di *Tetrahymena* [25] invece è un esempio di struttura G-quadruplex che ha tre filamenti paralleli e uno antiparallelo. Ci sono poi molti esempi sia di strutture G-quadruplex con due coppie di filamenti adiacenti paralleli [26-28] sia con filamenti antiparalleli alternati [29,30].

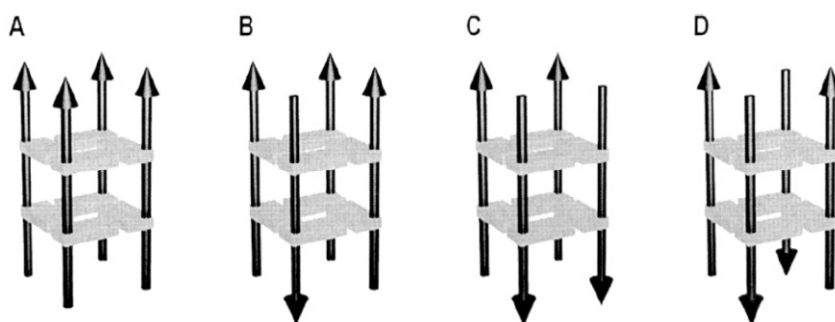


Figura 5. Diversa polarità dei filamenti formanti la struttura G-quadruplex. (A) Tutti i filamenti paralleli; (B) Tre filamenti paralleli e uno antiparallelo; (C) Due filamenti paralleli adiacenti; (D) Due filamenti paralleli alternati.

Nel caso delle G-quadruplex monomolecolari o bimolecolari, i *loop* che connettono i filamenti possono assumere diverse tipologie. I filamenti coinvolti nella formazione di strutture bimolecolari possono presentare *loop* laterali o diagonali. I *loop* laterali (*edgewise loop*) connettono catene adiacenti antiparallele mentre i *loop* diagonali (*diagonal loop*) attraversano la struttura G-quadruplex per connettere catene antiparallele. I *loop* diagonali tendono a disporsi all' estremità opposte rispetto al centro della tetrade (Figura 6 A). La formazione di *loop* diagonali dallo stesso lato è infatti altamente improbabile a causa sia dell'ingombro sterico sia della repulsione elettrostatica tra le due catene negative dei legami fosfodiesterici. Invece, i *loop* laterali possono o protrarsi dallo stesso lato ed essere sia paralleli (Figura 6 B) che antiparalleli (Figura 6 C) o dal lato opposto ed assumere due diverse direzioni (Figura 6 D-E).

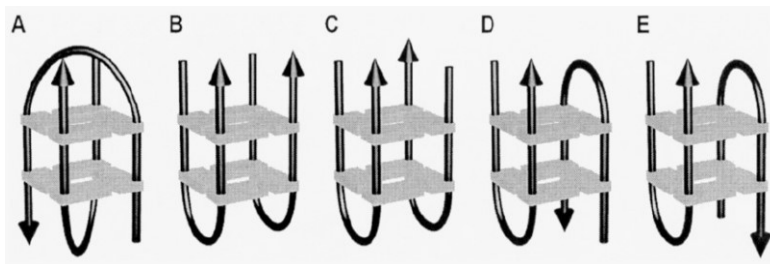


Figura 6: Disposizione dei loop che tengono uniti tratti di G che partecipano alla formazione di strutture G-quadruplex monomolecolari

Per le quadruplex monomolecolari il numero delle possibili orientazioni dei *loop* è ridotto. I tre *loop* possono unirsi tutti e tre lateralmente (Figura 7 A) oppure due laterali e uno diagonale (Figura 7 B).

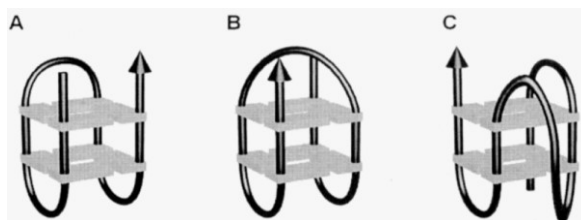


Figura 7: Disposizione dei loop che tengono uniti tratti di G che partecipano alla formazione di strutture G-quadruplex monomolecolari

Da studi strutturali di varie G-quadruplex è emerso, inoltre, che i *loop* non sono completamente liberi e flessibili, ma possono stabilire importanti interazioni di stacking con la tetrate di G più vicina. Ciascuna delle quattro basi, inoltre, in prossimità di tetradi di G ha la possibilità di formare a sua volta strutture planari stabilizzate da interazioni di *stacking* con i piani di G adiacenti [31]. Accanto alle tetradi di G, infatti, sono stati osservati altri tipi di tetradi, quali tetradi U<sub>4</sub>, T<sub>4</sub> e A<sub>4</sub> [31,32,33] (Figura 8) nonché tetradi miste, del tipo G: C: G: C [34] confermando l'ipotesi secondo cui le forze di *stacking* possono indirizzare la formazione di tetradi alternative.

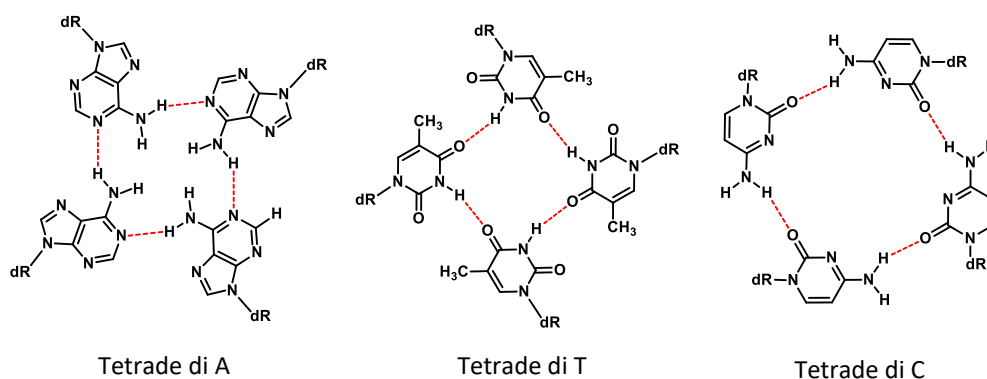


Figura 8. Tetradi alternative

Infine, la variabilità strutturale delle G-quadruplex risiede anche nella conformazione del legame glicosidico delle guanosine coinvolte nella formazione delle tetradi. Infatti, mentre nel B-DNA tutte le basi sono in conformazione *anti*, le

guanine coinvolte nella formazione dei quartetti possono essere sia in conformazione *syn* che *anti* (Figura 9).

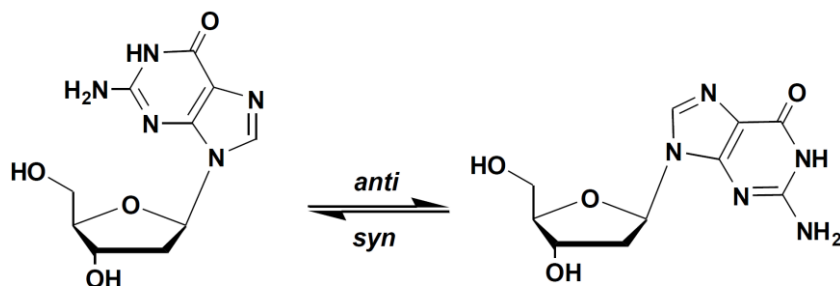


Figura 9. Rotazione intorno al legame N-glicosidico per l'interconversione tra le conformazioni *syn* e *anti*.

Tuttavia la libertà conformazionale di guanine adiacenti implicate nella medesima tetrate è limitata dall'orientamento relativo dei filamenti. Infatti, nel caso di strutture quadruplex a filamenti paralleli, perché si possano formare i legami idrogeno della tetrate, le guanine del medesimo quartetto devono avere lo stesso angolo torsionale glicosidico, al contrario, nel caso di quadruplex a filamenti antiparalleli devono avere angoli torsionali glicosidici opposti. La conformazione glicosidica influenza anche l'energia di *stacking* ed il tipo di solchi. Mentre nel B-DNA sono presenti unicamente un solco maggiore ed uno minore, lo *stacking* tra i quartetti di guanine produce quattro solchi che possono essere ampi, stretti o medi [35]. Se i filamenti che formano la tetrate di guanine sono tutti paralleli, i quattro solchi generati saranno tutti medi. Nel caso invece di quadruplex antiparallele per stabilire la tipologia dei solchi bisogna considerare la conformazione glicosidica delle guanosine. Le guanine di filamenti adiacenti che hanno lo stesso angolo di torsione glicosidica producono solchi medi, mentre le guanine su filamenti adiacenti ma con diversa conformazione glicosidica producono solchi stretti o ampi (Figura 10).

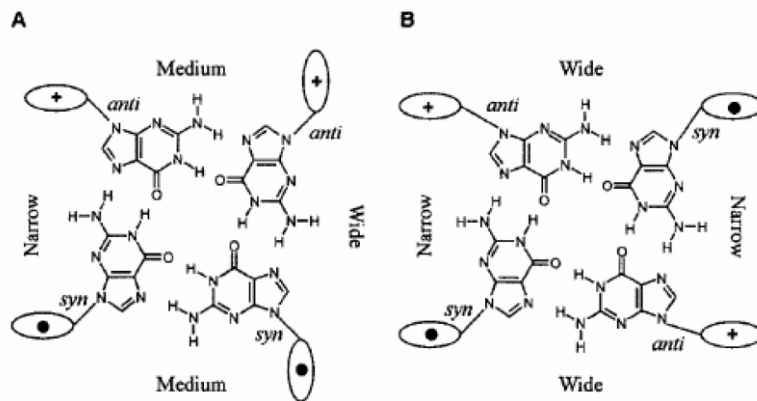


Figura 10. Le interazioni tra angoli torsionali glicosidici e polarità dei filamenti danno origine a solchi di ampiezze differenti.

La conformazione glicosidica delle guanine implicate nelle tetradi è strettamente correlata all'orientamento relativo dei filamenti. Per esempio, le guanine coinvolte nelle G-tetradi alla base di quadruplex tetramolecolari a filamenti paralleli adottano preferenzialmente una conformazione glicosidica di tipo *anti*, mentre in quartetti di G di quadruplex intramolecolari a filamenti antiparalleli si osserva un'alternanza *syn/anti* [36]. In generale strutture quadruplex a filamenti antiparalleli devono avere basi sia in conformazione *syn* che *anti* per garantire il loro appaiamento nelle tetradi.

### Esempi di strutture quadruplex mono, bi e tetra-molecolari

Le G-quadruplex tetramolecolari si originano da oligonucleotidi con una singola sequenza di G. Questi formano quasi sempre strutture parallele destrorse che contengono tutte le basi nella conformazione *anti* e i 4 filamenti orientati parallelamente generano 4 identici solchi medi. Esempio di tale tipologia di G-quadruplex è la struttura del cristallo formato dal complesso  $[d(TGGGGT)]_4$  (Figura 11) con ioni  $Na^+$ , disposti o a sandwich tra i piani di G o coplanari al quartetto [24].

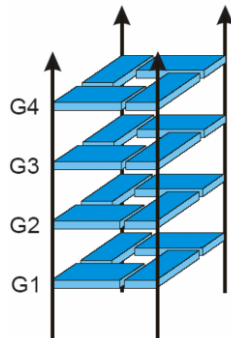


Figura 11. Rappresentazione schematica della struttura a raggi X del cristallo di  $[d(TGGGGT)]_4$ .

Oligonucleotidi contenenti due regioni ricche di G tendono ad assemblarsi in strutture bimolecolari. Esempio di tale tipologia di quadruplex è fornito dal frammento della sequenza telomerica di *Oxytricha*  $d(G_4T_4G_4)$  (Figura 12), che da studi NMR in soluzione con ioni  $Na^+$  ha rivelato la capacità di organizzarsi in una quadruplex bimolecolare con *loop* diagonali [26,27,37].

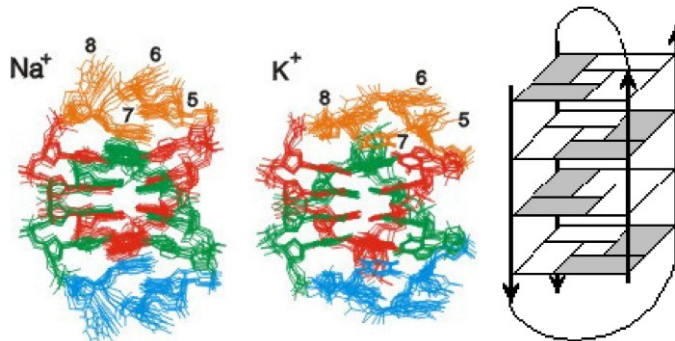


Figura 12. Sovrapposizione delle otto migliori strutture a quadrupla elica adottate dal frammento della sequenza telomerica di *Oxytricha* in soluzione di ioni  $Na^+$  o  $K^+$ .

Un singolo filamento oligonucleotidico ricco di guanine può ripiegarsi in modo da formare una struttura G-quadruplex monomolecolare con tre *loop* [27]. I *loop* in genere costringono i filamenti della struttura a disporsi in modo antiparallelo. Un esempio indicativo di tale tipologia di struttura è dato dall'aptamero legante la trombina (TBA) un pentadecamero di sequenza  $d(G_2T_2G_2TGTG_2T_2G_2)$  (Figura 13). Mediante studi NMR si è visto che in soluzione questo oligonucleotide può ripiegarsi in una G-quadruplex monomolecolare a filamenti adiacenti antiparalleli



contenente due quartetti di G con le basi in una orientazione del tipo *syn-anti-syn-anti* e tre *loop* laterali [29,38].

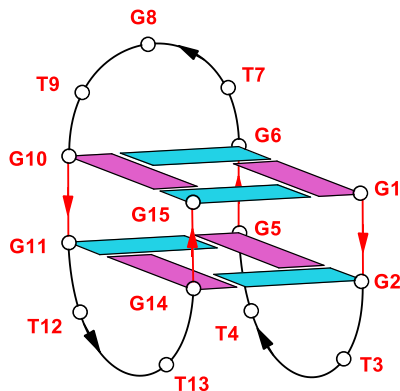


Figura 13. G-quadruplex monomolecolare a sedia formata dal TBA. Le guanosine *anti* e *syn* sono indicate in azzurro e viola, rispettivamente.

Le quadruplex intramolecolari con tre *loop* laterali sono frequentemente definite “strutture a sedia”. Ciascun tratto  $G_2$  ripetuto è 5’-*syn-anti*-3’ e tutte le timine sono in una conformazione *anti*. La quadrupla elica è caratterizzata da due solchi larghi e due stretti. Le timine dei *loop* corti TT (T4 e T13) sono impilate su quartetti di G vicini e formano un legame a idrogeno, mentre le timine T3 e T12 presentano una maggiore flessibilità. La timina T7 del più lungo *loop* centrale TGT è collocata nel solco maggiore mentre le altre due basi del *loop*, G8 e T9, sono più o meno impilate sui quartetti di G.

Un altro esempio di G-quadruplex monomolecolare è dato dalla sequenza del telomero umano. Le strutture dei cristalli di oligonucleotidi contenenti la sequenza telomerica umana d(TTAGGG), in presenza di ioni  $K^+$ , hanno arricchito la famiglia delle G-quadruplex di una nuova geometria di *loop* [39]. Il 22-mer d[AGGG(TTAGGG)<sub>3</sub>] forma, infatti, una quadruplex intramolecolare in cui i tre *loop* TTA si dispongono con geometria “*double-chain-reversal*” per dare una quadruplex monomolecolare con quattro filamenti paralleli; questi *loop* si estendono lontani

dal nucleo centrale costituito dai quartetti di G fornendo potenziali siti di riconoscimento per le proteine (Figura 14) [40].

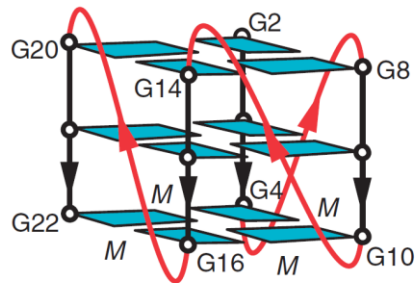


Figura 14. G-quadruplex monomolecolare formata dalla sequenza telomerica  $d[AG_3(T_2AG_3)_3]$ .

## 2.2 Significato biologico

L'interesse dei ricercatori verso le strutture G-quadruplex è notevolmente aumentato quando si è scoperto il loro potenziale coinvolgimento in importanti processi biologici. Il significato biologico di queste strutture a DNA è testimoniato dalla loro presenza o potenziale formazione in numerose regioni del genoma umano. In particolare, sequenze ricche di guanine sono state individuate a livello dei telomeri [41], delle regioni switch di immunoglobuline [42], nelle regioni promotrici del gene *c-myc* e di altri oncogeni [43], a livello del gene dell'insulina umana [44] e del gene della suscettibilità al retinoblastoma [45].

La prova dell'importanza biologica delle strutture G-quadruplex è legata alla capacità di tali strutture di interagire con molte proteine umane. La specificità del legame G-quadruplex-proteine è molto elevata, a tal punto che molte proteine riconoscono solo determinate disposizioni spaziali di DNA G-quadruplex.

Una delle prime prove *in vivo* della funzionalità biologica di strutture a quadrupla elica è stata fornita da Hurley e collaboratori nel 2002 che individuarono una quadruplex intramolecolare connessa ad una regione di 20-30 coppie di basi in grado di reprimere la trascrizione della proteina oncogenica *c-myc* [46].

Un importante esempio di interazione G-quadruplex-proteine è rappresentato dall'interazione G-quadruplex-telomerasi. Strutture G-quadruplex, infatti, sono riscontrabili a livello dei telomeri. I telomeri sono estremità dei cromosomi eucariotici composte da DNA e proteine, essenziali per il mantenimento dell'integrità cromosomiale e nel prevenire la perdita di informazione genetica nel corso dei vari cicli di replicazione cellulare. È stato ipotizzato che i telomeri siano coinvolti nelle patologie cancerose, dal momento che l'induzione *in vitro* della telomerasi permette ad alcune cellule di sfuggire al processo di invecchiamento cellulare ed acquisire una capacità replicativa pressochè infinita [47]. La telomerasi è una ribonucleoproteina con attività di trascrittasi inversa che, catalizzando la sintesi di una serie di unità d(T2AG3) a partire dall'estremità 3' telomerica (che funge da primer), impedisce l'accorciamento telomerico [48]. La telomerasi è espressa nell'80-90% delle cellule tumorali ed è assente nella maggior parte delle cellule somatiche. Tale enzima può rappresentare un potenziale bersaglio di farmaci nella chemioterapia antitumorale, con il vantaggio di una scarsa tossicità perché non è attivo nelle cellule somatiche. L'attività della telomerasi può essere inibita per esempio impedendo l'interazione enzima-substrato; la telomerasi riconosce come proprio substrato il DNA a singolo filamento, ma non le strutture G-quadruplex. La porzione a singolo filamento protrudente all'estremità 3' del telomero umano, costituita da unità ripetute di sequenza 5'-TTAGGG-3', sembrerebbe in grado di ripiegarsi in una quadruplex intramolecolare. L'inibizione della telomerasi dipende dallo spostamento dell'equilibrio singolo filamento/quadruplex verso la forma strutturata, per cui, composti capaci di legare e stabilizzare tali strutture a partire dal DNA a singola elica ricco di G delle estremità 3' dei telomeri, interferiscono con l'attività della telomerasi e quindi con il mantenimento dei telomeri nelle cellule cancerose, trasformando queste linee

cellulari immortali in cellule capaci di subire progressivi accorciamenti dei telomeri e quindi di invecchiare.

Tuttavia, l'importanza delle strutture G-quadruplex non è confinata alla ricerca in genetica o biologia molecolare. Infatti, grazie alle loro notevoli stabilità e variabilità, queste strutture costituiscono l'impalcatura di numerosi aptameri a DNA con importanti applicazioni sia in ambito analitico che farmaceutico [49,50]. Inoltre, considerando le loro proprietà di auto assemblaggio, le G-quadruplex sono spesso sfruttate nella costruzione di nanostrutture e nello sviluppo di nanodispositivi [51]. Un altro importante esempio di interazione G-quadruplex-proteina è rappresentato proprio dall'interazione di aptameri con il peptide bersaglio. Numerosi aptameri ripiegano in quadruplex la porzione bioattiva della propria struttura, per rendere possibile il legame con la proteina target. Le strutture di numerosi aptameri sono state determinate con l'impiego della spettroscopia NMR e della cristallografia a raggi X. Uno degli aptameri più noti è il TBA (thrombin binding aptamer), un pentadecamero deossiribonucleotidico di sequenza d(GGTTGGTGTGGTTGG), in grado di inibire in vitro il processo, catalizzato dalla trombina, che porta alla formazione del coagulo di fibrina [52].

Recenti studi hanno messo in luce che, accanto all'attività anticoagulante, proprio come altri oligonucleotidi ricchi di G anche il TBA ha mostrato proprietà antiproliferative [53] riconducibili, con elevata probabilità, all'interazione di tali aptameri con uno specifico target. Numerosi studi hanno riportato che la nucleolina è il principale target coinvolto nell'attività antiproliferativa di vari oligonucleotidi ricchi di G [54-56].

Sono stati individuati altri aptameri di natura deossiribonucleotidica, strutturalmente correlati al TBA. Si tratta di inibitori dell'integrasi del virus HIV, estremamente efficaci in quanto caratterizzati da valori di IC50 nell'ordine di

grandezza del nanomolare [57,58]; questi si organizzano tendenzialmente in una struttura G-quadruplex monomolecolare molto simile a quella del TBA.

L'esistenza di proteine, spesso dotate di funzione enzimatica, che riconoscono le strutture quadruplex, suggerisce un importante ruolo biologico per queste strutture secondarie del DNA. Pertanto ricerche volte principalmente al chiarimento dell'entità delle interazioni G-quadruplex-proteine ci potrebbero aiutare a comprendere i meccanismi alla base del riconoscimento molecolare, agevolando la progettazione di nuovi farmaci.

## ***Bibliografia***

- [1] S. Neidle, Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure, 1998, Oxford University Press, New York.
- [2] M. Gellert, J. F. Chantot, D. Thiele, J. Biomol. Struct. Dyn., 1990, 8, 491-511.
- [3] M. Gellert, N. M. Lipsett, D. R. Davies, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1962, 48, 2013.
- [4] S. B. Zimmerman, Biopolymers, 1975, 14, 889-890.
- [5] S. B. Zimmerman, G. H. Cohen, D. R. Davies, J. Mol. Biol., 1975, 92, 181-192.
- [6] Marathias, V.M.; Bolton, P.H. Biochemistry, 1999, 38, 4355-4364
- [7] S. M. Kerwin, Current Pharmaceutical Design, 2000, 6, 441-471.
- [8] T. Simonsson, R. Sjöback, J. Biol. Chem., 1999, 274, 17379-17383.
- [9] G. Laughl, A. I. H. Murchie, D. M. J. Lilley, B. Luisi, Science, 1994, 265, 520-524.
- [10] F. M. Chen, Biochemistry, 1992, 31, 3769-3776.
- [11] D. S. Pilch, G. E. Plum, K. J. Breslauer, Curr. Opin. Struct. Biol., 1995, 5, 334-342.
- [12] D. Sen, W. Gilbert, Methods Enzymol., 1992, 211, 191-199.
- [13] W. S. Ross, C. C. Hardin, J. Am. Chem. Soc., 1994, 116, 6070-6080.
- [14] N. V. Hud, F. W. Smith, F. A. L. Anet, J. Feigon, Biochemistry, 1996, 35, 15383-15390.
- [15] J. D. Gu, J. Leszczynski, J. Phys. Chem. A, 2002, 106, 529-532.
- [16] E. T. Kool, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 2001, 30, 1-22.
- [17] E. A. Meyer, R. K. Castellano, F. Diederich, Angew. Chem., 2003, 115, 1244-1287.
- [18] Burge, S., Parkinson, G.N.; Hazel, P.; Todd, A.K.; Neidle, S. Nucleic Acids Res. 2006, 34, 5402-5415
- [19] Wang, Y.; Patel, D.J. J. Mol. Biol., 1995, 251, 263-282
- [20] Keniry, M.A.; Strahan, G.D.; Owen, E.A.; Shafer, R.H. Eur. J. Biochem., 1995, 233, 631-643
- [21] Laughlan, G.; Murchie, A.E.; Norman, D.G.; Moore, M.H.; Moody, P.C.; Lilley, D.M.; Luisi, B. Science, 1994, 265, 520-524
- [22] Y. Wang, D. J. Patel, Biochemistry, 1992, 31, 8112-8119.

- [23] F. Aboul-ela, A. I. Murchie, D. M. Lilley, *Nature*, 1992, 360, 280-282.
- [24] K. Phillips, Z. Dauter, A. I. H. Murchie, D. M. J. Lilley, B. Luisi, *J. Mol. Biol.*, 1997, 273, 171-182.
- [25] Y. Wang, D. J. Patel, *Structure*, 1994, 2, 1141-1156.
- [26] F. W. Smith, J. Feigon, *Nature*, 1992, 356, 164-168.
- [27] Y. Wang, D. J. Patel, *Structure*, 1993, 1, 263-282.
- [28] P. Catasti, X. Chen, R. K. Moyzis, E. M. Bradbury, G. Gupta, *J. Mol. Biol.*, 1996, 264, 534-545.
- [29] P. Schultze, R. F. Macaya, J. Feigon, *J. Mol. Biol.*, 1994, 235, 1532-1547.
- [30] R. F. Macaya, P. Schultze, F. W. Smith, J. A. Roe, J. Feigon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1993, 90, 3745-3749.
- [31] J. Sühnel, *Biopolymers*, 2001, 56, 32-51.
- [32] P. K. Patel, R. V. Hosur, *Nucleic Acids Res.*, 1999, 27, 2457-2464.
- [33] P. K. Patel, A. S. R. Koti, R. V. Hosur, *Nucleic Acids Res.*, 1999, 27, 3836-3843.
- [34] A. Kettani, S. Bouaziz, A. Gorin, H. Zhao, R. Jones, D. J. Patel, *J. Mol. Biol.*, 1998, 282, 619-636.
- [35] Wang, K.Y.; Krawczyk, S.H.; Bischofberger, N.; Swaminathan, S.; Bolton, P.H.; *Biochemistry*, 1993, 32, 11285-92
- [36] D. Mohanty, M. Bansal, *Nucleic Acids Res.*, 1993, 21, 1767-1774.
- [37] F. W. Smith, J. Feigon, *Biochemistry*, 1993, 32, 8682-8692.
- [38] K. Y. Wang, S. H. Krawczyk, N. Bischofberger, S. Swaminathan, P. H. Bolton, *Biochemistry*, 1993, 32, 1899-1904.
- [39] G. N. Parkinson, M. P. H. Lee, S. Neidle, *Nature*, 2002, 417, 876-880.
- [40] D. J. Patel, *Nature*, 2002, 417, 807-808.
- [41] E. H. Blackburn, *Nature*, 1991, 350, 569-573.
- [42] D. Sen, W. Gilbert, *Nature*, 1990, 344, 410-414.
- [43] T. Simonsson, P. Pecinka, M. Kubista, *Nucleic Acids Res.*, 1998, 26, 1167-1172.
- [44] G. I. Bell, M. J. Selby, W. J. Rutter, *Nature*, 1982, 295, 31-35.
- [45] A. I. H. Murchie, D. M. J. Lilley, *Nucleic Acids Res.*, 1992, 20, 49-53.
- [46] A. Siddiqui-Jain, C. L. Grand, D. J. Bearss, L. H. Hurley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2002, 99, 11593-11598.
- [47] W. C. Hahn, C. M. Counter, A. S. Lundberg, *Nature*, 1999, 400, 464-468.
- [48] V. L. Makarov, Y. Hirose, J. P. Langmore, *Cell*, 1997, 88, 657-666.
- [49] Varizhuk, A., Ilyinsky, N., Smirnov, I. and Pozmogova, G. (2016) G4 aptamers: trends in structural design. *Mini-Rev. Med. Chem.*, 16, 1321–1329.
- [50] Tucker, W.O., Shum, K.T. and Tanner, J.A. (2012) G-quadruplex DNA aptamers and their ligands: structure, function and application. *Curr. Pharm. Des.*, 18, 2014–2026.
- [51] Yatsunyk, L.A., Mendoza, O. and Mergny, J.L. (2014) 'Nano-oddities': Unusual nucleic acid assemblies for DNA-based nanostructures and nanodevices. *Acc. Chem. Res.*, 47, 1836–1844.
- [52] L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, J. J. Toole, *Nature*, 1992, 355, 564–566.

- [53] V. Dapic', V. Abdomerovic', R. Marrington, J. Peberdy, A. Rodger, J.O. Trent, P.J. Bates, Biophysical and biological properties of quadruplex oligodeoxyribonucleotides, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 2097–2107.
- [54] Bates,P.J., Kahlon,J.B., Thomas,S.D., Trent,J.O. and Miller,D.M. (1999) Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides correlates with protein binding. *J. Biol. Chem.*, 274, 26369–26377.
- [55] Girvan,A.C., Teng,Y., Casson,L.K., Thomas,S.D., J " uliger,S., Ball,M.W., Klein,J.B., Pierce,W.M., Barve,S.S. and Bates,P.J. (2006) AGRO100 inhibits activation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) by forming a complex with NF-kappaB essential modulator (NEMO) and nucleolin. *Mol. Cancer Ther.*, 5, 1790–1799.
- [56] Teng,Y., Girvan,A.C., Casson,L.K., Pierce,W.M., Qian,M., Thomas,S.D. and Bates,P.J. (2007) AS1411 alters the localization of a complex containing protein arginine methyltransferase 5 and nucleolin. *Cancer Res.*, 67, 10491–10500.
- [57] A. Mazumder, N. Neamati, J. O. Ojwang, S. Sunder, R. F. Rando,Y. Pommier, *Biochemistry*, 1996, 35, 13762-13771.
- [58] N. J. Jing, R. F. Rando,Y. Pommier, M. E. Hogan, *Biochemistry*, 1997, 36, 12498-12505.

## **CAPITOLO 3: APTAMERI CHE ADOTTANO STRUTTURE G-QUADRUPLEX**

### **3.1 Quadro generale**

Negli ultimi due decenni, gli aptameri hanno dimostrato di essere agenti terapeutici molto allettanti principalmente per il loro migliore *uptake* cellulare, per la non immunogenicità e per i costi di produzione più bassi. Sono stati scoperti e valutati numerosi aptameri contro differenti patologie umane quali malattie neurodegenerative [1], la degenerazione maculare legata all'età [2], l'infiammazione [3], la trombosi [4], il diabete [5] etc. Sebbene sia stato identificato un ampio numero di aptameri, solo alcuni di loro appartengono al piccolo gruppo che può formare strutture G-quadruplex. Inoltre, sebbene non tutti gli aptameri che mostrano un potenziale uso in terapia adottino conformazioni G-quadruplex (un esempio è dato dal Macugen) quelli contenenti tali strutture hanno il vantaggio di un'addizionale stabilità conferita proprio da esse. La capacità degli aptameri formanti G-quadruplex di riconoscere varie proteine che giocano un ruolo fondamentale in differenti patologie ha aperto la strada allo sviluppo di agenti terapeutici aptamerici a DNA o RNA che adottano strutture G-quadruplex. Tali strutture hanno un grande potenziale diagnostico e terapeutico per la rilevazione e il trattamento di varie e gravi patologie. Alcuni degli aptameri formanti G-quadruplex che sono attualmente sottoposti a studi clinici o che hanno mostrato un potenziale uso come agenti terapeutici sono mostrati in tabella 1. Tra questi, i più noti hanno dimostrato di essere potenziali farmaci contro il cancro, il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) e i processi patologici legati al meccanismo della coagulazione.



Disease	Aptamer	Sequence (5' → 3')	Target	Current status
Cancer	AS1411	d(GGTGGTGGTGGTGTGGTGGTGGTGG)	Nucleolin	Phase II (completed)
	T40214	d(GGGCGGGCGGGCGGGC)	STAT3	Phase 0
	HJ24	d(AGCGTCGAATACCACACGGGGGTTTT GGTGGGGGGGCTGGGTGTCTTGGGGG TGGGCTAATGGAGCTCGTGGTCAT)	Shp2	<i>In vitro</i> studies (IC <sub>50</sub> = 29 nM)
	3R02	d(TGTGGGGTGGACTGGTGGTACC)	VEGF	<i>In vitro</i> studies (K <sub>d</sub> = 0.30 nM)
Human immunodeficiency virus (HIV)	ISIS 5320	d(T <sup>+</sup> T <sup>+</sup> G <sup>+</sup> G <sup>+</sup> G <sup>+</sup> G <sup>+</sup> T <sup>+</sup> T <sup>+</sup> )	HIV gp120	<i>In vitro</i> studies (IC <sub>50</sub> = 0.30 μM)
	Hotoda sequence	DBB-d(TGGGAG) and TBDPS-d(TGGGAG)	HIV gp120	<i>In vitro</i> studies (IC <sub>50</sub> = 0.37 μM and 0.88 μM, resp.)
	Modified Hotoda sequence	(4-benzyloxy)phenylphosphate-d(TGGGAG)	HIV gp120	<i>In vitro</i> studies (EC <sub>50</sub> = 61 nM)
	Modified Hotoda sequence	[TBDPS-d(TGGGCG)] <sub>4</sub> -TEL	HIV gp120	<i>In vitro</i> studies (IC <sub>50</sub> = 39 nM)
	AS1411	d(GGTGGTGGTGGTGTGGTGGTGGTGG)	Nucleolin	<i>In vitro</i> studies (EC <sub>50</sub> = 15.4 nM)
	93del	d(GGGGTGGGAGGAGGGT)	HIV Integrase	<i>In vitro</i> studies (IC <sub>50</sub> = 42 nM)
	Zintevir	d(G <sup>+</sup> TGGTGGGTGGGTGGG <sup>+</sup> T)	HIV Integrase	Phase I (completed)
	RT6	d(ATCCCGCTGATTAGCGATACTCAGCGTTAG GGAAGGGCGTCGAAAGCAGGGTGGGACTTG AGCAAAATCACCTGCAGGGG)	HIV Reverse Transcriptase	<i>In vitro</i> studies (IC <sub>50</sub> = 16 nM)
	ODN 93	d(GGGGGTGGGAGGAGGGTAGGCCTTAGGTTTCTGA)	HIV RNase H	<i>In vitro</i> studies (IC <sub>50</sub> = 0.50 μM)
ODN 112	d(CCAGTGGCGGGTGGGTGGTGGGGGACTTGG)	HIV RNase H	<i>In vitro</i> studies (IC <sub>50</sub> = 0.50 μM)	
Coagulation	TBA	d(GGTGGTGTGGTGG)	Thrombin	Phase I (completed)
	HD22	d(AGTCCGTGGTAGGGCAGGTGGGGTACT)	Thrombin	<i>In vitro</i> studies (K <sub>d</sub> = 3.2 nM)
	HD1–22	d(GGTGGTGTGGTGGAAAAAAGATC CGTGGTAGGGCAGGTGGGGTACT)	Thrombin	<i>In vitro</i> studies (K <sub>d</sub> = 0.65 nM)
	RA-36 NU172	d(GGTGGTGTGGTGGTGGTGGTGGTGG) d(CGCTAGGTGGGTAGGGTGGTGCG)	Thrombin Thrombin	Phase 0 Phase II (unknown)
Osteoporosis	Scl 2	d(TTGCCTTAATTTGGGGGGTGGTGGTGGT)	Sclerostin	<i>In vitro</i> studies (IC <sub>50</sub> = 0.90 μM)
Prion diseases	R12	r(GGAGGAGGAGGA)	PrP <sup>C</sup>	<i>In vitro</i> studies (K <sub>d</sub> = 8.5 nM)
Tuberculosis	PPK2 G9	d(AACACATAGTTTGGTTAGGTGGTGGTGAATTA)	PPK2	<i>In vitro</i> studies (IC <sub>50</sub> = 39.3 nM)

\* = phosphorothioate bond; DBB = 3,4-dibenzyloxybenzyl; TBDPS = *tert*-butyldiphenylsilyl; TEL = tetra-end-linker.

Tabella 1. Esempi di aptameri formanti G-quadruplex

### 3.2 Aptameri anticoagulanti formanti G-quadruplex

La trombina è una proteasi a serina che, convertendo il fibrinogeno solubile nella fibrina insolubile, gioca un ruolo chiave nell'ultimo step del processo di coagulazione del sangue [6]. Il primo aptamero anticoagulante legante la trombina, ovvero il TBA, è stato descritto nel 1992 da Bock e collaboratori [7]. Successivamente, è stato scoperto che anche altri aptameri a DNA sono capaci di inibire la trombina e la maggior parte di essi adotta strutture G-quadruplex. Il TBA (Thrombin Binding Aptamer) è un aptamero a DNA che lega l'esosito I della

trombina con affinità nanomolare (intervallo 25-200 nM). Sia in base agli studi di cristallografia ai raggi X che di spettroscopia NMR, il TBA adotta una struttura G-quadruplex a sedia, antiparallela monomolecolare, costituita da 2 quartetti o tetradi di G e tre *edge loop*, un *loop* TGT e 2 *loop* TT [8]. Nella fase I degli studi clinici, il TBA è stato valutato come potenziale anticoagulante nell'intervento chirurgico di bypass aorto-coronarico. I risultati preliminari hanno confermato che la desiderata attività anticoagulante è correlata alla dose. L'elevata quantità richiesta per ottenere il desiderato effetto anticoagulante ha portato ad un profilo di dosaggio sub-ottimale. Per tale ragione, nel 2005 gli studi clinici sul TBA in fase I sono stati interrotti spostando la concentrazione su aptameri di seconda generazione con migliori proprietà [9].

### **3.3 Aptameri antitumorali formanti G-quadruplex**

Molti autori hanno dimostrato che numerosi corti oligomeri ricchi di G possono inibire la proliferazione cellulare e indurre apoptosi nelle linee cellulari tumorali. L'attività di questi oligomeri è correlata alla loro capacità di legarsi a specifiche proteine cellulari [10,11]. Gli aptameri possono essere selezionati non solo per proteine o altri ligandi disciolti in un tampone ma anche per proteine che sono legate alla superficie cellulare. Le cellule cancerose sono note per avere specifiche proteine sulle loro membrane e alcune di esse sono sovraesprese nelle cellule tumorali. Proteine quali la nucleolina, l'antigene di membrana specifico per la prostata (PSMA) e altri [12,13] possono servire come *marker* tumorali. Sono stati sviluppati parecchi aptameri a DNA e RNA che legano selettivamente i *marker* tumorali, tuttavia, non tutti tra questi contengono G-quadruplex. Tra gli aptameri anticancro che formano G-quadruplex particolare interesse hanno suscitato **AS1411** e **T40214**.

L'aptamero **AS1411** è stato scoperto per caso e non mediante il metodo SELEX convenzionale [14] (Figura 1). È il più avanzato e il primo della classe degli anticancro ad essere entrato in studio clinico, attualmente in fase II. È un aptamero G-quadruplex a DNA, è costituito da 26 nucleotidi d(GGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG) ed è risultato altamente stabile e resistente alla degradazione ad opera delle nucleasi. Il suo target è rappresentato dalla nucleolina, una proteina ubiquitaria e multifunzionale che gioca un ruolo essenziale nella sopravvivenza, nella crescita e nella proliferazione cellulare [3]. AS1411 è capace di riconoscere specificatamente il dominio esterno della nucleolina che è sovraespressa sulla superficie delle cellule neoplastiche, si lega ad esso e, successivamente, è trasportato all'interno della cellula [15]. Il complesso aptamero-nucleolina internalizzato inibisce la replicazione del DNA portando ad un aumento delle cellule in fase S e conseguente citotossicità [16]. Negli studi preclinici, AS1411 ha mostrato attività antiproliferativa in diverse linee cellulari incluse le cellule del cancro al polmone, alla prostata e al seno. Ha mostrato di essere efficace anche nei topi conducendo ad una significativa riduzione della crescita del cancro alla prostata nei modelli con trapianti *xenograft*. Negli studi clinici di fase I, è stato ben tollerato da circa 30 pazienti con tumori solidi avanzati senza mostrare tossicità intensa [14]. Negli studi clinici di fase II AS1411 ha esibito una promettente attività contro il carcinoma renale a cellule metastatiche e la leucemia mieloide acuta con minima tossicità [17].



Figura 1. Struttura dell'aptamero AS1411

L'aptamero **T40214** è un oligonucleotide 16-mer d(GGGCGGGCGGGCGGGC) che forma una stabile struttura G-quadruplex ed ha come target il dimero STAT3 a cui impedisce di legare il DNA [18]. La proteina STAT3 è un trasduttore di segnale e attivatore della trascrizione coinvolto nella differenziazione, proliferazione e apoptosi cellulare che risulta eccessivamente attivato in molti tipi di cancro umano [5]. La somministrazione di T40214 ha determinato una significativa riduzione dell'espressione di STAT3, un incremento dei processi dell'apoptosi e la soppressione nei topi dei tumori xeno-trapiantati alla prostata e al seno [19,20].

### **3.4 Aptameri antivirali formanti G-quadruplex**

Molte sequenze ricche di G sono state identificate come aptameri attivi contro agenti infettivi quali il virus dell'epatite C (HCV) e il *coronavirus* responsabile dell'insorgenza della sindrome acuta respiratoria grave (SARS-CoV) [21,22] ma la classe di antivirali formanti G-quadruplex di gran lunga più rappresentata è senz'altro quella contro il virus dell'immunodeficienza umana (HIV). Infatti, tra gli agenti anti-HIV molti sono aptameri che adottano strutture G-quadruplex ma che differiscono tra loro per il tipo di target coinvolto. Possono interagire con: a) la glicoproteina gp120 dell'*envelope* di HIV che lega i recettori cellulari CD4 o CCR5/CXCR4 favorendo l'ingresso del virus, b) l'integrasi o c) la trascrittasi inversa, inibendo rispettivamente, il legame e l'ingresso del virus nella cellula, l'integrazione virale nel genoma e la trascrizione inversa [23]. Una serie di esadesossiribonucleotidi (DBB-d(TGGGAG) e TBDPS-d(TGGGAG) con DBB = 3,4-dibenzilossibenzile e TBDPS = *tert*-butildifenilsilile) recanti varie modifiche all'estremità 3' o 5' e basati sulla cosiddetta **sequenza di Hotoda**, d(TGGGAG), sono stati sintetizzati e valutati *in vitro* per la loro attività anti-HIV dimostrando di essere

potenti inibitori della glicoproteina gp120 con valori di IC<sub>50</sub> tra sub-micromolare e nanomolare [24-27]. L'attività anti integrasi è stata riscontrata nel **93del**, un aptamero la cui sequenza d(GGGGTGGGAGGAGGGT) adotta una peculiare struttura G-quadruplex dimerica con interconnessioni (*interlocked*) e che esibisce un'attività inibitoria *in vitro* nell'ordine di grandezza delle nanomoli (Figura 2) [28,29].

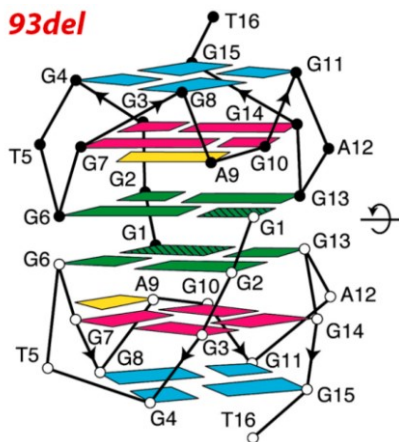


Figura 2. Struttura G-quadruplex dimerica di 93del

Una notevole inibizione dell'integrasi dell'HIV, con valori di IC<sub>50</sub> nel range delle nanomoli, è stata osservata anche per **T30177** (Figura 3). Si tratta di un aptamero la cui sequenza d(G\*TGGTGGGTGGGTGGG\*T) contiene legami internucleotidici fosforotioato alle estremità 5' e 3' (indicati dagli asterischi nella sequenza). Questo oligonucleotide ha mostrato un'inusuale ed elevata resistenza alle nucleasi in ambiente fisiologico dovuta alla sua capacità di formare strutture dimeriche stabili che coinvolgono 2 subunità G-quadruplex con filamenti paralleli e *loop propeller* [30]. T30177 è stato il primo inibitore dell'integrasi di HIV ad essere valutato in studi clinici (Zintervir, Aronex Pharmaceuticals) [31].

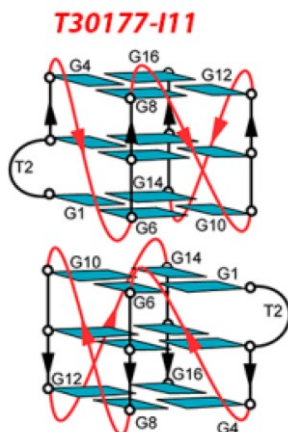


Figura 3. Struttura della G-quadruplex dimerica adottata da T30177-I11 in  $K^+$ .

## Bibliografia

- [1] J. Qu, S. Yu, Y. Zheng, Y. Zheng, H. Yang, J. Zhang, Aptamer and its applications in neurodegenerative diseases, *Cell. Mol. Life Sci.* (2016).
- [2] D.W. Drolet, L.S. Green, L. Gold, N. Janjic, Fit for the eye: aptamers in ocular disorders, *Nucleic Acid Ther.* 26 (2016) 127–146.
- [3] Y. Yu, C. Liang, Q. Lv, D. Li, X. Xu, B. Liu, A. Lu, G. Zhang, Molecular selection, modification and development of therapeutic oligonucleotide aptamers, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016) 358–376.
- [4] R.C. Becker, T. Povsic, M.G. Cohen, C.P. Rusconi, B. Sullenger, Nucleic acid aptamers as antithrombotic agents: opportunities in extracellular therapeutics, *Thromb. Haemost.* 103 (2010) 586–595.
- [5] B. Gatto, M. Palumbo, C. Sissi, Nucleic acid aptamers based on the G-quadruplex structure: therapeutic and diagnostic potential, *Curr. Med. Chem.* 16 (2009) 1248–1265.
- [6] M.T. Stubbs, W. Bode, The clot thickens: clues provided by thrombin structure, *Trends Biochem. Sci.* 20 (1995) 23–28.
- [7] L.C. Bock, L.C. Griffin, J.A. Latham, E.H. Vermaas, J.J. Toole, Selection of singlestranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin, *Nature* 355 (1992) 564–566.
- [8] D. Musumeci, D. Montesarchio, Polyvalent nucleic acid aptamers and modulation of their activity: a focus on the thrombin binding aptamer, *Pharmacol. Ther.* 136 (2012) 202–215.
- [9] <http://www.hcp.com/content5788.html2005> (accessed 18.09.2016).
- [10] Dapic V., Bates P. J., Trent J. O., Rodger A., Thomas S. D., Miller D. M. (2002): Antiproliferative activity of G-quartet-forming oligonucleotides with backbone and sugar modifications. *Biochemistry* 41, 3676–3685.
- [11] Bates P. J., Choi E. W., Nayak L. V. (2009): G-rich oligonucleotides for cancer treatment. *Methods Mol. Biol.* 542, 379–392.

- [12] Phillips J. A., Lopez-Colon D., Zhu Z., Xu Y., Tan W. (2008): Applications of aptamers in cancer cell biology. *Anal. Chim. Acta* 621, 101–108
- [13] Orava E. W., Cicmil N., Gariépy J. (2010): Delivering cargoes into cancer cells using DNA aptamers targeting internalized surface portals. *Biochim. Biophys. Acta* 1798, 2190–2200
- [14] P.J. Bates, D.A. Laber, D.M. Miller, S.D. Thomas, J.O. Trent, Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer, *Exp. Mol. Pathol.* 86 (2009) 151–164.
- [15] S. Soundararajan, L.Wang, V. Sridharan, W. Chen, N. Courtenay-Luck, D. Jones, E.K. Spicer, D.J. Fernandes, Plasma membrane nucleolin is a receptor for the anticancer aptamer AS1411 in MV4-11 leukemia cells, *Mol. Pharmacol.* 76 (2009) 984–991.
- [16] X. Wu, J. Chen, M. Wu, J.X. Zhao, Aptamers: active targeting ligands for cancer diagnosis and therapy, *Theranostics* 5 (2015) 322–344.
- [17] J.E. Rosenberg, R.M. Bambury, E.M. Van Allen, H.A. Drabkin, P.N. Lara Jr., A.L. Harzstark, N. Wagle, R.A. Figlin, G.W. Smith, T. Choueiri, F. Erlandsson, D.A. Laber, A phase II trial of the nucleolin-targeted DNA aptamer AS1411 in metastatic refractory renal cell carcinoma, *Investig. New Drugs* 32 (2014) 178–187.
- [18] N. Jing, Y. Li, X. Xu, W. Sha, P. Li, L. Feng, D.J. Twardy, Targeting Stat3 with G-quartet oligodeoxynucleotides in human cancer cells, *DNA Cell Biol.* 22 (2003) 685–696.
- [19] P. Weerasinghe, G.E. Garcia, Q. Zhu, P. Yuan, L. Feng, L. Mao, N. Jing, Inhibition of Stat3 activation and tumor growth suppression of non-small cell lung cancer by G-quartet oligonucleotides, *Int. J. Oncol.* 31 (2007) 129–136.
- [20] P. Weerasinghe, Y. Li, Y. Guan, R. Zhang, D.J. Twardy, N. Jing, T40214/PEI complex, a potent therapeutics for prostate cancer that targets STAT3 signaling, *Prostate* 68 (2008) 1430–1442.
- [21] T. Wandtke, J. Wozniak, P. Kopinski, Aptamers in diagnostics and treatment of viral infections, *Viruses* 7 (2015) 751–780.
- [22] M. Metifiot, S. Amrane, S. Litvak, M.L. Andreola, G-quadruplexes in viruses: function and potential therapeutic applications, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) 12352–12366.
- [23] D. Musumeci, C. Riccardi, D. Montesarchio, G-Quadruplex forming oligonucleotides as anti-HIV agents, *Molecules* 20 (2015) 17511–17532.
- [24] H. Hotoda, M. Koizumi, R. Koga, M. Kaneko, K. Momota, T. Ohmine, H. Furukawa, T. Agatsuma, T. Nishigaki, J. Sone, S. Tsutumi, T. Kosaka, K. Abe, S. Kimura, K. Shimada, Biologically active oligodeoxyribonucleotides. 5. 5'-End-substituted d(TGGGAG) possesses anti-human immunodeficiency virus type 1 activity by forming a G-quadruplex structure, *J. Med. Chem.* 41 (1998) 3655–3663.
- [25] V. D'Atri, G. Oliviero, J. Amato, N. Borbone, S. D'Errico, L. Mayol, V. Piccialli, S. Haider, B. Hoorelbeke, J. Balzarini, G. Piccialli, New anti-HIV aptamers based on tetra-end-linked DNA G-quadruplexes: effect of the base sequence on anti-HIV activity, *Chem. Commun.* 48 (2012) 9516–9518.
- [26] J. D'Onofrio, L. Petraccone, E. Erra, L. Martino, G. Di Fabio, L. De Napoli, C. Giancola, D. Montesarchio, 5'-Modified G-quadruplex forming oligonucleotides endowed with anti-HIV activity: synthesis and biophysical properties, *Bioconjug. Chem.* 18 (2007) 1194–1204.

- [27] G. Di Fabio, J. D'Onofrio, M. Chiapparelli, B. Hoorelbeke, D. Montesarchio, J. Balzarini, L. De Napoli, Discovery of novel anti-HIV active G-quadruplexforming oligonucleotides, *Chem. Commun.* 47 (2011) 2363–2365.
- [28] M. Metifiot, O. Leon, L. Tarrago-Litvak, S. Litvak, M.L. Andreola, Targeting HIV-1 integrase with aptamers selected against the purified RNase H domain of HIV-1 RT, *Biochimie* 87 (2005) 911–919.
- [29] V.R. De Soultrait, P.Y. Lozach, R. Altmeyer, L. Tarrago-Litvak, S. Litvak, M.L. Andreola, DNA aptamers derived from HIV-1 RNase H inhibitors are strong antiintegrase agents, *J. Mol. Biol.* 324 (2002) 195–203.
- [30] V.T. Mukundan, N.Q. Do, A.T. Phan, HIV-1 integrase inhibitor T30177 forms a stacked dimeric G-quadruplex structure containing bulges, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 8984–8991.
- [31] C. Marchand, K. Maddali, M. Metifiot, Y. Pommier, HIV-1 IN inhibitors: 2010 update and perspectives, *Curr. Top. Med. Chem.* 9 (2009) 1016–1037.



## **CAPITOLO 4: ATTIVITA' ANTICOAGULANTE DEL TBA**

### **4.1 Analoghi del TBA con migliori proprietà contenenti siti ad inversione di polarità: effetti strutturali dei residui extra alle estremità.**

#### **INTRODUZIONE**

Sebbene il TBA sia uno dei primi aptameri ad essere stato scoperto, esso suscita ancora interesse terapeutico ed è soggetto a numerosi studi. Esso è stato sottoposto a numerose modifiche chimiche riguardanti sia le basi che lo scheletro zucchero-fosfato principalmente rivolte a (i) migliorare l'affinità per la trombina, (ii) renderlo resistente in ambiente biologico, (iii) migliorare la stabilità termica in condizioni fisiologiche, (iv) favorire gli studi sull'interazione aptamero-target e recentemente (v) a cambiare la sua attività da anticoagulante ad antiproliferativa [1]. Un convincente numero di studi ha indicato che i *loop* sono le parti del TBA principalmente coinvolte nell'interazione con la trombina, pertanto, la maggior parte delle modifiche rivolte ad incrementare l'affinità al target e quindi l'attività anticoagulante, hanno coinvolto i residui presenti nei *loop*. Ad esempio, sono stati studiati analoghi del TBA in cui le timidine naturali dei *loop* sono state sostituite con derivati modificati. Tra questi vi sono: i residui *locked nucleic acid* (LNA-T) [2], i residui *unlocked nucleic acid* (UNA-U) [3] e altri tipi di timidine acicliche [4], L-residui [5], D- e L-isotimidine [6], 5-idrossimetil- [7] e 5-fluoro-2'-desossipuridine [8]. D'altro canto, residui specifici nei *loop* possono anche contribuire alla stabilità termica, che a sua volta, è fondamentale associata all'attività biologica se si prendono in considerazione le basse temperature di fusione (*melting*) mostrate dal TBA in condizioni fisiologiche in cui c'è una prevalenza di ioni Na<sup>+</sup>. Generalmente, una migliore stabilità o attività biologica (o entrambe, in specifici casi) può essere

ottenuta modificando i residui T3, T7 e T12 [3,4]. Al contrario, solo in un caso [8], modifiche riguardanti i residui T4 e T13 hanno portato a migliori proprietà del TBA mentre la maggior parte delle alterazioni a carico di questi residui e, talvolta anche al T9, hanno dimostrato di essere dannose sia per la stabilità che per l'attività anticoagulante [3a, 4a, 6]. Un minor numero di studi è stato rivolto a migliorare la resistenza alle nucleasi. Ad esempio, analoghi del TBA contenenti 2'-desossi-2'-fluoroarabinonucleotidi [9], L-residui [5] o legami internucleotidici tiofosforilici [10] o triazolici [11] sono stati proposti senza particolari miglioramenti rispetto al TBA. Recentemente, è stata proposta una semplice modifica che consiste nell'aggiunta di un ulteriore residuo all'estremità 3' o ad entrambe le estremità della sequenza del TBA, legato attraverso legami fosfodiesterici 3'-3' o 5'-5' (Tabella 1) [12].

Name	Sequence
TBA	5'-G <sub>1</sub> G <sub>2</sub> T <sub>3</sub> T <sub>4</sub> G <sub>5</sub> G <sub>6</sub> T <sub>7</sub> G <sub>8</sub> T <sub>9</sub> G <sub>10</sub> G <sub>11</sub> T <sub>12</sub> T <sub>13</sub> G <sub>14</sub> G <sub>15</sub> -3'
TBA-A	5'-G <sub>1</sub> G <sub>2</sub> T <sub>3</sub> T <sub>4</sub> G <sub>5</sub> G <sub>6</sub> T <sub>7</sub> G <sub>8</sub> T <sub>9</sub> G <sub>10</sub> G <sub>11</sub> T <sub>12</sub> T <sub>13</sub> G <sub>14</sub> G <sub>15</sub> -3'-3'-A <sub>16</sub>
TBA-T	5'-G <sub>1</sub> G <sub>2</sub> T <sub>3</sub> T <sub>4</sub> G <sub>5</sub> G <sub>6</sub> T <sub>7</sub> G <sub>8</sub> T <sub>9</sub> G <sub>10</sub> G <sub>11</sub> T <sub>12</sub> T <sub>13</sub> G <sub>14</sub> G <sub>15</sub> -3'-3'-T <sub>16</sub>
T-TBA-A	T <sub>0</sub> -5'-5'-G <sub>1</sub> G <sub>2</sub> T <sub>3</sub> T <sub>4</sub> G <sub>5</sub> G <sub>6</sub> T <sub>7</sub> G <sub>8</sub> T <sub>9</sub> G <sub>10</sub> G <sub>11</sub> T <sub>12</sub> T <sub>13</sub> G <sub>14</sub> G <sub>15</sub> -3'-3'-A <sub>16</sub>
A-TBA-T	A <sub>0</sub> -5'-5'-G <sub>1</sub> G <sub>2</sub> T <sub>3</sub> T <sub>4</sub> G <sub>5</sub> G <sub>6</sub> T <sub>7</sub> G <sub>8</sub> T <sub>9</sub> G <sub>10</sub> G <sub>11</sub> T <sub>12</sub> T <sub>13</sub> G <sub>14</sub> G <sub>15</sub> -3'-3'-T <sub>16</sub>
TBA-G	5'-G <sub>1</sub> G <sub>2</sub> T <sub>3</sub> T <sub>4</sub> G <sub>5</sub> G <sub>6</sub> T <sub>7</sub> G <sub>8</sub> T <sub>9</sub> G <sub>10</sub> G <sub>11</sub> T <sub>12</sub> T <sub>13</sub> G <sub>14</sub> G <sub>15</sub> -3'-3'-G <sub>16</sub>
TBA-C	5'-G <sub>1</sub> G <sub>2</sub> T <sub>3</sub> T <sub>4</sub> G <sub>5</sub> G <sub>6</sub> T <sub>7</sub> G <sub>8</sub> T <sub>9</sub> G <sub>10</sub> G <sub>11</sub> T <sub>12</sub> T <sub>13</sub> G <sub>14</sub> G <sub>15</sub> -3'-3'-C <sub>16</sub>
C-TBA-G	C <sub>0</sub> -5'-5'-G <sub>1</sub> G <sub>2</sub> T <sub>3</sub> T <sub>4</sub> G <sub>5</sub> G <sub>6</sub> T <sub>7</sub> G <sub>8</sub> T <sub>9</sub> G <sub>10</sub> G <sub>11</sub> T <sub>12</sub> T <sub>13</sub> G <sub>14</sub> G <sub>15</sub> -3'-3'-G <sub>16</sub>
G-TBA-C	G <sub>0</sub> -5'-5'-G <sub>1</sub> G <sub>2</sub> T <sub>3</sub> T <sub>4</sub> G <sub>5</sub> G <sub>6</sub> T <sub>7</sub> G <sub>8</sub> T <sub>9</sub> G <sub>10</sub> G <sub>11</sub> T <sub>12</sub> T <sub>13</sub> G <sub>14</sub> G <sub>15</sub> -3'-3'-C <sub>16</sub>
TBA-A nat	5'-G <sub>1</sub> G <sub>2</sub> T <sub>3</sub> T <sub>4</sub> G <sub>5</sub> G <sub>6</sub> T <sub>7</sub> G <sub>8</sub> T <sub>9</sub> G <sub>10</sub> G <sub>11</sub> T <sub>12</sub> T <sub>13</sub> G <sub>14</sub> G <sub>15</sub> A <sub>16</sub> -3'
TBA-T nat	5'-G <sub>1</sub> G <sub>2</sub> T <sub>3</sub> T <sub>4</sub> G <sub>5</sub> G <sub>6</sub> T <sub>7</sub> G <sub>8</sub> T <sub>9</sub> G <sub>10</sub> G <sub>11</sub> T <sub>12</sub> T <sub>13</sub> G <sub>14</sub> G <sub>15</sub> T <sub>16</sub> -3'

Tabella 1. Sequenze e numerazione dei residui degli oligonucleotidi studiati. I residui extra sono stati contrassegnati come N<sub>0</sub> (inversione 5'-5') e N<sub>16</sub> (inversione 3'-3')

Un vantaggio di questa facile modifica consiste nel non influenzare negativamente le conformazioni dei *loop* TT che sono quelli maggiormente responsabili dell'interazione con la proteina target. Infatti, oltre a migliorare tutti gli aptameri modificati conferendo loro una notevole resistenza in ambiente biologico, questo approccio ha anche fornito alcuni derivati che rispetto alla loro controparte naturale, mostrano stabilità termiche di gran lunga più alte e migliori affinità per la trombina.

Con l'obiettivo di ottenere una maggiore comprensione circa gli effetti di queste modifiche sulla struttura delle G-quadruplex e sulla loro relazione con la stabilità termica, in questo lavoro, abbiamo riportato un'analisi strutturale e chimico-fisica dei più interessanti derivati del TBA, mediante esperimenti NMR, elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE), esperimenti di denaturazione termica al dicroismo circolare (CD) e di modellistica molecolare. Tra i derivati del TBA che hanno mostrato caratteristiche idonee degli spettri NMR e una conformazione prevalente, sono stati studiati quelli caratterizzati da stabilità termiche e/o affinità per la trombina simili o più elevate del TBA naturale. In particolare, l'attenzione è stata focalizzata sul TBA-A (Figura 1) che, tra i derivati caratterizzati da una più alta affinità per il target rispetto al TBA, ha anche mostrato un più alto incremento della temperatura di *melting* ( $\Delta T_m = +11$  °C), nel tentativo di comprendere le origini di questa extra stabilità ed in vista di estendere questa semplice modifica ad altri aptameri biologicamente promettenti che formano G-quadruplex. Inoltre, sono state confrontate le strutture di TBA-A e TBA-T in modo da evidenziare le differenze nel loro comportamento.

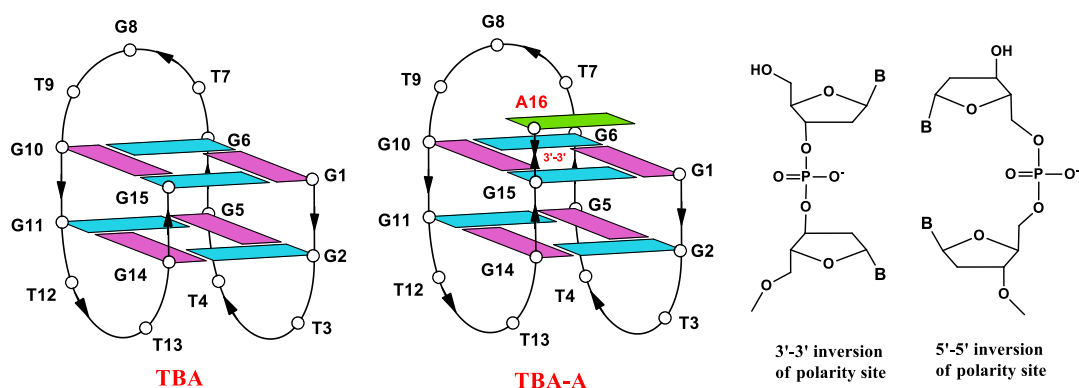
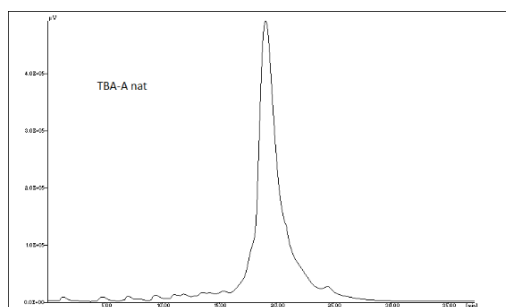


Figura 1. Rappresentazione schematica delle strutture G-quadruplex del TBA e del TBA-A. Le deossiguanosine nelle conformazioni *sin* ed *anti* sono rispettivamente in viola e in azzurro. La deossiadenosina extra è in verde. Sulla destra sono riportate le strutture chimiche dei siti ad inversione di polarità 3'-3' e 5'-5'.

### 4.1.1 SEZIONE SPERIMENTALE

#### *Sintesi e purificazione degli oligonucleotidi*

Gli oligonucleotidi contenenti siti ad inversione di polarità sono stati sintetizzati e purificati come precedentemente riportato [12]. Gli oligonucleotidi TBA-nat e TBA-T sono stati sintetizzati mediante un sintetizzatore Millipore Cyclone Plus DNA sfruttando la chimica in fase solida del  $\beta$ -cianoetilfosforamidito su scala 15  $\mu$ mol. Gli oligomeri sono stati rimossi dal supporto solido e deprotetti mediante trattamento con una soluzione acquosa di ammoniaca concentrata a 80% per 12 h. La miscela è stata quindi filtrata, lavata e successivamente concentrata a pressione ridotta. In seguito è stata ridisciolta in H<sub>2</sub>O ed analizzata e purificata mediante cromatografia liquida ad elevata prestazione (HPLC) su una colonna Nucleogel SAX (Macherey–Nagel, 1000-8/46) con gli eluenti: tampone A: 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in soluzione acquosa a pH7.0 contenente 20% (v/v) CH<sub>3</sub>CN e tampone B: 1 M NaCl, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in soluzione acquosa a pH7.0 contenente 20% (v/v) CH<sub>3</sub>CN. Per l'eluizione del campione è stato usato un gradiente lineare da 0 a 100% di B in 45 min ad una velocità di flusso di 1.0 ml/min. Le frazioni degli oligomeri sono state raccolte e successivamente desalificate su colonne Sep-Pak (C18). Gli oligomeri isolati hanno dimostrato di essere puri all'HPLC più del 98% (Figura 2).



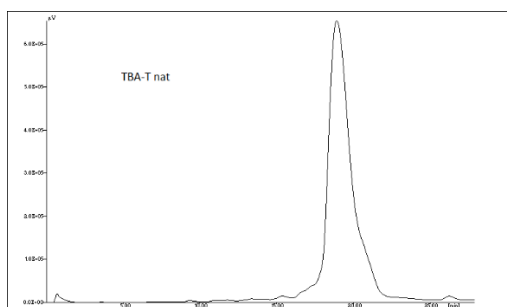


Figura 2. Cromatogrammi HPLC di TBA-A nat e TBA-T nat purificati. Vedi la sezione sperimentale per i dettagli.

### ***Spettroscopia NMR e modellistica molecolare***

I campioni NMR sono stati preparati ad una concentrazione di circa 2 mM in 0.6 ml ( $H_2O/D_2O$  9:1 v/v) in una soluzione tampone PBS (pH 7.0) e 0.2 mM di EDTA. Tutti i campioni sono stati riscaldati per 5-10 min a 80 °C e lentamente raffreddati (10-12 ore) a temperatura ambiente. Le soluzioni sono state equilibrate per 24 h a 4°C. Il processo di *annealing* è stato ritenuto completo quando gli spettri  $H^1$  NMR risultavano sovrapponibili al variare del tempo. Gli spettri NMR sono stati registrati su uno spettrometro Varian Unity INOVA 700 MHz. Gli spettri protonici monodimensionali dei campioni in  $H_2O$  sono stati registrati usando la sequenza di gradienti *pulsed-field* DPGSE per la soppressione del segnale dell'acqua [13]. I segnali relativi ai protoni del sodio 2,2-dimetil-2-silapentan-5-solfonato (DSS) sono stati usati come riferimento per i *chemical shift* dei protoni ( $^1H$ ). Per gli esperimenti in  $H_2O$  NOESY [14] (con *mixing times* di 250 e 180 ms) e TOCSY [15] (con *mixing time* di 120 ms) è stata usata la sequenza di gradienti DPGSE. Tutti gli esperimenti sono stati registrati usando la procedura STATES-TPPI per la *quadrature detection* [16]. In tutti gli esperimenti 2D, i dati nel dominio del tempo consistono di 2048 punti complessi in  $t_2$  e 400–512 *fids* nella dimensione  $t_1$ . Il tempo di rilassamento è stato settato a 1.2 s per tutti gli esperimenti.

