



Sede Amministrativa

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

**Scuola di Dottorato di Ricerca in
Scienze Molecolari**

Indirizzo: Scienze Chimiche

Ciclo XXI

**Sviluppo di Catalizzatori Mediante
Dynamic Covalent Capture**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Maurizio Casarin

Supervisore: Ch.mo Prof. Paolo Maria Scrimin

Dottorando: Giulio Gasparini

Alla mia famiglia

INDICE

1	INTRODUZIONE	1
1.1	Chimica Combinatoria	1
1.1.1	<i>Diversity oriented synthesis</i>	2
1.2	Chimica combinatoria dinamica	5
1.3	Reazioni di scambio	6
1.3.1	Reazioni coinvolgenti legami non covalenti	7
1.3.2	Reazioni coinvolgenti legami covalenti	8
1.4	Applicazioni della chimica combinatoria dinamica	10
1.4.1	Sviluppo di <i>guest</i>	10
1.4.2	Sviluppo di recettori	11
1.4.3	Sviluppo di catalizzatori	13
1.5	Limitazioni della chimica combinatoria dinamica	15
1.6	<i>Dynamic covalent capture</i>	17
1.7	Riferimenti bibliografici	20
2	AMPLIFICAZIONE IN UN SISTEMA MODELLO	25
2.1	Introduzione	25
2.2	Progettazione del sistema	26
2.2.1	Scelta del TSA	26
2.2.2	Piattaforme	27
2.2.3	Sintesi della piattaforma 1	28
2.2.4	Idrazidi	28
2.3	Test di formazione degli idrazoni	29
2.3.1	Isomeria degli idrazoni	30
2.4	Cinetiche di formazione	31
2.4.1	Formazione 1A	31
2.4.2	Formazione 1B	32
2.4.3	Formazione 2A	32
2.4.4	Formazione 2B	33
2.5	Test di scambio	35
2.6	Distribuzione all'equilibrio	37
2.6.1	Piattaforma di riferimento	37
2.6.2	Piattaforma di riconoscimento	38
2.6.3	Variazione dell'eccesso di idrazidi	39
2.6.4	Controlli	40

2.7	Razionalizzazione dell'andamento	41
2.8	Conclusioni	46
2.9	Parte sperimentale	47
2.9.1	Strumentazione	47
2.9.2	Materiali	48
2.9.3	Sintesi e caratterizzazioni	49
2.9.4	Procedura generale per gli esperimenti di amplificazione	54
2.9.5	Implementazione del modello proposto	55
2.10	Riferimenti bibliografici	57
3	AMPLIFICAZIONE IN MISCELE DINAMICHE	59
3.1	Introduzione	59
3.2	Estensione del sistema	60
3.2.1	Condizioni sperimentali	60
3.3	<i>Screening</i> a coppie	61
3.3.1	<i>Screening</i> a coppie su 2	62
3.3.2	<i>Screening</i> a coppie su 1	63
3.4	<i>Screening</i> simultaneo	64
3.4.1	<i>Screening</i> simultaneo su 2	65
3.4.2	<i>Screening</i> simultaneo su 1	67
3.5	Confronto tra i metodi di screening	68
3.6	Sviluppo di una nuova metodologia di <i>screening</i>	69
3.6.1	Esperimenti 2D-NMR	70
3.6.2	Sistema in esame	71
3.6.3	Cinetica ^1H - ^{13}C HSQC: punto iniziale	72
3.6.4	Cinetica ^1H - ^{13}C HSQC: aggiunta di B	72
3.6.5	Cinetica ^1H - ^{13}C HSQC: aggiunta di G	74
3.6.6	Cinetica ^1H - ^{13}C HSQC: aggiunta di C	75
3.6.7	Analisi dei dati	77
3.6.8	Adattabilità del sistema	78
3.7	Conclusioni	79
3.8	Parte sperimentale	81
3.8.1	Strumentazione	81
3.8.2	Materiali	81
3.8.3	Sintesi e caratterizzazioni	81
3.8.4	Procedura generale per gli esperimenti di distribuzione	92
3.8.5	Procedura generale per gli esperimenti cinetici ^1H - ^{13}C HSQC	92

	3.8.6 Implementazione del modello per il fitting dei dati cinetici	93
	3.9 Riferimenti bibliografici	96
4	CORRELAZIONE TRA AMPLIFICAZIONE TERMODINAMICA E ATTIVITÀ CATALITICA	97
	4.1 Introduzione	97
	4.2 Amplificazione	98
	4.3 Esteri	99
	4.3.1 Sintesi degli esteri	100
	4.3.2 Spettri UV/Vis	101
	4.4 Metanolisi	102
	4.4.1 Controlli	103
	4.5 Idrolisi	104
	4.5.1 Controlli	105
	4.6 Effetto della distanza tra TSA e gruppo funzionale	107
	4.6.1 Variazione dell'idrazide B	108
	4.6.2 Diminuzione dello <i>spacer</i>	111
	4.6.3 Ottimizzazione della piattaforma 1	112
	4.7 Conclusioni	115
	4.8 Parte sperimentale	117
	4.8.1 Strumentazione	117
	4.8.2 Materiali	117
	4.8.3 Sintesi e caratterizzazioni	117
	4.8.4 Procedura per le cinetiche di metanolisi	130
	4.8.5 Procedura per le cinetiche di idrolisi	130
	4.9 Riferimenti bibliografici	132
5	ANALISI OTTICA INDIRETTA DI UN EQUILIBRIO CHIMICO DINAMICO	133
	5.1 Introduzione	133
	5.2 Scelta delle molecole	135
	5.3 Formazione degli idrazoni	136
	5.4 Spettri UV/Vis	136
	5.5 Cinetiche di scambio e studi di competizione	137
	5.6 Correlazione NMR-UV/Vis in un sistema a quattro componenti	139
	5.6.1 Sistema con A ed N	140
	5.6.2 Sistema con B ed N	141
	5.7 Protocollo per la misura indiretta dell'equilibrio	142
	5.7.1 <i>Screening</i> UV/Vis su un set di idrazidi	143

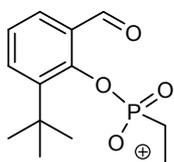
5.8	Condizioni essenziali	144
5.9	Massimizzazione del segnale	146
5.10	Conclusioni	148
5.11	Parte sperimentale	149
	5.11.1 Strumentazione	149
	5.11.2 Materiali	149
	5.11.3 Sintesi e caratterizzazioni	149
	5.11.4 Procedura generale per l'analisi ottica indiretta	152
	5.11.5 Retta di taratura dell'idrazione 4N	153
5.12	Riferimenti bibliografici	154
ELENCO PUBBLICAZIONI		155

ABBREVIAZIONI

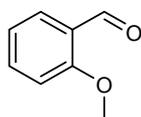
BTA	<i>backbone thioester exchange</i>
BOC	<i>terz-butilossicarbonile</i>
CAII	anidrasi carbonica II
CAPS	acido 3-(N-cicloesilammino) 1-propansolfonico
CC	<i>combinatorial chemistry</i>
CHES	acido 2-(N-cicloesilammino) 1-etansolfonico
DCC	<i>dynamic combinatorial chemistry</i>
DCL	<i>dynamic combinatorial libraries</i>
DMSO	dimetilsolfossido
DOS	<i>diversity-oriented sythesis</i>
EDC	N-(3-dimetilamminopropil)-N'-etilcarbodiimide
EPPS	acido N-(2-idrossietil)-piperazin-N'-(3-propansolfonico)
ESI-MS	<i>electrospray ionization mass spectroscopy</i>
GC	<i>gas chromatography</i>
HEPES	acido N-(2-idrossietil)-piperazin-N'-(2-etansolfonico)
HOBt	1-idrossibenzotriazolo
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
IR	spettroscopia infrarossi
LC-MS	<i>liquid chromatography mass spectrography</i>
MALDI-ESI	<i>matrix assisted laser absorption ionization mass spectroscopy</i>
MeOD	metanolo deuterato
MeOH	metanolo
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
TBA	tetrabutil ammonio
TFA	acido trifluoroacetico
THF	tetraidro furano
TLC	<i>thin layer chromatography</i>
TOS	<i>target-oriented synthesis</i>
TSA	<i>transition state analogue</i>
UV/Vis	spettroscopia UV/Visibile

LISTA DELLE MOLECOLE

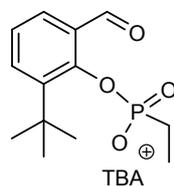
PIATTAFORME



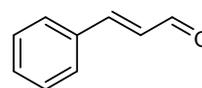
1



2



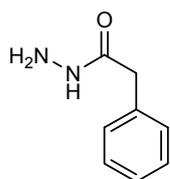
3



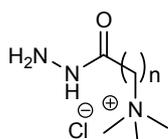
4

BUILDING BLOCKS

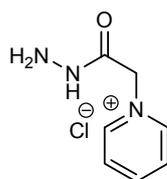
idrazidi



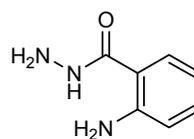
A



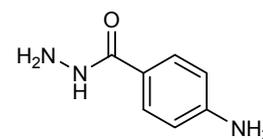
B : n=1
B₂ : n=2
B₃ : n=3



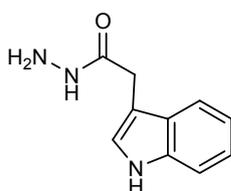
C



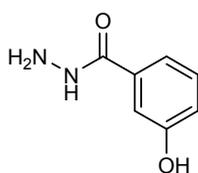
D



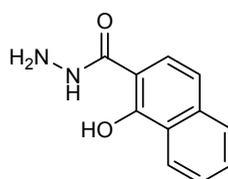
E



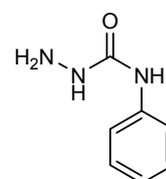
F



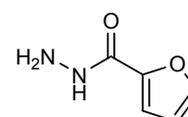
G



H

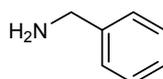


I

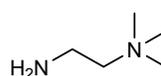


N

ammine



L



M

Catalyst discovery using dynamic covalent capture

The aim of this research project is to develop new methodology for the discover of catalysts. A key factor is the fast generation and screening of a large number of potential catalysts with a minimal synthetic effort. The approach is based on the complementary use of molecular recognition and reversible covalent bond formation within the same molecular structure, also referred to as *dynamic covalent capture*.¹ In our experimental set up, self-selection of the best catalyst occurs simply upon the addition of a transition state analogue (TSA)² of a chemical reaction to a mixture of potential catalysts at thermodynamic equilibrium. Such a mixture of rapidly interconverting components is generally referred to as a Dynamic Combinatorial Library (DCL).³ When a transition state analogue is added to the library, the library composition will spontaneously shift toward the library member that most strongly interacts with the TSA. Any species able to develop a stabilizing interaction with the TSA is expected to stabilize also the transition state of the given reaction, leading to an increased reaction rate resulting from a lowering of the required activation energy.

In 2000, Erlanson and co-workers reported a brilliant strategy,^{4,5} called “Tethering”[®], to discover ligands from a library that bind weakly to targeted sites in proteins. The tethering strategy is based on the covalent coupling of the target to a molecular scaffold. Library components that interact with the target are captured via the “pseudo”-intramolecular formation of a reversible covalent bond. We decided to apply tethering for the selection of functional groups able to bind to a phosphonate moiety (as a model of the transition state of a carboxylate ester hydrolysis) in a protic solvent, where electrostatic and hydrogen-bonding interactions are relatively weak. Initially, preliminary studies were performed on the smallest library possible: only two functional groups compete for the recognition site via formation of a reversible covalent hydrazone bond (Fig. 1).

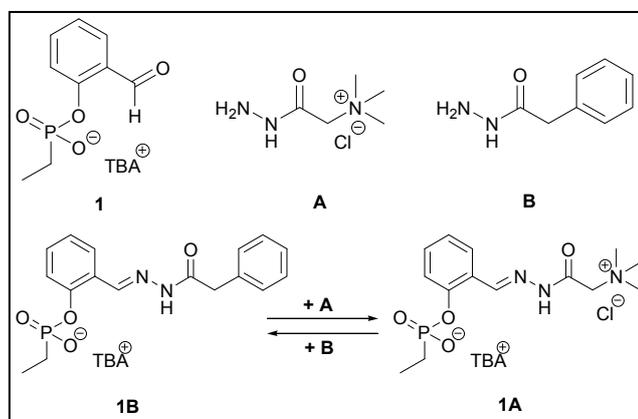


Fig. 1: preliminary studies with hydrazides A and B.

It became immediately evident that the selection process was strongly dependent on the conditions used and in some cases, no selection at all could be observed. Intrigued by this

behavior we decided to analyze this simple system in detail in order to clarify possible limitations of the tethering approach in synthetic systems and establish its conditions of validity.⁶

We screened scaffold **1** with hydrazides **A** and **B**. In this preliminary study hydrazide **B** was chosen because it was expected to form electrostatic interaction with the negatively charged TSA present in the scaffold. Hydrazide **A**, instead, was taken as a reference because it was expected not to develop any interactions. Competition experiments revealed that the occurrence of an intramolecular interaction between the phosphonate group and the functional group (ammonium group) present in the hydrazone **1B** indeed caused a shift of the equilibrium. Working with 2 mM of scaffold **1**, the best ratio obtained is **1B:1A** = 70:30, compared to the statistic distribution (50:50) that emerge when reference methoxy scaffold is used. It was observed that the concentration of molecules at which the competition experiments are performed plays a key role on the amplification factor: upon increasing the concentrations of the free hydrazides **A** and **B**, the intramolecular stabilizing interaction is replaced by an intermolecular interaction, which results in a loss of amplification (Fig. 2).

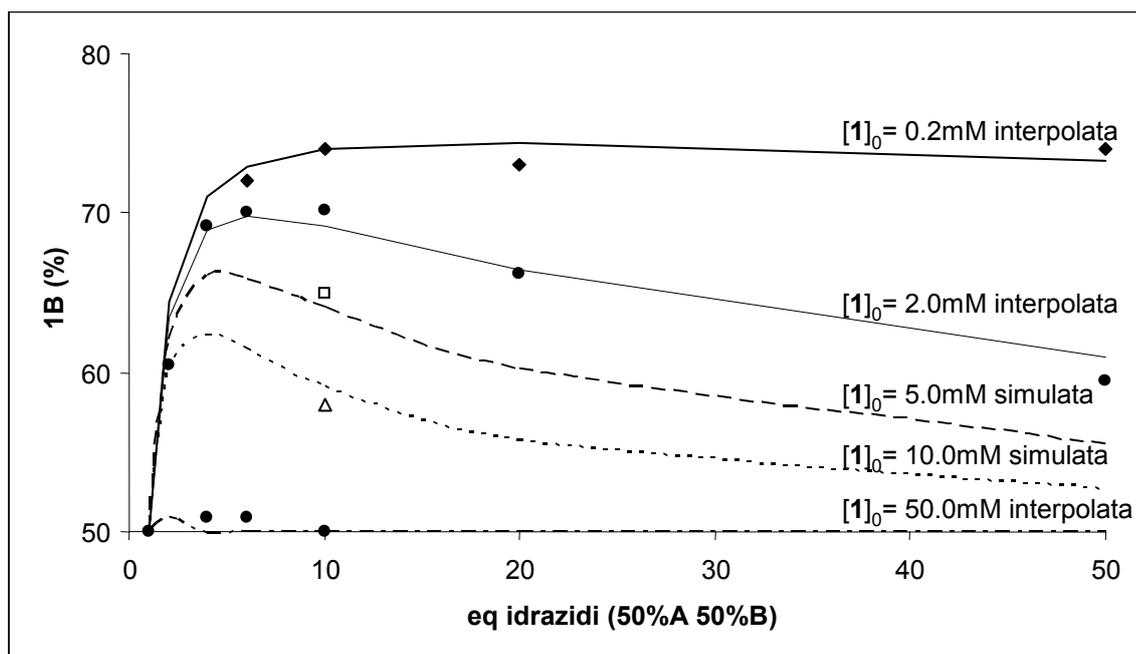


Fig. 2: amplification of **1A** as a function of the number of equivalents of hydrazides **A** and **B** present at various concentrations of **1**.

Also the starting concentration of scaffold **1** plays a key role in the resulting amplification: increasing its concentration, at fixed equivalents of hydrazides present, there is a drop of amplification until it is completely lost when 50 mM of scaffold **1** are used (as shown in Figure 2, with 10 total equivalents of hydrazides).

Once determined the best conditions to perform the screening, we decided to extend the study to a small library of nine hydrazides (Fig. 3).

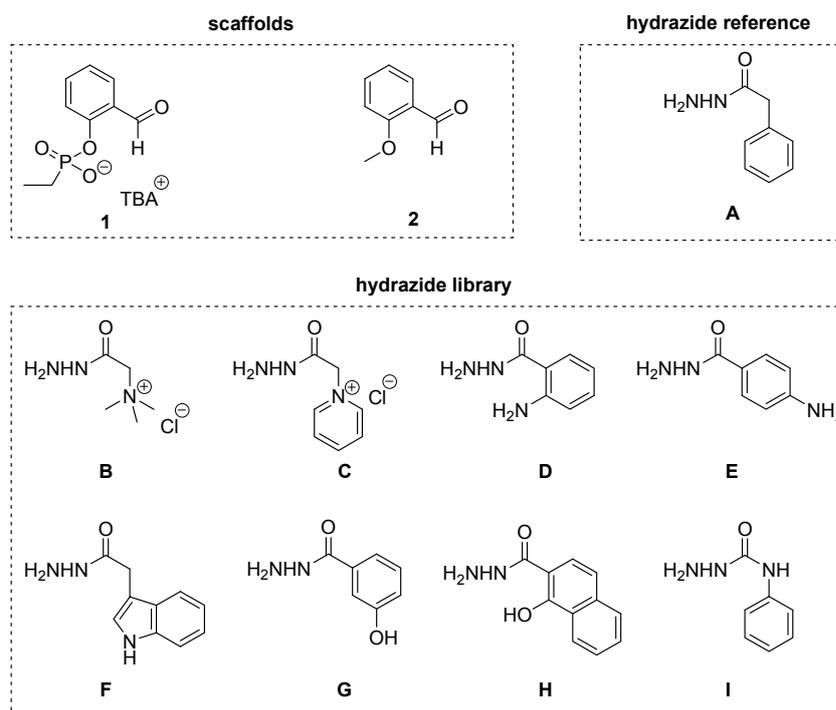
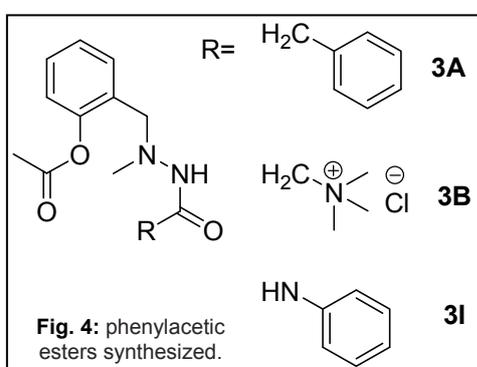


Fig. 3: scaffolds **1** and **2**, reference hydrazide **A**, hydrazides **B-I**.

Using ^1H ^{13}C HSQC-NMR spectroscopy it was possible to analyze the complex mixture of hydrazones obtained when scaffold **1** or **2** was added to a solution containing the nine hydrazides **A-I**. The amplification data from the mixture analysis were confirmed by an individual screening of each hydrazide **B-I** against the reference hydrazide **A**. It was shown that the functional groups that interact most strongly with the TSA are charged (hydrazides **B** and **C**, amplification factors 1.8 and 1.3, respectively) or can give H-bond (hydrazide **I**, amplification factor 1.3).

Subsequently, a series of phenyl acetic esters substituted with the functional groups selected from the thermodynamic amplification were synthesized (Fig. 4). We measured the rate of



hydrolysis of these esters and a correspondence was observed between the thermodynamic amplification in the competition experiments and the efficiency of the selected functional group in assisting in intramolecular catalysis, both in order of reactivity ($k_{3B} > k_{3I} > k_{3A}$) and in relative acceleration (the k is related to the amplitude of the amplification mixtures). Control experiments were in support of our hypothesis that catalysis occurred through stabilization of the transition state. These studies resulted in the dynamic self-selection of a functional group able to induce a 60-fold rate enhancement in the basic hydrolysis of the neighboring carboxylic ester.⁷

This proof-of-principle study illustrates the potential of dynamic combinatorial chemistry for the self-selection of a catalyst. A critical issue in this approach is the analysis of the dynamic mixture. For that reason, we focused our attention on the development of methodology that permits the composition of a dynamic library to be obtained in a straightforward manner. The first approach allows for the analysis of complex mixtures and relies on the use of NMR spectroscopy. NMR spectroscopy is probably the most informative analytical tool as it is one of the few techniques that allows a direct identification and quantification of all the species present in solution as a function of time.⁸ However, the application of NMR spectroscopy for studying mixtures of molecules is often severely hampered by overlapping signals and difficulties in signal assignment. In collaboration with Damien Jeannerat from the University of Genève, we solved these problems using a series of quick and highly resolved ¹H-¹³C HSQC-NMR experiments. These experiments used a reduced and optimized ¹H-¹³C spectral window and a gradual increase in complexity of the system so it was possible to follow the kinetic formation and thermodynamic exchange of a complex network involving 8 molecules and 6 thermodynamic equilibria. In just one mixing experiment, it was possible to obtain the complete kinetic and thermodynamic parameters of this network (Fig. 5).⁹ Starting from a solution of **1A**, hydrazide **B** was added and the exchange was followed via NMR until equilibrium was reached (Fig. 6, section 1). At this point hydrazide **G** was added (section 2) and the kinetic followed as before. Finally, the addition of hydrazide **C** installs the complete

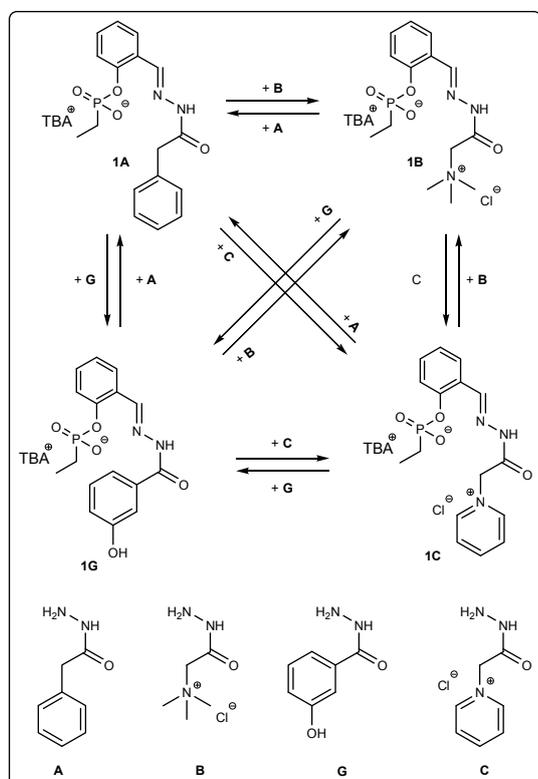


Fig. 5: dynamic eight-component network containing four hydrazones **1A-1D** and four hydrazides **A-D** accounting for a total of twelve exchange reactions.

network of 8 molecules (section 3). This one-by-one procedure allows for the individuation of the characteristic signals of each hydrazone without its isolation simply by following the increasing signals in the spectra after the addition of each hydrazide.

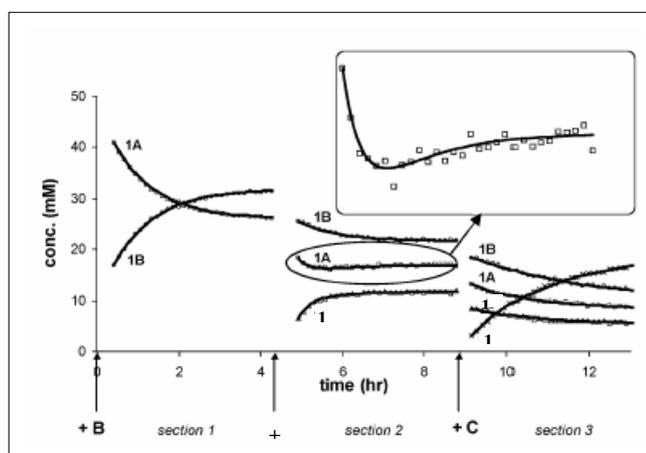


Fig. 6: concentrations of hydrazones measured by ¹H-¹³C HCQC throughout the mixing experiment.

The second screening methodology is highly adapted for the parallel screening of hydrazides and relies on the use of UV/Vis spectroscopy. This approach provides information about a dynamic covalent equilibrium in a fast and straightforward manner. Rather than measuring directly the concentration of the target compound, it is indirectly determined by quantifying the concentration of a reporter molecule. The experimental conditions are chosen such that the target and the reporter molecules are present at identical concentrations.

In the experimental set up, scaffold **1** was equilibrated with equimolar quantities of a reporter hydrazide (2-furoic hydrazide **L**) and one of the hydrazides in exam (**A-I**), resulting in the formation of two hydrazones: **1L** and **1X** ($X=A-I$). Their concentration in solution is determined by their relative thermodynamic stabilities. The excess of hydrazide is scavenged using *trans*-cinnamaldehyde **2**, which does not affect the equilibrium between **1L** and **1X**. Moreover, hydrazone **4L** gives a characteristic UV absorption at 348 nm, which allows for its quantification in the presence of other hydrazones. Using mass balances, it is then possible to calculate the concentration of every hydrazone in solution. (Fig. 7). This straightforward methodology for the analysis of dynamic covalent equilibrium was successfully tested on the series of hydrazides used before.

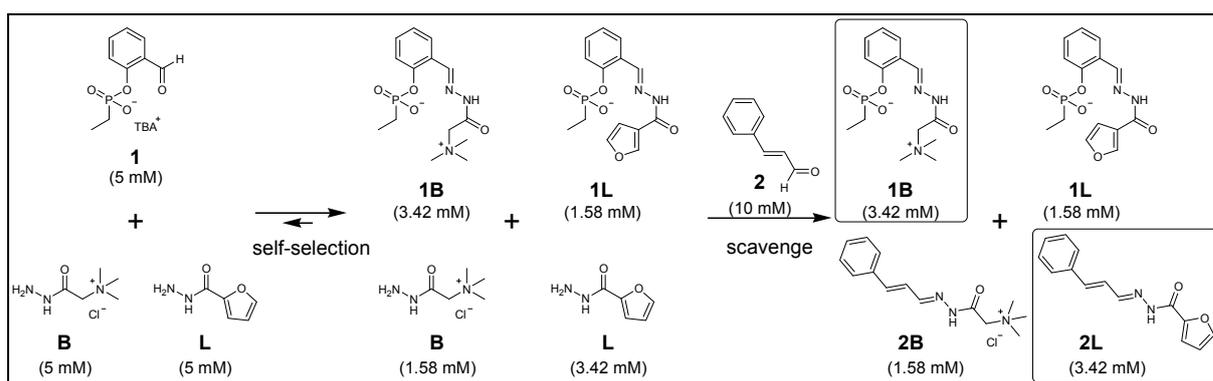


Fig. 7: example of procedure using hydrazide **B**.

Sviluppo di catalizzatori mediante *dynamic covalent capture*

Lo scopo di questo progetto di ricerca riguarda lo sviluppo di una nuova metodologia per la scoperta di catalizzatori. Fattori chiave sono la rapida generazione e screening di un largo numero di potenziali catalizzatori con il minimo sforzo sintetico. Questo approccio è basato sull'uso complementare del riconoscimento molecolare e della formazione di legami covalenti reversibili all'interno della stessa struttura molecolare, riferita come *dynamic covalent capture*.¹ A livello pratico, l'autoselezione del miglior catalizzatore avviene semplicemente in seguito all'aggiunta di un analogo dello stato di transizione (TSA)² di una reazione chimica ad una miscela di potenziali catalizzatori, in equilibrio termodinamico. Questo tipo di miscela di componenti in rapida interconversione è generalmente denominato libreria combinatoria dinamica (DCL)³. Quando un analogo dello stato di transizione è aggiunto alla libreria, la composizione di quest'ultima si sposterà spontaneamente verso quel membro della libreria che interagisce più fortemente con il TSA. Ogni specie che sviluppa delle interazioni stabilizzanti con il TSA dovrebbe essere in grado di stabilizzare anche lo stato di transizione della reazione data, permettendo un aumento della velocità della reazione come risultato della minore energia di attivazione richiesta.

Nel 2000, Erlanson e collaboratori hanno riportato una strategia brillante,^{4,5} chiamata "*Tethering*"[®], per la selezione di leganti da una libreria dinamica capaci di legare, anche debolmente, siti particolari di una proteina bersaglio. La strategia *tethering* è basata sull'accoppiamento covalente del target alla piattaforma molecolare. I componenti della libreria in grado di interagire con il target sono catturati attraverso la formazione di un legame reversibile "pseudo"-intramolecolare. Si è quindi decisi di applicare il *tethering* per la selezione di gruppi funzionali capaci di legare un substrato fosfonato (preso a modello per la reazione di idrolisi basica di un estere) in un solvente protico, dove le interazioni elettrostatiche ed i legami ad idrogeno sono relativamente deboli.

Inizialmente gli studi preliminari sono stati condotti sulla più piccola libreria possibile: solo due gruppi funzionali competono per il sito di riconoscimento, attraverso la formazione di un legame imminico reversibile (Fig. 1).

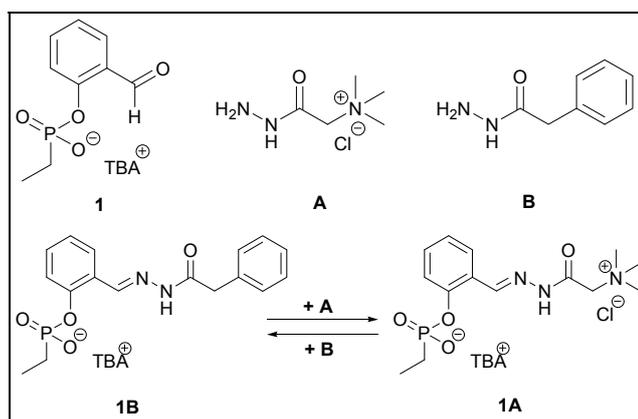


Fig. 1: studi preliminari con le idrazidi **A** e **B**.

E' apparso immediatamente evidente che il processo di selezione è fortemente dipendente dalle condizioni sperimentali usate e, in alcuni casi, nessuna selezione è stata osservata. Si è deciso di analizzare questo sistema semplice più in dettaglio, in modo da chiarire le possibili limitazioni dell'approccio usato nei sistemi sintetici e determinare così le sue condizioni di validità.⁶

E' stata studiata in dettaglio la piattaforma **1** con le idrazidi **A** e **B**. In questo studio preliminare l'idrazide **B** è stata scelta in quanto essa dovrebbe formare delle interazioni elettrostatiche con la carica negativa presente sul TSA. L'idrazide **A**, invece, è stata usata come riferimento dal momento che non è in grado di avere alcuna interazione. Esperimenti di competizione hanno rivelato la presenza di una interazione intramolecolare tra il gruppo fosfonato e il gruppo funzionale (gruppo ammonio) presente nell'idrazone **1B**, che causa uno spostamento dell'equilibrio.

Lavorando con 2 mM di piattaforma **1**, il miglior rapporto ottenuto è **1B:1A** = 70:30, comparato con la distribuzione statistica (50:50) che si ottiene quando è usata la piattaforma di riferimento **2**. E' stato osservato che la concentrazione delle molecole alle quali gli esperimenti di competizione sono condotti gioca un ruolo fondamentale sul fattore di amplificazione: aumentando le concentrazioni delle idrazidi libere **A** e **B**, l'interazione intramolecolare stabilizzante è sostituita da un'interazione intermolecolare, conducendo così ad una perdita dell'amplificazione (Fig. 2).

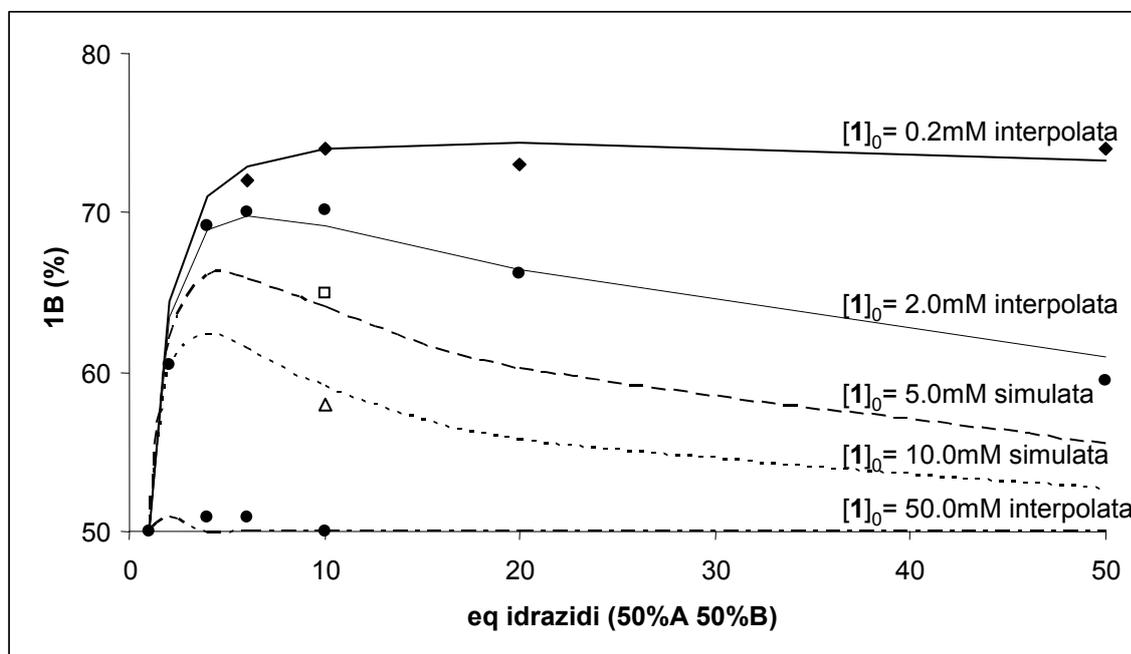


Fig. 2: amplificazione di **1A** in funzione del numero di equivalenti di idrazidi **A** e **B** presenti a varie concentrazioni di **1**.

Anche la piattaforma **1** gioca un ruolo nel determinare l'amplificazione risultante: aumentando la sua concentrazione iniziale, mantenendo fisso il numero di equivalenti di idrazidi presenti, si ha una diminuzione dell'amplificazione fino alla sua completa scomparsa

quando è usata una concentrazione di 50 mM di **1** (come mostrato in Fig. 2, con 10 equivalenti totali di idrazidi presenti).

Una volta determinate le migliori condizioni per eseguire lo screening, si è esteso lo studio ad una piccola libreria di nove idrazidi (Fig. 3).

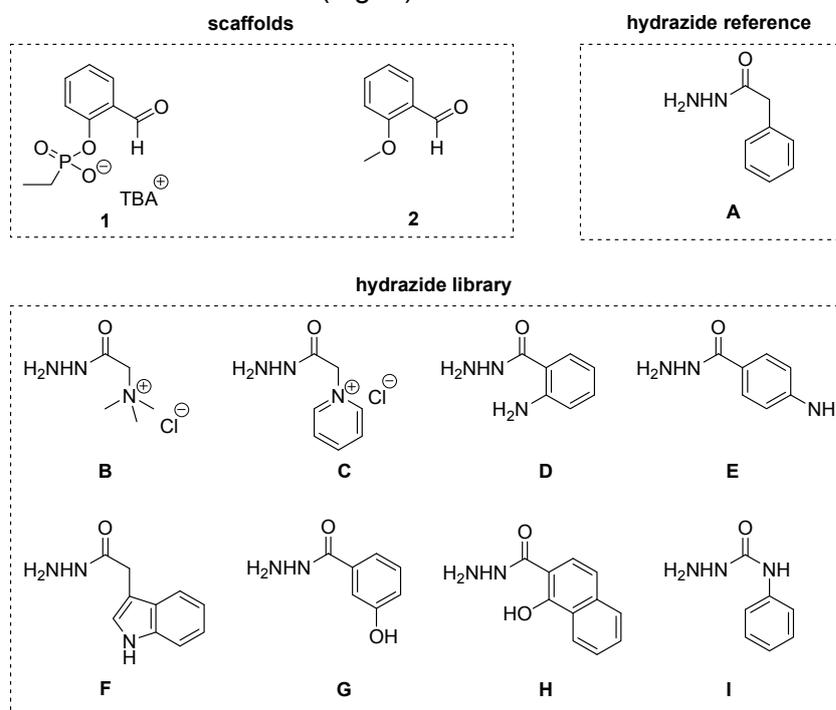


Fig. 3: piattaforme **1** e **2**, idrazide di riferimento **A**, idrazidi **B-I**.

Usando la spettroscopia ^1H ^{13}C HSQC-NMR è stato possibile analizzare la complessa miscela di idrazoni che si ottiene quando la piattaforma **1** o **2** è aggiunta ad una soluzione contenente le nove idrazide **A-I**. I dati di amplificazione della miscela sono confermati dallo screening individuale di ciascuna idrazide **B-I** contro quella di riferimento **A**. È stato dimostrato che i gruppi funzionali che interagiscono più fortemente con il TSA sono carichi (idrazidi **B** e **C**, fattori di amplificazione 1.8 ed 1.3, rispettivamente) o possono formare legami ad idrogeno (idrazide **I**, fattore di amplificazione 1.3).

Di conseguenza, è stata sintetizzata una serie di esteri fenilacetici sostituiti con i gruppi

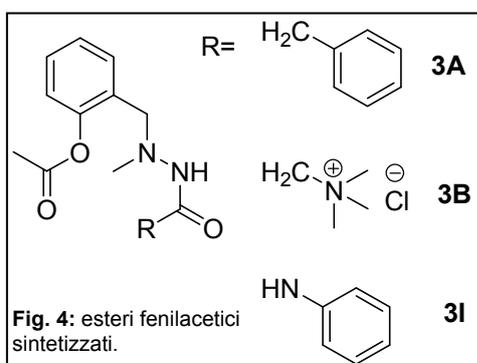


Fig. 4: esteri fenilacetici sintetizzati.

funzionali selezionati dall'amplificazione termodinamica (Fig. 4). È stata misurata la velocità di idrolisi di questi esteri ed è stata verificata l'esistenza di una corrispondenza tra l'entità dell'amplificazione termodinamica e l'efficienza del gruppo selezionato nell'assistere la catalisi intramolecolare, sia in ordine di reattività ($k_{3B} > k_{3I} > k_{3A}$) che di relativa accelerazione (la costante cinetica è collegata all'entità

dell'amplificazione osservata). Sono stati eseguiti numerosi esperimenti di controllo i quali supportano l'ipotesi secondo la quale la catalisi è dovuta alla stabilizzazione dello stato di transizione. Come risultato finale, questi studi hanno permesso l'autoselezione dinamica di

un gruppo funzionale capace di accelerare fino a 60 volte la velocità di idrolisi basica di un estere carbossilico vicinale.⁷

Questo studio di principio illustra la potenzialità della chimica covalente dinamica per l'autoselezione di un catalizzatore. Un punto estremamente importante in questo tipo di approccio è rappresentato dall'analisi della miscela complessa. Per questa ragione, l'attenzione è stata focalizzata allo sviluppo di una metodologia che permette l'ottenimento della composizione di una libreria dinamica in maniera veloce ed accurata. Il primo approccio in questo senso prevede l'utilizzo della spettroscopia NMR.

La spettroscopia NMR è probabilmente lo strumento analitico più informatico dal momento che è una delle poche tecniche che permettono l'identificazione e la quantificazione diretta di tutte le specie presenti in soluzione, anche in funzione del tempo.⁸ Tuttavia, l'applicazione della spettroscopia NMR nello studio di miscele di molecole è spesso seriamente impedita dalla sovrapposizione dei segnali e dalla difficoltà nella loro assegnazione. In collaborazione con Damien Jeannerat dell'Università di Ginevra, è stato risolto questo problema usando una serie di esperimenti ¹H-¹³C HSQC-NMR veloci ed altamente risolti. Questi esperimenti usano una finestra spettrale ¹H-¹³C ridotta ed ottimizzata che, insieme al graduale aumento della complessità del sistema, permette di seguire la cinetica di formazione e di scambio di un network complesso, costituito da 8 molecole e 6 equilibri termodinamici. In un singolo esperimento, è così possibile ottenere il profilo cinetico completo ed i parametri termodinamici di questo sistema (Fig. 5).⁹

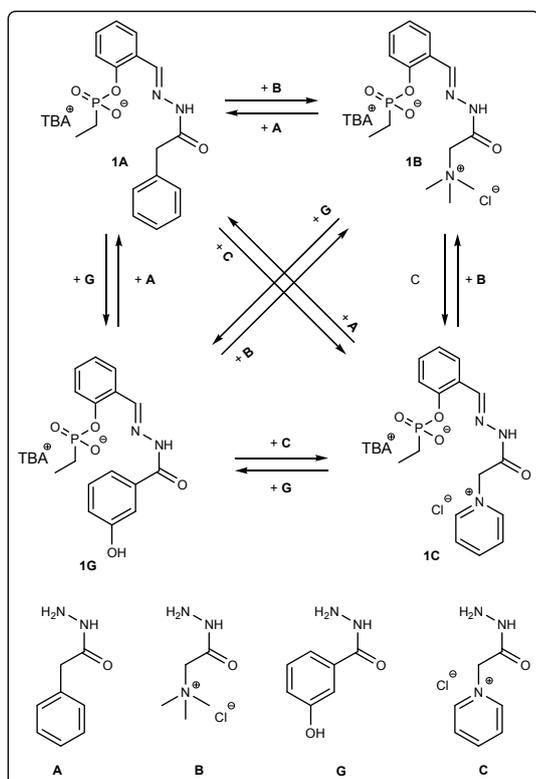


Fig. 5: network dinamico a otto componenti contenente i quattro idrazoni **1A**-**1D** e le quattro idrazidi **A**-**D**, per un totale di 12 reazioni di scambio.

Partendo da una soluzione di **1A**, l'idrazide **B** è stata aggiunta e lo scambio è seguito via NMR fino al raggiungimento dell'equilibrio termodinamico (Fig. 6, sezione 1). A questo punto è aggiunta l'idrazide **G** (sezione 2) e la cinetica è seguita come in precedenza.

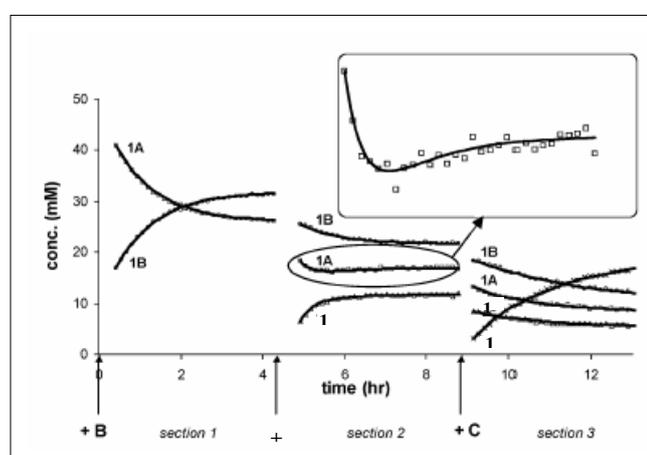


Fig. 6: concentrazione degli idrazoni misurata via ¹H-¹³C HCQC durante l'esperimento di scambio.

Alla fine, l'aggiunta dell'idrazide **C** installa il completo network di 8 molecole (sezione 3). Questa procedura permette l'individuazione dei segnali caratteristici di ciascun idrazone senza la necessità di disporlo puro, semplicemente seguendo l'intensità crescente dei segnali nello spettro dopo l'aggiunta di ciascuna idrazide.

La seconda metodologia di screening è adattata per lo screening parallelo di idrazidi e prevede l'utilizzo della spettrofotometria UV/Vis. Questo approccio permette di ottenere informazioni su un equilibrio covalente dinamico in maniera facile e veloce. Invece che misurare direttamente la concentrazione del composto in esame, esso è indirettamente determinato quantificando la concentrazione di una molecola *reporter*. Le condizioni sperimentali sono scelte in modo tale che la molecola *target* e quella *reporter* siano presenti in concentrazione identica.

A livello sperimentale, la piattaforma **1** è stata fatta equilibrare con quantità equimolari di idrazide *reporter* (idrazide 2 furanoica **L**) e una delle idrazidi in esame (**A-I**), ottenendo la formazione di due idrazoni: **1L** e **1X** ($X=A-I$). La loro concentrazione in soluzione è determinata dalla relativa stabilità termodinamica. L'eccesso di idrazide presente è eliminato usando la *trans*-cinnamaldehyde **4**, senza che vi sia variazione dell'equilibrio tra **1L** e **1X**. L'idrazone **4L** presenta una caratteristica banda di assorbimento a 348 nm, che permette la sua quantificazione in presenza di altri idrazoni. Usando bilanci di massa, è perciò possibile calcolare la concentrazione di ogni altro idrazone presente in soluzione (Fig. 7). Questa metodologia di analisi di equilibri covalenti dinamici è stata testata nella serie di idrazidi usata in precedenza.

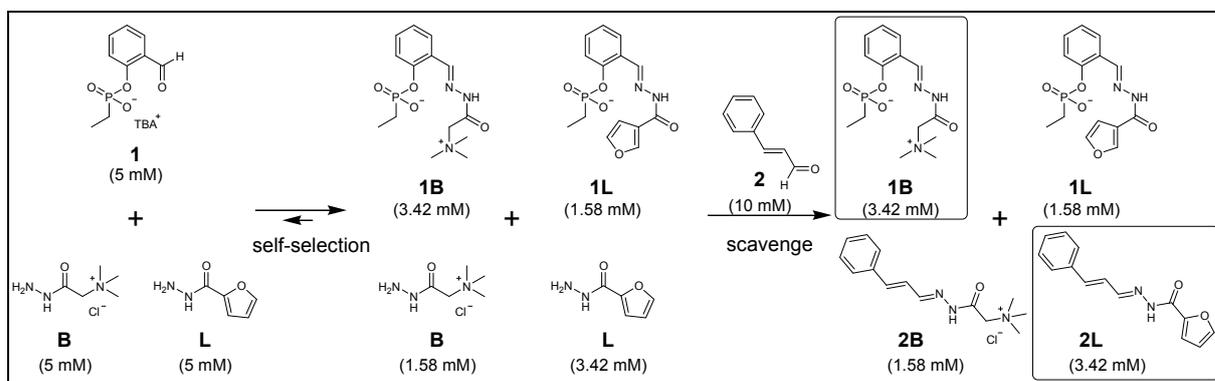


Fig. 7: esempio della procedura utilizzando l'idrazide **B**.

Bibliographic references / Riferimenti bibliografici

- ¹ L. J. Prins, P. Scrimin *Angew. Chem Int. Ed.*, *accepted for publications*
- ² M. M. Mader, P. A. Bartlett, *Chem. Rev.*, **1997**, 97, 1281.
- ³ P. T. Corbett, J. Leclaire; L. Vial, K. R. West, J. Wietor, J. K. M. Sanders, S. Otto, *Chem. Rev.*, **2006**, 106, 3652.
- ⁴ D. A. Erlanson, A. C. Braisted, D. R. Raphael, M. Randal, R. M. Stroud, E. M. Gordon, J. A. Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2000**, 97, 9367.
- ⁵ D. A. Erlanson, J. A. Wells, C. A. Braisted, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **2004**, 33, 199.
- ⁶ G. Gasparini, M. Martin, L. J. Prins, P. Scrimin, *Chem. Commun.*, **2007**, 1340.
- ⁷ G. Gasparini, L. J. Prins, P. Scrimin, *Angew. Chem Int. Ed.*, **2008**, 47, 2475.
- ⁸ a) I. Stahl, G. von Kiedrowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 14014;
b) R. M. Bennes, D. Philp, *Org. Lett.*, **2006**, 8, 3651.
- ⁹ G. Gasparini, B. Vitorge, P. Scrimin, D. Jeannerat, L. J. Prins, *Chem. Commun.*, **2008**, 3034.

CAPITOLO 1: introduzione

1.1 Chimica Combinatoria

La scoperta di sostanze biologicamente attive, recettori molecolari, sensori, inibitori ed anche catalizzatori, richiede la selezione di molecole organiche in grado di interagire selettivamente con un *target*. In questo processo gioca un ruolo fondamentale il riconoscimento molecolare. Dal momento che non è facile razionalizzare le complesse interazioni che possono esservi in questi sistemi, storicamente l'ottenimento di molecole attive è derivato maggiormente dallo studio di prodotti naturali.

Dall'inizio degli anni Sessanta, sono state sviluppate solide metodologie sintetiche utilizzando l'approccio retrosintetico.¹ Attraverso la disconnessione di legami chiave, che rimandano a precise trasformazioni chimiche, molecole attive sono state sintetizzate a partire da reagenti semplici. L'ottimizzazione di queste molecole tuttavia richiede la necessità di mettere a punto una strategia sintetica opportuna per ciascuna modificazione strutturale. Questo fatto, oltre a limitare notevolmente la diversità strutturale esplorabile, rende il processo estremamente dispendioso.

Negli ultimi trent'anni si è imposta come metodologia innovativa per ridurre tempi e costi della ricerca in questo campo la chimica combinatoria (CC, *Combinatorial Chemistry*). Essa consiste nella sintesi di una vasta collezione di molecole potenzialmente utili, preparate connettendo una serie di unità molecolari in sequenze diverse attraverso la ripetizione di opportune reazioni chimiche. La libreria così ottenuta deve essere testata per verificare quale tra i composti che la compongono è il più adatto allo scopo richiesto.

Una libreria combinatoria è un sistema statico, in quanto è frutto di un processo sintetico irreversibile: la selezione del prodotto attivo ricercato avviene testando ogni singola molecola sintetizzata. Appare quindi chiara la necessità di sintetizzare una libreria contenente la più alta diversità possibile, in modo da esplorare lo "spazio chimico" più vasto possibile. Tradizionalmente, nella chimica combinatoria la diversità tra i vari componenti della libreria è data principalmente dai differenti *building blocks* che vengono utilizzati nella fase di sintesi. Da essi dipendono infatti i gruppi sostituenti presenti in una molecola e anche la stereochimica di quest'ultima.

Recentemente sono stati sottolineati i limiti di questo tipo di approccio². L'uso di un grande numero di *building blocks* per formare i componenti della libreria combinatoria porta ad una grande diversità degli stessi, ma rimane tuttavia modesta la loro complessità. Infatti se è vero che essi presentano una varietà di gruppi funzionali, ciononostante le loro strutture sono relativamente simili (Fig. 1.1). La chimica combinatoria appare dunque uno strumento ideale nel caso in cui si voglia ottimizzare una specifica molecola attiva in quanto essa permette di

popolare una specifica area nello spazio chimico intorno ad essa, mentre incontra delle limitazioni nel caso in cui si vogliono sviluppare da zero sistemi funzionali.

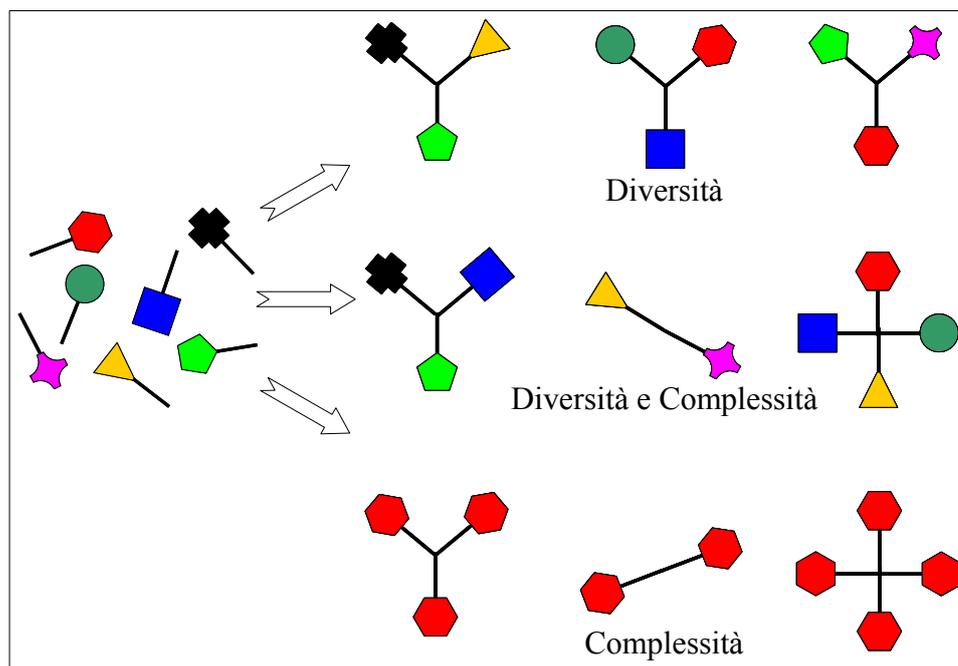


Fig. 1.1: diversità e complessità in miscele combinatorie.

Recentemente è stata sviluppata una nuova metodologia, definita "*diversity oriented synthesis*" (DOS), la quale permette di espandere il campo di applicabilità della chimica combinatoria classica permettendo di esplorare un intorno chimico più ampio, per mezzo dell'aumento della complessità strutturale dei composti prodotti.

1.1.1 *Diversity oriented synthesis*

L'obiettivo della *Diversity Oriented Synthesis* (DOS) riguarda la preparazione di librerie di piccole molecole organiche strutturalmente molto diverse tra loro, in modo da rappresentare la grande varietà di interazioni che possono esservi nei sistemi complessi, come ad esempio quelli naturali. Questo permette di esplorare aree maggiori all'interno dello spazio chimico rispetto alle librerie combinatorie tradizionali.³

La preparazione di una collezione di composti usando la DOS richiede lo sviluppo di una pianificazione che permetta di convertire reagenti semplici in prodotti strutturalmente complessi.⁴ Questo approccio è in contrapposizione con la *target oriented synthesis* (TOS), in cui è usata l'analisi retrosintetica per pianificare i *building blocks* da utilizzare per la formazione della libreria di composti (Fig. 1.2).

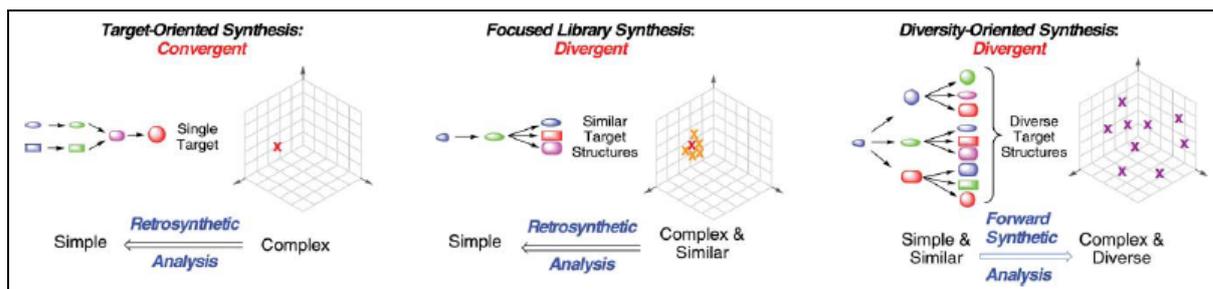


Fig. 1.2: target oriented synthesis (sinistra), librerie combinatorie dinamiche (centro), librerie DOS (destra).

Come risultato di questi differenti approcci, la diversità funzionale e la complessità strutturale generata dalla DOS sono molto maggiori rispetto a quelle ottenibili da sistemi tradizionali, come la chimica combinatoria classica. In entrambi i casi, tuttavia, sono richieste reazioni stereoselettive estremamente efficienti che avvengano con elevate rese.

I composti presenti in una libreria derivante dall'applicazione della DOS sono tra loro differenti non solo per i gruppi funzionali di cui essi dispongono o per la stereochimica di questi ultimi, come avviene nelle librerie combinatorie classiche, ma anche per la loro differente orientazione nello spazio tridimensionale,⁵ considerata la migliore strada per generare diversità strutturale.⁶ In termini qualitativi, questo può essere visualizzato nello "spettro di diversità strutturale" (Fig. 1.3), in cui la diversità può essere variata a partire dalla sintesi mirata di un composto fino alla sintesi di tutte le entità molecolari possibili. La chimica combinatoria, la cui diversità è dovuta ai *building blocks*, e le librerie DOS, che incorporano anche diversità strutturali, producono collezioni di composti tra questi due estremi.

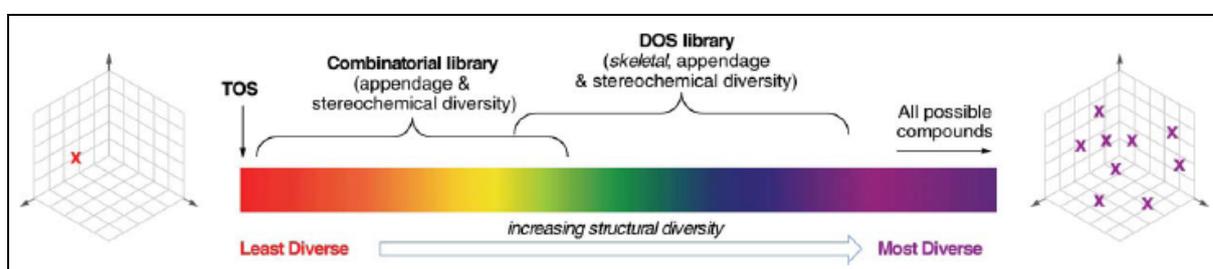


Fig. 1.3: "spettro di diversità molecolare".

La diversità strutturale può essere ottenuta in due modi: il primo riguarda la possibilità di usare differenti reagenti e un comune composto di partenza (Fig. 1.4a), il secondo invece presuppone l'utilizzo di composti di partenza che dispongano già di una certa diversità strutturale, i quali vengono sottoposti ad un comune set di reazioni (Fig. 1.4b).⁷

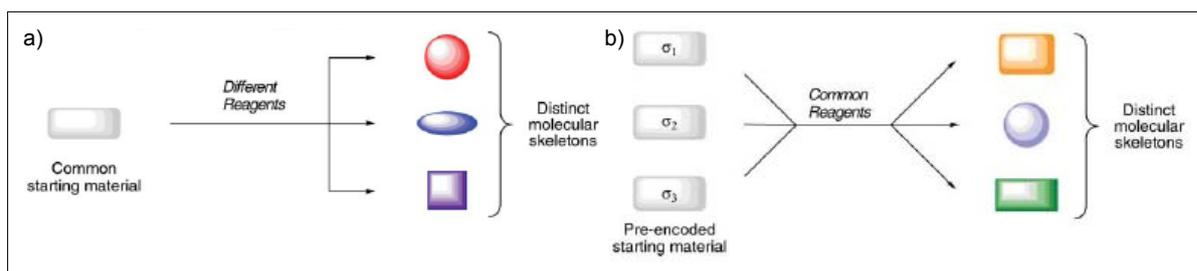


Fig. 1.4: metodi generali per ottenere diversità strutturale.

La bontà di questo tipo di approccio volto a generare la più alta diversità possibile tra i componenti della libreria ha portato, in tempi recenti, allo sviluppo di numerose molecole attive, in particolar modo in ambito biologico, dove sono stati identificati, ad esempio, modulatori di sistemi enzimatici.⁸

Un esempio dell'importanza della diversità strutturale è riportato da Park e collaboratori,⁹ i quali hanno sintetizzato una libreria di diversi composti recanti un'unità benzopiranic comune (Fig. 1.5).

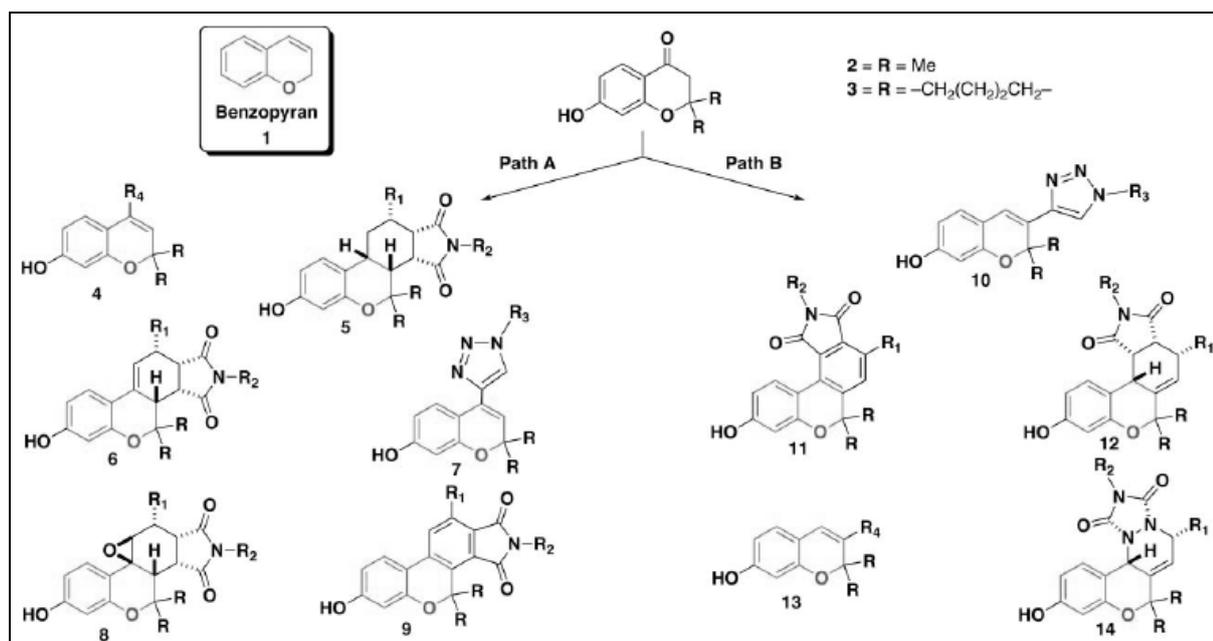


Fig. 1.5: esempio di libreria DOS generata dal benzopirano.

A partire dal benzopirano sono stati sintetizzati due differenti composti, **2** e **3**, a seconda del gruppo sostituito presente. Essi sono poi stati sottoposti a due differenti trasformazioni sintetiche, generando 11 diverse strutture (quindi 22 differenti composti). Come si può vedere la diversità strutturale è molto marcata, anche se la presenza comune dell'unità benzopiranic conferisce ai membri di questa libreria la possibilità di avere buona attività biologica contro le cellule cancerogene. Sono stati eseguiti studi in questo senso che hanno dimostrato che la diversa attività non è data tanto dai diversi gruppi sostituenti presenti, quanto dalla diversa geometria molecolare. Appare quindi chiaro che uno studio del genere può essere usato per identificare la struttura migliore tra tutte quelle possibili, per poi magari utilizzare la chimica combinatoria classica per ottimizzarla.

1.2 Chimica combinatoria dinamica

Un approccio concettualmente completamente differente rispetto a quello appena descritto è usato nella chimica combinatoria dinamica (*dynamic combinatorial chemistry*, DCC) Esso si basa sulla generazione di librerie dinamiche (*dynamic combinatorial libraries*, DCL) le quali possono essere considerate virtuali, in quanto i costituenti fisicamente presenti non sono altro che la parte reale di tutti quelli potenzialmente accessibili dalle combinazioni tra i vari *building blocks*. Una libreria combinatoria dinamica, perciò, esplora uno spazio chimico virtuale, dal momento che non è necessario che ciascun componente della libreria sia fisicamente presente in soluzione. Questo è possibile dal momento che tutti i costituenti sono in equilibrio termodinamico tra loro. Il sistema richiede che vi sia interconversione tra i vari membri della libreria attraverso processi chimici reversibili, che possono coinvolgere sia interazioni covalenti che non covalenti, attraverso quelle che vengono definite reazioni di scambio.

Nella chimica combinatoria dinamica la composizione della libreria è determinata principalmente dalla stabilità termodinamica relativa dei membri che la compongono, nelle particolari condizioni sperimentali in cui essi si trovano. Questo implica che cambiando le condizioni si può indurre una modificazione nella composizione della libreria: in pratica, le librerie combinatorie dinamiche rispondono ad uno stimolo esterno. L'uso di una procedura guidata dalla termodinamica del processo di equilibrio evita la necessità di sintetizzare tutte le possibili molecole, pur portando alla selezione delle migliori. Infatti il controllo termodinamico su cui la chimica combinatoria dinamica si basa è in grado di fare esprimere al sistema quelle molecole che portano ad una stabilizzazione migliore, a spese delle altre. Il processo di selezione è quindi affidato al sistema, il quale è in grado di orientare automaticamente la sintesi verso i candidati migliori.

La maggior parte delle applicazioni riguarda l'aggiunta di una molecola *target* in modo tale da avere riconoscimento molecolare per generare uno *shift* nella composizione della libreria. In linea di principio questo stimolo esterno può però derivare anche da una modificazione fisica (pH, temperatura, pressione, luce, campi magnetici, etc...): una delle prime applicazioni in questo senso è stata data da Giuseppone e Lehn, i quali dimostrarono che una libreria di immine è in grado di adattarsi al cambiamento di pH o temperatura.¹⁰

L'aggiunta di una molecola *target* influenza la composizione dei prodotti non sulla base dei legami che li tengono assieme ma su quello delle loro caratteristiche strutturali.. Quando come *target* si usa un agente che può legarsi ad uno specifico membro della libreria questa specie è stabilizzata e l'equilibrio totale si sposta, generalmente nella direzione di un aumento di concentrazione di tale componente.¹¹ Questo incremento della concentrazione della specie selezionata in risposta all'introduzione del *target* è comunemente definito

"amplificazione". L'amplificazione può coinvolgere una specie la quale agisce da recettore (Fig. 1.6a) o può anche condurre alla scoperta di *guest* molecolari (Fig. 1.6b).

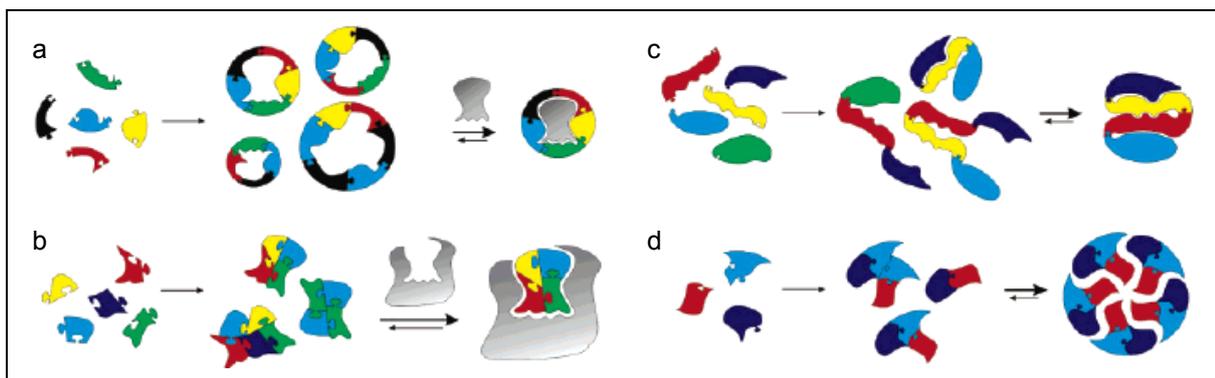


Fig. 1.6: differenti modi di selezione di un componente di una DCL sulla base di interazioni non covalenti.

E' anche possibile che, in assenza di *target*, venga stabilizzata la struttura con le più elevate interazioni intramolecolari, generando così dei foldameri (Fig. 1.6c) oppure quella che presenta le maggiori interazioni intermolecolari, formando degli aggregati (Fig. 1.6d).

Idealmente, l'amplificazione dovrebbe avere luogo per quel composto della libreria combinatoria dinamica che presenta le interazioni più forti (con un *target*, con sé stesso, con altri membri della libreria), in altre parole, quel composto che è maggiormente stabilizzato attraverso interazioni non covalenti. In realtà, invece, il sistema si modifica in modo da minimizzare l'energia libera di tutto il sistema, per cui in casi particolari può accadere che la distribuzione finale all'equilibrio favorisca componenti diversi (per esempio, per questioni statistiche) da quello che poi, una volta isolato, risulta la specie più stabile (vedi paragrafo 1.5). Questo comportamento dipende dal fatto che le librerie combinatorie dinamiche sono *networks* complessi,¹² in cui ogni membro della libreria è connesso agli altri attraverso un insieme di reazioni all'equilibrio. Questo significa che ogni cambiamento della stabilità di ogni singolo membro sarà "sentito" da tutti gli altri. La distribuzione finale è determinata perciò dalla somma totale delle stabilità termodinamiche di tutte le specie presenti.¹³ Nella maggioranza dei casi però questo può essere trascurato in quanto le specie che vengono più amplificate sono anche quelle che poi rivelano avere la maggiore stabilità.

1.3 Reazioni di scambio

Una condizione necessaria per progettare una libreria combinatoria dinamica consiste nella reazione reversibile che deve consentire lo scambio dei *building blocks* tra i vari costituenti della libreria stessa. Essa deve soddisfare alcuni requisiti fondamentali per poter essere applicata. In primo luogo essa deve avvenire in un tempo ragionevole, in modo da dare la possibilità al sistema di rispondere in maniera sufficientemente rapida alle variazioni dell'ambiente di reazione in cui si trova. Dal momento che la reazione di equilibratura e il processo di selezione avvengono simultaneamente, la reazione reversibile deve essere compatibile con le condizioni sperimentali in cui essa avviene. E' importante inoltre che

venga garantita la solubilità di tutti i prodotti di reazione, in quanto la precipitazione di uno dei membri della libreria può agire da "trappola", sottraendolo all'equilibrio totale e quindi spostando inesorabilmente la composizione termodinamica. Le reazioni di scambio devono inoltre dare origine a dei prodotti il più possibile isoenergetici tra loro, in modo da evitare la formazione di librerie combinatorie dinamiche fortemente distorte verso quei prodotti più stabili, in quanto può risultare troppo costoso, in termini energetici, spostare l'equilibrio in un'altra direzione. In realtà quest'ultimo requisito è in genere difficile da soddisfare in quanto la maggior parte delle reazioni, pur dando origine a dei prodotti aventi la stessa energia di legame da un punto di vista entalpico (il legame chimico che si forma è lo stesso), presentano dei contributi entropici differenti (basti pensare, ad esempio, che nella formazione di macrocicli sono entropicamente favoriti gli oligomeri più piccoli).

In base ai requisiti appena descritti, possono essere individuati due tipi diversi di reazioni reversibili: quelli che sfruttano la formazione di legami covalenti e quelli che, invece, presuppongono la formazione di legami non covalenti tra i vari *building blocks*. Generalmente, con l'utilizzo di legami non covalenti, essendo essi più deboli e labili, l'equilibrio è raggiunto con più rapidità. Questo avviene però a spese della stabilità stessa dei prodotti che si formano, rendendoli, di conseguenza, difficili da analizzare e, soprattutto, da isolare. I legami covalenti reversibili, invece, mostrano una cinetica di formazione e rottura più lenta, la quale però può essere accelerata aggiungendo un catalizzatore, portando il processo di equilibrizzazione della libreria su una scala di tempi accettabile dal punto di vista pratico. E' possibile quindi, in seguito alla rimozione del catalizzatore, fermare lo scambio di *building blocks* in modo tale da isolare e manipolare i componenti selezionati dalla libreria dinamica senza il rischio di una nuova equilibrizzazione.

1.3.1 Reazioni coinvolgenti legami non covalenti

Le reazioni più importanti in questa categoria sono senza dubbio quelle coinvolgenti la formazione di legami ad idrogeno e legami coordinativi su metalli. La direzionalità offerta da questo tipo di legami ha permesso la generazione di elaborate architetture supramolecolari,¹⁴ con la formazione di librerie dinamiche in seguito all'aggregazione in maniera non covalente di differenti *building blocks*.

L'uso nella chimica combinatoria dinamica di interazioni metallo-legante richiede che la sostituzione di quest'ultimo sia rapida. La sua velocità dipende da un gran numero di fattori, quali la natura del centro metallico, gli effetti sterici, elettronici e di carica. Questo richiede che le condizioni sperimentali debbano essere messe a punto per ciascuna serie di costituenti. Dal momento che l'interazione metallo-legante è in genere più labile rispetto ai legami covalenti, il suo uso per generare librerie dinamiche è alquanto difficoltoso, infatti, in

letteratura gli esempi riportati richiedono una grande quantità di interazioni non covalenti, per dare stabilità alle strutture che si formano.¹⁵

L'uso di legami ad idrogeno è reso ancora più difficoltoso dal momento che esso è ancora più debole rispetto ai legami coordinativi. Nonostante ciò, usando combinazioni donatore-accettore di *building blocks*, massimizzando il numero di legami ad idrogeno formati (fino a 36 per ciascun componente della libreria) e scegliendo le condizioni in modo da rendere più forti questi legami (per esempio, lavorando a basse temperature ed in solventi apolari), è stato possibile generare una libreria combinatoria dinamica.¹⁶ In questo caso, oltre alle limitazioni proprie dei legami labili già descritte per i legami coordinativi, questo tipo di assemblati in genere non è stabile in solventi polari e non tollera la presenza di acqua, in quanto vengono distrutti i legami ad idrogeno.

