



HIGHLIGHTS TECNOLOGIE INNOVATIVE

di Pierfausto Seneci - Dipartimento di Chimica Organica - Università di Milano, pierfausto.seneci@unimi.it

Mi sono imbattuto in un lavoro (S.E. Lohse *et al.*, *ACS Nano*, 2013, **7**, 4135) che contiene un gran numero di “parole chiave” fra titolo ed *abstract*: sintesi a flusso continuo, nanoparticelle, sintesi ad alta capacità (o *high-throughput synthesis*, se preferite), sintesi multi-grammo, apparecchiature a basso costo. Incuriosito, mi son letto il lavoro e l'impressione di generale utilità si è perfino rafforzata.

Di certo sapevate che le nanoparticelle, o NP, hanno molteplici applicazioni; forse, come me, non sapevate che sintesi di NP monodisperse e di buona qualità su scala multi-grammo sono tuttora piuttosto rare. Nello specifico riguardante NP d'oro, si calcola che per somministrare ad ogni persona sulla faccia della terra una singola “dose” terapeutica (terapeutica + diagnostica), pari ad un monostrato spesso 10 nm e della superficie di 2,25 cm², si debba produrre tali NP con metodi rapidi ed automatizzati in lotti/*batch* superiori ai 100 kg! Gli autori si sono orientati verso la microfluidica, che tanto è di moda nella sintesi organica classica: reazioni in condizioni più controllate, maggiore stabilità di intermedi e prodotti, possibilità di mettere in parallelo vari reattori per lungo tempo e di ottenere alte rese e quantità di prodotto. Nel caso di NP, però, si sottolinea come vari tentativi a tutt'oggi abbiano evidenziato il rischio di “blocco” irreversibile dei microcanali e la difficoltà/alto costo nella loro parallelizzazione a dare grammi di NPs.

La soluzione proposta è semplice e tecnologicamente *retrò*: millifluidica - cioè canali di diametro millimetrico - invece che microfluidica. Pompe peristaltiche a flussi tra i 35 ed i 50 mL/min permettono controllo e miscelazione delle soluzioni; i materiali necessari sono facilmente reperibili ed a basso costo; la lunghezza dei canali stessi permette di modulare la grandezza e la forma delle NP d'oro; il sistema prodotto - rivendicato come portatile - può produrre in alcune ore *batch* di un grammo e più di NP d'oro. Fra queste, troverete nel lavoro NP sferiche stabilizzate con citrato, con acido mercaptoesanoico o con cetil tributil ammonio bromuro, di diametro variabile fra 2, 8, 20 e 40 nm, con un *throughput* variabile fra 0,4 e 1,2 mg/min di NP sferica, e NP non simmetrici, o *nanorods* (nanobarre?) con rapporto fra lunghezza e larghezza (*aspect ratio*) variabile fra 1,5 e 3,5, fra cui “piccoli” - 16,5x6,1 nm - e “grandi” *nanorods* - 49,2x34,2 nm - con un *throughput* variabile fra 0,25 e 0,58 mg/min di NP anisotrope. Si illustra anche il monitoraggio di reazione/formazione delle NP nelle soluzioni pompate in continuo e la contemporanea purificazione/funzionalizzazione *high throughput* delle NP con le tecniche della *layer-by-layer polyelectrolyte wrapping* e della *tangential flow filtration*.

Sicuramente conoscete l'artemisinina, e magari anche la sua struttura (**1**, Schema): se foste uno dei >200 milioni di casi di malaria al mondo e se non foste ancora uno dei >655.000 morti all'anno, sentireste il bisogno del miglior farmaco disponibile. Purtroppo, la produzione di **1** dall'*Artemisia annua* (o, per dirla con i cinesi, *qinghao*) soffre di fluttuazioni stagionali e conseguentemente di prezzo; i tentativi di trasferire il *pathway* metabolico del produttore naturale danno solitamente

una produttività ridotta dell'intermedio chiave acido artemisinico (**2**, Schema), non oltre 1,6 g/L. Ricercatori dell'azienda statunitense Amyris sono riusciti ad unire l'utile - incremento di più di 10 volte nella sintesi per fermentazione di **2**, ottimizzazione della semisintesi da **2** ad **1** - al dilettevole - pubblicazione di risultati su una rivista d'élite (C.J. Paddon *et al.*, *Nature*, 2013, **496**, 528).

L'incremento nella produttività per fermentazione di **2** fino ad un titolo di >25 g/L passa per l'identificazione di un nuovo citocromo b5 (CYB5), di una nuova artemisinina-aldeide (ALDH1) ed artemisinina-alcool deidrogenasi (ADH1) dal produttore *Artemisia annua*; dalla loro espressione, con altri enzimi, in *Saccharomyces cerevisiae*, o lievito di birra; nella solubilizzazione di **2** durante il processo fermentativo attraverso l'uso di isopropil miristato.

La messa a punto di una semisintesi in 4 passaggi da **2** ad **1** (Schema), con rese del 40-45%, passa attraverso modifiche importanti - introduzione dell'esterificazione/step 2, per eliminare la formazione di prodotti collaterali - o apparentemente minori - generazione dell'ossigeno singolo/step 3 dal disproporzionamento *manufacturing-friendly* dell'acqua ossigenata con molibdato, piuttosto che per fotosensibilizzazione di coloranti. Il composto **1** ottenuto ha purezze del 99,6% (superiori a quelle dei produttori cinesi) ed il processo è utilizzato per la sintesi di circa 300 tonnellate annue di artemisinina. Cito testualmente dal sito di Amyris (www.amyris.com): «Amyris is working to ensure access to affordable malaria treatments worldwide. In 2008, Amyris made available its Artemisinic Acid-producing yeast strains to Sanofi, via OneWorld Health, on a royalty-free basis. In early 2013, Sanofi announced this technology is now being used at large-scale to produce Artemisinin for ACT treatments. Sanofi has indicated it plans to produce enough semi-synthetic Artemisinin for up to 150 million treatments by 2014 and will ensure its distribution under the “no profit, no loss” principle.» Come vi dicevo: unire l'utile per la popolazione dei pazienti al dilettevole per i ricercatori coinvolti.