Le principali caratteristiche conformazionali delle G-quadruplex adottate da TBA-A e TBA-T sono state esplorate mediante uno studio di modellistica molecolare. Sono stati usati il campo di forze ed il set di atomi CVFF [17]. Le coordinate iniziali per i modelli di partenza di TBA-A e TBA-T sono state ricavate dalla struttura NMR in soluzione della G-quadruplex d(GGTTGGTGTGGTTGG) (Protein Data Bank entry number 148D) con il primo e più rappresentativo conformero dei 12 disponibili proposti da Feigon [18]. I modelli iniziali G-quadruplex 5'G<sub>1</sub>G<sub>2</sub>T<sub>3</sub>T<sub>4</sub>G<sub>5</sub>G<sub>6</sub>T<sub>7</sub>G<sub>8</sub>T<sub>9</sub>G<sub>10</sub>G<sub>11</sub>T<sub>12</sub>T<sub>13</sub>G<sub>14</sub>G<sub>15</sub>3'-3'A<sub>16</sub> (TBA-A) e 5'G<sub>1</sub>G<sub>2</sub>T<sub>3</sub>T<sub>4</sub>G<sub>5</sub>G<sub>6</sub>T<sub>7</sub>G<sub>8</sub>T<sub>9</sub>G<sub>10</sub>G<sub>11</sub>T<sub>12</sub>T<sub>13</sub>G<sub>14</sub>G<sub>15</sub>3'-3'T<sub>16</sub> (TBA-T) sono stati costruiti aggiungendo un residuo extra di adenosina o timidina, rispettivamente, all'estremità 3' della sequenza del TBA, collegati attraverso un legame fosfodiesterico 3'-3', usando il *Builder building tool di Discover*. I calcoli sono stati eseguiti usando una costante dielettrica macroscopica dipendente dalla distanza di 4r e un limite di esclusione infinito per le interazioni di non legame per compensare parzialmente l'assenza del solvente usato [19]. Usando i metodi *steepest descent* seguito da quello quasi-Newton Raphson (VA09A), l'energia conformazionale di ciascun complesso è stata minimizzata fino al raggiungimento di un gradiente RMS di 0.1 kcal/mol Å. Le figure delle strutture sono state generate utilizzando il programma INSIGHT II, versione 2005 (Accelrys, San Diego, CA, USA). Tutti i calcoli sono stati eseguiti su un PC running Linux ES 2.6.9.

### **Misure di denaturazione termica al CD**

I campioni CD degli oligonucleotidi modificati e delle loro controparti naturali sono stati preparati ad una concentrazione 100 µM utilizzando un tampone PBS o un tampone potassio (10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 70 mM KCl, pH 7.0) e sottoposti alla procedura di *annealing* (riscaldando a 90°C e facendo raffreddare lentamente fino a temperatura ambiente). Per tutte le G-quadruplex, le curve di fusione sono state

registrate in funzione della temperatura, da 20 a 90°C, alle lunghezze d'onda corrispondenti al loro massimo effetto Cotton. I dati CD sono stati registrati utilizzando una cuvetta con un cammino ottico di 0,1 cm e con una velocità di scansione di 0.5 °C/min. Le curve di *melting* sono state adattate ad una transizione a due stati in accordo con l'analisi di van't Hoff [20]. Le temperature di *melting* ( $T_m$ ) e i valori delle variazioni di entalpia ( $\Delta H_{v.H.}$ ) e di entropia ( $\Delta S_{v.H.}$ ) (Tabella 3) forniscono il migliore adeguamento ai dati sperimentali di fusione.

### ***Elettroforesi su gel***

Tutti gli oligonucleotidi sono stati analizzati mediante PAGE non denaturante. I campioni nel tampone NMR sono stati caricati su un gel di poliacrilammide al 20% contenente Tris-Borato-EDTA (TBE) 2.5× e NaCl 50 mM. Il tampone di corsa utilizzato è stato TBE 1x contenente 100 mM NaCl. Per tutti i campioni, appena prima di caricare è stata aggiunta una soluzione di glicerolo/TBE1x con 100 mM NaCl 2:1. L'elettroforesi è stata eseguita a 8 V cm<sup>-1</sup> ad una temperatura prossima a 10°C. Le bande sono state visualizzate mediante *UV shadowing*.

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

### ***Spettroscopia NMR e modellistica molecolare***

Lo spettro monodimensionale H<sup>1</sup> NMR (700 MHz, T = 25 °C) di tutti tutti gli aptameri modificati nelle condizioni tampone usate (PBS) (vedi la parte sperimentale per i dettagli) mostra la presenza di non meno di 8 segnali ben definiti nella regione 11.5-12.3 ppm attribuibili ai protoni immidici coinvolti nei legami a H di tipo Hoogsteen di almeno 2 tetradi. Inoltre, si rilevano più di 15 segnali principali nella regione aromatica dovuti alla presenza dei protoni delle basi dei residui extra che si aggiungono ai 9 protoni H8 delle guanine e ai 6 protoni H6 delle timine. Riguardo

agli analoghi TBA-A, TBA-T, A-TBA-T, TBA-G, TBA-C, il semplice aspetto dei loro spettri 1D indica che questi oligomeri formano un'unica conformazione principale ben definita (Figura 3). In alcuni casi, si osservano deboli segnali nella regione aromatica di alcuni campioni, probabilmente attribuibili alle specie non strutturate, considerando che le loro intensità relative risultano sensibili ai cambiamenti di temperatura (dati non mostrati). Dall'altra parte, nel caso dei T-TBA-A, G-TBA-C e C-TBA-G, le risonanze dei protoni immidici sono distribuite su una regione spettrale più ampia (10.5–12.8 ppm) ma soprattutto i loro segnali sono più di 8 ovvero quelli previsti per 2 tetradi di G (Figura 4).

Tenendo in considerazione la buona qualità degli spettri  $^1\text{H}$  NMR degli analoghi TBA-A, TBA-T, A-TBA-T, TBA-G e TBA-C insieme ai dati riguardanti gli esperimenti di stabilità termica e il test di affinità alla trombina [12], l'attenzione è stata focalizzata su questi 5 analoghi effettuando ulteriori studi NMR. Una combinazione delle analisi degli spettri 2D NOESY (Figure 5 e 6) e TOCSY (dati non mostrati) ci ha permesso di ottenere un'assegnazione quasi completa dei protoni non scambiabili (Tabelle 2-6).

Tutti i 5 analoghi studiati in dettaglio condividono le caratteristiche NMR descritte di seguito. Le intensità dei *crosspeak* NOESY tra i segnali dei protoni delle basi aromatiche e quelli H1' dello zucchero indicano che le quattro guanosine ( $G_1$ ,  $G_5$ ,  $G_{10}$  e  $G_{14}$ ) adottano conformazioni glicosidiche *syn* mentre le cinque guanosine ( $G_2$ ,  $G_6$ ,  $G_8$ ,  $G_{11}$  e  $G_{15}$ ) adottano conformazioni *anti*. I segnali H8 delle G *syn* sono spostati a campi più bassi di quelle G *anti* [21]. D'altronde tutte le timidine e i residui extra mostrano conformazioni glicosidiche *anti*. I pattern dei *crosspeak* mostrano che le quattro guanosine *anti* ( $G_2$ ,  $G_6$ ,  $G_{11}$  e  $G_{15}$ ) danno luogo a classiche connettività sequenziali H8/H2'–H2'' coi residui vicini 5' *syn*-G ( $G_1$ ,  $G_5$ ,  $G_{10}$  e  $G_{14}$ ) indicando così che le subunità 5'- $G_1G_2$ -3', 5'- $G_5G_6$ -3', 5'- $G_{10}G_{11}$ -3' e 5'- $G_{14}G_{15}$ -3' sono coinvolte nella formazione di una struttura elicoidale a quattro filamenti. In sintesi, come osservato



per il TBA non modificato, ci sono tratti 5'-GsynGanti-3' lungo ciascun filamento che connettono le due tetradi [22] Inoltre, l'intero pattern dei NOE osservato per tutte le citate guanosine indica che la conformazione del *backbone* di questi tratti somiglia a quelle del TBA canonico, che adotta una struttura elicoidale destrorsa. L'alternanza di residui di G *syn* e *anti* all'interno di ciascun filamento suggerisce che, come nel caso del TBA naturale, tutti gli oligomeri modificati ripiegano in una struttura G-quadruplex monomolecolare "a sedia" (chair-like), caratterizzata da due tetradi di G.

Visto che i NOEs interesiduo sono generalmente deboli per i tratti 5'-*anti-syn*-3' steps [23], ci sono due segmenti di connettività 5'-GGTT-3' cioè 5'-G<sub>1</sub>G<sub>2</sub>T<sub>3</sub>T<sub>4</sub>-3' e 5'-G<sub>10</sub>G<sub>11</sub>T<sub>12</sub>T<sub>13</sub>-3' (in cui i residui G *syn* sono sottolineati). Inoltre connettività aggiuntive sono presenti per i segmenti 5'-G<sub>5</sub>G<sub>6</sub>T<sub>7</sub>G<sub>8</sub>T<sub>9</sub>-3' e 5'-G<sub>14</sub>G<sub>15</sub>-3' e i corrispondenti tratti, identificati sulla base delle connettività *anti-anti*. Non ci sono connettività sequenziali tra le timidine dal lato 3' in ciascun *loop* (T<sub>4</sub>, T<sub>9</sub> e T<sub>13</sub>) e le *syn*-G successive.

Questi tratti di connettività sequenziali da due a quattro residui sono stati ordinati tenendo in considerazione la sequenza primaria e l'informazione delle connettività NOE *long-range*.

Come nel caso del TBA originario, per tutti i TBA modificati studiati, c'è un numero di connettività NOE osservato tra i residui non adiacenti nella sequenza. In particolare, segnali NOE sono presenti tra il protone H8 di G<sub>2</sub> e il metile, H2' e H2'' di T<sub>4</sub> e tra il protone H8 di G<sub>11</sub> e il metile, H2' e H2'' di T<sub>13</sub>. Un'informazione complementare è fornita dai segnali NOE tra il metile di T<sub>4</sub> con H1', H2' e H2'' di G<sub>2</sub> e dal metile di T<sub>13</sub> con H1', H2' e H2'' di G<sub>11</sub>. Questa raccolta di segnali NOE colloca i residui T<sub>4</sub> e T<sub>13</sub> vicini alla tetrate G<sub>2</sub>-G<sub>5</sub>-G<sub>11</sub>-G<sub>14</sub>. Connettività NOE ci sono anche tra il protone H8 di G<sub>8</sub> e H1', H2' e H2'' di G<sub>6</sub> e tra H1' di T<sub>9</sub> e H8 di G<sub>15</sub>, indicando così che i residui G<sub>8</sub> e T<sub>9</sub> nel *loop* TGT sono vicini alla tetrate G<sub>1</sub>-G<sub>6</sub>-G<sub>10</sub>-G<sub>15</sub>. Questa

raccolta di segnali NOE mostra che, come fortemente suggerito dai dati CD [12], tutti i TBA modificati studiati mediante NMR adottano strutture G-quadruplex strettamente somiglianti a quella della loro controparte naturale.

Un dato importante è che i TBA modificati sono caratterizzati da segnali NOE addizionali tra i residui extra adiacenti ai siti ad inversione di polarità e le deossiguanosine della tetrate superiore. In particolare, sono state osservate connettività NOE tra H1'/G<sub>15</sub> e H2' e H2''/A<sub>16</sub>, H2''/G<sub>10</sub> e H8/A<sub>16</sub>, per TBA-A (Figura 5); H2''/G<sub>15</sub> e H8/G<sub>16</sub> per TBA-G; H8/G<sub>1</sub> e CH<sub>3</sub>/T<sub>16</sub>, H8/G<sub>15</sub> e H1'/T<sub>16</sub> per TBA-T; H6/C<sub>16</sub> e H1'/G<sub>15</sub> per TBA-C; H8/G<sub>1</sub> e CH<sub>3</sub>/T<sub>16</sub>, H8/G<sub>1</sub> e H2' e H2''/A<sub>0</sub>, H6/T<sub>16</sub> e H2' e H2''/A<sub>0</sub> nel caso di A-TBA-T (Figura 6). Questo insieme di contatti NOE suggerisce che i residui extra nei sopra citati campioni non sono orientati casualmente ma sono posizionati sulla parte superiore della tetrate di G. Al fine di corroborare la validità di queste considerazioni sono stati costruiti dei modelli molecolari di TBA-A e TBA-T (Figure 7 e 8). Sono stati scelti questi analoghi del TBA poiché sono tra i più stabili della serie. Come atteso, l'inserzione di un residuo extra di adenosina o timidina con un sito ad inversione di polarità 3'-3' non influenza in modo significativo la conformazione generale delle strutture G-quadruplex modificate, paragonate al TBA originario, come già suggerito dai dati NMR. È comunque degno di nota che, nel caso di TBA-A, una rigorosa disamina delle regioni che includono la tetrate superiore con l'adenosina extra 3'-3' (A<sub>16</sub>) e il loop TGT rivela un particolare tipo di intercalazione in cui A<sub>16</sub> è inserita tra i residui T<sub>9</sub> e G<sub>15</sub> permettendo così tra loro un'interazione di *stacking* molto efficiente (Figura 8). Questo particolare arrangiamento rende possibile la presenza di legami H tra N1 di A<sub>16</sub> e (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> di G<sub>8</sub> e, inoltre, tra il 5'-OH di A<sub>16</sub> e O4 di T<sub>9</sub>. Un'altra significativa differenza tra TBA-A e TBA riguardante la posizione del residuo T<sub>7</sub> è che, nell'aptamero modificato, esso è posto nelle vicinanze della G-tetrate superiore mentre nel TBA originario si trova lontano dal *core* della struttura G-quadruplex rendendolo, così, esposto al solvente

(Figura 7). Per quanto riguarda il modello del TBA-T, il residuo extra  $T_{16}$  mostra un comportamento simile ad  $A_{16}$  nel TBA-A, essendo intercalato tra i residui  $T_9$  e  $G_{15}$ . Tuttavia, in questo caso, non sono stati osservati legami H che coinvolgano il residuo extra e il residuo  $T_9$  è meno efficientemente impilato sul residuo extra  $T_{16}$ . Queste differenze potrebbero essere responsabili della più alta temperatura di *melting* osservata per il TBA-A. Inoltre, diversamente dal TBA-A, il residuo  $T_7$  nel TBA-T si posiziona verso l'esterno, similmente al TBA.

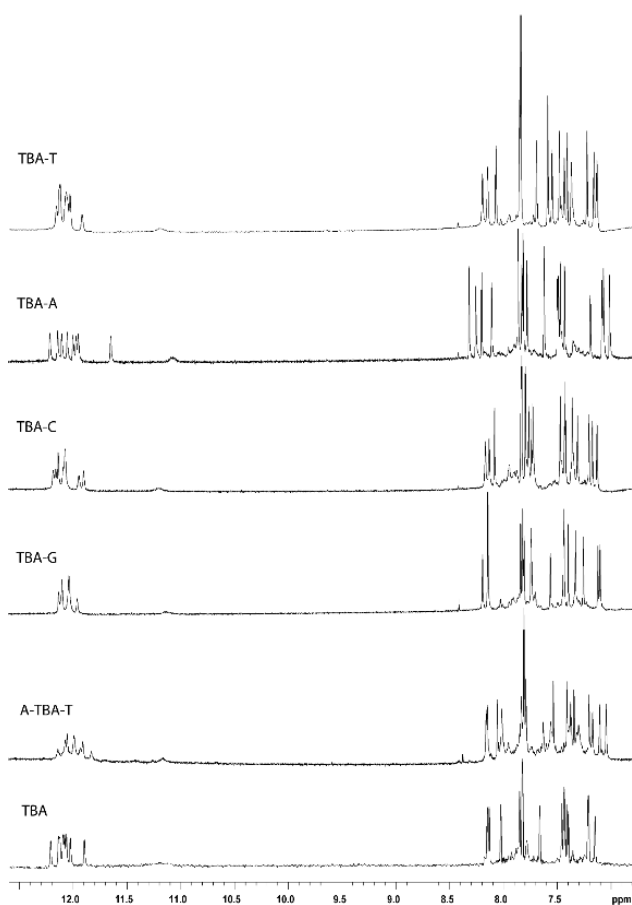


Figura 3. Regioni dei protoni imidici e aromatici degli spettri  $H^1$  NMR (700 MHz,  $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ ) degli analoghi del TBA e della loro controparte naturale nella soluzione tampone PBS ( $H_2O/D_2O$  9 : 1) e 0.2 mM EDTA (pH 7.0).

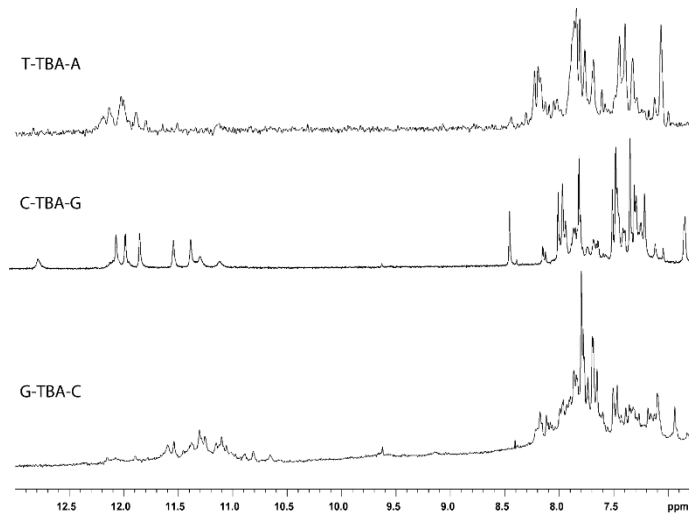


Figura 4. Regioni dei protoni immidici e aromatici degli spettri  $H^1$  NMR (700 MHz,  $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ ) degli analoghi del TBA T-TBA-A, C-TBA-G and G-TBA-C nella soluzione tampone PBS ( $H_2O/D_2O$  9 : 1) e 0.2 mM EDTA (pH 7.0).

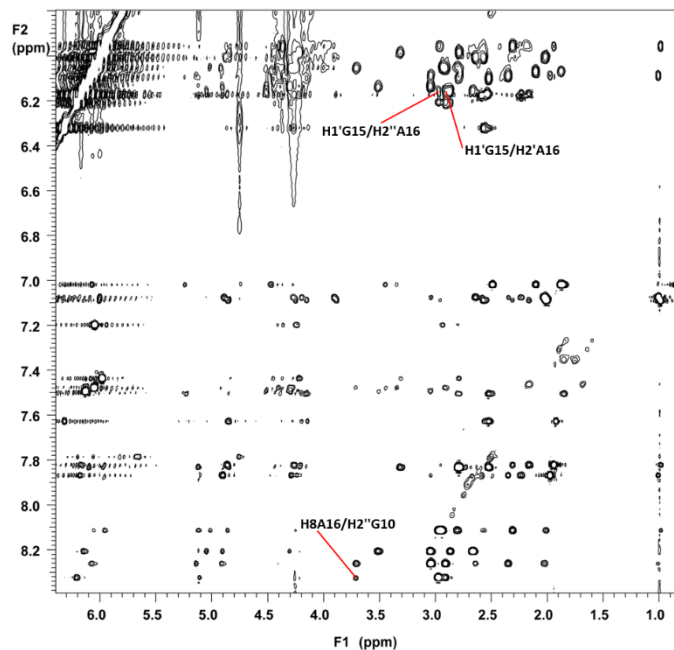
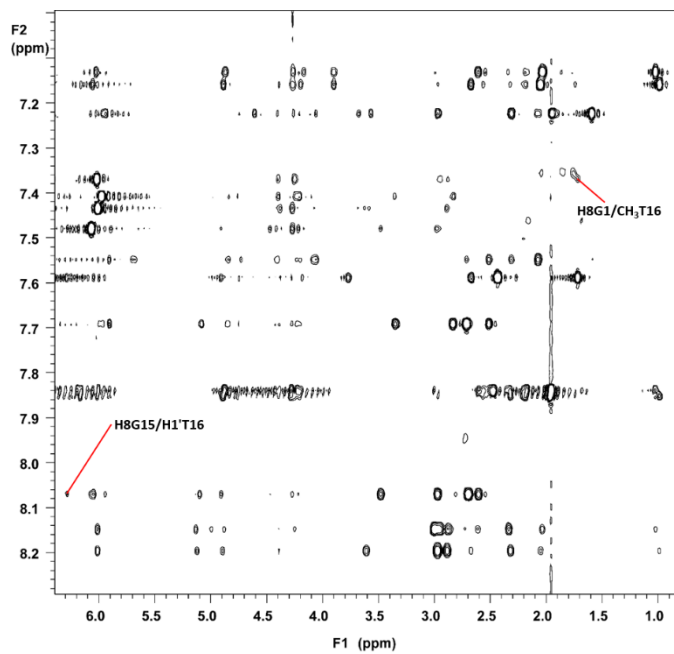
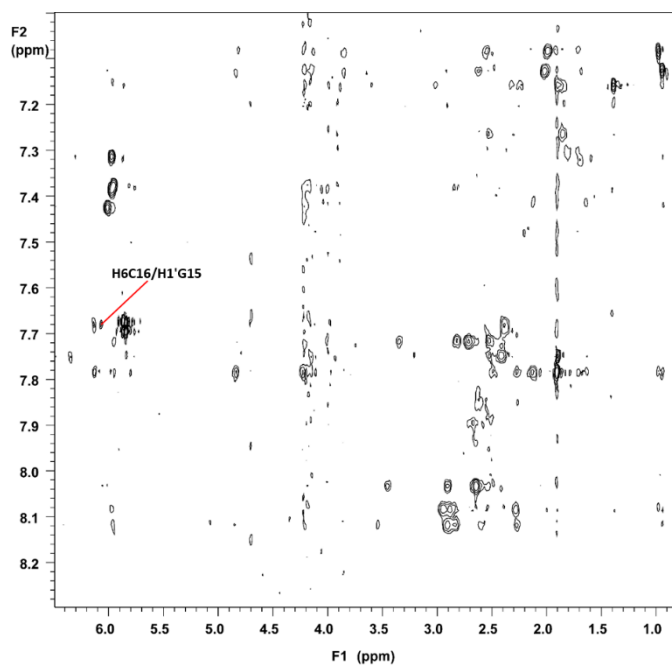


Figura 5. Regione espansa dello spettro 2D NOESY del TBA-A (700 MHz;  $25\text{ }^\circ\text{C}$ ; concentrazione 2 mM in soluzione tampone PBS ( $H_2O/D_2O$  9 : 1) e 0.2 mM EDTA (pH 7.0); volume totale 0.6 ml; *mixing time* 180 ms) che correla i protoni H8/H6 delle basi e quello anomero coi protoni dello zucchero. I segnali NOE che riguardano il residuo extra sono stati evidenziati.

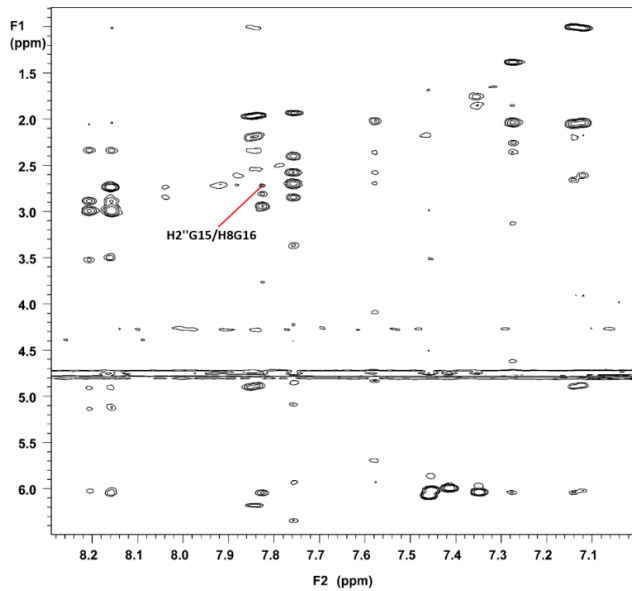
## TBA-T



## TBA-C



## TBA-G



## A-TBA-T

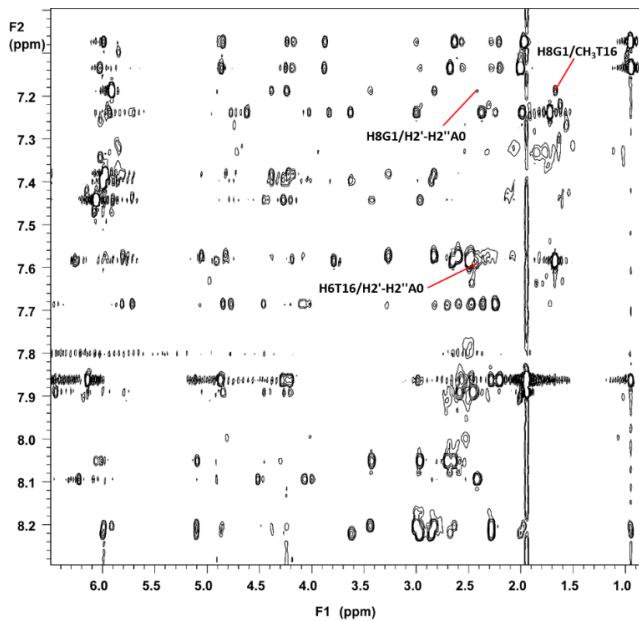


Figura 6. Regioni espanse degli spettri 2D NOESY del TBA-T, TBA-C, TBA-G e A-TBA-T (700 MHz; 25 °C; concentrazione 2 mM in soluzione tampone PBS (H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9: 1) e 0.2 mM EDTA (pH 7.0); volume totale 0.6 ml; *mixing time* 180 ms) che correla i protoni H8/H6 delle basi e quello anomero coi protoni dello zucchero. I segnali NOE coinvolgenti il residuo extra sono evidenziati.

<b>A-TBA-T</b> A <sub>0</sub> 5'-5' <u>G</u> <sub>1</sub> G <sub>2</sub> T <sub>3</sub> T <sub>4</sub> G <sub>5</sub> G <sub>6</sub> T <sub>7</sub> G <sub>8</sub> T <sub>9</sub> G <sub>10</sub> G <sub>11</sub> T <sub>12</sub> T <sub>13</sub> G <sub>14</sub> G <sub>15</sub> 3'-3'T <sub>16</sub>							
	H8/H6	H1'	H2'/H2''	H3'	H4'	H5'/H5''	CH <sub>3</sub> /H2
A <sub>0</sub>	8.10	6.23	2.43	4.52	4.45	4.07/4.00	7.81
<u>G</u> <sub>1</sub>	7.19	5.91	2.83/3.44	4.90	-	4.39/4.24	
G <sub>2</sub>	8.21	5.99	2.28/3.00	5.10	4.86	4.39/4.24	
T <sub>3</sub>	7.86	6.14	2.20/2.56	4.87	-	4.28/4.22	1.95
T <sub>4</sub>	7.08	5.99	1.97/2.64	4.85	4.24	4.17/3.87	0.95
<u>G</u> <sub>5</sub>	7.38	5.98	2.84/3.27	4.82	4.39	4.22/4.18	
G <sub>6</sub>	7.58	5.81	2.47/2.60	5.05	4.38	4.08	
T <sub>7</sub>	7.89	6.45	2.46/2.58	4.85	4.45	4.26/4.20	1.95
G <sub>8</sub>	7.69	5.71	2.25/2.36	4.77	4.46	4.08/4.02	
T <sub>9</sub>	7.24	5.93	1.99/2.38	4.62	4.02	3.83/3.63	1.72
<u>G</u> <sub>10</sub>	7.40	6.00	2.86/3.62	-	4.39	4.28/4.24	
G <sub>11</sub>	8.22	6.00	2.28/2.97	5.10	4.38	-	
T <sub>12</sub>	7.86	6.14	2.20/2.56	4.87	-	4.28/4.22	1.95
T <sub>13</sub>	7.14	6.03	2.01/2.68	4.86	4.25	4.19/3.88	0.95
<u>G</u> <sub>14</sub>	7.44	6.06	2.97/3.42	-	4.44	4.27/4.20	
G <sub>15</sub>	8.05	6.01	2.64/2.70	5.09	4.30	-	
T <sub>16</sub>	7.59	6.27	2.50/2.65	4.92	4.18	3.79	1.67

Tabella 2. Assegnazione dei *chemical shift* protonici della struttura G-quadruplex formata dall'oligonucleotide A-TBA-T (700 MHz; 25°C) in soluzione tampone PBS (H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1) e 0.2 mM EDTA (pH 7.0). Le deossiguanosine che adottano conformazione *syn* sono sottolineate. I trattini indicano valori non determinati.

<b>TBA-G</b> 5'G <sub>1</sub> G <sub>2</sub> T <sub>3</sub> T <sub>4</sub> G <sub>5</sub> G <sub>6</sub> T <sub>7</sub> G <sub>8</sub> T <sub>9</sub> G <sub>10</sub> G <sub>11</sub> T <sub>12</sub> T <sub>13</sub> G <sub>14</sub> G <sub>15</sub> 3'-3'G <sub>16</sub>							
	H8/H6	H1'	H2'/H2''	H3'	H4'	H5'/H5''	CH <sub>3</sub>
<u>G</u> <sub>1</sub>	7.35	6.04	2.90	4.92	4.40	4.25	
G <sub>2</sub>	8.16	6.05	2.36	5.15	-	-	
T <sub>3</sub>	7.83	6.18	2.19/2.56	4.90	4.29	4.22	1.95
T <sub>4</sub>	7.12	6.03	2.06/2.61	4.88	-	4.17/3.91	1.01
<u>G</u> <sub>5</sub>	7.41	6.00	2.85/3.39	4.87	4.27	-	
G <sub>6</sub>	7.76	5.93	2.58/2.70	5.08	4.51	4.21	
T <sub>7</sub>	7.76	6.34	2.43/2.58	4.84	4.42	4.21	1.94
G <sub>8</sub>	7.58	5.70	2.04/2.37	4.73	-	4.10	
T <sub>9</sub>	7.27	6.04	2.05/2.26	4.63	3.62	3.52/3.13	1.38
<u>G</u> <sub>10</sub>	7.45	6.02	2.91/3.53	4.92	4.40	4.27	
G <sub>11</sub>	8.21	6.03	2.35/3.01	5.14	4.40	-	
T <sub>12</sub>	7.85	6.18	2.20/2.56	4.89	4.29	4.22	1.97
T <sub>13</sub>	7.14	6.05	2.07/2.66	4.89	-	4.20/3.91	1.00
<u>G</u> <sub>14</sub>	7.46	6.06	2.99/3.51	4.92	4.27	-	
G <sub>15</sub>	8.16	6.05	2.63/2.73	4.98	4.36	-	
G <sub>16</sub>	7.82	6.05	2.82/2.95	5.04	4.29	3.77	

Tabella 3. Assegnazione dei *chemical shift* protonici della struttura G-quadruplex formata dall'oligonucleotide TBA-G (700 MHz; 25°C) in soluzione tampone PBS (H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1) e 0.2 mM EDTA (pH 7.0). Le deossiguanosine che adottano conformazione *syn* sono sottolineate. I trattini indicano valori non determinati.



<b>TBA-C</b> 5'G <sub>1</sub> G <sub>2</sub> T <sub>3</sub> T <sub>4</sub> G <sub>5</sub> G <sub>6</sub> T <sub>7</sub> G <sub>8</sub> T <sub>9</sub> G <sub>10</sub> G <sub>11</sub> T <sub>12</sub> T <sub>13</sub> G <sub>14</sub> G <sub>15</sub> 3'-3'C <sub>16</sub>							
	H8/H6	H1'	H2'/H2''	H3'	H4'	H5'/H5''	CH <sub>3</sub> /H5
<u>G</u> <sub>1</sub>	7.31	5.97	2.88	4.94	-	-	
G <sub>2</sub>	8.09	5.96	2.29/2.94	5.08	-	-	
T <sub>3</sub>	7.79	6.13	2.14/2.49	-	-	-	1.91
T <sub>4</sub>	7.09	5.96	1.99/2.55	-	-	-	0.98
<u>G</u> <sub>5</sub>	7.38	5.96	2.83/3.35	4.82	-	-	
G <sub>6</sub>	7.72	5.95	2.53/2.72	5.06	-	-	
T <sub>7</sub>	7.75	6.35	2.42/2.52	-	-	-	1.90
G <sub>8</sub>	7.27	5.59	1.86/2.32	4.67	-	-	
T <sub>9</sub>	7.16	5.86	2.25/2.32	-	-	-	1.40
<u>G</u> <sub>10</sub>	7.39	5.97	2.84/3.55	4.86	-	-	
G <sub>11</sub>	8.12	5.96	2.27/2.90	5.08	-	-	
T <sub>12</sub>	7.79	6.13	2.14/2.49	-	-	-	1.91
T <sub>13</sub>	7.13	5.96	2.02/2.62	4.84	-	-	0.95
<u>G</u> <sub>14</sub>	7.43	6.01	2.91/3.45	4.87	-	-	
G <sub>15</sub>	8.04	6.06	2.41/2.65	5.01	-	-	
C <sub>16</sub>	7.68	6.13	2.38/2.56	-	-	-	5.85

Tabella 4. Assegnazione dei *chemical shift* protonici della struttura G-quadruplex formata dall'oligonucleotide TBA-C (700 MHz; 25°C) in soluzione tampone PBS (H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1) e 0.2 mM EDTA (pH 7.0). Le deossiguanosine che adottano conformazione *syn* sono sottolineate. I trattini indicano valori non determinati.

<b>TBA-A</b> 5' <u>G</u> <sub>1</sub> G <sub>2</sub> T <sub>3</sub> T <sub>4</sub> G <sub>5</sub> G <sub>6</sub> T <sub>7</sub> G <sub>8</sub> T <sub>9</sub> G <sub>10</sub> G <sub>11</sub> T <sub>12</sub> T <sub>13</sub> G <sub>14</sub> G <sub>15</sub> 3'-3'A <sub>16</sub>							
	H8/H6	H1'	H2'/H2''	H3'	H4'	H5'/H5''	CH <sub>3</sub> /H2
<u>G</u> <sub>1</sub>	7.20	6.05	2.80/2.94	5.01	4.24	4.00	
G <sub>2</sub>	8.12	5.96	2.01/2.31	5.12	-	-	
T <sub>3</sub>	7.82	6.17	2.17/2.31	4.87	-	4.26/4.21	1.94
T <sub>4</sub>	7.09	6.00	2.00/2.57	4.86	4.25	4.16/3.89	0.98
<u>G</u> <sub>5</sub>	7.44	5.98	2.79/3.31	4.84	4.48	4.22	
G <sub>6</sub>	7.84	6.10	2.52/2.79	5.12	-	-	
T <sub>7</sub>	7.62	6.32	2.52/2.56	4.85	4.26	4.20/4.14	1.92
G <sub>8</sub>	7.51	6.11	2.52	5.23	4.44	4.15	
T <sub>9</sub>	7.01	6.07	1.87/2.10	5.24	4.47	3.45/3.35	0.83
<u>G</u> <sub>10</sub>	7.48	6.05	2.91/3.71	5.11	4.92	4.41	
G <sub>11</sub>	8.26	6.07	2.35/3.04	5.14	-	-	
T <sub>12</sub>	7.87	6.18	2.23/2.59	4.90	4.29	4.23	1.97
T <sub>13</sub>	7.07	6.00	2.02/2.64	4.89	4.27	4.19/3.91	1.00
<u>G</u> <sub>14</sub>	7.50	6.13	3.04/3.51	4.91	4.30	-	
G <sub>15</sub>	8.21	6.16	2.67/2.86	5.05	-	4.30/4.21	
A <sub>16</sub>	8.33	6.21	2.91/2.97	5.11	-	-	7.78

Tabella 5. Assegnazione dei *chemical shift* protonici della struttura G-quadruplex formata dall'oligonucleotide TBA-A (700 MHz; 25°C) in soluzione tampone PBS (H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1) e 0.2 mM EDTA (pH 7.0). Le deossiguanosine che adottano conformazione *syn* sono sottolineate. I trattini indicano valori non determinati.

<b>TBA-T</b> 5'G <sub>1</sub> G <sub>2</sub> T <sub>3</sub> T <sub>4</sub> G <sub>5</sub> G <sub>6</sub> T <sub>7</sub> G <sub>8</sub> T <sub>9</sub> G <sub>10</sub> G <sub>11</sub> T <sub>12</sub> T <sub>13</sub> G <sub>14</sub> G <sub>15</sub> 3'-3'T <sub>16</sub>							
	H8/H6	H1'	H2'/H2''	H3'	H4'	H5'/H5''	CH <sub>3</sub>
<u>G</u> <sub>1</sub>	7.37	6.02	2.88/2.95	5.00	4.40	4.25/4.03	
G <sub>2</sub>	8.15	6.02	2.33/2.99	5.13	-	4.25	
T <sub>3</sub>	7.84	6.20	2.18/2.55	4.89	-	4.27/4.19	1.95
T <sub>4</sub>	7.13	6.03	2.04/2.61	4.87	4.47	4.17/3.90	1.02
<u>G</u> <sub>5</sub>	7.41	5.98	2.83/3.35	4.85	4.40	4.22	
G <sub>6</sub>	7.69	5.91	2.52/2.71	5.09	-	4.22	
T <sub>7</sub>	7.84	6.43	2.48/2.60	4.86	-	-	1.96
G <sub>8</sub>	7.55	5.70	2.07/2.31	4.73	4.41	4.21/4.07	
T <sub>9</sub>	7.22	5.96	1.94/2.31	4.61	-	3.68/3.57	1.59
<u>G</u> <sub>10</sub>	7.44	6.01	2.88/3.60	4.90	4.39	4.27/4.11	
G <sub>11</sub>	8.20	6.02	2.32/2.97	5.12	-	4.28	
T <sub>12</sub>	7.85	6.17	2.19/2.56	4.89	4.47	4.27/4.19	1.96
T <sub>13</sub>	7.16	6.06	2.05/2.67	4.88	4.47	4.19/3.90	0.98
<u>G</u> <sub>14</sub>	7.48	6.07	2.97/3.48	4.91	4.48	4.27/4.21	
G <sub>15</sub>	8.07	6.06	2.61/2.70	5.10	4.48	4.27/4.22	
T <sub>16</sub>	7.59	6.28	2.44/2.67	4.90	4.19	3.77	1.72

Tabella 6. Assegnazione dei *chemical shift* protonici della struttura G-quadruplex formata dall'oligonucleotide TBA-T (700 MHz; 25°C) in soluzione tampone PBS (H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1) e 0.2 mM EDTA (pH 7.0). Le deossiguanosine che adottano conformazione *syn* sono sottolineate. I trattini indicano valori non determinati.

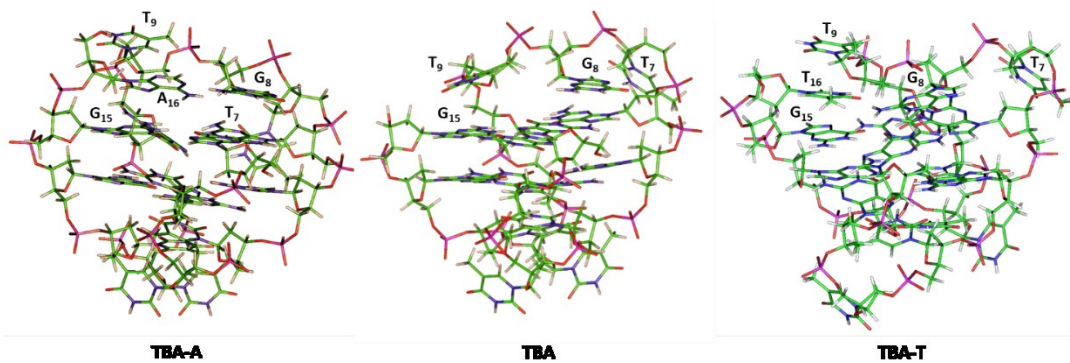


Figura 7. *Stick model* del TBA-A, del TBA originario e del TBA-T. Gli atomi sono mostrati in colori differenti (carbonio, verde; azoto, blu; ossigeno, rosso; idrogeno, bianco; fosforo, viola).

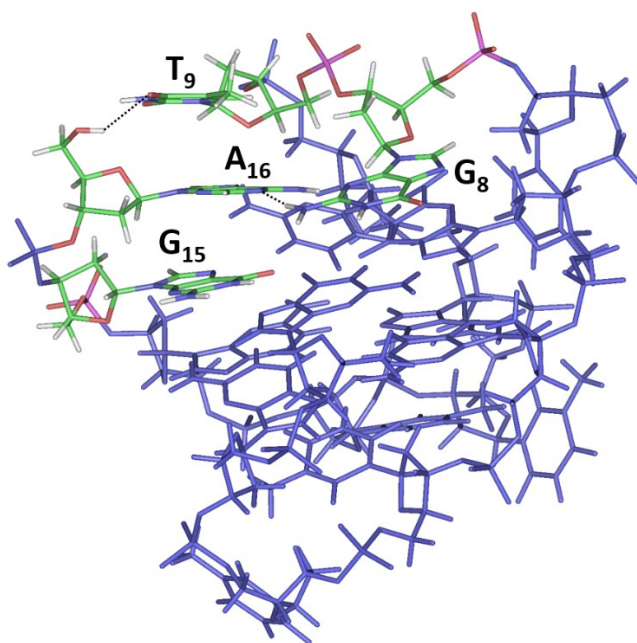


Figura 8. Vista laterale dello *stick model* del TBA-A che evidenzia le interazioni di *stacking* tra i residui G<sub>15</sub>, A<sub>16</sub> e T<sub>9</sub>. Gli atomi dei residui evidenziati sono mostrati in differenti colori (carbonio, verde; azoto, blu; ossigeno, rosso; idrogeno, bianco; fosforo, viola). Le linee nere tratteggiate indicano i legami idrogeno che coinvolgono il residuo extra A<sub>16</sub>.

### Misure di denaturazione termica al CD

La stabilità termica degli analoghi del TBA è stata determinata mediante esperimenti di CD *melting*. I parametri termodinamici e le temperature di *melting* ottenuti dalle analisi van't Hoff delle curve di fusione [12] in PBS sono mostrati in Tabella 7. Osservando tale tabella è possibile rilevare che tutti gli analoghi mostrano temperature di *melting* più alte del TBA, ad eccezione di A-TBA-T che mostra una  $T_m$  simile a quella del TBA. Una analisi termodinamica dettagliata mostra che l'aggiunta di un nucleotide extra con inversione di polarità porta a valori di  $\Delta H_{v.H.}$  e  $\Delta S_{v.H.}$  più alti. Questo dato suggerisce che TBA-A, TBA-G, TBA-C e TBA-T formano uno stato più strutturato stabilizzato dalla presenza di interazioni addizionali rispetto al TBA non modificato. Questa conclusione è pienamente coerente con i risultati NMR e di modellistica molecolare ottenuti per il TBA-A.

Names	$T_m$ (°C) ( $\pm 1$ )	$\Delta T_m$	$\Delta H_{v.H.}$ (kJ/mol) <sup>a</sup>	$\Delta S_{v.H.}$ (kJ/mol K) <sup>a</sup>
TBA	33	-	124	0.40
TBA-A	44	+11	170	0.54
TBA-T	39	+6	150	0.48
A-TBA-T	33	0	140	0.46
T-TBA-A	36	+3	145	0.47
TBA-G	39	+6	175	0.56
TBA-C	38	+5	148	0.48
TBA-A nat	33	0	130	0.42
TBA-T nat	33	0	130	0.42

<sup>a</sup> The errors on  $\Delta H_{v.H.}$  and  $\Delta S_{v.H.}$  are within the 10%.

Tabella 7. Parametri termodinamici di alcuni aptameri modificati e della loro controparte naturale (TBA) in tampone PBS ottenuti dalle analisi van't Hoff delle curve di fusione CD.

Inoltre, è stato trovato che TBA-G e TBA-A mostrano valori di  $\Delta H_{v.H.}$  più alti ( $\Delta\Delta H_{v.H.} \sim +48$  kJ mol<sup>-1</sup>) rispetto a TBA-T e TBA-C ( $\Delta\Delta H_{v.H.} \sim +25$  kJ mol<sup>-1</sup>). Questa osservazione rivela che i residui purinici sono capaci di stabilizzare le interazioni più fortemente di quelli pirimidinici. Curiosamente, il confronto dei valori di  $\Delta H_{v.H.}$  ottenuti per TBA-A e TBA-T con quelli per T-TBA-A e A-TBA-T, rispettivamente, rivela

che l'aggiunta di un extra residuo con inversione di polarità 5'-5' riduce il contributo entalpico alla stabilità delle strutture G-quadruplex. D'altro canto, l'aggiunta di un nucleotide extra attraverso un legame fosfodiesterico 3'-5' naturale (TBA-A nat e TBA-T nat) non influenza i parametri termodinamici del TBA (entro l'errore sperimentale) confermando così che la presenza di siti ad inversione di polarità 3'-3' rappresenta una caratteristica strutturale decisiva nel determinare la più alta stabilità termodinamica degli analoghi del TBA. Altri autori hanno riportato la sintesi e lo studio di derivati del TBA recanti una porzione di acridina e/o di quindolina all'estremità 3' [24]. Anche in questi casi è stato osservato un aumento delle  $T_m$ , tuttavia, non sono stati riportati dati NMR o di modellistica molecolare che suggerissero interazioni simili a quelle osservate per TBA-A e TBA-T.

Visto che la stabilità e la conformazione delle strutture G-quadruplex dipende fortemente dalla natura dei cationi in soluzione, sono stati registrati spettri CD e curve CD di *melting* ed *annealing* in tampone K degli aptameri modificati TBA-A, TBA-T, TBA-C e TBA-G che sono tra i derivati del TBA caratterizzati da una conformazione prevalente e che hanno mostrato stabilità termiche in PBS più alte del TBA naturale (Figure 9, 10 e Tabella 8). I profili CD dei 4 analoghi risultano piuttosto simili al TBA naturale suggerendo che essi adottano una struttura G-quadruplex antiparallela "a sedia" (*chair-like*) anche in queste condizioni. Riguardo agli esperimenti di *melting*, i 4 oligonucleotidi considerati confermano di possedere stabilità più alte rispetto al TBA, sebbene le differenze tra loro sono risultate di minor entità. Nel tampone PBS, TBA-A si è rivelato il più stabile mentre TBA-T ha mostrato una  $T_m$  più alta di TBA-C e TBA-G. I profili di *melting* ed *annealing* sono risultati quasi sovrapponibili suggerendo la formazione di strutture G-quadruplex monomolecolari, come per il TBA naturale.

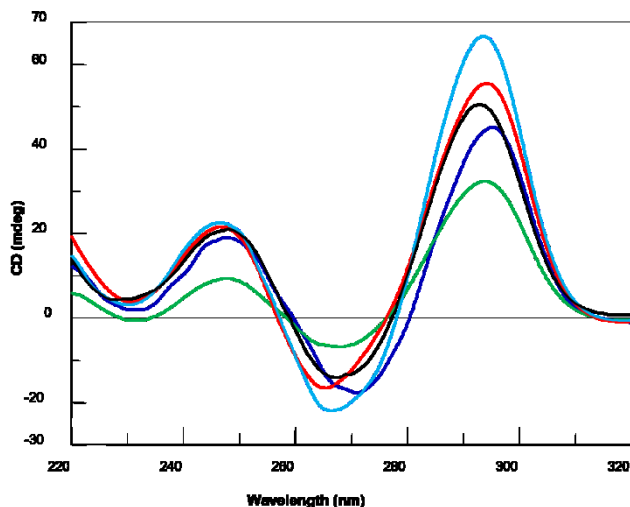


Figura 9. Spettri CD a 20°C (soluzione tampone 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 70 mM KCl, pH 7.0) di TBA (nero), TBA-G (rosso), TBA-A (blu scuro), TBA-C (azzurro), TBA-T (verde).

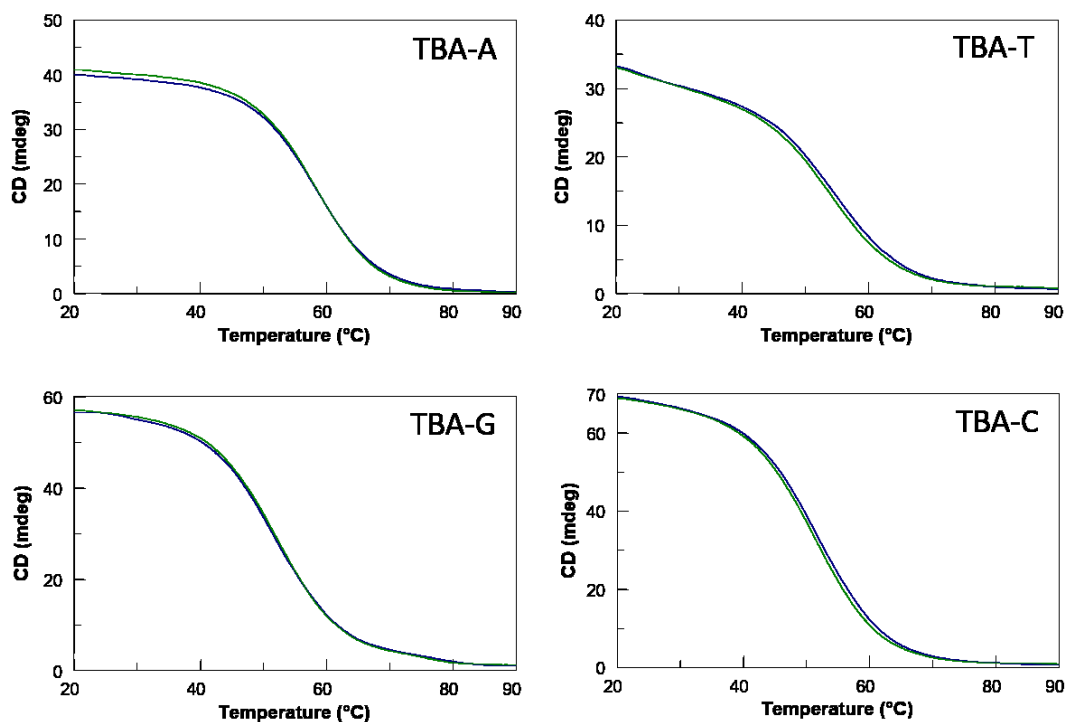


Figura 10. Le curve di melting (blu) ed annealing (verde) degli analoghi del TBA modificati sono state registrate in funzione della temperatura (range: 20-90°C) per tutte le G-quadruplex alle lunghezze d'onda corrispondenti al massimo effetto Cotton (294-295 nm). I dati CD sono stati registrati utilizzando una cuvetta con un cammino ottico di 0,1 cm ad una concentrazione di oligonucleotide

di 100  $\mu\text{M}$  utilizzando una soluzione tampone 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 70 mM KCl (pH 7.0), con una velocità di scansione di 0.5  $^\circ\text{C}/\text{min}$ .

Names	$T_m$ ( $^\circ\text{C}$ ) ( $\pm 1$ )	$\Delta T_m$ ( $^\circ\text{C}$ )	$\Delta H_{v.H.}$ (kJ/mol) <sup>a</sup>	$\Delta S_{v.H.}$ (kJ/mol K) <sup>a</sup>
TBA	50	-	154	0.48
TBA-A	59	+9	194	0.58
TBA-T	56	+6	174	0.53
TBA-G	52	+2	175	0.54
TBA-C	53	+3	172	0.53

<sup>a</sup> The errors on  $\Delta H_{v.H.}$  and  $\Delta S_{v.H.}$  are within the 10 %.

Tabella 8. I parametri termodinamici di alcuni aptameri modificati e della loro controparte naturale (TBA) in tampone potassio ottenuti dalle analisi van't Hoff delle curve di fusione CD.

### ***Elettroforesi su gel***

Per confermare che tutti gli analoghi contenenti siti ad inversione di polarità possano adottare la struttura G-quadruplex monomolecolare caratteristica del TBA naturale, è stata eseguita un'analisi elettroforetica su gel di poliacrilammide (PAGE) non detaturante (Figura 11). Fatta eccezione per G-TBA-C, il profilo elettroforetico mostra che tutti gli analoghi formano strutture principali dotate di una mobilità molto simile a quella del TBA naturale. Tenendo conto che la mobilità elettroforetica delle strutture G-quadruplex è principalmente influenzata dalla loro conformazione e che il rapporto carica/massa è molto simile per tutti gli ODN, i risultati elettroforetici ottenuti suggeriscono chiaramente la formazione di conformazioni G-quadruplex comparabili a quella del TBA originale. In alcuni analoghi contenenti 2 siti ad inversione di polarità (ovvero A-TBA-T, T-TBA-A e C-TBA-G) è stata osservata una migrazione leggermente più lenta rispetto a quelli con un solo sito. Questo può essere attribuito ad un possibile intralcio dei 2 extra residui che rendono più difficoltosa la migrazione attraverso le maglie del gel. Nel caso di



G-TBA-C, la presenza di più di una banda suggerisce la presenza di più conformazioni.

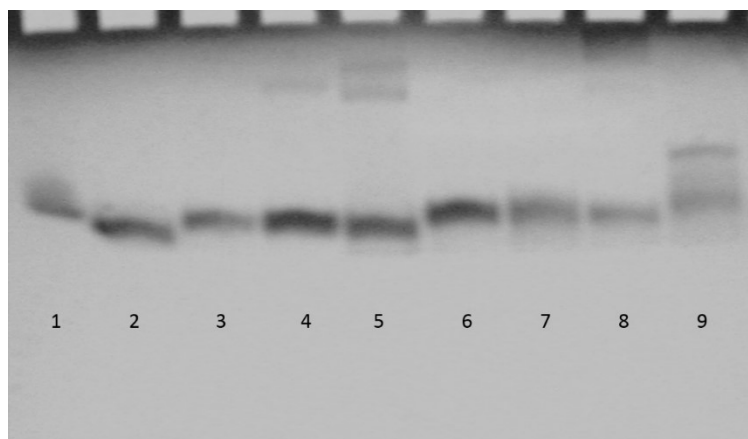


Figura 11. Gel di poliacrilammide non denaturante degli analoghi del TBA e della loro controparte naturale. Vedi la tabella 1 e testo principale per i dettagli e le procedure sperimentali. Corsia 1: TBA; corsia 2: TBA-A; corsia 3: TBA-G; corsia 4: TBA-T; corsia 5: TBA-C; corsia 6: A-TBA-T; corsia 7: T-TBA-A; corsia 8: C-TBA-G; corsia 9: G-TBA-C.

## **CONCLUSIONI**

Tra gli aptameri che formano strutture G-quadruplex, il TBA è probabilmente il più studiato ed è ancora sottoposto a numerosi studi. La maggior parte delle modifiche post-SELEX proposte per questo aptamero, con l'obiettivo di migliorarne le proprietà biologiche e chimico-fisiche, ha riguardato la sostituzione di residui naturali con quelli modificati. In relazione al tipo di residuo modificato usato e alla sua posizione nella sequenza, sono stati ottenuti risultati coerenti in particolare nel caso in cui la modifica riguarda i residui dei *loop* TT. In una recente comunicazione è stato dimostrato che proprietà del TBA notevolmente migliori possono essere ottenute semplicemente legando un residuo naturale extra all'estremità 3' o in entrambe le estremità della sequenza attraverso un legame fosfodiesterico 3'-3' o 5'-5'. Questo tipo di modifica non influenza la conformazione dei *loop* TT visto che questi sono la parte della struttura maggiormente responsabile dell'interazione con

il target. Gli studi NMR su TBA-A, TBA-G, TBA-T, TBA-C e A-TBA-T mostrano che essi adottano conformazioni G-quadruplex *chair-like* molto simili a quella della loro controparte naturale. Le interazioni NOE che coinvolgono gli extra residui e una o più guanine della G-tetrate superiore suggerisce che i residui extra non sono orientati casualmente ma sono sovrapposti al piano superiore della struttura G-quadruplex. L'analisi dei parametri termodinamici mostra che tutti gli analoghi contenenti solo un residuo extra 3'-3' sono caratterizzati da temperature di *melting* più alte rispetto al TBA ( $\Delta T_m$  nell'intervallo da +5 a +11). Cosa più importante, il confronto dei dati termodinamici tra TBA-A nat e TBA-T nat da un lato e TBA-A e TBA-T dall'altro, chiaramente mostra che la presenza di un solo residuo extra in 3' all'interno della sequenza, non conduce a temperature di *melting* più alte e che la presenza del legame fosfodiesterico 3'-3' è fondamentale per migliorare la stabilità termica degli aptameri modificati. I dati termodinamici delle coppie TBA-A e T-TBA-A, TBA-T e A-TBA-T, e TBA-G e C-TBA-G [12] suggeriscono anche che la presenza degli extra residui 5'-5' annulla l'effetto stabilizzante degli extra residui 3'-3' in tre casi su quattro. L'aggiunta di un extra residuo 3'-3' comporta un notevole miglioramento sia della stabilità termica che delle proprietà generali del TBA. Questi dati suggeriscono che questa modifica possa essere applicata con successo per il miglioramento delle proprietà anche di altri aptameri che adottano una struttura G-quadruplex.

## **Bibliografia**

- [1] M. Scutto, E. Riviaccio, A. Varone, D. Corda, M. Bucci, V. Vellecco, G. Cirino, A. Virgilio, V. Esposito, A. Galeone, N. Borbone, M. Varra and L. Mayol, *Nucleic Acids Res.*, 2015, **43**, 7702.
- [2] L. Bonifacio, F. Church and M. Jarstfer, *Int. J. Mol. Sci.*, 2008, **9**, 422.
- [3] (a) A. Pasternak, F. J. Hernandez, L. M. Rasmussen, B. Veste and J. Wengel, *Nucleic Acids Res.*, 2011, **39**, 1155; (b) T. N. Jensen, J. R. Henriksen, B. E. Rasmussen, L. M. Rasmussen, T. L. Andresen, J. Wengel and A. Pasternak, *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, **19**, 4739.
- [4] (a) T. Coppola, M. Varra, G. Oliviero, A. Galeone, G. D'Isa, L. Mayol, E. Morelli, M. R. Bucci, V. Vellecco, G. Cirino and N. Borbone, *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, **16**, 8244; (b) N. Borbone, M. Bucci, G. Oliviero, E. Morelli, J. Amato, V. D'Atri, S. D'Errico, V. Vellecco, G. Cirino, G. Piccialli, C. Fattorusso, M. Varra, L. Mayol, M. Persico and M. Scutto, *J. Med. Chem.*, 2012, **55**, 10716; (c) M. Scutto, M. Persico, M. Bucci, V. Vellecco, N. Borbone, E. Morelli, G. Oliviero, E. Novellino, G. Piccialli, G. Cirino, M. Varra, C. Fattorusso and L. Mayol, *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**, 5235.
- [5] A. Virgilio, M. Varra, M. Scutto, A. Capuozzo, C. Irace, L. Mayol, V. Esposito and A. Galeone, *ChemBioChem*, 2014, **15**, 652.
- [6] B. Cai, X. Yang, L. Sun, X. Fan, L. Li, H. Jin, Y. Wu, Z. Guan, L. Zhang, L. Zhang and Z. Yang, *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**, 8866.
- [7] A. Virgilio, L. Petraccone, M. Scutto, V. Vellecco, M. Bucci, L. Mayol, M. Varra, V. Esposito and A. Galeone, *ChemBio-Chem*, 2014, **15**, 2427.
- [8] A. Virgilio, L. Petraccone, V. Vellecco, M. Bucci, M. Varra, C. Irace, R. Santamaria, A. Pepe, L. Mayol, V. Esposito and A. Galeone, *Nucleic Acids Res.*, 2015, **43**, 10602.
- [9] C. G. Peng and M. J. Damha, *Nucleic Acids Res.*, 2007, **35**, 4977.
- [10] M. Zaitseva, D. Kaluzhny, A. Shcholkina, O. Borisova, I. Smirnov and G. Pozmogova, *Biophys. Chem.*, 2010, **146**, 1.
- [11] A. M. Varizhuk, V. B. Tsvetkov, O. N. Tatarinova, D. N. Kaluzhny, V. L. Florentiev, E. N. Timofeev, A. K. Shcholkina, O. F. Borisova, I. P. Smirnov, S. L. Grokhovsky, A. V. Aseychev and G. E. Pozmogova, *Eur. J. Med. Chem.*, 2013, **67**, 90.
- [12] V. Esposito, M. Scutto, A. Capuozzo, R. Santamaria, M. Varra, L. Mayol, A. Virgilio and A. Galeone, *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**, 8840.
- [13] C. Dalvit, *J. Biomol. NMR*, 1998, **11**, 437.
- [14] J. Jeener, B. Meier, H. P. Bachmann and R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.*, 1979, **71**, 4546.
- [15] L. Braunschweiler and R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.*, 1983, **53**, 521.
- [16] D. Marion, M. Ikura, R. Tschudin and A. Bax, *J. Magn. Reson.*, 1989, **85**, 393.
- [17] (a) J. R. Maple, M.-J. Hwang, T. P. Stockfish, U. Dinur, M. Waldman, C. S. Ewing and A. T. Hagler, *J. Comput. Chem.*, 1994, **15**, 162; (b) W. R. Rudnicki and B. Lesyng, *Comput. Chem.*, 1995, **19**, 253.
- [18] P. Schultze, R. F. Macaya and J. Feigon, *J. Mol. Biol.*, 1994, **235**, 1532.
- [19] S. J. Weiner, P. A. Kollman, D. A. Case, U. C. Singh, C. Ghio, G. Alagona, S. Profeta and P. J. Weiner, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 765.
- [20] L. A. Marky and K. J. Breslauer, *Biopolymers*, 1987, **26**, 1601.

- [21] (a) K. Y. Wang, S. McCurdy, R. G. Shea, S. Swaminathan and P. H. Bolton, *Biochemistry*, 1993, **32**, 1899; (b) F. W. Smith and J. Feigon, *Biochemistry*, 1993, **32**, 8682; (c) Y. Wang and D. J. Patel, *Structure*, 1993, **1**, 263.
- [22] R. F. Macaya, P. Schultze, F. W. Smith, J. A. Roe and J. Feigon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1993, **90**, 3745.
- [23] (a) F. J. M. Van de Ven and C. W. Hilbers, *Eur. J. Biochem.*, 1988, **178**, 1; (b) G. M. Clore and A. M. Gronenborn, *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 1989, **24**, 479; (c) K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York, 1986.
- [24] A. Aviñó, S. Mazzini, R. Ferreira and R. Eritja, *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, **18**, 7348.

## **4.2 Studio delle proprietà delle varianti del TBA con domini gemelli leganti la trombina**

### **INTRODUZIONE**

Una molecola di ligando a DNA o RNA scoperta attraverso le tecniche SELEX può essere raramente utilizzata non modificata, principalmente a causa della scarsa resistenza degli oligodeossiribonucleotidi e degli oligonucleotidi in ambiente biologico. Per queste ragioni, la sequenza originaria di un aptamero è spesso soggetta a modifiche *post-SELEX* volte a migliorare le loro proprietà generali quali affinità e specificità verso il target, stabilità termica e resistenza alle ubiquitarie endo- ed esonucleasi [1]. Le modifiche chimiche più comuni includono l'introduzione di basi modificate, l'alterazione dello scheletro zucchero-fosfato e la coniugazione con altre molecole. Un minor numero di ricerche è stato dedicato alla dimerizzazione degli aptameri o alla costruzione di un aptamero polivalente che consiste nella progettazione di ligandi con due o più domini leganti il target, nonostante sia stato dimostrato che queste modifiche strutturali forniscano ligandi di nuova costruzione con migliori proprietà rispetto all'aptamero originale. Per esempio, nel 2008 Hasegawa ed altri hanno descritto un aptamero dimerico anti-VEGF (fattore di crescita dell'endotelio vascolare) che mostra un valore di costante di dissociazione più basso rispetto a quello del monomero originario [2]. In una precedente ricerca, sono stati progettati ed assemblati degli aptameri circolari polivalenti contro la trombina che hanno mostrato un incremento dell'attività anticoagulante con valori di  $EC_{50}$  migliori di quello di GS-522, il canonico aptamero a DNA legante la trombina [3]. Due ulteriori aptameri anticoagulanti, ossia l'aptamero G-quadruplex legante la trombina (TBA, anche chiamato HD1, Figura 1 e Tabella 1), e HD22, sono stati sottoposti a dimerizzazione attraverso la formazione di una *duplex* poly-A/poly-T stabile che collega i loro domini di legame mediante

ibridizzazione (*aptabody*) [4,5]. Il TBA rappresenta anche il precursore di uno dei più semplici ed interessanti aptameri dimerici, ovvero il 31-mer RA-36 (Figura 1 e Tabella 1), in cui due moduli farmacoforici del TBA sono connessi attraverso un residuo di timidina. Le proprietà di RA-36 sono state dettagliatamente studiate e paragonate a quelle degli altri aptameri anti-trombina [6-10]. I dati raccolti hanno mostrato che RA-36 è un efficiente inibitore della trombina con un effetto dose dipendente. Inoltre, test sugli animali hanno suggerito, nel caso di RA-36, una specificità di specie [6,7]. In un ulteriore studio l'attività antitrombotica di RA-36 è stata studiata attraverso un modello murino di trombosi [9]. Inoltre, le sue proprietà farmacodinamiche e farmacocinetiche sono state ampiamente valutate [10]. Dei dati interessanti ottenuti da studi di *truncation* hanno evidenziato che i 2 domini G-quadruplex non sono funzionalmente equivalenti visto che il modulo 5'-G-quadruplex ha un'attività inibitoria più alta di quella del TBA precursore e del modulo 3'-G-quadruplex [8].

I risultati appena descritti ci hanno ispirato la progettazione di alcuni derivati dimerici del TBA in cui due domini 5'-G-quadruplex del TBA sono connessi attraverso le loro estremità 3' attraverso dei *linker* simmetrici composti da residui di adenosina o timidina e/o glicerolo (Figure 1, 2 e Tabella 1). Il *design* di questi aptameri dimerici mostra i seguenti vantaggi rispetto agli altri aptameri dimerici anti-trombina: 1) essi sono caratterizzati da due domini 5'-G-quadruplex più attivi e 2) grazie all'inversione di polarità, essi non possiedono estremità 3' libere che sono suscettibili alla degradazione ad opera delle 3'-esonucleasi biologicamente più abbondanti. Sebbene l'introduzione dei siti ad inversione di polarità nelle strutture G-quadruplex sia stato proposto alcuni anni fa [11-13], solo recentemente questa strategia è stata utilizzata con successo come modifica *post-SELEX* per incrementare la stabilità biologica del TBA [14,15] o per modulare le sue attività biologiche [16]. In questo lavoro, è stato sfruttato un sito ad inversione di polarità per collegare due

domini G-quadruplex del TBA. Poiché è stato dimostrato che il TBA interagisce con l'esosito di riconoscimento del fibrinogeno (EXO I), quest'ultimo molto probabilmente è il target anche nel caso delle varianti del TBA qui descritte. I nuovi aptameri dimerici sono stati studiati mediante dicroismo circolare (CD) ed elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE). Inoltre, le loro capacità di legare la trombina sono state valutate mediante calorimetria isoterma di titolazione (ITC) mentre l'attività anticoagulante è stata testata attraverso il saggio del tempo di protrombina (PT). La resistenza in ambienti biologici è stata valutata mediante il saggio in siero fetale bovino (FBS).