1.3.2 Reazioni coinvolgenti legami covalenti

Le reazioni di scambio più utilizzate nella chimica combinatoria dinamica sono senza dubbio quelle che generano legami covalenti. A seconda dei gruppi funzionali che coinvolgono, possono essere divise in due categorie: reazioni omofunzionali ed eterofunzionali.

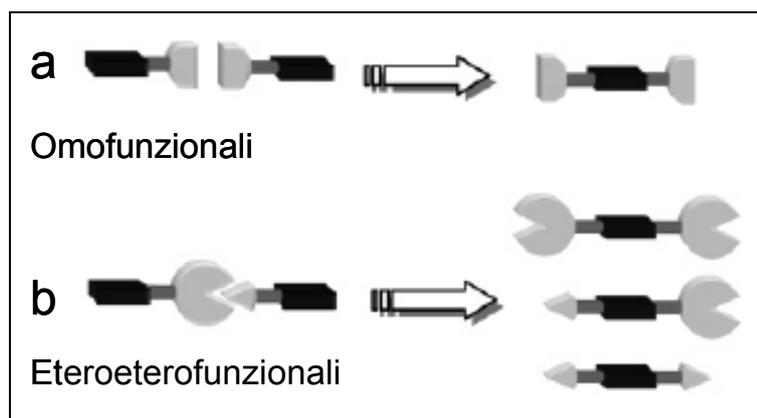
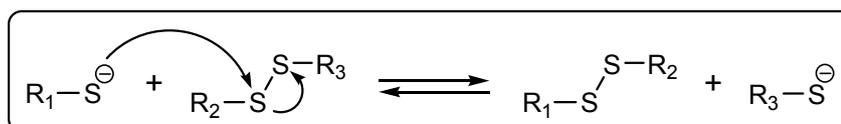


Fig. 1.7: reazioni covalenti reversibili omofunzionali (a) ed eterofunzionali (b).

Il primo caso (Fig. 1.7a) si verifica quando sui vari *building blocks* che originano la libreria è presente il medesimo gruppo funzionale, rendendo così possibile la formazione tra i componenti della libreria anche di omo-oligomeri. La reazione più usata in questo ambito è sicuramente lo scambio disolfuro-tiolato, ampiamente sfruttato nelle reazioni biologiche.¹⁷ Il meccanismo di questa reazione prevede la sostituzione di un tiolato di un disolfuro attraverso l'attacco nucleofilo da parte di un altro tiolato (Schema 1.1).¹⁸



Schema 1.1: scambio disolfuro.

Lo scambio necessita di un tiolo deprotonato, per cui è pH dipendente: già a pH neutro esso può avere luogo. Il processo può essere invece fermato semplicemente diminuendo il pH, permettendo così una semplice analisi della libreria.

Nel caso in cui si sfruttino le reazioni tra gruppi funzionali complementari (Fig. 1.7b) si riesce ad orientare e controllare in maniera migliore la composizione della libreria combinatoria dinamica che si forma, dal momento che può essere eliminata la formazione di omooligomeri (Fig. 1.8b), scegliendo in maniera opportuna i gruppi funzionali presenti in ogni singolo elemento costituente (Fig. 1.8a).

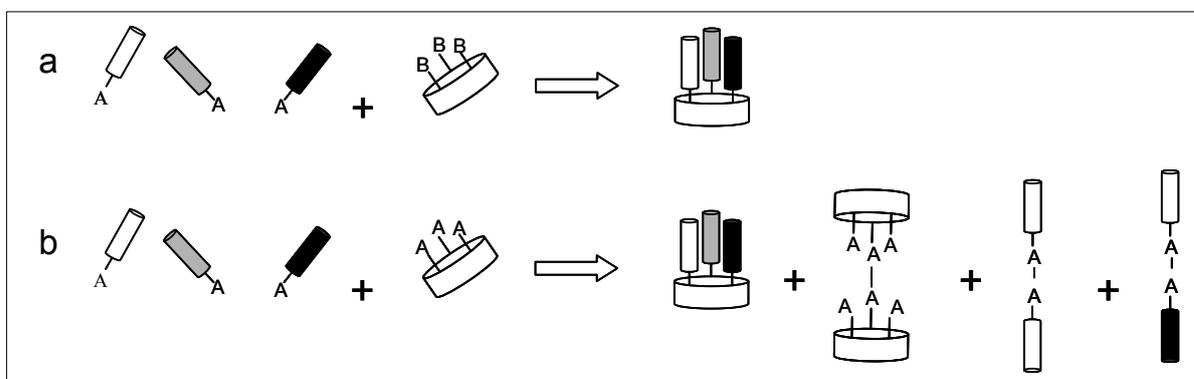
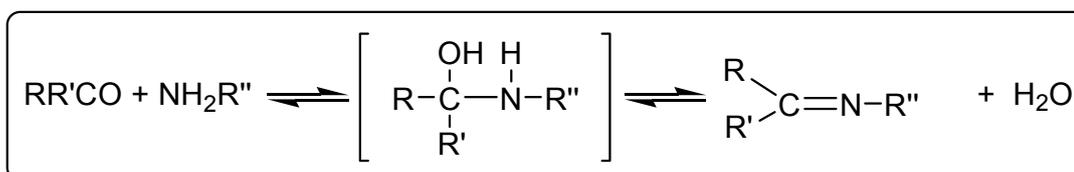


Fig. 1.8: controllo dei prodotti offerto dalle reazioni eterofunzionali (a) e omofunzionali (b).

Il modo più comune per generare questo tipo di librerie dinamiche coinvolge la reazione, acido catalizzata, tra derivati amminici ed aldeidi o chetoni, formando immine o composti recanti doppio legame C=N. Questa reazione è stata scoperta da Schiff,¹⁹ per cui le immine sono definite basi di Schiff e il legame C=N legame azometinico.



Schema 1.2: formazione di legami imminici.

Dal momento che dalla reazione di condensazione si libera una molecola di acqua, per forzare il sistema alla completa formazione degli addotti la si può rimuovere dall'ambiente di reazione (distillazione azeotropica, setacci molecolari).²⁰ Un'altra strada praticabile per variare la stabilità termodinamica dei prodotti consiste nel variare il *pattern* di sostituzione o le caratteristiche stereoelettroniche della base.²¹ In particolar modo, quando la reazione è condotta con una ammina che presenta, legato all'azoto che porta l'attacco, almeno un atomo elettronegativo recante un doppietto non condiviso (ed esempio semicarbazidi, idrazine, idrossilammine, idrazoni, etc) i prodotti che si formano godono di un'elevata stabilità, tanto da permettere la completa formazione del prodotto di condensazione anche in acqua. Generalmente, dal momento che queste reazioni sono acido catalizzate, è sufficiente basicizzare la soluzione contenente la libreria combinatoria dinamica per bloccare il sistema e procedere poi alla sua analisi senza complicazioni.

Oltre alle reazioni coinvolgenti la formazione di disolfuri o le basi di Schiff, le quali sono ampiamente sfruttate per generare librerie combinatorie dinamiche, esistono altre numerose reazioni che permettono di generare processi di disconnessione-riconnessione di legami covalenti, le quali però sono meno diffuse nella chimica combinatoria. Tra queste vale la

pena menzionare la transacilazione,²² l'addizione di Michael,²³ l'alchene e l'alchينو metatesi,²⁴ la reazione di Diels-Alder.²⁵ (Fig. 1.9).

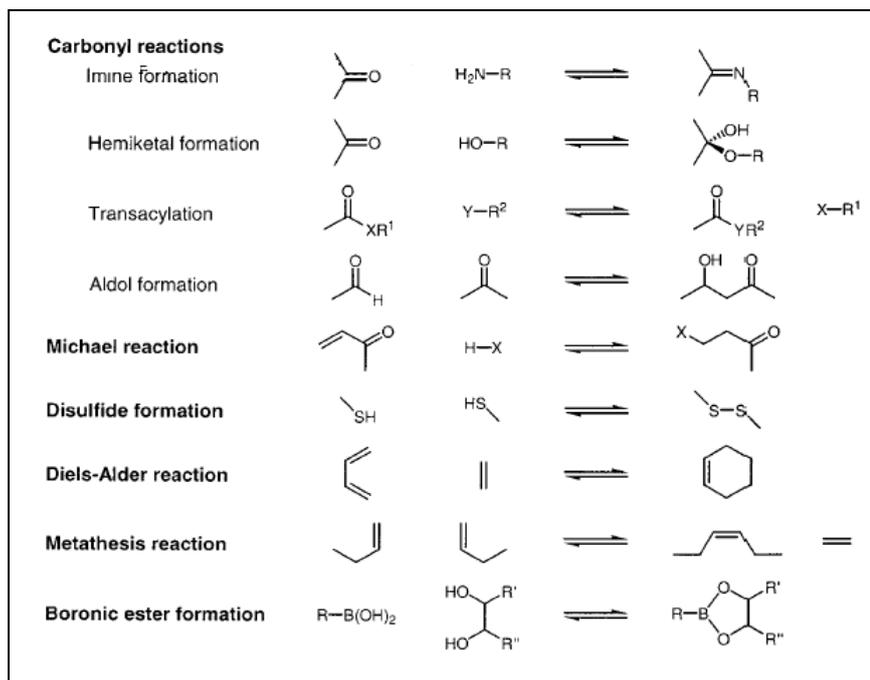


Fig. 1.9: reazioni reversibili sfruttabili in DCC.

1.4 Applicazioni della chimica combinatoria dinamica

Come già discusso precedentemente, il maggior vantaggio della chimica combinatoria dinamica sulla sua controparte "classica" è rappresentato dal fatto che in essa vengono espressi in maniera maggiore i componenti con le più forti interazioni non covalenti, a spese degli altri e ciò avviene in maniera spontanea. Questo rende l'approccio dinamico estremamente adatto per lo *screening* di composti che presentano attività nel riconoscimento molecolare. I campi in cui la chimica combinatoria dinamica può essere applicata con successo comprendono lo studio di foldameri sulla base di interazioni intramolecolari (peptidi,²⁶ nucleotidi,²⁷ polimeri sintetici²⁸), selezione di aggregati sulla base di interazioni non covalenti tra i membri della libreria,²⁹ selezione di sistemi *host-guest*. In quest'ultimo caso sono stati sviluppati tramite librerie combinatorie dinamiche diversi metodi per generare sia dei recettori molecolari, che ligandi, specialmente per biomolecole.

1.4.1 Sviluppo di *guest*

Lo sviluppo di *guest* molecolari tramite chimica combinatoria dinamica è stato concentrato particolarmente sulla determinazione di ligandi in grado di essere riconosciuti da biomolecole. Infatti in questi sistemi complessi, quali proteine o acidi nucleici, l'esatta struttura tridimensionale è spesso solo parzialmente nota, difficile da modellare o anche dipendente dal legame con il *guest* stesso, per cui non è semplice anticipare le interazioni necessarie per avere un processo di riconoscimento. In quest'ottica le reazioni più

comunemente utilizzate sono lo scambio disolfuro-tiolato,^{16,30} e lo scambio ammine-immine,^{19,31} dal momento che esse avvengono facilmente in condizioni fisiologiche. Di seguito è riportato il primo esempio, dato da Huc e Lehn, di come sia possibile generare un inibitore per un enzima da una libreria dinamica.³²

La libreria utilizzata, mostrata in figura 1.10, è stata generata in presenza ed in assenza dell'enzima anidrasi carbonica II (CAII), mescolando tra loro ammine ed aldeide (quest'ultime in eccesso di 15 equivalenti in modo da evitare competizione da parte dei gruppi amminici presenti sulla proteina) in soluzione acquosa.

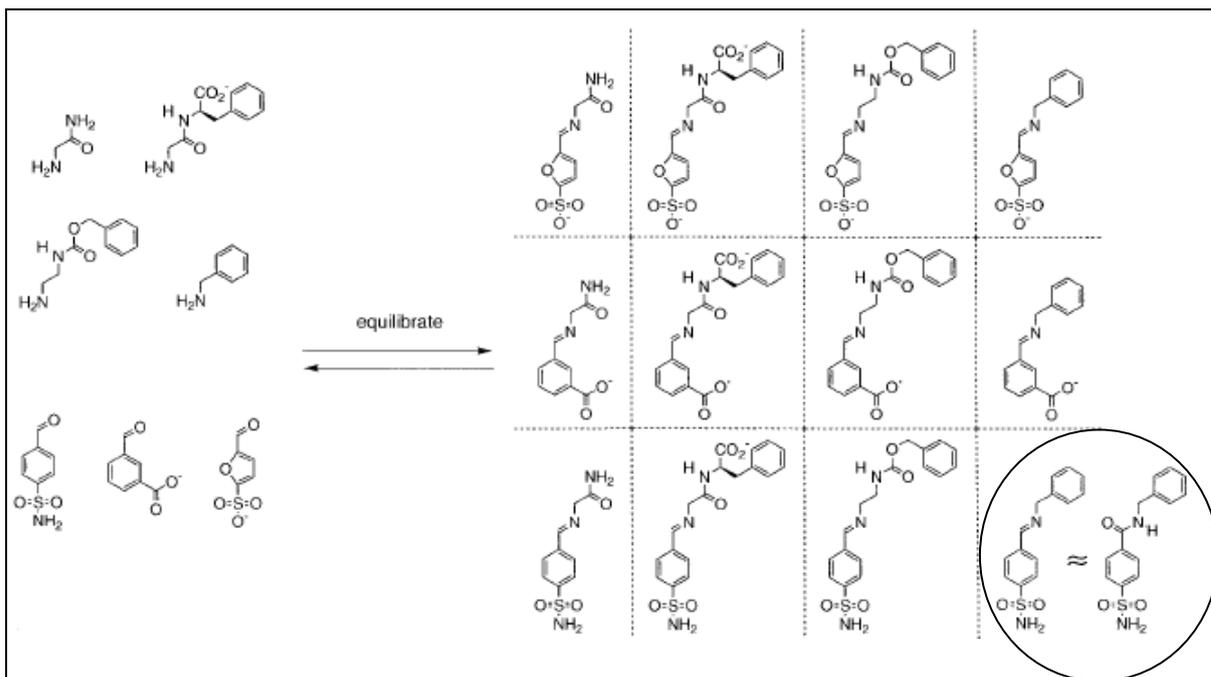


Fig. 1.10: DCL generata dalla combinazione di 3 aldeidi e 4 ammine. Evidenziato il miglior inibitore della CAII selezionato.

Il confronto dei profili HPLC delle librerie (dopo riduzione in modo da fissarle) in presenza o in assenza dell'agente templante ha permesso di evidenziare l'amplificazione del composto evidenziato, la cui struttura è simile agli inibitori noti di questo enzima.

1.4.2 Sviluppo di recettori

Il processo di sviluppo di nuovi recettori supramolecolari è alquanto laborioso dal momento che esso richiede lunghe fasi di progettazione, sintesi, valutazione e razionalizzazione dei sistemi. La chimica combinatoria dinamica consente di evitare queste fasi, semplicemente usando dei frammenti di recettore e lasciando alla molecola *target* il compito di selezionarne l'assemblaggio. Lo sviluppo di questa linea di ricerca ha portato a generare librerie di recettori lineari³³ (a partire da *building blocks* monofunzionalizzati), di recettori macrociclici³⁴ (da elementi costituenti bifunzionalizzati) e di capsule molecolari.³⁵

Uno degli esempi più interessanti in questo senso è stato sviluppato dal gruppo di Sanders, il quale ha sviluppato un sistema in grado di esprimere differenti recettori in funzione dei

differenti *guests* cui è esposto.³⁶ Gli elementi costituenti la libreria sono dei ditioli (1, 2, 3, Fig. 1.11) i quali si possono legare tra loro per formare una famiglia di recettori ciclici.

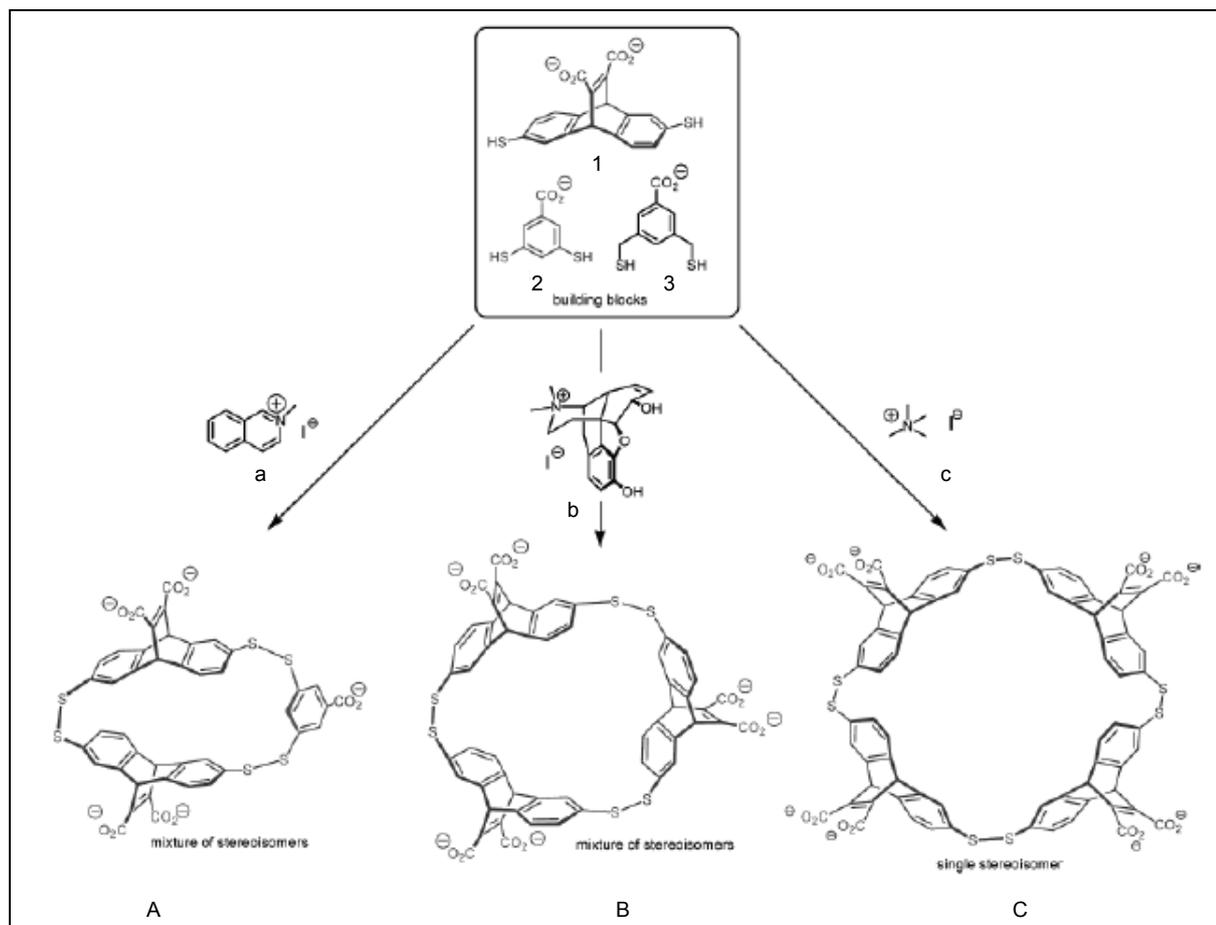


Fig. 1.11: recettori ciclici selezionati a seconda del *target* usato.

L'aggiunta di 2-metil-isochinolina (a) alla miscela dinamica provoca l'amplificazione del recettore formato da tre *building blocks* A, mentre l'aggiunta di N-metil-morfina genera l'amplificazione del recettore B. E' importante sottolineare che i recettori selezionati vengono prodotti come miscela di stereoisomeri. Questo però cambia quando alla libreria viene aggiunto trimetil ammonio ioduro. Esso infatti promuove la formazione del tetramero C, il quale è presente come singolo stereoisomero pur partendo da una miscela racema di *building blocks*.

Il sistema che ha dato i risultati più sorprendenti e decisamente impensabili a priori è stato riportato nel 2005.³⁷ Il gruppo di Sanders ha sviluppato una libreria combinatoria dinamica utilizzando come *building block* uno pseudo-dipeptide (*pPFm*). Esso è in grado, disponendo di due gruppi funzionali complementari, di legarsi per formare dei macrocicli. In presenza di ioni litio o sodio si induce l'amplificazione del trimero ciclico,³⁸ mentre il sistema risponde in maniera decisamente diversa in caso di aggiunta di acetilcolina (Fig. 1.12).

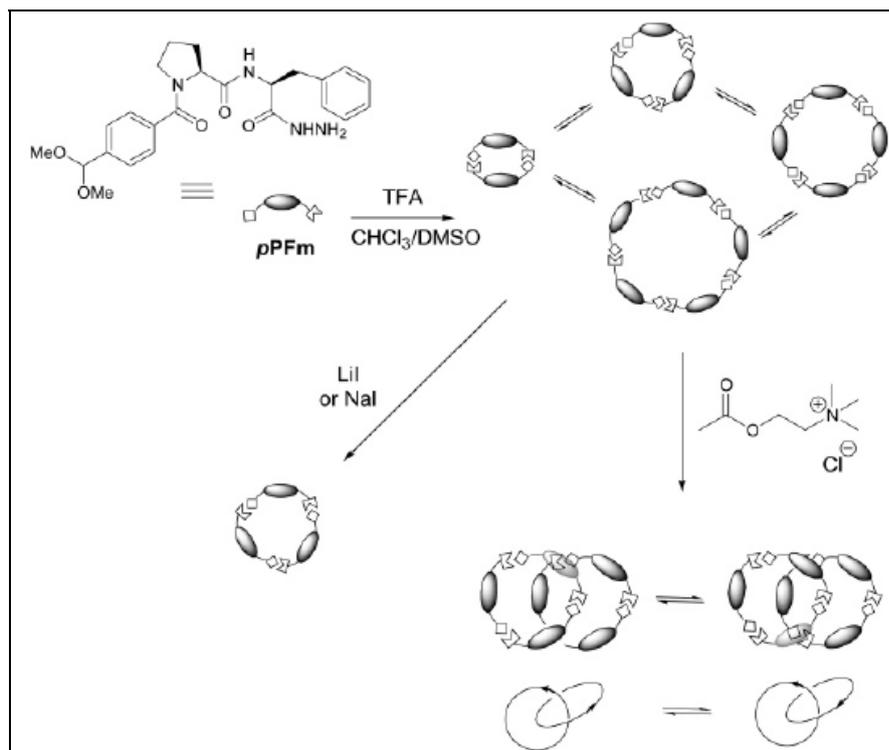


Fig. 1.12: catenani prodotti dalla DCL in seguito all'aggiunta di acetilcolina.

Inizialmente, il dimero ciclico è il maggior componente presente nella libreria. Esso però è un prodotto cinetico, dal momento che in un'ora diventa maggioritario un esamero ciclico. Misure LC-MS hanno rivelato che il nuovo componente prodotto è in realtà costituito da due trimeri ciclici, accoppiati ad anello per costituire un [2]-catenano. Da un'analisi NMR approfondita è emerso inoltre che solo uno solo dei due possibili stereoisomeri è prodotto. Il processo di amplificazione di questo componente della libreria è guidato dalla grande entalpia di legame con l'acetilcolina, dal momento che è stata misurata una costante di *binding* $K = 1.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, che riesce a controbilanciare la bassa probabilità che si formi una struttura così complessa.

Questi lavori ben esemplificano le potenzialità e l'adattabilità della chimica combinatoria dinamica nello sviluppo di recettori, in quanto in un singolo passaggio è possibile, a seconda del *target* usato, sintetizzare, selezionare e, una volta bloccata la miscela, isolare il componente attivo, anche tra quelli presenti in maniera "virtuale" all'interno della miscela.

1.4.3 Sviluppo di catalizzatori

I risultati ottenuti nello sviluppo di recettori molecolari tramite l'uso di librerie combinatorie dinamiche hanno dato un notevole impulso all'applicazione di tale strategia per l'ottenimento di nuovi catalizzatori. Nonostante gli sforzi applicati, i catalizzatori scoperti non sono numerosi, ma comunque rappresentano la prova che tale principio può essere applicato con successo.³⁹

Un catalizzatore funziona in quanto diminuisce l'energia di attivazione di una reazione, aprendo un cammino reattivo alternativo. Questo può avvenire diminuendo l'energia dello stato di transizione, ad esempio formando delle interazioni stabilizzanti con esso. Dal momento che lo stato di transizione, per sua stessa definizione, è una specie labile, non è possibile praticare uno screening combinatorio dinamico su di esso per determinare il miglior recettore molecolare, ma si deve utilizzare un analogo dello stato di transizione (*transition state analogue*, TSA).⁴⁰

Il TSA è un composto stabile che è in grado di rappresentare in maniera soddisfacente le caratteristiche geometriche ed elettroniche dello stato di transizione. In figura 1.13 sono rappresentati tre tipi diversi di legami ed i relativi analoghi di stato di transizione in una reazione di idrolisi.

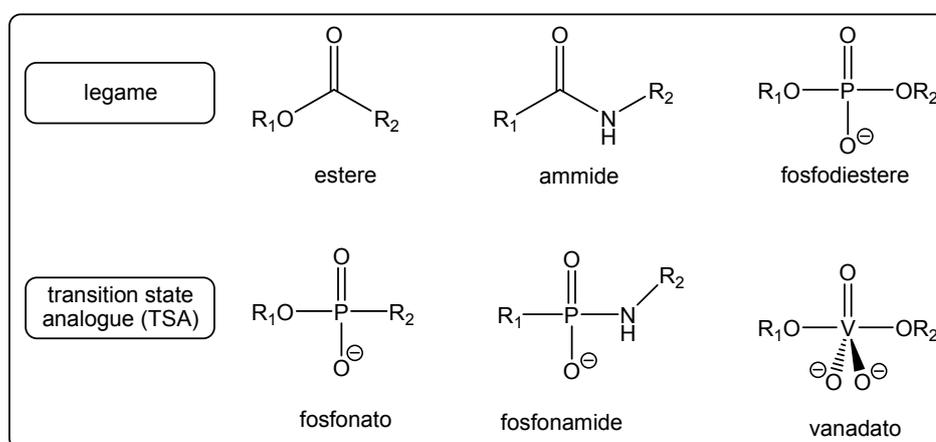


Fig. 1.13: tipi di legame e relativi TSA in una reazione di idrolisi.

Utilizzando la teoria del riconoscimento dell'analogo dello stato di transizione come criterio per sviluppare un catalizzatore sono stati ottenuti risultati positivi con anticorpi catalitici⁴¹ e polimeri catalitici,⁴² per cui essa è stata estesa anche alla chimica combinatoria dinamica. La libreria viene fatta equilibrare in presenza del TSA della reazione in esame, portando all'amplificazione del componente che ha le più forti interazioni con esso, quindi del catalizzatore.

Un esempio di sviluppo di catalizzatori mediante chimica combinatoria dinamica è stato ottenuto per la reazione di Diels-Alder rappresentata in figura 1.14.⁴³

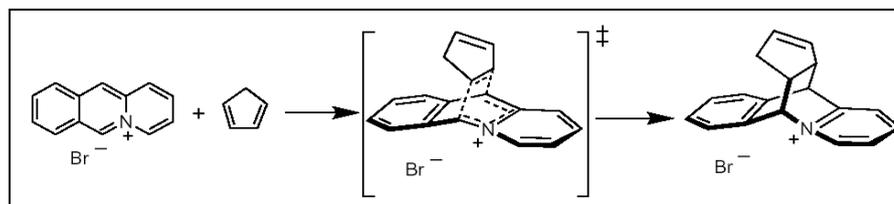


Fig. 1.14: reazione Diels-Alder da catalizzare

In questo caso, data l'elevata somiglianza geometrica tra lo stato di transizione e il prodotto stesso, è stato utilizzato quest'ultimo come TSA. Come elementi costituenti la libreria dinamica sono stati utilizzati gli stessi riportati in figura 1.11. Lasciando equilibrare la libreria in presenza del TSA, si è ottenuta l'amplificazione dei prodotti *D* ed *E* (Fig. 1.15).

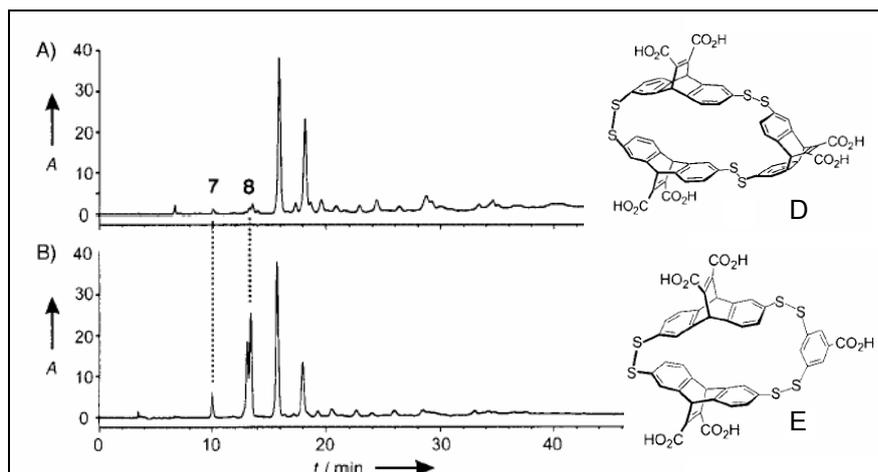


Fig. 1.15: potenziali catalizzatori selezionati dalla DCL.

E' stato determinato che l'eterotrimerico *E* lega meglio il reagente rispetto al prodotto, mentre per la specie *D* avviene il contrario. In base a ciò *D* dovrebbe presentare una attività catalitica, in quanto dispone di una cavità sufficientemente larga da poter ospitare entrambi i reagenti della reazione. Esperimenti cinetici hanno confermato questa previsione, in quanto *D* è in grado di accelerare di circa 10 volta la reazione, mentre *E* non presenta attività catalitica.

Dal momento che è stato usato il prodotto stesso come TSA, il catalizzatore selezionato presenta inibizione da prodotto. Fortunatamente però l'affinità del macrociclo per i reagenti ed il prodotto della reazione sono comparabili, per cui è possibile avere comunque un certo numero di cicli catalitici.

1.5 Limitazioni della chimica combinatoria dinamica

Lo sviluppo concettuale delle librerie combinatorie dinamiche è stato guidato largamente dai lavori sperimentali effettuati, infatti molti di essi costituivano dei veri e propri "*proof-of-principle*". Nella maggioranza dei casi è stata osservata una forte amplificazione di uno dei membri della libreria, anche se le librerie studiate erano di dimensioni alquanto ridotte. Questo quindi solleva il problema di cosa possa accadere con l'aumento del numero di elementi costituenti: da una parte la probabilità che venga generato il miglior agente interagente aumentano, dall'altra però la possibilità di riconoscerlo diventa più difficile, in quanto immerso in un insieme di strutture in competizione. Aumentando le dimensioni delle librerie può anche accadere che vengano generati più membri con affinità comparabile, rendendo difficilmente prevedibile la risposta del sistema in termini di amplificazione.

Negli ultimi anni, per far fronte a questi problemi, è stato avviato un approfondito studio teorico di miscele combinatorie dinamiche,⁴⁴ simulando scenari diversi in modo da valutare le possibili risposte date dal sistema. Il contributo più importante in questo ambito è stato portato da Severin e collaboratori,⁴⁵ i quali hanno dimostrato come, già in una piccola libreria modello, i risultati che si ottengono non sempre coincidono con quelli attesi.

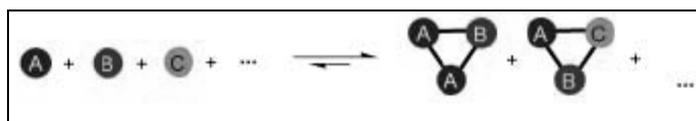


Fig. 1.16: libreria di trimeri ciclici originata da 3 diversi *building blocks*.

E' stata simulata una libreria di composti formata da tre diversi *building blocks* (**A**, **B**, **C**), i quali si legano tra loro con una fissata stechiometria per formare 10 diversi trimeri (Fig. 1.16). A seconda della stabilità relativa impostata (dovuta, per esempio, da interazioni con una molecola *target*), sono stati ottenuti risultati in contrasto con il principio "dell'amplificazione del miglior *binder*"⁴⁶ (Tabella 1.1).

Entry	Relative stability relative concentration [%]									
1	1 3.7	1 11.1	1 11.1	1 3.7	1 11.1	1 11.1	1 3.7	1 11.1	1 11.1	1 22.2
2	1000 28.1	1 0.5	1 3.4	1 7.2	1 21.5	1 21.5	1 7.2	1 0.5	1 3.4	1 6.8
3	1 0.0	1000 47.7	1 0.5	1 1.9	1 11.1	1 21.2	1 13.5	1 0.1	1 1.9	1 2.0
4	1 0.0	1 0.1	1 0.1	1 0.0	1 0.1	1 0.1	1 0.0	1 0.1	1 0.1	1000 99.6
5	1000 0.4	1 0.0	1 0.1	1 0.1	1 0.3	1 0.3	1 0.1	1 0.0	1 0.1	1000 98.6
6	900 0.1	600 2.1	300 22.8	1 0.5	1 1.6	1 1.6	1 0.5	600 2.1	300 22.8	300 45.7

Tabella 1.1

Se il trimero **AAA** è stabilizzato rispetto agli altri di un fattore 1000, esso sarà la specie maggioritaria in soluzione, con un fattore di amplificazione $f_{AAA} = 7.6$ relativamente alla concentrazione originale all'equilibrio (riga 2). Se una stabilizzazione analoga viene eseguita su **AAB** (riga 3), si ottiene un risultato simile: essa è la specie dominante in soluzione (47.7%, $f_{AAB} = 4.3$). E' importante notare che in entrambi i casi pure le specie aventi un elevato contenuto di **B** e **C** vengono amplificate (per esempio, $f_{CCB} = 3.6$, riga 3). Nel caso invece vengano stabilizzate, contemporaneamente e con la stessa intensità, le specie **AAA** e **ABC**, si ottiene unicamente l'amplificazione di quest'ultima ($f_{ABC} = 4.4$) ed essa è praticamente il trimero esclusivo in soluzione. Inoltre, **AAA** non solo non viene amplificato, ma esso viene addirittura deamplificato ($f_{AAA} = 0.11$). Una situazione più complicata è infine presentata nell'ultima riga: la presenza dell'elemento **A** nel trimero porta ad una stabilizzazione relativa di 300. In questo caso, le tre specie (**ABB**, **ACC** e **ABC**) che presentano moderata stabilità dominano ($f_{ABB} = f_{ACC} = f_{ABC} = 2.1$), mentre quella che presenta la stabilizzazione maggiore (**AAA**) è quasi estinta dalla libreria termodinamica.

L'esempio appena presentato sottolinea come, già in un sistema a prima vista semplice, i risultati che in alcuni casi si ottengono possono essere completamente fuorvianti. Sono stati proposti alcuni rimedi per evitare che ciò abbia luogo. Il primo riguarda la possibilità di separare i membri della libreria legati al *target* da quelli che non lo sono, in modo da eliminare i falsi positivi. La libreria può essere inoltre progettata in modo tale da essere

dominata dagli elementi costituenti liberi, dove l'interazione con il *target* rende possibile la loro aggregazione.

1.6 *Dynamic covalent capture*

Uno dei metodi più eleganti sfruttati per evitare l'ottenimento di "falsi positivi" in una libreria combinatoria dinamica e, più in generale, affrontare le limitazioni di questo tipo di tecnica è senza dubbio l'utilizzo del "*covalent capture*".⁴⁷ In esso la formazione del legame covalente (irreversibile o, nel caso della chimica combinatoria dinamica, reversibile) è accoppiata ad un evento di riconoscimento molecolare. Questo significa che solo in caso vi siano interazioni non covalenti è possibile originare il legame covalente (Fig. 1.17).

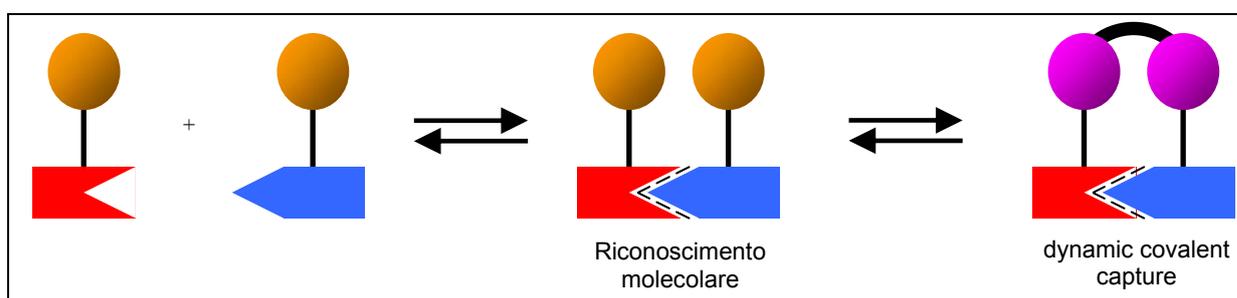


Fig. 1.17: rappresentazione del *dynamic covalent capture*.

Questo tipo di approccio è largamente sfruttato in natura (sintesi peptidica,⁴⁸ catalisi enzimatica,⁴⁹ etc.) ed ha ispirato i chimici ad applicare la stessa strategia in sistemi artificiali.⁵⁰

La distribuzione dei prodotti è determinata dalle stabilità termodinamiche relative dei componenti liberi, del complesso frutto del riconoscimento molecolare ($\Delta G^{\circ}_{\text{complex}}$) e dall'addotto covalente formato ($\Delta G^{\circ}_{\text{complex}} + \Delta G^{\circ}_{\text{capture}}$) (Fig. 1.18).

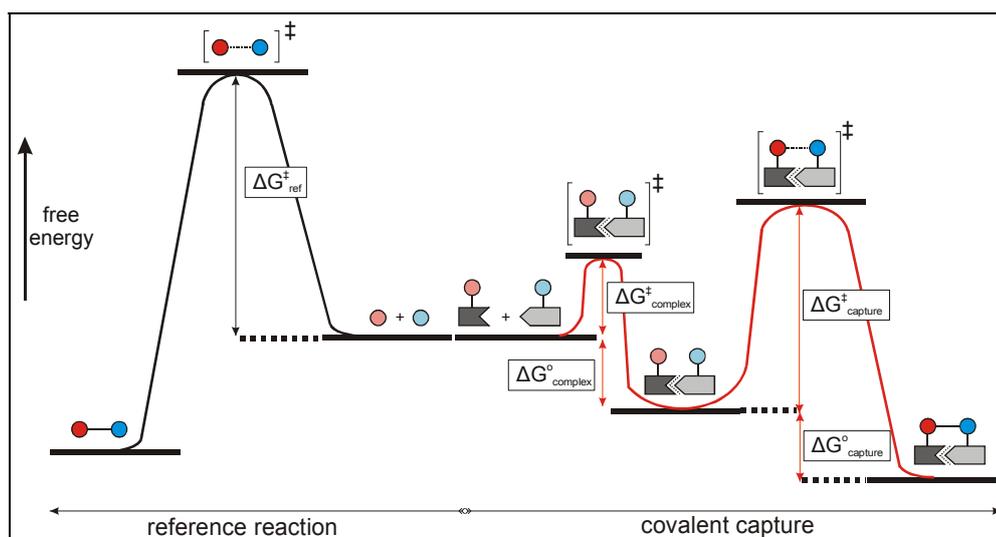


Fig. 1.18: diagramma energetico per il *dynamic covalent capture* e la stessa reazione in assenza di riconoscimento.

Questo fatto può essere sfruttato in due modi differenti. Da un lato, può rappresentare uno strumento adatto per determinare la formazione di complessi anche se questi sono frutto di una debole interazione. In questi sistemi, a causa del modesto $\Delta G^\circ_{\text{complex}}$, non sono presenti in soluzione quantità apprezzabili di complesso, per cui l'aggiunta della formazione di un legame reversibile ($\Delta G^\circ_{\text{complex}} + \Delta G^\circ_{\text{capture}}$) può spingere l'equilibrio verso la formazione di addotti. Il *dynamic covalent capture* può essere anche applicato per valutare la differente stabilità termodinamica di addotti covalenti. In questo caso, assumendo che si formino legami isoenergetici (stesso $\Delta G^\circ_{\text{capture}}$), è la forza dell'interazione non covalente ($\Delta G^\circ_{\text{complex}}$) che determina la distribuzione dei prodotti nella miscela.

Un esempio di come si possa studiare la forza dell'interazione non covalente nei complessi è stato portato da Gellman e suoi collaboratori, i quali hanno sviluppato una nuova strategia per misurare la stabilizzazione della struttura terziaria in polipeptidi.⁵¹ L'approccio, definito *backbone thioester exchange* (BTE), consiste nella sostituzione di un legame ammidico nel polipeptide con un tioestere, il quale è soggetto a scambio in presenza di tioli nelle condizioni fisiologiche necessarie per non denaturare il peptide. La validità di questo modello è stata applicata sul polipeptide pancreatico bovino (bPP), un peptide di 36 amminoacidi che adotta una struttura terziaria ben definita, in cui la regione N-terminale è ripiegata sulla regione C-terminale che si trova in α -elica. Sostituendo il legame ammidico tra queste due regioni (dal momento che esso non partecipa al *binding*) con un legame tioestereo, in presenza di un tiolo libero di riferimento, si instaura un equilibrio di competizione tra quest'ultimo e la regione C-terminale per il legame con quella N-terminale (Fig. 1.19).

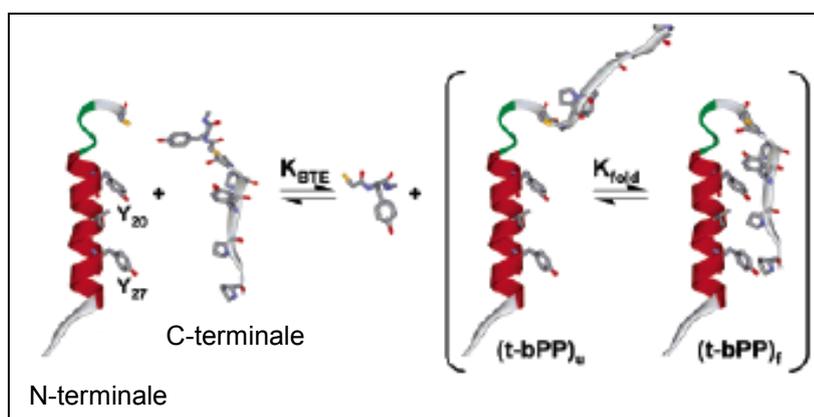


Fig. 1.19: *backbone thioester exchange* su bPP.

Assumendo che il tiolo di riferimento non abbia interazioni con la regione N-terminale e che i legami tioesterici che si formano siano isoenergetici (uguale $\Delta G^\circ_{\text{capture}}$), lo spostamento dell'equilibrio è da attribuire all'interazione non covalente ($\Delta G^\circ_{\text{complex}}$).

Questo approccio permette un rapido studio degli effetti che può avere la modificazione di un singolo amminoacido nella catena peptidica sulla struttura terziaria della proteina.⁵²

L'applicazione del *dynamic covalent capture* non è però limitato allo studio di interazioni tra diversi sistemi. Esso è stato applicato con successo da Wells, Braisted, Erlanson e

collaboratori i quali hanno messo a punto un metodo (definito "Tethering[®]") per lo sviluppo di farmaci basato sullo screening combinatorio di possibili inibitori per proteine.⁵³ Esso consiste nell'uso dello scambio disolfuro tra un residuo cisteinico localizzato vicino al sito di interesse e una piccola libreria di possibili leganti, anch'essi contenenti un disolfuro (Fig. 1.20).

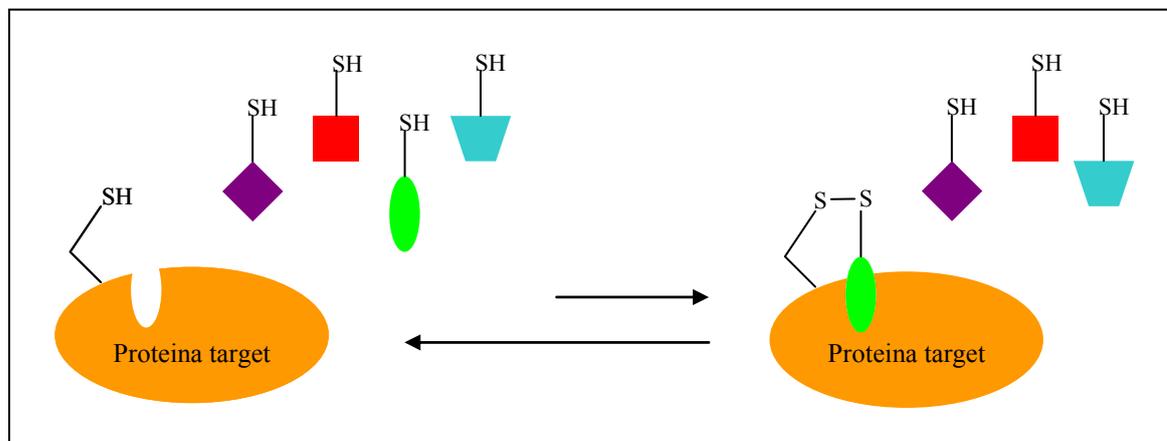


Fig. 1.20: sviluppo di inibitori tramite *tethering*.

La maggior parte dei leganti, che non presentano interazioni con il sito *target* della proteina, avranno il legame disolfuro con essa molto labile. In presenza di interazioni tra sito di interesse e legante si verifica una stabilizzazione del legame disolfuro che porta allo spostamento dell'equilibrio termodinamico verso la proteina modificata ($\Delta G^{\circ}_{\text{complex}} + \Delta G^{\circ}_{\text{capture}}$). La semplice determinazione della composizione all'equilibrio termodinamico rivela quindi quale membro della libreria presenta la maggiore affinità con la proteina. Il vantaggio principale di questa strategia consiste perciò nell'abilità di determinare interazioni anche molto deboli tra il sito della proteina e i membri della libreria.

L'approccio *tethering* è stato applicato con successo nella determinazione di inibitori della timidilato sintasi (TS), enzima coinvolto nella sintesi della timidina monofosfato e quindi un candidato per lo sviluppo di farmaci anticancro. È stato eseguito lo screening di possibili leganti in gruppi di 10, con masse molecolari sufficientemente diverse in modo tale da permettere l'identificazione dei componenti selezionati tramite spettrometria di massa. Lo *screening* di 1200 candidati ha portato alla selezione di un buon inibitore della proteina. La sensibilità del *tethering* nel determinare interazioni deboli è rappresentata dal basso valore ottenuto per la costante di dissociazione del composto selezionato: l'uso di tecniche di *screening* tradizionali probabilmente non avrebbero avuto successo.

1.7 Riferimenti bibliografici

- ¹ E. J. Corey and X.-M. Cheng, *The Logic of Chemical Synthesis* (Wiley, New York, **1989**).
- ² G.L.Thomas, E. E.WyattandD.R. Spring, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.*, **2006**, 9, 700.
- ³ S. J. Haggarty, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2005**, 9, 296.
- ⁴ M. D. Burke and S. L. Schreiber, *Angew. Chem, Int. Ed.* **2004**, 43, 46.
- ⁵ M. D. Burke, E. M. Berger and S. L. Schreiber, *Science*, **2003**, 302, 613.
- ⁶ E. E. Wyatt, S. Fergus, W. Galloway, A. Bender, D. J. Fox, A. T. Plowright, A. S. Jessiman, M. Welch and D. R. Spring, *Chem. Commun.*, **2006**, 3296.
- ⁷ M. D. Burke, E. M. Berger and S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 14095.
- ⁸ a) S. K. Ko, H. J. Jang, E. Kim and S. B. Park, *Chem. Commun.*, **2006**, 2962.
b) Y. K. Kim, M. A. Arai, T. Arai, J. O. Lamenza, E. F. Dean, N. Patterson, P. A. Clemons and S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 14740.
c) A. N. Koehler, A. F. Shamji and S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 8420.
d) D. R. Spring, S. Krishnan, H. E. Blackwell and S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 1354.
e) F. G. Kuruvilla, A. F. Shamji, S. M. Stenson, P. J. Hergenrother and S. L. Schreiber, *Nature*, **2002**, 416, 653.
- ⁹ S. K. Ko, H. J. Jang, E. Kim and S. B. Park, *Chem. Commun.*, 2006, 2962.
- ¹⁰ N. Giuseppone, J. M. Lehn *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 1715.
- ¹¹ a) D. H. Busch, N. A. Stephenson, *Coord. Chem. Rev.* **1990**, 100, 119.
b) D. H. Busch, *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1992**, 12, 389.
c) S. Anderson, H. L. Anderson, J. K. M. Sanders, *Acc. Chem. Res.* **1993**, 26, 469.
d) R. Hoss, F. Vögtle, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 375.
- ¹² S. Otto, *J. Mater. Chem.* **2005**, 15, 3357.
- ¹³ a) Z. Grote, R. Scopelliti, K. Severin, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, 42, 3821.
b) K. Severin, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 2565.
c) P. T. Corbett, J. K. M. Sanders, S. Otto, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, 46, 8858.
- ¹⁴ a) M. M. Conn, J. Jr. Rebek, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1647.
b) B. Linton, A. D. Hamilton, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1669.
c) S. Leininger, B. Olenyuk, P. J. Stang, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 853.
d) G. F. Swiegers, T. J. Malefetse, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 3483.
- ¹⁵ B. Hasenknopf, J.-M. Lehn, N. Boumediene, A. Dupont-Gervais, A. Van Dorsselaer, B. Kneisel, D. Fenske, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 10956.
- ¹⁶ a) Crego Calama, M.; Hulst, R.; Fokkens, R.; Nibbering, N. M. M.; Timmerman, P.; Reinhoudt, D. N. *Chem. Commun.* **1998**, 1021.
b) P. Timmerman, R. H. Vreekamp, R. Hulst, W. Verboom, D. N. Reinhoudt, K. Rissanen, K. A. Udachin, J. Ripmeester, *Chem. Eur. J.* **1997**, 3, 1823.
- ¹⁷ a) H. F. Gilbert, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 29399.
b) J. Golik, J. Clardy, G. Dubay, G. Groenewold, H. Kawaguchi, M. Konishi, B. Krishnan, H. Ohkuma, K. Saitoh, T. W. Doyle, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 3461.

- c) H. F. Gilbert, *Methods Enzymol.* **1995**, 251, 8.
- ¹⁸ P. A. Fernandes, M. J. Ramos, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 257.
- ¹⁹ H. Schiff, *Ann. Chem. Pharm.* **1864**, 131, 118.
- ²⁰ a) R. B. Moffett, W. M. Hoehn, *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, 69, 1792.
b) M. Freifelder, *J. Org. Chem.* **1966**, 31, 3875.
- ²¹ a) J. B. Conant, P. D. Barret, *J. Am. Chem. Soc.* **1932**, 54, 2881.
b) E. G Sander, W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 6154.
- ²² a) K. S. Chichak, S. J. Cantrill, A. R. Pease, S. H. Chiu, G.W. V. Cave, J. L. Atwood, J. F. Stoddart, *Science* **2004**, 304, 1308.
b) S. J. Rowan, P. A. Brady, J. K. M. Sanders, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 2143.
c) P. G. Swann, R. A. Casanova, A. Desai, M. M. Frauenhoff, M. Urbancic, U. Slomczynska, A. J. Hopfinger, G. C. LeBreton, D. L. Venton, *Biopolymers* **1996**, 40, 617.
d) R. J. Lins, S. L. Flitsch, N. J. Turner, E. Irving, S. A. Brown, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 3405.
- ²³ a) B. L. Shi, M. F. Greaney, *Chem. Commun.* **2005**, 886.
b) B. L. Shi, M. F. Greaney, *Chem. Commun.* **2005**, 2181.
- ²⁴ a) K. C. Nicolaou, R. Hughes, S. Y. Cho, N. Winssinger, C. Smethurst, H. Labischinski, R. Endermann, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, 39, 3823.
b) C. Brandli, T. R. Ward, *Helv. Chim. Acta* **1998**, 81, 1616.
c) W. Zhang, J. S. J. Moore, *Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 11863.
- ²⁵ P. J. Boul, P. Reutenauer, J. M. Lehn, *Org. Lett.* **2005**, 7, 15.
- ²⁶ a) B. Bilgicer, X. C. Xing, K. Kumar, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 11815.
b) M. Royo, M. A. Contreras, E. Giralt, F. Albericio, M. Pons, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 6639.
c) M. Pons, F. Albericio, M. Royo, E. Giralt, *Synlett* **2000**, 172.
- ²⁷ Y. Krishnan-Ghosh, A. M. Whitney, S. Balasubramanian, *Chem. Commun.* **2005**, 3068.
- ²⁸ a) K. Oh, K. S. Jeong, J. S. Moore, *Nature* **2001**, 414, 889.
b) D. H. Zhao, J. S. Moore, *Macromolecules* **2003**, 36, 2712.
- ²⁹ J. B. Zhang, B. W. Jing, N. Tokutake, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 10856.
- ³⁰ a) D. A. Erlanson, S. K. Hansen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, 8, 399.
b) D. A. Erlanson, A. C. Braisted, D. R. Raphael, M. Randal, R. M. Stroud, E. M. Gordon, J. A. Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2000**, 97, 9367.
- ³¹ a) M. Hochgurtel, H. Kroth, D. Piecha, M. W. Hofmann, C. Nicolau, S. Krause, O. Schaaf, G. Sonnenmoser, A. V. Eliseev, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, 99, 3382.
c) S. Zameo, B. Vauzeilles, J.-M. Beau, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, 44, 965.
- ³² I. Huc, J.-M. Lehn, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, 94, 2106.
- ³³ a) A. V. Eliseev, M. I. Nelen, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 1147.
b) S. Otto, S. Kubik, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 7804.
c) S. Kubik, R. Goddard, S. Otto, S. Pohl, C. Reyheller, S. Stuwe, *Biosens. Bioelectron.* **2005**, 20, 2364.
d) T. Nishinaga, A. Tanatani, K. C. Oh, J. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 5934.

- ³⁴ a) B. Hasenknopf, J. M. Lehn, B. O. Kneisel, G. Baum, D. Fenske, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1838.
b) I. Saur, K. Severin, *Chem. Commun.* **2005**, 1471.
c) S. Hiraoka, Y. Kubota, M. Fujita, *Chem. Commun.* **2000**, 1509.
d) M. M. Cai, X. D. Shi, V. Sidorov, D. Fabris, Y. F. Lam, J. T. Davis, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 661.
e) E. Stulz, Y.-F. Ng, S. M. Scott, J. K. M. Sanders, *Chem. Commun.* **2002**, 524.
f) P. A. Brady, R. P. Bonar-Law, S. J. Rowan, C. J. Suckling, J. K. M. Sanders, *Chem. Commun.* **1996**, 319.
- ³⁵ a) B. Fuchs, A. Nelson, A. Star, J. F. Stoddart, S. B. Vidal, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 4220.
b) M. Crego Calama, R. Hulst, R. Fokkens, N. M. M. Nibbering, P. Timmerman, D. N. Reinhoudt, *Chem. Commun.* **1998**, 1021.
c) M. Crego Calama, P. Timmerman, D. N. Reinhoudt, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 755.
d) F. Hof, C. Nuckolls, J. Jr. Rebek, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4251.
e) M. Albrecht, I. Janser, J. Runsink, G. Raabe, P. Weis, R. Frohlich, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 6662.
- ³⁶ a) S. Otto, R. L. E. Furlan, J. K. M. Sanders, *Science* **2002**, *297*, 590.
b) P. T. Corbett, L. H. Tong, J. K. M. Sanders, Otto, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8902.
- ³⁷ R. T. S. Lam, A. Belenguer, S. L. Roberts, C. Naumann, T. Jarrosson, S. Otto, J. K. M. Sanders, *Science* **2005**, *308*, 667.
- ³⁸ a) R. L. E. Furlan, Y.-F. Ng, S. Otto, J. K. M. Sanders, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8876
b) S. L. Roberts, R. L. E. Furlan, S. Otto, J. K. M. Sanders, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 1625.
- ³⁹ a) P. A. Brady, J. K. M. Sanders, *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *26*, 327.
b) L. Vial, J. K. M. Sanders, S. Otto, *New J. Chem.* **2005**, *29*, 1001.
- ⁴⁰ M. M. Mader, P. A. Bartlett, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1281.
- ⁴¹ a) A. Tramontano, K. D. Janda, R. A. Lerner, *Science* **1986**, *234*, 1566.
b) S. J. Pollack, J. W. Jacobs, P. G. Schultz, *Science* **1986**, *234*, 1570.
c) M. M. Mader, P. A. Bartlett, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1281.
- ⁴² a) G. Wulff, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1.
b) J. Q. Liu, G. Wulff, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1287.
- ⁴³ B. Brisig, J. K. M. Sanders, S. Otto, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 1270.
- ⁴⁴ a) A. V. Eliseev, M. I. Nelen, *Chem.-Eur. J.* **1998**, *4*, 825.
b) J. S. Moore, N. W. Zimmerman, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 915.
c) P. T. Corbett, S. Otto, J. K. M. Sanders, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1825.
- ⁴⁵ a) K. Severin, *Chem.sEur. J.* **2004**, *10*, 2565.
b) B. Saur, R. Scopelliti, K. Severin, *Chem.-Eur. J.* **2006**, *12*, 1058.
- ⁴⁶ M. Freemantle, *Chem. Eng. News* **2002**, 31
- ⁴⁷ L. J. Prins, P. Scrimin, *Angew.Chem.Int.Ed.* accettato per la pubblicazione.
- ⁴⁸ a) K. H. Nierhaus, D. N. Wilson, *Protein Synthesis and Ribosome Structure*, 1 ed. (Wiley-VCH, Weinheim, **2004**).
b) R. C. Thompson, D. B. Dix, A. M. Karim, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 4868.

-
- ⁴⁹ A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Structure*, 3 ed. (W. H. Freeman and Company, New York, **1999**).
- ⁵⁰ J. D. Hartgerink, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, 8, 604.
- ⁵¹ M. G. Woll, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 11172.
- ⁵² a) M. G. Woll, E. B. Hadley, S. Mecozzi, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 15932.
b) E. B. Hadley, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 16444.
- ⁵³ a) D. A. Erlanson, A. C. Braisted, D. R. Raphael, M. Randal, R. M. Stroud, E. M. Gordon, J. A. Wells, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, 97, 9367.
b) J. A. Wells, D. A. Erlanson, W. DeLano, A. Braisted, D. R. Raphael, M. Randal, M. Arkin, B. Raimundo, J. Oslob, R. M. Stroud, E. M. Gordon, *FASEB J.* **2002**, 16, A135.
c) D. A. Erlanson, J. A. Wells, A. C. Braisted, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2004**, 33, 199.

CAPITOLO 2: amplificazione in un sistema modello[§]

2.1 Introduzione

La chimica covalente dinamica (DCC)¹ è stata largamente sfruttata per l'individuazione di recettori molecolari per ioni metallici,² piccole molecole,³ proteine,⁴ etc. ma sono estremamente pochi gli esempi in cui dei catalizzatori sono stati sviluppati usando questa tecnica, e quelli studiati mostrano inoltre modeste accelerazioni.⁵

L'approccio proposto in questo lavoro permette di facilitare la scoperta di nuovi catalizzatori, in quanto esso presuppone l'accoppiamento della formazione del legame reversibile con il riconoscimento di un opportuno TSA, rendendo così il processo intramolecolare (*dynamic covalent capture*).⁶ Questo fatto rende possibile lo *shift* della libreria anche in quei sistemi in cui l'interazione noncovalente è estremamente debole.

Nel corso di questo lavoro è stata verificata la capacità di una molecola semplice di selezionare un'altra molecola in grado di riconoscere un fosfonato (usato quale analogo dello stato di transizione dell'idrolisi basica di un estere carbossilico) in un solvente in cui le interazioni elettrostatiche e i legami idrogeno sono relativamente deboli (CH₃OH). E' subito emerso che, anche in un sistema relativamente semplice come quello proposto, il numero delle variabili in gioco rende l'amplificazione osservata fortemente dipendente dalle condizioni sperimentali in cui l'analisi viene eseguita. Si sono quindi studiate in maniera esaustiva le condizioni al contorno ed il miglior metodo di screening di una libreria, valutando in particolare l'effetto della concentrazione sulla risposta data dal sistema.

[§] Parte dei dati presentati in questo capitolo sono stati pubblicati in G. Gasparini, L. J. Prins, P. Scrimin, *Chem. Commun.* **2007**, 1340-1342.

2.2 Progettazione del sistema

Come è stato precedentemente analizzato (Capitolo 1), esistono molteplici reazioni reversibili che vengono sfruttate nella chimica covalente dinamica al fine di creare delle librerie di componenti in equilibrio termodinamico tra di loro.

Questo progetto di tesi è basato sull'utilizzo di una reazione reversibile fra gruppi funzionali complementari in quanto essa permette un maggiore controllo strutturale dei prodotti rispetto a sistemi basati sull'utilizzo di gruppi funzionali identici.

La reazione scelta è la condensazione che avviene tra un'aldeide e una idrazide (Fig. 2.1). Per quanto riguarda l'aldeide si è tenuto conto della maggiore reattività delle aldeidi aromatiche nelle reazioni di condensazione (senza peraltro la necessità di aggiungere catalizzatori o di rimuovere l'acqua che si forma), per cui le piattaforme sviluppate presentano il carbonile direttamente legato all'anello aromatico. Le idrazidi sono invece state preferite alle ammine (comunemente utilizzate nella chimica combinatoria dinamica) in quanto, oltre a garantire una reattività maggiore, la presenza del legame amidico conferisce all'idrazone che si forma anche un certo grado di rigidità strutturale. Questo può contribuire a porre in prossimità del TSA il gruppo di riconoscimento presente sull'idrazide, amplificando così le possibili interazioni tra i due.

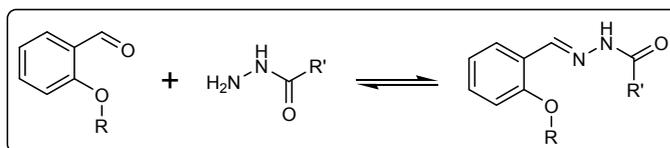


Figura 2.1: condensazione tra aldeide ed idrazide

2.2.1 Scelta del TSA

Lo sviluppo di catalizzatori mediante *dynamic covalent capture* è stato focalizzato sulla reazione di idrolisi basica di un fenil estere (Fig. 2.2).

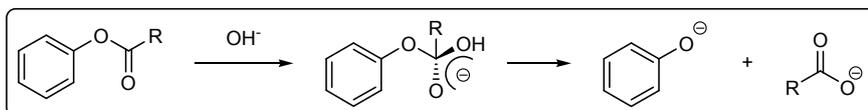


Figura 2.2: meccanismo di idrolisi basica di un fenil estere

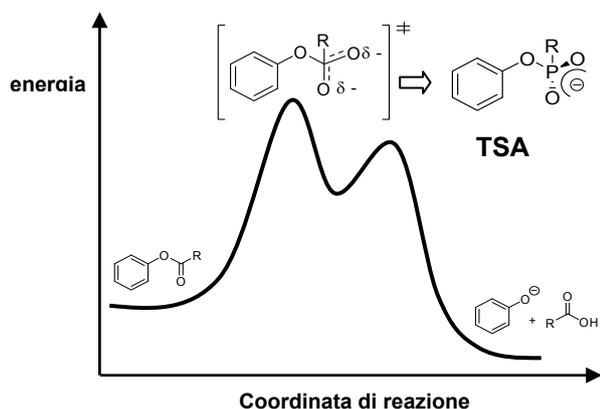


Figura 2.3: profilo energetico di una reazione di idrolisi esterea rappresentato in Fig. 2.3. Lo stato di

In questo meccanismo il gruppo ossidrilico agisce da nucleofilo e attacca il carbonio carbonilico dell'estere. Si forma un intermedio tetraedrico ad alta energia formalmente carico negativamente, il quale può evolvere verso il prodotto della reazione in seguito all'uscita del fenato. Il profilo energetico di questa reazione è

transizione di questa reazione, per il postulato di Hammond, avrà una forma molto simile all'intermedio tetraedrico. Un TSA comunemente accettato per questa reazione è quindi rappresentato da un fosfonato.⁷ Esso infatti possiede le caratteristiche geometriche (geometria tetraedrica) ed elettroniche (presenza di una distribuzione di una carica negativa) ottimali al fine di mimare al meglio lo stato di transizione.

2.2.2 Piattaforme

Alla luce di quanto visto finora, la piattaforma utilizzata deve presentare due caratteristiche fondamentali: da un lato deve portare l'ideale TSA per la reazione in esame, dall'altro deve avere una funzione aldeidica tale da essere usata come "ancora" reversibile nella formazione di legami imminici. A questo scopo è stata sintetizzata la 2-(etil)fosfonilbenzaldeide **1** (Fig. 2.4).

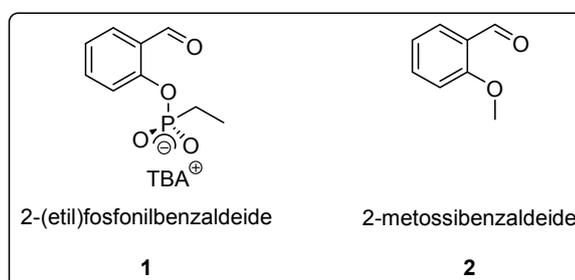


Figura 2.4: piattaforme utilizzate

La piattaforma **1** presenta sia il gruppo (etil)fosfonico che una funzione aldeidica. Il primo viene utilizzato come analogo dello stato di transizione di una reazione di idrolisi basica di un fenil estere. È stata necessaria l'introduzione del tetrabuttilammonio (TBA^+) come controione noncoordinativo al fine di sviluppare la carica negativa sul TSA e, al contempo, promuovere la sua solubilità in solvente organico. L'aldeide invece viene usata per formare legami reversibili sfruttando la chimica delle immine.

La piattaforma **2** (2-metossibenzenaldeide) è stata utilizzata come riferimento. Dal momento che si sono assunte come *driving force* nel riconoscimento del TSA le interazioni che si possono formare con la carica negativa, la presenza del gruppo metossi fa sì che queste non abbiano luogo. Si ottiene così una distribuzione che riflette la stabilità intrinseca dei componenti che si vengono a creare in seguito alla formazione del legame reversibile. Il confronto tra la distribuzione che si ottiene usando la piattaforma **1** e quella con la piattaforma **2** è quindi attribuibile alla interazione intramolecolare (stabilizzante o destabilizzante) dovuta alla presenza del TSA.

2.2.3 Sintesi della piattaforma 1

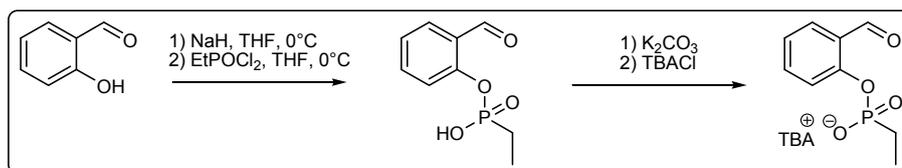


Figura 2.5: procedura di sintesi della piattaforma 1

La piattaforma **1** è sintetizzata a partire dalla salicilaldeide e richiede due passaggi: l'inserimento del gruppo fosfonico seguito dallo scambio ionico per sviluppare sullo stesso la carica negativa.

Per rendere reattiva la molecola di salicilaldeide è richiesta la deprotonazione dell'ossidrile fenolico. A questo scopo è utilizzato sodio idruro in quanto esso permette la deprotonazione in ambiente organico (THF), senza avere la formazione di sottoprodotti. Il passaggio chiave della sintesi riguarda la reazione con il dicloruro etilfosfonico. Esso infatti può reagire con una molecola di salicilaldeide, dando il prodotto desiderato, oppure con due, portando alla formazione di un dimero. Quest'ultimo viene rimosso facilmente sfruttando la sua diversa solubilità, ma causa comunque una sensibile diminuzione della resa della reazione.

Lo scambio cationico è eseguito sciogliendo la piattaforma acida in una soluzione acquosa a pH leggermente basico (circa 7.5) e controestraendola con una soluzione di tetrabutylammonio cloruro in cloroformio. Così facendo si permette la migrazione degli ioni cloruro in soluzione acquosa, i quali vengono sostituiti dal fosfonato. La semplice evaporazione del solvente organico consente di ottenere la piattaforma **1**, la quale è stata utilizzata senza ulteriore purificazione.

2.2.4 Idrazidi

L'unico vincolo nella scelta delle idrazidi da utilizzare è rappresentato dalla necessità che esse portino la funzione amminica non sostituita. Solo così è infatti possibile la formazione del doppio legame imminico (con l'uscita di acqua) in seguito all'attacco nucleofilo sul carbonio carbonilico dell'aldeide. Durante questo lavoro l'attenzione si è focalizzata su delle

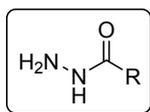


Figura 2.6:
Formula generale
di un'idrazide

idrazidi variamente sostituite, di formula generale riportata in Fig. 2.6. Esse sono particolarmente indicate in quanto esse reagiscono in tempi ragionevolmente brevi con le piattaforme scelte ed inoltre sono ampiamente disponibili commercialmente o facilmente modificabili.

Nella fase preliminare del progetto, particolari studi sono stati dedicati alle idrazidi **A** (idrazide fenil acetica) e **B** (acetil idrazide trimetilammonio cloruro), riportate in Fig 2.7. Quest'ultima, portando un gruppo ammonio carico, dovrebbe presentare una interazione elettrostatica con il gruppo fosfonato presente nella piattaforma **1**, permettendo una maggiore stabilità del corrispondente idrazone.

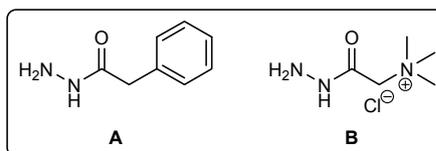


Figura 2.7: idrazidi usate negli studi preliminari

L'idrazide **A**, invece, viene usata come riferimento in quanto essa non dovrebbe presentare interazioni significative, permettendo di ricavare il valore della stabilità intrinseca del legame imminico.

2.3 Test di formazione degli idrazoni

I primi esperimenti sono stati volti a verificare l'effettiva funzionalità del sistema. Dapprima sono stati sintetizzati e caratterizzati gli idrazoni delle due piattaforme in esame con le due idrazidi **A** e **B**, (Fig. 2.8)

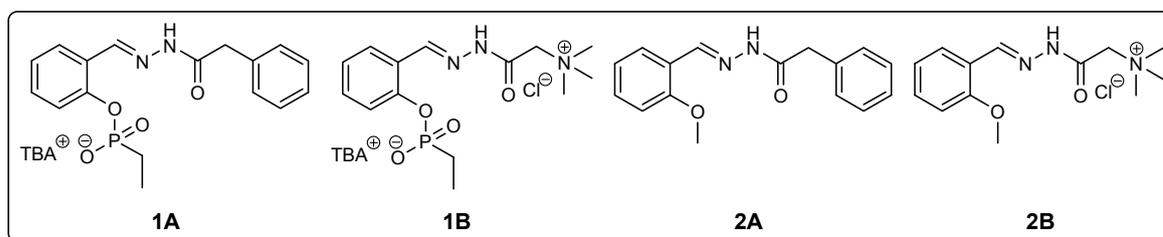


Figura 2.8: idrazoni puri sintetizzati

La sintesi di ciascuno di questi composti è avvenuta in metanolo ad una temperatura di 50°C. A queste condizioni si assiste ad una conversione completa, senza la formazione di sottoprodotti dovuti alla formazione di aminali o emiaminali. Inoltre non si assiste alla formazione di semiacetali o acetali, in quanto il nucleofilo più forte in soluzione è rappresentato dall'idrazide.

La formazione delle nuove specie può essere facilmente verificata considerando la scomparsa del segnale aldeidico nello spettro $^1\text{H-NMR}$ (al di sopra di 10 ppm). Dall'analisi degli spettri emerge la presenza in soluzione di due isomeri, come appare chiaramente esaminando la regione compresa tra 8-9 ppm, dove cade il segnale relativo al protone

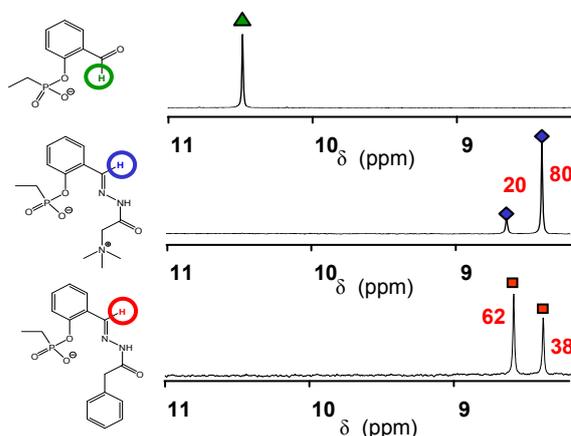


Figura 2.9a: protoni imminici degli idrazoni 1A e 1B

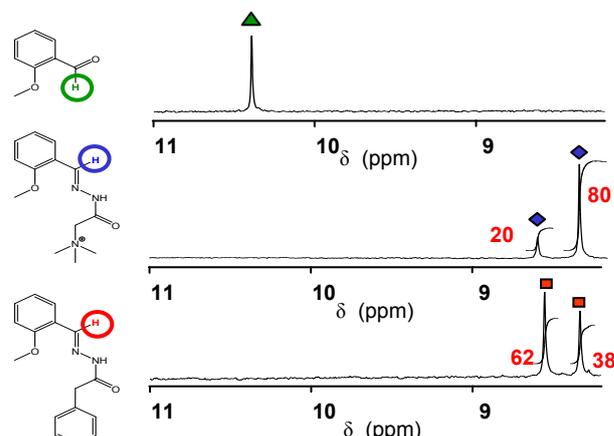


Figura 2.9b: protoni imminici degli idrazoni 2A e 2B

imminico. Per l'idrazide **A** il rapporto è 62/38, mentre per l'idrazide **B** è 80/20 sia nel caso che esse siano legate alla piattaforma **1** o **2** (Fig. 2.9a), (Fig. 2.9b).

