



Eccoci di nuovo a parlare di “microarrays” organici, anche detti small organic molecule microarrays (SOM), per terminare il discorso iniziato nello scorso appuntamento. I problemi a cui daremo oggi risposta sono:

- 1) la riduzione del rischio di non scoprire interazioni ligando-bersaglio, dovuto alla orientazione “sbagliata” del ligando nel microarray (perché legato alla superficie solida attraverso un gruppo funzionale necessario per l’interazione, o perché costretto in una conformazione sbagliata dal legame con la superficie);
- 2) la necessità di introdurre nelle librerie di potenziali ligandi da immobilizzare sulla superficie solida alcuni fra i pochi gruppi funzionali ad oggi adatti per il supporto su lastre di vetro, e cioè sui classici supporti per microarrays.

Questi punti ben ricapitolano due dei maggiori svantaggi dei saggi biologici effettuati su librerie, o microarrays, di potenziali ligandi: *in primis* la restrizione conformazionale di ogni ligando (o peggio, la non disponibilità di un suo gruppo funzionale, importante per l’interazione ligando-bersaglio, perché usato per legarsi al supporto solido); inoltre, la frequente necessità di introdurre, nel disegno di librerie su fase solida, o di microarrays organici, un gruppo funzionale eteroatomico (a volte nocivo per l’interazione ligando-bersaglio) per poter supportare le molecole sul supporto.

Un primo lavoro (N. Kanoh *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2003, **42**, 5584) dà una risposta “chimica” ai problemi sopra citati attraverso le cosiddette PALCs (photoaffinity linker-coated slides, Figura, **1**).

La sintesi di **1** è relativamente facile, a partire da una microlastra di vetro funzionaliz-

zata con un’ammina; la sua stabilità in condizioni controllate è alta. Mettendo però il microarray PALC **1** in presenza di una qualsiasi delle 3 molecole pure mostrate in Figura (rodamina B, **2**; biotina, **3**; digossigenina, **4**), ed irradiando per 30 minuti a 365 nm, si ottiene l’attivazione fotochimica della funzione trifluorometil aril azirinicca, ed una sua reazione di inserzione/addizione “aspecifica” alla molecola presente nel mezzo di incubazione. Sottoponendo ognuno dei microarrays funzionalizzati con **2-4** alle opportune condizioni di rivelazione (fluorescenza per **2**; incubazione con streptavidina marcata e fluorescenza per **3**; anticorpo monoclonale DI-22 e fluorescenza per **4**) si è osservato un segnale forte anche a basse concentrazioni di molecola da immobilizzare; il test in parallelo in queste condizioni di lastre di silice amminica non-PALC ha escluso la rivelazione di fenomeni aspecifici nelle condizioni di saggio utilizzate. La struttura completamente diversa di rodamina B, biotina e digossigenina mostra

quanto il linker fotoattivabile **1** sia capace di legare ogni tipo di molecola desiderata, indipendentemente dalla sua natura aromatica, alifatica od eterociclica, e dalla presenza o meno in essa di particolari gruppi funzionali. In più, l’estrema reattività del linker fotoattivato assicura che ogni copia della molecola da supportare si leghi al linker stesso utilizzando reazioni di inserzione od addizione su parti diverse della molecola; ne deriva che sicuramente esisterà una percentuale delle molecole supportate ancora capace di riconoscere il proprio bersaglio, e quindi in grado di essere riconosciuta attraverso il più adatto saggio di misurazione di attività. Questo metodo, apparentemente privo di controindicazioni, dovrebbe essere utilizzato nella fase di supporto di un’intera libreria organica su microarrays, e poi di screening di attività, per potersi definire completamente validato.

Un secondo esempio (D.N. Rosalia, S.L. Diamond, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, **100**, 8721) affronta i sopraindicati problemi in maniera completamente diversa. Invece di supportare una libreria di 352 composti attraverso legame chimico con una lastra di silice, si è deposto in ogni pozzetto di un microarray una microgoccia di glicerolo contenente ognuno dei componenti della libreria; l’alta viscosità del glicerolo ha fatto in modo che il microarray non covalentemente legato così

prodotto potesse venire preparato e fosse stabile a sufficienza per non avere fenomeni di contaminazione fra pozzetti adiacenti. La miscibilità del glicerolo in acqua, e la sua compatibilità in basse concentrazioni con protocolli di screening biologico, ha poi permesso il trattamento con aerosol acquosi contenenti substrati ed enzimi di

cui si voleva misurare l’inibizione da parte dei componenti la libreria. Il saggio biologico della libreria ha permesso di identificare un singolo, debole inibitore di alcune caspasi (proteasi implicate nello sviluppo e trattamento terapeutico del cancro); la susseguente analisi di questo stesso inibitore, stavolta come singolo solido, ne ha confermato la natura inibitoria e quindi ha validato questa tecnica di deposizione di microarrays. Seppur la natura non-covalente del legame molecola-supporto richieda particolare cura nella preparazione e nella manipolazione del microarray, e richieda attenta esclusione dell’umidità, la totale libertà conformazionale delle molecole adsorbite in ogni pozzetto assicurano l’identificazione di ligandi/inibitori anche deboli, purché il saggio biologico sia adattabile alla presenza di percentuali significative di glicerolo. Da notare anche l’assoluta indipendenza da qualsivoglia funzione chimica presente od assente nella libreria da supportare sul microarray.