L'insieme dei dati ha indicato che tutti gli aptameri dimerici sono capaci di formare strutture G-quadruplex sebbene l'affinità per la trombina dipenda dal tipo di *linker*. Significativamente, la maggior parte dei derivati dimerici del TBA ha mostrato attività anticoagulanti migliori sia rispetto al TBA che a RA-36. Inoltre, tutti i nuovi aptameri sono caratterizzati da una resistenza alle nucleasi migliore del TBA e, in alcuni casi, anche di RA-36.

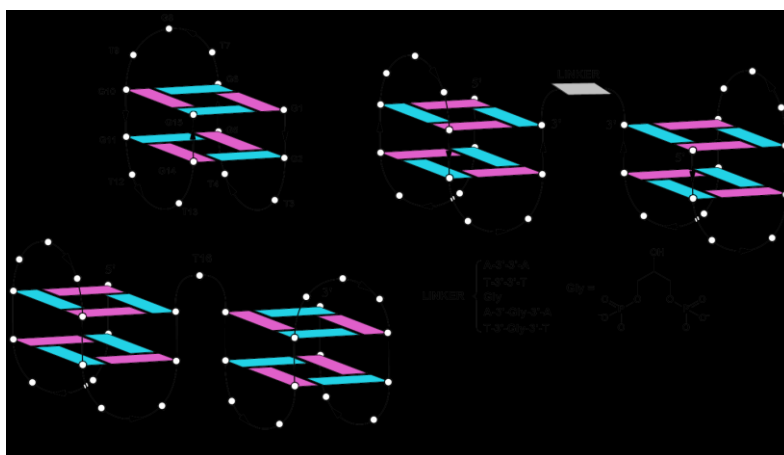


Figura 1. Strutture G-quadruplex formate da TBA, RA-36 e dai nuovi analoghi dimerici del TBA. Le guanosine che adottano conformazioni glicosidiche *anti* e *syn* sono indicate in azzurro e viola, rispettivamente. Per chiarezza, i residui dei *loop* sono indicati solo da un cerchio bianco.

<b>Name</b>	<b>Sequence</b>	<b>T<sub>m</sub> (°C) ± 1</b>
TBA	5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3'	33
RA-36	5'-TBA-T-TBA-3'	32
AA	5'-TBA-A-3'-3'-A-TBA-5'	37
TT	5'-TBA-T-3'-3'-T-TBA-5'	33
Gly	5'-TBA-3'-Gly-3'-TBA-5'	35
AGlyA	5'-TBA-A-3'-Gly-3'-A-TBA-5'	35
TGlyT	5'-TBA-T-3'-Gly-3'-T-TBA-5'	29

Tabella 1. Nomi, sequenze e temperature di *melting* (T<sub>m</sub>) degli oligonucleotidi studiati. Vedi la sezione Metodi per i dettagli.

#### **4.2.1 SEZIONE SPERIMENTALE**

##### ***Sintesi e purificazione degli oligonucleotidi***

Gli oligonucleotidi in Tabella 1 sono stati sintetizzati mediante un sintetizzatore Millipore Ciclone Plus DNA sfruttando la chimica in fase solida dei β-cianoetilfosforamiditi su scala 15 μmol. La sintesi dei tratti 3'-5' è stata eseguita utilizzando normali 3'-fosforamiditi mentre i tratti 5'-3' sono stati sintetizzati utilizzando i 5'-fosforamiditi. Per tutti gli oligonucleotidi è stato usato un supporto universale. Per la sintesi degli oligonucleotidi modificati contenenti il *linker* glicerolo, un monomero fosforamidito non nucleosidico, sintetizzato come descritto in seguito, è stato accoppiato al supporto solido universale prima di usare i normali 3'-fosforamiditi (Figura 2). Gli oligomeri sono stati rimossi dal supporto solido e deprotetti mediante trattamento con una soluzione acquosa di ammoniaca concentrata a 80% per 12h. La miscela è stata quindi filtrata, lavata e successivamente concentrata a pressione ridotta. In seguito è stata ridisciolta in H<sub>2</sub>O ed analizzata e purificata per HPLC su una colonna Nucleogel SAX (Macherey–Nagel, 1000-8/46) con gli eluenti: tampone A: 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in soluzione acquosa a pH 7.0 contenente 20% (v/v) CH<sub>3</sub>CN e tampone B: 1 M NaCl, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in soluzione acquosa a pH 7.0 contenente 20% (v/v)





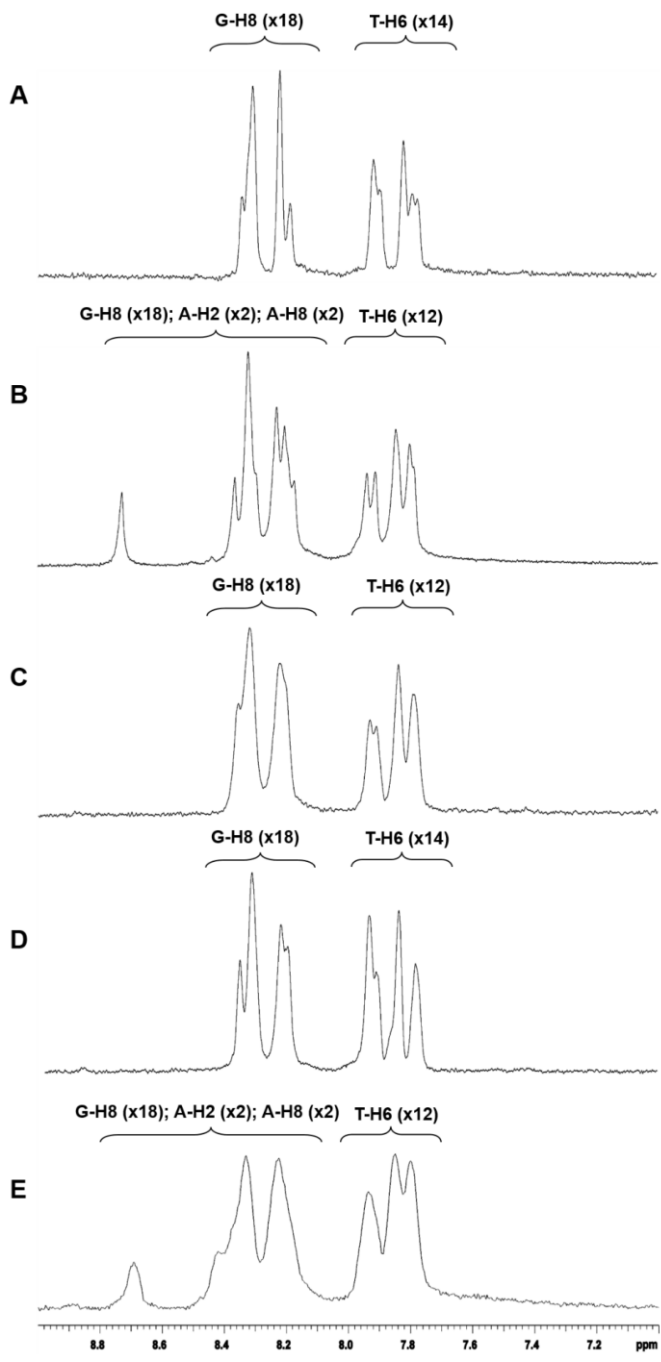


Figura 3. Regione aromatica degli spettri NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O, 80°C, no salt) di TT (A), AA (B), Gly (C), TGlyT (D), AGlyA (E).

### ***Spettroscopia di Dicroismo Circolare***

I campioni CD degli oligonucleotidi modificati e la loro controparte naturale sono stati preparati ad una concentrazione di oligonucleotide di 50  $\mu\text{M}$  utilizzando PBS (Sigma-Aldrich; 10 mM tampone fosfato, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, pH 7.4) e sottoposti alla procedura di *annealing* (riscaldando a 90°C e facendo raffreddare velocemente a 4 °C). Per tutti i campioni, gli spettri CD e le curve di *melting/annealing* CD sono stati registrati su uno spettrofotometro Jasco 715 CD. Per gli spettri CD, la lunghezza d'onda è stata variata da 220 nm a 320 nm alla velocità di scansione di 100 nm min<sup>-1</sup> e gli spettri sono stati registrati con una risposta di 16 s e un'ampiezza di banda di 2.0 nm. Agli spettri dei campioni è stato sottratto lo spettro del tampone. La temperatura è stata mantenuta costante a 5 °C con una cella programmabile termoelettricamente controllata (JASCO PTC-348). Per tutti i campioni, le curve di *melting/annealing* sono state registrate in funzione della temperatura (*range*: 5 °C- 80 °C) in corrispondenza del loro massimo effetto Cotton. I dati CD sono stati registrati utilizzando una cuvetta con un cammino ottico di 0,1 cm e con una velocità di scansione di 0.5 °C/min.

### ***Elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE)***

Tutti gli oligonucleotidi sono stati analizzati mediante PAGE non denaturante. I campioni dopo l'*annealing* in PBS sono stati caricati su un gel di poliacrilammide al 20% contenente Tris-Borato-EDTA (TBE) 2.5x e NaCl 50 mM. Il tampone di corsa utilizzato è stato TBE 1x contenente 100 mM NaCl. Per tutti i campioni, appena prima di caricare è stata aggiunta una soluzione di glicerolo/TBE1x con 100 mM NaCl 2:1. L'elettroforesi è stata eseguita a 8 V cm<sup>-1</sup> ad una temperatura prossima a 10°C. Le bande sono state visualizzate mediante *UV shadowing*.

### **Calorimetria isoterma di titolazione (ITC)**

Gli studi ITC sono stati eseguiti a 22°C con un calorimetro ITC200 (MicroCal/GE Healthcare). Prima di tutti gli esperimenti di titolazione la proteina è stata dializzata contro PBS pH 7.4 e gli oligonucleotidi sono stati risospesi nello stesso buffer. Il TBA (25 or 100 µM) e i suoi analoghi dimerici **AA**, **TT**, **Gly**, **AGlyA**, **TglyT** e RA-36 (25 µM) sono stati titolati in una soluzione di  $\alpha$ -trombina umana (2.5 µM o 10 µM) (Hematologic Technologies Inc., HCT-0020) [17]. Per escludere la presenza di artefatti, dovuti alla diluizione del ligando nel tampone della proteina, le misure ITC sono state eseguite mediante titolazione degli oligonucleotidi nello stesso tampone. Tutti i dati sono stati analizzati e processati utilizzando il software Microcal Origin versione 7.0. Le costanti di dissociazione sono state determinate adattando i dati ad un modello *one-set-of-site-binding*. Gli esperimenti ITC sono stati ripetuti due volte per valutare la riproducibilità dei risultati.

### **Saggio del tempo di protrombina (PT)**

Il saggio del tempo di protrombina è stato eseguito su campioni di plasma umano in accordo con altri autori (Esposito ed altri, 2018 BBA). Brevemente, questo metodo si basa sull'elevata sensibilità del reagente tromboplastina basato su fattori ricombinanti di tessuto umano. L'aggiunta al plasma della tromboplastina ricombinante, in presenza di ioni calcio, innesca l'attivazione della via estrinseca della coagulazione che converte il fibrinogeno in fibrina con formazione di un gel solido. Nelle nostre condizioni sperimentali, il TBA e gli altri aptameri modificati sono stati testati a due differenti concentrazioni: 2 µM e 20 µM. Tutti gli oligonucleotidi o il veicolo (tampone fosfato salino, PBS) sono stati incubati con 100 µl di plasma a 37 °C per 15 min, dopodiché sono stati aggiunti 200 µl della soluzione del kit contenente tromboplastina ricombinante con conseguente attivazione del *pathway* estrinseco.

La misura del PT è stata prodotta in triplicato e la media e i valori dell'errore standard sono stati calcolati ed espressi in secondi. Il tempo di coagulazione basale è stato determinato misurando il tempo di coagulazione in assenza del veicolo.

### ***Saggio in siero fetale bovino***

Il saggio di stabilità alle nucleasi degli oligonucleotidi modificati è stato condotto in siero fetale bovino (FBS) al 10% diluito con Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) a 37 °C. Circa 15 nmol di soluzione stock di ciascun oligonucleotide (~ 3 O.D.U.) sono stati evaporati a secchezza a pressione ridotta e successivamente incubati con 500 µl di FBS al 10% a 37 °C. A 0, 1, 6 e 24 ore, 125 µl dei campioni sono stati raccolti e conservati a -20 °C per almeno 20 minuti. I campioni sono stati evaporati a secchezza e poi sono stati aggiunti 10 µl di tampone di caricamento del gel e 10 µl di acqua sterile. 10 µl di tale miscela sono stati usati per l'elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE) che è stata eseguita a temperatura ambiente utilizzando un gel di poliacrilammide al 20% in un tampone TBE 1x (Tris-borato-EDTA). I *pattern* di degradazione sul gel sono stati visualizzati mediante *UV shadowing*.

## ***RISULTATI E DISCUSSIONE***

### ***Aspetti strutturali dei derivati dimerici del TBA***

Al fine di ottenere informazioni strutturali preliminari riguardo alla conformazione adottata dai dimeri dei derivati del TBA e valutare gli effetti dei *linker* simmetrici o dei siti ad inversione di polarità, per tutti i derivati, sono stati acquisiti gli spettri CD e gli esperimenti di *melting/annealing* e confrontati con i dati della loro controparte naturale, il TBA.

Lo spettro CD del TBA è caratterizzato da due bande positive a 247 e 295 nm e una negativa a 266 nm. Questo profilo è tipico delle strutture G-quadruplex antiparallele in cui guanosine *sin* ed *anti* si alternano sia lungo i filamenti che in ciascuna tetrate. Considerando l'unicità di questo profilo, una stretta comparazione tra gli spettri CD dei derivati dimerici del TBA e quello della loro controparte naturale, può essere considerato un utile metodo per valutare direttamente gli effetti di queste modifiche sulla struttura G-quadruplex. In particolare, a parte alcune differenze concernenti l'intensità delle bande e a differenze trascurabili relative alle loro lunghezze d'onda, gli spettri CD di tutti i derivati dimerici del TBA, (Figura 4) eseguiti a 10 °C, risultano abbastanza simili. Infatti essi mostrano analoghe bande positive e negative, indicative della formazione, per tutti i derivati dimerici, di strutture G-quadruplex antiparallele comparabili a quella dell'aptamero TBA non modificato.

Le misure CD delle curve di *melting/annealing* sono state utilizzate anche per valutare la stabilità termica degli aptameri modificati (Figure 5 e 6). I profili sigmoidali e ben definiti di *melting/annealing* CD dei dimeri del TBA ci hanno permesso di misurare con affidabilità le temperature di *melting* ( $T_m$ ) (Tabella 1). Un confronto di tutti i dati rivela che mentre le  $T_m$  di **TT**, **Gly**, **AGlyA** e RA-36 possono essere considerate simili a quella dell'aptamero non modificato, tenendo conto degli errori sperimentali, **AA** è caratterizzato da una  $T_m$  leggermente più alta ( $\Delta T = +4^\circ\text{C}$ ) di quella della controparte naturale. D'altro canto, **TGlyT** ha mostrato una  $T_m$  leggermente più bassa ( $\Delta T = -4^\circ\text{C}$ ) rispetto al TBA. In tutti i casi, la chiara assenza di isteresi tra i profili di riscaldamento e raffreddamento, indicativa di un rapido equilibrio del sistema nelle condizioni sperimentali, suggerirebbe la presenza di una struttura G-quadruplex monomolecolare.

Gli oligonucleotidi studiati sono stati analizzati, inoltre, mediante PAGE e confrontati con il TBA e con RA-36, usati come riferimenti (Figura 7). Gli

oligonucleotidi **TT**, **Gly**, **TGlyT** hanno esibito bande con mobilità elettroforetiche piuttosto simili a quella del derivato dimerico del TBA, RA-36, e abbastanza più lente di quella del TBA, suggerendo pertanto, anche in questi casi, la formazione di strutture G-quadruplex dimeriche. Le piccole differenze riguardanti le loro mobilità potrebbero essere ascritte all'effetto sulla velocità di migrazione dei diversi *linker* che connettono i domini TBA gemelli. Tuttavia, nel caso degli oligonucleotidi **AA** e **AGlyA** sono presenti due bande, di cui la più lenta, è caratterizzata da una mobilità simile a RA-36. Visto che i loro profili CD sono comparabili a quello del TBA (Figura 4) e visto che è stata preservata sia la loro attività anticoagulante che l'affinità alla trombina (vedi sotto) è ragionevole ipotizzare che questo comportamento elettroforetico non coinvolga la capacità di **AA** e **AGlyA** di adottare strutture G-quadruplex "a sedia" (*chair-like*) identiche e indipendenti. Tenendo in considerazione che entrambi questi oligonucleotidi presentano dei residui adenosinici nella composizione dei loro *linker*, la presenza di una banda più veloce potrebbe essere spiegata con la propensione delle basi puriniche ad interagire con G-quadruplex adiacenti, formando così strutture prevalenti più compatte che riducono l'impatto del *linker* sulla mobilità elettroforetica. Nel caso di **Gly**, **AGlyA** e **TGlyT** un ulteriore banda minore, con una mobilità elettroforetica comparabile a quella del TBA, è appena visibile. Questo risultato indicherebbe che la maggiore labilità dei dimeri G-quadruplex contenenti glicerolo abbia causato una degradazione in monomeri di una piccola quantità dei campioni degli oligonucleotidi usati per l'elettroforesi. La valutazione della resistenza dei derivati dimerici del TBA mediante saggio in FBS (vedi sotto) è chiaramente in accordo con questa ipotesi.

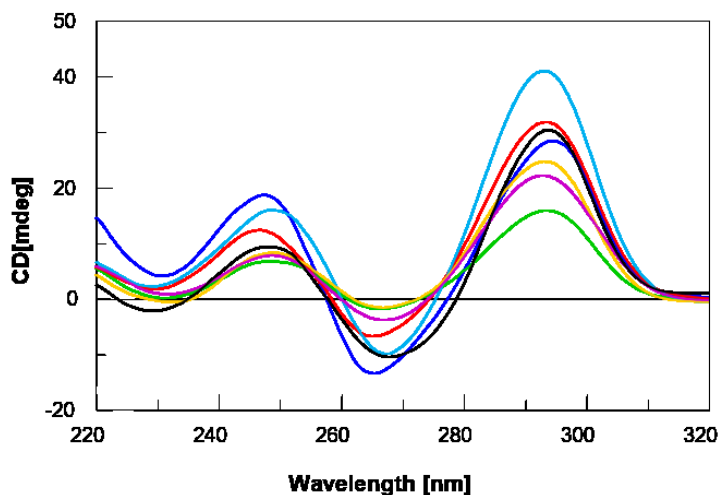


Figura 4. Spettri CD degli oligonucleotidi studiati. **AA** (blu scuro), **TT** (viola), **Gly** (rosso), **TGlyT** (giallo) e **AGlyA** (verde). Gli oligonucleotidi TBA (nero) e RA-36 (azzurro) sono stati introdotti come riferimenti. Vedi il testo principale e la sezione metodi per i dettagli.

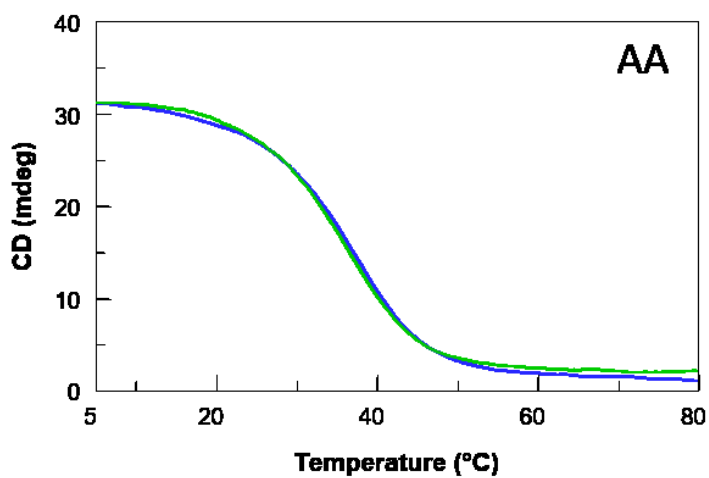


Figura 5. Curve CD rappresentative di *melting* (blu) e *annealing* (verde) della G-quadruplex formata da **AA**. Vedi il testo principale e la sezione metodi per i dettagli.



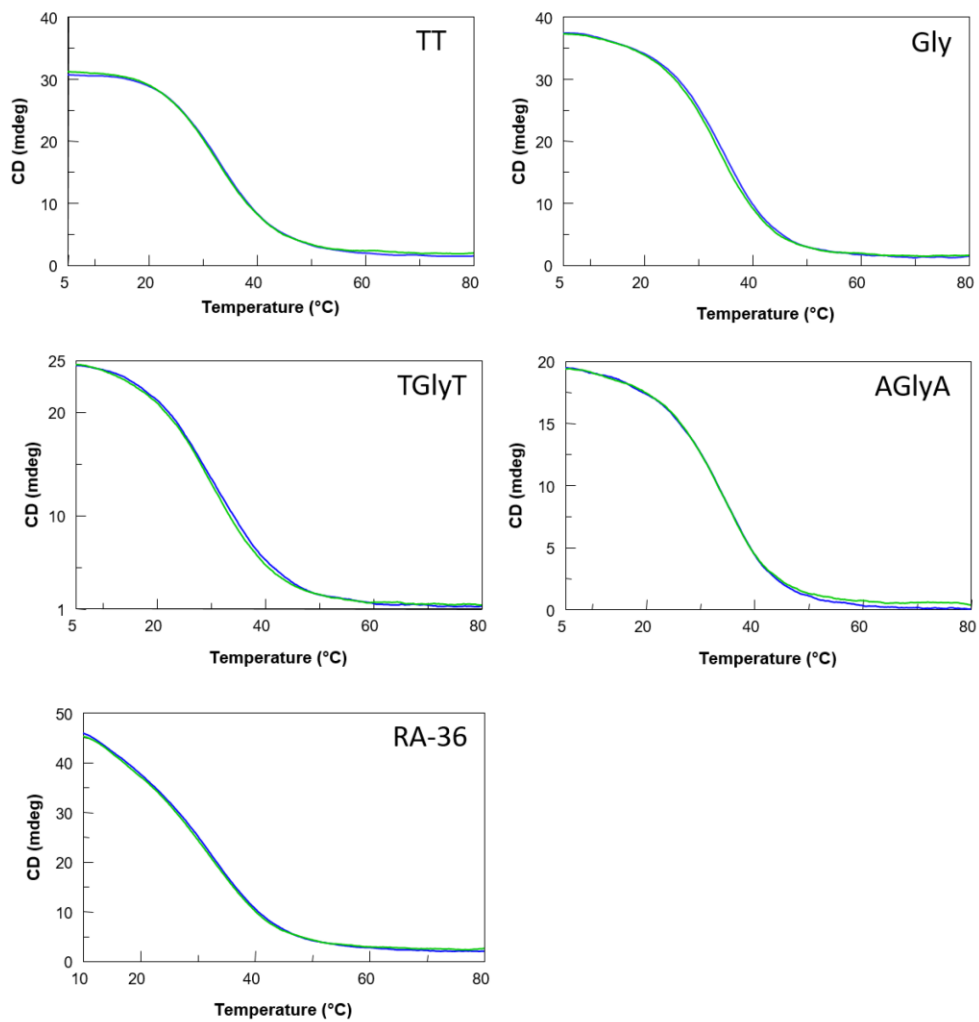


Figura 6. Profili di *melting* (blu) e *annealing* (verde) CD delle G-quadruplex formate da **TT**, **Gly**, **TGlyT**, **AGlyA** e **RA-36**. Vedi il testo principale e la sezione sperimentale per i dettagli.

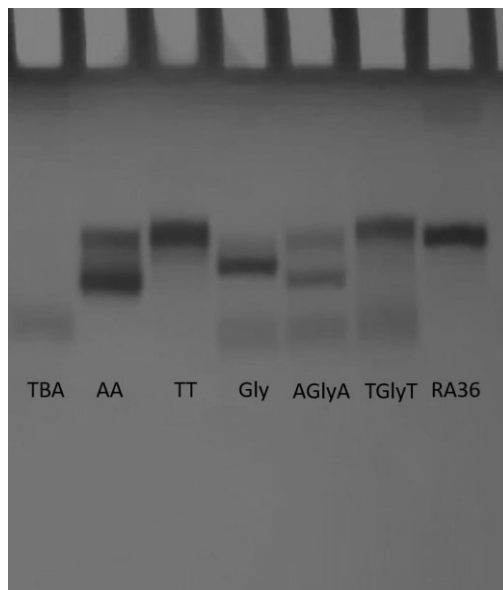


Figura 7. Elettroforesi su gel di poliacrilammide degli oligonucleotidi studiati (Tabella 1). Le strutture G-quadruplex di TBA e RA-36 sono state usate come riferimenti. Vedi il testo principale e la sezione sperimentale per i dettagli.

### ***Valutazioni delle interazioni aptamero/trombina***

Allo scopo di valutare e quantificare l'interazione tra il TBA e i suoi analoghi dimerici e l' $\alpha$ -trombina umana, sono state eseguite misure ITC. In primo luogo, l'interazione tra il TBA e la trombina è stata analizzata a due differenti concentrazioni in modo da ottenere valori di  $K_d$  più affidabili. In entrambi i casi, l'evoluzione del cambio di temperatura durante la titolazione è indicativa di un forte legame tra le due molecole (Figura 8, A e B). I dati ITC, dopo integrazione e correzione per le temperature di diluizione, sono stati adattati ad un modello *one-set-of-site-binding*. L'adattamento ottimale dei dati sperimentali ha fornito un'affidabile costante di dissociazione  $K_d$  di  $8 \pm 1$  nM. In secondo luogo, tutti gli altri oligonucleotidi sono stati studiati considerando il valore di concentrazione usato nei saggi biologici. Tutti gli analoghi dimerici del TBA hanno dimostrato di essere capaci di legare la trombina e, in particolare, gli oligonucleotidi **AA**, **TT** (Figura 8 C) e **AGlyA** mostrano valori di  $K_d$ , (cioè 10 nM, 5 nM e 5 nM, rispettivamente), comparabili a quello del TBA ( $K_d =$

8 nM) (Figura 9, Tabella 2) mentre RA-36 ha mostrato l'affinità più bassa ( $K_d = 100$  nM) (Figura 8 D). Un dato interessante riguarda gli oligonucleotidi **AA** e **TT** che presentano un trend compatibile con una reazione esotermica, diversamente dalle varianti **Gly**, **AGlyA** e **TGlyT** che manifestano un profilo di titolazione endotermico. Tale comportamento induce a ritenere che i *linker* contenenti il glicerolo potrebbero essere coinvolti nell'interazione con la trombina.

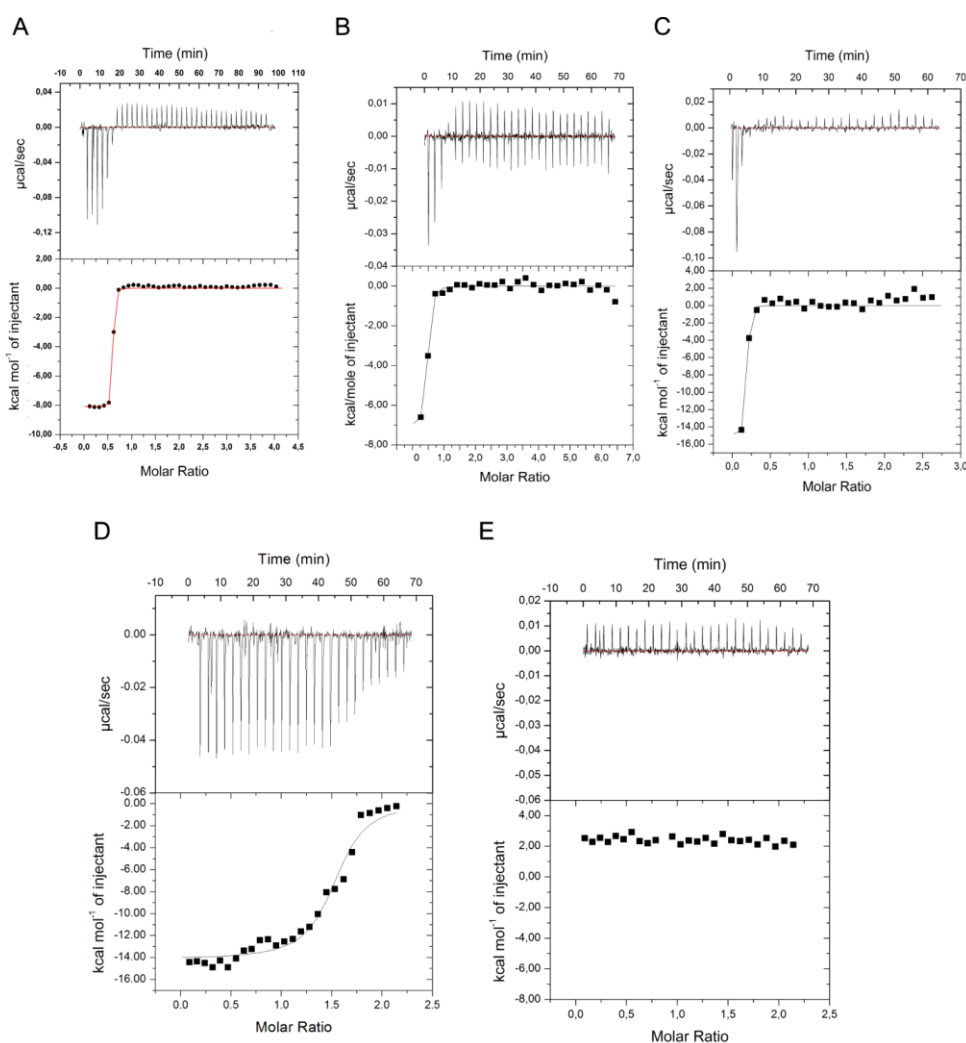


Figura 8. Dati di calorimetria isoterma di titolazione dell'interazione della trombina con TBA (A) 100  $\mu\text{M}$  contro la trombina 10  $\mu\text{M}$ , con TBA (B) 25  $\mu\text{M}$  contro la trombina 2.5  $\mu\text{M}$ , con **TT** (C), con RA-36 (D) e controllo (E). I pannelli superiori e inferiori riportano i dati non processati e quelli integrati, rispettivamente.

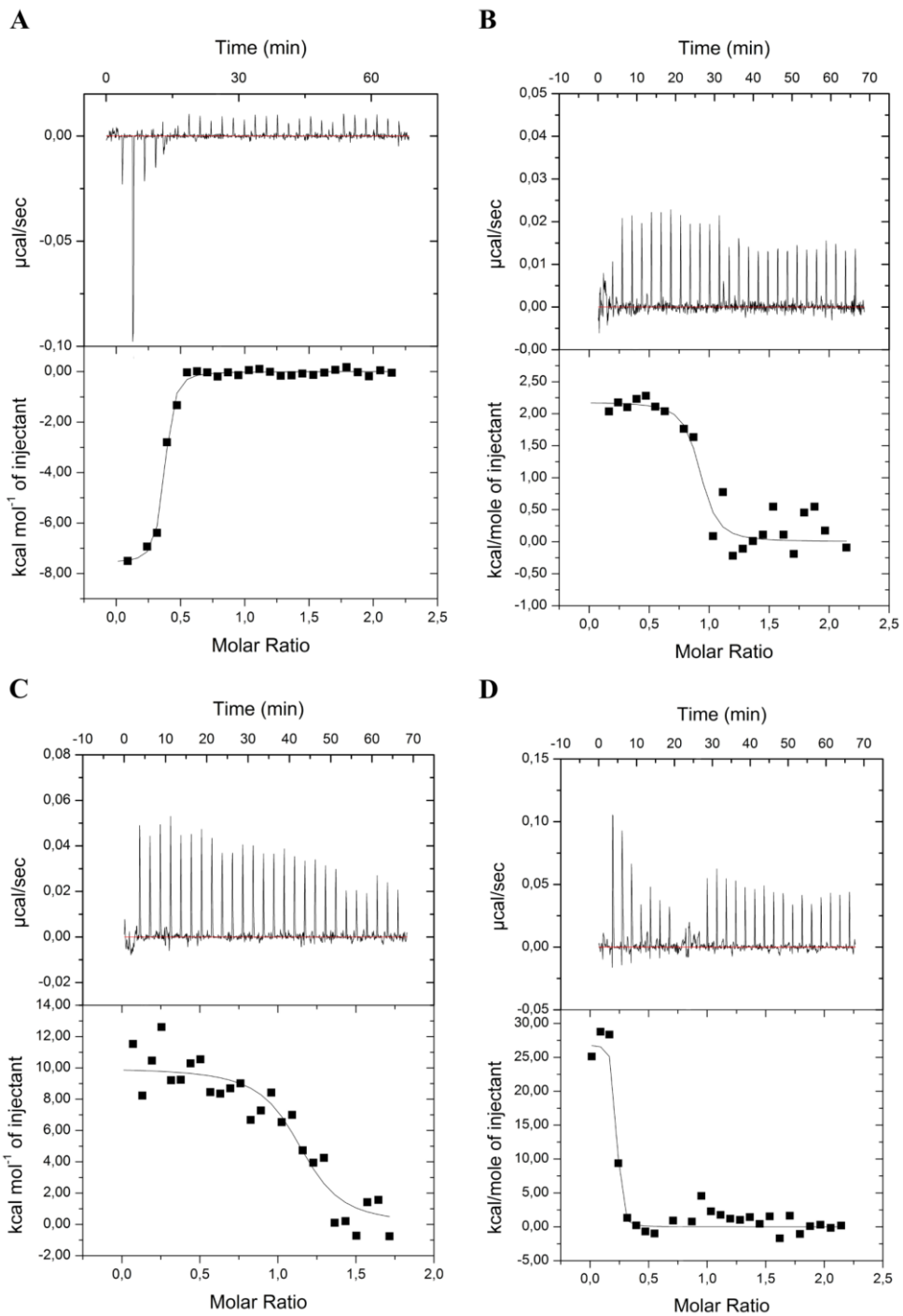


Figura 9. Analisi ITC del legame della trombina ai differenti derivati dimerici del TBA. Sono mostrati i dati di calorimetria isoterma di titolazione dell'interazione della trombina con **AA** (A), **Gly** (B), **TGlyT** (C) e **AGlyA** (D). I pannelli superiori e inferiori riportano i dati non processati e quelli integrati, rispettivamente.

Name	Sequence	K <sub>d</sub>
TBA	5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3'	8 ± 1 nM
<b>RA-36</b>	5'-TBA-T-TBA-3'	100 ± 5 nM
<b>AA</b>	5'-TBA-A-3'-3'-A-TBA-5'	10 ± 2 nM
<b>TT</b>	5'-TBA-T-3'-3'-T-TBA-5'	5 ± 0.5 nM
<b>Gly</b>	5'-TBA-3'-Gly-3'-TBA-5'	15 ± 3 nM
<b>AGlyA</b>	5'-TBA-A-3'-Gly-3'-A-TBA-5'	5 ± 1 nM
<b>TGlyT</b>	5'-TBA-T-3'-Gly-3'-T-TBA-5'	50 ± 7 nM

Tabella 2. Valori delle costanti di dissociazione (K<sub>d</sub>) derivate dagli esperimenti ITC. Vedi il testo principale per i dettagli.

### ***Attività anticoagulante***

Per valutare le proprietà anticoagulanti degli analoghi dimerici del TBA, gli oligonucleotidi sono stati sottoposti al saggio PT e le loro attività anticoagulanti sono state confrontate con quella del TBA (Figura 10). I risultati mostrano che tutti gli aptameri, eccetto **TGlyT**, manifestano un tempo PT prolungato ad entrambe le concentrazioni testate (2 e 20 μM). Tuttavia, quando confrontati con il TBA, tra gli oligonucleotidi testati sono state individuate alcune differenze. In particolare, alle concentrazioni più basse utilizzate ovvero 2 μM, il PT rilevato per **TT**, **AGlyA** e **AA** è stato rispettivamente di 29.6±0.18, 30.5±1.2 and 32.6±0.32 sec. Questi valori PT sono significativamente più alti rispetto al valore (25.7±0.10 sec) mostrato dalla loro controparte naturale, il TBA, e a quello di RA-36 per il quale è stato riportato un valore PT di circa 23 sec [9]. Diversamente, la valutazione del PT incubato nel plasma con **Gly** rivela un incremento del valore PT sovrapponibile a quello osservato per il TBA. Questi dati sono abbastanza in accordo con quelli riguardanti i valori della costante di dissociazione del complesso aptamero/trombina calcolati mediante ITC (Tabella 2). Per quanto riguarda l'assenza di attività anticoagulante di **TGlyT**, dovrebbe essere notato che questa variante mostra sia la più bassa stabilità termica (Tabella 1) che la più alta costante di dissociazione (Tabella 2) indicando

chiaramente che queste due caratteristiche negative contribuiscono al crollo dell'attività biologica. Inaspettatamente, quando gli analoghi dimerici del TBA sono stati valutati a concentrazioni più alte (20  $\mu\text{M}$ ), è stata rilevata, rispetto al TBA, una riduzione delle proprietà anticoagulanti. Questi dati suggeriscono un effetto negativo della concentrazione che potrebbe essere dovuto ad un incremento, in queste condizioni, delle interazioni intermolecolari tra i domini G-quadruplex.

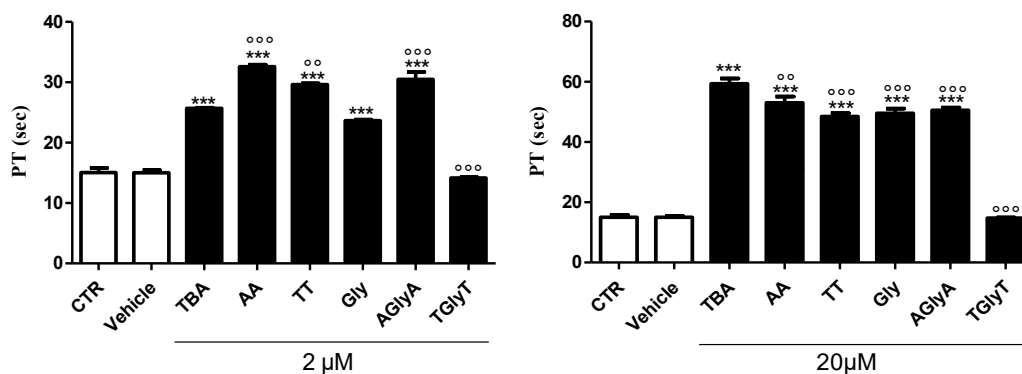


Figura 10. Valori PT degli analoghi dimerici del TBA e della loro controparte naturale a 2 e 20  $\mu\text{M}$  per 15 min di incubazione. Vedi la sezione Metodi per i dettagli. \*\*\* =  $p < 0.001$  vs. veicolo, °° =  $p < 0.01$ , °°° =  $p < 0.001$  vs. TBA ( $n = 3$ ).

### **Resistenza in ambiente biologico**

Al fine di valutare la resistenza in ambiente biologico, tutti gli analoghi dimerici del TBA sono stati sottoposti al saggio di degradazione in siero fetale bovino (Figura 11) e analizzati mediante elettroforesi su gel. I dati hanno indicato che, dopo 6 ore, ci sono ancora significative quantità degli oligonucleotidi **AA** e **TT** integri. Al contrario, per RA-36, dopo lo stesso tempo, è evidente una degradazione quasi completa mentre è stato dimostrato che il TBA, nelle medesime condizioni, si degrada completamente dopo solo 1 ora [18]. Questi dati possono essere spiegati tenendo in considerazione che **AA** e **TT** sono caratterizzati solo da estremità 5' mentre TBA e RA-36 hanno sequenze canoniche con un'estremità 3' più sensibile alle nucleasi. Sorprendentemente, **Gly**, **AGlyA** e **TGlyT** dopo 6 ore, hanno manifestato una

minore resistenza rispetto agli altri analoghi dimerici del TBA con siti ad inversione di polarità, sebbene anch'essi esibiscano unicamente estremità 5'. Questi dati indicano che i *linker* contenenti il glicerolo rendono le molecole meno resistenti negli ambienti biologici.

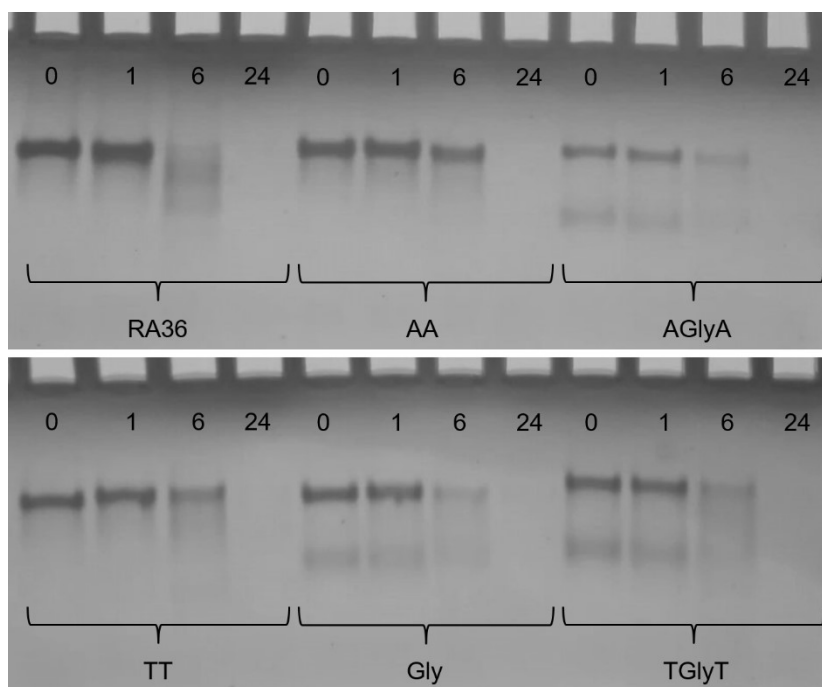


Figura 11. Stabilità degli oligonucleotidi studiati in siero fetale bovino (FBS) al 10%, come osservato mediante PAGE non denaturante. I punti temporali 0, 1, 6, e 24 sono in ore. Vedi la sezione metodi per i dettagli sperimentali.

## **CONCLUSIONI**

La dimerizzazione del dominio attivo è una delle strategie spesso usate per migliorare le proprietà degli aptameri. Proprio come gli altri aptameri, anche il TBA, essendo uno degli aptameri più studiati, è stato sottoposto a studi di dimerizzazione. In particolare, le proprietà di un analogo dimerico del TBA contenente due domini separati da un residuo di timidina (ossia il 31-mer RA-36) è

stato dettagliatamente studiato. Tuttavia, visto che RA-36 analogamente al TBA, è una sequenza canonica del DNA, esso è facilmente degradato negli ambienti biologici. Inoltre, studi di *truncation* hanno dimostrato che il dominio 5'-G-quadruplex contribuisce all'attività anticoagulante in misura maggiore rispetto al dominio 3'-G-quadruplex. In questo ambito, abbiamo sintetizzato 5 analoghi dimerici del TBA in cui due domini 5'-G-quadruplex sono connessi attraverso le loro estremità 3' utilizzando dei *linker* contenenti due nucleotidi e/o glicerolo. Esperimenti CD e PAGE suggeriscono chiaramente che tutte le sequenze sono capaci di formare strutture monomolecolari con domini G-quadruplex molto simili a quella del TBA originario. Tuttavia, il tipo di *linker* può influenzare sia le proprietà chimico-fisiche che biologiche. La maggior parte degli analoghi dimerici mostra una stabilità termica comparabile al TBA, considerando l'errore sperimentale. Tuttavia, **AA** mostra una  $T_m$  leggermente più alta del TBA mentre **TGlyT** è caratterizzato da una  $T_m$  più bassa del TBA. Riguardo l'affinità per la trombina valutata mediante ITC, **AA**, **TT** e **AGlyA** sono caratterizzati da costanti di dissociazione con lo stesso ordine di grandezza del TBA. Al contrario, i valori delle costanti di dissociazione di **Gly** e **TGlyT** sono più alti del TBA indicando, così, che questi aptameri hanno una più bassa affinità per la trombina. Notevolmente, nel caso di RA-36, la misura ITC ha mostrato un'affinità per la trombina di gran lunga più bassa di quelle mostrate dai derivati **AA**, **TT** e **AGlyA**. Le proprietà biologiche degli analoghi del TBA a concentrazione più bassa sono abbastanza in accordo con le costanti di affinità per la trombina, con **AA**, **TT** e **AGlyA** che mostrano attività anticoagulanti più alte di quella del TBA, sebbene sia stato evidenziato un effetto negativo della concentrazione. Un dato interessante è che **AA** e **TT** hanno mostrato anche le più alte stabilità dopo 6 h in siero fetale bovino in cui TBA, RA-36 e i derivati del TBA contenenti la porzione glicerolica sono stati parzialmente o completamente degradati. Sebbene lo sviluppo clinico del TBA (o HD1) come farmaco anticoagulante sia stato interrotto, la ricerca



sulle varianti del TBA dotati di migliori proprietà e capaci di interagire con EXO I è ancora attiva, considerato il ruolo primario di questo sito nell'azione della trombina [19]. L'insieme dei nostri risultati rivela chiaramente che il tipo di dimerizzazione proposto è un'utile strategia per incrementare le proprietà del TBA.

## **Bibliografia**

- [1] Maier, K. E. & Levy, M. From selection hits to clinical leads: progress in aptamer discovery. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **3**, 16014 (2016).
- [2] Hasegawa, H., Taira, K., Sode, K. & Ikebukuro, K. Improvement of Aptamer Affinity by Dimerization. *Sensors* **8**, 1090–1098 (2008).
- [3] Di Giusto, D. A. & King, G. C. Construction, stability, and activity of multivalent circular anticoagulant aptamers. *J. Biol. Chem.* **279**, 46483–46489 (2004).
- [4] Hianik, T., Porfireva, A., Grman, I. & Evtugyn, G. Aptabodies - new type of artificial receptors for detection proteins. *Protein Pept. Lett.* **15**, 799–805 (2008).
- [5] Poniková, S., Tlučková, K., Antalík, M., Víglaský, V. & Hianik, T. The circular dichroism and differential scanning calorimetry study of the properties of DNA aptamer dimers. *Biophys. J.* **155**, 29–35 (2011).
- [6] Zavyalova, E. et al. Novel modular DNA aptamer for human thrombin with high anticoagulant activity. *Curr. Med. Chem.* **18**, 3343–50 (2011).
- [7] Zavyalova, E. et al. DNA Aptamers for Human Thrombin with High Anticoagulant Activity Demonstrate Target- and Species-Specificity. *Curr. Med. Chem.* **19**, 5232–5237 (2012).
- [8] Zavyalova, E., Golovin, A., Pavlova, G. & Kopylov, A. Module-Activity Relationship of Gquadruplex Based DNA Aptamers for Human Thrombin. *Curr. Med. Chem.* **20**, 4836–4843 (2013).
- [9] Zavyalova, E. et al. Evaluation of antithrombotic activity of thrombin DNA aptamers by a murine thrombosis model. *PLoS ONE* **9**, (2014).
- [10] Zavyalova, E. et al. The evaluation of pharmacodynamics and pharmacokinetics of antithrombin DNA aptamer RA-36. *Front. Pharmacol.* **8**, (2017).
- [11] Esposito, V., Virgilio, A., Randazzo, A., Galeone, A. & Mayol, L. A new class of DNA quadruplexes formed by oligodeoxyribonucleotides containing a 3'-3' or 5'-5' inversion of polarity site. *Chem. Commun. (Camb)* 3953–3955 (2005). doi:10.1039/b504455c
- [12] Galeone, A., Mayol, L., Virgilio, A., Virno, A. & Randazzo, A. A further contribution to the extreme variability of quadruplex structures from oligodeoxyribonucleotides containing inversion of polarity sites in the G-tract. *Molecular Biosystems* **4**, 426–430 (2008).
- [13] Esposito, V. et al. Effects of the introduction of inversion of polarity sites in the quadruplex forming oligonucleotide TGGGT. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **17**, 1997–2001 (2009).

- [14] Esposito, V. et al. A straightforward modification in the thrombin binding aptamer improving the stability, affinity to thrombin and nuclease resistance. *Org. Biomol. Chem.* **12**, 8840–8843 (2014).
- [15] Virgilio, A. et al. Improved thrombin binding aptamer analogues containing inversion of polarity sites: Structural effects of extra-residues at the ends. *Org. Biomol. Chem.* **14**, 7707–7714 (2016).
- [16] Esposito, V. et al. Thrombin binding aptamer analogues containing inversion of polarity sites endowed with antiproliferative and anti-motility properties against Calu-6 cells. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **1862**, 2645–2650 (2018).
- [17] Pirone, L. et al. Functional analyses yield detailed insight into the mechanism of thrombin inhibition by the antihemostatic salivary protein cE5 from *Anopheles gambiae*. *Journal of Biological Chemistry* **292**, 12632–12642 (2017).
- [18] Peng, C. G. & Damha, M. J. G-quadruplex induced stabilization by 2'-deoxy-2'-fluorodarabinonucleic acids (2'F-ANA). *Nucleic Acids Res.* **35**, 4977–4988 (2007).
- [19] Derszniak, K. et al. Comparison of Effects of Anti-thrombin Aptamers HD1 and HD22 on Aggregation of Human Platelets, Thrombin Generation, Fibrin Formation, and Thrombus Formation Under Flow Conditions. *Frontiers in Pharmacology* **10**, 1–13 (2019).

## **CAPITOLO 5: APTAMERI AD ATTIVITA' ANTIPROLIFERATIVA**

### **5.1 Il duplice aspetto del TBA: studio delle proprietà anticoagulanti e antiproliferative attraverso semplici modifiche chimiche.**

#### **INTRODUZIONE**

L'aptamero legante la trombina (TBA) è un oligodeossinucleotide lungo 15 basi (5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3') dotato di interessanti proprietà anticoagulanti [1,2] (Figura 1). Numerosi studi hanno mostrato che le tetradi di G sono maggiormente responsabili della stabilità termica dell'aptamero mentre i *loop* sono coinvolti nell'interazione con la sua proteina target ovvero la trombina. In particolare, questi studi hanno indicato che i *loop* minori TT interagiscono con l'esosito anionico I della trombina mentre il *loop* più largo TGT è nelle vicinanze del sito legante l'eparina di un'ulteriore molecola di trombina [2-4].

Dopo la sua scoperta, il TBA è stato sottoposto ad una pletera di modifiche chimiche indirizzate a migliorare la stabilità termica, la resistenza alle nucleasi e l'attività anticoagulante [5]. Sia le modifiche riguardanti lo scheletro zucchero-fosfato che gli studi concernenti la sostituzione di singole basi nei *loop* hanno permesso l'ottenimento di utili dati circa il ruolo di ciascun residuo nella stabilità strutturale e/o nell'attività anticoagulante. Limitando la nostra discussione ai *loop* TT ossia quelli principalmente coinvolti nell'interazione con il target, la generale visione d'insieme, che è emersa dai dati in letteratura, suggerisce che i miglioramenti dell'attività anticoagulante sono più probabili se le modifiche riguardano i residui T<sub>3</sub> e T<sub>12</sub> [6-11]. D'altronde, i residui T<sub>4</sub> e T<sub>13</sub> hanno dimostrato di essere particolarmente cruciali per l'attività anticoagulante, pertanto, quasi tutte le modifiche riguardanti questi residui risultano deleterie per le proprietà biologiche

[7,8,12]. Tuttavia, contrariamente alla tendenza generale indicata sopra, in un recente lavoro, è stato mostrato che la sostituzione sito specifica del gruppo metilico della timina dei residui 4 e 13 con il fluoro, migliora significativamente la stabilità strutturale e l'attività anticoagulante [13]. Questo risultato suggerisce la possibilità di modulare le proprietà del TBA attraverso semplici piccole modifiche concernenti posizioni specifiche.

Accanto all'attività anticoagulante, proprio come altri oligonucleotidi ricchi di G, il TBA ha mostrato anche proprietà antiproliferative [14]. In quest'ambito, la simultanea attività anticoagulante del TBA rappresenta uno svantaggio nell'utilizzazione di questa addizionale proprietà biologica. Tuttavia, recenti lavori riguardanti sia la sostituzione di specifici residui con un *linker* dibenzilico appositamente preparato [15], che sostanziali modifiche dello scheletro zuccherofosfato [16], hanno mostrato che è possibile sviluppare analoghi del TBA in cui l'attività anticoagulante è stata rimossa o considerevolmente ridotta ma ancora dotati di una notevole attività antiproliferativa. Nel tentativo di continuare e migliorare le nostre precedenti ricerche sono stati preparati analoghi del TBA in cui i residui T<sub>4</sub> e T<sub>13</sub> sono stati sostituiti con derivati timidinici disponibili commercialmente (Tabella 1) con gli obiettivi di: i) incrementare le loro proprietà strutturali ed anticoagulanti attraverso semplici piccole modifiche o, al contrario, ii) ridurre o eliminare completamente l'attività anticoagulante in modo da preservare, come proprietà biologica, solo quella antiproliferativa. Specificamente, i derivati del TBA contenenti 2'-deossiuridina (**U**) e 5-bromo-2'-deossiuridina (**B**) sono stati studiati mediante tecniche CD e NMR e le loro proprietà anticoagulante ed antiproliferativa sono state valutate e confrontate con quelle della loro controparte naturale, il TBA, e di derivati analoghi contenenti 5-idrossimetil-2'-deossiuridina (**H**) precedentemente investigati [17]. Per stimare il contributo dei prodotti guaninici derivati dalla degradazione biologica all'attività antiproliferativa, è stato anche

studiato un derivato *scrambled* del TBA (**sTBA**) in cui la composizione delle basi e la lunghezza dell'aptamero originario sono state mantenute.

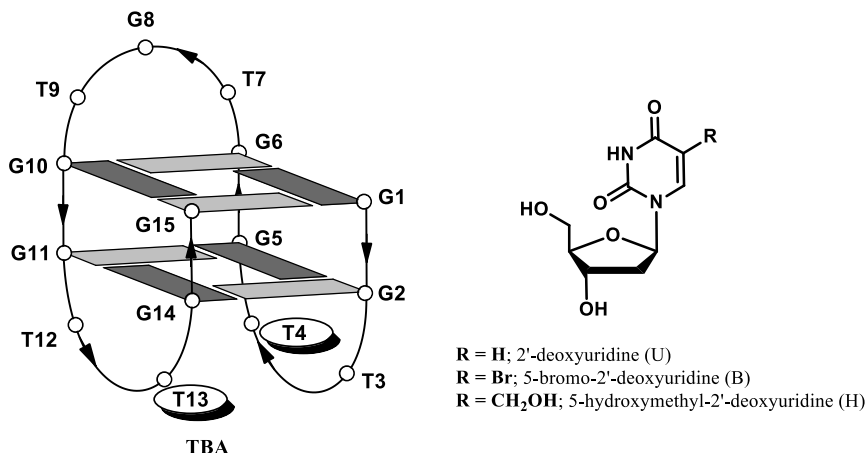


Figura 1. Rappresentazione schematica della struttura G-quadruplex adottata dal TBA e strutture chimiche dei nucleosidi introdotti nelle posizioni 4 e 13. Le guanosine nelle conformazioni glicosidiche *syn* ed *anti* sono in grigio scuro e chiaro, rispettivamente.

Name	Sequence*	T <sub>m</sub> (°C) (±1)	ΔT <sub>m</sub> (°C)
<b>TBA</b>	5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3'	50	-
<b>TBA-U4</b>	5'-GGTUGGTGTGGTTGG-3'	51	+1
<b>TBA-U13</b>	5'-GGTTGGTGTGGTUGG-3'	50	0
<b>TBA-B4</b>	5'-GGT <b>B</b> GGTGTGGTTGG-3'	57	+7
<b>TBA-B13</b>	5'-GGTTGGTGTGGT <b>B</b> GG-3'	57	+7
<b>TBA-H4<sup>a</sup></b>	5'-GGT <b>H</b> GGTGTGGTTGG-3'	50	0
<b>TBA-H13<sup>a</sup></b>	5'-GGTTGGTGTGGT <b>H</b> GG-3'	50	0
<b>sTBA</b>	5'-GTGGTGTGTGTGTGG-3'	-	-

\*U = 2'-deoxyuridine; B = 5-bromo-2'-deoxyuridine; H = 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine

Tabella 1. Nome, sequenza e temperature di fusione degli oligonucleotidi studiati. ΔT<sub>m</sub> indica la differenza tra la T<sub>m</sub> degli aptameri modificati e quella del TBA.

### **5.1.1 SEZIONE SPERIMENTALE**

#### ***Sintesi e purificazione degli oligonucleotidi***

Gli oligonucleotidi riportati in Tabella 1 sono stati sintetizzati mediante un sintetizzatore Millipore Cyclone Plus DNA tramite la chimica in fase solida dei  $\beta$ -cianoetilfosforamiditi su scala 10  $\mu$ mol. I monomeri modificati sono stati introdotti nelle sequenze usando i derivati commercialmente disponibili 5'-dimetossitritil-5-bromo-2'-deossiuridina, 3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidito, 5'-dimetossitritil-2'-deossiuridina, 3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidito e 5'-dimetossitritil-5-acetossimetil-2'-deossiuridina, 3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidito (Glen Research). Gli oligomeri sono stati rimossi dal supporto e deprotetti mediante trattamento con una soluzione acquosa di ammoniaca concentrata a temperatura ambiente per 24 h (**TBA-B4** e **TBA-B13**) o a 55°C per una notte (tutti gli altri). La miscela è stata quindi filtrata, lavata e successivamente concentrata a pressione ridotta. In seguito è stata ridisciolta in H<sub>2</sub>O, analizzata e purificata mediante cromatografia liquida ad elevata prestazione (HPLC) su una colonna Nucleogel SAX (Macherey–Nagel, 1000-8/46) con gli eluenti: Tampone A: 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in soluzione acquosa a pH7.0 contenente 20% (v/v) CH<sub>3</sub>CN e Tampone B: 1 M NaCl, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in soluzione acquosa a pH7.0 contenente 20% (v/v) CH<sub>3</sub>CN. Per l'eluizione del campione è stato usato un gradiente lineare 0% B→100%B in 45 min ad un flusso di 1.0 ml/min. Le frazioni degli oligomeri sono state raccolte e successivamente desalificate su colonne Sep-Pak (C18). Gli oligomeri isolati sono risultati puri all'NMR più del 98%.

#### ***Spettroscopia CD***

I campioni CD degli oligonucleotidi riportati in Tabella 1 sono stati preparati ad una concentrazione di oligonucleotide di 100  $\mu$ M utilizzando un tampone fosfato di

potassio (10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 70 mM KCl, pH 7.0) e sottoposti alla procedura di *annealing* (riscaldando a 90°C e facendo raffreddare lentamente a temperatura ambiente). Per tutti i campioni, gli spettri CD e le curve di fusione CD sono stati registrati su uno spettrofotometro Jasco 715 CD. Per gli spettri CD, la lunghezza d'onda è stata variata da 220 nm a 320 nm alla velocità di scansione di 100 nm min<sup>-1</sup> e gli spettri sono stati registrati con una risposta di 16 s e un'ampiezza di banda di 2.0 nm. Agli spettri dei campioni è stato sottratto lo spettro del tampone. La temperatura è stata mantenuta costante a 20 °C con una cella programmabile termoelettricamente controllata (JASCO PTC-348). Per tutti i campioni, le curve di *melting* e *annealing* sono state registrate in funzione della temperatura (range: 20 °C- 90 °C) in corrispondenza del loro massimo effetto Cotton. I dati CD sono stati registrati utilizzando una cuvetta con un cammino ottico di 0,1 cm e con una velocità di scansione di 0.5 °C/min.

### ***Risonanza Magnetica Nucleare***

I campioni NMR sono stati preparati ad una concentrazione di circa 2 mM in 0.6 ml ( $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  9:1 v/v) di una soluzione tampone a pH 7, 10 mM di  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 70 mM di KCl e 0.2 mM di EDTA. Tutti i campioni sono stati riscaldati per 5-10 min a 90 °C e lentamente raffreddati (10-12 ore) a temperatura ambiente. Le soluzioni sono state equilibrate per un giorno a 4°C. Il processo di *annealing* è stato ritenuto completo quando gli spettri  $\text{H}^1$  NMR risultavano sovrapponibili al variare del tempo. Gli spettri NMR sono stati registrati su uno spettrometro Varian Unity INOVA 500 MHz. Gli spettri protonici monodimensionali dei campioni in  $\text{H}_2\text{O}$  sono stati registrati usando la sequenza di gradienti DPGSE per la soppressione del segnale dell'acqua [18]. I segnali relativi ai protoni del sodio 2,2-dimetil-2-silapentan-5-solfonato (DSS) sono stati usati come riferimento per i *chemical shift* dei protoni ( $^1\text{H}$ ). Per gli esperimenti in  $\text{H}_2\text{O}$  NOESY [19] (con *mixing times* di 250 and 180 ms) e

TOCSY [20] (con *mixing time* di 120 ms) è stata usata la sequenza di gradienti DPGSE. Tutti gli esperimenti sono stati registrati usando la procedura STATES-TPPI per la *quadrature detection* [21]. In tutti gli esperimenti 2D, i dati nel dominio del tempo consistono di 2048 punti complessi in  $t_2$  e 400–512 *fids* nella dimensione  $t_1$ . Il tempo di rilassamento è stato settato a 1.2 s per tutti gli esperimenti.

### ***Saggio del tempo di protrombina (PT)***

Il saggio del tempo di protrombina è stato eseguito su campioni di plasma umano ed è stato misurato usando un apparecchio *Koagulab MJ Coagulation System* dotato di uno specifico *kit RecombiPlastin* (tromboplastina ricombinante) *Hemosil 2G* (Instrumentation Laboratory, Milano, Italia). Questo metodo si basa sull'elevata sensibilità del reagente tromboplastina basato su fattori ricombinanti di tessuto umano. L'aggiunta al plasma della tromboplastina ricombinante, in presenza di ioni calcio, innesca l'attivazione del *pathway* estrinseco della coagulazione che culmina con la conversione del fibrinogeno in fibrina e la formazione di un gel solido. La procedura è stata eseguita secondo manuale. Nelle nostre condizioni sperimentali, ciascun oligonucleotide o il veicolo è stato incubato con 100  $\mu\text{l}$  di plasma a 37 °C per 15 min, dopodiché sono stati aggiunti 200  $\mu\text{l}$  della soluzione del kit contenente tromboplastina ricombinante con conseguente attivazione del *pathway* estrinseco. In particolare, per la valutazione del PT alla concentrazione di 20  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{l}$  di soluzione del corrispondente oligonucleotide (1 mM) o veicolo (tampone fosfato salino, PBS) sono stati aggiunti nell'apposito microtubo. Per la valutazione del PT alla concentrazione di 2  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{l}$  di una soluzione diluita (0.1 mM di soluzione oligonucleotidica in tampone PBS) sono stati aggiunti nell'apposito microtubo. La misura del PT è stata prodotta in triplicato e le medie e i valori dell'errore standard sono stati calcolati ed espressi in secondi. Il tempo di coagulazione basale è stato determinato misurando il tempo di coagulazione in presenza del veicolo.



### ***Il saggio MTT***

Le cellule Calu-6 [22] e HCT 116<sup>p53-/-</sup> [23] sono state seminate su piastre a 96 pozzetti alla densità di  $2 \times 10^4$  cellule/pozzetto e trattate con i differenti oligonucleotidi alla concentrazione finale di 10  $\mu$ M e 50  $\mu$ M dalle 24 alle 72 ore. Successivamente, la vitalità cellulare è stata determinata utilizzando il saggio MTT come precedentemente riportato [24]. Un gruppo di tre diversi set di esperimenti, ciascuno ripetuto in triplice copia sono stati eseguiti. Le barre di errore rappresentano la media  $\pm$  SEM da  $n = 3$  repliche biologiche. I confronti statistici sono stati effettuati come mostrato in precedenza [25].

### ***Saggio di stabilità nell'estratto delle cellule HCT 116<sup>p53-/-</sup>***

Il saggio di stabilità alle nucleasi degli oligonucleotidi modificati è stato condotto nell'estratto delle cellule HCT 116<sup>p53-/-</sup> preparato attraverso i metodi precedentemente descritti [26]. Circa 7 nmol di ciascun oligonucleotide ( $\sim 1$  O.D.U.) in un tampone contenente 10 mM di  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 70 mM di KCl a pH= 7 sono stati incubati con 100  $\mu$ g di estratto cellulare (25  $\mu$ l) a 37 °C per 72 h (volume totale di 500  $\mu$ l). A 0, 24, 48 e 72 h, 125  $\mu$ l dei campioni sono stati raccolti e conservati a -20 °C per almeno 20 min. Questi campioni sono stati seccati e successivamente sono stati aggiunti 5  $\mu$ l di tampone di caricamento del gel e 5  $\mu$ l di  $\text{H}_2\text{O}$  sterile. Questa miscela è stata usata per l'elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE) che è stata eseguita a temperatura ambiente usando un gel al 20% di poliacrilammide nel tampone TBE 1x (Tris-Borato-EDTA). I *pattern* di degradazione sono stati visualizzati sul gel mediante *UV shadowing*.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### CD e CD melting

La spettroscopia CD è considerata una tecnica utile per ottenere informazioni strutturali preliminari sulla conformazione adottata da una specifica sequenza che adotta una struttura G-quadruplex [27]. Lo spettro CD del TBA mostra il profilo tipico di una struttura G-quadruplex antiparallela in cui guanosine *anti* e *syn* si alternano lungo i filamenti, essendo caratterizzata da due bande positive a 247 e 295 nm e da una banda negativa a 266 nm. Considerando la particolarità di questo profilo e le modifiche marginali introdotte negli analoghi del TBA rispetto alla struttura originale, un attento confronto tra il profilo CD dei derivati del TBA e quello della loro controparte naturale può essere considerato un utile metodo per valutare le sottili differenze nel loro comportamento (Figura 2).

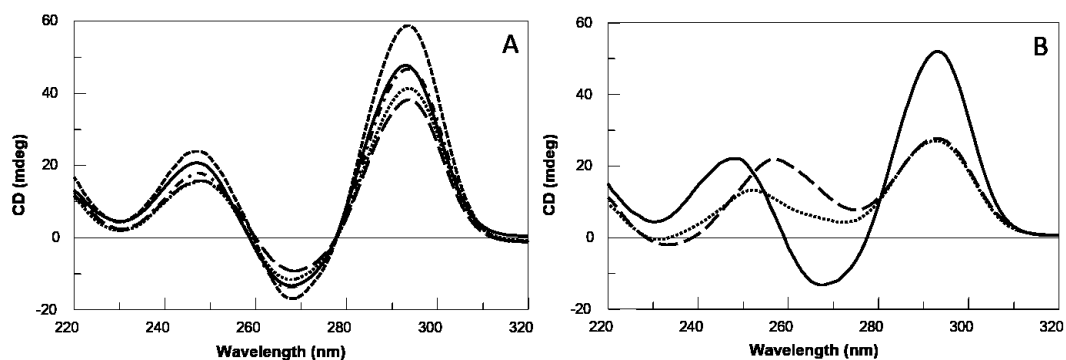


Figura 2. Gli spettri CD a 20 °C del **TBA-U4** (·····), **TBA-U13** (— · — · —), **TBA-B4** (— — —), **TBA-B13** (— — —) e **TBA** (—) (Pannello A); **TBA-H4** (— — —), **TBA-H13** (·····) e **TBA** (—) (Pannello B) ad una concentrazione di oligonucleotide di 100  $\mu$ M in una soluzione tampone 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 70 mM KCl (pH 7.0).

