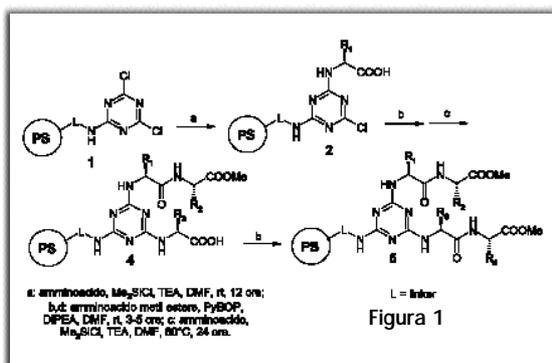




a cura di Pierfausto Seneci - Director of Chemistry, NAP AG, Monaco, Germania

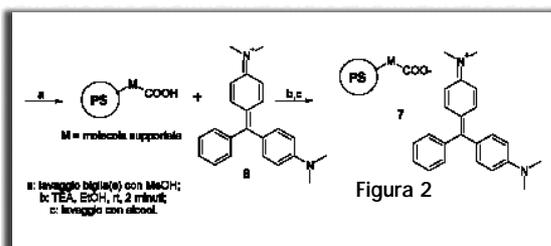
● **L'utilizzo di metodiche sintetiche** in fase solida per la preparazione di librerie combinatoriali, o anche per la sintesi di prodotti singoli, ha fra i suoi maggiori svantaggi, quando confrontato con metodiche classiche in soluzione, la difficoltà di monitorare in tempo reale l'andamento della reazione. Metodi normali e non costosi, quali TLC od iniezione diretta di soluzioni di reazione in apparecchi di massa o cromatografici, sono ovviamente preclusi dalla natura stessa della fase solida; il rilascio del supporto ancorato in soluzione per usare i sopradetti metodi provoca sia una diminuzione della resa finale (il prodotto rilasciato non è più riancorabile) che a volte anche l'insorgenza di artefatti dovuti alla reazione di *cleavage* dal supporto. Metodi più o meno semplici, e più o meno costosi per il monitoraggio diretto di reazioni su fase solida esistono ma un'espansione delle possibilità a disposizione del chimico di sintesi è altamente auspicabile per allargare l'utilizzo di metodiche sintetiche in fase solida. Qui di seguito riporterò due esempi significativi e recenti adatti anche ai laboratori meno "dotati" di fondi ed attrezzature sofisticate, poi altri tre che riflettono tendenze attuali e richiedono una maggiore esperienza e strumentazione.

● **Fa particolarmente piacere** poter ricordare il lavoro di un gruppo italiano ormai da considerare fra i più attivi in questo settore, facente capo a Taddei dell'Università di Sassari. Questo gruppo ha recentemente pubblicato due comunicazioni (M.E. Attardi et al., *Tetrahedron Lett.* 2000, 41, 7391, 7395) riportanti metodi colorimetrici capaci di identificare (e nel primo caso anche di quantificare) con grande rapidità rispettivamente gruppi carbossilici ed idrossilici presenti su alcune, o perfino su una singola biglia di supporto solido polistirenico.

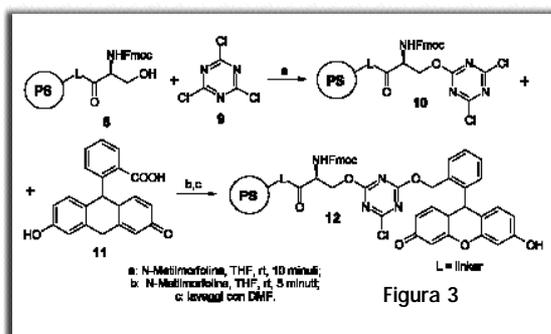


Lo schema di reazione studiato nel primo lavoro è riportato in Figura 1. Lo scaffold diclorotriazinico presente in 1 può essere sottoposto a due *displacement* con amminoacidi, a dare 2 e 4 rispettivamente, sfruttando la diversa reattività dei due clori. Ogni *displacement* è seguito dall'introduzione di un residuo amminoacidico come metil estere per permettere l'ulteriore diversificazione dei due siti triazinici. Il prodotto (o libreria) triazinico risultante 5 reca due catene dipeptidiche e contiene ovviamente 4 punti di diversità. L'uso di un metodo sensibile ed affidabile per l'identificazione di gruppi COOH liberi su resina è importante, perché permette di verificare la formazione di 2 e 4 ma soprattutto perché può monitorare la scomparsa del loro gruppo carbossilico a dare il monoestere 3

e il diestere 5. Un lavoro sperimentale accurato usando coloranti basici ha permesso di identificare il verde malachite (6, Figura 2) come reattivo che provoca la colorazione verde delle biglie recanti un gruppo carbossilico attraverso la formazione del sale 7 (Figura 2); il protocollo sperimentale usato è affidabile, sensibile (l'1% dei siti recanti un COOH provoca ancora colorazione verde percettibile) e rapido (5-10 minuti in totale). Lo stesso metodo è stato applicato ad altri acidi carbossilici od idrossammici supportati e si è dimostrato in generale altrettanto valido per monitorare l'apparire e lo scomparire di gruppi carbossilici supportati in tempo reale.



