

Chimica combinatoriale e sintesi parallela

Sintesi combinatoriale

- Sintesi automatizzata di un gran numero di composti in un breve periodo di tempo utilizzando un processo ben definito e una grande varietà di reagenti
- Normalmente effettuata su piccola scala usando la sintesi in fase solida e sintetizzatori automatici
- Miscele di composti in ciascun ambiente di reazione
- Utile per la ricerca di lead compound o per l'ottimizzazione
- Libraries di diverse dimensioni con scopi diversi

Sintesi parallela

- Sintesi automatizzata di un gran numero di composti in un breve periodo di tempo utilizzando un processo ben definito e una grande varietà di reagenti
- Un solo prodotto in ciascun ambiente di reazione
- Utile per SAR e ottimizzazione del lead compound

Sintesi combinatoriale

Design di Libraries

GENERICHE

>10.000

Diversità strutturale

Building block diversi

Strategie flessibili

Possibilità di molti target biologici

FOCALIZZATE

<10.000

Lead oriented

Retrosintesi

Strategie definite

Un target biologico

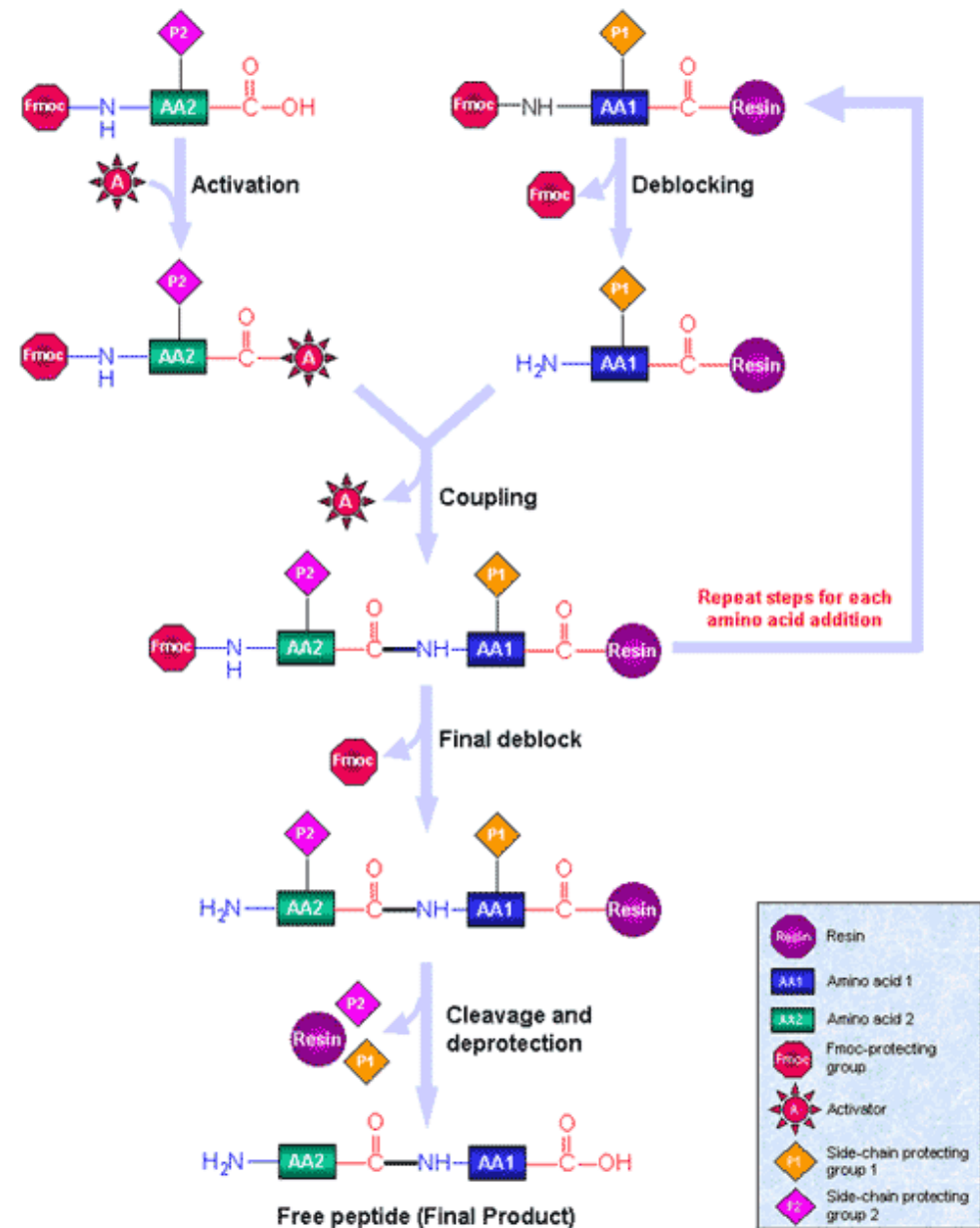
Sintesi in fase solida

Merrifield *JACS* **1963**, 85, 2149 (peptidi)

1978: prime reazioni multi steps

1992: composti non polimerici

Utilizzo in chimica combinatoriale



Sintesi in fase solida

- **Reagenti legati a un solido** (resina/superficie) e modificati tenendoli ancorati
- Presenza di un **linker o anchor**
- **Composto legato al supporto** tramite il linker
- **Legame stabile** in tutte le condizioni di reazione e scindibile in condizioni specifiche
- Prodotto staccato alla fine della sintesi
- Reagenti specifici possono essere legati a specifiche biglie
- Le biglie possono essere mescolate e poste a reagire nello stesso recipiente di reazione

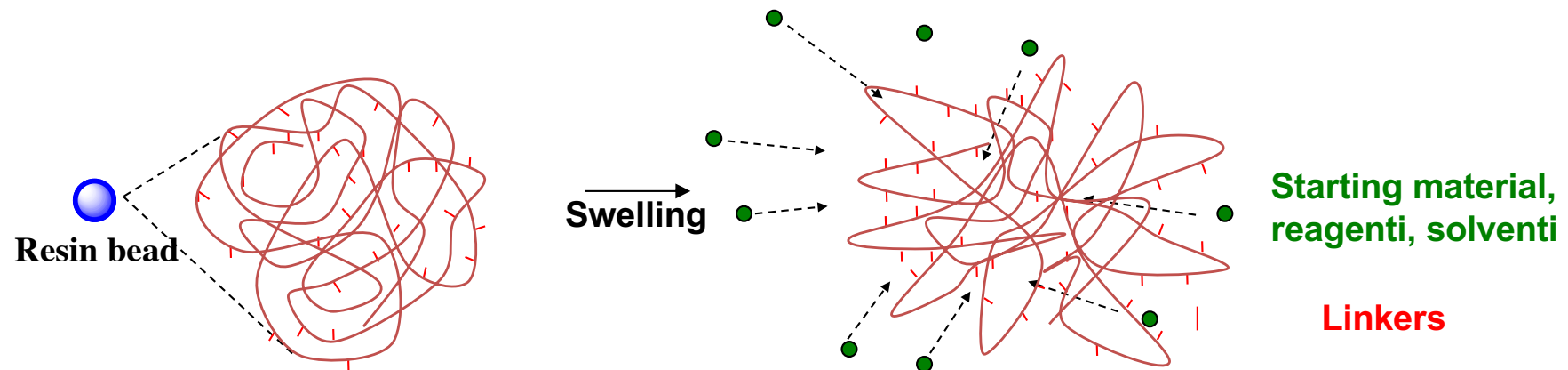
Sintesi in fase solida

- Prodotti formati sono diversi e fisicamente distinti sulle varie biglie
- Reagenti in eccesso (facilmente rimossi)
- **Intermedi di reazione** legati alle biglie: non devono essere isolati e purificati
- Singole biglie possono essere separate per isolare singoli prodotti
- Supporto polimerico: può essere **rigenerato** e riutilizzato dopo il cleavage del prodotto
- **Automatizzazione** possibile

Sintesi in fase solida

Biglie: capacità di rigonfiamento (swelling)
stabilità

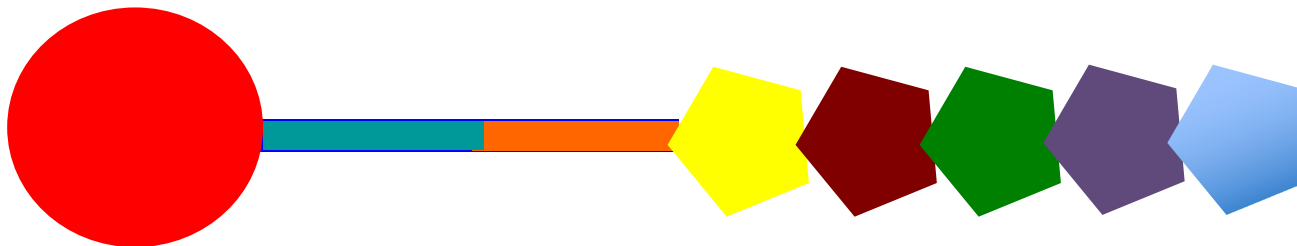
Reazioni all'INTERNO della biglia – solo l'1% dei siti reattivi è sulla superficie



**Swelling
Loading**

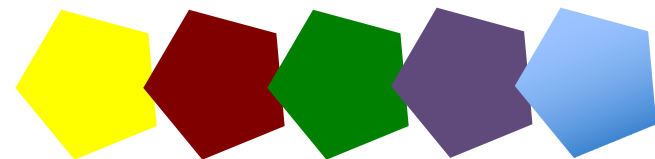
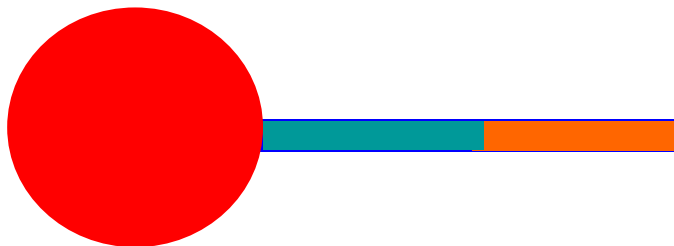
Sintesi in fase solida

- **Linker**: molecola bifunzionalizzata con una porzione funzionale legata IRREVERSIBILMENTE alla resina e l'altra estremità che si lega reversibilmente ai building blocks (rimozione del prodotto). Determina quale funzionalizzazione si ha dopo il cleavage
- **Spacer**: porzione molecolare introdotta tra resina e linker. Può cambiare le caratteristiche "locali" della resina
- **Anchor**: spacer + linker. In assenza di spacer, anchor e linker coincidono



Sintesi in fase solida

- **Linker**: molecola bifunzionalizzata con una porzione funzionale legata IRREVERSIBILMENTE alla resina e l'altra estremità che si lega reversibilmente ai building blocks (rimozione del prodotto). Determina quale funzionalizzazione si ha dopo il cleavage
- **Spacer**: porzione molecolare introdotta tra resina e linker. Può cambiare le caratteristiche "locali" della resina
- **Anchor**: spacer + linker. In assenza di spacer, anchor e linker coincidono



Sintesi in fase solida

Supporto solido

Resina polistirenica (con parzialmente cross-linking)

Natura idrofobica

Problemi nella sintesi peptidica per il folding del prodotto

Resina poliammidica (Sheppard)

discreta polarità

Tentagel

ambiente simile a etere e THF

Superfici di vetro funzionalizzato (biglie, aghi, piastre)

Diametro medio: 10-750 μm

Sintesi in fase solida

Supporti solidi: Stabilità meccanica, chimica e termica
compatibilità chimica

Polimeri & dendrimeri

Resine gelatinose

PS/DVB 1-2%

Poliacrilammide

PEG crosslinked:

PEGA (PEG-N,N-dimetilacrilammide)

SPOCC

PS/PEG, PS/PTHF

Polimeri con graphing

PEG/PS (Tentagel)

PE/PS

Supporti macroporosi

Macrobeads

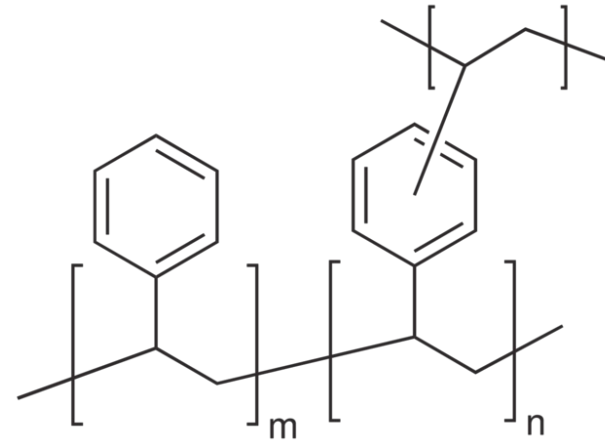
Sintesi in fase solida

Resine

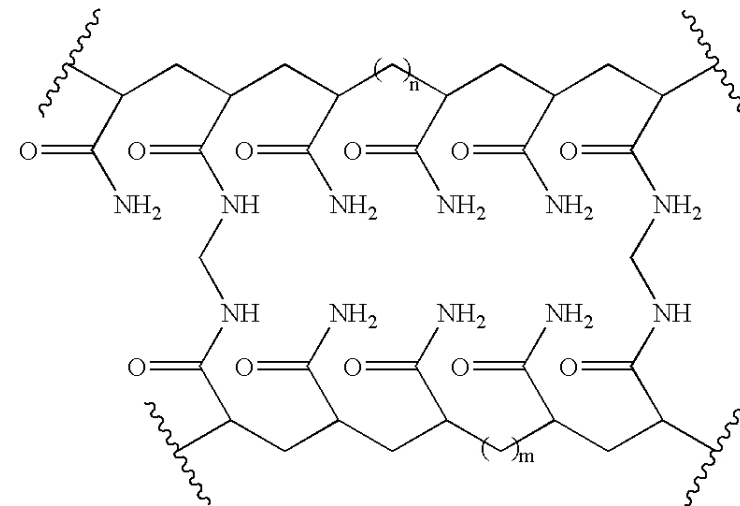
PS/DVB 1-2%

Stabilità termica

Non compatibile con solventi acquosi



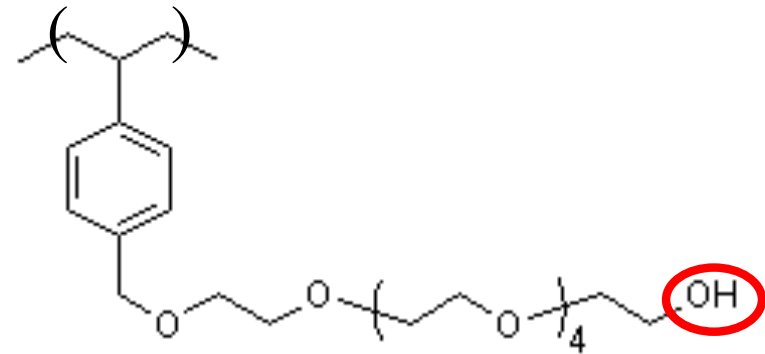
Poliacrilammide



Sintesi in fase solida

TENTAGEL

70% in peso di PEG

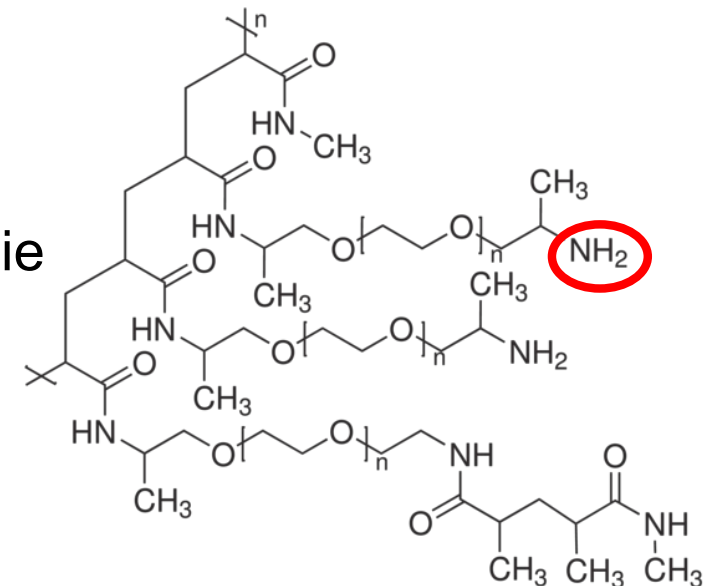


PEGA

Rigonfia in solventi polari

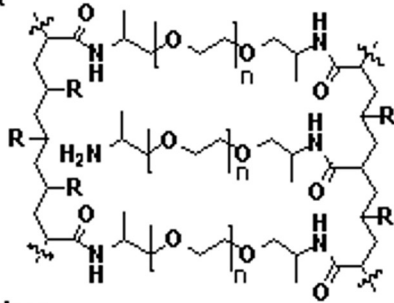
Può essere usata per lo screen diretto sulle biglie

Non porta a binding aspecifico nei saggi di binding di proteine



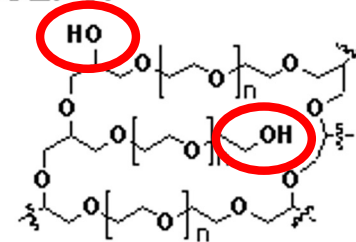
Sintesi in fase solida

PEGA

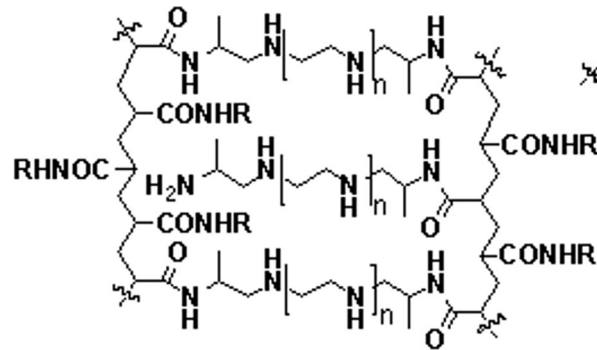


PEG-Based Resins

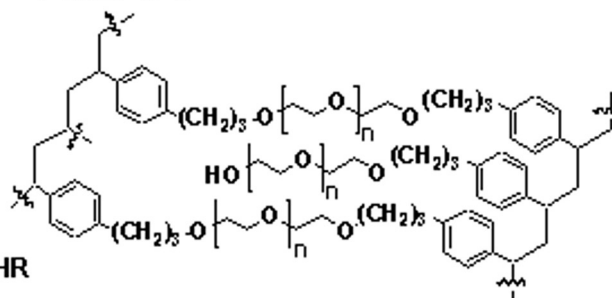
POEPOP



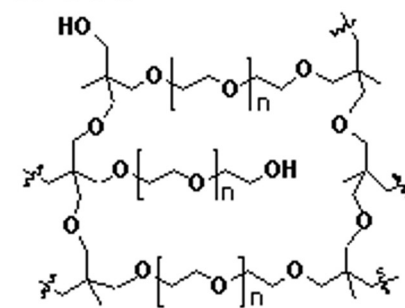
Ultramine



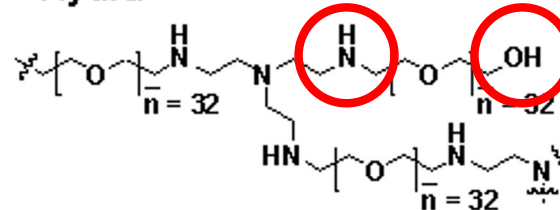
POEPS-3



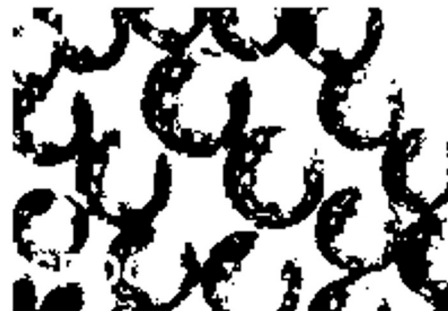
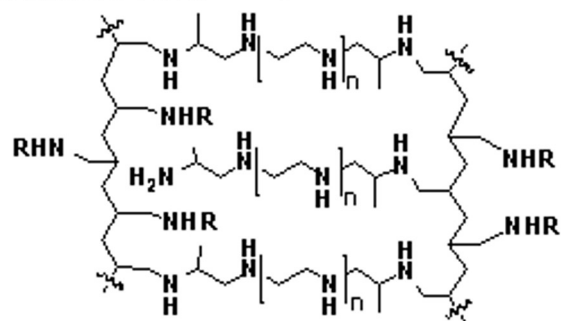
SPOCC



Hydra



Ultramine-Red



- Beaded
- Stable in synthesis
- Biocompatible
- Property control
- Transparent
- Encoding

www.versamatrix.com

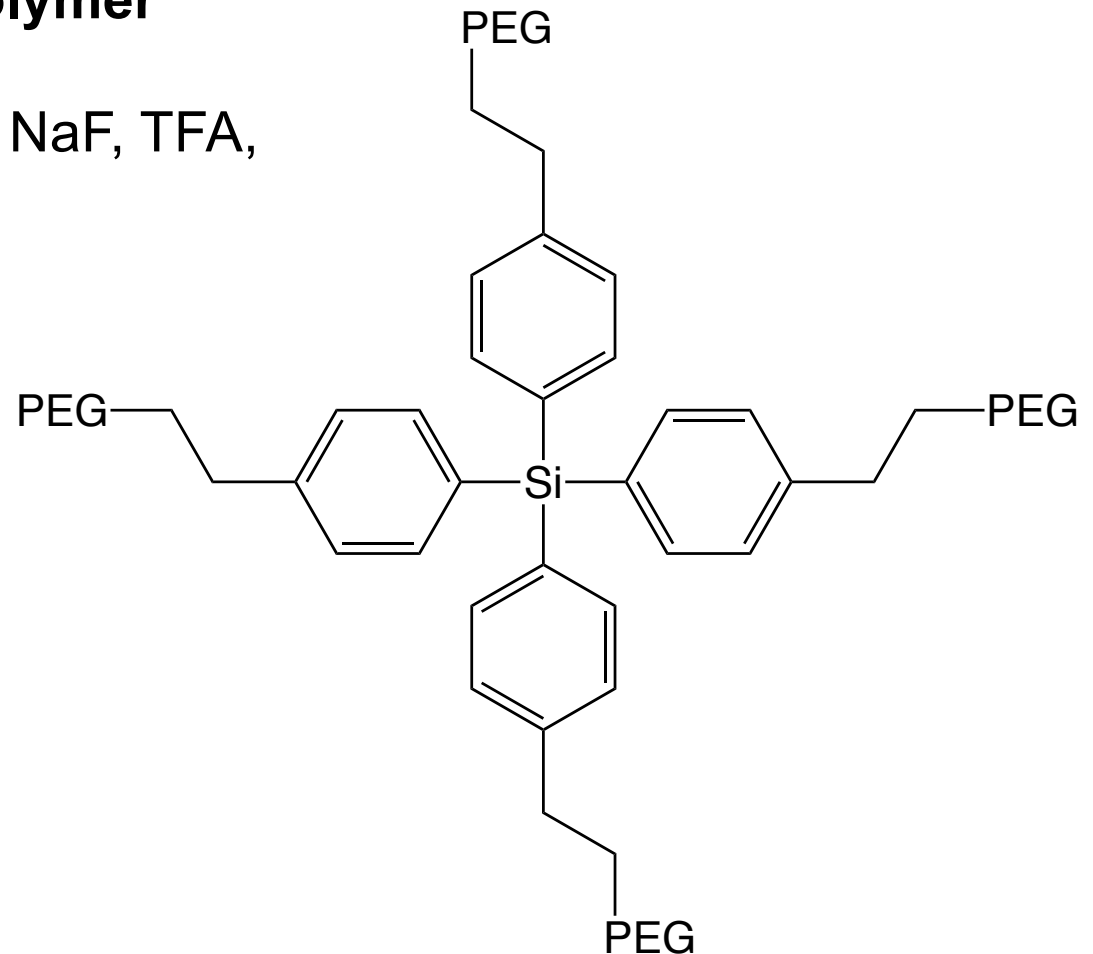
Sintesi in fase solida

EXPO₃₀₀₀ Expandable polymer

Espansione dopo trattamento con NaF, TFA,
TFMSA

Volume finale 5/10 volte maggiore

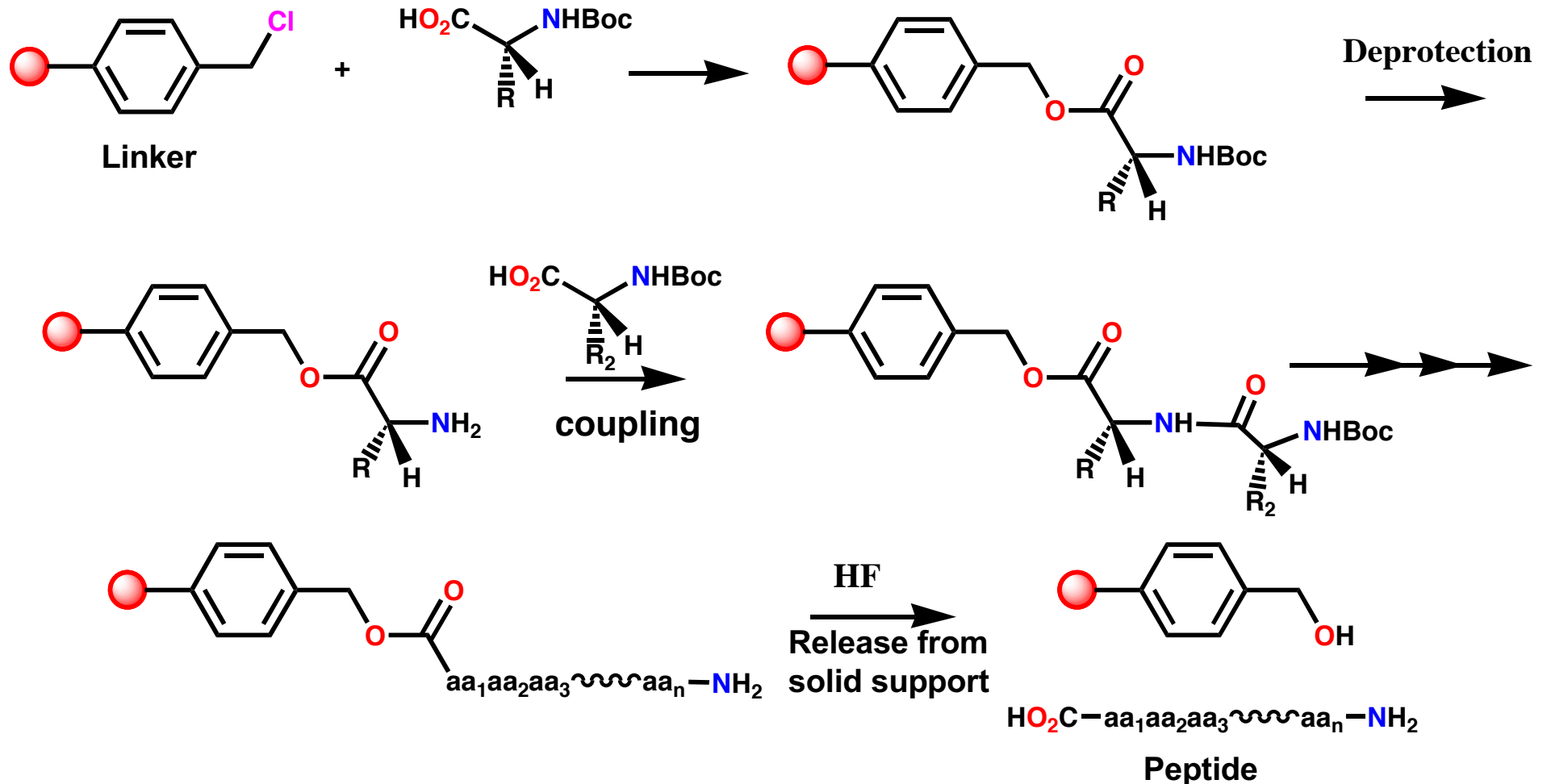
Accessibilità delle proteine



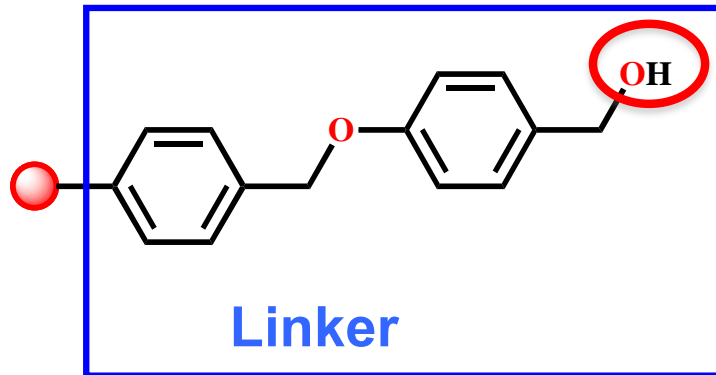
Sintesi in fase solida

Resina di Merrifield (Clorometilica)

 = resin bead

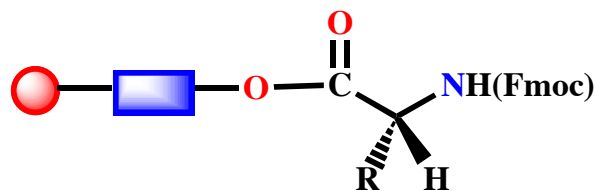
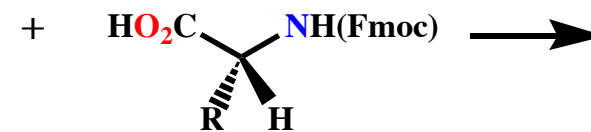


Sintesi in fase solida

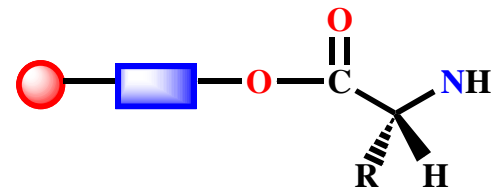


Resina di Wang

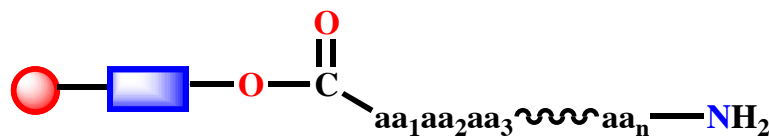
Acido carbossilico



piperidina
deprotezione

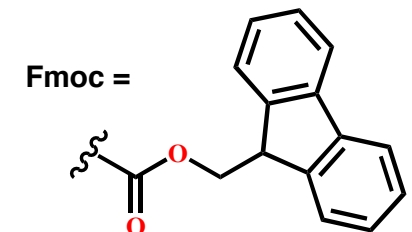
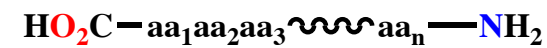


Peptide synthesis

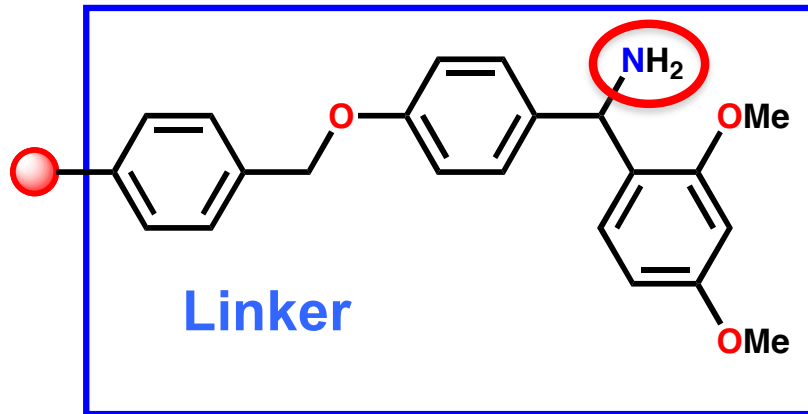


TFA
cleavage

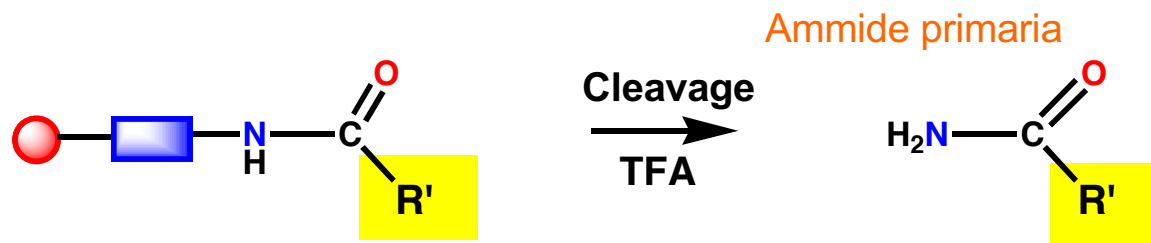
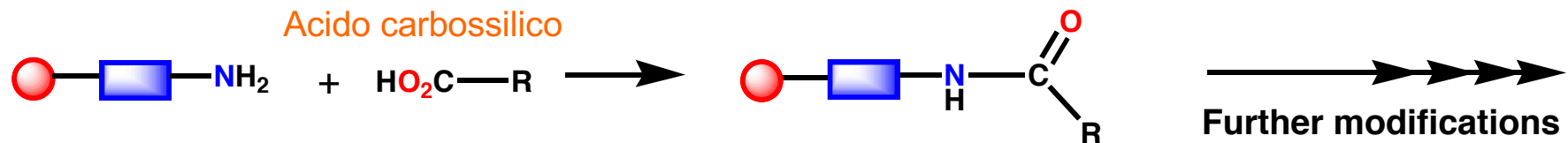
Acido carbossilico



Sintesi in fase solida

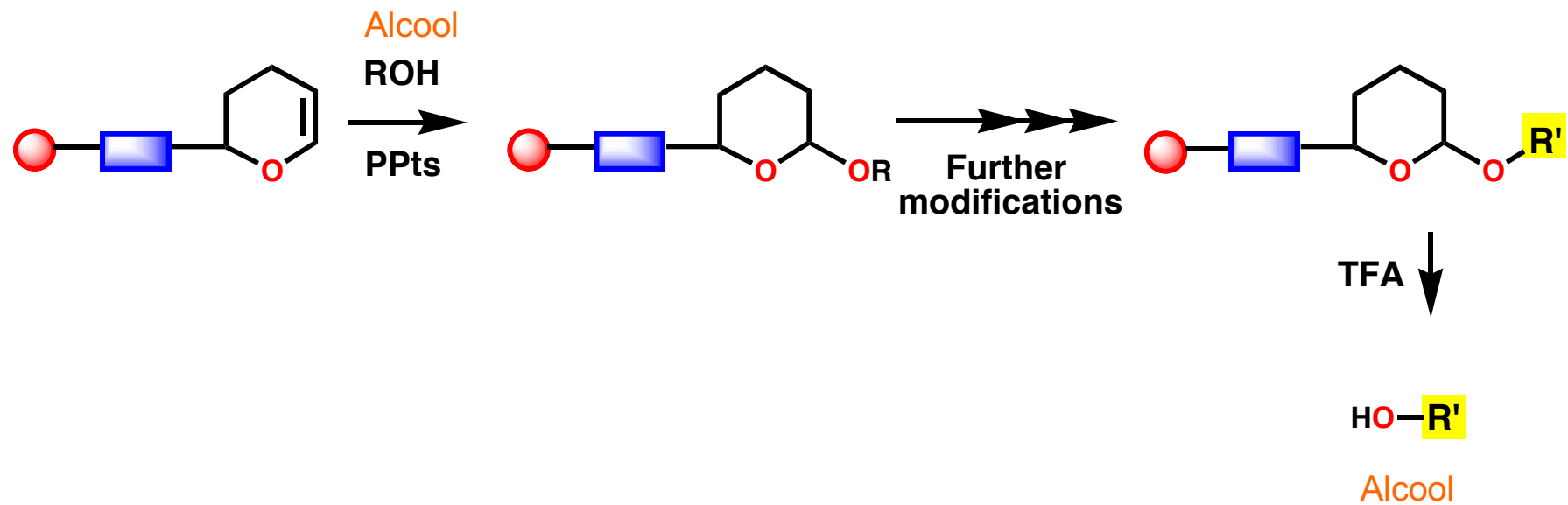
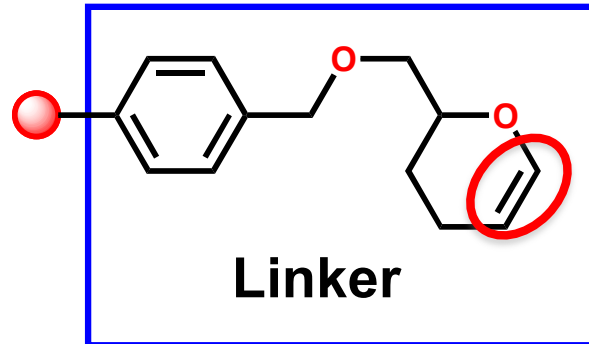


Resina Rink

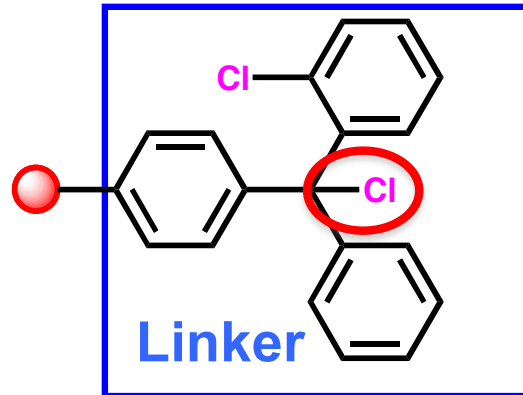


Sintesi in fase solida

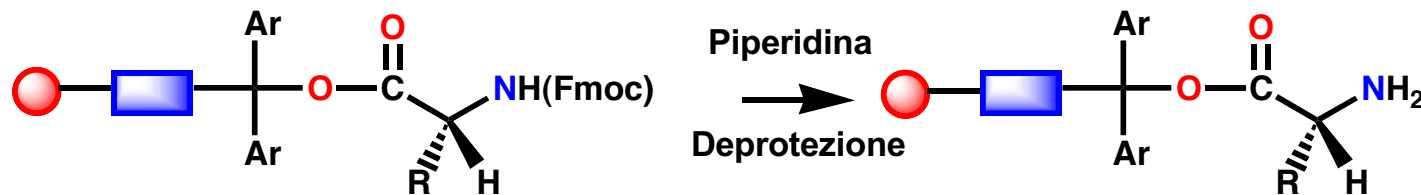
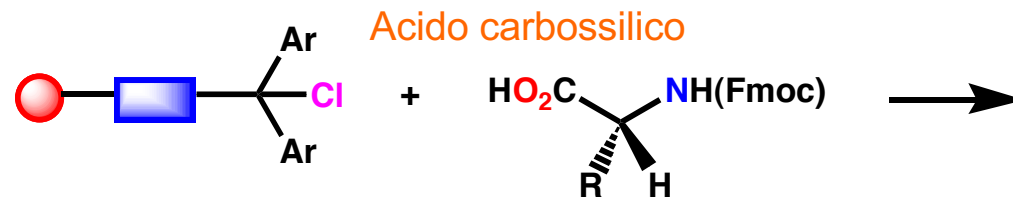
Resina diidropiranicca



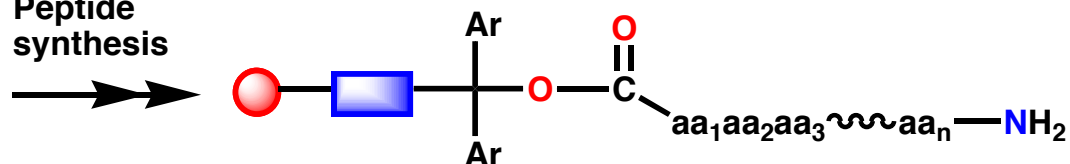
Sintesi in fase solida



Resina di Barrios (tritle)

