

LORENZO FLORA \*

## **Robert Bruce Merrifield ed il processo di automazione nella sintesi delle proteine**

### **Robert Bruce Merrifield and automation in protein synthesis**

**Summary:** The history of physical sciences is the history of instruments and their intelligent use, and the bond within them became even more evident in twentieth century by the introduction of automated and computational systems: their use lowered time and cost of scientific research and directed its progress. The work of R.B. Merrifield is an exemplary case. He developed in 1963 a novel strategy for peptide synthesis, solid-phase peptide synthesis (SPPS), based on a sequence of reactions conducted in a single vessel, not needing separation and recrystallization steps; this process was soon automatized and an automated apparatus appeared in 1965. SPPS, i.e. strategy of synthesis and automation process, showed its potential in the first synthesis of a protein, inconceivable with the traditional liquid-phase synthesis, conducted by Merrifield and Gutte in 1969. Soon SPPS became largely used in medical and pharmaceutical research, and its chemistry and automation process were adapted in different areas; furthermore SPPS was an important factor in the birth of combinatorial chemistry.

**Key words:** Automation, SPPS, Merrifield, Scientific Progress

### *Introduzione*

L'idea che le scienze naturali, nell'accezione moderna del termine, siano nate con l'applicazione del metodo sperimentale allo studio dei fenomeni è oggi largamente diffusa. Il primo a ricorrere al metodo sperimentale nelle sue indagini fu Galileo Galilei: come dice Geymonat, il suo lavoro costituisce «un esempio del tutto soddisfacente di combinazione sistematica fra “certe dimostrazioni” e “sensate esperienze”» [1] e rappresenta tuttora il modello di quella razionalità che viene attribuita alla ricerca scientifica. Nei tre secoli successivi a Galileo, insieme alla nascita ed al rapido sviluppo di nuove discipline scientifiche, si è assistito al fiorire

\* Via Digione, 7 - 10143 Torino. E-mail: flora.lorenzo@libero.it

di un dibattito tra filosofi circa il nesso che intercorre tra la pretesa razionalità delle scienze ed il carattere di verità dei loro risultati teorici; in altre parole, mentre le scienze naturali fornivano all'uomo un sempre maggior controllo sui fenomeni, cominciavano a sorgere interrogativi sui motivi per cui si ottenevano questi successi. Nel XX secolo la razionalità scientifica subì duri colpi sia dal punto di vista logico che da quello epistemologico e le diverse discipline, pur continuando a produrre risultati sensazionali, persero agli occhi dei filosofi la base comune che conferiva ai loro prodotti il carattere di verità o al loro modo di procedere il carattere di assolutezza.

Centrale nel privare le scienze naturali della certezza dell'esistenza di una comune base cognitiva che garantisca il loro sviluppo è stata l'analisi storica: gli studi di diversi episodi scientifici condotti da epistemologi quali Kuhn o Feyerabend, sebbene finalizzati ad obiettivi differenti, hanno messo in evidenza come sia complicato formulare un criterio di razionalità che spieghi o giustifichi la crescita delle conoscenze scientifiche. Anche la forte convinzione dell'esistenza di tale criterio non ha impedito a Lakatos di notare che i programmi di ricerca, che per definizione si protraggono per un periodo di tempo prolungato e che magari portano a risultati tutt'oggi considerati validi, talora si poggiano su fondamenti incoerenti e si mantengono pur in presenza di evidenti anomalie [2]. Così, verso la fine del XX secolo, si assiste alla tendenza degli storici ed epistemologi a negare l'esistenza di un univoco criterio di demarcazione che permetta di distinguere ciò che è scientifico da ciò che non lo è e, di conseguenza, a ricercare le basi cognitive e procedurali specifiche per ogni singola disciplina scientifica [3, 4, 5].

Il processo finora descritto è stato utile per sostenere il carattere di scientificità delle singole discipline che si occupano dello studio dei fenomeni naturali: infatti per ognuna di esse sono stati individuati specifici aspetti normativi, quali i nuclei centrali, le procedure cognitive ed il linguaggio, che forniscono una base epistemologica che permette ad uno scienziato di definirsi chimico piuttosto che geologo. Oltre agli aspetti normativi vi sono anche degli aspetti contingenti che contribuiscono a differenziare tra loro le scienze naturali: ad esempio l'oggetto di studio, il luogo dove viene condotta la ricerca o la strumentazione utilizzata. Il processo di differenziazione delle scienze naturali induce in linea di principio le singole comunità scientifiche ad isolarsi le une dalle altre: la mancanza di comuni obiettivi di ricerca, di comuni procedure e persino di un comune linguaggio rende pressoché impossibile sia il confronto tra i risultati ottenuti sia la collaborazione.

La stessa analisi storica che ha portato all'abbattimento della visione positivista delle scienze naturali mette comunque in evidenza il fatto che l'incontro tra più discipline ha spesso generato rilevanti risultati sul piano scientifico: i lavori condotti da scienziati quali Von Humboldt e Faraday nel XIX secolo o Pauling e Lovelock nel XX secolo ne sono solo alcuni esempi. Risulta dunque che, storicamente, l'incontro tra le diverse comunità scientifiche è stato fattivo e, considerati i risultati prodotti, è tuttora auspicabile; inoltre le teorie che descrivono la natura come un

sistema complesso, in cui ogni fenomeno dipende non solo dalla somma di altri ma anche dalla loro reciproca interazione, portano con sé inevitabilmente la richiesta di un approccio olistico allo studio della natura [6].

