

Principi di
CombiChem

Indice

1. Concetti Fondamentali
2. Metodi
3. Caratterizzazione dei composti prodotti

1. Concetti Fondamentali

La chimica combinatoriale o **CombiChem** si basa sull'idea di produrre una grande libreria di composti **CONTEMPORANEAMENTE** per permettere uno «screening» ad alta produzione di dati (**high throughput screening** o **HTS**) che in poco tempo aiuti ad identificare dei composti bioattivi (per es. per trovare una nuova terapia).

Sintesi classica: $A + B \rightarrow A-B$ (1 reazione, 1 prodotto)

CombiChem: $A_n + B_m \rightarrow A_n-B_m$ (n reazioni, n prodotti)

La **libreria combinatoriale** è l'insieme dei composti prodotti con approccio combichem. Dipende dal numero di reagenti o **building blocks** utilizzati, e dal numero di passaggi (reazioni). Posso avere librerie focalizzate (stesso scaffold) o diversificate (DOS).

1. Concetti Fondamentali

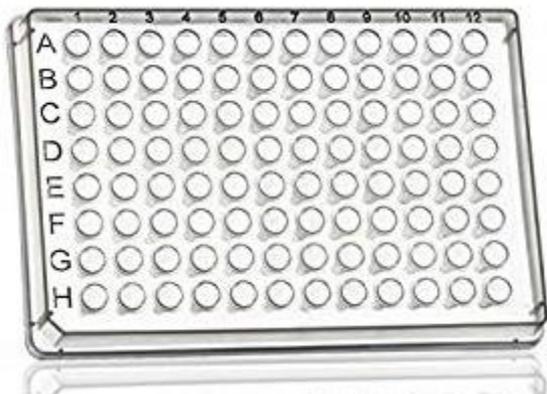
Tipicamente una libreria combinatoriale comprende da circa 100 a 10.000 composti. Più esattamente i numeri riflettono i «pozzetti» o ambienti di reazione di una piastra «multipozzetto» (multi-well plate), che tipicamente corrispondono a:

96 (8x12)

384 (16x24)

864 (24x36)

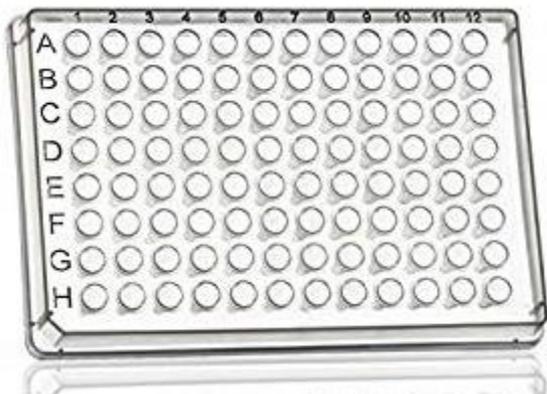
1536 (16x96)



1. Concetti Fondamentali

Questo tipo di piastre permettono l'uso di matrici ben definite (righe e colonne) per creare la libreria, per es. per fare una reazione di esterificazione, vado a testare 8 acidi x 12 alcoli = 96 esteri

96 (8x12)



Ad es. nella riga A metto Me-COOH

nella riga B metto Et-COOH

nella riga C metto Pr-COOH...

