

INTRODUÇÃO A QUÍMICA MEDICINAL

QUÍMICA COMBINATÓRIA E SÍNTESE PARALELA



Prof. Gustavo Pozza Silveira
gustavo.silveira@iq.ufrgs.br

Sala 209 – Bloco K



SÍNTESE COMBINATÓRIA

- Síntese automatizada de uma grande quantidade de compostos em um curto período utilizando uma reação definida e uma grande quantidade de reagentes.
- Geralmente realizada em pequena escala utilizando síntese em fase sólida bem como sistemas automatizados de síntese.
- Misturas de compostos são formados em cada frasco reacional.
- Adequado para identificação de *hits* e líderes.

SÍNTESE PARALELA

- Síntese automatizada de um grande número de compostos em curto período utilizando-se uma reação definida e um grande número de reagentes.
- Um único produto é formado em cada frasco reacional.
- Adequado para REA (SAR) e otimização de fármacos.

TÉCNICAS DE SÍNTESE EM FASE SÓLIDA

- Reagentes são ligados a superfície de um polímero e modificados enquanto permanecem ligados.
- O produto desejado é clivado da resina polimérica no final da rota sintética.

Vantagens

- Reagentes específicos podem ser ligados aos *beads*.
- *Beads* e reagentes podem ser misturados e reagidos no mesmo frasco reacional.
- Produtos formados podem ser distintos para cada *bead* além de fisicamente distinguíveis
- Excesso de reagentes podem ser usados para deslocar reações para os respectivos produtos.
- Excesso reagentes e subprodutos são facilmente removíveis.
- Intermediários reacionais são ligados aos *beads* e não precisam ser purificados e isolados.
- *Beads* podem ser separados para isolar produtos específicos.
- Suporte polimérico pode ser regenerado e re-utilizado após clivagem do produto.
- Automatização é possível.

TÉCNICAS DE SÍNTESE EM FASE SÓLIDA

Requerimentos

- Um resina (*bead*) ou uma superfície funcionalizada para agir como suporte sólido.
- Um linker ou âncora.
- Uma ligação química capaz de unir o *linker* e o composto. Esta ligação precisa ser estável frente as condições reacionais utilizadas na síntese.
- Um método sintético para clivar o produto do *linker* no final da rota sintética.
- Grupos protetores compatíveis aos grupos funcionais que não estão envolvidos na síntese.

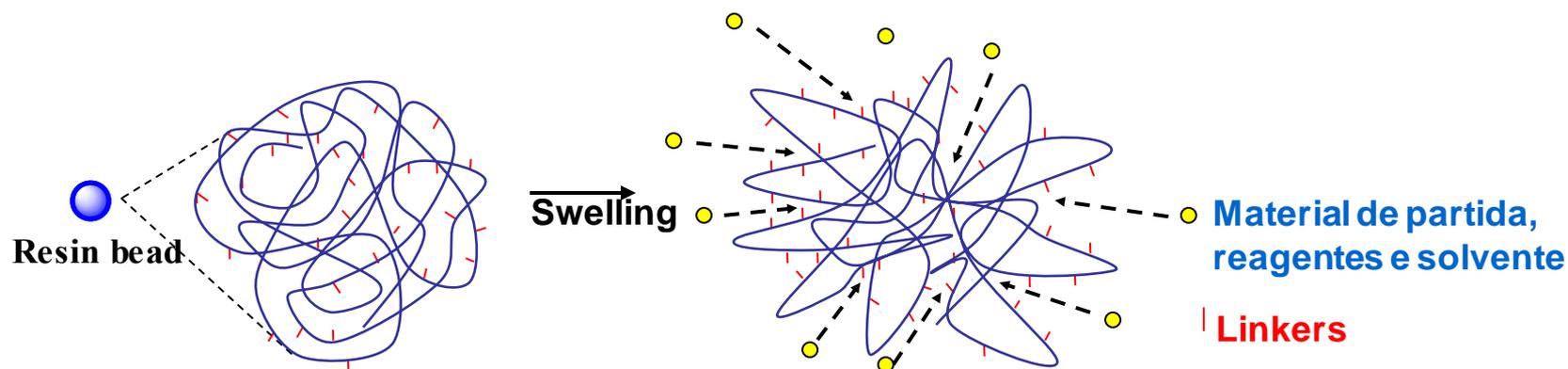
TÉCNICAS DE SÍNTESE EM FASE SÓLIDA

Exemplos de Suportes Sólidos

- *Beads* de polistireno parcialmente trançados
Natureza hidrofóbica
Causam problemas em síntese de peptídeos devido ao enovelamento
- Resina de poliamida de Sheppard – maior polaridade
- Resina tentagel – ambiente químico semelhante a THF e éter
- *Beads*, *pins* e superfícies vitrias funcionalizadas

TÉCNICAS DE SÍNTESE EM FASE SÓLIDA

- *Beads* precisam ser capazes de expansão (swell – como sílica) no solvente a ser utilizado.
- *Beads* necessitam permanecerem estáveis.
- A maioria das reações ocorre no interior do *bead*.