Se il connubio tra più discipline è non solo fattibile ma spesso anche proficuo, è necessario che tra di esse ci sia qualche elemento comune; in alcuni casi questo risiede nell'oggetto di studio stesso mentre in altri può essere, ad esempio, lo scopo della ricerca. Numerosi sono i filosofi e gli scienziati che hanno individuato nell'uso della strumentazione un aspetto comune a tutte le discipline correlate con le scienze naturali. In tal senso si può dire che le scienze naturali hanno fatto propria la richiesta di Francis Bacon di ricorrere all'utilizzo di strumenti di osservazione e di controllo necessario per evitare di cadere nella staticità e nella rassegnazione tipica della filosofia naturale degli antichi [7]. Lo stesso titolo dell'opera metodologica di Bacon, *Novum Organum*, è apertamente in polemica con la filosofia aristotelica, secondo la quale lo studio della realtà può essere condotto efficacemente solo tramite la logica (le opere di Aristotele relative alla logica sono state raccolte e organizzate nell'*Organon*): la richiesta esplicita di Bacon era di sostituire alla logica i «nuovi organi» (*organum*: strumento) più sensibili di quelli umani.

Ma come vengono utilizzati questi nuovi organi? In che relazione si trovano rispetto alla ricerca scientifica? In risposta a queste domande sono state scritte numerose pagine, a cominciare da quelle di N. Grew che nel 1681 propose la distinzione tra strumenti filosofici, usati per investigare la natura, e strumenti matematici, usati per svolgere misurazioni [8]. In breve si può dire che la strumentazione è direttamente correlata alla pratica scientifica in quanto permette di effettuare osservazioni, raccogliere dati, provocare fenomeni o tenerli sotto controllo, mettere alla prova ipotesi o corroborare teorie, costruire una nuova realtà o nuovi oggetti di studio. Ma essa si rapporta alla scienza anche in modo meno evidente eppure altrettanto importante: vi sono ad esempio strumenti dimostrativi, usati col fine di convincere un uditorio della validità di una teoria [9], oppure costruiti con fini didattici, per addestrare studenti ad una prassi ripetitiva. Anche la modalità di utilizzo di uno stesso strumento può essere diversa, portando talvolta a risultati diversi: si pensi ad esempio all'uso originale che Galileo, privo di una solida base di ottica, fece del cannocchiale ed alle ripercussioni che le sue conclusioni ebbero sulla cultura dell'epoca.

Nelle pagine che seguono è esposto il percorso di ricerca che ha portato Bruce Merrifield a venire insignito del premio Nobel: si vedrà come la sua ricerca è stata strettamente correlata all'utilizzo di uno strumento, e come tale strumento ha supportato lo sviluppo della chimica dei peptidi e di campi ad essa attigui, e la nascita di una nuova disciplina chimica.

*Note biografiche su R.B. Merrifield* [10]

Robert Bruce Merrifield (1921-2006) nacque a Fort Worth in Texas e si laureò in chimica presso la University of California di Los Angeles (UCLA) nel 1942, nel

gruppo di ricerca guidato da M. Dunn. In quegli anni il gruppo di Dunn era dedito alla sintesi degli amminoacidi e fu il primo a riuscire a produrre (e commercializzare) tutti gli amminoacidi naturali con un elevato grado di purezza; il lavoro di tesi di Merrifield consistette nel mettere a punto un metodo microbiologico per la determinazione quantitativa della prolina. Durante il PhD, condotto sempre presso il laboratorio di Dunn, sviluppò un altro metodo microbiologico, questa volta per la determinazione quantitativa delle basi pirimidiniche contenute nel lievito di birra, fornendo così il suo contributo al nascente studio degli acidi nucleici.

La fine della primavera del 1949 fu un periodo intenso e ricco di soddisfazioni per Merrifield: in tre giorni infatti ottenne il titolo di PhD (19 giugno), si sposò (20 giugno) e si trasferì a New York (21 giugno) nel gruppo di ricerca di D.W. Woolley al Rockefeller Institute (dal 1955 Rockefeller University). L'Istituto era un centro di eccellenza per la ricerca biochimica: lì vi lavorava V. du Vigneaud, premio Nobel nel 1955 per la prima sintesi di un ormone, il nonapeptide ossitocina; lì, nel laboratorio dove operò Merrifield, lavorarono M. Bergmann e L. Zervas. In quel periodo il gruppo di Woolley compiva ricerche nel campo dei fattori di crescita batterica e tra il 1949 ed il 1955 Merrifield studiò un fattore di crescita dello streptococco; individuò la molecola responsabile in un pentapeptide, la streptogenina, e per confermarne l'attività dovette, secondo i canoni tradizionali, procedere nella sua sintesi totale e sottoporre l'oligopeptide sintetico al confronto con quello naturale. Nei sei anni dedicati a tale lavoro ebbe modo di collaborare con du Vigneaud, col supporto del quale fu in grado di completare la sintesi del pentapeptide tramite il metodo in fase liquida in 11 mesi e con una resa del 7%. Negli anni successivi il suo lavoro continuò nel sempre più complesso campo dei peptidi e presto gli fu evidente che, al fine di ottenere più informazioni utili per la ricerca, era necessario poter disporre di un maggior numero di polipeptidi a catena più lunga di quelli fino ad allora sintetizzati. In effetti il metodo in fase liquida richiedeva tempi ampi, non permetteva la sintesi di catene lunghe e forniva una resa minima.

Il concepimento dell'idea della sintesi in fase solida (*Solid-Phase Peptide Synthesis* – SPPS) è del 26/5/1959: in tale data infatti Merrifield appuntò nel suo diario le prime note al proposito. Da lì per i successivi dieci anni il suo lavoro di laboratorio fu dedicato ad ottimizzare il metodo curandone tutti gli aspetti, da quelli prettamente chimici (come la scelta dei solventi o dei reagenti adatti a proteggere l'amminogruppo terminale) a quelli strumentali (come lo studio del recipiente di reazione o del sistema di automazione del processo). Divenuto professore nel 1966 interruppe il lavoro in laboratorio nel 1969; il suo gruppo di ricerca continuò ad occuparsi di migliorare gli aspetti chimici dell'SPPS e a sintetizzare nuovi polipeptidi.