A parte trascurabili differenze riguardanti l'intensità delle bande, **TBA-U4**, **TBA-U13**, **TBA-B4** e **TBA-B13** mostrano spettri CD (Figura 2A) molto simili a quello della loro controparte naturale indicando, pertanto, la formazione di strutture G-quadruplex antiparallele equiparabili a quella dell'aptamero inalterato. Al contrario, i profili CD di **TBA-H4** e **TBA H-13** non mostrano la banda negativa a 266 nm e, in generale,

sono piuttosto differenti da quello del TBA suggerendo chiaramente, la presenza di conformazioni G-quadruplex abbastanza diverse da quella originale (Figura 2B).

Al fine di escludere la formazione di strutture G-quadruplex per **sTBA**, è stato registrato il suo spettro CD (Figura 3). L'intensità del segnale CD appare molto bassa, soprattutto se paragonata a quella del TBA. Inoltre, lo spettro CD di **sTBA** non mostra un profilo attribuibile a conformazioni note del DNA. Questi dati indicano chiaramente che **sTBA** è presente in soluzione principalmente come singolo filamento non strutturato (*random coil*).

Le misure delle curve di fusione CD sono state usate per valutare la stabilità termica degli aptameri modificati (Figura 4). I sigmoidali e ben definiti profili di fusione CD dei derivati del **TBA** contenenti **U** e **B** hanno permesso di misurare con affidabilità le temperature di *melting* ( $T_m$ ) (Tabella 1). Un confronto di tutti i dati ottenuti, mostra che mentre le  $T_m$  di **TBA-U4**, **TBA-U13**, **TBA-H4** e **TBA-H13** sono simili a quella dell'aptamero non modificato, **TBA-B4** e **TBA-B13** sono caratterizzati da  $T_m$  più alte ( $\Delta T = +7$  °C) della loro controparte naturale. Questi dati sono in accordo con quelli ottenuti per i derivati contenenti 5-fluoro-2'-deossiuridina [13] per i quali sono state osservate temperature di *melting* perfino più alte e suggerirebbero che l'introduzione di atomi elettronegativi in posizione 5 delle basi 4 o 13, incrementa notevolmente la stabilità termica dell'aptamero. Significativamente, le curve di *melting* e *annealing* di ciascun derivato del **TBA** contenente **U** e **B** sono quasi sovrapponibili suggerendo così la presenza di strutture G-quadruplex monomolecolari, come nel caso dell'aptamero non modificato (Figura 4).

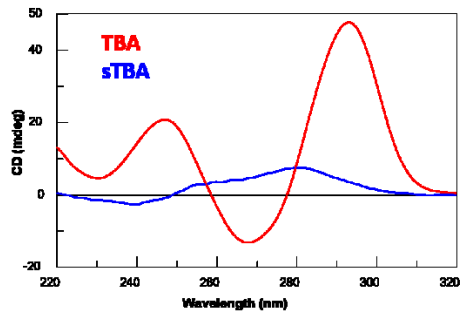


Figura 3. Spettri CD a 20°C di sTBA (TBA scrambled) in confronto con TBA ad una concentrazione di oligonucleotide di 100  $\mu$ M in una soluzione tampone 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 70 mM KCl (pH 7.0).

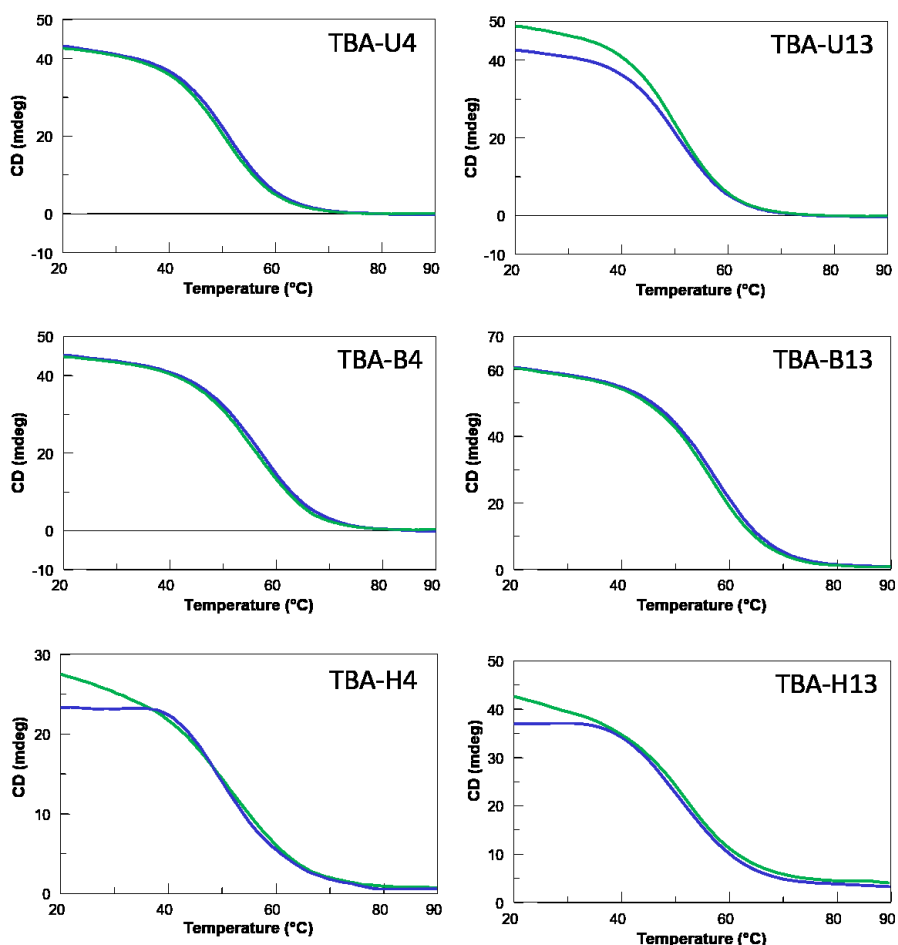


Figura 4. Curve CD *melting* (blu) ed *annealing* (verde) registrate, per tutte le G-quadruplex modificate, in funzione della temperatura alle lunghezze d'onda corrispondenti al loro massimo effetto Cotton. I dati CD sono stati registrati utilizzando una cuvetta con un cammino ottico di 0,1 cm, con una velocità di scansione di 0.5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  ad una concentrazione di oligonucleotide di 100  $\mu$ M in tampone potassio (vedi la sezione sperimentale per i dettagli).

## Risonanza magnetica nucleare

La capacità di **TBA-U4**, **TBA-U13**, **TBA-B4** e **TBA-B13** di ripiegarsi in una struttura G-quadruplex antiparallela simile al TBA è stata valutata attraverso la spettroscopia NMR. L'aspetto semplice di tutti gli spettri  $H^1$  NMR indica che, nelle condizioni usate, gli oligomeri modificati formano principalmente una singola conformazione con legami H ben definita. Infatti, i loro spettri  $H^1$  NMR monodimensionali (500 MHz, T = 25 °C) (Figura 5) nel tampone utilizzato contenente  $K^+$ , mostrano, nella regione tra 11.8-12.5 p.p.m., la presenza principalmente di 8 segnali attribuibili ai protoni immidici coinvolti nei legami idrogeno di tipo Hoogsteen di almeno due quartetti di G. Inoltre sono presenti 15 segnali principali nella regione aromatica (7.0-8.5 ppm) dovuti alla presenza dei singoletti H8 delle nove guanine e di quelli H6 delle cinque timine e del residuo B, nel caso di **TBA-B4** and **TBA-B13**. Mentre nel caso di **TBA-U4** and **TBA-U13** i segnali sono dovuti ai singoletti H8 di nove guanine, a quelli H6 delle cinque timine ed al doppietto H6 del residuo U (accoppiamento col protone H5).

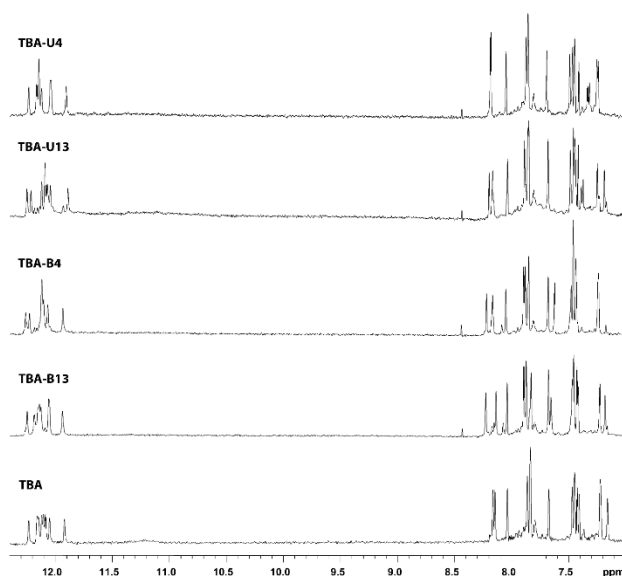


Figura 5. Regioni dei protoni immidici e aromatici degli spettri  $H^1$  NMR (500 MHz, T = 25 °C) dei derivati del TBA e della loro controparte naturale in 10 mM  $KH_2PO_4/K_2HPO_4$ , 70 mM KCl e 0.2 mM EDTA (pH 7.0).

La combinazione delle analisi degli spettri 2D NOESY (Figura 6-9) e TOCSY (dati non mostrati) ha permesso di ottenere un'assegnazione quasi completa dei protoni non scambiabili (Tabelle 2-5). Le intensità dei *crosspeaks* NOESY tra il protone della base aromatica e il protone H1' dello zucchero degli aptameri modificati indicano che le 4 G<sub>s</sub> (G1, G5, G10 e G14) adottano conformazione glicosidica *syn*, mentre le 5 G<sub>a</sub> (G2, G6, G8, G11 e G15) adottano conformazione *anti*, dove le risonanze dei protoni in 8 delle G *syn* sono spostati a campi più alti rispetto a quelli delle G *anti* [28-30]. Anche tutte le timidine e i residui modificati **U** e **B** mostrano conformazioni glicosidiche *anti*. Quindi, le quattro G *anti* (G2, G6, G11, e G15) mostrano le classiche connettività sequenziali H8/H2'-H2'' col 5' delle G *syn* adiacenti (G1, G5, G10 e G14, rispettivamente) indicando che le subunità G1-G2, G5-G6, G10-G11 e G14-G15 sono coinvolte nella formazione di una struttura ad elica a 4 filamenti (i residui sottolineati adottano una conformazione glicosidica *syn*). In sintesi, come osservato per il TBA, ci sono frammenti 5'-G<sub>syn</sub>G<sub>anti</sub>-3' lungo ciascun filamento dei due quartetti di G e, inoltre, l'intero *pattern* di NOEs osservato per tutte le citate G<sub>s</sub> indica che le conformazioni dello scheletro zucchero-fosfato di questi tratti somiglia a quelle del TBA non modificato che possiede una struttura ad elica destrorsa. L'alternanza di residui G *syn* e *anti* all'interno di ciascun filamento suggerisce che, come per il TBA, tutti i 4 oligomeri modificati adottano una struttura G-quadruplex monomolecolare a sedia caratterizzata da due tetradi di G. Sono stati identificati anche due frammenti 5'-TT-3' e 5'-TU-3' or 5'-TB-3' ed uno 5'-TGT-3' sulla base delle connettività *anti-anti*. Tutti i frammenti ottenuti dalle connettività sequenziali sono stati ordinati usando le connettività NOE *long range*. Analogamente al TBA originario, per tutti i campioni c'è un numero di connettività NOE osservato tra residui non adiacenti in sequenza. In particolare, ci sono connettività NOE tra H8 di G8 e H1', H2' e H2'' di G6 e tra H1' di T9 e H8 of G15 indicando così che, in tutti i 4 analoghi del TBA, i residui G8 e T9 nel *loop* TGT sono vicini alla tetrad G1-G6-G10-

G15. Segnali NOE sono anche presenti tra H8 di G2 e H2' e H2'' di U4/B4 e tra H8 di G11 e metile, H2' e H2'' di T13 nel caso di **TBA-U4** e **TBA-B4**, rispettivamente. Allo stesso modo, per quanto riguarda **TBA-U13** e **TBA-B13**, ci sono connettività NOE tra H8 di G2 e metile, H2' e H2'' di T4 e tra H8 di G11 e H2' e H2'' di U13/B13. Informazioni complementari sono fornite dai NOE che coinvolgono il metile di T13 con H1', H2' e H2'' di G2 nel caso di **TBA-U4** e **TBA-B4** e il metile di T4 con H1', H2' e H2'' di G11 nel caso di **TBA-U13** e **TBA-B13**. Per tutti i campioni, questo insieme di NOE colloca i residui 4 e 13 vicino alla tetrate G2-G5-G11-G14. L'insieme dei dati NMR mostra, come chiaramente suggerito dagli esperimenti CD, che questi 4 aptameri modificati adottano strutture G-quadruplex strettamente somiglianti a quella del TBA originale.

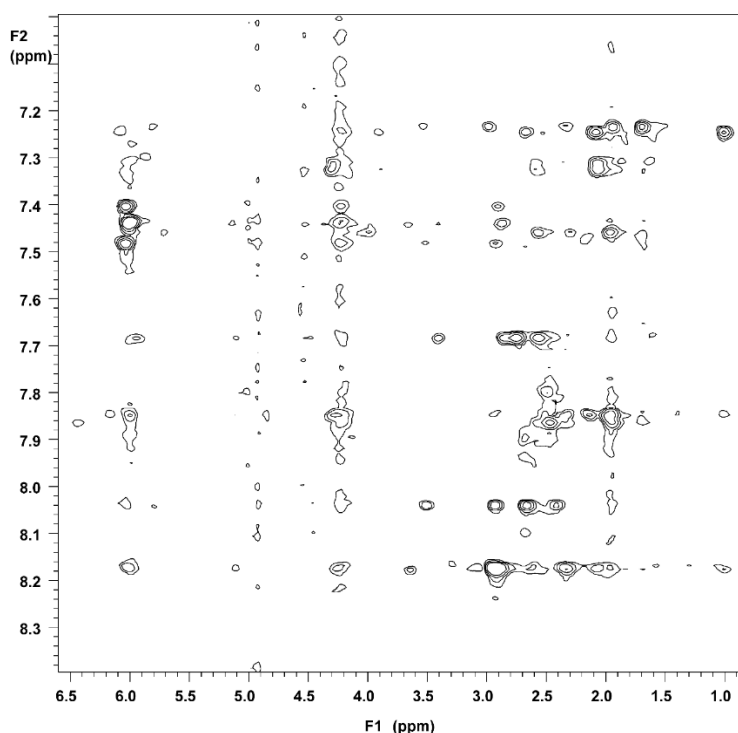


Figura 6. Regione espansa dello spettro 2D NOESY di **TBA-U4** in cui si evidenziano i picchi di correlazione tra i protoni H8/H6 delle basi e i protoni dello zucchero (500 MHz; 25°C; concentrazione 2 mM; 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 70 mM KCl e 0.2 mM EDTA, pH 7.0 in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  9:1; volume totale 0.6 ml; *mixing time* 180 ms).

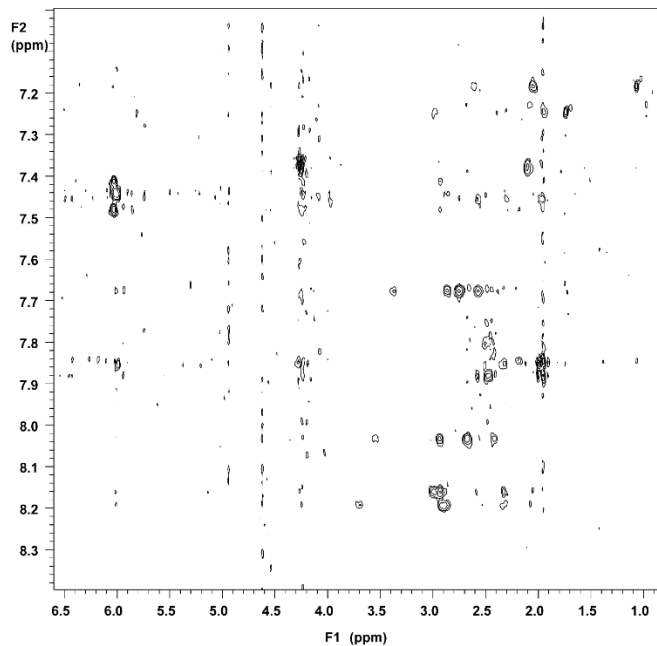


Figura 7. Regione espansa dello spettro 2D NOESY di **TBA-U13** in cui si evidenziano i picchi di correlazione tra i protoni H8/H6 delle basi e i protoni dello zucchero (500 MHz; 25°C; concentrazione 2 mM; 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 70 mM KCl e 0.2 mM EDTA, pH 7.0 in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  9:1; volume totale 0.6 ml; *mixing time* 180 ms).

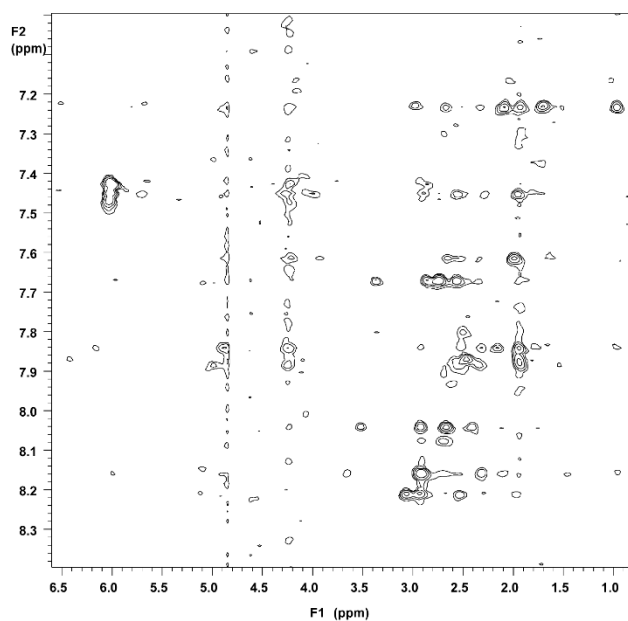


Figura 8. Regione espansa dello spettro 2D NOESY di **TBA-B4** in cui si evidenziano i picchi di correlazione tra i protoni H8/H6 delle basi e i protoni dello zucchero (500 MHz; 25°C; concentrazione 2 mM; 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 70 mM KCl e 0.2 mM EDTA, pH 7.0 in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  9:1; volume totale 0.6 ml; *mixing time* 180 ms).



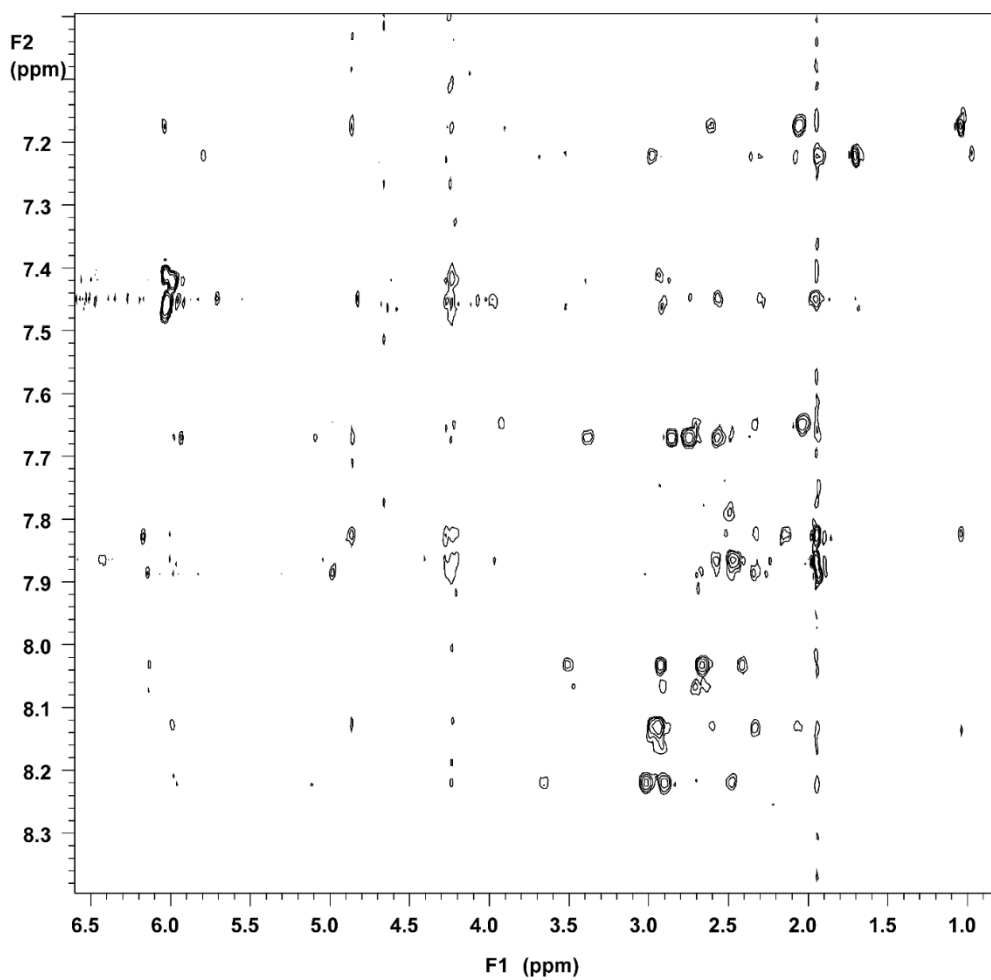


Figura 9. Regione espansa dello spettro 2D NOESY di **TBA-B13** in cui si evidenziano i picchi di correlazione tra i protoni H8/H6 delle basi e i protoni dello zucchero (500 MHz; 25°C; concentrazione 2 mM; 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 70 mM KCl e 0.2 mM EDTA, pH 7.0 in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  9:1; volume totale 0.6 ml; *mixing time* 180 ms).

<b>TBA-U4 5'-G<sub>1</sub>G<sub>2</sub>T<sub>3</sub>U<sub>4</sub>G<sub>5</sub>G<sub>6</sub>T<sub>7</sub>G<sub>8</sub>T<sub>9</sub>G<sub>10</sub>G<sub>11</sub>T<sub>12</sub>T<sub>13</sub>G<sub>14</sub>G<sub>15</sub>-3'</b>							
	H8/H6	H1'	H2'/H2''	H3'	H4'	H5'/H5''	CH <sub>3</sub> /H5
<u>G</u> <sub>1</sub>	7.41	6.03	2.91	4.98	4.41	4.15/4.03	-
G <sub>2</sub>	8.18	6.00	2.34/2.96	5.12	4.44	4.25	-
T <sub>3</sub>	7.85	6.18	2.17/2.52	4.91	4.27	4.33/4.15	2.00
U <sub>4</sub>	7.32	6.07	2.07/2.60	4.86	4.21	3.87	4.31
<u>G</u> <sub>5</sub>	7.44	6.00	2.86/3.41	4.86	N.D.	4.25/4.21	-
G <sub>6</sub>	7.69	5.94	2.57/2.75	5.10	4.45	4.23	-
T <sub>7</sub>	7.87	6.42	2.47/2.58	4.86	4.30	4.22	1.95
G <sub>8</sub>	7.46	5.72	1.99/2.30	N.D.	3.98	N.D.	-
T <sub>9</sub>	7.24	5.82	1.95/2.35	4.60	3.70	3.56/3.00	1.70
<u>G</u> <sub>10</sub>	7.44	6.02	2.88/3.66	4.90	N.D.	N.D.	-
G <sub>11</sub>	8.18	6.00	2.34/2.94	5.12	4.44	4.28	-
T <sub>12</sub>	7.85	6.18	2.15/2.52	4.91	4.27	4.33/4.15	1.95
T <sub>13</sub>	7.25	6.09	2.09/2.68	4.90	4.23	3.90	1.02
<u>G</u> <sub>14</sub>	7.48	6.04	2.92/3.52	4.90	N.D.	N.D.	-
G <sub>15</sub>	8.04	6.14	2.42/2.66	N.D.	4.23	N.D.	-

Tabella 2. Assegnazione dei *chemical shifts* protonici per la G-quadruplex formata dall'oligonucleotide **TBA-U4** (500 MHz, T = 25°C) in 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 70 mM KCl e 0.2 mM EDTA (pH 7.0). N.D. = non determinato.

<b>TBA-U13 5'-G<sub>1</sub>G<sub>2</sub>T<sub>3</sub>T<sub>4</sub>G<sub>5</sub>G<sub>6</sub>T<sub>7</sub>G<sub>8</sub>T<sub>9</sub>G<sub>10</sub>G<sub>11</sub>T<sub>12</sub>U<sub>13</sub>G<sub>14</sub>G<sub>15</sub>-3'</b>							
	H8/H6	H1'	H2'/H2''	H3'	H4'	H5'/H5''	CH <sub>3</sub> /H5
<u>G</u> <sub>1</sub>	7.42	6.03	2.93	4.98	4.24	4.09/4.03	-
G <sub>2</sub>	8.16	6.02	2.33/2.99	5.13	N.D.	4.25	-
T <sub>3</sub>	7.86	6.17	2.18/2.50	4.86	4.28	N.D.	1.99
T <sub>4</sub>	7.19	6.04	2.05/2.61	4.87	4.27	N.D.	1.06
<u>G</u> <sub>5</sub>	7.45	6.01	2.86/3.38	4.86	4.24	4.08	-
G <sub>6</sub>	7.68	5.93	2.57/2.75	5.10	4.26	4.14	-
T <sub>7</sub>	7.88	6.45	2.47/2.60	5.00	N.D.	4.23	1.96
G <sub>8</sub>	7.46	5.74	1.99/2.30	N.D.	3.98	4.08	-
T <sub>9</sub>	7.25	5.81	1.95/2.40	4.60	N.D.	N.D.	1.74
<u>G</u> <sub>10</sub>	7.45	6.01	2.90/3.70	4.90	4.30	4.14	-
G <sub>11</sub>	8.20	6.01	2.33/2.90	5.11	4.24	4.08	-
T <sub>12</sub>	7.85	6.20	2.18/2.50	4.86	4.28	N.D.	1.95
U <sub>13</sub>	7.38	6.10	2.10/2.63	4.90	N.D.	3.88	4.25
<u>G</u> <sub>14</sub>	7.48	6.04	2.93/3.56	4.91	4.40	N.D.	-
G <sub>15</sub>	8.04	6.13	2.42/2.67	4.86	4.23	N.D.	-

Tabella 3. Assegnazione dei *chemical shifts* protonici per la G-quadruplex formata dall'oligonucleotide **TBAU13** (500 MHz, T = 25°C) in 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 70 mM KCl e 0.2 mM EDTA (pH 7.0). N.D. = non determinato.

<b>TBA-B4 5'-G<sub>1</sub>G<sub>2</sub>T<sub>3</sub>B<sub>4</sub>G<sub>5</sub>G<sub>6</sub>T<sub>7</sub>G<sub>8</sub>T<sub>9</sub>G<sub>10</sub>G<sub>11</sub>T<sub>12</sub>T<sub>13</sub>G<sub>14</sub>G<sub>15</sub>-3'</b>							
	H8/H6	H1'	H2'/H2''	H3'	H4'	H5'/H5''	CH <sub>3</sub>
<u>G</u> <sub>1</sub>	7.42	6.03	2.95	4.96	4.39	4.09/4.02	-
G <sub>2</sub>	8.21	6.00	2.30/3.06	5.12	4.38	N.D.	-
T <sub>3</sub>	7.85	6.19	2.16/2.53	4.88	4.26	3.98	1.94
B <sub>4</sub>	7.62	6.01	2.01/2.66	4.86	4.39	3.92/3.87	-
<u>G</u> <sub>5</sub>	7.43	5.99	2.87/3.37	4.85	4.36	4.23	-
G <sub>6</sub>	7.67	5.94	2.57/2.75	5.09	4.42	4.23	-
T <sub>7</sub>	7.89	6.45	2.47/2.59	4.83	4.40	4.25	1.93
G <sub>8</sub>	7.45	5.71	1.96/2.29	4.71	3.98	N.D.	-
T <sub>9</sub>	7.23	5.81	1.95/2.37	4.60	3.72	3.54/3.00	1.71
<u>G</u> <sub>10</sub>	7.45	6.02	2.88/3.66	4.89	4.27	4.06	-
G <sub>11</sub>	8.16	6.00	2.32/2.93	5.11	4.39	4.23	-
T <sub>12</sub>	7.85	6.19	2.16/2.53	4.88	4.26	3.98	1.95
T <sub>13</sub>	7.23	6.10	2.09/2.66	4.87	4.28	3.96/3.89	0.99
<u>G</u> <sub>14</sub>	7.47	6.03	2.93/3.52	4.91	4.40	4.28	-
G <sub>15</sub>	8.04	6.15	2.41/2.67	4.87	4.23	4.12	-

Tabella 4. Assegnazione dei *chemical shifts* protonici per la G-quadruplex formata dall'oligonucleotide **TBA-B4** (500 MHz, T = 25°C) in 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 70 mM KCl e 0.2 mM EDTA (pH 7.0). N.D. = non determinato.

<b>TBA-B13</b> 5'-G <sub>1</sub> G <sub>2</sub> T <sub>3</sub> T <sub>4</sub> G <sub>5</sub> G <sub>6</sub> T <sub>7</sub> G <sub>8</sub> T <sub>9</sub> G <sub>10</sub> G <sub>11</sub> T <sub>12</sub> B <sub>13</sub> G <sub>14</sub> G <sub>15</sub> -3'							
	H8/H6	H1'	H2'/H2''	H3'	H4'	H5'/H5''	CH <sub>3</sub>
<u>G</u> <sub>1</sub>	7.41	6.03	2.93	4.98	4.42	4.09/4.03	-
G <sub>2</sub>	8.13	5.99	2.33/2.97	5.13	4.38	4.26	-
T <sub>3</sub>	7.83	6.18	2.15/2.50	4.86	4.27	4.12	1.95
T <sub>4</sub>	7.18	6.04	2.06/2.61	4.86	4.25	3.90	1.05
<u>G</u> <sub>5</sub>	7.42	5.99	2.86/3.40	4.85	4.38	4.24	-
G <sub>6</sub>	7.67	5.94	2.57/2.75	5.09	4.42	4.24	-
T <sub>7</sub>	7.87	6.43	2.47/2.57	4.84	4.40	N.D.	1.95
G <sub>8</sub>	7.45	5.71	1.96/2.30	4.72	3.97	4.10	-
T <sub>9</sub>	7.22	5.80	1.93/2.36	4.60	3.69	3.54	1.71
<u>G</u> <sub>10</sub>	7.45	6.02	2.91/3.66	4.88	4.25	4.12	-
G <sub>11</sub>	8.22	5.97	2.47/3.01	5.12	4.42	4.24	-
T <sub>12</sub>	7.89	6.15	2.33/2.57	4.98	4.24	4.09/4.03	1.93
B <sub>13</sub>	7.65	6.08	2.04/2.70	4.89	4.24	3.93	-
<u>G</u> <sub>14</sub>	7.46	6.03	2.92/3.51	4.91	N.D.	4.24/4.17	-
G <sub>15</sub>	8.03	6.14	2.42/2.67	4.78	4.23	N.D.	-

Tabella 5. Assegnazione dei *chemical shifts* protonici per la G-quadruplex formata dall'oligonucleotide **TBA-B13** (500 MHz, T = 25°C) in 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 70 mM KCl e 0.2 mM EDTA (pH 7.0). N.D. = non determinato.

## Attività anticoagulante

Al fine di valutare l'attività anticoagulante degli analoghi del TBA contenenti una modifica in posizione 4 o 13, essi sono stati sottoposti al saggio PT. I risultati ottenuti mostrano chiaramente che tutti i derivati del TBA conservano la loro attività anticoagulante. In dettaglio, alle più alte concentrazioni (cioè 20  $\mu$ M), **TBA-U4**, **TBA-U13**, **TBA-B4** e **TBA-B13** hanno mostrato un significativo miglioramento dell'attività anticoagulante rispetto al TBA. Al contrario, **TBA-H4** e **TBA-H13** hanno mostrato una minore attività anticoagulante rispetto al TBA (Figura 10A) e per questa ragione, essi non sono stati ulteriormente studiati. Quando gli altri composti sono stati testati alla concentrazione più bassa (2  $\mu$ M), **TBA-U4** e **TBA-U13** hanno mostrato una migliore attività anticoagulante rispetto al TBA. Tutti gli altri analoghi del TBA, invece, hanno mostrato lo stesso profilo anticoagulante osservato con il TBA (Figura 10B).

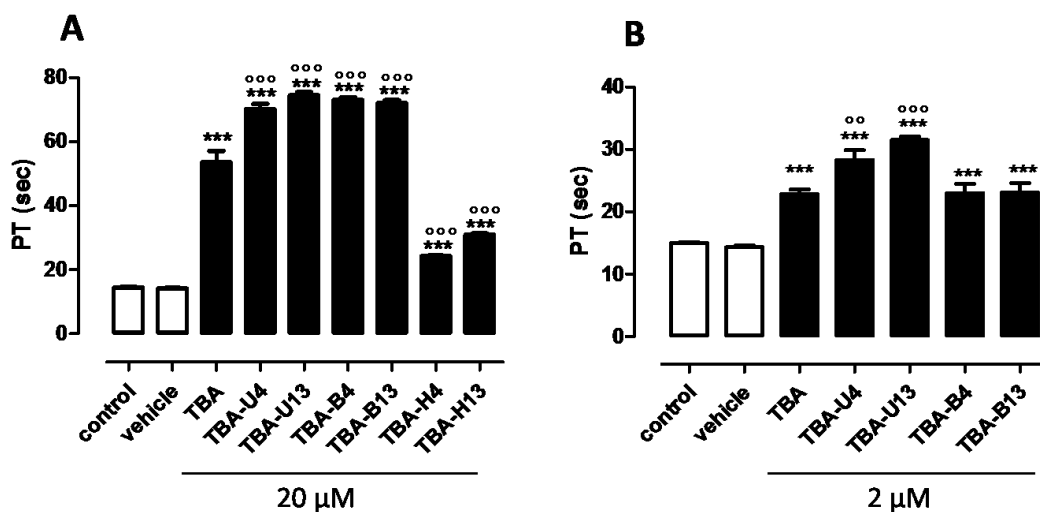


Figura 10. Valori PT del TBA e degli analoghi. \*\*\* =  $p < 0.001$  vs. veicolo, °° =  $p < 0.01$  e °°° =  $p < 0.001$  vs. TBA ( $n = 3$ ).

### ***Attività antiproliferativa degli analoghi del TBA***

Per capire se gli analoghi del TBA fossero in grado di inibire la proliferazione cellulare, la loro attività citotossica è stata esaminata mediante il saggio MTT in 2 differenti linee cellulari tumorali. Nelle cellule tumorali del colon HCT 116<sup>P53</sup> -/- (Figura 11), tra gli analoghi del TBA che conservano le proprietà anticoagulanti, **TBA-U4** è stato il solo oligonucleotide a mostrare effetto citotossico a 10  $\mu$ M (circa 40% a 24 h e 48 h, e 60% a 72 h). **TBA-U13**, **TBA-B4**, **TBA-B13** e **sTBA** non hanno un evidente effetto sulla proliferazione cellulare a tutti i tempi testati. Infatti, è stata osservata solo una minima attività antiproliferativa (circa 10-20%). Al contrario, gli analoghi del TBA con una attività anticoagulante residua, ossia **TBA-H4** e **TBA-H13**, hanno fortemente influenzato la vitalità cellulare. Dato interessante è che, questi oligonucleotidi hanno mostrato un'attività citotossica proporzionale al tempo maggiore di quella osservata per il TBA. Specificamente, il trattamento delle cellule con **TBA-H4** ha comportato circa il 75% di morte cellulare già a 48 h. Ad una concentrazione più alta (50  $\mu$ M), **TBA-U13**, **TBA-B4**, **TBA-B13** e **sTBA** diventano citotossici a 48h causando circa il 50-70% di morte cellulare. Come previsto, tutti gli altri analoghi del TBA hanno mostrato un incremento della loro attività antiproliferativa a questa concentrazione se confrontati con quella a 10  $\mu$ M. Risultati analoghi sono stati ottenuti nella linea cellulare tumorale polmonare Calu-6 (Figura 12).

Complessivamente, questi risultati dimostrano che gli analoghi del TBA **TBA-H4** e **TBA-H13** esercitano una rilevante attività antiproliferativa senza un concomitante effetto anticoagulante. Queste molecole rappresentano un modello per la progettazione di nuovi farmaci, basati sulle strutture G-quadruplex, con migliori proprietà antiproliferative senza effetti avversi.

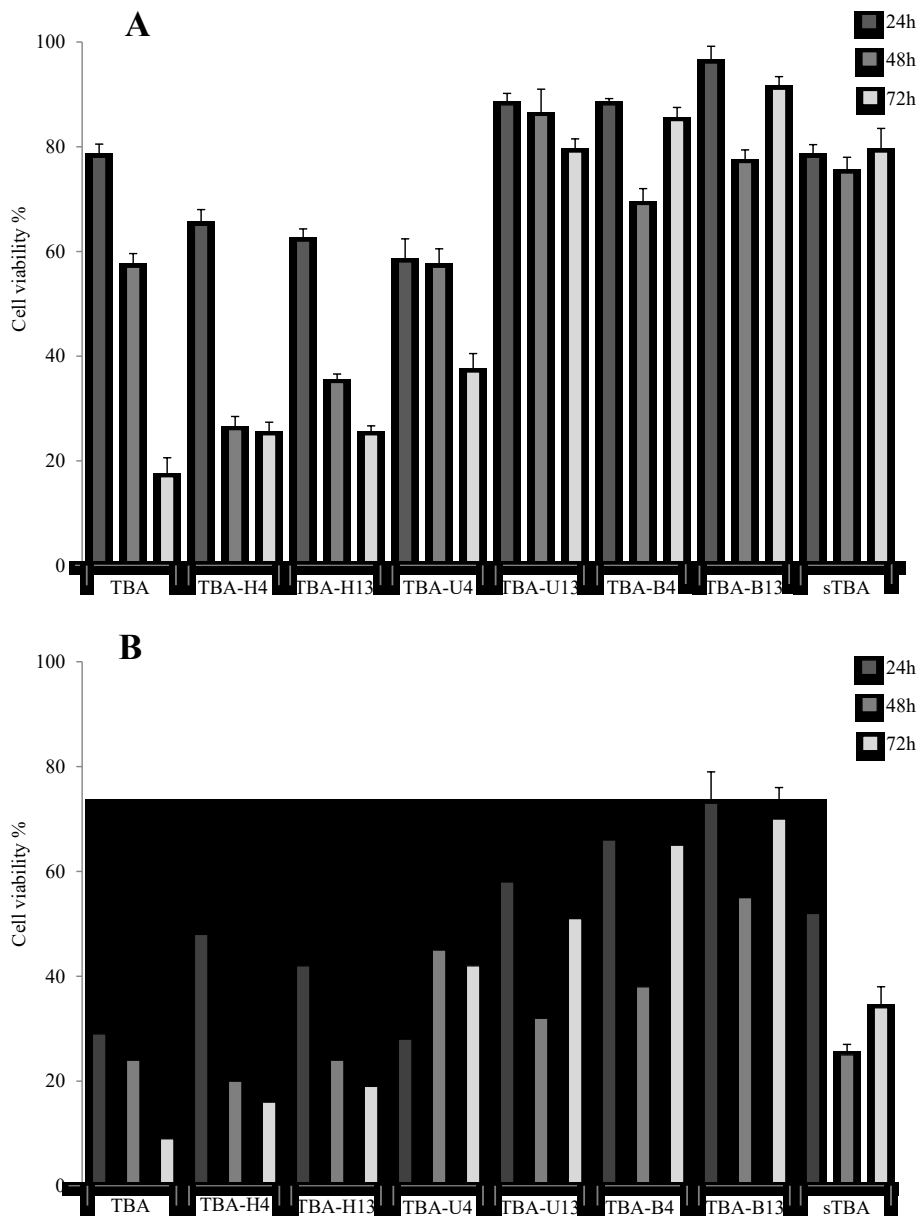


Figura 11. Attività antiproliferativa degli analoghi del TBA sulla linea cellulare HCT 116<sup>p53-/-</sup>. Le cellule sono state trattate con due differenti concentrazioni di oligonucleotidi, 10  $\mu$ M (A) e 50  $\mu$ M (B), da 24 a 72 h. La vitalità cellulare è stata esaminata mediante il saggio MTT. I risultati sono presentati come percentuali (mean $\pm$ SEM) (n= 3) delle cellule di controllo. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01.



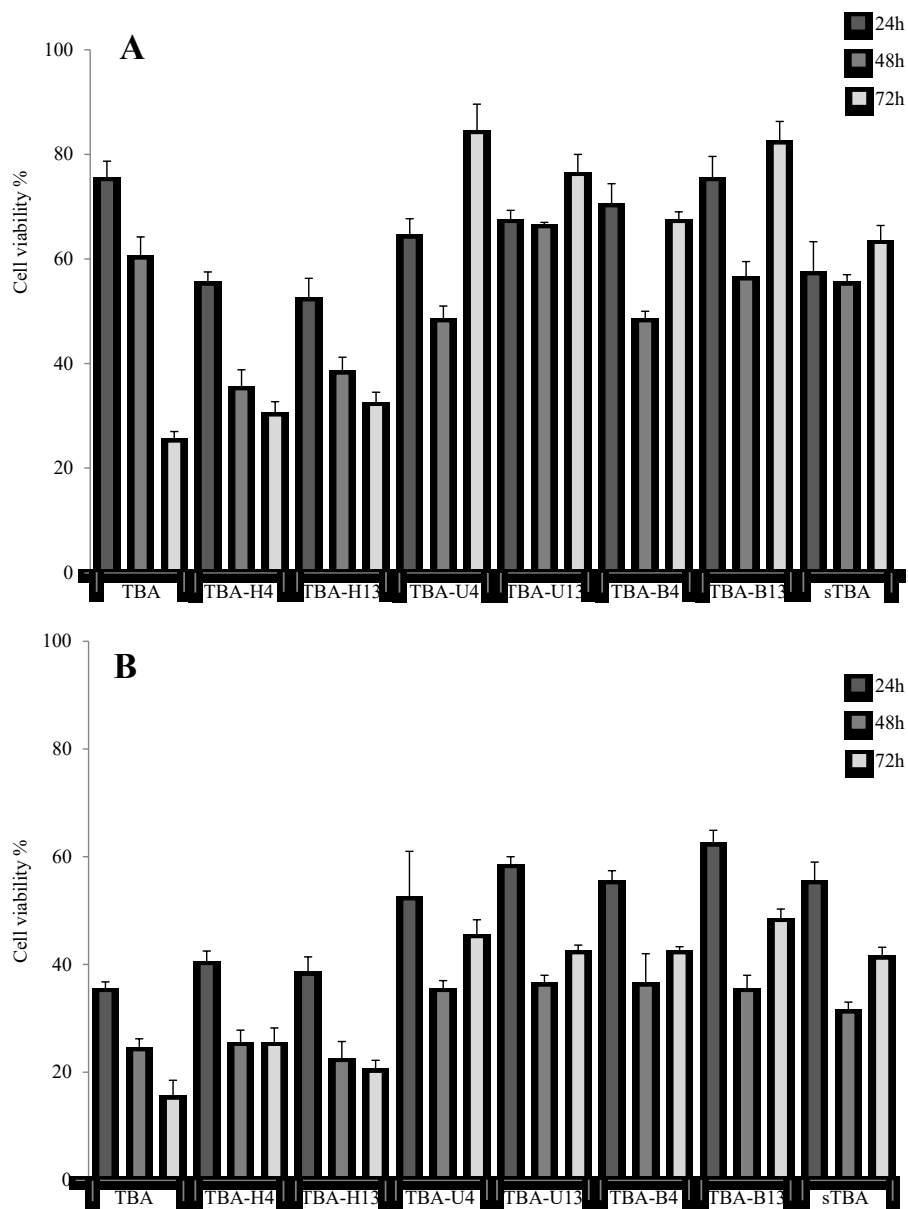


Figura 12. Attività antiproliferativa degli analoghi del TBA sulla linea cellulare Calu-6. Le cellule sono state trattate con 2 differenti concentrazioni di oligonucleotidi, 10  $\mu$ M (A) e 50  $\mu$ M (B), da 24 a 72 h. La vitalità cellulare è stata esaminata mediante il saggio MTT. I risultati sono presentati come percentuali (mean $\pm$ SEM) (n= 3) delle cellule di controllo. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01.

### Saggio di stabilità nell'estratto delle cellule HCT 116<sup>P53</sup><sup>-/-</sup>

Per testare la loro biodegradabilità, gli aptameri modificati del TBA, la loro controparte naturale (**TBA**) e lo *scrambled* TBA (**sTBA**) sono stati sottoposti al saggio di degradazione nell'estratto cellulare HCT 116<sup>P53</sup><sup>-/-</sup> fino a 72 h e analizzati mediante elettroforesi su gel (Figura 13). Come atteso, la maggior parte degli oligonucleotidi studiati è stata quasi completamente degradata dopo 24h. **TBA-B4** e **TBA-B13** hanno mostrato una resistenza leggermente più alta se confrontata con quella degli altri oligonucleotidi. Questo dato potrebbe essere dovuto alle loro maggiori temperature di *melting* (Tabella 1) indicando, rispetto agli altri oligonucleotidi, una minore quantità di singolo filamento degradabile in equilibrio con la struttura G-quadruplex.

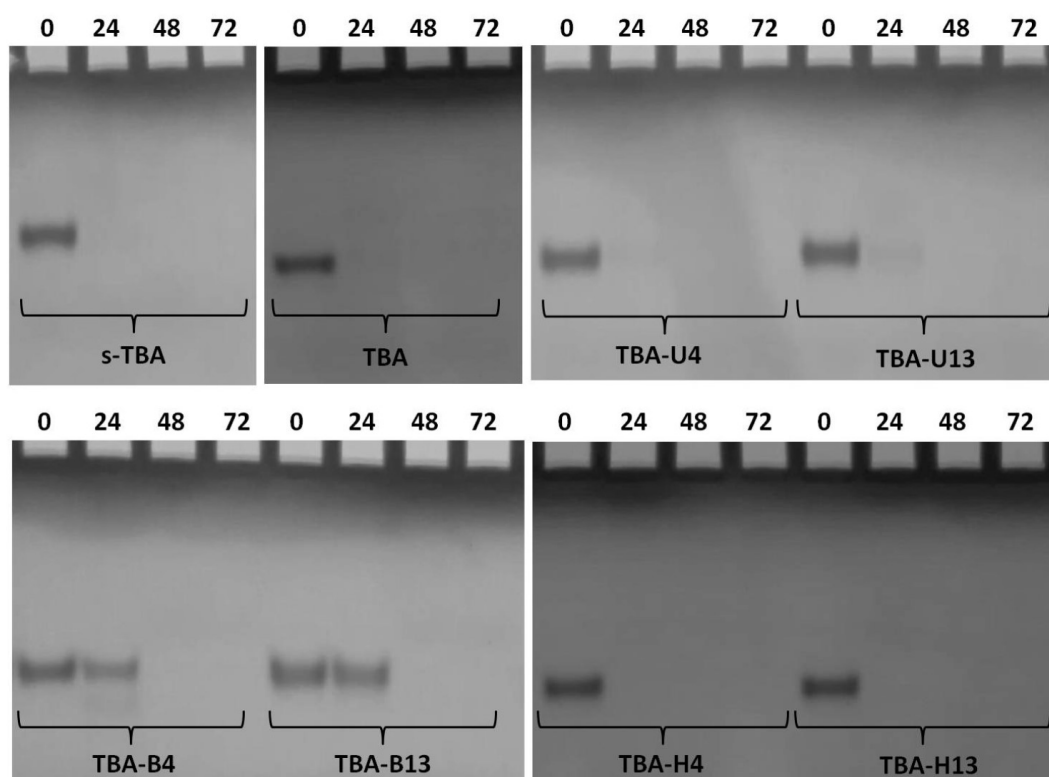


Figura 13. Stabilità degli ODN investigati nell'estratto di cellule HCT 116<sup>P53</sup><sup>-/-</sup> monitorato tramite PAGE non denaturante. I punti temporali 0, 24, 48 e 72 sono in ore. Vedi la sezione materiali e metodi per i dettagli sperimentali.

## **CONCLUSIONI**

Un convincente numero di studi ha dimostrato che le proprietà chimico-fisiche e biologiche del TBA possono essere modulate attraverso sostituzioni sito-specifiche di appropriati residui, in particolare quelli coinvolti nella formazione dei *loop* [5]. In questo lavoro, sono state studiate le proprietà strutturali e le attività biologiche di quattro analoghi del TBA in cui le timidine 4 e 13 sono state sostituite, una alla volta, con i residui 2'-deossiuridina (**TBA-U4** e **TBA-U13**) o 5-bromo-2'-deossiuridina (**TBA-B4** e **TBA-B13**). I dati CD e NMR mostrano chiaramente che tutti gli oligonucleotidi studiati adottano strutture G-quadruplex a sedia strettamente somiglianti a quella dell'aptamero non modificato. Mentre **TBA-U4** e **TBA-U13** hanno esibito una stabilità termica comparabile a quella del TBA, le temperature di *melting* di **TBA-B4** e **TBA-B13** hanno mostrato di essere di 7 °C più alte del TBA. L'attività anticoagulante dei derivati contenenti 2'-deossiuridina e 5-bromo-2'-deossiuridina è stata valutata e confrontata con quella di analoghi simili contenenti 5-idrossimetil-2'-deossiuridina (**TBA-H4** e **TBA-H13**). Mentre **TBA-H4** e **TBA-H13** hanno precedentemente dimostrato di non avere un'attività anticoagulante migliore del TBA a concentrazioni oligonucleotidiche più alte (20 µM) [17], tutti gli altri oligonucleotidi, nelle medesime condizioni, hanno mostrato migliori proprietà anticoagulanti rispetto al TBA mentre a concentrazioni oligonucleotidiche più basse (2 µM), **TBA-U4** e **TBA-U13** hanno esibito un'attività anticoagulante significativamente più alta del TBA. Le proprietà antiproliferative di tutti gli oligonucleotidi, inclusi **TBA-H4** e **TBA-H13**, sono state testate su 2 linee cellulari tumorali. In base ai saggi MTT, tutti gli oligonucleotidi modificati conservano, in misura diversa, l'attività antiproliferativa, in relazione al tipo di cellula, al tipo di sequenza, al tempo di trattamento e alla concentrazione oligonucleotidica. Diversamente dagli altri oligonucleotidi, alla concentrazione di 10 µM, **TBA-H4** e **TBA-H13** hanno mostrato profili antiproliferativi comparabili o talvolta più

promettenti del TBA, in dipendenza dal tempo di trattamento. Perciò la sostituzione sito-specifica delle timidine 4 e 13 con 5-idrossimetil-2'-deossiridina ha consentito la conservazione dell'attività antiproliferativa e, allo stesso tempo, la rimozione di quella anticoagulante che rappresenta uno svantaggio in questo quadro.

In base ad un recente studio [31], l'attività antiproliferativa degli oligonucleotidi ricchi di G è stata parzialmente attribuita ai prodotti di degradazione guaninici. Al fine di affrontare questo punto, sono stati acquisiti dati MTT anche su un TBA *scrambled* (**sTBA**) incapace di formare strutture G-quadruplex, ma caratterizzato dalla stessa lunghezza e dalla stessa composizione in basi del TBA ed è stato eseguito, per tutti gli oligonucleotidi studiati, un saggio di stabilità in un estratto di cellule HCT 116<sup>P53</sup> <sup>-/-</sup>. Tutti gli oligonucleotidi sono stati quasi completamente degradati dopo 24 h. Le significative differenze tra i profili MTT degli oligonucleotidi testati e, in particolare, le differenze tra i profili MTT di **sTBA** e quelli di TBA, **TBA-H4** e **TBA-H13** suggeriscono che, sebbene i prodotti di degradazione guaninici possano contribuire all'attività biologica, l'attività antiproliferativa di TBA, **TBA-H4** e **TBA-H13** dipende principalmente dall'interazione degli aptameri con uno specifico target. D'altronde le stabilità termiche e biologiche del TBA e dei suoi analoghi potrebbero essere facilmente incrementate mediante semplici modifiche chimiche senza influenzarne la struttura G-quadruplex [32,33]. Questi dati aprono nuove prospettive allo sviluppo di analoghi del TBA ad azione antiproliferativa. Sono stati pianificati esperimenti volti all'identificazione della proteina target coinvolta nell'attività antiproliferativa.

## **Bibliografia**

- [1] R.F. Macaya, P. Schultze, F.W. Smith, J.A. Roe, J. Feigon, Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 3745–3749.
- [2] J.A. Kelly, J. Feigon, T.O. Yeates, Reconciliation of the X-ray and NMR structures of the thrombin-binding aptamer d(GGTTGGTGTGGTTGG), *J. Mol. Biol.* 256 (1996) 417–422.
- [3] K. Padmanabhan, A. Tulinsky, An ambiguous structure of a DNA 15-mer thrombin complex, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 52 (1996) 272–282.
- [4] I.R. Krauss, A. Merlino, C. Giancola, A. Randazzo, L. Mazzarella, F. Sica, Thrombin-aptamer recognition: A revealed ambiguity, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 7858–7867.
- [5] A. Avino, C. Fabrega, M. Tintore, R. Eritja, Thrombin binding aptamer, more than a simple aptamer: chemically modified derivatives and biomedical applications, *Curr. Pharm. Des.* 18 (2012) 2036–2047.
- [6] L. Bonifacio, F.C. Church, M.B. Jarstfer, Effect of locked-nucleic acid on biologically active G-quadruplex A structure-activity relationship of the thrombin aptamer, *Int. J. Mol. Sci.* 9 (2008) 422–433.
- [7] A. Pasternak, F.J. Hernandez, L.M. Rasmussen, B. Vester, J. Wengel, Improved thrombin binding aptamer by incorporation of a single unlocked nucleic acid monomer, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 1155–1164.
- [8] T. Coppola, M. Varra, G. Oliviero, A. Galeone, G. D’Isa, L. Mayol, E. Morelli, M.-R. Bucci, V. Vellecco, G. Cirino, N. Borbone, Synthesis, structural studies and biological properties of new TBA analogues containing an acyclic nucleotide, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 8244–8253.
- [9] N. Borbone, M. Bucci, G. Oliviero, E. Morelli, J. Amato, V. D’Atri, S. D’Errico, V. Vellecco, G. Cirino, G. Piccialli, C. Fattorusso, M. Varra, L. Mayol, M. Persico, M. Scuotto, Investigating the role of T7 and T12 residues on the biological properties of thrombin-binding aptamer: Enhancement of anticoagulant activity by a single nucleobase modification, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 10716–10728.
- [10] M. Scuotto, M. Persico, M. Bucci, V. Vellecco, N. Borbone, E. Morelli, G. Oliviero, E. Novellino, G. Piccialli, G. Cirino, M. Varra, C. Fattorusso, L. Mayol, Outstanding effects on antithrombin activity of modified TBA diastereomers containing an optically pure acyclic nucleotide analogue, *Org. Biomol. Chem.* 12 (2014) 5235–5242.
- [11] T.B. Jensen, J.R. Henriksen, B.E. Rasmussen, L.M. Rasmussen, T.L. Andresen, J. Wengel, A. Pasternak, Thermodynamic and biological evaluation of a thrombin binding aptamer modified with several unlocked nucleic acid (UNA) monomers and a 2’-C-piperazino-UNA monomer, *Bioorganic Med. Chem.* 19 (2011) 4739–4745.
- [12] B. Cai, X. Yang, L. Sun, X. Fan, L. Li, H. Jin, Y. Wu, Z. Guan, L. Zhang, L. Zhang, Z. Yang, Stability and bioactivity of thrombin binding aptamers modified with D-/L-isothymidine in the loop regions, *Org. Biomol. Chem.* 12 (2014) 8866–8876.
- [13] A. Virgilio, L. Petraccone, V. Vellecco, M. Bucci, M. Varra, C. Irace, R. Santamaria, A. Pepe, L. Mayol, V. Esposito, A. Galeone, Site-specific replacement of the thymine methyl group by fluorine in thrombin binding aptamer significantly improves structural stability and anticoagulant activity, *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) 10602–10611.
- [14] V. Dapic´, V. Abdomerovic´, R. Marrington, J. Peberdy, A. Rodger, J.O. Trent, P.J. Bates, Biophysical and biological properties of quadruplex oligodeoxyribonucleotides, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 2097–2107.

- [15] M. Scutto, E. Riviaccio, A. Varone, D. Corda, M. Bucci, V. Vellecco, G. Cirino, A. Virgilio, V. Esposito, A. Galeone, N. Borbone, M. Varra, L. Mayol, Site specific replacements of a single loop nucleoside with a dibenzyl linker may switch the activity of TBA from anticoagulant to antiproliferative, *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) 7702–7716.
- [16] V. Esposito, A. Russo, T. Amato, M. Varra, V. Vellecco, M. Bucci, G. Russo, A. Virgilio, A. Galeone, Backbone modified TBA analogues endowed with antiproliferative activity, *BBA - Gen. Subj.* 2017 (1861) 1213–1221.
- [17] A. Virgilio, L. Petraccone, M. Scutto, V. Vellecco, M. Bucci, L. Mayol, M. Varra, V. Esposito, A. Galeone, 5-Hydroxymethyl-20-deoxyuridine residues in the thrombin binding aptamer: Investigating anticoagulant activity by making a tiny chemical modification, *ChemBioChem* 15 (2014) 2427–2434.
- [18] T. Parella, P. Adell, F. Sánchez-Ferrando, A. Virgili, Effective multiple-solvent suppression scheme using the excitation sculpting principle, *Magn. Reson. Chem.* 36 (1998) 245–249.
- [19] J. Jeener, B.H. Meier, P. Bachmann, R.R. Ernst, Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy, *J. Chem. Phys.* 71 (1979) 4546–4553.
- [20] L. Braunschweiler, R.R. Ernst, Coherence transfer by isotropic mixing: Application to proton correlation spectroscopy, *J. Magn. Reson.* 53 (1983) 521–528.
- [21] D. Marion, M. Ikura, R. Tschudin, A. Bax, Rapid recording of 2D NMR spectra without phase cycling Application to the study of hydrogen exchange in proteins, *J. Magn. Reson.* 85 (1989) 393–399.
- [22] A. Russo, V. Pagliara, F. Albano, D. Esposito, V. Sagar, F. Loreni, C. Irace, R. Santamaria, G. Russo, Regulatory role of rpL3 in cell response to nucleolar stress induced by act D in tumor cells lacking functional p53, *Cell Cycle* 15 (2016) 41–51.
- [23] D. Esposito, E. Crescenzi, V. Sagar, F. Loreni, A. Russo, G. Russo, Human rpL3 plays a crucial role in cell response to nucleolar stress induced by 5-FU and LOHP, *Oncotarget* 5 (2014) 11737–11751.
- [24] S. Maiolino, A. Russo, V. Pagliara, C. Conte, F. Ungaro, G. Russo, F. Quaglia, Biodegradable nanoparticles sequentially decorated with Polyethyleneimine and Hyaluronan for the targeted delivery of docetaxel to airway cancer cells, *J. Nanobiotechnology* 13 (2015) 29.
- [25] D. De Filippis, A. Russo, D. De Stefano, M. Cipriano, D. Esposito, G. Grassia, R. Carnuccio, G. Russo, T. Iuvone, Palmitoylethanolamide inhibits rMCP-5 expression by regulating MITF activation in rat chronic granulomatous inflammation, *Eur. J. Pharmacol.* 725 (2014) 64–69.
- [26] A. Russo, A. Saide, S. Smaldone, R. Faraonio, G. Russo, Role of uL3 in multidrug resistance in p53-mutated lung cancer cells, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 547.
- [27] M. Vorlíčková, I. Kejnovská, J. Sagi, D. Renc̃iuk, K. Bednářová, J. Motlová, J. Kypr, Circular dichroism and guanine quadruplexes, *Methods* 57 (2012) 64–75.
- [28] K. Yu Wang, S. McCurdy, R.G. Shea, S. Swaminathan, P.H. Bolton, A DNA aptamer which binds to and inhibits thrombin exhibits a new structural motif for DNA?, *Biochemistry* 32 (1993) 1899–1904
- [29] F.W. Smith, J. Feigon, Strand orientation in the DNA quadruplex formed from the *Oxytricha* telomere repeat oligonucleotide d(G4T4G4) in solution, *Biochemistry* 32 (1993) 8682–8692.
- [30] Y. Wang, D.J. Patel, Solution structure of the human telomeric repeat d [AG3 (T2AG3)3] G-tetraplex, *Structure* 1 (1993) 263–282.
- [31] N. Zhang, T. Bing, X. Liu, C. Qi, L. Shen, L. Wang, D. Shangguan, Cytotoxicity of guanine-based degradation products contributes to the antiproliferative activity of guanine-rich oligonucleotides, *Chem. Sci.* 6 (2015) 3831–3838.

- [32] V. Esposito, M. Scutto, A. Capuozzo, R. Santamaria, M. Varra, L. Mayol, A. Virgilio, A. Galeone, A straightforward modification in the thrombin binding aptamer improving the stability, affinity to thrombin and nuclease resistance, *Org. Biomol. Chem.* 12 (2014) 8840–8843.
- [33] A. Virgilio, T. Amato, L. Petraccone, R. Filosa, M. Varra, L. Mayol, V. Esposito, A. Galeone, Improved thrombin binding aptamer analogues containing inversion of polarity sites: Structural effects of extra-residues at the ends, *Org. Biomol. Chem.* 14 (2016) 7707–7714

## **5.2 Analoghi del TBA Backbone modificati dotati di attività antiproliferativa**

### **INTRODUZIONE**

Oltre ad aptameri G-quadruplex con un ruolo in ambito analitico, sono stati identificati anche ligandi G-quadruplex d'interesse terapeutico [1-4]. In questo contesto, gli aptameri G-quadruplex ad attività antiproliferativa ed anticancro hanno assunto una notevole importanza, in particolare considerando il loro grado di sviluppo negli studi clinici [5,6]. Un esempio degno di nota è l'aptamero (GGGC)<sub>4</sub> (T40214) che forma una G-quadruplex parallela che si lega alla proteina Stat 3 (*signal transducer and activator of transcription 3 protein*) [7]. Recentemente, sono stati selezionati due aptameri G-quadruplex a DNA contro cellule A549 transfettate con EGFR (epidermal growth factor receptor) e sono state testate le loro proprietà antiproliferative [8]. Nel 2010 Bates ed altri hanno suggerito che l'attività antiproliferativa cancro-selettiva può essere una caratteristica generale di certi oligodeossinucleotidi (ODNs) ricchi di G ed è associata alla formazione di strutture G-quadruplex [9]. In un precedente studio, Bates ed altri hanno descritto le proprietà fisiche e l'attività biologica di un gruppo di 12 oligodeossinucleotidi G-quadruplex [8]. Tra questi, KS-B (G<sub>2</sub>T<sub>2</sub>G<sub>2</sub>TGTG<sub>2</sub>T<sub>2</sub>G<sub>2</sub>, corrispondente al TBA) e GRO29A (T<sub>3</sub>(G<sub>2</sub>T)<sub>4</sub>TG(TG<sub>2</sub>)<sub>4</sub>) hanno mostrato le due migliori attività antiproliferative contro le cellule HeLa del carcinoma alla cervice uterina. In seguito, è stato dimostrato che GRO29A è attivo anche senza la prima delle tre timidine (AGRO100 or AS1411: (G<sub>2</sub>T)<sub>4</sub>TG(TG<sub>2</sub>)<sub>4</sub>) [11,12] e, pertanto, i successivi studi dettagliati sono stati eseguiti su questa sequenza [5,13]. L'aptamero AS1411 ha mostrato promettenti effetti antineoplastici e numerosi studi hanno indicato che il target dell'aptamero AS1411 è la nucleolina di superficie [11,12,14], una proteina multifunzionale presente nel nucleolo e nel nucleo della maggior parte delle cellule,



così come nel citoplasma e sulla superficie di alcune cellule, incluse le cellule cancerose e le cellule endoteliali angiogeniche. Questi dati suggeriscono che le proprietà biologiche di AS1411 possono essere attribuite all'interferenza con la moltitudine di processi cellulari mediati dalla nucleolina. A differenza dell'ampia quantità di studi biologici e pre-clinici, solo pochi studi sono stati dedicati alle caratteristiche strutturali della conformazione G-quadruplex adottata da AS1411, probabilmente a causa dell'alto grado di polimorfismo mostrato da questo aptamero [15]. Dati interessanti sono emersi da studi NMR e di cristallografia ai raggi X su una sequenza derivata da quella di AS1411, ossia  $T(G_2T)_4TG(TG_2)_3TGT_2$ , in cui è stato mostrato che questo oligonucleotide è capace di formare un'inusuale struttura G-quadruplex sinistrorsa [16].

Contrariamente al polimorfismo di AS1411, il TBA adotta una ben definita struttura G-quadruplex antiparallela caratterizzata dalla sovrapposizione di due tetradi di G connesse attraverso tre *loop* [17,18]. Sfortunatamente, lo sviluppo del TBA come agente antiproliferativo è stato fortemente contrastato dalla sua concomitante attività anticoagulante e dalla bassa stabilità termica in condizioni fisiologiche.

In base alle considerazioni precedenti, nello sviluppo di analoghi del TBA potenzialmente dotati di proprietà antiproliferative, dovrebbero essere presi in considerazione questi principali punti: 1) la propensione della sequenza a formare una struttura G-quadruplex prevalente dovrebbe essere preservata; 2) l'aptamero modificato dovrebbe possedere un'attività anticoagulante nulla o trascurabile; 3) la resistenza dell'aptamero alle nucleasi dovrebbe essere migliorata.

Un recente lavoro ha riportato che la sostituzione sito specifica di singoli nucleosidi in un *loop* con un *linker* dibenzilico è capace di modulare l'attività del TBA da quella anticoagulante a quella antiproliferativa contro le cellule HeLa del carcinoma alla cervice uterina [19]. In studi precedenti, nel tentativo di ottenere aptameri modificati con migliori proprietà, è stata descritta la preparazione di analoghi del

TBA contenenti residui L (le cui strutture sono immagini speculari dei residui naturali D) o sia residui L che siti ad inversione di polarità [20,21]. Qui sono riportati i dati di alcuni di essi (Tabella 1) concernenti sia le proprietà anticoagulanti che antiproliferative su due differenti linee cellulari cancerose.

Tabella 1  
Sequenze studiate e relative temperature di melting ( $T_M$ )

Name	Sequence <sup>[a]</sup>	$T_m$ (°C) <sup>[b]</sup>	G-quadruplex <sup>[c]</sup>
TBA	5'-G G <b>TT</b> G G <b>TGT</b> G G <b>TT</b> G G-3'	50	right-handed
TBA all-L	5'-g g <b>tt</b> g g <b>tgt</b> g g <b>tt</b> g g-3'	50	left-handed
D13	5'-g g <b>TT</b> g g <b>tgt</b> g g <b>TT</b> g g-3'	52	left-handed
IL4	5'-g g <b>xTT</b> • g g <b>tgt</b> g g <b>xTT</b> • g g-3'	50	left-handed
ID6	5'-g g <b>xTT</b> • g g <b>xTGT</b> • g g <b>xTT</b> • g g-3'	41	left-handed
ULDD	5'-g G <b>TT</b> G g <b>tgt</b> g <b>TT</b> G g-3'	42	right-handed

<sup>a</sup> I residui D ed L sono indicati in maiuscolo e minuscolo, rispettivamente. I siti ad inversione di polarità 3'-3' e 5'-5' sono indicati con una x e con un punto, rispettivamente. I residui dei loop nella struttura originaria del TBA sono evidenziati in rosso.