2.3.1 Isomeria degli idrazoni

In letteratura sono stati esaustivamente studiati gli idrazoni derivanti dalla condensazione tra la salicilaldeide e benzoidrazidi variamente sostituite.⁸ Possono esistere infatti diversi stereoisomeri originati dall'isomeria E/Z rispetto al doppio legame C=N o ai legami singoli C-N ed N-N (Fig. 2.10). Quest'ultimi presentano infatti carattere di doppio legame in quanto coniugati per risonanza con il carbonile e l'anello aromatico.

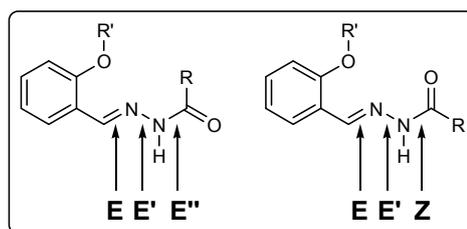


Figura 2.10: stereoisomeri originati dall'isomeria E/Z

Attraverso tecniche di spettroscopia IR ed NMR è possibile attribuire la conformazione delle specie presenti in soluzione. E' stata verificata l'esclusività della conformazione E per i legami C=N ed N-N, mentre il legame C-N le può assumere entrambe. Questo genera la presenza in soluzione di solo due isomeri tra gli otto possibili. Questa è una proprietà intrinseca non tanto degli idrazoni che si formano quanto invece delle idrazidi usate. Infatti esaminando attentamente gli spettri NMR delle idrazidi **A** e **B** libere in soluzione, si può notare già la presenza di questi stereoisomeri.

E' importante sottolineare che lo sdoppiamento del segnale NMR del protone imminico dell'idrazone si verifica unicamente in quelle idrazidi che presentano un metilene direttamente legato al carbonio carbonilico; nel caso in cui questa condizione venga a mancare, si osserva unicamente un solo segnale.

2.4 Cinetiche di formazione

Per ricavare la velocità di formazione dei vari idrazoni sono state eseguite delle cinetiche, seguite via NMR. Queste cinetiche hanno avuto una doppia finalità: da un lato hanno permesso la determinazione delle costanti cinetiche di formazione, dall'altro sono state fondamentali per stabilire le condizioni ideali alle quali eseguire poi i successivi studi.

Le cinetiche sono state condotte in metanolo ad una temperatura di 50°C, in modo da mantenere la formazione su una scala di tempi accettabile.

2.4.1 Formazione 1A

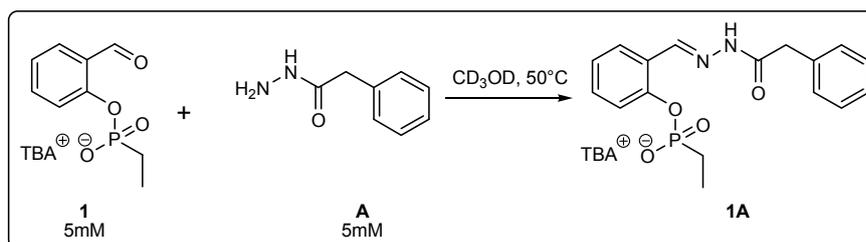


Figura 2.11

La piattaforma **1** in concentrazione 5 mM è stata fatta reagire con 1 eq di idrazide **A** (5 mM) in metanolo deuterato, alla temperatura di 50°C (Fig. 2.11). E' stata seguita la formazione dell'idrazone **1A** monitorando nel tempo la crescita dei segnali derivanti dal protone imminico a 8,60 ppm (isomero 62%) e 8,40 ppm (isomero 38%) (Fig. 2.12).

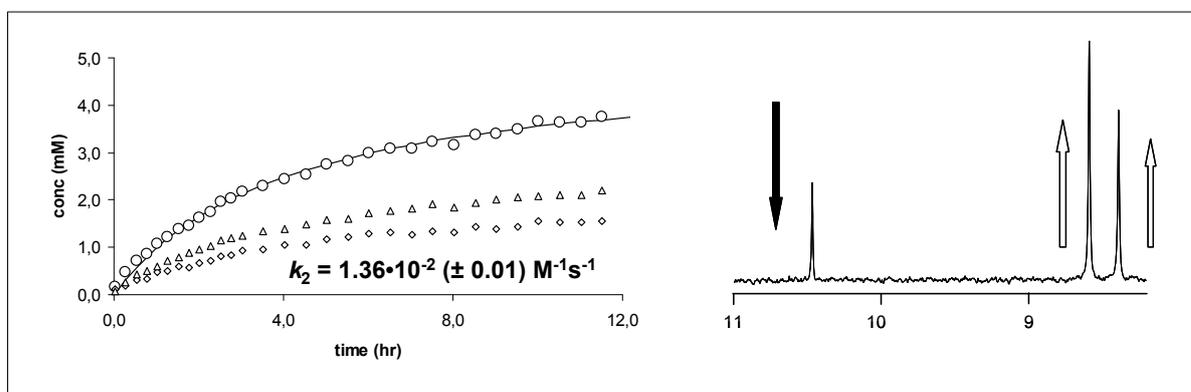


Figura 2.12

L'interpolazione della curva curva permette di ricavare la costante cinetica di secondo ordine $k_{2, 1A}$, pari a $1.36 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. E' importante sottolineare che, analizzando separatamente i due isomeri dell'idrazone (nel grafico: \triangle = isomero 62%, \square = isomero 38%), essi vengono formati con la stessa velocità. Non è quindi presente un secondo processo cinetico nel quale un isomero è convertito nell'altro.

2.4.2 Formazione 1B

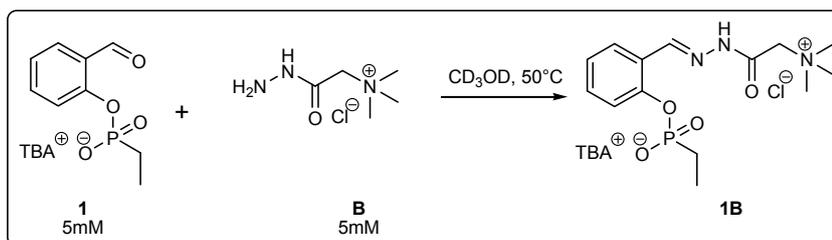


Figura 2.13

La piattaforma **1** (5 mM) è stata fatta reagire con 1 eq di idrazide **B** (Fig. 2.13). In questo caso però la cinetica di formazione è stata seguita monitorando nel tempo la scomparsa del segnale dell'aldeide a 10.54 ppm (Fig. 2.14).

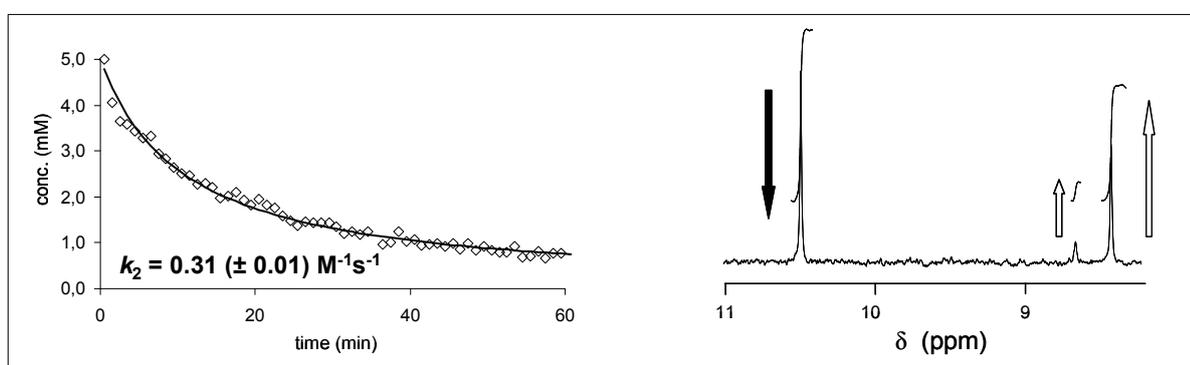


Figura 2.14

L'interpolazione della curva permette di ricavare la costante cinetica di secondo ordine $k_{2, 1B}$, pari a $0.31 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

2.4.3 Formazione 2A

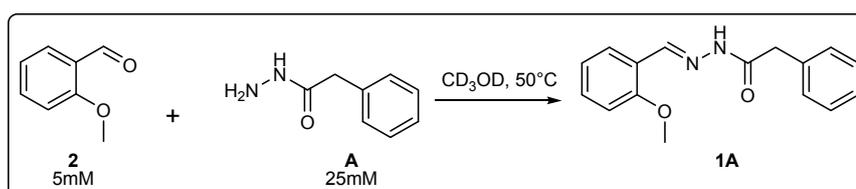


Figura 2.15

A causa della cinetica sensibilmente più lenta rispetto ai casi precedenti, l'aldeide **2** (5 mM) è stata fatta reagire con 5 eq di idrazide **A** (25 mM) (Fig. 2.15).

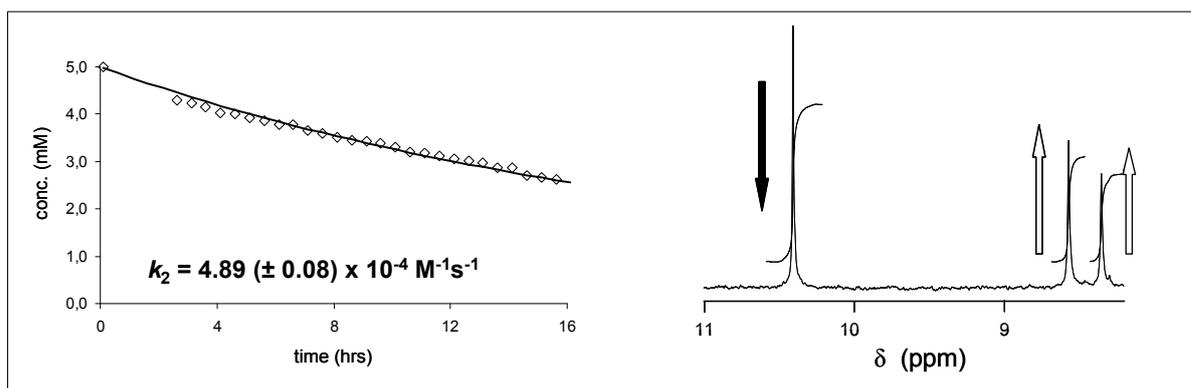


Figura 2.16

Nonostante la presenza di un eccesso di idrazide **A**, la regione spettrale compresa tra 8 ppm e 11 ppm non viene alterata. E' perciò possibile determinare la costante cinetica della reazione di formazione $k_{2, 2A}$ seguendo la scomparsa del segnale del protone dell'aldeide a 10.39 ppm (Fig. 2.16), ottenendo $4.89 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

2.4.4 Formazione 2B

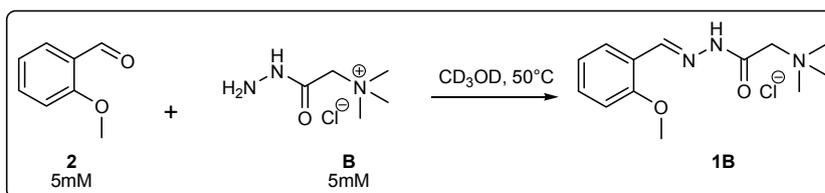


Figura 2.17

La piattaforma **2** (5 mM) è stata fatta reagire con 1 eq di idrazide **B** (5 mM) (Fig. 2.17) e la cinetica è stata seguita monitorando il segnale dell'aldeide (Fig. 2.18).

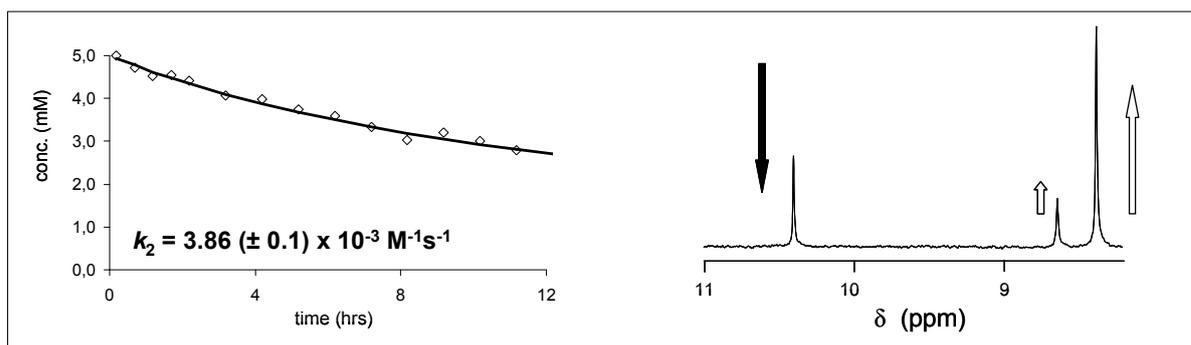


Figura 2.18

In questo caso la velocità di formazione è di $3.86 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

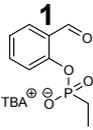
	A	B	rapporto $k_{2,B} / k_{2,A}$
	$1.36 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$0.31 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	22,8
	$4.89 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$3.86 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	7,9

Tabella 2.1: riassunto delle costanti cinetiche ottenute

Come è stato possibile verificare da queste cinetiche, la piattaforma **1** presenta una maggiore reattività rispetto a quella di riferimento (Tab. 2.1). Ciò è attribuibile alla presenza stessa dell'analogo dello stato di transizione sull'anello aromatico: il gruppo fosfonato, essendo elettrone attrattore, rende più facile l'attacco nucleofilo sul carbonio aldeidico. Inoltre la carica negativa del TSA può stabilizzare la carica positiva che si viene a formare sull'azoto dell'idrazide in seguito all'attacco nucleofilo, rendendo la molecola ulteriormente più reattiva. Confrontando tra loro le idrazidi si nota che quella recante il gruppo carico è più reattiva, nella reazione di formazione, con entrambe le piattaforme in esame. La differenza di reattività non è però uguale con entrambe le piattaforme. Infatti l'idrazide **B** reagisce circa 23 volte più velocemente con l'aldeide **1** rispetto all'idrazide **A**, mentre nel caso dell'aldeide **2** essa è circa 8 volte più reattiva. Questo rappresenta la prima differenza apprezzabile tra le due idrazidi utilizzate nei confronti di **1**, segno che esse vengono influenzate in maniera diversa dalla presenza del gruppo fosfonato. Per spiegare questa differenza di reattività si può invocare il riconoscimento della carica negativa presente sul TSA da parte del gruppo carico dell'idrazide **B**, il quale può permettere l'orientamento del nucleofilo in maniera ottimale per eseguire l'attacco sul carbonio carbonilico, dando origine così ad un contributo intramolecolare nella formazione dell'idrazone. Se tale riconoscimento è presente anche una volta che l'idrazone è formato, ne deriverebbe una stabilità termodinamica maggiore dell'idrazone **1B** nei confronti di **1A**.

2.5 Test di scambio

Al fine di verificare se il sistema proposto avesse realmente un comportamento dinamico su una scala di tempi accettabile, sono stati eseguiti dei test di scambio delle idrazidi.

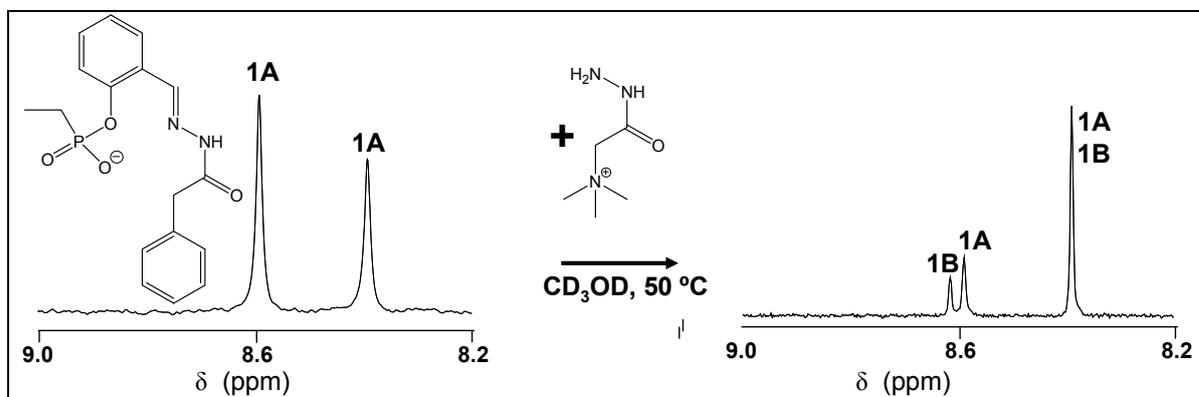


Figura 2.19: aggiunta di **B** all'idrazone **1A**

All'aldeide **1** (5 mM) sono stati aggiunti 5 eq di idrazide **A** (25 mM) e la miscela di reazione è stata mantenuta a 50 °C in metanolo deuterato fino alla completa scomparsa del segnale aldeidico, ottenendo così una conversione quantitativa all'idrazone **1A**. A questo punto sono stati aggiunti 5 eq (25 mM) di idrazide **B** e il sistema è stato lasciato equilibrare fino a che non si sono più avute modificazioni nello spettro NMR (Fig. 2.19.).

L'esperimento è stato ripetuto nelle medesime condizioni partendo dalla piattaforma **1** e dall'idrazide **B** (Fig. 2.20).

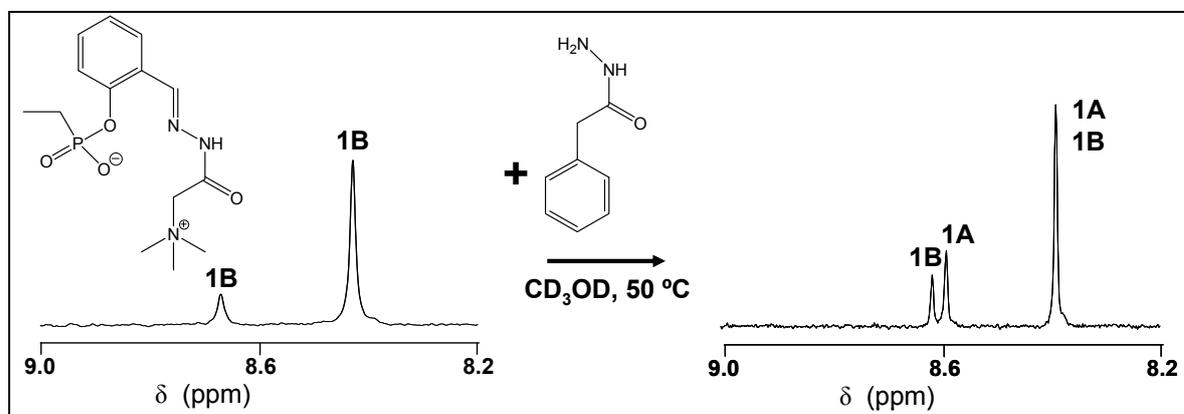


Figura 2.20: aggiunta di **A** all'idrazone **1B**

In questo caso è stata aggiunta l'idrazide fenil acetica **A** una volta registrata la conversione totale all'idrazone. Lasciato equilibrare il sistema, si ottiene il medesimo spettro registrato in precedenza, segno che il sistema è in grado di scambiare le idrazidi e che, pur partendo da condizioni iniziali opposte, esso è in grado di raggiungere l'equilibrio termodinamico.

La medesima coppia di esperimenti è stata eseguita utilizzando l'aldeide **2**. Anche in questo caso si ottengono risultati identici (Fig. 2.21), nonostante la metossibenzaldeide sia meno reattiva rispetto all'aldeide **1**.

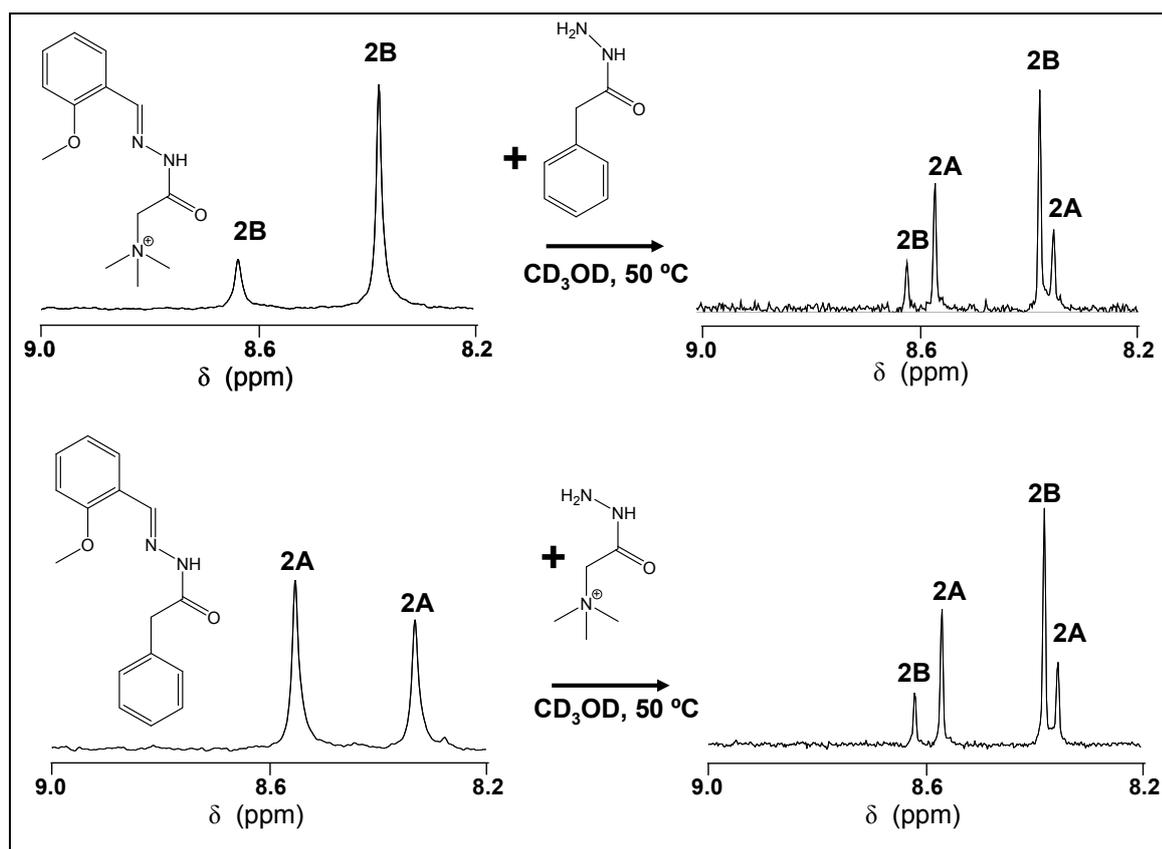


Figura 2.21: test di scambio effettuati con la piattaforma 2

Questi esperimenti hanno permesso di verificare la dinamicità del sistema proposto. Partendo da condizioni il più possibile lontane dall'equilibrio, il sistema è in grado di evolvere fino a raggiungere la distribuzione che riflette la relativa stabilità termodinamica delle specie coinvolte. E' stato possibile stabilire anche il tempo necessario affinché ciò avvenga. Infatti utilizzando l'aldeide **1** il tempo richiesto per permettere al sistema di riequilibrarsi è 48 ore, mentre per l'aldeide **2** il sistema raggiunge l'equilibrio in 72 ore. Questo dato è estremamente importante in quanto è stato verificato che la piattaforma **1** comincia a decomporsi se mantenuta per oltre 4 giorni alle condizioni in cui si ha lo scambio delle idrazidi (50°C in metanolo).

2.6 Distribuzione all'equilibrio

Determinate le principali variabili che possono influenzare il sistema, l'attenzione è stata posta sulla quantificazione degli idrazoni presenti in soluzione una volta raggiunto l'equilibrio termodinamico.

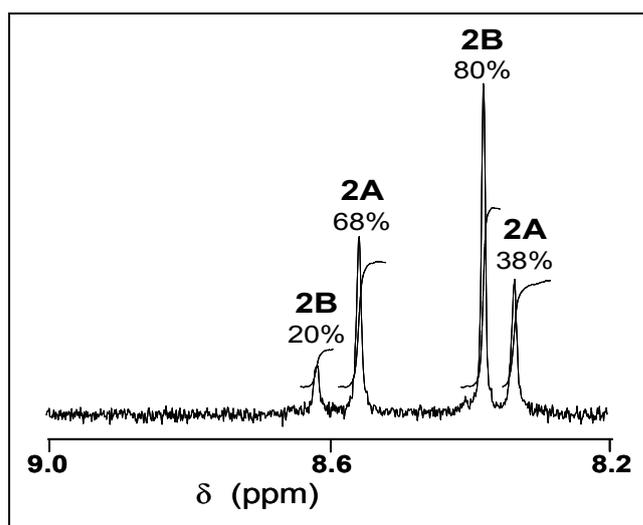
L'analogo dello stato di transizione è in grado di selezionare l'idrazide che porta ad un prodotto più stabile. La distribuzione di prodotti che si ottiene usando la piattaforma **2** rappresenta la stabilità intrinseca degli idrazoni, mentre quella originata dall'utilizzo dell'aldeide **1** è influenzata anche dalle possibili interazioni che il gruppo funzionale presente sull'idrazide può avere con il TSA. Il confronto tra i due sistemi permette perciò di stimare la forza dell'interazione idrazide-TSA.

2.6.1 Piattaforma di riferimento

Per determinare la stabilità intrinseca è stata preparata una soluzione in metanolo deuterato contenente le due idrazidi **A** e **B**, in rapporto equimolare. Ad essa è stata aggiunta la 2-metossibenzaldeide **2**, in modo tale che la concentrazione delle specie in soluzione fosse **2** : **A** : **B** = 2mM : 10mM : 10mM, rispettivamente. Il sistema è stato lasciato equilibrare a 50°C. L'equilibrio termodinamico è stato considerato raggiunto quando due spettri NMR, eseguiti a 12 ore di distanza, hanno mostrato nessuna differenza (tempo richiesto 48 ore).

La quantificazione degli idrazoni presenti in soluzione è stata eseguita mediante integrazione diretta dei segnali caratteristici nello spettro NMR. In particolare è stato sfruttato il segnale del protone imminico, in quanto esso cade in una regione spettrale libera. Inoltre è un segnale comune a tutti gli idrazoni, per cui confrontando il valore del suo integrale tra specie diverse non si corre il rischio di commettere degli errori dovuti alla possibilità che vi siano tempi di rilassamento diversi.

Come già discusso precedentemente, gli idrazoni **2A** e **2B** sono presenti in soluzione come due isomeri. L'idrazone **2A**, infatti, presenta due singoletti relativi al protone imminico, uno a 8,34 ppm, relativo all'isomero minoritario (38%), l'altro a 8,55 ppm, relativo all'isomero maggioritario (68%). Analogamente per l'idrazone **2B**, sono presenti due singoletti: a 8.38 ppm (80%) ed a 8.65 ppm (20%). Per avere quindi una quantificazione esaustiva delle specie in soluzione, è quindi necessario determinare il valore dell'integrale di questi segnali (Fig. 2.21).

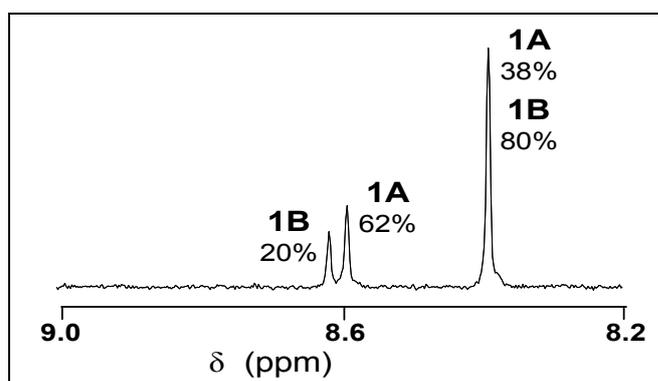
Figura 2.21: segnali imminici degli idrazoni **2A** e **2B**

E' stato possibile calcolare la concentrazione delle specie presenti, ottenendo una distribuzione pressoché statistica dei due idrazoni. Infatti il valore del rapporto **2B/2A** ottenuto è 1.0 (**2A** : **2B** = 49.8 : 50.2). Ciò significa che i due idrazoni, nelle condizioni sperimentali indagate, presentano la medesima stabilità termodinamica.

2.6.2 Piattaforma di riconoscimento

Esperimento analogo al precedente è stato eseguito utilizzando la piattaforma recante il TSA. In questo caso alla soluzione delle due idrazidi **A** e **B** è stata aggiunta la 2(etil)fosfonilbenzaldeide, in modo tale che la concentrazione finale fosse **1** : **A** : **B** = 2mM : 10 mM : 10 mM. Anche in questo caso è stato concesso al sistema di raggiungere l'equilibrio termodinamico, evidenziato dall'assenza di ulteriori modificazioni nello spettro NMR (circa 24 ore).

Anche con la piattaforma fosfonata sono presenti due isomeri per ciascun idrazone (Fig. 2.22). Infatti per **1A** si ottiene un segnale a 8.40 ppm, relativo all'isomero minoritario (38%), ed un segnale a 8.60 ppm, relativo all'isomero maggioritario (62%). Per quanto riguarda, invece, l'idrazone **1B** otteniamo: 8.39 ppm (isomero maggioritario, 80%) e 8.64 ppm (isomero minoritario, 20%).

Figura 2.22: segnali imminici degli idrazoni **1A** e **1B**

Esaminando lo spettro si può notare che i segnali a campi alti dei due idrazoni sono sovrapposti. E' possibile comunque calcolare il rapporto **1B/1A** utilizzando i segnali a campi più bassi, correggendo il valore del loro integrale tenendo conto della quantità relativa dell'isomero a cui essi appartengono. Come controllo per questa operazione si è confrontato il valore misurato dell'integrale a 8.4 ppm con quello che si può calcolare, noto il rapporto **1B/1A**. La perfetta coincidenza tra i due valori rivela la bontà di tale tipo di approccio.

Da questo esperimento ci si aspetta che l'interazione elettrostatica intramolecolare tra il gruppo ammonio dell'idrazide **B** e quello fosfonato possa conferire all'idrazone **1B** una stabilità termodinamica maggiore, che si riflette, di conseguenza, in una sua maggiore concentrazione in soluzione. Ciò è confermato dai dati sperimentali, i quali danno un rapporto 70:30 ($K_1= 2.33$) per **1B:1A** che, confrontato con la distribuzione statistica 50:50 ($K_2= 1.0$) ottenuta con la piattaforma **2**, è una chiara prova che vi è possibilità di riconoscimento del TSA da parte di un gruppo posto sull'idrazide.

Per esprimere a livello numerico l'entità del riconoscimento del TSA, rendendo così immediato il confronto tra le idrazidi (soprattutto nell'ottica di espandere lo studio ad una libreria di idrazidi) è necessario definire un parametro unico, chiamato fattore di amplificazione. Esso è dato dal rapporto tra la distribuzione dei prodotti ottenuta utilizzando la piattaforma **1** con quella ottenuta dalla piattaforma **2**. In pratica, quindi, il fattore di amplificazione non è altro che il rapporto tra le costanti di equilibrio K_1/K_2 . Nel caso in esame, il fattore di amplificazione ottenuto è 2.33.

2.6.3 Variazione dell'eccesso di idrazidi

Per determinare se esiste una dipendenza dell'amplificazione dalla quantità di idrazidi presenti, gli esperimenti sono stati condotti nuovamente variando il numero di equivalenti totale di idrazidi aggiunte. Mantenendo fissa la concentrazione di **1** a 2 mM, sono state preparate soluzioni contenenti 0,5, 1, 2, 3, 25 equivalenti di ciascuna idrazide (1, 2, 4, 6, 50 eq totali, rispettivamente). Il profilo di amplificazione che si ottiene da questo esperimento è rappresentato in Figura 2.23, dove si osserva una dipendenza non trascurabile del rapporto tra i due idrazoni e gli equivalenti totali di idrazidi aggiunte.

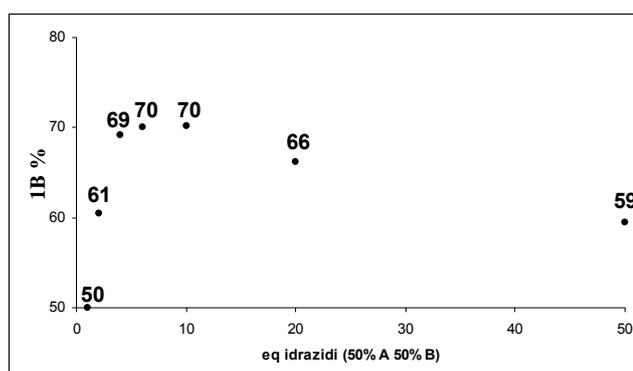


Figura 2.23: profilo di amplificazione di **1A** ($[1]_0=2\text{mM}$)

L'andamento dell'amplificazione dell'idrazone **1B** presenta un profilo a massimo, che viene raggiunto quando 10 equivalenti totali di idrazidi sono presenti.

Lavorando senza eccesso di idrazidi (0.5 eq **A**, 0.5 eq **B**) si forza il sistema a consumarle completamente, ottenendo una distribuzione dei due idrazoni 50:50. Aumentando gli equivalenti di idrazidi, si permette alla piattaforma **1** di "scegliere" il componente con cui legarsi, per dare origine al prodotto termodinamicamente più stabile. Infatti nella prima parte del grafico si ha un progressivo aumento dell'amplificazione all'aumentare degli equivalenti usati. Questo progressivo aumento è legato al fatto che, se le idrazidi non sono in largo eccesso, quella termodinamicamente più favorita va in esaurimento, favorendo così statisticamente l'altra.

	1 eq tot	2 eq tot	4 eq tot	6 eq tot	10 eq tot	20 eq tot	50 eq tot
1B %	50	61	69	70	70	66	59
amplif.	1.00	1.56	2.22	2.33	2.33	1.94	1.44

Tabella 2.2: valori di amplificazione ottenuti

Una volta raggiunta l'amplificazione massima, questa dovrebbe essere mantenuta all'aumentare della quantità di idrazidi presenti, in quanto la stabilità relativa degli idrazoni non dovrebbe essere alterata. Quello che è invece chiaro esaminando il grafico è che esiste un trend in cui il rapporto relativo dei due prodotti diminuisce progressivamente. Si passa da **1B : 1A** = 66 : 34 quando sono presenti un totale di 20 eq di idrazidi, a **1B : 1A** = 59 : 41 quando ne sono presenti 50. Questo comportamento sembra quindi indicare che l'amplificazione possa venire definitivamente persa lavorando con un largo eccesso.

2.6.4 Controlli

Una prima ipotesi che spieghi quanto osservato può essere formulata prendendo in considerazione la forza ionica della soluzione. Esistono numerose specie cariche presenti nel sistema che possono concorrere alla sua variazione. Il contributo dato dalla piattaforma **1** è stato però subito scartato in quanto la sua concentrazione non cambia nei vari esperimenti eseguiti.

Altra specie carica presente nel sistema è l'idrazide **B**: in questo caso l'intervallo di concentrazioni esplorato (1mM ÷ 50mM) è sufficientemente elevato affinché vi siano variazioni significative della forza ionica. Sono state quindi eseguite due serie di esperimenti al fine di verificare quanto ipotizzato.

Il primo controllo è stato eseguito aggiungendo un eccesso di tetrametil ammonio cloruro (TMACl). E' stato scelto questo tipo di catione in quanto esso rappresenta, con una buona approssimazione, il gruppo funzionale presente nell'idrazide.

Ad una soluzione contenente **1** : **A** : **B** in proporzioni 2 : 10 : 10 è stato aggiunto un eccesso di sale (100mM, 50 eq rispetto ad **1**). Questo ha provocato solo una modesta diminuzione dell'amplificazione osservata, si passa infatti da una composizione 70 : 30 ad una 67 : 33.

Alla luce di quanto osservato si è deciso di ripetere gli esperimenti fatti in precedenza "tamponando" la forza ionica della soluzione. Per fare questo la somma delle concentrazioni delle specie cariche **B** e TMACl è stata fissata e mantenuta costante a 50mM. Anche in questo caso non si sono osservate variazioni significative dell'andamento del profilo di amplificazione ottenuto in precedenza, per cui la diminuzione della concentrazione dell'idrazone **1B** in soluzione in seguito all'aumento dell'eccesso di idrazidi è da imputare ad altri fattori.

2.7 Razionalizzazione dell'andamento

E' stato dimostrato che il trend ottenuto sperimentalmente non è imputabile ad una variazione della forza ionica della soluzione. All'aumentare dell'eccesso di idrazidi devono invece entrare in gioco nuovi equilibri i quali portano ad una modificazione della distribuzione delle specie in soluzione.

Generalmente, negli studi relativi alla chimica combinatoria dinamica, è considerata solo la reazione di scambio tra l'idrazone **1A** e **1B**, indotta dalle idrazidi libere **A** e **B**. In questa situazione, la costante di equilibrio, K_{eq} , è determinata da quanto **1B** è stabilizzato dall'interazione intramolecolare tra i gruppi di carica opposta (ΔG_{intra} , Fig. 2.24). Tuttavia, questo non può spiegare i risultati sperimentali osservati nella curva di amplificazione, in quanto la stabilizzazione intramolecolare **1B** dovrebbe essere indipendente dall'eccesso di idrazide libera presente. Quindi abbiamo esteso lo schema in modo da comprendere la formazione di un complesso tra gli idrazoni **1A** e **1B** con l'idrazide libera **B**, in modo da dare origine ai complessi **1A•B** e **1B•B**, con costante di binding K_{1AB} e K_{1BB} , rispettivamente. I complessi **1A•B** e **1B•B** scambiano sotto l'influenza delle idrazidi libere **A** e **B**, con costante $K_{eq,c}$.

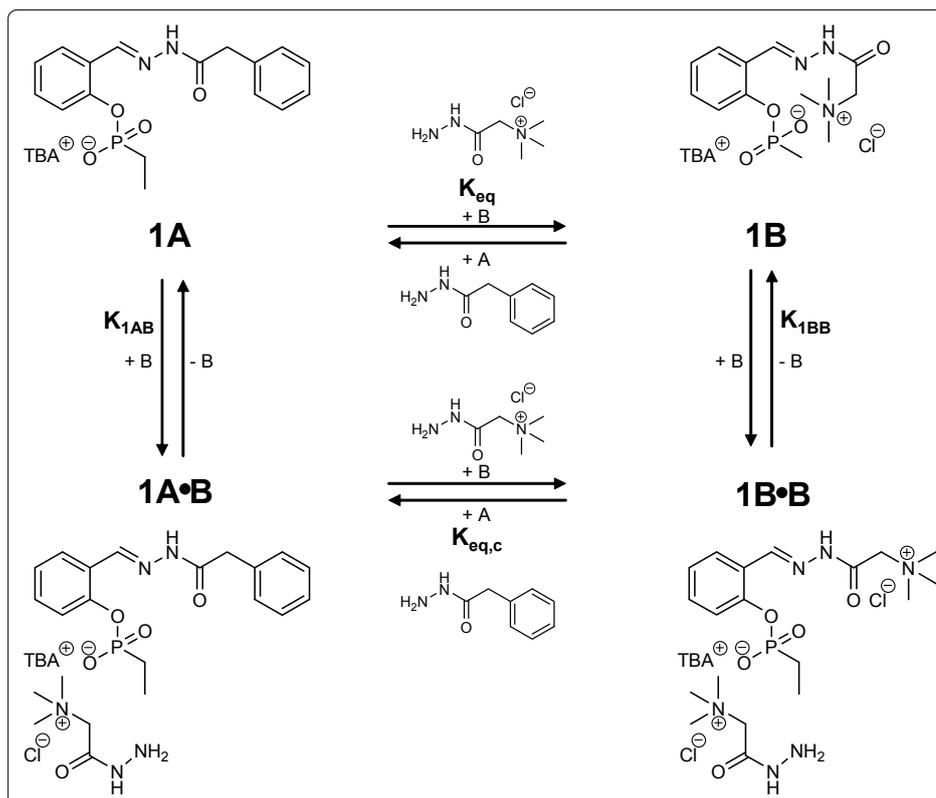


Figura 2.24: equilibri considerati nel modello proposto

In questo modello non è stata presa in considerazione la formazione di altre specie complesse, come ad esempio dimeri $1B \cdot 1B$, che potrebbero influenzare la distribuzione all'equilibrio. Questa scelta è dettata dal fatto che non sono state registrate variazioni apprezzabili tra gli spettri NMR registrati a 2 e 25 mM di idrazone $1B$ che possano essere indice dell'avvenuta dimerizzazione.

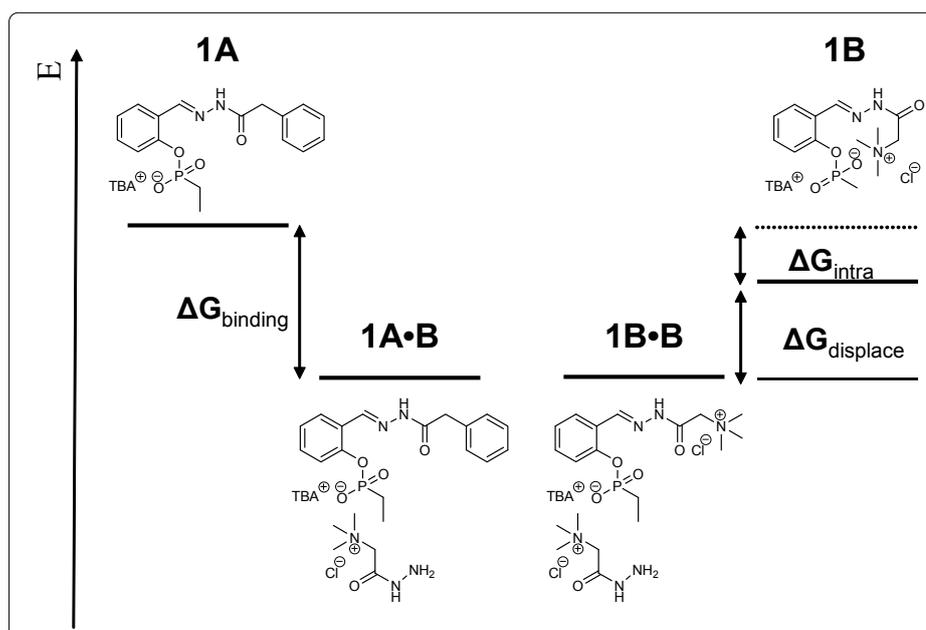


Figura 2.25: diagramma energetico delle specie considerate

Il modello proposto permette di dare una spiegazione alla curva di amplificazione sperimentale osservata. Con un piccolo eccesso di idrazidi **A** e **B** le specie dominanti sono **1A** e **1B** e le loro relative concentrazioni (così come l'amplificazione) sono determinati dalla costante di equilibrio K_{eq} , a sua volta dipendente dalla stabilizzazione intramolecolare. Aumentando la concentrazione di **A** e **B** le specie dominanti cominciano a diventare **1A•B** e **1B•B**, con una nuova distribuzione determinata da $K_{eq,c}$ (Fig. 2.25). Intuitivamente, è chiaro che la differenza in stabilità termodinamica tra **1A•B** e **1B•B** deve essere modesta, dal momento che l'interazione intramolecolare di stabilizzazione tra il fosfonato e il gruppo ammonio è assente (per l'analisi del sistema infatti i due complessi sono stati posti sullo stesso livello energetico). Di conseguenza, l'amplificazione diminuisce all'aumentare dell'eccesso di idrazidi e, in condizioni estreme, eventualmente scompare.

L'ipotesi avanzata ha ottenuto un prima conferma quando i dati sperimentali della curva di amplificazione sono stati interpolati utilizzando il modello proposto (Fig. 2.26). È stato assunto che la costante di equilibrio $K_{eq,c}$ tra i due complessi **1A•B** e **1B•B** sia 1, in quanto ci si aspetta che essi presentino la medesima stabilità termodinamica. In questo modo le concentrazioni all'equilibrio dipendono unicamente da due parametri, K_{eq} e K_{1AB} , in quanto essi definiscono di conseguenza anche la costante di equilibrio ($K_{1BB} = K_{1AB}/K_{eq}$).

Dalla curva è stato possibile ottenere i valori, con buone approssimazioni, delle costanti dei principali equilibri in gioco: la costante di equilibrio K_{eq} tra **1A** e **1B** è uguale a $3.3 (\pm 0.3)$, mentre il valore ottenuto per K_{1BA} è $58 (\pm 19) M^{-1}$.

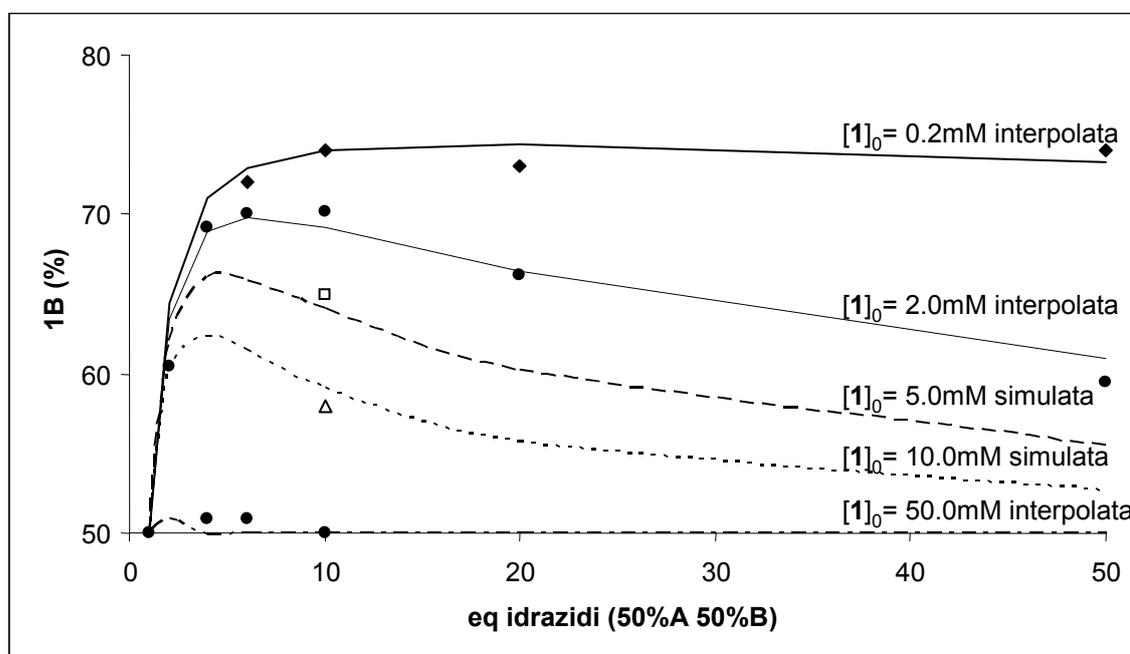


Figura 2.26: dati sperimentali interpolati secondo il modello proposto

Imponendo le costanti di equilibrio K_{eq} , K_{1AB} , K_{1BB} calcolate precedentemente, il modello proposto è stato utilizzato per simulare le curve di amplificazione variando la concentrazione iniziale di piattaforma **1**, in modo da valutare se anche questo parametro incide sul profilo

osservato. Secondo il modello è attesa una progressiva diminuzione dell'amplificazione al crescere della concentrazione iniziale di **1**, come si può vedere nelle curve simulate a 5 (linea tratteggiata) e 10mM (linea punteggiata), in quanto anche in questo caso si favorisce la formazione del complesso intermolecolare. Conferma di questo è stata ottenuta ripetendo gli esperimenti di competizione a queste concentrazioni, utilizzando 5 eq di ciascuna idrazide. I punti sperimentali, infatti, correlano molto bene con quelli calcolati. Si ha una diminuzione del rapporto iniziale da **1A** : **1B** = 30 :70 a 35 : 65 ($[1]_0=5\text{mM}$) e 42 :58 ($[1]_0=10\text{mM}$) (sul grafico, punti \square e \circ , rispettivamente). L'ottima correlazione tra i punti sperimentali e quelli calcolati sottolinea l'attendibilità del modello proposto.

Sono stati verificati i limiti di applicabilità del processo eseguendo gli esperimenti di amplificazione ad una concentrazione iniziale di **1** pari a 50mM, in presenza di 4, 6 e 10 equivalenti totali di idrazidi **A** e **B**. Come previsto dal modello, nessuna amplificazione è stata osservata. L'unico modo per evitare la formazione dei complessi **1A•B** e **1B•B** sembra essere l'utilizzo di condizioni più diluite, dal momento che le costanti di equilibrio K_{1AB} e K_{1BB} non possono essere modificate.

A questo scopo sono stati condotti gli esperimenti di amplificazione partendo da una concentrazione iniziale di **1** pari a 0.2 mM. Lavorando in condizioni così diluite non è stato possibile utilizzare la spettroscopia NMR per quantificare gli idrazoni presenti in soluzione in quanto i segnali caratteristici si perdono nel rumore dello spettro. Si è stati quindi costretti ad utilizzare la tecnica HPLC, in quanto più sensibile e perciò in grado di evidenziare la presenza degli idrazoni anche in basse concentrazioni. La quantificazione è stata possibile misurando l'area dei picchi cromatografici e confrontandola con una retta di calibrazione.

Il protocollo sperimentale ha subito una leggera modifica rispetto a quello messo a punto per l'analisi NMR. Infatti diminuendo la concentrazione delle specie in soluzione la cinetica di formazione e di scambio risulta notevolmente rallentata. Si è deciso di utilizzare come condizioni di partenza l'idrazone **1A** preformato, in quanto presenta la minore velocità di formazione e di scambio, altre che essere il meno stabile tra i due. Questo permette di ridurre i tempi necessari al raggiungimento dell'equilibrio in quanto si ha solo lo scambio tra gli idrazoni ma non la loro formazione a partire dall'aldeide libera **1**. Nonostante questi accorgimenti, le miscele contenenti meno di 6 eq totali di idrazidi hanno evidenziato la presenza di prodotti di decomposizione prima del raggiungimento dell'equilibrio termodinamico. I valori di amplificazione ottenuti, per gli esperimenti con 6, 10, 20 e 50 eq totali di idrazidi aggiunte, sono riportati nella Figura 2.26, interpolati utilizzando il modello visto precedentemente.

Appare chiaro che lavorando in condizioni diluite non si assiste alla diminuzione dell'amplificazione in seguito alla presenza dell'eccesso di idrazidi. Il sistema raggiunge il rapporto massimo **1B** : **1A** = 75 : 25 ed esso viene mantenuto costante nell'intervallo di

concentrazione esplorato. Inoltre, il valore di amplificazione ottenuto è in eccellente accordo con quanto calcolato utilizzando il valore di $K_{eq} = 3.3$ estratto dagli esperimenti NMR. Questi ultimi, infatti, permettono di stimare come massima amplificazione un rapporto 76 : 24 per **1B** : **1A**.

Fino a questo momento l'attenzione è stata posta sulla perdita di amplificazione che si ha all'aumentare dell'eccesso di idrazidi aggiunte, generando un tipico profilo a massimo. Questo però, come è stato visto, non è l'unico fattore in gioco. Infatti anche la concentrazione iniziale $[1]_0$ della piattaforma che porta il gruppo di riconoscimento gioca un ruolo fondamentale nel selezionare i componenti con cui essa si va a legare. In Figura 2.27 è riportato il grafico in cui la quantità di idrazone **1A** è posta in funzione della concentrazione iniziale dell'aldeide **1**, fissato a 10 il numero totale di equivalenti di idrazidi presenti.

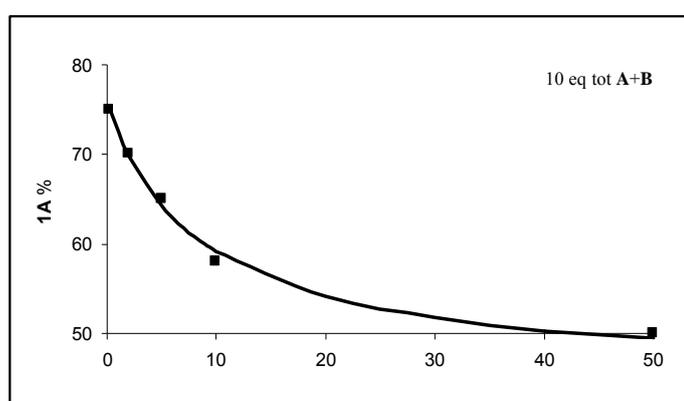


Figura 2.27: dipendenza dell'amplificazione dalla concentrazione iniziale di **1**

In questo grafico è ben rappresentata la forte dipendenza dell'amplificazione dalle condizioni iniziali. Infatti, in un intervallo di solo 50mM, si passa dall'aver amplificazione massima (0.2mM, **1A** = 75%) fino alla totale scomparsa della stessa (50mM, **1A** % = 50), dovuta al passaggio da una situazione in cui si ha stabilizzazione intramolecolare ad una in cui la stabilizzazione è completamente persa a causa dell'istaurarsi di interazioni intramolecolari tra gli idrazoni e l'idrazide **B** libera. I punti sperimentali sono stati interpolati utilizzando lo stesso modello descritto in precedenza, dando risultati molto simili a quelli già ottenuti per K_{eq} e K_{1AB} (3.5 ± 0.2 e $66 \pm 8 \text{ M}^{-1}$, rispettivamente).

2.8 Conclusioni

Per stabilire le condizioni ideali alle quali applicare l'idea del *dynamic covalent capture* si è scelto di lavorare con un sistema estremamente ridotto, composto da solo 4 componenti.

In un primo momento si è esaustivamente indagato il comportamento del legame imminico tra un'aldeide aromatica e delle idrazidi opportunamente sostituite. Ciò ha permesso di comprendere i parametri chiave (solvente, temperatura, tempo, condizioni iniziali...) che bisogna considerare per permettere ad un sistema di distribuirsi tra i vari prodotti in relazione alla loro stabilità termodinamica relativa, sfruttando una reazione reversibile.

Una volta stabilito come realizzare un sistema dinamico, è stato verificato, mediante l'utilizzo dell'aldeide **1**, che la presenza di un gruppo di riconoscimento (fosfonato, TSA) su una molecola può permettere la formazione di interazioni intramolecolari con un gruppo opportuno presente su un'altra (idrazide **B**). Questo genera una stabilizzazione del prodotto di condensazione (idrazone **1B**) tale per cui la sua concentrazione in soluzione è maggiore rispetto a quella che si ottiene in un analogo sistema in cui però il gruppo di riconoscimento è assente (idrazone **2A**).

Questo studio preliminare ha anche permesso di fare luce sugli equilibri che si vengono a formare già in un sistema poco complesso come quello utilizzato. In particolare è stato dimostrato il ruolo che le concentrazioni, sia della piattaforma che dei componenti a cui essa si deve legare, ricoprono nella generazione dell'amplificazione.

Solo lavorando a concentrazioni basse è possibile prendere in considerazione il sistema semplice, in cui la concentrazione relativa dei prodotti è regolata da un'unica costante di equilibrio (K_{eq}). Aumentando le concentrazioni, il sistema assume un comportamento che è impossibile da spiegare se non si considera una più complessa rete di equilibri intra ed intermolecolari (K_{1AB} , K_{1BB}). E' quindi necessario individuare le condizioni migliori.

Non è possibile conoscere a priori la condizione ideale alla quale si può ottenere amplificazione massima del prodotto che presenta le interazioni migliori. Ciò rappresenta il limite fondamentale di questo tipo di approccio, largamente utilizzato nella selezione di *targets* per biomolecole⁹ ma molto meno sfruttato per sistemi molecolari sintetici. Infatti, se da un lato le condizioni diluite sono da considerarsi fortemente positive per avere la miglior amplificazione possibile, dall'altro esse pongono dei seri problemi di carattere pratico, che riguardano sia la determinazione dell'amplificazione stessa che il tempo necessario per raggiungere l'equilibrio termodinamico. E' possibile che questo sia un limite intrinseco del sistema studiato, in quanto le concentrazioni utilizzate nello studio di biomolecole sono svariati ordini di grandezza inferiori rispetto a quelle usate in questo lavoro. Rimane tuttavia chiaro che i problemi emersi in questo tipo di approccio sono presenti indipendentemente dal tipo di recettore considerato.

2.9 Parte sperimentale

2.9.1 Strumentazione

Spettri NMR

Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ sono stati registrati a 298 K con spettrometro Bruker AC-250, operante a 250.2 MHz, ed a 301 K o 323 K con spettrometro Bruker Avance DRX-300, operante a 300.1 MHz. I valori di *chemical shift* (δ) riportati sono dati in ppm, calibrando la scala rispetto al segnale determinato dalla frazione di solvente non deuterato presente come impurezza (CDCl_3 $\delta=7.26$ ppm, CD_3OD $\delta=3.34$ ppm, DMSO-d_6 $\delta=2.49$ ppm).

Gli spettri $^{13}\text{C-NMR}$, disaccoppiati dal protone, sono stati registrati a 298 K con spettrometro Bruker AC-250, operante a 62.9 MHz, ed a 301 K con spettrometro Bruker Avance DRX-300, operante a 75.5 MHz. I valori di *chemical shift* (δ) riportati sono dati in ppm, calibrando la scala rispetto al segnale determinato dal solvente deuterato presente (CDCl_3 $\delta=77.0$ ppm, CD_3OD $\delta=49.3$ ppm, DMSO-d_6 $\delta=40.45$ ppm).

Gli spettri $^{31}\text{P-NMR}$, disaccoppiati dal protone, sono stati registrati a 301 K con spettrometro Bruker Avance DRX-300, operante a 121.5 MHz. I valori di *chemical shift* (δ) riportati sono dati in ppm, eseguendo una calibrazione esterna (H_3PO_4 85% in acqua $\delta=0.0$ ppm).

Nel riportare gli spettri NMR è stata utilizzata la seguente simbologia:

s: singoletto

d: doppietto

t: tripletto

q: quartetto

m: multipletto

br: allargato

Misure di massa

Gli esperimenti di *Spettrometria di Massa* sono stati effettuati utilizzando uno spettrometro Agilent Technologies 1100 Series LC/MSD Trap-SL, con ionizzazione ad elettrospray, filtro esapolo ed analizzatore di massa a trappola ionica. Si è operato mediante infusione diretta di una soluzione del campione con concentrazione 10^{-5} - 10^{-6} M.

Analisi HPLC

Le *analisi HPLC* sono state condotte su uno strumento Shimadzu LC-10AT VP, utilizzando un detector UV/Vis SPD-10A VP. La colonna e la rampa utilizzata è indicata per ciascun composto.

Spettri IR

Gli *spettri IR* sono stati registrati con uno spettrometro Nicolet 5700 FT-IR con finestra spettrale 4000÷400 cm^{-1} . La posizione delle bande di assorbimento vibrazionali è espressa in cm^{-1} .

Analisi TLC

Le *analisi TLC* sono state eseguite su lastre Macherey-Nagel POLYGRAM[®]SIL G/UV₂₅₄ di plastica ricoperte di silice (40x80 mm, 0.2 mm spessore) o lastre Fluka di alluminio ricoperto di silice (40x80 mm, 0.2 mm spessore, diametro delle particelle 10 Å indicatore fluorescente a $\lambda=254\text{nm}$) e visualizzate mediante UV/Vis o sviluppate con soluzione di ninidrina in etanolo, potassio permanganato in acetone, blue shift o vapori di iodio.

Purificazioni cromatografiche

Le *Purificazioni Cromatografiche* sono state effettuate su colonna a gravità o a bassa pressione secondo la tecnica Flash Chromatography. E' stato utilizzato gel di silice Macherey-Nagel con granulometria 230÷400 mesh per cromatografia flash, e 70÷230 mesh per cromatografia su colonna a gravità.

Eseguite anche delle purificazioni su lastra preparativa (gel di silice, spessore 2 mm, dimensioni 20 cm x 20 cm).

Purificazioni HPLC

Le *purificazioni HPLC* sono state eseguite su uno strumento Shimadzu LC-8A, utilizzando come detector UV/Vis SPD-6A. La colonna utilizzata è Jupiter Proteo 4u 90A (250x21.20 mm , 4 μm), flusso 17 ml/min.

2.9.2 Materiali

Solventi e reattivi

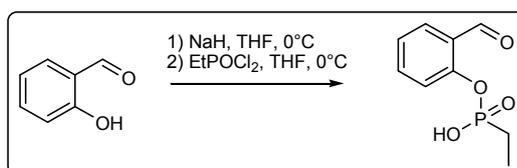
I reattivi impiegati nelle sintesi sono acquistati da Sigma-Aldrich o Fluka come prodotti ad elevata purezza (>98%) e sono stati utilizzati senza ulteriori purificazioni.

I solventi utilizzati sono HPLC-grade, provenienti da Fluka ed usati senza ulteriori purificazioni. Per le analisi ESI-MS è stata utilizzata acqua distillata filtrata mediante sistema Millipore MILLI-Q, mentre metanolo ed acetonitrile provengono da Riedel-de Haën Chromasolv[®].

I solventi deuterati sono provenienti da Sigm-Aldrich (CDCl_3 99.8%D; methanol- d_4 99.9%D, DMSO-d_6 99.8%D, $\text{CD}_3\text{CN-d}_3$ 99.8%).

2.9.3 Sintesi e caratterizzazioni

Sintesi di 2(etil)fosfonil benzaldeide



Schema 2.1

Una soluzione di salicilaldeide (5ml, 5.8g, 47.7mmol) in 15 ml di THF è stata aggiunta goccia a goccia, nel corso di un'ora, ad una sospensione di NaH (1.19g, 49.5mmol, 1 eq) in THF, raffreddata a 0°C. Dopo l'aggiunta, la miscela risultante è stata lasciata in agitazione per mezz'ora a temperatura ambiente. Raffreddata nuovamente a 0°C e aggiunta una soluzione di dicloruro (etil)fosfonico (4ml, 5.5g, 1eq) in THF. La soluzione risultante è stata lasciata per 2h a temperatura ambiente.

Raffreddata nuovamente a 0° e aggiunti 2ml di HCl 12N. La rimozione del THF all'evaporatore rotante ha portato all'ottenimento di un residuo marrone. Ripreso con acqua, portato a pH basico con NaHCO₃. La fase acquosa è stata estratta con CHCl₃ e acidificata con HCl 12N. Dopo estrazione con CHCl₃, la fase organica è stata anidrificata (Na₂SO₄) e il solvente rimosso per evaporazione a pressione ridotta. Si ottengono 1.5 g di olio verde (resa 15%).

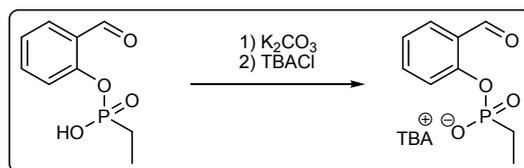
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.20 (dt, *J* = 21.11, 7.55Hz, 3H), 1.90 (qd, *J* = 18.83, 7.55Hz, 2H), 7.22-7.33 (m, 2H), 7.48-7.53 (m, 1H), 7.84-7.87 (m, 1H), 8.17 (s br, 1H), 10.32 (s, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.98 (d, *J*_{P-C} = 6.45 Hz), 19.02 (d, *J*_{P-C} = 145.46 Hz), 121.72, 125.11, 127.68 (d, *J*_{P-C} = 3.80 Hz), 128.56, 135.32, 151.95 (d, *J*_{P-C} = 9.31 Hz), 188.51.

³¹P-NMR (122 MHz, CDCl₃) proton decoupled δ (ppm): 34.43

ESI-MS(+) ACN+0,1%HCOOH: [M+Na]⁺ 237m/z

ESI-MS(-) ACN: [M-H]⁻ 213 m/z

Sintesi di 2 (etil) fosfonil benzaldeide tetrabuttilammonio (Piattaforma 1)

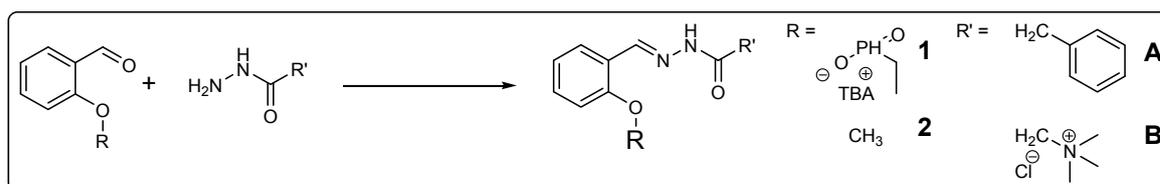
Schema 2.2

2(etil)fosfonil benzaldeide (531.8mg, 2.48mmol, 1eq), sono stati sciolti in acqua e il pH della soluzione risultate è stato corretto a ~7.5 usando NaHCO₃. La fase acquosa è stata estratta con una soluzione di tetrabuttilammonio cloruro (669mg, 2.22mmol, 0.89eq) in CHCl₃. Il solvente organico è stato evaporato a pressione ridotta, ottenendo **1** sotto forma di solido giallo (904.9mg, 1.99mmol, 89.6% resa).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.94 (t, $J = 7.28$ Hz, 12H), 1.15 (dt, $J = 18.29, 7.65$ Hz, 3H) 1.36 (m, 8H), 1.53-1.76 (m, 10H), 3.03 (s, 1H), 3.24 (m, 8H), 6.99 (t, 7.47 Hz, 1H), 7.45-7.37 (m, 1H), 7.64 (d, $J = 8.34$ Hz, 1H), 7.74 (dd, $J = 7.76, 1.56$ Hz, 1H), 10.54 (s, 1H).

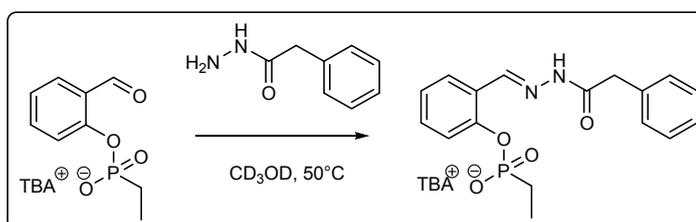
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.41 (d, $J_{P-C} = 6.37$ Hz), 13.59, 19.63, 21.38 (d, $J_{P-C} = 137.16$ Hz), 23.93, 58.63, 121.68, 122.24 (d, $J_{P-C} = 2.92$ Hz), 126.98, 127.73 (d, $J_{P-C} = 4.20$ Hz), 135.04 (d, $J_{P-C} = 0.81$ Hz), 157.79 (d, $J_{P-C} = 7.35$ Hz), 191.54.

³¹P-NMR (122 MHz, CDCl₃) proton decoupled δ (ppm): 24.95

Procedura generale per la sintesi degli idrazoni

Schema 2.3

Le aldeidi **1** o **2** sono state sciolte in MeOH e alla soluzione risultante è stato aggiunto 1 eq di idrazide. La miscela di reazione è stata mantenuta a riflusso da 5 a 8 ore.

Idrazone 1A

Schema 2.4

¹H-NMR isomero maggioritario (62%) (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.01 (t, $J = 7.31$ Hz, 12H), 1.17 (dt, $J = 19.02, 7.69$ Hz, 3H), 1.41 (m, 8H), 1.59-1.79 (m, 10H), 3.18-3.24 (m, 8H), 3.63 (s, 1H), 7.05-7.46 (m, 8H), 8.08 (dd, $J = 7.82, 1.05$ Hz, 1H), 8.60 (s, 1H)

¹H-NMR isomero minoritario (38%) (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.01 (t, $J = 7.31$ Hz, 12H), 1.17 (td, $J = 19.02, 7.69$ Hz, 3H), 1.41 (m, 8H), 1.59-1.79 (m, 10H), 3.18-3.24 (m, 8H), 4.07 (s, 1H), 7.05-7.46 (m, 8H), 7.95 (dd, $J = 7.79, 1.10$ Hz, 1H), 8.40 (s, 1H)

¹³C-NMR isomero maggioritario (62%) (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.18 (d, $J_{P-C} = 6.18$ Hz), 13.98, 20.75, 21.84 (d, $J_{P-C} = 139.61$ Hz), 24.81, 42.42, 59.53, 122.15 (d, $J_{P-C} = 2.52$ Hz), 124.23, 126.72, 127.10 (d, $J_{P-C} = 4.67$ Hz), 127.56, 127.72, 128.08, 129.66, 130.14, 132.48, 136.49, 146.28, 153.87 (d, $J_{P-C} = 7.73$ Hz), 170.42

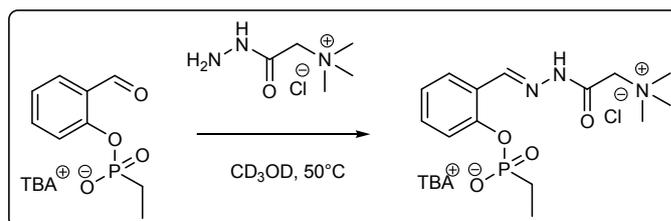
¹³C-NMR isomero minoritario (38%) (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.18 (d, $J_{P-C} = 6.18$ Hz), 13.98, 20.75, 21.84 (d, $J_{P-C} = 139.61$ Hz), 24.81, 40.46, 59.53, 122.32 (d, $J_{P-C} = 2.50$ Hz), 124.23, 126.72, 127.10 (d, $J_{P-C} = 4.67$ Hz), 127.56, 127.72, 127.94, 129.47, 130.52, 131.97, 136.91, 142.47, 153.61 (d, $J_{P-C} = 7.72$ Hz), 175.64

³¹P-NMR isomero maggioritario (62%) (122 MHz, CDCl₃) proton decoupled δ (ppm): 26.47

³¹P-NMR isomero minoritario (38%) (122 MHz, CDCl₃) proton decoupled δ (ppm): 26.54

ESI-MS (-) MeOH: [M-H]⁻ 345 m/z

HPLC (Jupiter Proteo 4u 250x4.60 mm, 4μm, flow=0.8ml/min, 0-15min 10-90% ACN, 15-25min 90%ACN, λ=226nm): 16.8 min

Idrazone 1B

Schema 2.5

¹H-NMR isomero maggioritario (80%) (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.03 (t, $J = 7.31$ Hz, 12H), 1.19 (dt, $J = 19.02, 7.69$ Hz, 3H), 1.42 (m, 8H), 1.62-1.83 (m, 10H), 3.22-3.27 (m, 8H), 3.42 (s, 1H), 4.79 (s, 1H), 7.07-7.12 (m, 1H), 7.32-7.44 (m, 2H), 7.93 (dd, $J = 7.83, 1.23$ Hz, 1H), 8.39 (s, 1H)

¹H-NMR isomero minoritario (20%) (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.03 (t, $J = 7.31, 7.31$ Hz, 12H), 1.19 (dt, $J = 19.02, 7.69$ Hz, 3H), 1.42 (m, 8H), 1.62-1.83 (m, 10H), 3.22-3.27 (m, 8H), 3.32 (s, 1H), 4.20 (s, 1H), 7.07-7.12 (m, 1H), 7.32-7.44 (m, 2H), 8.05 (dd, $J = 7.68$ Hz, 1.13, 1H), 8.64 (s, 1H)

¹³C-NMR isomero maggioritario (80%) (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.17 (d, $J_{P-C} = 6.28$ Hz), 13.99, 20.77, 21.84 (d, $J_{P-C} = 139.53$ Hz), 24.86, 54.83, 59.58, 64.32, 122.44 (d, $J_{P-C} = 2.74$ Hz), 124.29, 126.61 (d, $J_{P-C} = 4.52$ Hz), 127.19, 132.57, 144.35, 153.81 (d, $J_{P-C} = 7.74$ Hz), 166.35

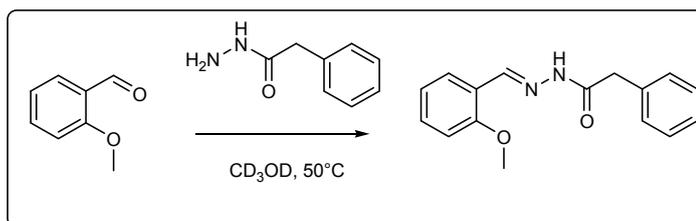
¹³C-NMR isomero minoritario (20%) (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.17 (d, $J_{P-C} = 6.28$ Hz), 13.99, 20.77, 21.94 (d, $J_{P-C} = 139.95$ Hz), 24.86, 55.04, 59.58, 64.82, 122.71 (d, $J_{P-C} = 2.53$ Hz), 124.50, 126.61 (d, $J_{P-C} = 4.52$ Hz), 127.58, 133.10, 148.55, 154.04 (d, $J_{P-C} = 7.98$ Hz), 161.70

³¹P-NMR isomero maggioritario (80%) (122 MHz, CDCl₃) proton decoupled δ (ppm): 26.59

³¹P-NMR isomero minoritario (20%) (122 MHz, CDCl₃) proton decoupled δ (ppm): 26.74

ESI-MS(+) MeOH+0,1%HCOOH: [M+H]⁺ 328 m/z

HPLC (Jupiter Proteo 4u 250x4.60 mm, 4μm, flow=0.8ml/min, 0-15min 10-90% ACN, 15-25min 90%ACN, λ=226nm): 9.5 min

Idrazone 2A

Schema 2.6

¹H-NMR isomero maggioritario (62%) (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.60 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 6.92-7.03 (m, 2H), 7.20-7.40 (m, 5H), 8.00 (dd, *J* = 7.78, 1.55 Hz, 1H), 8.55 (s, 1H)

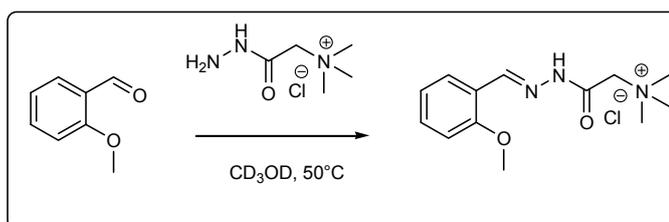
¹H-NMR isomero minoritario (38%) (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.86 (s, 3H), 4.05 (s, 2H), 6.92-7.03 (m, 2H), 7.20-7.40 (m, 5H), 7.89 (dd, *J* = 7.73, 1.53 Hz, 1H), 8.34 (s, 1H)

¹³C-NMR isomero maggioritario (62%) (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 39.80, 55.69, 111.26, 121.16, 122.48, 126.32, 126.92, 127.71, 128.63, 129.64, 129.72, 131.56, 135.26, 140.22, 158.22, 173.83

¹³C-NMR isomero minoritario (38%) (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 42.84, 55.59, 111.00, 121.01, 122.48, 126.32, 126.92, 127.80, 128.63, 129.28, 129.72, 132.26, 135.26, 144.26, 158.22, 173.83

ESI-MS(+) MeOH+0,1%HCOOH: [M+Na]⁺ 291 m/z

HPLC (Jupiter Proteo 4u 250x4.60 mm, 4μm, flow=0.8ml/min, 0-15min 10-90% ACN+0,1%TFA, 15-25min 90%ACN, λ=280nm): 17.3 min

Idrazone 2B

Schema 2.7

¹H-NMR isomero maggioritario (80%) (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.42 (s, 9H), 3.88 (s, 3H), 4.79 (s, 2H), 6.96-7.06 (m, 2H), 7.38-7.44 (m, 1H), 7.92 (dd, *J* = 7.77, 1.65 Hz, 1H), 8.38 (s, 1H)

¹H-NMR isomero minoritario (20%) (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.41 (s, 9H), 3.88 (s, 3H), 4.30 (s, 2H), 6.96-7.06 (m, 2H), 7.38-7.44 (m, 1H), 8.00 (dd, *J* = 7.78, 1.63 Hz, 1H), 8.65 (s, 1H)

¹³C-NMR isomero maggioritario (80%) (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 54.79, 64.30, 112.54, 121.84, 123.14, 127.13, 133.30, 141.39, 143.54, 147.90, 160.07

¹³C-NMR isomero minoritario (20%) (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 55.06, 56.26, 64.30, 112.55, 121.94, 123.14, 127.68, 133.85, 142.34, 147.83, 160.07

ESI-MS(+) MeOH+0,1%HCOOH: [M]⁺ 250 m/z

HPLC (Jupiter Proteo 4u 250x4.60 mm, 4 μm, flow=0.8ml/min, 0-15min 10-90% ACN+0,1%TFA, 15-25min 90%ACN, λ=280nm): 11.4 min

2.9.4 Procedura generale per gli esperimenti di amplificazione

NMR

Sono state preparate le soluzioni madre delle piattaforme **1** e **2** (circa 100 mM, per l'esperimento con [1]₀=50mM è stata preparata una soluzione 500 mM) in CD₃CN, al fine di evitare la formazione di semiacetali. Le soluzioni madre delle idrazidi **A** e **B** sono state preparate in CD₃OD (200÷500 mM).