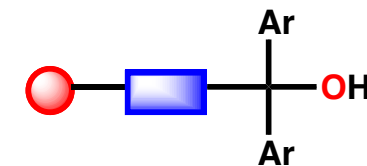


Peptide synthesis



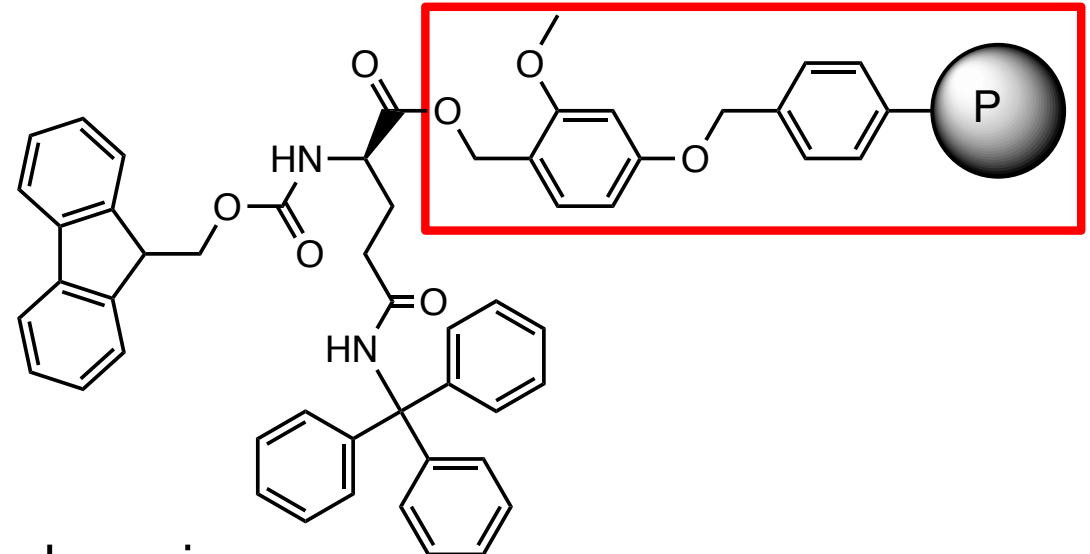
TFA
CH₂Cl₂
or HOAc
TFE, CH₂Cl₂

Acido carbossilico

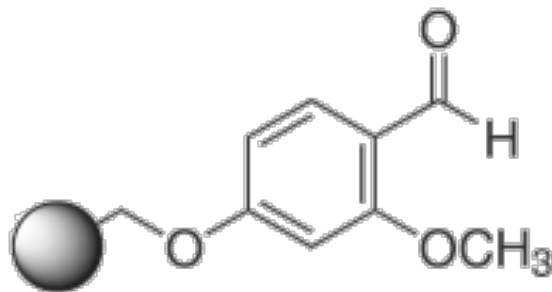


Sintesi in fase solida

Cleavage TFA 1%
Prodotto: **Acido carbossilico**



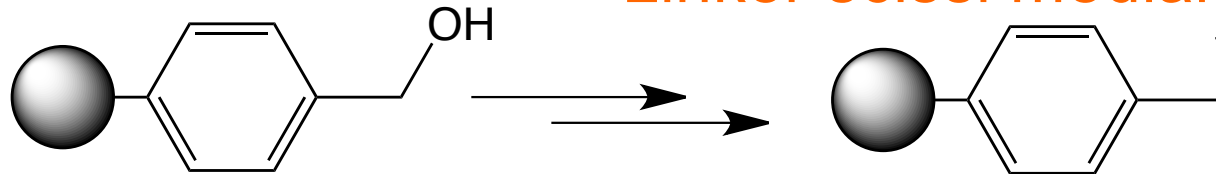
Resina AMEBA
Acid sensitive methoxy BenzAldehyde resin



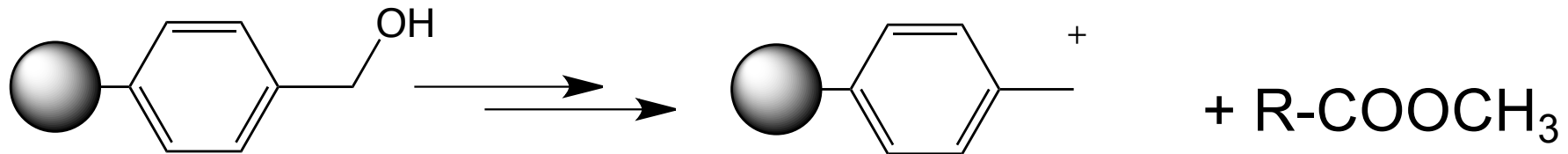
Cleavage TFA 5%
Prodotto: **Ammide**

Sintesi in fase solida

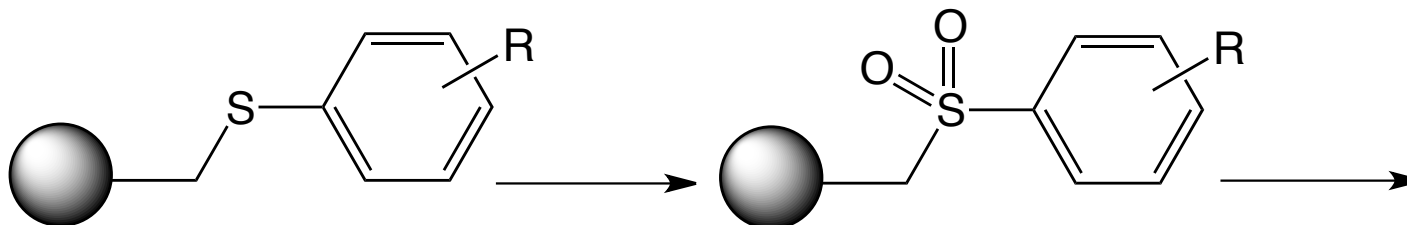
Linker scissi mediante saponificazione



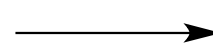
Linker scissi mediante transesterificazione



Linker Safety catch



Sostituzione aromatica



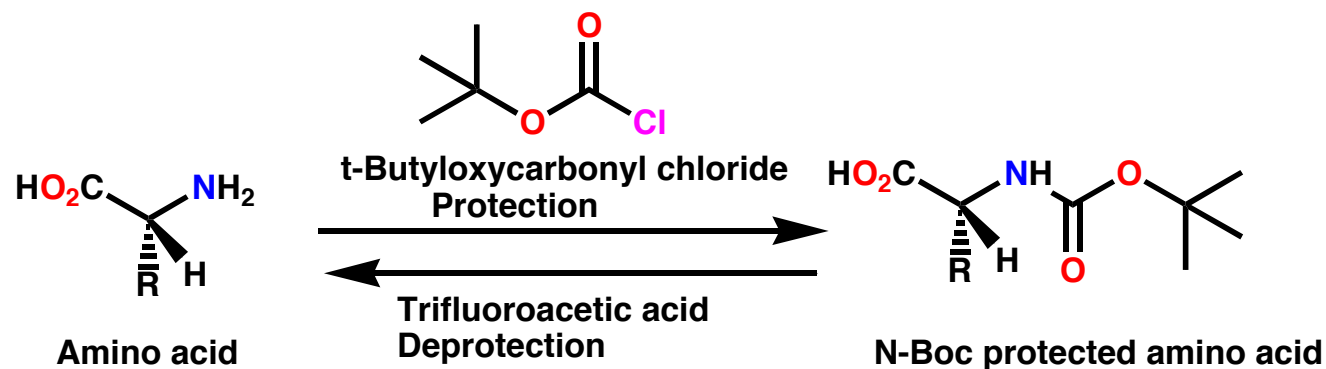
Rilascio di ammine aromatiche

Gruppi protettori e strategie sintetiche

- Protezione di gruppi funzionali per evitare reazioni secondarie
- Presenza di gruppi protettori introdotti facilmente con alte rese e in condizioni blande
- Stabili nelle condizioni di reazione
- Rimovibili selettivamente e in condizioni blande

Sintesi peptidica

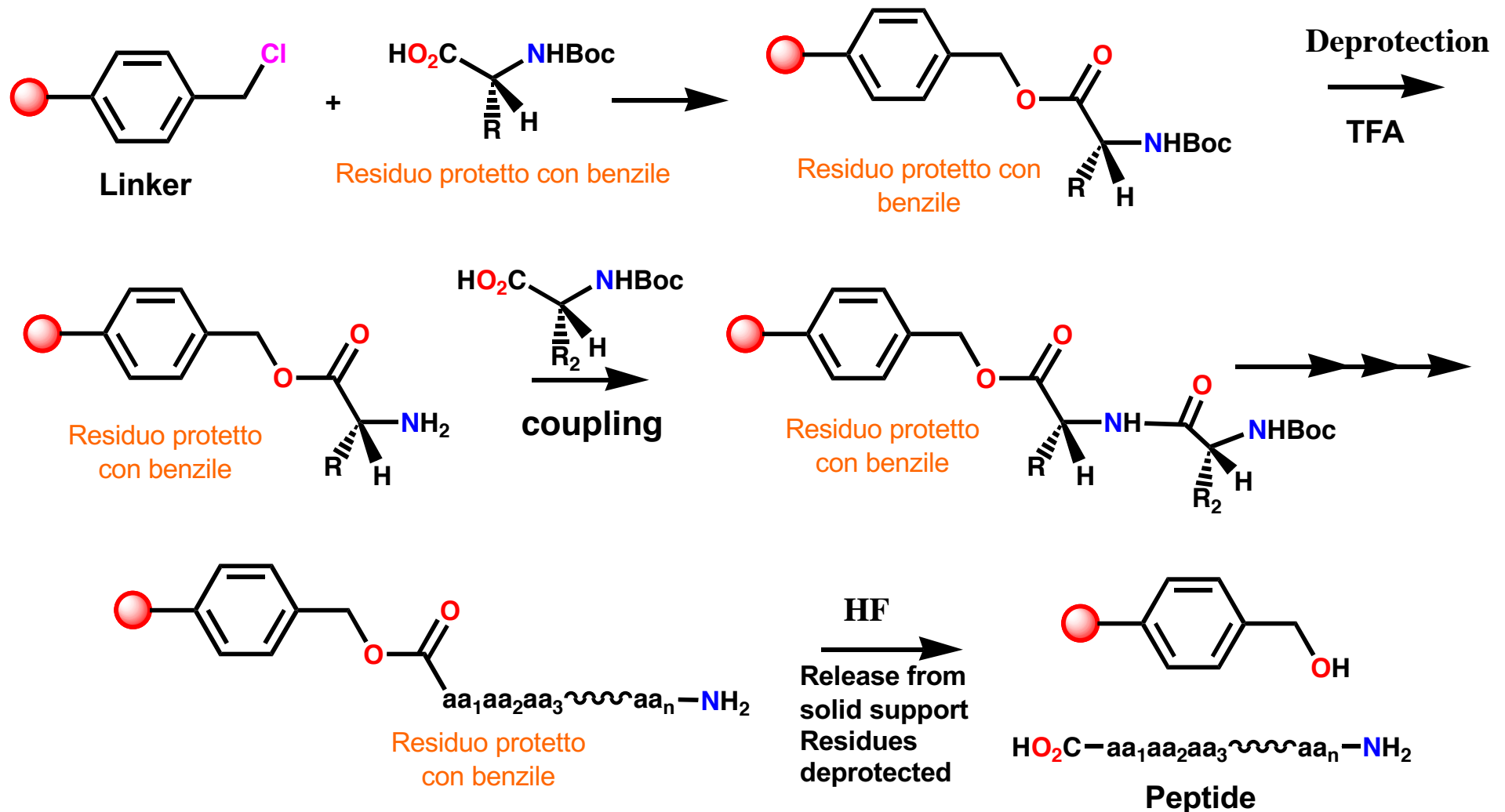
- Boc/benzile
- Porzione *N*-Terminale degli aa: *t*-butilossicarbonile
- Rimozione in ambiente acido (TFA)
- Benzile: stabile in TFA, rimosso con HF (come il prodotto dalla resina)



Gruppi protettori e strategie sintetiche

○ = resin bead

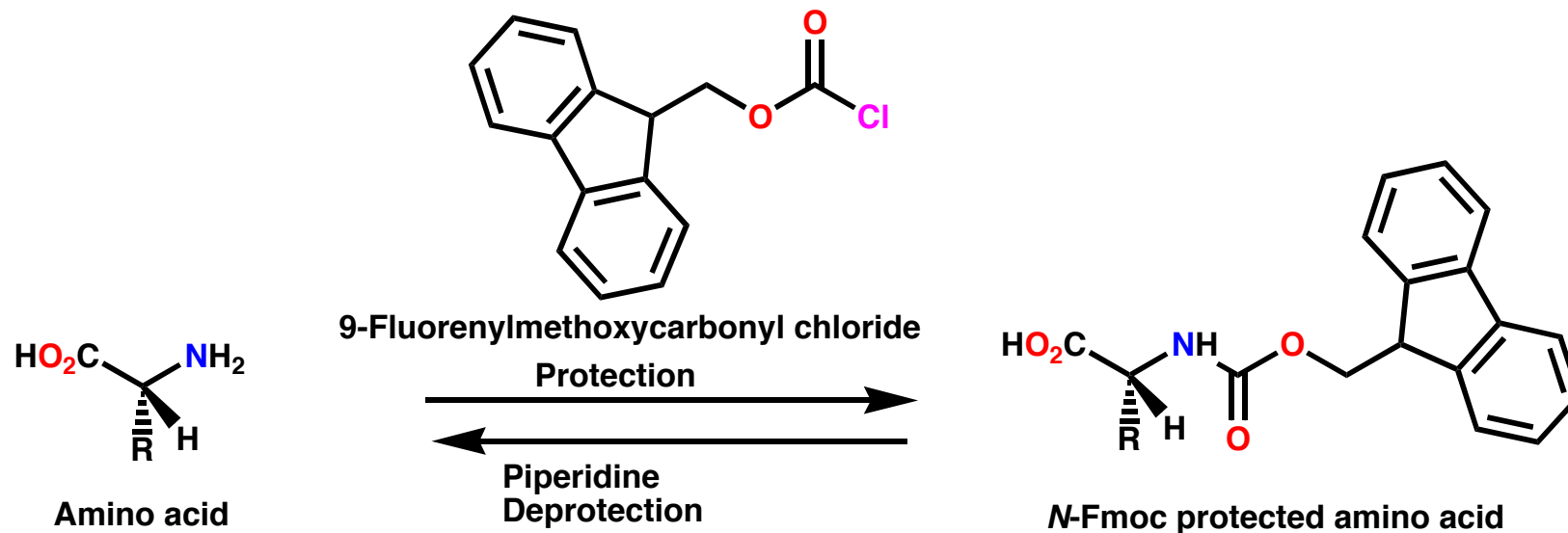
Resina di Merrifield



Gruppi protettori e strategie sintetiche

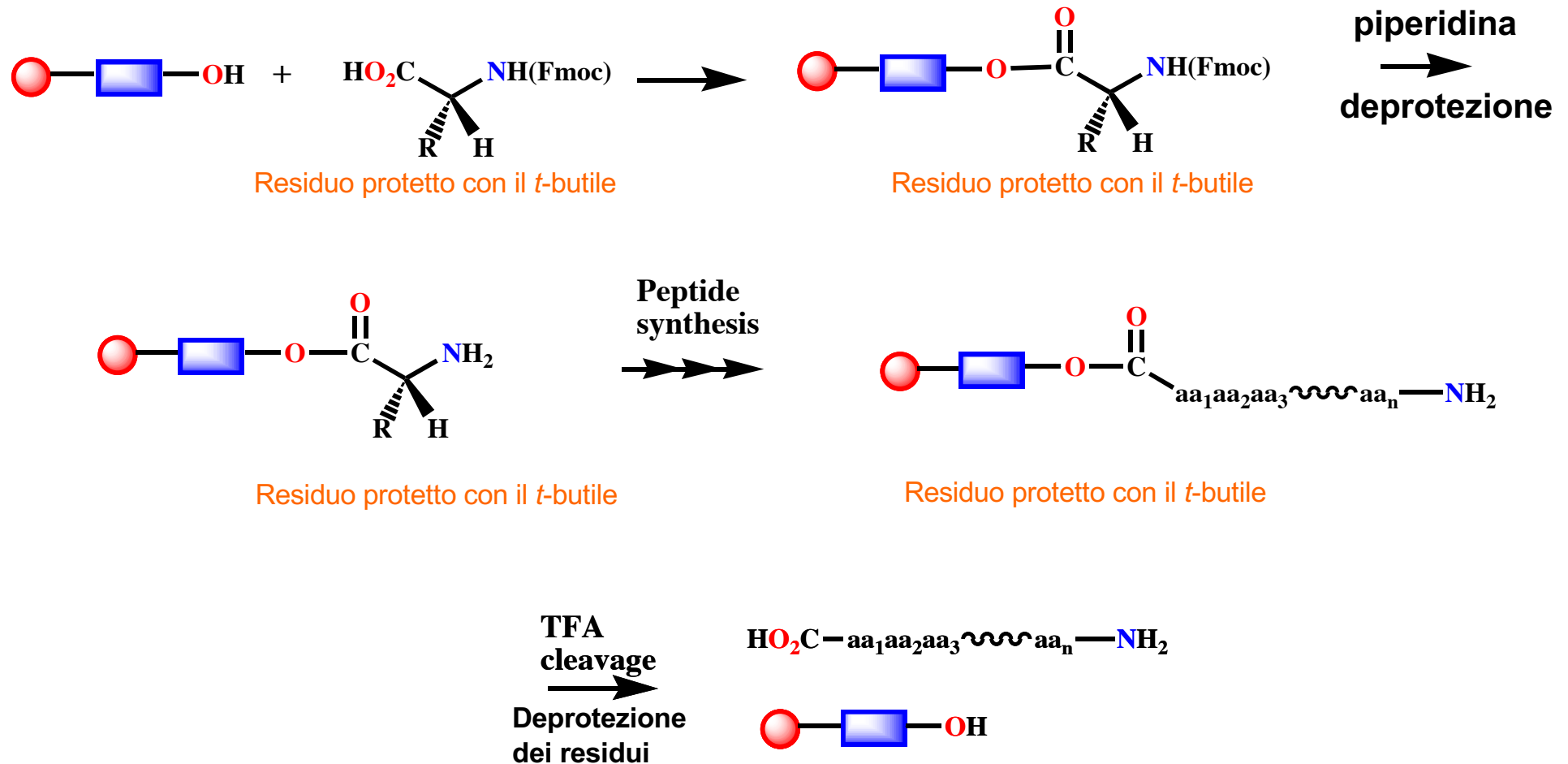
Sintesi peptidica

- Fmoc/t-butile
- Porzione *N*-Terminale degli aa: 9-fluorenilmetossicarbonile
- Rimozione in ambiente basico (piperidina)
- *t*-butile: stabile in ambiente basico, rimosso con TFA (come il prodotto dalla resina)



Gruppi protettori e strategie sintetiche

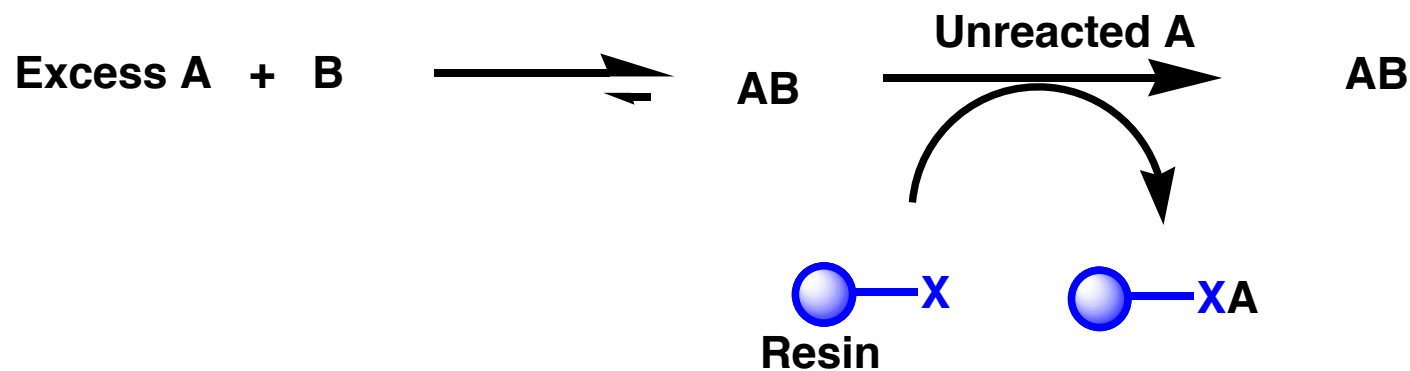
Strategia Fmoc/*t*-Bu



Fase solida

Resine in sintesi organica in soluzione

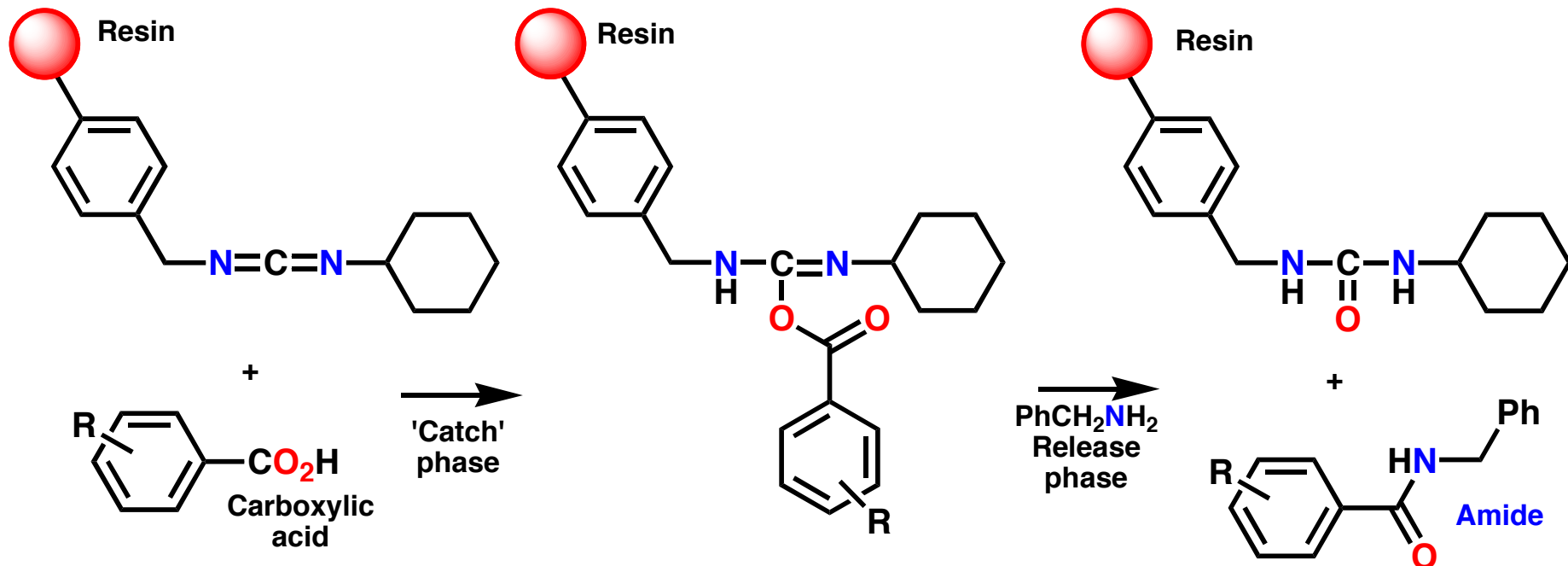
- Resine usate per rimuovere l'eccesso di reagente e le impurezze
- Utilizzo di resine nucleofile, elettrofile, acide, basiche
- Reazioni spinte dalla presenza di larghi eccessi di reagente
- Rimozione dei reagenti con opportune resine



Fase solida

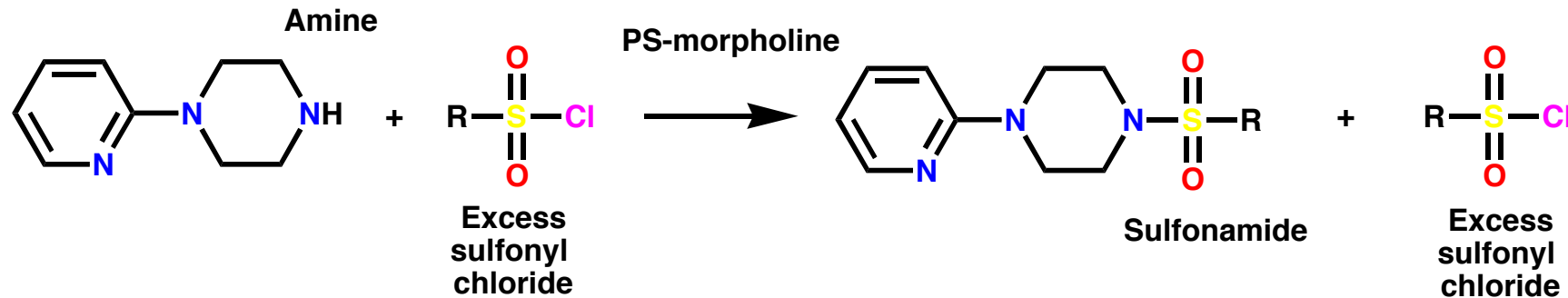
Resine in sintesi organica in soluzione Strategia "Catch and release"

- Reagente legato al supporto solido
- Secondo reagente "catturato" dalla soluzione
- Reazione e "rilascio" del prodotto
- Prodotto secondario legato alla resina

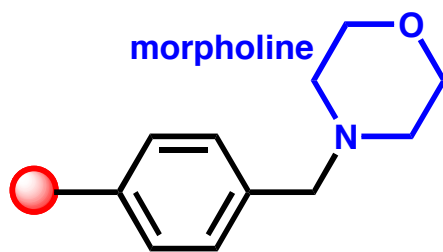


Fase solida

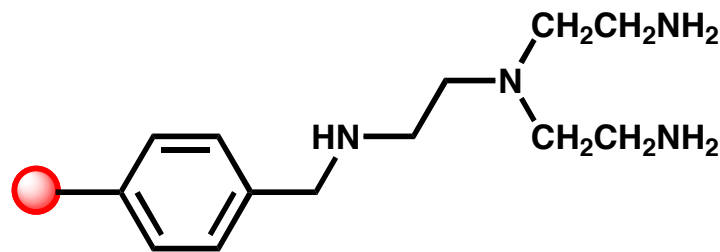
Sintesi di sulfonammidi



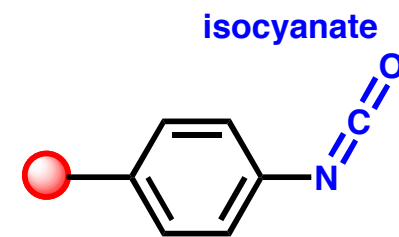
- Catalizzatore basico su supporto solido: PS-morfolina
- Resina basica per eliminare l'eccesso di solfonil cloruro: PS-tris ammina
- Resina elettrofila per eliminare l'eccesso di ammina: PS-isocianato



PS-morfolina



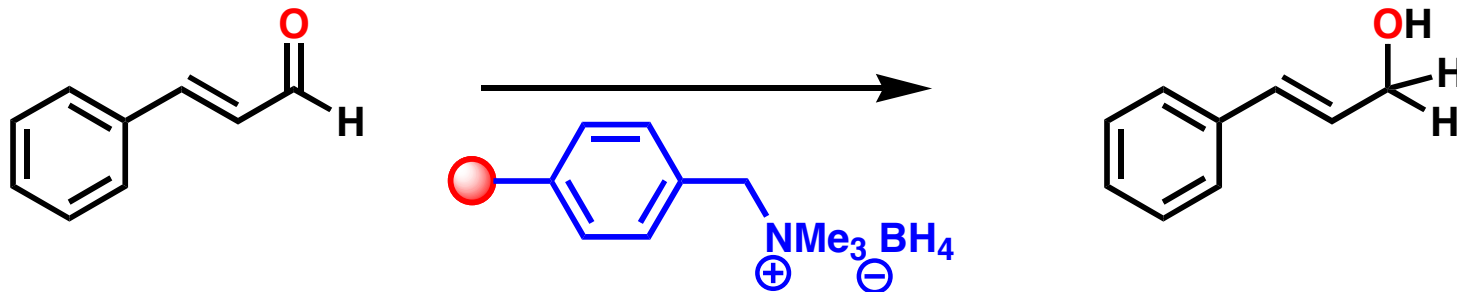
PS-tris ammina



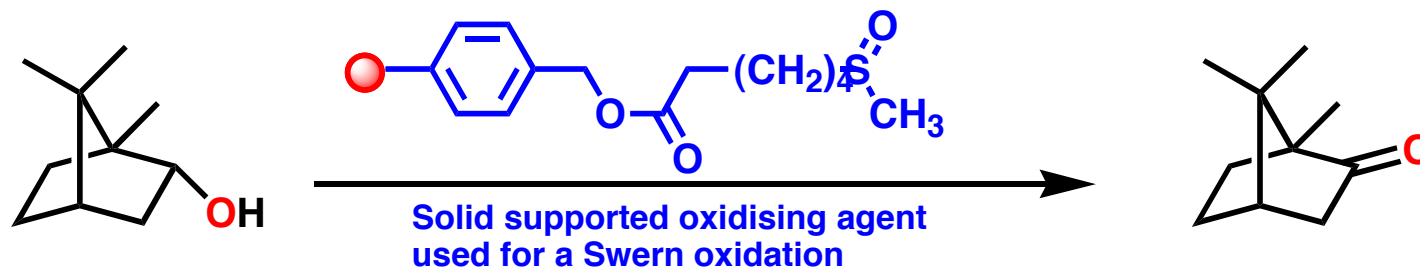
PS-isocianato

Fase solida

Reagenti su supporto solido



Borohydride reducing agent
linked to a solid support resin

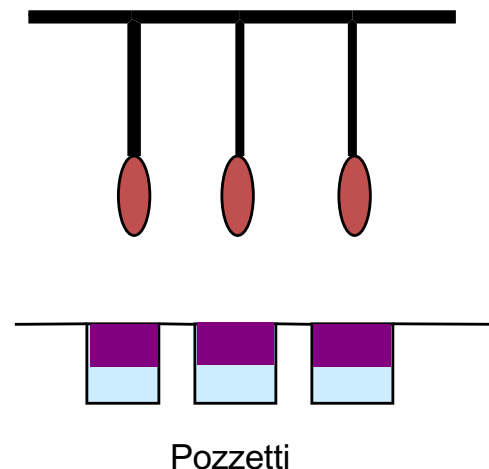


Solid supported oxidising agent
used for a Swern oxidation

Fase solida

Estrazione in fase solida (SPE)

- Usata al posto della convenzionale estrazione liquido-liquido
- Maggiore efficienza
- Soluzione della reazione passata in colonne
- Colonne acide per rimuovere impurezze basiche
- Colonne basiche per rimuovere impurezze acide
- Fluorous solid phase extraction: usata per rimuovere i composti fluorurati
- Reagenti in eccesso: possono essere fatti reagire con agenti fluorurati per essere successivamente rimossi
- Fase acquosa: può essere congelata e rimossa - Lollipop Phase Separator



Sintesi combinatoriale

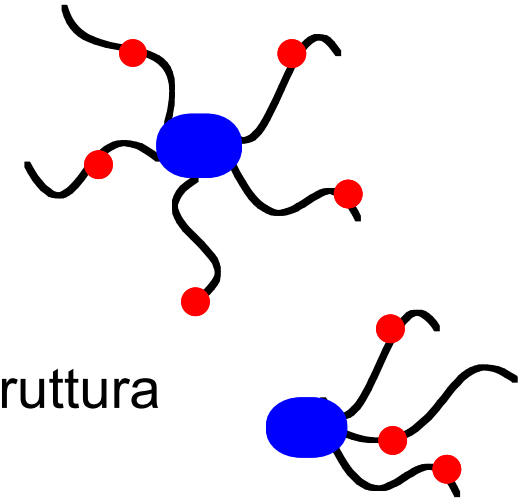
- Metodologie di sintesi standard per produrre **varietà di analoghi diversi**
- Ciascun contenitore presenta una **miscela di prodotti**
- Prodotti diversi legati a biglie differenti
- **Identificazione del prodotto a posteriori**
- Utile per l'identificazione di un lead compound
- **Rapida sintesi di un gran numero di composti**
- **Test di attività su ciascuna miscela** come tale
- Miscele inattive: conservate nelle libraries combinatoriali
- Miscele attive: studi per identificare il composto attivo

Sintesi combinatoriale

Spider like

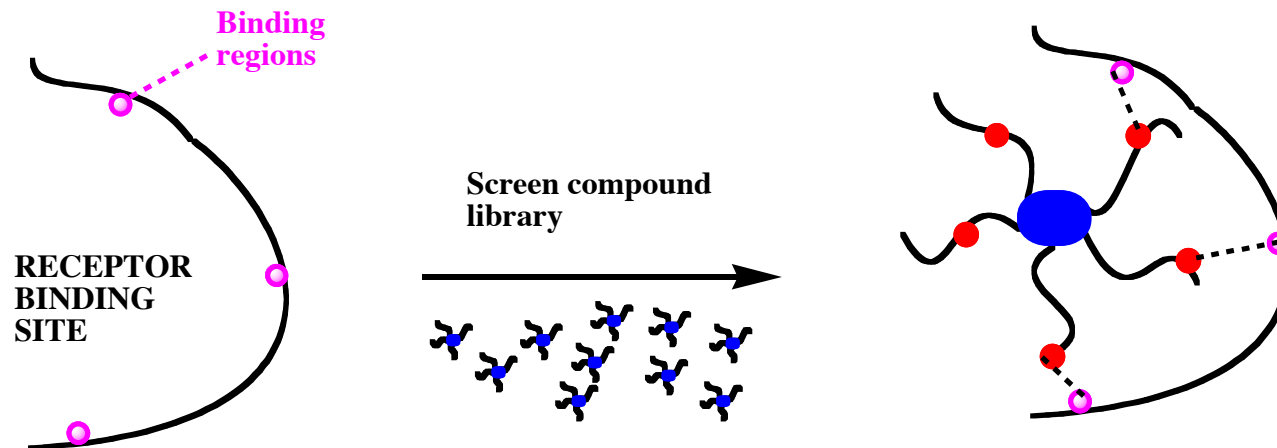
- Variazioni distribuite su tutta la struttura
- Preferibile per esplorare lo spazio conformazionale
- Migliori possibilità di trovare interazioni

Scaffolds



Tadpole like

- Variazioni concentrate in una specifica regione della struttura

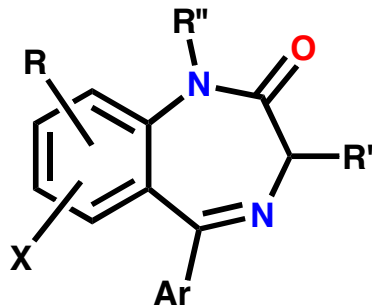


MW dello scaffold: basso per permettere di avere molteplicità di funzionalizzazione tenendo in considerazione la regola del 5

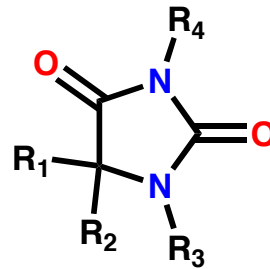
Sintesi combinatoriale

Scaffolds

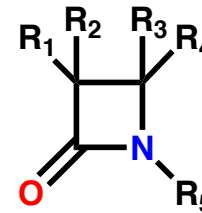
Scaffolds comuni in chimica farmaceutica
Strutture diverse con associate specifiche attività



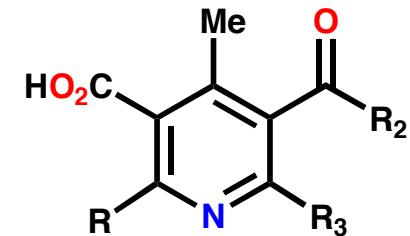
Benzodiazepine



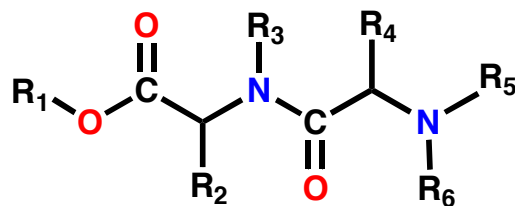
Idantoine



β -Lattamici



Piridine

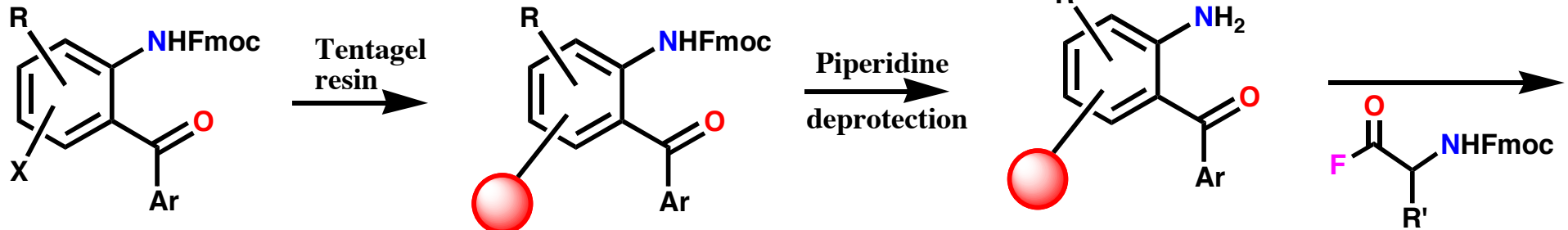


Dipeptidi

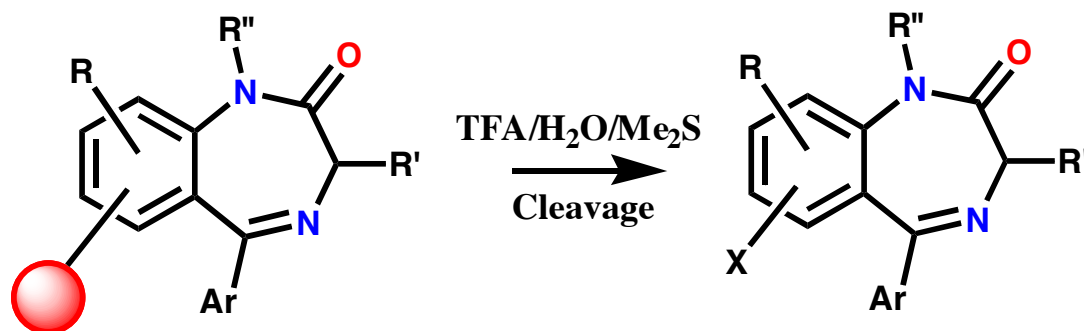
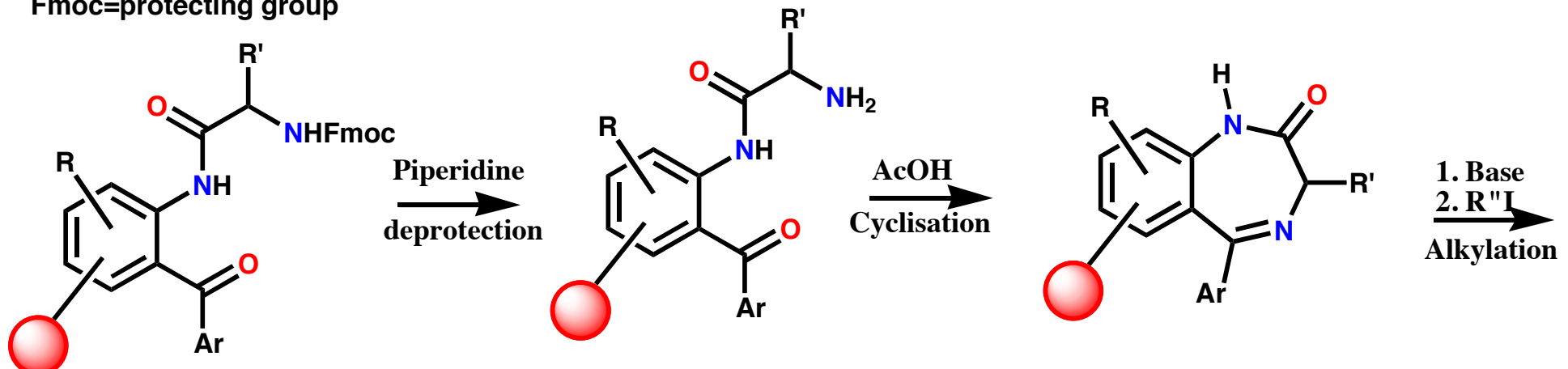
- Buoni scaffolds
- Struttura “ramificata” (Spider like)
- Basso peso molecolare
- Diverse vie sintetiche possibili