Merrifield ottenne negli anni numerosi riconoscimenti, tra i quali il più importante è sicuramente il premio Nobel del 1984 consegnato per lo sviluppo del metodo di sintesi chimica su supporto solido.

*SPPS e automazione*

Per comprendere l'utilità di SPPS, che fu tale da far meritare al suo ideatore il premio Nobel, bisogna valutare le possibilità di crescita che offrì alle conoscenze nel campo dei peptidi, ma prima di affrontare questo percorso vale la pena soffermarsi sulle principali caratteristiche della strategia di sintesi: vediamo brevemente in cosa consiste.

Il primo articolo nel quale Merrifield espone dettagliatamente i principi della sintesi in fase solida è datato 31/1/1963, ovverosia tre anni e mezzo dopo il concepimento dell'idea: «[Il nuovo metodo] si basa sull'ancoraggio del primo amminoacido della catena ad un polimero solido tramite un legame covalente, sull'addizione passo passo degli amminoacidi uno alla volta fino a che non sia assemblata la sequenza desiderata, ed infine sulla separazione del peptide dal supporto solido. La ragione di questo approccio sta nel fatto che quando la catena peptidica che si sta formando è fermamente ancorata ad una particella solida completamente insolubile si trova in una forma utile per essere filtrata e separata da reagenti e sottoprodotti. Dunque i peptidi intermedi sono purificati non tramite le usuali procedure di ricristallizzazione, ma allontanando le impurità. Ciò semplifica enormemente le operazioni ed accorcia il tempo necessario per la sintesi dei peptidi» [11]. L'idea è all'apparenza piuttosto semplice e non costituisce un punto di rottura netto rispetto alla classica sintesi in fase liquida: come nelle sintesi tradizionali infatti si progetta un percorso di reazioni che porta al prodotto desiderato, ovverosia si parte da reagenti noti, si conducono le reazioni secondo uno schema previsto e si ottiene un prodotto che va isolato e caratterizzato. L'unica differenza notevole rispetto al metodo in fase liquida sta nel fatto che il prodotto si trova in una fase differente rispetto a quella in cui avvengono le reazioni, il che permette una facile e rapida separazione.

Il lungo periodo intercorso tra la formulazione dell'idea di SPPS e la realizzazione della prima sintesi è dovuto esclusivamente alle difficoltà pratiche incontrate nell'ottimizzare gli aspetti chimici della sintesi. Anzitutto Merrifield dovette trovare un supporto completamente insolubile sia in condizioni acide che basiche, che permettesse l'ancoraggio del primo amminoacido ma non interagisse con il resto della catena in crescita; fin dalla prima sintesi pubblicata utilizzò una resina fatta di un copolimero costituito da stirene e piccole quantità di divinilbenzene. Come gruppo protettivo per l'amminogruppo degli amminoacidi utilizzò inizialmente il tradizionale carbobenzoil, sviluppato alcuni anni prima da Bergmann e Zervas proprio negli stessi laboratori in cui lavorava Merrifield; presto tale gruppo fu sostituito dal *terzbutilossicarbonil*, che richiedeva condizioni meno estreme per essere rimosso. Altri aspetti cui fu necessario prestare attenzione erano la scelta dell'eluente atto alla rimozione del gruppo protettivo dall'amminogruppo (fu utilizzata inizialmente una miscela di acido bromidrico e acido acetico glaciale) e alla separazione del peptide dal supporto una volta terminata la polimerizzazione (idrolisi basica), e la scelta del solvente che favorisse la formazione del legame peptidico durante l'inserzione dei successivi amminoacidi (il più adatto si rivelò essere il dicicloesilcarbodiimmide).

In tutte le pubblicazioni in cui descrive il metodo SPPS Merrifield dedica sempre una parte a sottolineare il fatto che il processo può essere automatizzato. L'obiettivo del presente lavoro di considerare il rapporto tra lo sviluppo delle scienze e l'utilizzo della strumentazione impone di porsi la domanda: il metodo SPPS è stato studiato fin dall'inizio col fine di essere automatizzato oppure l'idea dell'automazione è successiva alla sua messa a punto? Gli scritti di Merrifield lasciano alcuni dubbi al riguardo, ma almeno tre considerazioni fanno propendere per la prima ipotesi. La prima trae origine dall'autobiografia di Merrifield: in essa il biochimico più volte evidenzia le grosse difficoltà che trovò nell'ottimizzare gli aspetti chimici di SPPS ed affermò che «parte della motivazione nello sviluppare il nuovo approccio di sintesi risiedeva nella fiducia che esso si sarebbe ben prestato alla meccanizzazione ed alla automazione» [12]; ciò significa che l'idea dell'automazione era già presente prima che la strategia di sintesi fosse efficace ed era ritenuta di primaria importanza. La seconda verte sull'utilizzo di un recipiente di reazione fin dalla prima sintesi manuale quasi in tutto uguale a quello che sarebbe stato montato sullo strumento due anni dopo; è chiaro che l'idea di automatizzare il processo era già ben definita anche in alcuni dettagli. Infine per effettuare l'ultima considerazione bisogna uscire dal laboratorio di Merrifield ed entrare in quello di W.H. Stein ed S. Moore, collocato un piano più in basso sempre all'interno della Rockefeller University: lì, nel 1958, entrò in funzione il primo strumento automatizzato per la separazione cromatografica degli amminoacidi [13]. Lo stesso Merrifield riporta nella sua autobiografia come fossero frequenti gli incontri e le discussioni scientifiche con i colleghi in sala mensa, ed indubbiamente i due ricercatori gli resero noti i vantaggi in termini di rapidità che il processo di automazione ed il nuovo strumento avevano fornito.

