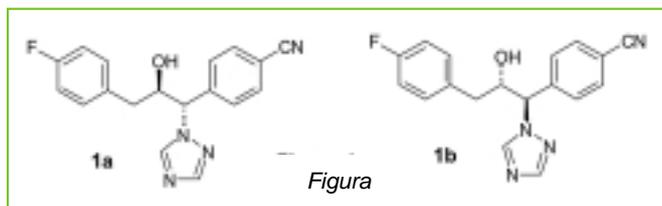


● Vorrei in questo ed in un futuro appuntamento parlarvi della separazione di enantiomeri attraverso l'uso di due esempi molto recenti. Entrambi sono applicabili alle strutture chimiche più complesse e diverse, ed entrambi utilizzano come esempio una miscela enantiomerica contenente un isomero otticamente attivo ad attività farmacologica importante ed un altro isomero inattivo: sappiamo quanto sia forte la spinta verso principi attivi chirali, piuttosto che racemati, nello sviluppo di nuovi farmaci per una loro migliore qualità e, quindi, per un migliore servizio al paziente.

Nell'esempio oggi descritto (S.B. Lee *et al.*, *Science*, 2002, **296**, 2918) l'approccio al problema coinvolge discipline quali le biotecnologie e la scienza dei materiali. Gli autori hanno selezionato la coppia enantiomerica **1a,b** (Figura), dove l'isomero RS è un inibitore enzimatico di un'aromatasi attualmente in fase clinica, mentre sia **1b** sia i due isomeri RR ed SS (non mostrati) sono inattivi. Fra i vari lavori riguardanti **1a**, ve n'è uno (T.K. Nevanen *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2001, **925**, 89) dove è prodotto e caratterizzato un anticorpo (Fab) ad alta affinità per **1a**. Il lavoro qui trattato utilizza questo Fab per la messa a punto di un sistema di separazione dinamico e utile industrialmente; sottolinea l'aspetto dinamico e preparativo del metodo riportato, poiché l'uso dell'anticorpo come tale in presenza della miscela racemica **1a,b** sarebbe troppo laborioso (esso richiederebbe, dopo incubazione, la separazione del complesso **1a**-Fab dalle molecole di **1b** non complessato e la denaturazione del complesso stesso per eliminare il Fab).



Figura

Gli autori hanno deciso di servirsi del trasporto facilitato attraverso una membrana contenente Fab capace di discriminare fra i due enantiomeri, in modo che si potesse dopo un tempo ragionevolmente contenuto recuperare l'isomero **1a** puro, od almeno molto arricchito, nel compartimento di raccolta. Possiamo intuire gli obiettivi e i potenziali ostacoli considerati nel disegno razionale del progetto di separazione dinamica: essi erano (in ordine sparso) la preparazione di una membrana contenente Fab stabile ed efficiente tale da garantirne l'utilizzazione ripetuta; la modulazione, o meglio la riduzione controllata dell'affinità **1a**-Fab, per provocare non un legame pressoché irreversibile che sequestrerebbe irreversibilmente **1a** dall'equilibrio dinamico fra i compartimenti, ma piuttosto un graduale rilascio di **1a** nel compartimento di raccolta; il mantenimento della selettività per l'isomero RS; il (relativamente) rapido accumulo dell'isomero desiderato nel compartimento di raccolta.

La membrana permeabile è stata costruita a partire da due tipi di pellicole sottili (40 μm di spessore) di allumina a superficie porosa (diametro dei pori: 20 oppure 35 nm) utilizzate come matrici. All'interno dei pori delle matrici sono state deposte delle nanostrutture tubolari di silice con tecniche tipiche della chimica dei materiali. Le pareti interne di questi "nanotubi" sono state funzionalizzate per presentare all'interno del nanotubo dei gruppi aldeidici liberi. Una volta ultimata la preparazione, la membrana inorganica è stata incubata in pre-

senza di Fab, provocando la reazione fra i gruppi aldeidici e fra i gruppi amminici delle lisine contenute nell'anticorpo; ciò determina l'ancoraggio covalente del reattivo biologico sulla membrana e ne permette l'utilizzo come discriminante chirale dinamico. Per finire, la membrana è stata inserita fra le due braccia di una cella di permeabilità a forma di U (dimensioni non specificate nel lavoro).