Sintesi combinatoriale

1,4 benzodiazepine



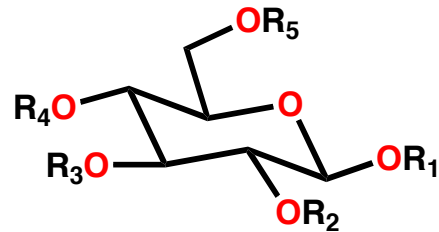
X=OH or CO₂H
Fmoc=protecting group



Il prodotto finale
CONTIENE
X= OH o CO₂H

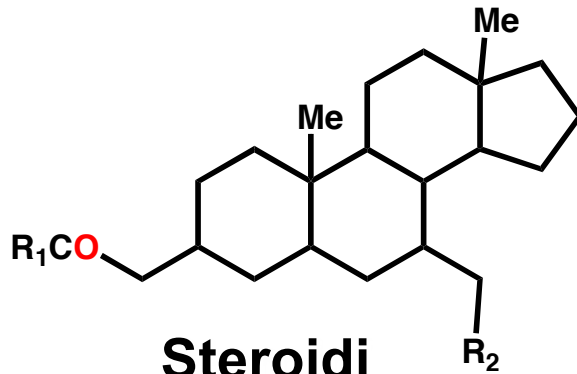
Sintesi combinatoriale

Scaffolds



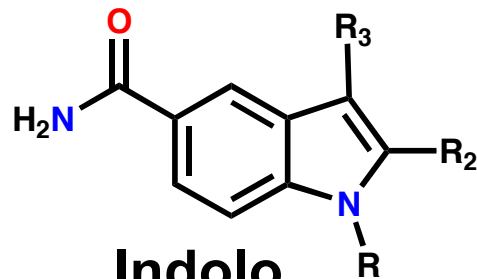
Glucosio

- Spider like
- Basso MW
- Molteplici OH
- Problemi di selettività per R₁-R₅



Steroidi

- MW relativamente alto
- Numero limitato di gruppi funzionali



Indolo

- Tadpole like
- Variabilità limitata

Sintesi combinatoriale

Sintesi di tutti i possibili dipeptidi usando 5 aa

Metodo standard: 25 sintesi separate

Glycine (Gly)	25 separate experiments →	Gly-Gly	Ala-Gly	Phe-Gly	Val-Gly	Ser-Gly
Alanine (Ala)		Gly-Ala	Ala-Ala	Phe-Ala	Val-Ala	Ser-Ala
Phenylalanine (Phe)		Gly-Phe	Ala-Phe	Phe-Phe	Val-Phe	Ser-Phe
Valine (Val)		Gly-Val	Ala-Val	Phe-Val	Val-Val	Ser-Val
Serine (Ser)		Gly-Ser	Ala-Ser	Phe-Ser	Val-Ser	Ser-Ser

Numero di prodotti = 5^2

Con un metodo di Sintesi Combinatoriale potrebbe essere fatta **1 sola sintesi** (multistep) o al massimo **5 sintesi separate**

Sintesi combinatoriale

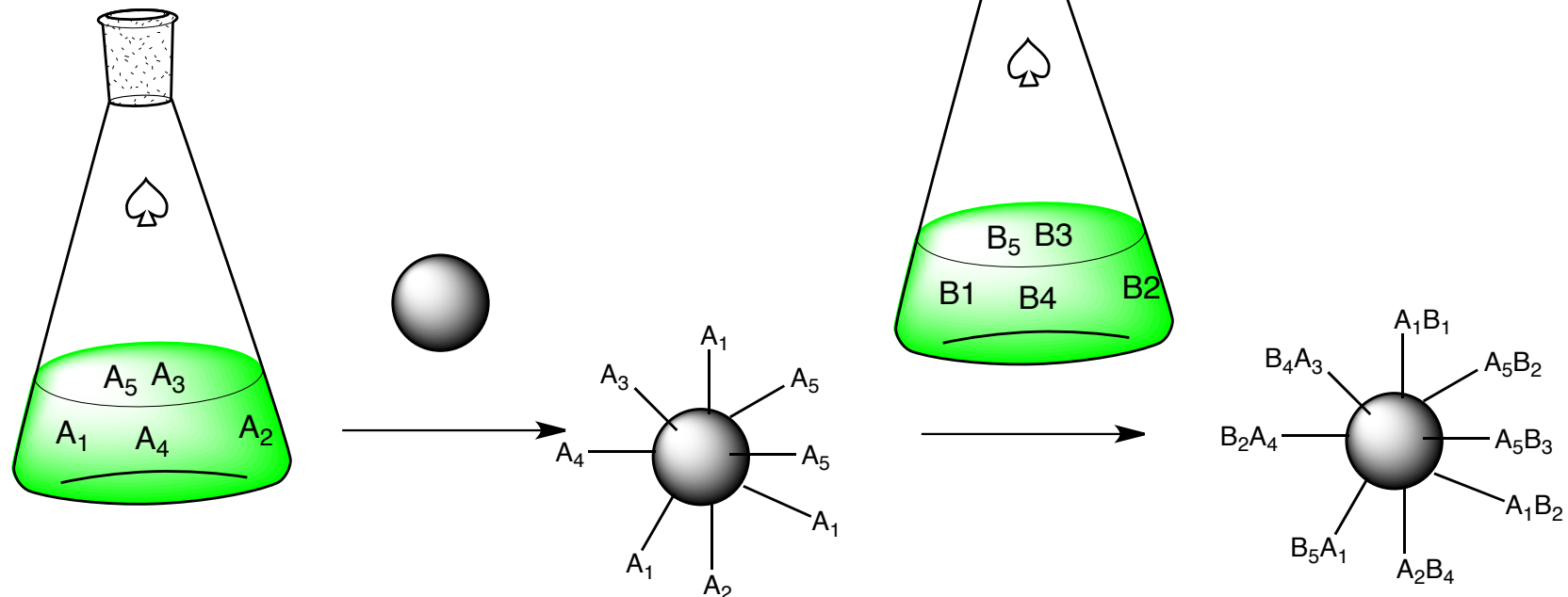
Premix Approach

Es:

Sintesi di tutti i possibili dipeptidi a partire da 5 amminoacidi

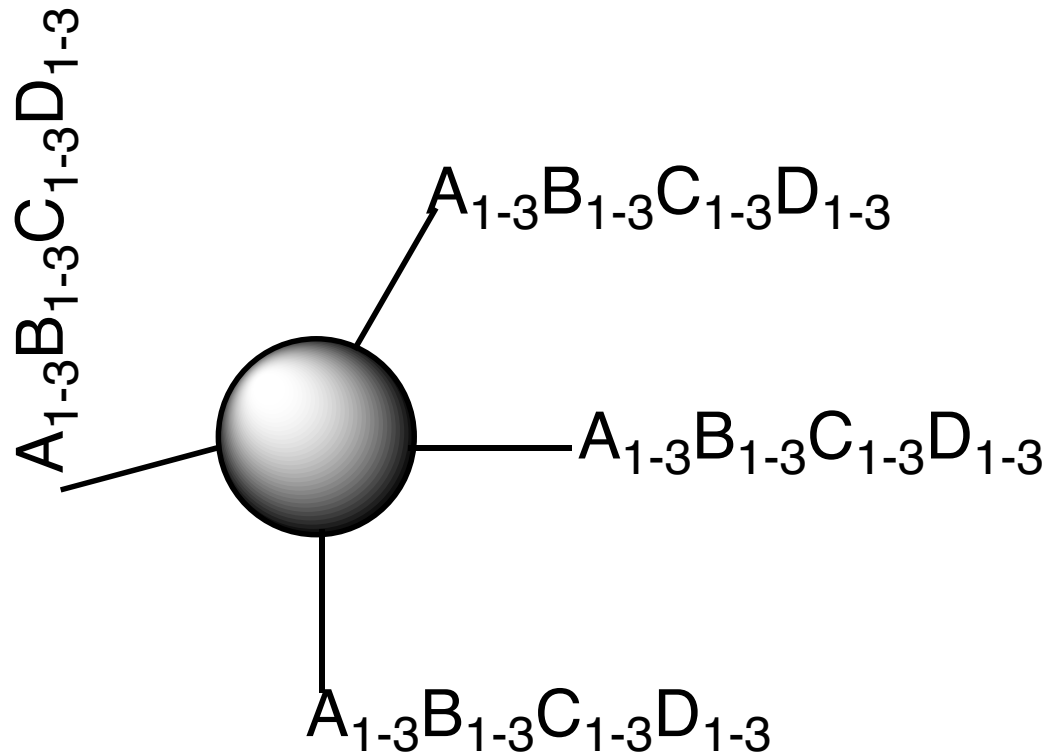
Metodo standard: 25 sintesi separate

Procedura Premix: 1 SOLA sintesi



Sintesi combinatoriale

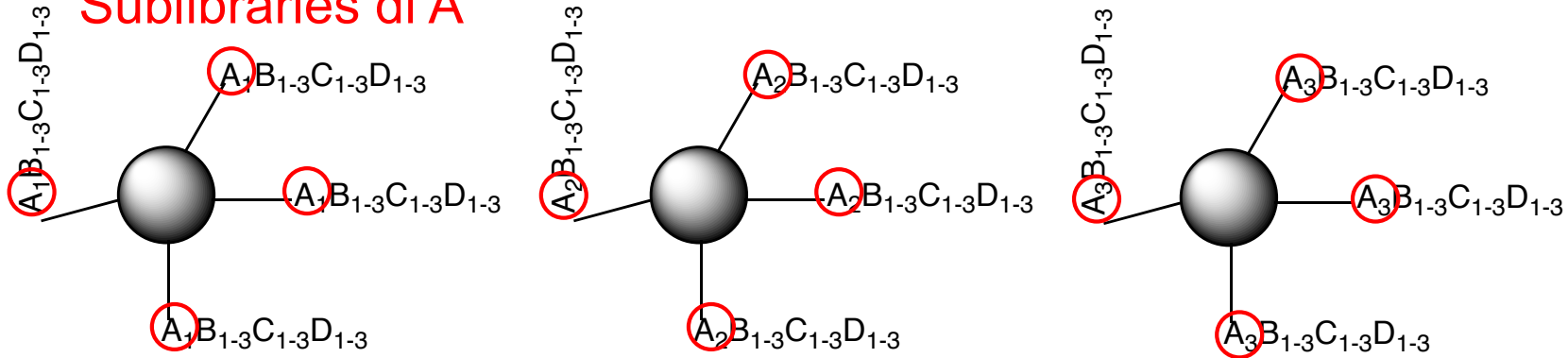
Premix Approach: identificazione dei composti attivi



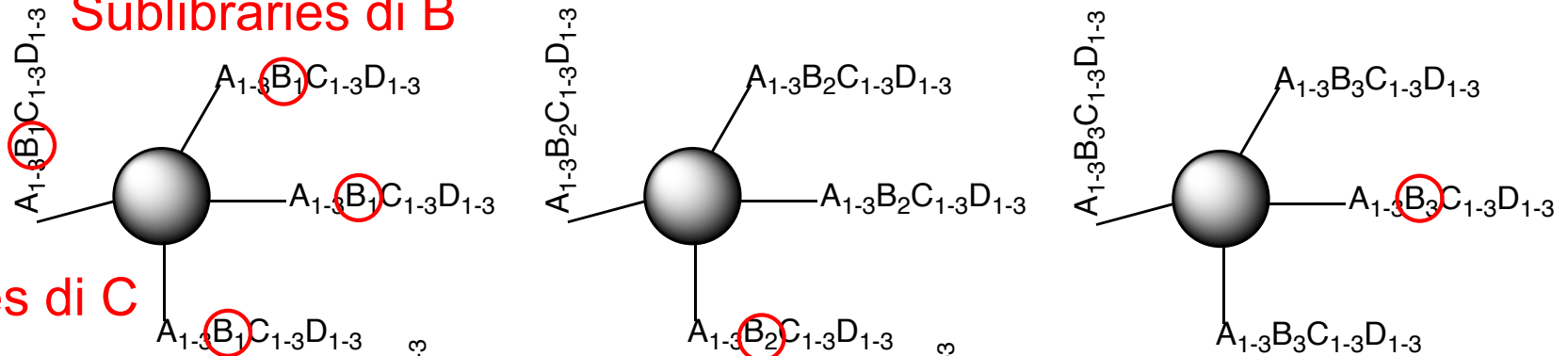
Sintesi combinatoriale

POSITIONAL SCANNING

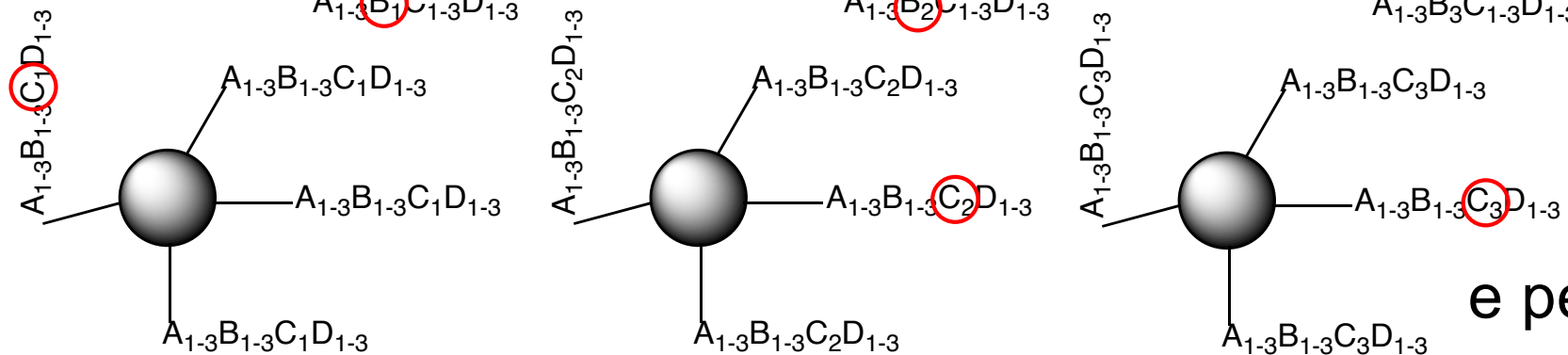
Sublibraries di A



Sublibraries di B



Sublibraries di C



e per D...

Sintesi combinatoriale

POSITIONAL SCANNING

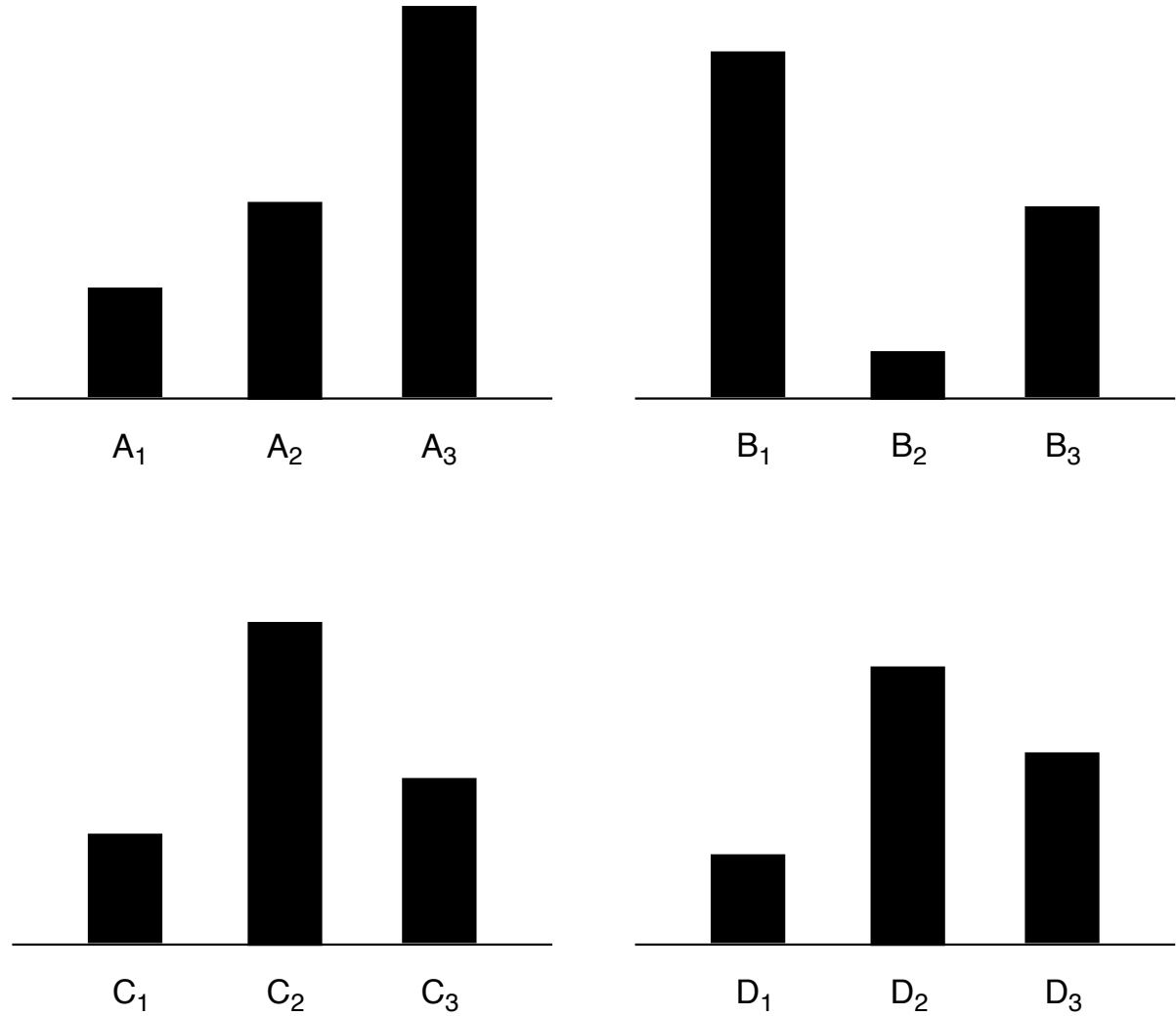
Attività

per le sublibraries A

per le sublibraries B

per le sublibraries C

per le sublibraries D

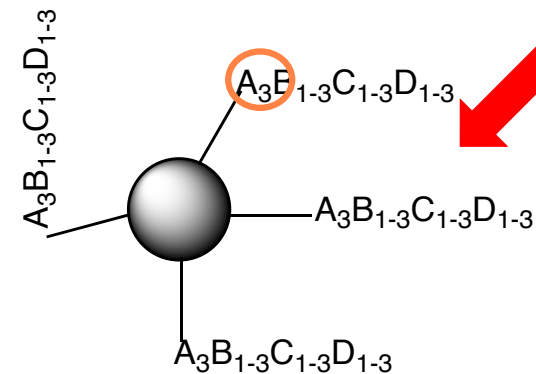
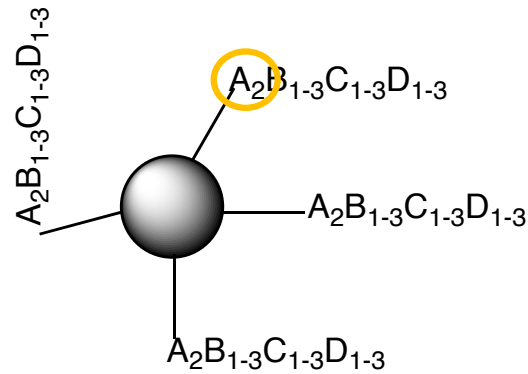
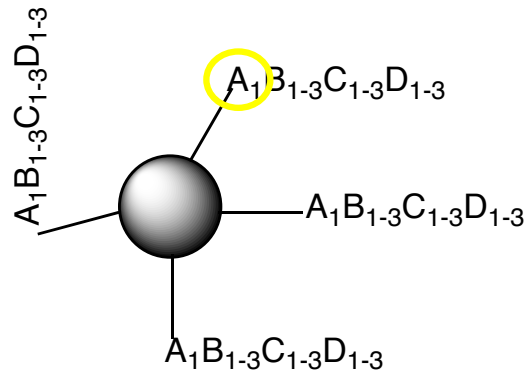


$A_3B_1C_2D_2$

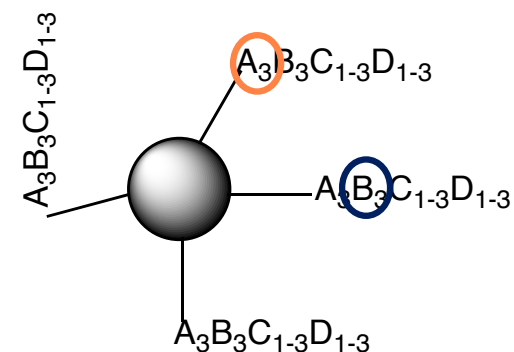
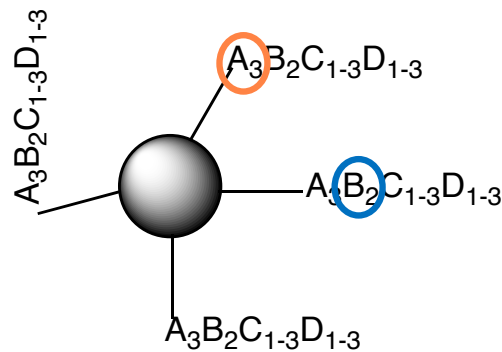
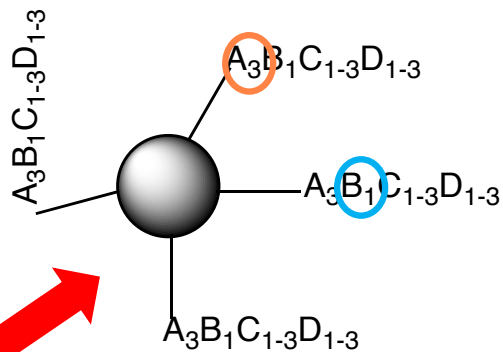
Sintesi combinatoriale

DECONVOLUZIONE ITERATIVA

Sublibraries di A



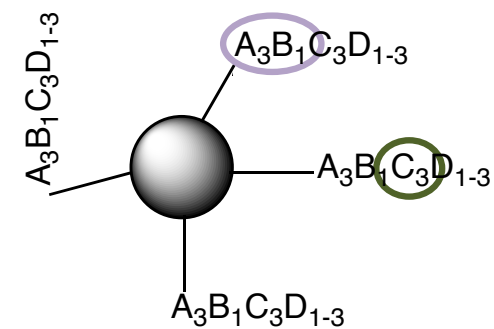
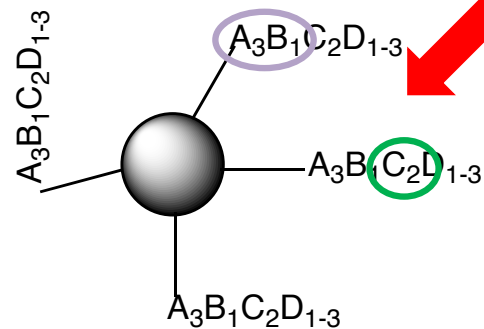
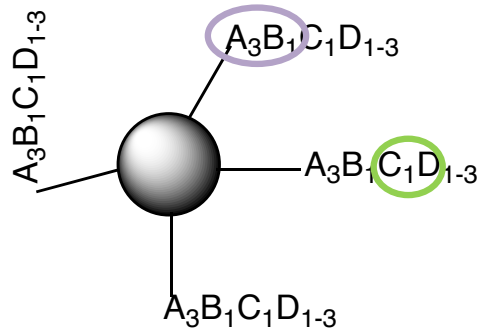
Sublibraries di B



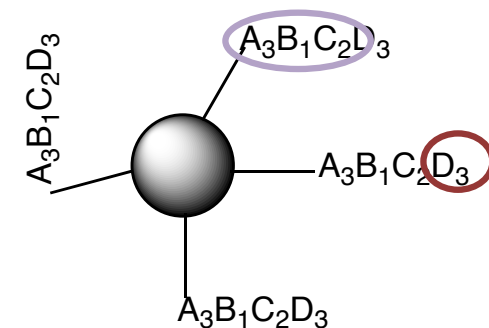
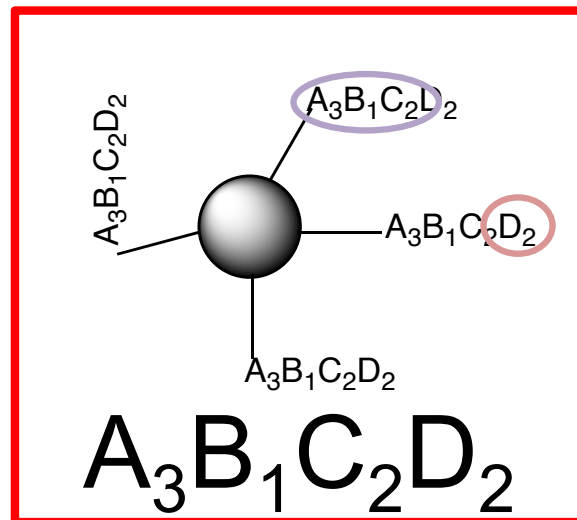
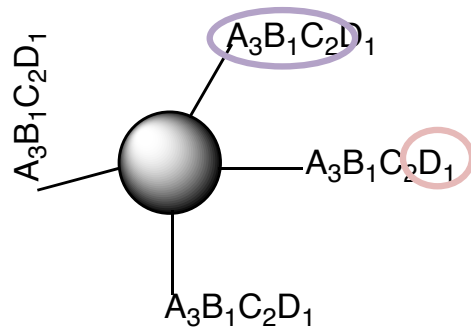
Sintesi combinatoriale

DECONVOLUZIONE ITERATIVA

Sublibraries di C



Sublibraries di D



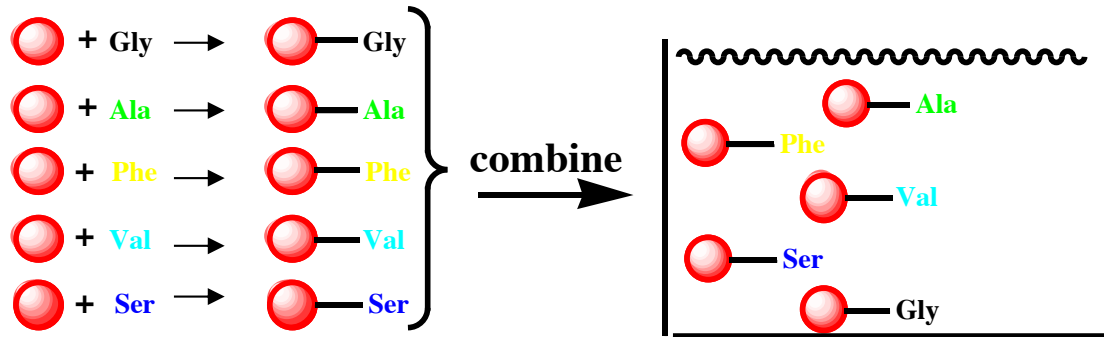
Sintesi combinatoriale

Libraries ortogonali (sublibraries ortogonali)

CIASCUN composto appartiene a SOLO due diverse libraries

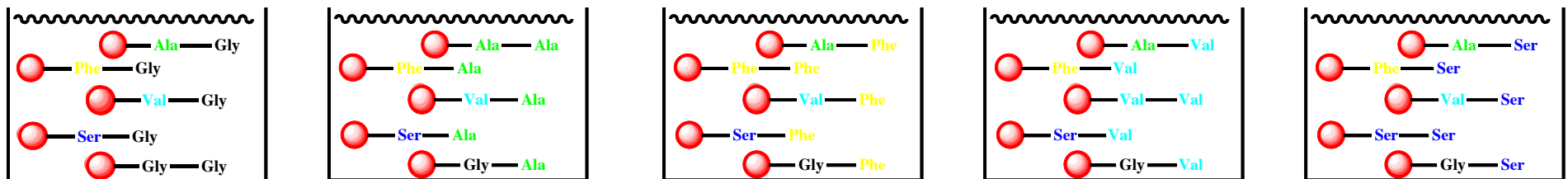
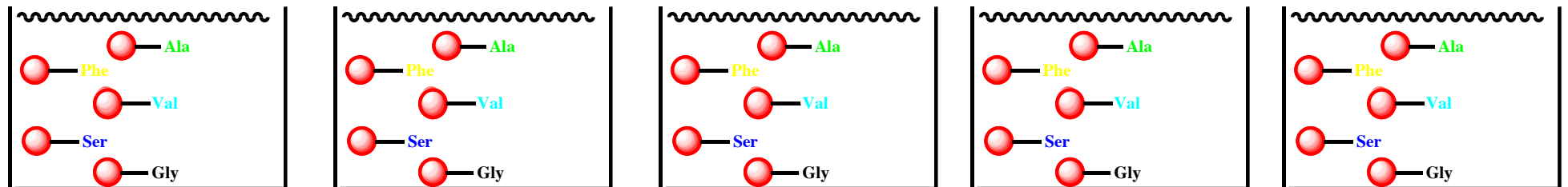
$A_{1-4}B_{1-4}$	A_1B_{1-4}	A_2B_{1-4}	A_3B_{1-4}	A_4B_{1-4}
$A_{1-4}B_1$	A_1B_1	A_2B_1	A_3B_1	A_4B_1
$A_{1-4}B_2$	A_1B_2	A_2B_2	A_3B_2	A_4B_2
$A_{1-4}B_3$	A_1B_3	A_2B_3	A_3B_3	A_4B_3
$A_{1-4}B_4$	A_1B_4	A_2B_4	A_3B_4	A_4B_4

Sintesi combinatoriale



Metodo "Mix and split"

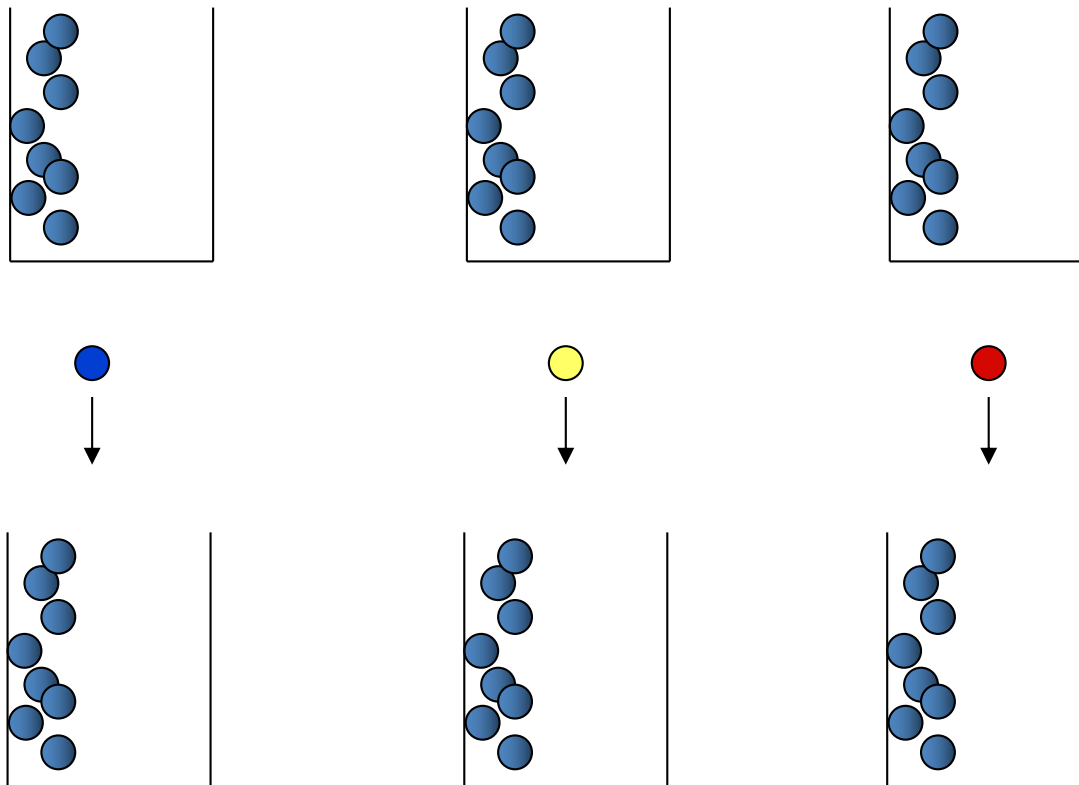
Split



Sintesi combinatoriale

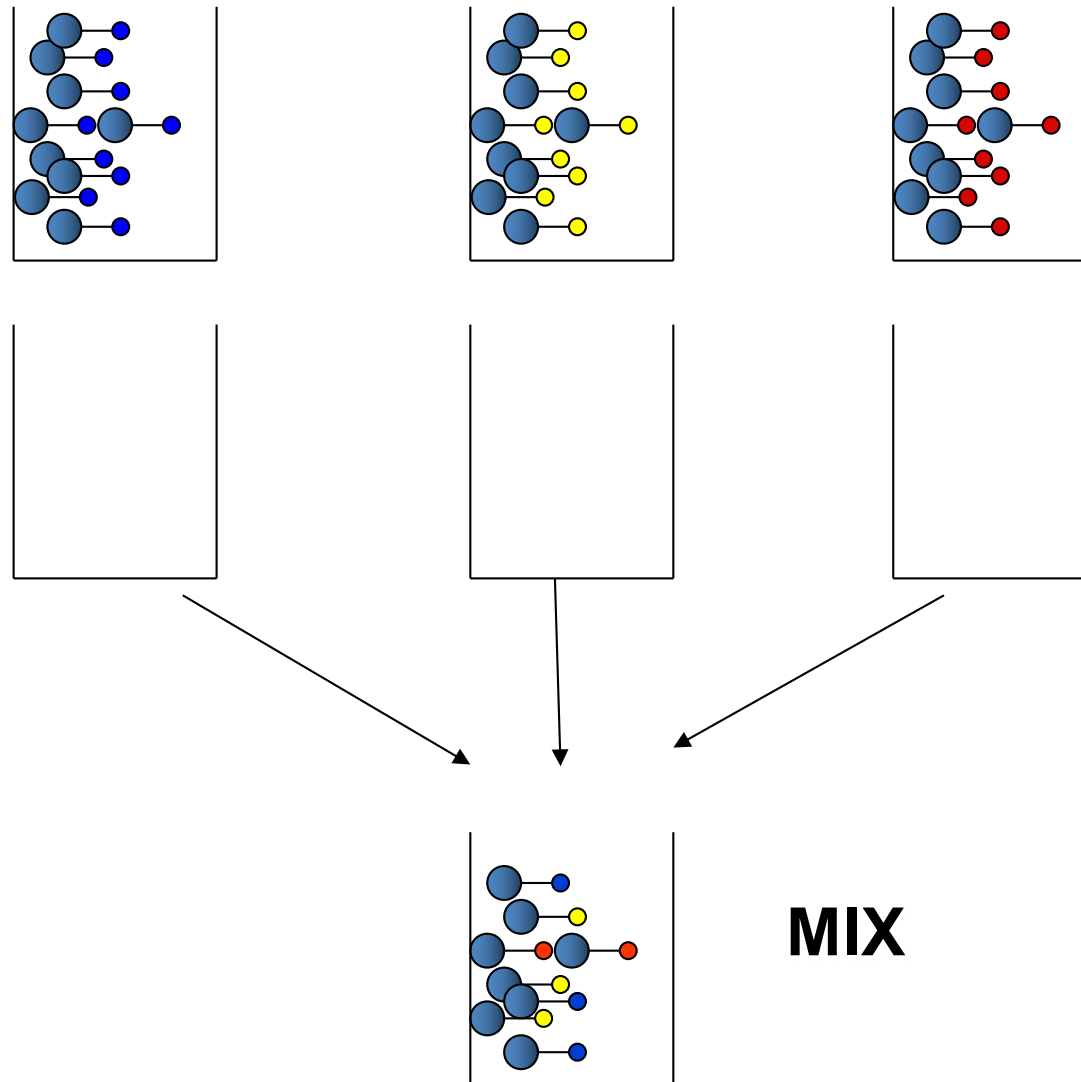
Metodo "Mix and split"

Sintesi di tutti i possibili tripeptidi (27) a partire da 3 aa



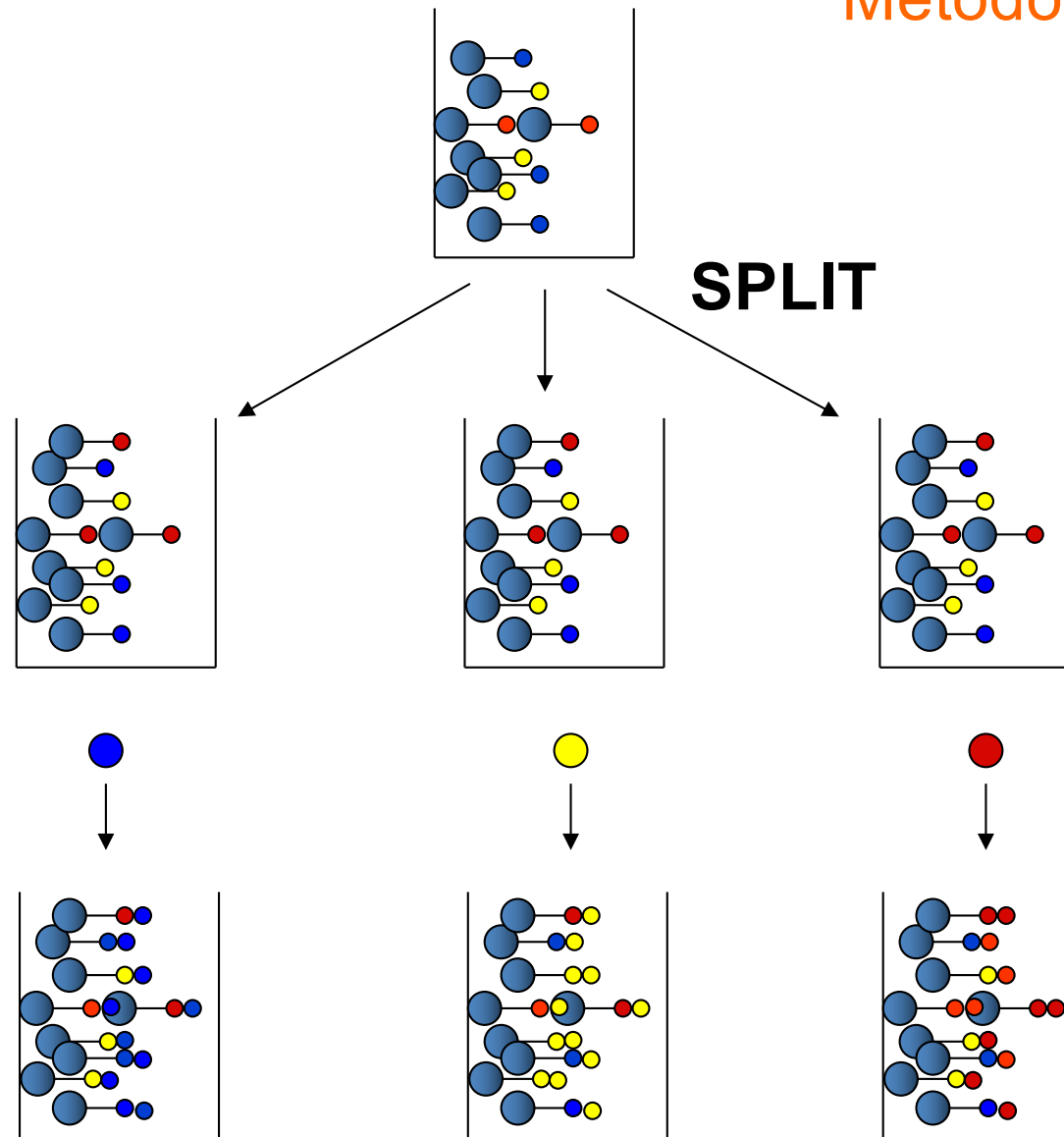
Sintesi combinatoriale

Metodo "Mix and split"