Considerato quanto esposto finora sembra evidente che la nascita di SPPS è strettamente legata alla volontà di automatizzare il processo, tanto che probabilmente la strategia di sintesi non sarebbe stata sviluppata così come è se non ci fosse stata l'intenzione iniziale di renderla automatica. In questo senso le tappe chimiche della sintesi ed il suo processo di automazione devono essere considerati due aspetti complementari; in altre parole per SPPS non si deve intendere solo il metodo di sintesi ma anche il suo processo di automazione e quindi l'utilizzo di uno strumento.

#### *Lo strumento per la sintesi automatizzata dei peptidi*

Nel 1966, tre anni dopo la prima pubblicazione relativa alla sintesi in fase solida, fu pubblicata una descrizione completa del nuovo strumento per la sintesi automatizzata dei peptidi [14] (brevettato poi nel 1970), nato dalla collaborazione di Merrifield con John Morrow Stewart, un ricercatore del gruppo di Woolley che si occupò prevalentemente della parte elettronica, e con Niels Jernberg, capo tecnico della Rockefeller University che progettò e realizzò le due valvole (*rotary selec-*

*tor valves*) che costituiscono il cuore dell'apparecchio. A conferma di quanto sostenuto poche righe sopra vale la pena sottolineare il fatto che Jernberg fu già parte attiva nella realizzazione dello strumento di Stein e Moore del 1958.

In figura 1 è riportata una fotografia del primo strumento, mentre in figura 2 vi è una sua rappresentazione schematica. Lo strumento è formato da due parti principali, una costituita dal recipiente di reazione e dalle componenti atte ad immagazzinare, selezionare e trasferire i reagenti, mentre l'altra consiste nel programmatore che controlla e sequenzia le operazioni di tutte le componenti. Nel recipiente di reazione viene inserito il supporto solido cui è già covalentemente legato, tramite il gruppo carbossilico, il primo amminoacido della catena polipeptidica; i diversi reagenti, solventi ed eluenti, tenuti in appositi contenitori, sono connessi ad esso tramite un sistema di tubature in vetro o in materiale plastico, ed il loro flusso viene controllato grazie ad una pompa dosatrice; la loro selezione avviene ad opera delle valvole costruite da Jernberg, che in base alla rispettiva posizione permettono solo al reagente, solvente e/o eluente desiderato di raggiungere il recipiente di reazione; quest'ultimo, collegato ad un agitatore meccanico, viene svuotato della fase liquida grazie ad una pompa per il vuoto. Il programmatore con-

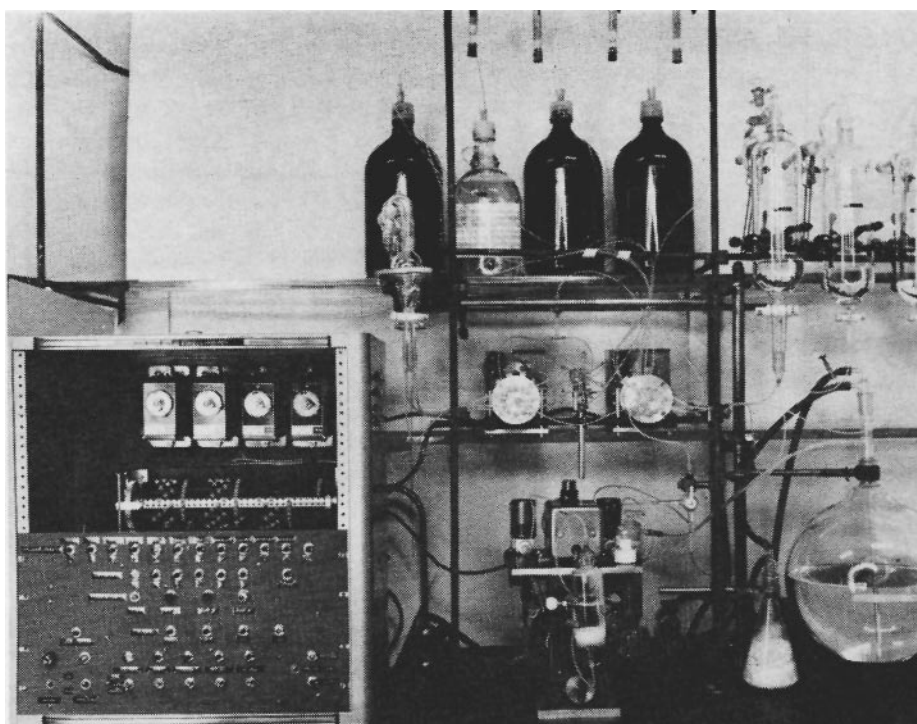


Fig. 1. Il primo strumento per la sintesi automatizzata dei peptidi (immagine tratta da [15]).

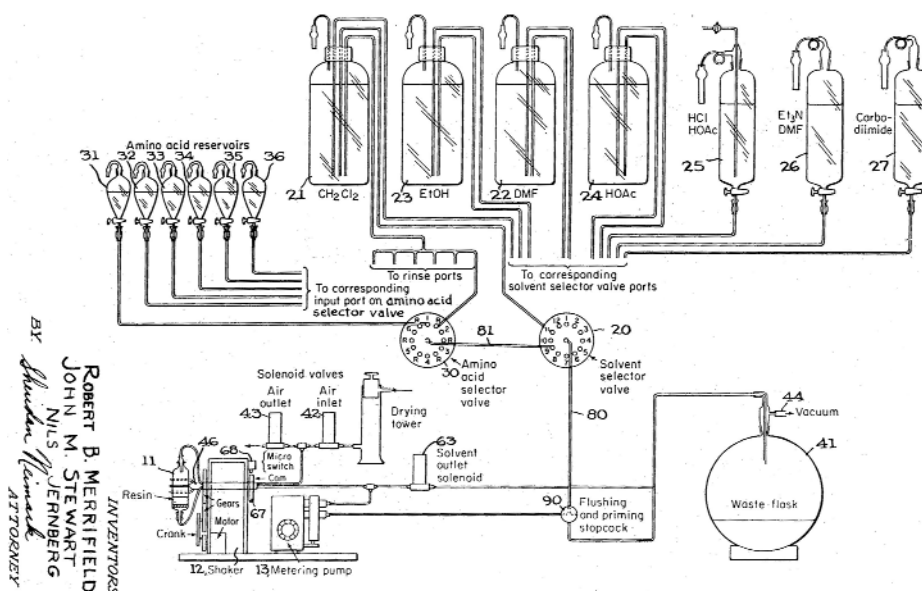


Fig. 2. Schema dello strumento (immagine tratta da [16]).

