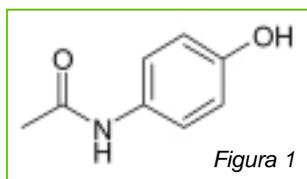


● **In questo appuntamento** vorrei presentarvi due lavori molto recenti a forte valenza tecnologica. In entrambi, l'introduzione di protocolli sperimentali paralleli e ad alta capacità in settori tradizionalmente limitati alla sperimentazione sequenziale (uno per volta!) ha portato a un'accelerazione importante nell'acquisizione di risultati significativi senza alcun compromesso in termini di riproducibilità e di qualità. In entrambi i lavori il successo riportato in esperimenti pilota permette di prevedere un'applicabilità estesa a varie aree di applicazione scientifica ed industriale.

Il primo lavoro (M.L. Peterson *et al.*, *JACS*, 2002, **124**, 10958) riguarda la determinazione ad alta capacità delle varie strutture cristalline proprie di un determinato composto solido. È noto come la presenza di diverse forme cristalline abbia grosse implicazioni soprattutto sulla solubilità di un composto. Ciò ha un'importanza notevole ad esempio nel processo di sviluppo di un nuovo farmaco, dove i lotti testati per determinate applicazioni terapeutiche devono essere ricondotti alla forma cristallina più adatta per l'uso farmaceutico e purificati da altre; spesso il processo di studio del polimorfismo di un candidato clinico è lungo e tedioso, e l'uso di metodi predittivi per l'identificazione di forme cristalline non ha sino ad ora prodotto risultati significativi di generale applicazione.

Gli autori, affiliati in maggioranza ad una piccola start-up fondata nel 1999 in America, hanno sviluppato un sistema integrato e miniaturizzato di nome CrystalMax, che permette la misurazione in parallelo della cristallizzazione di un composto, e la determinazione della o delle forme cristalline ottenute, in vari solventi o miscele fino ad arrivare a 10.000 diversi campioni in micropiastre testati in parallelo. *In primis* la cristallizzazione (se è avvenuta) viene osservata in ogni pozzetto con uno scanner; i campioni cristallizzati vengono rimossi dalla piastra originale, il solvente viene aspirato via ed il solido è analizzato *in situ* usando la spettroscopia Raman. Il sistema comprende anche un software di disegno combinatoriale, che permette di razionalizzare la scelta delle miscele di solventi e delle concentrazioni utilizzate, un sistema robotico di dispensazione e prelievo reagenti e soluzioni, un sistema analitico capace di processare campioni di pochi microgrammi in pochi secondi, ed un software specialistico per l'analisi dei dati. Quest'ultimo permette di processare gli spettri Raman, e soprattutto di confrontarli rapidamente così da focalizzarsi da subito sulle miscele di solventi più interessanti per esperimenti più approfonditi. L'esempio, o meglio il composto scelto per validare il sistema è il paracetamolo (Figura 1), un ben noto farmaco



Fans per il quale sono note tre forme cristalline, due delle quali (I e II) stabili ed una (III) osservata solo utilizzando microscopia termica.

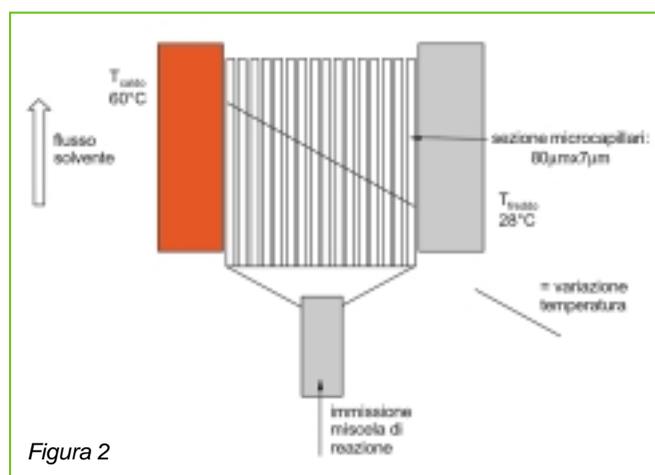
Un primo esperimento ha interessato 7.776 miscele di cristallizzazione, rappresentanti 2.592 condizioni diverse (ripetute in triplice copia), 723 delle quali (9,3%) hanno evidenziato presenza di cristalli; fra questi 29 si sono dimostrati essere della forma II e gli altri della più comune forma I. Le 29 miscele producenti II nel primo esperimento (molte delle quali non si erano comportate in maniera uniforme nei tre pozzetti che le contenevano) sono poi state ripetute ciascuna in 8 diversi reattori, così da verificare ulteriormente la riproducibilità degli esperimenti: solo la miscela 2/1 metanolo/toluene ha in ogni

caso condotto alla cristallizzazione della forma II, mentre di nuovo non si è osservata traccia della forma III. L'impiego di tecniche di cristallizzazione complesse (che, in tutta onestà, non sono familiari a chi scrive) ha permesso di osservare anche la forma III e, soprattutto, di acquisirne uno spettro a raggi X utilizzando apparecchiature miniaturizzate; ciò ha consentito agli autori di formulare un'ipotesi di struttura per questa forma cristallina elusiva.