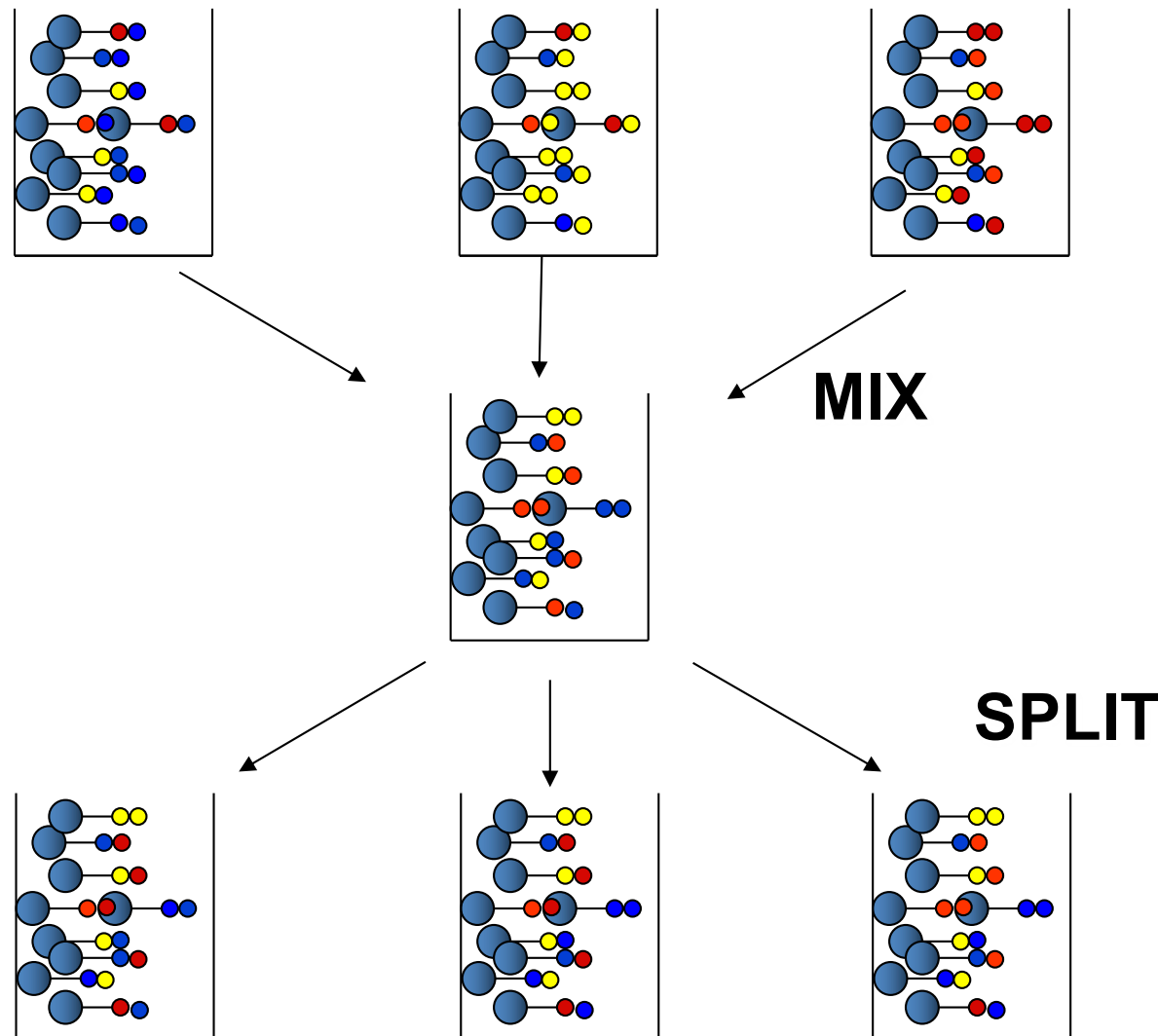
Sintesi combinatoriale

Metodo "Mix and split"



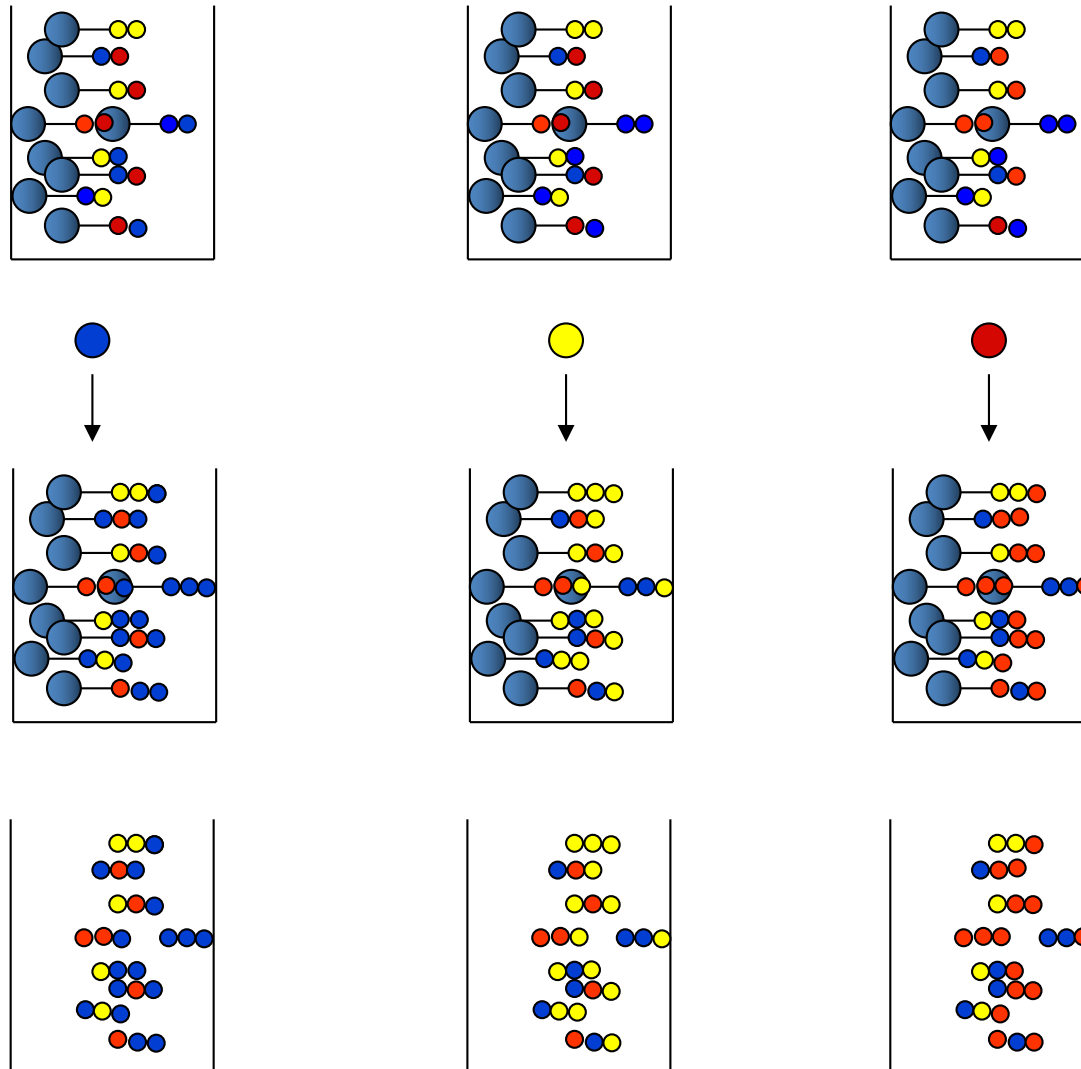
Sintesi combinatoriale

Metodo "Mix and split"



Sintesi combinatoriale

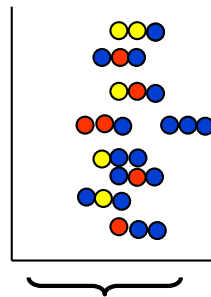
Metodo "Mix and split"



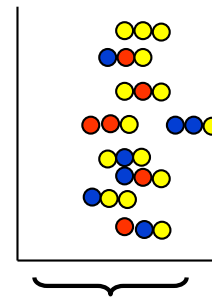
Sintesi combinatoriale

Metodo "Mix and split"

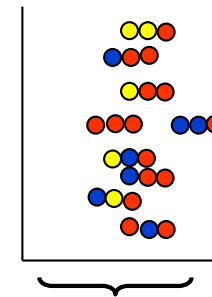
di
tripeptidi



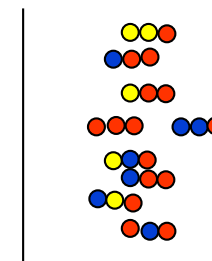
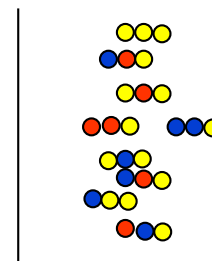
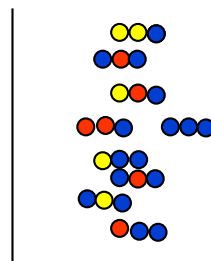
9



9



9



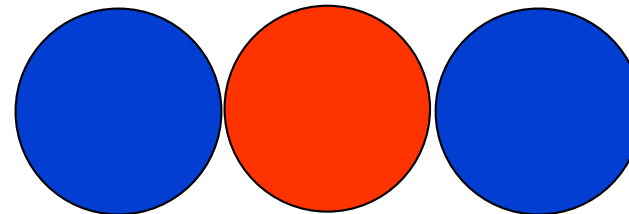
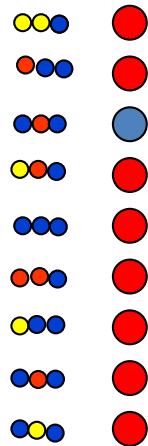
Saggi di attività sulle miscele

Sintesi combinatoriale

Metodo "Mix and split"



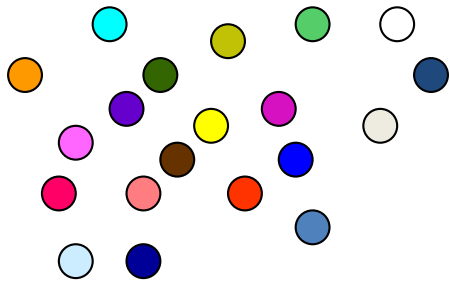
Sintesi di ciascuno dei 9 tripeptidi della sublibrary attiva



Sintesi combinatoriale

Metodo "Mix and split"

20 Amminoacidi



Esapeptidi



64 Milioni di prodotti

20^6 composti

$(n \text{ di building block})^n$ di passaggi

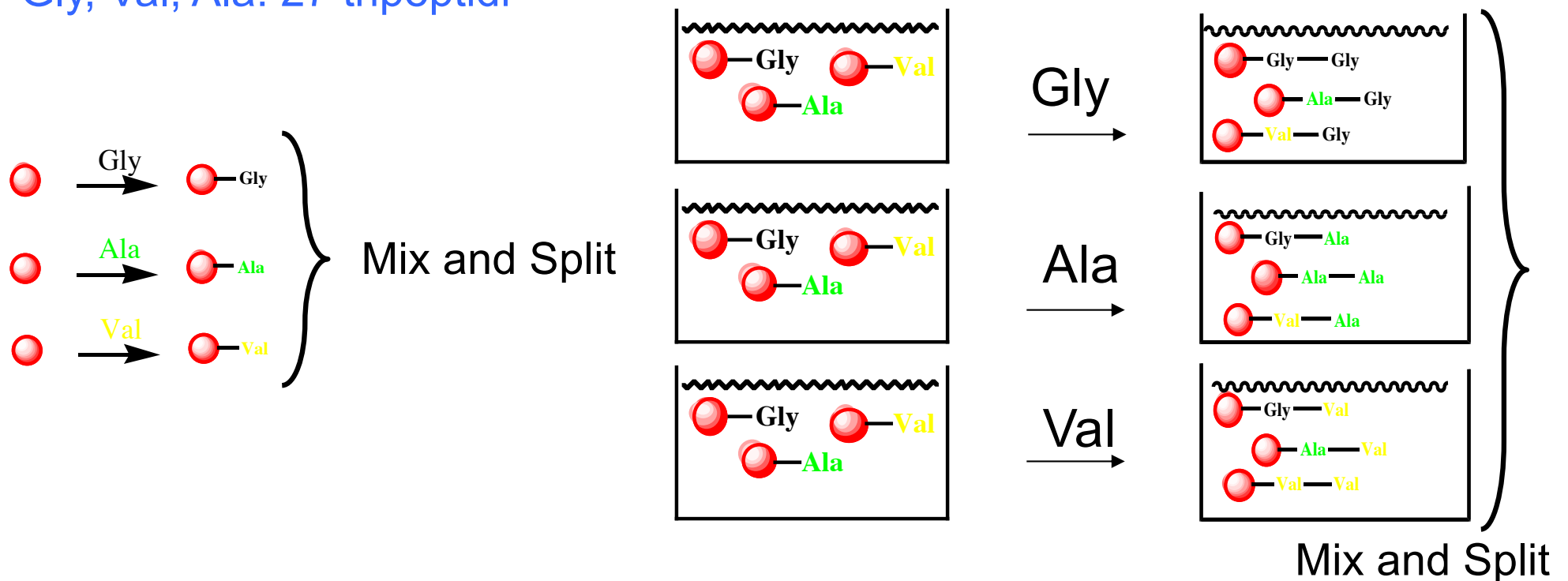
Sintesi combinatoriale

Identificazione

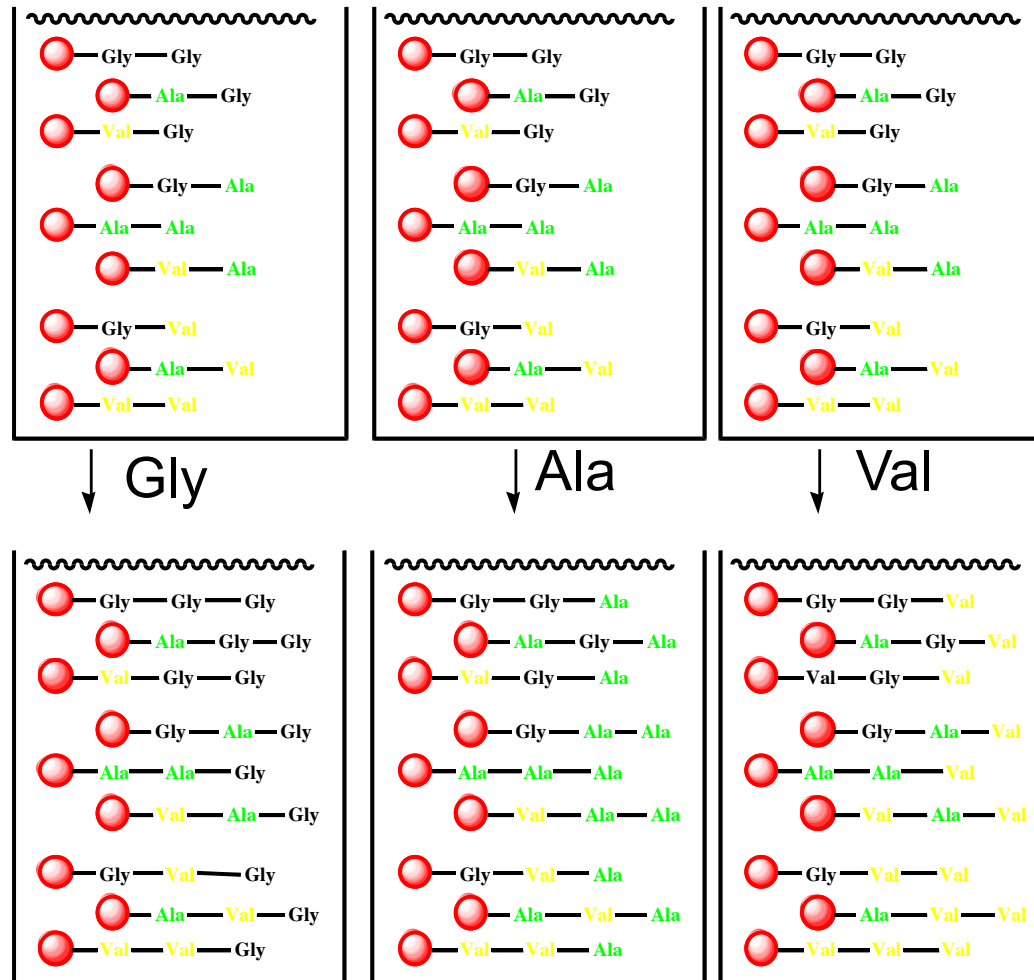
Deconvoluzione iterativa

- Metodo d'identificazione del composto attivo nella miscela
- Sistema più veloce delle sintesi separate di tutti i composti
- **Necessità di conservare parte dei campioni prima del mix and split**

Gly, Val, Ala: 27 tripeptidi

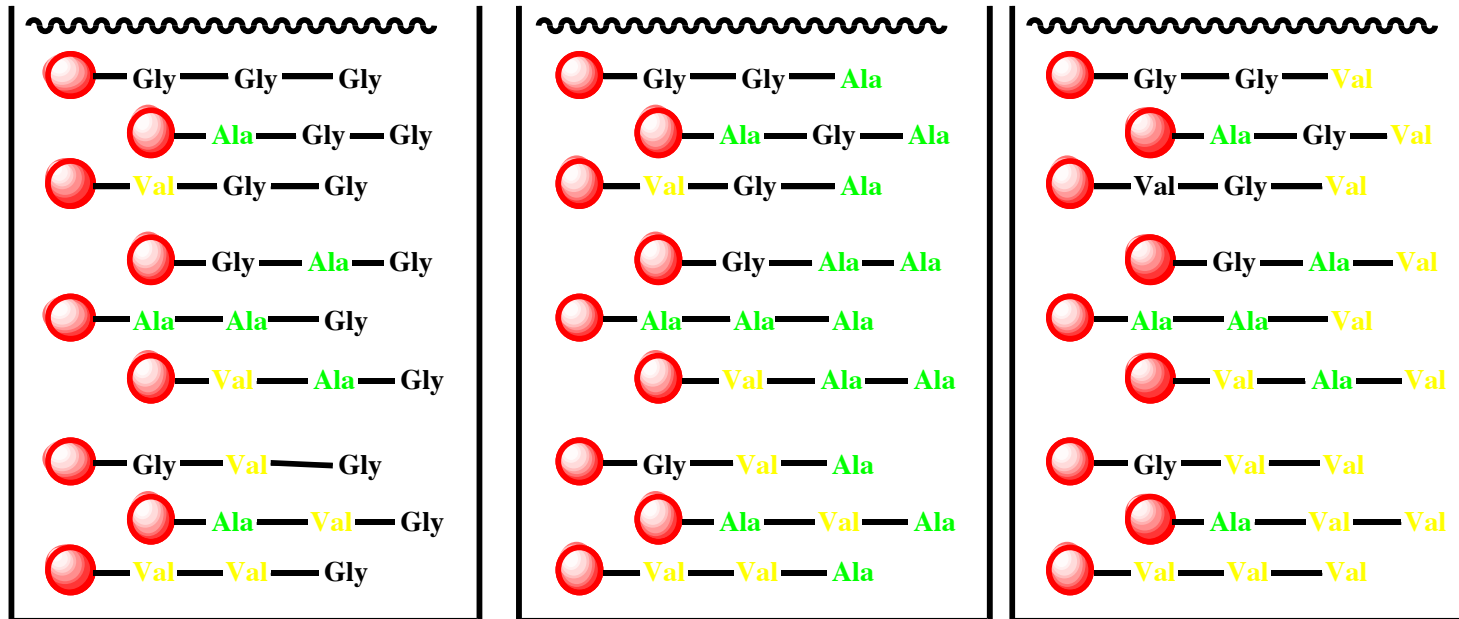


Sintesi combinatoriale



Tutti i possibili tripeptidi in tre contenitori

Sintesi combinatoriale



Miscela inattiva

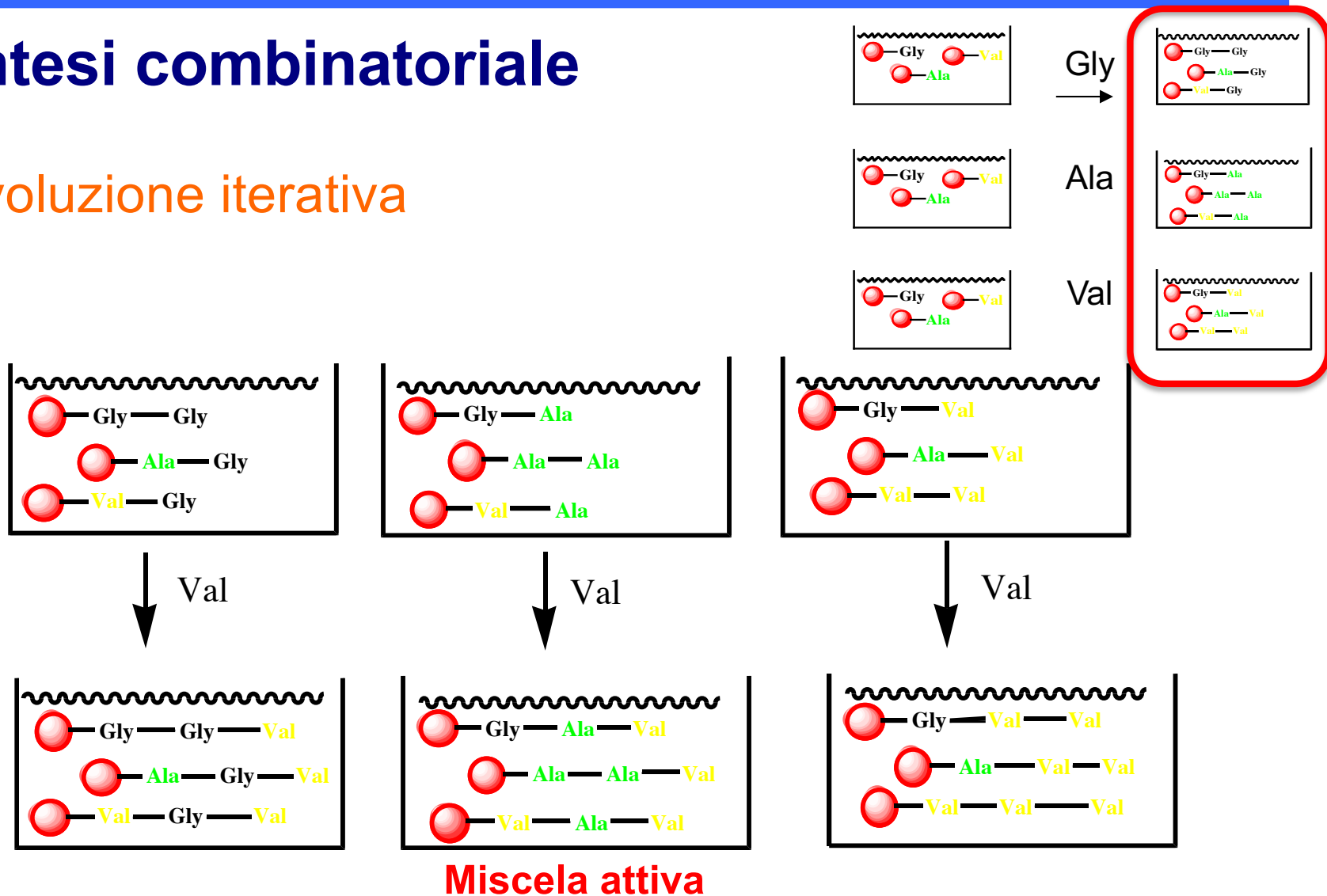
Miscela inattiva

Miscela attiva

- 9 possibili tripeptidi nella miscela attiva
- POSIZIONE NOTA: Valina in 3
- Si aggiunge la valina alle tre miscele di **DIPEPTIDI**

Sintesi combinatoriale

Deconvoluzione iterativa



Miscele di 3 peptidi

Sintesi separata dei tre peptidi appartenenti alla miscela attiva

Sintesi combinatoriale

Identificazione

Metodo delle tag

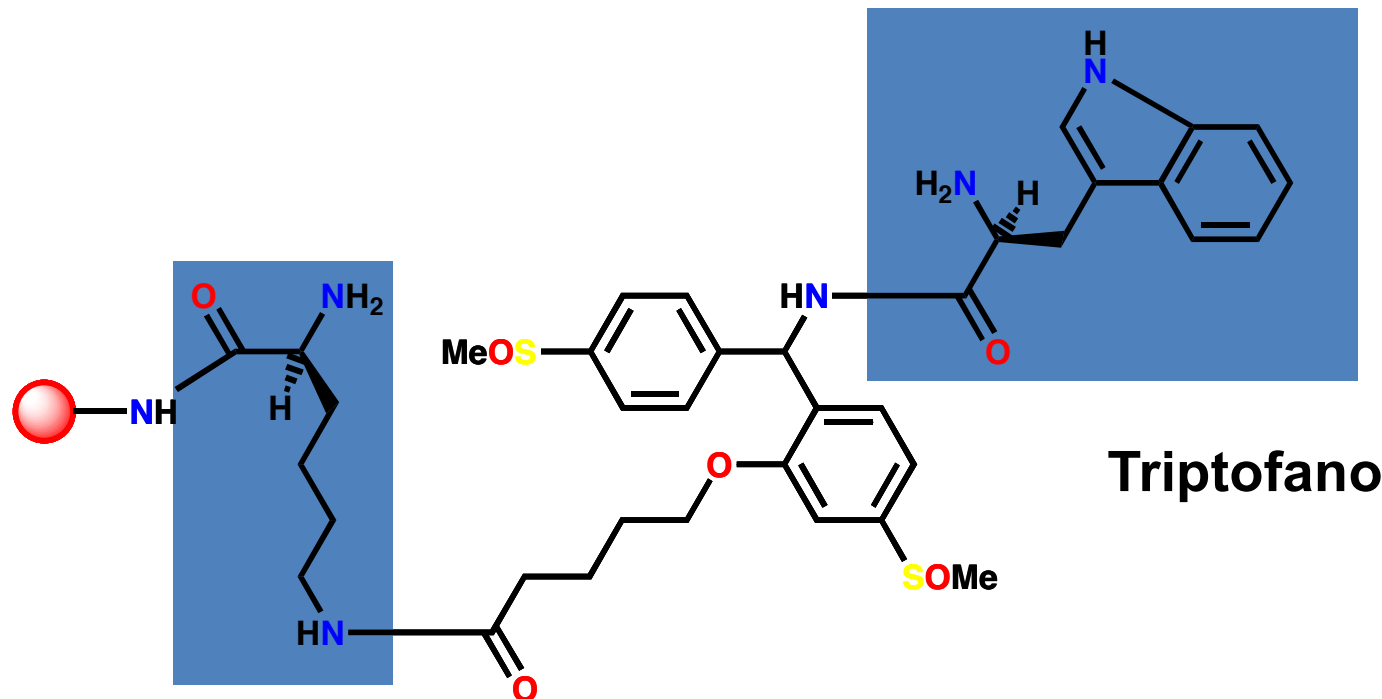
- Metodo d'identificazione della struttura presente su CIASCUNA bead
- La molecola di riconoscimento è sintetizzata sulla MEDESIMA biglia su cui è legato il prodotto
- Molecola di riconoscimento: peptide o oligonucleotidi
- Ciascun aa o nucleotide è usato per identificare uno specifico reagente in ciascuno step
- L'etichetta è aggiunta dopo ciascuno passaggio della sequenza di sintesi del prodotto
- Peptide: identificato con sistema di sequencing peptidico automatico
- Oligonucleotide: identificato con sistema di sequencing oligonucleotidico

- **NECESSITA'** di un LINKER con DUE GRUPPI funzionali disponibili dopo l'ancoraggio del linker sulla resina

Sintesi combinatoriale

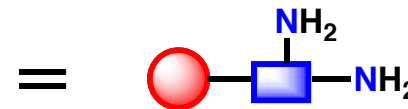
Metodo delle tag: linker bifunzionale

Identificazione

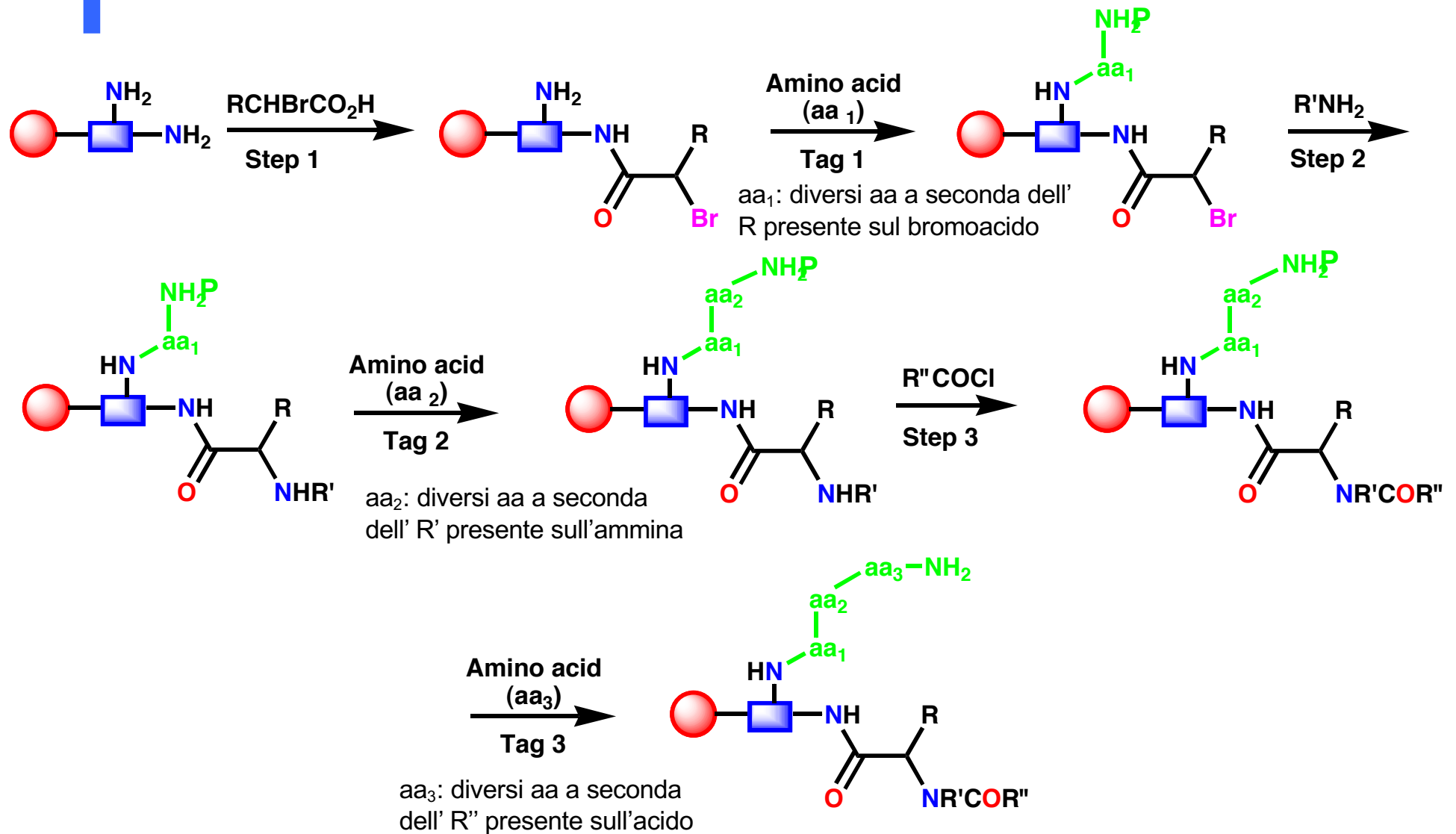


Lisina

Tryptofano



Sintesi combinatoriale



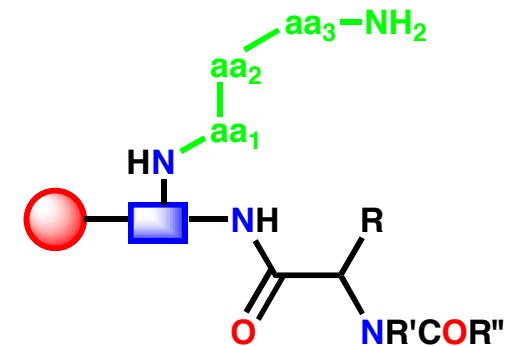
Identificazione della SEQUENZA dell'etichetta (cosa e dove)

Sintesi combinatoriale



R= -Me
R= -iPr
R= -cicloesano

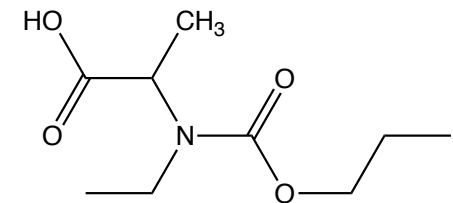
aa₁ = Gly
aa₁ = Asp
aa₁ = Lys



R= -Et
R= -Ph
R= -Pentile

aa₂ = Gly
aa₂ = Asp
aa₂ = Lys

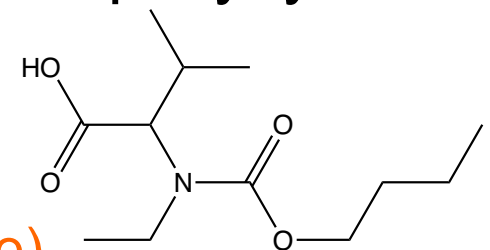
GlyGlyGly



R= -Pr
R= -Bz
R= -Bu

aa₃ = Gly
aa₃ = Asp
aa₃ = Lys

AspGlyLys



Identificazione della SEQUENZA dell'etichetta (cosa e dove)

Sintesi combinatoriale

Codice a barre

Tre etichette per sette reagenti
del primo step sintetico

Reagente	Etichetta molecolare
1	A
2	B
3	C
4	A+B
5	A+C
6	B+C
7	A+B+C

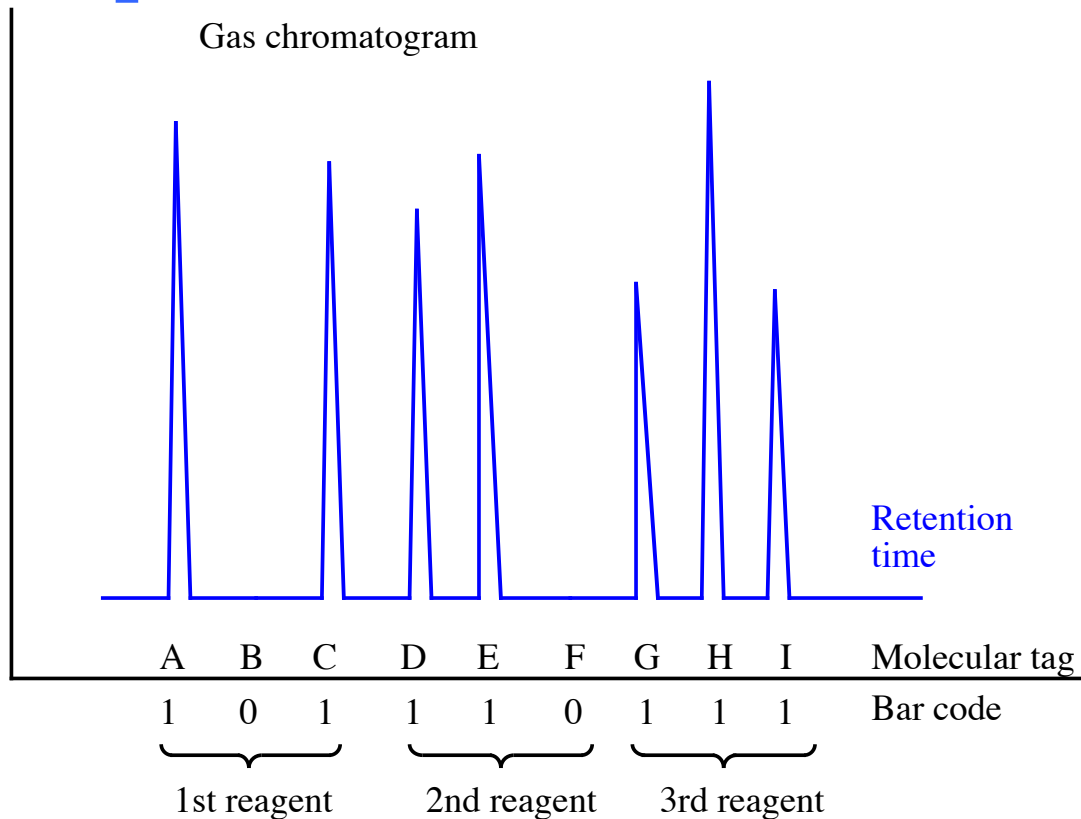
Tre etichette per sette reagenti
del secondo step sintetico

Reagente	Etichetta molecolare
1	D
2	E
3	F
4	D+E
5	D+F
6	E+F
7	D+E+F

Identificazione di A-F mediante gas cromatografia
(D-E con tempi di ritenzioni maggiori rispetto a A-C)

Sintesi combinatoriale

Codice a barre



- Etichette legate mediante legame fotolabile
- Irradiazione: rimozione di tutte le etichette
- Gascromatogramma della miscela di etichette
- Tags identificate dal loro tempo di ritenzione
- PRESENZA O ASSENZA di etichetta