nella colonna 1 metto MeOH

nella colonna 2 metto EtOH

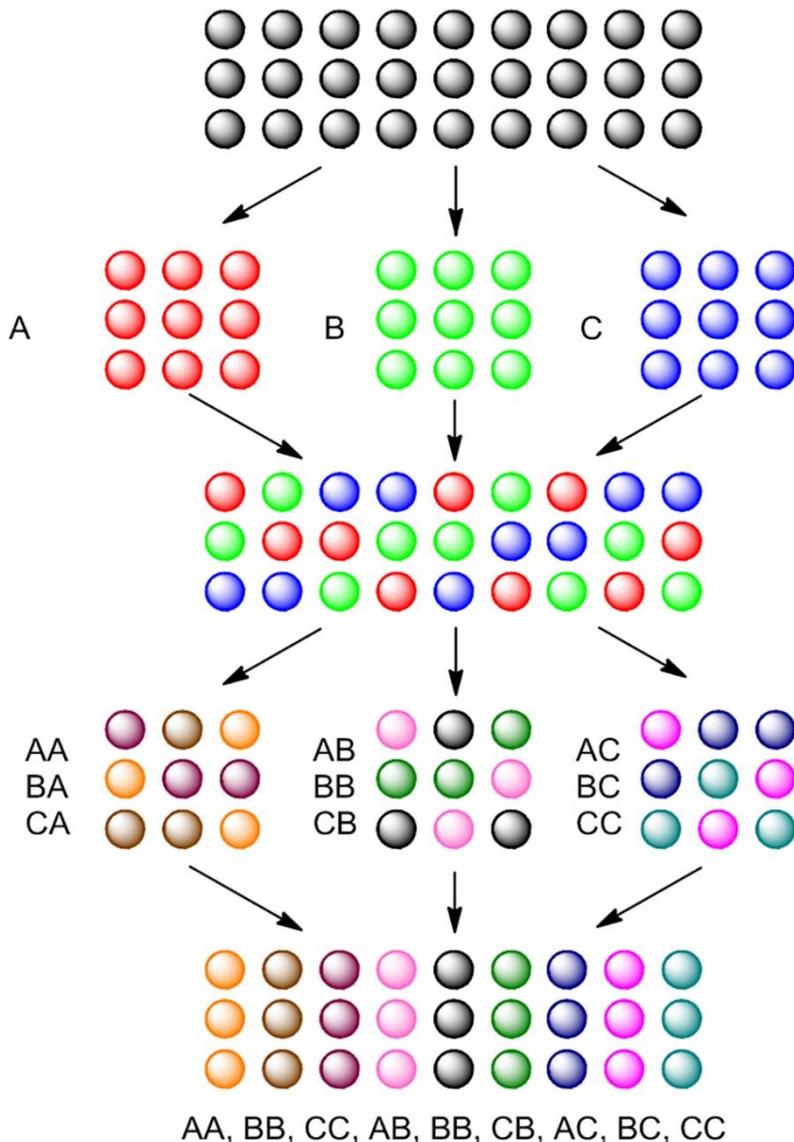
nella colonna 3 metto PrOH ecc.

Quindi A1 = Me-COO Me , A2 = Me-COO Et

B1 = Et-COO Me , B2 = Et-COO Et , ecc.

2. Metodi

Split (divido)-Pool (riunisco) synthesis



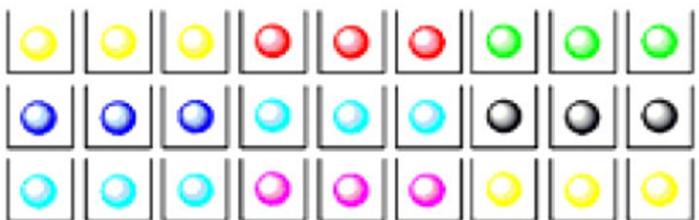
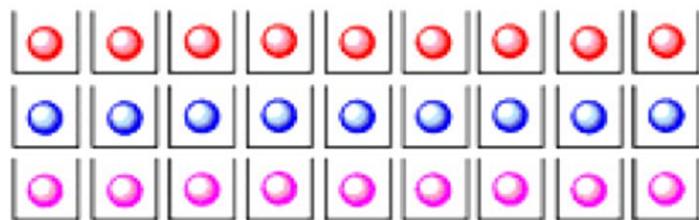
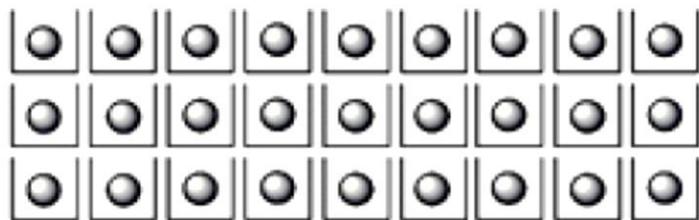
- sintesi in fase solida (costosa)
- ogni composto è ancorato ad un «bead» o microsfera di resina
- piccole quantità ma tanti composti ≠
- ideale per librerie grandi (10.000 composti)