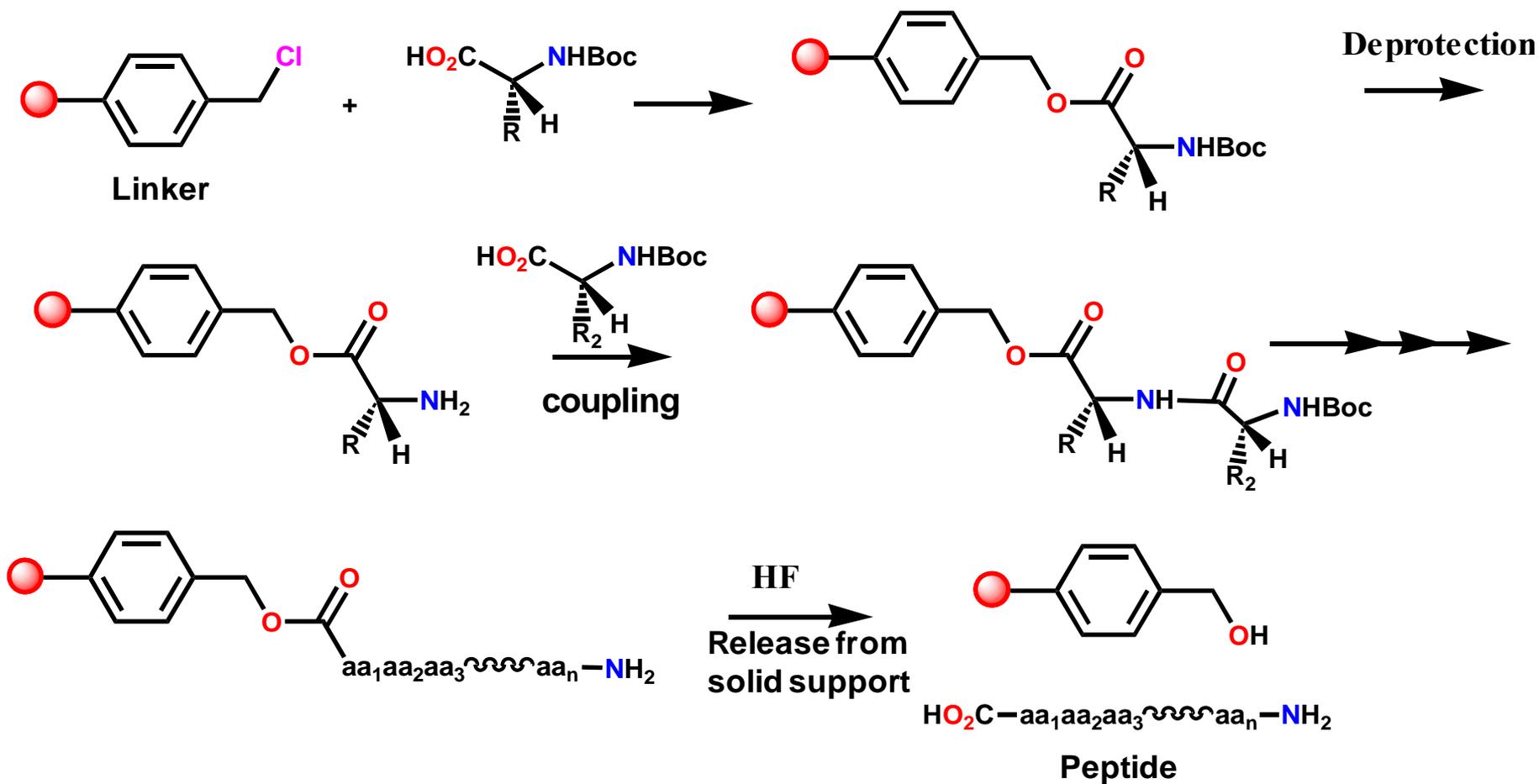
TÉCNICAS DE SÍNTESE EM FASE SÓLIDA

Âncora ou linker

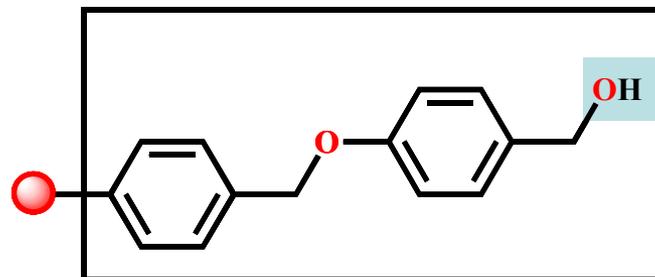
- Um grupo de uma molécula que é covalentemente ligada ao suporte sólido e que contenha o grupo funcional reativo.
- Permite a ligação ao primeiro reagente.
- O *linker* precisa ser estável às condições reacionais de síntese, mas facilmente clivado para liberar o composto desejado no final da rota sintética.
- Vários *linkers* são disponíveis dependendo do grupo funcional a ser ligado e do grupo funcional presente no produto.
- Resinas apresentam nomes definidos pelo *linker*.
- Exemplos: Merrifield, Wang, Rink, Barlos

Resina de Merrifield para Síntese de Peptídeos (grupo clorometil)

 = resin bead



Resina de Wang



Linking functional group

Linker

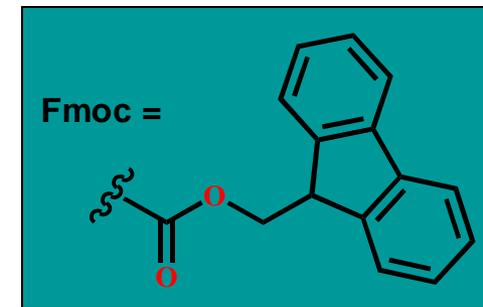
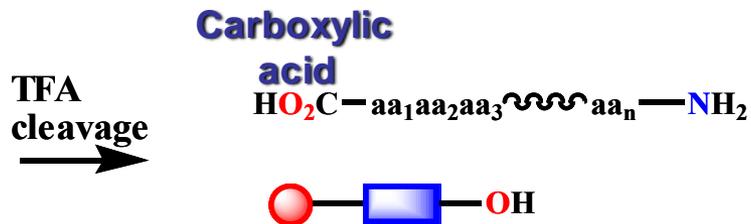
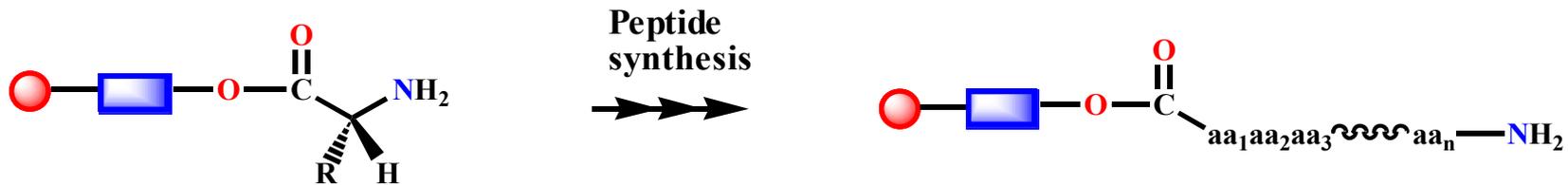
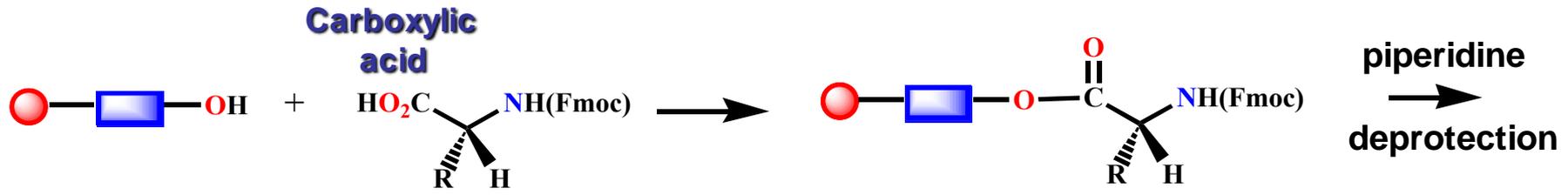
Wang Resin

