

Il nostro rapido *excursus* attraverso la sintesi su fase solida, o SPS, iniziato nello scorso appuntamento, si completa oggi parlando dei linker, e cioè delle strutture (essenziali per un buon rendimento nella sintesi di molecole singole, o di librerie su fase solida) deputate al supporto della molecola/libreria durante la sua sintesi, e al rilascio della molecola target/libreria finale al termine della stessa sintesi.

Il concetto di linker è sicuramente noto ad ogni chimico oggi, mentre forse così non era nel 1999: per gli interessati segnalo comunque alcune review significative e recenti (F. Guillier *et al.*, *Chem. Rev.*, 2000, **100**, 2091; A.J. Wills, S. Balasubramanian, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2003, **7**, 346; S. Brase, S. Dahmen, *Handb. Comb. Chem.*, 2003, **1**, 59; P. Li *et al.*, *Drug Discovery Strategies Methods*, 2004, 175).

La "ortogonalità" di un linker è fra le caratteristiche più apprezzate: con ciò intendo la sua assoluta (o, visto che viviamo nel mondo reale e non in quello dei sogni, la notevole...) stabilità nelle condizioni sperimentali più comuni in SPS, accompagnata dalla completa instabilità (corrispondente alla cosiddetta reazione di cleavage) in un particolare ambiente di reazione. Oggi esiste un'enorme varietà di linker, appartenenti a molte classi ortogonali: ai classici acido- o base-labili, redox- e nucleofilo-labili si sono aggiunti i safety-catch linkers (richiedenti attivazione prima del cleavage); i cyclative cleavage linkers (che rilasciano la molecola supportata via ciclizzazione intramolecolare, e quindi riducono il rischio di side products); i traceless linkers (che non richiedono la presenza di un eteroatomo come "maniglia", o handle, nella molecola bersaglio per supportarla su fase solida). Ognuna di queste classi, poi, si divide in sottoclassi caratterizzate da maggiore o minore stabilità nelle condizioni di cleavage, così che l'ar-

senale a disposizione del chimico di sintesi è veramente completo.

Un recente esempio (D. Shabat *et al.*, *Chem. Eur. J.*, 2004, **10**, 2626) riporta, fra gli altri, alcuni safety catch linkers che richiedono l'uso di reazioni enzimatiche per attivare il rilascio della molecola bersaglio. La loro struttura è riportata in Figura 1. Il linker di sinistra viene attivato per rimozione di acetato (enzima lipasi) e il risultante fenato spontaneamente espelle la molecola bersaglio come acido carbossilico e produce un chinone metide supportato. Il linker di destra idrolizza un gruppo fenilacetamidico per azione di penicillina G acilasi, promuovendo un attacco intramolecolare dell'ammino gruppo sul carbonile reggente la molecola bersaglio; come risultato, si ottiene un lattame supportato e la molecola bersaglio in soluzione.

L'automazione, nel 1999, veniva intesa come sforzo spasmodico nell'aumentare la capacità delle cosiddette "high throughput technologies": chimica combinatoriale, ma anche analitica e separativa, screening di attività, e via dicendo. Il futuro era, allora, di chi si dimostrasse capace di sintetizzare, analizzare, purificare e caratterizzare in termini di attività le librerie più numerose possibili nel tempo più rapido possibile.

Oggi lo scenario è molto cambiato: le librerie numerose hanno spesso mostrato problemi di qualità e riproducibilità, mentre al tempo stesso tecniche "in silico" permettono, con un buon grado di predittività, di focalizzare gli sforzi sintetici su librerie di dimensioni medio-piccole (da poche decine a poche migliaia di composti). Per questo motivo, apparecchiature robotiche complesse (e costosissime!) capaci di sintetizzare migliaia o decine di migliaia di composti in un'unica soluzione non sono più di grande interesse; il Lettore interessato potrà accedere a una review (C. Zechel, *Methods Princ. Med. Chem.*, 2000, **9**, 243) e ad un lavoro (M. Patek *et al.*, *J. Comb. Chem.*, 2004, **6**, 43) per esaminare più in dettaglio le tendenze attuali.