Nella figura ogni sfera rappresenta una resina su cui cresce un composto diverso codificato per colore. AL primo passaggio divido la resina in 3, e in ogni pozzetto unisco alla resina un building block (A, B, o C), poi riunisco il tutto, quindi lo divido nuovamente in 3 porzioni, e in ogni pozzetto aggiungo un secondo building block (A, B, o C), poi riunisco, poi divido e vado avanti così... alla fine dovrò separare i composti dalla resina (idrolisi) e analizzare i prodotti LC-MS).

2. Metodi

Parallel synthesis (sintesi parallela)

- sintesi in fase solida o liquida
- ideale per piccole librerie e quantità un po' più grandi



Nella figura ogni sfera rappresenta un composto diverso codificato per colore. Al 1° passaggio preparo un certo numero di ambireti di reazione (per es. 27 provette) che possono avere lo stesso composto di partenza (sfere in grigio).

Al 2° step posso fare una reazione (ad es. un coupling) ma con 3 diversi reagenti (per es. 3 tipi di ammine, in rosso, blu e rosa) per cui su 1/3 delle provette (per es. 9) metto 1 ammina, su un 1/3 un'altra ecc.

Al 3° step faccio un'altra reazione con 3 diversi tipi di reagenti, per ogni composto (per es. 9 provette in rosso), su 1/3 aggiungo un reagente (3 provette in giallo), su un altro terzo un altro reagente (3 provette in verde, ecc.)

2. Caratterizzazione

I. ANALITICA

Occorre idealmente una tecnica per analizzare **velocemente piccole quantità** in modo automatico; per librerie molto grandi di solito si tratta di **GC** o **LC-MS** che sono facilmente automatizzabili. NMR poco pratico, si usa su librerie più piccole, di solito in steps successivi. Ad es., nella ricerca di un nuovo farmaco si può partire con una libreria diversificata split-and-pool di molti composti, poi si testano con saggi biologici, si identifica 1 «hit», cioè un composto che ha l'attività desiderata (ad es. inibizione enzimatica). Quindi ci si focalizza su questa «hit» e si crea una libreria più piccola e in scala più grande, per es. con piccole variazioni strutturali del composto «hit», e la si può fare in sintesi parallela e analisi NMR. Su questa libreria si può tentare una relazione struttura-attività (SAR) e trovare il composto migliore («lead»), che poi andrà ulteriormente ottimizzato per efficacia, formulazione, tossicità, ecc.

2. Caratterizzazione

II. BIOLOGICA

Occorre idealmente una tecnica per analizzare **velocemente piccole quantità** in modo automatico; spesso si usano dei «kit», per es. se si vuole trovare un inibitore enzimatico, il «kit» può comprendere l'enzima «target» dell'azione dell'inibitore, i suoi cofattori necessari per l'azione (sali, ATP, ecc.), e un substrato che si usa per la «detection» o lettura dell'attività biologica, ad es.:

- Substrato fluorescente (se convertito in prodotto perde fluorescenza);
- Prodotto fluorescente (se si forma aumenta la fluorescenza);

Oppure al posto della **fluorescenza** si può usare la **luminescenza** (più sensibile), o l'**assorbanza UV-Vis** (meno sensibile). Inoltre i saggi possono essere diretti o indiretti, continui nel tempo o discreti (lettura all'end point).

In alternativa al posto dell'enzima si possono usare anche intere cellule e valutare la loro vitalità con saggi di fluorescenza, luminescenza, ecc.