||

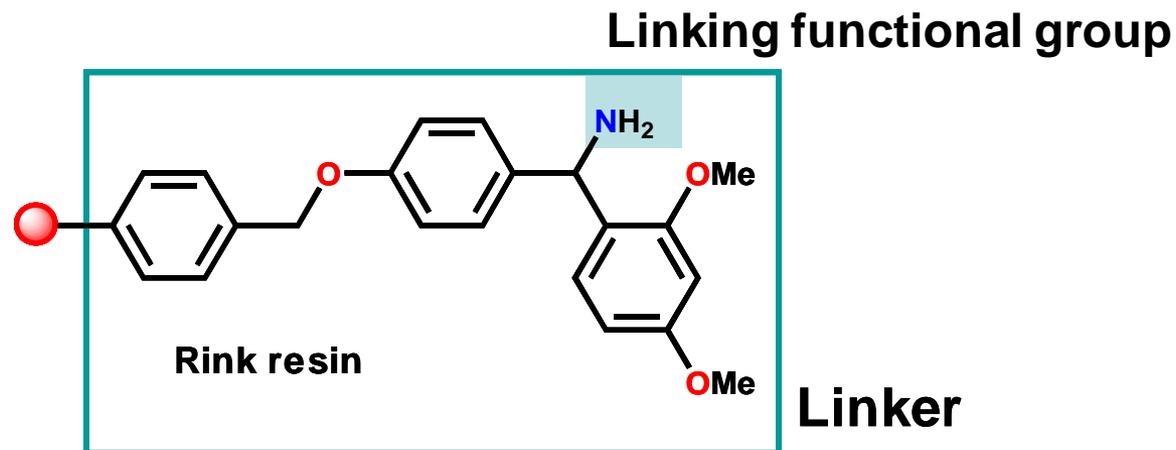


Bead Linker

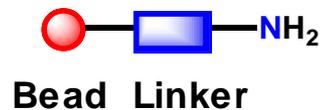
Resina de Wang



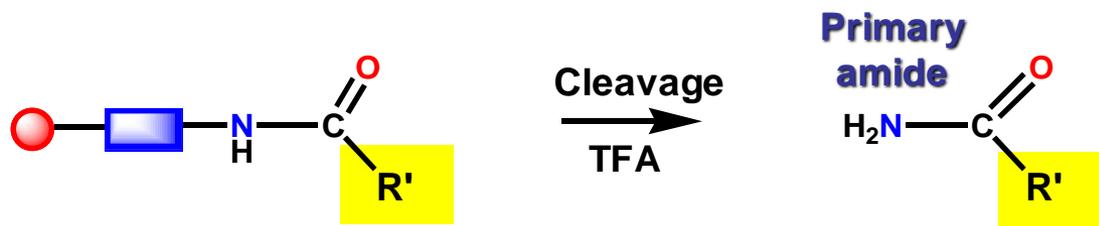
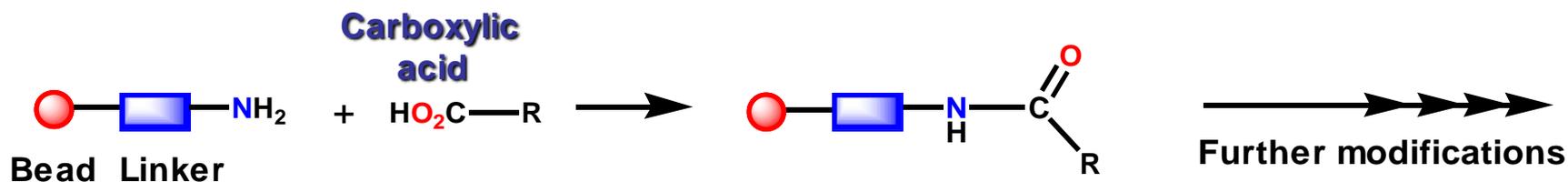
Resina de Rink



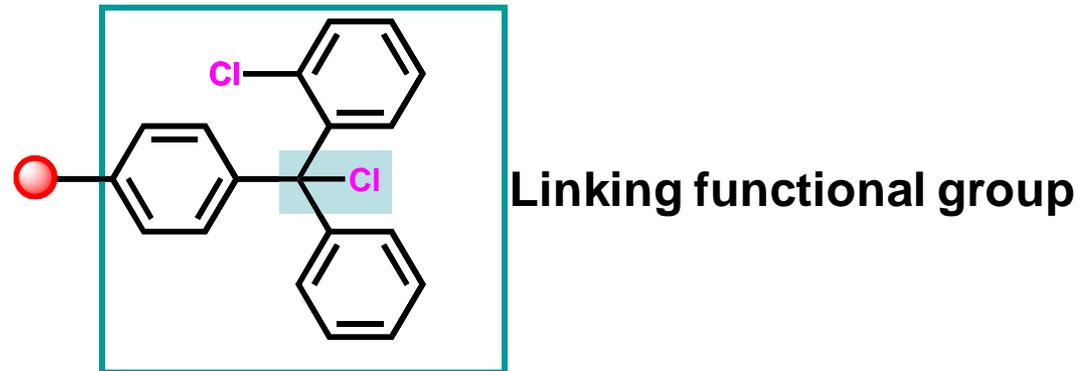
||



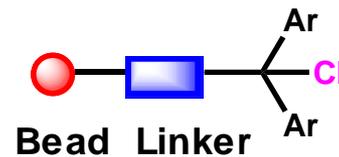
Resina de Rink



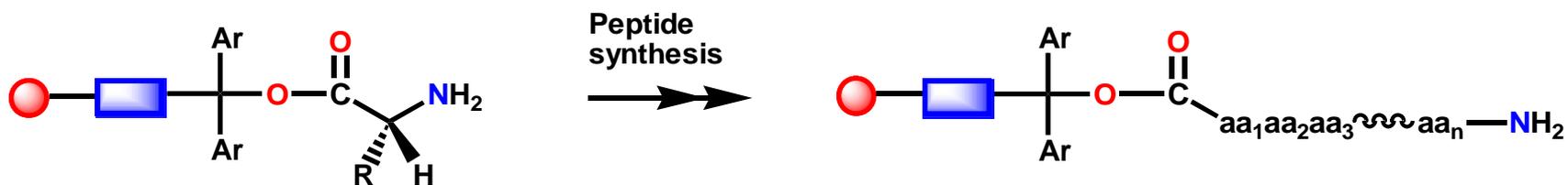
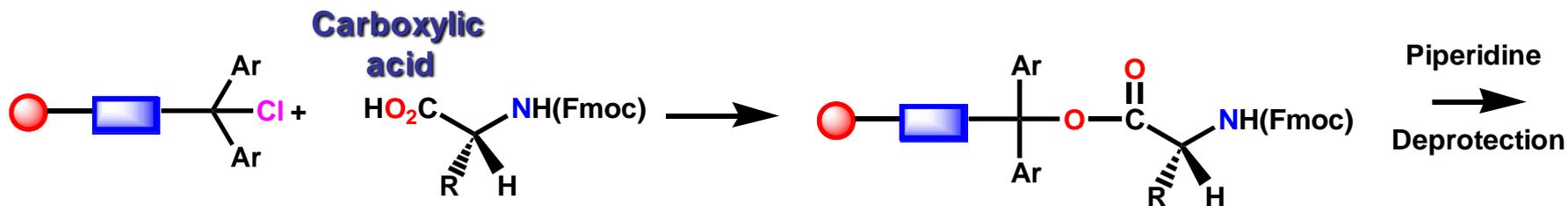
Resina Barlos



Linker

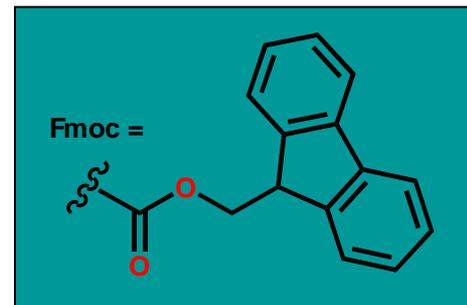
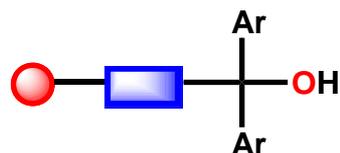


Resina Barlos



TFA
 CH₂Cl₂
 →
 or HOAc
 TFE, CH₂Cl₂

Carboxylic acid



Agentes Protetores e Estratégia Sintética

Grupos Protetores

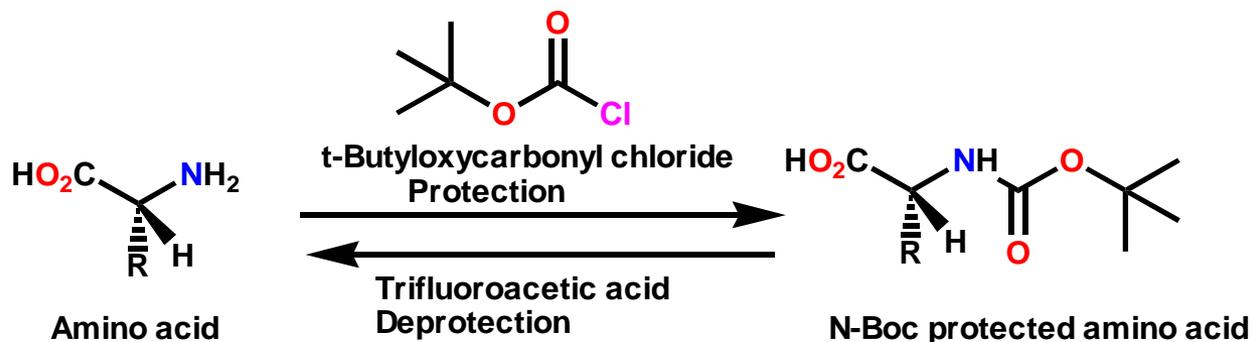
- Protegem grupos funcionais que devem reagir durante o desenvolvimento da rota sintética.
- Idealmente adicionados através de estratégias sintéticas simples, com alto rendimento e em condições brandas.
- Precisam ser estáveis nas condições reacionais utilizadas na síntese.
- Devem ser removidos facilmente, em alto rendimento e em condições brandas.
- Grupos protetores diferentes geralmente devem ser removidos em condições sintéticas diferentes.