Il discorso cambia se parliamo di analisi e purificazione automatica: la necessità di ottenere la caratterizzazione analitica di ogni componente di una libreria, e se necessario di purificarlo in maniera automatizzata, ispira il lavoro di molti gruppi attivi nel settore analitico e preparativo. Per quanto riguarda i primi, citerei alcuni lavori imperniati su NMR (S. Kalekar *et al.*, *J. Comb. Chem.*, 2002, **4**, 622) e MS (K. Klagkou *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2003, **17**, 1163) e M.A.R. Meier *et al.*, *J. Comb. Chem.*, 2003, **5**, 369); fra i lavori di automazione preparativa/separativa, citerei S.X. Peng *et al.*, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 261 (estrazione liquido-liquido automatizzata) e M. Irving *et al.*, *J. Comb. Chem.*, 2004, **6**, 478 (separazione automatizzata di prodotti diastereomericamente puri da librerie contenenti coppie di diastereoisomeri).

Eccoci ora a trattare della chimica combinatoriale vera e propria: quante e quali librerie sono apparse, e quali nuove metodologie sono state usate per prepararle? Per quanto riguarda il comparto

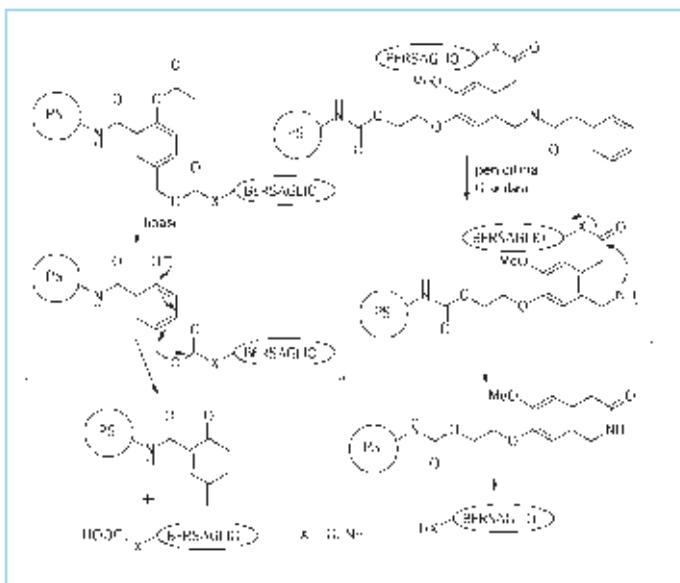


Figura 1

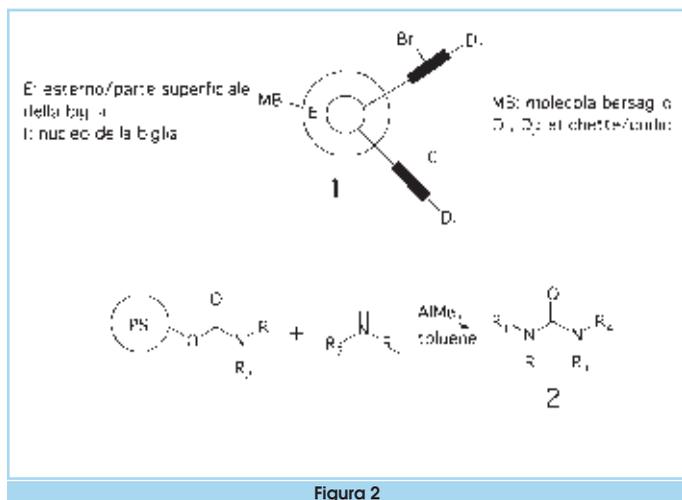


Figura 2

farmaceutico, rimanderei il Lettore alle review pubblicate annualmente da Dolle su *J. Comb. Chem.* (*J. Comb. Chem.*, 2000, **2**, 383; 2001, **3**, 477; 2002, **4**, 369; 2003, **5**, 693; 2004, **6**, 623): esse raggruppano alcune migliaia di esempi, e forniscono molti dati di tipo strutturale ed applicativo, insieme ad un'analisi critica sulle tendenze della chimica combinatoriale in campo farmaceutico.

Mi piace citare anche alcuni esempi legati a tecniche in voga in chimica combinatoriale da lungo tempo, ma ancora utilizzate. Per primo, tecniche di codifica per "bead based libraries": Kurth *et al.* (*Org. Lett.* 2004, **6**, 3829) hanno riportato l'uso di biglie di resina "segregate topologicamente" (1, Figura 2), cioè dove la superficie e la parte esterna della biglia sono funzionalizzate con i siti di reazione (molecola target), mentre i siti nel nucleo interno serviranno a codificare la struttura della molecola target via etichette a base di Cl e Br (decodifica via spettroscopia MS). Supuran *et al.* (*J. Med. Chem.*, 2004, **47**, 5224) hanno riportato un esempio di "on bead screening", cioè di analisi biologica di una libreria di inibitori dell'enzima anidraasi carbonica effettuata senza bisogno di rilasciare il composto supportato in soluzione (e quindi potendo riutilizzare la stessa libreria in successivi saggi biologici). Per finire, Janda *et al.* (*J. Comb. Chem.*, 2004, **6**, 822) hanno riportato la sintesi di librerie dove anche il rilascio dalla fase solida è effettuato in maniera combinatoriale, più precisamente usando una batteria di ammine primarie e secondarie per ottenere una libreria di uree diversificate (2, Figura 2).