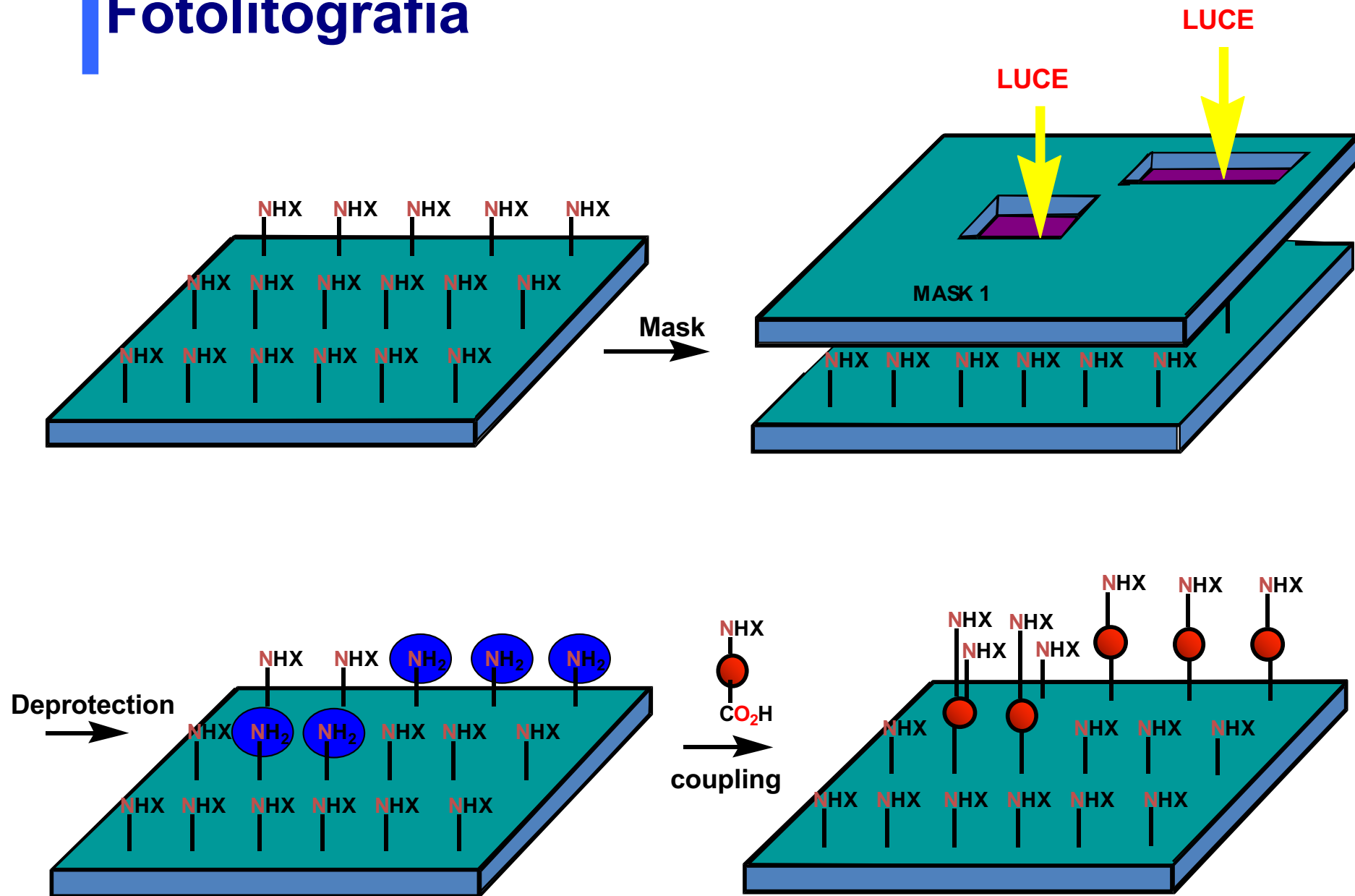
Identificazioni in base alla posizione

Fotolitografia

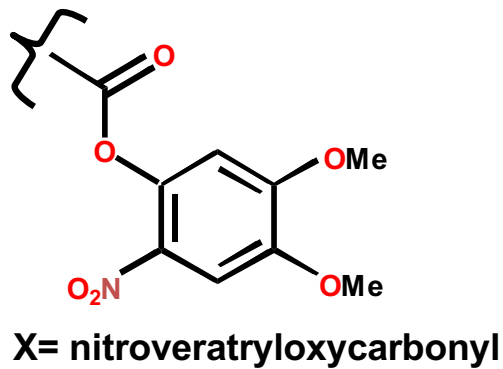
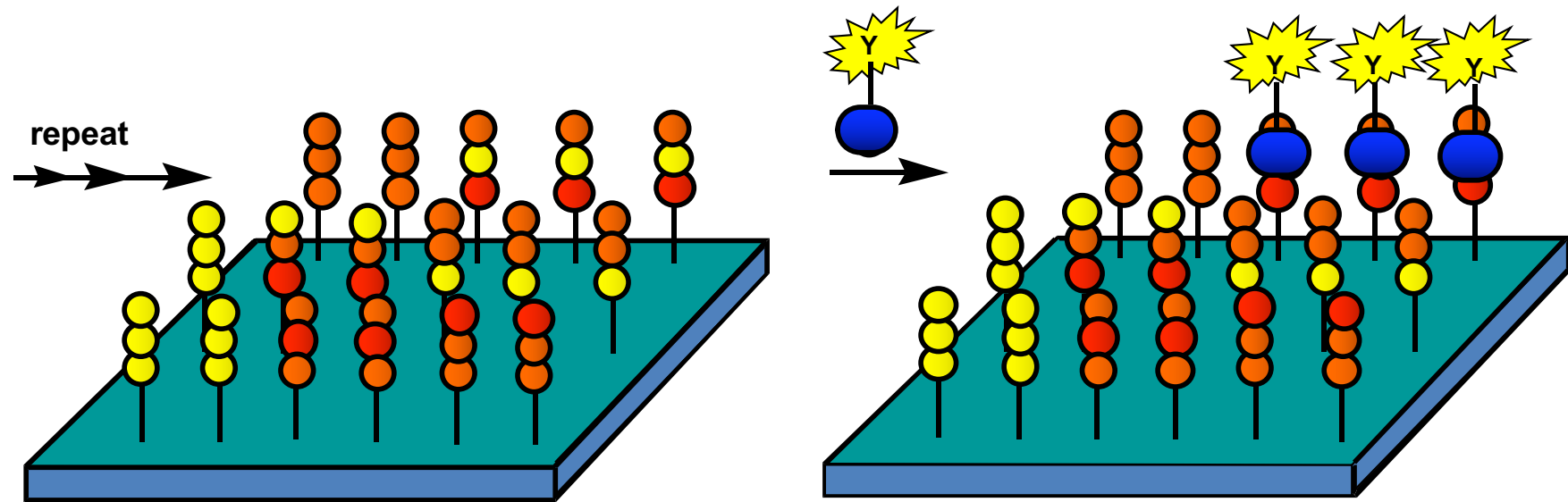
Identificazione

- Miniaturizzazione e elevata risoluzione spaziale
- Piastre con supporto per la sintesi in fase solida
- Gruppi protettori fotolabili
- Maschere per deproteggere selettivamente alcune aree della superficie
- Registrazione della posizione su cui avviene la reazione/deprotezione
- Composti finali: ancorati sulla superficie quando la sintesi è completata
- Incubazione del substrato con recettore con indicatore fluorescente
- Composto “attivo”: si lega al recettore
- Aree attive identificate mediante fluorescenza
- Risoluzione possibile: $20\ \mu\text{m} = 250.000$ composti in $1\ \text{cm}^2$

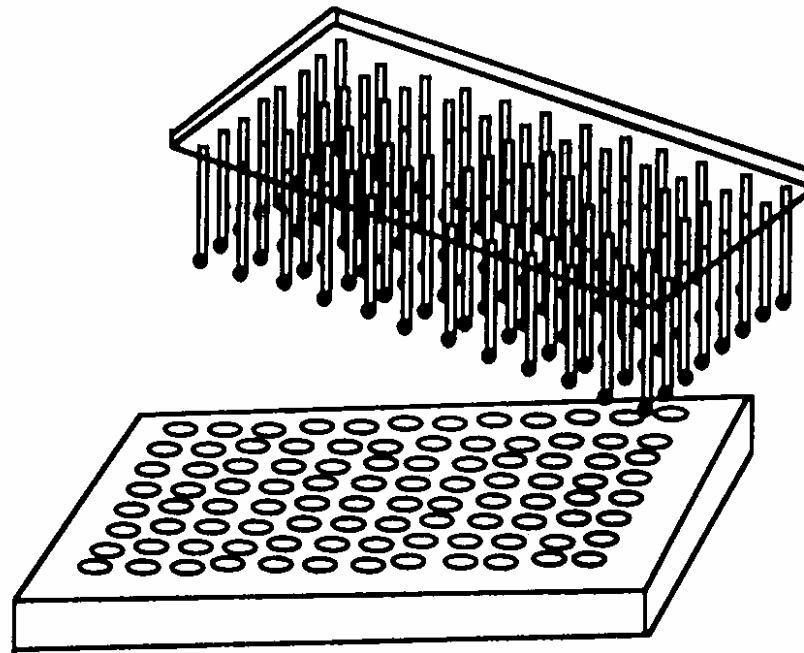
Fotolitografia



Fotolitografia



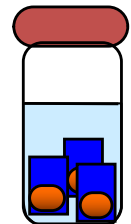
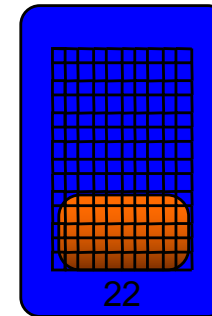
Metodo degli spilli



Sintesi parallela

- Procedura standard per sintetizzare un certo numero di analoghi, ciascuno un un pozzetto/vial/provetta
- Identità di ciascun prodotto nota
- Utile per la preparazione di analoghi per SAR e ottimizzazione della struttura

Metodo del sacchetto
(o delle tea bags)

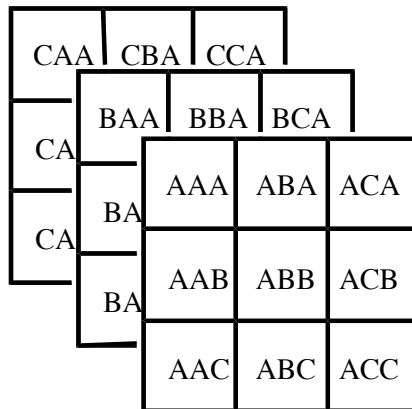


- Procedura manuale per la sintesi parallela
- Ciascuna bustina identificata/identificabile contiene la resina
- Reazioni separate per ogni bustina
- Lavaggi e work up comuni
- Un composto diverso per ogni contenitore
- Quantità relativamente ridotte di ciascun composto

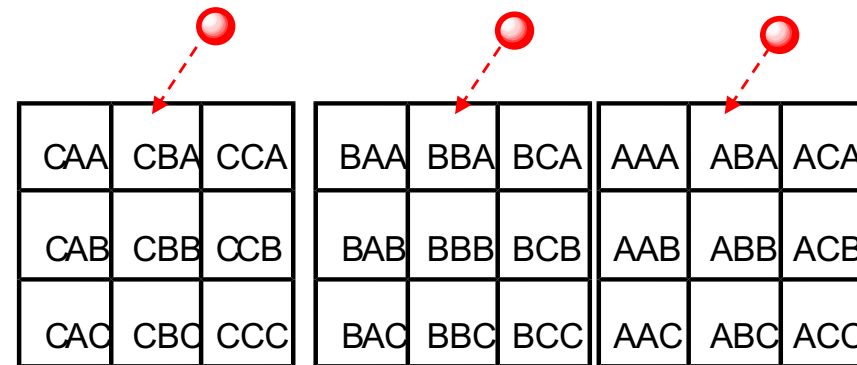
Codifica su fogli

Encoded Sheets

- Resina inserita tra due fogli di polipropilene (come dei sacchetti)
- Fogli divisi in quadrati



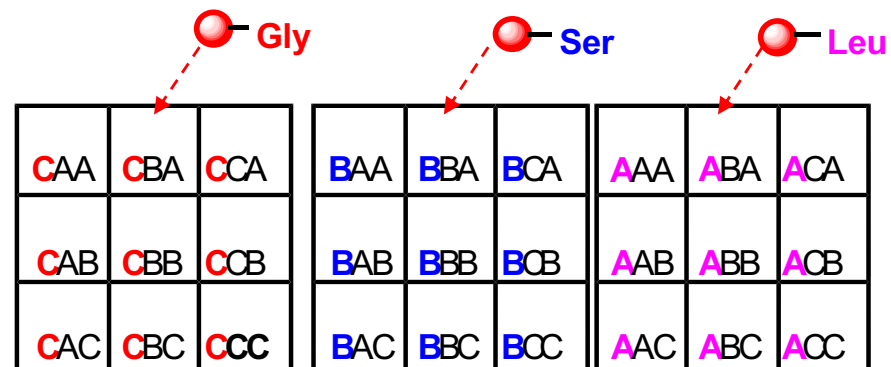
Separate sheets



1) Fmoc-Gly-OH
2) Deprotect Fmoc

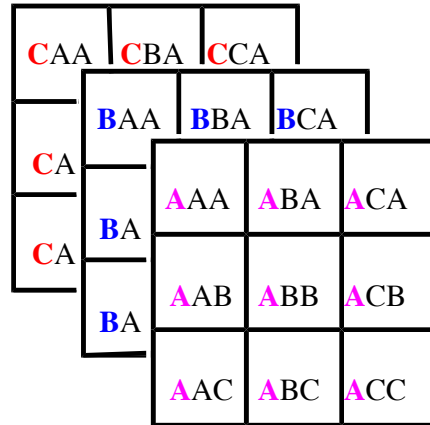
1) Fmoc-Ser-OH
2) Deprotect Fmoc

1) Fmoc-Leu-OH
2) Deprotect Fmoc

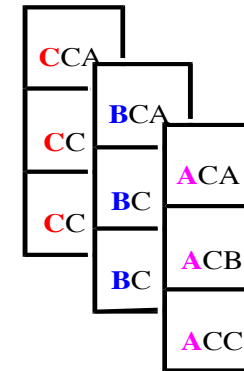
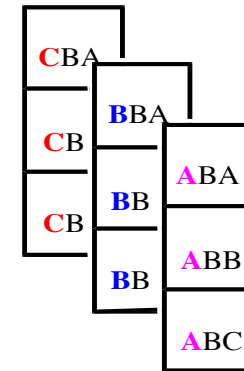
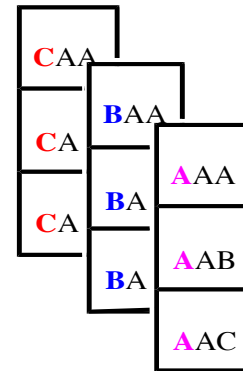


Introduzione del primo aa

Codifica su fogli



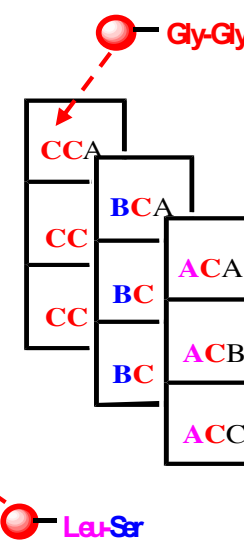
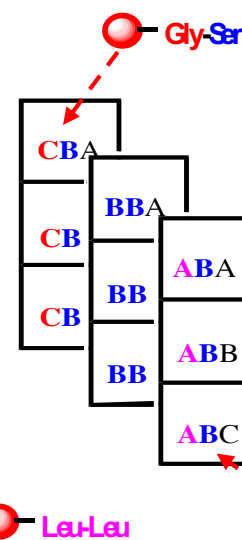
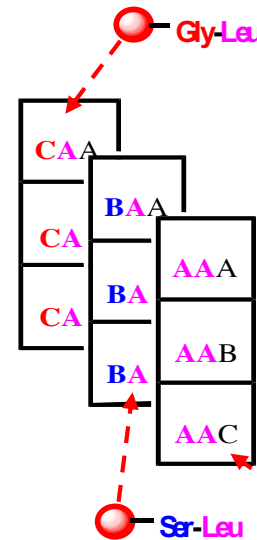
Cut →



↓ 1)Fmoc-Leu-OH
2)Deprotect Fmoc

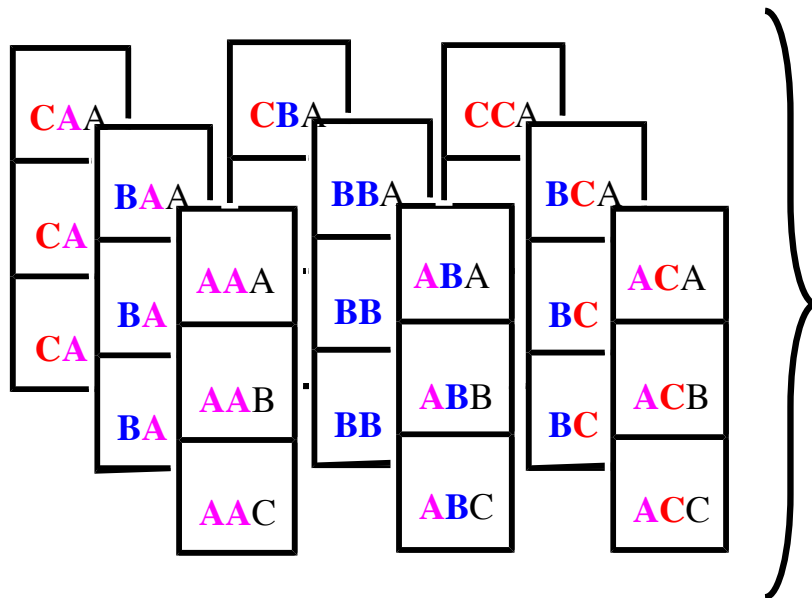
↓ 1)Fmoc-Ser-OH
2)Deprotect Fmoc

↓ 1)Fmoc-Gly-OH
2)Deprotect Fmoc

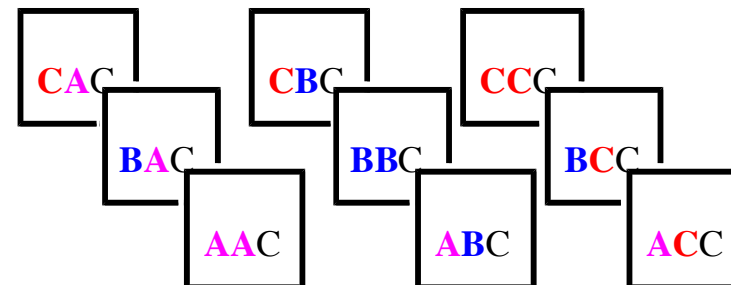
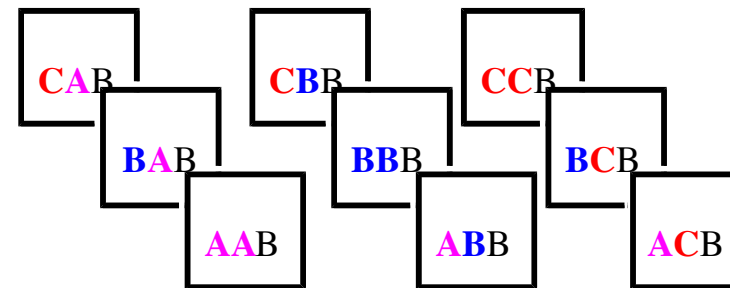
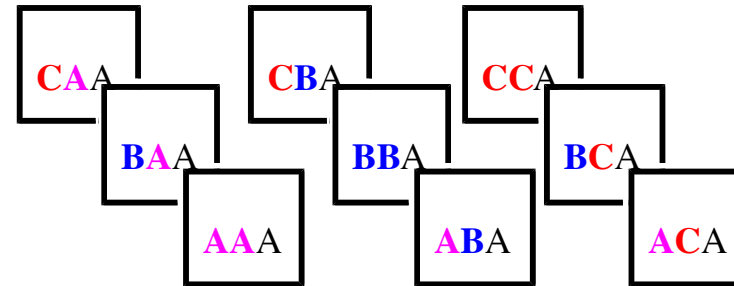


Introduzione del secondo aa

Codifica su fogli

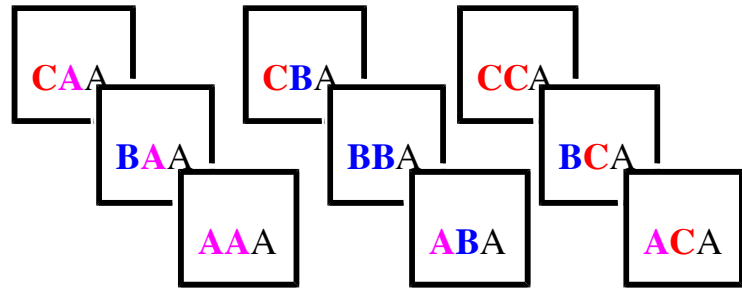


Taglio e separazione

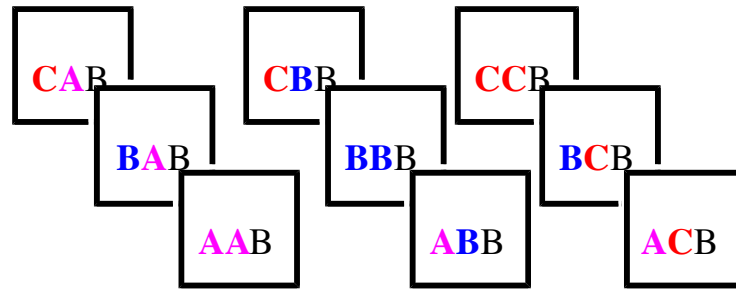
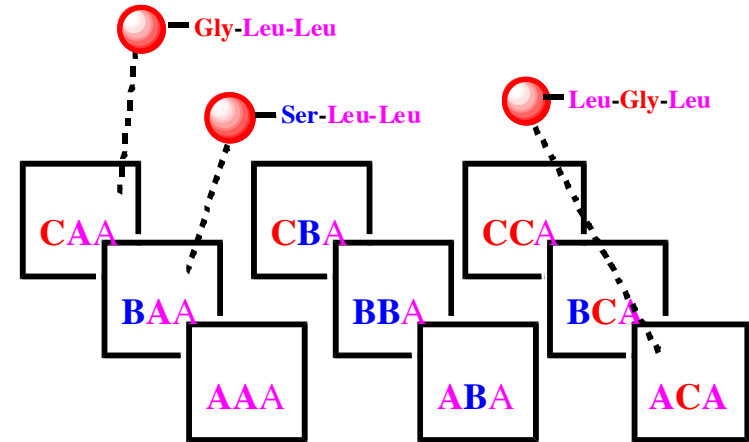


Introduzione del terzo aa

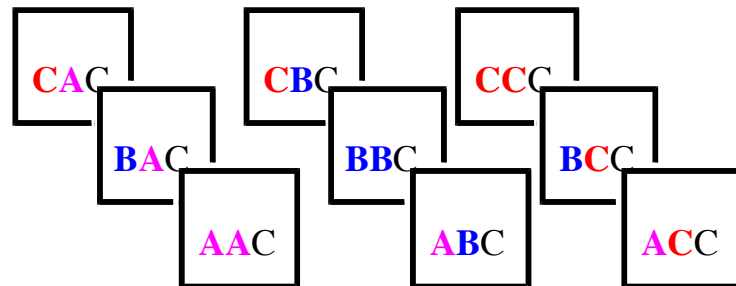
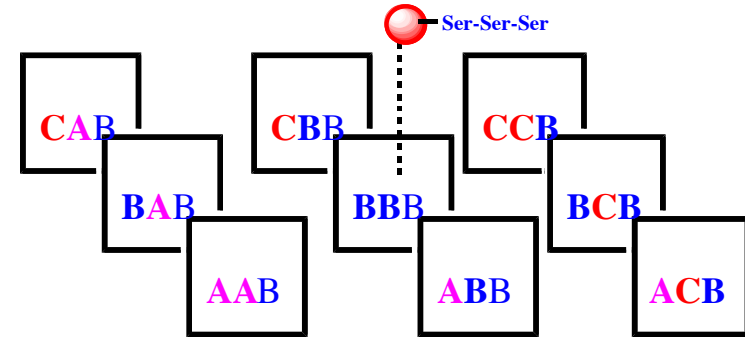
Codifica su fogli



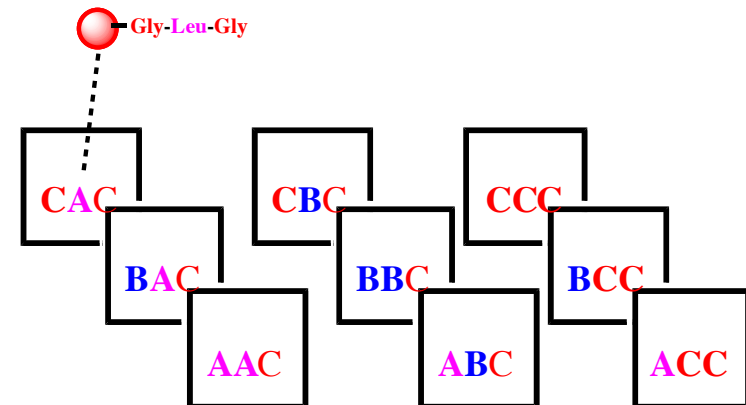
1) FmocLeuOH
2) Deprotect Fmoc



1) FmocSerOH
2) Deprotect Fmoc



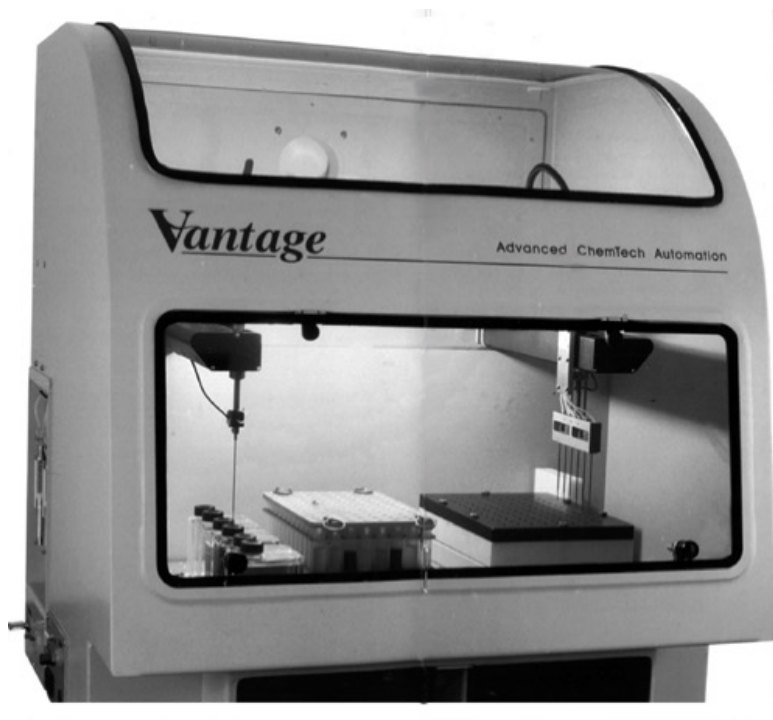
1) FmocGlyOH
2) Deprotect Fmoc



Sintesi parallela

- Sintetizzatori con 42, 96 o 144 siti di reazione (o pozzetti)
- Reazioni eseguite e lavorate automaticamente
- Stesso processo sintetico con differenti reagenti per ciascuna posizione
- Prodotti differenti in ogni pozzetto

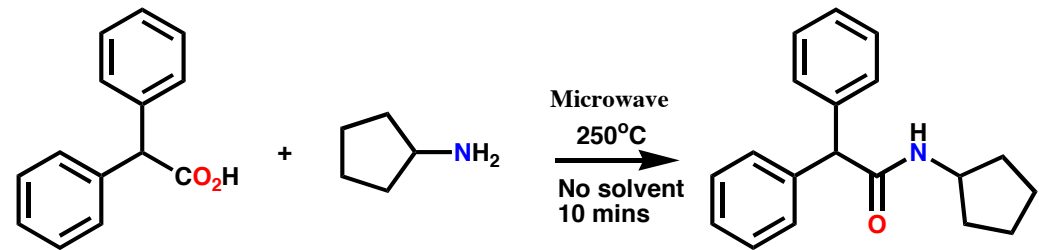
Sistemi di sintesi automatizzata



Sistemi di sintesi automatizzata accoppiati alle microonde

Approcci «green»

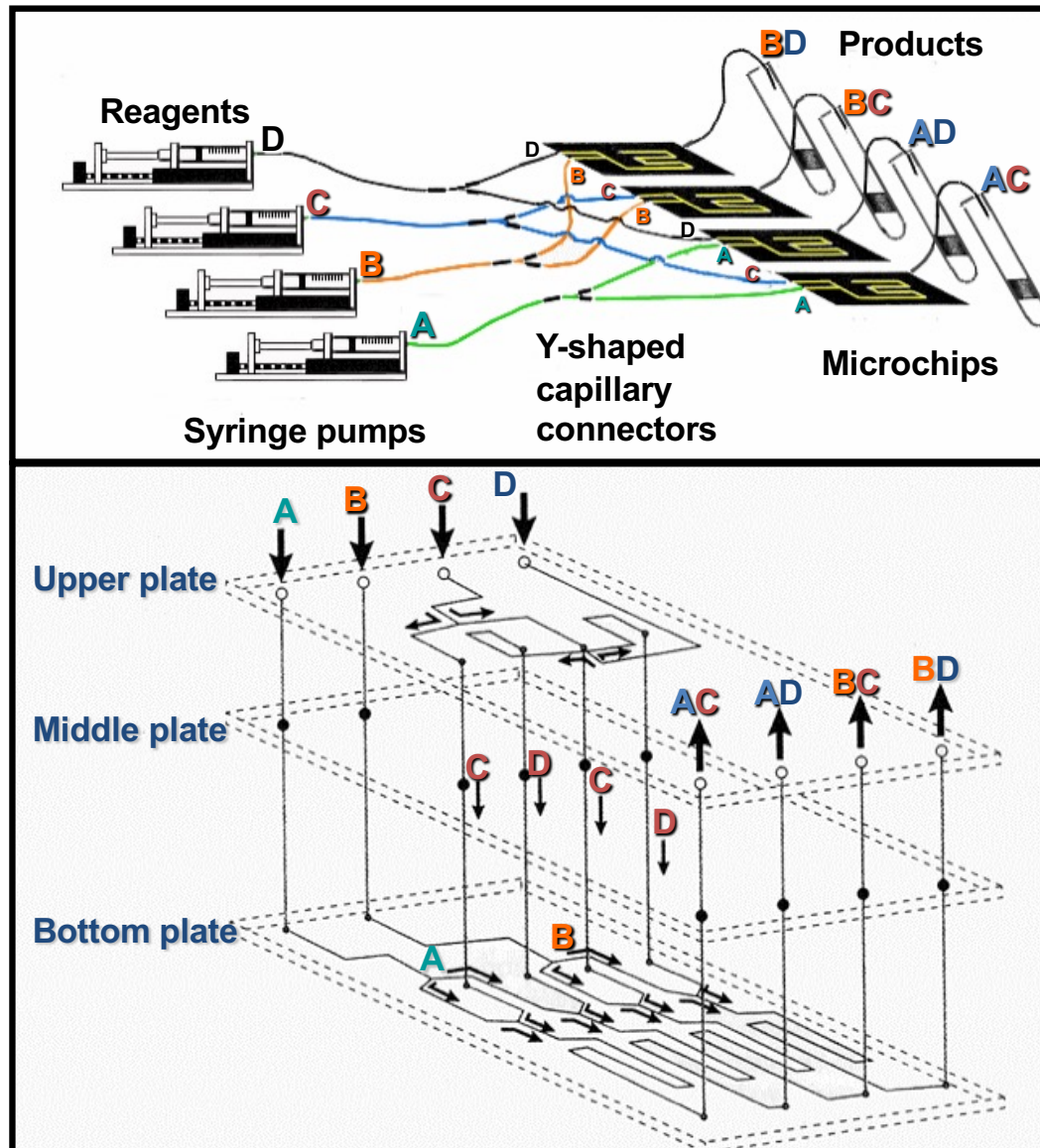
- Vantaggi rispetto al riscaldamento convenzionale
- Reazioni più veloci
- Migliore efficienza
- Ottimo trasferimento del calore
- Miglioramento delle rese



Microfluidica

- Volumi “micro”
- Reazioni in microchip (lab on a chip)
- Reazioni più veloci
- Possibilità di ottenere rese migliori e minori reazioni secondarie
- Possibilità di controllo accurato della temperatura
- Microreattori: permettono la sintesi parallela su microchip 3D

Approcci «green»



Microfluidica

Sintesi parallela di 4 prodotti
usando 4 microchips

Sintesi parallela di 4 prodotti
usando un microchip 3-D

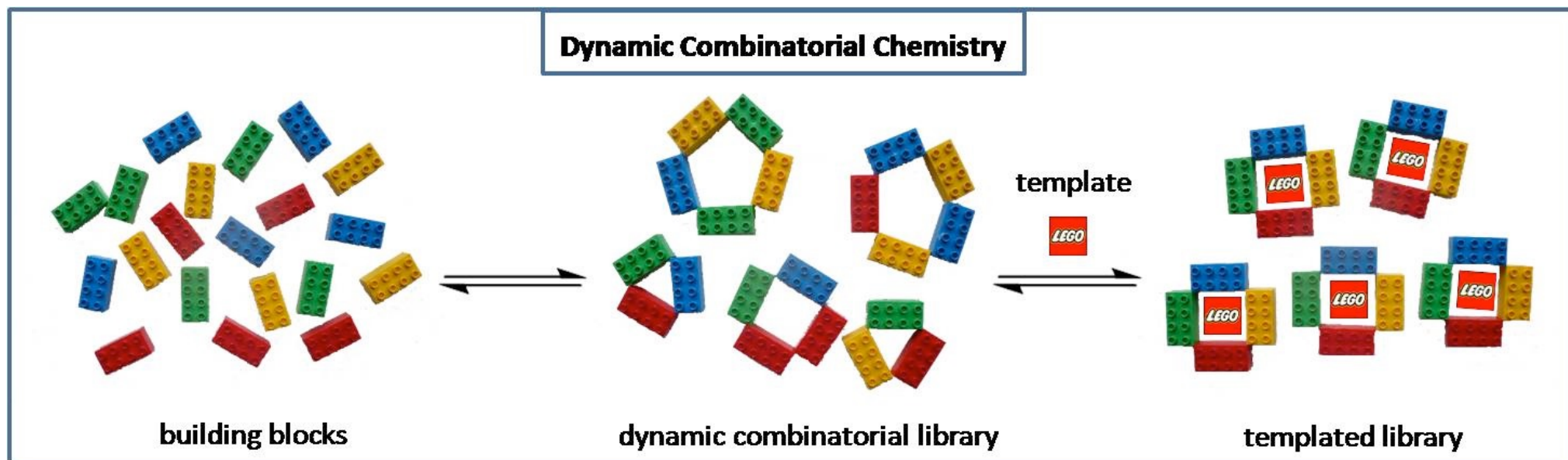
Chimica combinatoriale dinamica

Chimica combinatoriale dinamica

Chimica combinatoriale dinamica
sotto controllo termodinamico

Combinatorial Dynamic Library CDL

Ideale anche per trovare specie coinvolte nel riconoscimento di controparti biologiche



Chimica combinatoriale dinamica

- Utilizzo per la ricerca di nuovi lead compounds
- Miscele testate *in situ*
- Reazioni **reversibili** in un tempo ragionevole
- Equilibrio e selezione simultanei
- Reazioni compatibili con le condizioni presenti
- Condizioni blande che non interferiscano con le interazioni non covalenti coinvolte nel riconoscimento molecolare
- Congelamento dello stato della library

AMPLIFICAZIONE

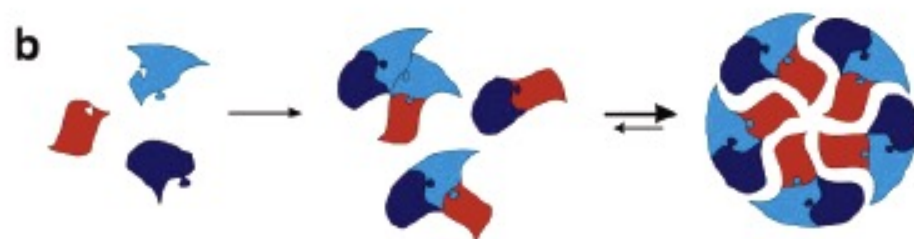
- Target presente nella miscela
- Spostamento dell'equilibrio verso la formazione del composto che interagisce con il target

- Target: non deve reagire con i building blocks; stabile nelle condizioni di reazione
- Ambiente acquoso (target biologico!)
- Veloce equilibrio per poter avere amplificazione
- Reattivi scelti in modo tale che un prodotto non sia significativamente favorito rispetto agli altri (problema di amplificazione indotta dal target)

Chimica combinatoriale dinamica



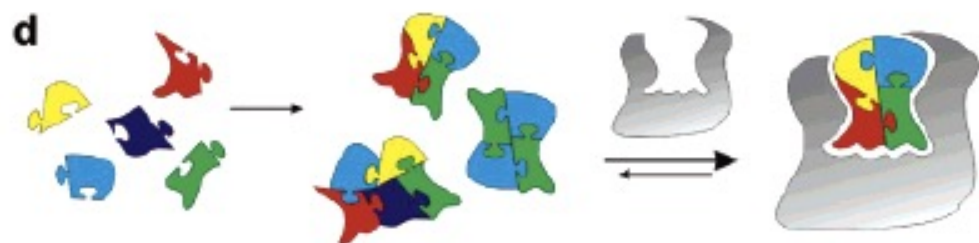
Selezione dei foldamers
basata su interazioni non
covalenti interne



Selezione di molecole che si
autoassemblano sulla base di
interazioni non covalenti tra i
costituenti la library