Agentes Protetores e Estratégia Sintética

Estratégia Sintética em Síntese de Peptídeos

Boc/benzil estratégia de proteção

- Grupo *N*-amino terminal de aminoácidos protegidos com *t*-butiloxicarbonil
- Grupo protetor removido com TFA



Boc₂O também pode ser utilizado.

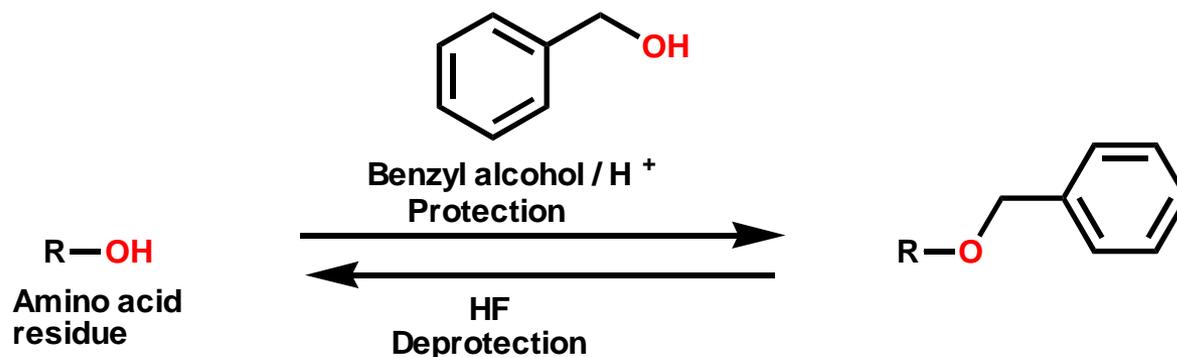
Agentes Protetores e Estratégia Sintética

Estratégia Sintética em Síntese de Peptídeos

Boc/benzil estratégia de proteção

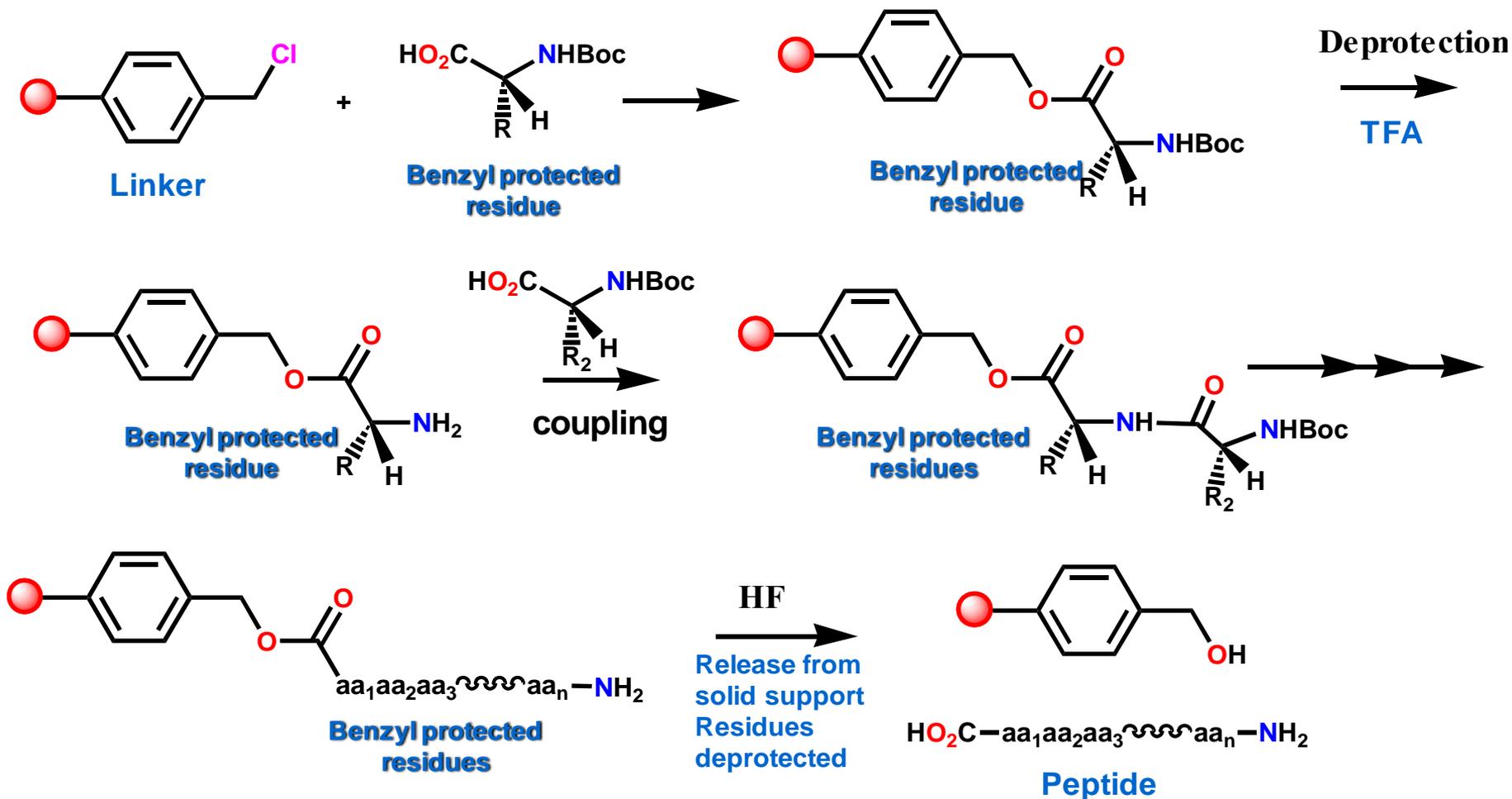
Grupos funcionais protegidos com benzil.

- estável frente a TFA utilizado para desproteger o grupo Boc.
- Removido com HF. Hidrogenação também é possível.
- HF utilizado para remover cadeias peptídicas do suporte sólido.