Utilizzando siringhe di tipo Hamilton la quantità di idrazidi appropriata è stata trasferita in un tubo NMR con tappo a vite, aggiunto CD₃OD per diluire alla concentrazione desiderata ed infine è stata aggiunta la piattaforma (**1** oppure **2**).

Le soluzioni sono state mantenute a 50°C e monitorate attraverso spettroscopia NMR finché l'equilibrio termodinamico è stato raggiunto, evidenziato dall'assenza di modificazioni dello spettro nel tempo. L'integrazione dei segnali degli idrazoni ha permesso la loro quantificazione diretta.

HPLC

Gli studi di amplificazione via HPLC sono stati condotti a partire dall'idrazone **1B** invece che dalla piattaforma **1** libera. La motivazione di questa scelta dipende dal lungo tempo richiesto dal sistema per raggiungere l'equilibrio. Partendo dall'idrazone **1B**, termodinamicamente sfavorito, le variazioni nello spettro HPLC sono molto più facili da valutare, per cui è più semplice determinare se l'equilibrio è stato raggiunto.

Sono state preparate le soluzioni madre di **1B**, **A**, **B** (circa 5 mM) in CH₃OH. Le miscele di equilibrato sono state preparate trasferendo con siringhe tipo Hamilton le quantità di sostanze appropriate in *vial* contenenti la quantità solvente (CH₃OH) tale per cui la concentrazione finale fosse quella desiderata. Esse sono state mantenute a 50°C fino al raggiungimento dell'equilibrio.

Quantificazione:

I campioni sono stati iniettati direttamente all'HPLC a intervalli di tempo regolari. La quantificazione dell'idrazone **1A** è stata resa possibile confrontando l'area del picco con la propria retta di taratura.

- Retta di taratura: Area = 124,91 μM **1B** (R² = 0.9982)
- Colonna: Jupiter Proteo 4u 250x4.60 mm. 4μm

- Flusso: 0.8 ml/min
- detector: 226 nm
- Rampa:
 - t = 0 min → 90% H₂O, 10% CH₃CN
 - t = 15 min → 10% H₂O, 90% CH₃CN
 - t = 25 min → 10% H₂O, 90% CH₃CN
- Picco: 9,5 min

[1B] μM	Area
50	6631
75	9361
100	12340
125	15525
150	18513
175	21591
200	25553

Tabella 2.3

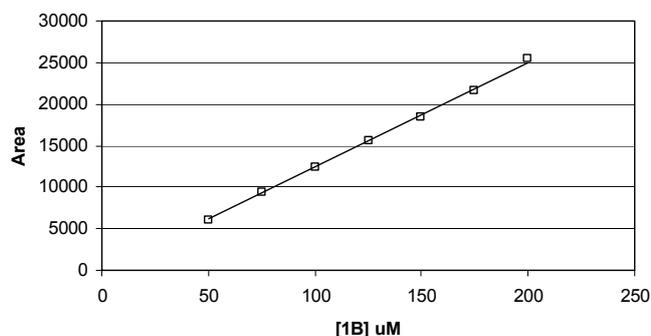


Figura 2.28:

2.9.5 Implementazione del modello proposto

Il modello termodinamico proposto è stato sviluppato utilizzando il programma MicroMath Scientist per Windows, nella versione 2.01. Il sistema ha richiesto la riscrittura dell'equilibrio proposto in modo tale che fosse compatibile con il programma, come presentato di seguito. In questo schema tutte le specie sono in equilibrio con i componenti **1**, **A**, **B**, con costanti di binding rappresentate in figura. Dal momento che è stato verificato sperimentalmente che la presenza di aldeide **1** libera in soluzione è al di sotto del limite di rivelabilità, il valore di K_{ass} è posto estremamente elevato (10^8 M^{-1}). La stabilità termodinamica relativa di tutte le specie presenti all'equilibrio (**1A**, **1B**, **1A·B**, **1B·B**) sarà influenzata dai valori delle costanti K_{eq} e K_{ass} , che, a livello pratico, si riferiscono, rispettivamente, all'entità della stabilizzazione intramolecolare e intermolecolare.

L'insieme di questi parametri è stato usato per fittare i dati sperimentali con il metodo dei minimi quadrati.

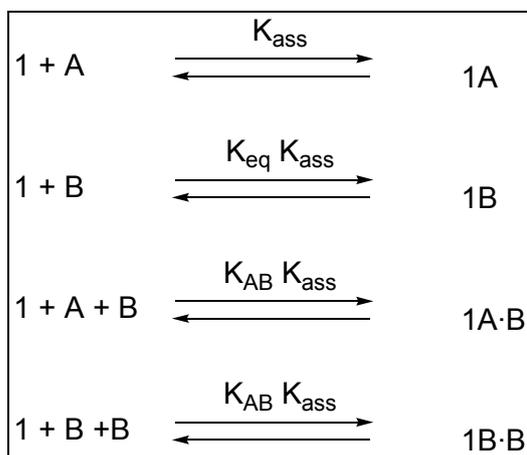


Fig. 2.29

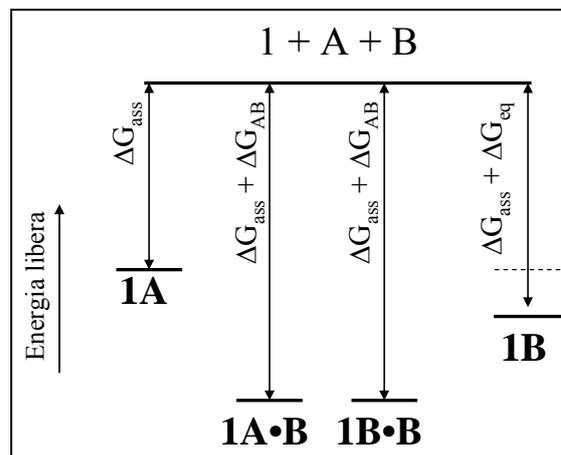


Fig. 2.30

Il modello implementato è riportato di seguito:

// MicroMath Scientist Model File

```

IndVars: H0
DepVars: ratio, perc, PA, PB, PBB, PAB, P, A, B, PTOT, ATOT, BTOT
Params: Kass, Keq, Kab, P0
A0=H0/2
B0=H0/2
PB=Kass*Keq*P*B
PA=Kass*P*A
PBB=Kass*Kab*P*B*B
PAB=Kass*Kab*P*B*A
P=P0-PA-PB-PBB-PAB
B=B0-PB-2*PBB-PAB
A=A0-PA-PAB
PTOT=P+PA+PB+PBB+PAB
BTOT=B+PB+2*PBB+PAB
ATOT=A+PA+PAB
ratio=(PB+PBB)/(PA+PAB)
perc=(PB+PBB)/(PB+PBB+PA+PAB)*100

```

//constraints

```

0<PA<P0
0<PB<P0
0<PBB<P0
0<PAB<P0
0<A<A0
0<B<B0
0<P<P0

```

con:

H0: quantità totale di idrazidi presenti

A: idrazide **A**

B: idrazide **B**

P: piattaforma **1**

PA: idrazone **1A**

PB: idrazone **1B**

PAB : complesso **1A•B**

PBB: complesso **1B•B**

I parametri *PTOT*, *ATOT* e *BTOT* sono usati come controllo, per verificare che le concentrazioni totali di P, A e B rimangano costanti durante la simulazione. I parametri *ratio* e *perc* rappresentano i fattori di amplificazione.

2.10 Riferimenti bibliografici

¹ Review sulla chimica covalente dinamica:

a) P. T. Corbett, J. Leclaire, L. Vial, K. R. West, J.-L. Wietor, J. K. M. Sanders and S. Otto, *Chem. Rev.*, **2006**, 106, 3652.

b) J. D. Cheeseman, A. D. Corbett, J. L. Gleason and R. L. Kazlauskas, *Chem. Eur. J.*, **2005**, 11, 1708.

c) O. Ramström and J.-M. Lehn, *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2002**, 1, 26.

² a) O. Storm, U. Lüning, *Chem. Eur. J.*, **2002**, 8, 793.

b) I. Huc, M. J. Krische, D. P. Funeriu, J. M. Lehn, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **1999**, 1415.

c) R. L. E. Furlan, Y-F. Ng, S. Otto, J. K. M. Sanders, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 8876.

³ a) G. R. L. Cousins, R. L. E. Furlan, Y-F. Ng, J.E. Redman, J. K. M. Sanders, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 423.

b) R. L. E. Furlan, Y-F. Ng, G.R.L. Cousins, J. E. Redman, J. K. M. Sanders, *Tetrahedron*, **2002**, 58, 771.

⁴ a) A. C. Braisted, J. D. Oslob, W. L. Delano, J. Hyde, R. S. McDowell, N. Waal, C. Yu and M. R. Arkin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 3714.

b) B. G. Szczepankiewicz, G. Liu, P. J. Hajduk, C. Abad-Zapatero, Z. Pei, Z. Xin, T. H. Lubben, J. M. Trevillyan, M. A. Stashko, S. J. Ballaron, H. Liang, F. Huang, C. W. Hutchins, S. W. Fesik and M. R. Jirousek, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 4087.

c) T. Obita, T. Muto, T. Endo and D. Kohda, *J. Mol. Biol.*, **2003**, 328, 495.

⁵ a) J. K. M. Sanders, *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 1378.

b) B. Brisig, J.K.M. Sanders, S. Otto, *Angew.Chem.Int.Ed.* **2003**, 42, 1270.

c) S. I. Pascu, T. Jarrosson, C. Naumann, S. Otto, G. Kaiser, J. K. M. Sanders, *New J. Chem.* **2005**, 29, 1, 80.

⁶ L. J. Prins, P. Scrimin, *Angew. Chem. Int. Ed.* accettato per la pubblicazione.

⁷ A. Tramontano, A. A. Ammann, R. A. Lerner, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 2282.

⁸ F. V. Bagrov, R. V. Vasil'eva, *Russ. J. Org. Chem.* **2002**, 38, 9, 1309.

⁹ D.A. Erlanson, A.C. Braisted, D.R. Raphael, M. Randal, R.M. Stroud, E.M. Gordon, J.A. Wells, *Proc Natl. Acad. Sc. (USA)* **2000**, 97, 9367.

CAPITOLO 3: amplificazione in miscele dinamiche[§]

3.1 Introduzione

In letteratura sono sempre più frequenti gli esempi di sistemi complessi derivanti dalla chimica combinatoria dinamica¹, sistemi autoreplicanti², reazioni chimiche oscillanti³, modelli di *networks* biologici⁴, etc. che coinvolgono non tanto lo studio e la manipolazione di singole molecole, bensì una ben più complessa rete di sistemi interagenti⁵, verso quella che recentemente è stata definita *systems chemistry*.⁶ Parallelamente al diffondersi di tali sistemi complessi, è necessario anche lo sviluppo di metodi analitici che permettano la loro analisi, siano cioè in grado di affrontare la loro aumentata complessità rispetto ai sistemi tradizionali. Le tecniche analitiche che vengono generalmente utilizzate presuppongono l'uso di cromatografie (HPLC, GC), di misure di massa (ESI-MS, MALDI-MS) o di spettroscopia NMR. In ogni caso queste tecniche devono essere messe a punto per ciascun sistema che si vuole studiare a causa della sua intrinseca complessità, rallentando notevolmente il processo di ricerca. E' stato presentato nel Capitolo 2 come lo studio preliminare su un sistema limitato, generato dalla presenza in soluzione degli idrazoni derivanti solamente dalle idrazidi **A** e **B**, dia comunque luogo ad una risposta estremamente complessa. In particolare ha permesso di sottolineare l'importante ruolo che la concentrazione delle specie in soluzione ricopre nell'influenzare l'entità dell'amplificazione osservata. E' stato così possibile determinare le condizioni sperimentali ottimali che possano consentire lo studio di sistemi più estesi. Per lo studio di tali sistemi si è utilizzata in principio la spettroscopia ¹H-NMR "classica", in quanto rappresenta uno degli strumenti più informativi rispetto agli altri a disposizione, dal momento che permette una diretta identificazione e quantificazione di tutte le specie in soluzione.⁷ Tuttavia è ben presto emerso il limite intrinseco di tale tecnica, dovuto alla parziale o totale sovrapposizione dei segnali delle varie molecole in soluzione, che impedisce così una loro corretta quantificazione.

In questo capitolo sono presentati gli studi di amplificazione eseguiti estendendo ad undici il numero di idrazidi in esame (**A-I**). In modo particolare sono discusse le varie tecniche di analisi che sono state messe a punto per studiare la composizione di una miscela complessa in maniera rapida ed efficiente.

[§] Parte dei dati presentati in questo capitolo sono stati pubblicati in
G. Gasparini, L. J. Prins, P. Scrimin, *Angew. Chem Int. Ed.*, **2008**, *47*, 2475-2479.
G. Gasparini, B. Vitorge, P. Scrimin, D. Jeannerat, L. J. Prins, *Chem. Commun.*, **2008**, 3034-3036.

3.2 Estensione del sistema

Le dimensioni della libreria (Capitolo 2) sono state aumentate estendendo lo studio ad un set di undici idrazidi commercialmente disponibili (Fig. 3.1). Ciascuna di esse presenta potenzialità di interazione con il fosfonato diversa, ad esempio tramite interazioni elettrostatiche (**B**, **B₂**, **B₃**, **C**) o attraverso la formazione di uno o più legami ad idrogeno (**D-I**). L'idrazide **A** studiata precedentemente è stata utilizzata come standard interno in quanto l'anello aromatico non dovrebbe dare interazioni con il gruppo di riconoscimento.

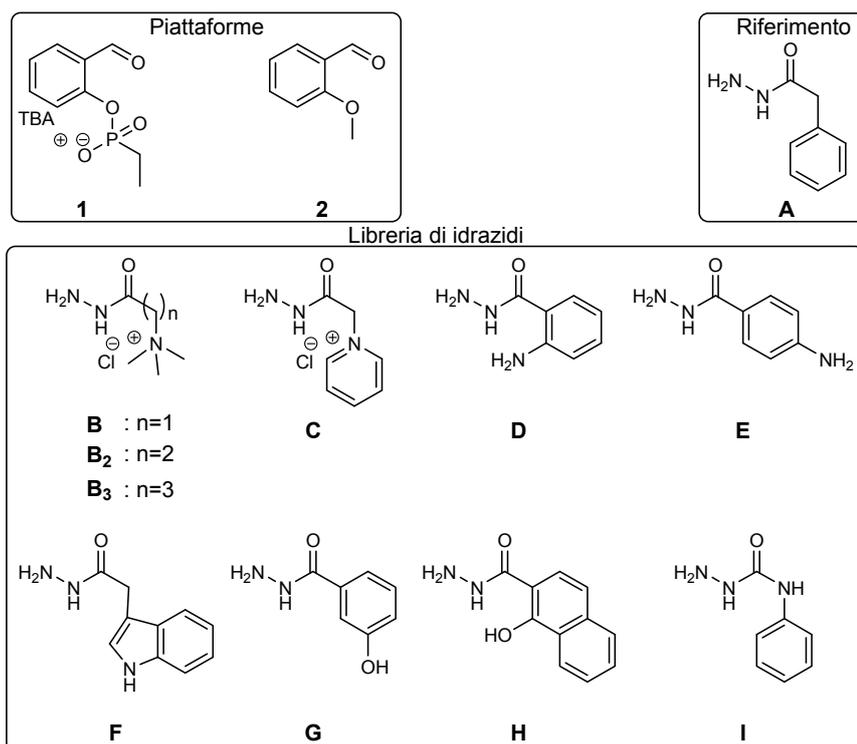


Figura 3.1: set di idrazidi utilizzate

Anche in questo caso è stata studiata la distribuzione delle idrazidi nei confronti della piattaforma **2**, in quanto la libreria risultante serve come riferimento per determinare la stabilità intrinseca degli idrazoni in assenza di target. Lo spostamento nella composizione della libreria usando la piattaforma **1** rispetto a quella ottenuta con la piattaforma **2** è quindi attribuito alla stabilizzazione intramolecolare tra l'idrazide e il target.

3.2.1 Condizioni sperimentali

Attraverso lo studio preliminare con le idrazidi **A** e **B** è stato possibile stabilire le condizioni ideali per avere il migliore compromesso tra amplificazione e risposta del sistema. È stato dimostrato infatti che, all'interno dell'intervallo di concentrazione esplorato, la risposta migliore, in termini di amplificazione, è data dall'utilizzo di miscele estremamente diluite ($[1]_0 = 0,2 \text{ mM}$). In questo modo, è possibile evitare la formazione dei complessi intermolecolari (**1A•B**, **1B•B**) che, ad elevate concentrazioni, cancellano la risposta del sistema.

Sfortunatamente però non è possibile lavorare in soluzioni così diluite in quanto si presentano due problemi fondamentali.

Il primo problema è rappresentato dal tempo richiesto dal sistema per raggiungere l'equilibrio termodinamico. Infatti la cinetica di formazione degli idrazoni e del successivo scambio delle idrazidi non permette il raggiungimento dell'equilibrio termodinamico prima che il sistema cominci a decomporre. E' stato risolto questo problema nel sistema semplice, utilizzando l'idrazone meno stabile preformato (vedi paragrafo 2.9). Non è però possibile praticare questo stratagemma nel caso di soluzioni complesse, in quanto le specie coinvolte sono troppo numerose perché esso possa dare risultati apprezzabili.

Altra questione fondamentale inerente l'utilizzo di soluzioni diluite riguarda la quantificazione e determinazione delle specie presenti in soluzione. Le condizioni diluite non permettono l'uso di tecniche $^1\text{H-NMR}$ in quanto il rapporto segnale/rumore non è sufficientemente elevato per consentire una quantificazione accurata. Si è quindi costretti ad utilizzare tecniche HPLC, che però consentono la quantificazione delle specie in soluzione solo a patto che si disponga di una retta di taratura per ciascun composto, cosa che è altamente sfavorevole laddove si abbia a che fare con librerie di considerevoli dimensioni. Infatti ciò significherebbe sintetizzare e testare ogni singolo componente, cancellando così il vantaggio dell'utilizzo di miscele dinamiche.

Si è quindi deciso di utilizzare delle condizioni sperimentali che permettessero di avere un buon compromesso tra entità dell'amplificazione, capacità del sistema di raggiungere l'equilibrio termodinamico e possibilità di analisi via $^1\text{H-NMR}$.

3.3 Screening a coppie

Come primo passo verso l'analisi di sistemi complessi si è deciso di considerare indipendentemente i vari componenti contro l'idrazide di riferimento **A**, per ciascuna piattaforma (Fig. 3.2).

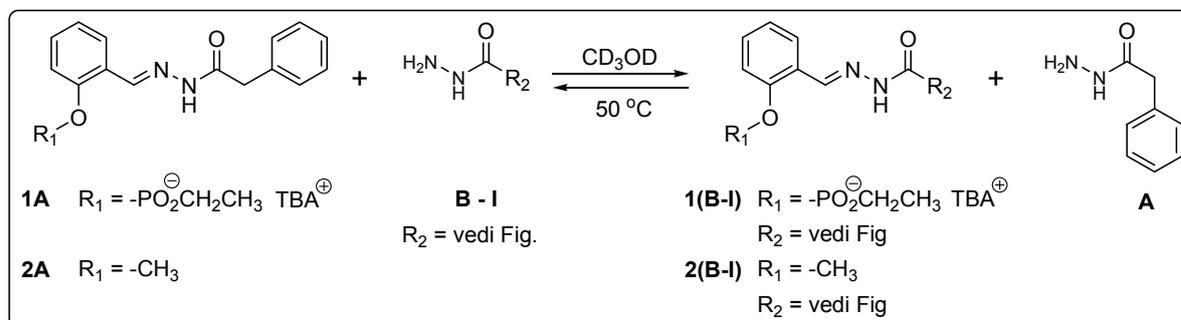


Figura 3.2: schema generale dello screening a coppie

La motivazione di tale scelta risiede nella necessità di determinare in maniera univoca la stabilità relativa dei vari idrazoni, incrementando gradualmente la complessità del sistema.

Le concentrazioni per questo tipo di studio sono state scelte tenendo conto della necessità di raggiungere l'equilibrio in tempi compatibili con la stabilità dei componenti presenti in

soluzione. Per questo motivo le concentrazioni iniziali delle piattaforme ($[1]_0$ o $[2]_0$) sono state poste a 5 mM. Le idrazidi (**A-I**) sono invece state usate in concentrazione 25 mM ciascuna. L'eccesso di 5 eq si trova leggermente oltre il massimo della curva di amplificazione presentata nel capitolo precedente (Fig. 2.26). Tuttavia è stato dimostrato che in queste condizioni l'amplificazione ottenuta è solamente qualche punto percentuale al di sotto di quella massima attesa.⁸

Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ sono stati eseguiti ad intervalli di tempo di circa 12 ore, fino a che due spettri successivi hanno dimostrato perfetta sovrapposizione, segno che il sistema ha raggiunto l'equilibrio termodinamico. La quantificazione degli idrazoni in soluzione è avvenuta focalizzando l'attenzione nella regione spettrale compresa tra 8 e 9 ppm, dove cadono i segnali relativi ai protoni legati al carbonio che porta il legame imminico. Nel caso in cui vi era l'impossibilità di attribuire in maniera univoca i segnali a causa della sovrapposizione tra gli stessi, sono stati sintetizzati gli idrazoni puri ed il loro spettro è stato utilizzato come riferimento.

3.3.1 Screening a coppie su 2

I primi esperimenti sono stati condotti sulla piattaforma **2**, in modo da avere idea della stabilità intrinseca degli idrazoni (**2X**) rispetto a quello di riferimento **2A**. I risultati ottenuti sono schematizzati nella tabella seguente (Tab. 3.1).

Idrazide	Idrazone		$K_{2,\text{rif}}$
	2X (%)	2A (%)	
B	51	49	1.0
B₂	NP (decomposizione dell'idrazide)		
B₃	52	48	1.1
C	72	28	2.6
D	52	48	1.1
E	55	45	1.2
F	52	48	1.1
G	39	61	0.6
H	50	50	1.0
I	85	15	5.5

Tabella 3.1

E' stato riscontrato un problema di stabilità dell'idrazide **B₂**. Sottoposta alle condizioni in cui avviene l'equilibratura del sistema, è stato verificato che essa si decompone in maniera spontanea. Infatti, a seguito della presenza di base o del solo riscaldamento, si ha eliminazione, con uscita di trimetilammina, ottenendo la formazione di un'idrazide α - β insatura (Fig. 3.3). E' stata evidenziata la comparsa di un singoletto a 2.9 ppm (trimetilammina) e di multipletti nella regione spettrale compresa tra 5.8 e 6.4 ppm, imputabili ai protoni del doppio legame che si forma. Questo problema coinvolge unicamente l'idrazide

B₂, ma non la sua analoga **B₃**, in quanto, nonostante entrambe presentino degli idrogeni resi acidi dalla presenza in α di un carbonile, solo la prima dispone di un ottimo gruppo uscente in posizione ideale.

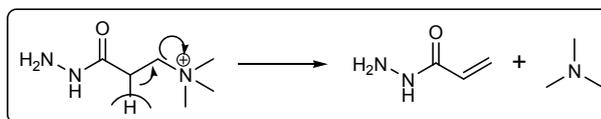


Figura 3.3: decomposizione dell'idrazide **B₂**

Dall'analisi dei dati appare chiaro come tutte le altre idrazidi studiate siano in grado di generare degli idrazoni con stabilità termodinamica comparabile tra loro. Il valore della costante $K_{2,rif}$, ottenuta con buona approssimazione dal rapporto tra le concentrazioni degli idrazoni **2X** e **2A** in soluzione, per tutte le idrazidi studiate è molto vicino all'unità. Le uniche eccezioni sono rappresentate dalle idrazidi **C** ed **I**, le quali presentano valori delle costanti di equilibrio di distribuzione di 2.6 e 5.5, rispettivamente.

3.3.2 Screening a coppie su 1

Una serie di esperimenti analoga alla precedente è stata condotta sulla piattaforma **1** recante l'analogo di stato di transizione. Anche in questo caso l'aldeide **1** è stata aggiunta ad una soluzione equimolare delle due idrazidi **X** ed **A**, in modo da ottenere concentrazioni finali pari a **1** : **A** : **X** = 5 : 25 : 25 mM. Il sistema è stato lasciato a 50 °C finché l'equilibrio chimico è stato raggiunto.

Idrazide	Idrazone		$K_{1,target}$
	1X (%)	1A (%)	
B	68	32	2.1
B₂	NP (decomposizione dell'idrazide)		
B₃	62	38	1.6
C	77	23	3.4
D	54	46	1.2
E	54	46	1.2
F	52	48	1.1
G	41	59	0.7
H	51	49	1.1
I	88	12	7.3

Tabella 3.2

In questo caso, la differenza di stabilizzazione tra l'idrazone con il riferimento **A** e l'idrazide in esame **X**, data dal valore di $K_{1,target}$, contiene sia il contributo di stabilità intrinseca che quello dovuto all'interazione intramolecolare.

Eseguendo il rapporto tra le costanti termodinamiche ottenute con le due piattaforme ($K_{1,target}/K_{2,rif}$) è possibile separare i due contributi, ricavando i fattori di amplificazione, i quali dipendono unicamente dall'interazione intramolecolare.

Idrazide	B	B₃	C	D	E	F	G	H	I
Amplif.	1.8	1.5	1.3	1.1	1.0	1.0	1.1	1.1	1.3

Tabella 3.3

Come anticipato, l'idrazide **B** e le analoghe cariche **B₃** e **C**, vengono amplificate, a causa della presenza della carica positiva. E' importante sottolineare che esse non presentano però tutte la stessa amplificazione, per cui lo *spacer* tra il carbonile e la carica positiva gioca un ruolo non marginale nel determinare l'entità dell'interazione elettrostatica che si può venire a creare (come sarà discusso in dettaglio nel capitolo 3).

Tra le idrazidi in cui è possibile invece la formazione di legami ad idrogeno con il fosfonato, unicamente l'idrazide **I** presenta una, seppur modesta, amplificazione. Probabilmente ciò è dovuto al posizionamento del gruppo che può fungere da donatore di legami ad idrogeno. Infatti in tutte le altre idrazidi il gruppo donatore (-NH- o -OH) è posto su un anello aromatico, relativamente distante dal gruppo funzionale che si lega alla piattaforma. Nell'idrazide **I**, invece, il gruppo donatore è direttamente legato al carbonio carbonilico che porta l'idrazide, riuscendo così a trovarsi in una posizione migliore per avere interazione.

Questo primo screening a coppie ha permesso di determinare con assoluta sicurezza la stabilità dei vari idrazoni che si formano, relativamente ad **1A** e **2A**. Il passo successivo nello studio di miscele complesse richiede l'analisi simultanea di tutti gli idrazoni.

3.4 Screening simultaneo

Il grande vantaggio dell'utilizzo della spettroscopia NMR è rappresentato dalla possibilità di identificare e quantificare i componenti di una libreria in un unico esperimento, con notevole risparmio di tempo. Inoltre non è necessario bloccare la libreria dinamica per compiere l'analisi. Si possono quindi eseguire esperimenti di "adattabilità" del sistema. Sfortunatamente però non è possibile applicare la tecnica monodimensionale ¹H-NMR quando il sistema comincia ad assumere dimensioni considerevoli, a causa del parallelo incremento dell'affollamento dei segnali in quelle regioni spettrali usate per determinare le specie in soluzione. Per poter utilizzare questa tecnica di analisi è quindi necessario trovare una metodologia che permetta di eliminare (o almeno ridurre in modo drastico) la sovrapposizione dei segnali senza tuttavia alterare la loro quantificazione. Il metodo proposto in questo lavoro è originato dall'idea di separare segnali non solo su un'unica dimensione (¹H) ma su due dimensioni (¹H-¹³C), dal momento che anche il segnale ¹³C del carbonio imminico cade in una regione spettrale caratteristica (130÷150ppm) ed è soggetto a minori variazioni dovute alle diverse strutture molecolari.

Si è scelto di utilizzare e testare in questo nuovo tipo di approccio la sequenza HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation spectroscopy* - spettroscopia eteronucleare a singolo quanto) in quanto permette di accoppiare ogni protone con il carbonio ad esso legato. I segnali caratteristici vengono così separati nelle due dimensioni: sono sufficienti delle piccole variazioni di *chemical shift* in ciascuna dimensione per riuscire ad ottenere dei picchi separati nello spettro bidimensionale. L'analisi HSQC prevede che avvenga un trasferimento di magnetizzazione dal protone al ^{13}C , facendola evolvere su quest'ultimo ed infine ritrasferendola al protone. Il segnale che si registra ha perciò intensità qualche decina di volte maggiore rispetto ad un normale spettro ^{13}C , rendendo così appetibile l'analisi anche per la possibilità di utilizzare concentrazioni relativamente modeste. E' però importante sottolineare che devono essere comparati segnali appartenenti a gruppi funzionali simili perché la quantificazione possa essere accurata. Infatti il trasferimento di magnetizzazione tra ^1H - ^{13}C è influenzato dal valore della costante di accoppiamento $J_{\text{H-C}}$, che deve essere il più possibile uguale nelle varie specie che si vanno ad indagare. Nel caso in esame, si è considerato che la costante di accoppiamento $J_{\text{H-C}}$ tra il protone imminico e il carbonio che lo porta sia uguale per tutti gli idrazoni presenti in soluzione.

3.4.1 Screening simultaneo su 2

Lo *screening* simultaneo utilizzando la piattaforma **2** è stato eseguito aggiungendo quest'ultima ad una soluzione contenente le nove idrazidi **A-I**, in rapporto equimolare tra loro. Non sono state utilizzate per questo studio le idrazidi **B₂** e **B₃**.

La soluzione finale ottenuta presenta una concentrazione di aldeide **2** pari a 5mM, mentre ciascuna idrazide è presente in concentrazione 7.5 mM. In questo caso si è utilizzato un minore rapporto idrazide libera-piattaforma (1.5 eq) rispetto allo screening a coppie. Infatti, aggiungendo 5 eq di ciascuna idrazide, la soluzione ottenuta non permette l'analisi degli idrazoni perché essi si perdono nel rumore, essendo i picchi maggioritari quelli provenienti dalle idrazidi libere. L'equilibrio termodinamico è stato considerato raggiunto dopo 48 ore a 50°C, infatti eseguendo uno spettro a 62 ore dal mescolamento, non si assiste ad alcuna variazione dei segnali caratteristici.

Per l'analisi della miscela si è focalizzata l'attenzione sulla regione spettrale compresa tra 8.2 e 9.0 ppm per la dimensione diretta, 130 e 150 ppm per la dimensione indiretta (Fig. 3.4). Infatti si è verificato che in questa zona dello spettro bidimensionale sono presenti i segnali relativi al cross-picco ^1H - ^{13}C dell'immina di ciascun idrazone. L'identificazione dei segnali è avvenuta in maniera relativamente semplice, utilizzando gli spettri ^1H -NMR ottenuti in precedenza. Sapendo il chemical shift del protone in esame nella dimensione diretta, è bastato andare a verificare il cross picco dato dall'accoppiamento con il proprio ^{13}C . Nel caso di attribuzione dubbia a causa di *overlap* dei segnali, si è resa necessaria la sintesi

dell'idrazone puro per verificare la frequenza di risonanza del ^{13}C in esame. In alcuni casi la quantificazione dell'idrazone presente è stata basata sul segnale di un solo isomero, correggendo il suo valore per la sua percentuale relativa che esso rappresenta.

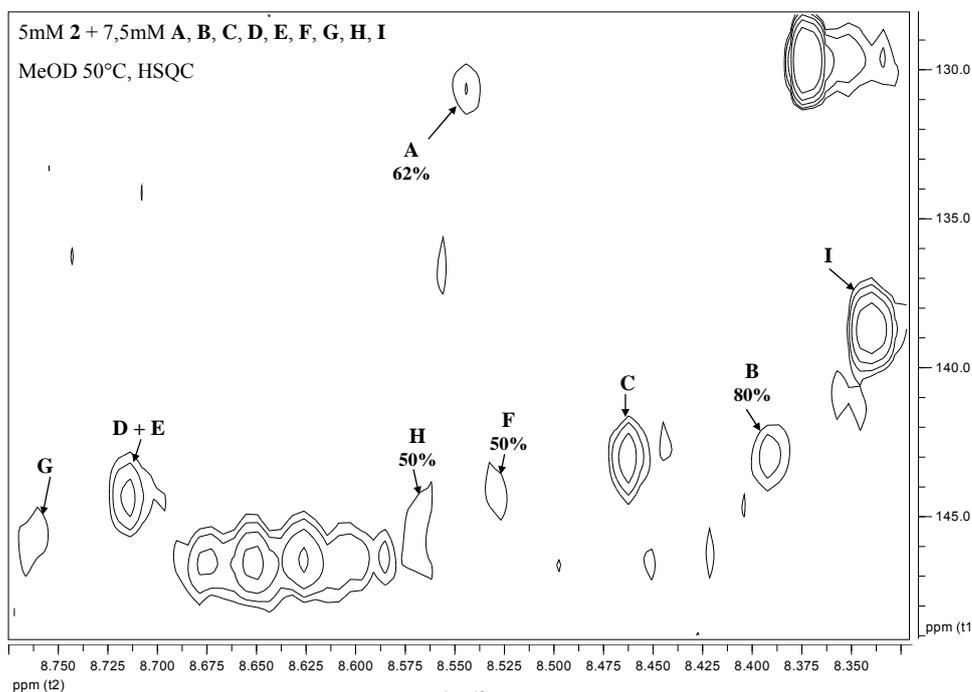


Figura 3.4: regione *fingerprint* dello spettro ^1H - ^{13}C HSQC della miscela contenente gli idrazoni **2X**

La quantificazione delle specie in soluzione ha dato i risultati riportati in Tabella 3.4.

Idrazide	Idrazone	
	2X (%)	2X/2A
A	6.7	1.0
B	9.6	1.4
C	13.5	2.0
D	6.4	1.0
E	6.4	1.0
F	8.1	1.2
G	5.6	0.8
H	5.9	0.9
I	37.6	5.6

Tabella 3.4

I valori ottenuti sono stati normalizzati prendendo come riferimento l'idrazide **A**, in modo da rendere possibile un confronto con i dati raccolti in precedenza.

3.4.2 Screening simultaneo su 1

L'analogo processo di *screening* descritto nel paragrafo precedente è stato eseguito utilizzando la piattaforma 1 che porta il gruppo di riconoscimento. L'aldeide 1 è stata aggiunta ad una soluzione contenente le idrazidi **A-I**, ottenendo una soluzione **1 : X = 5 : 7.5** mM. Il sistema è stato lasciato a 50°C fino al raggiungimento dell'equilibrio termodinamico (48 ore), si è eseguita poi l'analisi ^1H - ^{13}C HSQC (Fig. 3.5).

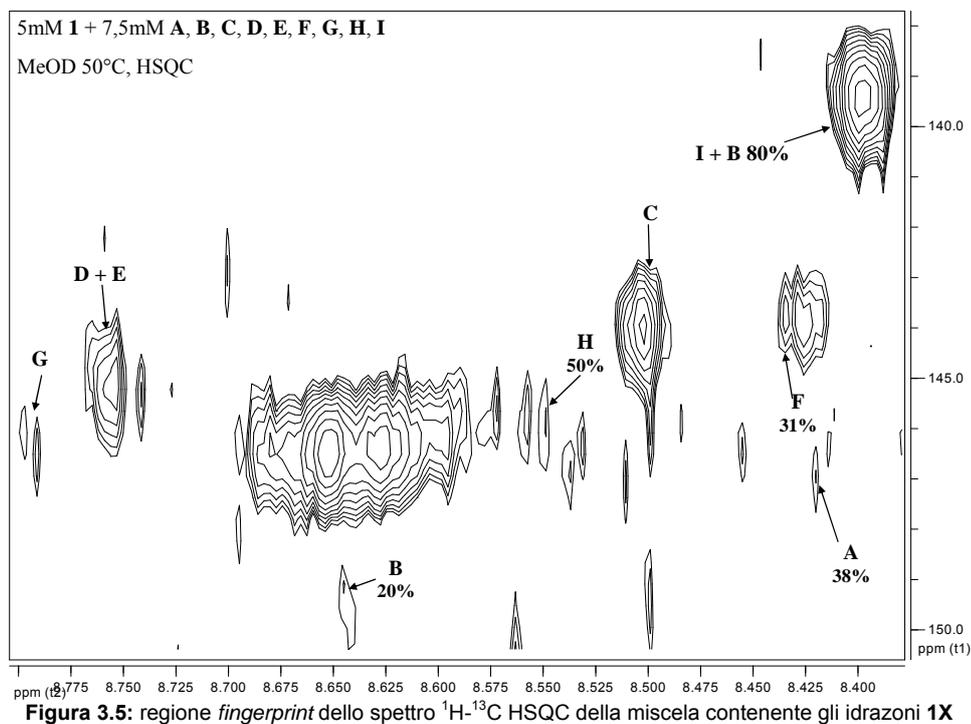


Figura 3.5: regione *fingerprint* dello spettro ^1H - ^{13}C HSQC della miscela contenente gli idrazoni **1X**

La quantificazione delle specie presenti in soluzione è avvenuta in maniera analoga alla precedente, sfruttando gli spettri ^{13}C degli idrazoni puri solo nei casi in cui si ha sovrapposizione dei segnali.

La quantificazione delle specie in soluzione ha dato i risultati riportati in Tabella 3.5. .

Idrazide	Idrazone	
	1X (%)	1X/1A
A	6.1	1.0
B	14.7	2.4
C	16.4	2.7
D	5.2	0.8
E	5.2	0.8
F	7.4	1.2
G	3.8	0.6
H	4.7	0.8
I	36.4	5.9

Tabella 3.5

3.5 Confronto tra i metodi di screening

E' possibile effettuare un confronto fra i dati ottenuti utilizzando i due diversi tipi di screening elaborati. E' bene ricordare che essi sono stati eseguiti in condizioni sperimentali differenti. In particolar modo sono state variate la concentrazione delle piattaforme (5 mM per lo screening a coppie, 2 mM per quello simultaneo) e gli equivalenti in eccesso di idrazidi presenti (5 eq per lo screening a coppie, 1.5 eq per lo screening simultaneo). Questo fatto, nonostante non vari il profilo generale delle distribuzioni ottenute, genera delle piccole discrepanze sui singoli valori di ciascuna idrazide.

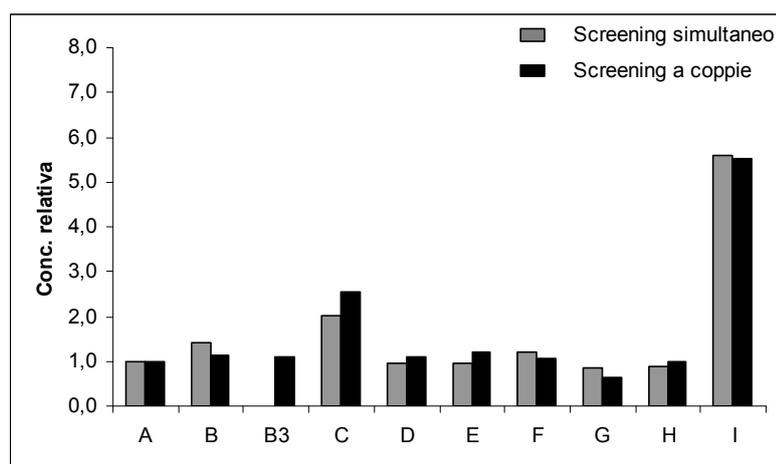


Figura 3.6: confronto tra i due metodi di screening con la piattaforma 2

In Figura 3.6. sono riportati i risultati ottenuti sulla piattaforma **2** con i due metodi di screening utilizzati. Normalizzando la concentrazione degli idrazoni presenti in soluzione relativamente all'idrazone **2A**, è possibile un confronto diretto (per cui esso, per definizione, ha valore 1).

Grafico analogo può essere costruito per la piattaforma **1** (Fig. 3.7).

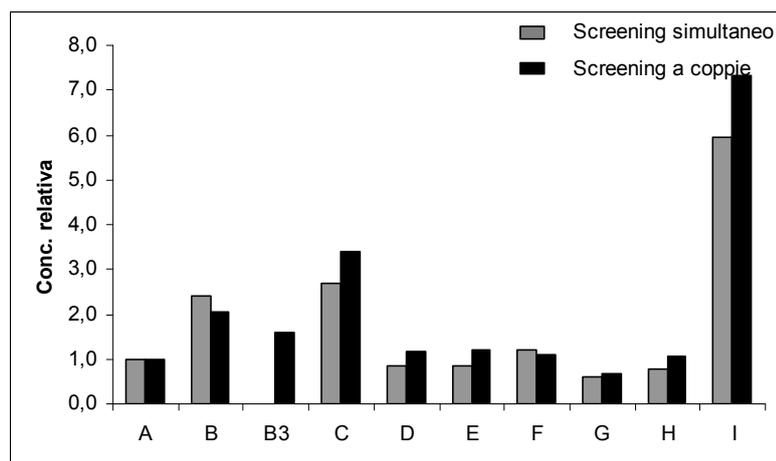


Figura 3.7: confronto tra i due metodi di screening con la piattaforma 1

Esaminando i grafici si può affermare che, nelle condizioni sperimentali utilizzate, la stabilità termodinamica relativa degli idrazoni esaminati viene mantenuta sia che si tratti un sistema semplice a due componenti, sia che si prenda in considerazione un sistema caratterizzato da un grado di complessità molto maggiore, determinato dal grande numero di specie presenti in soluzione.

Il forte grado di riproducibilità tra i due tipi di screening è massimizzato se si confrontano tra loro le amplificazioni ottenute (Fig. 3.8). Esse sono introdotte in questo capitolo ma saranno discusse in maniera esaustiva in quello successivo.

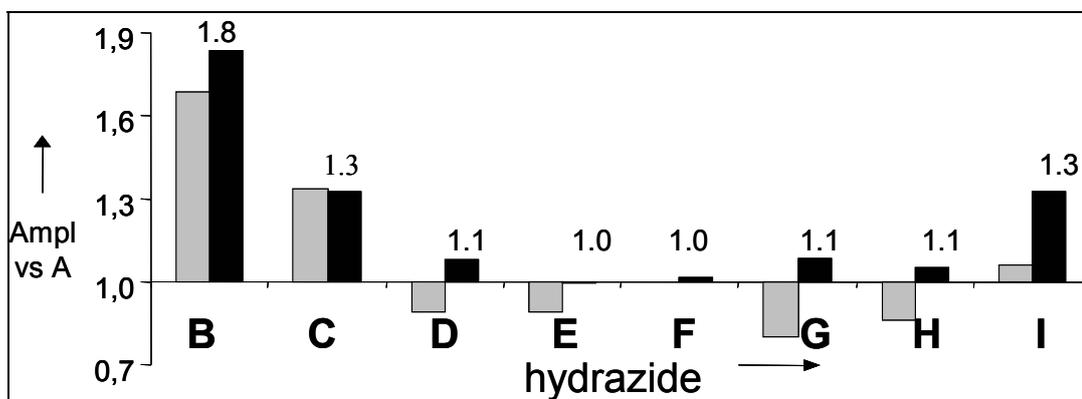


Figura 3.8: confronto tra le amplificazioni ottenute con i due metodi di screening

Inoltre è stata verificata l'attendibilità dell'innovativo metodo di screening bidimensionale proposto, il quale permette di ricavare, con un singolo esperimento, la distribuzione termodinamica di una miscela combinatoria dinamica.

Purtroppo però questo metodo di screening non è di immediata applicazione. Infatti, per l'identificazione dei cross picchi nello spettro bidimensionale, bisogna avere a disposizione almeno i *chemical shift* del protone imminico dei singoli idrazoni. Questo permette l'attribuzione dei segnali imminici che non si sovrappongono. Nel caso di sovrapposizioni questa informazione non basta, in quanto si è in grado di separare i segnali sovrapposti nello spettro monodimensionale, ma la loro attribuzione senza ambiguità richiede anche la conoscenza degli spettri ^{13}C degli idrazoni in questione. Questo è un fatto altamente sfavorevole qualora si voglia estendere l'indagine di stabilità su larga scala, includendo nel sistema composti non ancora completamente caratterizzati.

3.6 Sviluppo di una nuova metodologia di screening

Come è stato sottolineato precedentemente, aumentando le dimensioni di una libreria risulta sempre più difficile riuscire ad attribuire con certezza ogni segnale, per cui si ha necessità di disporre degli spettri ^1H e ^{13}C di ogni singolo componente in soluzione. Anche ammesso che si dispongano di tutte queste informazioni (cosa laboriosa nel caso di librerie anche di solo una decina di componenti), non sempre l'assegnazione risulta semplice a causa di piccoli *shift* del segnale dovuti alla differente concentrazione e forza ionica tra il composto isolato e la miscela dinamica. Si possono avere inoltre problemi di risoluzione a causa delle basse concentrazioni a cui i componenti meno stabili della libreria si vengono a trovare.

Si possono risolvere o perlomeno ridurre i problemi sopra citati monitorando il sistema dinamico con una serie di esperimenti ^1H - ^{13}C HSQC rapidi e ad alta risoluzione. La procedura sperimentale si basa su due fattori: da una parte sulla riduzione dei tempi

necessari per eseguire uno spettro, dall'altra sull'aumento graduale della complessità del sistema.

3.6.1 Esperimenti 2D-NMR

Uno spettro bidimensionale non è altro che la somma di una serie di spettri monodimensionali, registrati a diversi tempi t_1 (Fig. 3.9).

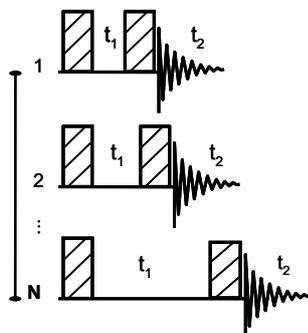


Figura 3.9: costruzione di un generico spettro bidimensionale

Il tempo necessario per eseguire uno spettro 2D dipende sia dall'ampiezza spettrale analizzata, che dal numero di incrementi di tempo t_1 utilizzati per costruirla (numero di spettri monodimensionali eseguiti, determina la risoluzione dello spettro). Sono quindi presenti due possibilità per diminuire il tempo necessario ad ottenere un esperimento bidimensionale. Si può ridurre il numero di incrementi t_1 (mantenendo costante la finestra spettrale) ottenendo però anche una diminuzione della risoluzione. Diminuendo la finestra spettrale, invece, a parità di risoluzione, è richiesto minor numero di spettri per costruire la dimensione indiretta, per cui il tempo totale risulta minore. Si perdono però quei segnali che si trovano fuori dall'intervallo analizzato. Inoltre, i segnali presenti nella prossimità esterna della finestra spettrale (unicamente nella dimensione indiretta) vengono rifocalizzati al suo interno, complicando notevolmente lo spettro che si ottiene (Fig. 3.10).

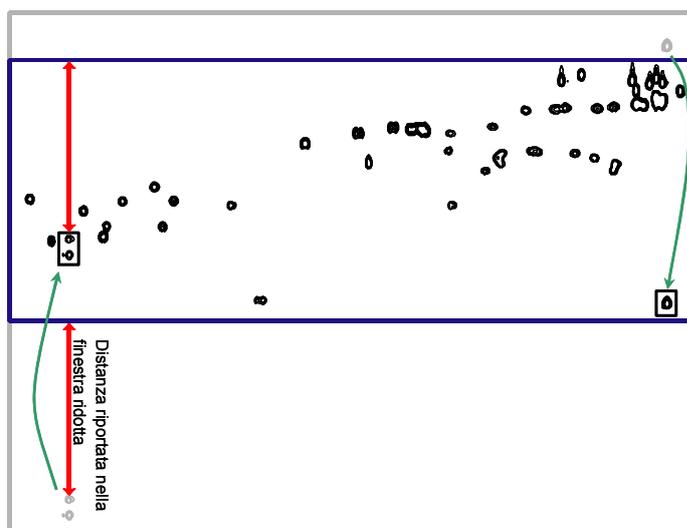


Figura 3.10: rifocalizzazione dei segnali nella prossimità esterna della finestra spettrale

3.6.2 Sistema in esame

Damien Jeannerat dell'Università di Ginevra ha elaborato un algoritmo⁹ che permette di prevedere dove i segnali che originariamente si trovano al di fuori della finestra spettrale vengono rifocalizzati. E' quindi possibile utilizzare un'ampiezza spettrale ottimizzata nella dimensione del ^{13}C per la regione *fingerprint* in esame. In questo modo il numero di incrementi di tempo necessari per risolvere i segnali è ridotto di uno o due ordini di grandezza, senza tuttavia alterare la risoluzione dello spettro. Di conseguenza, diminuisce il tempo necessario dello stesso fattore, permettendo così di seguire cinetiche di scambio in un sistema dinamico attraverso l'utilizzo della spettroscopia bidimensionale ^1H - ^{13}C HSQC.

Il network utilizzato per validare questo nuovo tipo di approccio consiste nei quattro idrazoni derivanti dalla condensazione tra l'aldeide **1** e ciascuna delle quattro idrazidi **A**, **B**, **C**, e **G** (Fig. 3.11). Il sistema si trova in equilibrio dinamico dal momento che sono presenti le quattro idrazidi libere, le quali garantiscono che avvenga l'interscambio. Gli esperimenti sono stati condotti a Losanna, presso l'Ecole Polytechnique Fédérale, in cui è stato messo a disposizione uno spettrometro NMR Bruker DRX-600, equipaggiato con TXI-cryoprobe, necessario per questo tipo di misure.

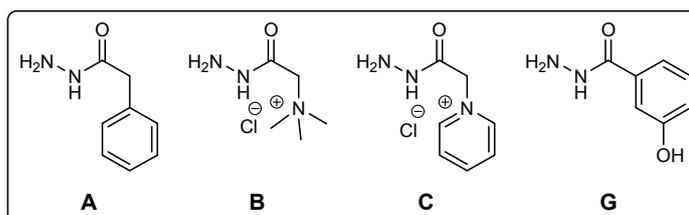


Figura 3.11: idrazidi usate per testare il nuovo approccio di *screening*

L'idrazide **A** è stata scelta in quanto è stata considerata come riferimento in tutti gli esperimenti precedenti, l'idrazide **B** in quanto essa viene incorporata preferenzialmente dal sistema. Le rimanenti due idrazidi sono state scelte in modo da valutare i limiti del sistema proposto. Infatti l'idrazide **C** presenta, a causa della presenza del catione piridinio, dei segnali nella regione spettrale interessata dovuti ai protoni aromatici (in posizione *orto* e *para*) che complicano l'analisi. Infine, l'idrazide **G**, invece, si è stimato avere una reattività nei confronti di **1** maggiore delle altre, per cui è stata selezionata in modo da verificare il limite massimo di velocità di scambio che può essere determinato utilizzando questo sistema. Il fattore chiave che permette l'analisi di questo sistema è l'incremento graduale della sua complessità, in modo da seguire passo passo la formazione di nuove specie in soluzione.

3.6.3 Cinetica ^1H - ^{13}C HSQC: punto iniziale

Il punto iniziale della cinetica è costituito dallo spettro di **1A**, 58 mM in metanolo deuterato. Questo idrazone, come visto in precedenza, presenta due specie nella regione in esame dovute agli isomeri *anti* e *sin* rispetto al legame ammidico¹⁰ **1A_M** isomero maggioritario presente al 68% e **1A_m**, isomero minoritario presente al 32% (Fig 3.12).

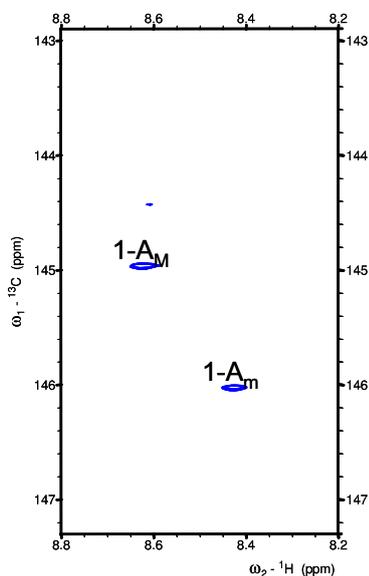


Figura 3.12: punto iniziale cinetica HSQC

3.6.4 Cinetica ^1H - ^{13}C HSQC: aggiunta di B

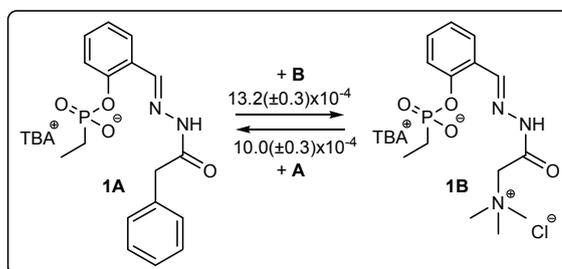


Figura 3.13: equilibri presenti dopo l'aggiunta di B

L'aggiunta di 1 eq di **A** e di 2 eq di **B** porta alla formazione dell'idrazone **1B** a spese di **1A** (Fig. 3.13). Lo strumento è settato in maniera tale da acquisire uno spettro bidimensionale ^1H - ^{13}C HSQC ogni 8 minuti, per cui è possibile seguire la cinetica di scambio delle idrazidi. Si vedono infatti la comparsa e crescita di due segnali relativi agli isomeri **1B_M** (80%) e **1B_m** (20%) a spese di **1A_M** e **1A_m** nella regione spettrale caratteristica (Fig 3.14).

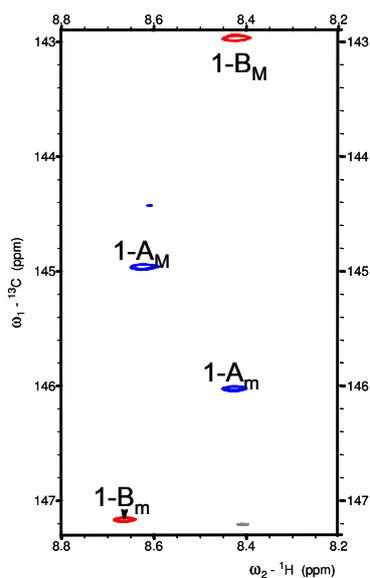


Fig. 3.14: comparsa dei segnali dell'idrazone **1B**

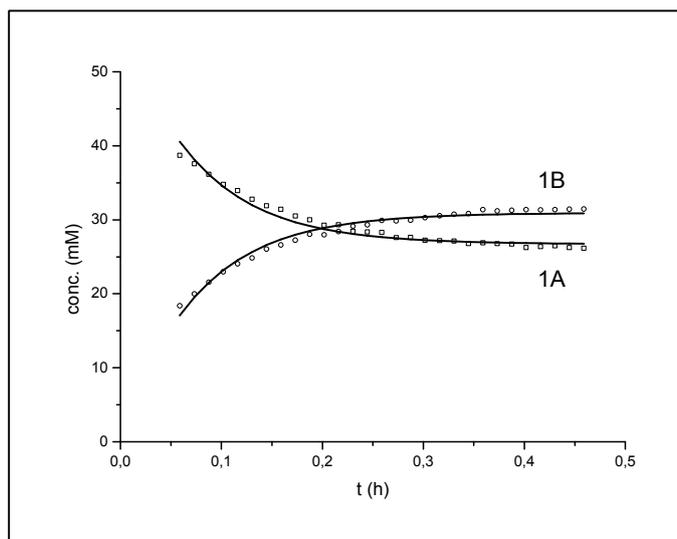
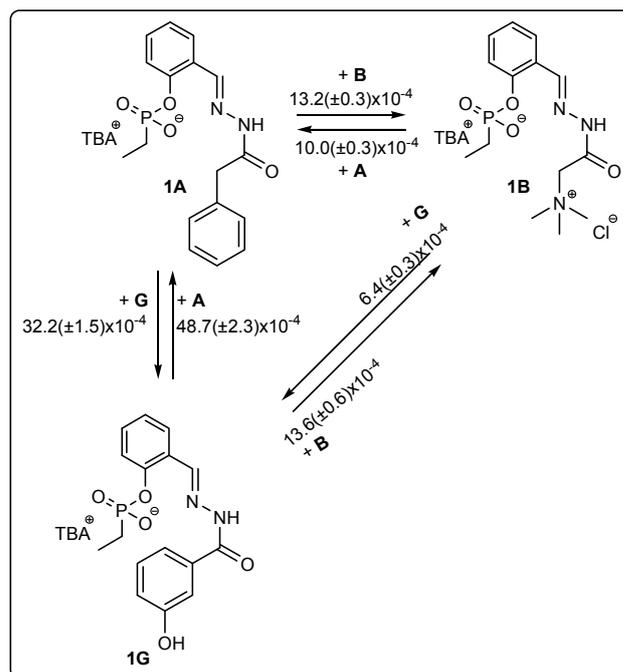


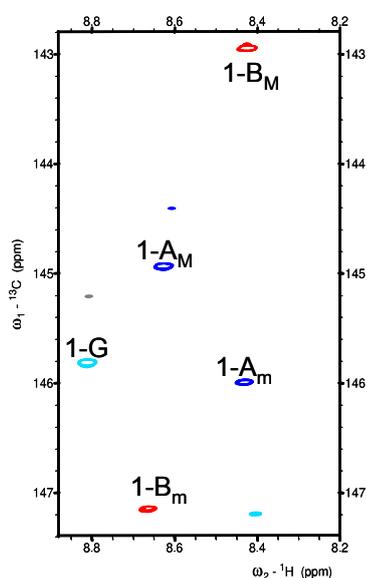
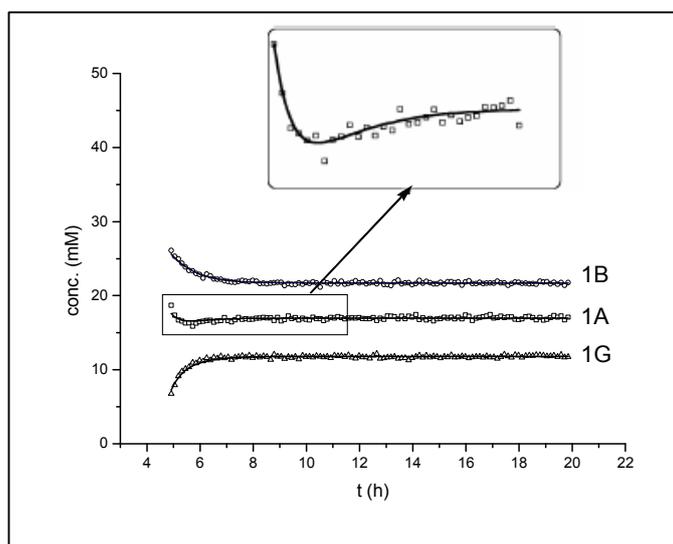
Fig. 3.15: cinetica di scambio dopo l'aggiunta di **B**

Il punto iniziale della cinetica è registrato dopo circa 20 minuti dall'aggiunta, in quanto rappresenta il tempo minimo necessario per approntare lo strumento (omogeneità del campo, *wobbling* della frequenza, etc.). Monitorando l'intensità del segnale in funzione del tempo si ottiene il profilo di equilibrizzazione (Fig 3.15) dal quale possono essere estrapolati i valori delle costanti di velocità del secondo ordine ($k_{1A \rightarrow 1B} = 13.2(\pm 0.3) \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e $k_{1B \rightarrow 1A} = 10.0(\pm 0.3) \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

All'equilibrio, i due idrazoni si trovano in rapporto **1A** : **1B** = 45 : 55 tra loro, dato che è perfettamente in linea con la diminuzione dell'amplificazione all'aumentare della concentrazione della piattaforma **1**, presentata precedentemente nel capitolo 1 (per $[1]=50\text{mM}$ si è ottenuto **1A** : **1B** = 48 : 52).

3.6.5 Cinetica ^1H - ^{13}C HSQC: aggiunta di **G**Figura 3.16: equilibri presenti dopo l'aggiunta di **G**

A distanza di quattro ore, in modo da dare al sistema la possibilità di raggiungere l'equilibrio termodinamico, sono stati aggiunti due equivalenti dell'idrazide **G** (Fig. 3.16). Si ha quindi la formazione del nuovo idrazone **1G** a spese di **1A** ed **1B** (Fig. 3.17).

Fig. 3.17: comparsa del segnale dell'idrazone **1G**Fig. 3.18: cinetica di scambio dopo l'aggiunta di **G**

Nel caso dell'aggiunta di questo componente il profilo cinetico che si ottiene dall'analisi dell'andamento dei picchi assume un profilo particolare (Fig. 3.18). Infatti, la concentrazione dell'idrazone **1A** inizialmente diminuisce rapidamente per poi aumentare nuovamente fino a raggiungere un valore costante, una volta instaurato l'equilibrio termodinamico. Questo andamento può essere spiegato considerando il fatto che **1A** è più reattivo di **1B** nella reazione di scambio con l'idrazide **G**. Tuttavia, la differenza di reattività è maggiore della differenza di stabilità termodinamica, per cui il sistema ripristina l'equilibrio aumentando la

concentrazione di **1A**. Fissate le costanti cinetiche $k_{1A \rightarrow 1B}$ e $k_{1B \rightarrow 1A}$ ottenute nell'analisi cinetica della sezione precedente, è possibile interpolare le curve ottenute al fine di ottenere le rimanenti quattro costanti cinetiche che regolano questo equilibrio, riportate in Tabella 3.6.

k	$k_{1A \rightarrow 1B}$	$k_{1B \rightarrow 1A}$	$k_{1A \rightarrow 1G}$	$k_{1G \rightarrow 1A}$	$k_{1B \rightarrow 1G}$	$k_{1G \rightarrow 1B}$
$10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	13.2(± 0.3)	10.0(± 0.3)	48.7(± 2.3)	32.2(± 1.5)	6.4(± 0.3)	13.6(± 0.6)

Tabella 3.6: costanti cinetiche ottenute dal *fitting* dopo l'aggiunta di **G**

3.6.6 Cinetica ^1H - ^{13}C HSQC: aggiunta di **C**

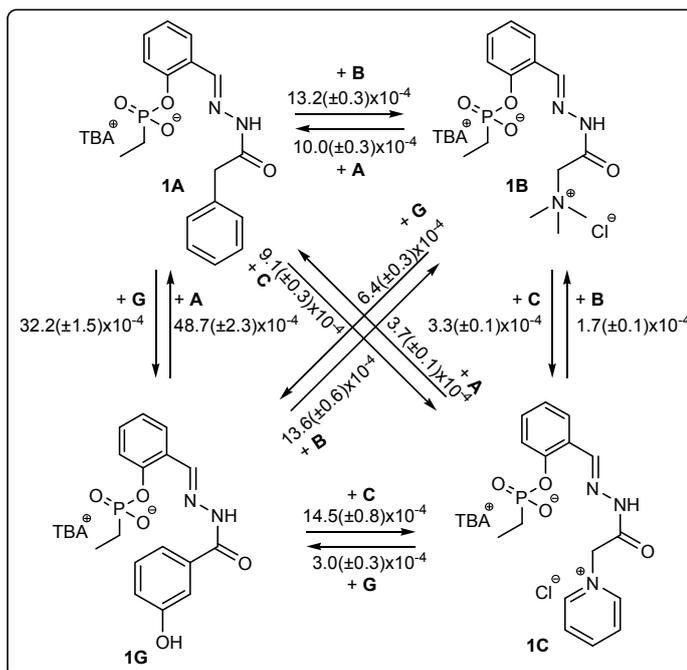


Figura 3.19: equilibri presenti dopo l'aggiunta di **C**

L'aggiunta di 2 eq dell'idrazide **C** instaura il network finale proposto inizialmente. Essa è stata aggiunta per ultima nella miscela in quanto aumenta notevolmente il grado di complessità del sistema, dal momento che i protoni in posizione *orto* e *para* dell'anello aromatico del piridinio, sia che l'idrazide sia in forma libera o legata all'aldeide **1**, risuonano all'interno della finestra spettrale scelta (Fig 3.20). Inoltre, anche l'idrazide **C**, analogamente ad **A** e **B**, presenta due forme isomeriche. Il totale dei segnali che appaiono nello spettro è quindi dieci. A causa di ciò, l'identificazione dei segnali da un singolo esperimento ^1H - ^{13}C HSQC è essenzialmente impossibile. Il metodo proposto però permette di seguire l'evolvere dei segnali nel tempo (Fig. 3.21), rendendo l'attribuzione degli stessi agevole. I segnali sono divisi in due gruppi, a seconda che essi aumentino d'intensità o meno nel corso della cinetica. Quattro dei dieci segnali diminuiscono di intensità, per cui essi devono necessariamente risultare dall'idrazide **C** libera che viene consumata. Inoltre essi possono essere ulteriormente divisi in due set da due segnali ciascuno, in rapporto 2 : 1, corrispondenti, rispettivamente, ai protoni *orto* e *para* dell'isomero maggioritario (\mathbf{C}_M) e minoritario (\mathbf{C}_m) dell'idrazide **C**.

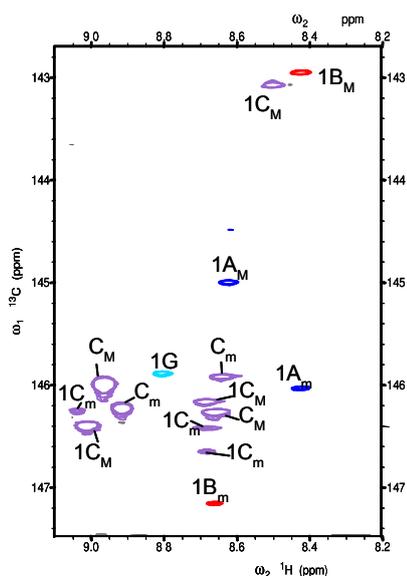


Fig. 3.20: comparsa dei segnali dell'idrazone **1C** e dell'idrazide **C**

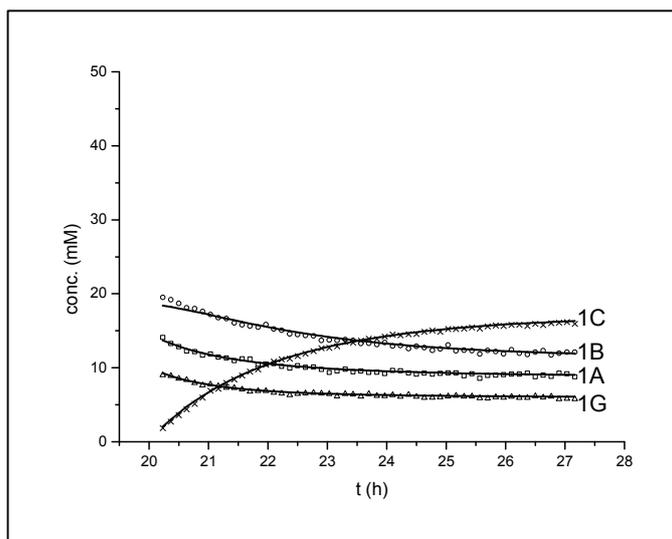


Fig. 3.21: cinetica di scambio dopo l'aggiunta di **C**

Basandosi sulle rispettive intensità, i sei segnali positivi possono essere raggruppati in due *sets* da tre segnali ciascuno, che corrispondono all'isomero maggioritario (**1C_M**) e minoritario (**1C_m**) dell'idrazone **1C** (Fig. 3.22).

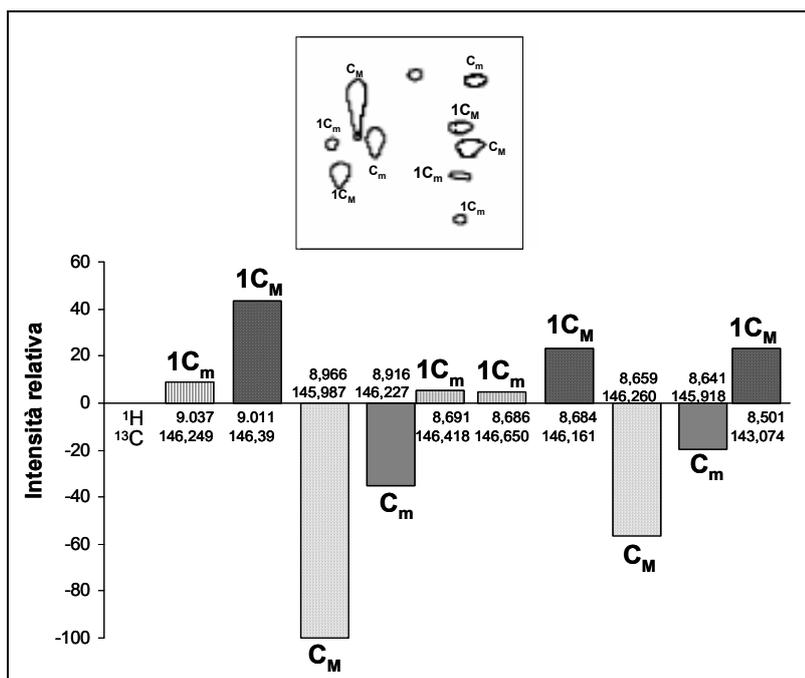


Figura 3.22: variazioni di intensità relativa dei segnali di **1C** e **C**

Il rapporto relativo 2 : 1 : 1 tra i segnali di ciascun set è consistente con il rapporto tra i protoni *orto*, *para* ed imminico dell'idrazone. L'assegnazione del segnale derivante dal protone imminico dell'idrazone **1C_M** può essere eseguita basandosi sul *chemical shift* del ¹³C, in quanto cadendo a 143.074 ppm si trova ben al di fuori dalla regione aromatica. Per quanto riguarda l'altro isomero, esso necessita di un'analisi più approfondita, in quanto il segnale imminico può essere discriminato da quello *para* andando a considerare le differenze nella costante di accoppiamento eteronucleare ¹J_{CH}. L'assegnazione dei picchi è stata

completamente confermata da analisi NMR bidimensionali tradizionali quali NOESY, HMBC e DQF-COSY.