siste in un tamburo rotante che sulla superficie curva presenta 32 file di buchi, di 30 buchi ciascuna; in corrispondenza di ogni fila vi è un microinterruttore che innesta quando viene azionato una specifica componente dello strumento. Il programma, che contiene tutte le istruzioni necessarie per condurre la sintesi, si stabilisce inserendo negli appropriati buchi dei tappi di nylon: quando il tappo passa sul microinterruttore lo attiva e viene così messa in azione la corrispondente componente dello strumento. Affinché il tamburo compia un giro completo sono necessari trenta scatti (un ciclo), la cui cadenza è controllata grazie ad un temporizzatore. Prima di poter essere utilizzato, lo strumento necessita di una serie di operazioni preliminari quali la calibrazione della pompa dosatrice alla velocità di flusso idonea, il riempimento dei contenitori con i desiderati reagenti, solventi ed eluenti nella giusta quantità, il condizionamento delle tubature, il settaggio del programmatore con il programma desiderato. Il primo strumento possedeva sei contenitori per i reagenti e permetteva quindi di prolungare la catena polipeptidica di sei amminoacidi senza alcun intervento umano; il tempo necessario per un ciclo di reazioni, cioè per l'inserimento di un amminoacido, era di quattro ore, per cui nell'arco di una giornata si poteva far crescere la catena di ben sei residui. Solo pochi anni prima furono necessari a Merrifield undici mesi per sintetizzare un pentapeptide!



*La sintesi del ribonucleasi A*

Nella sua autobiografia Merrifield espone il proprio pensiero a proposito delle novità nelle pratiche di laboratorio: «Credo che sia importante che una nuova metodologia sia sviluppata tecnicamente fino alla massima affidabilità ed efficienza, ma è ancor più importante metterla a punto perchè permetta di imparare cose che prima non erano possibili» [17]. Alla luce di questa asserzione appare chiaro che nell'idea di Merrifield SPPS avrebbe in prima istanza permesso di accorciare i tempi necessari per la sintesi dei peptidi (l'obiettivo primario per cui era nata), ma sarebbe stata veramente utile al progresso della chimica solo se avesse fornito nuove possibilità di ricerca.

Tali nuove possibilità furono palesi quando, nel 1969, Merrifield rese noto tramite una comunicazione di un paio di pagine di aver sintetizzato per intero una proteina del tutto simile ad un enzima naturale [18]; in questa impresa, iniziata nel 1967, fu affiancato da B. Gutte, un ricercatore di origine tedesca. La proteina scelta per tentare la sintesi fu l'enzima ribonucleasi A, un polipeptide di 124 residui di cui erano ben note la sequenza lineare di amminoacidi, la struttura tridimensionale e l'attività biologica. La sintesi fu completata con una resa del 3% e si ottenne un prodotto sintetico con una attività biologica pari al 78% dell'enzima naturale; i due polipeptidi, naturale e sintetico, risultavano praticamente indistinguibili all'analisi elettroforetica e cromatografica e nelle misure di affinità per il substrato. Nonostante il notevole risultato l'interesse verso SPPS crebbe solo moderatamente fino al 1971, anno in cui Merrifield, senza avere nuovi dati di laboratorio, pubblicò un articolo di venti pagine [19] nel quale sosteneva di aver effettivamente sintetizzato l'enzima ribonucleasi A: tale mossa, che ha il chiaro sentore di propaganda, fu vincente e nel 1972 si conta un numero di pubblicazioni relative ad SPPS superiore alla somma di quelle dei due anni precedenti.

La sintesi totale dell'enzima mostrò i vantaggi di SPPS rispetto alla sintesi in fase liquida: in primo luogo la strategia in fase solida consentiva di sintetizzare vere e proprie proteine in tempi rapidi e quindi metteva a disposizione dei biochimici, dei farmacologi e dei medici una notevole quantità di nuovo materiale da studiare; in secondo luogo aprì la strada a nuove conoscenze nel campo dei peptidi. Così, come osservò lo stesso Merrifield, la sintesi del ribonucleasi A fornì una nuova conferma dello stretto rapporto che sussiste tra la sequenza lineare di amminoacidi e l'attività biologica in una proteina, e permise di valutare l'importanza di specifici amminoacidi all'interno della catena.

La sintesi dell'enzima ribonucleasi A, cioè il primo grande successo del metodo di Merrifield, non sarebbe stata portata a termine se il processo non fosse stato automatizzato: infatti «l'assemblaggio dei 124 residui amminoacilici sul precursore protetto della catena lineare del ribonucleasi legata alla resina richiese 369 reazioni chimiche e 11931 operazioni della macchina per la sintesi automatizzata dei peptidi senza alcuna operazione di isolamento intermedia» [20]. È evidente che

senza lo strumento, che permetteva la crescita della catena al ritmo di 6 amminoacidi al giorno, una tale sintesi non sarebbe stata realizzabile in termini di tempo e di costo del lavoro umano. Questa considerazione conferma ulteriormente il fatto che il successo del metodo di sintesi proposto da Merrifield non può essere semplicemente inteso come l'affermazione di una strategia basata sulla successione di alcune reazioni chimiche. La sintesi in fase solida è sì una procedura che segue il tradizionale algoritmo della chimica

reagenti → prodotti

ma in questo caso la freccia non rappresenta solo il processo di trasformazione delle molecole: in essa gioca un ruolo estremamente importante lo strumento, senza il quale alcuni prodotti non si potrebbero ottenere.