Boc/benzil – Síntese de Merrifield

 = resin bead

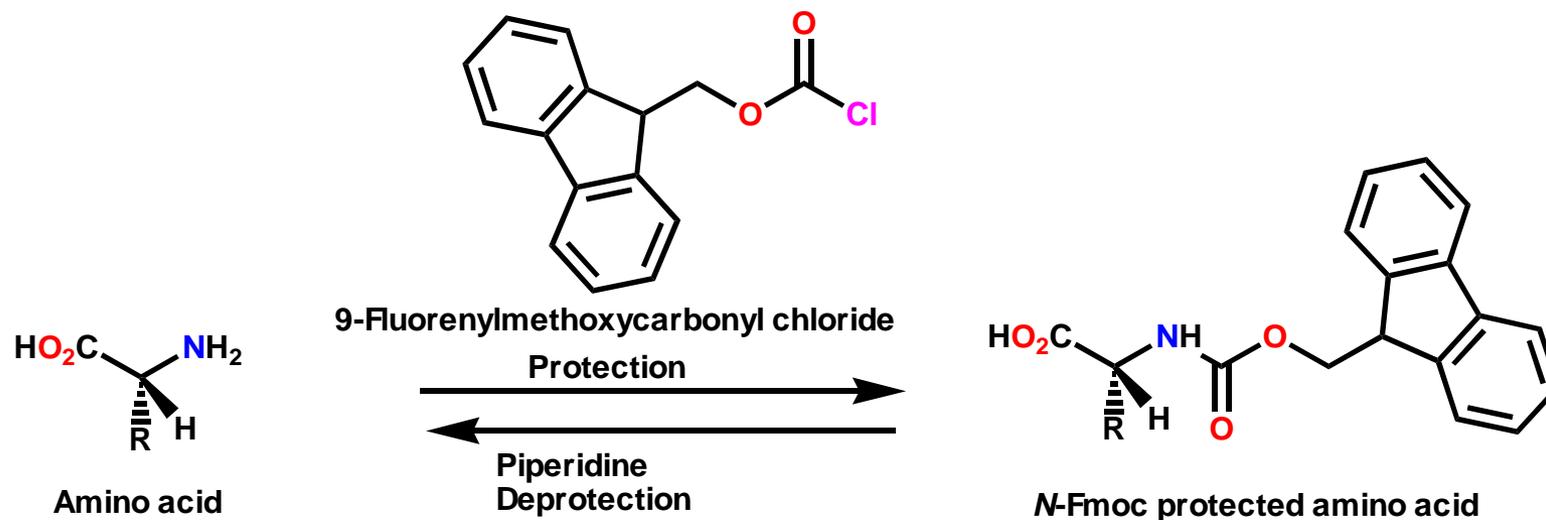


Agentes Protetores e Estratégia Sintética

Estratégia Sintética em Síntese de Peptídeos

Fmoc/t-Bu estratégia de proteção

- Aminoácidos *N*-terminal são protegidos pelo grupo 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc).
- Grupo protetor removido por piperidina.

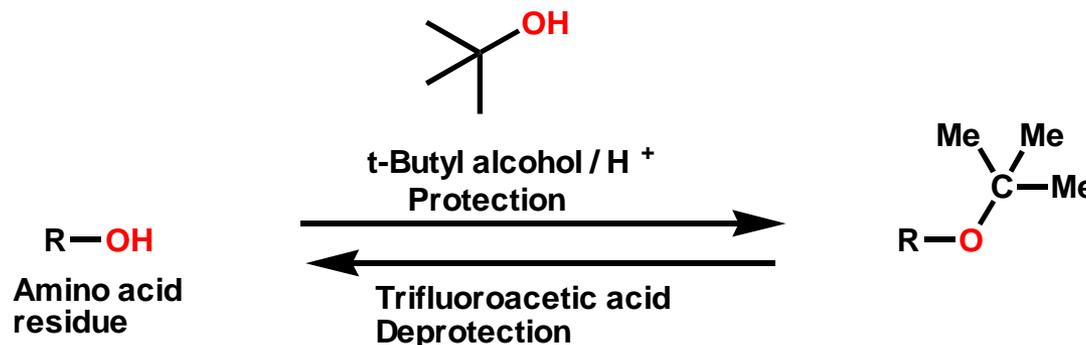


Agentes Protetores e Estratégia Sintética

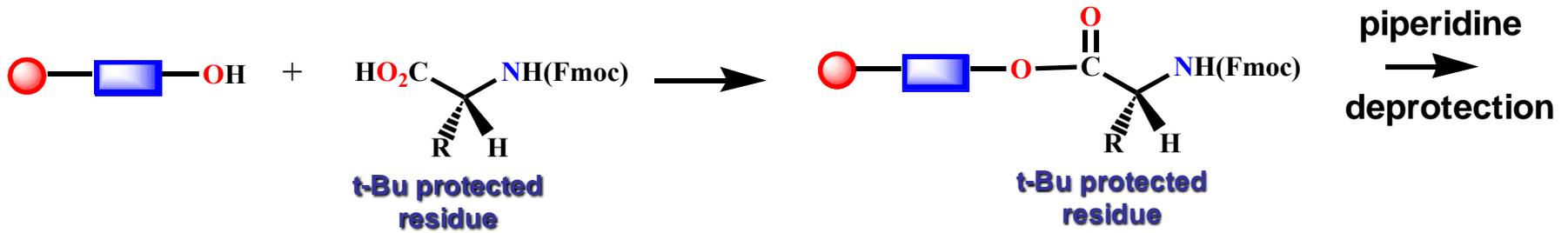
Estratégia Sintética em Síntese de Peptídeos

Fmoc/t-Bu estratégia de proteção

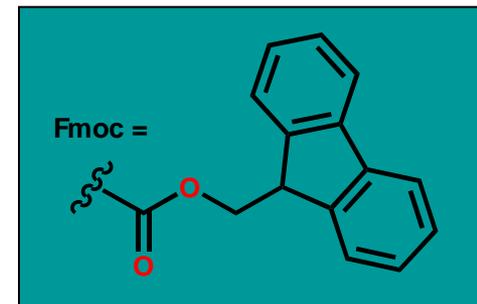
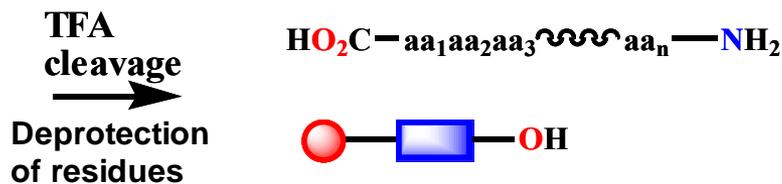
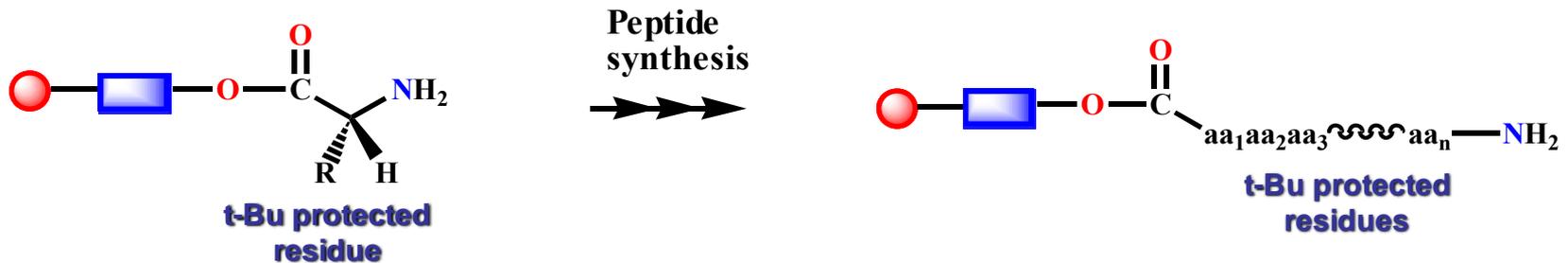
- Grupos funcionais de resíduos protegidos pelo grupo protetor *t*-butil.
- Estável frente a piperidina utilizado na desproteção de grupos Fmoc.
- Removidos por TFA
- TFA é utilizado para remover a cadeia peptídica do suporte sólido.



Estratégia Fmoc/t-Bu



piperidine
 \rightarrow
 deprotection



Síntese Combinatória

Objetivos

- Utilizar um rota sintética padrão para gerar uma grande variedade de análogos.
- Cada frasco contém uma mistura de produtos.
- Produtos são fisicamente distintos – ligados a *beads* diferentes.
- A estrutura em cada poço não é conhecida “com certeza”.
- Adequado para encontrar *hits* e líderes.
- Permite a síntese rápida de uma grande quantidade de compostos.
- Cada mistura é testada para atividade como mistura.
- Misturas inativas são guardadas em bibliotecas combinatórias.
- Misturas ativas são estudadas mais a fundo para identificação do componente ativo.