Una volta identificati tutti i segnali, è stato possibile determinare le costanti cinetiche fittando i dati ottenuti, mantenendo fisse quelle ricavate in precedenza (Tabella 3.7).

k	$k_{1A \rightarrow 1B}$	$k_{1B \rightarrow 1A}$	$k_{1A \rightarrow 1G}$	$k_{1G \rightarrow 1A}$	$k_{1B \rightarrow 1G}$	$k_{1G \rightarrow 1B}$
$10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	13.2(± 0.3)	10.0(± 0.3)	48.7(± 0.3)	32.2(± 1.5)	6.4(± 0.3)	13.6(± 0.6)
k	$k_{1A \rightarrow 1C}$	$k_{1C \rightarrow 1A}$	$k_{1B \rightarrow 1C}$	$k_{1C \rightarrow 1B}$	$k_{1G \rightarrow 1C}$	$k_{1C \rightarrow 1G}$
$10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	9.1(± 0.3)	3.7(± 0.1)	3.3(± 0.3)	1.7(± 0.1)	14.5(± 0.8)	3.0(± 0.3)

Tabella 3.7: costanti cinetiche ottenute dal *fitting* dopo l'aggiunta di C

3.6.7 Analisi dei dati

Utilizzando questo metodo di screening è possibile determinare le 12 costanti cinetiche che regolano un sistema che coinvolge quattro componenti in equilibrio termodinamico.

La conoscenza del profilo cinetico può dare la possibilità di calcolare la composizione del sistema all'equilibrio termodinamico attraverso l'estrapolazione, utilizzando le costanti cinetiche ottenute precedentemente. Questo riduce significativamente il tempo necessario per eseguire l'esperimento, specialmente in quei sistemi dove esso è raggiunto molto lentamente.

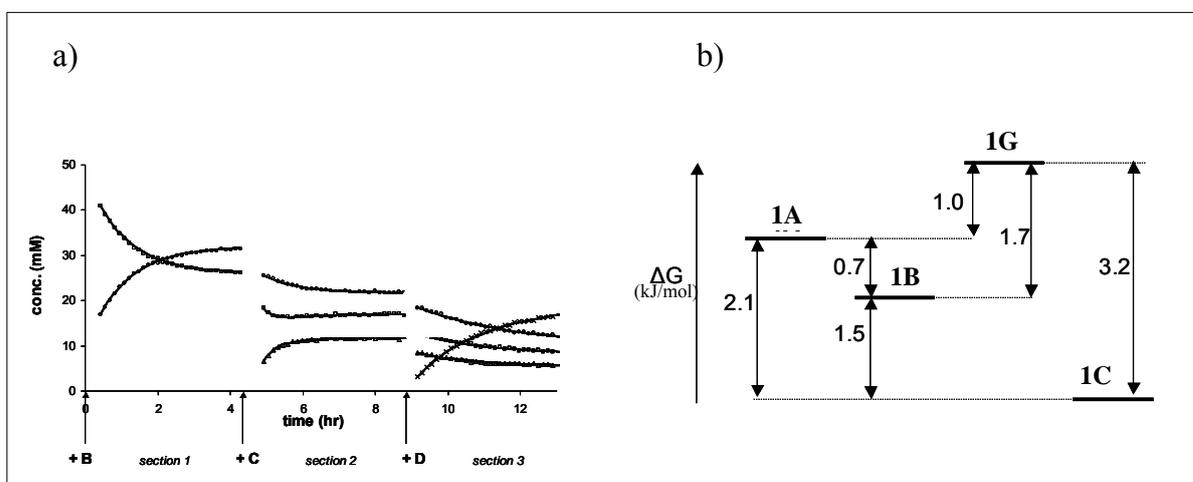


Figura 3.23: cinetica totale (a) e diagramma energetico relativo (b)

Estrapolando la curva della sezione 3 in Figura 3.23,a) si ottiene così una distribuzione del sistema pari a $1A : 1B : 1C : 1G = 19 : 25 : 43 : 13$ che, tradotta in termini di variazione di energia libera, permette di tracciare il diagramma energetico degli idrazoni presenti in soluzione (Fig. 3.23, b).

3.6.8 Adattabilità del sistema

L'utilizzo dell'analisi cinetica ^1H - ^{13}C HSQC permette anche di estrarre informazioni relative alla risposta che il sistema è in grado di dare in seguito ad uno stimolo esterno. E' stato dimostrato nel capitolo precedente che la stabilità degli idrazoni dipende dalla loro concentrazione in soluzione. La miscela all'equilibrio dei quattro idrazoni ($[1]_{\text{finale}} = 43 \text{ mM}$) è stata diluita in modo da ottenere una soluzione 5 mM in piattaforma **1**. E' stata seguita la cinetica di riarrangiamento del sistema in seguito a questa diluizione, verificando un aumento della concentrazione degli idrazoni **1B** ed **1C** a spese di **1A** ed **1G** a causa dell'aumentare delle interazioni elettrostatiche intramolecolari, in linea con quanto discusso nel Capitolo 2. In Fig 3.24 è rappresentata la variazione percentuale relativa degli idrazoni in seguito alla diluizione.

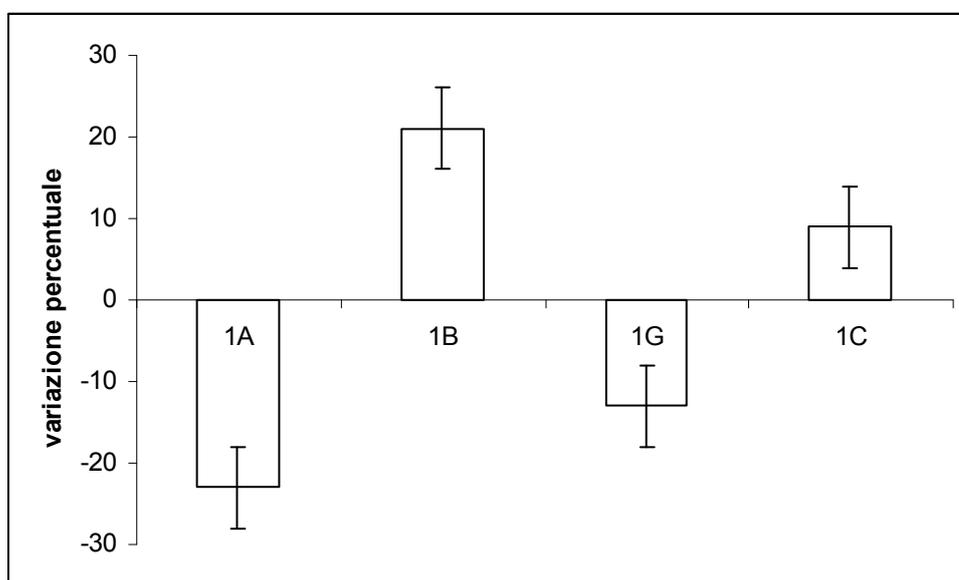


Figura 3.24: variazione percentuale degli idrazoni in seguito alla diluizione

La diluizione ha permesso inoltre di verificare l'attendibilità delle misure eseguite in prossimità del limite di concentrazione minima. Infatti, per le specie meno stabili **1A** e **1G**, la concentrazione in soluzione è molto vicino a 0.5 mM, che è considerata la concentrazione minima apprezzabile con questo *setup* (strumento e *probehead*).

3.7 Conclusioni

In questo capitolo sono stati presentati i vari metodi utilizzati per lo studio di miscele combinatorie dinamiche.

Inizialmente l'analisi della distribuzione termodinamica è stata eseguita attuando uno screening individuale di ciascuna idrazide **B÷I** nei confronti dell'idrazide di riferimento **A**. Questo ha permesso di prendere in esame un sistema semplice, rendendo accessibili in maniera chiara le stabilità relative dei vari idrazoni, che regolano le costanti termodinamiche. Successivamente è stato messo a punto uno screening simultaneo di una vera miscela combinatoria. Anche se di modeste dimensioni (un totale di 9 diversi idrazoni, escludendo gli isomeri), la conoscenza della composizione della miscela non è immediata, a causa delle numerose sovrapposizioni dei segnali caratteristici nello spettro NMR monodimensionale. Il problema è stato risolto utilizzando la tecnica bidimensionale ^1H - ^{13}C HSQC, che permette di separare i segnali che sono sovrapposti nella dimensione del protone grazie al diverso *chemical shift* nella dimensione del ^{13}C .

Il confronto tra i risultati ottenuti con i due metodi ha permesso di confermare gli studi svolti in precedenza (vedi Capitolo 1). Infatti il numero di equivalenti di idrazidi presenti in soluzione è stato scelto tenendo conto della dipendenza dell'amplificazione dalla concentrazione (Fig 2.26), cosicché i risultati ottenuti dai due set di esperimenti, nonostante piccole variazioni, sono paragonabili tra loro.

Esistono tuttavia dei problemi operativi che rendono particolarmente difficoltosa l'applicazione dei due approcci appena visti, i quali vengono via via enfatizzati all'aumentare delle dimensioni della libreria dinamica oggetto di studio. Aumentando le dimensioni della libreria risulta sempre più difficile riuscire ad attribuire con certezza ogni segnale, per cui si ha necessità di disporre degli spettri ^1H e ^{13}C di ogni singolo componente della libreria. Anche ammesso che si dispongano di queste informazioni (cosa laboriosa nel caso di librerie anche di solo una decina di componenti), non sempre l'assegnazione risulta semplice a causa di piccoli *shift* del segnale dovuti alla differente concentrazione e forza ionica tra il composto isolato e la miscela dinamica. Si possono avere inoltre problemi di risoluzione a causa delle basse concentrazioni a cui i componenti meno stabili della libreria si vengono a trovare.

Applicando una metodologia ^1H - ^{13}C HSQC innovativa, si è dimostrato che è possibile ridurre al minimo le informazioni che devono necessariamente essere note a priori in quanto permette di risolvere il problema di attribuzione dei segnali. Con l'utilizzo di questa spettroscopia bidimensionale si riesce infatti a seguire nel tempo l'instaurarsi dell'equilibrio, permettendo così di estrarre, in un unico esperimento, anche informazioni sulla termodinamica e sulla cinetica dei complessi equilibri che governano una libreria combinatoria dinamica. Inoltre, si è dimostrata l'applicabilità di questa procedura al

monitoraggio diretto del comportamento adattativo di sistemi complessi in seguito ad una sollecitazione ambientale esterna.

3.8 Parte sperimentale

3.8.1 Strumentazione

Per la descrizione dettagliata di tutta la strumentazione utilizzata si rimanda al Capitolo 2, paragrafo 9.1, pag. 47.

Spettri NMR

Gli spettri ^1H - ^{13}C HSQC sono stati registrati a 303 K con spettrometro Bruker DRX-600, equipaggiato con *TXI-cryoprobe* (situato a Losanna, presso l'Ecole Polytechnique Fédérale), ed a 323 K con spettrometro Bruker Avance DRX-300. I valori di *chemical shift* (δ) riportati sono dati in ppm, calibrando la scala rispetto al segnale determinato dal solvente deuterato presente (CD_3OD $\delta(^1\text{H})=3.34$ ppm; $\delta(^{13}\text{C})=49.3$ ppm).

3.8.2 Materiali

Per la descrizione dettagliata dei materiali utilizzati si rimanda al Capitolo 2, paragrafo 9.2, pag. 48.

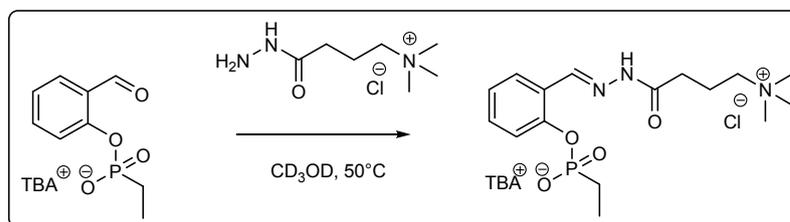
3.8.3 Sintesi e caratterizzazioni

Per la sintesi e caratterizzazione della piattaforma **1** e degli idrazoni **1A**, **1B**, **2A** e **2B** si rimanda al Capitolo 2, paragrafo 9.3, pag. 49.

Procedura generale per la sintesi degli idrazoni 1X

L'aldeide **1** è stata sciolta in metanolo deuterato e alla soluzione risultante è stato aggiunto 1 eq di idrazide. La miscela di reazione è stata mantenuta a 50°C fino a conversione completa (controllo TLC ed NMR).

Idrazone 1B₃



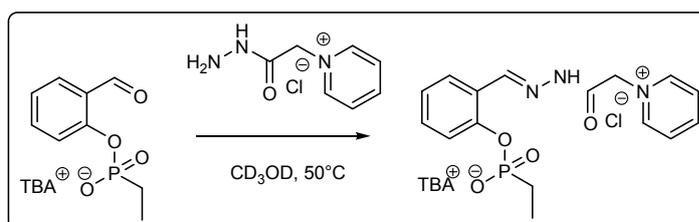
Schema 3.1

^1H -NMR isomero maggioritario (55%) (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.02 (t, $J = 7.30$ Hz, 12H), 1.17 (dt, $J = 18.76, 7.74$ Hz, 3H), 1.42 (m, 8H), 1.61-1.79 (m, 10H), 2.00 (q, $J = 2.49$ Hz, 2.11-2.23 (m, 2H), 2.90 (t, $J = 6.89$ Hz, 2H), 3.16 (s, 9H), 3.19-3.25 (m, 8H), 7.05-7.18 (m, 1H), 7.30-7.43 (m, 2H), 8.06 (dd, $J = 7.63, 1.32$ Hz, 1H), 8.55 (s, 1H).

¹H-NMR isomero minoritario (45%) (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 1.02 (t, $J = 7.30$ Hz, 12H), 1.18 (dt, $J = 18.90, 7.59$ Hz, 3H), 1.42 (m, 8H), 1.61-1.79 (m, 10H), 2.00 (qn, $J = 2.49$ Hz, 2.11-2.23 (m, 2H), 2.46 (t, $J = 6.87$ Hz, 2H), 3.15 (s, 9H), 3.19-3.25 (m, 8H), 7.05-7.18 (m, 1H), 7.30-7.43 (m, 2H), 7.89 (dd, $J = 7.83, 1.42$ Hz, 1H), 8.38 (s, 1H).

ESI-MS(+) MeOH: [M]⁺ 250 m/z

Idrazone 1C



Schema 3.2

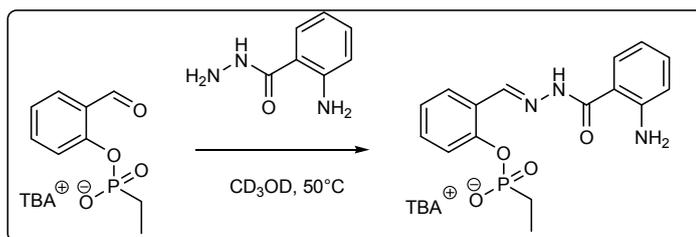
¹H-NMR isomero maggioritario (84%) (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 1.03 (t, $J = 7.26$ Hz, 12H), 1.20 (dt, $J = 18.98, 7.65$ Hz, 3H), 1.42 (m, 8H), 1.61-1.84 (m, 10H), 3.22-3.28 (m, 8H), 6.07 (s, 2H), 7.12 (t, $J = 7.42$ Hz, 1H), 7.33-7.46 (m, 2H), 8.01 (d, $J = 7.69$ Hz, 1H), 8.18 (t, $J = 6.71$ Hz, 2H), 8.46 (s, 1H), 8.61-8.75 (m, 1H), 9.00 (d, $J = 5.65$ Hz, 2H)

¹H-NMR isomero minoritario (16%) (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 1.03 (t, $J = 7.26$ Hz, 12H), 1.20 (dt, $J = 18.98, 7.65$ Hz, 3H), 1.42 (m, 8H), 1.61-1.84 (m, 10H), 3.22-3.28 (m, 8H), 5.62 (s, 2H), 7.12 (t, $J = 7.42$ Hz, 1H), 7.33-7.46 (m, 2H), 8.01 (d, $J = 7.69$ Hz, 1H), 8.18 (t, $J = 6.71$ Hz, 2H), 8.46 (s, 1H), 8.61-8.75 (m, 1H), 9.00 (d, $J = 5.65$ Hz, 2H)

¹³C-NMR isomero maggioritario (84%) (63 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 8.12 (d, $J_{P-C} = 6.45$ Hz), 14.01, 20.76 (t, $J_{P-N} = 1.51$ Hz), 21.75 (d, $J_{P-C} = 139.60$ Hz), 24.84, 59.54 (t, $J_{P-N} = 2.882$ Hz), 63.01, 122.44 (d, $J_{P-C} = 2.79$ Hz), 124.49, 126.72 (d, $J_{P-C} = 4.60$ Hz), 127.13, 128.95, 132.57, 144.19, 147.56, 147.85, 153.57 (d, $J_{P-C} = 7.77$ Hz), 167.60.

¹³C-NMR isomero minoritario (16%) (63 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 8.12 (d, $J_{P-C} = 6.45$ Hz), 14.01, 20.76 (t, $J_{P-N} = 1.51$ Hz), 21.75 (d, $J_{P-C} = 139.60$ Hz), 24.84, 59.54 (t, $J_{P-N} = 2.882$ Hz), 63.01, 122.44 (d, $J_{P-C} = 2.79$ Hz), 124.56, 126.55 (d, $J_{P-C} = 4.35$ Hz), 127.58, 129.08, 132.96, 147.48, 147.71, 147.77, 153.57 (d, $J_{P-C} = 7.77$ Hz), 163.09

ESI-MS(+) MeOH: [M-TBA]⁻ 347m/z

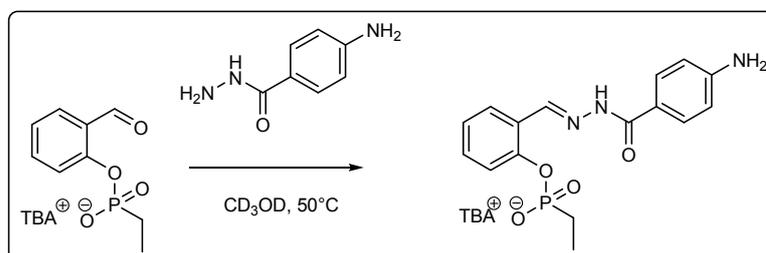
Idrazone 1D

Schema 3.3

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 1.01 (t, $J = 7.30$ Hz, 12H), 1.20 (td, $J = 18.89, 7.66$ Hz, 3H), 1.49-1.31 (m, 8H), 1.86-1.56 (m, 10H), 3.28-3.15 (m, 8H), 6.58-6.81(m, 2H), 6.95-7.00 (m, 1H), 7.08-7.27 (m, 1H), 7.32-7.44 (m, 1H), 7.61 (dd, $J = 7.97, 1.37$ Hz, 1H), 7.74 (dd, $J = 7.84, 1.34$ Hz, 1H), 8.17 (d, $J = 7.66$ Hz, 1H), 8.75 (s, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 8.13 (d, $J_{P-C} = 6.44$ Hz), 13.97, 20.75, 21.80 (d, $J_{P-C} = 139.69$ Hz), 24.82, 59.54, 114.76, 122.35 (d, $J_{P-C} = 2.78$ Hz), 123.13 (d, $J_{P-C} = 2.52$ Hz), 124.36, 127.28 (d, $J_{P-C} = 4.46$ Hz), 127.55, 128.90, 129.21, 133.91, 146.20, 150.56, 153.77, 165.84, 175.17.

ESI-MS (-) MeOH: [M-H]⁻ 346 m/z

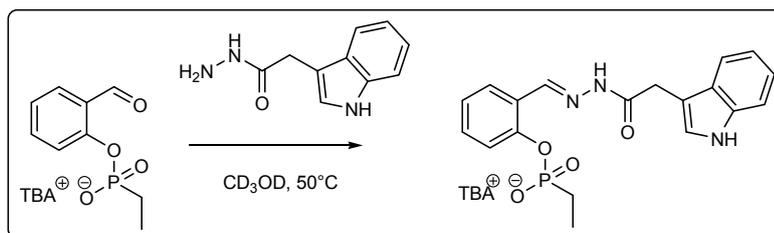
Idrazone 1E

Schema 3.4

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 1.01 (t, $J = 7.30$ Hz, 12H), 1.20 (td, $J = 18.89, 7.66$ Hz, 3H), 1.49-1.31 (m, 8H), 1.86-1.56 (m, 10H), 3.28-3.15 (m, 8H), 6.77-6.61 (m, 2H), 7.10 (t, $J = 7.47, 7.47$ Hz, 1H), 7.39-7.29 (m, 1H), 7.46-7.38 (m, 1H), 7.75 (d, $J = 8.70$ Hz, 2H), 8.17 (d, $J = 7.57$ Hz, 1H), 8.75 (s, 1H)

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 8.13 (d, $J_{P-C} = 6.44$ Hz), 13.97, 20.75, 21.80 (d, $J_{P-C} = 139.69$ Hz), 24.82, 59.54, 114.74, 121.26, 122.31 (d, $J_{P-C} = 2.78$ Hz), 124.37, 127.35 (d, $J_{P-C} = 4.52$ Hz), 127.58, 130.04, 130.63, 132.19, 145.78, 153.66 (d, $J_{P-C} = 7.87$ Hz), 167.15, 175.19.

ESI-MS (-) MeOH: [M-H]⁻ 346 m/z

Idrazone 1F

Schema 3.5

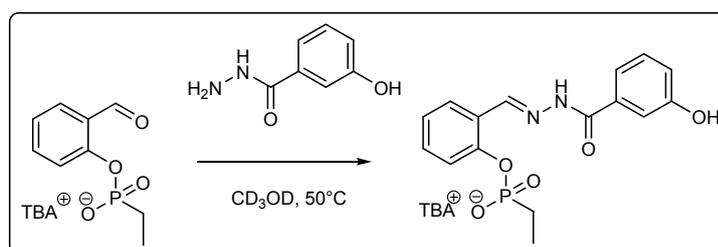
¹H-NMR isomero maggioritario (70%) (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 1.00 (t, $J = 7.30$, 12H), 1.17 (td, $J = 18.91$, 7.62 Hz, 3H), 1.39 (m, 8H), 1.81-1.53 (m, 10H), 3.23-3.08 (m, 8H), 4.19 (s, 2H), 7.67-6.94 (m, 8H), 7.99 (d, $J = 6.78$ Hz, 1H), 8.42 (s, 1H)

¹H-NMR isomero minoritario (30%) (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 1.00 (t, $J = 7.30$, 7.30 Hz, 12H), 1.17 (td, $J = 18.91$, 7.62 Hz, 3H), 1.39 (m, 8H), 1.81-1.53 (m, 10H), 3.23-3.08 (m, 8H), 3.77 (s, 2H), 7.67-6.94 (m, 8H), 8.07 (d, $J = 7.63$ Hz, 1H), 8.57 (s, 1H)

¹³C-NMR isomero maggioritario (70%) (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 8.12 (d, $J_{P-C} = 6.28$ Hz), 13.97, 20.73, 21.77 (d, $J_{P-C} = 139.65$ Hz), 24.79, 32.78, 59.49, 109.06, 112.40, 119.53, 120.02, 122.16, 122.61, 124.90, 126.81 (d, $J_{P-C} = 4.53$ Hz), 127.62, 128.62, 132.42, 138.14, 142.14, 145.99, 153.73 (d, $J_{P-C} = 7.71$ Hz), 171.33.

¹³C-NMR isomero minoritario (30%) (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 8.12 (d, $J_{P-C} = 6.28$ Hz), 13.97, 20.73, 21.77 (d, $J_{P-C} = 139.65$ Hz), 24.79, 30.38, 59.49, 108.87, 112.25, 119.38, 119.78, 122.12, 122.38, 124.30, 127.20 (d, $J_{P-C} = 4.69$ Hz), 127.62, 128.97, 131.91, 137.95, 142.14, 145.99, 153.50 (d, $J_{P-C} = 7.79$ Hz), 171.33.

ESI-MS (-) MeOH: [M-H]⁻ 386 m/z

Idrazone 1G

Schema 3.6

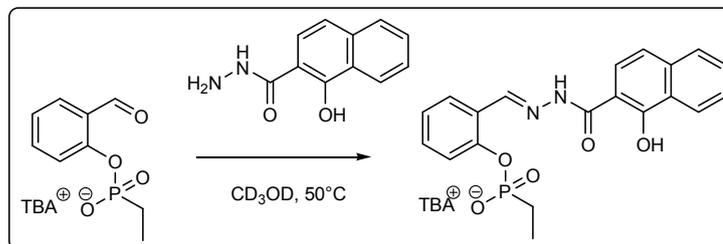
¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 1.01 (t, $J = 7.31$, 7.31 Hz, 12H), 1.20 (dt, $J = 18.96$, 7.62 Hz, 3H), 1.40 (m, 8H), 1.58-1.82 (m, 10H), 3.18-3.23 (m, 8H), 6.94-7.03 (m, 1H), 7.09-7.14 (m, 1H), 7.22-7.44 (m, 5H), 8.17 (d, $J = 7.75$ Hz, 1H), 8.79 (s, 1H)

¹³C-NMR (63 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 8.13 (d, $J_{P-C} = 6.44$), 14.00, 20.74 (t, $J_{P-N} = 1.51$ Hz), 21.79 (d, $J_{P-C} = 139.64$ Hz), 24.80, 59.48 (t, $J_{P-N} = 2.86$ Hz), 115.67, 119.58, 120.28, 122.37

(d, $J_{P-C} = 2.83$ Hz), 124.45, 127.09 (d, $J_{P-C} = 4.47$ Hz), 127.63, 130.86, 132.56, 135.61, 147.09, 153.79 (d, $J_{P-C} = 7.90$ Hz), 159.09, 167.133

ESI-MS(+) MeOH: $[M-TBA]^-$ 347m/z

Idrazone 1H

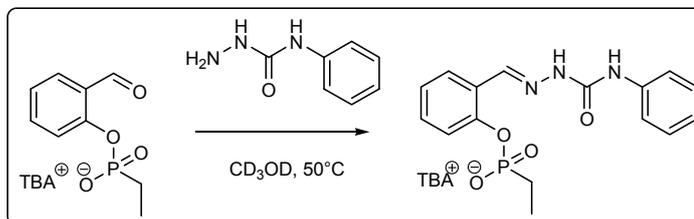


Schema 3.7

1H -NMR (300 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 1.00 (t, $J = 7.31$, Hz, 12H), 1.22 (td, $J = 18.96, 7.65$ Hz, 3H), 1.33-1.45 (m, 8H), 1.58-1.85 (m, 10H), 3.17-3.23 (m, 8H), 7.14 (t, $J = 7.61$ Hz, 1H), 7.30-7.52 (m, 5H), 7.71 (d, $J = 8.35$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J = 8.12$ Hz, 1H), 8.20 (d, $J = 7.73$ Hz, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.84 (s, 1H)

ESI-MS (-) MeOH: $[M-H]^-$ 397 m/z

Idrazone 1I



Schema 3.8

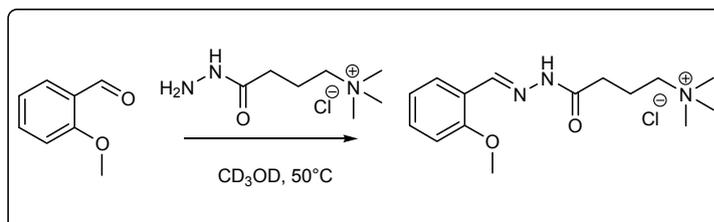
1H -NMR (300 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 1.02 (t, $J = 7.32$ Hz, 12H), 1.19 (td, $J = 18.88, 7.65$ Hz, 3H), 1.35-1.47 (m, 8H), 1.59-1.80 (m, 10H), 3.19-3.24 (m, 8H), 7.00-7.14 (m, 2H), 7.23-7.33 (m, 3H), 7.41-7.45 (m, 1H), 7.55-7.59 (m, 2H), 8.07 (dd, $J = 7.85, 1.33$ Hz, 1H), 8.41-8.37 (s, 1H)

ESI-MS (-) MeOH: $[M-H]^-$ 346 m/z

Procedura generale per la sintesi degli idrazoni 2X

L'aldeide **2** è stata sciolta in metanolo deuterato e alla soluzione risultante è stato aggiunto 1 eq di idrazide. La miscela di reazione è stata mantenuta a 50°C fino a conversione completa (controllo TLC ed NMR).

Idrazone 2B₃



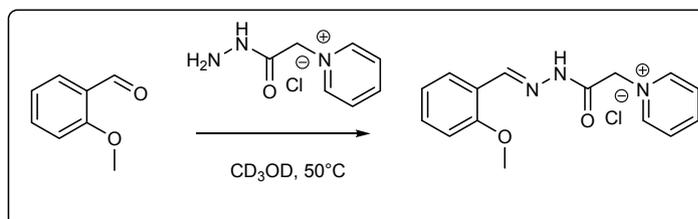
Schema 3.9

¹H-NMR isomero maggioritario (55%) (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2.25-2.31 (m, 2H), 2.90 (t, *J* = 6.86 Hz, 2H), 3.16 (s, 9H), 3.88 (s, 3H), 3.93 (m, 2H), 6.94-7.18 (m, 1H), 7.29-7.43 (m, 1H), 7.60-7.65 (m, 1H), 7.99-8.03 (m, 1H), 8.53 (s, 1H).

¹H-NMR isomero minoritario (45%) (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 2.25-2.31 (m, 2H), 2.45 (t, *J* = 6.78 Hz, 2H), 3.14 (s, 9H), 3.87 (s, 3H), 3.92 (m, 2H), 6.94-7.18 (m, 1H), 7.29-7.43 (m, 1H), 7.45-7.51 (m, 1H), 7.99-8.03 (m, 1H), 8.36 (s, 1H).

ESI-MS(+) MeOH: [M]⁺ 250 m/z

Idrazone 2C

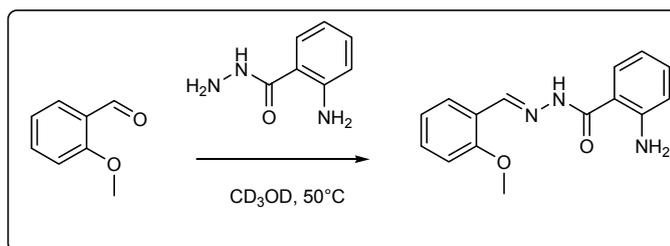


Schema 3.10

¹H-NMR isomero maggioritario (84%) (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 3.61 (s, 3H), 4.06 (s, 2H), 6.96-7.09 (m, 2H), 7.34-7.46 (m, 1H), 7.96 (d, *J* = 7.90 Hz, 1H), 8.12-8.16 (m, 2H), 8.46 (s, 1H), 8.57-8.68 (m, 1H), 8.86-8.97 (m, 1H).

¹H-NMR isomero minoritario (16%) (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 3.61 (s, 3H), 3.68 (s, 2H), 6.96-7.09 (m, 2H), 7.34-7.46 (m, 1H), 7.96 (d, *J* = 7.90 Hz, 1H), 8.12-8.16 (m, 2H), 8.46 (s, 1H), 8.57-8.68 (m, 1H), 8.86-8.97 (m, 1H).

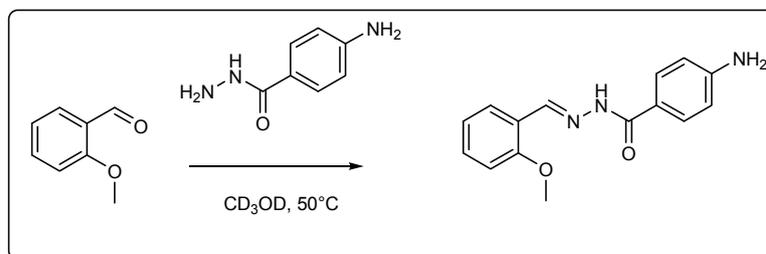
ESI-MS(+) MeOH+0,1%HCOOH: [M]⁺ 270 m/z

Idrazone 2D

Schema 3.11

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 3.87 (s, 3H), 6.58-6.63 (m, 1H), 6.73-6.76 (m, 1H), 6.97-7.04 (m, 2H), 7.21-7.25 (m, 2H), 7.53-7.56 (m, 1H), 8.08 (dd, $J = 7.83, 1.60$ Hz, 1H), 8.71 (s, 1H).

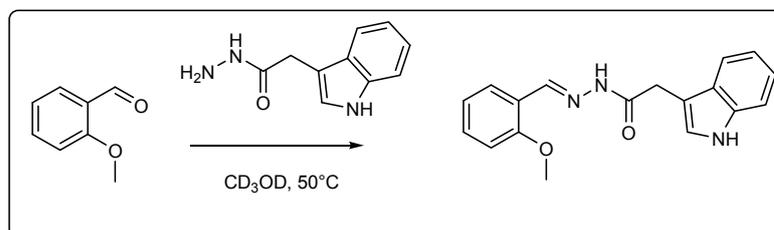
ESI-MS(+) MeOH+0,1%HCOOH: $[M+H]^+$ 270 m/z

Idrazone 2E

Schema 3.12

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 3.87 (s, 3H), 6.42-6.73 (m, 2H), 6.96-7.04 (m, 2H), 7.31-7.40 (m, 1H), 7.70-7.79 (m, 2H), 8.08 (dd, $J = 7.44, 1.16$ Hz, 1H), 8.71 (s, 1H).

ESI-MS(+) MeOH+0,1%HCOOH: $[M+H]^+$ 270 m/z

Idrazone 2F

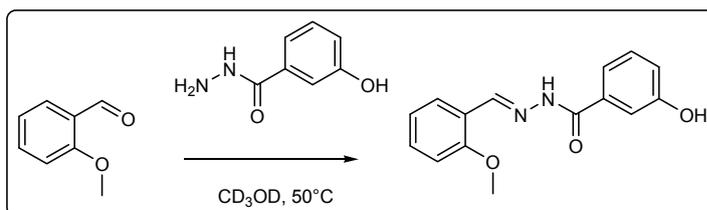
Schema 3.13

¹H-NMR isomero maggioritario (70%) (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 3,76 (s, 3H), 4.18 (s, 2H), 6.99-7.36 (m, 7H), 7.53-7.55 (m, 1H), 8.00 (d, $J = 7.64$ Hz, 1H), 8.51 (s, 1H).

¹H-NMR isomero minoritario (30%) (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 3,76 (s, 3H), 4.26 (s, 2H), 6.99-7.36 (m, 7H), 7.53-7.55 (m, 1H), 7.92 (d, $J = 8.13$ Hz, 1H), 8.34 (s, 1H).

ESI-MS(+) MeOH+0,1%HCOOH: $[M+H]^+$ 308 m/z

Idrazone 2G

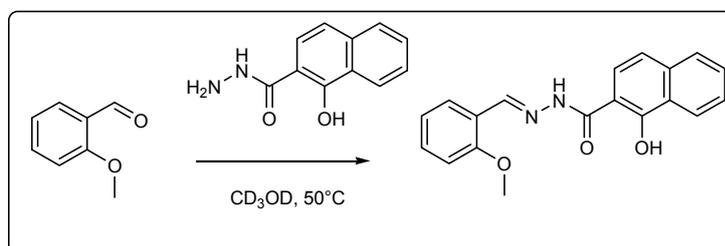


Schema 3.14

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 3.87 (s, 3H), 6.92-6.96 (m, 4H), 7.20-7.30 (m, 3H), 8.08 (d br, 1H), 8.75 (s br, 1H).

ESI-MS(+) MeOH+0,1%HCOOH: [M+H]⁺ 285 m/z

Idrazone 2H

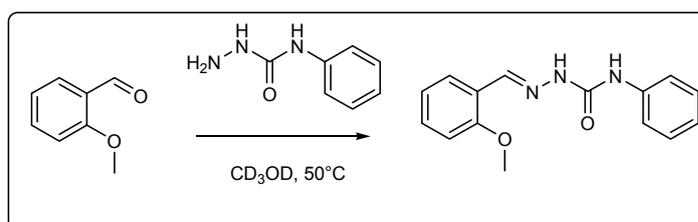


Schema 3.15

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 3.37 (s, 3H), 6.93-7.07 (m, 2H), 7.19-7.48 (m, 4H), 7.70 (d, *J* = 7.08 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H), 8.12 (d br, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.77 (s, 1H).

ESI-MS(+) MeOH+0,1%HCOOH: [M+H]⁺ 321 m/z

Idrazone 2I

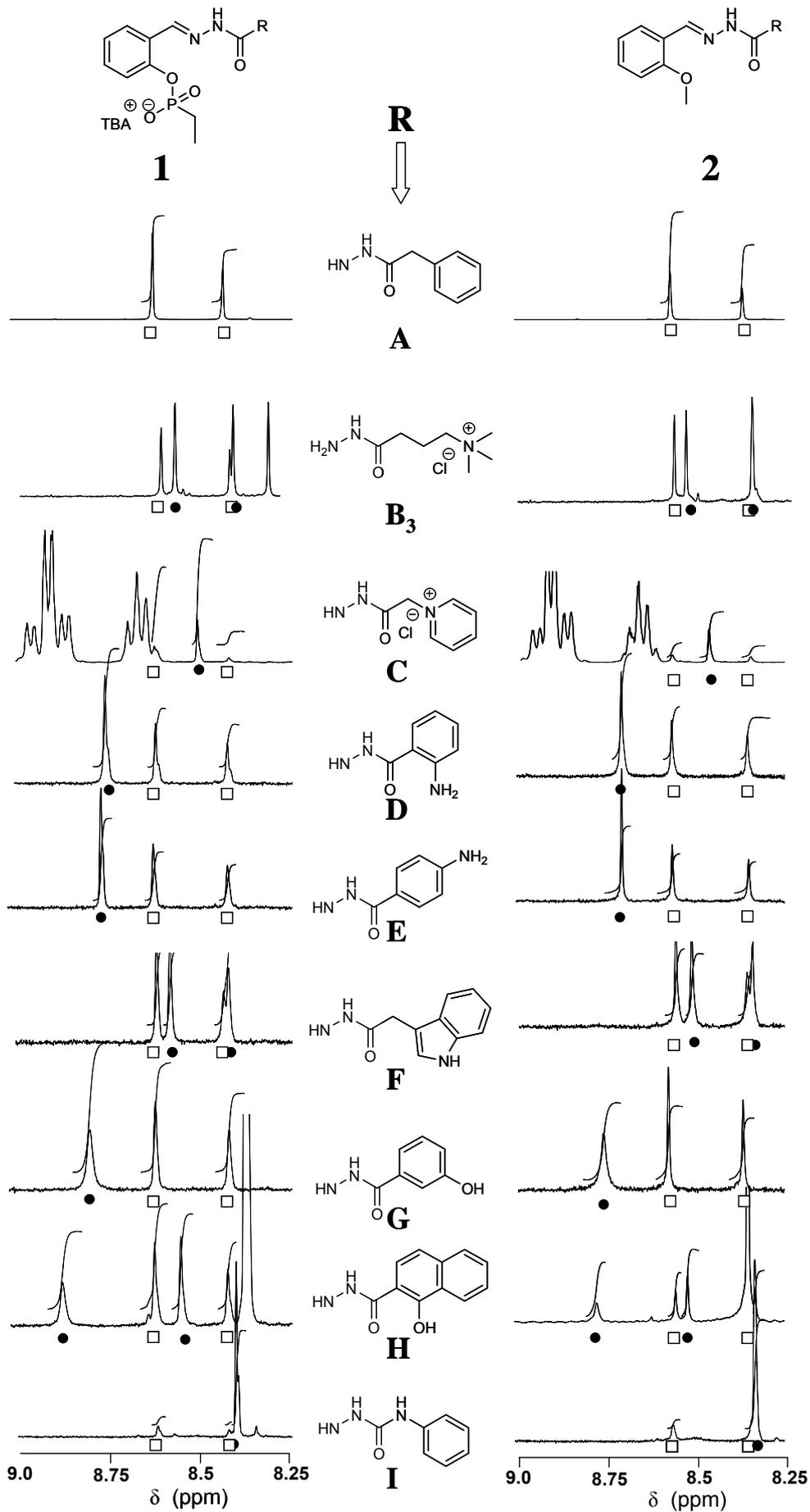


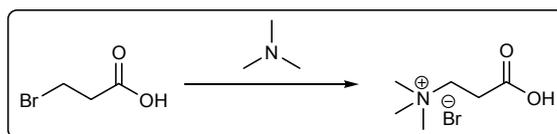
Schema 3.16

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 4.25 (s, 3H), 6.97-7.09 (m, 2H), 7.20-7.34 (m, 4H), 7.51-7.54 (m, 2H), 7.99 (dd, *J* = 7.67, 1.51 Hz, 1H), 8.33 (s, 1H).

ESI-MS(+) MeOH+0,1%HCOOH: [M+H]⁺ 270 m/z

Regione fingerprint



Sintesi dell'acido 3-(trimetilammino) propionico

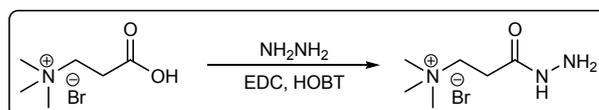
Schema 3.17

Ad una soluzione dell'acido 3 bromopropionico commerciale (2.04 g, 13.3 mmol) in etanolo (10 ml) è aggiunta una soluzione 4.2 M di trimetilammina in etanolo (28 ml, 120 mmol, 9 eq) e la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 3 giorni. L'eccesso di trimetilammina è rimosso flussando aria all'interno della soluzione, dopodichè il solvente è stato rimosso per evaporazione a pressione ridotta, ottenendo il prodotto desiderato sotto forma di solido bianco, purificato tramite ricristallizzazione caldo-freddo in etanolo (2.8 g, resa 74%).

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 3.66 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.17 (s, 9H), 2.79 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 174.45, 64.46, 53.78 (t, $J_{NC} = 3.4$ Hz), 30.84.

ESI-MS (+) MeOH: $[M]^+$ 132 m/z

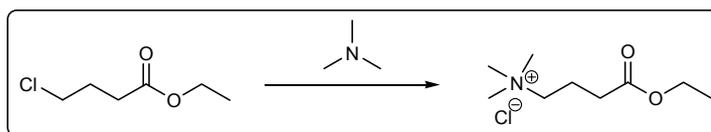
Sintesi di B₂

Schema 3.18

L'acido 3-(trimetilammino) propionico (180 mg, 0.85 mmol, 1 eq) è stato posto in acetonitrile anidro, raffreddato a 0°C. Sono stati aggiunti 2 eq di HOBT e lasciato in agitazione per 20 minuti, poi si sono aggiunti 2 eq di EDC. Lasciato in agitazione a temperatura ambiente per 20 minuti, poi raffreddato nuovamente a 0°C ed aggiunta una soluzione contenente 3 eq di idrazina in acetonitrile. Lasciato reagire a temperatura ambiente per 2 giorni. il solvente è stato rimosso per evaporazione a pressione ridotta ed il prodotto purificato per cromatografia.

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 3.87 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.14 (s, 9H), 2.28 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H).

ESI-MS (-) MeOH: $[M]^+$ 146 m/z

Sintesi di etil 4 (trimetilammino) butirrato

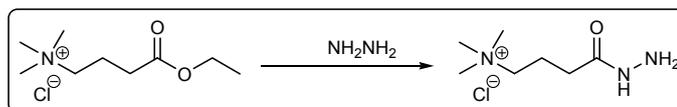
Schema 3.19

Una soluzione di trimetilammina in etanolo (4.2 N, 40 ml, 9 eq) è stata aggiunta ad una soluzione di etil 4 cloro butirrato (2.7 g, 18 mmol) in etanolo (18 ml). La miscela è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 3 giorni (controllo via TLC). L'aggiunta di etere etilico alla soluzione porta alla precipitazione del prodotto desiderato come solido bianco, recuperato mediante filtrazione e seccato sotto vuoto. Purificato mediante cristallizzazione caldo-freddo in etanolo (300 mg, resa totale sul purificato: 10%).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 4.16 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.42-3.36 (m, 2H), 3.17 (s, 9H), 2.47 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.11-2.06 (m, 2H), 1.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171.01, 64.14, 59.31, 51.02, 28.48, 16.80, 11.89.

ESI-MS (-) MeOH: $[\text{M}]^+$ 174 m/z

Sintesi di B₃

Schema 3.20

Etil 4 (trimetilammonio)butirrato (100 mg, 0.5 mmol) è stato sciolto in etanolo (1 ml) e alla soluzione risultante sono stati aggiunti 0.5 ml di idrazina monoidrata ($\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Lasciato in agitazione a 50°C per una notte. L'aggiunta di etere etilico ha comportato la precipitazione dell'idrazide **B₃** sotto forma di solido bianco, che è stato recuperato per filtrazione e seccato sotto vuoto. Purificato mediante cristallizzazione caldo-freddo in etanolo (90 mg, resa totale sul purificato: 92%).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.39-3.30 (m, 2H), 3.15 (s, 9H), 2.28 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.14-2.08 (m, 2H), 1.93 and 1.89 (s, 1H, due isomeri).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 173.08, 67.00 (t, $J_{\text{N-C}} = 2.8$ Hz), 53.70 (t, $J_{\text{N-C}} = 3.7$ Hz), 30.86, 20.07.

ESI-MS (-) MeOH: $[\text{M}]^+$ 160 m/z

3.8.4 Procedura generale per gli esperimenti di distribuzione

1D ^1H -NMR Screening a coppie

Sono state preparate le soluzioni madre delle piattaforme **1** e **2** in CD_3CN , al fine di evitare la formazione di semiacetali. Le soluzioni madre delle idrazidi **A-I** sono state preparate in CD_3OD (200÷500 mM).

Utilizzando siringhe di tipo Hamilton la quantità di idrazidi appropriata è stata trasferita in un tubo NMR con tappo a vite, aggiunto CD_3OD per diluire alla concentrazione desiderata ed infine è stata aggiunta la piattaforma (**1** oppure **2**).

Le soluzioni sono state mantenute a 50°C e monitorate attraverso spettroscopia NMR finché l'equilibrio termodinamico è stato raggiunto, evidenziato dall'assenza di modificazioni dello spettro nel tempo. L'integrazione dei segnali degli idrazoni ha permesso la loro quantificazione diretta.

2D ^1H - ^{13}C HSQC Screening simultaneo

Sono state preparate le soluzioni madre delle piattaforme **1** e **2** in CD_3CN , al fine di evitare la formazione di semiacetali. Le soluzioni madre delle idrazidi **A-I** sono state preparate in CD_3OD (200÷500 mM).

Utilizzando siringhe di tipo Hamilton la quantità appropriata di ciascuna idrazide è stata aggiunta in un tubo NMR con tappo a vite, aggiunto CD_3OD per diluire alla concentrazione desiderata (7.5 mM per ciascuna idrazide) ed infine è stata aggiunta la piattaforma (**1** oppure **2**, concentrazione 5 mM).

Le soluzioni sono state mantenute a 50°C fino al raggiungimento dell'equilibrio termodinamico e in seguito registrato lo spettro ^1H - ^{13}C HSQC alla stessa temperatura.

3.8.5 Procedura generale per gli esperimenti cinetici ^1H - ^{13}C HSQC

Sono state preparate le soluzioni madre delle idrazidi in esame (**A**, **B**, **C** e **G**) più concentrate possibili (0.7-0.8 M in CD_3OD), anche usando leggero riscaldamento per favorire la solubilizzazione. In questo modo la diluizione della soluzione in seguito ad ogni aggiunta è stata ridotta al massimo.

Il punto iniziale della cinetica è costituito da una soluzione in metanolo deuterato dell'idrazone **1A** in concentrazione 73.82 mM. In seguito all'aggiunta di 2 eq di idrazide **B** ed 1 eq di idrazide **A** la concentrazione totale di piattaforma **1** passa a 57.65 mM. Il tempo minimo necessario per registrare il primo spettro ^1H - ^{13}C HSQC dopo ogni aggiunta è circa 20 minuti, in modo tale da permettere l'ottimizzazione del *setup* del sistema (omogeneità, *wobbling*, impulsi, etc.) .

La concentrazione totale della piattaforma **1** dopo l'aggiunta dell'idrazide **G** è 50.47 mM, mentre quella finale del *network* completo, in seguito all'aggiunta di **C**, è 43.43 mM.

La descrizione dettagliata del metodo utilizzato per compiere questo tipo di analisi, comprendente le sequenze di impulsi, è pubblicata da Damien Jeannerat in *Journal Magnetic Resonance* (**2007**, 186, 112-122).

Adattabilità del sistema

La soluzione concentrata ($[1] = 43.43 \text{ mM}$) contenente il network completo dei 4 idrazoni in equilibrio termodinamico è stata diluita di circa 9 volte, in modo da ottenere una concentrazione finale dell'aldeide **1** in soluzione pari a 5.0 mM . È stata seguita l'evoluzione dell'equilibrio termodinamico via ^1H - ^{13}C HSQC con la procedura sopra citata.

3.8.6 Implementazione del modello per il fitting dei dati cinetici

Il modello termodinamico proposto è stato sviluppato utilizzando il programma MiroMath Scientist per Windows, nella versione 2.01. Il sistema ha richiesto la riscrittura dell'equilibrio proposto in modo tale che fosse compatibile con il programma., come presentato di seguito. Sapendo la concentrazione totale dell'aldeide **1** presente in soluzione e delle idrazidi aggiunte, tenendo conto delle diluizioni avvenute all'inizio di ciascuna sezione, la concentrazione di ciascun idrazone presente è stata calcolata direttamente dall'integrazione dei picchi nello spettro bidimensionale. Tramite bilanci di massa è stato possibile ricavare la concentrazione delle aldeidi libere.

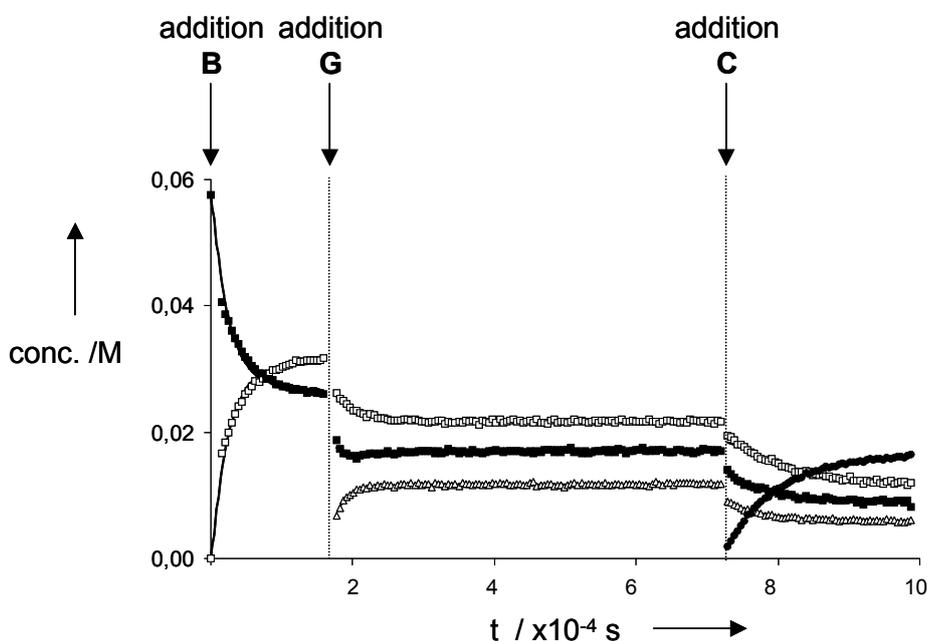


Figura 3.25

Le tre sezioni della cinetica sono state interpolate separatamente, fissando le costanti cinetiche ottenute per rendere possibile l'analisi della sezione successiva

Il modello matematico implementato è di seguito riportato:

// MicroMath Scientist Model File

// section 1

```
// 1A+B = 1B +A
// kAB; kBA
IndVars: T
DepVars: HA, HB, A, B
Params: kAB, kBA, HA0, HB0, A0, B0
HA'=-kAB*HA*B+kBA*HB*A
HB'=kAB*HA*B-kBA*HB*A
A'=-kBA*HB*A+kAB*HA*B
B'=kBA*HB*A-kAB*HA*B
//initial conditions
t=0
HA=HA0
HB=HB0
A=A0
B=B0
***
```

// MicroMath Scientist Model File

// section 2 (parameter kAB, kBA fixed)

```
// 1A + B = 1B + A
// kAB, kBA
// 1A + G = 1G + A
// kAG, kGA
// 1B + G = 1G +B
// kBG, kGB
IndVars: T
DepVars: HA, HB, HG, A, B, G, ATOT, BTOT, GTOT
Params: kAB, kBA, kAG, kGA, kBG, kGB, HA0, HB0, HG0, A0, B0, G0
HA'=-kAB*HA*B+kBA*HB*A-kAG*HA*G+kGA*HG*A
HB'=-kBA*HB*A+kAB*HA*B-kBG*HB*G+kGB*HG*B
HG'=-kGA*HG*A+kAG*HA*G-kGB*HG*B+kBG*HB*G
A'=kAB*HA*B-kBA*HB*A-kGA*HG*A+kAG*HA*G
B'=kBA*HB*A-kAB*HA*B-kGB*HG*B+kBG*HB*G
G'=kGA*HG*A-kAG*HA*G-kBG*HB*G+kGB*HG*B
ATOT=HA+A
BTOT=HB+B
GTOT=HG+G
//initial conditions
t=0
HA=HA0
HB=HB0
HG=HG0
A=A0
B=B0
G=G0
***
```

```

// MicroMath Scientist Model File
// section 3 (parameter kAB, kBA, kAC, kCA, kBC, kCB fixed)
// 1A + B = 1B + A
// kAB, kBA
// 1A + G = 1G + A
// kAG, kGA
// 1A + C = 1C + A
// kAC, kCA
// 1B + G = 1G + B
// kBG, kGB
// 1B + C = 1C + B
// kBC, kCB
// 1G + C = 1C + G
// kGC, kCG
IndVars: T
DepVars: HA, HB, HG, HC, A, B, G, C, ATOT, BTOT, GTOT, CTOT
Params: kAB, kBA, kAG, kGA, kAC, kCA, kBG, kGB, kBC, kCB, kGC, kCG, HA0, HB0, HG0,
HC0, A0, B0, G0, C0
HA'=-kAB*HA*B+kBA*HB*A-kAG*HA*G+kGA*HG*A-kAC*HA*C+kCA*HC*A
HB'=-kBA*HB*A+kAB*HA*B-kBG*HB*G+kGB*HG*B-kBC*HB*C+kCB*HC*B
HG'=-kGA*HG*A+kAG*HA*G-kGB*HG*B+kBG*HB*G-kGC*HG*C+kCG*HC*G
HC'=-kCA*HC*A+kAC*HA*C-kCB*HC*B+kBC*HB*C-kCG*HC*G+kGC*HG*C
A'=kAB*HA*B-kBA*HB*A-kGA*HG*A+kAG*HA*G+kAC*HA*C-kCA*HC*A
B'=kBA*HB*A-kAB*HA*B-kGB*HG*B+kBG*HB*G+kBC*HB*C-kCB*HC*B
G'=kGA*HG*A-kAG*HA*G-kBG*HB*G+kGB*HG*B+kGC*HG*C-kCG*HC*G
C'=kCA*HC*A-kAC*HA*C+kCB*HC*B-kBC*HB*C+kCG*HC*G-kGC*HG*C
ATOT=HA+A
BTOT=HB+B
GTOT=HG+G
CTOT=HC+C
//initial conditions
t=0
HA=HA0
HB=HB0
HG=HG0
HC=HC0
A=A0
B=B0
G=G0
C=C0
***

```

3.9 Riferimenti bibliografici

- ¹ a) J.-M. Lehn, *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, 36, 151.
b) P. T. Corbett, J. Leclaire, L. Vial, K. R. West, J.-L. Wietor, J. K. M. Sanders, S. Otto, *Chem. Rev.*, **2006**, 106, 3652..
- ² a) V. Patzke, G. von Kiedrowski, *Arkivoc*, **2007**, part v, 293.
b) N. Paul, G. F. Joyce, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2004**, 8, 634.
- ³ R. Epstein, J. A. Pojman, O. Steinbock, *Chaos*, **2006**, 16, 037101.
- ⁴ a) C. J. Kastrup, F. Shen, R. F. Ismagilov, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 46, 3660.
b) M. K. Runyon, B. L. Johnson-Kerner, R. F. Ismagilov, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 1531.
- ⁵ G. M. Whitesides, R. F. Ismagilov, *Science*, **1999**, 284, 89.
- ⁶ R. F. Ludlow, S. Otto, *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, 37, 101.
- ⁷ a) I. Stahl, G. von Kiedrowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 14014.
b) R. M. Bennes, D. Philp, *Org. Lett.*, **2006**, 8, 3651.
- ⁸ G. Gasparini, M. Martin, L. J. Prins, P. Scrimin, *Chem. Commun.*, **2007**, 1340.
- ⁹ Jeannerat, D. *J. Mag. Res.*, **2007**, 186, 112.
- ¹⁰ a) B. Levrand, Y. Ru., J.-M. Lehn and A. Herrmann, *Chem. Commun.*, **2006**, 2965.
b) Bagrov, F. V.; Vasil'eva, T. V.; *Russ. J. Org. Chem.*, **2002**, 38, 9, 1309.
c) G. Palla, G. Predieri, P. Damiano, C. Vignali and W. Turner, *Tetrahedron*, **1986**, 42, 3649.

CAPITOLO 4: correlazione tra amplificazione termodinamica e attività catalitica[§]

4.1 Introduzione

Il principio base della chimica covalente dinamica (DCC) è dato dal fatto che la composizione termodinamica di una libreria dinamica di molecole (costituita da diversi componenti tenuti insieme da legami noncovalenti o covalenti reversibili) cambia spontaneamente in relazione ad uno stimolo esterno.¹ In principio,² la DCC può essere applicata per la selezione di un catalizzatore semplicemente spostando l'equilibrio della libreria verso l'amplificazione di un recettore molecolare per l'analogo dello stato di transizione di una data reazione.³ La formazione di un complesso tra lo stato di transizione ed il recettore molecolare apre un cammino reattivo ad energia di attivazione minore, conducendo così ad un aumento della velocità della reazione. Questo concetto è stato sviluppato per primo da Linus Pauling⁴ per spiegare la catalisi enzimatica e applicato alla scoperta di catalizzatori attraverso l'utilizzo di anticorpi catalitici⁵ e polimeri catalitici.⁶ Nonostante il successo della DCC, sono tuttavia ancora pochi gli esempi di catalizzatori sviluppati utilizzando questa tecnica, e quelli trovati presentano inoltre modeste accelerazioni.³

Un catalizzatore ideale, in analogia con i sistemi enzimatici, dovrebbe essere in grado di legare il substrato di una reazione e, in seguito, convertirlo a prodotto.⁷ Di conseguenza, esso dovrebbe sia riconoscere il substrato che stabilizzare lo stato di transizione. Nei sistemi biologici questo avviene normalmente, in luoghi dell'enzima differenziati, a seconda dei diversi compiti che devono ricoprire.⁸ Si vengono ad avere, infatti, due funzioni distinte: l'unità di riconoscimento, che serve a legare il substrato, e l'unità catalitica, responsabile della diminuzione dell'energia di attivazione della reazione.

In questo capitolo è presentata l'autoselezione, tramite l'utilizzo della chimica covalente dinamica, di un gruppo funzionale in grado di stabilizzare lo stato di transizione di una reazione di idrolisi basica di un fenil estere. Una volta verificata la correlazione tra amplificazione termodinamica ed attività catalitica è presentata una serie di studi volti ad ottimizzare il sistema. Si tratta quindi della selezione dell'unità catalitica in un sistema artificiale, che può portare alla costruzione di un vero catalizzatore una volta individuata l'opportuna unità di riconoscimento del substrato.

[§] Parte dei dati presentati in questo capitolo sono stati pubblicati in G. Gasparini, L. J. Prins, P. Scrimin, *Angew. Chem Int. Ed.* **2008**, *47*, 2475-2479.

4.2 Amplificazione

Nel capitolo 2 sono stati presentati diversi metodi di *screening* che possono essere utilizzati per determinare la stabilità relativa degli idrazoni che si formano per reazione tra le aldeidi **1** o **2** con le idrazidi **A-I**. In particolare è stata sottolineata l'analogia che intercorre tra lo *screening* a coppie e quello simultaneo, nonostante alcune piccole variazioni dovute alle differenti condizioni sperimentali utilizzate.

In entrambi i metodi di *screening*, il valore di $K_{2,rif}$ rappresenta la stabilità intrinseca di ciascun idrazione **2X** nei confronti dell'idrazione di riferimento **2A**. Nel caso invece della costante $K_{1,target}$, essa contiene sia il contributo di stabilità intrinseca degli idrazoni che quello dovuto all'interazione intramolecolare tra il TSA legato all'aldeide **1** e il gruppo funzionale portato dall'idrazide.

Eseguito il rapporto tra le costanti termodinamiche ottenute con le due piattaforme ($K_{1,target}/K_{2,rif}$) è possibile separare i due contributi, ricavando i valori di amplificazione (Tab. 4.1), i quali dipendono unicamente dall'interazione intramolecolare.

idrazide	B	C	D	E	F	G	H	I
a coppie	1.8	1.3	1.1	1.0	1.0	1.1	1.1	1.3
simultaneo	1.7	1.3	0.8	0.8	1.0	0.6	0.7	1.1

Tabella 4.3: valori di amplificazione

Come si può vedere, esiste una buona correlazione tra i valori di amplificazione ottenuti con i due metodi di *screening* (Fig 4.1).

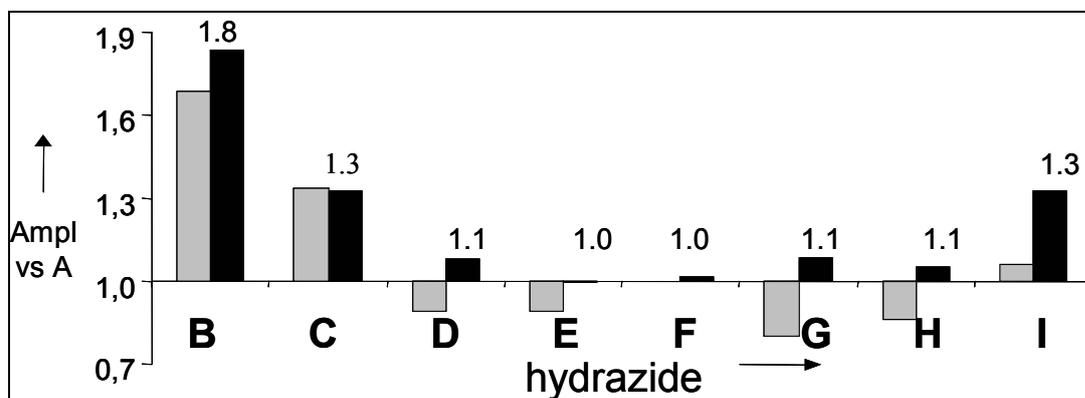


Figura 4.1: confronto tra i due metodi di screening.

Da questi dati appare chiaramente che 3 delle 8 idrazidi utilizzate nello *screening* vengono amplificate. In particolar modo sono amplificate le due idrazidi che portano il gruppo carico (**B** e **C**) e l'idrazide **I** (Fig. 4.2).

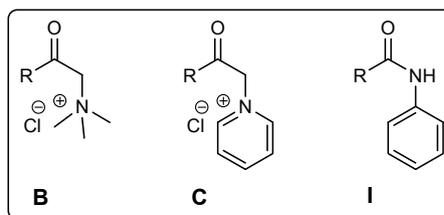


Figura 4.2: idrazidi maggiormente amplificate.

Questi risultati dimostrano chiaramente che gli idrazoni **1B**, **1C** e **1I** sono stabilizzati come conseguenza di un'interazione intramolecolare tra il fosfonato e il gruppo funzionale presente nell'idrazide.

Era facilmente prevedibile che le idrazidi **B** e **C** potessero venire amplificate (1.8 ed 1.3, rispettivamente), a causa della presenza della carica positiva. E' importante sottolineare che esse non presentano la stessa amplificazione, per cui i sostituenti attorno alla carica positiva giocano un ruolo non marginale nel determinare l'entità dell'interazione elettrostatica che si può venire a creare. Infatti, l'idrazide **B** presenta la carica positiva localizzata sull'azoto del gruppo ammonio, mentre nel caso dell'idrazide **C** essa si trova all'interno di un anello aromatico, per cui è delocalizzata sullo stesso: questo fatto probabilmente la rende meno disponibile ad interagire con il TSA.

Tra le idrazidi in cui è possibile invece la formazione di legami ad idrogeno con il fosfonato, unicamente l'idrazide **I** è amplificata (fattore 1.3). Probabilmente ciò è dovuto al posizionamento del gruppo che può fungere da donatore di legami ad idrogeno. Infatti in tutte le altre idrazidi il gruppo donatore (-NH- oppure -OH) è posto su un anello aromatico, relativamente distante dal gruppo funzionale che si lega alla piattaforma. Nell'idrazide **I**, invece, il gruppo donatore è direttamente legato al carbonio carbonilico che porta l'idrazide, riuscendo così a trovarsi in una posizione migliore per avere interazione.

Per avere certezza che l'amplificazione ottenuta non fosse un artefatto, gli esperimenti sono stati ripetuti aggiungendo 1 eq di dimetilfosfato. L'assenza di qualsiasi cambiamento apprezzabile rispetto al profilo di amplificazione ottenuto precedentemente permette di attribuire quest'ultimo unicamente all'interazione intramolecolare.

4.3 Esteri

Il posizionamento dei gruppi funzionali selezionati dagli esperimenti di amplificazione vicino a un substrato estereo dovrebbero condurre ad un aumento della velocità di idrolisi in seguito alla stabilizzazione dello stato di transizione. Inoltre, l'entità di questo effetto catalitico dovrebbe essere correlata al grado di amplificazione osservata. Avendo ottenuto per le tre idrazidi **B**, **C** ed **I** valori di amplificazione pari a 1.8, 1.3 ed 1.3, rispettivamente, rispetto all'idrazide di riferimento **A**, si dovrebbe avere massima accelerazione per l'estere contenente il gruppo funzionale ammonio, mentre gli altri due dovrebbero essere circa della

stessa entità, comunque inferiori a **B**. Per stabilire questo tipo di correlazione, sono state studiate le idrazidi **B** ed **I** in dettaglio, in quanto esse non solo esprimono diversa forza nell'interazione con l'analogo dello stato di transizione, ma rappresentano anche due diversi tipi di interazione con esso. Sono stati quindi sintetizzati gli esteri **3A** (usato come riferimento), **3B** e **3I**; in cui i gruppi funzionali caratteristici delle idrazidi **A**, **B** ed **I** sono posizionati in stretta vicinanza all'estere carbossilico (Fig. 4.3).

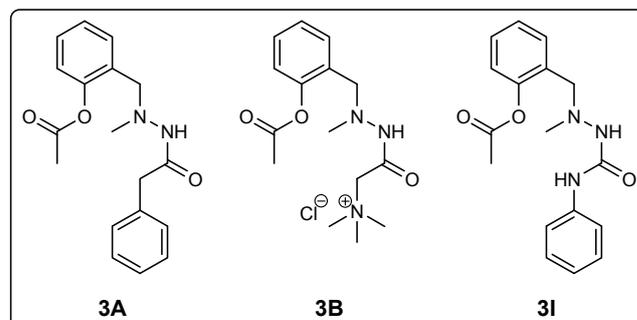
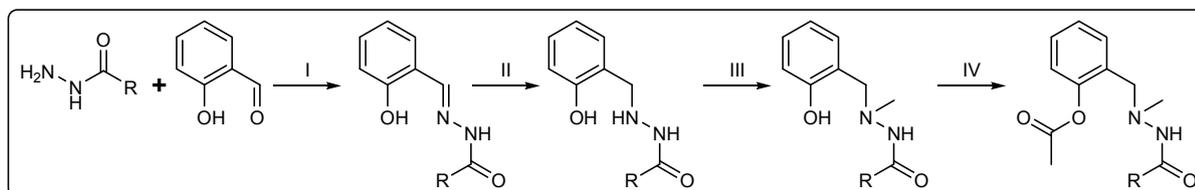


Figura 4.3: esteri sintetizzati con i gruppi funzionali selezionati.

Confrontando **3A**, **3B** e **3I** con gli idrazoni da cui essi derivano si possono notare due modifiche strutturali. Infatti in questi composti il doppio legame caratteristico dell'idrazone C=N è stato ridotto in modo da rendere la struttura stabile alle condizioni basiche richieste per le prove di idrolisi. Questo tipo di modifica è molto comune nella chimica combinatoria dinamica basata sulle immine⁹. La seconda modifica strutturale riguarda l'ammina secondaria risultante da questa riduzione. Infatti essa è stata metilata in modo da evitare l'attacco intramolecolare sul vicino gruppo estereo, favorita ulteriormente di un intermedio ciclico a sei membri.

4.3.1 Sintesi degli esteri

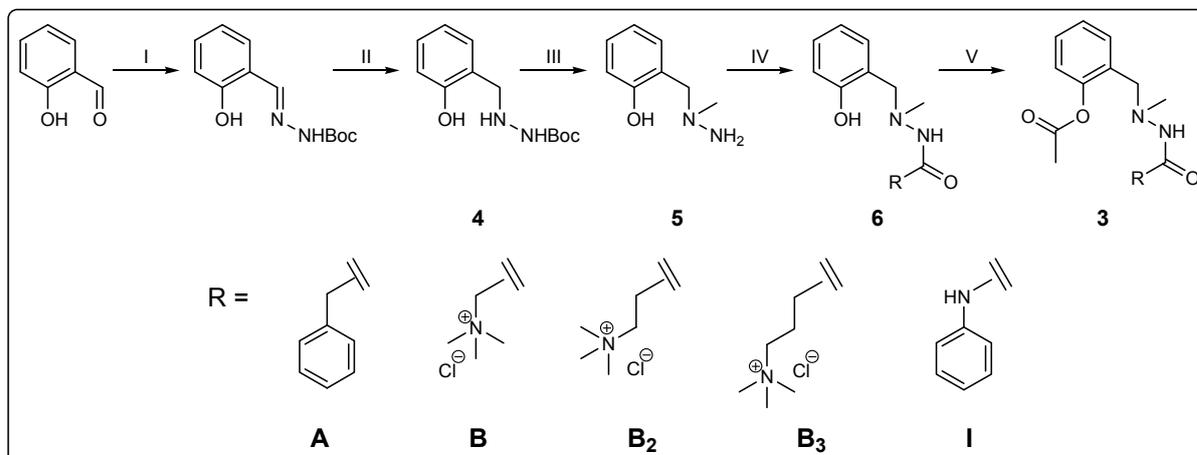
La sintesi degli esteri può essere eseguita in due modi. In un caso (Schema 4.1) si può utilizzare la salicilaldeide e formare l'idrazone con l'idrazide di interesse. Il doppio legame C=N risultante viene poi ridotto mediante idrogenazione catalitica. Il prodotto che si ottiene viene poi metilato all'azoto secondario appena formato ed infine viene acetilato.



Schema 4.1: (I) CH₃OH, 50°C; (II) P_{idrogeno} = 8 bar, 20% Pd/C, EtOAc; (III) CH₃I, 60°C, CH₃CN; (IV) An.acetica, K₂CO₃, CH₃CN.

Il passaggio chiave di questa via sintetica consiste nella metilazione all'azoto. Esso presenta numerose difficoltà sia in termini di resa che di purificazione. Infatti il gruppo metilico si può legare non solo all'azoto in questione, ma anche all'ossigeno del fenolo, generando due sottoprodotti. Per questo motivo si è scelta una via sintetica in cui la metilazione avviene su un intermedio comune (Schema 4.2), in modo tale da riuscire a mettere a punto una sola

reazione. Inoltre, l'inserzione successiva dei gruppi funzionali tipici dell'idrazide rende la purificazione del prodotto di metilazione molto più facile da realizzare.



Schema 4.2: (I) $\text{NH}_2\text{NH-Boc}$, CH_3OH , 50°C ; (II) $\text{P}_{\text{idrogeno}} = 8 \text{ bar}$, $20\% \text{ Pd/C}$, EtOAc ; (III) CH_3I , 60°C , CH_3CN ; (IV) 1. HCl , CH_3OH , 2. EDC , HOBT , RCOOH , CH_3CN ; (V) An. acetica , K_2CO_3 , CH_3CN .