Per stessa ammissione degli autori, la bassa riproducibilità di esperimenti apparentemente identici sottolinea l'importanza di un alto throughput che permette di acquisire in pochi giorni, se non ore, dati atti a caratterizzare le forme cristalline di uno o più composti, invece di dover attendere settimane, se non mesi, utilizzando tecniche classiche (che consumano anche quantità molto superiori di composto). Gli autori concludono dicendo: "lavori futuri riguardanti cristallizzazioni ad alta capacità e scoperta di nuove forme cristalline saranno focalizzati verso la comprensione delle interazioni molecolari che orientano i processi di cristallizzazione verso un fatto specifico".

Mi preme a questo proposito sottolineare due aspetti: *in primis*, un throughput aumentato in settori come questo permetterebbe (o meglio, permetterà) di ridurre enormemente i tempi necessari per la caratterizzazione farmaceutica di principi attivi, e per la selezione di candidati clinici da progredire nelle fasi successive di sviluppo clinico. L'opinione generalizzata secondo la quale tecniche ad alto throughput non sarebbero utili nelle fasi di sviluppo avanzato dei farmaci è, quindi, smentita. In secondo luogo, l'acquisizione di un set di dati sufficiente a razionalizzare i fenomeni ed i principi che determinano l'apparizione e l'abbondanza relativa di forme cristalline per un determinato composto sarebbe un vero e proprio toccasana per una disciplina che a tutt'oggi si fonda sull'empirismo più totale.

● **Il secondo lavoro** (H. Mao *et al.*, *JACS*, 2002, **124**, 4432) riguarda invece lo studio dell'influenza della temperatura su reazioni o, più in generale, su fenomeni chimici o



biologici determinabili in parallelo con un alto throughput. È noto come la temperatura influenzi pesantemente molti, se non tutti, i processi in campo chimico e biologico; è purtroppo molto difficile studiare la sua influenza in modo parallelo poiché la strumentazione esistente non permette (se non in casi sporadici, dove però è richiesta una complessità strumentale e dimensioni non indifferenti per aumentare solo di poco il th-

roughput) di effettuare reazioni in simultanea, ad esempio in micropiastre da 96 pozzetti, variando la temperatura di ogni pozzetto. Gli autori hanno risolto il problema utilizzando un sistema on-chip, basato sulle proprietà dei fluidi in sistemi miniaturizzati, mostrato per sommi capi in Figura 2.

Un microchip viene equipaggiato su due lati con (a sinistra) un'unità riscaldante e (a destra) con un'unità a temperatura più bassa; la temperatura di entrambe le unità (qui 60 °C e 28 °C) viene mantenuta costante. Fra le due unità viene piazzato un sistema di microcapillari (16 in Figura 2) che, a seconda della vicinanza con le unità, vengono equilibrate a temperature diverse il cui gradiente (vedi Figura 2) è più o meno costante. Nell'esempio mostrato, dove vi sono 32 gradi di differenza fra le unità e 16 microcapillari, la differenza di temperatura fra ogni microcapillare è di circa 2 °C, in diminuzione da sinistra a destra.

La generale affidabilità nel controllo della temperatura durante il passaggio del flusso di reazione è garantita dalla quasi-bidimensionalità del sistema (i microcapillari sono "alti" solo 7 mm) e quindi dal bassissimo scambio termico che ne deriva, viste anche le dimensioni miniaturizzate del chip. Gli autori hanno validato la tecnica, e soprattutto la strumentazione utilizzata, in tre casi sperimentali:

- la determinazione della variazione di resa quantica di fluorescenza (fluorescence quantum yield) di nanocristalli di CdSe (8 nm di diametro) utilizzabili come sensori di fluorescenza in sistemi biologici, misurata in soluzione tamponata a pH 7,3 in un intervallo

- di temperatura fra 10 °C e 80 °C, utilizzando 36 microcapillari;
- la misurazione della temperatura per la fase di transizione gel-liquido cristallino per membrane fosfolipidiche, depositate sulla superficie interna dei microcapillari, utilizzando 14 microcapillari e temperature fra 22 °C e 51 °C;
- la determinazione dell'energia di attivazione  $E_a$  per la defosforilazione catalitica di un substrato non fosforescente (4-metilumbelliferil fosfato) a dare un derivato fluorescente (7-idrossi-4-metilcumarina), catalizzata dall'enzima fosfatasi alcalina, ottenuta attraverso misurazioni in 14 microcapillari e a temperature variabili fra 9 °C e 38 °C.

Come si vede (o meglio, come il Lettore potrà apprezzare leggendo il lavoro originale) le applicazioni possibili di tipo biologico, o meglio chimico-biologico, sono sicuramente molte e possono impattare in aree "hot" al momento, quali genomica e proteomica. Nel campo della sintesi chimica miniaturizzata si stanno anche facendo passi da gigante, ed esempi sono stati illustrati nel passato anche in questa Rubrica: non si vede perché, quindi, la generazione di librerie miniaturizzate di reazioni chimiche in parallelo a temperatura variabile non possano divenire, in futuro, uno strumento importante per il chimico di sintesi allo scopo di ottimizzare rapidamente schemi di sintesi recanti a prodotti di interesse industriale, oppure di acquisire rapidamente informazioni legate alla cinetica di una o più trasformazioni di interesse, oppure di determinare la stabilità di uno o più reagenti a temperature di reazione diverse, e così via...