Per quanto riguarda le tecniche analitiche in chimica combinatoriale, abbiamo già accennato alle determinazioni di purezza ad alta capacità usando apparecchiature analitiche automatizzate (MS, NMR, LC ecc.). Un altro campo molto studiato riguarda la determinazione della cinetica di una reazione, e quindi del suo progresso, in parallelo durante la sintesi di una libreria. Ciò può avvenire in soluzione, utilizzando strumentazione semi- o totalmente automatizzata per il prelievo e la lavorazione di aliquote di rea-

zione da reattori diversi; o in fase solida, mettendo a punto tecniche (possibilmente non distruttive) per determinare la natura e l'abbondanza di prodotti supportati su una singola biglia di resina. Fra questi ultimi lavori, segnalerei esempi basati su reazioni colorimetriche (S. Manabe, Y. Ito, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 12638); su spettroscopia FT-IR (J. Mihaichuk *et al.*, *Anal. Chem.*, 2002, **72**, 1355); su entrambi i metodi precedentemente citati (B. Yan, H. Yan, *J. Comb. Chem.*, 2001, **3**, 78); su spettrometria MS (J.M. Gerdes, H. Waldmann, *J. Comb. Chem.*, 2003, **5**, 814); su misurazioni di fluorescenza (S.K. Shannon, G. Barany, *J. Org. Chem.*, 2003, **69**, 4586 e G. Pina-Luis *et al.*, *J. Comb. Chem.*, 2004, **6**, 391).

Per finire (per oggi...) qualche parola su chemoinformatica e chimica computazionale in chimica combinatoriale. Questa è un'area che, in conseguenza (o come causa del?) ridimensionamento della taglia delle librerie e della focalizzazione su librerie medio/piccole ad alta qualità analitica, ha acquisito enorme importanza. La selezione di un sottoinsieme "ad alta diversità" all'interno di uno spazio chimico virtuale ad elevata numerosità permette di ridurre costi, sforzi di laboratorio e quant'altro, allo stesso tempo mantenendo un'alta probabilità di trovare fra i componenti della libreria composti attivi e quindi ottimizzabili in seguito. Esempi di filtri computazionali in voga in ricerca farmaceutica sono quelli per caratteristiche chimico-fisiche (le famigerate cinque regole di Lipinski!), filtri basati sul fitting in un modello farmacoforico del recettore/bersaglio, filtri atti ad eliminare composti potenzialmente tossici, e così via. Fra i recenti lavori, segnalerei O. Ivanciuc, D.J. Klein, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 2002, **42**, 8; E. Evensen *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2003, **46**, 5125; R.V. Belosludov *et al.*, *Comb. Mater. Synth.*, 2003, 363; G.L. Moore *et al.*, *AIChE Journal*, 2004, **50**, 262 e K. Severin, *Chem. Eur. J.*, 2004, **10**, 2565.

Più in dettaglio, il lavoro di Ivanciuc e Klein descrive un set di algoritmi computazionali utile per l'analisi di diversità di librerie combinatoriali contenenti sistemi eterociclici, utilizzando i cosiddetti indici di Wiener; il lavoro di Evensen *et al.* riporta una comparazione fra diversi metodi computazionali per il disegno di una libreria combinatoriale, applicandoli a due esempi relativi a progetti miranti ad inibire rispettivamente la chinasi CDK2 e più in generale un gruppo di proteasi; la review di Belosludov *et al.* descrive approcci computazionali utili nel disegno di nuovi catalizzatori e, più in generale, di nuovi materiali; la review di Moore *et al.* copre in dettaglio l'uso (e i problemi ancora irrisolti!) di tecniche computazionali nel disegno di librerie di proteine artificialmente ingegnerizzate (directed evolution, eccetera); infine, il lavoro di Severin descrive l'uso di tecniche chemoinformatiche nel disegno e nella valutazione di attività delle cosiddette "librerie combinatoriali dinamiche", dove i componenti della libreria sono generati attraverso una o più reazioni reversibili, il cui equilibrio sarà determinato dall'affinità di ogni componente della libreria per il bersaglio biologico d'interesse.