4.3.2 Spettri UV/Vis

I fenil esteri sintetizzati sono stati sottoposti a misure di assorbimento UV/Vis. Infatti, dal momento che si è scelta questa tecnica per seguire la cinetica di idrolisi, è fondamentale conoscere la lunghezza d'onda ottimale alla quale misurare la variazione di assorbanza. Sono stati quindi registrati gli spettri di assorbimento UV/Vis sia dei prodotti acetilati, sia dei prodotti aventi l'ossidrilico libero, in modo da valutare dove si ha la maggiore differenza di assorbimento.

Di seguito, in figura 4.4, sono riportati gli spettri di assorbimento delle specie contenenti il gruppo funzionale dell'idrazide di riferimento, i composti **6A** (fenolo libero, linea continua) e **3A** (fenolo acetilato, linea tratteggiata).

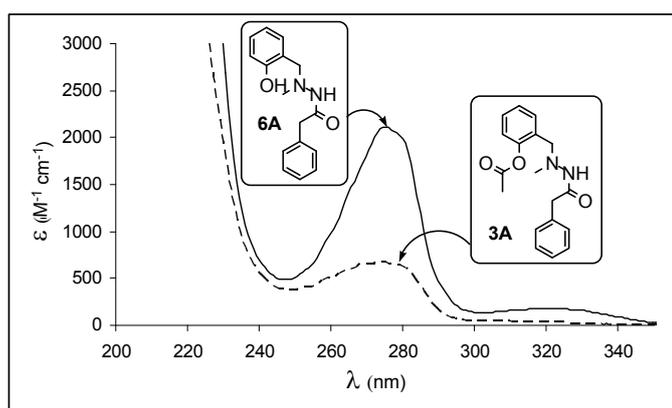


Figura 4.4: assorbimento UV di **3A** e **6A**.

Come si può osservare, 280 nm rappresenta la lunghezza d'onda ottimale alla quale seguire la cinetica. Infatti la differenza del coefficiente di estinzione molare tra le due specie è sufficientemente grande, inoltre si trova in un massimo locale, che minimizza gli errori strumentali.

Sono stati misurati gli spettri di assorbimento anche per le altre due coppie di composti (**6B** e **3B**, **6I** e **3I**), verificando che anche in questi casi si ha un comportamento analogo.

4.4 Metanolisi

L'effetto della presenza del gruppo ammonio in **3B** e di quello ureidico in **3I** sulla velocità di rottura del legame estereo è stata dapprima studiata misurando le cinetiche di metanolisi dei composti **3A**, **3B** e **3I**. Questa scelta è giustificata dal fatto che le condizioni sperimentali sono le più simili possibile a quelle utilizzate per le misure di amplificazione.

A delle cuvette contenenti ciascuna le soluzioni di **3A**, **3B** o **3I** in metanolo, in concentrazione 0.6 mM, sono stati aggiunti 12 eq di sodio metossido, preparato di fresco sciogliendo la quantità opportuna di sodio metallico in metanolo. E' stato utilizzato un eccesso di nucleofilo in modo da permettere l'instaurarsi di condizioni per una cinetica di pseudo primo ordine.

La cinetica di transesterificazione è stata seguita registrando nel tempo l'aumento di assorbanza a 280 nm, a causa della formazione del fenolo libero (Fig. 4.5). E' stata inoltre verificata l'avvenuta metanolisi utilizzando cromatografia HPLC e spettrometria ESI-MS, le quali hanno confermato la completa scomparsa dell'estere e l'esclusiva formazione del fenolo.

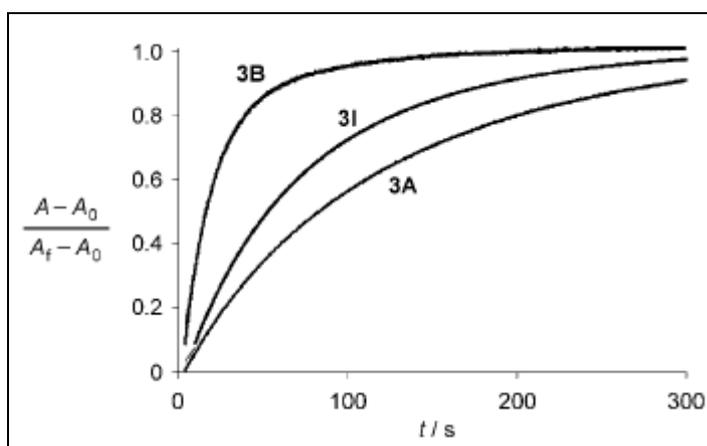


Figura 4.5: cinetiche di metanolisi di **3A**, **3B** e **3I**.

Le curve risultanti sono state elaborate utilizzando un esponenziale di primo ordine, in modo da ottenere le costanti di pseudo primo ordine riportate in Tabella 4.2.

	3A	3B (k_{3B}/k_{3A})	3I (k_{3I}/k_{3A})
k (s^{-1})	0.82×10^{-2}	3.96×10^{-2}	1.28×10^{-2}
k_{3X}/k_{3A}	1	4.8	1.6

Tabella 4.2: [3] = 0.6 mM, [NaOMe] = 7.2 mM, MeOH, 20 °C, λ = 280 nm.

Come si può osservare, i valori delle costanti sono perfettamente in linea con quanto previsto dagli esperimenti di amplificazione della libreria, sia in termine di ordine di reattività ($k_{\text{obs},3\text{B}} > k_{\text{obs},3\text{I}} > k_{\text{obs},3\text{A}}$) che di relativa accelerazione (4.8 : 1.6 : 1 per **3B**, **3I**, e **3A**, rispettivamente).

4.4.1 Controlli

Sono stati eseguiti esperimenti di controllo al fine di confermare che l'aumento della velocità di idrolisi dell'estere fosse dovuta all'effetto di stabilizzazione intramolecolare da parte del gruppo vicinale. Per questo motivo le cinetiche sono state ripetute aggiungendo a tutte le soluzioni 1 eq di tetrametilammonio cloruro, verificando che la presenza del sale non avesse alcun effetto sulla velocità di metanolisi. Questo esperimento permette di escludere la possibilità che la differente velocità sia dovuta semplicemente ad un cambiamento della forza ionica della soluzione. Infatti non basta che lo ione ammonio sia presente in soluzione, ma esso deve trovarsi in prossimità dell'estere carbossilico in modo da indurre effetto catalitico.

E' stata inoltre misurata la velocità di metanolisi del composto **3B** a differenti concentrazioni, comprese tra 1.0 mM e 0.1 mM, essendo quest'ultime, rispettivamente, i limiti massimo e minimo di assorbanza che possono essere misurati via UV/Vis. La concentrazione di sodio metossido è stata invece mantenuta costante a 7.2 mM.

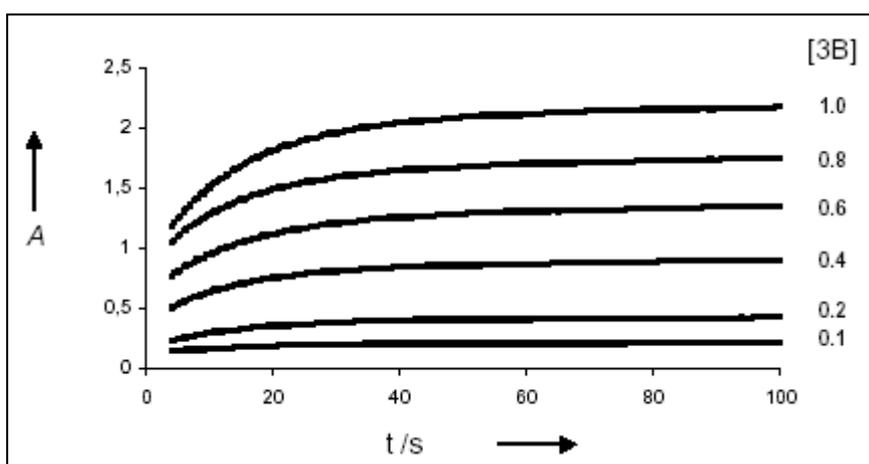


Figura 4.6: cinetiche di metanolisi a varie [3B].

E' stato possibile interpolare le curve riportate in figura 4.6 utilizzando un esponenziale di primo ordine come ci si aspetta in caso di catalisi intramolecolare. In caso di catalisi intermolecolare vi deve essere la partecipazione di una seconda molecola di substrato; in questo caso la cinetica avrebbe seguito una legge del secondo ordine.

Come si può vedere dal grafico riportato in figura 4.7, le k_{obs} ottenute variando la concentrazione di substrato presentano valori estremamente simili tra loro, fatto che è in ottimo accordo con l'ipotesi di catalisi intramolecolare.

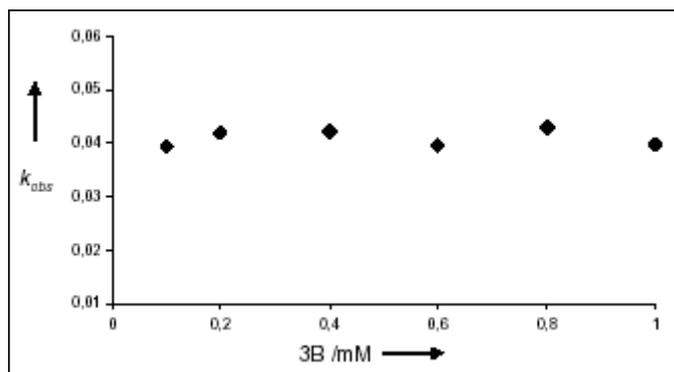


Figura 4.7: dipendenza delle costanti cinetiche dalla [3B].

4.5 Idrolisi

Le misure di velocità di rottura del legame estereo nei composti **3A**, **3B** e **3I** sono state estese anche a miscele di acqua/acetonitrile. In questo modo è stato possibile verificare ancora una volta se la maggiore reattività dei composti **3B** e **3I** fosse dovuta ad una stabilizzazione intramolecolare. Infatti usando miscele di acqua/acetonitrile è molto facile diminuire la polarità del mezzo (aumentando semplicemente la quantità di solvente

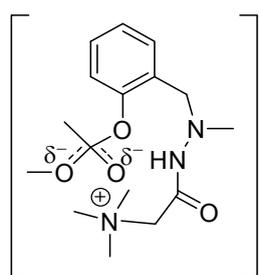


Figura 4.8: stabilizzazione dello stato di transizione.

organico), che dovrebbe portare, e come risposta del sistema, ad un aumento relativo della velocità. Infatti, un solvente meno polare ha una capacità solvatante dello stato di transizione minore, per cui le interazioni intramolecolari dovrebbero essere favorite (Fig. 4.8), aumentando perciò la differenza di velocità di idrolisi tra le specie che possono avere o meno queste interazioni.

Sono state preparate delle soluzioni di ciascun composto **3A**, **3B** o **3I** in acqua/acetonitrile 1:1 ed 1:9, in concentrazione 0,6 mM. Le soluzioni sono state mantenute a pH = 11 utilizzando il tampone CAPS in concentrazione 60 mM. La cinetica di idrolisi di ciascun composto è stata seguita registrando nel tempo l'aumento di assorbanza a 280 nm (Fig. 4.9). E' stata inoltre verificata l'avvenuta idrolisi utilizzando cromatografia HPLC e spettrometria ESI-MS.

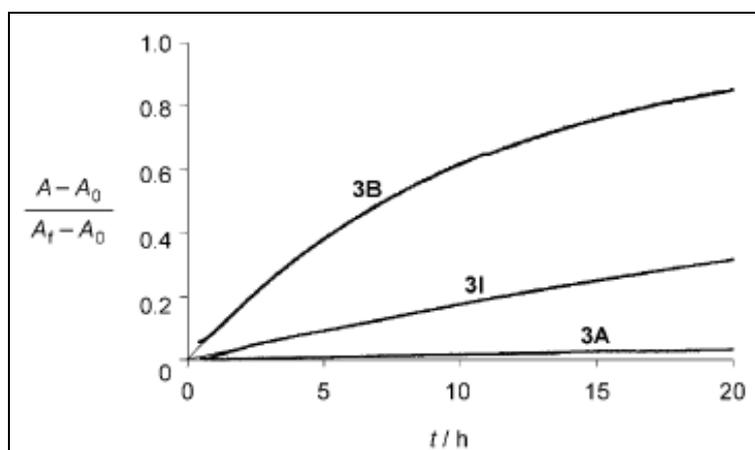


Figura 4.9: cinetiche di idrolisi a pH = 11 di **3A**, **3B** e **3I**.

Le curve risultanti sono state elaborate utilizzando un esponenziale di primo ordine, in modo da ottenere le costanti di pseudo primo ordine riportate in Tabella 4.3.

		3A	3B (k_{3B}/k_{3A})	3I (k_{3I}/k_{3A})
H₂O:CH₃CN 50 : 50	k (s ⁻¹)	0.82 x 10 ⁻²	3.96 x 10 ⁻²	1.28 x 10 ⁻²
	k_{3X}/k_{3A}	1	4.8	1.6
H₂O:CH₃CN 10 : 90	k (s ⁻¹)	4.41 x 10 ⁻⁷	2.64 x 10 ⁻⁵	5.23 x 10 ⁻⁶
	k_{3X}/k_{3A}		59.9	11.8

Tabella 4.3: [3] = 0.6 mM, [CAPS] = 60 mM, H₂O:CH₃CN = 50:50, 45 °C, λ = 280 nm.

In termini assoluti, le velocità di idrolisi sono circa tre ordini di grandezza inferiori a quelle di metanolisi, ma questo fatto può essere facilmente spiegato considerando la maggiore reattività come nucleofilo dello ione metossido rispetto all'ossidrile.

L'ordine di reattività ottenuto per la soluzione 1 : 1 dei composti **3A**, **3B** e **3I** è in linea con il trend osservato per la reazione di metanolisi. Anche in questo caso, infatti, i due composti **3B** e **3I** vengono idrolizzati più facilmente rispetto a **3A**, rispettivamente 16 e 1.3 volte più velocemente, anche se il valore ottenuto per **3B** è leggermente superiore a quanto atteso (tabella 4.3, prima riga).

Diminuendo la polarità del mezzo, utilizzando infatti una soluzione acqua/acetonitrile 1:9, si ottiene un notevole aumento della velocità di idrolisi dei composti **3B** e **3I** relativamente al composto di riferimento **3A**: in questo caso **3B** e **3I** sono idrolizzati, rispettivamente, 60 e 12 volte più velocemente (Tabella 4.3, seconda riga). Questi risultati sono in ottimo accordo con l'ipotesi che attribuisce la maggiore reattività dei composti **3B** e **3I** alla stabilizzazione intramolecolare dello stato di transizione.

Il fatto che il gruppo ammonio sia l'unità catalitica migliore indica chiaramente che le interazioni elettrostatiche hanno prevalenza rispetto alle interazioni per legame ad idrogeno nella stabilizzazione dello stato di transizione in quanto in quest'ultimo vi è un considerevole sviluppo di carica negativa. I valori di accelerazione trovati sono simili a quelli che si hanno utilizzando polimeri catalitici in sistemi analoghi, dove analogamente a questo sistema si sfrutta unicamente la stabilizzazione dello stato di transizione per avere catalisi.¹⁰

4.5.1 Controlli

Una maggiore velocità di idrolisi del fenil acetato **3B** rispetto a **3A** può essere anche spiegata, in principio, considerando la possibilità di un aumento della concentrazione locale degli ioni ossidrile, dovuti alla presenza della carica positiva del gruppo ammonio. In questo caso non si avrebbe la stabilizzazione dello stato di transizione della reazione, ma più semplicemente essa avverrebbe con più facilità (quindi, con maggiore velocità) in quanto

l'effetto sarebbe equivalente ad un aumento della concentrazione totale degli ioni OH^- in soluzione. La velocità di idrolisi di **3B** sarebbe così indipendente dal pH della soluzione in quanto il processo diverrebbe pseudo-intramolecolare, ottenendo una linea orizzontale nel grafico $\log(k_{\text{obs}})$ contro pH, mentre quella di **3A** dovrebbe esserne linearmente dipendente.

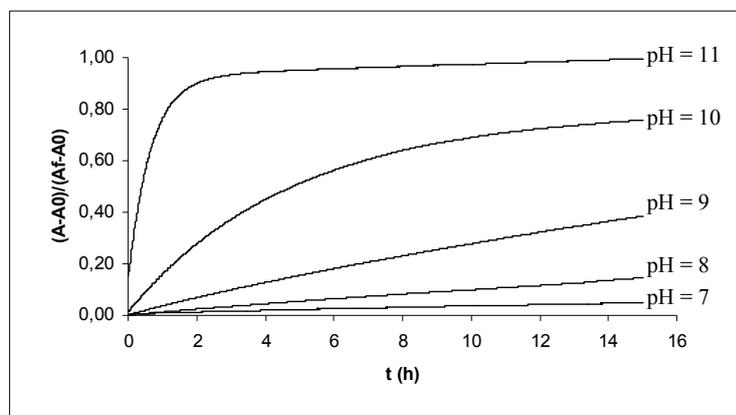


Figura 4.10: cinetiche di idrolisi di **3B** a vari pH.

Sono state eseguite le cinetiche di idrolisi dei composti **3A** e **3B** a pH compresi tra 7 ed 11, utilizzando delle soluzioni acqua/acetonitrile 1 : 1. Le curve ottenute (Fig. 4.10 per **3B**) sono state interpolate in modo da ottenere le costanti cinetiche di pseudo primo ordine, i cui valori sono riportati nella tabella 4.4.

	pH = 11 [CAPS] = 60 mM	pH = 10 [CAPS] = 60 mM	pH = 9 [CHES] = 60 mM	pH = 8 [EPPS] = 60 mM	pH = 7 [HEPES] = 60 mM
3A	$2.00 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	$2,99 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$	$1.11 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$	$7.89 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$	$4.84 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$
3B	$3.60 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$3.02 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	$1.01 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	$4.00 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$	$1.13 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$

Tabella 4.4: $[3] = 0.6 \text{ mM}$, $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN} = 50:50$, 45°C , $\lambda = 280 \text{ nm}$.

I valori di k_{obs} ottenuti sono stati posti in grafico contro i valori di pH ad essi relativi, ottenendo l'andamento in figura 4.11.

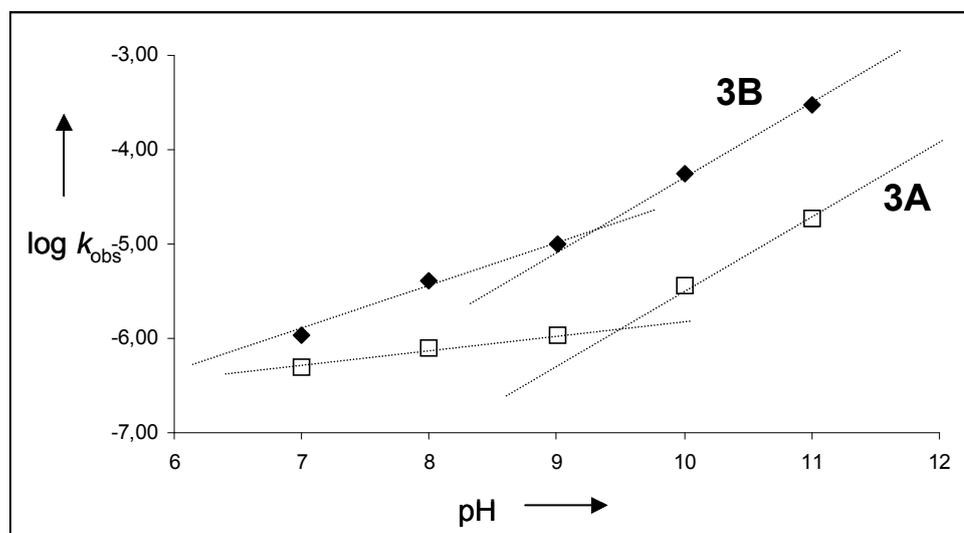


Figura 4.11: andamento delle costanti cinetiche in funzione del pH.

Come si può vedere, a pH compresi tra 9 ed 11 il logaritmo decimale della costante di velocità di entrambi i fenil acetati **3A** e **3B** ($\log k_{3A}$ e $\log k_{3B}$, rispettivamente) dipende linearmente dal pH con la stessa pendenza. Questo fatto permette di affermare che non si ha un aumento locale della concentrazione degli ioni OH^- nel caso dell'idrolisi di **3B**, per cui si può affermare con una certa confidenza che la sua maggiore reattività è dovuta alla stabilizzazione dello stato di transizione.

A pH al di sotto di 9, invece, la differenza della velocità di idrolisi tra **3A** e **3B** tende a svanire, in quanto si ha una netta variazione della pendenza della curva $\log k_{3A}$ contro pH. Questo comportamento è molto probabilmente dovuto alla protonazione dell'ammina terziaria presente nei fenil esteri, provocando la comparsa di una carica positiva localizzata in prossimità del gruppo estereo. Di conseguenza, a pH via via più acidi l'effetto stabilizzante sullo stato di transizione dato dalla presenza del gruppo ammonio presente in **3B** è soppresso da quello dell'ammina terziaria protonata, ottenendo delle velocità di idrolisi simili per i due composti.

4.6 Effetto della distanza tra TSA e gruppo funzionale

Un ruolo fondamentale nella formazione di complessi intramolecolari è ricoperto dalla geometria del complesso stesso. Non è infatti sufficiente che due gruppi in grado di avere interazioni stabilizzanti siano presenti nella stessa molecola, ma essi devono essere in grado di trovarsi in stretta vicinanza. Sono stati quindi eseguiti degli studi mirati a comprendere il ruolo ricoperto dalla distanza tra il TSA ed il gruppo funzionale.

Studi in letteratura hanno dimostrato come la formazione di specie tramite riconoscimento intramolecolare dipenda fortemente dal numero di legami tra i due gruppi che devono interagire.¹¹ In particolare modo questi legami sono trattati come dei rotori liberi di ruotare ed orientarsi entro certi gradi di libertà; di conseguenza, maggiore è il numero di rotori, maggiore è la flessibilità del sistema. Definendo *molarità effettiva* come il rapporto tra la costante cinetica di primo ordine tra due gruppi funzionali che reagiscono all'interno della stessa molecola e la costante cinetica di secondo ordine tra gli stessi due gruppi localizzati su molecole diverse, è possibile tracciare un grafico dell'influenza del numero di legami sull'entità del riconoscimento intramolecolare (Fig. 4.12).¹²

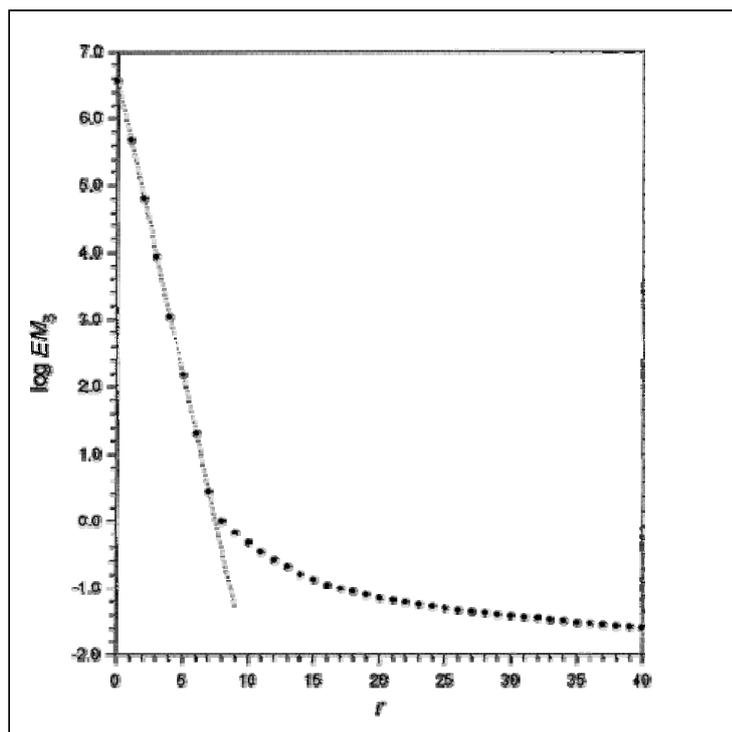


Figura 4.12: andamento della molarità effettiva in funzione del numero di rotori.

Come si può vedere, quando il numero di rotori è sufficientemente basso, la molarità effettiva è elevata, segno che l'interazione intramolecolare è forte. Aumentando il numero di legami, invece, essa viene progressivamente a diminuire. In particolar modo si può notare che, fino ad un certo numero di legami, la diminuzione della molarità effettiva è lineare con l'incremento dei rotori; oltre ad un certo numero di quest'ultimi, però, la lunghezza della catena ha un effetto marginale.

Per verificare la formazione di un complesso intramolecolare nel sistema in esame, si è quindi deciso di eseguire degli studi variando il numero di rotori tra l'analogo dello stato di transizione ed il gruppo funzionale portato dall'idrazide: nel caso infatti della formazione di un complesso intramolecolare si dovrebbero ottenere amplificazioni differenti a seconda dello *spacer* utilizzato.

4.6.1 Variazione dell'idrazide B

E' stato dimostrato dalle misure di amplificazione e dagli esperimenti catalitici che l'idrazide **B**, tra tutte quelle esaminate, dà i risultati migliori. Essa quindi è la migliore candidata per verificare se vi sia una diminuzione dell'amplificazione dell'idrazone **1B** in funzione dell'aumento della lunghezza dello *spacer* tra il carbonile ed il gruppo ammonio. Infatti aggiungendo dei metileni non solo aumenta la distanza tra questi due gruppi funzionali, ma viene anche ad aumentare la flessibilità del sistema. La formazione del complesso intramolecolare, in accordo con i dati presentati nel paragrafo precedente, è quindi sfavorita in quanto la carica positiva sul gruppo ammonio deve vincere un maggiore contributo

entropico per stabilire un'interazione elettrostatica con la carica negativa presente sul fosfonato.¹³

Sono state perciò sintetizzate e studiate le idrazidi **B₂** e **B₃** (Fig. 4.13).

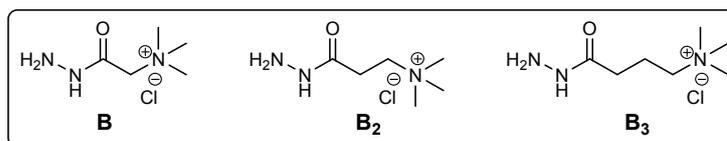


Figura 4.13: variazione dello spacer sull'idrazide **B**.

Come già anticipato nel capitolo 2, non è stato possibile ottenere dei valori certi di amplificazione dagli esperimenti utilizzando l'idrazide **B₂**, in quanto essa presenta un'elevata instabilità, dovuta alla sua decomposizione attraverso l'eliminazione di trimetilammina.

Sono stati condotti gli studi di amplificazione utilizzando l'idrazide **B₃** confrontata con l'idrazide di riferimento **A**. Come nei casi precedenti, le due idrazidi (in concentrazione 25 mM ciascuna, 5 eq) sono state aggiunte ad una soluzione contenente l'aldeide **1** o **2** (5 mM) in metanolo deuterato. Il valore dell'amplificazione è stato determinato integrando direttamente il segnale del protone imminico CH=N di ciascun idrazone.

Il fattore di amplificazione ottenuto per questa idrazide, relativamente a quella di riferimento **A**, assume il valore di 1.5, che è leggermente inferiore a quello dato dall'idrazide **B** nelle stesse condizioni (1.8). Questo è in accordo con la formazione di un complesso intramolecolare nell'idrazone **1B**. La diminuzione dell'amplificazione osservata è spiegabile, come anticipato, dall'aumento della flessibilità dell'idrazide, mentre non dovrebbe avere presentato alcun cambiamento in caso essa fosse stata causata dalla formazione di interazioni intermolecolari.

Sono stati sintetizzati in ogni caso i fenil esteri **3B₂** e **3B₃** (Fig. 4.14), seguendo la procedura descritta in precedenza nel paragrafo 3.3.1, per avere conferma che lo stesso comportamento venga mantenuto anche negli esteri. Si è scelto di sintetizzare ugualmente l'estere contenente il gruppo funzionale dell'idrazide **B₂** anche non disponendo dei relativi fattori di amplificazione nei confronti di **A** in quanto esso può fornire, dalle misure cinetiche, delle preziose indicazioni relative alla geometria ottimale del complesso intramolecolare.

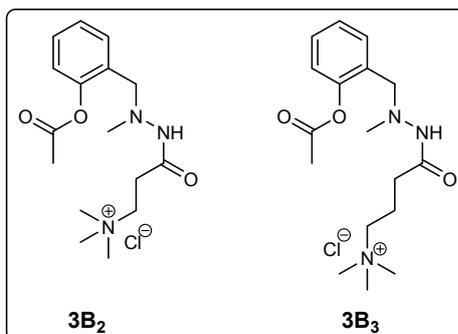


Figura 4.14: fenil esteri **3B₂** e **3B₃**.

Entrambi i prodotti sono stati sottoposti a misure cinetiche di metanolisi, utilizzando le stesse condizioni applicate per i prodotti **3A**, **3B** e **3I**. Sfortunatamente però la presenza di una base forte come il sodio metossido induce decomposizione rapida di **3B₂**, prima che possa essere apprezzata la formazione del prodotto di transesterificazione. Controlli mediante spettrometria ESI-MS hanno infatti confermato la presenza di una specie chimica frutto dell'eliminazione della trimetilammina (Fig. 4.15).

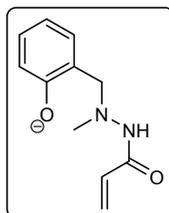


Figura 4.15: decomposizione di **3B₂**.

Il fenil estere **3B₃** ha invece presentato un'ottima stabilità nelle condizioni sperimentali utilizzate ed è stato perciò possibile registrare la sua cinetica di transesterificazione seguendo l'aumento di assorbanza a 280 nm mediante spettrometria UV/Vis (Fig. 4.16).

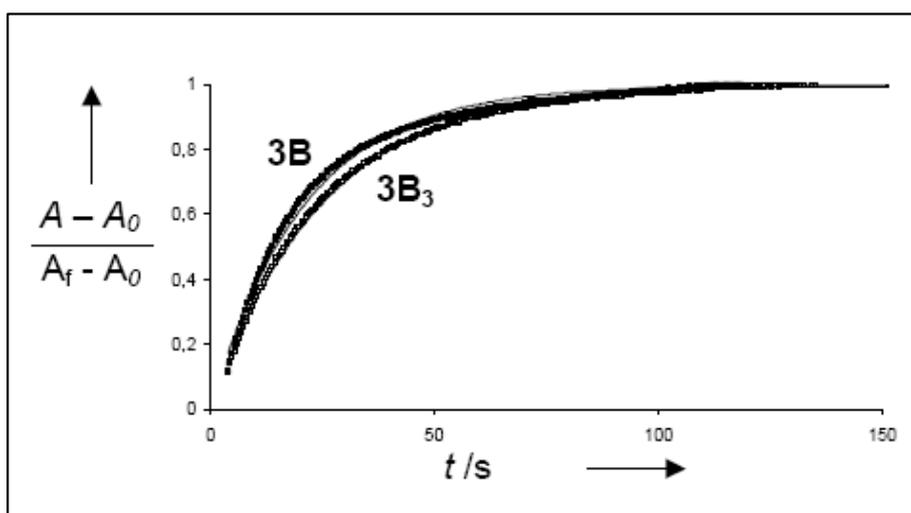


Figura 4.16: cinetiche di metanolisi di **3B** e **3B₃**.

Interpolando i dati sperimentali è stato possibile ricavare la costante cinetica di pseudo primo ordine per questa reazione (Tab. 4.5).

	3A	3B (k_{3B}/k_{3A})	3B₃ (k_{3B3}/k_{3A})
k (s ⁻¹)	0.82×10^{-2}	3.96×10^{-2}	3.33×10^{-2}
k_{3X}/k_{3A}	1	4.8	4.1

Tabella 4.5: [3] = 0.6 mM, [NaOMe] = 7.2 mM, MeOH, 20 °C, λ = 280 nm.

Il valore della velocità di metanolisi di **3B₃** è in linea con quanto preventivato. Questo estere infatti viene deacetilato 4.1 volte più velocemente rispetto al riferimento **3A**, ma comunque in misura minore rispetto a **3B**. Questo risultato è prevedibile dalle misure di amplificazione in

quanto l'idrazide $3B_3$ presenta un fattore di amplificazione pari a 1.5, mentre quello ottenuto per **B** vale 1.8. Ancora una volta, quindi, è stata dimostrata la correlazione tra amplificazione termodinamica ed attività catalitica per il sistema studiato. Si deve però notare che la diminuzione di velocità non è così importante. Ciò fa pensare che per questo processo ci troviamo già ad una distanza tra i due gruppi interagenti (calcolata come numero di rotori) fuori dalla regione di dipendenza lineare (vedi Fig. 4.12).

4.6.2 Diminuzione dello *spacer*

Aumentando il numero di legami tra il TSA ed il gruppo ammonio è stato possibile verificare la dipendenza dell'amplificazione dalla flessibilità in un sistema che prevede il riconoscimento intramolecolare. Per questo motivo, al fine di aumentare l'entità dell'interazione intramolecolare, è stato preso in considerazione l'utilizzo di componenti aventi un minore numero di legami (e quindi di rotori). La semplice rimozione, però, del metilene dell'idrazide **B** non è sinteticamente accessibile. Si è scelto perciò di diminuire il numero di legami sostituendo il gruppo idrazidico con uno amminico (Fig. 4.17).

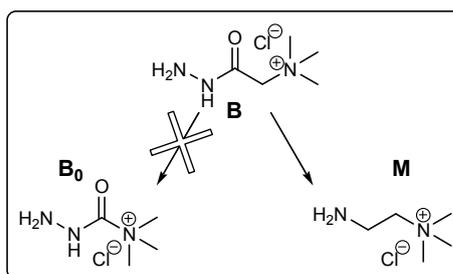


Figura 4.17: diminuzione dello *spacer* di **B**.

Rimuovendo il legame ammidico si viene anche a perdere il parziale carattere di doppio legame che conferisce rigidità alla struttura, per cui l'effetto totale risultante non può essere noto a priori.

Sono stati eseguiti nuovi esperimenti di amplificazione utilizzando l'ammina **M**. Subito però si è manifestata la necessità di utilizzare un riferimento diverso dall'idrazide **A**. I prodotti che si ottengono per condensazione tra un'ammina o un'idrazide con un'aldeide sono, rispettivamente, un'immina o un idrazone. Essi presentano delle stabilità termodinamiche intrinseche nettamente diverse tra loro, in cui l'immina è diversi ordini di grandezza meno stabile dell'idrazone, a causa della delocalizzazione elettronica presente in quest'ultimo. Il loro confronto diretto non è quindi possibile ed è necessario utilizzare come nuovo riferimento per questa serie di esperimenti la benzilammina (**L**), in quanto essa garantisce comunque una certa somiglianza strutturale con l'idrazide **A**.

Le piattaforme **1** o **2** (5mM) sono state aggiunte ad una soluzione contenente 5 equivalenti di ciascuna ammina **M** ed **L** (25mM) in metanolo deuterato. La soluzione è stata lasciata a

50°C per due giorni, tempo necessario per raggiungere l'equilibrio termodinamico, evidenziato dall'assenza di modificazioni nei segnali caratteristici dello spettro $^1\text{H-NMR}$.

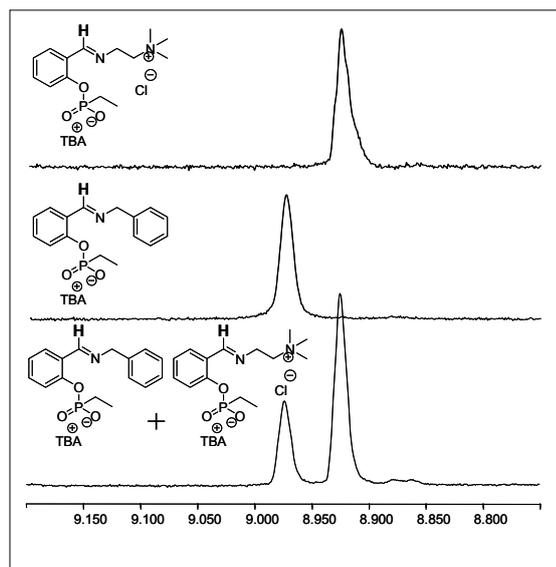


Figura 4.18a

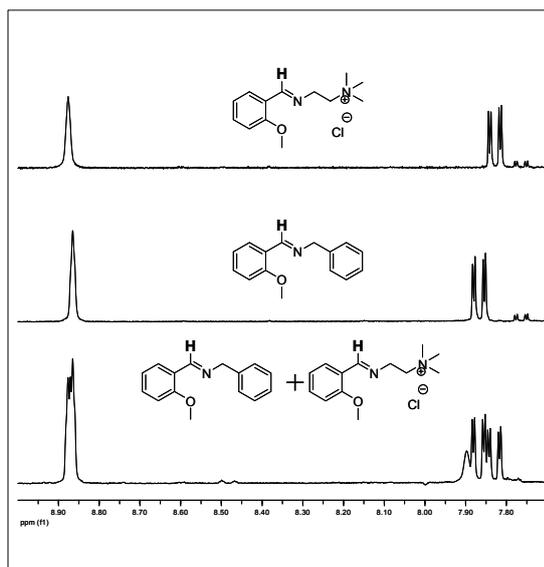


Figura 4.18b

L'integrazione dei picchi del protone imminico ha permesso di quantificare il rapporto tra **1M** e **1L** (Fig. 4.18a). Per quanto riguarda la piattaforma di controllo **2** è stato invece necessario ricorrere ai segnali dei protoni aromatici, in quanto quelli imminici sono sovrapposti (Fig. 4.18b).

Utilizzando la piattaforma **2** si ha una distribuzione statistica dei componenti (50 : 50) in quanto è assente il gruppo di riconoscimento. Con la piattaforma **1**, invece, l'interazione elettrostatica è tale che viene incorporata maggiormente l'ammina **M**, portando una distribuzione delle immine **1M-1L** al valore di 70 : 30. Tradotto in termini di amplificazione, si ottiene il valore di 2.3.

Confrontando questi risultati con quelli ottenuti in precedenza con l'idrazide **B** (amplificazione 1.8) appare evidente come si sia ottenuta una migliore orientazione del gruppo ammonio, garantendo di conseguenza una stabilizzazione intramolecolare maggiore. Purtroppo però non sono ancora disponibili i dati relativi all'attività catalitica dei fenil esteri contenenti il gruppi funzionali caratteristici delle ammine **L** oppure **M** a causa della difficoltà richiesta per la loro purificazione.

4.6.3 Ottimizzazione della piattaforma 1

L'ottimizzazione del sistema non ha riguardato solamente i componenti che si devono legare alla piattaforma che porta il gruppo di riconoscimento, ma si è esplorata anche la modificazione strutturale di quest'ultima. È importante sottolineare come si sia cercato evitare di ridisegnare completamente la molecola originale, in modo da rendere possibile un

confronto con essa. La nuova piattaforma fosfonato **3** (Fig. 4.19) è stata sintetizzata con una procedura analoga a quella utilizzata in precedenza.

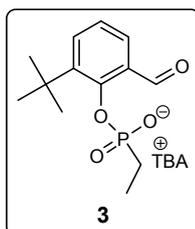


Figura 4.19: piattaforma 3.

Essa presenta in posizione orto al gruppo fosfonato un gruppo terz-butile. La presenza di quest'ultimo dovrebbe indurre, a causa dell'elevato ingombro sterico, una limitazione nelle libertà conformazionali del gruppo fosfonato, garantendo il suo orientamento preferenziale in stretta prossimità alla funzione aldeidica. Il risultato di questo avvicinamento dovrebbe condurre ad un aumento dell'intensità dell'interazione tra il gruppo funzionale dei componenti ed il TSA, producendo così valori di amplificazione più elevati nello screening termodinamico. Come riferimento per le prove di amplificazione si è scelto di sfruttare nuovamente la metossi benzaldeide (piattaforma **2**), in quanto mantenendo lo stesso sistema usato in precedenza rende pratico il confronto diretto con i risultati ottenuti utilizzando la piattaforma **1**.

Si è scelto di eseguire uno screening a coppie in metanolo deuterato nelle medesime condizioni utilizzate in precedenza. Esso è stato condotto sull'idrazide **B** e sull'ammina **M** in quanto esse presentano le amplificazioni migliori, utilizzando come riferimenti **A** ed **L**, rispettivamente. Anche in questo caso le quantificazioni delle specie derivanti dalla reazione di condensazione, presenti in soluzione, sono state possibili sfruttando i segnali $^1\text{H-NMR}$ caratteristici nella regione spettrale compresa tra 8 e 9 ppm.

I risultati ottenuti sono riassunti nella Tabella 4.6.

	1	2	3
Idrazone (B Vs A)			
(amplificazione)	50 : 50	65 : 35 (1.8)	75 : 25 (3.0)
Immina (M Vs L)			
(amplificazione)	50 : 50	70 : 30 (2.3)	89 : 11 (8.1)

Tabella 4.6: distribuzioni percentuali e relative amplificazioni.

Come si può osservare i risultati dati dalla piattaforma **3** sembrano confermare le ipotesi avanzate. Già dal confronto tra le due piattaforme che portano il gruppo di riconoscimento nelle competizioni delle idrazidi emerge un effetto del gruppo terbutile tale per cui il valore di

amplificazione cresce da 1.8 ad un valore di 3.0. Considerando invece le ammine, l'effetto risulta molto più marcato: si passa da 2.3 a 8.1. Questo può dipendere dal fatto che, essendo l'ammina **L** molto più flessibile rispetto all'idrazide **B**, essa si adatta molto meglio alla costrizione indotta dal terbutile, ponendo il gruppo ammonio carico in posizione ottimale per avere interazione elettrostatica.

E' importante sottolineare che l'aumento di amplificazione osservato non è la semplice somma dei singoli contributi dati dall'utilizzo delle ammine e dalla presenza del gruppo terbutile. I valori che si ottengono, infatti, sembrano quasi ad indicare un effetto cooperativo. Per verificare se questa amplificazione maggiore corrisponda anche ad un'efficienza catalitica maggiore dovranno essere eseguite le prove di idrolisi sui fenil acetati **3L** e **3M** (Fig. 4.20), le cui sintesi sono ancora in corso.

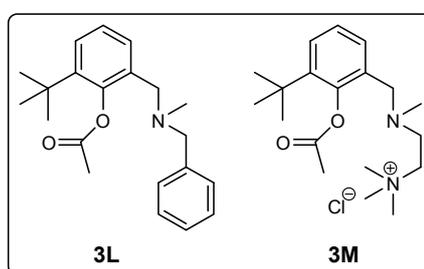


Figura 4.20: esteri **3L** e **3M** da sottoporre a prove di idrolisi.

4.7 Conclusioni

In questo capitolo è stata verificata la correlazione esistente tra le misure di amplificazione termodinamica dei componenti di una libreria e l'entità dell'attività catalitica nella reazione di idrolisi dell'estere fenil acetico.

Dalla libreria termodinamica emerge chiaramente che le idrazidi **B**, **C** ed **I** vengono amplificate in misura rilevante rispetto a tutte le altre studiate. Si è deciso di indagare dettagliatamente **B** ed **I** in quanto esse presentano non solo entità di amplificazione differenti (1.8 contro 1.3, rispettivamente) ma anche e soprattutto diverse capacità di interazione con l'analogo dello stato di transizione (interazioni elettrostatiche e formazione di legami ad idrogeno, rispettivamente). Sono stati perciò sintetizzati i fenilacetati **3B** e **3I**, sostituiti in modo tale da recare i gruppi funzionali tipici di queste idrazidi. Come riferimento è stato altresì sintetizzato l'estere **3A**.

Le prime prove di catalisi nella reazione di rottura del legame estereo sono state condotte in metanolo, in modo da mantenere lo stesso solvente usato per gli studi di amplificazione. Numerosi controlli sono stati eseguiti al fine di verificare che quanto ottenuto fosse da imputare alla stabilizzazione intramolecolare dello stato di transizione della reazione di idrolisi e non ad "artefatti" come, ad esempio, l'aumento della concentrazione locale della specie nucleofila. Analoghi esperimenti eseguiti in solvente misto acqua/acetonitrile hanno permesso di determinare un effetto catalitico massimo pari a 60 volte rispetto al sistema di riferimento.

Per avere conferma della formazione di interazioni intramolecolari nel sistema in esame si è variata la lunghezza dello *spacer* dell'idrazide **B**. È stato verificato come allungando la catena vi sia una diminuzione dell'amplificazione osservata, a causa dell'aumento di flessibilità del sistema che rende necessario un maggiore contributo entropico per avere interazione tra TSA e gruppo ammonio. Viceversa, diminuendo il numero di legami si ottiene un buon miglioramento del sistema. Si è cercato di favorire ulteriormente la formazione dell'interazione modificando la piattaforma **1** mediante l'inserimento di un gruppo ingombrante per limitare le libertà conformazionali del fosfonato, permettendo così di raggiungere un valore di amplificazione termodinamica massimo di 8.1.

Questo lavoro non solo ha permesso l'autoselezione di un gruppo vicinale che assiste nella catalisi, ma in aggiunta esso ha consentito di correlare l'attività catalitica con l'amplificazione termodinamica, sia in termini di reattività che di relativa accelerazione.

Nell'ottica di sviluppo di catalizzatori artificiali, è stata dimostrata l'applicabilità del metodo proposto per l'ottimizzazione dell'evento catalitico. Quello che si è ottenuto non è quindi un catalizzatore vero e proprio, in quanto esso manca della possibilità di avere turnover. Questo però esula dall'obiettivo del presente lavoro, il quale è invece focalizzato sulla possibilità di ottenere un metodo veloce ed affidabile per vagliare gruppi funzionali candidati ad avere un

ruolo catalitico. In linea di principio, il metodo messo a punto può essere applicato non solo per la selezione dell'unità catalitica, ma anche per quella di riconoscimento del substrato, aprendo la via all'ottenimento di un reale catalizzatore artificiale.

4.8 Parte sperimentale

4.8.1 Strumentazione

Per la descrizione dettagliata di tutta la strumentazione utilizzata si rimanda al Capitolo 2, paragrafo 9.1, pag. 47.

Spettri UV/Vis

Gli spettri UV/VIS sono stati registrati con uno spettrofotometro Perkin-Elmer Lambda 5, Lambda 16 o Lambda 45, controllati da software UV WinLab Ver. 2.85.04, dotati di portacelle termostatati a circolazione d'acqua, utilizzando delle celle al quarzo (Hellma) con cammino ottico di 1 cm.

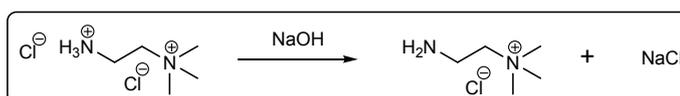
4.8.2 Materiali

Per la descrizione dettagliata dei materiali utilizzati si rimanda al Capitolo 2, paragrafo 9.2, pag. 48.

4.8.3 Sintesi e caratterizzazioni

Per la sintesi e caratterizzazione degli idrazoni con le piattaforme **1** e **2** si rimanda al Capitolo 3, paragrafo 8.3, pag. 81.

Ammina L



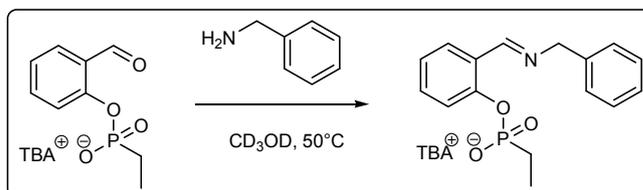
Schema 4.3

L'ammina **L** è disponibile commercialmente come sale cloridrato. Per ottenere la forma base libera il sale 2-(amminio)etil-trimetilammonio cloruro (513.2 mg, 2.93 mmol, 1.0 eq) è stato sciolto in 29.5 ml di NaOH 0.1 N (2.93 mmol, 1.0 eq) e la soluzione ottenuta è stata liofilizzata. Il solido è stato triturato con etanolo. Dopo filtrazione da NaCl residuo, il solvente organico è stato evaporato a pressione ridotta, ottenendo 406.0 mg di prodotto (resa quantitativa).

Procedura generale per la sintesi delle immine 1M e 1L

L'aldeide **1** è stata sciolta in metanolo deuterato e alla soluzione risultante è stato aggiunto 1 eq di ammina. La miscela di reazione è stata mantenuta a 50°C fino a conversione completa (controllo TLC ed NMR).

Immina 1L

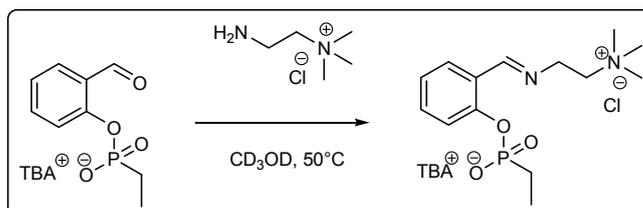


Schema 4.4

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 8.98 (s, 1H), 7.88 (dd, *J* = 7.80, 1.24 Hz, 1H), 7.06-7.59 (m, 8H), 4.55 (s, 2H), 3.19-3.25 (m, 8H), 1.59-1.81 (m, 10H), 1.41 (m, 8H), 1.19 (m, 2H), 1.02 (t, *J* = 7.26 Hz, 1H).

ESI-MS (-) MeOH: [M-H]⁻ 302 m/z

Immina 1M



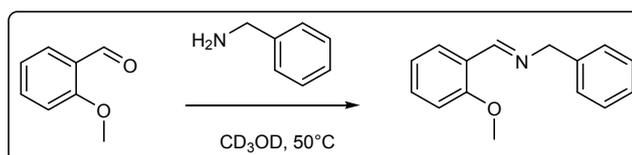
Schema 4.5

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 8.92 (s, 1H), 7.92 (dd, *J* = 7.79, 1.44 Hz, 1H), 7.01-7.58 (m, 3H), 4.10 (m, 2H), 3.70 (t, *J* = 6.00 Hz, 2H), 3.19-3.26 (m, 17H), 1.59-1.83 (m, 10H), 1.41 (m, 8H), 1.21 (td, *J* = 18.87, 7.97 Hz, 2H), 1.02 (t, *J* = 7.28 Hz, 1H).

ESI-MS (+) MeOH+0.1%HCOOH: [M+H]⁺ 299 m/z

Procedura generale per la sintesi delle immine 2M e 2L

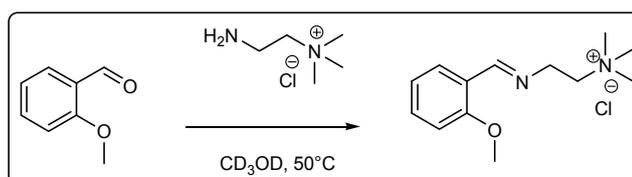
L'aldeide **2** è stata sciolta in metanolo deuterato e alla soluzione risultante è stato aggiunto 1 eq di ammina. La miscela di reazione è stata mantenuta a 50°C fino a conversione completa (controllo TLC ed NMR).

Immina 2L

Schema 4.6

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 8.76 (s, 1H), 7.90 (dd, *J* = 7.71, 1.74 Hz, 1H), 7.15-7.34 (m, 5H), 6.82-6.93(m, 2H), 4.62 (s, 2H), 3.68 (s, 3H).

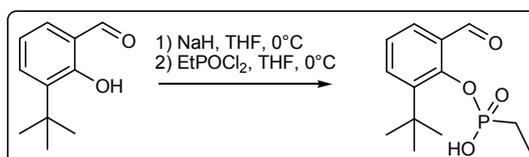
ESI-MS (+) MeOH: [M+H]⁺ 226 m/z

Immina 2M

Schema 4.7

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 8.87 (s, 1H), 7.85 (m, 1H), 7.46 (m, 1H), 7.21-7.36 (m, 1H), 6.95-7.10 (m, 1H), 4.05-4.12 (m, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.69 (t, *J* = 6.07 Hz, 2H), 3.17 (s, 9H).

ESI-MS (+) MeOH+0.1%HCOOH: [M+H]⁺ 256 m/z

Sintesi di 2(etil)fosfonil 3-terbutil benzaldeide

Schema 4.8

Una soluzione di salicilaldeide (1.01 g, 5.61mmol) in 15 ml di THF è stata aggiunta goccia a goccia, nel corso di un'ora, ad una sospensione di NaH (0.269 g, 11.2 mmol, 2 eq) in THF, raffreddata a 0 °C. Dopo l'aggiunta, la miscela risultante è stata lasciata in agitazione per mezz'ora a temperatura ambiente. Raffreddata nuovamente a 0 °C e aggiunta una soluzione di dicloruro (etil)fosfonico (1.2 ml, 1.65 g, 1.1 eq) in THF. La soluzione risultate è stata lasciata per 2h a temperatura ambiente.

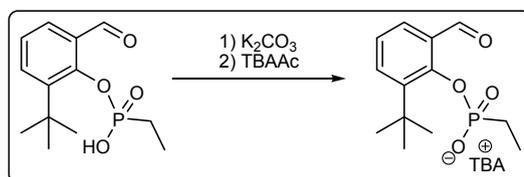
Raffreddata nuovamente a 0 °C e aggiunti 2ml di HCl 12N. La rimozione del THF all'evaporatore rotante ha portato all'ottenimento di un residuo marrone. Ripreso con acqua, portato a pH basico con NaHCO₃. La fase acquosa è stata estratta con CHCl₃ e acidificata con HCl 12N. Dopo estrazione con CHCl₃, la fase organica è stata anidrificata (Na₂SO₄) e il solvente rimosso per evaporazione a pressione ridotta. Si ottengono 0.177 g di prodotto (resa 12%).

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 10.48 (s, 1H), 7.63-7.68 (m, 2H), 7.10 (t, *J* = 7.72 Hz, 1H), 1.83 (dq, *J* = 17.31, 7.53 Hz, 2H), 1.50 (s, 9H), 1.26 (dt, *J* = 19.04, 7.63 Hz, 3H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 188.49, 151.11, 143.93, 139.28 (d, *J* = 6.15 Hz), 128.66, 124.80, 123.75, 30.89, 29.82, 19.98 (d, *J* = 137.0 Hz), 6.13 (d, *J* = 7.06 Hz).

ESI-MS (-) MeOH: [M-H]⁻ 269 m/z

Sintesi di 2-(etil)fosfonil 3-terbutil benzaldeide tetrabuttilammonio (Piattaforma 3)



Schema 4.9

2-(etil)fosfonil 3-terbutil benzaldeide (40.4 mg, 0.150mmol, 1eq), sono stati sciolti in acqua e il pH della soluzione risultate è stato corretto a ~7.5 usando NaHCO₃. La fase acquosa è stata estratta con una soluzione di tetrabuttilammonio acetato (45.1 mg, 0.15 mmol, 1 eq) in CHCl₃. Il solvente organico è stato evaporato a pressione ridotta, ottenendo **1** sotto forma di solido giallo (79.3 mg, 0.15 mmol, resta quantitativa).

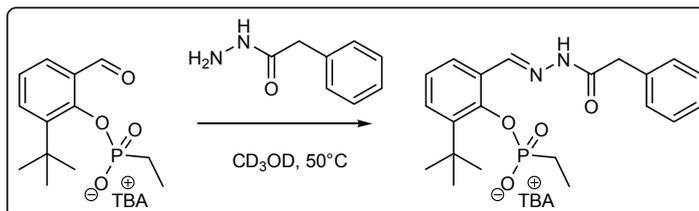
¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 10.50 (s, 1H), 7.63-7.68 (m, 2H), 7.10 (t, *J* = 7.70 Hz, 1H), 3.20-3.77 (m, 8H), 1.60-1.91 (m, 10H), 1.50 (s, 9H), 1.37-1.48 (m, 8H), 1.25 (dt, *J* = 19.01, 7.66 Hz, 2H), 1.03 (t, *J* = 7.26 Hz, 12H).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃CN) δ (ppm): 191.68, 156.20 (d, *J* = 9.45 Hz), 143.54 (d, *J* = 3.71 Hz), 133.23 (d, *J* = 1.12 Hz), 132.34 (d, *J* = 2.47 Hz), 125.83 (d, *J* = 1.15 Hz), 122.60 (d, *J* = 1.13 Hz), 59.15, 35.80, 31.27, 24.20, 20.22, 19.98 (d, *J* = 137.0 Hz), 13.72, 8.76 (d, *J* = 6.35 Hz).

ESI-MS (-) MeOH: [M-TBA]⁻ 269 m/z

Procedura generale per la sintesi degli idrazoni 3A e 3B

L'aldeide **3** è stata sciolta in metanolo deuterato e alla soluzione risultante è stato aggiunto 1 eq di idrazide. La miscela di reazione è stata mantenuta a 50°C fino a conversione completa (controllo TLC ed NMR).

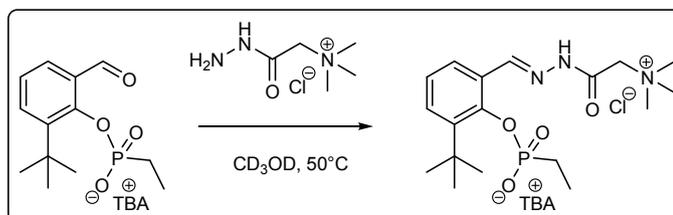
Idrazone 3A

Schema 4.10

¹H-NMR isomero maggioritario (62%) (250 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 9.08 (s, 1H), 7.99 (dd, J = 7.82, 1.65 Hz, 1H), 7.21-7.45 (m, 7H), 6.99-7.07 (m, 1H), 4.08 (s, 2H), 3.19-3.26 (m, 8H), 1.59-1.90 (m, 10H), 1.46 (s, 9H), 1.17-1.43 (m, 11H), 1.02 (t, J = 7.27 Hz, 1H),

¹H-NMR isomero minoritario (38%) (250 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 8.83 (s, 1H), 7.86 (dd, J = 7.83, 1.64 Hz, 1H), 7.21-7.45 (m, 7H), 6.99-7.07 (m, 1H), 4.62 (s, 2H), 3.19-3.26 (m, 8H), 1.59-1.90 (m, 10H), 1.46 (s, 9H), 1.17-1.43 (m, 11H), 1.02 (t, J = 7.27 Hz, 1H),

ESI-MS (-) MeOH: [M-TBA]⁻ 401 m/z

Idrazone 3B

Schema 4.11

¹H-NMR isomero maggioritario (80%) (250 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 8.81 (s, 1H), 7.81 (dd, J = 7.74, 1.76 Hz, 1H), 7.46 (d, J = 7.93 Hz, 1H), 7.03 (t, J = 7.74 Hz, 1H), 4.74 (s, 2H), 3.40 (s, 9H), 3.19-3.26 (m, 8H), 1.60-1.92 (m, 10H), 1.46 (m, 9H), 1.43-1.37 (m, 8H), 1.25 (t, J = 19.07, 7.62 Hz, 3H), 1.02 (t, J = 7.27 Hz, 12H).

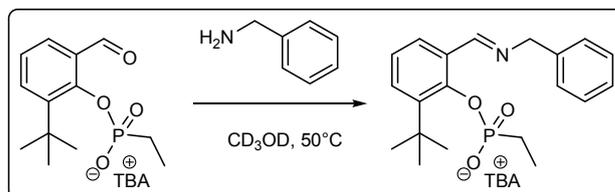
¹H-NMR isomero minoritario (20%) (250 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 9.07 (s, 1H), 7.94 (dd, J = 7.71, 1.63 Hz, 1H), 7.46 (d, J = 7.93 Hz, 1H), 7.03 (t, J = 7.74 Hz, 1H), 4.19 (s, 2H), 3.35 (s, 9H), 3.19-3.26 (m, 8H), 1.60-1.92 (m, 10H), 1.46 (m, 9H), 1.43-1.37 (m, 8H), 1.25 (t, J = 19.07, 7.62 Hz, 3H), 1.02 (t, J = 7.27 Hz, 12H).

ESI-MS (+) MeOH+0.1% HCOOH: [M+H]⁺ 284 m/z

Procedura generale per la sintesi delle immine 3M e 3L

L'aldeide **3** è stata sciolta in metanolo deuterato e alla soluzione risultante è stato aggiunto 1 eq di ammina. La miscela di reazione è stata mantenuta a 50°C fino a conversione completa (controllo TLC ed NMR).

Immina 2L

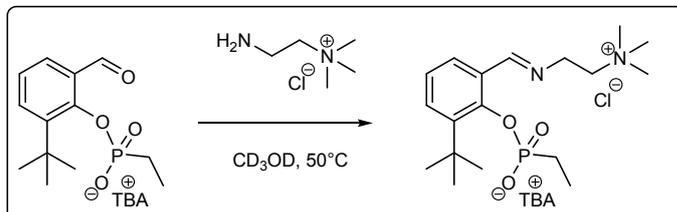


Schema 4.12

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 9.38, 7.23-7.40 (m, 5H), 7.73 (dd, *J* = 7.72, 1.67 Hz, 1H), 7.49 (dd, *J* = 7.79, 1.01 Hz, 1H), 7.02 (t, *J* = 7.78 Hz, 1H), 4.57 (s, 2H), 3.19-3.26 (m, 8H), 1.59-1.87 (m, 10H), 1.49 (s, 9H), 1.34-1.47 (m, 8H), 1.24 (td, *J* = 18.68, 7.65Hz, 3H), 1.02 (t, *J* = 7.28Hz, 12H).

ESI-MS (-) MeOH: [M-H]⁻ 358 m/z

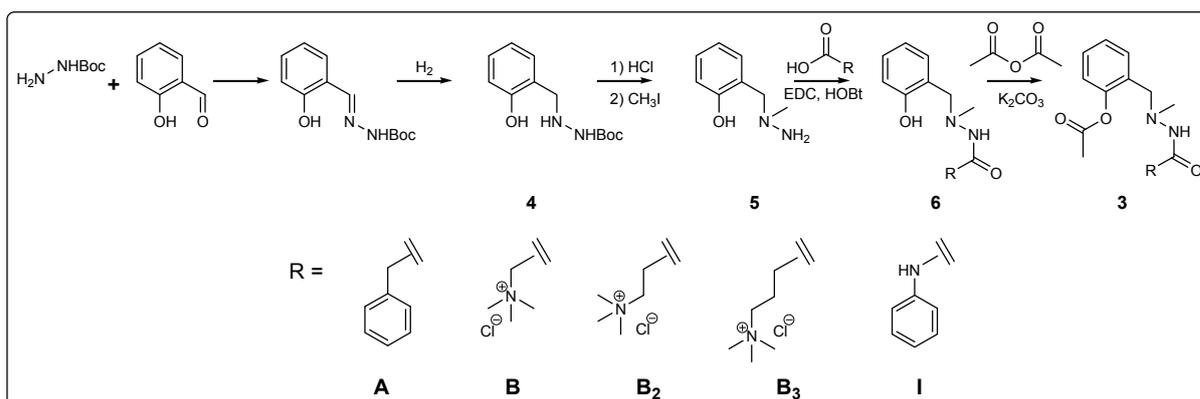
Immina 2M



Schema 4.13

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 9.26, 7.73 (dd, *J* = 7.70, 1.69 Hz, 1H), 7.49 (dd, *J* = 7.82, 1.56 Hz, 1H), 7.03 (t, *J* = 7.76 Hz, 1H), 4.07 (m, 2H), 3.72 (t, *J* = 5.98 Hz, 2H), 3.18-3.26 (m, 17H), 1.86 (qd, *J* = 17.53, 7.65 Hz, 2H), 1.66 (m, 8H), 1.47 (s, 9H), 1.37-1.46 (m, 8H), 1.28 (td, *J* = 18.96, 7.61 Hz, 1H), 1.03 (t, *J* = 7.28 Hz, 1H).

ESI-MS (+) MeOH+0.1%HCOOH: [M+H]⁺ 355 m/z

Procedura generale per la sintesi degli esteri 3A, 3B, 3B₂, 3B₃, 3I

Schema 4.14

La sintesi del composto 4 è stata eseguita seguendo la procedura riportata in letteratura senza alcuna modificazione:

H. Zhao, N. Neamati, S. Sunder, H. Hong; S. Wang, G. W. A. Milne, Y. Pommier, T. R. Burke, Jr. *J. Med. Chem.*, **1997**, *40*, 937.

Composto 5 Boc protetto

Il composto 4 (1.1 g, 4.61 mmol) è stato sciolto in acetonitrile e la soluzione risultante è stata trasferita in una bottiglia di pyrex munita di tappo a vite. Dopo l'aggiunta di metil ioduro (3.5 ml, 56.2 mmol, 12 eq) la miscela di reazione è stata mantenuta a 60°C per 5 ore; il solvente è stato quindi rimosso per evaporazione a pressione ridotta. Il solido risultante è stato cristallizzato (etile acetato) per dare il prodotto 5 sotto forma di solido bianco (541 mg, resa 47%).

¹H-NMR (250 MHz, CD₃CN) δ (ppm): 10.34-9.94 (m, 2H), 7.09 (dd, *J* = 8.18, 3.42 Hz, 1H), 6.95 (t, *J* = 7.50, 7.50 Hz, 1H), 4.67 (s, 2H), 3.20 (s, 3H), 1.36 (s, 9H).

¹³C-NMR (62.5 MHz, CD₃CN) δ (ppm): 157.25, 133.78, 132.92, 121.22, 116.50, 85.26, 60.87, 46.47, 27.98, 25.48.

ESI-MS (+) MeOH+0.1%HCOOH: [M+H]⁺ 253 m/z

HPLC (Jupiter Proteo 4u 250x4.60 mm, 4μm, flow=0.8ml/min, 0-15min 10-90% ACN + 0.1%TFA, 15-25min 90%ACN + 0.1%TFA, λ=226nm): 18.8 min

Composto 5

Il composto Boc protetto (300 mg, 1.19 mmol) è sciolto in 25 ml di soluzione 1.75 M di HCl in metanolo. Dopo una notte il solvente è rimosso tramite evaporazione a pressione ridotta, ottenendo il prodotto deprotetto **5** in resa quantitativa, usato senza ulteriore purificazione.

¹H-NMR (250 MHz, CD₃CN) δ (ppm): 7.70-7.06 (m, 2H), 6.95-6.82 (m, 2H), 4.30 (s, 2H), 2.84 (s, 3H).

¹³C-NMR (62.5 MHz, CD₃CN) δ (ppm): 157.71, 133.62, 132.53, 120.93, 117.73, 116.40, 60.32, 44.72

ESI-MS (+) MeOH+0.1%HCOOH: [M+H]⁺ 153 m/z

Composto 6

Gli acidi carbossilici commerciali (eccetto che per **B₂** e **B₃**, vedi in seguito) sono sciolti in acetonitrile anidro e alla soluzione è stato aggiunto HOBT (2eq). Lasciato in agitazione la sospensione per 20 minuti in bagno a ghiaccio, poi si è aggiunto EDC (2eq). L'agitazione è stata mantenuta 15 minuti a 0°C e poi a temperatura ambiente per altri 15 minuti. Dopo aver raffreddato nuovamente a 0°C, è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione del composto **5** (1 eq) e trietilammina (6 eq) in acetonitrile. La miscela di reazione è stata lasciata per 4 ore a 0°C e una notte a temperatura ambiente. Successivamente, il solvente è stato rimosso per evaporazione a pressione ridotta ed il prodotto purificato per cromatografia.

6A

¹H-NMR (250 MHz, CD₃CN) δ (ppm): 7.37-7.15 (m, 6H), 7.12-7.01 (m, 1H), 6.84-6.73 (m, 2H), 3.96 (s, 2H), 3.44 (s, 2H), 2.55 (s, 3H).

¹³C-NMR (62.5 MHz, CD₃CN) δ (ppm): 170.47, 158.15, 135.90, 131.04, 130.69, 130.05, 129.46, 127.83, 121.80, 120.20, 117.15, 62.39, 43.15, 41.29.

ESI-MS(+) MeOH+0.1%HCOOH: [M+H]⁺ 271 m/z, [M+Na]⁺ 293 m/z

HPLC (Jupiter Proteo 4u 250x4.60x4u, flow=0.8ml/min, 0-15min 10-90% ACN+0.1%TFA, λ=280nm): 16.11 min

6B

¹H-NMR isomero maggioritario (60%) (250 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.18-7.14 (m, 2H), 6.89-6.80 (m, 2H), 4.26 and 4.07 (q, ²J = 16.8 Hz, 2H), 3.90 and 3.63 (q, ²J = 11.7 Hz, 2H), 3.06 (s, 9H), 2.64 (s, 3H).

¹H-NMR isomero minoritario (40%) (250 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.18-7.14 (m, 2H), 6.89-6.80 (m, 2H), 3.97 (s, 2H), 3.32 (s, 2H), 3.20 (s, 9H), 2.63 (s, 3H).

¹³C-NMR isomero maggioritario (60%) (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 167.74, 157.87, 133.95, 130.91, 123.92, 120.72, 116.50, 64.85, 60.71, 54.86, 45.94.

¹³C-NMR isomero minoritario (40%) (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 163.19, 157.57, 131.79, 130.58, 122.84, 117.11, 116.50, 63.93, 59.92, 54.50, 44.21.

ESI-MS (+) MeOH+0.1%HCOOH: [M]⁺ 252 m/z

HPLC (Jupiter Proteo 4u 250x4.60x4u, flow=0.8ml/min, 0-15min 10-90% ACN+0.1%TFA, λ=280nm): 11.12 min.

6B₂

¹H-NMR isomero maggioritario (60%) (250 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.18-7.15 (m, 2H), 6.86-6.78 (m, 2H), 4.03 (s, 2H), 3.63 (t, J=7.5 Hz, 2H), 3.07 (s, 9H), 2.71 (t, t, J=7.2Hz, 2H), 2.68 (s, 3H).

¹H-NMR isomero minoritario (40%) (250 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.18-7.15 (m, 2H), 6.86-6.78 (m, 2H), 4.03 (s, 2H), 3.63 (t, J=7.5 Hz, 2H), 3.07 (s, 9H), 2.72 (t, J=7.2Hz, 2H), 2.66 (s, 3H).

¹³C-NMR isomero maggioritario (60%) (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 168.72, 157.58, 133.99, 130.76, 124.45, 120.65, 116.53, 63.10 (t, J_{CN} = 3.3 Hz), 59.75, 53.67 (t, J_{CN} = 3.3 Hz), 44.10, 26.86.

¹³C-NMR isomero minoritario (40%) (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 168.70, 158.06, 133.99, 130.76, 124.45, 120.70, 117.10, 62.84 (t, J_{CN} = 3.3 Hz), 61.06, 53.49 (t, J_{CN} = 3.3 Hz), 43.55, 28.65.

ESI-MS (+) MeOH+0.1%HCOOH: [M]⁺ 266 m/z

HPLC (Jupiter Proteo 4u 250x4.60x4u, flow=0.8ml/min, 0-15min 10-90% ACN+0.1%TFA, λ=280nm): 11.55 min.

6B₃

¹H-NMR isomero maggioritario (85%) (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.23-7.12 (m, 2H), 6.87-6.78 (m, 2H), 4.07 (s, 2H), 3.28-3.22 (m, 2H), 3.11 (s, 9H), 2.69 (s, 3H), 2.26 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 2.08-2.00 (m, 2H).

¹H-NMR isomero minoritario (15%) (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.23-7.12 (m, 2H), 6.87-6.78 (m, 2H), 4.07 (s, 2H), 3.28-3.22 (m, 2H), 3.08 (s, 9H), 2.63 (s, 3H), 2.34 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 2.08-2.00 (m, 2H).

¹³C-NMR isomero maggioritario (85%) (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 155.57, 130.91, 129.20, 128.31, 118.05, 114.49, 64.17, 58.72, 50.98, 41.31, 27.86, 16.86.

¹³C-NMR isomero minoritario (15%) (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 168.86, 154.92, 130.91, 129.20, 128.31, 117.81, 113.78, 64.51, 56.93, 50.98, 41.20, 25.90, 16.12.

ESI-MS (+) MeOH: [M]⁺ 280 m/z

HPLC (Jupiter Proteo 4u 250x4.60x4u, flow=0.8ml/min, 0-15min 10-90% ACN+0.1%TFA, $\lambda=280$ nm): 12.80 min.

6I

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.42-7.29 (m, 2H), 7.27-7.17 (m, 2H), 7.16-7.05 (m, 2H), 7.01-6.93 (m, 1H), 6.85-6.72 (m, 2H), 3.82 (s, 2H), 2.56 (m, 3H).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 158.67, 157.57, 140.23, 133.08, 130.54, 129.80, 124.34, 123.88, 120.65, 120.53, 116.42, 61.54, 44.92.

ESI-MS (+) MeOH+0.1%HCOOH: [M+H]⁺ 272 m/z, [M+Na]⁺ 294 m/z

Composto 3

Il composto **6** è sciolto in acetonitrile anidro e alla soluzione risultante è aggiunta anidride acetica (2 eq) e una quantità catalitica di carbonato di potassio. La miscela è stata lasciata in agitazione per 8 ore a temperatura ambiente, eliminato il sale per filtrazione ed evaporata la soluzione risultante a pressione ridotta. I prodotti finali **3A**, **3B**, **3B₂**, **3B₃** sono stati purificati attraverso HPLC preparativo. Il prodotto **3I** è stato purificato mediante ricristallizzazione da etile acetato.

3A

¹H-NMR isomero maggioritario (75%) (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.29-6.82 (m, 9H), 4.11 (s, 2H), 3.37 (s, 2H), 2.83 (s, 3H), 2.28 (s, 3H).