Lo stesso gruppo di ricercatori ha sviluppato nel secondo lavoro un metodo indiretto per monitorare la comparsa e la scomparsa di gruppi idrossilici supportati, utilizzando la triclorotriazina 9 (Figura 3). In un esempio caratteristico, lo standard 8, con *loading* determinato di serina e quindi di gruppi idrossilici, è stato fatto reagire con 9 a dare monosostituzione (10, Figura 3). La reazione di 10 con fluoresceina ha prodotto il derivato fluorescente 12, che impartisce colorazione giallo-verdastra alla resina.



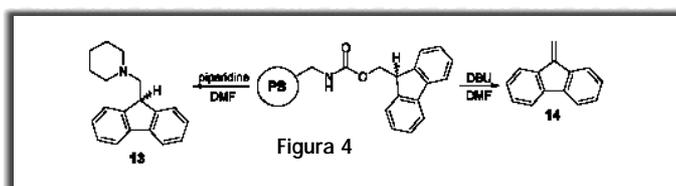
Il sistema messo a punto è economico, rapido (15-20 minuti in totale), sensibile (fino all'1% dei siti recanti un idrossile sono identificabili attraverso analisi fluorimetrica anche di una sola biglia) ed adatto ai più svariati substrati supportati (alcoli primari, secondari, terziari, benzoici ed anche fenoli). Per quanto riguarda i limiti del metodo, essi sono legati alla natura di 8 e 9: ad esempio, gruppi carbossilici concomitanti (idrossiacidi) possono provocare lattonizzazioni intramolecolari, e gruppi nucleofili (amine, tioli ecc.) possono essi stessi reagire con 9 e complicare il monitoraggio legato alla funzione idrossilica.

● **Muovendoci verso approcci** un poco più sofisticati, incontriamo un recente lavoro (Varady et al., *J. Chromatogr. A*, 2000, 869, 171) di ricercatori da Ar-Qule, un'azienda americana molto attiva nel campo della sintesi parallela ad alto *throughput*. Questi ricerca-





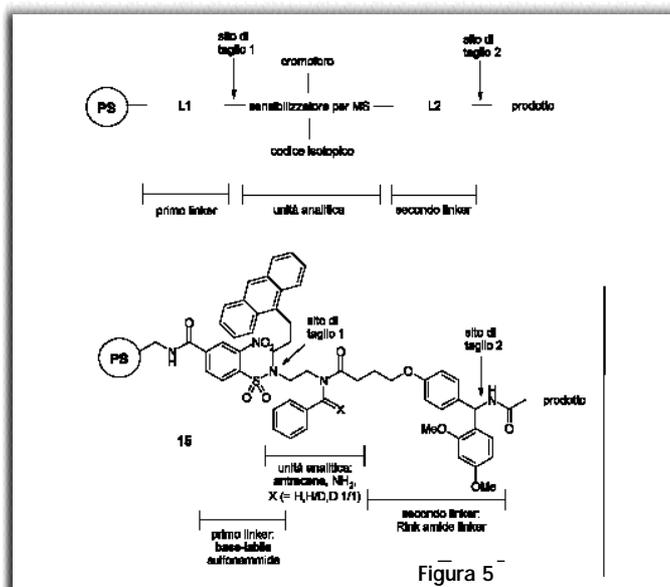
tori necessitavano di un metodo rapido e quantitativo per la quantificazione di siti amminici supportati, a partire dal ben noto metodo chiamato "Fmoc reading", basato sulla deprotezione di Fmoc-amine con piperidina a liberare un addotto piperidina-dibenzofulvene (**13**, Figura 4) poi quantificato spettrofluorimetricamente. Questo metodo classico è affidabile, sensibile e riproducibile ma richiede un protocollo sperimentale complesso (lavaggi, diluizioni, riscaldamento) e soprattutto richiede molto tempo e non è adatto a monitoraggi rapidi in parallelo. Recentemente è stato messo a punto un metodo utilizzante DBU come base, che libera dibenzofulvene (**14**, Figura 4) e non un addotto e che permette quantificazione in fase solida (W.S. Newcomb et al., *Biotechnol. Bioeng.* 2000, **61**, 55); la quantificazione di **14** avviene attraverso gascromatografia, ma sfortunatamente il protocollo sperimentale richiede sempre tempi troppo lunghi (circa un'ora) per applicazioni in sintesi parallela ad alto throughput.