<sup>b</sup> Vedere i riferimenti 20,21

## 5.2.1 SEZIONE SPERIMENTALE

### *Sintesi e purificazione degli oligonucleotidi*

Gli oligonucleotidi modificati riportati in Tabella 1 sono stati preparati e purificati come precedentemente riportato [20,21]. Gli oligonucleotidi sono stati sintetizzati mediante un sintetizzatore Millipore Cyclone Plus DNA sfruttando la chimica in fase solida dei  $\beta$ -cianoetilfosforamiditi su scala 15  $\mu$ mol. La sintesi dei tratti 3'-5' è stata eseguita utilizzando normali 3'-fosforamiditi, 5'-dimetossitritil-  $\beta$ -L-deossiguanosine (iBu)-3'-fosforamidito e 5'-dimetossitritil-  $\beta$ -L-deossitimidina-3'-

fosforamidito mentre i tratti 5'-3' sono stati sintetizzati utilizzando i 5'-fosforamiditi. Tutti i monomeri fosforamidito modificati sono commercialmente disponibili (ChemGenes). Per tutti gli oligonucleotidi è stato usato un supporto universale. Gli oligomeri sono stati rimossi dal supporto solido e deprotetti mediante trattamento con una soluzione acquosa di ammoniaca concentrata a 80% per 12h. La miscela è stata quindi filtrata, lavata e successivamente concentrata a pressione ridotta. In seguito è stata ridisciolta in H<sub>2</sub>O ed analizzata e purificata per HPLC su una colonna Nucleogel SAX (Macherey–Nagel, 1000-8/46) con gli eluenti: tampone A: 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in soluzione acquosa a pH 7.0 contenente 20% (v/v) CH<sub>3</sub>CN e tampone B: 1 M KCl, 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in soluzione acquosa a pH 7.0 contenente 20% (v/v) CH<sub>3</sub>CN. Per l'eluizione del campione è stato usato un gradiente lineare 0% B→100%B in 45 min ad un flusso di 1.0 ml/min. Le frazioni degli oligomeri sono state raccolte e successivamente desalificate su colonne Sep-Pak (C18). Gli oligomeri isolati sono risultati puri all'NMR più del 98%.

### ***Risonanza Magnetica Nucleare***

I campioni NMR sono stati preparati ad una concentrazione di circa 1.5 mM in 0.6 ml (H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1 v/v) di una soluzione tampone a pH7, 10 mM di KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 70 mM di KCl e 0.2 mM di EDTA. Tutti i campioni sono stati riscaldati per 5-10 min a 80% e lentamente raffreddati (10-12 ore) a temperatura ambiente. Le soluzioni sono state equilibrate per diverse settimane a 4°C. Il processo di *annealing* è stato ritenuto completo quando gli spettri H<sup>1</sup> NMR risultavano sovrapponibili al variare del tempo. Gli spettri NMR sono stati registrati su uno spettrometro Varian Unity INOVA 700 MHz. Gli spettri protonici monodimensionali dei campioni in H<sub>2</sub>O sono stati registrati usando gradiente *pulsed-field* DPGSE per la soppressione del segnale dell'acqua [22]. I segnali relativi ai protoni del sodio 2,2-dimetil-2-

silapentan-5-solfonato (DSS) sono stati usati come riferimento per i *chemical shift* dei protoni ( $^1\text{H}$ ).

### ***Saggio del tempo di protrombina (PT)***

Il saggio del tempo di protrombina è stato eseguito su campioni di plasma umano ed è stato misurato usando un apparecchio *Koagulab MJ Coagulation System* dotato di uno specifico kit RecombiPlastin (tromboplastina ricombinante) Hemosil 2G (Instrumentation Laboratory, Milano, Italia). Questo metodo si basa sull'elevata sensibilità del reagente tromboplastina basato su fattori ricombinanti di tessuto umano. L'aggiunta al plasma della tromboplastina ricombinante, in presenza di ioni calcio, innesca l'attivazione della via estrinseca della coagulazione che converte il fibrinogeno in fibrina con formazione di un gel solido. La procedura è stata eseguita secondo manuale. Nelle nostre condizioni sperimentali, ciascun oligonucleotide o il veicolo è stato incubato con 100  $\mu\text{l}$  di plasma a 37 °C per 15 min, dopodiché sono stati aggiunti 200  $\mu\text{l}$  della soluzione del kit contenente tromboplastina ricombinante con conseguente attivazione della via estrinseca. In dettaglio, 2  $\mu\text{l}$  di soluzione del relativo oligonucleotide (1 mM in PBS) o veicolo (PBS) sono stati aggiunti nell'apposito microtubo con l'obiettivo di ottenere una concentrazione finale di 20  $\mu\text{M}$ . La misura del PT è stata prodotta in triplicato e le medie e i suoi valori dell'errore standard sono stati calcolati ed espressi in secondi. Il tempo di coagulazione basale è stato determinato misurando il tempo di coagulazione in assenza dell'oligonucleotide. L'incubazione con PBS non modifica la misura del PT.

### ***Culture cellulari e trattamenti con gli oligonucleotidi***

La linea cellulare Calu-6 costituita da cellule tumorali polmonari umane p53 mutate (ATCC® HTB-56™) e la linea cellulare HCT 116p53-/- costituita da cellule tumorali colon rettali *p53-null* [23] sono state coltivate in Dulbecco's Modified Eagle's

Medium (DMEM), integrate con siero fetale bovino (FBS) al 10% (Euroclone S.p.A), L-glutamina 2 mM e penicillina-streptomocina 50 U/ml sotto atmosfera umidificata con il 5% di anidride carbonica a 37°C. I trattamenti delle cellule sono stati eseguiti sostituendo il mezzo di coltura con quelli contenenti i differenti oligonucleotidi alla concentrazione finale di 10 µM e 50 µM per pozzetto dalle 24 alle 144 ore.

### ***Il saggio MTT***

Le cellule Calu-6 [24] e HCT 116p53-/- [25] sono state seminate su piastre a 96 pozzetti alla densità di  $2 \times 10^4$  cellule/pozzetto e trattate con i differenti oligonucleotidi alla concentrazione finale di 10 µM e 50 µM dalle 24 alle 144 ore. Successivamente, la vitalità cellulare è stata determinata utilizzando il saggio MTT come precedentemente riportato [26]. Un gruppo di tre diversi set di esperimenti, ciascuno ripetuto in triplice copia sono stati eseguiti. Le barre di errore rappresentano la media  $\pm$  SEM da  $n = 3$  repliche biologiche. I confronti statistici sono stati effettuati come in precedenza mostrato [27].

### ***Saggio di stabilità alle nucleasi***

La stabilità alle nucleasi degli aptameri anti-trombina è stata valutata in siero fetale bovino (FBS) al 10% diluito con Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) a 37 °C. Circa 7 nmol di soluzione stock di ciascun oligonucleotide ( $\sim 1$  O.D.U.) sono stati evaporati a secchezza a pressione ridotta e successivamente incubati con 250 µl di FBS al 10% a 37 °C. a 0 e 144 ore, 125 µl dei campioni sono stati raccolti e immagazzinati a -20 °C per almeno 20 minuti. I campioni sono stati evaporati a secchezza e poi sono stati aggiunti 10 µl di tampone di caricamento del gel e 10 µl di acqua sterile. 10 µl di tale miscela sono stati usati per l'elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE) che è stata eseguita a temperatura ambiente utilizzando

un gel di poliacrilammide al 20% in un tampone TBE1x (Tris-borato-EDTA). I pattern di degradazione sul gel sono stati visualizzati mediante *UV shadowing*. L'intensità delle bande del gel è stata quantificata mediante densitometria con l'uso del software *ImageJ*.

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

### ***Aspetti strutturali delle sequenze studiate***

È ben noto che il TBA è capace di formare una caratteristica struttura G-quadruplex monomolecolare antiparallela con una conformazione "a sedia" (*chair-like*). La parte centrale della struttura G-quadruplex è caratterizzata da due tetrad di G sovrapposte in cui guanosine *syn* ed *anti* si alternano in ciascuna tetrad e lungo i filamenti. Le due tetrad sono legate tra loro attraverso *loop* laterali (*edge-wise loops*) di diverse dimensioni: un *loop* centrale (sequenza TGT) e due ai lati (sequenza TT) (Figura 1) [17,18].

Un convincente numero di studi ha suggerito che i due *loop* TT rappresentano le più importanti regioni dell'aptamero coinvolte nell'interazione con l'esosito anionico I della trombina e, pertanto, sono maggiormente responsabili dell'attività anticoagulante del TBA [28-30]. D'altro canto, gli stessi studi hanno anche suggerito un ruolo minore per il *loop* TGT, essendo capace di interagire con il sito di legame dell'eparina su un'ulteriore molecola di trombina. Dunque, similmente ad altri aptameri formanti G-quadruplex, la struttura del TBA è caratterizzata da una parte centrale costituita dalle tetrad di G sovrapposte, maggiormente responsabili della stabilità termica, e da alcuni *loop* che protendono all'esterno e, perciò, più inclini ad interagire con le proteine target. Nella selezione degli analoghi del TBA come potenziali aptameri antiproliferativi, è stato tenuto conto principalmente di tre

proprietà: 1) la capacità di formare strutture G-quadruplex, 2) la stabilità termica in condizioni fisiologiche e 3) la resistenza chimica in ambienti biologici. Recentemente, nel tentativo di ottenere analoghi del TBA con migliori proprietà, sono state preparate e studiate sequenze contenenti L-nucleotidi o sia L-nucleotidi che siti ad inversione di polarità [20,21]. Tra questi, sono stati scelti quegli oligonucleotidi con una composizione ed un orientamento delle sequenze dei *loop* diversa rispetto a quelli della struttura a sedia originale (Tabella 1).

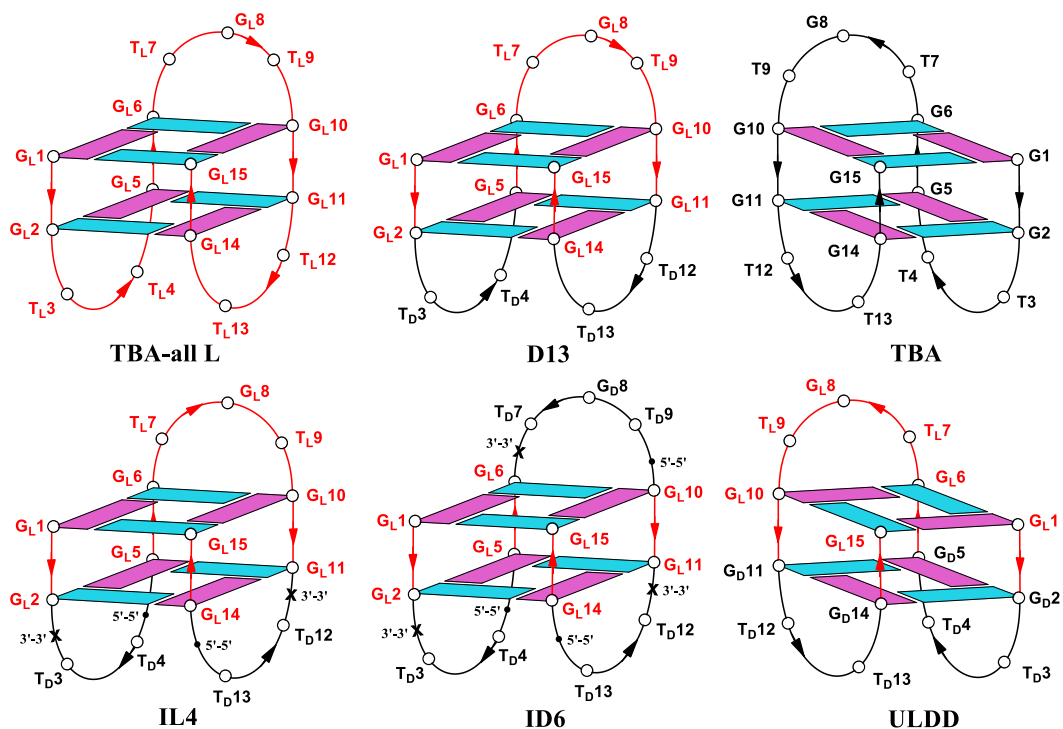


Figura 1. Strutture G-quadruplex proposte per gli oligonucleotidi studiati (tabella 1). Le guanosine *syn* ed *anti* sono indicate, rispettivamente, in azzurro e in viola. I siti ad inversione di polarità 3'-3' e 5'-5' sono indicati, rispettivamente, da una x e da un punto. Le frecce indicano l'orientazione 5'-3'. I residui D e L sono contrassegnati, rispettivamente, in nero e rosso.

Il dicroismo circolare è una tecnica importante, non solo per accertare la formazione in soluzione di strutture G-quadruplex ma anche per ottenere informazioni riguardanti la topologia adottata, in particolare nel caso di sequenze analoghe all'oligonucleotide precursore per il quale la formazione di una peculiare

struttura G-quadruplex sia stata accertata attraverso altre tecniche e il cui profilo CD sia noto [31]. In Figura 2 sono mostrati i profili CD degli oligonucleotidi studiati in confronto con quello del TBA naturale. Visto che **TBA all-L** ha la stessa sequenza del TBA ma è composto unicamente da residui L, il suo profilo CD, come atteso, è perfettamente speculare a quello del TBA. Perciò, **TBA all-L** adotta una struttura G-quadruplex a sedia sinistrorsa che è l'immagine speculare della struttura del TBA. L'oligonucleotide **D13** è, per la maggior parte, composto da residui L, fatta eccezione per le timidine che costituiscono i due piccoli *loop* laterali, ossia T3, T4, T12 e T13. Il suo spettro CD mostra un profilo molto simile a quello del **TBA all-L** suggerendo, anche in questo caso, la formazione di una struttura G-quadruplex a sedia sinistrorsa (Figura 1). L'oligonucleotide **IL4** mostra una sequenza ed una composizione in basi analoghe a D13 ma, in questo caso, rispetto a D13, sono stati introdotti due siti ad inversione di polarità 3'-3' (tra G2-T3 e tra G11-T12) e due siti ad inversione di polarità 5'-5' (tra T4-G5 e T13-G14) al fine di invertire la direzione dei filamenti dei *loop* piccoli TT. Nell'oligonucleotide **ID6** sono stati aggiunti due ulteriori siti ad inversione di polarità (uno 3'-3' e uno 5'-5' rispettivamente tra G6-T7 e T9-G10) in modo da invertire anche la direzione del filamento del *loop* grande TGT. Anche gli spettri CD di **IL4** e **ID6** mostrano profili simili a quello del **TBA all-L**, a parte lievi differenze riguardanti l'intensità delle bande e le loro lunghezze d'onda. Pertanto, anche per questi casi, abbiamo proposto una struttura G-quadruplex a sedia sinistrorsa (Figura 1). Questi risultati non dovrebbero essere ritenuti particolarmente sorprendenti tenendo in considerazione che, nei casi in cui è stata proposta una struttura G-quadruplex a sedia sinistrorsa (ovvero **TBA all-L**, **D13**, **IL4** e **ID6**), tutte le guanosine che formano il nucleo delle due tetradi di G nell'originale conformazione a sedia, sono residui L, condizionando così l'elicità dell'intera struttura.



Dovrebbe essere notato che sebbene sia **IL4** che **ID6** formino una struttura G-quadruplex a sedia sinistrorsa, la temperatura di *melting* di **IL4** è circa 9°C più alta di **ID6**. Considerando le loro differenti strutture, questo dato non dovrebbe essere considerato inaspettato. Infatti, nel più stabile **IL4**, i residui nelle tetrad di G e nel *loop* TGT (che sono le parti principalmente responsabili della stabilità termica [32-34]) condividono la stessa chiralità e sono connessi attraverso legami fosfodiesterici 3'-5'. Al contrario, in **ID6**, i residui nelle tetrad e nel *loop* TGT mostrano chiralità opposta e due siti ad inversione di polarità, influenzando, pertanto, negativamente la stabilità strutturale.

Diversamente dagli altri oligonucleotidi, la sequenza di **ULDD** è la sola e l'unica in cui quattro guanosine che formano il corpo centrale della G-quadruplex nel TBA, sono residui D mentre gli altri appartengono alla serie L. Di conseguenza, in questo caso, non c'è un fattore decisivo che guida l'elicità della struttura G-quadruplex. Infatti, lo spettro CD di **ULDD** (Figura 2) mostra un profilo piuttosto diverso da quello degli altri analoghi del TBA e della loro controparte naturale, essendo caratterizzato, da una banda negativa e una positiva a 245 e 266 nm, rispettivamente. Prendendo in considerazione a) la somiglianza del profilo CD di **ULDD** con quello delle G-quadruplex tetramolecolari formate da TG<sub>4</sub>T (Figura 2), b) la dipendenza del profilo CD dal tipo di sovrapposizione delle tetrad di G [35] e c) la relazione tra legame glicosidico delle L-guanosine e la direzionalità del filamento nelle strutture G-quadruplex precedentemente studiate [36], per **ULDD** è stata proposta una conformazione G-quadruplex a sedia destrorsa mostrata in Figura 1.

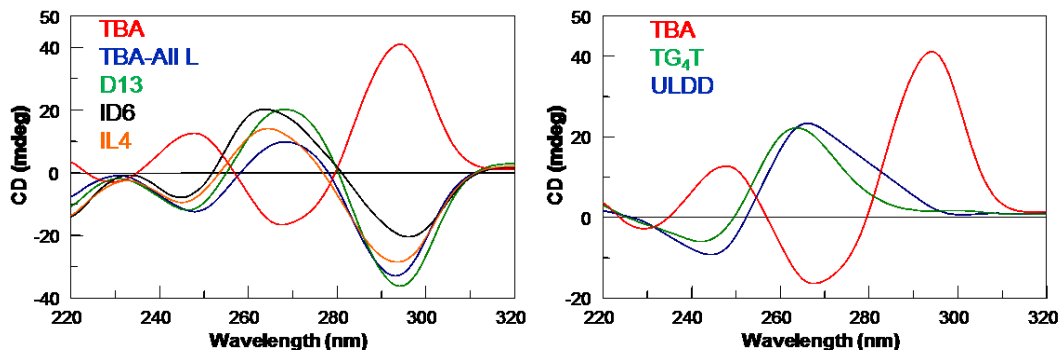


Figura 2. Spettri CD degli oligonucleotidi studiati (tabella 1) (20 °C in una soluzione tampone 10mMKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 70mMKCl, pH=7, ODN conc. = 1 × 10<sup>-4</sup> M). Lo spettro della G-quadruplex parallela TG<sub>4</sub>T è stato mostrato come riferimento.

Nel tentativo di ottenere maggiori informazioni strutturali e confermare la presenza di strutture G-quadruplex per gli analoghi del TBA, abbiamo registrato gli spettri <sup>1</sup>H NMR. In Figura 3, sono mostrate le regioni dei protoni immidici e aromatici. Come previsto, **TBA all-L** mostra uno spettro identico al suo enantiomero TBA. Nel caso di **D13**, l'aspetto semplice del suo spettro e la presenza di 8 segnali parzialmente sovrapposti nella regione diagnostica delle G-quadruplex tra 10.5 e 12.5 ppm (in cui sono presenti i protoni immidici delle guanosine coinvolte nei legami H) indica chiaramente la formazione di una struttura G-quadruplex ben definita. Studi 2D-NMR più dettagliati hanno confermato una struttura G-quadruplex a sedia monomolecolare molto simile a quella del TBA originale, eccetto per il tipo di elica [20]. Diversamente da **D13** e **TBA all-L**, gli oligonucleotidi **IL4**, **ID6**, e **ULDD** hanno mostrato spettri <sup>1</sup>H NMR caratterizzati da segnali larghi e parzialmente sovrapposti suggerendo la presenza di più di una conformazione all'equilibrio e impedendo, pertanto, di effettuare ulteriori dettagliati studi. Tuttavia, anche in questi casi, la presenza di segnali nella regione diagnostica ha confermato la presenza di strutture G-quadruplex che era già stata suggerita dai profili CD.

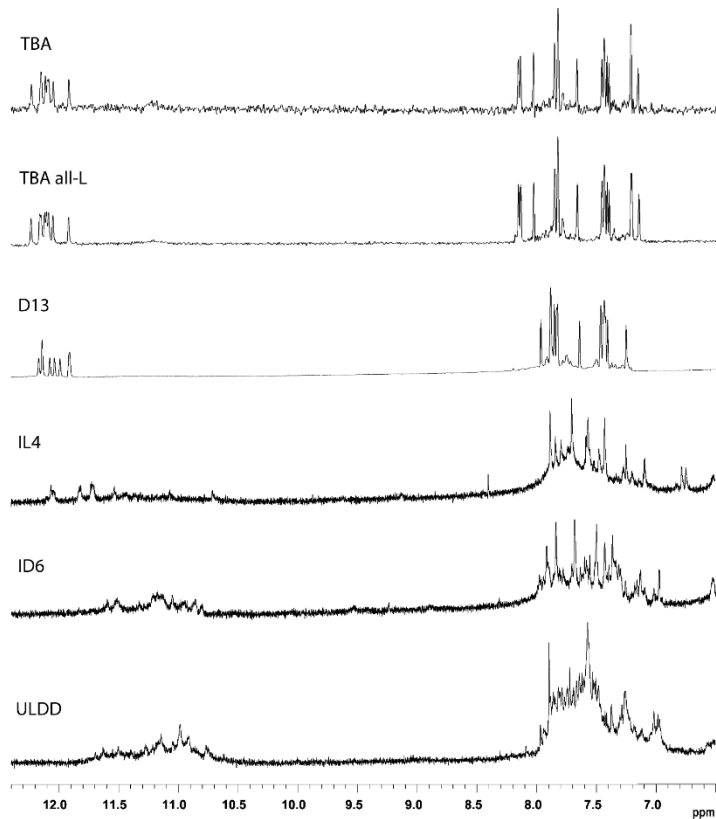


Figura 3. Spettri  $^1\text{H}$  NMR degli oligonucleotidi studiati (tabella 1). Vedi la sezione sperimentale per i dettagli.

### ***Attività biologica***

Al fine di valutare l'attività anticoagulante degli analoghi del TBA (Tabella 1), le sequenze modificate sono state sottoposte al saggio del tempo di protrombina (PT). Da quest'analisi è emerso che nessuno dei derivati del TBA studiati è dotato di attività anticoagulante, sebbene siano state usate alte concentrazioni di oligonucleotidi (Figura 4).

Le proprietà antiproliferative degli oligonucleotidi studiati (Tabella 1) sono state testate su due differenti linee cellulari tumorali umane ossia Calu-6 e HCT 116<sup>p53-/-</sup>, rispettivamente linee cellulari tumorali polmonari e del colon-retto. Per ciascuna linea cellulare, l'attività degli aptameri è stata valutata a due diverse

concentrazioni, 10  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  e a tempi differenti, dalle 24 alle 144 ore. Le curve rappresentative della sopravvivenza cellulare sono mostrate in Figure 5 e 6. Nelle cellule Calu-6, è stato riscontrato che tutti gli oligonucleotidi sono attivi (Figura 5). Tra gli oligonucleotidi testati, **ULDD** ha mostrato il più grande effetto sulla vitalità cellulare ad entrambe le concentrazioni testate. Precisamente, **ULDD** mostra il 50% della sua attività antiproliferativa sulle cellule tumorali dopo tempi di incubazione più bassi (circa 53 h e 52 h per le concentrazioni 10  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ , rispettivamente) di quelli osservati per il TBA (circa 61 e 55 h per le concentrazioni 10  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ , rispettivamente) (Tabella 2). Gli altri oligonucleotidi hanno specificità simile ma sono risultati meno efficaci nell'inibire la vitalità delle cellule tumorali. Tuttavia, tutti gli oligonucleotidi testati hanno ridotto la vitalità delle cellule Calu-6 dal 10% al 1% dopo 144 h. È stato osservato che **ID6**, **ULDD** e TBA sono attivi in maniera dipendente dal tempo anche nella linea cellulare HCT 116<sup>p53-/-</sup> (Figura 6) mentre **TBA all-L**, **D13** e **IL4** hanno mostrato un differente andamento. Infatti, per questi oligonucleotidi è stata osservata a 10  $\mu\text{M}$  una decrescente citotossicità dopo 96 h di incubazione e per **D13** e **IL4** anche a 50  $\mu\text{M}$  è osservabile un decremento della citotossicità rispettivamente dopo 96 e 120 h di incubazione. La ridotta attività antiproliferativa di questi oligonucleotidi nelle cellule HCT 116<sup>p53-/-</sup> potrebbe essere conseguenza dell'attivazione, in risposta al trattamento con queste molecole, di specifiche vie intracellulari di trasduzione capaci di inibire la loro attività. Numerosi studi dimostrano che alcuni composti chimici esibiscono citotossicità specifica contro un particolare tipo di cellula tumorale e non contro altre. Inoltre, ricerche di screening farmacologico hanno identificato diversi composti con specificità verso un certo tipo di cellule [37, 38].

Tali analisi rivelano che tutti gli oligonucleotidi testati esibiscono una potente citotossicità sulle cellule Calu-6 mentre i composti **TBA all-L**, **D13** e **IL4** mostrano differente citotossicità sulle cellule Calu-6 e HCT 116<sup>p53-/-</sup> suggerendo che queste

due linee cellulari possiedono distinti segnali di sopravvivenza che potrebbero portare a differenti emivite di questi oligonucleotidi. Future analisi di questi composti dovranno essere eseguite su ulteriori linee cellulari tumorali umane per determinare se questa selettività potrebbe condurre alla scoperta di nuovi e specifici agenti contro il tumore al polmone.

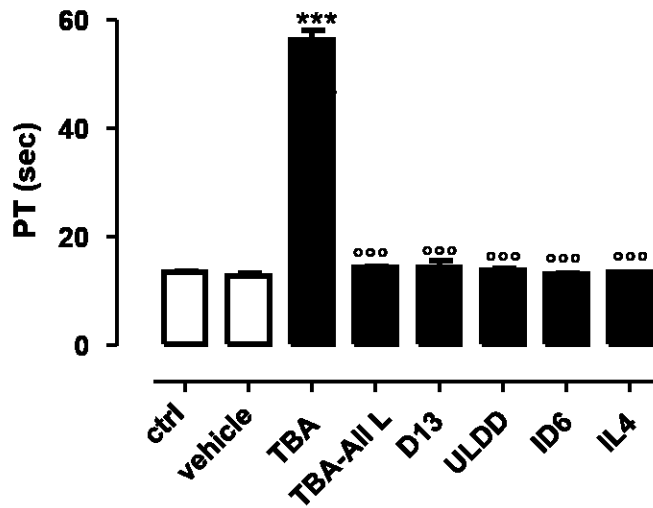


Figura 4. Valori PT del TBA e dei suoi analoghi modificati alla concentrazione di oligonucleotide 20 $\mu$ M e tempo di incubazione di 15 min. Vedi la sezione sperimentale per i dettagli. \*\*\* = p b 0.001 vs. veicolo, ° = p b 0.05, °° = p b 0.01, °°° = p b 0.001 vs. TBA (n= 3).

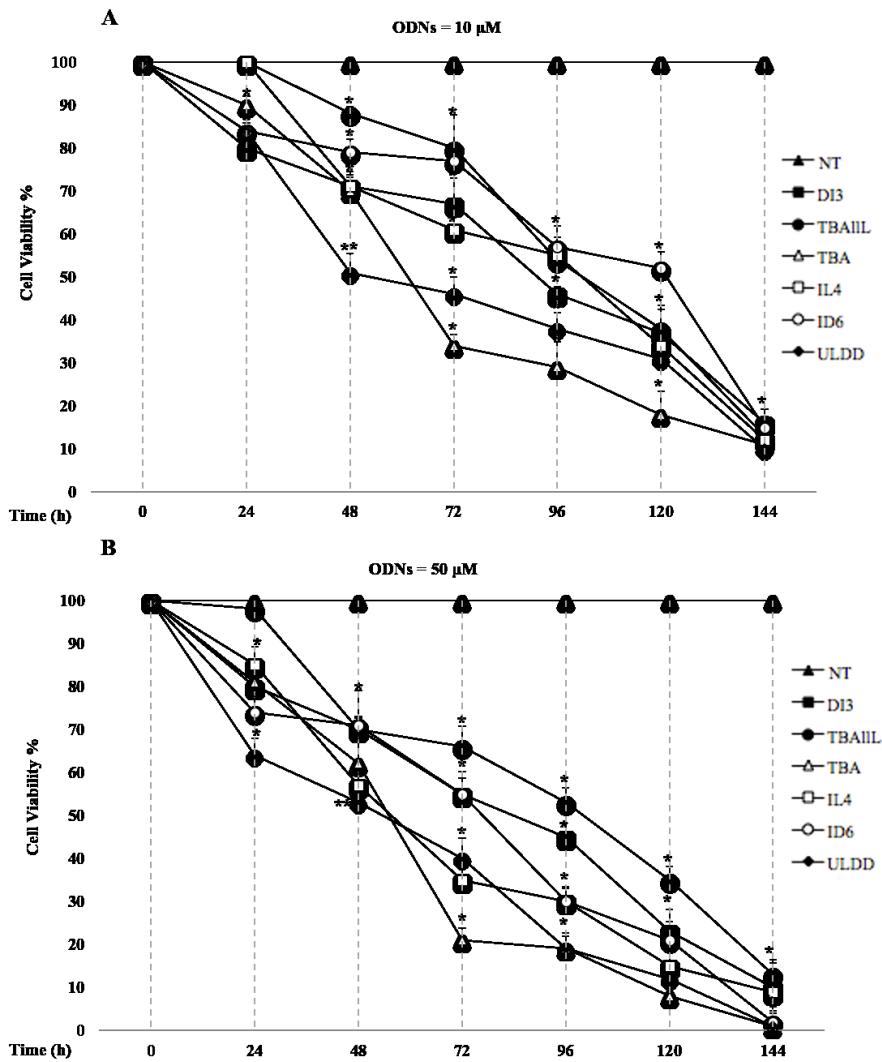


Figura 5. Attività antiproliferativa degli oligonucleotidi sulla linea cellulare Calu-6. Le cellule sono state trattate con due differenti concentrazioni di oligonucleotidi, 10  $\mu$ M (A) e 50  $\mu$ M (B), da 24 a 144 h. La linea NT (non trattate) riporta la vitalità cellulare in assenza di oligonucleotidi. La vitalità cellulare è stata esaminata mediante il saggio MTT dopo l'aggiunta degli oligonucleotidi a 24, 48, 72, 96, 120 e 144 h. I risultati sono presentati come percentuali (mean $\pm$ SEM) (n= 3) delle cellule di controllo. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01.

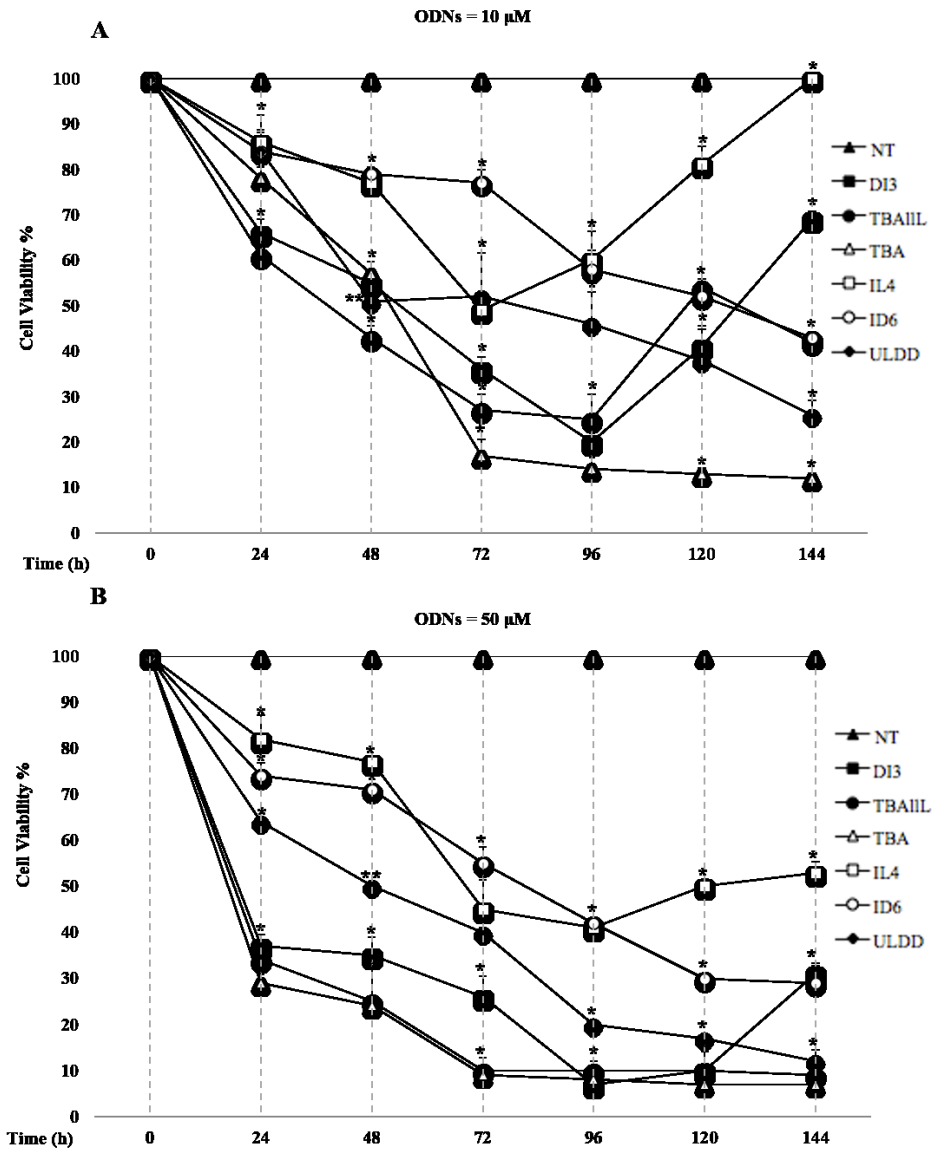


Figura 6. Attività antiproliferativa degli oligonucleotidi sulla linea cellulare HCT 116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup>. Le cellule sono state trattate con due differenti concentrazioni di oligonucleotidi, 10  $\mu$ M (A) e 50  $\mu$ M (B), da 24 a 144 h. La linea NT (non trattate) riporta la vitalità cellulare in assenza di oligonucleotidi. La vitalità cellulare è stata esaminata mediante il saggio MTT in seguito all'aggiunta degli oligonucleotidi a 24, 48, 72, 96, 120 e 144 h. I risultati sono presentati come percentuali (mean $\pm$ SEM) (n=3) delle cellule di controllo. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01.

	CALU cell line		HCT 116 <sup>p53</sup> <sup>-/-</sup> cell line	
	10 $\mu$ M	50 $\mu$ M	10 $\mu$ M	50 $\mu$ M
<b>D13</b>	91	82	54	19
<b>TBA all-L</b>	102	99	38	18
<b>TBA</b>	61	55	52	17
<b>IL4</b>	102	55	72	68
<b>ID6</b>	121	76	126	81
<b>ULDD</b>	53	52	48	48

Tabella 2. Tempi stimati (h) richiesti per determinare la morte del 50% delle cellule, così come si evince dai grafici riguardanti l'attività antiproliferativa (figure 5 e 6).

### ***Saggio di stabilità alle nucleasi***

Al fine di testare la resistenza in ambiente biologico, tutti gli analoghi del TBA sono stati sottoposti al saggio di degradazione in siero fetale bovino (FBS) ed analizzati mediante elettroforesi su gel (Figura 7). Dal momento che la vitalità cellulare misurata attraverso il saggio MTT è stata testata fino 144 h, anche la resistenza degli oligonucleotidi nel siero fetale bovino è stata valutata dopo lo stesso tempo. Come atteso, in queste condizioni, gli oligonucleotidi composti in misura maggiore da residui L hanno mostrato una debole (**IL4** e **D13**) o non rilevabile degradazione (**TBA all-L**), mentre il TBA, la loro controparte naturale, è stata completamente degradata. D'altro canto, **ID6** ha mostrato solo una parziale resistenza mentre **ULDD** è stato quasi completamente degradato. Considerando che tutti i derivati del TBA modificati mostrano residui L sia alle estremità 3' che 5', è improbabile che la degradazione osservata possa essere dovuta all'azione di esonucleasi. È plausibile ritenere che, con tempi di reazione maggiori, la degradazione avvenga ad opera di endonucleasi. Questa ipotesi è corroborata dal trend di stabilità osservato in queste condizioni (**TBA all-L** > **IL4** > **D13** > **ID6** >> **ULDD**) che è in buon accordo con il numero di legami fosfodiesterici canonici 3'-5' presenti in tali sequenze (0, 2, 2, 4 e 6 per **TBA all-L**, **IL4**, **D13**, **ID6** e **ULDD**, rispettivamente).



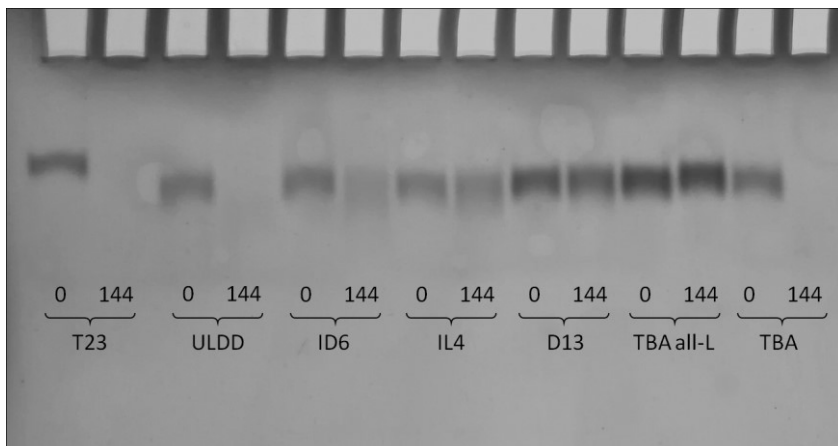


Figura 7. Stabilità degli oligonucleotidi studiati in siero fetale bovino (FBS) al 10%, come osservato mediante PAGE non denaturante. I punti temporali 0 e 144 sono in ore. L'oligonucleotide T23 è stato usato come controllo positivo. Vedi la sezione materiali e metodi per i dettagli sperimentali.

## CONCLUSIONI

Considerando le loro strutture e i loro target, gli aptameri antiproliferativi che adottano strutture G-quadruplex (quindi potenzialmente dotati di proprietà anticancro), appaiono come un gruppo piuttosto eterogeneo di ligandi. Questo dato non è particolarmente sorprendente se si considera che la proliferazione cellulare dipende da numerosi *pathway* biologici che implicano un numero piuttosto alto di potenziali target. Ad esempio, un convincente numero di studi suggerisce decisamente che il target del più studiato aptamero G-quadruplex antiproliferativo, ossia il 26-mer AS1411, sia la nucleolina, una proteina multifunzionale sovraespressa nel citoplasma e sulla superficie cellulare di molti tipi di tumori [39,40]. Questo contesto è complicato da ulteriori dati tra cui 1) la recente scoperta che la citotossicità dei prodotti di degradazione guaninici contribuisce all'attività antiproliferativa degli oligonucleotidi ricchi di G come AS1411 e di altre sequenze con le stesse caratteristiche [41] e 2) l'estremo polimorfismo dell'aptamero AS1411 [15]. D'altronde, l'aptamero 16-mer T40214 (GGGC)<sub>4</sub> (e i suoi analoghi), formante una ben definita struttura G-quadruplex parallela, è capace di

legarsi alla proteina Stat3 (*signal transducer and activator of transcription 3 protein*) [7,42] che è coinvolta in una varietà di processi cellulari e biologici che includono la proliferazione, la differenziazione, l'apoptosi, l'*host defense* e la trasformazione. A differenza di questi due aptameri per i quali sono stati proposti target unici, e in accordo con i dati presenti in letteratura, l'attività antiproliferativa del TBA dipenderebbe da 3 fattori: 1) la capacità del TBA di interagire con una proteina, presumibilmente la nucleolina [10], 2) il coinvolgimento della trombina, il principale target del TBA, nel promuovere la proliferazione interagendo con il recettore attivato dalla proteasi (PAR-1) [43], e 3) similmente ad altri oligonucleotidi ricchi di G, il contributo dei prodotti di degradazione guaninici [41], tenendo conto della bassa resistenza del TBA alle nucleasi [44]. Sebbene l'attività anticoagulante del TBA rappresenti chiaramente uno svantaggio nello sviluppo dell'attività antiproliferativa di questo aptamero, una recente ricerca ha mostrato che appropriate modifiche chimiche possono conservare la sua attività antiproliferativa a discapito di quella anticoagulante [19]. Seguendo una strategia simile, in questo lavoro, sono state studiate le proprietà degli analoghi del TBA contenenti due modifiche (Tabella 1) ovvero la presenza di residui L [20,36] e l'introduzione di siti ad inversione di polarità [21,45-47]. I dati CD e NMR suggeriscono che tutti gli oligonucleotidi adottano strutture G-quadruplex, sebbene caratterizzate da differenti tipi di elica (destrorsa o sinistrorsa). I dati raccolti sono coerenti con la presenza, anche in questi casi, di conformazioni G-quadruplex a sedia somiglianti a quella del TBA. Un dato molto importante è che nessuno degli oligonucleotidi testati ha mostrato attività anticoagulante (Figura 4) suggerendo così che tali analoghi sono incapaci di interagire con la trombina. I saggi MTT riguardanti i due tipi di cellule antitumorali, hanno indicato, in parecchi casi, attività antiproliferative comparabili a quella del TBA naturale a seconda del tipo di cellula, sequenza, tempo di trattamento e concentrazione dell'oligonucleotide. Ad esempio, il comportamento di **TBA all-L** e

TBA sulla linea cellulare HCT 116<sup>p53-/-</sup> a 50  $\mu$ M di concentrazione di oligonucleotide è abbastanza simile (Figura 6). D'altronde, per un tempo di trattamento pari a 144 h, l'attività antiproliferativa sulla linea cellulare Calu 6 è risultata comparabile a quella del TBA per la maggior parte degli oligo testati (Figura 5). I dati CD e NMR hanno indicato chiaramente che, tra gli oligonucleotidi analizzati, **TBA all-L** e **D13** adottano una struttura G-quadruplex sinistrorsa a sedia ben definita [20]. Tuttavia, contrariamente al TBA, le loro attività antiproliferative non possono essere attribuite né all'interazione con la trombina (visto che non mostrano attività anticoagulante) né ai prodotti di degradazione guaninici (dato che sono abbastanza resistenti alle nucleasi e i loro potenziali prodotti di degradazione sarebbero in misura maggiore residui L). D'altro canto, sebbene non possa essere definitivamente escluso, è piuttosto improbabile che anche per **TBA all-L** e per **D13** il target sia la nucleolina, visto che essi adottano strutture G-quadruplex sinistrorse che sono l'immagine speculare di quella del TBA. Un'osservazione interessante, riguarda l'ipotesi di una possibile relazione tra la struttura G-quadruplex sinistrorsa adottata da un oligonucleotide correlato a AS1411 [16] e quella formata da **TBA all-L** e **D13**. Queste osservazioni suggeriscono che l'attività antiproliferativa di **TBA all-L** e **D13** potrebbe dipendere da target e *pathway* biologici diversi da quelli presi in considerazione fin ora. Esperimenti biochimici in quest'ambito sono in corso presso il gruppo in cui ho svolto la mia attività di ricerca. Considerazioni simili potrebbero essere applicate anche a **IL4** e **ID6** che, similmente, mostrano notevoli attività antiproliferative (particolarmente contro la linea cellulare Calu-6) sebbene, in questi casi, la loro parziale degradabilità non consenta di escludere completamente il contributo dei prodotti di degradazione guaninici. Per quanto riguarda la bassa resistenza biologica di **ULDD**, che tra i vari oligonucleotidi ha mostrato i risultati più interessanti, il contributo dei prodotti di degradazione guaninici all'attività antiproliferativa potrebbe essere maggiore rispetto a quello degli altri derivati. Nel

caso di **ULDD** è stata suggerita una struttura G-quadruplex destrorsa sebbene non siano disponibili maggiori dettagli riguardanti la sua conformazione.

## ***Bibliografia***

- [1] For a recent general review see: F. Radom, P.M. Jurek, M.P. Mazurek, J. Otlewski, F. Jeleń, Aptamers: molecules of great potential, *Biotechnol. Adv.* 31 (2013) 1260–1274.
- [2] Y. X. Wu, Y.J. Kwon, Aptamers: the “evolution” of SELEX, *Methods* (2016).
- [3] A. Varizhuk, N. Ilyinsky, I. Smirnov, G. Pozmogova, G4 aptamers: trends in structural design, *Mini Rev. Med. Chem.* (2016).
- [4] W.O. Tucker, K.T. Shum, J.A. Tanner, G-quadruplex DNA aptamers and their ligands: structure, function and application, *Curr. Pharm. Des.* 18 (2012) 2014–2026.
- [5] J.E. Rosenberg, R.M. Bambury, E.M. Van Allen, H.A. Drabkin, P.N. Lara Jr., A.L. Harzstark, N. Wagle, R.A. Figlin, G.W. Smith, L.A. Garraway, T. Choueiri, F. Erlandsson, D.A. Laber, A phase II trial of AS1411 (a novel nucleolin-targeted DNA aptamer) in metastatic renal cell carcinoma, *Investig. New Drugs* 32 (2014) 178–187.
- [6] M.T. Malik, M.G. O'Toole, L.K. Casson, S.D. Thomas, G.T. Bardi, E.M. Reyes-Reyes, C.K. Ng, K.A. Kang, P.J. Bates, AS1411-conjugated gold nanospheres and their potential for breast cancer therapy, *Oncotarget* 26 (2015) 22270–22281.
- [7] N. Jing, Y. Li, W. Xiong, W. Sha, L. Jing, D.J. Tweardy, G-quartet oligonucleotides: a new class of signal transducer and activator of transcription 3 inhibitors that suppresses growth of prostate and breast tumors through induction of apoptosis, *Cancer Res.* 64 (2004) 6603–6609.
- [8] J. Hu, Z. Zhao, Q. Liu, M. Ye, B. Hu, J. Wang, W. Tan, Study of the function of G-rich aptamers selected for lung adenocarcinoma, *Chem. Asian J.* 10 (2015) 1519–1525.
- [9] E.W. Choi, L.V. Nayak, P.J. Bates, Cancer-selective antiproliferative activity is a general property of some G-rich oligodeoxynucleotides, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) 1623–1635.
- [10] V. Đapić, V. Abdomerović, R. Marrington, J. Peberdy, A. Rodger, J.O. Trent, P.J. Bates, Biophysical and biological properties of quadruplex oligodeoxyribonucleotides, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 2097–2107.
- [11] A.C. Girvan, Y. Teng, L.K. Casson, S.D. Thomas, S. Jülicher, M.W. Ball, J.B. Klein, W.M. Pierce Jr., S.S. Barve, P.J. Bates, AGRO100 inhibits activation of nuclear factor kappa B (NF-kappaB) by forming a complex with NF-kappaB essential modulator (NEMO) and nucleolin, *Mol. Cancer Ther.* 5 (2006) 1790–1799.
- [12] Y. Teng, A.C. Girvan, L.K. Casson, W.M. Pierce Jr., M. Qian, S.D. Thomas, P.J. Bates, AS1411 alters the localization of a complex containing protein arginine methyltransferase 5 and nucleolin, *Cancer Res.* 67 (2007) 10491–10500.

- [13] P.J. Bates, D.A. Laber, D.M. Miller, S.D. Thomas, J.O. Trent., Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer, *Exp. Mol. Pathol.* 86 (2009) 151–164.
- [14] P.J. Bates, J.B. Kahlon, S.D. Thomas, J.O. Trent, D.M. Miller, Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides correlates with protein binding, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 26369–26377.
- [15] M.M. Dailey, M. Clarke Miller, P.J. Bates, A.N. Lane, J.O. Trent, Resolution and characterization of the structural polymorphism of a single quadruplex-forming sequence, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) 4877–4888.
- [16] W.J. Chung, B. Heddi, E. Schmitt, K.W. Lim, Y. Mechulam, A.T. Phan, Structure of a left-handed DNA G-quadruplex, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (2015) 2729–2733.
- [17] R.F. Macaya, P. Schultze, F.W. Smith, J.A. Roe, J. Feigon, Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 3745–3749.
- [18] J.A. Kelly, J. Feigon, T.O. Yeates, Reconciliation of the X-ray and NMR structures of the thrombin-binding aptamer d(GGTTGGTGTGGTTGG), *J. Mol. Biol.* 256 (1996) 417–422.
- [19] M. Scuotto, E. Rivieccio, A. Varone, D. Corda, M. Bucci, V. Vellecco, G. Cirino, A. Virgilio, V. Esposito, A. Galeone, N. Borbone, M. Varra, L. Mayol, Site specific replacements of a single loop nucleoside with a dibenzyl linker may switch the activity of TBA from anticoagulant to antiproliferative, *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) 7702–7716.
- [20] A. Virgilio, M. Varra, M. Scuotto, A. Capuozzo, C. Irace, L. Mayol, V. Esposito, A. Galeone, Expanding the potential of G-quadruplex structures: formation of a heterochiral TBA analogue, *ChemBiochem* 155 (2014) 652–655.
- [21] A. Virgilio, L. Mayol, M. Varra, A. Galeone, V. Esposito, Unusual chair-like G-quadruplex structures: heterochiral TBA analogues containing inversion of polarity sites, *J. Chem.* (2015), 473051.
- [22] C. Dalvit, Efficient multiple-solvent suppression for the study of the interactions of organic solvents with biomolecules, *J. Biomol. NMR* 11 (1998) 437–444.
- [23] F. Bunz, A. Dutriaux, C. Lengauer, T. Waldman, S. Zhou, J.P. Brown, J.M. Sedivy, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage, *Science* 282 (1998) 1497–1501.
- [24] A. Russo, V. Pagliara, F. Albano, D. Esposito, V. Sagar, F. Loreni, C. Irace, R. Santamaria, G. Russo, Regulatory role of rpl3 in cell response to nucleolar stress induced by Act D in tumor cells lacking functional p53, *Cell Cycle* 15 (2016) 41–51.
- [25] D. Esposito, E. Crescenzi, V. Sagar, F. Loreni, A. Russo, G. Russo, Human rpl3 plays a crucial role in cell response to nucleolar stress induced by 5-FU and L-OHP, *Oncotarget* 5 (2014) 11737–11751.
- [26] S. Maiolino, A. Russo, V. Pagliara, C. Conte, F. Ungaro, G. Russo, F. Quaglia, Biodegradable nanoparticles sequentially decorated with polyethyleneimine and hyaluronan for the targeted delivery of docetaxel to airway cancer cells, *J. Nanobiotechnol.* 13 (2015) 29.

- [27] D. De Filippis, A. Russo, D. De Stefano, M. Cipriano, D. Esposito, G. Grassia, R. Carnuccio, G. Russo, T. Iuvone, Palmitoylethanolamide inhibits rMCP-5 expression by regulating MITF activation in rat chronic granulomatous inflammation, *Eur. J. Pharmacol.* 15 (2014) 64–69.
- [28] K. Padmanabhan, A. Tulinsky, An ambiguous structure of a DNA 15-mer thrombin complex, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* D52 (1996) 272–282.
- [29] A. Avino, C. Fabrega, M. Tintore, R. Eritja, Thrombin binding aptamer, more than a simple aptamer: chemically modified derivatives and biomedical applications, *Curr. Pharm. Des.* 18 (2012) 2036–2047.
- [30] I. Russo Krauss, A. Merlino, C. Giancola, A. Randazzo, L. Mazzarella, F. Sica, Thrombin-aptamer recognition: a revealed ambiguity, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 7858–7867.
- [31] M. Vorlíčková, I. Kejnovská, J. Sagi, D. Renčiuk, K. Bednářová, J. Motlová, J. Kypr, Circular dichroism and guanine quadruplexes, *Methods* 57 (2012) 64–75.
- [32] I. Russo Krauss, A. Merlino, A. Randazzo, E. Novellino, L. Mazzarella, F. Sica, High resolution structures of two complexes between thrombin and thrombin-binding aptamer shed light on the role of cations in the aptamer inhibitory activity, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 8119–8128.
- [33] R. Reshetnikov, A. Golovin, A. Kopylov, J. Šponer, Structural dynamics of thrombin binding DNA aptamer d(GGTTGGTGTGGTTGG) quadruplex DNA studied by largescale explicit solvent simulations, *J. Chem. Theory Comput.* 6 (2010) 3003–3014.
- [34] S. Nagatoishi, N. Sugimoto, Interaction of water with the G-quadruplex loop contributes to the binding energy of G-quadruplex to protein, *Mol. BioSyst.* 8 (2012) 2766–2770.
- [35] S. Masiero, R. Trotta, S. Pieraccini, S. De Tito, R. Perone, A. Randazzo, G.P. Spada, A non-empirical chromophoric interpretation of CD spectra of DNA G-quadruplex structures, *Org. Biomol. Chem.* 8 (2010) 2683–2692.
- [36] A. Virgilio, V. Esposito, G. Citarella, A. Mangoni, L. Mayol, A. Galeone, Unprecedented right- and left-handed quadruplex structures formed by heterochiral oligodeoxyribonucleotides, *Biochimie* 93 (2011) 1193–1196.
- [37] K.W. Yip, X. Mao, P.Y. Au, D.W. Hedley, S. Chow, S. Dalili, J.D. Mocanu, C. Bastianutto, A. Schimmer, F.F. Liu, Benzethonium chloride: a novel anticancer agent identified by using a cell-based small-molecule screen, *Clin. Cancer Res.* 12 (2006) 5557–5569.
- [38] H. Kashida, H. Ito, T. Fujii, T. Hayashi, H. Asanuma, Positively charged base surrogate for highly stable “base pairing” through electrostatic and stacking interactions, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 9928–9930.
- [39] S. Christian, J. Pilch, M.E. Akerman, K. Porkka, P. Laakkonen, E. Ruoslahti, Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels, *J. Cell Biol.* 163 (2003) 871–878.
- [40] H. Ginisty, H. Sicard, B. Roger, P. Bouvet, Structure and functions of nucleolin, *J. Cell Sci.* 112 (1999) 761–772.
- [41] N. Zhang, T. Bing, X. Liu, C. Qi, L. Shen, L. Wanga, D. Shangguan, Cytotoxicity of guanine-based degradation products contributes to the antiproliferative activity of guanine-rich oligonucleotides, *Chem. Sci.* 6 (2015) 3831–3838.

- [42] P. Weerasinghe, Y. Li, Y. Guan, R. Zhang, D.J. Tweardy, N. Jing, T40214/PEI complex: a potent therapeutics for prostate cancer that targets STAT3 signaling, *Prostate* 68 (2008) 1430–1442.
- [43] S. Zhou, W. Xiao, X. Pan, M. Zhu, Z. Yang, F. Zhang, C. Zheng, Thrombin promotes proliferation of human lung fibroblasts via protease activated receptor-1- dependent and NF- $\kappa$ B-independent pathways, *Cell Biol. Int.* 38 (2014) 747–756.
- [44] C. Geng Peng, M.J. Damha, G-quadruplex induced stabilization by 2'-deoxy-2'- fluoro-D-arabinonucleic acids (2'F-ANA), *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 4977–4988.
- [45] V. Esposito, A. Virgilio, A. Pepe, G. Oliviero, L. Mayol, A. Galeone, Effects of the introduction of inversion of polarity sites in the quadruplex forming oligonucleotide TGGGT, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 1997–2001.
- [46] P. Sket, A. Virgilio, V. Esposito, A. Galeone, J. Plavec, Strand directionality affects cation binding and movement within tetramolecular G-quadruplexes, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 11047–11057.
- [47] A. Virgilio, V. Esposito, R. Filosa, L. Mayol, A. Galeone, The introduction of inversion of polarity sites in DNA G-quadruplex structures: effects and perspectives, *Mini Rev. Med. Chem.* 16 (2016) 509–523.

### ***5.3 Strutture G-quadruplex monomolecolari con siti ad inversione di polarità: nuove topologie e potenzialità***

#### **INTRODUZIONE**

Subito dopo la loro scoperta, le strutture G-quadruplex sono state sottoposte a numerose modifiche chimiche e a coniugazione con l'obiettivo di promuovere, stabilizzare e studiare una particolare conformazione, migliorare le loro proprietà ed incoraggiare la formazione di strutture di ordine superiore. La maggior parte delle modifiche chimiche proposte ha riguardato la sostituzione di una o più basi naturali con basi analoghe mentre un minor numero di modifiche riguardanti lo scheletro zucchero-fosfato è comparso in letteratura, probabilmente a causa del loro più alto impatto sulle conformazioni adottate dalle strutture G-quadruplex [1]. Tra le modifiche riguardanti lo scheletro zucchero-fosfato, l'introduzione dei siti ad inversione di polarità (IPS) 3'-3' e/o 5'-5' rappresenta una modifica che comporta un minor cambiamento strutturale dal momento che coinvolge solo deossiribonucleotidi naturali. Numerosi studi hanno mostrato che la presenza di siti ad inversione di polarità 5'-5' nelle strutture G-quadruplex tetramolecolari è capace di influenzare il legame glicosidico di nucleosidi adiacenti [2-4]. Per quanto riguarda gli aptameri, gli effetti degli IPS sulla sequenza del TBA sono stati sistematicamente studiati sostituendo, uno alla volta, ciascun legame fosfodiesterico canonico con un IPS [5]. L'introduzione degli IPS nel TBA è stata anche utilizzata sintetizzando analoghi caratterizzati da uno o due ulteriori residui connessi alle estremità dell'oligonucleotide attraverso IPS 3'-3' o sia 3'-3' che 5'-5' in modo da preservare la sequenza biologicamente attiva dell'aptamero di partenza [6,7]. Alcuni di questi analoghi hanno mostrato maggiore stabilità strutturale, maggiore affinità per la trombina e una migliore resistenza alle nucleasi rispetto al TBA. In un recente lavoro, due analoghi eterochirali del TBA contenenti IPS sia 3'-3' e/o 5'-5' che



adottano strutture G-quadruplex sinistrorse, hanno mostrato un'interessante attività antiproliferativa [8]. Pertanto, mentre finora l'introduzione degli IPS nelle G-quadruplex è stata usata per migliorare le proprietà di alcuni aptameri, la capacità degli IPS di invertire la direzionalità dei filamenti dando luogo a topologie G-quadruplex non permesse dai legami fosfodiesterici canonici 3'-5' non è stata adeguatamente esplorata e sfruttata.

È ben noto che nelle strutture G-quadruplex, l'arrangiamento parallelo dei filamenti è generalmente considerato la disposizione che dà luogo alle conformazioni più stabili. Infatti, corte sequenze quali TG<sub>3</sub>T [9] e TG<sub>4</sub>T [10] hanno la tendenza ad assemblarsi in complessi paralleli tetramolecolari mentre l'aptamero anti HIV-integrasi contenente quattro tratti di G (GGGT)<sub>4</sub> adotta una struttura G-quadruplex parallela monomolecolare caratterizzata da una stabilità termica notevolmente alta [11].

Pertanto, al fine di estendere la variabilità strutturale e il repertorio topologico delle strutture G-quadruplex sfruttando la presenza degli IPS, il gruppo di ricerca presso il quale ho svolto l'attività di dottorato ha progettato e sintetizzato 3 sequenze oligonucleotidiche, ciascuna contenente tre IPS e quattro tratti di G con un numero variabile di residui ovvero due, tre e quattro (Tabella 1). Tra le due alternative ossia un 3'-3' e due 5'-5' o un 5'-5' e due 3'-3' siti ad inversione di polarità, è stata scelta la prima al fine di dotare la molecola di due *linker* più lunghi che connettono i tratti di G e facilitare, pertanto, l'associazione dei filamenti. È stato dimostrato che tutti gli ODN modificati adottano conformazioni G-quadruplex. Queste strutture sono state studiate mediante tecniche NMR, CD ed elettroforetiche. Considerando le proprietà antiproliferative mostrate da altre strutture G-quadruplex contenenti IPS [8], questi oligonucleotidi sono stati sottoposti al saggio per l'attività antiproliferativa ed è stata valutata la loro resistenza in ambiente biologico. Inoltre, nella maggior parte degli esperimenti, il comportamento di **mTG<sub>2</sub>T**, **mTG<sub>3</sub>T** e **mTG<sub>4</sub>T**

è stato comparato con quello delle loro controparti naturali, rispettivamente  $(TG_2T)_4$ ,  $(TG_3T)_4$   $(TG_4T)_4$ .

Tabella 1. Nomi e sequenze degli oligonucleotidi studiati

Name	Sequence
<b>mTG<sub>2</sub>T</b>	3'-(T <sub>4</sub> G <sub>3</sub> G <sub>2</sub> T <sub>1</sub> ) <sub>A</sub> -5'-5'-(T <sub>1</sub> G <sub>2</sub> G <sub>3</sub> T <sub>4</sub> ) <sub>B</sub> -3'-3'-(T <sub>4</sub> G <sub>3</sub> G <sub>2</sub> T <sub>1</sub> ) <sub>C</sub> -5'-5'-(T <sub>1</sub> G <sub>2</sub> G <sub>3</sub> T <sub>4</sub> ) <sub>D</sub> -3'
<b>mTG<sub>3</sub>T</b>	3'-(T <sub>5</sub> G <sub>4</sub> G <sub>3</sub> G <sub>2</sub> T <sub>1</sub> ) <sub>A</sub> -5'-5'-(T <sub>1</sub> G <sub>2</sub> G <sub>3</sub> G <sub>4</sub> T <sub>5</sub> ) <sub>B</sub> -3'-3'-(T <sub>5</sub> G <sub>4</sub> G <sub>3</sub> G <sub>2</sub> T <sub>1</sub> ) <sub>C</sub> -5'-5'-(T <sub>1</sub> G <sub>2</sub> G <sub>3</sub> G <sub>4</sub> T <sub>5</sub> ) <sub>D</sub> -3'
<b>mTG<sub>4</sub>T</b>	3'-(T <sub>6</sub> G <sub>5</sub> G <sub>4</sub> G <sub>3</sub> G <sub>2</sub> T <sub>1</sub> ) <sub>A</sub> -5'-5'-(T <sub>1</sub> G <sub>2</sub> G <sub>3</sub> G <sub>4</sub> G <sub>5</sub> T <sub>6</sub> ) <sub>B</sub> -3'-3'-(T <sub>6</sub> G <sub>5</sub> G <sub>4</sub> G <sub>3</sub> G <sub>2</sub> T <sub>1</sub> ) <sub>C</sub> -5'-5'-(T <sub>1</sub> G <sub>2</sub> G <sub>3</sub> G <sub>4</sub> G <sub>5</sub> T <sub>6</sub> ) <sub>D</sub> -3'
<b>(TG<sub>2</sub>T)<sub>4</sub></b>	5'-TGGTTGGTTGGTTGGT-3'
<b>(TG<sub>3</sub>T)<sub>4</sub></b>	5'-TGGGTTGGGTTGGGTTGGGT-3'
<b>(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub></b>	5'-TGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGT-3'

### 5.3.1 SEZIONE SPERIMENTALE

#### *Sintesi e purificazione degli oligonucleotidi*

Gli oligonucleotidi riportati in Tabella 1 sono stati sintetizzati mediante un sintetizzatore Millipore Cyclone Plus DNA sfruttando la chimica in fase solida dei β-cianoetilfosforamiditi su scala 15 μmol. Per gli oligonucleotidi con siti ad inversione di polarità, la sintesi dei tratti 3'-5' è stata eseguita utilizzando normali 3'-fosforamiditi mentre i tratti 5'-3' sono stati sintetizzati utilizzando i 5'-fosforamiditi. Per tutti gli oligonucleotidi è stato usato un supporto universale. Gli oligomeri sono stati rimossi dal supporto solido e deprotetti mediante trattamento con una soluzione acquosa di ammoniaca concentrata a 80 °C per 12h. La miscela è stata quindi filtrata, lavata e successivamente concentrata a pressione ridotta. In seguito è stata ridisciolta in H<sub>2</sub>O, analizzata e purificata mediante cromatografia liquida ad elevata prestazione su una colonna Nucleogel SAX (Macherey–Nagel, 1000-8/46) con gli eluenti: tampone A: 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in soluzione acquosa a pH7.0 contenente 20% (v/v) CH<sub>3</sub>CN e tampone B: 1 M NaCl, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in

soluzione acquosa a pH7.0 contenente 20% (v/v) CH<sub>3</sub>CN. Per l'eluizione del campione è stato usato un gradiente lineare 0% B→100%B in 45 min ad un flusso di 1.0 ml/min. Le frazioni degli oligomeri sono state raccolte e successivamente desalificate su colonne Sep-Pak (C18). Gli oligomeri isolati sono risultati puri all'NMR più del 98%.

### ***Risonanza Magnetica Nucleare***

I campioni NMR sono stati preparati ad una concentrazione di circa 1.2 mM in 0.6 ml (H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1 v/v) di una soluzione tampone 10 mM di KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> o NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 70 mM di KCl o NaCl e 0.2 mM di EDTA (pH 7.0). I campioni purificati mediante HPLC sono stati poi desalificati, addizionati al tampone avente adatta concentrazione salina, riscaldati per 5-10 min a 90 °C e lentamente raffreddati (10-12 ore) a temperatura ambiente. Le soluzioni sono state equilibrate per almeno un giorno a 4°C. Il processo di strutturazione è stato ritenuto completo quando gli spettri H<sup>1</sup> NMR risultavano sovrapponibili al variare del tempo. Gli spettri NMR sono stati registrati su uno spettrometro Varian Unity INOVA 500 MHz. Gli spettri protonici monodimensionali dei campioni in H<sub>2</sub>O sono stati registrati usando la sequenza di gradienti DPGSE per la soppressione del segnale dell'acqua [12]. I segnali relativi ai protoni del sodio 2,2-dimetil-2-silapentan-5-solfonato (DSS) sono stati usati come riferimento per i *chemical shift* dei protoni (<sup>1</sup>H). Per gli esperimenti in H<sub>2</sub>O NOESY [13] (con *mixing times* di 180 e 80 ms) e TOCSY [14] (con *mixing time* di 120 ms) è stata usata la sequenza di gradienti DPGSE. Tutti gli esperimenti sono stati registrati usando la procedura STATES-TPPI per la *quadrature detection* [15]. In tutti gli esperimenti 2D, i dati nel dominio del tempo consistono di 2048 punti complessi in t<sub>2</sub> e 400–512 *fids* nella dimensione t<sub>1</sub>. Il tempo di rilassamento è stato settato a 1.2 s per tutti gli esperimenti.

### ***Spettroscopia CD***

I campioni CD degli oligonucleotidi modificati sono stati preparati ad una concentrazione di oligonucleotide 50  $\mu\text{M}$  utilizzando un tampone fosfato di potassio (10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 70 mM KCl, pH 7.0) o tampone fosfato di sodio (10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 70 mM NaCl, pH 7.0) e sottoposti alla procedura di *annealing* riscaldando a 90°C e facendo raffreddare lentamente a temperatura ambiente. Gli spettri CD di tutte le quadruplex e i profili CD di riscaldamento-raffreddamento sono stati registrati su uno spettrofotometro Jasco 715 CD. Per tutti gli spettri CD, la lunghezza d'onda è stata variata da 220 nm a 320 nm alla velocità di scansione di 100 nm  $\text{min}^{-1}$ . Gli spettri sono stati registrati con una risposta di 0.5 s, un'ampiezza di banda di 1.0 nm e normalizzati mediante sottrazione dello spettro del tampone. La temperatura è stata mantenuta costante a 5 °C con una cella programmabile termoelettricamente controllata (JASCO PTC-348). Per tutte le G-quadruplex, i profili CD di riscaldamento-raffreddamento sono stati registrati in funzione della temperatura (5-95 °C) alle lunghezze d'onda corrispondenti al loro massimo effetto Cotton. I dati CD sono stati registrati utilizzando una cuvetta con un cammino ottico di 0,1 cm e con una velocità di scansione di 30°C/h o 10°C/h.