#### *La diffusione di SPPS*

Dalla prima pubblicazione in cui si parla di sintesi in fase solida (1963) fino a quella relativa alla sintesi del ribonucleasi A (1969) si contano un'ottantina di articoli correlati ad SPPS, di cui circa la metà porta la firma di Merrifield o di suoi collaboratori o ex studenti: ciò indica che gli studi sul nuovo metodo rimasero per sette anni in mano a pochi gruppi di ricerca. Eppure fin dai suoi primi passi SPPS destò l'interesse di alcuni chimici influenti, tanto che già nel 1964 l'inglese Sir R. Robinson volle vedere di persona come veniva condotta la nuova sintesi. Il principale ostacolo alla diffusione del metodo stava nella difficoltà della comunità dei chimici dei peptidi ad accettarlo: ancora nel 1971, all'XI congresso della European Peptide Society tenuto a Vienna, furono espressi dubbi e critiche. In particolare G. Marshall, il primo studente PhD di Merrifield, fu attaccato per la sintesi di analoghi della proteina ACP: «I direttori di molti laboratori dediti alla ricerca sui peptidi... furono più che generosi con le loro critiche; l'unica vera difesa era che non [si] poteva distinguere il nostro prodotto sintetico dalla proteina isolata dal fegato utilizzando le tecniche biochimiche e biofisiche disponibili all'epoca». Marshall trova una spiegazione per questa diffidenza: «...il trattamento a me riservato era una reazione alla minaccia che SPS costituiva per lo statu quo della chimica dei peptidi in soluzione e non alla scienza che presentai» [21].

SPPS cominciò a sovvertire tale statu quo proprio grazie ai notevoli risultati e potenzialità mostrati con la sintesi del ribonucleasi A: dopo di essa fu notevole l'aumento dell'utilizzo di SPPS e il numero delle pubblicazioni lo conferma. Nel quinquennio successivo (1970-1974) si enumerano oltre 200 articoli in cui si fa riferimento al metodo di Merrifield.

Tali articoli vertevano in tre principali filoni di ricerca. Un primo filone era ancora strettamente connesso all'ottimizzazione della strategia di sintesi. Molteplici furono le modifiche apportate al metodo di Merrifield: come esempio si possono ricordare quella di J.D. Glass, I.L. Schwartz e R. Walter [22], che legarono l'am-

minoacido al supporto insolubile tramite la catena laterale in modo da permettere la crescita del polipeptide in entrambe le direzioni, oppure quella di H. Frank e H. Hagenmaier [23], una elegante tecnica mista fase liquida – fase solida. Tra le varie proposte quella che ha riscosso più successo e che è stata poi successivamente utilizzata nella stragrande maggioranza delle sintesi è quella di ricorrere alla sintesi per frammenti (*fragment o segment synthesis*) più funzionale e rapida della sintesi passo passo proposta da Merrifield. Essa consiste nel sintetizzare separatamente e contemporaneamente brevi sequenze di amminoacidi ed assemblarle successivamente, in fase liquida o solida, in modo da ottenere il polipeptide desiderato: operando in tal maniera si accorciano notevolmente i tempi e si evitano i numerosi problemi dovuti all'aggravarsi di una lunga catena sul supporto insolubile.

Il secondo filone era legato al fatto che era oramai possibile sintetizzare rapidamente i polipeptidi, sia in tutto uguali a quelli naturali, sia loro analoghi, sia nuovi ibridi. Tale possibilità fu colta con entusiasmo soprattutto da parte della ricerca nel campo medico e farmaceutico, in quanto offriva il destro per progettare molecole che avessero proprietà inibitorie a livello enzimatico e ormonale o che trovassero applicazioni nel campo immunologico: fu possibile infatti, sintetizzando enzimi ed ormoni modificati o loro parti, ricercare quale fosse la regione della sequenza di amminoacidi principale responsabile della loro attività e quindi sintetizzare peptidi (o peptidi modificati) specifici per il loro controllo o la loro inibizione; allo stesso modo, testando con immunoglobuline diversi polipeptidi, fu possibile definire gli specifici epitopi degli antigeni.

Furono soprattutto le nuove possibilità offerte al ricco mondo farmaceutico che stimolarono la ricerca nel terzo filone, quello strumentale. Già pochi anni dopo la fabbricazione dell'apparecchio ideato da Merrifield altri si erano cimentati nella produzione artigianale di sintetizzatori automatizzati [24, 25], ma fu verso la metà degli anni settanta che cominciarono ad essere commercializzati strumenti più sofisticati sia nell'elettronica che nel recipiente di reazione [26], collegati a sistemi analitici di monitoraggio in tempo reale dell'andamento della sintesi, quali spettrofotometri o colorimetri. Successivamente allo strumento per la sintesi dei peptidi venne associata la tecnologia delle alte pressioni, permettendo la nascita di apparecchi che operassero in flusso continuo ed abbreviando così notevolmente i tempi necessari per le sintesi [27].

#### *SPPS: le aperture per altre discipline*

Nel discorso in occasione della consegna del premio Nobel a Merrifield, B. Lindberg, chimico dei carboidrati membro dell'Accademia Reale di Svezia, sottolineò che il metodo di sintesi tramite fase solida «ha creato nuove possibilità nella chimica delle proteine e degli acidi nucleici, e ha stimolato il progresso della biochimica, della biologia molecolare, della medicina e della farmacologia» [28]. SPPS dunque, ideata inizialmente per risolvere i problemi legati ai lunghi tempi ed alle

scarse rese nella sintesi dei peptidi, si è poi dimostrata importante nel favorire lo sviluppo non solo della chimica delle proteine ma anche di campi ad essa attigui. Si è già accennato ai motivi per cui si è rivelata utile nel campo farmaceutico e medico, mentre è ancora da chiarire il suo rapporto con la chimica degli acidi nucleici.