Síntese Combinatória

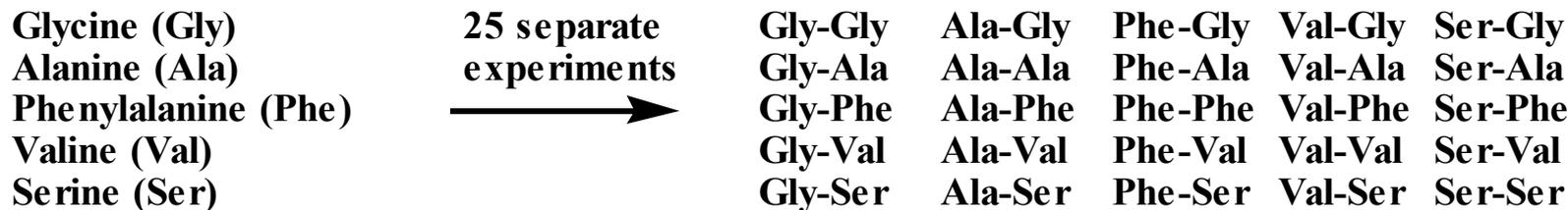
Mix & Split

Exemplo – Síntese de todos os possíveis dipetídeos utilizando-se 5 aminoácidos.

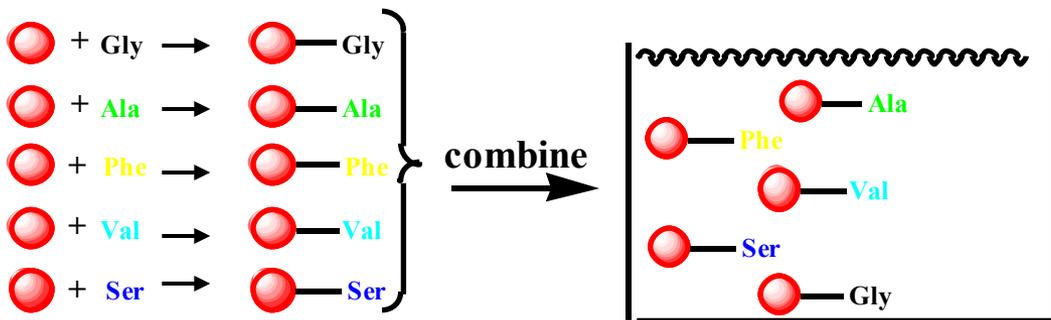
Método comum seria promover 25 reações sintéticas separadas

Procedimento Mix & split ocorre através de 5 reações separadas.

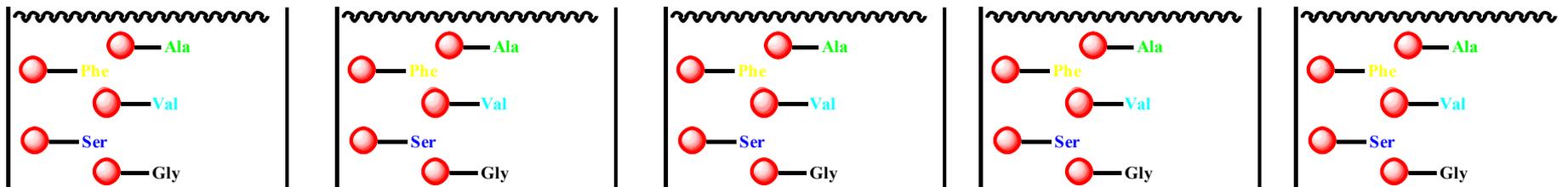
Método comum:



Mix & Split



↓ Split



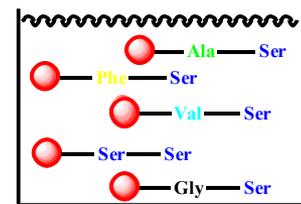
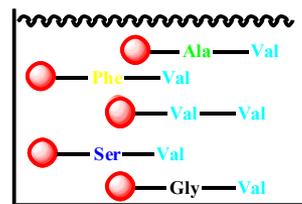
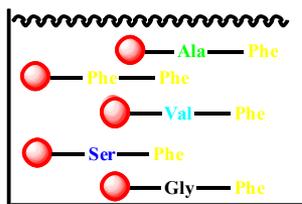
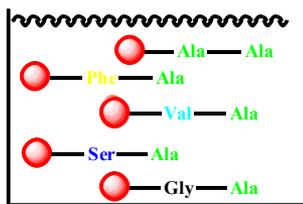
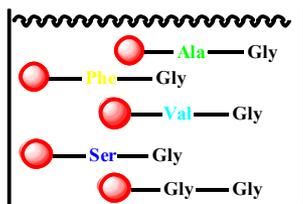
↓ Gly

↓ Ala

↓ Phe

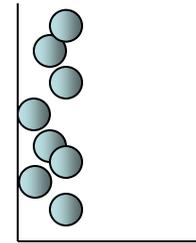
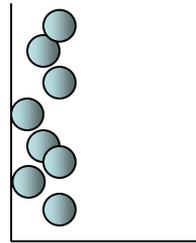
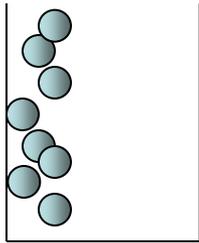
↓ Val

↓ Ser



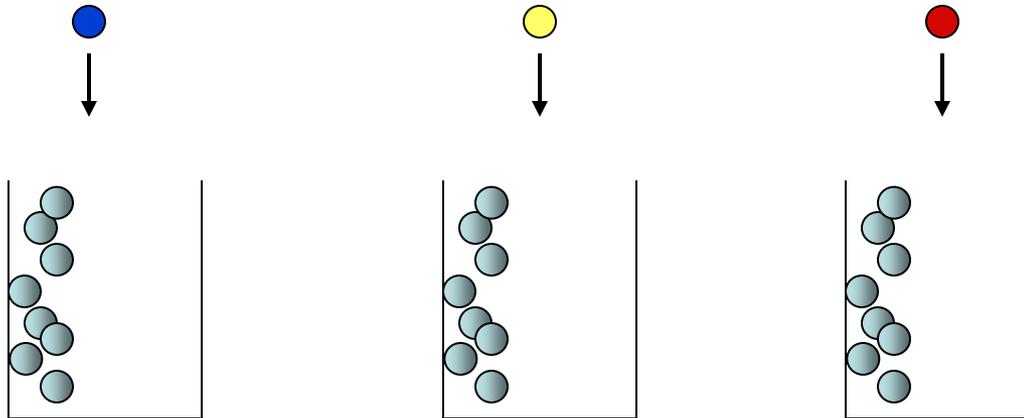
Mix & Split

Síntese de todos os tripetídeos possíveis empregando 3 aminoácidos



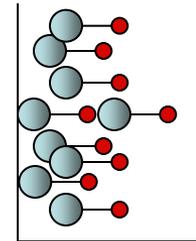
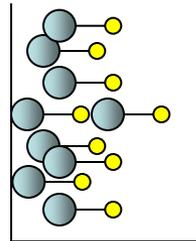
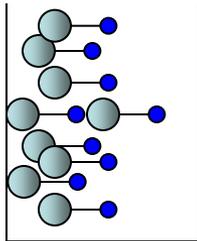
Mix & Split