### ***Elettroforesi su gel di poliacrilammide***

Tutti gli oligonucleotidi sono stati analizzati mediante PAGE non denaturante. I campioni nel tampone NMR (10 mM di  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 70 mM di KCl e 0.2 mM di EDTA, pH 7.0) sono stati caricati su un gel di poliacrilammide al 20% contenente Tris-Borato-EDTA (TBE) 2.5 $\times$  e KCl 50 mM. Il tampone di corsa utilizzato è stato TBE 1x contenente 100 mM KCl. Per tutti i campioni, appena prima di caricare è stata aggiunta una soluzione di glicerolo/TBE1x con 100 mM KCl 2:1. L'elettroforesi è

stata eseguita a  $8 \text{ V cm}^{-1}$  ad una temperatura prossima a  $10^\circ\text{C}$ . Le bande sono state visualizzate mediante *UV shadowing*.

### ***Colture cellulari e trattamenti con gli oligonucleotidi***

Le cellule Calu-6 costituite da cellule tumorali polmonari umane p53 mutate (ATCC® HTB-56™) [16], le cellule HCT-116<sup>p53-/-</sup> rappresentate da cellule tumorali colon-rettali [17] e le cellule MRC-5 (ATCC® CCL-171) sono state coltivate in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), integrate con siero fetale bovino (FBS) al 10% (Euroclone S.p.A), L-glutamina 2 mM e penicillina-streptomocina 50 U/ml sotto atmosfera umidificata con il 5% di anidride carbonica a  $37^\circ\text{C}$  [17]. I trattamenti delle cellule sono stati eseguiti sostituendo il mezzo di coltura con quelli contenenti i differenti oligonucleotidi alla concentrazione finale di  $10 \mu\text{M}$  e  $50 \mu\text{M}$  per pozzetto, dalle 24 alle 72 ore [18].

### ***Il saggio MTT***

Le cellule Calu-6 [19], HCT-116<sup>p53-/-</sup> e MRC-5 sono state seminate su piastre a 96 pozzetti alla densità di  $2 \times 10^4$  cellule/pozzetto e trattate con i differenti oligonucleotidi alla concentrazione finale di  $10 \mu\text{M}$  e  $50 \mu\text{M}$  dalle 24 alle 72 ore. Successivamente, la vitalità cellulare è stata determinata utilizzando il saggio MTT come precedentemente riportato [20]. È stato eseguito un insieme di tre diversi set di esperimenti, ciascuno ripetuto in triplice copia. Le barre di errore rappresentano la media  $\pm$  SEM da  $n = 3$  repliche biologiche. I confronti statistici sono stati effettuati come mostrato in precedenza [21].

### ***Saggio di stabilità alle nucleasi***

Il saggio di stabilità alle nucleasi degli oligonucleotidi modificati è stato condotto in siero fetale bovino (FBS) sia al 10% che al 50% a  $37^\circ\text{C}$ . Il FBS è stato diluito con

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). Circa 14 nmol di stock soluzione di ciascun oligonucleotide (~ 2 O.D.U.) sono stati seccati a pressione ridotta e successivamente incubati con 500 µl di FBS al 10% a 37 °C. A 0, 24, 48 e 72 ore, 125 µl dei campioni sono stati raccolti e conservati a -20 °C per almeno 20 minuti. I campioni sono stati seccati e successivamente sono stati aggiunti 10 µl di tampone di caricamento del gel e 10 µl di acqua sterile. 10 µl di tale miscela sono stati usati per l'elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE) che è stata eseguita a temperatura ambiente utilizzando un gel di poliacrilammide al 20% in un tampone TBE 1 X (Tris-Borato-EDTA). I *pattern* di degradazione sul gel sono stati visualizzati mediante *UV shadowing*.

## ***RISULTATI E DISCUSSIONE***

### ***Risonanza magnetica nucleare***

Per valutare la capacità degli oligonucleotidi elencati in Tabella 1 di formare strutture G-quadruplex e, in tal caso, di stabilire la loro natura, sono stati usati principalmente esperimenti NMR. I campioni, purificati mediante HPLC, desalificati, seccati e ridisciolti nell'adatto tampone, sono stati riscaldati per 5-10 min a 90 °C e lentamente raffreddati (10-12 h) a temperatura ambiente. Le soluzioni sono state equilibrate almeno per un giorno a 4 °C e successivamente sono stati registrati i loro spettri <sup>1</sup>H NMR. Il completamento del processo di strutturazione è stato garantito dall'acquisizione di spettri <sup>1</sup>H NMR sovrapponibili al variare del tempo. Una delle caratteristiche distintive delle strutture contenenti tetrad di G è la presenza di risonanze dei protoni immidici nella regione tra 10.5 e 12 ppm [22]. L'analisi di questa regione è generalmente usata per stabilire se la sequenza adotta un'unica struttura. L'aspetto semplice degli spettri 1D di **mTG<sub>3</sub>T** e **mTG<sub>4</sub>T** in tampone

potassio (Figure 1 e 2) indica che, nelle condizioni utilizzate, entrambi gli oligomeri formano principalmente una singola conformazione con legami H ben definita, compatibile con strutture G-quadruplex contenenti molto probabilmente 4 o 3 tetradi di G, rispettivamente. Infatti, lo spettro  $^1\text{H}$  NMR sia di **mTG<sub>3</sub>T** che di **mTG<sub>4</sub>T** (500 MHz, T = 25°C) ha mostrato la presenza, rispettivamente, di 12 e 16 segnali parzialmente sovrapposti nella regione tra 10.5-12.0 ppm attribuibili ai protoni immidici coinvolti nei legami H di tipo Hoogsteen dei quartetti di G e di circa 20 e 24 singoletti appartenenti ai protoni H8 delle guanine e ai protoni H6 delle timine, nella regione aromatica. Inoltre, per entrambi i campioni, tra 1.3 e 2.0 ppm, sono stati osservati approssimativamente 8 segnali dei metili per gli 8 T-CH<sub>3</sub> (Figura 2). Al contrario, lo spettro di **mTG<sub>2</sub>T** in tampone potassio, alla stessa temperatura, si è rivelato più complicato di quelli precedenti. Infatti, in questo caso, la regione dei protoni immidici è abbastanza affollata e il numero di segnali suggerisce la presenza in soluzione di più di una struttura.

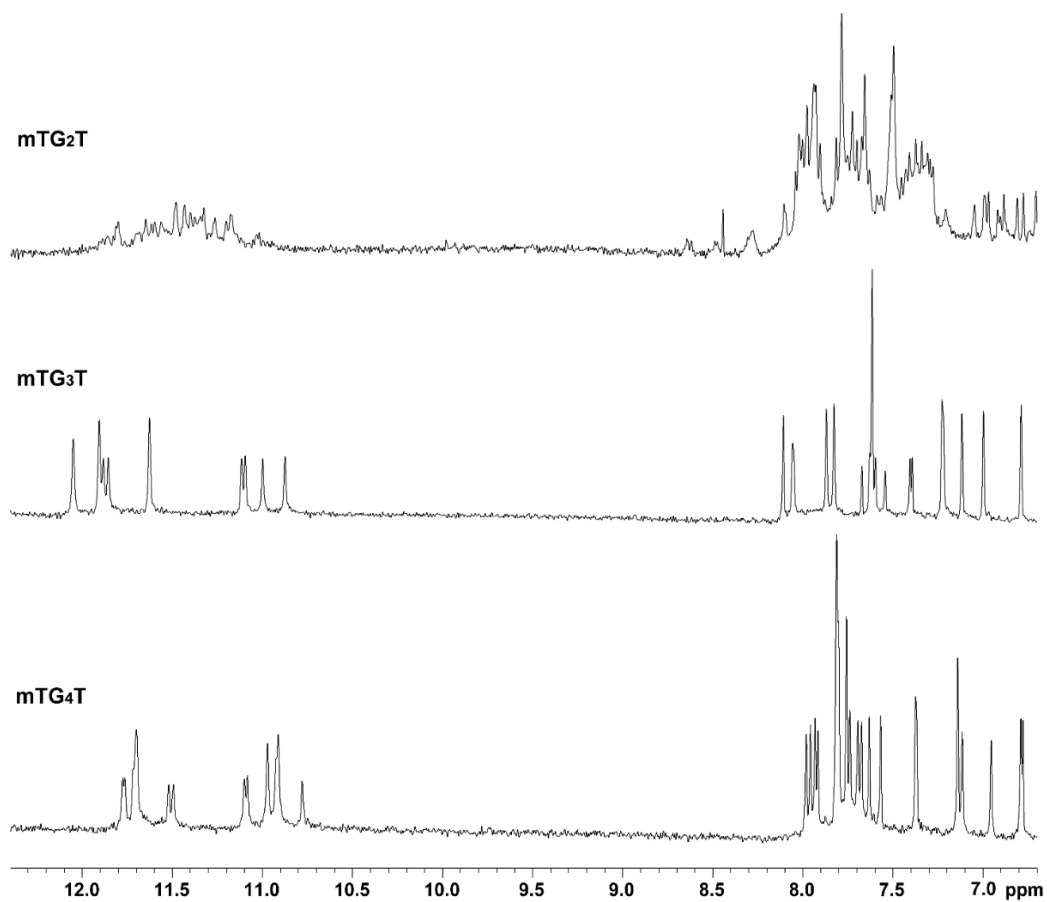


Figura 1. Regioni aromatiche e dei protoni immidici degli spettri  $^1\text{H}$ NMR (500 MHz) di **mTG<sub>2</sub>T**, **mTG<sub>3</sub>T** e **mTG<sub>4</sub>T** (Tabella 1) in 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 70 mM KCl e 0.2 mM EDT (pH 7.0), 25°C.



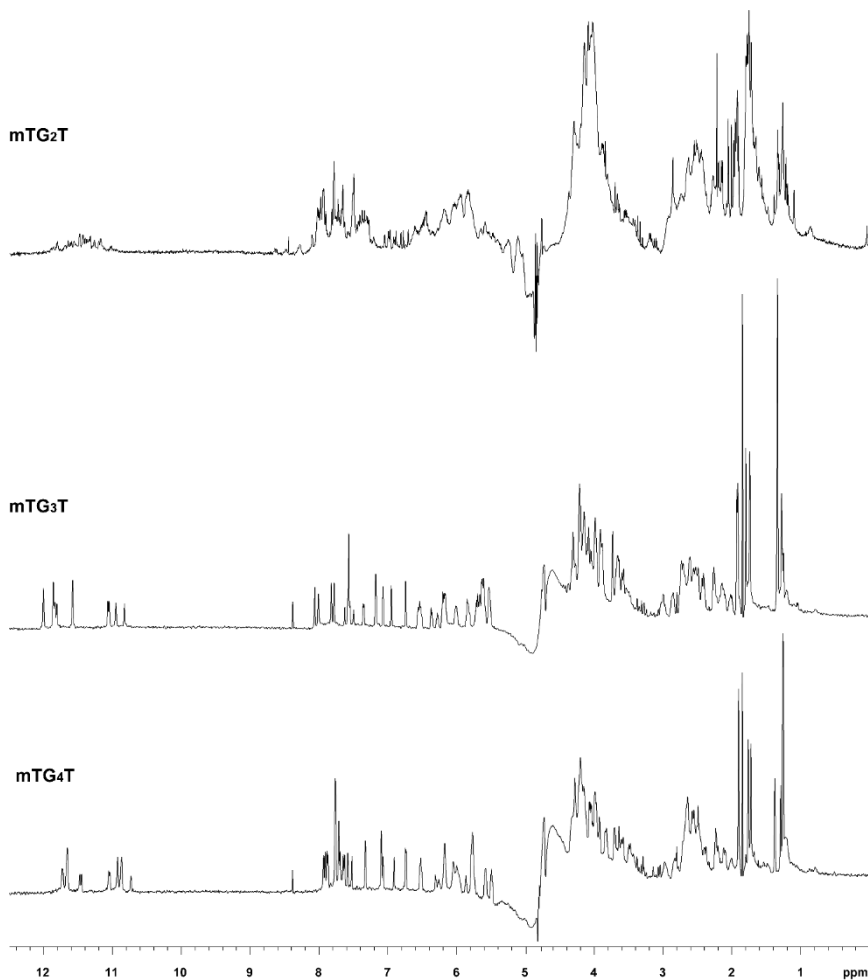


Figura 2. Spettri  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) di **mTG<sub>2</sub>T**, **mTG<sub>3</sub>T** e **mTG<sub>4</sub>T** (Tabella 1) in 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 70 mM KCl e 0.2 mM EDTA (pH 7.0), 25°C.

Con l'obiettivo di studiare le principali caratteristiche strutturali delle conformazioni G-quadruplex adottate da **mTG<sub>3</sub>T** e **mTG<sub>4</sub>T**, sono stati eseguiti esperimenti NOESY (Figure 3 e 4) e TOCSY (dati non mostrati) a 25 °C. La maggior parte dei protoni non scambiabili è stata quasi completamente assegnata seguendo le procedure standard [23] (Tabella 2). Come riportato per altre strutture G-quadruplex parallele [24,25], i segnali NOE osservati tra i protoni H8 delle guanine e i protoni H6 delle timine e i loro protoni H1', H2' e H2'' e i protoni H1', H2' e H2'' dal lato 5' suggeriscono che entrambe le strutture G-quadruplex assumono un

avvolgimento ad elica sinistrorsa. Tuttavia, rispetto ad altre G-quadruplex parallele si rilevano significative differenze [26]: (i) i protoni H8 delle guanosine in seconda posizione esibiscono un inusuale spostamento dei *chemical shift* a campi più alti se confrontati con i corrispondenti protoni degli altri residui, che mostrano i valori tipici delle strutture G-quadruplex [27,28]; (ii) tutti i residui in posizione G2 adottano angoli glicosidici *syn*, come suggerito dalla comparazione tra gli intensi segnali NOE intraresiduo H8 e H1' e i deboli NOE intraresiduo H8 e H2' o H2'', mentre la presenza di NOE molto deboli tra G H8/T H6 e H1' e di forti NOE tra GH8/TH6 e H2' e H2'' ha indicato che tutti gli altri residui assumono una conformazione glicosidica *anti* [27-29]; (iii) coerentemente con i tratti T(anti)-G(*syn*) osservati per altre strutture G-quadruplex, il *pattern* di connettività tra i residui T1 e G2 sono interrotti [27]. Inoltre, i NOE intrafilamento tra il gruppo metilico e i protoni H6 delle basi T e il protone H8 dei residui in G2 sullo stesso filamento ci hanno permesso di assegnare i residui T1 suggerendo che i residui T all'estremità 5' non sono orientati casualmente ma sovrapposti al piano delle tetradi di G.

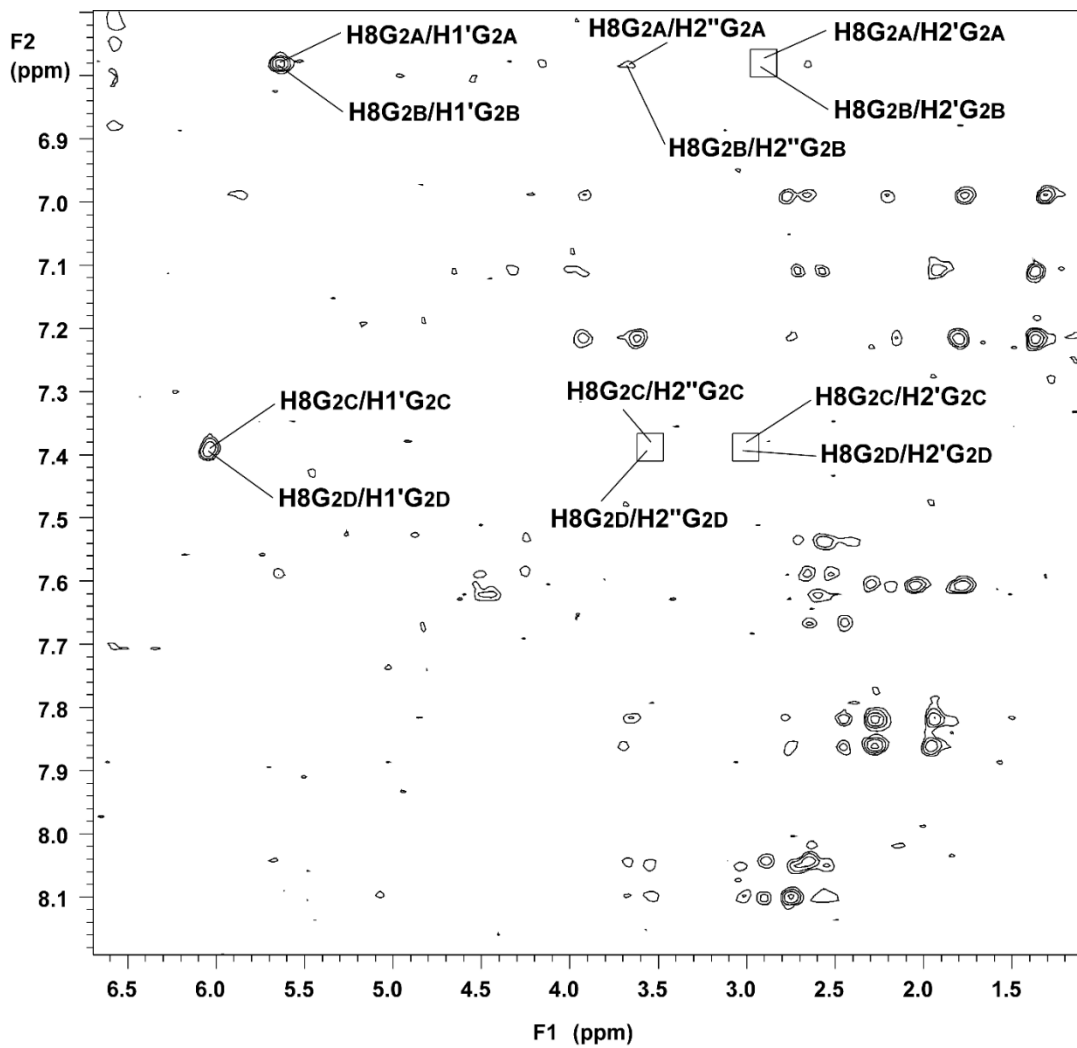


Figura 3. Regione espansa dello spettro 2D NOESY di  $mTG_3T$  (500 MHz; 25 °C; concentrazione 1.2 mM; 10 mM  $KH_2PO_4/K_2HPO_4$ , 70 mM KCl e 0.2 mM EDTA, pH 7.0 in  $H_2O/D_2O$  9: 1; volume totale 0.6 ml; *mixing time* 180 ms) che correlano i protoni delle basi aromatiche e i protoni degli zuccheri. I *cross-peak* che correlano H8G2 e H1', H2', H2'' sono stati evidenziati.

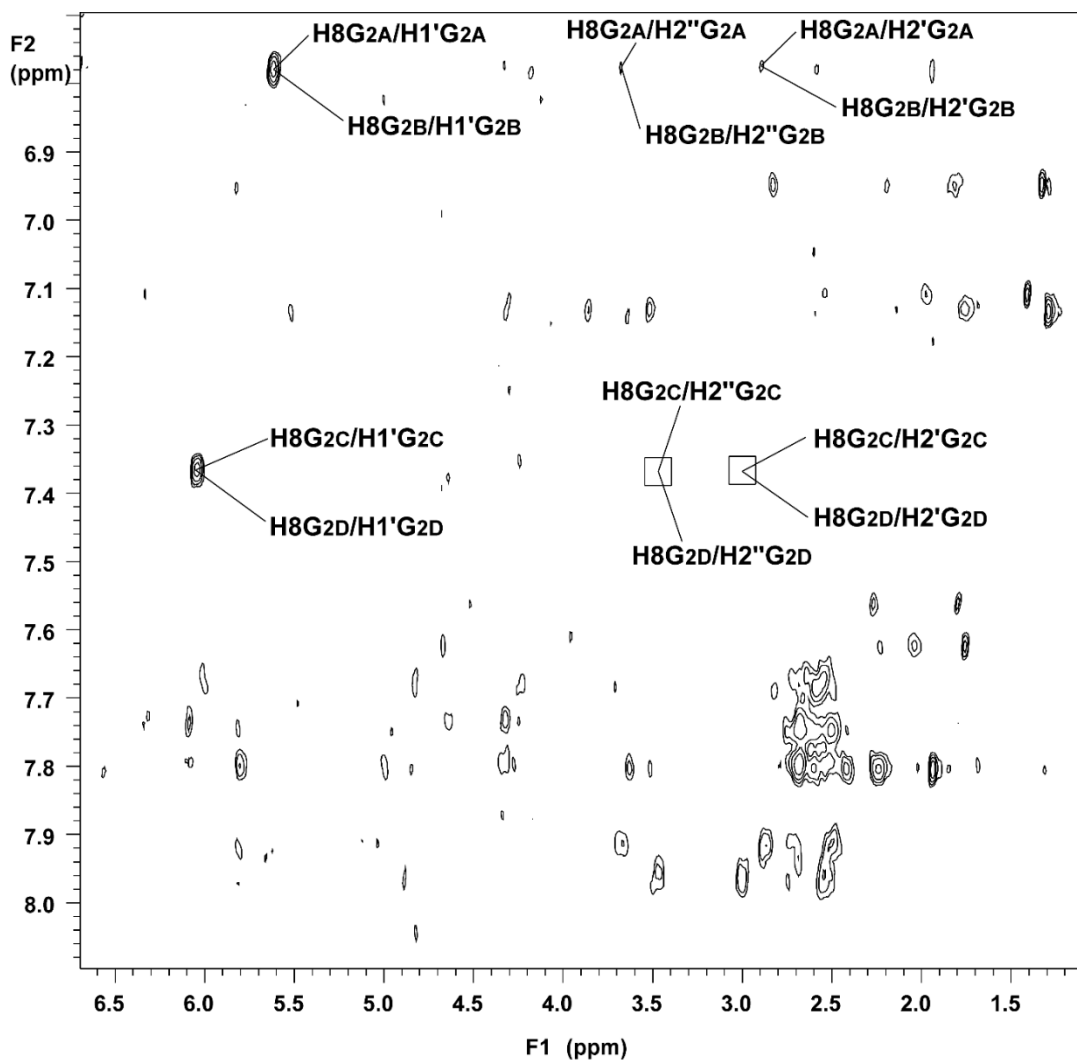


Figura 4. Regione espansa dello spettro 2D NOESY di **mTG<sub>4</sub>T** (500 MHz; 25 °C; concentrazione 1.2 mM; 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 70 mM KCl e 0.2 mM EDTA, pH 7.0 in H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9: 1; volume totale 0.6 ml; *mixing time* 180 ms) che correlano i protoni delle basi aromatiche e i protoni degli zuccheri. I *cross-peak* che correlano H8G2 e H1', H2', H2'' sono stati evidenziati.

<b>mTG<sub>3</sub>T</b>	<b>3'-TGGGT-5'-5'-TGGGT-3'-3'-TGGGT-5'-5'-TGGGT-3'</b>						
	H8/H6	H1'	H2'/H2''	H3'	H4'	H5'/H5''	CH <sub>3</sub>
T <sub>1α</sub>	7.82	6.58	2.28/2.47	4.88	4.35	3.95	1.95
<u>G</u> <sub>2α</sub>	6.78	5.64	2.89/3.71	4.81	4.25	4.17/4.04	-
G <sub>3α</sub>	8.05	5.76	2.65	5.04	4.42	N.D.	-
G <sub>4α</sub>	7.67	6.33	2.44/2.57	4.92	4.48	3.40	-
T <sub>5α</sub>	7.22	5.57	1.80/2.16	4.52	N.D.	3.76/3.70	1.37
T <sub>1β</sub>	7.87	6.60	2.28/2.46	4.90	N.D.	3.92/3.70	1.96
<u>G</u> <sub>2β</sub>	6.79	5.65	2.89/3.71	4.81	4.25	4.17/4.04	-
G <sub>3β</sub>	8.10	5.70	2.76	5.06	4.41	N.D.	-
G <sub>4β</sub>	7.61	6.41	2.54/2.64	5.04	4.31	4.24	-
T <sub>5β</sub>	6.99	5.87	1.77/2.20	4.64	4.36	4.20/3.91	1.31
T <sub>1γ</sub>	7.61	6.24	2.30	4.55	N.D.	4.12	1.83
<u>G</u> <sub>2γ</sub>	7.39	6.04	3.04/3.54	4.94	4.19	N.D.	-
G <sub>3γ</sub>	8.11	5.69	2.55/2.72	5.05	4.25	N.D.	-
G <sub>4γ</sub>	7.55	5.73	2.58/2.72	5.06	4.45	4.10	-
T <sub>5γ</sub>	7.12	5.89	1.93/2.05	4.34	N.D.	3.96	1.38
T <sub>1δ</sub>	7.61	6.24	2.05/2.18	4.82	N.D.	N.D.	1.78
<u>G</u> <sub>2δ</sub>	7.40	6.05	3.03/3.54	4.94	4.19	N.D.	-
G <sub>3δ</sub>	8.06	5.69	2.55/2.72	5.05	4.42	N.D.	-
G <sub>4δ</sub>	7.61	6.22	2.63/2.74	5.04	N.D.	4.18	-
T <sub>5δ</sub>	7.22	5.57	1.81/2.16	4.78	N.D.	3.93/3.62	1.39

<b>mTG<sub>4</sub>T</b>	3'-TGGGGT-5'-5'-TGGGGT-3'-3'-TGGGGT-5'-5'-TGGGGT-3'						
	H8/H6	H1'	H2'/H2''	H3'	H4'	H5'/H5''	CH <sub>3</sub>
T <sub>1α</sub>	7.81	6.57	2.28/2.45	4.83	4.31	3.88/3.53	1.95
<u>G<sub>2α</sub></u>	6.78	5.63	2.89/3.69	4.78	N.D.	4.27/4.19	-
G <sub>3α</sub>	7.91	5.82	2.51/2.73	5.04	4.26	N.D.	-
G <sub>4α</sub>	7.73	6.31	2.50/2.58	4.97	4.27	N.D.	-
G <sub>5α</sub>	7.69	6.21	2.55/2.80	4.82	4.23	3.87/3.71	-
T <sub>6α</sub>	6.96	5.82	1.82/2.18	4.65	N.D.	3.96	1.33
T <sub>1β</sub>	7.81	6.57	2.28/2.45	4.83	4.31	3.88/3.53	1.95
<u>G<sub>2β</sub></u>	6.78	5.63	2.89/3.69	4.78	N.D.	4.27/4.19	-
G <sub>3β</sub>	7.91	5.82	2.51/2.73	5.04	4.26	N.D.	-
G <sub>4β</sub>	7.74	6.34	2.50/2.61	5.02	N.D.	N.D.	-
G <sub>5β</sub>	7.80	6.02	2.60	4.52	4.25	N.D.	-
T <sub>6β</sub>	7.14	5.55	1.78/2.14	4.48	N.D.	3.75/3.63	1.30
T <sub>1γ</sub>	7.57	6.21	2.28	4.53	N.D.	N.D.	1.80
<u>G<sub>2γ</sub></u>	7.36	6.05	3.00/3.48	4.88	4.24	N.D.	-
G <sub>3γ</sub>	7.97	5.81	2.54/2.74	5.04	4.24	N.D.	-
G <sub>4γ</sub>	7.75	6.09	2.70	5.00	4.31	3.87/3.53	-
G <sub>5γ</sub>	7.80	6.20	2.54	4.83	N.D.	N.D.	-
T <sub>6γ</sub>	7.12	5.91	1.97/2.05	N.D.	4.33	3.95	1.41
T <sub>1δ</sub>	7.62	6.23	2.03/2.23	4.81	4.38	N.D.	1.76
<u>G<sub>2δ</sub></u>	7.36	6.05	3.00/3.48	4.88	4.24	N.D.	-
G <sub>3δ</sub>	7.97	5.81	2.54/2.74	5.04	4.24	N.D.	-
G <sub>4δ</sub>	7.80	6.09	2.69	5.00	N.D.	N.D.	-
G <sub>5δ</sub>	7.67	6.01	2.65	4.98	4.30	N.D.	-
T <sub>6δ</sub>	7.14	5.55	1.78/2.14	4.48	N.D.	N.D.	1.30

Tabella 2. Assegnazione dei *chemical shift* protonici per le G-quadruplex formate dagli oligonucleotidi **mTG<sub>3</sub>T** e **mTG<sub>4</sub>T** (500 MHz, T = 25°C) in 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 70 mM KCl e 0.2 mM EDTA (pH 7.0). N.D. = non determinato. I residui che adottano conformazioni glicosidiche *syn* sono sottolineati. Dovrebbe essere notato che, a causa delle analogie tra i filamenti e le interruzioni di connettività ai siti di inversione di polarità, non è stato possibile assegnare i *chemical shift* di un particolare filamento al tratto 5'-TG<sub>3</sub>T-3' o 5'-TG<sub>4</sub>T-3' corrispondente.

Considerando la relazione tra orientamento relativo di un filamento e conformazione glicosidica delle guanosine nelle strutture G-quadruplex [30,31] e considerando i dati CD ed elettroforetici che suggeriscono una struttura monomolecolare (vedi sotto), i dati NMR raccolti sarebbero incompatibili con arrangiamenti dei filamenti differenti da quello parallelo (Figura 5). Per tali ragioni, abbiamo proposto, per **mTG<sub>3</sub>T** e **mTG<sub>4</sub>T**, l'adozione di strutture G-quadruplex parallele caratterizzate, rispettivamente, da una tetrate di G *all-syn* e tre o due tetradi *all-anti* e con due *loop* laterali T-5'-5'-T e uno T-3'-3'-T (Figura 6).

La capacità di **mTG<sub>2</sub>T**, **mTG<sub>3</sub>T** e **mTG<sub>4</sub>T** di formare strutture G-quadruplex è stata esaminata anche in tampone sodio. La presenza di segnali dei protoni immidici nella regione tra 10.5 e 12 ppm dello spettro <sup>1</sup>H NMR di **mTG<sub>4</sub>T** (Figura 7) ha rivelato che, anche in queste condizioni, questo oligonucleotide è stato capace di formare strutture G-quadruplex. Sebbene la presenza di una conformazione prevalente non possa essere esclusa, una sostanziale sovrapposizione dei picchi ha impedito di eseguire analisi NMR più dettagliate. Contrariamente a **mTG<sub>4</sub>T**, lo spettro <sup>1</sup>H NMR di **mTG<sub>3</sub>T**, nelle stesse condizioni (Figura 7), ha manifestato chiaramente la presenza di soli dodici segnali parzialmente sovrapposti nella regione 10.5-12.0, suggerendo chiaramente, la presenza di una conformazione G-quadruplex prevalente. Gli esperimenti NOESY (Figura 8) e TOCSY (dati non mostrati) ci hanno consentito, seguendo le procedure standard, di assegnare la maggior parte dei protoni non scambiabili (Tabella 3). Nel caso di **mTG<sub>3</sub>T** i dati NMR raccolti in tampone sodio sono molto simili a quelli precedentemente descritti in tampone potassio indicando con un certo grado di affidabilità una stretta somiglianza tra le strutture G-quadruplex adottate in presenza dei due cationi. Per quanto concerne **mTG<sub>2</sub>T**, il suo spettro <sup>1</sup>H NMR ha palesato solo un picco molto basso e largo nella regione 10.5-12 e una regione aromatica abbastanza affollata indicando, pertanto,

la presenza di più di una specie e una significativa quantità di singolo filamento non strutturato (*random coil*).

I dati NMR raccolti per **mTG<sub>2</sub>T**, **mTG<sub>3</sub>T** e **mTG<sub>4</sub>T** sono stati confrontati con quelli delle loro versioni naturali, ossia **(TG<sub>2</sub>T)<sub>4</sub>**, **(TG<sub>3</sub>T)<sub>4</sub>** e **(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub>** rispettivamente, sia in tampone potassio (Figura 9) che in tampone sodio (Figura 10). Contrariamente a **mTG<sub>2</sub>T**, lo spettro <sup>1</sup>H NMR di **(TG<sub>2</sub>T)<sub>4</sub>** in tampone potassio non mostra segnali relativi ai protoni immidici nella regione 10.5-12.0 ppm, diagnostica per le strutture G-quadruplex. Lo spettro <sup>1</sup>H NMR di **(TG<sub>3</sub>T)<sub>4</sub>** nelle medesime condizioni ha esibito segnali relativi ai protoni immidici influenzati da un'intensa sovrapposizione mentre la regione dei protoni aromatici è apparsa abbastanza affollata, impedendo, pertanto, di studiare ulteriormente questo oligonucleotide. Analogamente, sebbene la presenza di segnali nella regione dei protoni immidici dello spettro <sup>1</sup>H NMR di **(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub>** suggerirebbe, anche in questo caso, la presenza di strutture G-quadruplex, una scarsa dispersione dei segnali e un considerevole affollamento nella regione aromatica hanno scoraggiato ulteriori studi su questo oligonucleotide. Riguardo al comportamento di **(TG<sub>2</sub>T)<sub>4</sub>**, **(TG<sub>3</sub>T)<sub>4</sub>** e **(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub>** in tampone sodio, i dati <sup>1</sup>H NMR (Figura 10) rivelano chiaramente che nessuno di essi è capace di formare significative quantità di strutture G-quadruplex per cui è ragionevole supporre la sola presenza di singoli filamenti non strutturati (*random coil*).

Un semplice confronto tra i dati NMR di **mTG<sub>3</sub>T** e **mTG<sub>4</sub>T**, da un lato, e **(TG<sub>3</sub>T)<sub>4</sub>** e **(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub>** dall'altro, indica distintamente che la presenza di siti ad inversione di polarità, nella maggior parte delle condizioni usate, promuove la formazione di stabili e singole strutture G-quadruplex caratterizzate da segnali ben dispersi.



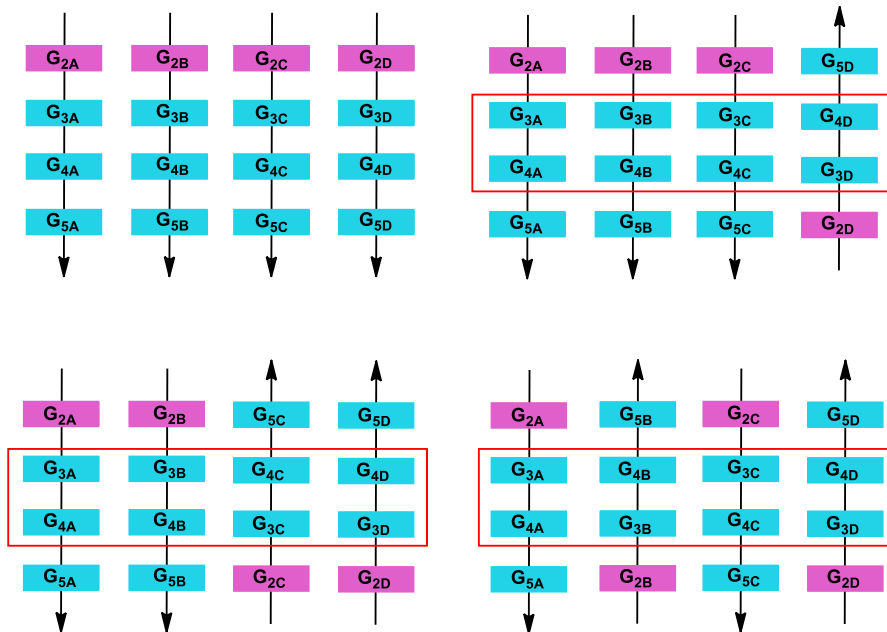


Figura 5. Possibili disposizioni dei filamenti per **mTG<sub>4</sub>T**. Le guanosine nelle conformazioni glicosidiche *syn* e *anti* sono in viola e azzurro, rispettivamente. Le timine e i *loop* che connettono i filamenti sono stati omessi per chiarezza. Le cornici rosse indicano le tetradi di G *all-anti* che sono incompatibili col tipo di disposizione relativa dei filamenti.

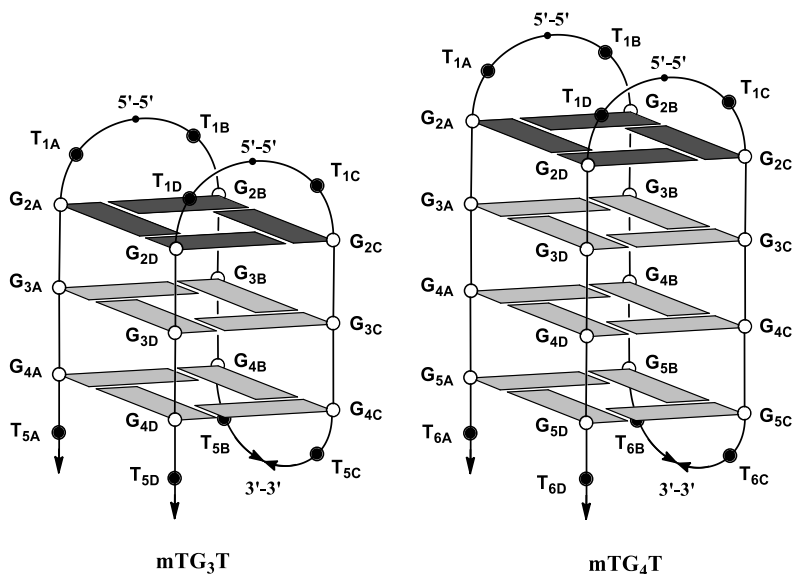


Figura 6. Rappresentazione schematica delle strutture G-quadruplex adottate da **mTG<sub>3</sub>T** e **mTG<sub>4</sub>T** (Tabella 1). Le guanosine nelle conformazioni glicosidiche *syn* e *anti* sono in nero e grigio, rispettivamente. Le timidine sono rappresentate da cerchi neri.

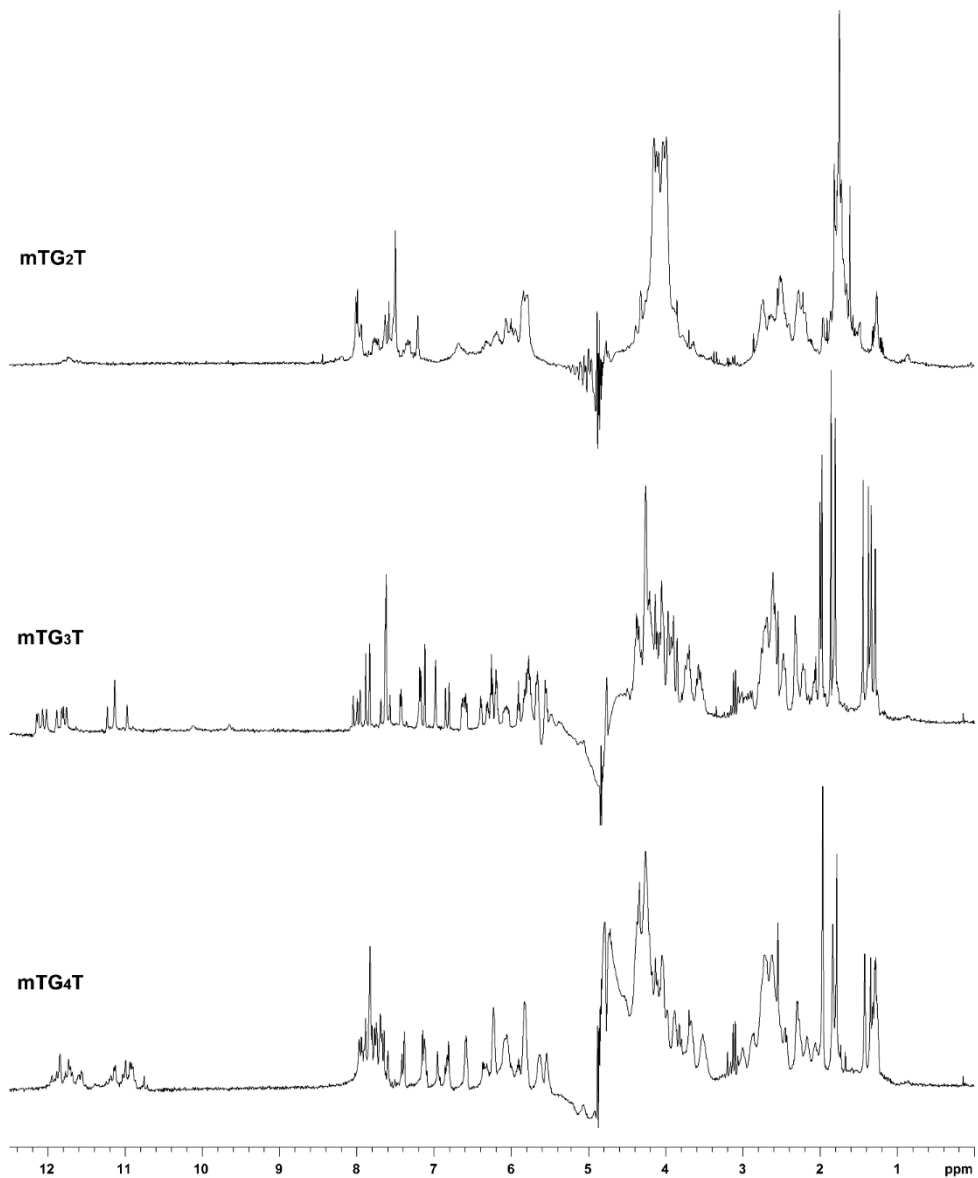


Figura 7. Spettri  $^1\text{H}$ NMR (500 MHz) di **mTG<sub>2</sub>T**, **mTG<sub>3</sub>T** e **mTG<sub>4</sub>T** (Tabella 1) in 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 70 mM NaCl e 0.2 mM EDTA (pH 7.0), 25°C.

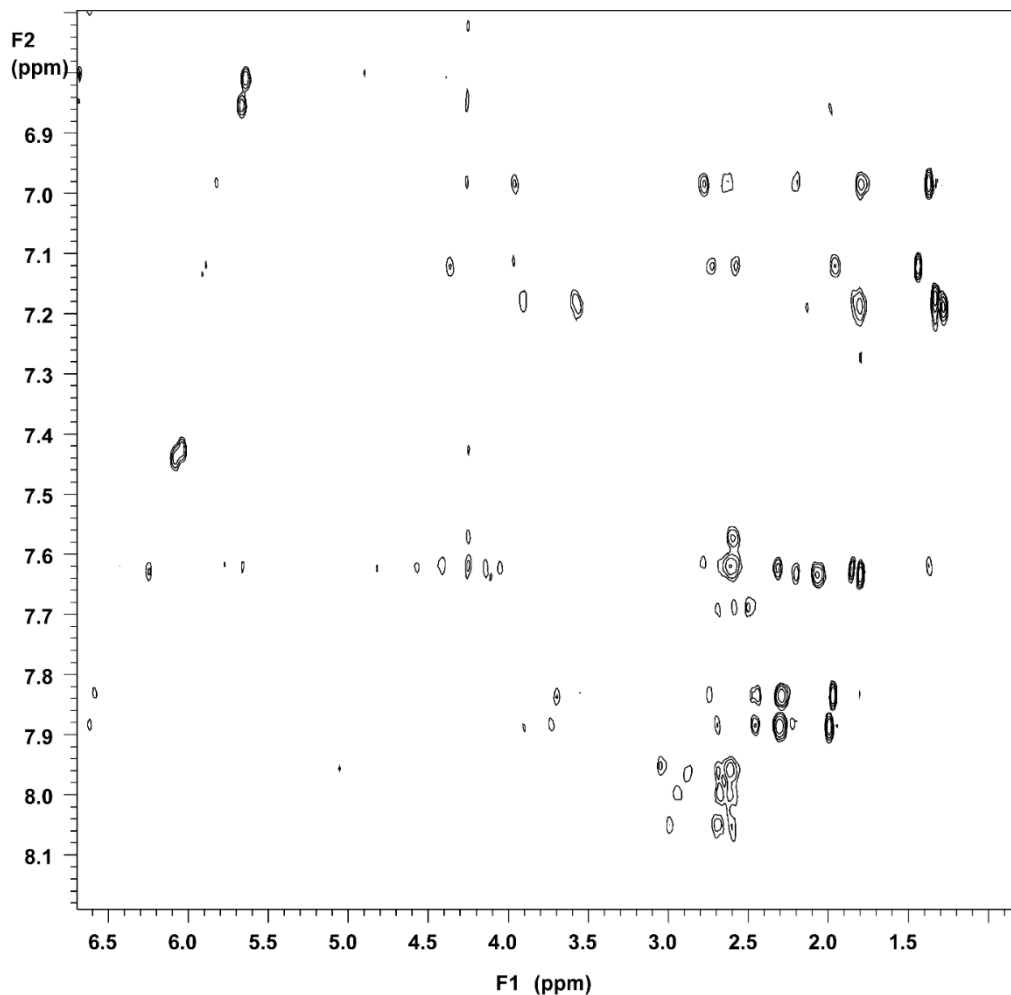


Figura 8. Regione espansa dello spettro 2D NOESY di **mTG<sub>3</sub>T** (500 MHz; 25 °C; concentrazione 1.2 mM; 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 70 mM NaCl e 0.2 mM EDTA, pH 7.0 in H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9: 1; volume totale 0.6 ml; *mixing time* 180 ms) che correlano i protoni delle basi aromatiche e i protoni degli zuccheri.

<b>mTG<sub>3</sub>T</b>	3'-TGGGT-5'-5'-TGGGT-3'-3'-TGGGT-5'-5'-TGGGT-3'						
	H8/H6	H1'	H2'/H2''	H3'	H4'	H5'/H5''	CH <sub>3</sub>
T <sub>1α</sub>	7.83	6.59	2.30/2.45	4.88	3.93	3.59	1.97
<u>G</u> <sub>2α</sub>	6.81	5.65	2.87/3.68	4.82	4.37	4.04	-
G <sub>3α</sub>	7.97	5.81	2.61/2.68	5.09	4.27	3.91	-
G <sub>4α</sub>	7.64	6.40	2.56/2.64	4.82	4.58	N.D.	-
T <sub>5α</sub>	7.18	5.55	1.81/2.24	4.54	3.90	3.85/3.71	1.34
T <sub>1β</sub>	7.89	6.62	2.31/2.46	4.88	3.92	N.D.	2.00
<u>G</u> <sub>2β</sub>	6.86	5.67	2.93/3.75	4.83	4.38	4.06	-
G <sub>3β</sub>	8.00	5.82	2.62/2.68	5.08	4.27	N.D.	-
G <sub>4β</sub>	7.62	6.20	2.62/2.78	4.79	4.58	4.14/4.04	-
T <sub>5β</sub>	6.99	5.82	1.80/2.21	4.65	4.26	3.96	1.37
T <sub>1γ</sub>	7.62	6.25	2.31	4.57	4.41	4.05	1.85
<u>G</u> <sub>2γ</sub>	7.43	6.04	3.00/3.53	4.93	4.25	N.D.	-
G <sub>3γ</sub>	8.06	5.81	2.60/2.69	5.09	N.D.	N.D.	-
G <sub>4γ</sub>	7.70	6.31	2.49/2.60	4.96	4.48	N.D.	-
T <sub>5γ</sub>	7.12	5.91	1.96/2.07	4.38	4.08	3.93/3.63	1.44
T <sub>1δ</sub>	7.64	6.25	2.07/2.20	4.84	4.40	4.07/3.76	1.80
<u>G</u> <sub>2δ</sub>	7.44	6.08	3.03/3.55	4.95	4.23	N.D.	-
G <sub>3δ</sub>	7.96	5.70	2.60/2.68	5.05	4.41	N.D.	-
G <sub>4δ</sub>	7.58	5.76	2.60/2.74	5.05	4.25	N.D.	-
T <sub>5δ</sub>	7.20	5.56	1.80/2.13	4.54	4.37	3.91/3.57	1.28

Tabella 3. Assegnazione dei *chemical shift* protonici per le G-quadruplex formate dall'oligonucleotide **mTG<sub>3</sub>T** (500 MHz, T = 25°C) in 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 70 mM NaCl e 0.2 mM EDTA (pH 7.0). N.D. = non determinato. I residui che adottano conformazioni glicosidiche *syn* sono sottolineati. Dovrebbe essere notato che, a causa delle analogie tra i filamenti e le interruzioni di connettività ai siti di inversione di polarità, non è stato possibile assegnare i *chemical shift* di un particolare filamento al tratto 5'-TG<sub>3</sub>T-3' corrispondente.

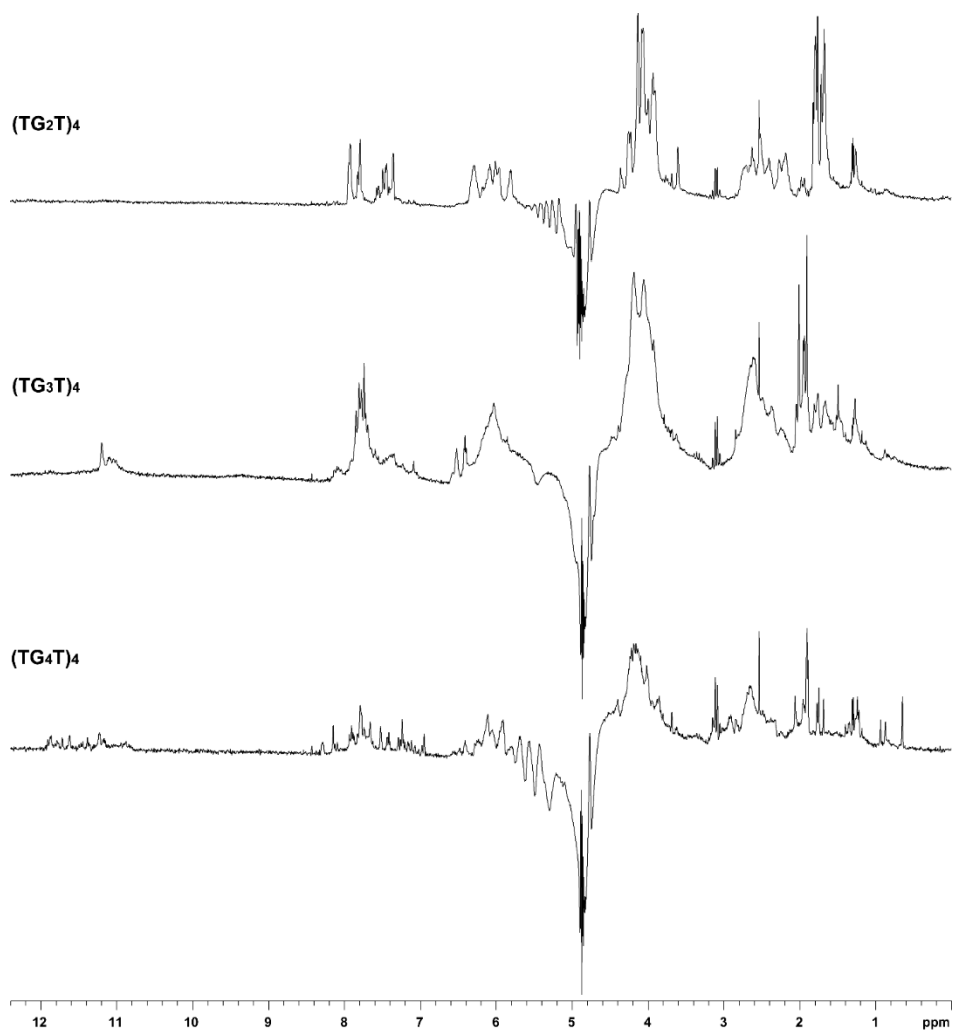


Figura 9. Spettri  $^1\text{H}$ NMR (500 MHz) di  $(\text{TG}_2\text{T})_4$ ,  $(\text{TG}_3\text{T})_4$  e  $(\text{TG}_4\text{T})_4$  (Tabella 1) in 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 70 mM KCl e 0.2 mM EDTA (pH 7.0), 25°C.

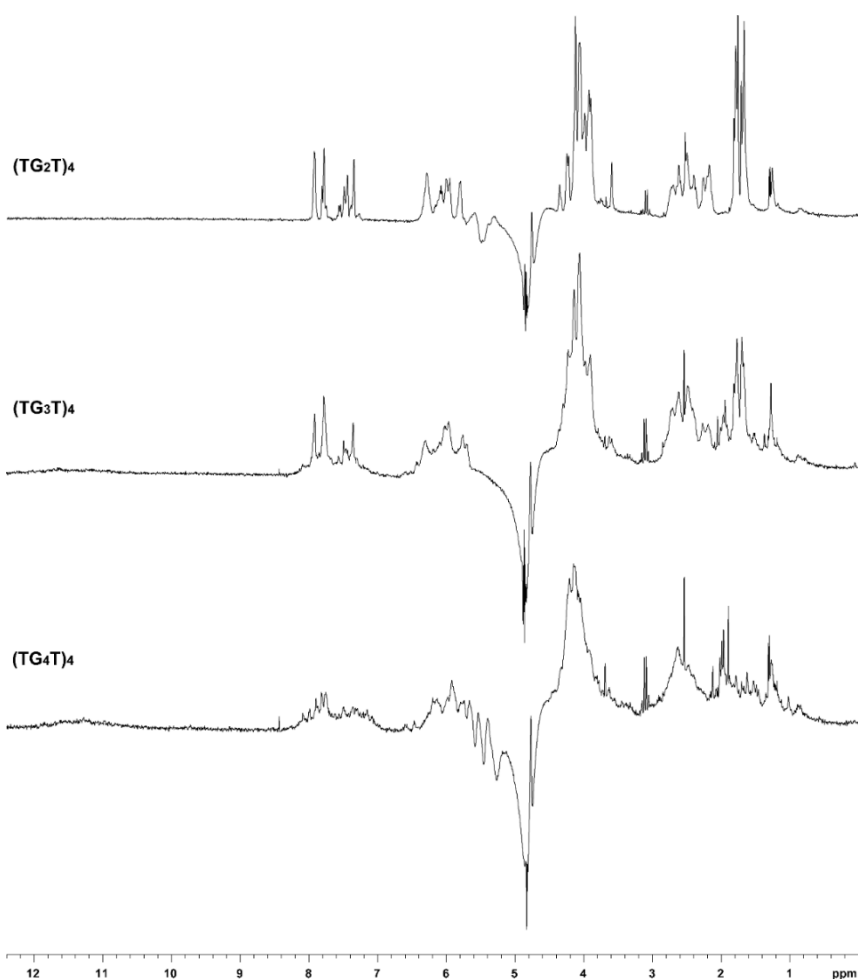


Figura 10. Spettri <sup>1</sup>H NMR (500 MHz) di (TG<sub>2</sub>T)<sub>4</sub>, (TG<sub>3</sub>T)<sub>4</sub> e (TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub> (Tabella 1) in 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 70 mM NaCl e 0.2 mM EDTA (pH 7.0), 25°C.

### Spettroscopia CD e misure di denaturazione termica

Nello studio delle strutture G-quadruplex, la tecnica del dicroismo circolare rappresenta un importante strumento per accertare la presenza in soluzione di queste conformazioni del DNA, per ottenere informazioni preliminari riguardanti la topologia di ripiegamento strutturale o per confermare i dati ottenuti da metodi differenti, in particolare se si considera che numerosi tipi di G-quadruplex esibiscono spettri CD peculiari [32-34]. Inoltre, in quei casi in cui il profilo CD è

ambiguo, informazioni topologiche aggiuntive potrebbero essere desunte da un confronto diretto tra lo spettro CD in esame e quelli di specifiche strutture G-quadruplex la cui conformazione è stata accertata attraverso altre tecniche.

La Figura 11 mostra gli spettri CD (5°C, 50 µM oligonucleotide) di **mTG<sub>2</sub>T** (A), **mTG<sub>3</sub>T** (B) e **mTG<sub>4</sub>T** (C) in condizioni tampone differenti (tampone fosfato potassio o sodio). Entrambi i profili di **mTG<sub>4</sub>T** e **mTG<sub>3</sub>T** sono caratterizzati da bande positive intorno a 255-260 e 290-295 nm, che differiscono entrambe per intensità. Queste caratteristiche non permettono di assegnare gli spettri CD direttamente ai profili di "Type I" o al "Type II" distintivi di alcune G-quadruplex [35]. L'oligonucleotide **mTG<sub>4</sub>T**, nel tampone sodio o potassio, ha mostrato profili CD quasi sovrapponibili, suggerendo chiaramente che esso adotta conformazioni simili in presenza dei due cationi. Un dato interessante è che questi spettri CD somigliano strettamente a quello di una sequenza TG<sub>4</sub>T modificata, ovvero TMGGGT (in cui M = 8-metil-2'-deossiguanosina), per la quale è stata dimostrata la formazione di una struttura G-quadruplex parallela tetramolecolare con tre tetradi di G *all-anti* e una *all-syn* all'estremità 5' attraverso studi NMR (Figura 11A) [36]. Tenendo in considerazione che, generalmente, la presenza di un massimo intorno a 290-295 nm è indicativo della presenza di residui di G che adottano conformazioni glicosidiche *syn* [32], questi dati inducono a ritenere che **mTG<sub>4</sub>T** si ripieghi in una struttura G-quadruplex caratterizzata dallo stesso orientamento dei filamenti e dalla stessa disposizione delle tetradi del complesso G-quadruplex tetramolecolare formato da TMGGGT, in accordo con l'orientamento della struttura G-quadruplex desunta dai dati NMR (Figura 6). A parte differenze nell'intensità delle bande tra i profili in tampone potassio e sodio, probabilmente dovute alla migliore capacità dello ione potassio di stabilizzare le conformazioni G-quadruplex, e lievi differenze nelle lunghezze d'onda, anche **mTG<sub>3</sub>T** ha dato luogo a spettri CD simili a quello del complesso G-quadruplex tetramolecolare formato da TMGGT (Figura 11B) che, in base agli studi

NMR, è caratterizzato da due tetradi di G *all-anti* e una tetrate di M *all-syn* all'estremità 5' [37]. Pertanto, analogamente a **mTG<sub>4</sub>T** e in accordo con i dati NMR, i dati CD suggeriscono che **mTG<sub>3</sub>T** adotta una struttura G-quadruplex caratterizzata dallo stesso orientamento dei filamenti e dalla stessa sistemazione delle tetradi della G-quadruplex tetramolecolare formata da TMGGT. Per quanto riguarda **mTG<sub>2</sub>T**, lo spettro CD in tampone potassio ha mostrato un profilo "Type II" con due bande positive a 252 e 297 nm e una negativa a 272 nm. D'altra parte, il profilo CD in tampone sodio potrebbe essere definito "Type I", a parte una marginale banda positiva a 296 nm. Prendendo in considerazione la relazione tra lo spettro CD e la sovrapposizione delle tetradi [32], diverse topologie G-quadruplex sarebbero compatibili con i profili CD osservati (Figura 12). Questo dato è in accordo con gli spettri NMR dai quali si desume la presenza di più di una struttura.

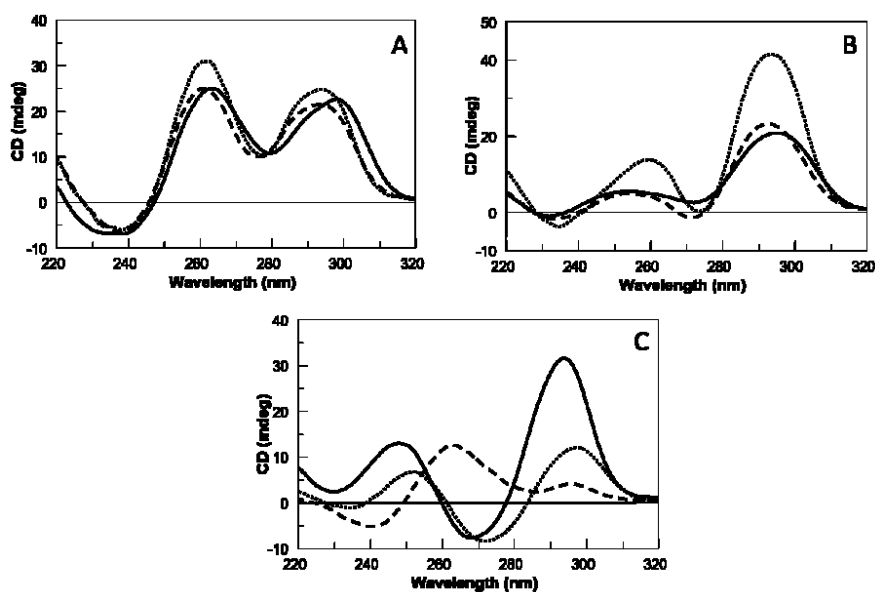


Figura 11. Spettri CD a 5°C di (A) **mTG<sub>4</sub>T** in tampone potassio (.....) e sodio (—) paragonati al complesso tetramolecolare TMGGGT (- - -); (B) **mTG<sub>3</sub>T** in tampone potassio (.....) e sodio (—) paragonati al complesso tetramolecolare TMGGT (- - -); **mTG<sub>2</sub>T** in tampone potassio (.....) e sodio (- - -) paragonati al TBA (—).



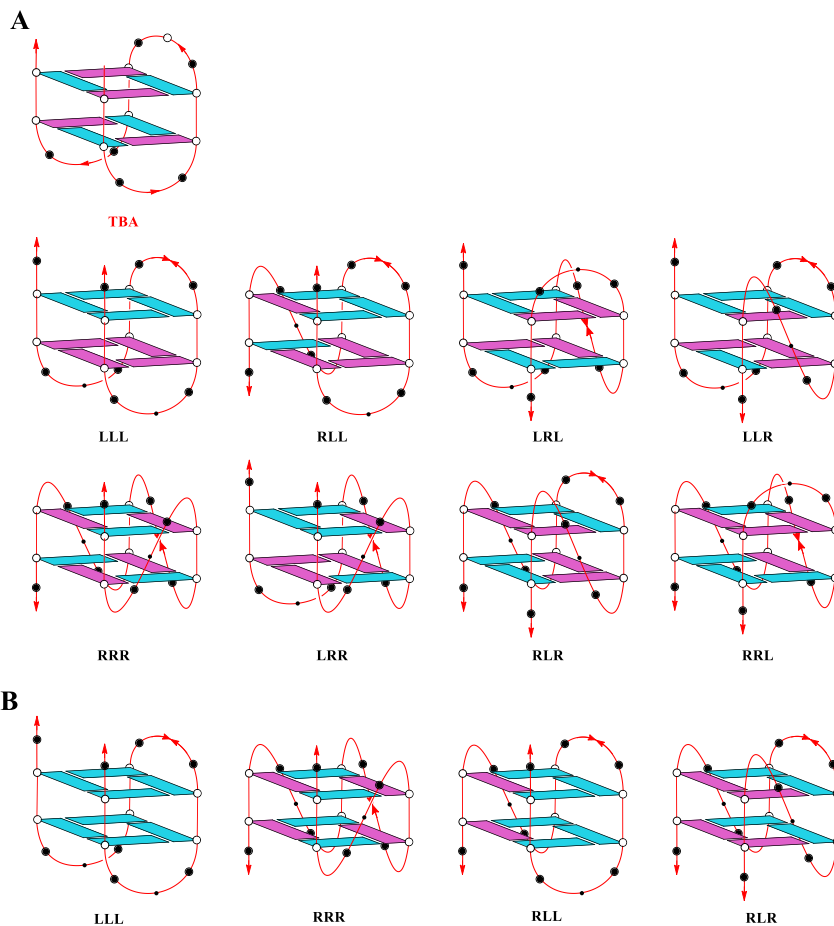


Figura 12. Alcune delle possibili strutture G-quadruplex per **mTG<sub>2</sub>T** compatibili con gli spettri CD nei tamponi potassio (A) e sodio (B), confrontate con la struttura G-quadruplex del TBA (vedere testo principale per i dettagli). Le G-quadruplex sono state contrassegnate secondo la progressione oraria dei *loop*: L=lateral, R=reversed. Le guanosine e le timidine sono rappresentate, rispettivamente, da cerchi bianchi e neri. Le conformazioni glicosidiche *syn* ed *anti* delle guanosine sono, rispettivamente, in viola e azzurro. I siti ad inversione di polarità 3'-3' e 5'-5' sono rappresentati, rispettivamente, da frecce rosse e punti neri.

Il dicroismo circolare è stato usato anche per valutare la stabilità termica delle strutture G-quadruplex in esame, sia in tampone sodio che potassio. I profili delle curve di fusione CD di tutti gli oligonucleotidi contenenti siti ad inversione di polarità (IPS) sono riportati in Figura 13. Le curve CD di riscaldamento di **mTG<sub>4</sub>T** sia in presenza di ioni potassio (dato non mostrato) che di ioni sodio (70 mM, Figura 13A), non hanno mostrato profili sigmoidali ma solo una minima riduzione del

segnale CD a 90°C. Nel tentativo di ottenere profili *melting* migliori, le curve di riscaldamento CD sono state registrate anche in presenza di 5 mM di ioni potassio o sodio (Figura 13 B). Anche in questi casi non sono stati ottenuti profili sigmoidali ma è stata osservata solo una riduzione del segnale a 95°C. Questi dati dimostrano decisamente, che la struttura G-quadruplex **mTG<sub>4</sub>T** è dotata di una straordinaria stabilità termica, in accordo con la disposizione parallela del filamento suggerita dai dati CD e NMR. Allo scopo di acquisire dati preliminari sulla molecolarità della struttura G-quadruplex formata da **mTG<sub>4</sub>T**, sono stati registrati spettri CD a concentrazione decrescente, come riportato da altri autori [35] (Figura 14 A). L'indipendenza del profilo CD dalla concentrazione è in buon accordo con la presenza di una struttura monomolecolare. Un ulteriore dato a supporto della presenza di una struttura monomolecolare è la dipendenza lineare dell'intensità del segnale CD (sia a 262 che a 294 nm) dalla concentrazione del filamento (Figura 14 B e C).

Le curve di riscaldamento CD di **mTG<sub>3</sub>T** in tampone potassio hanno dato luogo solo ad una riduzione del segnale CD a 95°C, evidenziando anche in questo caso, un'eccezionale stabilità termica. Tuttavia, le curve di riscaldamento CD di **mTG<sub>3</sub>T** in tampone sodio sono state caratterizzate da un profilo sigmoidale ben definito che ha permesso di misurare la temperatura di *melting* in queste condizioni (75°C) (Figura 13 C e D). L'assenza di isteresi tra i profili di riscaldamento e raffreddamento è in accordo con la presenza, anche in questo caso, di una struttura G-quadruplex monomolecolare (Figura 13D). Contrariamente ai casi precedenti, i profili di fusione di **mTG<sub>2</sub>T** in tampone potassio sono risultati sigmoidali e, pertanto, hanno permesso di misurare la  $T_m$  che è risultata di 40°C, in accordo con una struttura G-quadruplex formata dalla sovrapposizione di due sole tetradi di G. Tuttavia, l'evidente isteresi tra le curve di riscaldamento-raffreddamento suggerisce la presenza di strutture con differenti stabilità e velocità di formazione, come era

stato già indicato dai dati NMR. D'altra parte, le curve di riscaldamento-raffreddamento di **mTG<sub>2</sub>T** in tampone sodio non mostrano un profilo sigmoidale, probabilmente a causa della sua stabilità termica piuttosto bassa (Figura 13E e F). Visto che gli spettri <sup>1</sup>H NMR di **(TG<sub>3</sub>T)<sub>4</sub>** e **(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub>** in tampone potassio hanno denotato la presenza di strutture G-quadruplex, anche i loro spettri CD e i profili di riscaldamento sono stati registrati in un tampone 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 70 mM KCl, pH 7.0 (Figura 15). Lo spettro CD di **(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub>**, che mostra una banda negativa a 236 nm e due bande positive a 266 e 294 nm, è paragonabile a quello di **mTG<sub>4</sub>T**, suggerendo così, una sovrapposizione delle G-tetrad simile. Tuttavia, l'intensità della banda di **(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub>** è abbastanza bassa rispetto a **mTG<sub>4</sub>T**. Al contrario, il profilo CD di **(TG<sub>3</sub>T)<sub>4</sub>** è piuttosto differente da quello di **mTG<sub>3</sub>T** visto che ha mostrato una banda negativa e una positiva a 242 e 264 nm, rispettivamente. Questi dati sono compatibili con una struttura G-quadruplex parallela con tutte le guanosine che adottano una conformazione glicosidica *anti*. Il profilo di riscaldamento CD di **(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub>** ha rivelato una temperatura di *melting* di 83°C. Pertanto, la stabilità termica di **(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub>** è certamente più bassa di quella di **mTG<sub>4</sub>T** per il quale una temperatura di *melting* maggiore di 95°C è stata suggerita dal suo profilo di riscaldamento CD acquisito a concentrazioni di potassio perfino molto inferiori (Figura 13 B). Analogamente, sebbene la curva di riscaldamento CD di **(TG<sub>3</sub>T)<sub>4</sub>** non esibisca un profilo sigmoidale, esso ha suggerito una stabilità termica senz'altro più bassa di **mTG<sub>3</sub>T**, considerando che, nelle medesime condizioni, la curva di riscaldamento CD di quest'ultimo ha indicato una temperatura di *melting* maggiore di 95°C (Figura 13 C).