Il primo esperimento è stato effettuato con la membrana a maggiore porosità (35 nm). Una delle due metà della cella è stata riempita con una soluzione 0,2 mM di **1a,b** (0,1 mM per ogni enantiomero) in 9/1 tampone fosfato pH 8,5/DMSO, mentre l'altra metà (comparto di raccolta) è stata riempita con la sola miscela solvente. Ad intervalli periodici la concentrazione di **1a** ed **1b** è stata monitorata attraverso l'uso di metodi cromatografici e colonne chirali. Nel primo esperimento il rapporto fra la concentrazione di **1a** e **1b**, o coefficiente di selettività, è risultato essere intorno a 2, con una quantità elevata di miscela arricchita (**1a/1b** = 2/1) presente nel comparto di raccolta dopo 10 h. La riproducibilità dell'esperimento e la stabilità della membrana sono state verificate utilizzando lo stesso sistema cella/membrana a distanza di 7 giorni.

La prima variabile studiata è stata la presenza e la quantità del cosolvente organico (DMSO), prevedendo che a concentrazioni maggiori di DMSO si andasse sempre più verso una denaturazione dell'interazione **1a**-Fab, col risultato di diminuire la velocità di trasporto (eliminata la componente facilitata) e di arrivare ad uguali quantità di **1a** ed **1b** nel compartimento di raccolta (trasporto passivo). Tutto ciò è stato verificato, con una diminuzione della velocità di trasporto a partire dal 10% di DMSO (quantità inferiori di DMSO molto probabilmente non indeboliscono a sufficienza il complesso **1a**-Fab ed inibiscono di fatto il trasporto facilitato di **1a**) per finire ad un rapporto **1a/1b** = 1 intorno al 30% di DMSO. Anche **1b**, seppur in maniera molto ridotta rispetto ad **1a**, subisce una diminuzione della concentrazione nel comparto di raccolta tra il 10% ed il 30% di DMSO ed è quindi trasportato in maniera facilitata attraverso la membrana Fab; l'analisi delle due curve flusso/DMSO per i due enantiomeri ha determinato il massimo rapporto **1a/1b**, pari a 2,6 intorno al 15% di DMSO.

La componente passiva, e quindi non stereospecifica, nel trasporto di **1a,b** (misurata dal residuo al 30% di DMSO, pari a circa il 35% del totale misurato al 10% di DMSO) è negativa per l'ottenimento di una buona separazione enantiomerica dinamica. Per minimizzarla gli autori hanno utilizzato una membrana avente minore porosità (20 nm). L'esperimento di trasporto/separazione effettuato nelle identiche condizioni sperimentali già viste ha più che duplicato il coefficiente di selettività al 10% di DMSO, portandolo a 4,5; sfortunatamente, ma anche ovviamente, la ridotta porosità ha diminuito la velocità del processo che in queste condizioni ha richiesto almeno 40 h per l'ottenimento di quantità significative di miscela arricchita in **1a** nel comparto di raccolta. Se il risultato finale non è eclatante (scopi preparativi richiederebbero una selettività superiore almeno a 50), possiamo considerare questo esperimento preliminare un successo: anticorpi specifici per ogni composto chimico sono facilmente disponibili, e la loro inserzione in una membrana permeabile è chiaramente possibile; la stabilità di questo tipo di membrana è promettente; la modulabilità dell'interazione biologica attraverso l'uso di cosolventi è verificata; esistono una serie di fattori (natura della matrice, porosità ecc.) che influenzano le variabili fondamentali del trasporto.