¹H-NMR isomero minoritario (25%) (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.29-6.82 (m, 9H), 4.01 (s, 2H), 3.44 (s, 2H), 2.53 (s, 3H), 2.31 (s, 3H).

¹³C-NMR isomero maggioritario (75%) (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 170.42, 169.37, 149.91, 135.27, 132.03, 129.52, 129.30, 128.88, 128.50, 127.21, 126.74, 126.34, 126.33, 122.85, 56.03, 44.43, 38.94, 21.01.

¹³C-NMR isomero minoritario (40%) (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 170.09, 169.31, 149.85, 134.50, 131.75, 129.50, 129.48, 129.13, 128.59, 127.22, 126.75, 126.36, 126.35, 122.97, 59.13, 46.56, 42.54, 21.10.

ESI-MS (+) MeOH+0.1%HCOOH: [M+H]⁺ 313 m/z, [M+Na]⁺ 335 m/z, [M+K]⁺ 351 m/z,

HPLC (Agilent Eclipse XDB-C18, 5μm 150x4.60mm, flow=0.8ml/min, 0-15min 10-90% ACN+0.1%TFA, 15-25min 90%ACN+0.1%TFA, λ =280nm): 11.83 min.

3B

¹H-NMR isomero maggioritario (80%) (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.18 (m, 4H), 4.09 and 3.44 (q, ²J = 12.5 Hz, 2H), 3.98 and 3.66 (q, ²J = 16.8 Hz, 2H), 2.96 (s, 9H), 2.72 (s, 3H), 2.37 (s,3H).

¹H-NMR isomero minoritario (20%) (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.61 (dd, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, 1H), 7.33-7.23 (m, 2H), 7.04 (dd, ³J = 7.9 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, 1H), 3.87 (s, 2H), 3.85 (s, 2H), 3.10 (s, 9H), 2.68 (s, 3H), 2.35 (s, 3H).

¹³C-NMR isomero maggioritario (80%) (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 169.24, 165.19, 148.71, 131.28, 128.09,127.30, 124.62, 122.02, 60.68, 56.17, 51.74, 44.88, 19.00.

¹³C-NMR isomero minoritario (20%) (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 169.24, 165.19, 148.69, 129.90,128.09, 127.28, 124.43, 121.23, 62.45, 55.05, 52.10,42.92, 18.92.

ESI-MS (+) MeOH+0.1%HCOOH: [M]⁺ 294 m/z

HPLC (Jupiter Proteo 4u 250x4.60x4u, flow=0.8ml/min, 0-15min 10-90% ACN, 15-25min 90%ACN, λ=280nm): 21.40 min.

3B₂

¹H-NMR isomero maggioritario (70%) (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.46-7.18 (m, 4H), 4.24 and 4.11 (q, ²J = 12.9 Hz, 2H), 3.51 and 3.26 (q, ²J = 7.0 Hz, 2H), 3.00 (s, 3H), 2.87 (s, 9H), 2.74 (s, 3H), 2.66 (m, 2H).

¹H-NMR isomero minoritario (30%) (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.46-7.18 (m, 4H), 4.34 and 4.06 (q, ²J = 13.2 Hz, 2H), 3.86 (s, 2H), 2.98 (s, 3H), 2.92 (s, 9H), 2.76 (s, 3H), 2.61 (m, 2H).

¹³C-NMR isomero maggioritario (70%) (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 167.74, 167.52, 147.38, 129.44, 126.71, 123.17, 123.13, 120.46, 58.97, 55.01, 49.50, 41.22, 24.93, 18.86.

¹³C-NMR isomero minoritario (30%) (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 167.70, 167.06, 147.21, 129.15, 126.51, 125.74, 123.20, 119.64, 58.80, 53.64, 49.51, 38.96, 24.90, 19.16.

ESI-MS (+) MeOH+0.1%HCOOH: [M]⁺ 308 m/z

HPLC (Jupiter Proteo 4u 250x4.60x4u, flow=0.8ml/min, 0-15min 10-90% ACN, 15-25min 90%ACN, λ=280nm): 22.40 min.

3B₃

¹H-NMR isomero maggioritario (55%) (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.39-7.22 (m, 4H), 4.28 and 4.10 (q, ²J = 13.1 Hz, 2H), 3.93 (m, 1H), 3.54 (m, 1H), 3.02 (s, 9H), 2.70 (s, 3H), 2.34 (s, 3H), 2.11 (t, ³J = 6.6 Hz, 2H), 1.92-1.88 (m, 2H).

¹H-NMR isomero minoritario (45%) (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.39-7.22 (m, 4H), 3.82 (s, 2H), 3.12-3.14 (m, 2H), 3.01 (s, 9H), 2.68 (s, 3H), 2.35 (s, 3H), 2.11 (t, ³J = 6.6 Hz, 2H), 1.92-1.88 (m, 2H).

¹³C-NMR isomero maggioritario (55%) (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 167.56, 167.21, 147.26, 129.58, 128.95, 125.63, 123.01, 119.70, 62.88, 53.64, 49.53, 41.78, 27.09, 18.88, 15.72.

¹³C-NMR isomero minoritario (45%) (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 167.41, 167.18, 146.94, 129.60, 128.33, 126.64, 123.30, 120.22, 62.71, 54.99, 49.55, 38.90, 22.99, 16.87, 14.93.

ESI-MS (+) MeOH+0.1%HCOOH: [M]⁺ 322 m/z

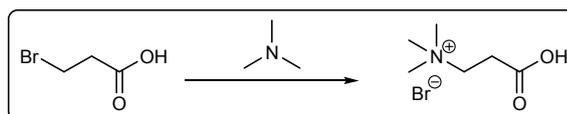
HPLC (Jupiter Proteo 4u 250x4.60x4u, flow=0.8ml/min, 0-15min 10-90% ACN, 15-25min 90%ACN, λ=280nm): 23.02 min.

3I

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.95 (s, 1H), 7.44-6.91 (m, 9H), 5.34 (s, 1H), 3.75 (s, 2H), 2.63 (s, 3H), 2.33 (s, 3H).

¹³C-NMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 169.90, 155.38, 149.74, 138.45, 131.86, 129.67, 128.69, 128.05, 126.39, 122.83, 122.74, 119.15, 59.57, 46.54, 30.94.

ESI-MS (+) MeOH+0.1%HCOOH: [M+Na]⁺ 336 m/z

Sintesi dell'acido 3 (trimetilammino) propanoico

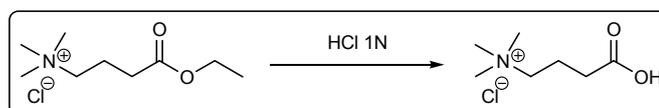
Schema 4.15

Ad una soluzione dell'acido 3 bromopropionico commerciale (2.04 g, 13.3 mmol) in etanolo (10 ml) è aggiunta una soluzione 4.2 M di trimetilammina in etanolo (28 ml, 120 mmol, 9 eq) e la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 3 giorni. L'eccesso di trimetilammina è rimosso flussando aria all'interno della soluzione, dopodiché il solvente è stato rimosso per evaporazione a pressione ridotta, ottenendo il prodotto desiderato sotto forma di solido bianco, purificato tramite ricristallizzazione caldo-freddo in etanolo (2.8 g, resa 74%).

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 3.66 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.17 (s, 9H), 2.79 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 174.45, 64.46, 53.78 (t, $J_{\text{NC}} = 3.4$ Hz), 30.84.

ESI-MS (+) MeOH: $[\text{M}]^+$ 132 m/z

Sintesi dell'acido 4 (trimetilammino) butirrico

Schema 4.16

Il reagente di partenza (100mg, 0.47 mmol, vedi sintesi nel Capitolo 3) è stato sciolto in una soluzione 1N di acido cloridrico e lasciato in agitazione a temperatura ambiente per 24h. La liofilizzazione della soluzione acquosa porta all'ottenimento del prodotto sotto forma di solido bianco (84 mg, resa 87%).

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 3.42-3.35 (m, 2H), 3.16 (s, 9H), 2.45 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.13-2.00 (m, 2H)

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 66.77 (t, $J_{\text{NC}} = 3.2$ Hz), 53.59 (t, $J_{\text{NC}} = 4.0$ Hz), 30.82 (t, $J_{\text{NC}} = 1.9$ Hz), 19.42.

ESI-MS (+) MeOH: $[\text{M}]^+$ 146 m/z

4.8.4 Procedura per le cinetiche di metanolisi

Sodio metossido

La soluzione di sodio metossido è stata preparata di fresco per pesata. Del sodio metallico lucido è stato lavato in metanolo, asciugato velocemente e sciolto in un matraccio tarato contenente un volume noto di solvente (5 ml). La differenza di peso dopo la dissoluzione del metallo permette di calcolare la concentrazione di sodio metossido presente.

Esteri

Le soluzioni madre degli esteri **3A**, **3B**, **3B₂**, **3B₃**, **3I** sono state preparate sciogliendo la quantità opportuna di prodotto in metanolo (circa 10 mM).

Preparazione delle cuvette

Le misure di metanolisi sono state condotte a 20°C. La quantità opportuna di soluzione madre di sodio metossido è stata prelevata con siringhe tipo Hamilton e posta direttamente all'interno della cuvetta contenente il metanolo necessario affinché la concentrazione finale fosse 7.2 mM. A questo punto è stata aggiunta la soluzione madre dell'estere, in modo tale che la concentrazione in cuvetta fosse 0.60 mM. Iniziata l'acquisizione dell'assorbanza a 280 nm immediatamente dopo l'aggiunta.

4.8.5 Procedura per le cinetiche di idrolisi

Tamponi

Negli esperimenti spettrofotometrici sono stati utilizzati i seguenti tamponi commerciali, non ulteriormente purificati:

- acido 3-(N-cicloesilammino) 1-propansolfonico (CAPS) pH= 11
- acido 3-(N-cicloesilammino) 1-propansolfonico (CAPS) pH= 10
- acido 2-(N-cicloesilammino) 1-etansolfonico (CHES) pH=9
- acido N-(2-idrossietil)-piperazin-N'-(3-propansolfonico) (EPPS) pH=8
- acido N-(2-idrossietil)-piperazin-N'-(2-etansolfonico) (HEPES) pH=7

Le soluzioni tampone sono state preparate per pesata. Si scioglie la quantità desiderata di tampone in un volume d'acqua pari ai $\frac{3}{4}$ del volume finale. Si aggiunge NaOH 1 M fino ad arrivare al pH desiderato e si porta a volume in un matraccio tarato la soluzione così ottenuta. Normalmente si preparano soluzioni madre a concentrazioni 0.2 M che vengono poi diluite fino ad ottenere la concentrazione desiderata per lo specifico esperimento.

Esteri

Le soluzioni madre degli esteri **3A**, **3B**, **3B₂**, **3B₃**, **3I** sono state preparate sciogliendo la quantità opportuna di prodotto in acetonitrile (circa 10 mM).

Preparazione delle cuvette

Le misure di idrolisi sono state condotte a 45°C. La quantità opportuna di soluzione madre di tampone è stata prelevata con siringhe tipo Hamilton e posta direttamente all'interno della cuvetta contenente una soluzione acqua/acetonitrile affinché la composizione (50 : 50 oppure 10 : 90) e la concentrazione (0.60 mM) finali fossero quelle desiderate. A questo punto è stata aggiunta la soluzione madre dell'estere, in modo tale che la concentrazione in cuvetta fosse 0.6 mM. Iniziata l'acquisizione dell'assorbanza a 280 nm immediatamente dopo l'aggiunta.

4.9 Riferimenti bibliografici

- ¹ a) J.-M. Lehn, *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, 36, 151–160;
b) P. T. Corbett, J. Leclaire, L. Vial, K. R. West, J.-L. Wietor, J. K. M. Sanders, S. Otto, *Chem. Rev.*, **2006**, 106, 3652–3711.
- ² J. K. M. Sanders, *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 1378
- ³ a) B. Brisig, J. K. M. Sanders, S. Otto, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 1308 – 1311;
b) B. Brisig, J. K. M. Sanders, S. Otto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 1270–1273;
c) L. Vial, J. K. M. Sanders, S. Otto, *New J. Chem.* **2005**, 29, 10011003.
- ⁴ L. Pauling, *Chem. Eng. News* **1946**, 24 (161), 707-709.
- ⁵ a) D. Hilvert, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, 69, 751–793;
b) C. V. Hanson, Y. Nishiyama, S. Paul, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, 16, 631–636.
- ⁶ a) M. Emgenbroich, G. Wulff, *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 4106 – 4117;
b) J.-Q. Liu, G. Wulff, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 7452 – 7453;
c) A. Volkmann, O. BrLggeman, *React. Funct. Polym.* **2006**, 66, 1725 – 1733.
- ⁷ A. Fersht in *Structure and Mechanism in Protein Science*, 3rd ed., W. H. Freeman, New York, **2000**.
- ⁸ a) A. J. Kirby, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 770–790;
b) A. J. Kirby, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 706–724.
- ⁹ a) C. Godoy-Alcántar, A. K. Yatsimirsky, J.-M. Lehn, *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, 18, 979-985;
b) M. Hochgürtel, H. Kroth, D. Piecha, M. W. Hofmann, C. Nicolau, S. Krause, O. Schaaf, G. Sonnenmoser, A. V. Eliseev, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, 99, 3382-3387;
c) S. Zameo, B. Vauzeilles, J.-M. Beau, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 987-991;
d) S. Zameo, B. Vauzeilles, J.-M. Beau, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 965-969.
- ¹⁰ In un sistema strutturalmente simile, Anslyn et al. osservano un'accelerazione di 40 volte nell'idrolisi di un diestere fosforico grazie alla stabilizzazione dello stato di transizione da parte di un gruppo guanidinico.
A. M. Piatek, M. Gray, E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 9878-9879.
- ¹¹ a) M. I. Page, W. P. Jencks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1971**, 68, 1678–1683;
b) A. J. Kirby, *Adv. Phys. Org. Chem.* **1980**, 17, 183–278;
c) G. Illuminati, L. Mandolini, *Acc. Chem. Res.* **1981**, 14, 95–102;
d) F. Menger, *Acc. Chem. Res.* **1985**, 18, 128–134
e) T.C. Bruice, F. C. Lightstone, *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 127–136.
- ¹² R. Cacciapaglia, S. Di Stefano, L. Mandolini, *Acc. Chem. Res.* **2004**, 37, 2, 113-122
- ¹³ Y. Chevalier, P. Perchec, *J. Phys. Chem.* **1990**, 94, 1768–1774.

CAPITOLO 5: analisi ottica indiretta di un equilibrio chimico dinamico[§]

5.1 Introduzione

Nella chimica covalente dinamica sono prese in considerazione reazioni chimiche che coinvolgono la formazione di un legame covalente reversibile. Questo fa sì che esse siano tipicamente sotto controllo termodinamico.¹ Una particolare area in questo ambito di ricerca è rappresentato da reazioni bimolecolari in cui la formazione del legame covalente reversibile è accoppiata ad un riconoscimento molecolare, definito *dynamic covalent capture*.² In esse la stabilità termodinamica del prodotto è influenzata dalla forza dell'interazione non covalente, che rende il *dynamic covalent capture* uno strumento utile per lo studio e la misura di interazioni deboli. Alcuni esempi di questo tipo di approccio riguardano substrati peptidici,³ membrane artificiali,⁴ inibitori per proteine,⁵ etc. È stato dimostrato nel Capitolo IV come il *dynamic covalent capture* possa essere applicato anche nello sviluppo di catalizzatori artificiali, permettendo l'autoselezione di gruppi funzionali che assistono nella catalisi intramolecolare.⁶ Uno dei punti chiave in questo tipo di studi riguarda la determinazione della costante dell'equilibrio dinamico in esame, dal momento che essa è correlata direttamente alla forza dell'interazione non covalente. I metodi di screening convenzionali sono limitati in quanto richiedono la conoscenza delle caratteristiche chimiche di ogni componente in funzione della tecnica analitica utilizzata. Nel Capitolo 3 è stato presentato un metodo di screening innovativo basato sull'utilizzo della spettrometria ¹H-¹³C HSQC NMR per l'analisi delle complesse miscele di idrazoni in una libreria covalente dinamica.⁷ Esso permette non solo di determinare la composizione termodinamica di una libreria, ma anche la sua cinetica di formazione fino al raggiungimento dell'equilibrio. Purtroppo però esso richiede una strumentazione avanzata e presenta limitazioni per quanto riguarda le concentrazioni che si possono indagare.

L'interesse è stato focalizzato sullo sviluppo di una nuova metodologia volta a permettere lo screening della stabilità degli idrazoni utilizzando la spettrofotometria UV/Vis. Essa non è intesa quindi a risolvere complesse miscele, piuttosto è focalizzata sull'analisi di un singolo equilibrio termodinamico. La facilità con cui esso può essere condotto permette di applicarla allo screening parallelo, ottenendo così in tempi rapidi e in maniera semplice la costante termodinamica di numerosi equilibri.

La composizione dell'equilibrio covalente dinamico è determinata non prendendo in considerazione il composto *target*, ma in maniera indiretta misurando la concentrazione del composto *reporter* rimasto dopo il raggiungimento dell'equilibrio. Questo è possibile facendolo reagire con uno *scavenger* in modo da generare un caratteristico segnale UV/Vis, indipendente dalla struttura molecolare del *target* (Fig. 5.1).

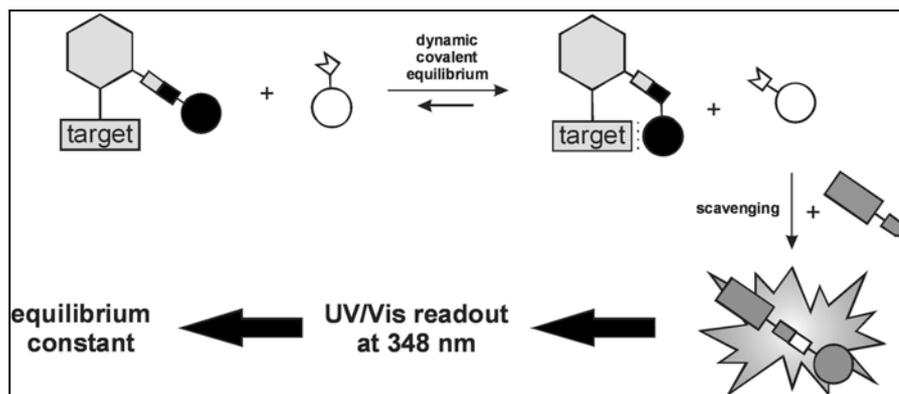


Figura 5.1: metodo di analisi ottica indiretta proposto.

In questo capitolo è discusso questo nuovo approccio in cui un segnale ottico è generato in relazione alla stabilità termodinamica dell'idrazone in esame, verificando i dati ottenuti via NMR.

§ Parte dei dati presentati in questo capitolo sono in corso di pubblicazione
G. Gasparini, F. Bettin, P. Scrimin, L. J. Prins,

5.2 Scelta delle molecole

La nuova strategia di screening richiede che un segnale ottico venga generato in relazione alla stabilità termodinamica dell'idrazone oggetto di studio. L'idea di base è quella di accoppiare la concentrazione dell'idrazone di interesse con quella di un idrazone dal caratteristico spettro di assorbimento UV/Vis (molecola *reporter*): un'unica misura permette di conoscere la concentrazione di quest'ultima molecola e, di riflesso, quella di interesse.

Dal momento che tutte le idrazidi sono analizzate rispetto alla stessa idrazide di riferimento, è più conveniente focalizzarsi sulla determinazione della concentrazione di quest'ultima piuttosto che di quella *target*. Siccome in questo caso non è richiesta nessuna struttura particolare per quanto riguarda l'idrazide di riferimento, essa può essere scelta in modo tale da essere in grado di generare un segnale caratteristico. E' stata quindi utilizzata l'idrazide **N** al posto dell'idrazide **A**, in quanto essa, in seguito a condensazione con la *trans*-cinnamaldeide (**4**) (Fig. 5.2), porta alla formazione di un idrazone dal caratteristico spettro di assorbimento, dovuto alla presenza di un sistema *push-pull*, come osservato da Herrmann, Lehn *et al.*⁸

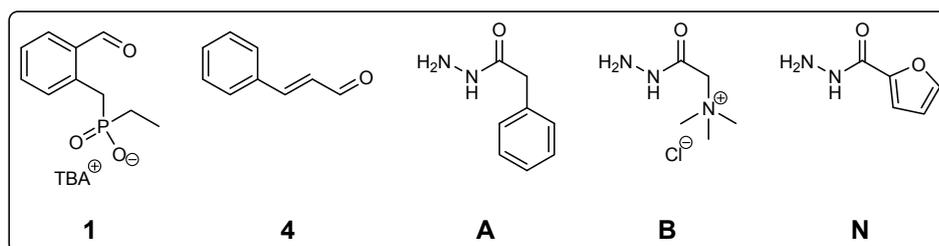


Figura 5.2: molecole usate per validare il sistema.

E' stato utilizzato per verificare l'applicabilità del sistema proposto l'equilibrio coinvolgente l'aldeide **1**, in quanto il suo comportamento è ben noto. Essa è stata fatta competere per la formazione degli idrazoni con una idrazide in esame (ad esempio **B**) e quella *reporter* **N**. Una volta raggiunto l'equilibrio termodinamico è stato messo a punto un protocollo tale per cui, in seguito all'aggiunta di **4**, è possibile accedere, attraverso una sola misura UV/Vis, alla concentrazione degli idrazoni **1X** e **1N** presenti all'equilibrio e, quindi, alla costante termodinamica che lo regola.

Si sono scelte in prima battuta per gli studi con la molecola *reporter* le idrazidi **A** e **B**, perchè il loro utilizzo permette un confronto con i dati dell'equilibrio tra gli idrazoni **1A** e **1B** ottenuti in precedenza, verificando così l'accuratezza dei valori ottenuti dalle misure spettrofotometriche.

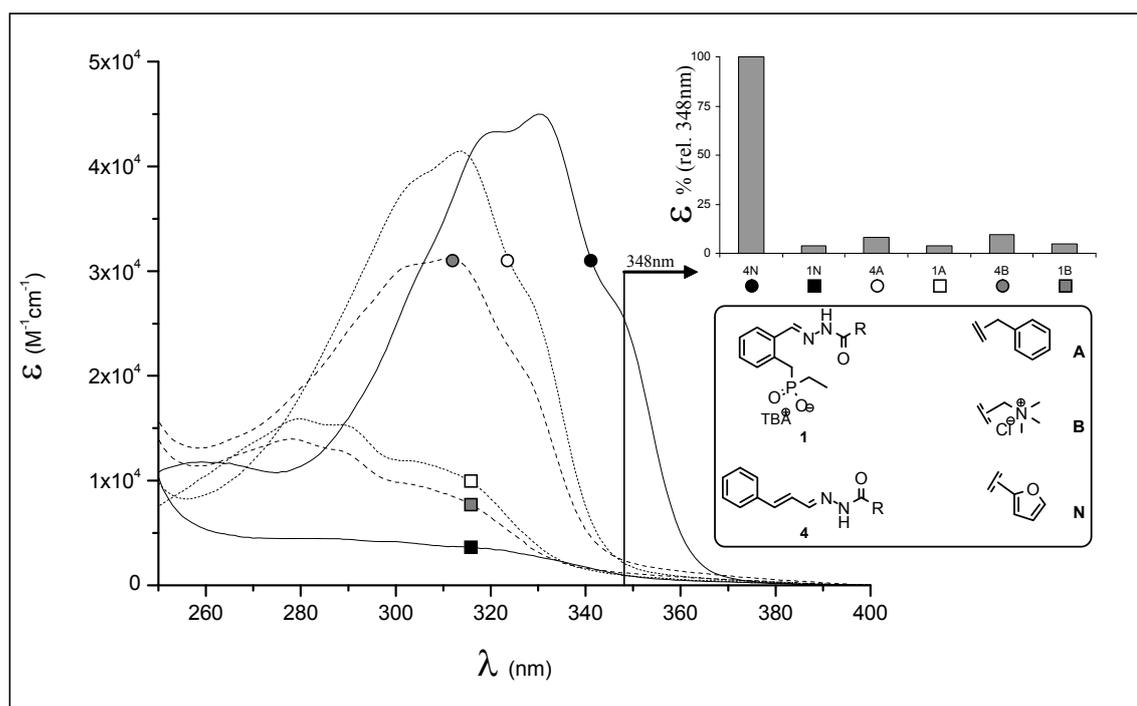


Figura 5.4: assorbimenti UV/vis delle specie considerate.

5.5 Cinetiche di scambio e studi di competizione

Utilizzando gli idrazoni preformati, sono state eseguite delle cinetiche di scambio delle idrazidi. Esse permettono di acquisire dati importanti relativi al tempo necessario al sistema per raggiungere l'equilibrio termodinamico. Inoltre, una volta raggiunto quest'ultimo, è possibile verificare, tramite la distribuzione dei prodotti, la costante termodinamica che regola l'equilibrio stesso ottenuta dal rapporto delle costanti cinetiche, determinando la stabilità relativa degli idrazoni.

Le prime cinetiche di scambio sono state condotte utilizzando la piattaforma **4**. L'idrazone **4N** (5mM) è stato aggiunto ad una soluzione 1 mM (0.2 eq) di idrazide **N** e 6 mM di idrazide **B** (1.2 eq) in solvente misto $CD_3OD/DMSO-d_6$ 85 : 15. E' stata necessaria l'aggiunta di dimetilsolfossido in quanto la solubilità degli idrazoni derivanti dalla cinnamaldehyde non è elevata in metanolo puro. La soluzione è stata mantenuta a 40 °C e la cinetica di scambio è stata seguita via NMR, monitorando la diminuzione dei segnali imminici dell'idrazone **4N** e la comparsa di quelli relativi all'idrazone **4B**.

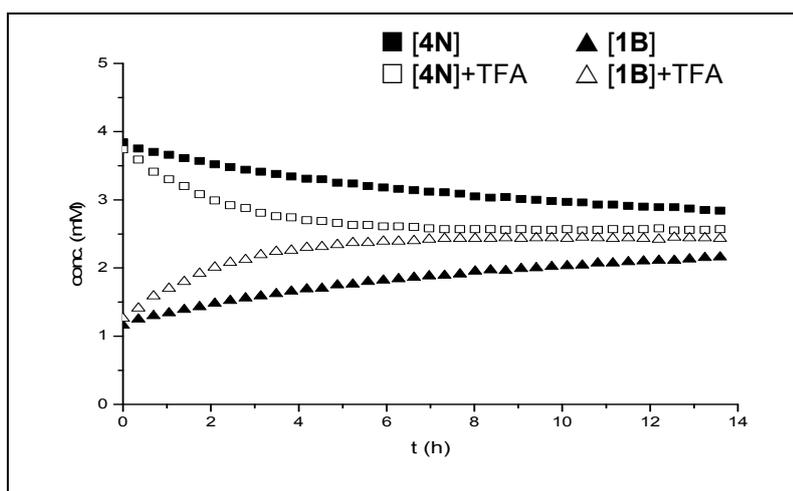


Figura 5.5: influenza del TFA sulla cinetica di scambio.

Purtroppo però la cinetica di scambio di questo sistema si è rivelata troppo lenta per permettere una sua successiva applicazione, in quanto ha richiesto più di 2 giorni per giungere all'equilibrio (Fig. 5.5). L'esperimento è stato così ripetuto aggiungendo alla soluzione in esame 0.1 eq di acido trifluoroacetico, il quale funge da catalizzatore protonando l'azoto imminico dell'idrazone, rendendolo più reattivo verso l'attacco nucleofilo. Applicando una procedura analoga, sono state eseguite le cinetiche di scambio degli altri idrazoni in esame. I risultati ottenuti sono schematizzati in tabella 5.1.

$\frac{k_{\text{dir}}}{k_{\text{ind}}}$	$k_{\text{dir}} \times 10^{-2}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$k_{\text{ind}} \times 10^{-2}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	K_{eq} (rapporto)	ΔG (KJ/mol)
$1\text{A} + \text{B} \rightleftharpoons 1\text{B} + \text{A}$	3.60	2.59	1.39	- 0.9
$1\text{N} + \text{A} \rightleftharpoons 1\text{A} + \text{N}$	67.1	29.2	2.30	- 2.1
$1\text{N} + \text{B} \rightleftharpoons 1\text{B} + \text{N}$	9.78	2.90	3.37	- 3.1
$4\text{N} + \text{A} \rightleftharpoons 4\text{A} + \text{N}$	1.01	1.03	0.98	+ 0.16
$4\text{N} + \text{B} \rightleftharpoons 4\text{B} + \text{N}$	0.33	0.29	1.13	- 0.31

Tabella 5.1

Analizzando le costanti di equilibrio ottenute con la cinnamaldehyde si può vedere che il sistema raggiunge una distribuzione pressochè statistica tra i due idrazoni in esame (con l'idrazide **B** si ottiene $4\text{B} : 4\text{N} = 52 : 48$, mentre con **A** si ottiene $4\text{A} : 4\text{N} = 49 : 51$), infatti le costanti di equilibrio sono molto vicine all'unità.

Nel caso della piattaforma **1**, invece, l'equilibrio è sfavorito nei confronti dell'idrazone **1N**, sia utilizzando l'idrazide con il gruppo carico, sia quella fenilacetica ($1\text{B} : 1\text{N} = 69 : 31$, $K_{\text{eq,BN}}=3.37$; $1\text{A} : 1\text{N} = 61 : 39$, $K_{\text{eq,AN}}=2.30$). In ogni caso, confrontando la stabilità di **1B** con quella di **1A** in questo nuovo sistema comprendente l'idrazone **1N**, facendo cioè il rapporto tra le loro costanti di equilibrio relative ad **N** ($K_{\text{eq,BN}}/K_{\text{eq,AN}}$), si ottiene con eccellente

approssimazione la costante dell'equilibrio tra **1A** e **1B**, che conferma i dati di amplificazione ottenuti in precedenza (Capitolo 2).

Esaminando le costanti cinetiche appare evidente la differenza di reattività delle due piattaforme: la piattaforma **4** è circa un ordine di grandezza meno reattiva di quella recante il fosfonato che, proprio per la presenza di quest'ultimo, è maggiormente attivata. In ogni caso, anche considerando la cinetica di scambio più lenta, la presenza del TFA rende possibile il raggiungimento dell'equilibrio termodinamico in circa 12 ore, tempo compatibile con la stabilità dei composti.

5.6 Correlazione NMR-UV/Vis in un sistema a quattro componenti

I dati ottenuti dalle cinetiche hanno permesso di verificare che il sistema è in grado di scambiare le idrazidi, in presenza di catalizzatore, fino al raggiungimento dell'equilibrio termodinamico. Si sono quindi studiati sistemi più complessi, in cui sono presenti quattro idrazoni, per verificare se esista una corrispondenza tra la quantificazione che può essere eseguita tramite NMR con quella ottenuta dall'analisi UV/Vis. Infatti, nonostante sia stato dimostrato che l'idrazone *reporter* **4N** presenta a 348 nm un coefficiente di estinzione molare talmente elevato da poter essere ritenuti trascurabili quelli degli altri idrazoni, bisogna verificare che questo comportamento venga mantenuto anche in un sistema dove sono presenti molteplici specie chimiche.

Sono stati utilizzati per la quantificazione via NMR i segnali imminici caratteristici di ciascuno dei quattro idrazoni presenti nella miscela. Avendo in alcuni casi delle sovrapposizioni di questi segnali si è ricorsi ad un segnale caratteristico dell'anello furanico, che deriva dal protone legato al carbonio 3 (Fig. 5.6). Esso cade in una regione spettrale libera, compresa tra 6.5 e 6.7 ppm. La sua particolarità è che esso presenta uno *shift* caratteristico a seconda che esso appartenga all'idrazone (campi bassi) o all'idrazide **N** libera, per cui tramite la sua integrazione è possibile risalire alla quantità di questa specie in soluzione e, mediante delle deconvoluzioni, calcolare le concentrazioni anche degli altri idrazoni.

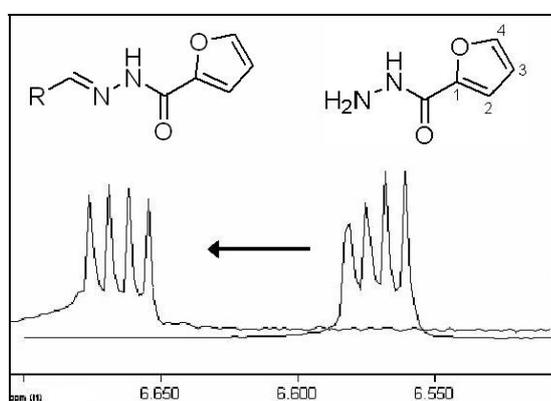


Figura 5.6: *shift* caratteristico del segnale dell'anello furanico.

La quantificazione via UV/Vis dell'idrazone **4N** è stata possibile utilizzando invece una retta di taratura. Essa permette di tradurre direttamente il valore di assorbanza a 348 nm della miscela nella concentrazione presente in soluzione.

5.6.1 Sistema con A ed N

In primo luogo sono stati studiati sistemi contenenti le idrazidi **A** ed **N**. Sono stati posti a reagire gli idrazoni preformati **1A** e **4N** (5mM ciascuno) in presenza di un leggero eccesso di idrazidi **A** e **N** libere (1mM ciascuna, 0.2eq) e di una quantità catalitica di TFA (0.5mM, 0.1 eq). L'eccesso di idrazidi è necessario al fine di garantire la possibilità di scambio dei componenti. E' stato eseguito anche l'esperimento speculare, utilizzando gli idrazoni preformati **1N** e **4A**, in modo da verificare che il sistema giunga alla stessa distribuzione partendo dai due estremi (Fig. 5.7).

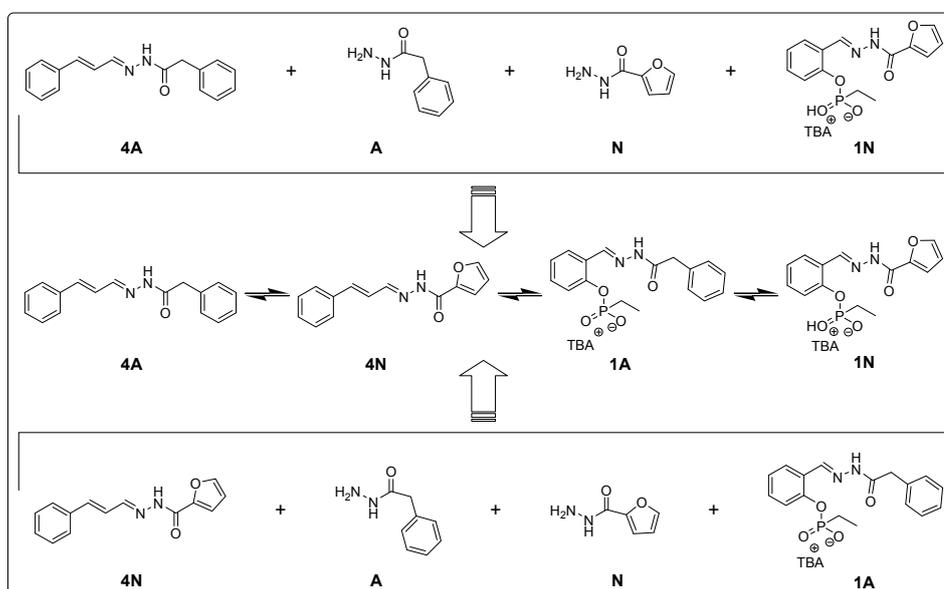


Figura 5.7: verifica del raggiungimento dell'equilibrio (CH₃OD, T = 40 °C).

L'equilibrio termodinamico è stato raggiunto dopo due giorni; infatti, dopo questo periodo di tempo, entrambe le soluzioni presentano un rapporto tra gli idrazoni **1A** : **1N** : **4A** : **4N** pari a 60 : 40 : 42 : 58, determinato attraverso l'integrazione dei segnali NMR caratteristici.

E' importante sottolineare che il rapporto tra **1A** e **1N** è quasi coincidente a quello ottenuto in assenza dell'aldeide **4** (paragrafo 5.4, **1A** : **1N** = 61 : 39), segno che l'equilibrio della piattaforma **1** è dominante rispetto a quello tra **4A** e **4N**. Infatti l'aldeide **4** genera degli idrazoni α - β insaturi, i quali hanno intrinsecamente minore stabilità rispetto a quelli generati dall'aldeide aromatica **1**. Inoltre ora gli idrazoni **4A** e **4N** si trovano in rapporto 43 : 57 ([**4N**] = 2.85 mM), rispetto al 49 : 51 ottenuto in assenza di **1**, segno che la loro distribuzione si "adatta", in seguito alla reazione, a consumare le idrazidi rimaste in soluzione.

Per verificare la corrispondenza con UV/Vis dei dati ottenuti la miscela di idrazoni è stata diluita 100 volte (nel medesimo solvente misto usato per l'analisi NMR) e sottoposta a misura

spettrofotometrica. Quest'ultima ha permesso di stabilire una concentrazione di 2.98mM nella miscela originale, dato in buon accordo con quello ottenuto via NMR (2.85 mM da entrambi gli estremi di partenza).

5.6.2 Sistema con B ed N

Analogo esperimento è stato eseguito utilizzando l'idrazide **B**. In questo caso si è seguito lo scambio di idrazidi tra **1B** e **4N** e tra **1N** e **4B**, sempre con un leggero eccesso di idrazidi **B** ed **N** libere (0.2eq) (Fig. 5.8).

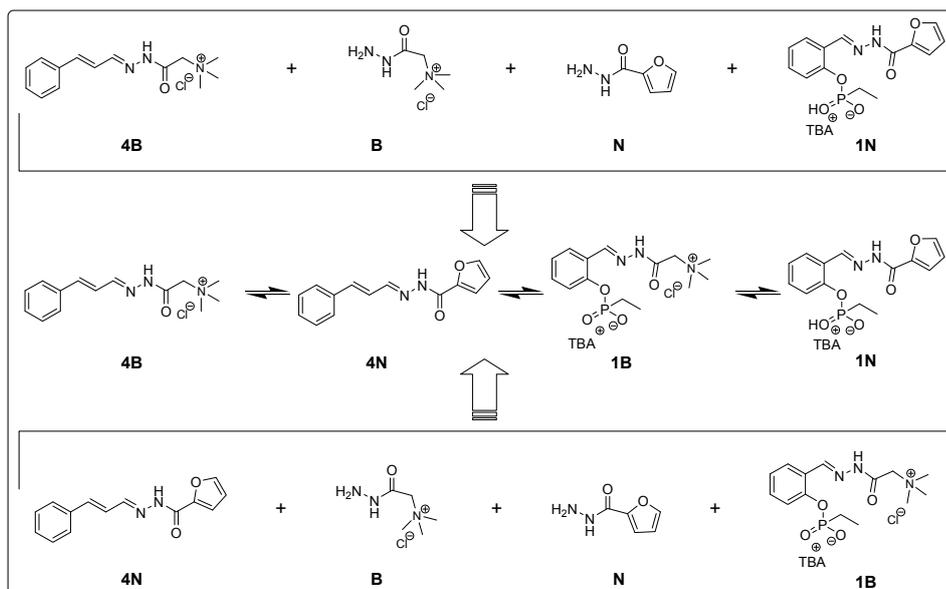


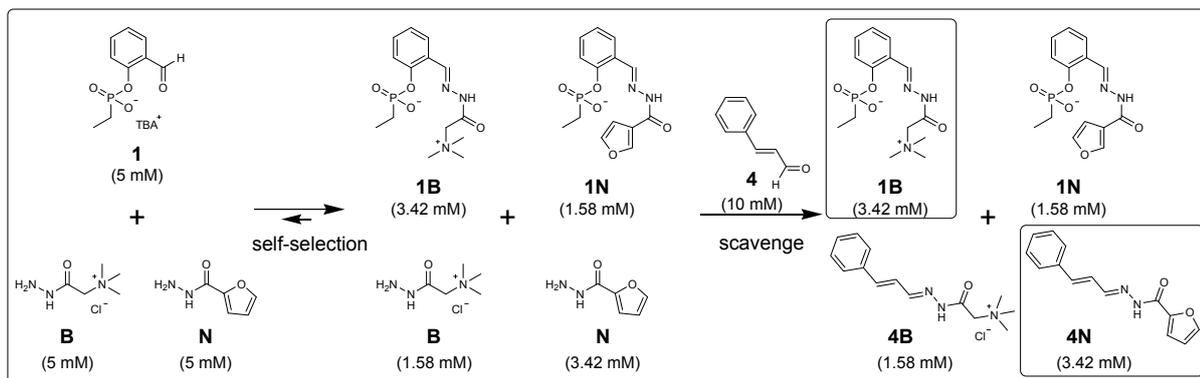
Figura 5.8: verifica del raggiungimento dell'equilibrio (CH₃OD, T = 40 °C).

Purtroppo, nonostante la presenza di acido trifluoroacetico (0.5mM, 0.1eq) come catalizzatore, il sistema in cui sono presenti **1N** e **4B** impiega un tempo troppo lungo per raggiungere l'equilibrio. Si assiste infatti alla comparsa di nuovi segnali, probabilmente dovuti alla decomposizione degli idrazoni, impedendo così una corretta quantificazione di quest'ultimi. L'esperimento speculare, invece, giunge all'equilibrio prima della comparsa di prodotti di decomposizione, rendendo così possibile la quantificazione delle specie in soluzione. Infatti integrando i segnali caratteristici si ottiene un rapporto 67 : 33 : 38 : 62 per **1B**, **1N**, **4B** e **4N**, rispettivamente. L'analisi UV/Vis della miscela ha permesso una quantificazione di **4N** pari a 3.35 mM nella miscela originale, in perfetto accordo con quanto trovato via NMR (3.31 mM).

5.7 Protocollo per la misura indiretta dell'equilibrio

Gli esperimenti appena presentati hanno permesso di dimostrare la perfetta coerenza tra la quantificazione NMR ed UV/Vis dell'idrazone **4N** nelle miscele complesse. La corretta quantificazione spettrofotometrica dell'idrazone *reporter* non è però sufficiente, in quanto la sua concentrazione deve rispecchiare esattamente quella dell'idrazone in esame per permettere una misura indiretta dell'equilibrio termodinamico di quest'ultimo. E' stato così sviluppato un protocollo che prevede una iniziale competizione tra l'idrazide in esame e quella *reporter* per la piattaforma **1**, seguito dallo *scavenging* delle idrazidi in eccesso usando la cinnamaldeide **4**. Il nuovo protocollo sviluppato è stato testato sul sistema comprendente l'idrazide **B**, che aveva dato i problemi maggiori.

La piattaforma **1** è stata lasciata quindi equilibrare in una soluzione contenente 1 eq di ciascuna idrazide **B** ed **N**. Entro 2 ore dal mescolamento il sistema raggiunge l'equilibrio termodinamico, verificato tramite NMR, in cui i due idrazoni **1B** e **1N** si trovano in rapporto 68 : 32. Esso è leggermente minore di quanto trovato in precedenza (paragrafo 5.4) in quanto la quantità totale di idrazidi presenti è minore (2.0 eq anziché 2.4). La concentrazione di **1B** presente è 3.42 mM e, per questioni di bilancio di massa, essa corrisponde alla quantità di idrazide **N** libera (Schema 5.1).



Schema 5.1

A questo punto sono stati aggiunti 2 eq di *trans*-cinnamaldehyde **4**, ottenendo una conversione quantitativa delle idrazidi in eccesso negli idrazoni **4B** e **4N**. La formazione dei prodotti è quantitativa in circa 2 ore dall'aggiunta (Fig. 5.9), grazie alla presenza di 2 eq di aldeide, che previene il rallentamento della cinetica dovuto all'esaurimento delle specie in soluzione.

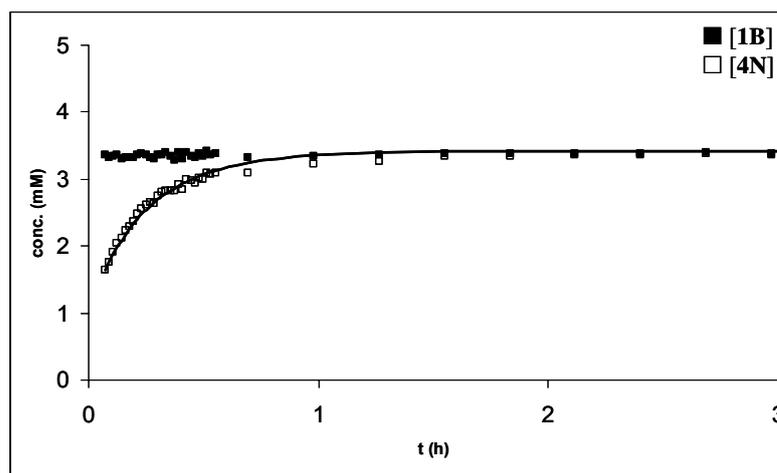


Figura 5.9: cinetica di formazione dell'idrazone **4N** in seguito a *scavenging*.

Il grafico in figura 5.9 permette inoltre di verificare che l'aggiunta della cinnamaldeide non ha alcun effetto sulla concentrazione degli idrazoni **1B** e **1N**, che rimane costante.

Tramite analisi NMR è stato possibile confermare che nella miscela finale gli idrazoni **1B** (*target*) e **4N** (*reporter*) sono presenti in rapporto equimolare. L'analisi UV/Vis della soluzione permette di ricavare la concentrazione dell'idrazone *reporter* **4N**, pari a 3.37 mM, che è in eccellente accordo con quanto ottenuto via NMR.

5.7.1 Screening UV/Vis su un set di idrazidi

Dopo aver stabilito le condizioni sperimentali ottimali al fine di riuscire a determinare l'andamento di un equilibrio utilizzando l'idrazone **4N** come molecola *reporter*, si è esteso lo studio sul set di idrazidi usate in precedenza (paragrafo 3.2) (Fig 5.10). Sono state scartate in questo tipo di studio le idrazidi **D**, **E**, **G** e **H**, in quanto, nella loro forma libera, presentano un'assorbanza considerevole a 348 nm.

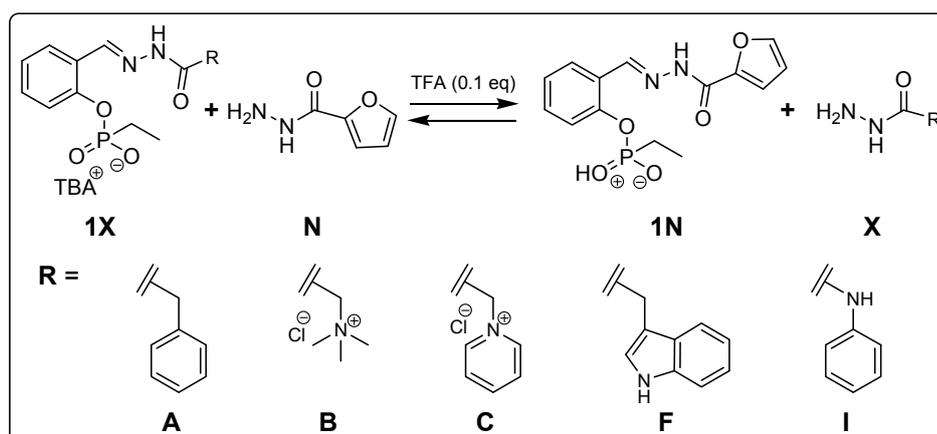
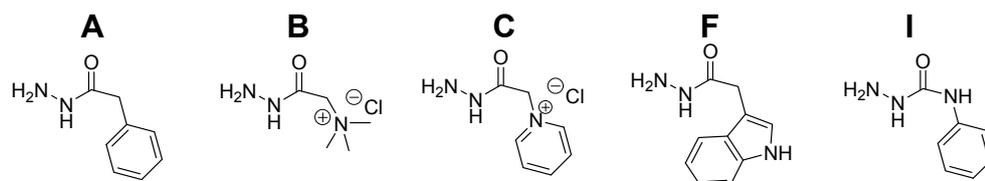


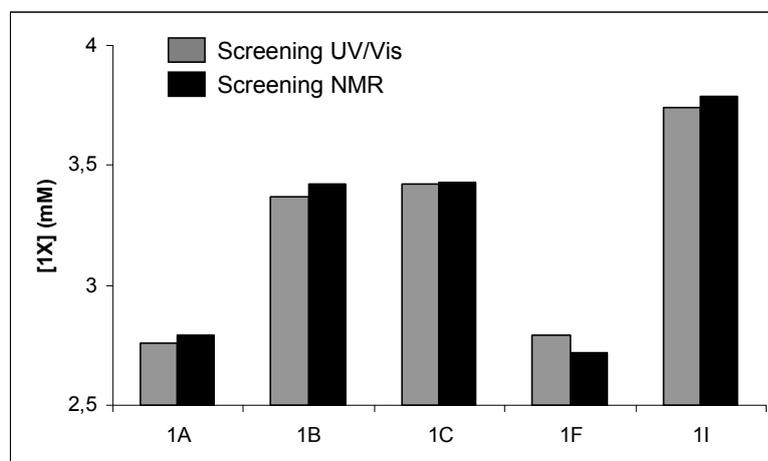
Figura 5.10: set di idrazidi studiate.



A_{348}	0.7669	0.9281	0.9418	0.7758	1.0267
[4N] mM UV/Vis	2.76	3.37	3.42	2.79	3.74
[1X] mM NMR	2.79	3.42	3.43	2.72	3.79

Tabella 5.2

L'aldeide **1** è stata quindi aggiunta ad una miscela costituita dall'idrazide in esame e quella *reporter* **N** (1 eq ciascuna). Dopo 5 ore è stata aggiunta l'aldeide **2** e la soluzione è stata lasciata a 40°C per due giorni. La concentrazione degli idrazoni in esame è stata misurata sia direttamente dallo spettro NMR, sia in maniera indiretta tramite misura dell'assorbanza della miscela a 348 nm. L'eccellente corrispondenza tra i due valori dimostra la validità di questa metodologia di screening, che permette di ottenere informazioni su un equilibrio chimico attraverso un'unica lettura di assorbanza di una specie *reporter* (Fig. 5.11).

Figura 5.11: confronto tra *screening* UV/Vis (barre grigie) ed NMR (barre nere).

5.8 Condizioni essenziali

L'esperimento appena discusso illustra la possibilità di analizzare un equilibrio termodinamico in maniera indiretta tramite una sola misura UV/Vis. Questo tipo di approccio può avere applicabilità generale laddove si vogliono analizzare reazioni competitive. Non è infatti limitato allo studio di equilibri covalenti dinamici, ma il suo principio può essere esteso con successo anche alle reazioni covalenti.

Esistono però delle condizioni essenziali che devono essere soddisfatte affinché la procedura possa dare risultati attendibili. In primo luogo è assolutamente essenziale che la

reazione di *scavenging* non alteri la composizione dell'equilibrio in esame. Questo implica che deve avvenire con tempi molto più rapidi rispetto alla reazione di scambio, in modo da prevenire la risposta dell'equilibrio alla variazione della concentrazione delle specie libere. Nel caso in esame, misure cinetiche hanno dimostrato che la costante cinetica bimolecolare della reazione di formazione degli idrazoni **4X** è circa 40 volte maggiore rispetto alla formazione dello stesso prodotto attraverso la reazione di scambio. Infatti la velocità di formazione di **4N** per condensazione tra l'aldeide **4** e l'idrazide **N** ha una costante di secondo ordine di $k_{2+B} = 0.12 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, mentre la formazione dello stesso idrazone mediante reazione di scambio dall'idrazone **4B** presenta una costante cinetica pari a $k_{2A+B} = 2.93 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

E' importante notare che è il periodo immediatamente successivo all'aggiunta della *trans*-cinnamaldeide **4** il più critico per le possibili ripercussioni sull'equilibrio in esame, dal momento che la velocità di scambio progressivamente diminuisce con la scomparsa delle idrazidi libere. Una volta reagite tutte le idrazidi, il sistema rimane "congelato" dal momento che manca uno dei reagenti nella reazione di scambio.

Altra considerazione importante riguarda la necessità di far reagire completamente le idrazidi rimaste dopo l'equilibrizzazione. Infatti, per avere corrispondenza tra la concentrazione della molecola *target* con quella *reporter* è fondamentale che tutto l'eccesso di idrazidi venga consumato. Per dimostrare ciò è stato eseguito un esperimento con un eccesso di idrazidi, le quali però non sono poi state completamente sequestrate con la cinnamaldeide **4**.

L'aldeide **1** (5 mM) è stata aggiunta ad una soluzione contenente 5 eq di ciascuna idrazide **B** ed **N** (25 mM ciascuna). Il sistema raggiunge l'equilibrio termodinamico quando il rapporto tra gli idrazoni **1B** e **1N** è pari a 75 : 25 ($[\mathbf{1B}] = 3.75 \text{ mM}$, $[\mathbf{1N}] = 1.25 \text{ mM}$) (più elevato di quanto ottenuto precedentemente a causa del maggior eccesso di idrazidi). A questo punto è stato aggiunto solo 1 eq di cinnamaldeide **4**. Come è facilmente intuibile, l'eccesso di idrazidi presenti rende la distribuzione degli idrazoni **4B** e **4N** completamente indipendente da quella di **1B** e **1N**, in quanto essa riflette unicamente la stabilità termodinamica relativa tra i due idrazoni con la cinnamaldeide. Si ottiene così una distribuzione tra i due idrazoni **4B** e **4N** pari a 51 : 49 ($[\mathbf{4B}] = 2.56 \text{ mM}$, $[\mathbf{4N}] = 2.44 \text{ mM}$).

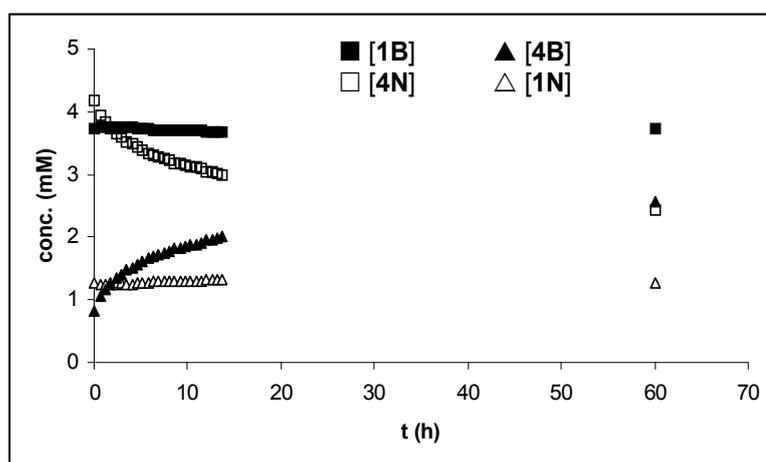


Figura 5.12: ottenimento di una distribuzione statistica per **4B** e **4N**.

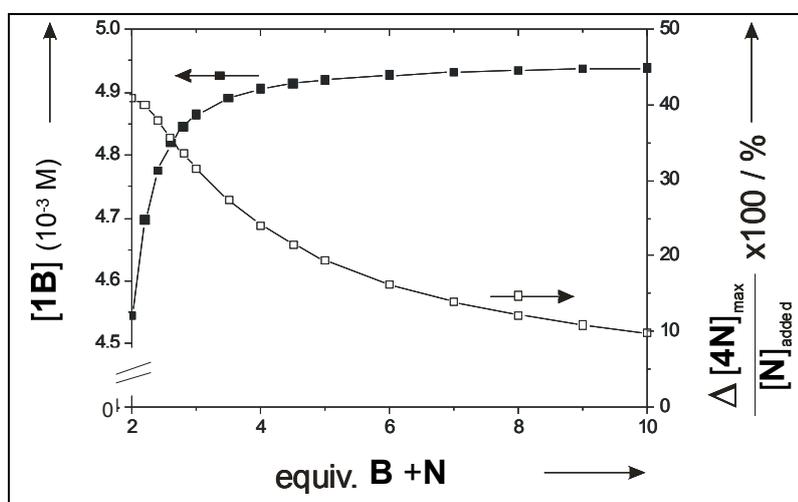
Questo esperimento permette di notare inoltre che è necessario un tempo lungo per raggiungere l'equilibrio dopo l'aggiunta della *trans*-cinnamaldeide ed effettuare così la lettura UV/Vis. Infatti immediatamente dopo l'aggiunta si formano gli idrazoni **4N** e **4B** con velocità elevata (in figura 5.12 non si vede la loro formazione), essi poi devono subire reazione di scambio dell'idrazide fino al raggiungimento dell'equilibrio termodinamico, che per questo sistema richiede circa 60 ore. E' importante notare che, anche in questo caso, l'aggiunta di **4** non altera l'equilibrio tra gli idrazoni **1B** e **1N**, le cui concentrazioni rimangono costanti.

Nel protocollo messo a punto per l'analisi ottica indiretta dell'equilibrio si usa un eccesso di aldeide **4** (2 eq), questo perchè oltre a garantire la completa reazione delle idrazidi rimaste, permette inoltre di evitare il rallentamento della cinetica a causa dell'esaurimento delle idrazidi libere.

5.9 Massimizzazione del segnale

Come è stato discusso nel Capitolo 1, la composizione termodinamica di un equilibrio covalente dinamico è influenzata dall'eccesso dei componenti presenti. Sono state quindi eseguite delle simulazioni al computer in maniera tale da determinare le condizioni ideali per ottenere la migliore risposta possibile da un punto di vista del segnale ottico.

E' stato simulato l'equilibrio tra **1B** e **1N**, imponendo che la stabilità termodinamica di quest'ultimo fosse 100 volte inferiore rispetto a quella dell'idrazone carico. Ciò è stato ottenuto in maniera pratica imponendo $K_{eq} = 0.01$ per l'equilibrio rappresentato in figura 5.10. Le concentrazioni all'equilibrio di **1B** seguono il profilo rappresentato in figura 5.13. E' importante sottolineare che in questa simulazione non è stata considerata la formazione di complessi intermolecolari che portano alla perdita di amplificazione quando è usato un largo eccesso (maggiore di 10 eq) di idrazidi (vedi Capitolo 1).

Figura 5.13: profilo di concentrazione per **1B** e risposta ottica del sistema al variare della quantità di idrazidi

Con un piccolo eccesso di idrazide **B** essa, man mano che forma l'idrazone più stabile **1B**, va in esaurimento, favorendo così statisticamente l'altra. Per questo motivo il rapporto massimo **1B/1N** è ottenuto solo quando almeno 6 eq di idrazidi sono presenti. La variazione assoluta massima della concentrazione di **1B** si ha quindi in condizioni di eccesso di idrazidi presenti, favorevole per la generazione di un segnale ottico di elevata intensità. Tuttavia, anche il segnale del *background* aumenta con l'aumentare delle idrazidi presenti, in quanto tutte quelle che non reagiscono con **1** devono poi essere sequestrate dall'aldeide **4**.

Per esempio, simulando un esperimento con 10 eq totali di idrazidi **B** e **N** (25 mM ciascuna), ammettendo una stabilità 100 volte inferiore dell'idrazone **1N** rispetto ad **1B** ($K_{eq} = 0.01$), si ottiene una concentrazione massima di quest'ultimo pari a 4.94 mM. In caso questa stabilizzazione non fosse presente (**1B** e **1N** sono isoenergetici, $K_{eq} = 1.00$) si otterrebbe una distribuzione statistica (2.50 mM ciascuno). La differenza massima ottenibile in termini di concentrazione è quindi 2.44 mM. Di conseguenza, la differenza di concentrazione dell'idrazide **N** rimasta in soluzione (e, quindi, dell'idrazone **4N** dopo lo *scavenging*) tra i due casi sarà compresa tra 24.94 e 22.50 mM, che implica una variazione massima dell'intensità del segnale di solo il 10%. Il profilo della variazione relativa massima della concentrazione di **N** rimasta, in funzione della quantità di idrazide aggiunta (Fig. 5.13), indica le migliori condizioni operative per questo protocollo. Un'ottima risposta del sistema si ha fino a circa 2.8 equivalenti totali di idrazide aggiunta, al di sopra dei quali l'incremento della concentrazione di **1B** non compensa più l'incremento del segnale del *background*.

5.10 Conclusioni

Lo screening di miscele permette, in un unico esperimento, di ricavare informazioni sia sulla cinetica che sulla termodinamica di un processo (Capitolo 3). Questo però ha luogo solo se si possiede un certo grado di conoscenza del sistema in esame e se si hanno a disposizione delle attrezzature dedicate. E' stato perciò sviluppato un metodo veloce ed accurato per la determinazione in maniera indiretta di un equilibrio chimico termodinamico. La scelta di considerare in maniera isolata i singoli equilibri che sono presenti in una miscela di più componenti è dettata dal fatto che, semplificando il sistema, risultano più facilmente accessibili le informazioni in esso contenute. Lo screening contemporaneo di grandi quantità di molecole richiederebbe però, con i metodi tradizionali quali spettroscopia NMR, cromatografia HPLC, spettrometria di massa, etc. l'ottimizzazione del protocollo di misura per ogni specifico composto in esame, operazione che, in caso di numerosi componenti, può rappresentare il collo di bottiglia dell'intero processo di ricerca.

In questo capitolo è stato presentato un modo per risolvere tale problema: il punto principale è rappresentato dalla disconnessione tra il tipo di specie di cui si vuole conoscere la costante di equilibrio e il segnale ad essa relativo. In questo caso l'attenzione non è incentrata sul composto in esame, ma essa viene focalizzata su una molecola *reporter* che si trova alla stessa concentrazione in seguito alla legge di azione di massa: misurare una o l'altra diventa perciò indifferente. Dal momento che la molecola *reporter* è sempre la stessa in tutte le analisi, è conveniente mettere a punto il metodo di misura su di essa.

Per rendere ancora più veloce e semplice la quantificazione delle specie all'equilibrio si è scelto di sfruttare la spettrometria UV/Vis, la quale, a differenza di altri metodi messi a punto in precedenza (vedi capitolo 3), richiede una strumentazione ed un *know-how* più elementari. Il metodo può però essere esteso, a seconda della molecola *reporter* scelta, anche verso l'utilizzo di spettroscopie diverse, come ad esempio la fluorescenza. Questo può permettere di risolvere i problemi di sovrapposizione degli assorbimenti nella regione caratteristica da molecole diverse da quella *reporter* (paragrafo 5.4.1). L'analisi ottica indiretta dell'equilibrio può perciò essere usata con successo nello screening parallelo di equilibri dinamici.

Con questo studio sono anche stati sottolineati alcuni aspetti importanti da tenere in considerazione per avere risposta ottimale da parte del sistema. Sono presenti infatti due contributi, i quali sono in contrapposizione tra loro. Da una parte l'equilibrio termodinamico richiede un eccesso di idrazidi per poter raggiungere l'amplificazione massima, dall'altra invece la risposta del segnale ottico diminuisce all'aumentare dell'eccesso a causa dell'aumento del segnale derivante dal *background*. Simulazioni al computer hanno dimostrato che conviene lavorare senza eccesso di idrazidi, con il rischio di sacrificare l'amplificazione dei componenti che possono dare i risultati migliori ma riuscendo a quantificare esattamente tutte le specie presenti all'equilibrio.

5.11 Parte sperimentale

5.11.1 Strumentazione

Per la descrizione dettagliata di tutta la strumentazione utilizzata si rimanda al Capitolo 2, paragrafo 9.1, pag. 47.

5.11.2 Materiali

Per la descrizione dettagliata dei materiali utilizzati si rimanda al Capitolo 2, paragrafo 9.2, pag. 48.

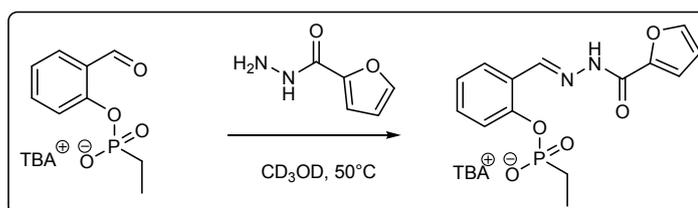
5.11.3 Sintesi e caratterizzazioni

Per la sintesi e caratterizzazione della piattaforma **1** si rimanda al Capitolo 2, paragrafo 9.3, pag. 49, mentre per la sintesi e caratterizzazione degli idrazoni con la piattaforma **1** si rimanda al Capitolo 3, paragrafo 8.3, pag. 81.

Procedura generale per la sintesi degli idrazoni

L'aldeide **1** o **4** è stata sciolta in metanolo deuterato e alla soluzione risultante è stato aggiunto 1 eq di idrazide. La miscela di reazione è stata mantenuta a 50°C fino a conversione completa (controllo TLC ed NMR).

Idrazone 1N



Schema 5.2

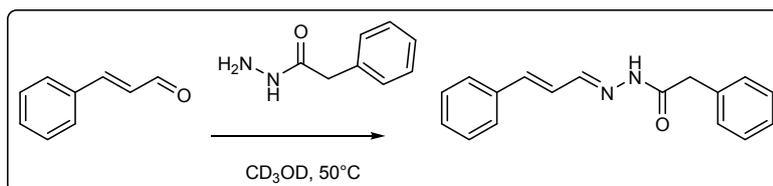
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.79 (s, 1H), 8.16 (d, 1H, J=7.71 Hz), 7.78 (s, 1H), 7.46-7.08 (m, 4H), 6.69 (q, 1H), 3.23 (m, 8H), 1.99 (s, 2H), 1.66 (m, 8H), 1.37 (m, 8H), 1.16 (dt, 3H, J=13.4Hz, J=27.3Hz), 0.96 (t, 12H, J=7.1Hz)

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 164.8, 157.5, 153.9 (d, J_{P-C}=7.8 Hz), 147.4, 147.1, 132.6, 127.6, 126.9 (d, J_{P-C}=4.6 Hz), 124.4, 122.3 (d, J_{P-C}=2.7 Hz), 116.9, 113.3, 59.5, 24.8, 22.9, 20.7, 13.9, 8.1.

³¹P-NMR (122 MHz, CDCl₃) proton decoupled δ (ppm): 28.2.

ESI-MS (-)CH₃OH, (m/z): 321 [M-H]⁻

Idrazone 4A



Schema 5.3

¹H-NMR isomero maggioritario (62%), (250 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.94 (dd, 1H, $J_1=2.75$ Hz $J_2=6.42$ Hz), 7.59-7.5 (m, 2H), 7.44-7.21 (m, 8H), 7.01-6.96 (m, 2H), 3.59 (s, 2H).

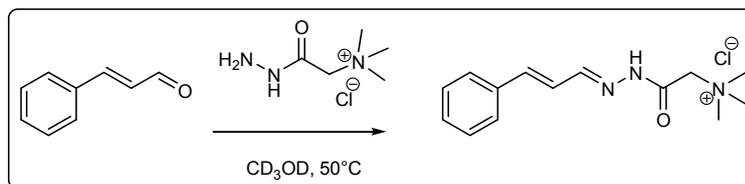
¹H-NMR isomero minoritario (38%), (250 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.78 (dd, 1H, $J_1=3.21$ Hz $J_2=5.501$ Hz), 7.59-7.5 (m, 2H), 7.44-7.21 (m, 8H), 7.01-6.96 (m, 2H), 3.99 (s, 2H).

¹³C-NMR isomero maggioritario (62%), (63 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 166.1, 149.6, 143.6, 143.2, 141.9, 137.2, 137.1, 130.6, 130, 128.5, 128.2, 125.6, 54.7.

¹³C-NMR isomero minoritario (38%), (63 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 166.1, 149.6, 143.6, 143.2, 141.9, 137.2, 137.1, 130.6, 130, 128.5, 128.2, 125.2, 55.

ESI-MS (+) CH₃OH+0.1%HCOOH, (m/z): 265 [M+H]⁺, 287 [M+Na]⁺

Idrazone 4B



Schema 5.4

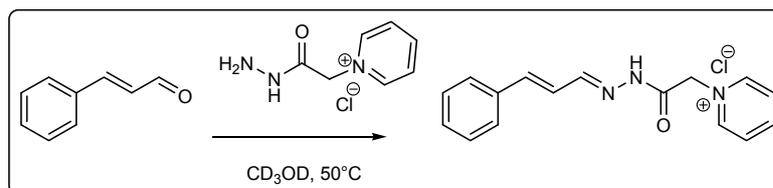
¹H-NMR isomero maggioritario (80%), (250 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.79 (d, $J=8.18$ Hz, 1H), 7.58-7.51 (m, 2H), 7.41-7.32 (m, 3H), 7.16-6.86 (m, 2H), 4.69 (s, 2H), 3.39 (s, 9H).

¹H-NMR isomero minoritario (20%), (250 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 8.45 (d, $J=8.18$ Hz, 1H), 7.58-7.51 (m, 2H), 7.41-7.32 (m, 3H), 7.16-6.86 (m, 2H), 4.29 (s, 2H), 3.39 (s, 9H).

¹³C-NMR isomero maggioritario (80%), (63 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 175.6, 151.5, 137.5, 130.6, 130.1, 129.7, 128.3, 125.8, 48.7, 42.3.

¹³C-NMR isomero minoritario (20%), (63 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 175.6, 148.2, 137.5, 130.6, 130.1, 129.7, 128.3, 125.8, 48.7, 40.1.

ESI-MS (+) CH₃OH, (m/z): 246 [M]⁺

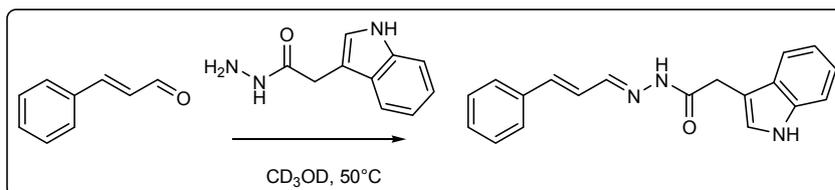
Idrazone 4C

Schema 5.5

¹H-NMR isomero maggioritario (84%) (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 8.90-8.96 (m, 2H), 8.68 (tt, $J = 7.89, 1.31$ Hz, 1H), 8.14-8.20 (m, 2H), 7.87 (d, $J = 8.53$ Hz, 1H), 7.55-7.58 (m, 2H), 7.34-7.43 (m, 4H), 6.94-7.11 (m, 3H).

¹H-NMR isomero minoritario (16%) (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 8.90-8.96 (m, 2H), 8.68 (tt, $J = 7.89, 1.31$ Hz, 1H), 8.14-8.20 (m, 2H), 8.05 (d, $J = 8.90$ Hz, 1H), 7.55-7.58 (m, 2H), 7.34-7.43 (m, 4H), 6.94-7.11 (m, 3H).

ESI-MS (+) CH₃OH, (m/z): 266 [M]⁺

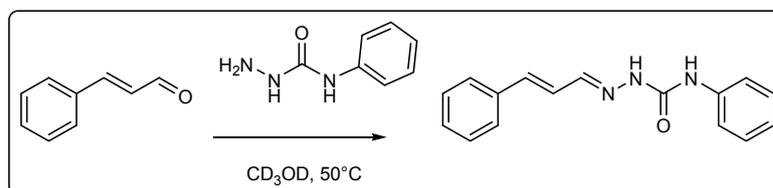
Idrazone 4F

Schema 5.6

¹H-NMR isomero maggioritario (70%) (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 8.02 (d, $J = 7.01$ Hz, 1H), 7.58-7.68 8m, 3H), 7.28-7.44 (m, 4H), 6.96-7.21 (m, 5H), 3.77 (s, 2H).

¹H-NMR isomero minoritario (30%) (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.86 (d, $J = 7.87$ Hz, 1H), 7.58-7.68 8m, 3H), 7.28-7.44 (m, 4H), 6.96-7.21 (m, 5H), 4.12 (s, 2H).

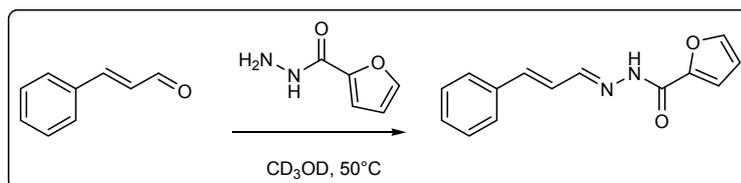
ESI-MS (+) CH₃OH+0.1%HCOOH, (m/z): 303 [M+H]⁺

Idrazone 4I

Schema 5.7

¹H-NMR (250 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.75 (d, $J = 8.39$ Hz, 1H), 7.54 (d, $J = 7.62$ Hz, 4H), 7.29-7.41 (m, 5H), 6.90-7.10 (m, 3H).

ESI-MS (+) CH₃OH+0.1%HCOOH,, (m/z): 266 [M+H]⁺

Idrazone 4N⁸

Schema 5.8

¹H-NMR (250 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 8.15 (t, $J=4.3$ Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.57 (dd, $J = 8.10$, 1.46 Hz, 2H), 7.28-7.42 (m, 4H), 7.06 (d, $J = 4.55$ Hz, 2H), 6.66 (dd, $J = 3.64$, 1.81 Hz, 1H).

¹³C-NMR (63 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 153.99, 149.75, 146.59, 145.73, 138.98, 135.82, 128.75, 127.03, 125.56, 114.91, 112.03.