Utilizzando i risultati NMR e in accordo con i dati CD, sono stati costruiti dei modelli molecolari delle strutture G-quadruplex formate da **mTG<sub>3</sub>T** e **mTG<sub>4</sub>T**, come descritto successivamente (Figura 16) con l'obiettivo di verificare la compatibilità

dei *loop* TT contenenti siti ad inversione di polarità con l'arrangiamento parallelo dei filamenti e verificare la presenza di possibili distorsioni del *backbone*.

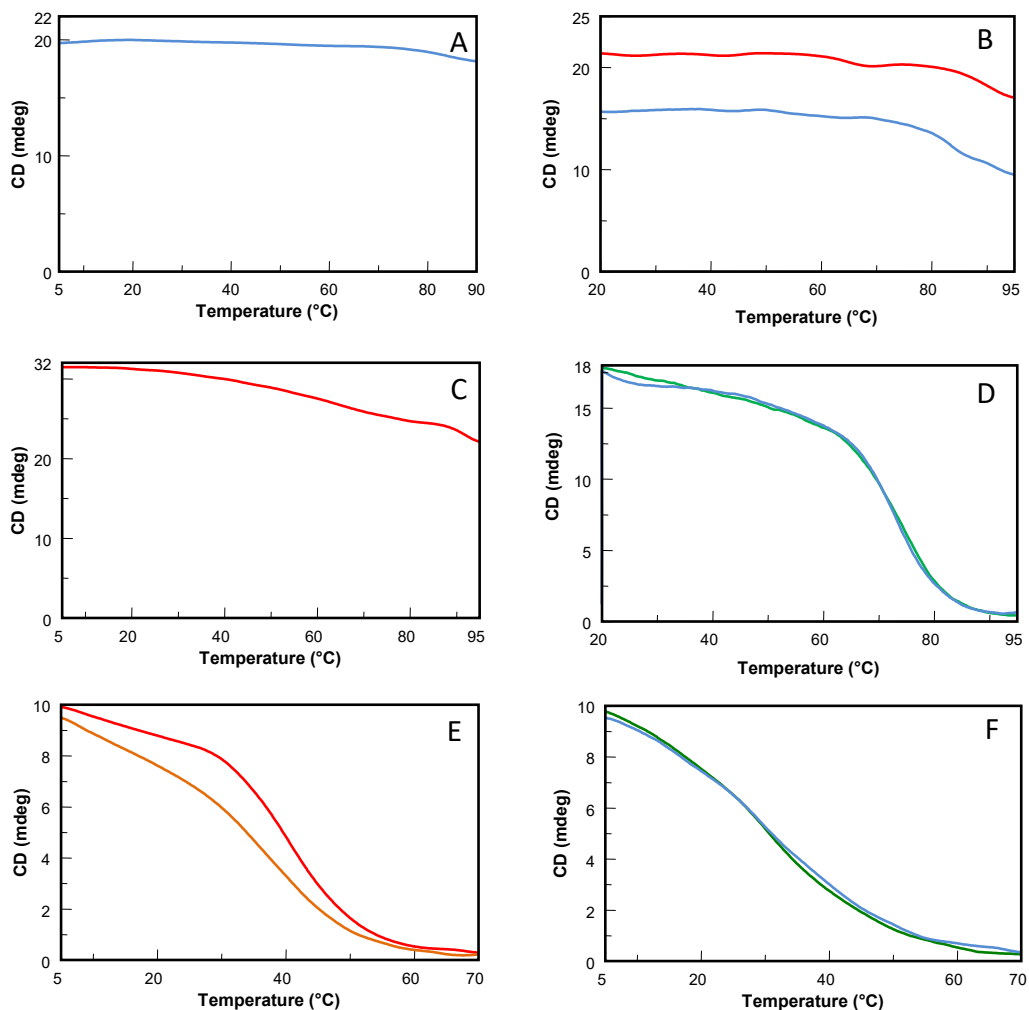


Figura 13. Curve di fusione CD di **mTG<sub>4</sub>T** in tampone sodio NaCl 70 mM (**A**) e in tampone potassio 5mM (rosso) e sodio NaCl 5mM (blu) (**B**); curve di fusione CD di **mTG<sub>3</sub>T** in tampone potassio KCl 70 mM (**C**) e profili di fusione (blu) e *annealing* (verde) in tampone sodio NaCl 70 mM (**D**); profili di fusione CD (rosso) e *annealing* CD (giallo) di **mTG<sub>2</sub>T** in tampone potassio KCl 70 mM (**E**) e profili di fusione CD (blu) e *annealing* CD (verde) in tampone sodio NaCl 70 mM (**F**). La velocità di scansione è di 0.5 °C/min eccetto per **D** (10°C/h). Vedi la sezione materiali e metodi per i dettagli.

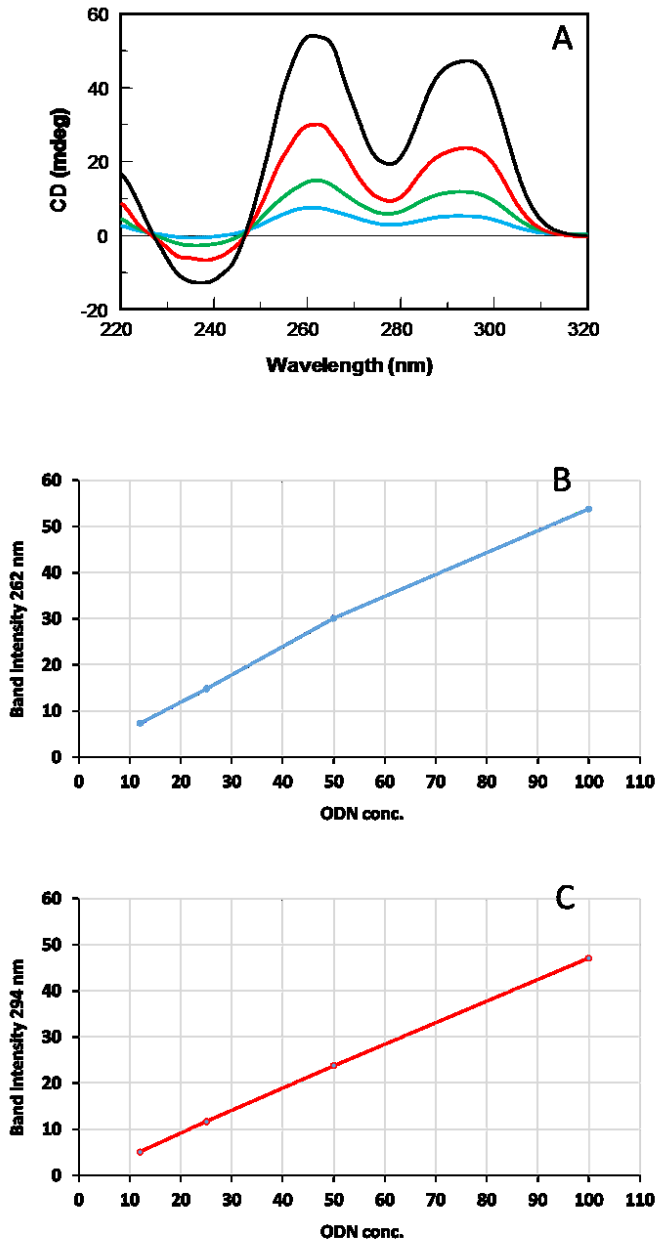


Figura 14. Spettri CD a 20°C di **mTG<sub>4</sub>T** in tampone potassio (10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 70 mM KCl, pH 7.0) a differenti concentrazioni di oligonucleotide (100  $\mu$ M: nero; 50  $\mu$ M: rosso; 25  $\mu$ M: verde; 12  $\mu$ M: blu) (A); diagrammi dell'intensità della banda CD a 262 nm (B) a 294 nm (C) al variare della concentrazione degli oligonucleotidi.

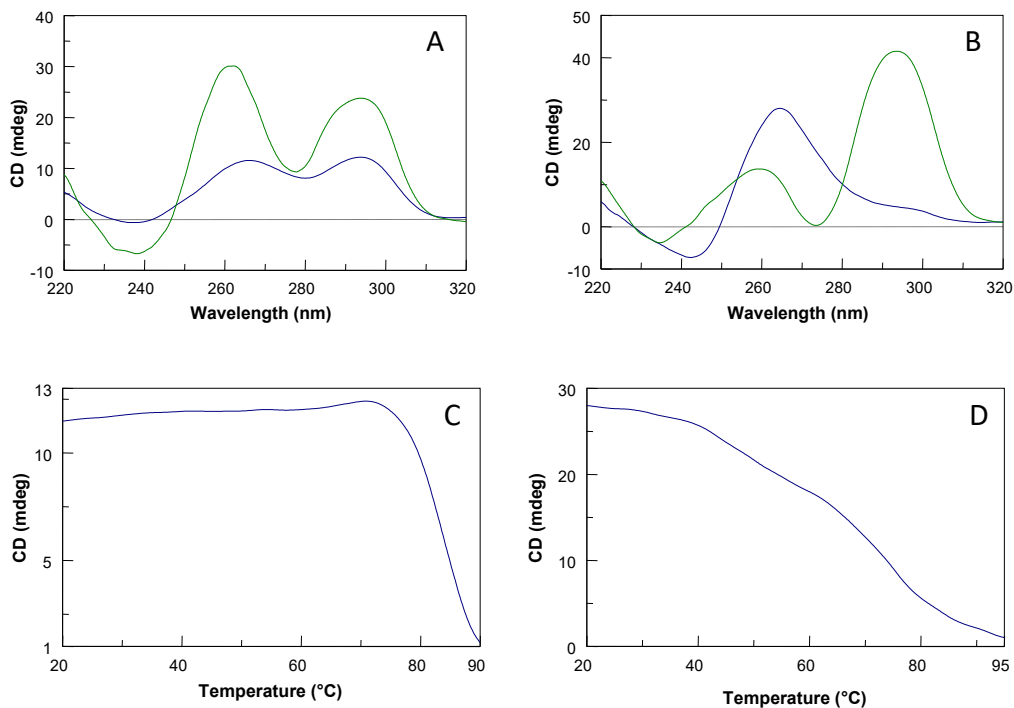


Figura 15. Spettri CD a 20 °C di  $(\text{TG}_4\text{T})_4$  (blu) e  $\text{mTG}_4\text{T}$  (verde) (A);  $(\text{TG}_3\text{T})_4$  (blu) e  $\text{mTG}_3\text{T}$  (verde) (B) in tampone potassio. Profili di fusione CD di  $(\text{TG}_4\text{T})_4$  (C) e  $(\text{TG}_3\text{T})_4$  (D) in tampone potassio. Vedi la sezione sperimentale per i dettagli.

### **Modellistica molecolare**

Le principali caratteristiche conformazionali delle G-quadruplex  $\text{mTG}_4\text{T}$  e  $\text{mTG}_3\text{T}$  sono state esplorate mediante studi di modellistica molecolare. In base ai dati NMR e CD, abbiamo costruito dei modelli molecolari approssimati delle G-quadruplex formate sia da  $\text{mTG}_3\text{T}$  che da  $\text{mTG}_4\text{T}$  (Figura 16).

Sono stati usati il campo di forze AMBER ed il set di parametri AMBER 99. In entrambi i casi, le coordinate iniziali per i modelli di partenza delle G-quadruplex  $\text{mTG}_4\text{T}$  e  $\text{mTG}_3\text{T}$  (per i tratti GGGG and GGG rispettivamente) sono state ricavate dalla struttura NMR in soluzione della G-quadruplex  $[\text{d}(\text{TTGGGGT})_4]$  (Protein Data Bank entry number 139D) scegliendo casualmente una delle 4 strutture disponibili. Il modello G-quadruplex preliminare di  $\text{mTG}_4\text{T}$  è stato realizzato eliminando il primo

residuo di timidina in ciascuno dei quattro filamenti d(TTGGGGT). L'iniziale modello di **mTG<sub>3</sub>T**, invece, è stato ottenuto da quello preliminare di **mTG<sub>4</sub>T** rimuovendo l'ultimo residuo di 2'-deossitimidina e sostituendo la 2'-deossiguanosina finale con un residuo di timidina. Le strutture complete delle corrispondenti G-quadruplex monomolecolari contenenti i siti ad inversione di polarità sono state poi sviluppate usando il *Builder building tool di Discover* mediante l'aggiunta di un gruppo fosfato alle estremità 5' dei primi due e degli ultimi due filamenti TGGGGT o TGGGT, rispettivamente, e un altro gruppo fosfato legato alle estremità 3' del secondo e del terzo filamento TGGGGT o TGGGT, rispettivamente. Come per i risultati NMR, le 2'-deossiguanosine in seconda posizione dei tratti GGGG e GGG, rispettivamente, sono state arrangiate nella conformazione *syn*. I calcoli sono stati eseguiti usando una costante dielettrica macroscopica dipendente dalla distanza di  $4r$  e un limite di esclusione infinito per le interazioni di non legame per compensare parzialmente l'assenza del solvente usato [1]. Usando i metodi *steepest descent* seguito da quello quasi-NewtonRaphson (VA09A), l'energia conformazionale di ciascun complesso è stata minimizzata fino al raggiungimento di un gradiente RMS di 0.1 kcal/mol Å. Le figure delle strutture sono state generate utilizzando il programma INSIGHT II, versione 2005 (Accelrys, San Diego, CA, USA). Tutti i calcoli sono stati eseguiti su un PC running Linux ES 2.6.9.

Si può notare che tutte le basi puriniche coinvolte nella formazione delle tetradi di G, inclusi i residui *syn* in seconda posizione, sono capaci di formare tetradi ben definite e planari e le risultanti strutture G-quadruplex esibiscono un angolo *twist* ottimale per un'elica destrorsa ed una geometria del *backbone* altamente simmetrica. In entrambe le G-quadruplex, i residui G della prima tetrad assume una conformazione glicosidica perfettamente *syn* senza causare alcuna distorsione dello scheletro e conducendo ad un buon impilamento con la tetrad di G *all-anti* sottostante. È degno di nota che l'inserzione di tre *loop* laterali contenenti due

residui timidinici legati attraverso i siti ad inversione di polarità (IPS) 5'-5' o 3'-3' non influenza significativamente il ripiegamento generale delle strutture G-quadruplex modificate, paragonate agli analoghi tetramolecolari canonici, [d(TGGGGT)]<sub>4</sub> [2] e [d(TGGGT)]<sub>4</sub> [3] come già suggerito dai dati NMR. Per quanto riguarda i siti ad inversione di polarità, è significativo notare che i gruppi fosfato delle due giunzioni 5'-5' e di quella 3'-3' non sono distorti: in entrambi i modelli non c'è alcuna alterazione dello scheletro. I due residui T alle estremità 3' insieme al residuo T del sito ad inversione di polarità 3'-3', si sovrappongono completamente sopra il piano degli anelli purinici della tetrate di G sottostante mentre l'altra base T della giunzione 3'-3' non è allineata con esso. Per quanto concerne i *loop* TT con i siti ad inversione di polarità 5'-5', i due residui T, appartenenti a due differenti *loop*, sono efficientemente sovrapposti sopra gli anelli a sei membri delle guanine sottostanti mentre le altre due sono leggermente spostate dal *core* della struttura G-quadruplex. Complessivamente, sia la G-quadruplex formata da **mTG<sub>3</sub>T** che da **mTG<sub>4</sub>T** sono caratterizzate dalla perdita di interazioni steriche e da un arrangiamento compatto, in accordo con la loro straordinaria stabilità termica.

[1] Weiner, S.J., Kollman, P.A., Case, D.A., Singh, U.C., Ghio, C., Alagona, G., Profeta, S. and Weiner, P.J. (1984) A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 765-784.

[2] Jin, R., Gaffney, B.L., Wang, C., Jones, R.A. and Breslauer, K.J. (1992) Thermodynamics and structure of a DNA tetraplex: a spectroscopic and calorimetric study of the tetramolecular complexes of d(TG3T) and d(TG3T2G3T). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89, 8832-8836.

[3] Aboul-ela, F., Murchie, A.I. and Lilley, D.M. (1992) NMR study of parallel-stranded tetraplex formation by the hexadeoxynucleotide d(TG4T). *Nature*, 360, 280-282.



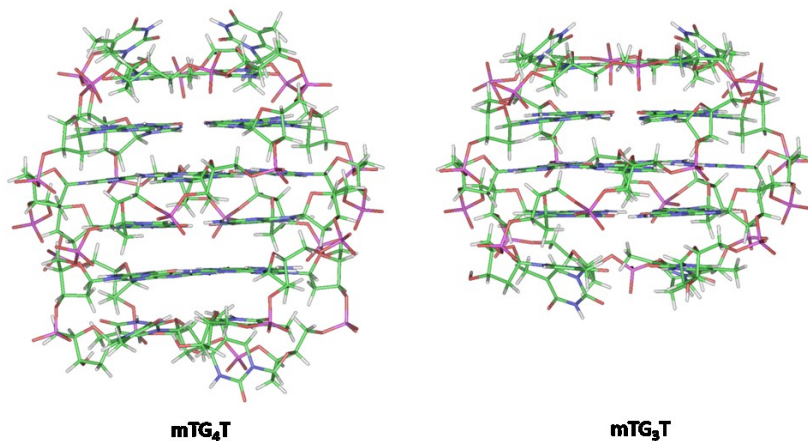


Figura 16. Modelli molecolari delle G-quadruplex adottate da **mTG<sub>4</sub>T** e **mTG<sub>3</sub>T**. le strutture sono orientate con le estremità 3' libere verso il basso, come riportato in Figura 1 (carbonio, verde; azoto, blu; ossigeno, rosso; idrogeno, bianco; fosforo, rosa).

### ***Elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE)***

Per acquisire ulteriori dati circa la molarità delle strutture G-quadruplex studiate, tutti gli oligonucleotidi contenenti siti ad inversione di polarità (IPs) sono stati ulteriormente analizzati mediante PAGE e confrontati con una serie di poli-T, con il TBA e con la G-quadruplex tetramolecolare formata da TG<sub>4</sub>T, tutti usati come riferimenti (Figura 17). Riguardo a **mTG<sub>3</sub>T** e **mTG<sub>4</sub>T**, i profili elettroforetici mostrano che essi sono caratterizzati da singole bande ben definite con una mobilità elettroforetica maggiore di T16 e T24, suggerendo così la presenza di prevalenti strutture monomolecolari. Come atteso, **mTG<sub>3</sub>T** e **mTG<sub>4</sub>T** hanno migrato più velocemente rispetto alla G-quadruplex tetramolecolare [TG<sub>4</sub>T]<sub>4</sub>. Tale dato è in accordo con i loro più alti rapporti carica/massa dovuti ai 3 addizionali gruppi fosfato dei siti ad inversione di polarità (IPS). Per quanto riguarda **mTG<sub>2</sub>T**, il campione oligonucleotidico ha mostrato una banda principale dotata di una mobilità simile a quella del TBA, sebbene abbia migrato leggermente più lentamente. Considerando che TBA e **mTG<sub>2</sub>T** hanno rapporti carica/massa molto

simili, questo dato suggerisce, anche in questo caso, la formazione di strutture G-quadruplex monomolecolari. D'altronde, la mobilità leggermente più lenta di **mTG<sub>2</sub>T** rispetto al TBA, potrebbe essere presumibilmente spiegata, dalla presenza di strutture G-quadruplex con 3 *propeller loop* (Figura 12) in cui l'arrangiamento delle tetradi di G è compatibile con i profili CD. Dovrebbe essere notato che in nessun caso sono state osservate strutture di ordine superiore.

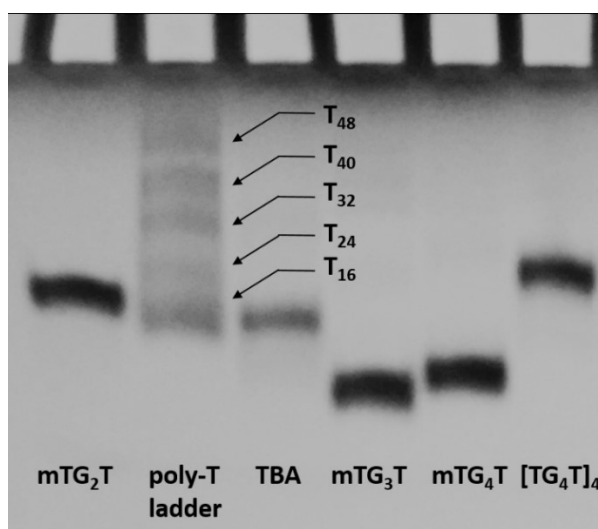


Figura 17. Elettroforesi su gel di poliaccilammide degli oligonucleotidi studiati dotati di siti ad inversione di polarità (Tabella 1). Una serie di Poli-T, il TBA (G2T2G2TG2G2T2G2) e la struttura G-quadruplex parallela monomolecolare formata TG<sub>4</sub>T sono stati usati come riferimenti.

### ***Attività antiproliferativa***

Allo scopo di studiare le attività antiproliferative degli oligonucleotidi esaminati, sono stati eseguiti saggi MTT sulle cellule Calu-6 e HCT-116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup>, trattate con 2 differenti concentrazioni di oligonucleotidi, 10  $\mu$ M e 50  $\mu$ M per 24, 48 e 72 ore. Tutti gli oligonucleotidi testati hanno inibito la proliferazione in queste linee cellulari tumorali in maniera tempo e dose dipendente. In particolare nella linea cellulare Calu-6, tra gli oligonucleotidi testati, **mTG<sub>4</sub>T** ha mostrato, ad entrambe le concentrazioni, la più alta attività. Precisamente, **mTG<sub>4</sub>T** ha mostrato il 50% della

sua attività antiproliferativa a 50  $\mu$ M dopo 24 h di incubazione mentre per gli altri oligonucleotidi la stessa attività antiproliferativa è stata ottenuta dopo 36 h (**mTG<sub>3</sub>T** e **mTG<sub>2</sub>T** in tampone potassio) o 48 h (**mTG<sub>2</sub>T** in tampone sodio) di incubazione (Figure 18 e 19). Tuttavia, tutti gli oligonucleotidi testati hanno ridotto la vitalità delle cellule Calu-6 di circa l'80% dopo 72 h di trattamento. Risultati simili sono stati osservati sulle cellule HCT-116<sup>p53-/-</sup> (Figura 20). Le cellule MRC-5 derivano dai normali fibroblasti polmonari e, diversamente dalla linea cellulare tumorale, sono risultate considerevolmente meno sensibili agli effetti antiproliferativi di tutti gli oligonucleotidi testati (Figura 21). L'attività antiproliferativa sulle cellule Calu-6 è stata valutata anche per gli oligonucleotidi naturali **(TG<sub>2</sub>T)<sub>4</sub>**, **(TG<sub>3</sub>T)<sub>4</sub>** e **(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub>** (Figure 22). Tutti gli oligonucleotidi naturali sono stati capaci di inibire la proliferazione fino a 48 h. In particolare, il *trend* di attività a 50  $\mu$ M è stato **(TG<sub>2</sub>T)<sub>4</sub>** > **(TG<sub>3</sub>T)<sub>4</sub>** > **(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub>**. Tuttavia, in questi casi, è stato chiaramente evidente un drastico decremento della citotossicità dopo 72 h di incubazione ad entrambe le concentrazioni, in forte contrasto con gli oligonucleotidi contenenti i siti ad inversione di polarità per i quali, dopo lo stesso tempo di incubazione, è stata osservata una notevole attività antiproliferativa. I dati osservati potrebbero essere spiegati considerando il contributo dei prodotti di degradazione guaninici, come recentemente descritto [38]. Questa ipotesi è in accordo con il *trend* di degradabilità osservato nel saggio con FBS (vedi sotto) in cui **(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub>** e **(TG<sub>2</sub>T)<sub>4</sub>** si sono rivelati, rispettivamente, il più ed il meno resistente. Perciò la temporanea attività antiproliferativa degli oligonucleotidi naturali non dovrebbe essere considerata specifica e quindi incapace di coinvolgere qualche proteina target particolare. La specificità degli oligonucleotidi testati contenenti siti ad inversione di polarità per le cellule tumorali, insieme alla loro capacità di esercitare attività antiproliferativa sulle cellule coltivate in assenza di un agente di trasfezione, suggerisce un meccanismo di internalizzazione mediato da un recettore oligonucleotidico non ancora

identificato, maggiormente espresso nelle cellule tumorali piuttosto che in quelle normali, come già dimostrato per altri oligonucleotidi ricchi di G [39]. Ulteriori studi sono richiesti per investigare i meccanismi alla base degli effetti inibitori sulla crescita degli oligonucleotidi testati contenenti siti ad inversione di polarità.

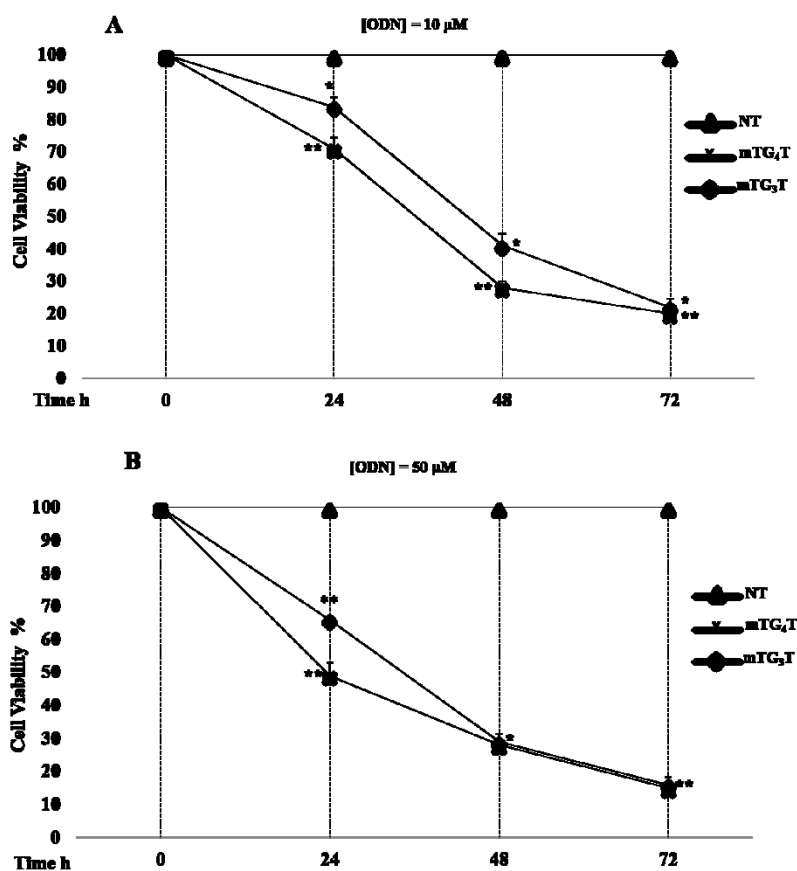


Figura 18. Attività antiproliferativa degli oligonucleotidi **mTG<sub>3</sub>T** e **mTG<sub>4</sub>T** sulla linea cellulare Calu-6. Le cellule sono state trattate con 2 differenti concentrazioni di oligonucleotidi, 10 μM (A) e 50 μM (B), da 24 a 72 h. La linea NT (non trattate) riporta la vitalità cellulare in assenza degli oligonucleotidi. La vitalità cellulare è stata esaminata mediante il saggio MTT. I risultati sono presentati come percentuali (mean±SEM) (n= 3) delle cellule di controllo. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01.

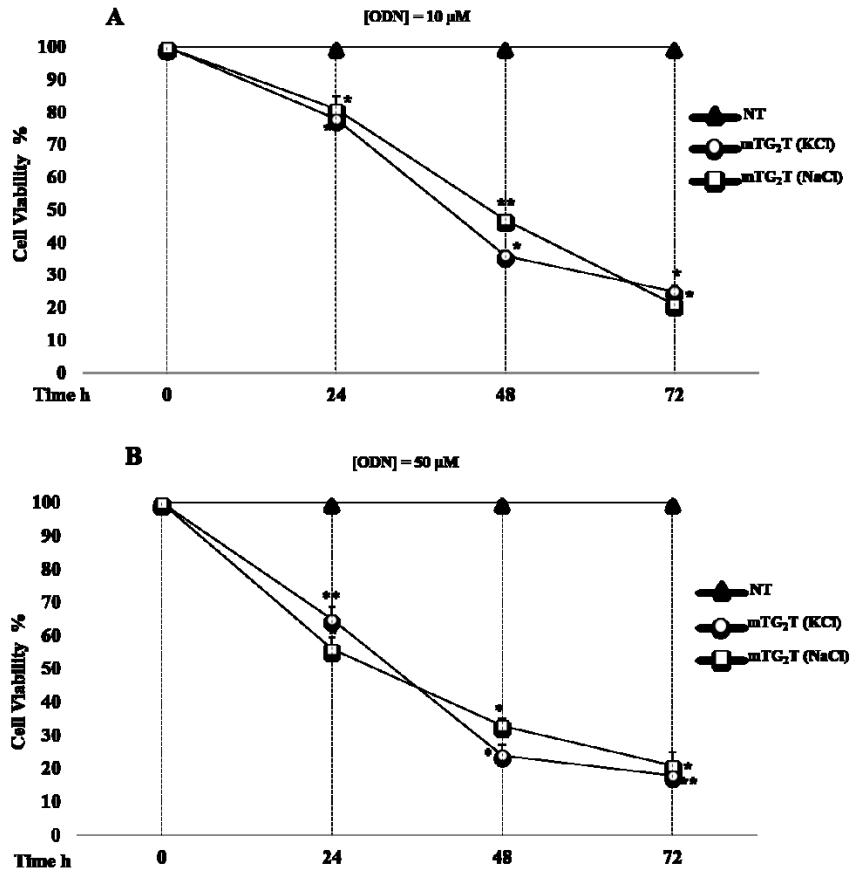


Figura 19. Attività antiproliferativa degli oligonucleotidi **mTG<sub>2</sub>T** sulla linea cellulare Calu-6. Le cellule sono state trattate con 2 differenti concentrazioni di oligonucleotidi, 10 μM (**A**) e 50 μM (**B**), da 24 a 72 h. La linea NT (non trattate) riporta la vitalità cellulare in assenza degli oligonucleotidi. La vitalità cellulare è stata esaminata mediante il saggio MTT. I risultati sono presentati come percentuali (mean±SEM) (n= 3) delle cellule di controllo. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01.

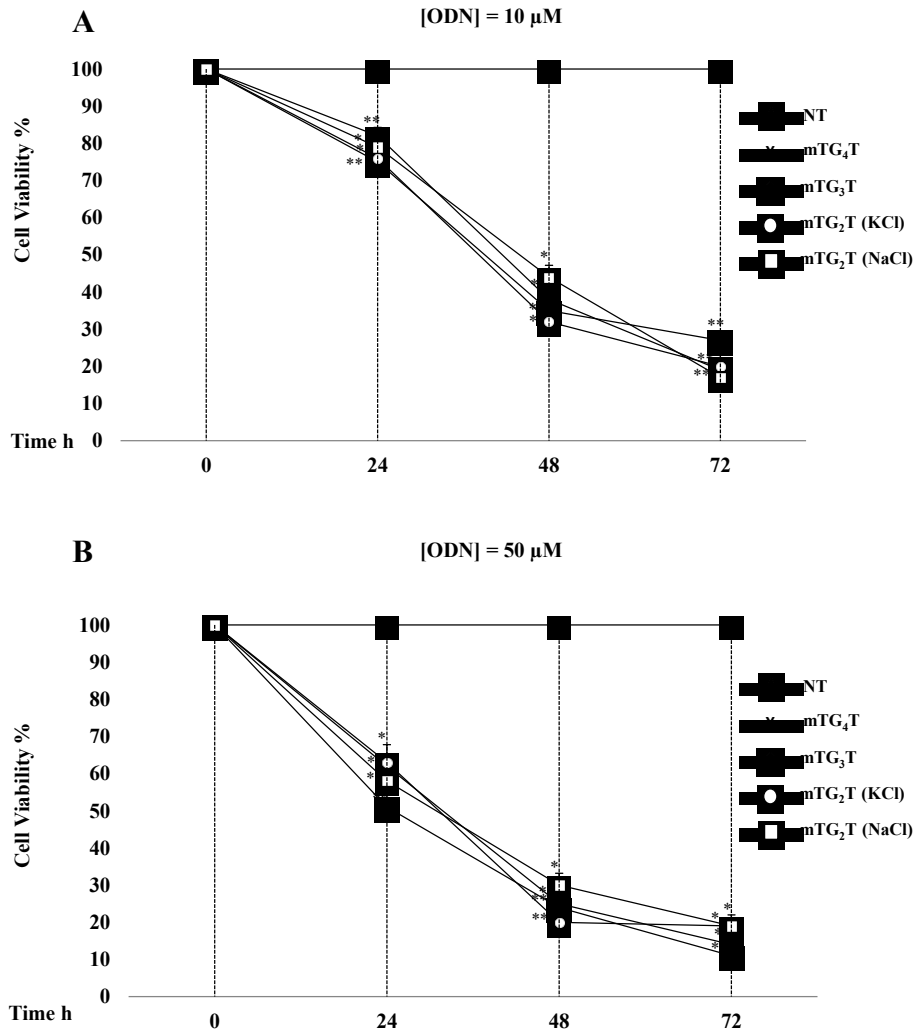


Figura 20. Attività antiproliferativa degli oligonucleotidi **mTG<sub>2</sub>T**, **mTG<sub>3</sub>T** e **mTG<sub>4</sub>T** sulla linea cellulare HCT-116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup>. Le cellule sono state trattate con 2 differenti concentrazioni di oligonucleotidi, 10 μM (**A**) e 50 μM (**B**), da 24 a 72 h. La linea NT (non trattate) riporta la vitalità cellulare in assenza degli oligonucleotidi. La vitalità cellulare è stata esaminata mediante il saggio MTT. I risultati sono presentati come percentuali (mean±SEM) (n= 3) delle cellule di controllo. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01.

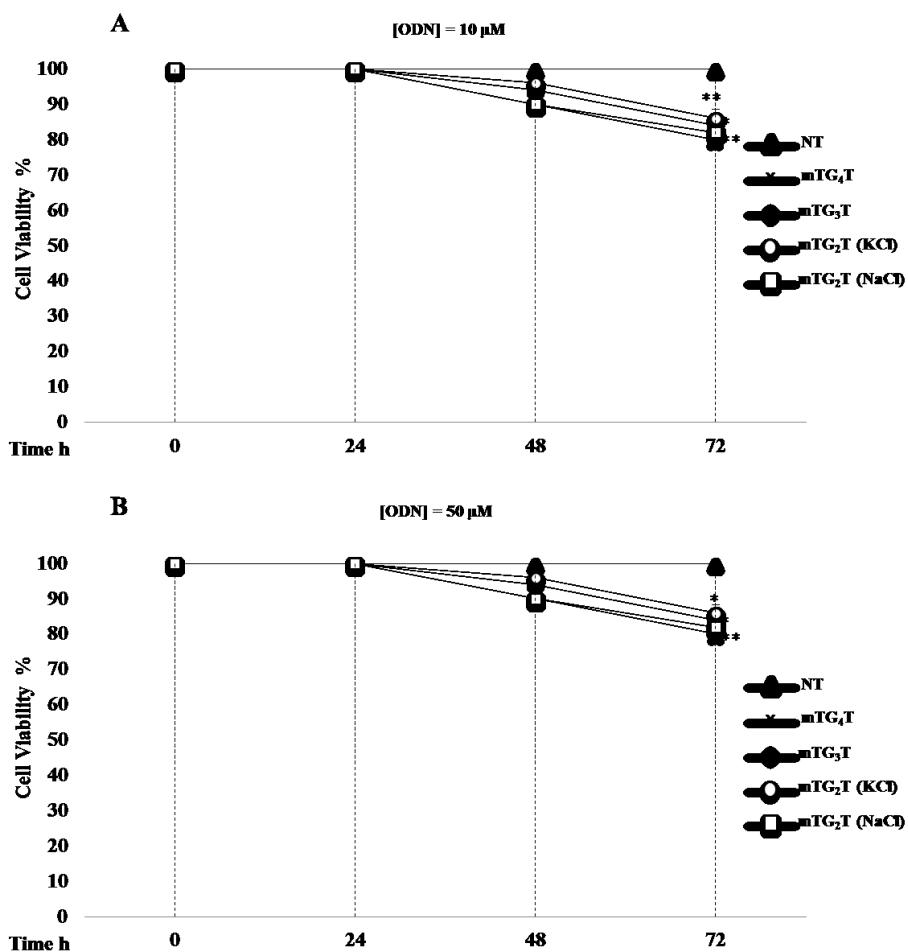


Figura 21. Attività antiproliferativa degli oligonucleotidi **mTG<sub>2</sub>T**, **mTG<sub>3</sub>T** e **mTG<sub>4</sub>T** sulla linea cellulare MRC-5. Le cellule sono state trattate con 2 differenti concentrazioni di oligonucleotidi, 10 μM (A) e 50 μM (B), da 24 a 72 h. La linea NT (non trattate) riporta la vitalità cellulare in assenza degli oligonucleotidi. La vitalità cellulare è stata esaminata mediante il saggio MTT. I risultati sono presentati come percentuali (mean±SEM) (n= 3) delle cellule di controllo. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01.

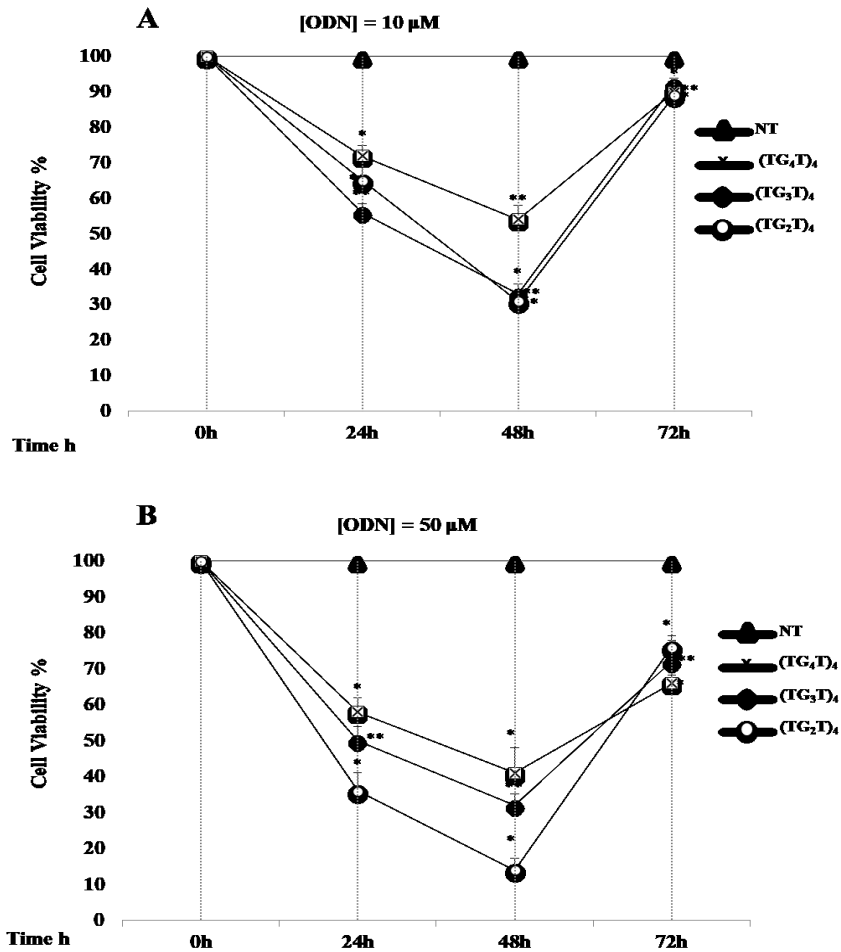


Figura 22. Attività antiproliferativa degli oligonucleotidi (TG<sub>2</sub>T)<sub>4</sub>, (TG<sub>3</sub>T)<sub>4</sub> e (TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub> sulla linea cellulare Calu-6. Le cellule sono state trattate con 2 differenti concentrazioni di oligonucleotidi, 10  $\mu$ M (A) e 50  $\mu$ M (B), da 24 a 72 h. La linea NT (non trattate) riporta la vitalità cellulare in assenza degli oligonucleotidi. La vitalità cellulare è stata esaminata mediante il saggio MTT. I risultati sono presentati come percentuali (mean $\pm$ SEM) (n= 3) delle cellule di controllo. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01.

### Saggio di stabilità alle nucleasi

Dal momento che tutti gli oligonucleotidi studiati hanno mostrato notevoli attività antiproliferative, in vista di un potenziale sviluppo come agenti terapeutici, la loro resistenza in ambiente biologico è stata valutata attraverso il saggio di degradazione sia al 10% che al 50% di FBS seguito da analisi elettroforetica su gel di poliacrilammide. Considerando che la vitalità cellulare misurata attraverso i saggi



MTT è stata testata fino a 72 h, la resistenza degli oligonucleotidi è stata valutata dopo 24, 48 e 72 h. I profili elettroforetici mostrano chiaramente che, in FBA al 10%, **mTG<sub>3</sub>T** ha resistito in parte dopo 72 h, mentre **mTG<sub>4</sub>T**, dopo lo stesso tempo, è risultato completamente resistente (Figura 23) nonostante essi siano caratterizzati da 2 estremità 3', particolarmente suscettibili alle più abbondanti 3'-esonucleasi. Probabilmente, le ragioni di questa elevata resistenza sono riconducibili al fatto che le strutture G-quadruplex formate da **mTG<sub>3</sub>T** e **mTG<sub>4</sub>T** non sono buoni substrati per le esonucleasi e la quantità di singolo filamento non strutturato (*random coil*) in equilibrio con le specie strutturate può essere considerata trascurabile se si tiene conto della loro eccezionale stabilità termica. Le strutture G-quadruplex di **mTG<sub>3</sub>T** e **mTG<sub>4</sub>T** hanno mostrato una certa resistenza anche in FBS al 50% sebbene una riduzione delle intensità della banda dopo 72 h ha indicato, come previsto, una minore quantità di struttura inalterata (Figura 24). D'altro canto, **mTG<sub>2</sub>T** è stato per lo più degradato in FBS al 10% dopo 24 h (Figura 23) o completamente degradato (in FBS al 50%) dopo 72 h (Figura 24). Questo dato non è sorprendente se si tiene conto della temperatura usata durante il saggio e della relativamente bassa stabilità termica osservata per le strutture formate da **mTG<sub>2</sub>T**, fattori che, nel loro insieme, implicano la presenza di una significativa quantità di singolo filamento non strutturato (*random coil*) degradabile.

Il saggio di degradazione in FBS al 10% è stato usato per valutare la resistenza alle nucleasi degli oligonucleotidi naturali dopo 24, 48 e 72 h (Figura 25). Il profilo elettroforetico suggerisce il seguente *trend* di degradazione decrescente: **(TG<sub>2</sub>T)<sub>4</sub>** > **(TG<sub>3</sub>T)<sub>4</sub>** > **(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub>**. Questo risultato è in accordo con i dati ottenuti dagli esperimenti CD ed NMR che non indicano la formazione di G-quadruplex per **(TG<sub>2</sub>T)<sub>4</sub>**, la formazione di strutture G-quadruplex caratterizzate da una bassa stabilità termica per **(TG<sub>3</sub>T)<sub>4</sub>** e strutture G-quadruplex abbastanza stabili per **(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub>**.

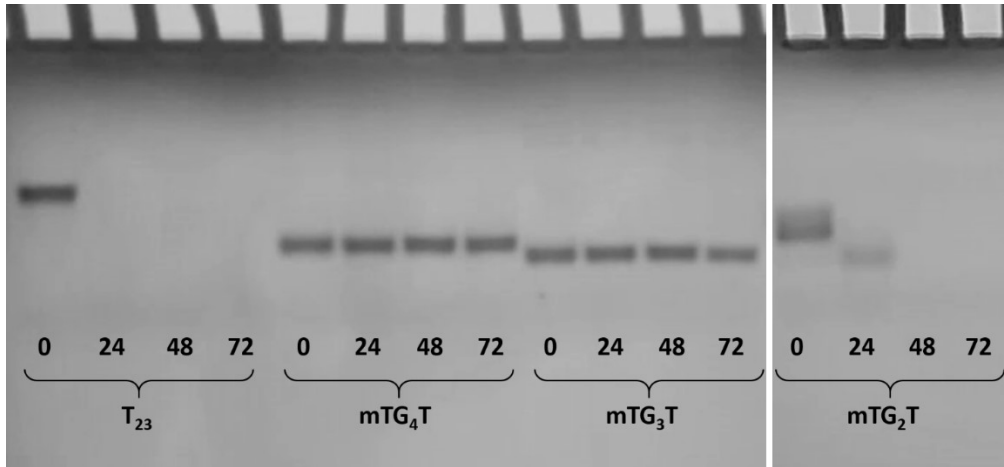


Figura 23. Stabilità degli oligonucleotidi studiati contenenti siti ad inversione di polarità in siero fetale bovino (FBS) al 10% a 0, 24, 48 e 72 h, monitorate mediante PAGE non denaturante. L'oligonucleotide  $T_{23}$  è stato usato come controllo positivo. Vedi la sezione materiali e metodi per i dettagli sperimentali.

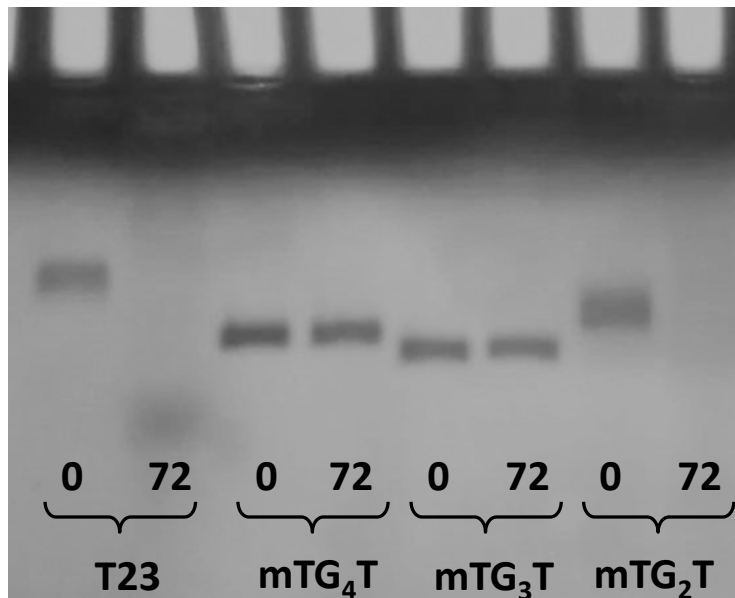


Figura 24. Stabilità degli oligonucleotidi studiati contenenti siti ad inversione di polarità in siero fetale bovino (FBS) al 50%, monitorate mediante PAGE non denaturante. I punti temporali 0 e 72 sono in ore. L'oligonucleotide  $T_{23}$  è stato usato come controllo positivo. Vedi la sezione materiali e metodi per i dettagli sperimentali.

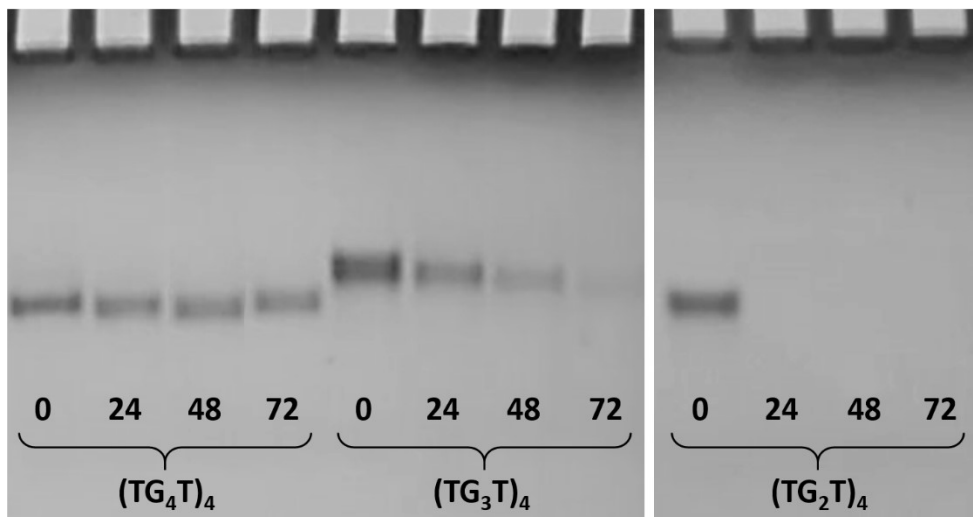


Figura 25. Stabilità degli oligonucleotidi naturali studiati in siero fetale bovino (FBS) al 10% a 0, 24, 48 e 72 h, monitorate mediante PAGE non denaturante. Vedi la sezione materiali e metodi per i dettagli sperimentali.

## CONCLUSIONI

Una delle più importanti ragioni della grande diffusione delle strutture G-quadruplex, della loro presenza in numerosi campi di ricerca e dell'ampia applicabilità in ambito tecnologico è rappresentata dalla loro estrema variabilità strutturale. Oltre a variare la sequenza e le condizioni sperimentali, questa variabilità strutturale può essere incrementata anche attraverso opportune modifiche chimiche. Nel tentativo di sfruttare il potenziale dei siti ad inversione di polarità per estendere il repertorio topologico delle strutture G-quadruplex, il gruppo di ricerca che mi ha ospitato durante l'attività di tesi ha progettato e studiato 3 sequenze contenenti sia siti ad inversione di polarità 3'-3' che 5'-5', caratterizzate da 4 tratti ricchi di G con due, tre e quattro residui. Nei casi di **mTG<sub>3</sub>T** e **mTG<sub>4</sub>T** i dati CD, NMR ed elettroforetici hanno suggerito che essi adottano delle strutture G-quadruplex parallele monomolecolari straordinariamente stabili. Esse sono caratterizzate da una tetrate G *all-syn* all'estremità 5', da due (**mTG<sub>3</sub>T**) o tre

**(mTG<sub>4</sub>T)** tetradi G *all-anti* e tre *loop* laterali TT contenenti un sito ad inversione di polarità 3'-3' e due siti ad inversione di polarità 5'-5'. Sebbene questo tipo di disposizione dei filamenti e sovrapposizione delle G-tetradi siano piuttosto inconsueti, essi sono già stati individuati in sequenze sia naturali che modificate che formano strutture G-quadruplex. Ad esempio, la sequenza ricca di G del promotore dell'oncogene RET forma una struttura G-quadruplex parallela monomolecolare con un arrangiamento delle G-tetrade simile a **mTG<sub>3</sub>T**, caratterizzata da tre *double-chain reversal loop* [40]. Sorprendentemente, l'oligonucleotide TG<sub>3</sub>T, oltre ad adottare una G-quadruplex parallela tetramolecolare con le tetradi di G *all-anti*, forma anche in minore quantità una G-quadruplex parallela tetramolecolare con una tetrade di G *all-syn* e due tetradi *all-anti*. D'altronde, anche gli oligonucleotidi opportunamente modificati contenenti un sito ad inversione di polarità 5'-5' adiacente ad un tratto di G (cioè l'oligonucleotide 3'-T-5'-5'-GGGT-3') o 8-Br [41] o 8-metil-2'-deossiguanosine, tutti in grado di promuovere la conformazione glicosidica *syn*, sono capaci di adottare stabili arrangiamenti delle tetradi di G simili a **mTG<sub>3</sub>T** e **mTG<sub>4</sub>T**. Dovrebbe essere notato che le sequenze naturali simili a **mTG<sub>2</sub>T**, **mTG<sub>3</sub>T** e **mTG<sub>4</sub>T** ma mancanti dei siti ad inversione di polarità, rispettivamente **(TG<sub>2</sub>T)<sub>4</sub>**, **(TG<sub>3</sub>T)<sub>4</sub>** e **(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub>**, nelle stesse condizioni, non sono capaci di formare strutture G-quadruplex o strutture singole caratterizzate da semplici spettri H<sup>1</sup> NMR.

Tutti gli oligonucleotidi studiati hanno mostrato un'interessante attività antiproliferativa contro cellule tumorali polmonari (Calu-6) e cellule tumorali colon-rettali (HCT-116<sup>p53-/-</sup>) mentre non è stato osservato alcun effetto sui normali fibroblasti polmonari. Considerando l'eccellente resistenza di **mTG<sub>3</sub>T** e **mTG<sub>4</sub>T** alla degradazione in siero fetale bovino, la loro attività biologica non può essere attribuita alla citotossicità dei prodotti di degradazione guaninici, come è stato recentemente descritto [38]. Queste considerazioni suggeriscono che l'attività

antiproliferativa di **mTG<sub>3</sub>T** e **mTG<sub>4</sub>T** potrebbe dipendere da specifici *pathway* e target biologici. Numerosi studi hanno riportato che la nucleolina è il principale target coinvolto nell'attività antiproliferativa di vari oligonucleotidi ricchi di G [42-44]. Molto recentemente, valutando la capacità di legarsi alla nucleolina di alcuni oligonucleotidi G-quadruplex, Lago ed altri autori hanno suggerito che questa proteina cellulare si leghi preferenzialmente a strutture G-quadruplex con *loop* di notevoli dimensioni [45]. Inoltre, sebbene non possa essere completamente escluso, è improbabile che la nucleolina sia coinvolta nell'attività antiproliferativa di **mTG<sub>3</sub>T** e **mTG<sub>4</sub>T** visto che i nostri studi sono stati rivolti a strutture G-quadruplex prive di *loop* estesi. Questi dati suggeriscono chiaramente il coinvolgimento di *pathway* biologici non ancora presi in considerazione; esperimenti in quest'ambito sono stati progettati volti ad identificare una nuova probabile proteina target.

Un'interessante caratteristica strutturale, presente nelle G-quadruplex parallele **mTG<sub>3</sub>T** e **mTG<sub>4</sub>T** ma assente nelle G-quadruplex parallele monomolecolari inalterate, è la presenza di entrambe le estremità oligonucleotidiche sullo stesso lato della struttura. Questa caratteristica strutturale è fondamentale nella progettazione di dispositivi molecolari analitici mediante l'approccio FRET in cui molecole *donor* e *quencher* sono legate all'estremità dell'oligonucleotide [46]. Inoltre, la propensione delle strutture G-quadruplex parallele ad interagire con cationi di metalli pesanti [47] e la dipendenza della loro formazione e stabilità dal potassio potrebbe essere sfruttata per progettare più efficienti sistemi molecolari analitici per la rilevazione di questi ioni [48].

Un'ulteriore possibile applicazione delle G-quadruplex parallele monomolecolari contenenti siti ad inversione di polarità qui proposte riguarda il loro potenziale come aptameri anti-HIV. Infatti, in letteratura sono stati descritti due aptameri G-quadruplex paralleli tetramolecolari ovvero l'aptamero di Hotoda [49,50] e ISIS5320 [51] per i quali è stata proposta l'interazione con la glicoproteina HIV 120.

Tuttavia, il loro sviluppo è stato limitato dalla percentuale di formazione abbastanza bassa [52]. Lo svantaggio potrebbe essere evitato attraverso la progettazione di G-quadruplex parallele contenenti siti ad inversione di polarità con le sequenze adatte che, grazie alla loro natura monomolecolare, sarebbero caratterizzate da una più alta percentuale di formazione e stabilità conservando le principali caratteristiche delle strutture G-quadruplex parallele originarie. Un approccio simile è stato applicato con successo nella versione monomolecolare *tetra-end-linked* (TEL-ODNs) dell'aptamero di Hotoda [53,54].

## **Bibliografia**

- [1] Sagi,J. (2014) G-quadruplexes incorporating modified constituents: a review. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **32**, 477-511.
- [2] Galeone,A., Mayol,L., Virgilio,A., Virno,A. and Randazzo,A. (2008) A further contribution to the extreme variability of quadruplex structures from oligodeoxyribonucleotides containing inversion of polarity sites in the G-tract. *Mol. Biosyst.*, **4**, 426-430.
- [3] Esposito,V., Virgilio,A., Pepe,A., Oliviero,G., Mayol,L. and Galeone,A. (2009) Effects of the introduction of inversion of polarity sites in the quadruplex forming oligonucleotide TGGGT. *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 1997-2001.
- [4] Virgilio,A., Esposito,V., Mangoni,A., Mayol,L. and Galeone,A. (2013) A novel equilibrium relating to the helix handedness in G-quadruplexes formed by heterochiral oligonucleotides with an inversion of polarity site. *Chem. Commun. (Camb).*, **49**, 7935-7937.
- [5] Esposito,V., Galeone,A., Mayol,L., Randazzo,A., Virgilio,A. and Virno,A. (2007) A mini-library of TBA analogues containing 3\_-3\_ and 5\_-5\_ inversion of polarity sites. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **26**, 1145-1159.
- [6] Esposito,V., Scuotto,M., Capuozzo,A., Santamaria,R., Varra,M., Mayol,L., Virgilio,A. and Galeone,A. (2014) A straightforward modification in the thrombin binding aptamer improving the stability, affinity to thrombin and nuclease resistance. *Org. Biomol. Chem.*, **12**, 8840-8843.
- [7] Virgilio,A., Amato,T., Petraccone,L., Filosa,R., Varra,M., Mayol,L., Esposito,V. and Galeone,A. (2016) Improved thrombin binding aptamer analogues containing inversion of polarity sites: Structural effects of extra-residues at the ends. *Org. Biomol. Chem.*, **14**, 7707-7714.

- [8] Esposito,V., Russo,A., Amato,T., Varra,M., Vellecco,V., Bucci,M., Russo,G., Virgilio,A. and Galeone,A. (2017) Backbone modified TBA analogues endowed with antiproliferative activity. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, 1861, 1213–1221.
- [9] Jin,R., Gaffney,B.L., Wang,C., Jones,R.a and Breslauer,K.J. (1992) Thermodynamics and structure of a DNA tetraplex: a spectroscopic and calorimetric study of the tetramolecular complexes of d(TG3T) and d(TG3T2G3T). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 8832–8836.
- [10] Aboul-ela,F., Murchie,A.I.H. and Lilley,D.M. (1992) NMR study of parallel-stranded tetraplex formation by the hexadeoxynucleotide d(TG4T). *Nature*, 360, 280–282.
- [11] Do,N.Q., Lim,K.W., Teo,M.H., Heddi,B. and Phan,A.T. (2011) Stacking of G-quadruplexes: NMR structure of a G-rich oligonucleotide with potential anti-HIV and anticancer activity. *Nucleic Acids Res.*, 39, 9448–9457.
- [12] Dalvit,C. (1998) Efficient multiple-solvent suppression for the study of the interactions of organic solvents with biomolecules. *J. Biomol. NMR*, 11, 437–444.
- [13] Jeener,J., Meier,B.H., Bachmann,P. and Ernst,R.R. (1979) Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy. *J. Chem. Phys.*, 71, 4546.4553
- [14] Braunschweiler,L. and Ernst,R.R. (1983) Coherence transfer by isotropic mixing: application to proton correlation spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, 53, 521–528.
- [15] Marion,D., Ikura,M., Tschudin,R. and Bax,A. (1989) Rapid recording of 2D NMR spectra without phase cycling. Application to the study of hydrogen exchange in proteins. *J. Magn. Reson.*, 85, 393–399.
- [16] Bunz,F., Dutriaux,A., Lengauer,C., Waldman,T., Zhou,S., Brown,J.P., Sedivy,J.M., Kinzler,K.W. and Vogelstein,B. (1998) Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*, 282, 1497–1501.
- [17] Esposito,D., Crescenzi,E., Sagar,V., Loreni,F., Russo,A. and Russo,G. (2014) Human rpl3 plays a crucial role in cell response to nucleolar stress induced by 5-FU and L-OHP. *Oncotarget*, 5, 11737–11751.
- [18] Di Villa Bianca,R.D. emmanuele, Mitidieri,E., Esposito,D., Donnarumm,E., Russo,A., Fusco,F., Ianaro,A., Mirone,V., Cirino,G., Russo,G. et al. (2015) Human cystathionine--synthase phosphorylation on serine227 modulates hydrogen sulfide production in human urothelium. *PLoS One*, 10, 1–16.
- [19] Russo,A., Pagliara,V., Albano,F., Esposito,D., Sagar,V., Loreni,F., Irace,C., Santamaria,R. and Russo,G. (2016) Regulatory role of rpl3 in cell response to nucleolar stress induced by act D in tumor cells lacking functional p53. *Cell Cycle*, 15, 41–51.
- [20] Maiolino,S., Russo,A., Pagliara,V., Conte,C., Ungaro,F., Russo,G. and Quaglia,F. (2015) Biodegradable nanoparticles sequentially decorated with Polyethyleneimine and Hyaluronan for the targeted delivery of docetaxel to airway cancer cells. *J. Nanobiotechnology*, 13, 29.
- [21] De Filippis,D., Russo,A., De Stefano,D., Cipriano,M., Esposito,D., Grassia,G., Carnuccio,R., Russo,G. and Iuvone,T. (2014) Palmitoylethanolamide inhibits rMCP-5 expression by regulating MITF activation in rat chronic granulomatous inflammation. *Eur. J. Pharmacol.*, 725, 64–69.

- [22] Feigon, J., Koshlap, K.M. and Smith, F.W. (1995) <sup>1</sup>H NMR spectroscopy of DNA triplexes and quadruplexes. *Methods Enzymol.*, **261**, 225–255.
- [23] Wuthrich, K. (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids* John Wiley and Sons, NY.
- [24] Patel, P.K., Bhavesh, N.S. and Hosur, R. V (2000) Cation-dependent conformational switches in d-TGGCGGC containing two triplet repeats of Fragile X Syndrome: NMR observations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **278**, 833–838.
- [25] Patel, P.K. and Hosur, R. V. (1999) NMR observation of T-tetrads in a parallel stranded DNA quadruplex formed by *Saccharomyces cerevisiae* telomere repeats. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 2457–2464.
- [26] Aboul-ela, F., Murchie, A.I.H., Norman, D.G. and Lilley, D.M.J. (1994) Solution structure of a parallel-stranded tetraplex formed by d(TG4T) in the presence of sodium ions by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.*, **243**, 458–471.
- [27] Smith, F.W. and Feigon, J. (1993) Strand orientation in the DNA quadruplex formed from the *Oxytricha* telomere repeat oligonucleotide d(G4T4G4) in solution. *Biochemistry*, **32**, 8682–8692.
- [28] Yu Wang, K., McCurdy, S., Shea, R.G., Swaminathan, S. and Bolton, P.H. (1993) A DNA Aptamer Which Binds to and Inhibits Thrombin Exhibits a New Structural Motif for DNA. *Biochemistry*, **32**, 1899–1904.
- [29] Virgilio, A., Esposito, V., Randazzo, A., Mayol, L. and Galeone, A. (2005) Effects of 8-methyl-2'-deoxyadenosine incorporation into quadruplex forming oligodeoxyribonucleotides. *Bioorganic Med. Chem.*, **13**, 1037–1044.
- [30] Karsisiotis, A.I., O' Kane, C. and Webba da Silva, M. (2013) DNA quadruplex folding formalism – a tutorial on quadruplex topologies. *Methods*, **64**, 28–35. 42.
- [31] Esposito, V., Galeone, A., Mayol, L., Oliviero, G., Virgilio, A. and Randazzo, L. (2007) A topological classification of G-quadruplex structures. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*, **26**, 1155–1159.
- [32] Masiero, S., Trotta, R., Pieraccini, S., De Tito, S., Perone, R., Randazzo, A. and Spada, G.P. (2010) A non-empirical chromophoric interpretation of CD spectra of DNA G-quadruplex structures. *Org. Biomol. Chem.*, **8**, 2683–2692.
- [33] Vorlíčková, M., Kejnovská, I., Sagi, J., Renčíuk, D., Bednářová, K., Motlová, J. and Kypr, J. (2012) Circular dichroism and guanine quadruplexes. *Methods*, **57**, 64–75.
- [34] Kypr, J., Kejnovská, I., Renčíuk, D. and Vorlíčková, M. (2009) Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 1713–1725.
- [35] Tran, P.L.T., Mergny, J.L. and Alberti, P. (2011) Stability of telomeric G-quadruplexes. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 3282–3294.
- [36] Thao Tran, P.L., Virgilio, A., Esposito, V., Citarella, G., Mergny, J.L. and Galeone, A. (2011) Effects of 8-methylguanine on structure, stability and kinetics of formation of tetramolecular quadruplexes. *Biochimie*, **93**, 399–408.
- [37] Virgilio, A., Esposito, V., Randazzo, A., Mayol, L. and Galeone, A. (2005) 8-Methyl-2'-deoxyguanosine incorporation into parallel DNA quadruplex structures. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 6188–6195.