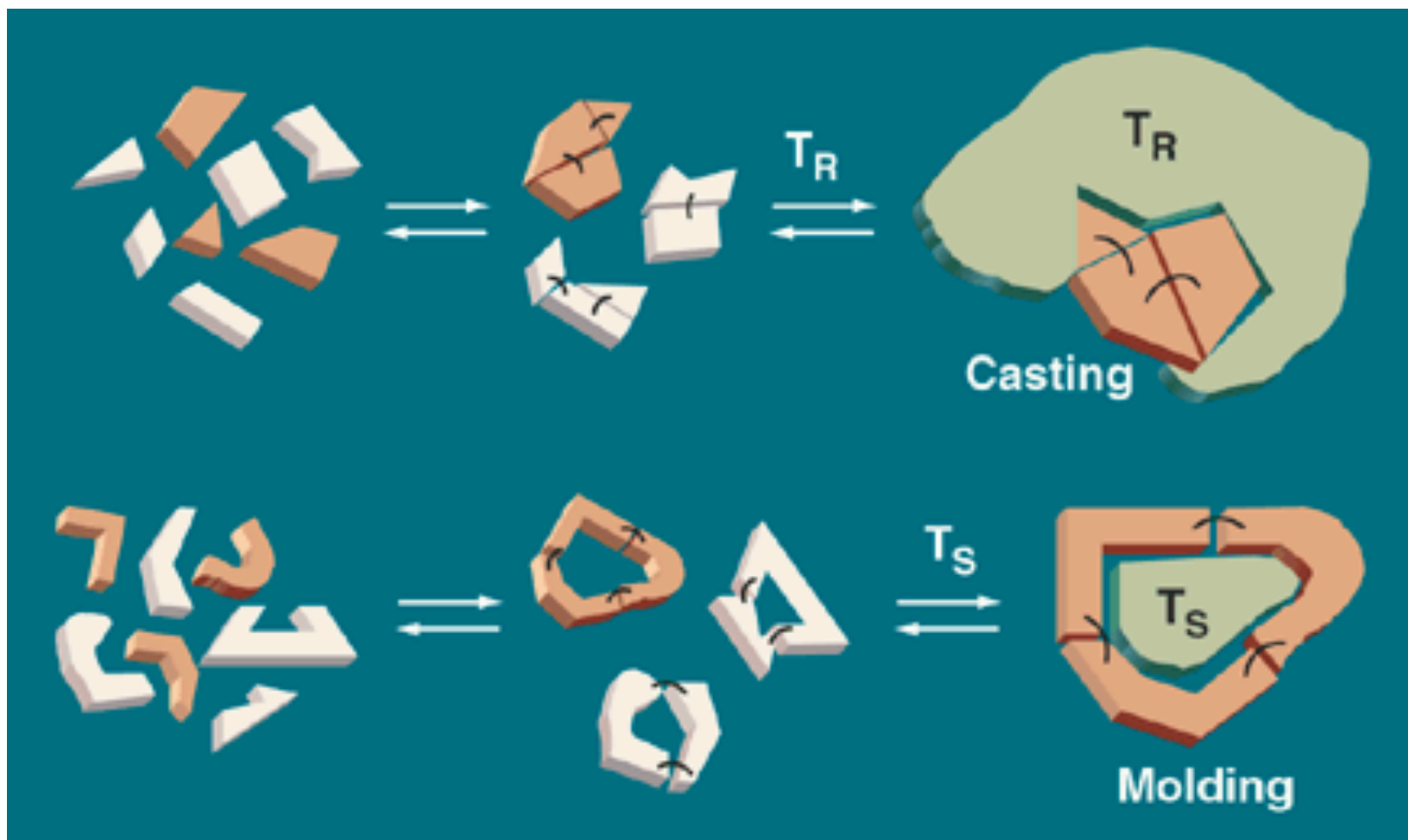


Selezione di un host indotta
da un **guest esterno**
MOLDING

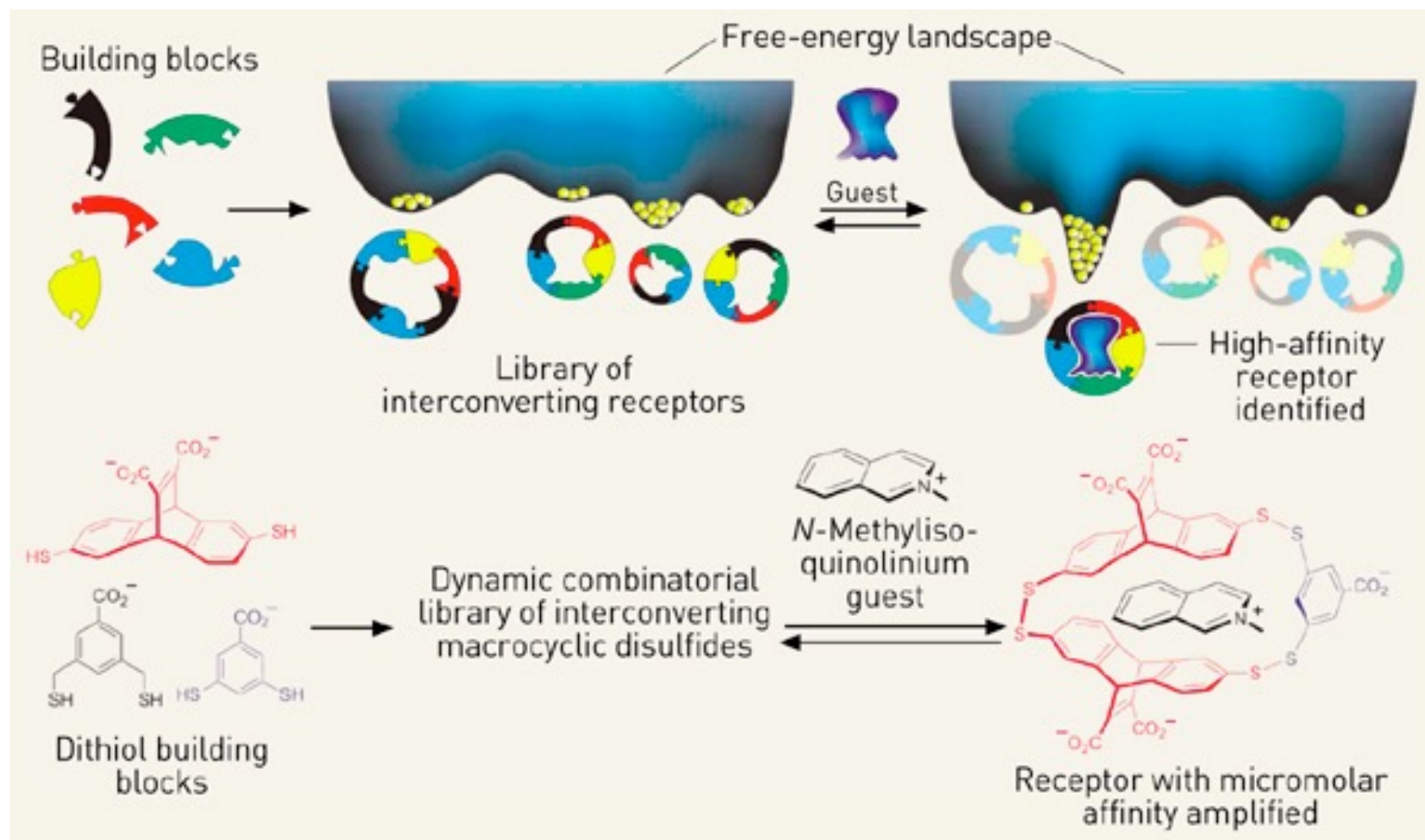


Selezione di un guest
indotta da un **host esterno**
CASTING

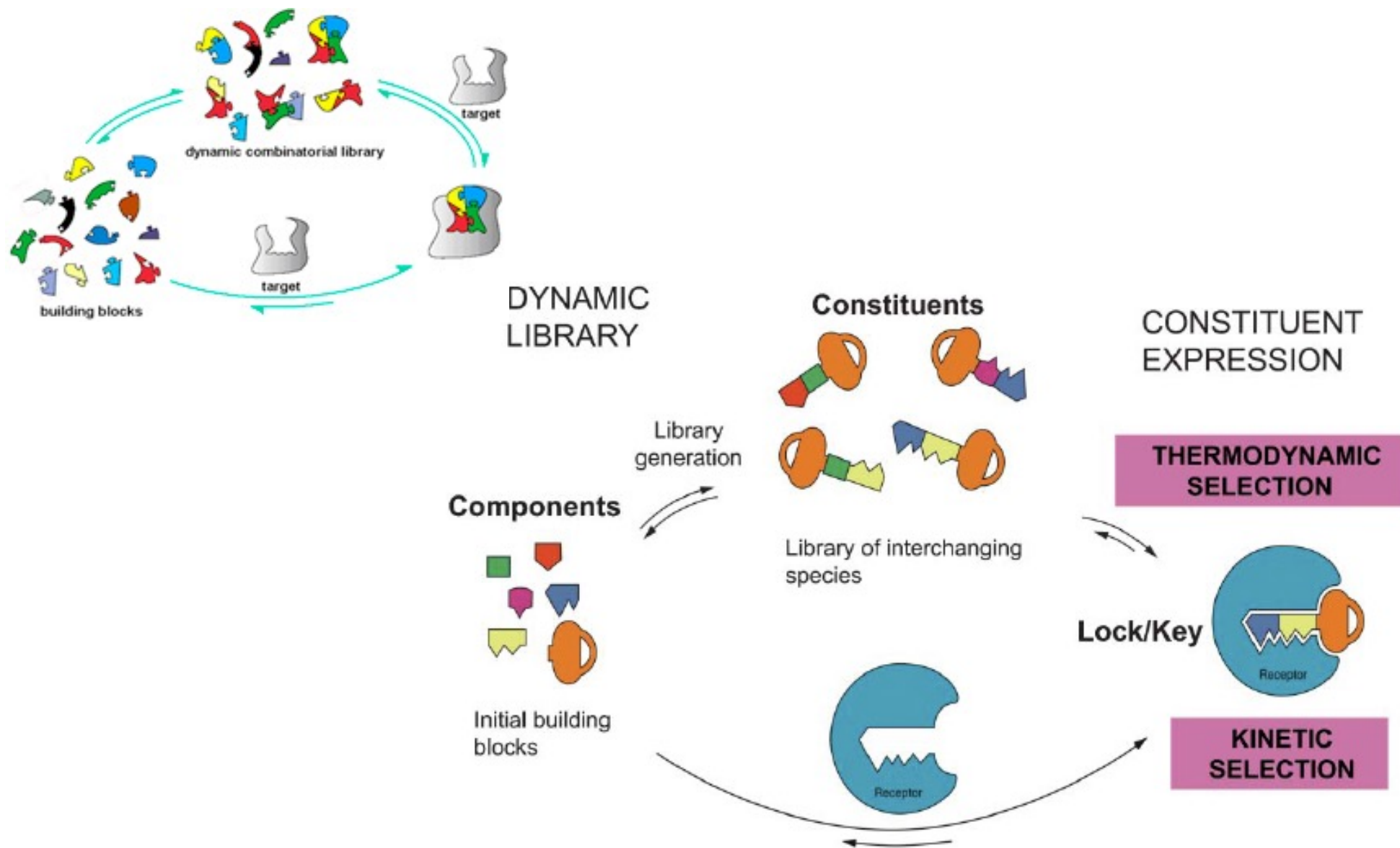
Chimica combinatoriale dinamica



Chimica combinatoriale dinamica



Chimica combinatoriale dinamica



Chimica combinatoriale dinamica

Tipi di legami

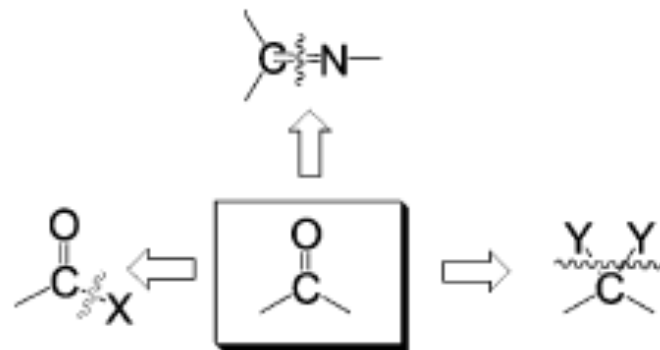
Non covalenti (legami H), di coordinazione, covalenti

interactions		energy (kJ/mol)	lability
covalent bonds		150–800 ^a	low
coordinative bonds	1st row ^b	80–350	high
	2nd row ^b	80–350	medium
	3rd row ^b	80–350	low
hydrogen bonds		0–20	high

^a Typical range for single and double bonds. ^b Localization of the metal in the d block of the periodic table (3d–5d series).

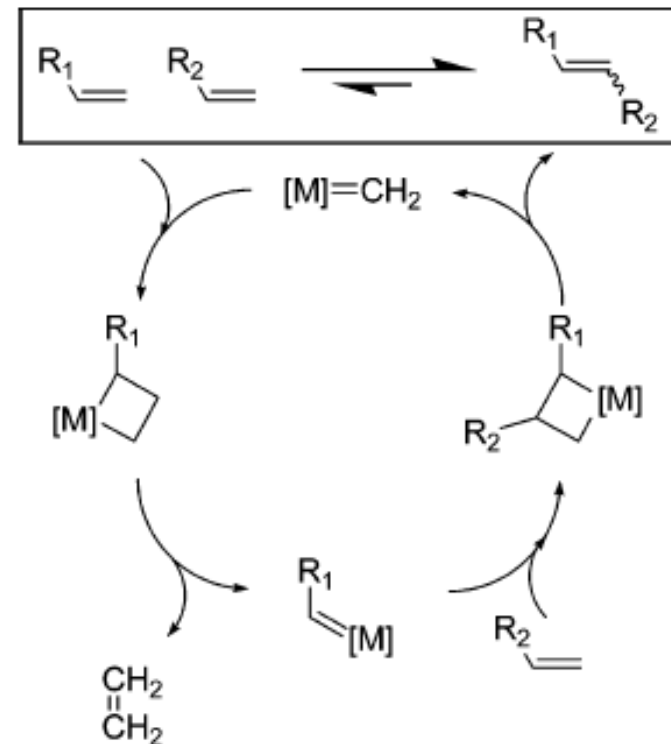
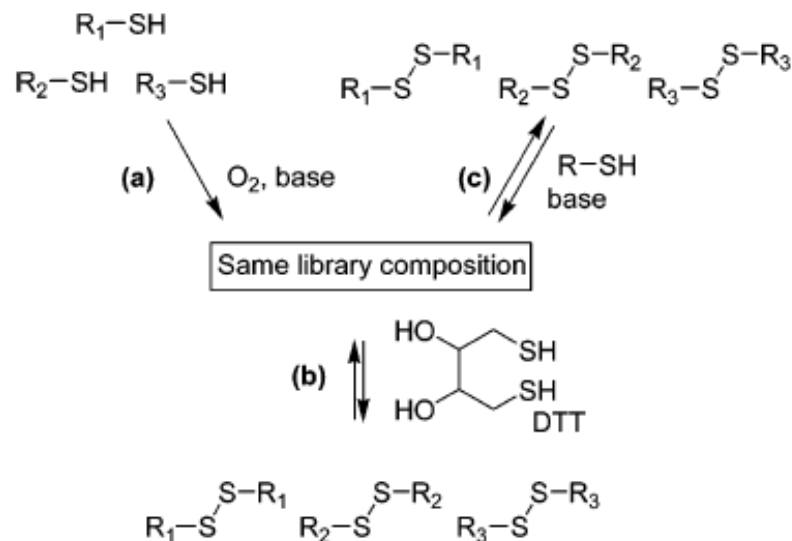
- Legami deboli: difficoltà a isolare i prodotti
- Legami covalenti: difficoltà di reversione
- Utilizzo di catalizzatori per accelerare le reazioni
- Rimozione dei catalizzatori per congelare la situazione

Chimica combinatoriale dinamica



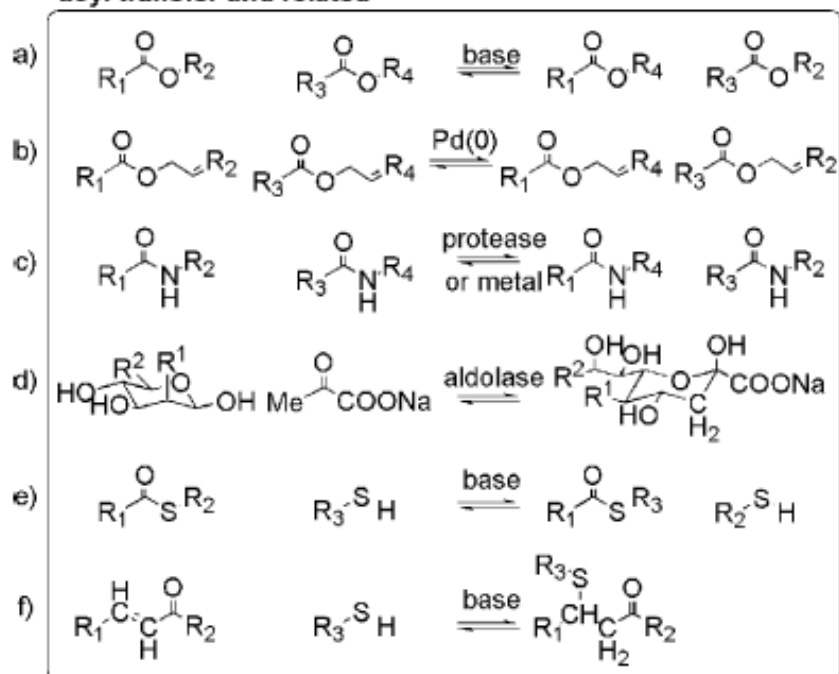
- Trans-esterificazione
- Trans-amidazione
- Legami disolfuro
- Metatesi

^a Acyl transfer ($X = \text{NHR}, \text{OR}, \text{SR}, \text{CH}_2\text{R}$), $\text{C}=\text{N}$ exchange and acetal-type exchange ($Y = \text{OR}, \text{SR}, \text{NHR}$).

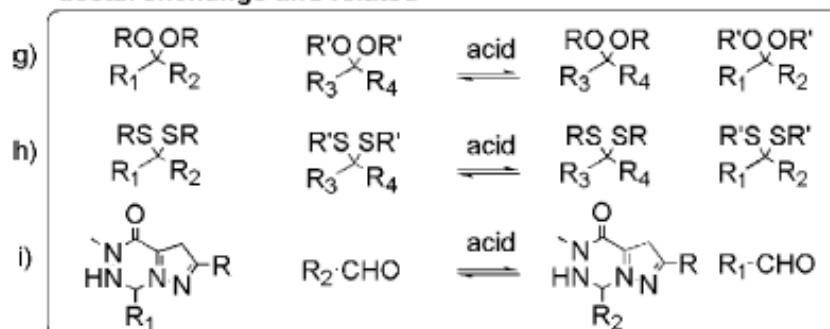


Chimica combinatoriale dinamica

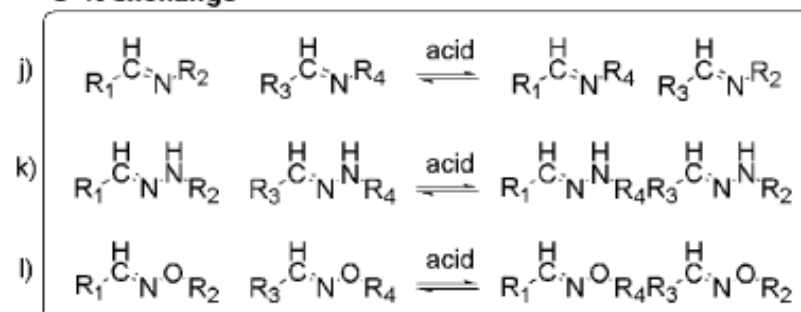
acyl transfer and related



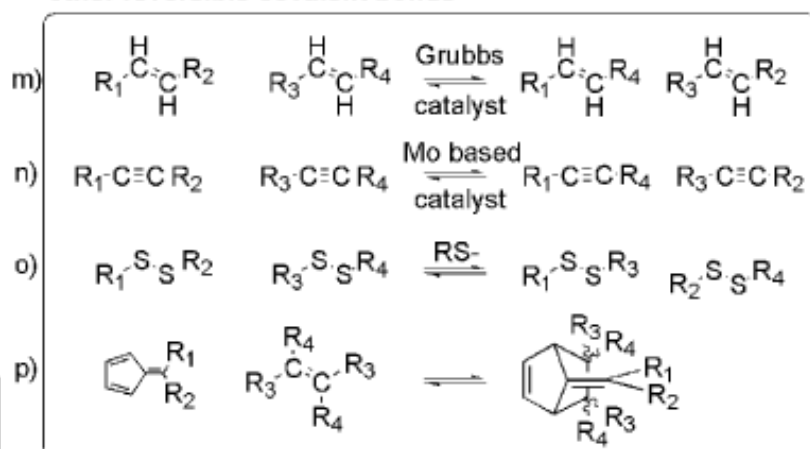
acetal exchange and related



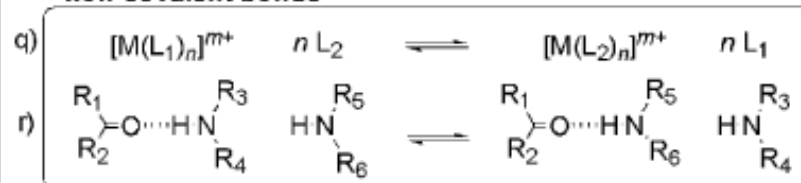
C=N exchange



other reversible covalent bonds

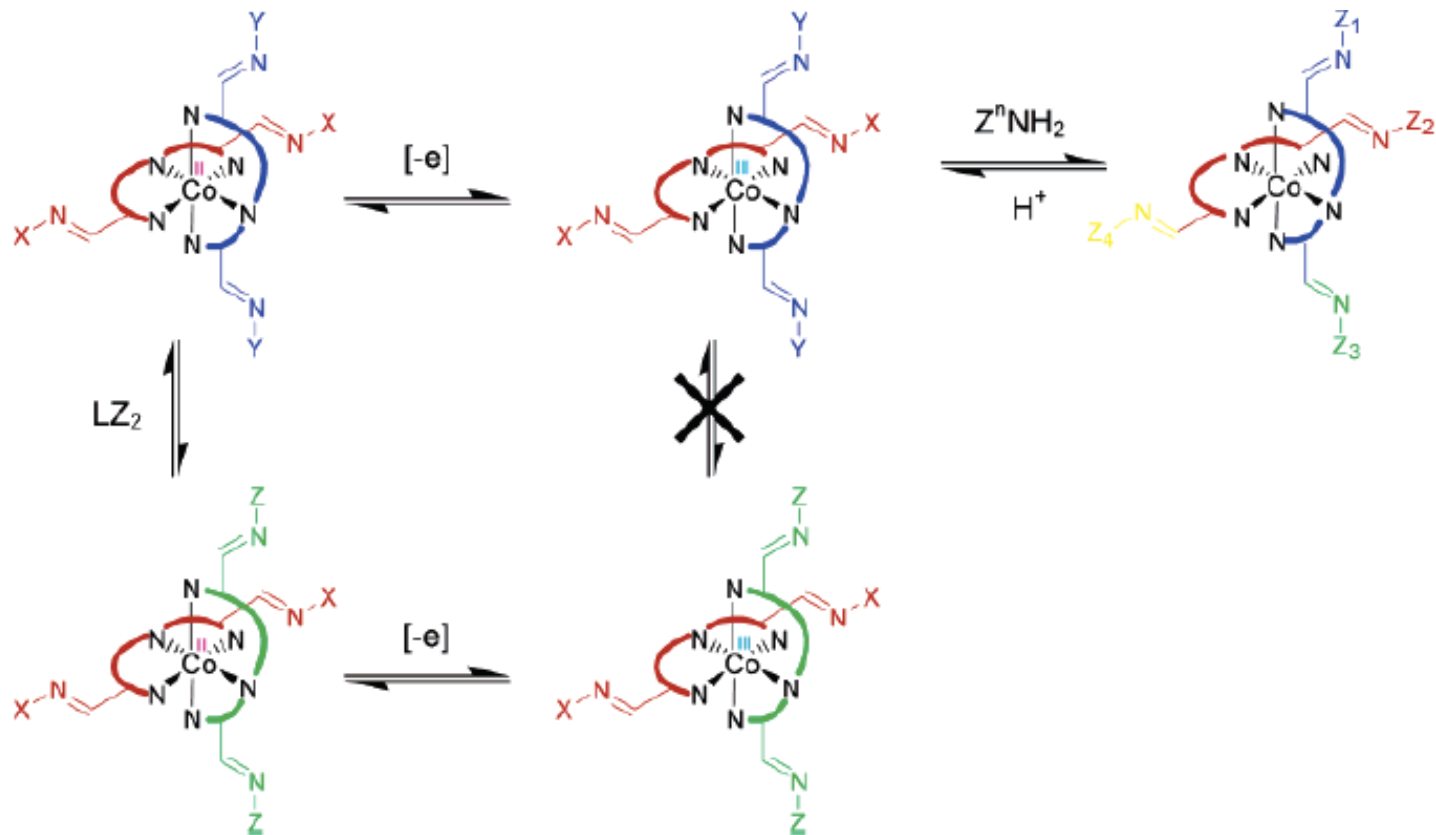
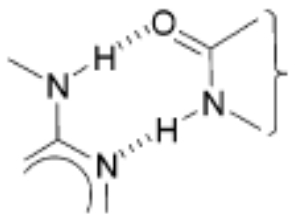
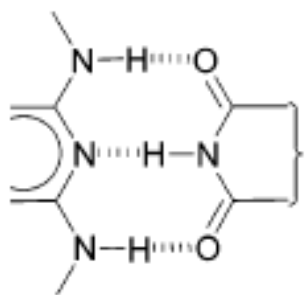


non-covalent bonds

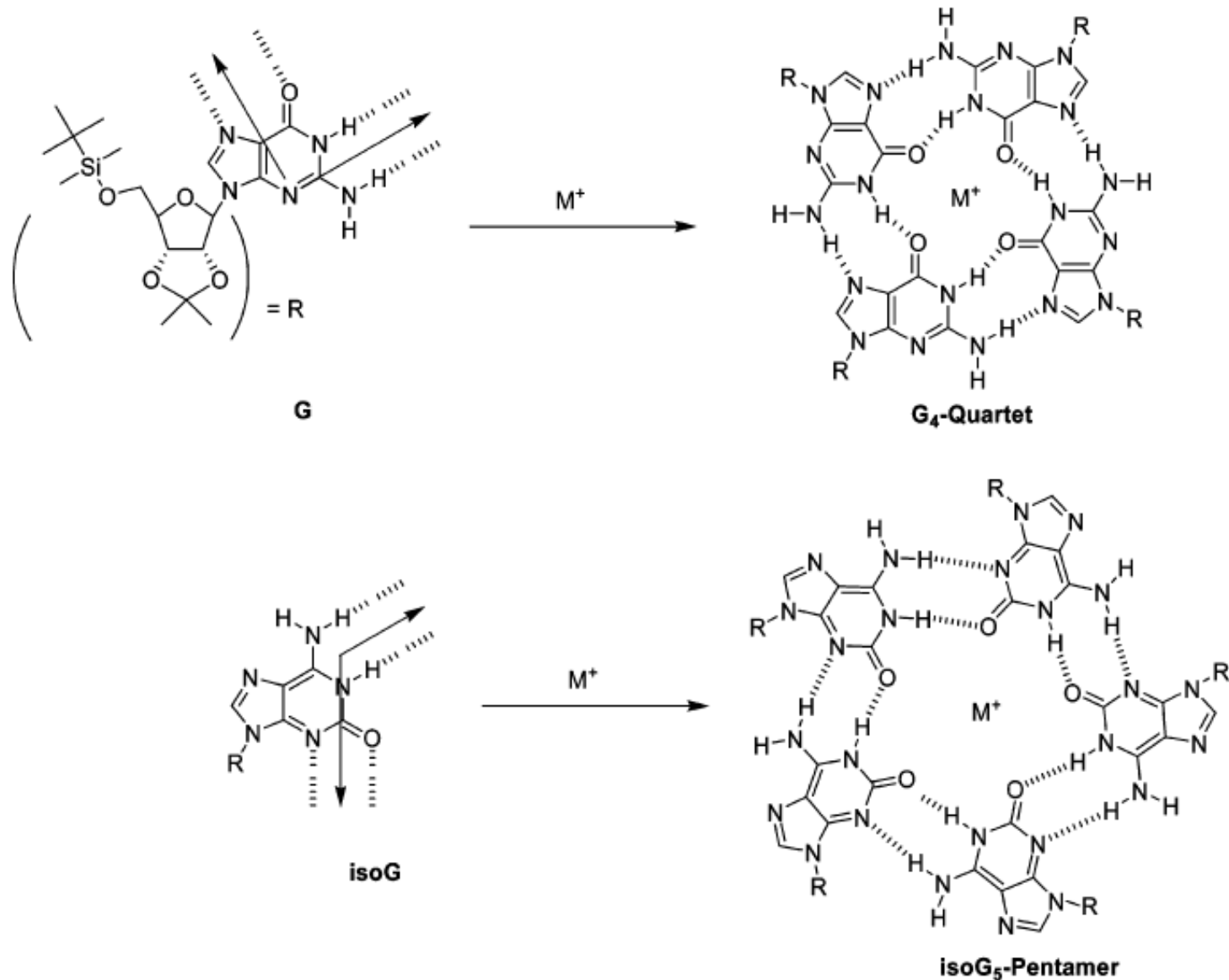


^a (a) Transesterification; (b) transallylesterification; (c) transamidation; (d) aldol exchange; (e) transthioesterification; (f) Michael/retro-Michael reactions; (g) acetal exchange; (h) thioacetal exchange; (i) pyrazolotriazone metathesis; (j) transimination; (k) hydrazone exchange; (l) oxime exchange; (m) alkene metathesis; (n) alkyne metathesis; (o) disulfide exchange; (p) Diels–Alder/retro-Diels–Alder reactions; (q) metal–ligand exchange; (r) hydrogen-bond exchange.

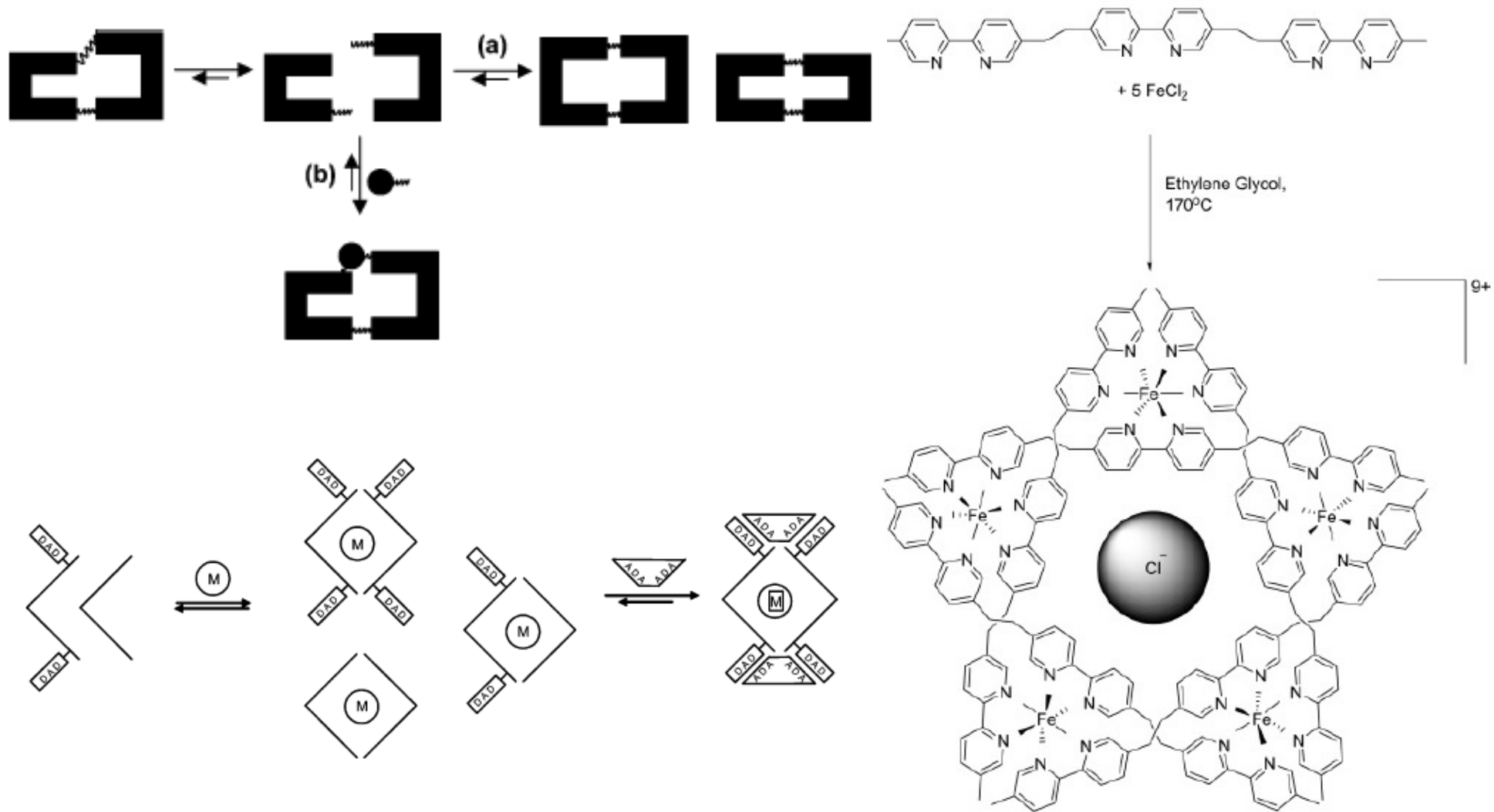
Chimica combinatoriale dinamica



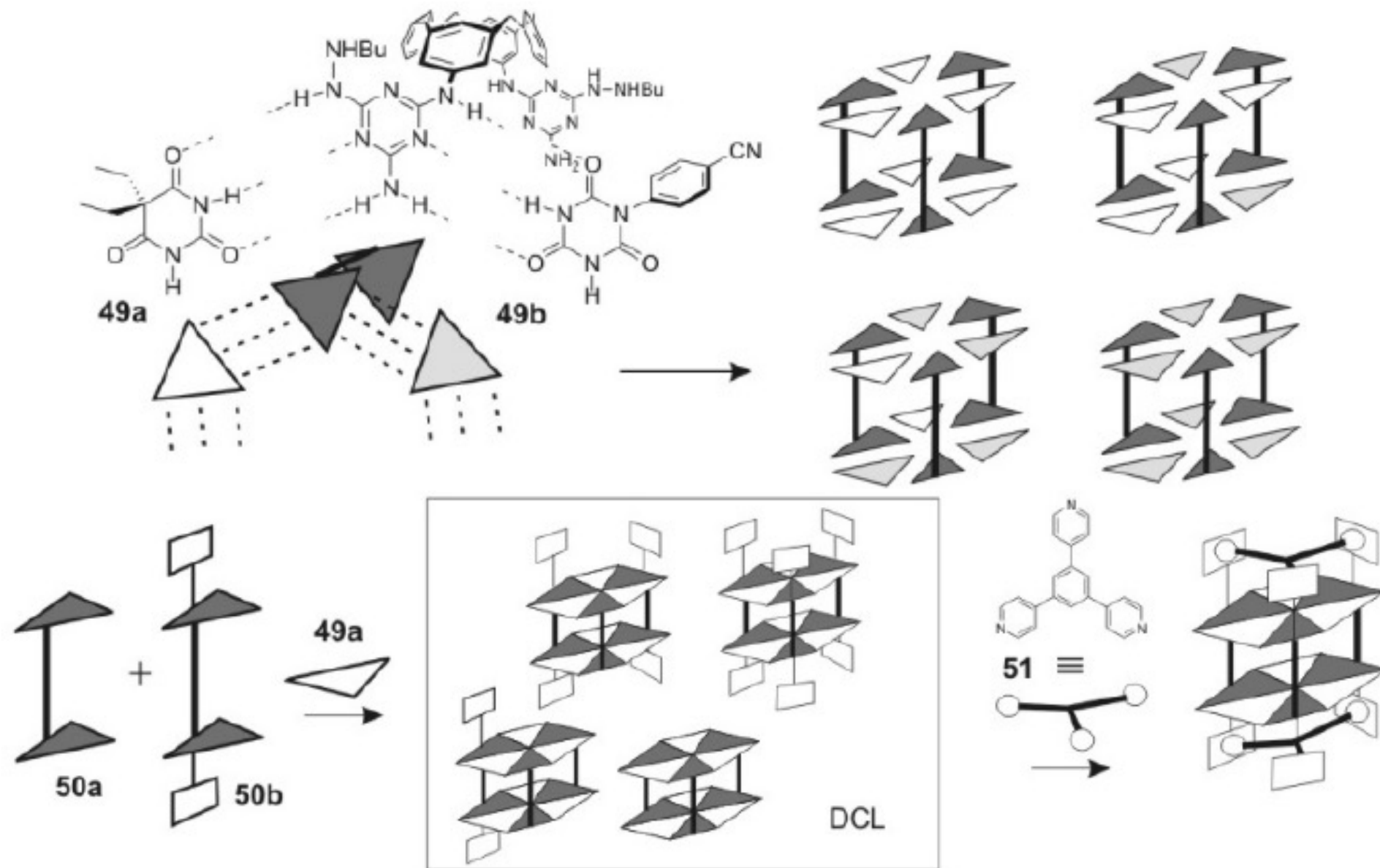
Chimica combinatoriale dinamica



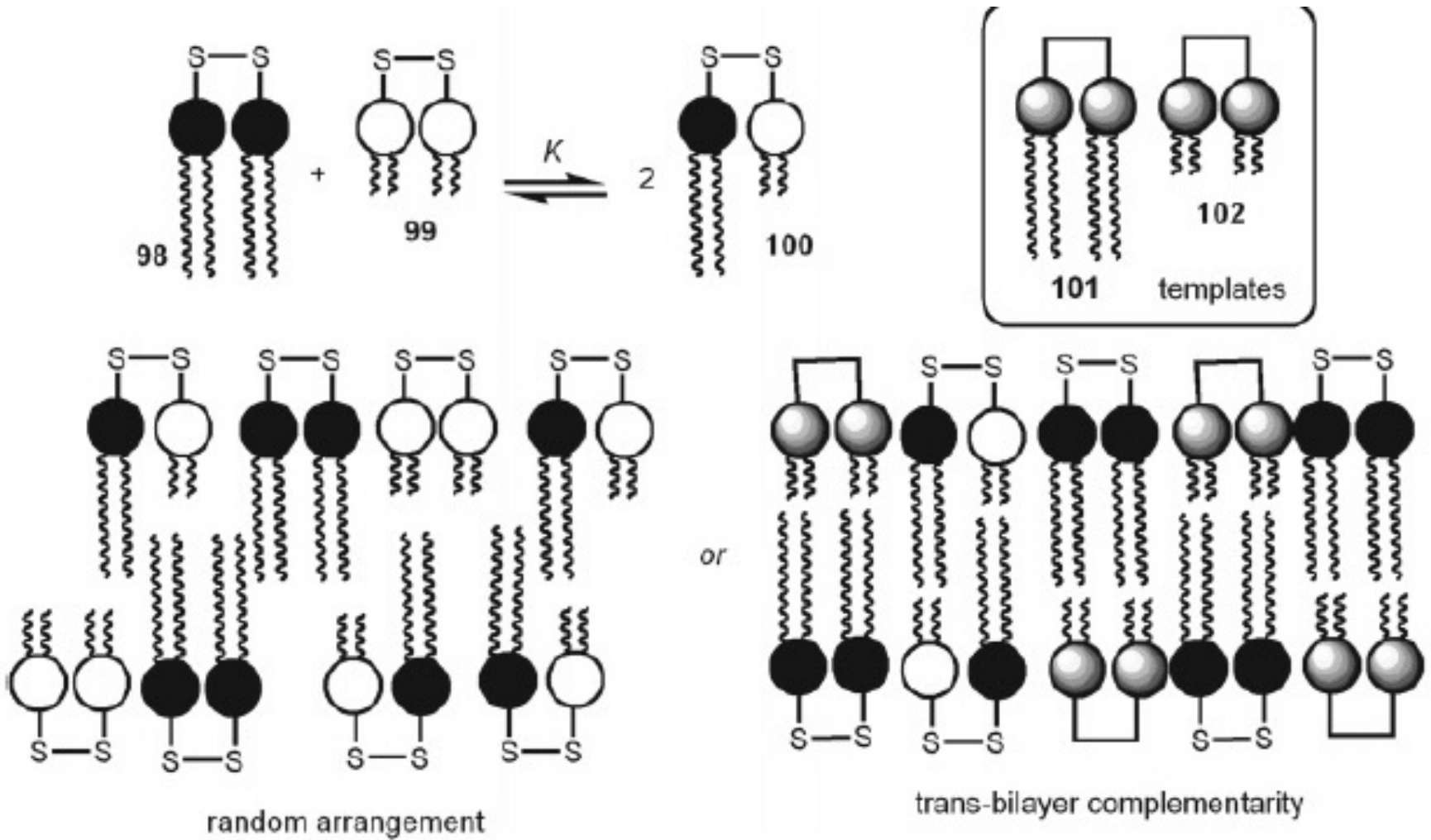
Chimica combinatoriale dinamica



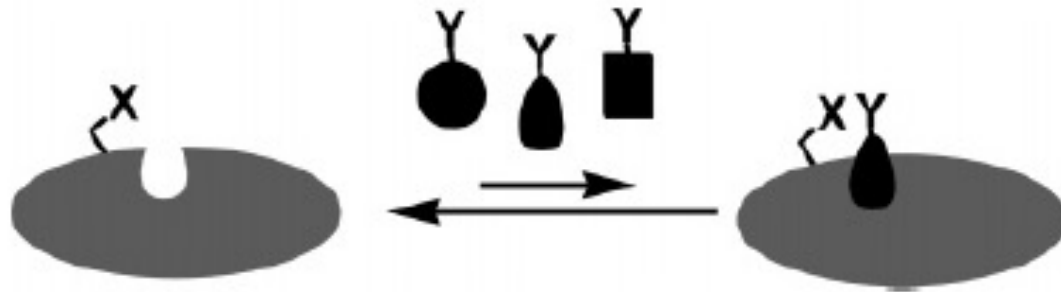
Chimica combinatoriale dinamica



Chimica combinatoriale dinamica

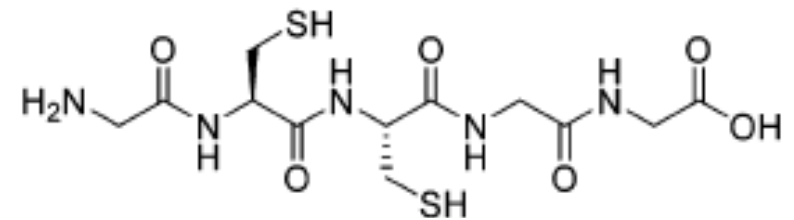
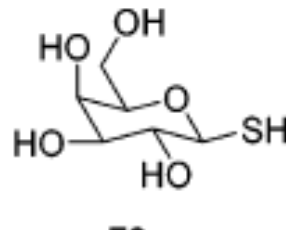
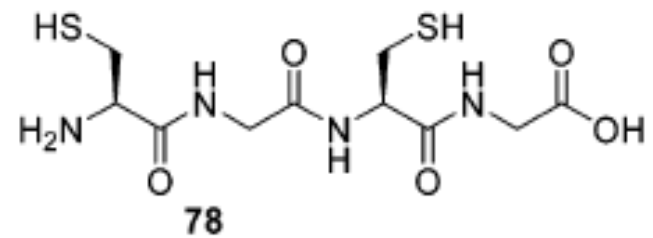
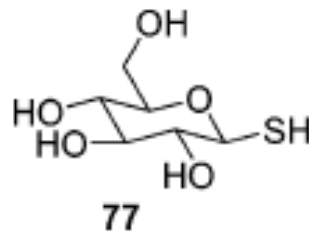


Chimica combinatoriale dinamica



X: cisteina

Libraries di glicopeptidi: per il riconoscimento di proteine

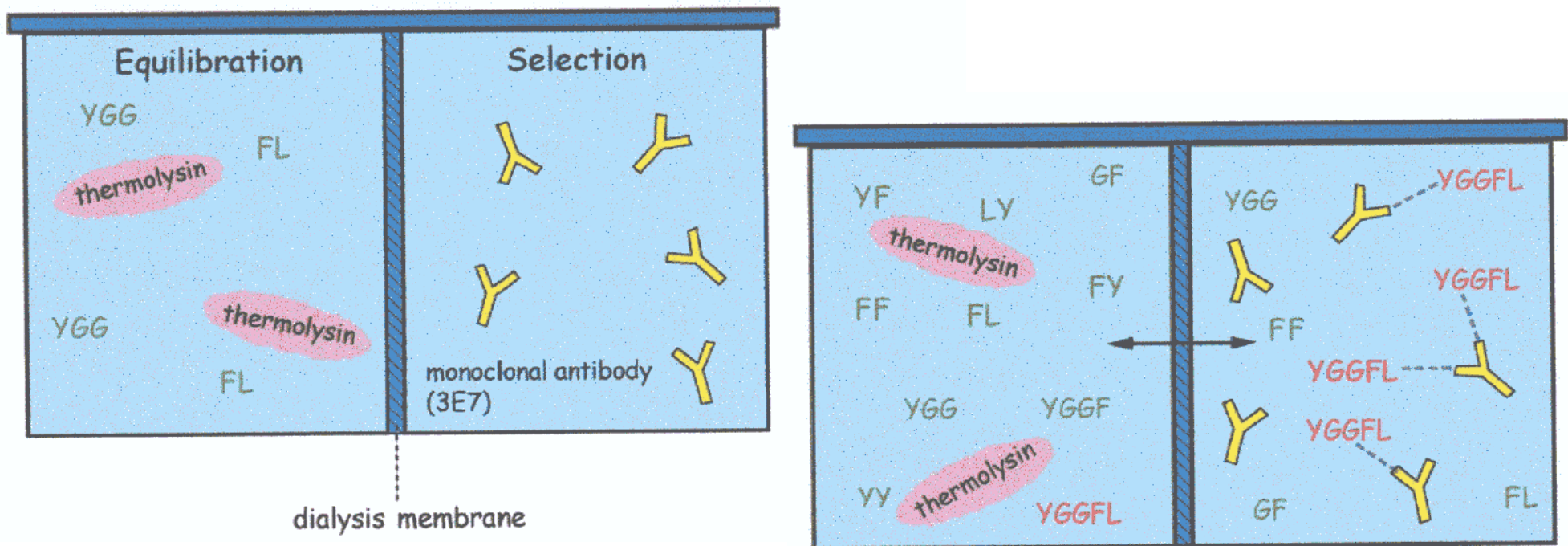
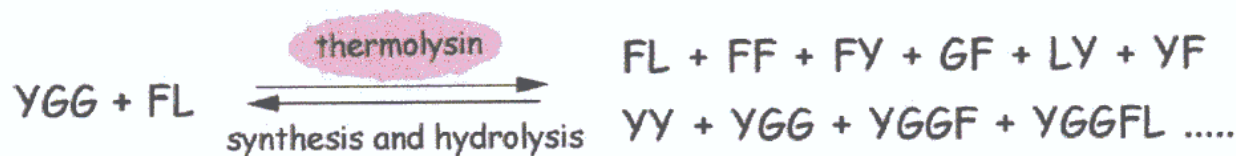


Sistemi misti, ciclici, lineari...