ESI-MS (+) CH₃OH+0.1%HCOOH,, (m/z): 241[M+H]⁺, 263 [M+Na]⁺, 279 [M+K]⁺

5.11.4 Procedura generale per l'analisi ottica indiretta

La procedura prevede la preparazione di una soluzione 1 : 1 dell'idrazide in esame (**A**, **B**, **C**, **F** o **I**) e dell'idrazide *reporter* **N** in metanolo deuterato, in concentrazione 5 mM ciascuna. Vengono quindi aggiunti DMSO-*d*₆ (15%) e TFA (0.1 eq, 0.05 mM) e l'equilibratura ha inizio quando è aggiunto 1 eq di aldeide **1** (soluzione madre 75.3 mM in CD₃CN). Il solvente misto è quindi composto da : CD₃OD, DMSO-*d*₆ e CD₃CN in rapporto 70 : 15 :15, rispettivamente. La miscela di reazione è mantenuta a 40 °C per due ore, trascorse le quali 2 eq di *trans*-cinnamaldehyde **4** (10 mM) sono aggiunti da una soluzione madre in CD₃CN (237.8 mM, si trascura l'aumento di volume).

Trascorse altre due ore, la composizione della miscela viene determinata via ¹H-NMR. La misura dell'assorbanza a 348 nm viene eseguita nel medesimo solvente misto, dopo una diluizione di 100 volte. Il confronto dell'assorbanza misurata con la retta di taratura permette di ricavare la concentrazione di **4N** presente nella miscela originale.

5.11.5 Retta di taratura dell'idrazone 4N

La retta di taratura dell'idrazone **4N** è stata costruita misurando l'assorbanza a 348 nm di soluzioni a concentrazione nota (comprese tra 10 e 70 μM), ciascuna delle quali preparata per pesata dell'idrazone puro. I solventi utilizzati sono presenti in proporzione uguale a quella usata per gli esperimenti NMR.

$$\text{Area} = 0,0266[4\text{N}] + 0,033$$

$$R^2 = 0,9911$$

[4N] (μM)	Assorbanza
10	0,2684
15	0,3646
20	0,5787
25	0,7308
30	0,8850
35	1,0222
40	1,0842
50	1,3230
60	1,6902
70	1,8357

Tabella 5.3

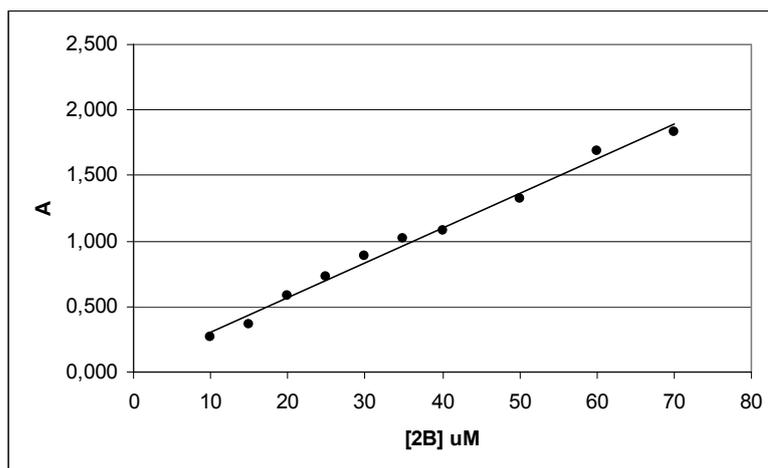


Figura 5.14

5.11.6 Implementazione del modello proposto

Il modello termodinamico proposto è stato sviluppato utilizzando il programma MicroMath Scientist per Windows, nella versione 2.01. Il sistema ha richiesto la riscrittura dell'equilibrio proposto in modo tale che fosse compatibile con il programma, come presentato nel paragrafo 2.9.5, escludendo la formazione di complessi intramolecolari (posta $K_{ab} = 0$).

5.12 Riferimenti bibliografici

- ¹ S. J. Rowan, S. J. Cantrill, G. R. L. Cousins, J. K. M. Sanders, J. F. Stoddart, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 898.
- ² L. J. Prins, P. Scrimin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, accettato per la pubblicazione.
- ³ M. G. Woll, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 11172.
- ⁴ S. M. K. Davidson, S. L. Regen, *Chem. Rev.*, **1997**, *97*, 1269.
- ⁵ D. A. Erlanson, A. C. Braisted, D. R. Raphael, M. Randal, R. M. Stroud, E. M. Gordon, J. A. Wells, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **2000**, *97*, 9367.
- ⁶ G. Gasparini, L. J. Prins, P. Scrimin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 2475.
- ⁷ G. Gasparini, B. Vitorge, P. Scrimin, D. Jeannerat, L. J. Prins, *Chem. Commun.*, **2008**, 3034.
- ⁸ B. Levrard, Y. Ruff, J. M. Lehn, A. Herrmann, *Chem. Commun.*, **2006**, 2965.

ELENCO PUBBLICAZIONI

E' di seguito riportato l'elenco delle pubblicazioni frutto del lavoro svolto durante il periodo di dottorato:

- G. Gasparini, L. J. Prins, P. Scrimin, *Chem. Commun.* **2007**, 1340-1342.
- G. Gasparini, L. J. Prins, P. Scrimin, *Angew. Chem Int. Ed.* **2008**, *47*, 2475-2479.
- G. Gasparini, B. Vitorge, P. Scrimin, D. Jeannerat, L. J. Prins, *Chem. Commun.*, **2008**, 3034-3036.

Limitations of the “tethering” strategy for the detection of a weak noncovalent interaction†

Giulio Gasparini, Marco Martin, Leonard J. Prins* and Paolo Scrimin*

Received (in Cambridge, UK) 29th November 2006, Accepted 2nd January 2007

First published as an Advance Article on the web 19th January 2007

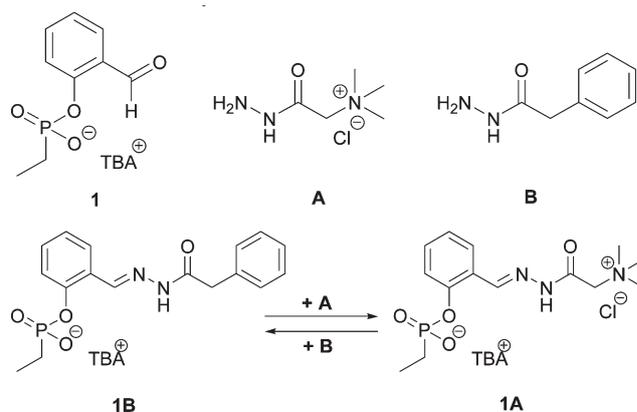
DOI: 10.1039/b617450g

The success of applying the tethering strategy in a synthetic molecular system strongly depends on the experimental conditions and is related to the strength of the noncovalent interaction and the competition between the ‘captured’ and unbound ligand for the recognition site.

In 2000 Erlanson and co-workers reported a brilliant strategy called “tethering” to discover ligands from a library that bind weakly to targeted sites on a protein (thymidylate synthase) through covalent reversible disulfide bond formation.^{1,2} Ligand selection without tethering would be impossible, because of the very weak affinity of the ligands for the protein. Since then, this strategy has been successfully applied for the selection of lead compounds for proteins such as IL-2,³ PTP-1B,⁴ and Tom20,⁵ and for the detection of self-templating peptides.⁶ Also synthetic systems are often characterized by weak noncovalent interactions, which means that, in principle, tethering should also be applicable for the selection of substrates for synthetic molecular receptors.⁷ One has only to mix the library of putative substrates to the selected host and evaluate which conjugate is most dominantly present at the thermodynamic equilibrium.⁸

For this reason we decided to apply “tethering” for the selection of a molecule able to bind to a phosphonate (as a model of the transition state of a carboxylate ester hydrolysis) in a protic solvent where electrostatic and hydrogen-bonding interactions are relatively weak. After preliminary studies it became immediately evident that the selection process was strongly dependent on the conditions used and in some cases no selection at all could be observed. Intrigued by this behavior we decided to analyze a very simple system in order to clarify possible limitations of the “tethering” approach in synthetic systems and establish its conditions of validity.

Therefore we reacted 2-ethylphosphonoxybenzaldehyde **1** (2 mM) with an excess (3 equivalents each) of hydrazides **A** and **B** in MeOH-*d*₄ at 50 °C to form the corresponding hydrazones **1A** and **1B**, and let the mixture equilibrate to form the most stable product.‡ Our obvious prediction was that hydrazone **1A** would be the preferred product because of the intramolecular electrostatic interaction between the ammonium and the phosphonate group. This prediction was confirmed by the 70 : 30 ratio of **1A** : **1B** observed at thermodynamic equilibrium.§ That this amplification



was caused by the presence of the phosphonate group was evidenced by the fact that the identical experiment using 2-methoxybenzaldehyde instead of **1** yielded both hydrazones in equal amounts (see ESI†). However, when the competition experiment was repeated with an increasing amount of hydrazides **A** and **B**, the ratio between the two hydrazones **1A** and **1B** decreased to 59 : 41 when 25 equivalents of each hydrazide were present. The dependence of the ratio between the two hydrazones and the number of equivalents of hydrazides present is shown in Fig. 1a (■). The curve reaches a maximum when 5 equivalents of both **A** and **B** are added, but then the relative ratio between the two products diminishes following a trend towards the complete disappearance of the amplification.¶ Noteworthy, for the control compound 2-methoxybenzaldehyde in all cases a hydrazone ratio of 50 : 50 was found independent of the excess of hydrazide present (see ESI†).

An amplification in a dynamic combinatorial library which is dependent on the reaction conditions is highly undesirable.⁹ In order to rationalize the observed trend in the formation of hydrazones **1A** and **1B**, we considered all possible equilibria present in solution (Scheme 1). Indeed one must consider not only the equilibrium between the two hydrazones **1A** and **1B** (K_{eq}), but also the possible interaction of the charged hydrazide **A** with each of them (defined by K_{AA} and K_{BA} , respectively).|| Such an interaction competes with the stabilizing interaction between the phosphonate and the ammonium present in **1A**, and therefore, the resulting complexes **1A·A** and **1B·A** are expected to have very similar stabilities ($K_{eq,c} \approx 1$). Notably, assuming $K_{eq,c} = 1$, the equilibrium concentrations depend only on two parameters (K_{eq} and K_{BA}), since these define also the third equilibrium constant ($K_{AA} = K_{BA}/K_{eq}$). We implemented this model in a software program and the experimental points were fitted (Fig. 1(a), curve a).** The model describes the observed experimental data more

Department of Chemical Sciences and CNR ITM Padova Section, University of Padova, via Marzolo 1, I-35131, Padova, Italy.

E-mail: leonard.prins@unipd.it; paolo.scrimin@unipd.it;

Fax: +39 049 8275239; Tel +49 8275276

† Electronic supplementary information (ESI) available: Synthesis and characterization of all compounds, description of the amplification experiments and simulations. See DOI: 10.1039/b617450g

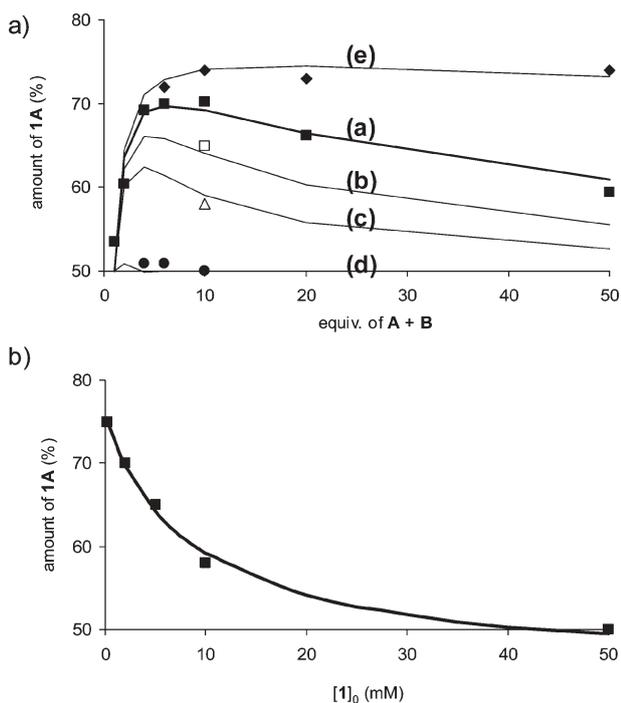
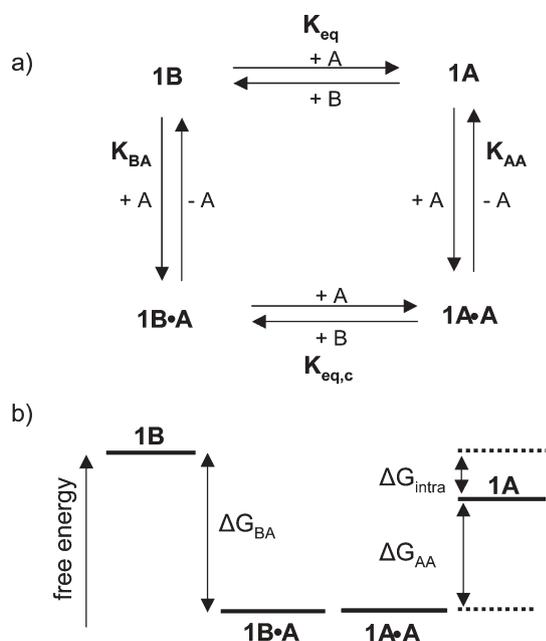


Fig. 1 (a) Amplification of **1A** as a function of the number of equivalents of hydrazides **A** and **B** present at various concentrations of **1** (◆: 0.2 mM; ■: 2 mM; □: 5 mM; △: 10 mM; ●: 50 mM). The solid lines represent either the obtained fit of the experimental data (a: [**1**] = 2 mM) or a simulation at different concentrations of [**1**] (b: [**1**] = 5 mM; c: [**1**] = 10 mM; d: [**1**] = 50 mM; e: [**1**] = 0.2 mM) using the model described in Scheme 1. (b) Observed amplification of **1A** as a function of the initial concentration of **1** in the presence of 5 equivalents of both **A** and **B**. The solid line represents the obtained fit using the model described in Scheme 1.



Scheme 1 (a) All equilibria taken into consideration to describe the amplification experiments. (b) Representation of the relative thermodynamic stabilities of the species involved.

than satisfactorily, yielding values for K_{BA} and K_{eq} of $58 (\pm 19) M^{-1}$ and $3.3 (\pm 0.3)$, respectively. These values clearly illustrate that the system is highly effective in detecting very weak noncovalent interactions, but, more importantly, also shed light on the problems of applying the tethering approach to synthetic systems.

Upon adding increasing amounts of hydrazides, complexes **1A·A** and **1B·A** become the dominant species and a concomitant drop in amplification occurs because the difference in free energy between these complexes is smaller than that between **1A** and **1B**. Confirmation for this hypothesis was obtained by rerunning the competition experiment at higher initial concentrations of **1** (5 and 10 mM) adding 5 equivalents of each hydrazide. Higher concentrations favor the formation of the complexes **1A·A** and **1B·A**, and, in fact, a drop of the original ratio of **1A** : **1B** = 70 : 30 to values of 65 : 35 and 58 : 42, respectively, was observed (Fig. 1(a), points □ and △, respectively). In addition, these values nicely correlate with the calculated values based on model simulations (imposing the previously determined equilibrium constants for K_{eq} , K_{AA} and K_{BA} , curves b and c in Fig. 1(a)). Finally, no amplification at all was observed for an initial concentration **1** of 50 mM in the presence of either 4, 6 or 10 equivalents of **A** and **B**, which is consistent with the model predictions (Fig. 1(a), curve d).

While the values of equilibrium constants K_{AA} and K_{AB} can not be changed, the formation of complexes **1A·A** and **1B·A** can be suppressed by working under more diluted conditions. Accordingly, we have rerun the competition experiment using 10 times more diluted solutions monitoring the equilibration with HPLC (Fig. 1(a)). Unfortunately, working at dilute concentrations has the obvious drawback of slowing down exchange kinetics. In fact, for the samples containing up to 6 equivalents of hydrazide even heating at 50 °C for 1 week was not sufficient to reach the thermodynamic equilibrium. However, for the samples that contained more than 6 equivalents of hydrazide, the observed amplification of **1A** turned out to be constant up to the final sample containing 50 equivalents of hydrazide. A decrease in amplification was no longer detected. In addition, the observed maximum ratio for **1A** : **1B** of 75 : 25 is in excellent agreement with the calculated value of $K_{eq} = 3.3$ obtained from the NMR experiments (which corresponds to a maximum ratio of 76 : 24 for **1A** : **1B**). This value represents the maximum amplification that can be obtained for the combination of these building blocks. Fig. 1(b) summarizes the experiments described above. The relative amount of hydrazone **1A** is given as a function of the initial concentration of **1** in the presence of 10 equivalents of hydrazide. It clearly shows how the selection of the most stable compounds strongly depends on the initial concentration of molecular receptor **1**. The solid line represents the fit using the same model as described before, yielding nearly identical values for K_{BA} and K_{eq} ($66 \pm 8 M^{-1}$ and 3.5 ± 0.2 , respectively).††

The optimum concentration that ensures the maximum amplification cannot be known *a priori* and this is, undoubtedly, a limitation of the “tethering” strategy. As a rule of thumb it is convenient to operate under high dilution conditions. These are very common conditions for the selection of targets for biomolecules,^{1–6} but much less for synthetic molecular systems. However, dilute conditions might depress the reaction rate to such an extent that it may require incredibly long reaction times to

reach the thermodynamic equilibrium. This may pose limits to the type of reversible reaction used for “tethering”. With this respect, it may be noteworthy that all successful (biological) applications of the “tethering” strategy^{1–7} rely on disulfide formation. Disulfide formation is a fast reaction and very compatible with polar solvents. As a final comment, it should be pointed out that the above limitations of the “tethering” strategy are present regardless of the type of molecular receptor considered.

Support by MIUR (contract 2003037580, PRIN 2003) and the University of Padova (Project CPDA054893) is gratefully acknowledged.

Notes and references

‡ All new compounds were characterized by ¹H, ¹³C and ³¹P NMR spectroscopy, ESI-MS and HPLC. See ESI†

§ The mixture composition was determined by integrating the respective signals for hydrazones **1A** and **1B** in the ¹H NMR spectrum. Throughout this study, the absence of any further changes in the ¹H NMR spectra upon standing at 50 °C was taken as an indicator that the thermodynamic equilibrium was reached. This was independently confirmed by a control experiment in which an identical ¹H NMR spectrum was obtained starting from two different mixtures (either preformed **1A** or preformed **1B**) upon standing at 50 °C (see ESI†).

¶ The observed amplification curve is not caused by a difference in ionic strength in the mixtures. In fact, the addition of an excess of tetramethylammonium chloride (TMACl, 100 mM) to mixture **1** : **A** : **B** = 2 : 12 : 12 mM caused only a minor decrease in the observed amplification (from 70 to 67%). In addition, rerunning the amplification experiment at constant ionic strength ([A] + TMACl = 50 mM) did not significantly affect the observed profile.

|| The formation of other species (for example dimer **1A·1A** as the most likely candidate) that may affect the final product distribution cannot be ruled out. However, the ¹H NMR spectra of hydrazone **1A** recorded at 2 and 25 mM (see ESI†) were superimposable, showing no indication whatsoever of dimerization. Therefore, we decided to use a minimal model involving only the thermodynamic equilibria required to explain the experimental observations.

** The model was implemented in MicroMath Scientist for Windows, version 2.01. A detailed description is given in the ESI.†

†† At thermodynamic equilibrium the model gives a ratio of 49 : 51 for **1A** : **1B** instead of 50 : 50 when [I]₀ = 50 mM. The reason is that the amount of hydrazone **A** involved in complex formation is subtracted from the amount of free **A**. Consequently, the slightly higher concentration of **B** shifts the equilibrium in favor of hydrazone **1B**.

- 1 D. A. Erlanson, A. C. Braisted, D. R. Raphael, M. Randal, R. M. Stroud, E. M. Gordon and J. A. Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, **97**, 9367–9372.
- 2 D. A. Erlanson, J. A. Wells and A. C. Braisted, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 2004, **33**, 199–223.
- 3 A. C. Braisted, J. D. Oslob, W. L. Delano, J. Hyde, R. S. McDowell, N. Waal, C. Yu and M. R. Arkin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 3714–3715.
- 4 B. G. Szczepankiewicz, G. Liu, P. J. Hajduk, C. Abad-Zapatero, Z. Pei, Z. Xin, T. H. Lubben, J. M. Trevillyan, M. A. Stashko, S. J. Ballaron, H. Liang, F. Huang, C. W. Hutchins, S. W. Fesik and M. R. Jirousek, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 4087–4096.
- 5 T. Obita, T. Muto, T. Endo and D. Kohda, *J. Mol. Biol.*, 2003, **328**, 495–504.
- 6 Y. Krishnan-Ghosh and S. Balasubramanian, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2003, **42**, 2171–2173.
- 7 (a) M. Li, K. Yamato, J. S. Ferguson and B. Gong, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 12628–12629; (b) S. J. Rowan, S. J. Cantrill, G. R. L. Cousins, J. K. M. Sanders and J. F. Stoddart, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2002, **41**, 898–952.
- 8 For reviews on dynamic combinatorial chemistry, see: (a) P. T. Corbett, J. Leclaire, L. Vial, K. R. West, J.-L. Wietor, J. K. M. Sanders and S. Otto, *Chem. Rev.*, 2006, **106**, 3652–3711; (b) J. D. Cheeseman, A. D. Corbett, J. L. Gleason and R. L. Kazlauskas, *Chem. Eur. J.*, 2005, **11**, 1708–1716; (c) O. Ramström and J.-M. Lehn, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2002, **1**, 26–36.
- 9 (a) R. M. Benne and D. Philp, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 3651–3654; (b) I. Saur and K. Severin, *Chem. Commun.*, 2005, 1471–1473; (c) P. T. Corbett, J. K. M. Sanders and S. Otto, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 9390–9392; (d) K. Severin, *Chem. Eur. J.*, 2004, **10**, 2565–2580; (e) P. T. Corbett, S. Otto and J. K. M. Sanders, *Chem. Eur. J.*, 2004, **10**, 3139–3143.

Exploiting Neighboring-Group Interactions for the Self-Selection of a Catalytic Unit**

Giulio Gasparini, Leonard J. Prins,* and Paolo Scrimin*

Dynamic combinatorial chemistry (DCC) is based on the principle that the thermodynamic composition of a dynamic library of molecules, that is, a library of which the components are held together either by noncovalent bonds or reversible covalent bonds, spontaneously changes upon the input of an external stimulus.^[1] This can be either the addition of a target molecule, but also an alteration of the environment (pH, light, etc.). Ideally, the composition of the library changes in favor of the component that is the most stable under the changed conditions.^[2] In the past decade, DCC has emerged as a powerful tool for the discovery of, sometimes very surprising, molecular receptors and novel materials.^[3]

In principle, DCC could be applied to the selection of a catalyst by shifting the equilibrium of the library with amplification of a molecular receptor for a transition state of a given reaction.^[4] By decreasing the energy of the transition state by formation of a complex with this molecular receptor (that is, a catalyst), the reaction rate is obviously accelerated. This concept was first developed by Pauling,^[5] and applied to catalyst discovery with catalytic antibodies^[6] and imprinted polymers.^[7] As a transition state is an elusive species, a stable analogue is required possessing similar features in terms of shape and charge distribution. However, despite the success of DCC, its use for catalyst discovery is significantly lagging, as evidenced by a very limited number of publications and, generally, very modest rate accelerations.^[4] This fact suggests that the endeavor is very challenging. In analogy with enzyme catalysis, an ideal catalyst should first bind to the substrate and subsequently transform it to product.^[8] Accordingly, the catalyst should both recognize the substrate and the transition state, although the thermodynamic stabilization of the latter must be much higher. It is not surprising that in enzymes the substrate and transition state recognition loci are quite often different because of the different tasks they have to accomplish.^[9] Herein we present the dynamic self-selection of a functional group which induces a 60-fold rate enhancement in the basic hydrolysis of a neighboring carboxylic ester; that is, the selection of a

catalytic unit on the way to the selection of a fully-fledged catalyst.

Recently, the “tethering” strategy has emerged as a powerful tool for the detection of weak, noncovalent interactions between substrates and a target.^[10] This approach implies that the target molecule is covalently linked to a scaffold molecule which has the additional ability to interact in a reversible manner with library members (Scheme 1). In this way, the recognition event between target and library component becomes intramolecular, which, for entropic reasons, significantly enhances the sensitivity of the screening process. In fact, Houk has recently pointed out that among the most efficient enzymes are those that covalently bind the substrate before its transformation into products.^[11]

During studies on hydrazone-based libraries, we recently observed that the presence of a phosphonate group in **1** resulted in the preferential incorporation of hydrazide **B** with respect to **A**, owing to an intramolecular, electrostatic interaction between the oppositely charged phosphonate and ammonium groups.^[12] The phosphonate group was chosen as a target because it is a model for the transition state of a carboxylic ester hydrolysis. Following the above concept that stabilization of the transition state should lead to an increased rate of hydrolysis, we argued that the phosphonate group in **1** could be used to self-select hydrazides that would enhance the cleavage rates of the corresponding carboxylic ester. Thus, we have screened a library of nine hydrazides, and present herein compelling data showing the existence of a correlation between thermodynamic amplification in the dynamic screening and the efficiency in assisting in intramolecular catalysis.

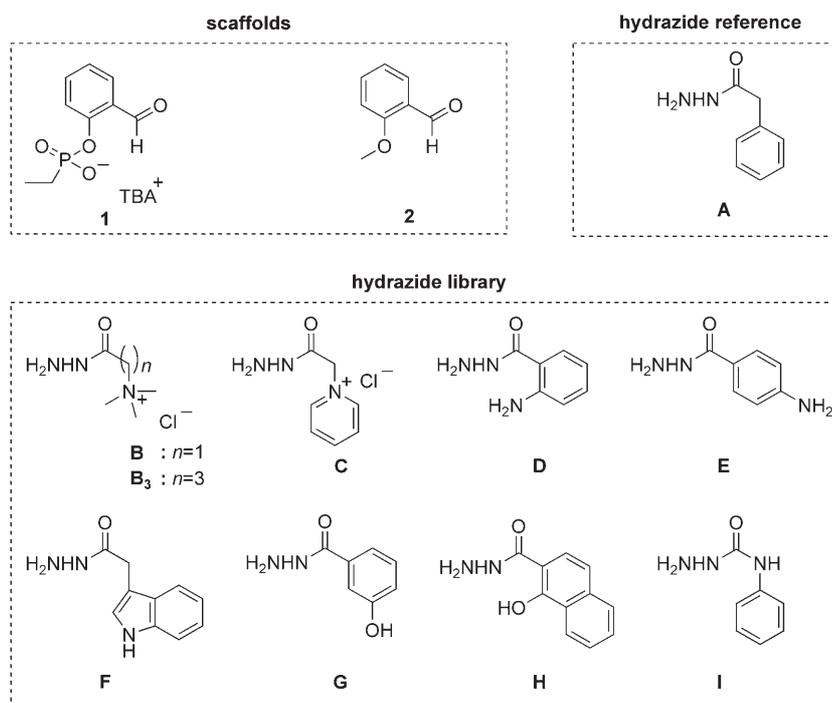
The nine components of the library were chosen from commercially available hydrazides, of which eight could potentially interact with a phosphonate moiety, either by electrostatic interactions (**B**, **C**) or the formation of one or more hydrogen-bonds (**D–I**) (Scheme 1). Hydrazide **A** was not expected to interact with the target and was used as an internal standard. We also screened aldehyde **2**, which contains a neutral methoxy group: the resulting library served as a neutral reference to determine the intrinsic stabilities of the hydrazones in the absence of the target. Any shift in the library composition using scaffold **1** with respect to that obtained using scaffold **2** can then be ascribed to an intramolecular stabilization between the hydrazide and the phosphonate target.^[13]

Library equilibration studies were performed by adding either scaffold **1** or **2** (5 mM) to a mixture of hydrazides **A–I** (each 1.5 equivalent) in CD₃OD. The mixtures were kept at 50 °C until the thermodynamic equilibrium was reached, which was detected by the absence of any further change in

[*] G. Gasparini, Dr. L. J. Prins, Prof. Dr. P. Scrimin
Department of Chemical Sciences, University of Padova
and CNR ITM, Padova Section
Via Marzolo 1, 35131 Padova (Italy)
Fax: (+39) 049-827-5239
E-mail: leonard.prins@unipd.it
paolo.scrimin@unipd.it

[**] We acknowledge financial support from the University of Padova (CPDA054893) and MIUR (PRIN2006).

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.angewandte.org> or from the author.



Scheme 1. Scaffolds **1**, **2**, reference hydrazone **A**, and the hydrazone library (**B–I**). TBA = tetra-*n*-butylammonium.

the ^1H NMR spectra of the mixtures (typically 12 hours for scaffold **1**, and 3 days for scaffold **2**). All hydrazones are characterized by the presence of a signal in the $\delta = 8\text{--}9$ ppm fingerprint region of the ^1H NMR spectrum originating from the hydrazone C–H proton. A direct determination of the library distribution by integration of these signals was not possible owing to a partial overlap and the presence of signals in this region from free hydrazone **C**. This problem could be resolved by measuring ^1H – ^{13}C HSQC-spectra of both mixtures. The additional separation of signals in the ^{13}C dimension allowed the individuation and quantification of each hydrazone present.^[14] Concentrations of **1B–I** and **2B–I** were determined relative to **1A** and **2A**, respectively, after which the amplification was calculated (Figure 1, light gray bars).^[15] The data reveal that charged hydrazones **1B** and **1C** are amplified in the mixture.

To confirm the observed amplification factors and to maximize precision in this proof-of-concept study, all the hydrazones were also individually screened against the

reference hydrazone **A** (Scheme 2). In this case, the competition experiments were performed by adding scaffold **1** or **2** (5 mM) to a solution containing hydrazone **A** (5 equiv) and one of the hydrazides **B–I** (5 equiv) in CD_3OD . The obtained amplification factors confirm the trend observed for the full library screening (Figure 1, dark gray bars).^[16] Furthermore, the data now substantiate the previously uncertain amplification of hydrazone **1I**. Considering the fact that the screening was performed under conditions where amplification effects are not maximal,^[17] we could confirm that three of the eight hydrazides (**B**, **C**, and **I**) were preferentially selected, and **B** (1.8) to a higher extent with respect to **C** and **I** (1.3 each).

These results clearly demonstrate that hydrazones **1B**, **1C**, and **1I** are stabilized as a consequence of an intramolecular interaction between the phosphonate and the functional group present in the hydrazone unit. This is supported by the fact that the addition of a phosphate to a hydrazone

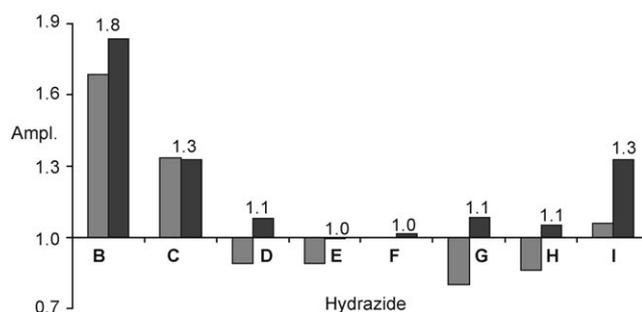
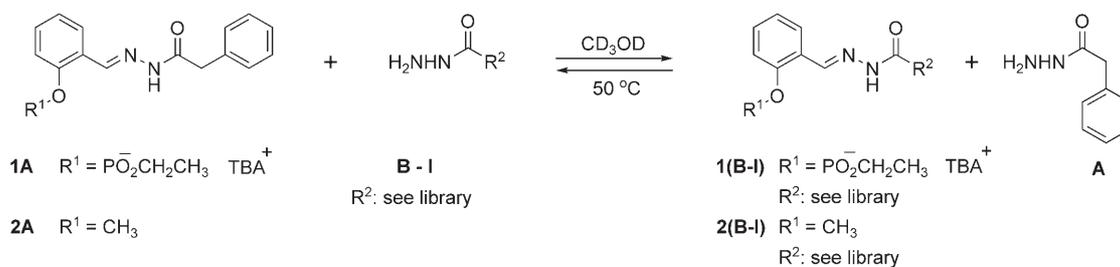


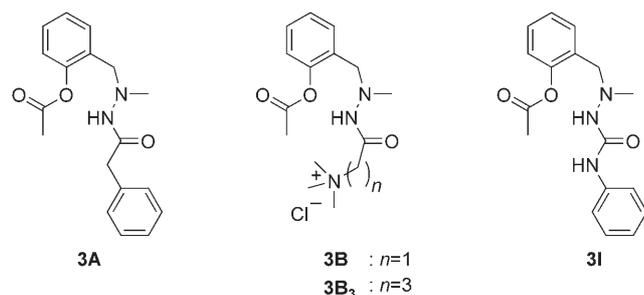
Figure 1. Observed amplification for each hydrazone in reference to hydrazone **A** obtained either from ^1H – ^{13}C HSQC-spectra (light gray bars) or from separate mixing experiments (dark gray bars).

library obtained from hydrazides **A** and **B** and benzaldehyde did not result in any detectable change of the composition at thermodynamic equilibrium (data not shown). Following our hypothesis, the positioning of these functional groups near an



Scheme 2. Competition experiments. All experiments were performed using scaffold **1** (or **2**, 5 mM), hydrazone **A** and either one of the hydrazides **B–I** in a 1:5:5 ratio in CD_3OD at 50°C.

ester moiety should consequently result in an enhanced cleavage rate of this ester because of transition state stabilization. In addition, the extent of such a catalytic effect should be correlated to the extent of amplification observed ($\mathbf{B} > \mathbf{C} \approx \mathbf{I} > \text{reference } \mathbf{A}$). To establish such a correlation, we studied hydrazides **B** and **I** in detail, as they should express a different type and strength of interaction with the transition state. Therefore, compounds **3B**, **3I** and **3A** (which serves as a reference) were prepared in which the structural elements of hydrazides **A**, **B**, and **I**, were positioned in close proximity to a neighboring carboxylate ester (Scheme 3). Compared to the parent hydrazone structures,



Scheme 3. Functionalized phenyl acetates that were studied.

two small structural changes had to be introduced. The $\text{C}=\text{N}$ double bond had to be reduced to render the structure stable under the basic conditions required for ester cleavage. Such a covalent post-modification is very common in imine-based dynamic combinatorial chemistry.^[18] Secondly, the resulting secondary amine had to be methylated to prevent an intramolecular attack of the amine on the neighboring ester.

The effect of the presence of the ammonium and urea groups in **3B** and **3I**, respectively, on the ester cleavage was initially studied by measuring the methanolysis rates of **3A**, **3B**, and **3I** because of the similarity to the conditions under which the amplification studies were performed. Twelve equivalents of sodium methoxide were added to 0.6 mM solutions of esters **3A**, **3B**, and **3I** in methanol at room temperature, and the methanolysis was followed by measuring the increase in absorbance at 280 nm (Figure 2a). The resulting curves were fitted using a first-order exponential yielding the pseudo-first-order rate constants given in Table 1, entry 1. The resulting rates are in good agreement with the results of the amplification studies, both in terms of the order of reactivity ($k_{\text{obs,3B}} > k_{\text{obs,3I}} > k_{\text{obs,3A}}$) and the relative acceleration (4.8:1.6:1 for **3B**, **3I**, and **3A**, respectively).

Several control experiments confirm that the increased ester cleavage rate results from an intramolecular neighboring-group effect. Firstly, the presence of one equivalent of tetramethylammonium chloride did not affect the methanolysis rate of compound **3A** at all. This excludes the possibility that the higher rate observed for **3B** is simply due to a change in ionic strength in the mixture. In other words, it shows that the ammonium ion needs to be present in close proximity to the carboxylic ester to induce a catalytic effect. Secondly, measuring the methanolysis rate of compound **3B** at decreasing

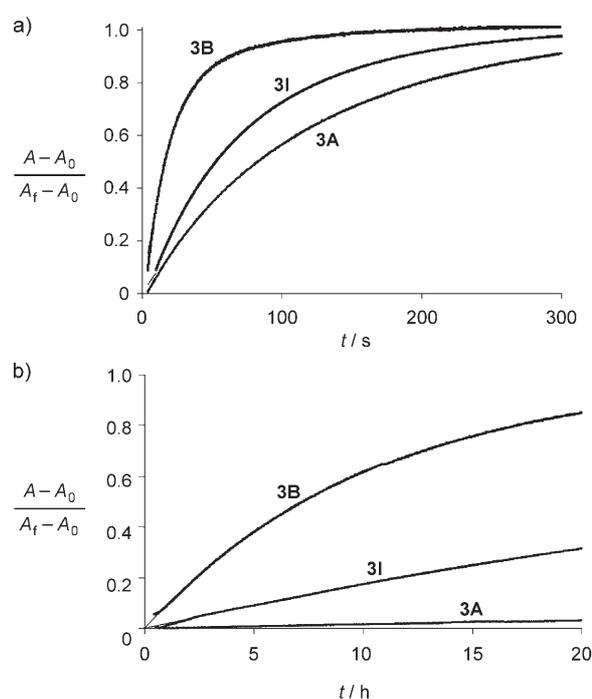


Figure 2. Changes of the absorbance at 280 nm upon a) methanolysis and b) hydrolysis of compounds **3A**, **3B**, and **3I**.

Table 1: Observed pseudo-first-order rate constants for the ester cleavage of compounds **3A**, **3B**, and **3I** under different basic conditions.^[a]

Entry ^[b]	3A	3B (k_{3B}/k_{3A})	3I (k_{3I}/k_{3A})
1	0.82×10^{-2}	3.96×10^{-2} (4.8)	1.28×10^{-2} (1.6)
2	1.85×10^{-5}	3.02×10^{-4} (16.4)	2.42×10^{-5} (1.3)
3	4.41×10^{-7}	2.64×10^{-5} (59.9)	5.23×10^{-6} (11.8)

[a] k_{obs} [s^{-1}]. Kinetics were followed by UV/Vis spectroscopy at 280 nm. [b] Entry 1: $[\mathbf{3}] = 0.6 \text{ mM}$, $[\text{NaOMe}] = 7.2 \text{ mM}$, MeOH, 25 °C; entry 2: $[\mathbf{3}] = 0.6 \text{ mM}$, pH 11 ($[\text{CAPS}] = 60 \text{ mM}$), $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN} = 50:50$, 45 °C; entry 3: $[\mathbf{3}] = 0.6 \text{ mM}$, pH 11 ($[\text{CAPS}] = 60 \text{ mM}$), $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN} = 10:90$, 45 °C.

ing substrate concentrations yielded the same rate constants, which is in strong support of intramolecular catalysis. Finally, if the ester moieties in **3B** and **3I** are cleaved at a higher rate owing to a stabilization of the negative charges in the transition state by the neighboring groups (Figure 3), we should observe an enhanced catalytic effect upon decreasing the polarity of the medium, because of a lower solvation ability of the solvent. Therefore, we performed hydrolysis studies of compounds **3** both in a 1:1 and a 1:9 mixture of $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ buffered at pH 11.^[19] The observed order of reactivity for compounds **3** in the 1:1 mixture is in line with the trend observed for the methanolysis reactions, although the hydrolysis rate for compound **3B** is slightly higher than expected (ca. 16-fold; Table 1, entry 2). Importantly, however, a decrease of the

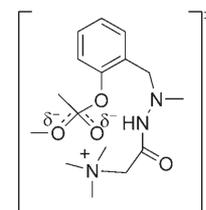


Figure 3. Stabilization of the transition state during the methanolysis of **3B**.

polarity of the medium results in a significant jump in hydrolysis rates both for compounds **3B** and **3I** relative to the reference compound **3A**. In a 1:9 mixture of H₂O/CH₃CN compounds **3B** and **3I** are now hydrolyzed approximately 60 and 16 times faster, respectively (Figure 2b and Table 1, entry 3). These results strongly support our hypothesis that the enhanced reactivity of compounds **3B** and **3I** is indeed due to transition-state stabilization.^[20,21] The fact that the ammonium moiety is the best catalytic unit indicates that there is a considerable amount of charge development in the transition state and charge–charge interaction prevails over hydrogen bonding in its stabilization. Accelerations similar to those that we have found here have been obtained with imprinted polymers, where catalysis is also based only on transition state stabilization.^[7a,c,22]

Classical studies on intramolecular interactions between neighboring groups have generally shown the importance of the geometry of the complex.^[23] To assess the influence of the geometry in this system, we have studied the behavior of hydrazide **B₃** and phenyl acetate **3B₃**,^[24] in which the ammonium group is attached by a propylene rather than a methylene spacer. A competition experiment between hydrazide **B₃** and reference hydrazide **A** using both scaffolds **1** and **2** yielded an amplification factor of 1.5, which is slightly less than that obtained for hydrazide **B** under the same conditions (1.8). The same trend is observed for the methanolysis rate of **3B₃** ($k_{\text{obs}} = 3.33 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$), which is lower than that obtained for **3B**, but still represents an acceleration of 4.1 with respect to reference compound **3A**. These results show that increasing the spacer length reduces the efficiency of the ammonium group in catalyzing the ester cleavage.^[25]

In summary, although the selected catalytic functionality is hardly unexpected,^[21] we have demonstrated the great potential of the tethering strategy for detecting noncovalent interactions that play a role in catalysis. Using a phosphonate target as a transition-state analogue of the hydrolysis of an ester bound to the reacting aldehyde, we have provided a proof-of-principle for the self-selection of functional groups that assist in catalysis. Very simple, commercially available molecules were used, which also illustrates the scope of this approach. In terms of developing enzyme-like catalysts, the tethering strategy, in contrast to currently performed dynamic screening methods, allows for an independent optimization of the binding and catalytic events. We have reported herein on the catalytic unit selection, but research in our laboratory is currently aimed at selecting also the recognition site to fully implement the catalyst selection.

Experimental Section

The syntheses and characterization data of compounds **B₃**, **3A**, **3B**, **3B₂**, **3B₃**, and **3I** can be found in the Supporting Information, together with characteristic parts of the ¹H-¹³C HSQC and ¹H NMR spectra used for determination of the amplification factors. The Supporting Information also contains a plot of log k_{obs} as a function of pH obtained for the hydrolysis of compounds **3A** and **3B**, the methanolysis of compound **3B₃**, and the methanolysis of **3B** at different concentrations.

Procedures for the equilibration experiments: a) Libraries: A mixture of hydrazides **A–I** (each 7.5 mM final concentration) were

added to scaffold **1** or **2** (5 mM) in CD₃OD. The mixtures were kept at 50 °C until the thermodynamic equilibrium was reached (no further change in the ¹H NMR spectra of the mixtures). ¹H-¹³C HSQC spectra (see Supporting Information) were used to assess library composition.

b) Couples: Freshly prepared mother solutions of the scaffold molecule (**1** or **2**, 100 mM in CD₃CN) and the hydrazides (**A–I**, 500 mM in CD₃OD) were used to prepare the mixtures of **1** or **2**:**A**:(**B–I**) in a 1:5:5 ratio with a final scaffold concentration of 5 mM. The solutions were kept at 50 °C and monitored by ¹H NMR spectroscopy until no additional changes were observed in time. Integration of the hydrazone signals yielded the relative concentrations of the two hydrazones.

General procedure for the kinetic experiments: A stock solution of **3** (10 mM in CH₃CN) was diluted and added to a cuvette containing either a) a NaOMe (7.2 mM) solution in MeOH at 25 °C, b) a 1:1, or c) a 9:1 mixture of CH₃CN:H₂O containing CAPS (3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid) buffer (60 mM) at 45 °C, obtaining a final concentration of **3** of 0.6 mM. Kinetics were followed by measuring the increase of absorbance at 280 nm in time. Ester cleavage was confirmed by HPLC and ESI-MS.

Received: August 22, 2007

Revised: November 9, 2007

Published online: February 20, 2008

Keywords: catalysis · combinatorial chemistry · supramolecular chemistry · thermodynamics · transition states

- [1] a) P. T. Corbett, J. Leclaire, L. Vial, K. R. West, J.-L. Wietor, J. K. M. Sanders, S. Otto, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3652–3711; b) J.-M. Lehn, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 151–160.
- [2] For theoretical discussions on the amplification in dynamic libraries: a) J. S. Moore, N. W. Zimmerman, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 915–918; b) Z. Grote, R. Scopelliti, K. Severin, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3951–3955; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3821–3825; c) P. T. Corbett, S. Otto, J. K. M. Sanders, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 3139–3143; d) K. Severin, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 2565–2580; e) P. T. Corbett, S. Otto, J. K. M. Sanders, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1825–1827.
- [3] For representative examples see: a) J.-M. Lehn, A. Eliseev, *Science* **2001**, *291*, 2331–2332; b) S. Otto, R. L. E. Furlan, J. K. M. Sanders, *Science* **2002**, *297*, 590–593; c) R. T. S. Lam, A. Belenguer, S. L. Roberts, C. Naumann, T. Jarrosson, S. Otto, J. K. M. Sanders, *Science* **2005**, *308*, 667–669; d) N. Sreenivasachary, J.-M. Lehn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 5938–5943; e) S. Ladame, A. M. Whitney, S. Balasubramanian, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 5882–5885; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5736–5739; f) A. Buryak, K. Severin, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 8149–8152; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7935–7938.
- [4] a) B. Brisig, J. K. M. Sanders, S. Otto, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1308–1311; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1270–1273; b) L. Vial, J. K. M. Sanders, S. Otto, *New J. Chem.* **2005**, *29*, 1001–1003.
- [5] L. Pauling, *Chem. Eng. News* **1946**, *24*(161), 707–709.
- [6] a) D. Hilvert, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 751–793; b) C. V. Hanson, Y. Nishiyama, S. Paul, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 631–636.
- [7] a) M. Emgenbroich, G. Wulff, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4106–4117; b) J.-Q. Liu, G. Wulff, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7452–7453; c) A. Volkmann, O. Brüggeman, *React. Funct. Polym.* **2006**, *66*, 1725–1733.
- [8] A. Fersht in *Structure and Mechanism in Protein Science*, 3rd ed., W. H. Freeman, New York, **2000**.
- [9] A. J. Kirby, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 770–790; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 706–724.

- [10] a) D. A. Erlanson, A. C. Braisted, D. R. Raphael, M. Randal, R. M. Stroud, E. M. Gordon, J. A. Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9367–9372; b) Y. Krishnan-Ghosh, S. Balasubramanian, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2171–2173; c) D. A. Erlanson, J. A. Wells, A. C. Braisted, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2004**, *33*, 199–223; d) R. M. Benne, D. Philp, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3651–3654.
- [11] X. Zhang, K. N. Houk, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 379–385.
- [12] G. Gasparini, M. Martin, L. J. Prins, P. Scrimin, *Chem. Commun.* **2007**, 1340–1342.
- [13] In principle, the amplification may also be affected by the occurrence of repulsive or intermolecular interactions.
- [14] ^1H - ^{13}C HSQC spectroscopy can also be used to follow the kinetics of hydrazone exchange. This allows a full evaluation of both the kinetic and thermodynamic parameters of a dynamic, multicomponent library and, in addition, eliminates any problem in peak assignment. This methodology will be published in due course.
- [15] The lowest concentrations are in the order of 0.25 mM. The errors in the amplification factors are estimated to be around 15%.
- [16] The amplification in this kind of systems depends on the number of equivalents of hydrazides added,^[12] which might explain the slightly different amplification factors between the two methods of screening.
- [17] As we have shown earlier,^[12] maximum amplification is observed under very dilute conditions (0.2 mM), as under these conditions, competing intermolecular interactions are minimal. However, at such concentrations the exchange kinetics are very slow. Therefore, for practical reasons we decided to work at an intermediate 5 mM concentration of scaffold. From our previous studies, this implies a drop in amplification from the maximum value of 3.1 to the observed intermediate value of 1.8.
- [18] a) C. Godoy-Alcántar, A. K. Yatsimirsky, J.-M. Lehn, *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, *18*, 979–985; b) M. Hochgürtel, H. Kroth, D. Piecha, M. W. Hofmann, C. Nicolau, S. Krause, O. Schaaf, G. Sonnenmoser, A. V. Eliseev, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 3382–3387; c) S. Zameo, B. Vauzeilles, J.-M. Beau, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 987–991; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 965–969.
- [19] The pH refers to the value of the pure aqueous component, and was not corrected for the mixture.
- [20] In principle, the enhanced hydrolysis rate of **3B** compared to **3A** could also be a result of an enhanced local concentration of OH^- . If this would have been the case, a plot of $\log k_{\text{obs}}$ vs pH would be nonlinear. Therefore, the hydrolysis rates of both **3A** and **3B** were determined at pH 7–11 (see Supporting Information). The analysis showed that for pH 9–11, $\log k_{\text{obs}}$ increases linearly with the pH with $\log k_{3\text{B}}$ and $\log k_{3\text{A}}$ increasing linearly with pH with the same slope. Based on these results, we conclude that the higher hydrolysis rate of **3B** is indeed due to transition-state stabilization. Interestingly, for pH values below 9, the difference in hydrolysis rates between **3A** and **3B** vanishes, and the slope of the curve by plotting $\log k_{\text{obs}}$ versus pH changes dramatically for **3A**. We ascribe this to the protonation of the tertiary amine in both **3A** and **3B** which, for both structures, results in a positive charge located very close to the carboxylic ester moiety. Consequently, at more acidic pH values the “catalytic” effect of the ammonium group in **3B** is taken over by the protonated tertiary amine.
- [21] a) R. Fuchs, J. A. Caputo, *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 1524–1526; b) J. Hajdu, G. M. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6192–6197.
- [22] In a structurally related system, Anslyn et al. observed a 40-fold acceleration of a phosphate diester cleavage by a neighbouring guanidinium-group. See: A. M. Piatek, M. Gray, E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9878–9879.
- [23] a) M. I. Page, W. P. Jencks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1971**, *68*, 1678–1683; b) A. J. Kirby, *Adv. Phys. Org. Chem.* **1980**, *17*, 183–278; c) G. Illuminati, L. Mandolini, *Acc. Chem. Res.* **1981**, *14*, 95–102; d) F. Menger, *Acc. Chem. Res.* **1985**, *18*, 128–134; e) T. C. Bruice, F. C. Lightstone, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 127–136. For the importance in a dynamic system see also ref. [10d].
- [24] We have also synthesized an analogous compound containing an ethylene spacer (**3B₂**). Regrettably it is not stable enough to carry out the hydrolysis studies: addition of base very rapidly leads to the elimination of trimethylamine.
- [25] This is in accord with what has been found by studying charge-charge interactions in flexible systems: Y. Chevalier, P. Percec, *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 1768–1774.

Real-time monitoring of a dynamic molecular system using ^1H - ^{13}C HSQC NMR spectroscopy with an optimized ^{13}C window†

Giulio Gasparini,^{‡a} Bruno Vitorge,^{‡b} Paolo Scrimin,^a Damien Jeannerat^{*b} and Leonard J. Prins^{*a}

Received (in Cambridge, UK) 21st February 2008, Accepted 17th March 2008

First published as an Advance Article on the web 21st April 2008

DOI: 10.1039/b803074j

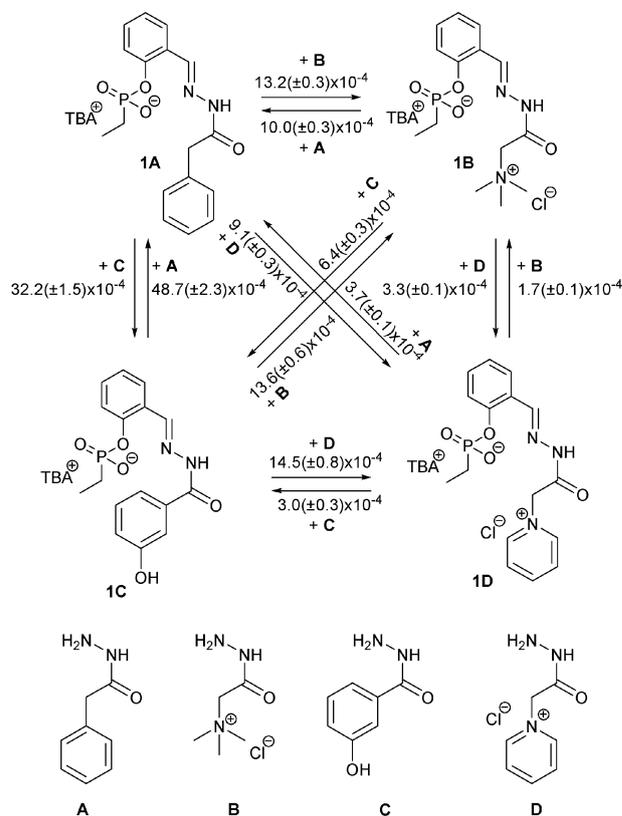
The kinetic and thermodynamic parameters of an equilibrating network involving 8 molecules can be determined from a series of quick and highly resolved ^1H - ^{13}C HSQC NMR experiments obtained using a reduced carbon spectral window.

Complexity is an emerging concept in chemistry, evidenced by a shift from the study and manipulation of individual molecules towards complex networks of interacting molecules.¹ Very recently, Ludlow and Otto made an enthusiastic plea for chemists to enter into this emerging field, called systems chemistry.² Examples ranging from dynamic combinatorial chemistry,³ self-replication,⁴ oscillating chemical reactions,⁵ to models of biological networks⁶ were used to illustrate the new properties and challenges that emerge from such systems. Consequently, analytical methods that permit a rapid and continuous monitoring of both the network composition and the reaction pathways are of eminent importance. For this purpose NMR spectroscopy is probably the most informative tool, since it is one of the few techniques that potentially allows a direct identification and quantification of all species present in solution as a function of time.⁷ However, the application of NMR spectroscopy for studying mixtures of molecules is often severely hampered by overlapping signals and difficulties in signal assignment. Here, we show that these problems can be completely solved by monitoring the dynamic system with a series of quick and highly resolved ^1H - ^{13}C HSQC NMR experiments. The experimental procedure relies on the reduction of the spectral width in the ^{13}C dimension of HSQC in order to enhance the resolution of signals and on a gradual increase in complexity of the system. From a single mixing experiment, the complete kinetic and thermodynamic picture of an eight-component network involving twelve exchange reactions can be obtained. In addition, this procedure allows for a direct monitoring of the adaptive behavior of the system towards an environmental change.

The dynamic network used to validate the application of ^1H - ^{13}C HSQC NMR spectroscopy consists of four hydrazones

1A–1D, which are in exchange due to the presence of the four hydrazides **A–D** (Scheme 1). Our interest in this kind of system arises from the observation that the thermodynamic equilibrium in this network is affected by the occurrence of intramolecular interactions between the phosphonate group and the functionality present in the hydrazide unit.⁸ Since the phosphonate group is a transition state analog of the basic hydrolysis of an ester, identification of stabilizing interactions reveals which functional group can assist in catalysis. Recently, we have indeed shown that a correlation exists between the thermodynamic amplification and the efficiency in assisting in intramolecular catalysis.⁹

Previously, we have shown that the thermodynamic composition of a dynamic library containing nine different hydrazones



Scheme 1 Dynamic eight-component network containing four hydrazones **1A–1D** and four hydrazides **A–D** accounting for a total of twelve exchange reactions. Rate constants are calculated by fitting the kinetic profiles of Fig. 2. Each section 1–3 is fitted separately, fixing the rate constants obtained from the previous section. That is, section 1 yields two rate constants $k_{1\text{A} \rightarrow 1\text{B}}$ and $k_{1\text{B} \rightarrow 1\text{A}}$ which are fixed for the fitting of section 2, which adds four new rate constants. Likewise, in section 3 six new rate constants are obtained.

^a Department of Chemical Sciences and CNR ITM Padova Section, University of Padova, via Marzolo 1, I-35131 Padova, Italy. E-mail: leonard.prins@unipd.it; Fax: +39 049 8275239; Tel: +39 049 8275256

^b Department of Organic Chemistry, University of Geneva, 30 Quai E Anserment, Geneva, CH-1211, Switzerland. E-mail: Damien.Jeannerat@chi.org.unige.ch

† Electronic supplementary information (ESI) available: Characterization data for hydrazones **1C** and **1D**, procedure for measuring the ^1H - ^{13}C HSQC NMR spectra, quantification of signals in the HSQC spectra and Scientist model files for fitting the kinetics. See DOI: 10.1039/b803074j

‡ Authors G.G. and B.V. contributed equally to this work.

can be quantitatively determined using ^1H - ^{13}C HSQC NMR spectroscopy.⁹ The use of the ^{13}C dimension turned out to be essential in order to unequivocally identify all hydrazones present, since spectral overlap occurred in the 1D ^1H NMR spectrum. Nonetheless, signal assignment in the 2D NMR spectrum was impossible without having the ^1H and ^{13}C spectra of the pure hydrazones at hand. Here we show that this problem can be solved by following the kinetics of exchange directly by ^1H - ^{13}C HSQC NMR measurements. ^1H - ^{13}C HSQC NMR kinetic measurements become possible by using a spectral width in the ^{13}C dimension optimized for the carbon 'fingerprint' area of the individual hydrazones. This reduces the number of time increments needed to resolve the signals by one or two orders of magnitude and, as a consequence, also the experimental time.¹⁰

Hydrazides **A** and **B** were chosen because their behavior was well-known from a detailed previous study.⁸ Hydrazide **C** exchanges at a much higher rate and thus enlarges the kinetic interval explored. Finally, hydrazide **D** forms a true challenge since additional signals are present in the 'fingerprint' area originating from the *o*- and *p*-protons of the pyridinium ring. The key trick in the experimental procedure is the sequential increase in complexity. So, the starting point is a 58 mM solution of hydrazone **1A** in CD_3OD which has two signals in the 'fingerprint' area (^1H : 7.8–9.2 ppm, ^{13}C : 142.6–147.4 ppm) corresponding to the *anti* and *syn* isomers with respect to the amide bond (**1A_M** and **1A_m**, Fig. 1a).¹¹ Addition of one equiv. of **A** and two equiv. of **B** results in the instalment of an equilibrium between **1A** and **1B**, evidenced by the appearance of two new signals in the 'fingerprint' area (**1B_M** and **1B_m**, Fig. 1b) and a concomitant decrease in intensity of signals **1A_M** and **1A_m**.[§] Monitoring of the signal intensities as a function of time yields the rate profile for equilibration (section 1, Fig. 2), from which two second-order rate constants ($k_{1\text{A}\rightarrow 1\text{B}}$ and $k_{1\text{B}\rightarrow 1\text{A}}$) can be determined. The importance of using the ^{13}C dimension is illustrated by the separation of signals **1B_M** and **1A_m** in this dimension, whilst these overlap in the ^1H dimension.

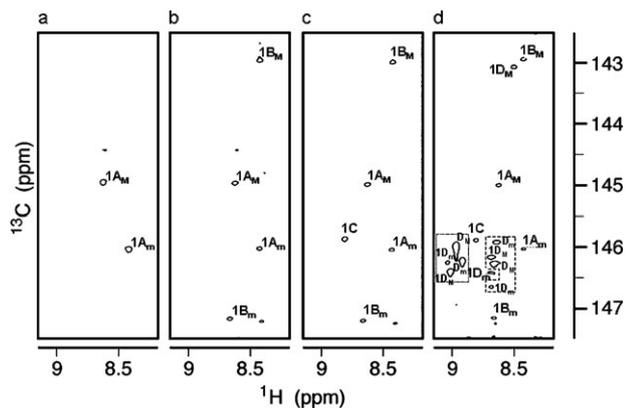


Fig. 1 ^1H - ^{13}C HSQC NMR spectra (600 MHz, CD_3OD , 303 K) of the 'fingerprint' area at different times ($t = 0$ (a), 4 (b), 8 (c), and 13 (d) h, Fig. 2). The *o*- and *p*-protons of **1D** and **D** reside in the encircled areas in Fig. 1D. Each spectrum was obtained in 8 min using 400 time increments, 4.951 ppm (747.2 Hz) carbon spectral width and one scan per increment. The processing involved sine square processing after zero filling to 1024 points.[¶]

After four hours, two equivalents of hydrazide **C** are added resulting in the formation of hydrazone **1C** on the account of both **1A** and **1B**. The kinetic profile of **1A** is very interesting as it initially decreases rapidly and subsequently increases again to reach a constant value at thermodynamic equilibrium (inset of Fig. 2). Analysis of the rate constants shows that **C** reacts 5.0× faster with **1A** compared to **1B** ($k_{1\text{A}\rightarrow 1\text{C}} = 32.2 \times 10^{-4}$ vs $k_{1\text{B}\rightarrow 1\text{C}} = 6.4 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), which corresponds to a difference in activation energy $\Delta\Delta G^\ddagger$ of 3.8 kJ mol⁻¹. However, compared to hydrazone **1C**, **1B** is thermodynamically more stable than **1A** by 0.7 kJ mol⁻¹ ($\Delta\Delta G_{1\text{C}-1\text{A}} = 1.0$ vs. $\Delta\Delta G_{1\text{C}-1\text{B}} = 1.7 \text{ kJ mol}^{-1}$), which explains the subsequent increase in concentration of **1A**.

Finally, two equivalents of hydrazide **D** are added which installs the complete network as given in Scheme 1. Hydrazide **D** poses a challenge as the *o*- and *p*-protons of the pyridinium-ring resonate within the 'fingerprint' area, which is additionally complicated due to the presence of two isomeric forms of **D**. Given the fact that hydrazone **1D** is also present in two isomeric forms, a total of ten new signals appear (which include the two imine protons of both isomers of **1D**). Consequently, signal identification from a single ^1H - ^{13}C HSQC spectrum as shown in Fig. 1d is essentially impossible. However, having the kinetic profile of each separate signal at hand, signal identification becomes very straightforward. First, signals are divided in two groups depending whether they increase or decrease in intensity. Four out of ten signals decrease in intensity, which by necessity means that these must result from hydrazide **D**, which is being consumed. These four signals can be further divided in two sets of two signals in a 2 : 1 ratio corresponding to the *o*- and *p*-protons of the major (**D_M**) and minor (**D_m**) isomers of hydrazide **D**. Based on their intensities, the six positive signals can also be grouped in two sets of three signals, which correspond to the major (**1D_M**) and minor (**1D_m**) isomers of hydrazone **1D**. The relative ratio of 2 : 1 : 1 for the three signals within each set is consistent with the ratio between *o*-, *p*-, and imine protons. The imine-signal of **1D_M** can be unambiguously assigned based on the ^{13}C

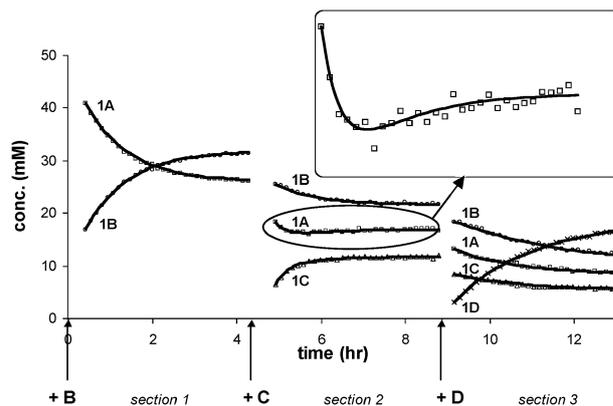


Fig. 2 Concentrations of hydrazones **1A** (\square), **1B** (\circ), **1C** (Δ) and **1D** (\times) as measured by ^1H - ^{13}C HSQC NMR spectroscopy (600 MHz, CD_3OD , 303 K) throughout the mixing experiment. At the beginning of each section, two equivalents of **B**, **C**, and **D** (with respect to the scaffold **1**) are added, respectively, and the evolution of the system is followed kinetically. The solid lines represent the best fits to the appropriate models (see ESI[†]).

chemical shift of 143.074 ppm which falls out of the aromatic region. The imine-signal of **1D_m** cannot be discriminated from the *p*-proton, but for the system analysis this is of less importance as both have identical intensities.^{***††} The peak assignment was fully confirmed by conventional 2D NMR measurements based on DQF-COSY, NOESY and HMBC.

The sequential increase in complexity allows for an accurate determination of all rate constants by fitting each section separately fixing the rate constants obtained from the previous sections. This way twelve rate constants were obtained with a maximum error of 9.4% for $k_{1D \rightarrow 1C}$ ($(3.0 \pm 0.3) \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Scheme 1). An additional advantage of measuring the kinetics of the system is the possibility to calculate the composition of the system at thermodynamic equilibrium *via* extrapolation of the kinetic profile. This significantly reduces the experimental time, especially in situations where the thermodynamic equilibrium is reached very slowly. So, the kinetic profile of section 3 in Fig. 2 was extrapolated to give the equilibrium concentrations of hydrazones **1A–1D** (**[1A] : [1B] : [1C] : [1D]** = 19 : 25 : 13 : 43) from which the $\Delta\Delta G$ values were calculated as given in Fig. 3 with a maximum error of 14% (for $\Delta\Delta G_{1A-1B}$).

Previous studies have shown that the thermodynamic stabilities of these hydrazones may depend on their concentration.⁸ We were interested to find out whether this analytical tool allows us to detect changes in the mixture composition upon dilution. Therefore, the final mixture (**[I]** = 43 mM) was diluted to a final concentration of 5 mM and changes in the signal intensities were monitored for 24 h (see ESI†). In complete accordance with our previous results,^{8,9} we observed an amplification of hydrazones **1B** and **1D** on the expense of hydrazones **1A** and **1C** upon dilution. Also the extent of amplification (**1B** > **1D**) is in line with our expectations. Obviously, dilution has brought us to the lower limits accessible with 2D NMR spectroscopy, which is around 0.5 mM for this spectrometer and probehead (600 MHz, TXI-cryoprobe), illustrated by the relative large errors.

The results presented here clearly illustrate the potential of using kinetic ¹H-¹³C HSQC NMR spectroscopy for analysing complex chemical systems. We want to point out that NMR spectroscopy by itself has several strongholds as an analytical tool. There is no need to ‘freeze’ the dynamic system *via* a covalent post modification, no internal standards are required to correct for different responses (which may occur with HPLC, GC, or MS analysis),^{‡‡} and the protocol does not need to be optimised for each different library. Using ¹H-¹³C

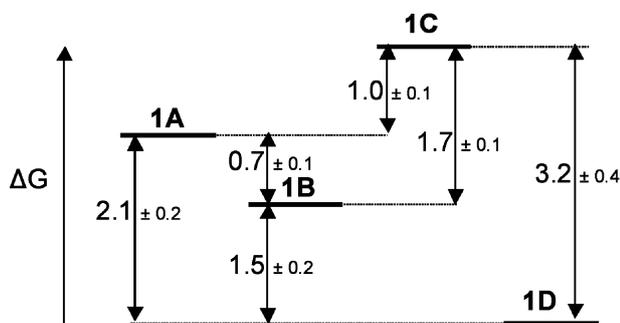


Fig. 3 Thermodynamic stabilities of hydrazones **1A–1D** obtained by extrapolation of the kinetic profile of the third section (Fig. 1d).^{||}

HSQC NMR spectroscopy the size of the chemical library can be significantly increased. Here we have studied a system composed of four hydrazones, but taking into account the presence of two isomers for hydrazones **1A**, **1B**, and **1D**, the actual number of measured species was seven. Considering the large spatial separation of these signals in the 2D ‘fingerprint’ area (Fig. 1d) this number could even be further increased. However, as a general point, it is clear that the spatial separation of signals is a critical issue for the general application of this technique. To our opinion, adding a ‘kinetic’ component to 2D NMR spectroscopy pushes its potential for monitoring complex molecular networks to a new level. Not only does it resolve the problem of signal identification, but in a single shot it also gives access to the kinetic and thermodynamic parameters. Finally, it also allows a direct monitoring of the adaptive behavior of a chemical system.

Support by MIUR (PRIN 2006), the University of Padova (project CPDA054893) and the *Département de l’Instruction Publique* (State of Geneva) is gratefully acknowledged. Most 2D experiments were acquired using the 600 MHz *d’intérêt Romand* located at the Lausanne Polytechnical school (EPFL).

Notes and references

§ Since the two isomers of hydrazones **1A**, **1B**, and **1D** have the same kinetic behavior and have a constant ratio, they are treated as a single species regarding the kinetic and thermodynamic analysis.

† New compounds **1C** and **1D** were characterized by ¹H, ¹³C and ESI-MS. See ESI.†

|| Since intermediate structures are never observed, the thermodynamic equilibrium constant, *e.g.* K_{1A-1B} , is defined as the ratio of the two rate constants for the given equilibrium, *i.e.* $k_{1A \rightarrow 1B} : k_{1B \rightarrow 1A}$.

** The differences in heteronuclear carbon–proton coupling constants ¹J_{CH} turned out to be useful to distinguish the imine C–H from the pyridinium protons.

†† In previous work⁹ we had not identified the minor isomer of **1D** (accounting for 20%) due to a lower resolution of the NMR spectrum. However, considering that this was a comparative study with a reference hydrazone this has no effect on the obtained conclusions.

‡‡ Relative intensities between different signals may be affected by different ¹J_{HC} coupling constants or relaxation rates. In order to verify the effect of these parameters, all signals in Fig. 1 were corrected (see ESI†) and the final thermodynamic composition was determined *via* extrapolation of section 3. A new ratio for **[1A] : [1B] : [1C] : [1D]** of 18 : 24 : 16 : 42 was determined illustrating a maximum difference of only 3% for **1C**.

- G. M. Whitesides and R. F. Ismagilov, *Science*, 1999, **284**, 89–92.
- R. F. Ludlow and S. Otto, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, **37**, 101–108.
- J.-M. Lehn, *Chem. Soc. Rev.*, 2007, **36**, 151–160; P. T. Corbett, J. Leclaire, L. Vial, K. R. West, J.-L. Wietor, J. K. M. Sanders and S. Otto, *Chem. Rev.*, 2006, **106**, 3652–3711.
- V. Patzke and G. von Kiedrowski, *Arkivoc*, 2007, **part v**, 293–310; N. Paul and G. F. Joyce, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2004, **8**, 634–639.
- I. R. Epstein, J. A. Pojman and O. Steinbock, *Chaos*, 2006, **16**, 037101.
- C. J. Kastrop, F. Shen and R. F. Ismagilov, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2007, **46**, 3660–3662; M. K. Runyon, B. L. Johnson-Kerner and R. F. Ismagilov, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2004, **43**, 1531–1536.
- I. Stahl and G. von Kiedrowski, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 14014–14015; R. M. Benne and D. Philp, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 3651–3654.
- G. Gasparini, M. Martin, L. J. Prins and P. Scrimin, *Chem. Commun.*, 2007, 1340–1342.
- G. Gasparini, L. J. Prins and P. Scrimin, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, **47**, 2475–2479.
- D. Jeannerat, *J. Mag. Res.*, 2007, **186**, 112–122.
- B. Levrard, Y. Ruff, J.-M. Lehn and A. Herrmann, *Chem. Commun.*, 2006, 2965–2967; G. Palla, G. Predieri, P. Damiano, C. Vignali and W. Turner, *Tetrahedron*, 1986, **42**, 3649–3654.

RINGRAZIAMENTI

Sono passati quasi quattro anni dalla tesi di laurea, quattro anni che mi sembrano volati. Fare il dottorato per me è stata una vera esperienza di vita, oltre che un'opportunità formativa. In questo periodo di tempo ho avuto modo di incontrare molte persone, ognuna delle quali ha aggiunto, in misura diversa, qualcosa a ciò che sono adesso: tramite queste poche parole vorrei provare a ringraziarle.

In primo luogo desidero ringraziare il Prof. Scrimin, che mi ha accolto nel suo gruppo di ricerca e mi ha sempre manifestato disponibilità e cortesia, ed il Prof. Casarin, la cui correttezza e dedizione nei confronti dei dottorandi è incredibile.

Un ringraziamento particolare lo devo al Dott. Prins, che mi ha insegnato a fare ricerca, a credere nel mio lavoro e, soprattutto, mi ha spesso contagiato con il suo entusiasmo ed il suo inguaribile ottimismo, anche quando le cose non sembravano andare per il verso giusto: non so come avrei fatto senza di te Leonard, grazie di cuore.

Sempre rimanendo in ambito "accademico", un "grazie" enorme a Giovanni, che mi ha sopportato, nonostante le ripetute minacce di morte, come vicino di cappa e come coinquilino al Pellegrino: prima o poi ci troveremo in bici in cima al passo dello Zovo!

Un pensiero va anche a chi ha reso decisamente più movimentata la vita nel "bunker": Claudia e la sua posta del cuore, Federico per le sue grezze uscite e Matteo della cui musica epic metal non sento proprio la mancanza.

Voglio dedicare un ringraziamento speciale ad Elena e Giorgio. Vi ho sempre considerato la mia famiglia a Padova, il periodo che ho trascorso "fuori casa" non sarebbe stato altrettanto bello senza la vostra amicizia. Anche se ci siamo un po' persi di vista, sono sicuro che ci ritroveremo presto.

Probabilmente leggeremo queste righe tutti assieme facendo una delle nostre memorabili cene, per cui ragazzi, anche se magari stasera non mi riesce di dirvelo a voce, sappiate che considero un privilegio avere degli Amici come voi, spero di esser sempre alla vostra altezza.

Grazie a Marta perchè, complice la "divina follia", ci siamo finalmente trovati.

Non so come avrei fatto senza mio fratello, anche se siamo un sacco diversi e probabilmente lo diamo poco a vedere, ci vogliamo veramente bene.

Ma il ringraziamento più grande va sicuramente ai miei genitori: tutto quello che sono adesso lo devo a voi, spero di poter sempre rendervi fieri.