Il lavoro qui analizzato ha condotto all'identificazione di condizioni di *cleavage* efficaci, rapide (2% DBU in DMF, 5 minuti) e generali, che hanno permesso di analizzare la soluzione di *cleavage* in HPLC con programmi di eluizione ultrarapidi e con tempo totale di analisi vicino ai 10 minuti. Da notare la verifica del *loading* di resine commerciali (deviazioni inferiori al 5% fra il dato fornito dal rivenditore e quello calcolato), ma ancora di più il controllo effettuato sulle cosiddette *high loading resin*, usate come supporti in fase solida ma anche come resine *scavenger* in soluzione. Soprattutto nel caso di resine a struttura rigida (*low swelling*) e di resine recanti appendici polifunzionali (dendrimeriche) la moltiplicazione dei siti supportati può portare allo "schermaggio" di alcuni di essi che non essendo più accessibili ai reattivi in soluzione portano a una diminuzione del *loading* totale e della resa di reazione. Il *loading* di un supporto è normalmente determinato via analisi elementare; mentre ciò è rigoroso e preciso, fenomeni di schermaggio, se esistenti, ovviamente non sono identificabili. Il metodo messo a punto in ArQule ha permesso di constatare *loading* "reali" su *high loading resin* molto inferiori al teorico; si va da casi di riduzione intorno al 20% (resina ArgoPore-amino) fino addirittura al 60% di siti non disponibili (resina ArgoGel-trisamine per *scavenging* in soluzione)!!!!

● **Un altro lavoro interessante**, che va ad espandere e arricchire lavori precedentemente commentati in questa rubrica, riporta una nuova versione del cosiddetto *analytical construct* cioè di un elaborato costruito supportato capace di fornire in pochi minuti una quantificazione accurata dell'andamento di reazione o del *loading* anche di una singola biglia sottoposta a reazione. La struttura funzionale generica (Figura 5 in alto) e quella particolare di un costrutto preparato (**15**) sono riportate.

In termini generici, il prodotto viene supportato su un costrutto contenente due *linker* ortogonali L1 e L2; fra i due *linker* si trova la cosiddetta unità analitica, che permette la quantificazione del prodotto supportato. Quando il *cleavage* finale è fatto a livello di L1 (primo taglio) il prodotto è rilasciato insieme all'unità analitica e può quindi essere facilmente quantificato attraverso HPLC (cromoforo) e MS (sensibilizzatore); la presenza di un codice isotopico, che viene rilevata in MS, permette di quantificare solo i prodotti effettivamente



supportati e non eventuali residui di reazione assorbiti sulla resina a causa di lavaggio incompleto della fase solida. Quando il *cleavage* finale è fatto a livello di L2 (secondo taglio) il prodotto è rilasciato tal quale, quindi pronto per essere testato su un saggio di attività a piacere. Nel caso del costrutto specifico **15** (Figura 5) il primo linker è costituito dal legame *o*-nitrofenilsulfonammide, rilasciabile in ambiente basico; il secondo è una forma leggermente modificata del linker ammidico di Rink, rilasciabile in ambiente acido. L'unità analitica è costituita da un pendaglio antracenico che fornisce un potente cromoforo per quantizzazione UV-HPLC, dal gruppo amminico mascherato dal linker 1 che dopo rilascio (primo taglio) fornisce il gruppo amminico ionizzabile come sensibilizzatore per MS e da una miscela 1/1 di *N*-benziletilendiammina contenente in posizione benzilica due atomi di idrogeno ($MW=X$) o due isotopi di deuterio ($MW=X+2$) che perciò fornisce un codice isotopico $X/X+2$ che permette di distinguere i prodotti che erano effettivamente supportati tramite legame covalente da ogni altra impurezza o prodotto secondario in soluzione. I ricercatori di GlaxoWellcome, utilizzando questo ed altri simili costrutti basati sul cromoforo antracenico, sono riusciti a quantificare in maniera rapida e riproducibile vari prodotti supportati, dimostrando perciò l'utilità di un approccio per ora destinato a laboratori abbastanza specializzati.

● **Per finire, un breve accenno** ad un articolo (W. Li et al., *J. Combi. Chem.*, 2000, **2**, 224.) riguardante il monitoraggio di reazione e soprattutto la determinazione di cinetiche di reazione su un diverso supporto solido introdotto dalla compagnia ChemRx/IRORI e che risponde al nome di MicroTube™. Questi veri e propri piccoli tubi di polipropilene/polistirene sono capaci di supportare grandi quantità di prodotto e di essere utilizzati con tecniche di sintesi parallela attraverso *encoding* di radiofrequenza (vedi alcune referenze: S. Shi et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 1998, **61**, 7; R. Li et al., *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 8581; C. Zhao et al., *J. Combi. Chem.*, 1999, **1**, 91).

Il lavoro qui esaminato dimostra chiaramente come, al contrario di quanto spesso si pensa, questi macrosupporti non sferici hanno cinetiche di reazione competitive ed a volte perfino migliori rispetto a quelle di convenzionali supporti polistirenici sferici; il gruppo in questione ha analizzato sei diverse reazioni supportate e ha sempre ottenuto completa conversione nel prodotto desiderato senza particolari problemi sperimentali.