Chimica combinatoriale dinamica

Oligopeptidi

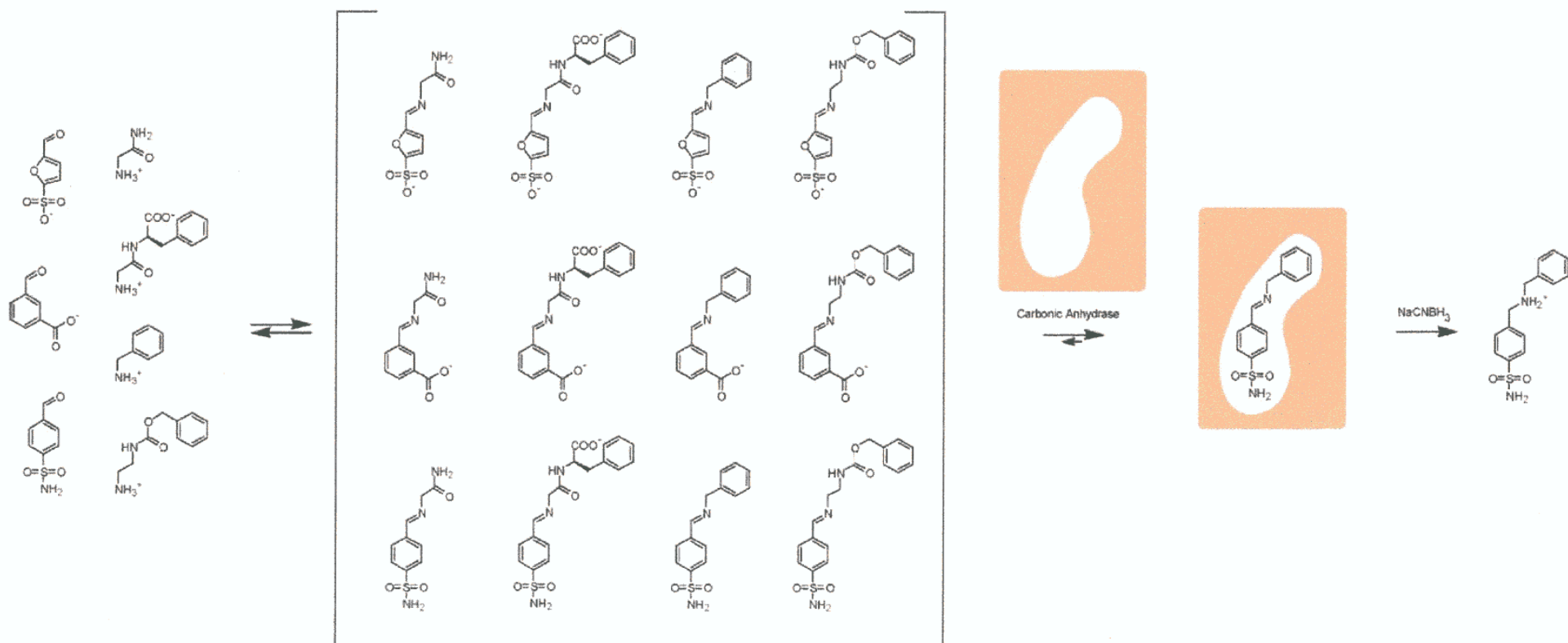
- **Oligopeptidi** correlati alla β -endorfina
- **Termolisina** (proteasi di bassa specificità): catalizzatore
- Idrolisi e la sintesi contemporanee
- Reazione in presenza di un template: **anticorpo anti β -endorfina**



Chimica combinatoriale dinamica

Inibitori dell'anidrasi carbonica

- **Anidrasi carbonica**
- Sito attivo: tasca contenente uno Zn(II) e un adiacente sito lipofilo
- Inibitori più potenti: gruppo solfonamidico legato a un sostituente lipofilo
- DCL costruita a partire da 3 aldeidi e 4 amine (12 diversi componenti)
- Riduzione delle imine con cianoboridruro



Chimica combinatoriale dinamica

Generalmente le molecole di interesse biologico/farmaceutico sono ditopiche ovvero presentano due porzioni (simili o diverse) coinvolte nel riconoscimento del target. Le due unità sono separate da uno spaziatore con geometria variabile.

Vancomicina

Target-Accelerated Combinatorial Synthesis and Discovery of Highly Potent Antibiotics Effective Against Vancomycin-Resistant Bacteria

Nicolaou et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39, 3823

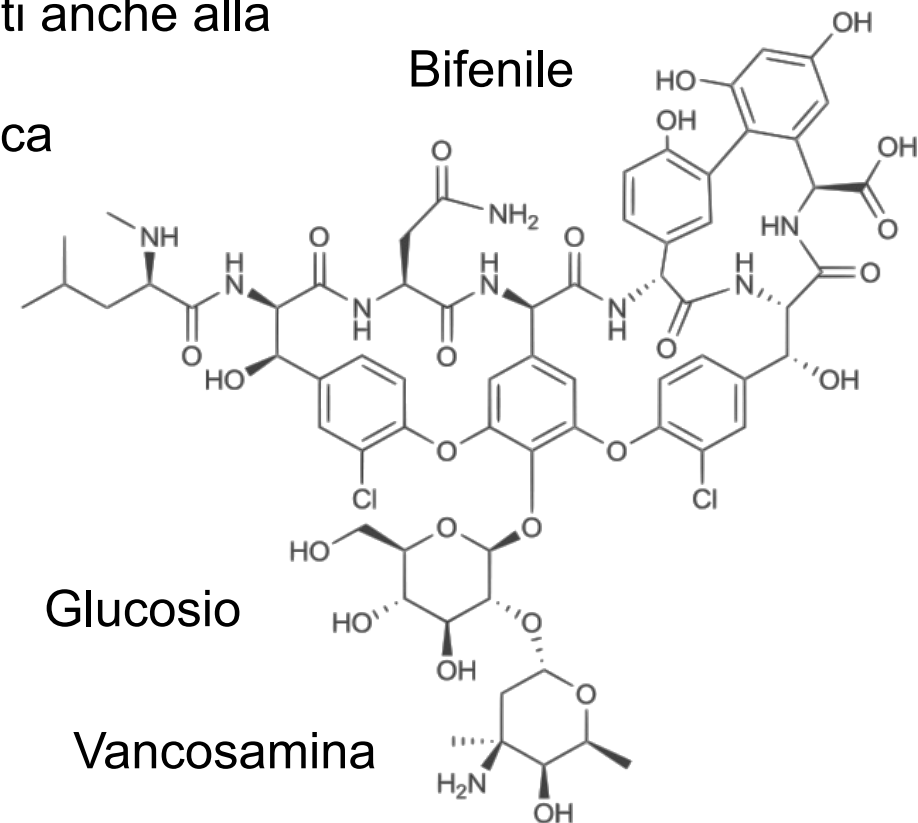
DIMERI della VANCOMICINA

- Ligandi con maggiore affinità per il target della vancomicina: dipeptide d-Ala-d-Ala
- Composti attivi contro patogeni resistenti alla vancomicina

Chimica combinatoriale dinamica

Vancomicina

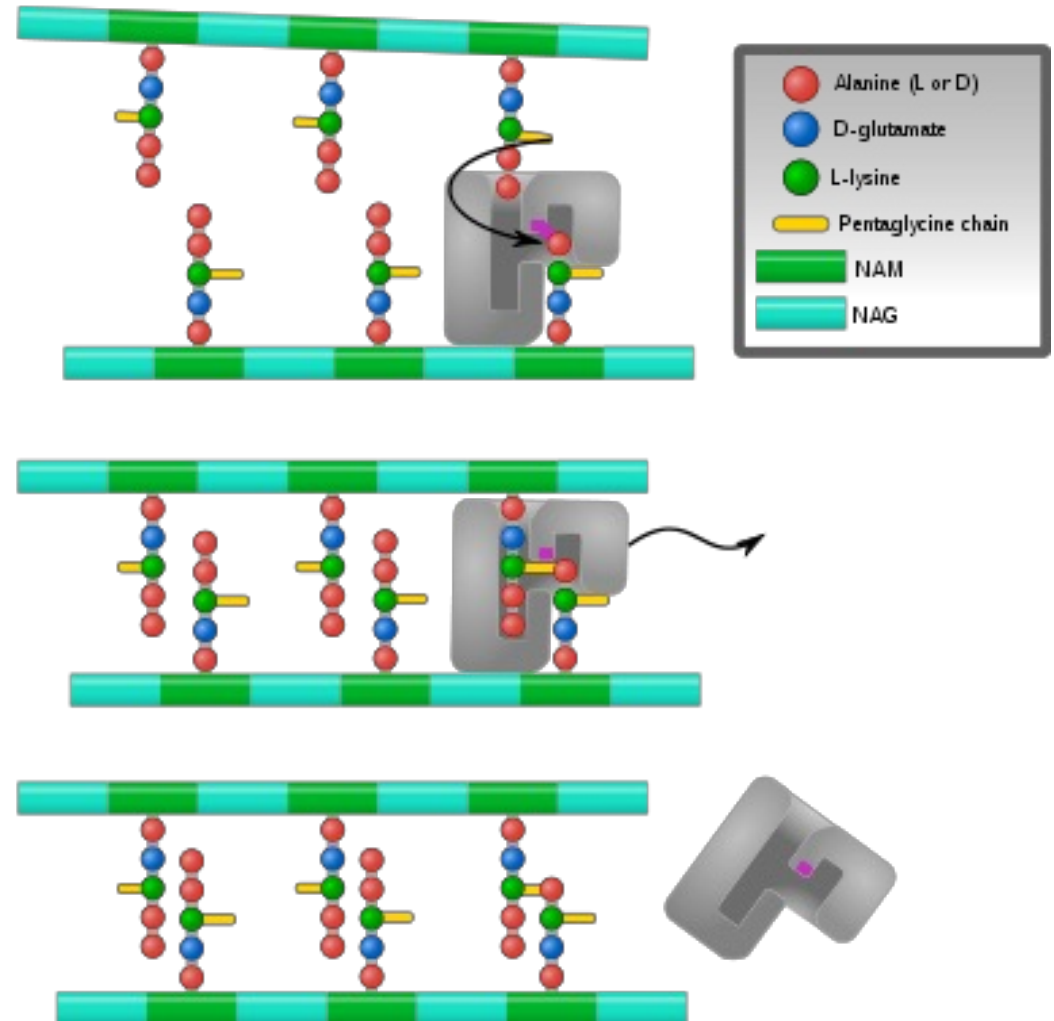
- Antibiotico glicopeptidico
- Efficace contro i G+
- *Staphylococcus aureus* meticillina-resistente
- Usato come **ultima risorsa**.
- Problema: insorgenza di ceppi resistenti anche alla vancomicina (VRE).
- Effetti collaterali: Ototossica, nefrotossica
- Somministrazione: Solitamente ev



Chimica combinatoriale dinamica

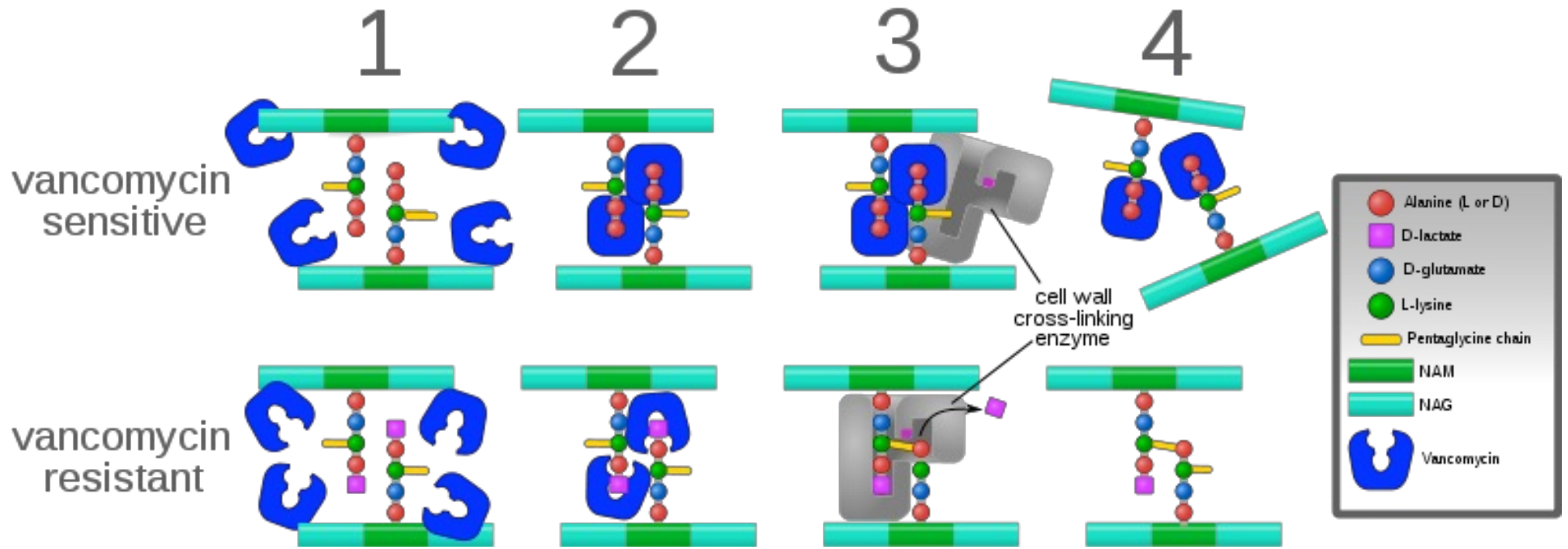
- Inibizione della sintesi della cell wall
- blocco della polimerizzazione dell'acido N-acetil muramico/N-acetil glucosamina
- legame con il dipeptide Lys-d-Ala-d-Ala
- Azione battericida

Vancomicina

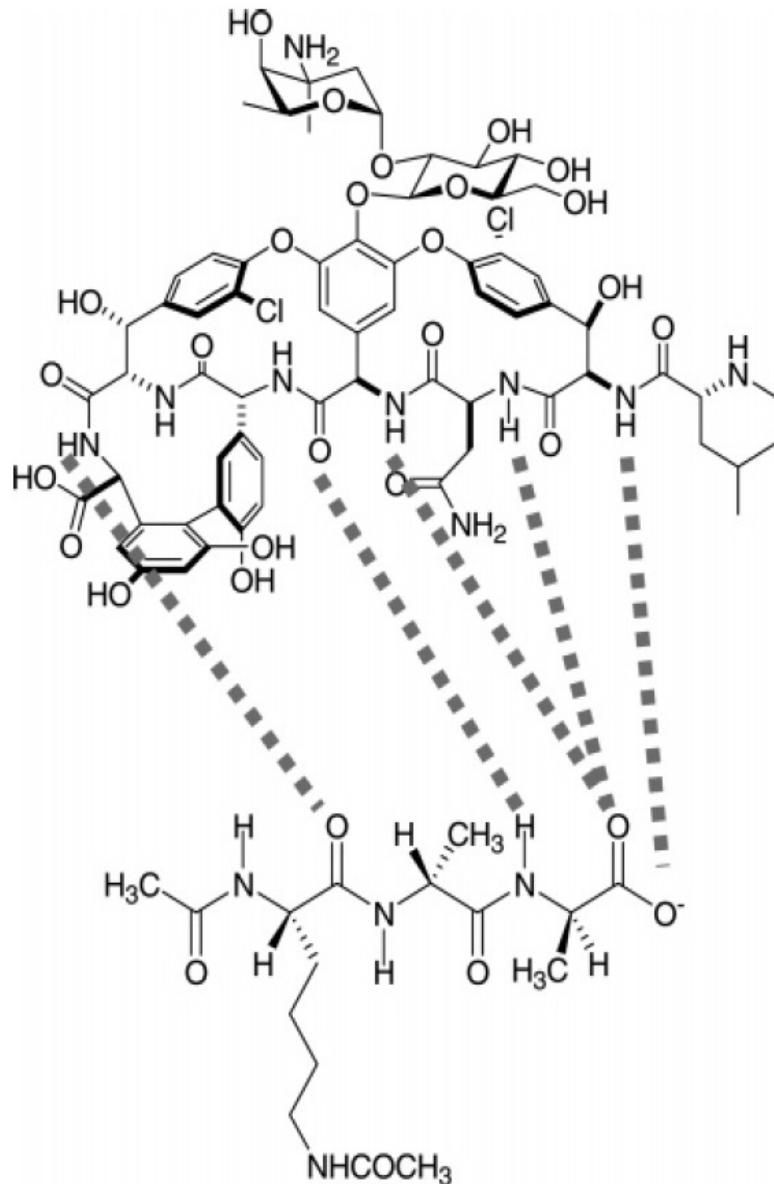


Chimica combinatoriale dinamica

Vancomicina

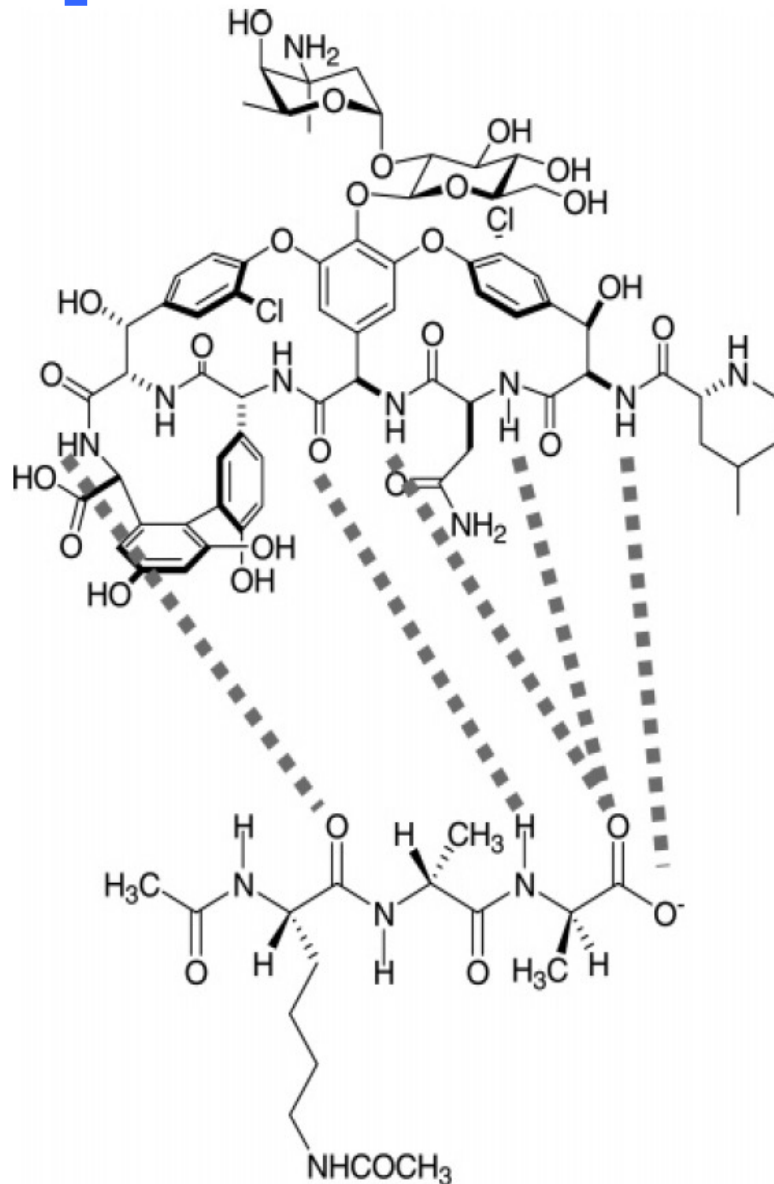


Glicopeptidi



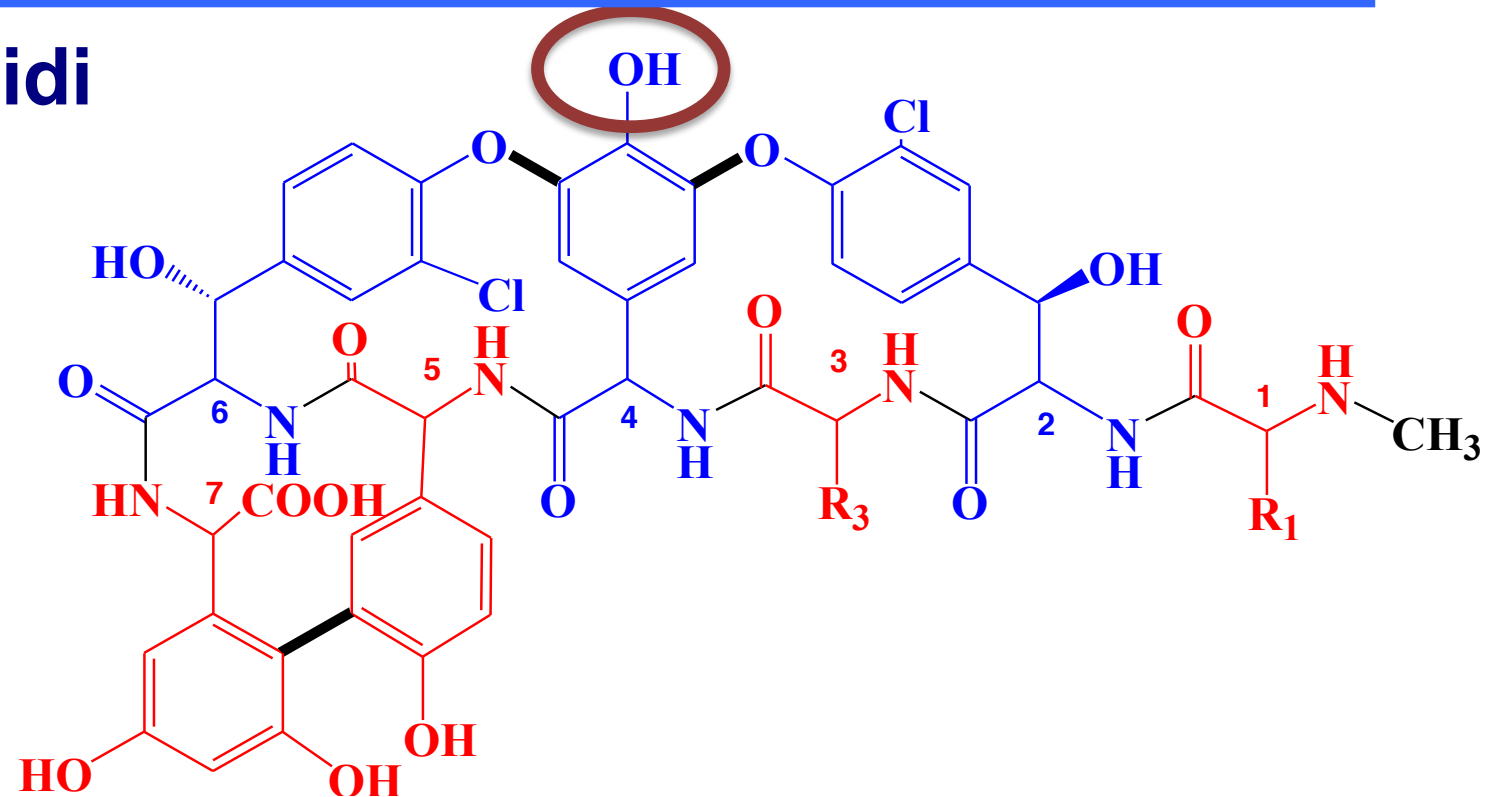
- Antibiotici glicopeptidici
- **DALBAEPTIDI:** D-Ala Binding Antibiotic EPTa-pepTIDE
- Actinomiceti
- Comune struttura *lineare* eptapeptidica
- Attività antibiotica: binding con la porzione D-Ala-D-Ala (dell’N-acetilglucosamina-N-acetilimuramil pentapeptide)

Glicopeptidi



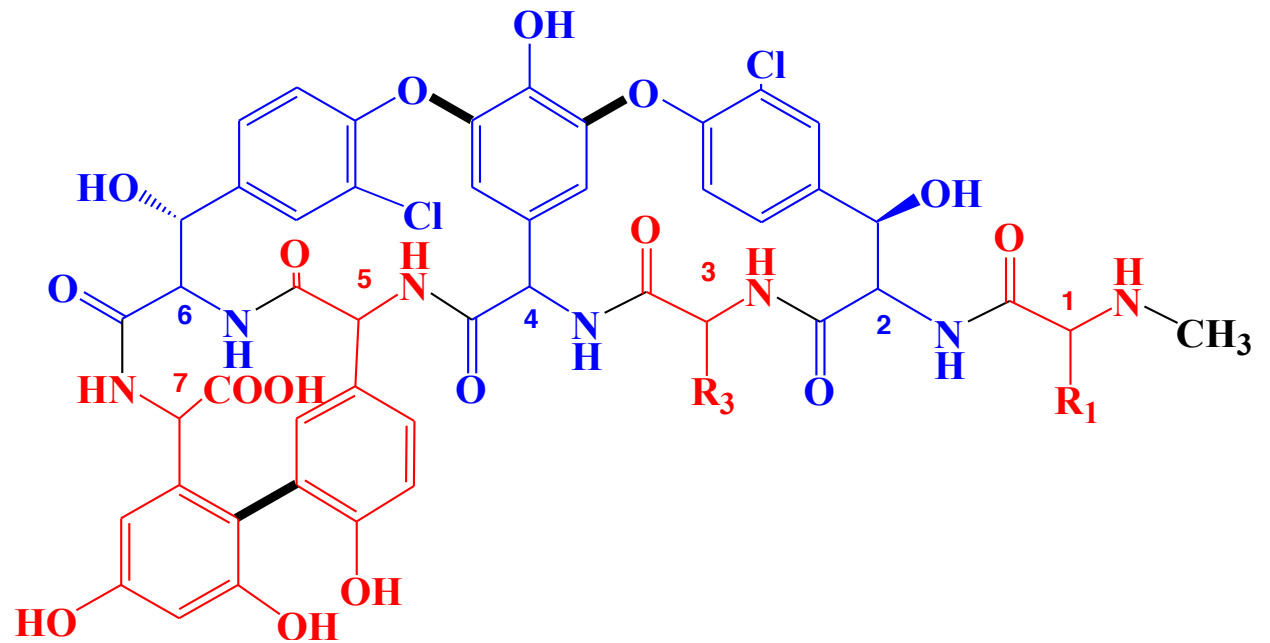
- 5 Leg H tra il glicopeptide e Acil-D-Ala-D-Ala
- Blocco incorporazione del precursore nella struttura del peptidoglicano
- Inibizione del processo di **transglicosilazione** e di **transpeptidazione**
- Inibizione della sintesi della parete batterica
- Parete cellulare più debole e suscettibile alla lisi

Glicopeptidi



- 5 aminoacidi invariati
- Pos 2: tirosina eventualmente idrossilata
- Pos 4 e 5: *p*-idrossifenilglicina
- Pos 6: idrossitirosina
- Pos 7: *m,m*-diidrossifenilglicina
- Catene laterali di almeno 5 dei 7 aminoacidi legate fra di loro
- Scheletro **glicosilato**
- Alcuni lipoglicopeptidi (teicoplanina)

Glicopeptidi



- Conformazione **rigida**
- Legami tramite un atomo di ossigeno tra le porzioni feniliche (aa 2-4 e aa 4-6)
- 2 cicli adiacenti
- Ciclizzazione con C-C tra fenili aa 5-7
- Aa 1 e 3: utilizzati per la classificazione dei dalbaeptidi (catene laterali alifatiche o aromatiche)

Glicopeptidi

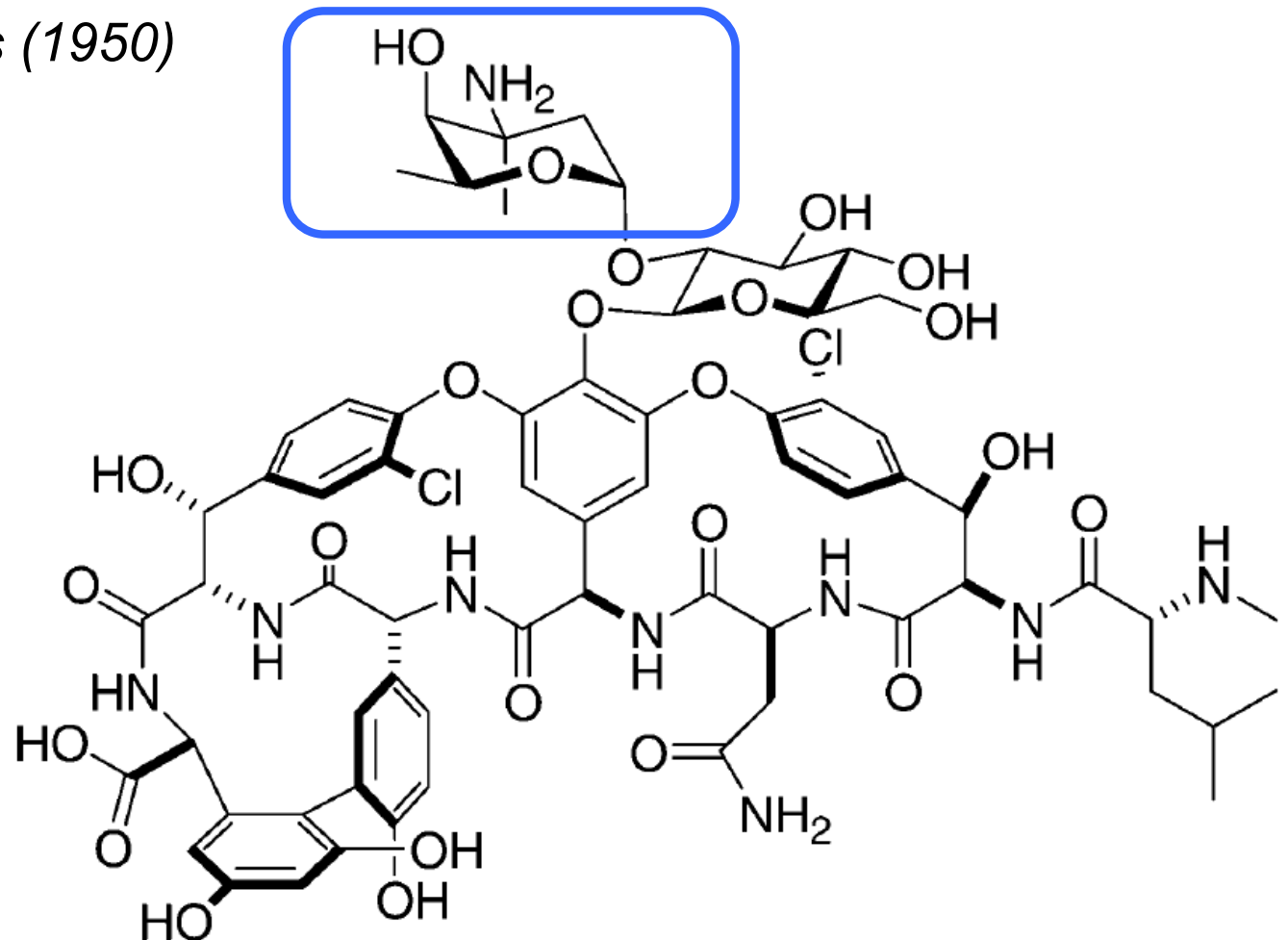
Vancomicina

Amycolatopsis orientalis (1950)

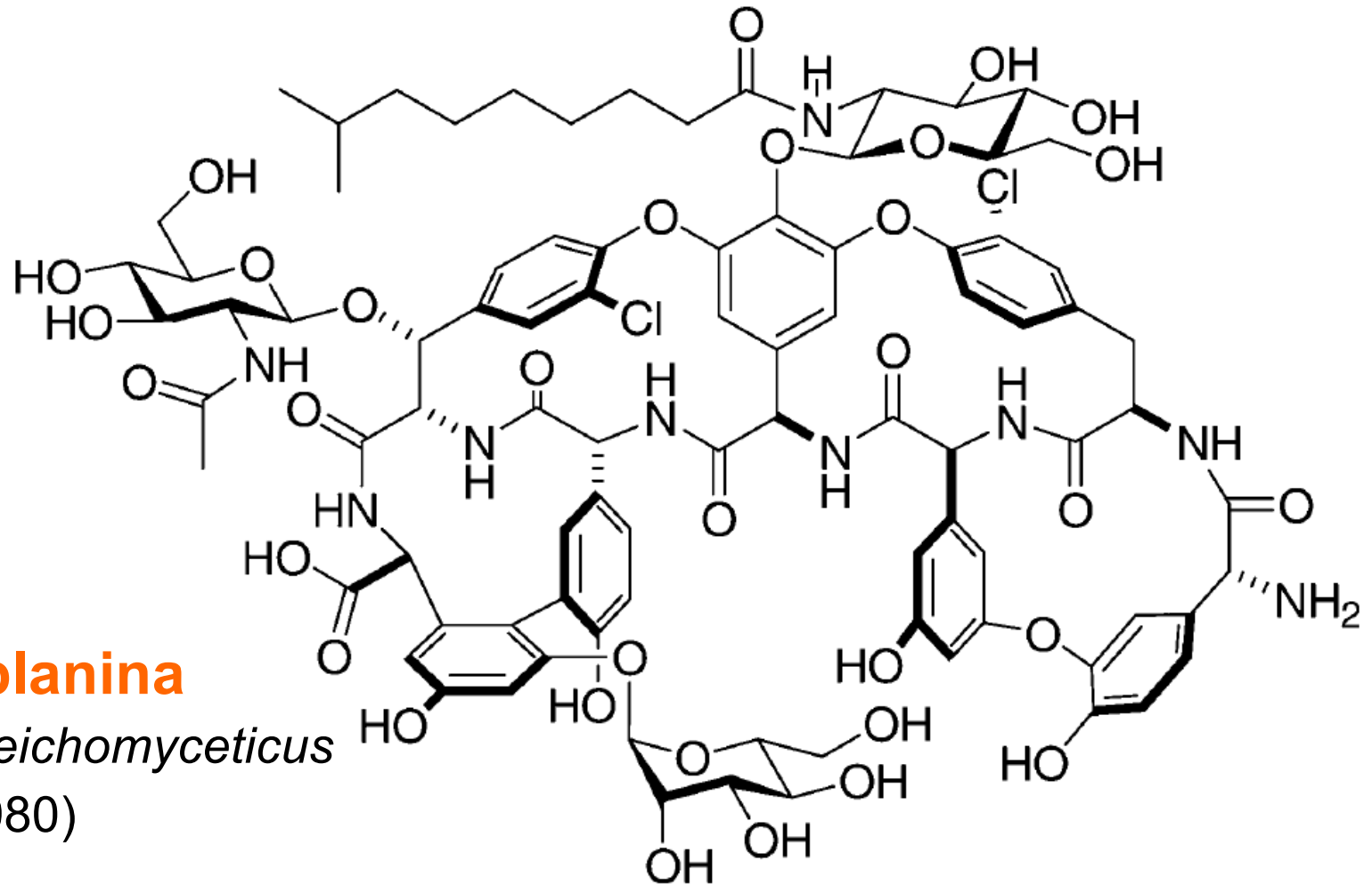
- Vancomicina e simili
- aa 1 e 3 alifatici