L'apporto fornito da SPPS a tale disciplina è da cercare nel processo di automazione più che nella strategia di sintesi: l'uso che ne fecero i chimici degli acidi nucleici infatti non è legato agli aspetti chimici del processo ideato da Merrifield, ma alle possibilità offerte dallo strumento. Mentre infatti le reazioni cui si ricorre nella sintesi degli oligonucleotidi sono diverse da quelle per le proteine (diverso supporto, diversi reagenti, solventi ed eluenti), del tutto analoga risulta essere la sequenza delle operazioni da compiere. Lo stesso Merrifield, quando presentò alla comunità scientifica il suo strumento nel 1966, era conscio di questo fatto e scriveva: «I principi della sintesi in fase solida potrebbero essere applicati alla sintesi di altri polimeri dalla struttura definita. Ci si aspetta che la flessibilità contenuta nel progetto di questo strumento possa agevolare il suo utilizzo nella sintesi automatizzata di tali polimeri» [29]. In questo caso la proposta non era particolarmente originale, in quanto un altro gruppo di ricerca, guidato da R.L. Letsinger presso la Northwestern University dell'Illinois, si stava già dedicando alla sintesi degli oligonucleotidi tramite il metodo in fase solida dal 1963; il processo fu però automatizzato solo dopo la comparsa dello strumento di Merrifield. Come nel campo delle proteine, anche in questo presto furono evidenti i vantaggi del nuovo metodo automatizzato che fu diffuso ed implementato in pochi anni. Il merito di Merrifield sta dunque anche nell'aver progettato una strategia automatizzata applicabile alla sintesi di diversi biopolimeri, e non solo una specifica strategia di sintesi delle proteine.

Nel 1984, anno in cui fu assegnato il premio Nobel a Merrifield, H.M. Geysen [30], un ricercatore australiano che si occupava di immunologia, sintetizzò contemporaneamente tramite SPPS 96 esapeptidi e ne testò la capacità di interagire con uno specifico anticorpo senza separarli dalla fase solida: questa fu la prima sintesi di una «libreria» di molecole, cioè di un insieme di molecole caratterizzate da una struttura comune ma sostituite casualmente in punti specifici. Verso la fine degli anni '80 la tecnica di sintesi multipla e di rapido screening proposta da Geysen si diffuse soprattutto nel campo farmaceutico e si affermò così la chimica combinatoriale. In tale nuova disciplina chimica diversi scienziati ed epistemologi vedono, utilizzando termini kuhniani, una sostituzione di paradigma o addirittura una rivoluzione scientifica. Non è interesse del presente contributo discutere questa forte presa di posizione, ma è indubbio che la chimica combinatoriale prevede un approccio alla ricerca differente rispetto a quella tradizionale, almeno per quanto riguarda gli aspetti legati alla sintesi: mentre nella tradizionale generalmente si progettava una strategia che portasse ad una sostanza dalle proprietà desiderate (o almeno così si sperava), la chimica combinatoriale richiede di sintetizzare rapidamente tutte le molecole possibili dotate di una certa struttura e altrettanto rapidamente testarne le proprietà, al fine di selezionare quelle più adatte alle necessità.

Ciò che importa qui evidenziare è che la chimica combinatoriale non solo non si sarebbe potuta affermare, ma nemmeno si sarebbe potuta pensare se non fosse stato disponibile un metodo di sintesi di biopolimeri rapido ed automatizzato.

### *Conclusione*

L'interpretazione dell'opera di Merrifield nell'ottica dello studio del rapporto tra scienze naturali e strumentazione dà sostegno alle affermazioni di quanti, filosofi, storici e scienziati, ritengono che la conoscenza scientifica moderna si ampli grazie all'uso razionale di strumenti ed alla creatività nel progettarli. SPPS infatti ha sostenuto la crescita della chimica dei peptidi e di discipline ad essa attigue grazie al fatto di essere automatizzata: se essa fosse stata condotta solo manualmente non sarebbe stato possibile sintetizzare l'enzima ribonucleasi A e di conseguenza, con ogni probabilità, non avrebbe suscitato l'interesse del mondo farmaceutico e di quello medico. Il metodo di Merrifield è dunque da considerare più come il processo di automazione di una strategia di sintesi che come una strategia di sintesi automatizzata: si è visto come SPPS sia stata progettata con la precisa intenzione di renderla automatica e come si sia affermata e diffusa solo in seguito alla costruzione di uno strumento che le permettesse di rendere al meglio.

Il fatto che SPPS abbia consentito lo sviluppo delle conoscenze scientifiche e non solo l'instaurarsi di una nuova prassi di laboratorio è evidente se si prendono in esame gli aspetti cognitivi della chimica delle proteine che grazie ad essa sono stati discussi: forse il più noto (e ancor oggi controverso) è quello relativo al rapporto che intercorre tra sequenza lineare di amminoacidi ed attività biologica dei polipeptidi, ma ve ne sono altri altrettanto importanti, quali il ruolo giocato dai singoli amminoacidi all'interno delle diverse catene proteiche o i meccanismi di reazione che governano le varie fasi di SPPS. Se si considera che questi risultati, insieme alla nascita della chimica combinatoriale e agli sviluppi nel campo medico, farmaceutico e degli acidi nucleici, sono stati originati da una strategia automatizzata nata inizialmente per fornire in tempi più rapidi un maggior numero di peptidi a più lunga catena, allora risulta evidente che, almeno in questo caso, la nascita e l'utilizzo creativo di un mezzo strumentale ha non solo affiancato la crescita delle conoscenze scientifiche ma ne ha anche in qualche modo indirizzato il percorso.