Síntese de todos os tripetídeos possíveis empregando 3 aminoácidos



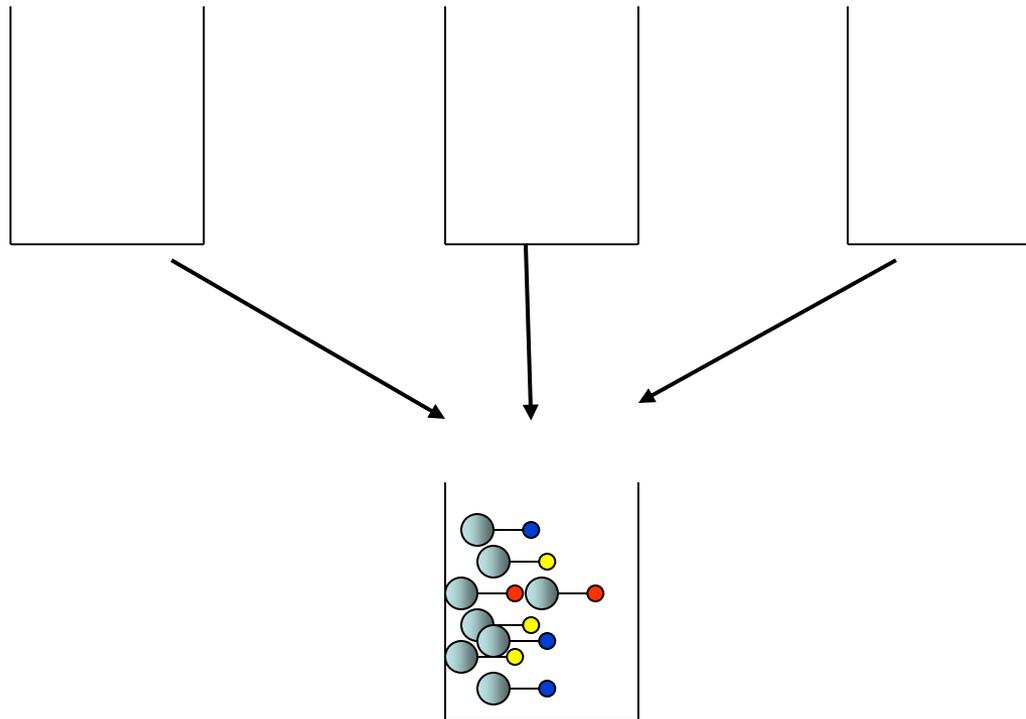
Mix & Split

Síntese de todos os tripetídeos possíveis empregando 3 aminoácidos



Mix & Split

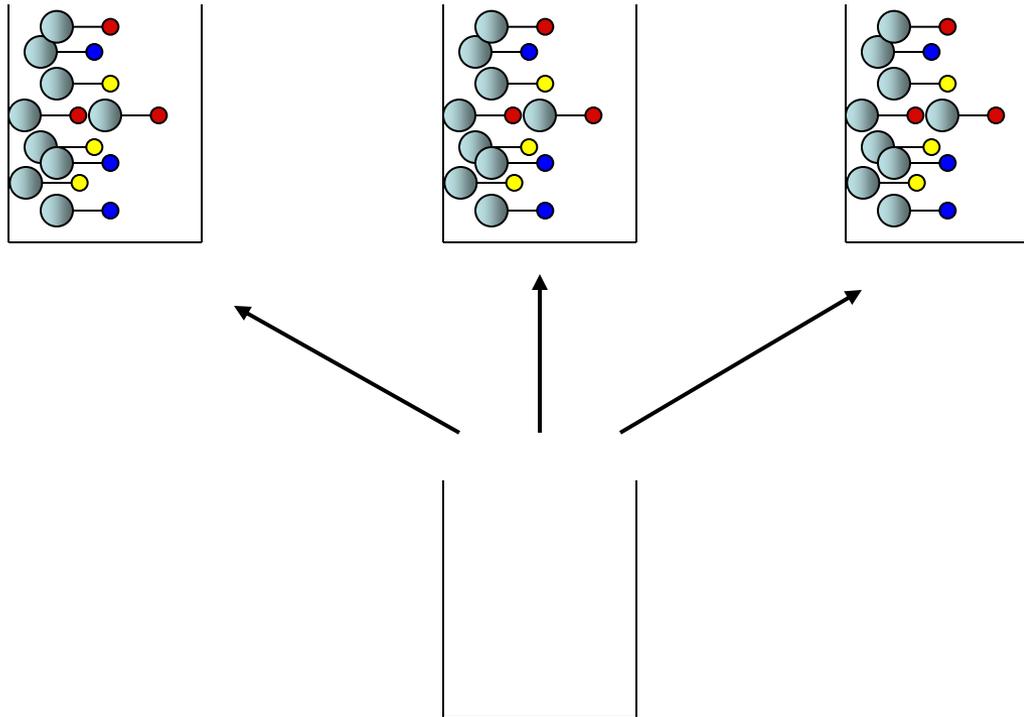
Síntese de todos os tripetídeos possíveis empregando 3 aminoácidos



MIX

Mix & Split

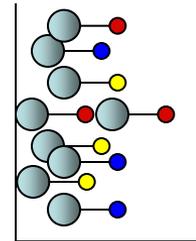
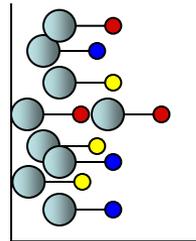
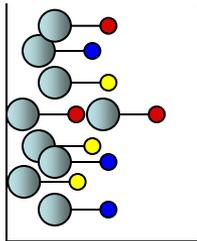
Síntese de todos os tripetídeos possíveis empregando 3 aminoácidos



SPLIT

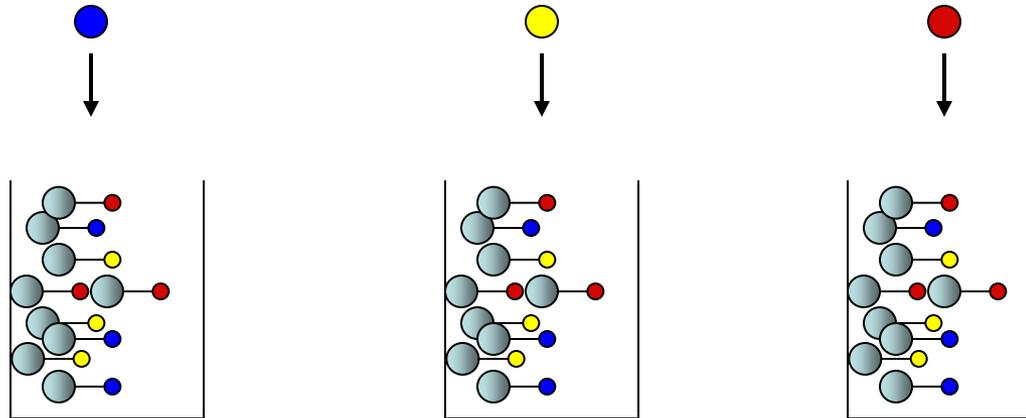
Mix & Split

Síntese de todos os tripetídeos possíveis empregando 3 aminoácidos



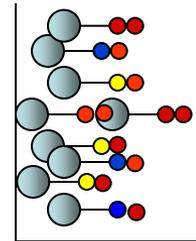
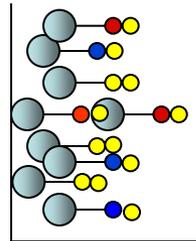
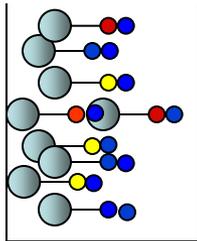
Mix & Split

