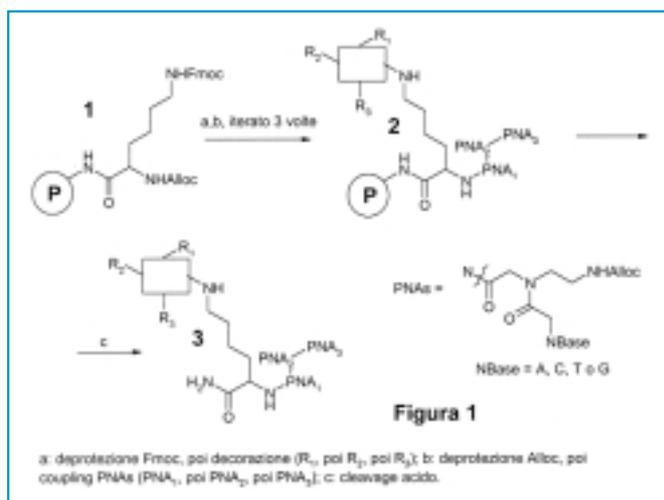




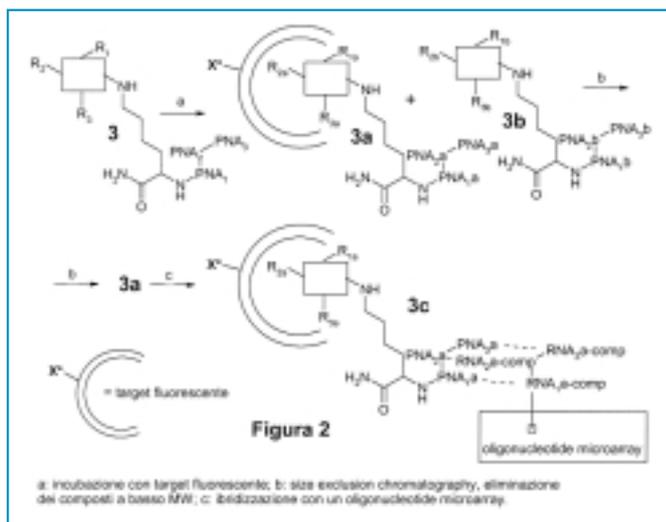
● **Le tecniche riguardanti un supporto chimico** (più o meno rilevante, a seconda che siano dei chimici o dei biologi a valutarne l'impatto!) per l'identificazione di nuovi target di rilevanza terapeutica, derivanti dalla decodifica del genoma umano, divengono sempre più popolari e più soggetto di studi da parte di gruppi accademici e industriali leader nella chimica di ricerca e applicata al mondo farmaceutico. Termini (già citati e descritti in appuntamenti precedenti di questa rubrica) come chemical genetics, functional proteomics e via dicendo sono ormai di grande interesse; a mio avviso alcuni lavori rappresentano un riuscito connubio di contenuti scientifici di alto livello, di applicazioni di tecnologie di grande attualità e di potenziale interesse industriale per aziende attive nel settore farmaceutico e biotecnologico. Uno di questi lavori, generato dal gruppo di Peter Schultz a San Diego, è apparso recentemente (N. Winssinger *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, **40**, 3152) e ha come scopo la generazione di diversità chimica in quantità e formato adatti per la mappazione e modulazione di network biologici ad alta complessità, come per esempio l'insieme dei prodotti genici (proteine) derivanti da tutto o da parte del genoma umano. Se si vuole differenziare il comportamento di queste macromolecole, o potenziali target farmaceutici, e "mapparne" la specificità attraverso l'interazione con un set di piccole molecole organiche, è ragionevole pensare che sia necessario testarle in presenza di una libreria molto numerosa, così da poter generare delle vere e proprie "impronte digitali" per ogni gene e/o prodotto genico. Qui iniziano le difficoltà: è risaputo che, in termini di produttività, la sintesi di librerie combinatoriali in miscela (split-and-mix in fase solida, già trattato in questa rubrica) è molto più efficace della sintesi parallela di discreti. Sfortunatamente, librerie in miscela spesso pongono problemi in termini di compatibilità chimica (non molti schemi sintetici, oltre la classica esterificazione a dare oligonucleotidi o ammidazione a dare peptidi, sono compatibili) e di qualità dei componenti la libreria (il controllo di qualità è molto più lungo e complesso); soprattutto, la loro deconvoluzione, e cioè la determinazione di ogni componente attivo all'interno della libreria, è molto complessa e spes-

so causa di errori (falsi positivi, falsi negativi) oppure, quando si utilizzano tecniche di encoding (pure già trattate in precedenza qui), richiede una notevole complessità chimica nello schema di sintesi della libreria e complesse metodiche di decoding. La quadratura del cerchio fra una maggiore produttività (pool libraries) e maggiori qualità e flessibilità (discrete libraries) è ovvia dal punto di vista teorico, ma difficile da un punto di vista pratico: è sufficiente, infatti, miniaturizzare l'intero schema sintetico e di screening in maniera tale che il prodotto supportato su una singola biglia sia sufficiente per la determinazione strutturale del composto supportato e per la misurazione della sua attività. Se si riesce a separare fisicamente ogni biglia di resina (o la soluzione da essa proveniente dopo cleavage) si arriva quindi a una sintesi efficace in miscela, unita ad una "parallelizzazione" finale che permette di caratterizzare composti discreti.