- [38] Zhang,N., Bing,T., Liu,X., Qi,C., Shen,L., Wang,L. and Shangguan,D. (2015) Cytotoxicity of guanine-based degradation products contributes to the antiproliferative activity of guanine-rich oligonucleotides. *Chem. Sci.*, **6**, 3831-3838.
- [39] Bates,P.J., Laber,D.A., Miller,D.M., Thomas,S.D. and Trent,J.O. (2009) Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer. *Exp. Mol. Pathol.*, **86**, 151-164.
- [40] Tong,X., Lan,W., Zhang,X., Wu,H., Liu,M. and Cao,C. (2011) Solution structure of all parallel G-quadruplex formed by the oncogene RET promoter sequence. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 6753-6763.
- [41] Karg,B., Haase,L., Funke,A., Dickerhoff,J. and Weisz,K. (2016) Observation of a dynamic G-tetrad flip in intramolecular G-quadruplexes. *Biochemistry*, **55**, 6949-6955.
- [42] Bates,P.J., Kahlon,J.B., Thomas,S.D., Trent,J.O. and Miller,D.M. (1999) Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides correlates with protein binding. *J. Biol. Chem.*, **274**, 26369-26377.
- [43] Girvan,A.C., Teng,Y., Casson,L.K., Thomas,S.D., Juliger,S., Ball,M.W., Klein,J.B., Pierce,W.M., Barve,S.S. and Bates,P.J. (2006) AGRO100 inhibits activation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) by forming a complex with NF-kappaB essential modulator (NEMO) and nucleolin. *Mol. Cancer Ther.*, **5**, 1790-1799.
- [44] Teng,Y., Girvan,A.C., Casson,L.K., Pierce,W.M., Qian,M., Thomas,S.D. and Bates,P.J. (2007) AS1411 alters the localization of a complex containing protein arginine methyltransferase 5 and nucleolin. *Cancer Res.*, **67**, 10491-10500.
- [45] Lago,S., Tosoni,E., Nadai,M., Palumbo,M. and Richter,S.N. (2017) The cellular protein nucleolin preferentially binds long-looped G-quadruplex nucleic acids. *BBA - Gen. Subj.*, **1861**, 1371-1381.
- [46] Juskowiak,B. (2006) Analytical potential of the quadruplex DNA-based FRET probes. *Anal. Chim. Acta*, **568**, 171-180.
- [47] Xu,H., Zhan,S., Zhang,D., Xia,B., Zhan,X., Wang,L. and Zhou,P. (2015) A label-free fluorescent sensor for the detection of Pb<sup>2+</sup> and Hg<sup>2+</sup>. *Anal. Methods*, **7**, 6260-6265.
- [48] Li,T., Dong,S. and Wang,E. (2010) A lead(II)-driven DNA molecular device for turn-on fluorescence detection of lead(II) ion with high selectivity and sensitivity. *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 13156-13157.
- [49] Koizumi,M., Akahori,K., Ohmine,T., Tsutsumi,S., Sone,J., Kosaka,T., Kaneko,M., Kimura,S. and Shimada,K. (2000) Biologically active oligodeoxyribonucleotides. Part 12:1 N<sup>2</sup>-methylation of 2'-deoxyguanosines enhances stability of parallel G-quadruplex and anti-HIV-1 activity. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **10**, 2213-2216.
- [50] Virgilio,A., Esposito,V., Citarella,G., Mayol,L. and Galeone,A. (2012) Structural investigations on the anti-HIV G-quadruplex-forming oligonucleotide TGGGAG and its analogues: evidence for the presence of an A-tetrad. *ChemBioChem.*, **13**, 2219-2224.
- [51] Stoddart,C.A., Rabin,L., Hincenbergs,M., Moreno,M.E., Linquist-Stepps,V., Leeds,J.M., Truong,L.A., Wyatt,J.R., Ecker,D.J. and Mccune,J.M. (1998) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infection in SCID-hu Thy/Liv mice by the G-quartet-forming oligonucleotide, ISIS 5320. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**, 2113-2115.

- [52] Wyatt,J.R., Davis,P.W. and Freier,S.M. (1996) Kinetics of G-quartet-mediated tetramer formation. *Biochemistry*, 35, 8002–8008.
- [53] Oliviero,G., Borbone,N., Amato,J., D’Errico,S., Galeone,A., Piccialli,G., Varra,M. and Mayol,L. (2009) Synthesis of quadruplex-forming tetra-end-linked oligonucleotides: effects of the linker size on quadruplex topology and stability. *Biopolymers*, 91, 466–477.
- [54] Oliviero,G., Amato,J., Borbone,N., D’Errico,S., Galeone,A., Mayol,L., Haider,S., Olubiyi,O., Hoorelbeke,B., Balzarini,J. et al. (2010) Tetra-end-linked oligonucleotides forming DNA G-quadruplexes: a new class of aptamers showing anti-HIV activity. *Chem. Commun. (Camb)*, 46, 8971–8973.

## **CAPITOLO 6: APTAMERI ANTI-INTEGRASI HIV**

### **6.1 Miglioramento dell'attività dell'aptamero anti-HIV-1 integrasi T30175 introducendo una timidina modificata nei loop**

#### **INTRODUZIONE**

La maggior parte degli aptameri G-quadruplex, la cui struttura è stata accertata o ipotizzata, sono caratterizzati dalla presenza di *loop* con uno o due residui che connettono i tratti di G e che si proiettano verso l'esterno. Questa categoria include gli aptameri anti-HIV-1 integrasi (IN) T30923 [1] (dotato anche di affinità per il recettore per interleuchina-6) (IL-6) [2], T30175 [3] (e le loro versioni contenenti legami fosforotioati, ossia T30695 e T30177, rispettivamente) e 93del [4,5], gli aptameri anticoagulanti aventi come target la trombina TBA [6] e NU172 [7], l'aptamero anti-STAT3 T40214 [1,8] e l'aptamero anti-HIV-1 e antiproliferativo avente come target la nucleolina, AS1411 [9,10]. Considerando il loro tipo di conformazione, è abbastanza ragionevole presumere che la maggior parte della stabilità strutturale in questi aptameri formanti G-quadruplex dipenda dal *core* compatto formato dalle tetradi di G sovrapposte mentre i residui dei *loop* esterni e più accessibili sono maggiormente responsabili dell'interazione con la proteina target.

La proteina codificata dal virus HIV-1 IN è un dimero di dimeri [11]. La parte centrale e l'estremità C-terminale che lega il DNA (quest'ultimo somigliante ad un dominio SH3), mostrano una capacità di legare il DNA non specifica ma piuttosto notevole. [12]. HIV-1 IN permette l'integrazione del genoma HIV-1 nel cromosoma della cellula ospite e rappresenta un target molecolare virale ben accertato che è stato già studiato per lo sviluppo di piccole molecole leganti o il suo sito catalitico [13] o i siti di legame allosterici [12,14]. Nonostante il fatto che gli inibitori dell'integrasi

siano già disponibili in terapia, l'identificazione di nuovi farmaci con un'innovativa modalità d'azione e potenzialmente in grado di superare la selezione di specie farmaco resistenti, è ancora un'emergenza [15-19]. Tra questi, gli aptameri sono una classe molto promettente di inibitori dell'integrasi. Inoltre, è stato anche suggerito che la cavità carica positivamente formata all'interfaccia del dimero di dimeri nella struttura cristallina di HIV-1 IN (PB code 1K6Y) sia un sito adatto per legare il DNA e l'aptamero 93del [4,11,20].

In generale, la sequenza naturale iniziale di un aptamero è successivamente soggetta a numerose modifiche chimiche dirette a migliorare la sua stabilità termica, migliorare l'affinità e la specificità per il target, incrementare la resistenza in ambienti biologici e ottenere utili dati concernenti l'interazione con il target [21]. Da questo punto di vista, il TBA (*Thrombin Binding Aptamer*) rappresenta l'esempio più ovvio dal momento che è stato sottoposto ad una pletora di modifiche chimiche riguardanti in particolare, i suoi *loop* che sono i responsabili dell'interazione con la trombina [6].

Contrariamente al grande numero di studi riguardanti gli analoghi e i derivati del TBA, solo qualche studio simile ha riguardato gli altri aptameri. Ad esempio, nei casi degli aptameri T30923, T30175 e 93del sono noti solo pochi studi concernenti modifiche sito specifiche [3-4], sebbene l'importanza dei *loop* nell'interazione con il loro target comune, ovvero HIV-1 IN, sia stata chiaramente suggerita [20,22]. La struttura dell'aptamero T30923 [(GGGT)<sub>4</sub>] [1,23] e quella del suo analogo T30175 [GTGGT(GGGT)<sub>3</sub>] strettamente correlato [3] sono state studiate mediante CD, NMR, elettroforesi su gel e dinamica molecolare. Entrambi formano un dimero testa-testa di due identiche G-quadruplex parallele sovrapposte all'estremità 5'-5', ciascuna caratterizzata da tre tetradi di G e tre *propeller loop* che consistono in una sola timidina. In particolare, rispetto a T30923, ciascuna G-quadruplex del dimero T30175 è caratterizzata da un'ulteriore *bulge-loop* formato da una timidina extra in

seconda posizione nella sequenza (Figura 1). Pertanto, considerando la sua natura dimerica, l'aptamero anti-HIV IN T30175 è complessivamente caratterizzato da 8 *loop*, ciascuno costituito da un'unica timidina, che possono essere considerati potenziali siti d'interazione con la proteina target. Queste considerazioni rendono i residui di timidina che costituiscono i *loop* di T30175 candidati ideali per gli studi di relazione struttura-attività basati sulle sostituzioni sito specifiche e indirizzati a migliorare l'attività biologica ed ottenere dati relativi all'interazione target-ligando. Un ulteriore vantaggio in questi studi è la disponibilità commerciale di numerosi analoghi timidinici, che facilita l'esplorazione dello spazio chimico. In questo contesto, è stato scelto l'analogo della timidina 5-idrossimetil-2'-deossiuridina (**H**) tenendo in considerazione le seguenti caratteristiche: 1) la presenza di un gruppo idrossimetilico rappresenta una variazione ridotta rispetto alla sua controparte naturale, che influenza al minimo la struttura della base; 2) esso cambia la natura lipofila del gruppo metilico in posizione 5, in quella idrofila del gruppo idrossimetilico, potenzialmente capace di formare interazioni polari e/o un legame H con il target, sia come donatore che come accettore e 3) è già stato introdotto con successo nel TBA, migliorando in tal modo la sua attività biologica [24].

In questo lavoro, sono riportati studi CD, NMR, PAGE, di modellistica molecolare e di valutazione biologica di 5 analoghi di T30175 preparati mediante sostituzione sito specifica, una alla volta, di ciascuna timidina in sequenza con un residuo 5-idrossimetil-2'-deossiuridina, a confronto con la loro controparte naturale (**INTB-nat**) (Tabella 1 e Figura 1). I dati raccolti indicano un rilevante miglioramento dell'attività biologica (in dipendenza dalla posizione del residuo **H** all'interno della sequenza), sebbene la presenza del nucleoside modificato non influenzi le caratteristiche strutturali peculiari di T30175.

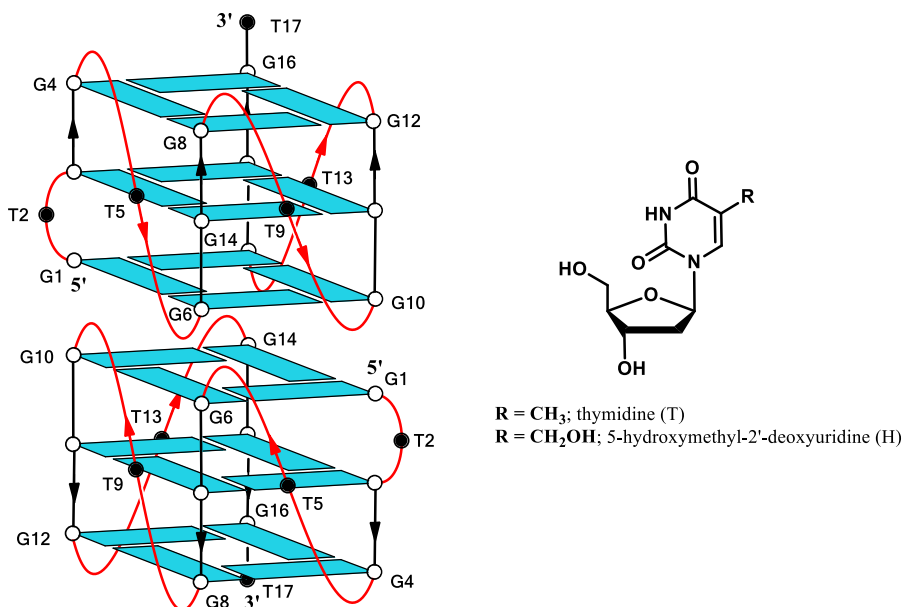


Figura 1. Rappresentazione schematica della struttura G-quadruplex dimerica adottata dall'aptamero T30175 e della struttura chimica della timidina (T) e della 5-idrossimetil-2'-deossiridina (H) introdotte nelle posizioni 2, 5, 9, 13, e 17. Tutte le guanosine adottano conformazioni glicosidiche anti (in azzurro). Le timidine sono rappresentate da cerchi neri.

Name	Sequence*	T <sub>m</sub> (°C) (±1)	Binding energy (Kcal/mol)
<b>INTB-nat</b> (T30175)	5'-GTGGTGGGTGGGTGGGT-3'	61	-110.0
<b>INTB-H2</b>	5'-GHGGTGGGTGGGTGGGT-3'	63	-139.1
<b>INTB-H5</b>	5'-GTGGHGGGTGGGTGGGT-3'	62	-137.2
<b>INTB-H9</b>	5'-GTGGTGGGHGGGTGGGT-3'	61	-133.4
<b>INTB-H13</b>	5'-GTGGTGGGTGGGHGGGT-3'	63	-132.2
<b>INTB-H17</b>	5'-GTGGTGGGTGGGTGGGH-3'	59	-132.9
<b>TT-INTB-nat</b>	5'-TTGTGGTGGGTGGGTGGGT-3'	74	N.T.

\*H = 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine; see main text for details. N.T.= not tested

Tabella 1. Nome, sequenza, temperatura di *melting* ed energia di legame con HIV-1 IN degli oligonucleotidi studiati.

## 6.1.1 SEZIONE SPERIMENTALE

### *Sintesi e purificazione degli oligonucleotidi*

Gli oligodeossiribonucleotidi (ODNs) riportati in Tabella 1 sono stati sintetizzati mediante un sintetizzatore Millipore Ciclone Plus DNA sfruttando la chimica in fase solida dei  $\beta$ -cianoetilfosforamiditi su scala 15  $\mu$ mol. Il monomero modificato 5-idrossimetil-2'-deossiuridina (H) è stato introdotto nelle sequenze usando il 5'-dimetossitritil-5-acetossimetil-2'-deossiuridina-3'-[(2-cianoetil) - (N,N-diisopropil)]-fosforamidito disponibile commercialmente (*Glen Research*). Per l'oligonucleotide **INTB-H17** è stato usato un supporto universale. Gli oligomeri sono stati rimossi dal supporto solido e deprotetti mediante trattamento con una soluzione acquosa di ammoniaca concentrata a 80% per 12h. La miscela è stata quindi filtrata, lavata e successivamente concentrata a pressione ridotta. In seguito è stata ridisciolta in H<sub>2</sub>O ed analizzata e purificata mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) su una colonna Nucleogel SAX (Macherey–Nagel, 1000-8/46) usando gli eluenti: tampone A: 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in soluzione acquosa (pH 7.0) contenente 20% (v/v) CH<sub>3</sub>CN e tampone B: 1 M KCl, 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in soluzione acquosa (pH 7.0) contenente 20% (v/v) CH<sub>3</sub>CN. Per l'eluizione del campione è stato usato un gradiente lineare 0% B→100%B in 45 min ad un flusso di 1.0 ml/min. Le frazioni degli oligomeri sono state raccolte e successivamente desalificate su colonne Sep-Pak (C18). Gli oligomeri isolati sono risultati puri all'NMR più del 98%.

### *Spettroscopia CD*

I campioni CD degli oligonucleotidi riportati in Tabella 1 sono stati preparati ad una concentrazione di oligonucleotide di 35  $\mu$ M utilizzando un tampone fosfato di potassio (1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM KCl, pH 7.0) e sottoposti alla procedura di

*annealing* (riscaldando a 90°C e facendo raffreddare lentamente a temperatura ambiente). Per tutti i campioni, gli spettri CD e le curve di fusione CD sono stati registrati su uno spettrofotometro Jasco 715 CD. Per gli spettri CD, la lunghezza d'onda è stata variata da 220 nm a 320 nm alla velocità di scansione di 100 nm min<sup>-1</sup> e gli spettri sono stati registrati con una risposta di 4 s e un'ampiezza di banda di 1.0 nm. Agli spettri dei campioni è stato sottratto lo spettro del tampone. La temperatura è stata mantenuta costante a 20 °C con una cella programmabile termoelettricamente controllata (JASCO PTC-348). Per tutti i campioni, le curve di *melting* sono state registrate in funzione della temperatura (range: 20 °C- 90 °C) in corrispondenza del loro massimo effetto Cotton. I dati CD sono stati registrati utilizzando una cuvetta con un cammino ottico di 0,1 cm e con una velocità di scansione di 10 °C/min. Le analisi van't Hoff [25] sono state eseguite sulle curve di *melting* CD assumendo come unità cooperativa il dimerico o il monomero. Le variazioni di entalpia ( $\Delta H_{vH}$ ) forniscono il miglior adattamento dei dati sperimentali di *melting* (Tabella 2).

### **Risonanza Magnetica Nucleare**

I campioni NMR sono stati preparati ad una concentrazione di circa 2 mM in 0.6 ml (H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1 v/v) di una soluzione tampone a pH 7, 10 mM di KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 70 mM di KCl e 0.2 mM di EDTA. Tutti i campioni sono stati riscaldati per 5-10 min a 90 °C e lentamente raffreddati (10-12 ore) a temperatura ambiente. Le soluzioni sono state equilibrate per 24-48 ore a 4°C. Il processo di *annealing* è stato ritenuto completo quando gli spettri H<sup>1</sup> NMR risultavano sovrapponibili al variare del tempo. Gli spettri NMR sono stati registrati su uno spettrometro Varian Unity INOVA 500 MHz. Gli spettri protonici monodimensionali dei campioni in H<sub>2</sub>O sono stati registrati usando la sequenza di gradienti DPGSE per la soppressione del segnale dell'acqua [26]. I segnali relativi ai protoni del sodio 2,2-dimetil-2-silapentan-5-



solfonato (DSS) sono stati usati come riferimento per i *chemical shift* dei protoni ( $^1\text{H}$ ).

### ***Elettroforesi su gel***

Tutti gli oligonucleotidi sono stati analizzati mediante PAGE non denaturante. I campioni nel tampone CD (1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 3 mM KCl, pH 7.0) sono stati caricati su un gel di poliacrilammide al 20% contenente Tris-Borato-EDTA (TBE) 2.5x e KCl 5 mM. Il tampone di corsa utilizzato è stato TBE 1x contenente 10 mM KCl. Per tutti i campioni, appena prima di caricare è stata aggiunta una soluzione di glicerolo/TBE 10x. L'elettroforesi è stata eseguita a  $8 \text{ V cm}^{-1}$  ad una temperatura prossima a  $10^\circ\text{C}$ . Le bande sono state visualizzate mediante *UV shadowing*.

### ***Saggio Homogeneous Time Resolved Fluorescence (HTRF) IN.***

La proteina completa HIV-1 IN è stata espressa in *Escherichia coli* BL21 (DE3) e purificata come descritto [27,28]. Il saggio HIV-1 IN permette la misura dell'inibizione del processo di trasferimento 3' del filamento ed è stata eseguita con le seguenti modifiche rispetto alla metodologia descritta [28]. Brevemente, 50 nM di integrasi sono stati preincubati con concentrazioni crescenti dei composti per 1 h a temperatura ambiente in un tampone di reazione contenente 10 mM HEPES pH 7.5, 1 mM DTT, 1% Glicerolo, 40 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.05% Brij-35 e 0.1 mg/ml BSA. A questa miscela sono stati aggiunti 100 nM di DNA substrato donatore (5'-ACAGGCCTAGCACGCGTTCG-Biotina-3' ibridati con 5'-CGACGCGTGGTAGGCCTGT-Biotina-3') e 50 nM di DNA substrato accettore (5'-Cy5-ATGTGGAAAATCTCTAGCAGT-3' ibridati con 5'-Cy5-TGAGCTCGAGATTTTCCACAT-3') ed è stata incubata a  $37^\circ\text{C}$  per 90 min. Dopo l'incubazione, alla miscela di reazione sono stati aggiunti 4 nM di *Europium-Streptavidine* e il segnale HTRF è stato registrato usando uno strumento Perkin Elmer Victor 3 *plate reader* a 314 nm per

la lunghezza d'onda di eccitazione e 668 e 620 nm per le lunghezze d'onda di emissione dei substrati accettori e donatori, rispettivamente.

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

### ***Caratteristiche strutturali e stabilità degli oligonucleotidi studiati***

Un'importante questione di questo studio è verificare se gli oligonucleotidi modificati sono capaci di adottare una struttura G-quadruplex parallela e formare il dimero caratteristico della sequenza naturale originaria. Al fine di affrontare questo punto, gli analoghi modificati di T30175 sono stati analizzati mediante  $^1\text{H-NMR}$  e confrontati con la loro controparte non modificata (Figura 2). Un confronto diretto tra le regioni dei protoni immidici diagnostiche della presenza di strutture G-quadruplex (10.5-12.0 ppm) suggerisce chiaramente che le strutture G-quadruplex adottate dagli oligonucleotidi modificati contenenti un residuo **H** somigliano strettamente a quella della loro controparte naturale GTGGT(GGGT)<sub>3</sub> (T30175).

Con l'obiettivo di confermare i dati  $^1\text{H-NMR}$ , sono stati acquisiti anche gli spettri CD degli aptameri T30175 modificati e confrontati con quello della loro controparte naturale e con l'oligonucleotide TTGTGGT(GGGT)<sub>3</sub> (**TT-INTB-nat**), corrispondente alla sequenza di T30175, allungata con due timidine extra all'estremità 5' che, secondo altri autori [3], impediscono la formazione del dimero 5'-5' testa-testa (Figura 3). L'aptamero non modificato T30175 mostra una banda negativa minore a 242 nm e una banda positiva maggiore a 263 nm, che sono caratteristiche delle strutture G-quadruplex parallele in cui tutte le guanosine adottano conformazioni glicosidiche *anti*. A parte trascurabili differenze in intensità, i profili CD delle sequenze modificate sono quasi sovrapponibili a quella della sequenza naturale,

suggerendo fortemente che essi adottano strutture G-quadruplex parallele strettamente somiglianti a quella dell'aptamero originario T30175, in accordo con i risultati NMR. Inoltre, le temperature di *melting* ( $T_m$ ) valutate attraverso i profili di riscaldamento CD degli oligonucleotidi modificati e della loro sequenza naturale (Figura 4) hanno mostrato chiaramente valori molto simili (tenendo conto dell'errore sperimentale) (Tabella 1), indicando quindi che, nelle condizioni sperimentali usate (vedi sotto), la presenza nella sequenza di un residuo **H** non influenza significativamente la conformazione adottata dalla sequenza originaria e la sua stabilità termica. Un dato interessante è che, sebbene il profilo CD di **TT-INTB-nat** conservi le principali caratteristiche di una G-quadruplex parallela con tutte le *G-anti*, esso mostra un leggero spostamento del massimo a lunghezze d'onda più alte. Tuttavia, poichè questo dato non fornisce una chiara evidenza della presenza di dimeri per le sequenze modificate, quest'ultime sono state analizzate mediante PAGE (Figura 5) paragonate alla sequenza naturale **INTB-nat** (capace di formare un dimero) e **TT-INTB-nat** (in cui la formazione del dimero è impedita dalle timidine extra in 5'). I risultati del PAGE hanno indicato chiaramente che **INTB-nat** e tutti gli oligonucleotidi contenenti un residuo **H** mostrano bande a migrazione più lenta, che sono attribuibili alla struttura dimerica, mentre TT-INTB mostra una banda che migra più velocemente, indicativa della presenza di una G-quadruplex monomeric. Per confrontare ulteriormente il comportamento durante la fusione delle sequenze studiate, è stata eseguita un'analisi di van't Hoff sui profili di *melting* CD sulla base di un meccanismo di destrutturazione a due stati. Innanzitutto, le variazioni di entalpia per il processo di destrutturazione sono state ottenute supponendo un processo a due stati in cui l'unità cooperativa è l'intero dimero (cioè la dissociazione è concomitante al processo di destrutturazione). I valori di entalpia forniti da questo modello (Tabella 2) variano tra 131 KJ/mol (**INTB-H5**) e 175 KJ/mol (**INTB-H13**). Questi valori sono sorprendentemente piccoli se confrontati alla variazione di

entalpia (255 KJ/mol) ottenuta per la sequenza che forma la struttura G-quadruplex singola (**TT-INTB-nat**). Inoltre, questi bassi valori di entalpia sono completamente inaspettati sulla base della struttura dimerica NMR di T30175 che mostra un'addizionale interazione monomero-monomero che dovrebbe condurre ad un contributo entalpico extra all'entalpia di destrutturazione del monomero. Tuttavia, questi valori entalpici contraddittori potrebbero essere il risultato dell'inadeguatezza del modello basato sull'assunzione che l'intero dimero fonda cooperativamente. In seguito a queste considerazioni, è stato deciso di adattare i dati considerando la singola G-quadruplex come un'unità cooperativa; questo equivale ad assumere che il dimero dissoci ad una temperatura molto al di sotto della temperatura di *melting* osservata e che il profilo di *melting* rifletta principalmente la destrutturazione del monomero. Le variazioni di entalpia ottenute con questo modello sono molto più coerenti con gli altri dati (Tabella 2). Infatti, le variazioni di entalpia per le sequenze modificate sono vicine (all'interno dell'errore sperimentale) al valore ottenuto per la sequenza non modificata, come atteso sulla base della similarità delle loro strutture (come dimostrato da NMR e CD). Inoltre, i valori di variazione di entalpia sono comparabili con il valore ottenuto per la sequenza **TT-INTB-nat** e vicini al valore atteso per una G-quadruplex monomerica contenente tre tetradi di G [29,30]. Tutti insieme, questi dati sono in accordo con l'ipotesi secondo cui la modifica chimica non cambia drasticamente la struttura di T30175 o il suo meccanismo di destrutturazione.

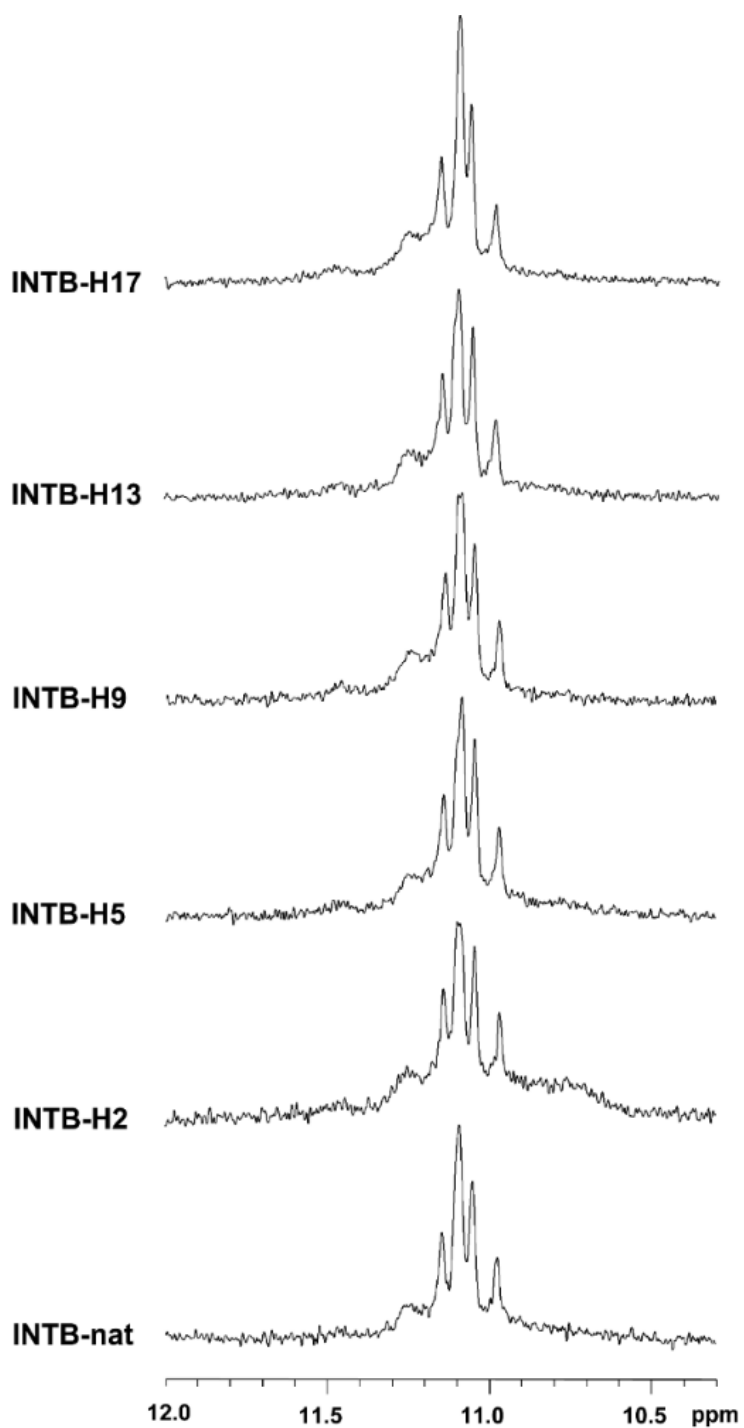


Figura 2. Regioni dei protoni immidici degli spettri <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz) degli oligonucleotidi studiati. Vedi il testo principale per i dettagli.

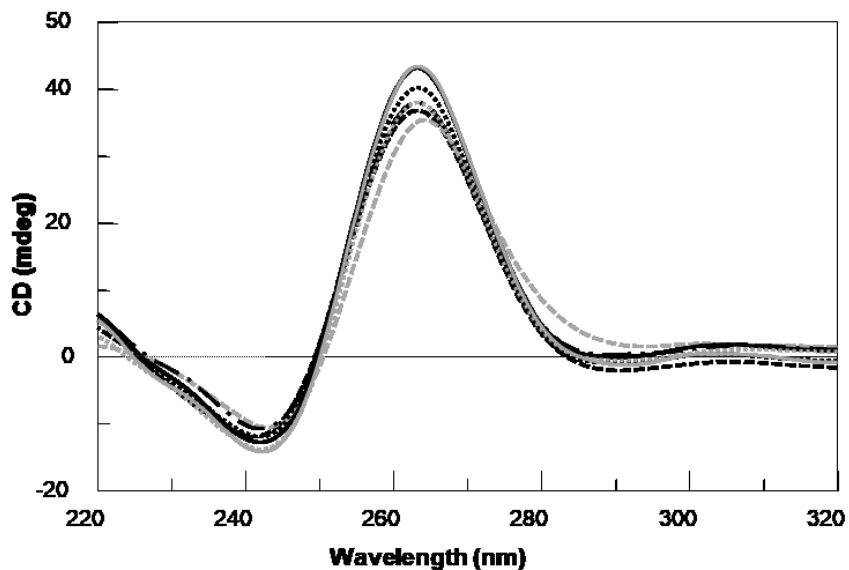


Figura 3. Spettri CD degli oligonucleotidi studiati. Condizioni: 20°C tampone fosfato di potassio (1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 3 mM KCl, pH 7.0) a concentrazione di oligonucleotide 35  $\mu\text{M}$ . **INTB-nat** (linea nera tratteggiata), **TT-INTB-nat** (linea grigia tratteggiata), **INTB-H2** (linea nera punto-trattino), **INTB-H5** (linea nera continua), **INTB-H9** (linea nera punteggiata), **INTB-H13** (linea grigia punteggiata), **INTB-H17** (linea grigia continua).

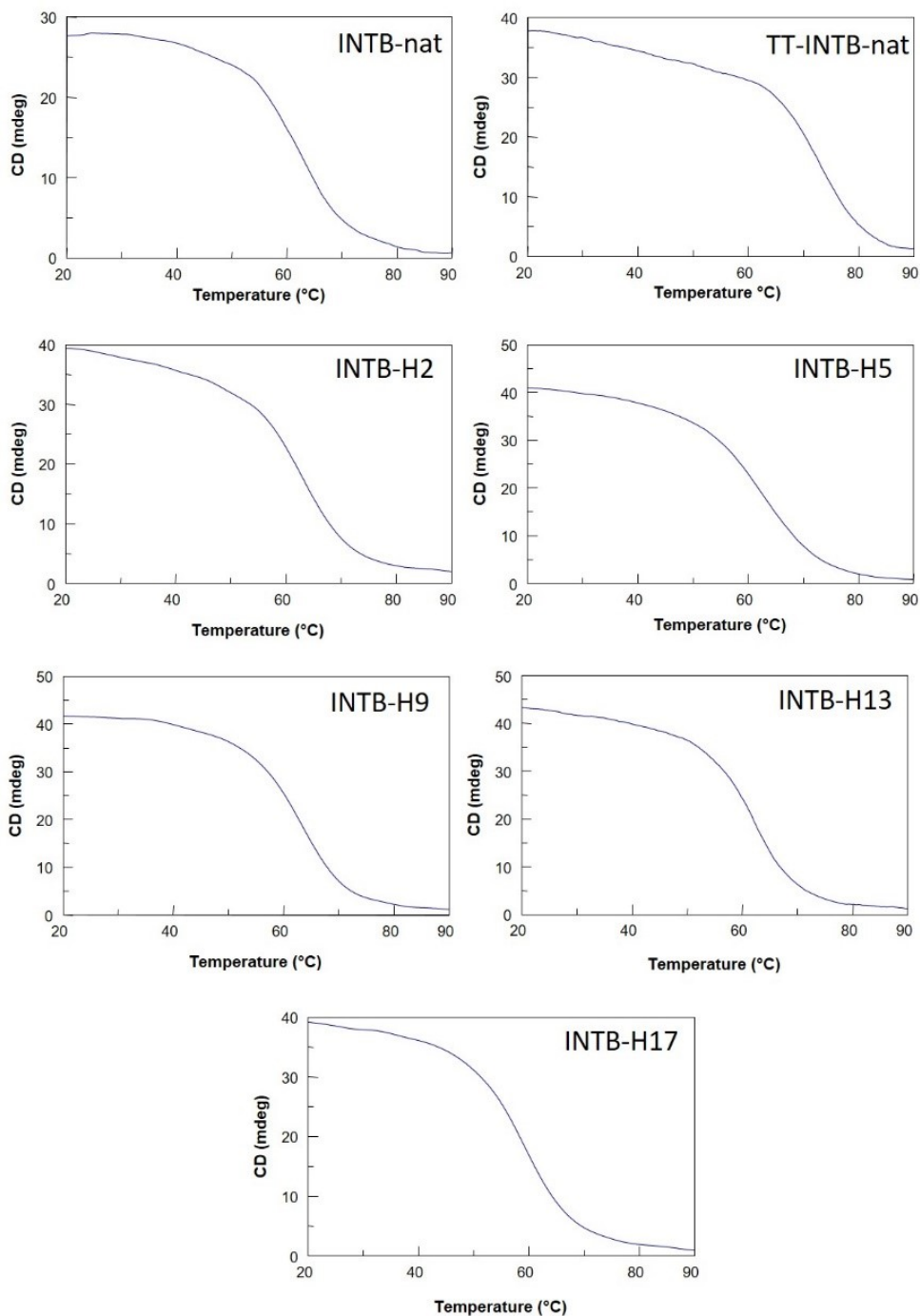


Figura 4. Curve di *melting* CD degli aptameri analoghi di T30175 studiati e i loro riferimenti oligonucleotidici INTB-nat e TT-INTB-nat.

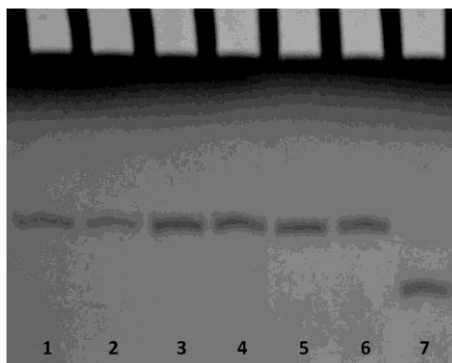


Figura 5. Analisi PAGE delle sequenze oligonucleotidiche naturale e modificate studiate. Linea 1: INTB-nat; linea 2: INTB-H2; linea 3: INTB-H5; linea 4: INTB-H9; linea 5: INTB-H13; linea 6: INTB-H17; linea 7: TT-INTB-nat.

Sequence	$\Delta H_{v.H.}$ (kJ/mol) <sup>a</sup>	$\Delta H_{v.H.}$ (kJ/mol)
	Unfolding model	
	Q <sub>2</sub> → 2S	Q → S
INTB-nat (T30175)	154	225
INTB-H2	167	220
INTB-H5	131	200
INTB-H9	148	205
INTB-H13	175	238
INTB-H17	155	210
TT-INTB-nat	-	255

<sup>a</sup> Enthalpy changes are reported per mole of monomer.  
Errors on  $\Delta H_{v.H.}$  is within  $\pm 10\%$ .

Tabella 2. Variazioni di entalpia ottenute dalle analisi di van't Hoff delle curve di *melting* CD usando differenti modelli di destrutturazione.

### **Valutazione dell'attività anti-HIV IN**

Finora sono stati identificati diversi inibitori di HIV-1 IN capaci di interferire con l'attività catalitica di HIV-1 IN o capaci di agire come inibitori allosterici. Questi inibitori includono piccole molecole [18,19,27], peptidi [31] e composti naturali



[15,16,32]. Inoltre, oligonucleotidi ricchi di G hanno mostrato di inibire l'attività HIV1-IN a concentrazioni nanomolari [4]. Inoltre, gli analoghi ottenuti modificando i singoli residui dei *loop* dell'aptamero anti-HIV-1 IN 93del, sono capaci di influenzare la reazione HIV-1 IN [4]. Pertanto, gli analoghi modificati di T30175 contenenti residui **H** sono stati testati *in vitro* per la loro capacità di inibire le attività di HIV-1 IN, usando l'inibitore dello *strand transfer* Raltegravir come controllo positivo. I risultati hanno mostrato che tutti gli analoghi modificati hanno inibito potentemente le attività di HIV-1 IN (Tabella 3). In particolare, **INTB-H2** e **INTB-H5** hanno inibito le attività HIV1-IN LEDGF-indipendenti con valori di IC<sub>50</sub> di 0.145 e 0.150 µM, rispettivamente, mentre **INTB-H9** ha inibito le funzioni di HIV-1 IN con un valore di IC<sub>50</sub> di 0.178 µM. Al contrario, per **INTB-H13** e **INTB-H17**, i valori di IC<sub>50</sub> osservati sono simili a quello riportato per la loro controparte naturale (Tabella 3). In conformità ai dati presenti in letteratura, gli analoghi modificati sono capaci di inibire le attività di HIV-1 IN a concentrazioni submicromolari [4].

Compound	<sup>a</sup> IC <sub>50</sub> IN LEDGF-independent integration (µM)
INTB-H2	0.145 ± 0.005
INTB-H5	0.150 ± 0.030
INTB-H9	0.178 ± 0.002
INTB-H13	0.225 ± 0.005
INTB-H17	0.225 ± 0.045
INTB-nat	0.270 ± 0.020
Raltegravir	0.058 ± 0.010

Tabella 3. Inibizione ad opera degli oligonucleotidi dell'attività HIV-1 IN LEDGF/p75-indipendente. <sup>a</sup> Concentrazione di composto richiesta per inibire del 50% le attività catalitiche di HIV-1 IN in assenza di LEDGF. Raltegravir è stato usato come riferimento. Vedi il testo principale per i dettagli.

### **Studi di docking dell'interazione aptamero/integrasi HIV-1**

In generale, gli studi di docking hanno mostrato che i residui **H** nei differenti aptameri modificati sono capaci di instaurare numerosi contatti con entrambe le

catene A e C del target HIV-1 IN. L'aptamero originario non modificato **T30175** ha presentato sia la più alta  $IC_{50}$  ( $0.27 \pm 0.02$ )  $\mu$ M sia l'energia di legame meno favorevole nel complesso ( $-110$  Kcal/mol). Le interazioni osservate per gli aptameri sono le seguenti:

INTB-H2. Il residuo **H** in posizione 2 nella catena A dell'aptamero **INTB-H2** forma legami idrogeno con i residui Q148 e E152 della catena C di HIV-1 IN. Il residuo **H** nella catena B dell'aptamero modificato crea un legame idrogeno con le catene laterali dei residui Q148, E152 e le catene laterali dei residui V150 e G149 della catena A di HIV-1 IN (Figura 6).

INTB-H5. Il residuo **H** in posizione 5 nella catena A dell'aptamero **INTB-H5** non forma alcuna interazione con HIV-1 IN. Tuttavia, il residuo **H** nella catena B del frammento di DNA instaura un legame idrogeno col suo intorno, formando interazioni con le catene laterali dei residui T112, H114, K136 e E138 della catena C di HIV-1 IN (Figura 7).

INT-H9. Il residuo **H** nella catena A dell'aptamero **INTB-H9** forma un legame idrogeno con il residuo Q44 della catena C di HIV-1 IN. Il residuo **H** nella catena B in posizione 9 forma un legame idrogeno con gli atomi del *backbone* dei residui S147 e Q146 della catena C dell'enzima (Figura 8).

INTB-H13. Il residuo **H** nella catena A dell'aptamero **INTB-H13** crea un legame idrogeno *network* con i residui Q62 e H114 della catena A di HIV-1 IN. Il residuo modificato **H** nella catena B dell'aptamero forma un legame idrogeno con il residuo N144 di HIV-1 IN (Figura 9).

INTB-H17. Il residuo **H** in posizione 17 della catena A dell'aptamero **INTB-H17** non interagisce con HIV-1 IN. Tuttavia, il nucleotide **H** modificato nella catena B forma legami idrogeno multipli con i residui Q53, V54 (*backbone*) e R144 della catena A di HIV-1 IN (Figura 10).

INTB-*nat*. Nell'aptamero originario T30175 (**INTB-nat**), in cui non ci sono modifiche alle basi, l'aptamero si accomoda nella cavità tra le subunità di HIV-1 IN, in cui l'O all'estremità 5' della catena A dell'aptamero forma interazioni con K370 di HIV-1 IN (Figura 11).

Le energie di legame finali degli aptameri modificati sono: -110 Kcal/mol (**INTB-Nat**); -132.2 Kcal/mol (**INTB-H13**); -132.9 Kcal/mol (**INTB-H17**); -133.4 Kcal/mol (**INTB-H9**); -137.2 Kcal/mol (**INTB-H5**); -139.1 Kcal/mol (**INTB-H2**). Di conseguenza, le affinità degli aptameri modificati a HIV-1 IN sono nel seguente ordine: **INTB-Nat** < **INTB-H13** < **INTB-H17** < **INTB-H9** < **INTB-H5** < **INTB-H2**, che è in buon accordo con i dati relativi all'attività biologica (Tabella1).

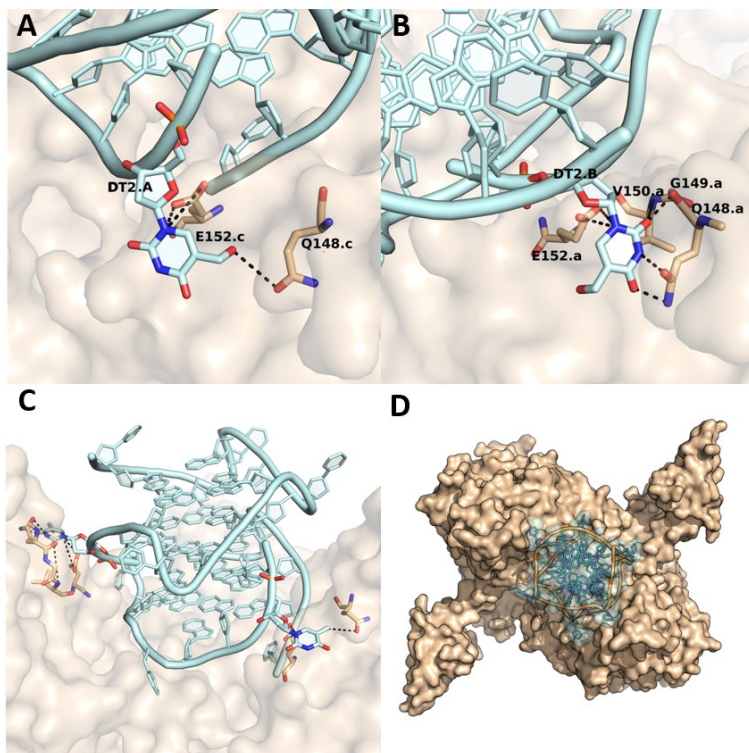


Figura 6. (A) Dettagli delle interazioni formate dal residuo H in posizione 2 nella catena A e (B) nella catena B dell'aptamero **INTB-H2**. (C) Vista laterale e (D) dall'alto del complesso aptamero-proteina. HIV1-IN è stato colorato in beige e rappresentato come una superficie, l'aptamero **INTB-H2** è stato colorato in azzurro chiaro.

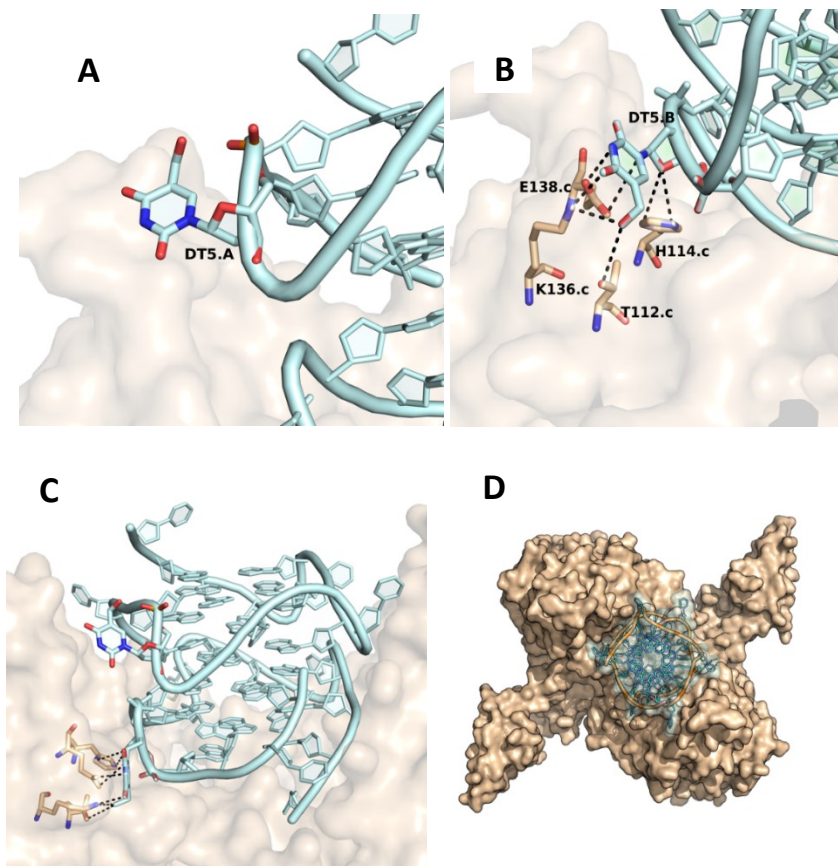


Figura 7. (A) Dettagli delle interazioni formate dal residuo H in posizione 5 nella catena A e (B) nella catena B dell'aptamero INTB-H5. (C) Vista laterale e (D) dall'alto del complesso aptamero-proteina. HIV1-IN è stato colorato in beige e rappresentato come una superficie, l'aptamero INTB-H5 è stato colorato in azzurro chiaro.

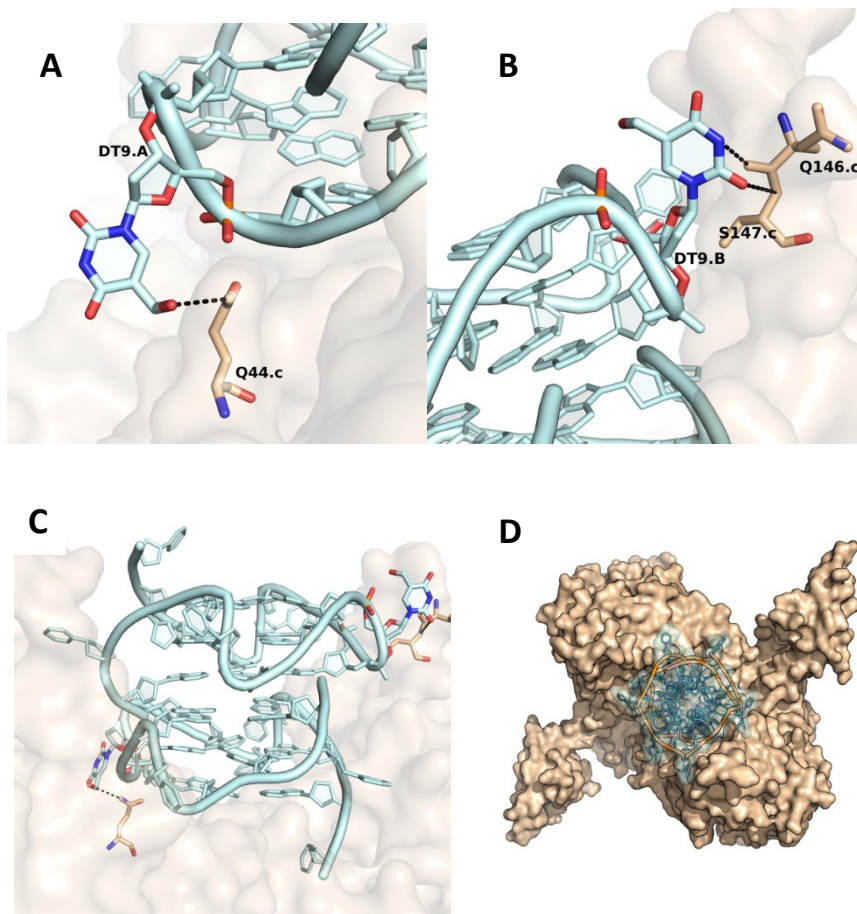


Figura 8. (A) Dettagli delle interazioni formate dal residuo **H** in posizione 9 nella catena A e (B) nella catena B dell'aptamero **INTB-H9**. (C) Vista laterale e (D) dall'alto del complesso aptamero-proteina. HIV1-IN è stato colorato in beige e rappresentato come una superficie, l'aptamero **INTB-H9** è stato colorato in azzurro chiaro.

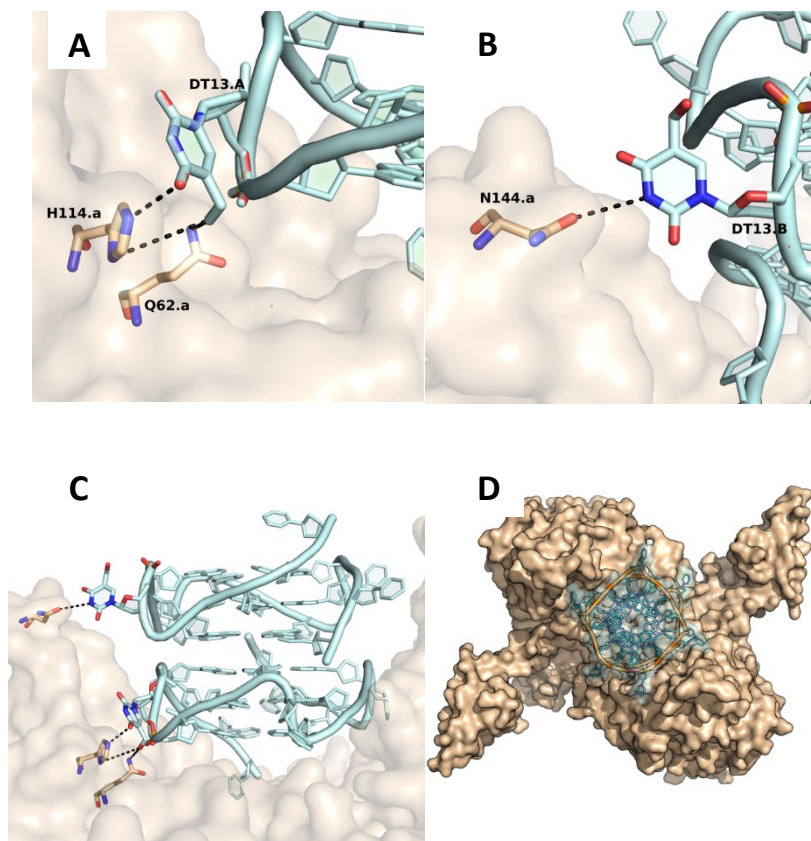


Figura 9. (A) Dettagli delle interazioni formate dal residuo H in posizione 13 nella catena A e (B) nella catena B dell'aptamero **INTB-H13**. (C) Vista laterale e (D) dall'alto del complesso aptamero-proteina. HIV1-IN è stato colorato in beige e rappresentato come una superficie, l'aptamero **INTB-H13** è stato colorato in azzurro chiaro.

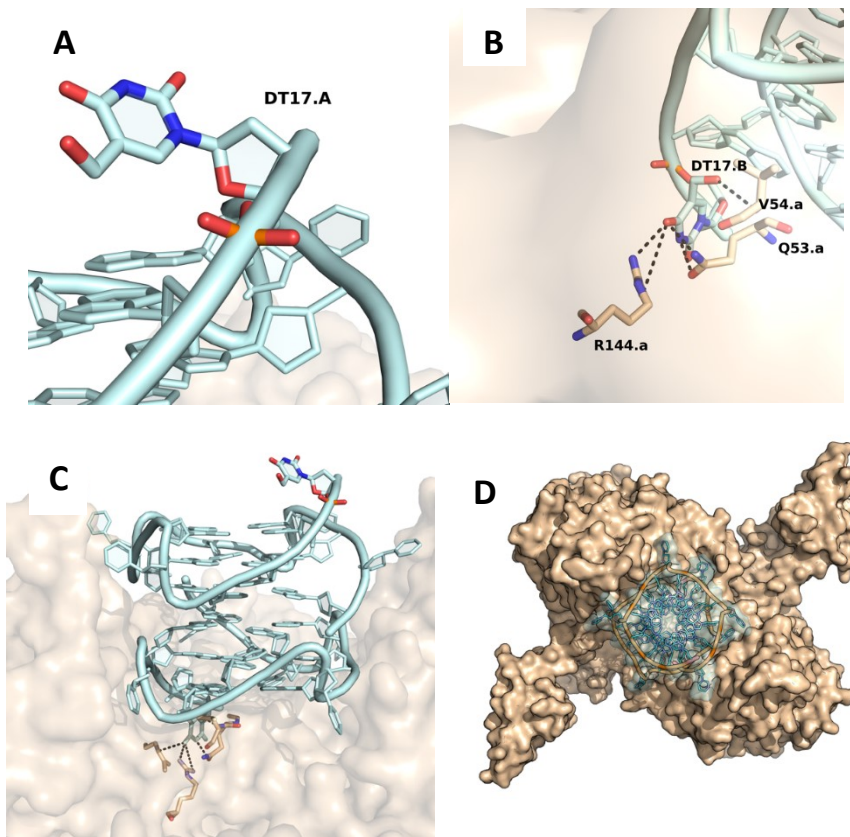


Figura 10. (A) Dettagli delle interazioni formate dal residuo H in posizione 17 nella catena A e (B) nella catena B dell'aptamero **INTB-H17**. (C) Vista laterale e (D) dall'alto del complesso aptamero-proteina. HIV1-IN è stato colorato in beige e rappresentato come una superficie, l'aptamero **INTB-H17** è stato colorato in azzurro chiaro.



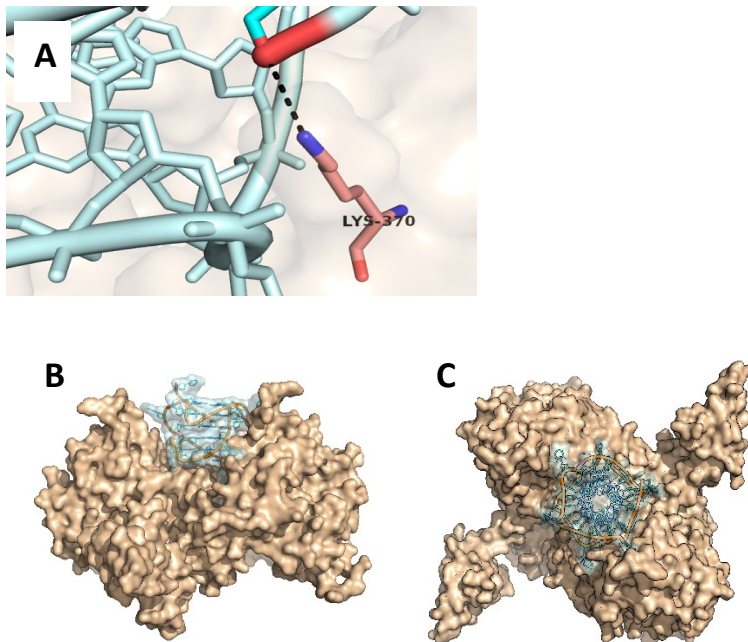


Figura 11. (A) Dettagli delle interazioni coinvolgenti la catena A dell'aptamero **INTB-nat**. (B) Vista laterale e (C) dall'alto del complesso aptamero-proteina. HIV1-IN è stato colorato in beige e rappresentato come una superficie, l'aptamero **INTB-nat** è stato colorato in azzurro chiaro.

## **CONCLUSIONI**

Le modifiche post-SELEX degli aptameri dirette a migliorare l'interazione con il target, incrementare la stabilità termica o potenziare la resistenza negli ambienti biologici, sono essenziali per lo sviluppo di queste molecole come potenziali agenti terapeutici e/o strumenti diagnostici. Tuttavia, informazioni dettagliate concernenti l'interazione aptamero-target, che sono indispensabili per evitare

modifiche deleterie, sono raramente disponibili e, in generale, diventano comprensibili solo molto tempo dopo la scoperta di un dato aptamero. Ciò nonostante, da questo punto di vista, gli aptameri G-quadruplex rappresentano un'eccezione. Infatti, per numerosi aptameri è noto o è stato suggerito che essi adottano strutture G-quadruplex in cui le tetradi di G sovrapposte contribuiscono principalmente alla loro alta stabilità termica mentre i *loop* che connettono i tratti di G, essendo proiettati all'esterno, instaurano interazioni con il target. In questi casi, l'identificazione delle regioni aptameriche, ossia i *loop*, principalmente responsabili dell'interazione con il target, consente un'esplorazione diretta dello spazio chimico attraverso sostituzioni sito specifiche progettate per migliorare le proprietà di questi ligandi, particolarmente se l'aptamero è caratterizzato da *loop* formati da uno o due residui, che sono timidine nella maggior parte dei casi. Con lo scopo di applicare questa strategia all'aptamero G-quadruplex anti-HIV-1 IN T30175, sono stati preparati 5 analoghi in cui le timidine nei *loop* e all'estremità 3' sono state sostituite una alla volta con i residui 5-idrossimetil-2'-deossiuridina. I dati NMR, CD ed elettroforetici suggeriscono chiaramente che tutti gli aptameri modificati conservano la capacità della sequenza originaria di formare una struttura dimerica composta da due G-quadruplex identiche, ciascuna caratterizzata da filamenti paralleli, tre tetradi di G *all-anti* e quattro *loop* con una timidina (un *bulge* e tre *reversed-chain loop*). I risultati del saggio HIV1-IN LEDGF-indipendente hanno indicato che la presenza del residuo modificato in posizione 2 o 5 (aptameri **INTB-H2** e **INTB-H5**, rispettivamente) permette un rilevante miglioramento dell'attività anti-HIV-1 IN, soprattutto considerando la piccola modifica chimica introdotta. I dati di modellistica molecolare riguardanti l'interazione tra gli aptameri modificati e la proteina target HIV-1 IN indicano una correlazione tra le energie di legame e le attività biologiche. Considerando l'ampia disponibilità commerciale delle timidine modificate, gli incoraggianti risultati qui descritti confermano la semplice strategia

proposta e suggeriscono la sua applicazione ad altri aptameri G-quadruplex con caratteristiche strutturali simili a T30175.

## **Bibliografia**

- [1] Do, N. Q., Lim, K. W., Teo, M. H., Heddi, B. & Phan, A. T. Stacking of G-quadruplexes: NMR structure of a G-rich oligonucleotide with potential anti-HIV and anticancer activity. *Nucleic Acids Res.* **39**, 9448–9457 (2011).
- [2] Magbanua, E. *et al.* d(GGGT)<sub>4</sub> and r(GGGU)<sub>4</sub> are both HIV-1 inhibitors and interleukin-6 receptor aptamers. *RNA biology* **10**, 216–27 (2013).
- [3] Mukundan, V. T., Do, N. Q. & Phan, A. T. HIV-1 integrase inhibitor T30177 forms a stacked dimeric G-quadruplex structure containing bulges. *Nucleic Acids Res* **39**, 8984–8991 (2011).
- [4] Phan, A. T. *et al.* An interlocked dimeric parallel-stranded DNA quadruplex: a potent inhibitor of HIV-1 integrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 634–9 (2005).
- [5] Faure-Perraud, A. *et al.* The guanine-quadruplex aptamer 93del inhibits HIV-1 replication *ex vivo* by interfering with viral entry, reverse transcription and integration. *Antivir. Ther.* **16**, 383–394 (2011).
- [6] Avino, A., Fabrega, C., Tintore, M. & Eritja, R. Thrombin binding aptamer, more than a simple aptamer: chemically modified derivatives and biomedical applications. *Current Pharmaceutical Des.* **18**, 2036–47 (2012).
- [7] Russo Krauss, I. *et al.* Duplex/quadruplex oligonucleotides: Role of the duplex domain in the stabilization of a new generation of highly effective anti-thrombin aptamers. *Int. J. Biol. Macromol.* **107**(pt B), 1697–1705 (2017).
- [8] Jing, N. *et al.* G-quartet oligonucleotides: a new class of signal transducer and activator of transcription 3 inhibitors that suppresses growth of prostate and breast tumors through induction of apoptosis. *Cancer res.* **64**, 6603–6609 (2004).
- [9] Bates, P. J. *et al.* G-quadruplex oligonucleotide AS1411 as a cancer-targeting agent: Uses and mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1861**, 1414–1428 (2017).
- [10] Perrone, R. *et al.* The G-quadruplex-forming aptamer AS1411 potently inhibits HIV-1 attachment to the host cell. *Int. J. Antimicrob. Agents* **47**, 311–316 (2016).
- [11] Wang, J. Y., Ling, H., Yang, W. & Craigie, R. Structure of a two-domain fragment of HIV-1 integrase: Implications for domain organization in the intact protein. *EMBO J.* **20**, 7333–7343 (2002).
- [12] Engelman, A., Hickman, A. B. & Craigie, R. The Core and Carboxyl-Terminal Domains of the Integrase Protein of Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Each Contribute to Nonspecific DNA-Binding. *J. Virol.* **68**, 5911–5917 (1994).
- [13] Hajimahdi, Z. & Zarghi, A. Progress in HIV-1 Integrase Inhibitors: A Review of their Chemical Structure Diversity. *Iran J. Pharm. Res.* **15**, 595–628 (2016).

- [14] Lutzke, R. A. & Plasterk, R. H. Structure-based mutational analysis of the C-terminal DNA-binding domain of human immunodeficiency virus type 1 integrase: critical residues for protein oligomerization and DNA binding. *J. Virol.* **72**, 4841–4848 (1998).
- [15] Esposito, F. *et al.* Kuwanon-L as a New Allosteric HIV-1 Integrase Inhibitor: Molecular Modeling and Biological Evaluation. *Chembiochem* **16**, 2507–2512 (2015).
- [16] Tintori, C. *et al.* Investigation on the sucrose binding pocket of HIV-1 Integrase by molecular dynamics and synergy experiments. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25**, 3013–3016 (2015).
- [17] Esposito, F. & Tramontano, E. Past and future. Current drugs targeting HIV-1 integrase and reverse transcriptase-associated ribonuclease H activity: Single and dual active site inhibitors. *Antivir. Chem. Chemother.* **23**, 129–144 (2014).
- [18] Cuzzucoli Crucitti, G. *et al.* Structure-activity relationship of pyrrolyl diketo acid derivatives as dual inhibitors of HIV-1 integrase and reverse transcriptase ribonuclease H domain. *J. Med. Chem.* **58**, 1915–1928 (2015).
- [19] Corona, A. *et al.* New insights into the interaction between pyrrolyl diketoacids and HIV-1 integrase active site and comparison with RNase H. *Antiviral Res.* **134**, 236–243 (2016).
- [20] Sgobba, M., Olubiyi, O., Ke, S. & Haider, S. Molecular dynamics of HIV1-integrase in coomplex with 93del-A Structural Perspective on the Mechanism of Inhibition. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **29**, 863–877 (2012).
- [21] Ni, S. *et al.* Chemical modifications of nucleic acid aptamers for therapeutic purposes. *Int. J. Mol. Sci.* **18** (2017).
- [22] Esposito, V. *et al.* Exploring the binding of d(GGGT)<sub>4</sub> to the HIV-1 integrase: An approach to investigate G-quadruplex aptamer/target protein interactions. *Biochimie* **127**, 19–22 (2016).
- [23] Do, N. Q. & Phan, A. T. Monomer-dimer equilibrium for the 5'-5' stacking of propeller-type parallel-stranded G-quadruplexes: NMR structural study. *Chemistry* **18**, 14752–14759 (2012).
- [24] Virgilio, A. *et al.* 5-Hydroxymethyl-2'-deoxyuridine residues in the thrombin binding aptamer: Investigating anticoagulant activity by making a tiny chemical modification. *ChemBioChem* **15**, 2427–2434 (2014).
- [25] Marky, L. A. & Breslauer, K. J. Calculating thermodynamic data for transitions of any molecularity from equilibrium melting curves. *Biopolymers* **26**, 1601–1620 (1987).
- [26] Dalvit, C. Efficient multiple-solvent suppression for the study of the interactions of organic solvents with biomolecules. *J. Biomol. NMR* **11**, 437–444 (1998).
- [27] Kessl, J. J. *et al.* Multimode, cooperative mechanism of action of allosteric HIV-1 integrase inhibitors. *J. Biol. Chem.* **287**, 16801–16811 (2012).
- [28] Carcelli, M. *et al.* Chelation motifs affecting metal-dependent viral enzymes: N'-acylhydrazone ligands as dual target inhibitors of HIV-1 integrase and reverse transcriptase ribonuclease h domain. *Front. Microbiol.* **8** (2017).
- [29] Petraccone, L. *et al.* Structure and stability of higher-order human telomeric quadruplexes. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 20951–20961 (2011).

- [30] Virgilio, A. et al. The abasic site lesions in the human telomeric sequence d[TA(G3T2A)3G3]: A thermodynamic point of view. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1820, 2037–2043 (2012).
- [31] Sala, M. et al. Development and identification of a novel anti-HIV-1 peptide derived by modification of the N-terminal domain of HIV-1 integrase. *Front. Microbiol.* 7 (2016).
- [32] Esposito, F. et al. Sennoside A, derived from the traditional chinese medicine plant *Rheum L.*, is a new dual HIV-1 inhibitor effective on HIV-1 replication. *Phytomedicine* 23, 1383–1391 (2016).

## ***Conclusioni generali***

Gli aptameri a DNA o RNA selezionati attraverso le tecniche SELEX possono essere raramente utilizzati non modificati, principalmente a causa della scarsa resistenza degli oligodeossiribonucleotidi e degli oligonucleotidi in ambiente biologico. Per queste ragioni, la sequenza originaria di un aptamero è spesso soggetta a modifiche *post-SELEX* volte a migliorarne le proprietà generali. In questo ambito si inserisce il lavoro di ricerca descritto in questa tesi. Esso, infatti, è stato incentrato proprio sull'applicazione delle modifiche *post-SELEX* con l'intento di ottenere analoghi caratterizzati da migliori affinità e specificità verso il target, stabilità termica e resistenza alle ubiquitarie endo- ed esonucleasi. Più specificamente, l'attenzione è stata rivolta al raggiungimento di tali obiettivi attraverso l'utilizzo di modifiche chimiche minime e/o di facile applicabilità dal punto di vista sintetico. Lo scopo era quello di dimostrare, come si evince dai risultati, che è possibile ottenere un miglioramento sia dell'affinità (e di conseguenza dell'attività) che della stabilità anche attraverso variazioni esigue della struttura chimica che non comportino significative distorsioni della struttura tridimensionale dell'aptamero. In tale ambito si inserisce la modifica che consiste nell'utilizzo di legami fosfodiesterici 3'-3' o 5'-5' per l'introduzione di un extra-residuo o per la sostituzione dei legami fosfodiesterici 3'-5' canonici per l'ottenimento di strutture con una topologia completamente nuova. Un'altra strategia frequentemente adottata e perfettamente in linea con l'intento dell'attività di ricerca consiste nella sostituzione dei residui canonici del DNA con nucleosidi modificati commercialmente disponibili (2'-deossiuridina (U), 5-bromo-2'-deossiuridina (B), 5-idrossimetil-2'-deossiuridina (H), L-residui). Gli incoraggianti risultati qui descritti

confermano le semplici strategie proposte e suggeriscono la loro generale applicabilità anche ad altri aptameri che adottano strutture G-quadruplex.