Se la relazione tra scienza e strumenti ora discussa viene condivisa e accettata, bisogna riconoscere che è inopportuno pensare alle scienze naturali moderne e alla loro storia come un insieme o successione di teorie, senza tenere conto del contributo fornito dagli strumenti: questi sono una base comune a tutte le discipline che si occupano dello studio della natura e ne indirizzano il percorso di crescita.

BIBLIOGRAFIA

- [1] L. Geymonat, 1970. *Storia del pensiero filosofico e scientifico*, vol. II. Garzanti, Milano, Italia, 171.
- [2] I. Lakatos, 1970. La falsificazione e la metodologia dei programmi di ricerca scientifici. In: *La metodologia dei programmi di ricerca scientifici* (I. Lakatos, 2001). Il Saggiatore - EST, Milano, Italia, 62-76.
- [3] G. Villani, 2001. *La chiave del mondo. Dalla filosofia alla scienza: l'onnipotenza delle molecole*. Cuen, Napoli, Italia.
- [4] G. Boniolo (ed.), 1997. *Filosofia della fisica*. Mondadori, Milano, Italia.
- [5] F. Focher, 2000. La biologia necessita di una nuova filosofia della scienza? In: *La scuola classica di Cremona, Annuario dell'associazione ex alunni del Liceo - Ginnasio D. Manin*, 2000, Viciguerra, Pizzighettone (Cr), Italia, 214-225.
- [6] L. Cerruti, 2003. *Bella e potente - La chimica del Novecento fra scienza e società*. Editori Riuniti, Roma, Italia, 467-475.
- [7] P. Rossi, 2002. *I filosofi e le macchine 1400-1700*. Universale Economica Feltrinelli, Milano, Italia, 94-100.
- [8] N. Grew, 1681. *Musaeum Regalis Societatis; or, a catalogue & description of the natural and artificial rarities belonging to the Royal Society and preserved at Gresham Colledge*. London, UK, 357-368 (tratto da D. Warner, 1994. Terrestrial magnetism: for the glory of God and the benefit of mankind. In: *Instruments* (A. Van Helden, T.L. Hankins, eds., 1994), Osiris, vol. 9, Chicago, IL, USA, 67).
- [9] S. Schaffer, 1994. Machine philosophy: demonstration devices in Georgian mechanics. In: *Instruments* (A. Van Helden, T.L. Hankins, eds, 1994), Osiris, vol. 9, Chicago, IL, USA, 157-182.
- [10] B. Merrifield, 1993. *Life during a golden age of peptide chemistry - The concept and development of Solid-Phase Peptide Synthesis*. American Chemical Society, Washington DC, USA.
- [11] R.B. Merrifield, 1963. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide, *Journal of American Chemical Society*, 85, 2149.
- [12] B. Merrifield, 1993. *Cit.*, 114.
- [13] D.H. Spackman, W. H. Stein, S. Moore, 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Analytical Chemistry*, 30, 1190-1206.
- [14] R.B. Merrifield, J.M. Stewart, N. Jernberg, 1966. Instrument for automated synthesis of peptides. *Analytical Chemistry*, 38, 1905-1914.
- [15] R.B. Merrifield, 1965. Automated synthesis of peptides. *Science*, 150, 183.
- [16] R.B. Merrifield, J.M. Stewart, N. Jernberg, 1970. Apparatus for the automated synthesis of peptides. *United States Patent Office*, US 3531258.
- [17] B. Merrifield, 1993. *Cit.*, 18.
- [18] B. Gutte, R.B. Merrifield, 1969. The total synthesis of an enzyme with Ribonuclease A activity. *Journal of American Chemical Society*, 91, 501-502.
- [19] B. Gutte, R.B. Merrifield, 1971. The synthesis of Ribonuclease A. *Journal of Biological Chemistry*, 246, 1922-1941.
- [20] B. Gutte, R.B. Merrifield, 1969. The total synthesis of an enzyme with Ribonuclease A activity. *Journal of American Chemical Society*, 91, 502.
- [21] G.R. Marshall, 2003. Solid-phase Synthesis: a paradigm shift. *Journal of Peptide Science*, 9, 538.
- [22] J.D. Glass, I.L. Schwartz, R. Walter, 1972. Bridging of peptides to solid supports through the dinitrophenylene moiety. Bidirectional extension of peptide chains. *Journal of American Chemical Society*, 94, 6209-6211.

- [23] H. Frank, H. Hagenmaier, 1975. Ein neues Verfahren zur Peptidsynthese: die Alternierende Fest-Flüssigphasen-Methode (A novel method for peptide synthesis: the alternating solid-liquid phase method). *Experientia*, 31, 131-133.
- [24] M.C. Khosla, R.R. Smeby, F.M. Bumpus, 1967. Apparatus for solid-phase peptide synthesis. *Science*, 156, 253-254.
- [25] J. Halstrom, P. Roepstorff, 1969. Punched tape controlled peptide synthesizer. *Acta Chemica Scandinavica (1947-1973)*, 23, 2830-2838.
- [26] W.K. Park, D. Regoli, 1973. System for the solid-phase peptide synthesis. *United States Patent Office*, US 3715190.
- [27] M.S. Verlander, W.D. Fuller, M. Goodman, 1980. Rapid, large scale, automatable high pressure peptide synthesis. *United States Patent Office*, US 4192798.
- [28] B. Lindberg, 1984. Presentation speech (for Nobel Prize in Chemistry 1984). In: *Nobel Lectures, Chemistry 1981-1990*. (B. G. Malmström, ed, 1992) World Scientific Publishing Co., Singapore.
- [29] R.B. Merrifield, J.M. Stewart, N. Jernberg, 1966. *Cit.*, 1914.
- [30] H.M. Geysen, R.H. Meloen, S.J. Barteling, 1984. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acids. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 81, 3998-4002.