Quest'idea, cosiddetta delle "bead-based" libraries, è da tempo un obiettivo importante nella ricerca farmaceutica; un lavoro recentemente presentato in questa rubrica come esempio di screening ad alta capacità (G. MacBeath, S.L. Schreiber, *JACS*, 1999, **121**, 7967 e P.J. Hergenrother *et al.*, *JACS*, 2000, **122**, 7849) offriva una soluzione valida utilizzando metodi di "stampaggio" robotico su superfici a base di vetro; il gruppo di Schreiber ha anche presentato in seguito un approccio "bead-based" molto efficiente applicato ad un progetto specifico a rilevanza terapeutica che sarà l'argomento di un futuro appuntamento di questa rubrica. Il metodo messo a punto da Schultz, invece, riesce ad ottenere una "parallelizzazione" della libreria in miscela senza separare fisicamente le biglie, o le soluzioni di cleavage. Vediamo come: esso si basa innanzitutto su un sistema di encoding pseudo-biologico, la cui chimica è descritta in Figura 1. Ad esempio, partendo da un supporto solido funzionalizzato con una lisina ortogonalmente protetta sui due gruppi amminici liberi (1, Figura 1) è possibile utilizzare due diverse sequenze per la sintesi di una libreria di composti da una parte (R_1 - R_3 , step a, Figura 1) e per la codifica dei sintoni usati (PNA_1 - PNA_3 , step b, Figura 1) ripetendo iterativamente gli step a e b con le coppie R_1 - PNA_1 , R_2 - PNA_2 e R_3 - PNA_3 . Una volta ottenuta la libreria 2 supportata, un semplice cleavage acido (step c) produce la libreria 3 in soluzione (Figura 1). I cosiddetti Peptide Nucleic Acids, o PNA, sono stati scelti come elementi codificanti per due motivi: primo, la loro stabilità nella maggior parte delle condizioni di reazione è elevata, permettendo di utilizzare un gran numero di reazioni per la sintesi della libreria; secondo, e più importante, la loro capacità di ibridizzarsi con una catena complementare di RNA è ottima e selettiva. Infatti, quando una sequenza di PNA è della lunghezza di circa 10-12 residui, essa può ibridizzarsi solo e soltanto con la corrispondente sequenza di RNA. Questo è il fenomeno su cui si fonda l'intero approccio di Schultz, che descriveremo usando la Figura 2. La li-



La libreria 2 supportata, un semplice cleavage acido (step c) produce la libreria 3 in soluzione (Figura 1). I cosiddetti Peptide Nucleic Acids, o PNA, sono stati scelti come elementi codificanti per due motivi: primo, la loro stabilità nella maggior parte delle condizioni di reazione è elevata, permettendo di utilizzare un gran numero di reazioni per la sintesi della libreria; secondo, e più importante, la loro capacità di ibridizzarsi con una catena complementare di RNA è ottima e selettiva. Infatti, quando una sequenza di PNA è della lunghezza di circa 10-12 residui, essa può ibridizzarsi solo e soltanto con la corrispondente sequenza di RNA. Questo è il fenomeno su cui si fonda l'intero approccio di Schultz, che descriveremo usando la Figura 2. La li-



breria **3**, contenente svariati composti in miscela, è incubata con un target biologico di interesse sul quale è fissata una entità fluorescente che ne permette la rapida identificazione. L'incubazione (step a, Figura 2) produce interazione fra i membri della libreria affini al target e il target stesso (**3a**) mentre la maggior parte dei componenti la libreria resta come tale (**3b**, Figura 1). Una cromatografia di esclusione, capace di discriminare fra molecole a peso molecolare molto diverso, permette di eliminare i composti a basso peso molecolare (**3b**) ritenendo in soluzione i "positivi" **3a**. Ec-

co che subentra il passaggio chiave della decodifica: la frazione **3a** viene ibridizzata con un microarray di oligonucleotidi (RNA) scelto in modo che tutte le sequenze complementari rispetto alle sequenze di PNA usate per la codifica di ogni membro della libreria **3** siano rappresentate e separate sulla superficie di vetro. L'ibridizzazione fa sì che l'addotto (o gli addotti, se più di uno) **3a** si ibridizzi solo nella posizione complementare al suo "PNA-tag" a dare l'addotto supportato **3c** (Figura 2); una lettura di fluorescenza del microarray permette di vedere dove è avvenuta l'ibridizzazione, di determinare la sequenza di RNA ibridizzata e quindi quella complementare di PNA, ed eventualmente di determinare l'identità del componente della libreria codificato dalla sequenza di PNA in questione. Immaginiamo ora che, invece che un solo recettore, vari potenziali target siano testati in miscela (ognuno legato ad un frammento rivelatore di fluorescenza diverso e distinguibile) usando una libreria numerosa: lo stesso concetto permette di determinare quali (se ci sono) componenti della libreria si legano ad ogni recettore, e anche se un solo componente si legasse a più di un target. Gli autori hanno effettivamente portato a termine nel lavoro in questione un esperimento pilota, dove 6 inibitori noti di 6 proteasi sono stati supportati e codificati come visto, per poi essere incubati con le proteasi in questione ed ibridizzati ad un microarray complementare: l'esperimento si è dimostrato di successo, nel senso che rispettivamente ha evidenziato l'interazione con i rispettivi inibitori codificati, ma non con gli inibitori delle altre proteasi. È facile, in conclusione, intravedere molte, rilevanti applicazioni nel campo della chemical genetics per un approccio di questo tipo.