Generalmente:

- aa 1 leucina
- aa 3 asparagina



Glicopeptidi

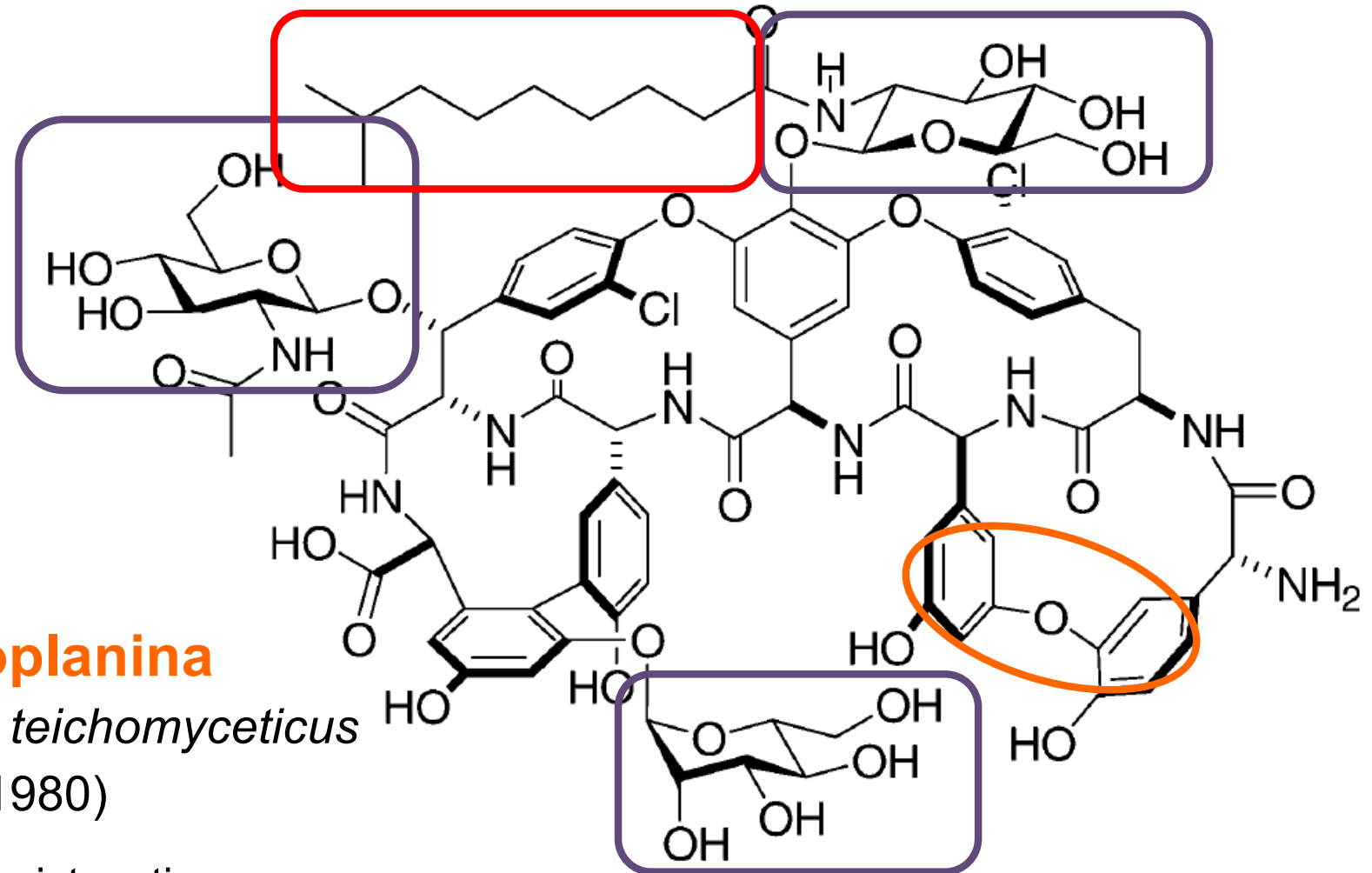


Teicoplanina

Actinoplanes teichomyceticus
(1980)

- gruppo della ristocetina
- **1 e 3 aromatici**
- ponte etereo tra aa 1 e 3

Glicopeptidi



Teicoplanina

Actinoplanes teichomyceticus
(1980)

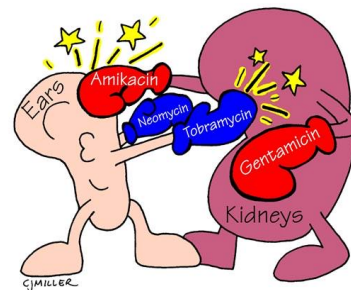
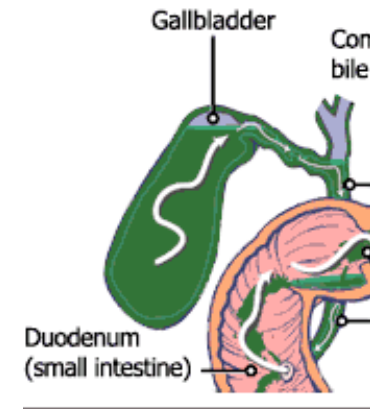
- gruppo della ristocetina
- **1 e 3 aromatici**
- ponte etereo tra aa 1 e 3

Glicopeptidi

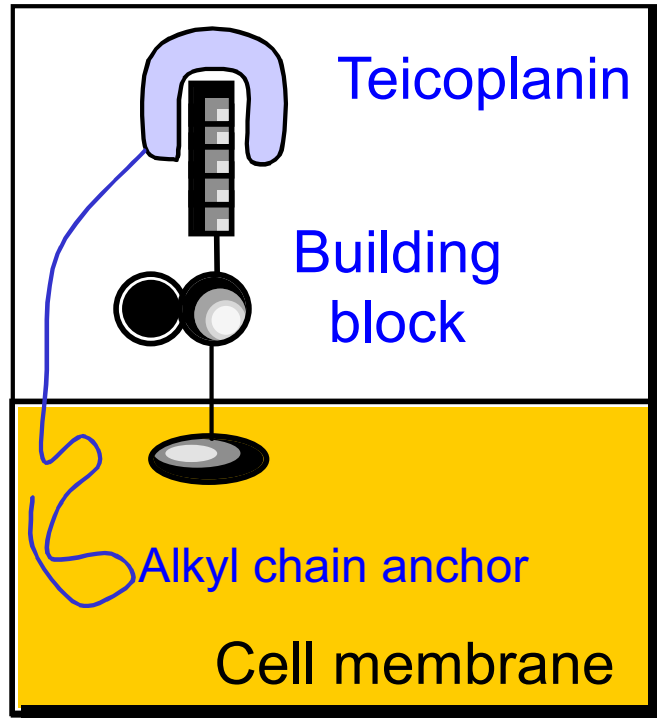
- **Antibiotici battericidi**
- Cocchi e bacilli G(+), anche *Staphylococcus aureus* e stafilococchi resistenti a penicilline e cefalosporine
- **Batteriostatici verso enterococchi**
- Ceppi di *E. faecium*: resistenti
- **Bacilli G(-): resistenti**
- Assorbimento orale: non apprezzabile, indicato per le coliti pseudomembranose da *Clostridium difficile*
- Somministrazione parenterale: diffusione nei fluidi corporei, inclusi quelli pleurici, sinoviali, ascitici e **cerebrospinali**

Glicopeptidi

- Livelli terapeutici anche a livello della **bile**
- Escreti per filtrazione glomerulare, non metabolizzati
- **Prima scelta** nelle **infezioni gravi** causate da G(+) resistenti a penicilline e cefalosporine (i.e. *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* resistenti alla meticillina), comprese le endocarditi
- **Reazioni di tipo anafilattico**
- Nefrotossicità
- Ototossicità

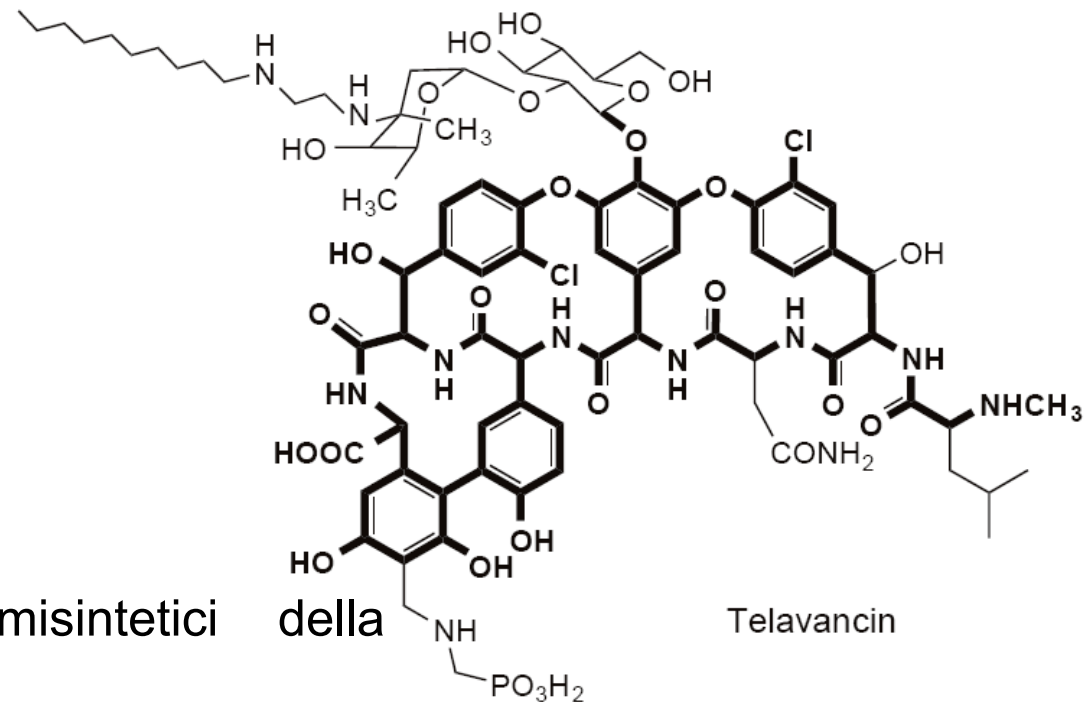


Glicopeptidi



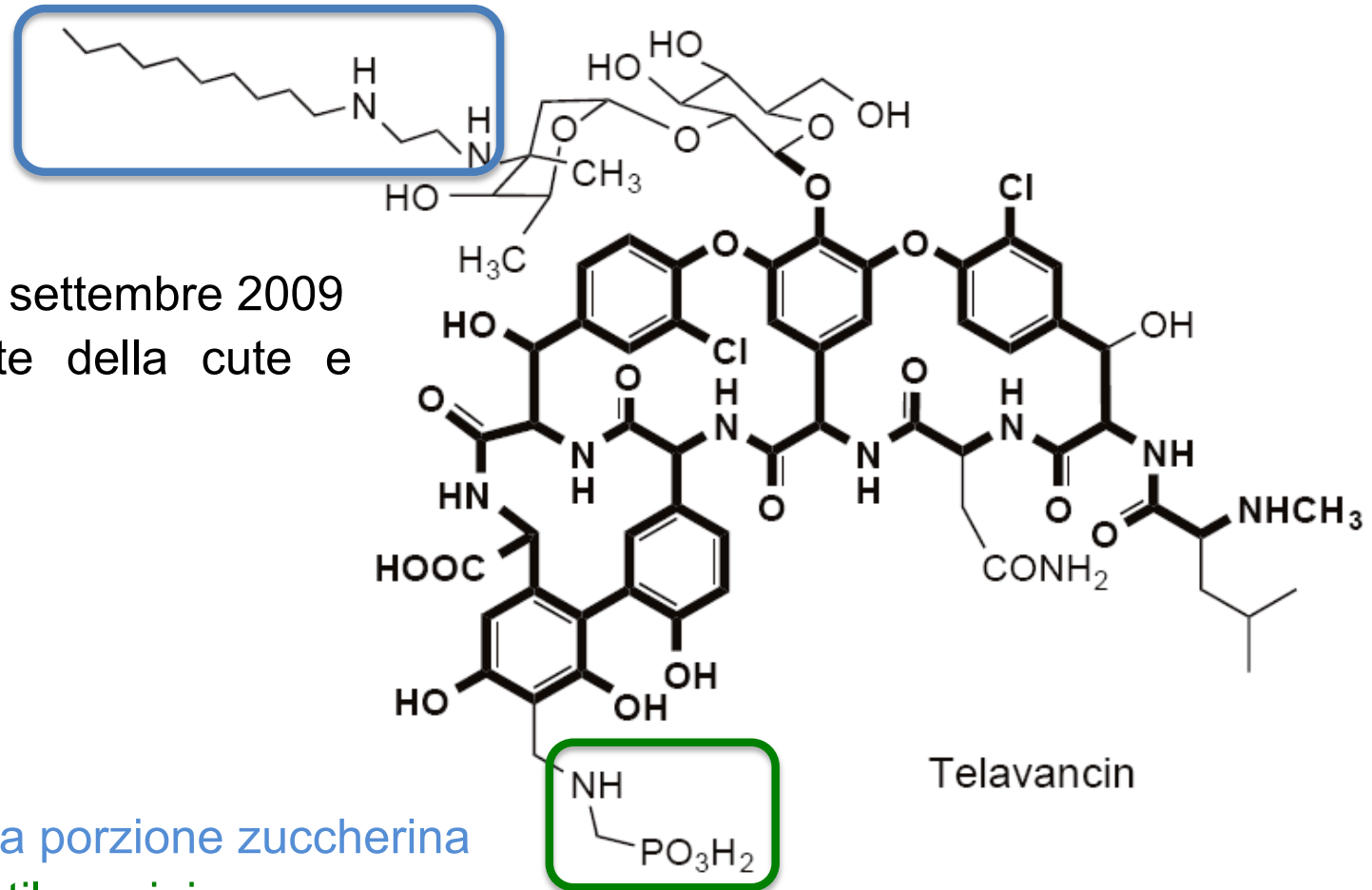
Teicoplanina

- No dimerizzazione
- Ancoraggio mediante catena lipidica



- Sviluppati diversi derivati semisintetici della vancomicina: **telavancina**

Glicopeptidi



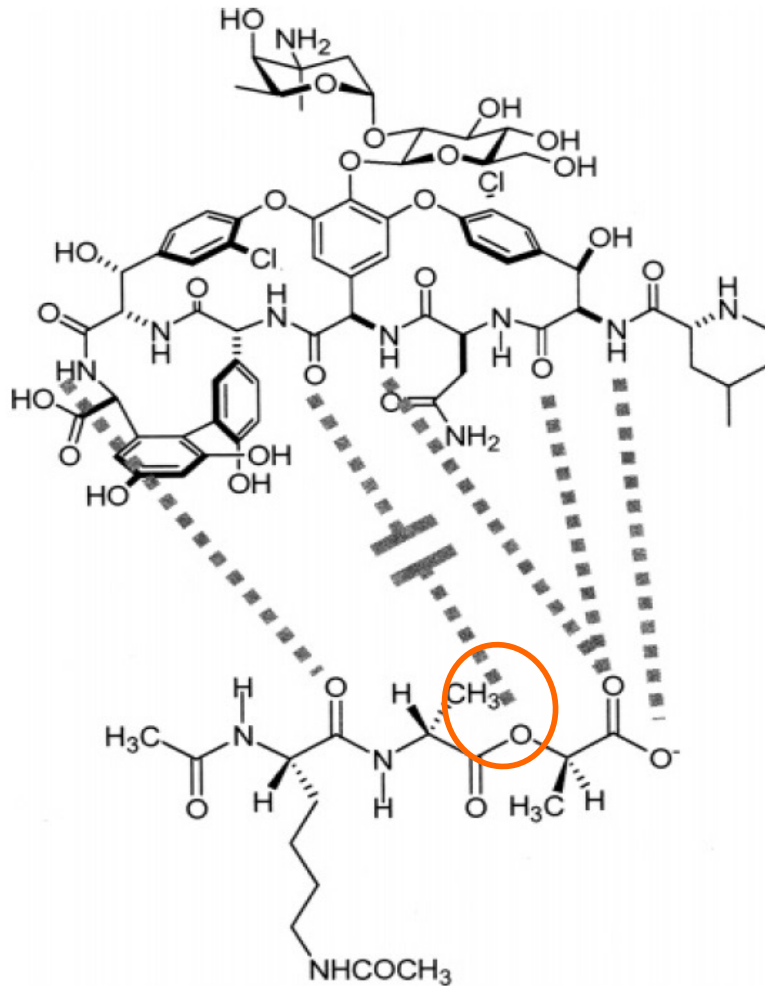
Telavancina

- Approvato FDA nel settembre 2009
- Infezioni complicate della cute e annessi cutanei

Telavancin

- Catena lipofila sulla porzione zuccherina
- Gruppo fosfonometilamminico
- Tempo di dimezzamento prolungato (7h)
- Favorito l'ancoraggio sulla membrana
- Azione sia sulla biosintesi della parete che diretta sulla membrana

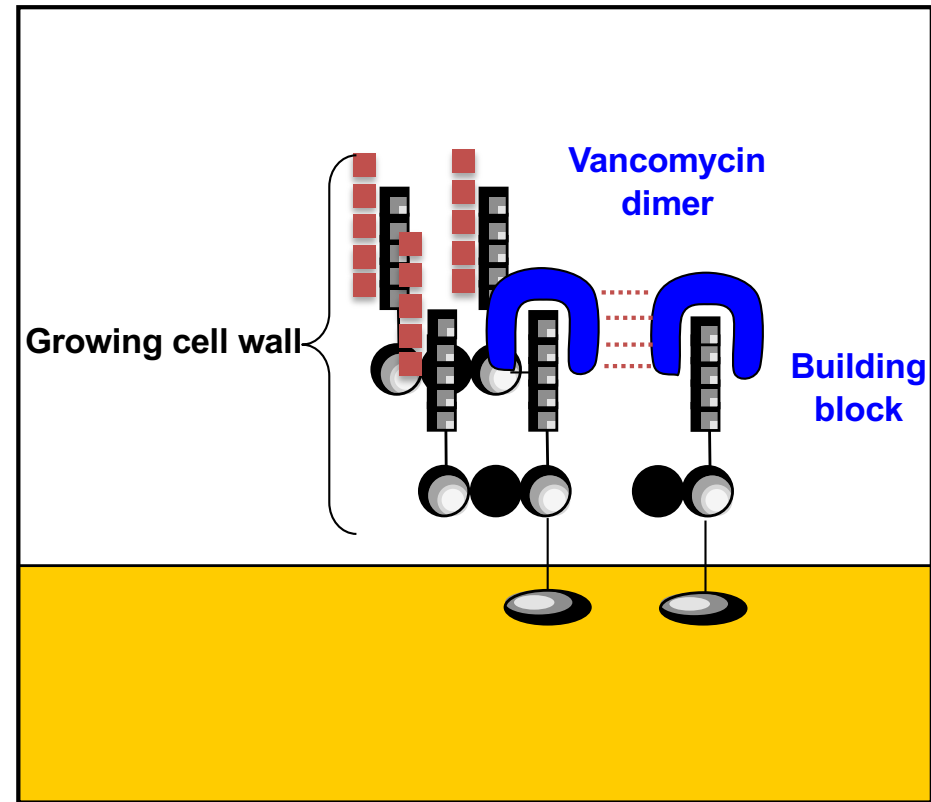
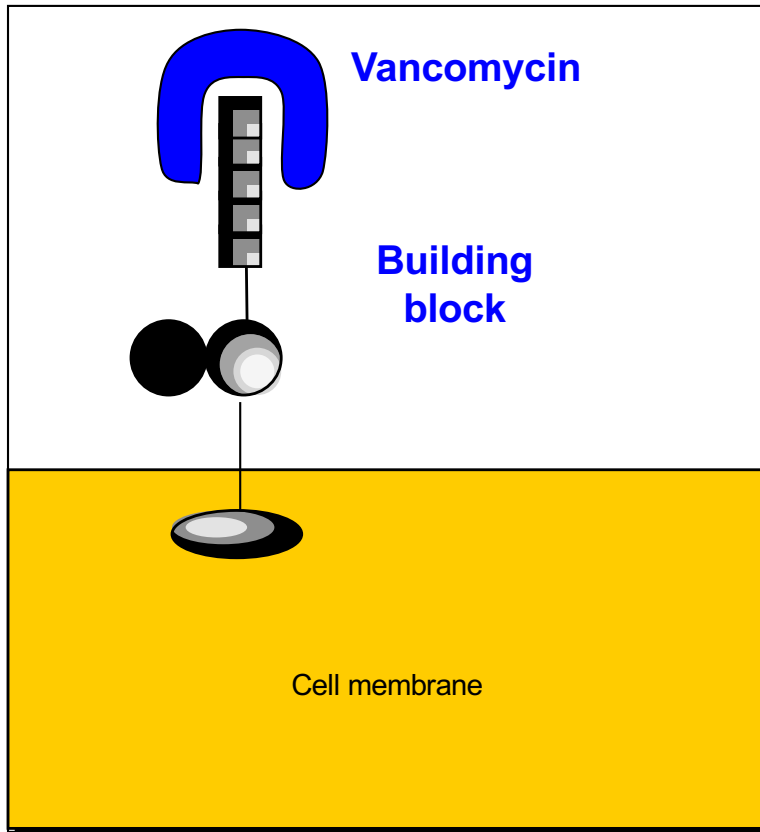
Glicopeptidi (resistenza)



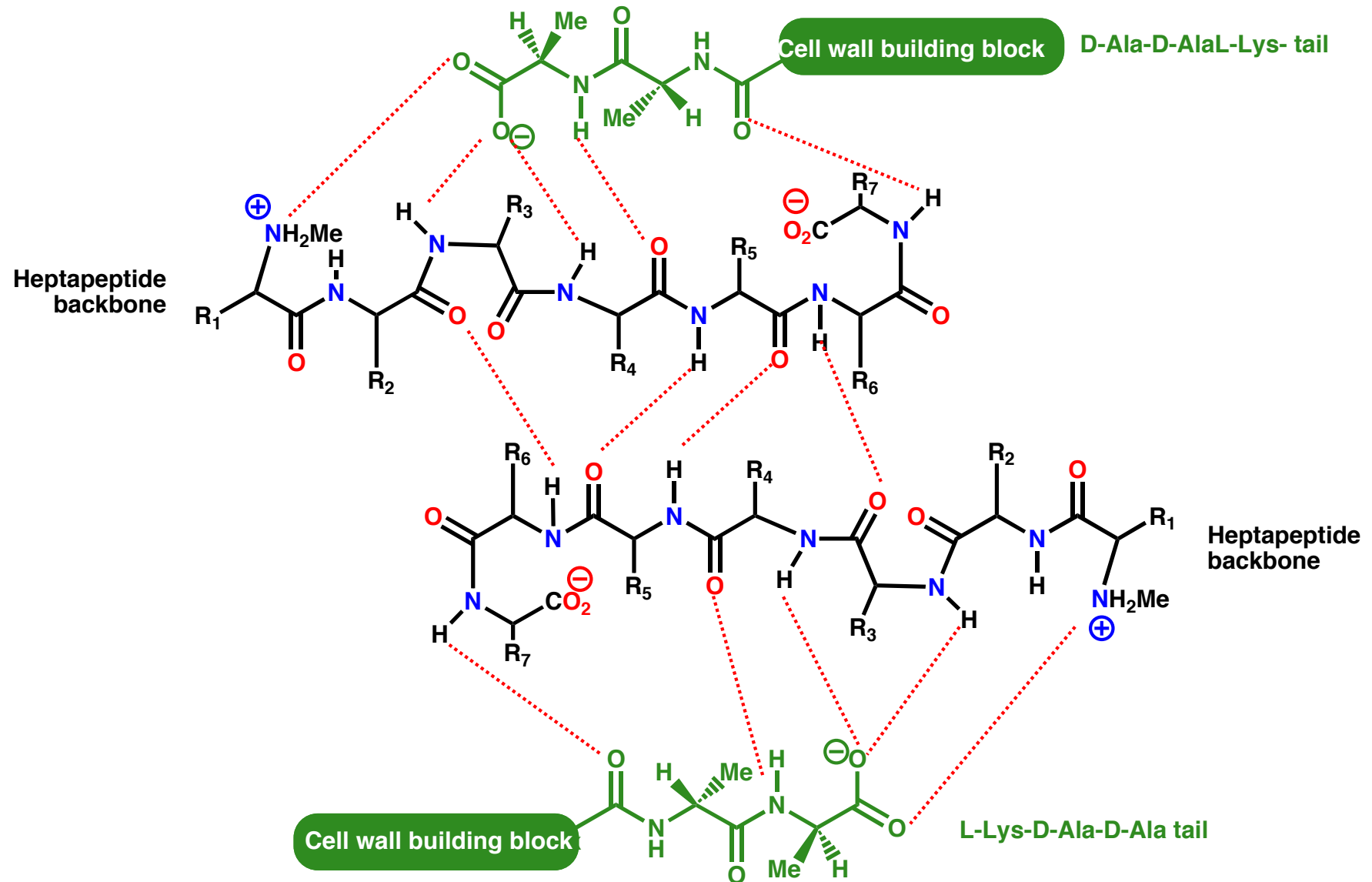
- Variazione strutturale del target
- D-alanil-D-lattato (**D-ala-D-lac**) anziché **D-ala-D-ala**
- Sostituzione di N (D-ala terminale) con O
- NO legame idrogeno
- Repulsione dei lone pair dell'ossigeno
- **Riduzione dell'affinità** di legame (<1000 volte)
- NO attività antibatterica

D-Ala-D-Ala (Sensibili) D-Ala-D-lactate (Resistenti)

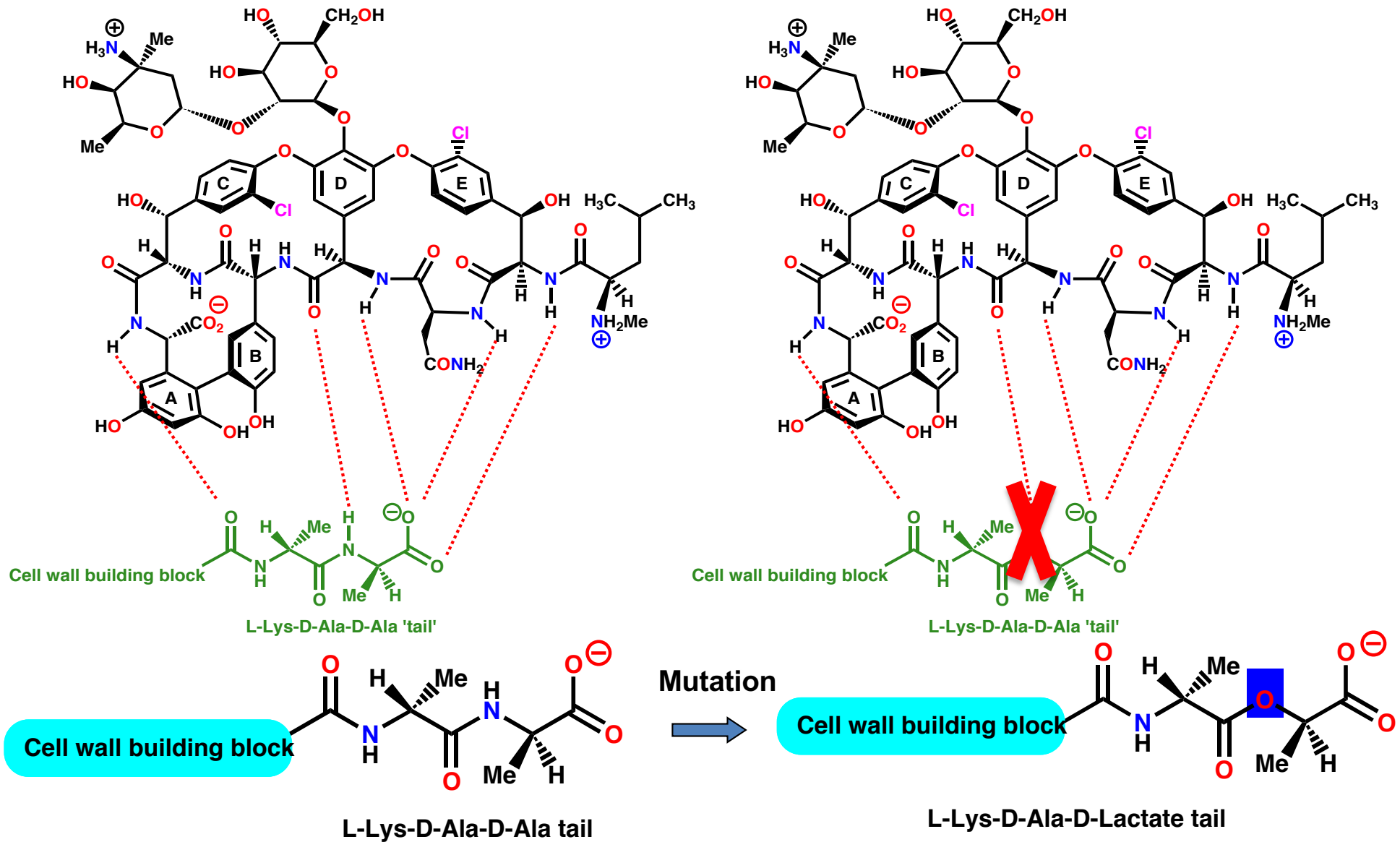
Glicopeptidi



Glicopeptidi

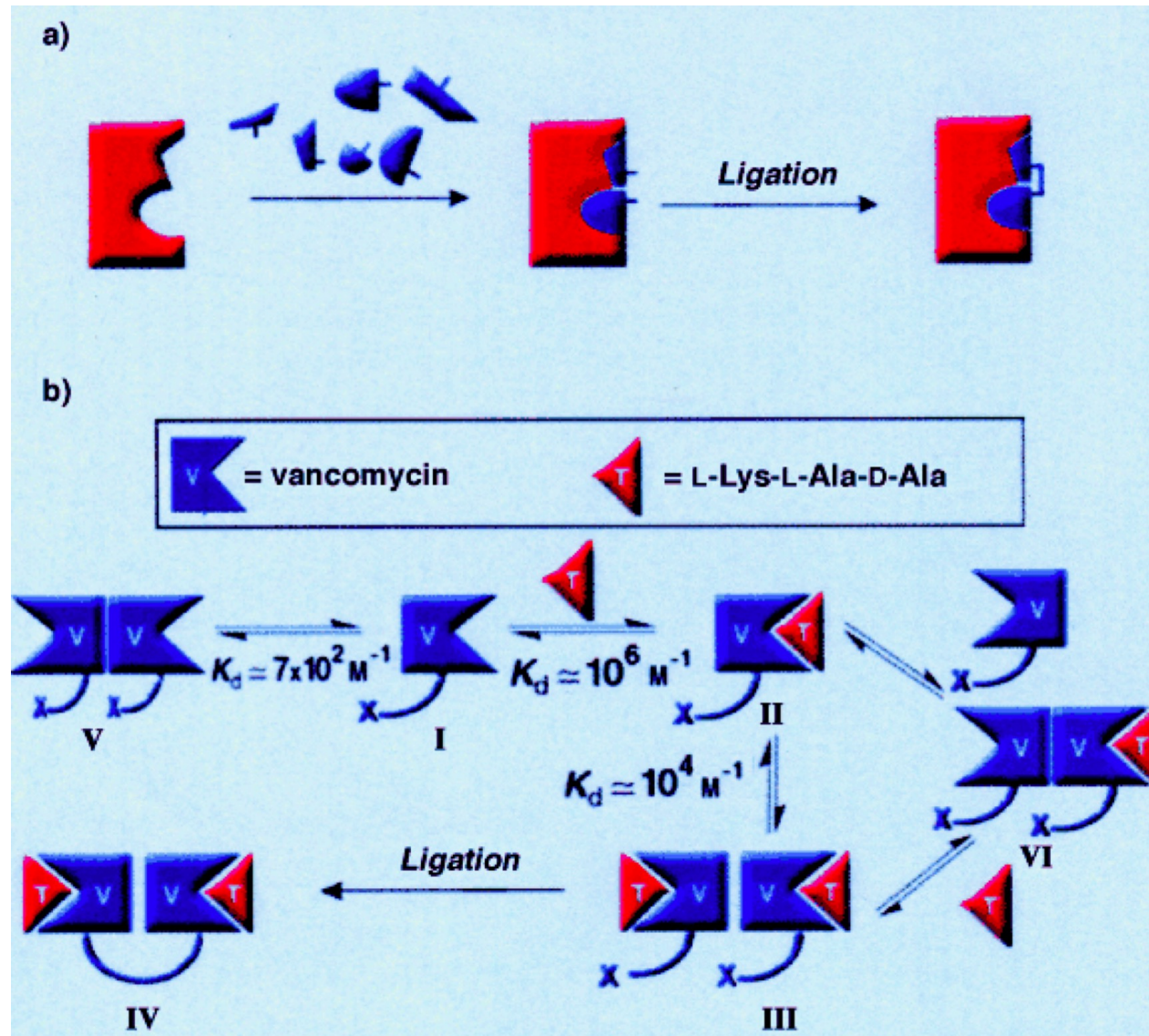


Glicopeptidi (resistenza)



Chimica combinatoriale dinamica

Vancomicina



A target (red) is incubated with a library of building blocks (blue).

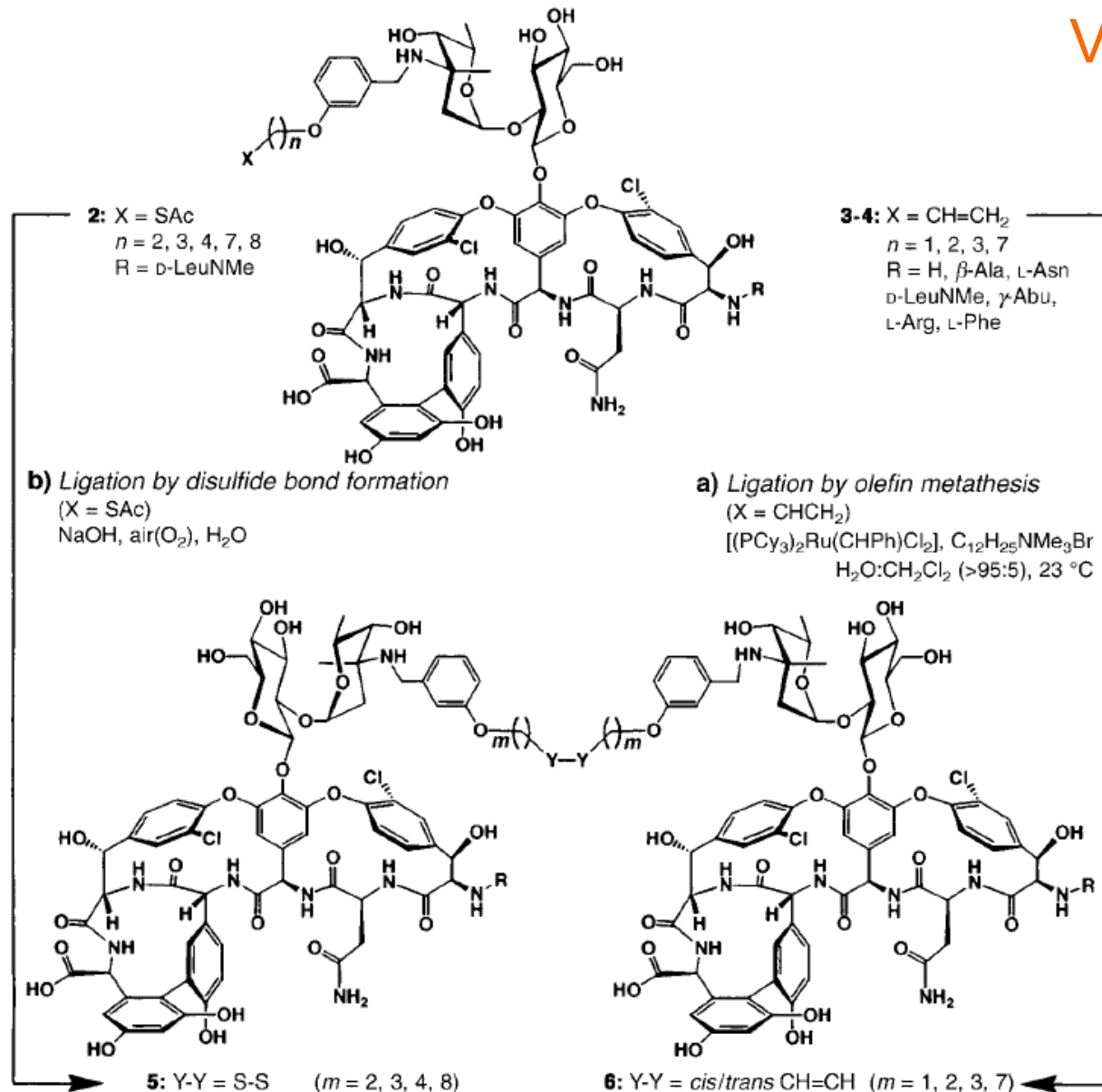
Dynamic target-accelerated synthesis of vancomycin dimers. A library of vancomycin analogues (V, blue) are incubated with their target, Ac2-l-Lys-d-Ala-d-Ala (T, red).

K. C. Nicolaou et al, *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 3824

© Oxford University Press, 2009.

Chimica combinatoriale dinamica

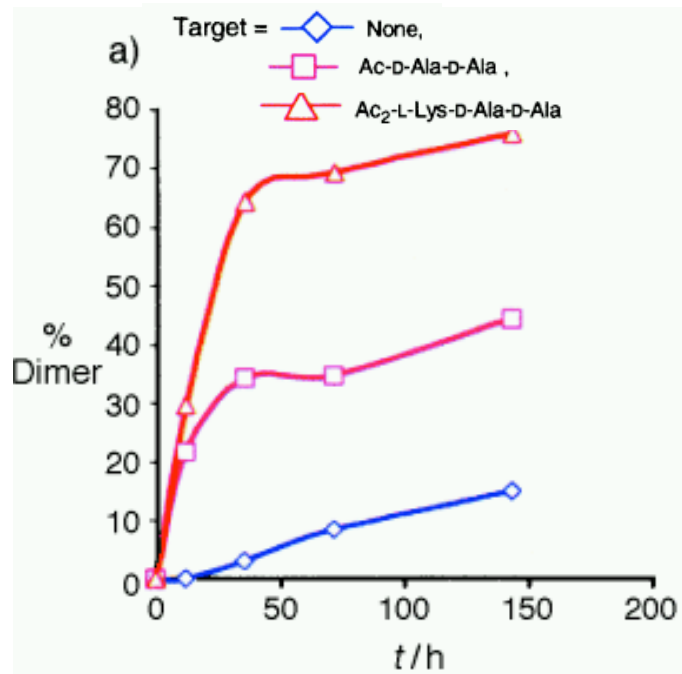
Vancomicina



Chimica combinatoriale dinamica

Vancomicina

Sintesi combinatoriale accelerata di dimeri di vancomicina legati covalentemente mediante reazioni di metatesi delle olefine in assenza e presenza del bersaglio



Correlazione tra lunghezza dello spaziatore e attività antibatterica vs i ceppi sensibili alla vancomicina e resistenti alla vancomicina.