Síntese de todos os tripetídeos possíveis empregando 3 aminoácidos



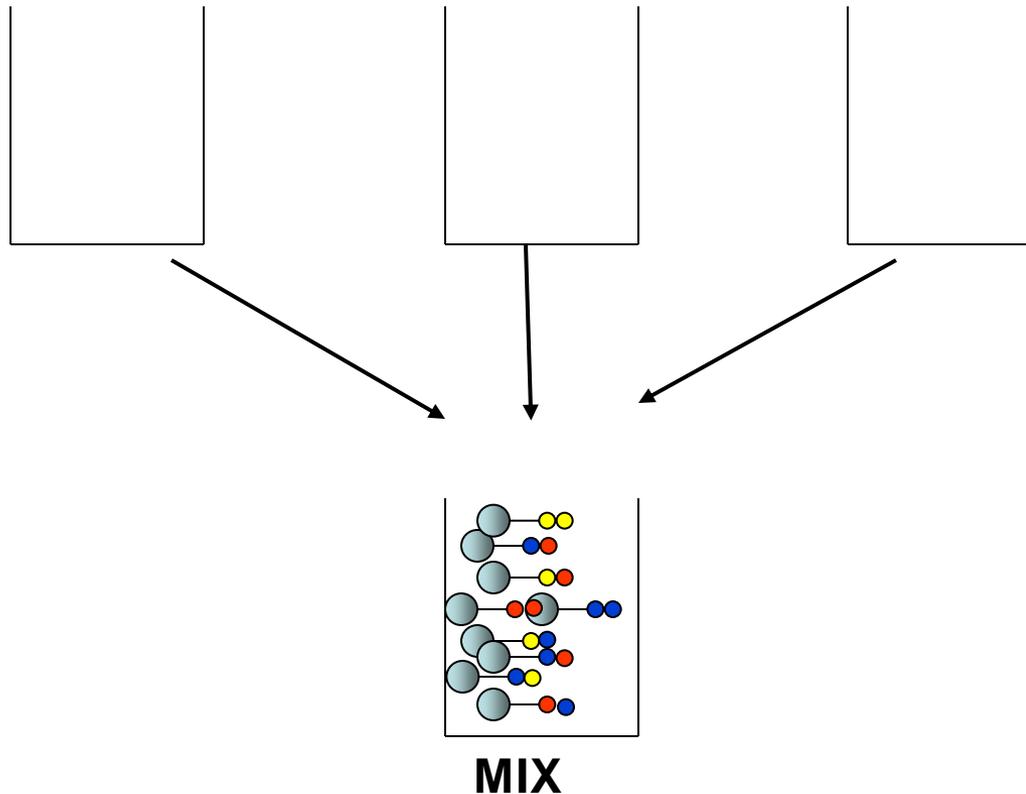
Mix & Split

Síntese de todos os tripetídeos possíveis empregando 3 aminoácidos



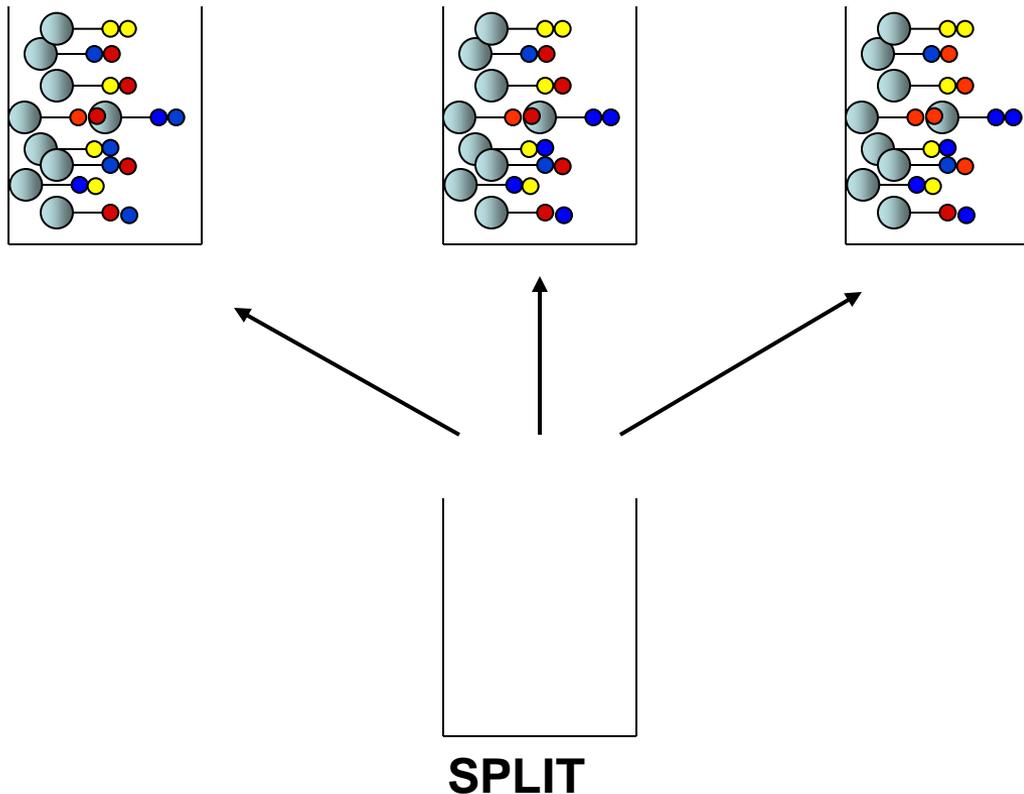
Mix & Split

Síntese de todos os tripetídeos possíveis empregando 3 aminoácidos



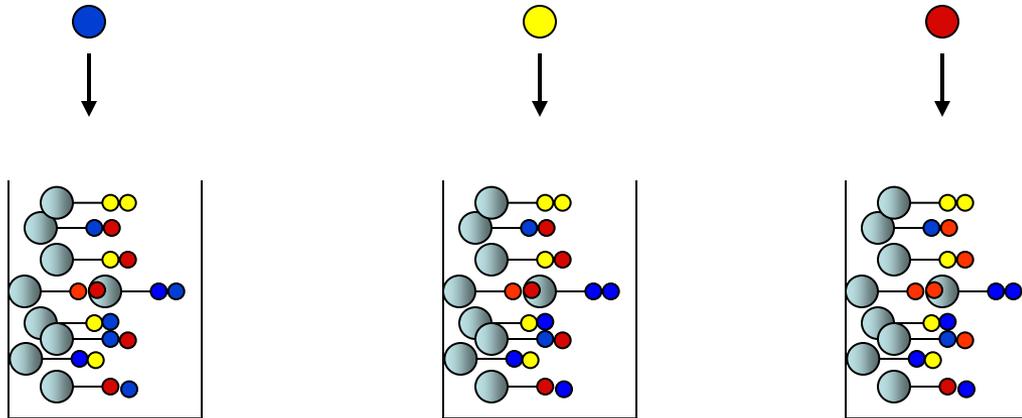
Mix & Split

Síntese de todos os tripetídeos possíveis empregando 3 aminoácidos



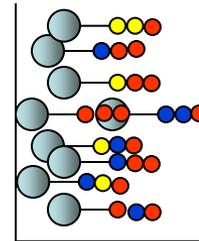
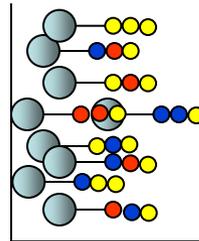
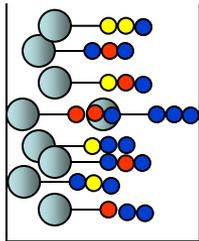
Mix & Split

Síntese de todos os tripetídeos possíveis empregando 3 aminoácidos



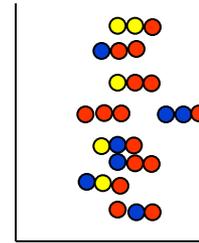
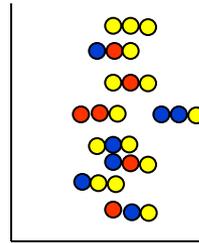
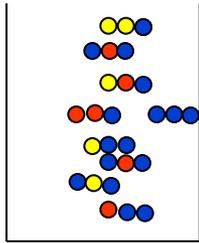
Mix & Split

Síntese de todos os tripetídeos possíveis empregando 3 aminoácidos



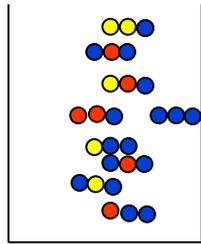
Mix & Split

Síntese de todos os tripetídeos possíveis empregando 3 aminoácidos

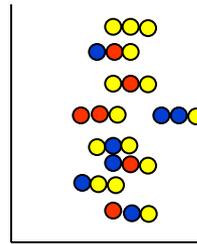


Mix & Split

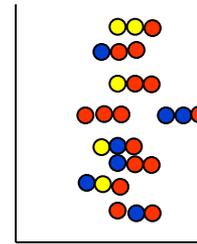
Síntese de todos os tripeptídeos possíveis empregando 3 aminoácidos



9



9

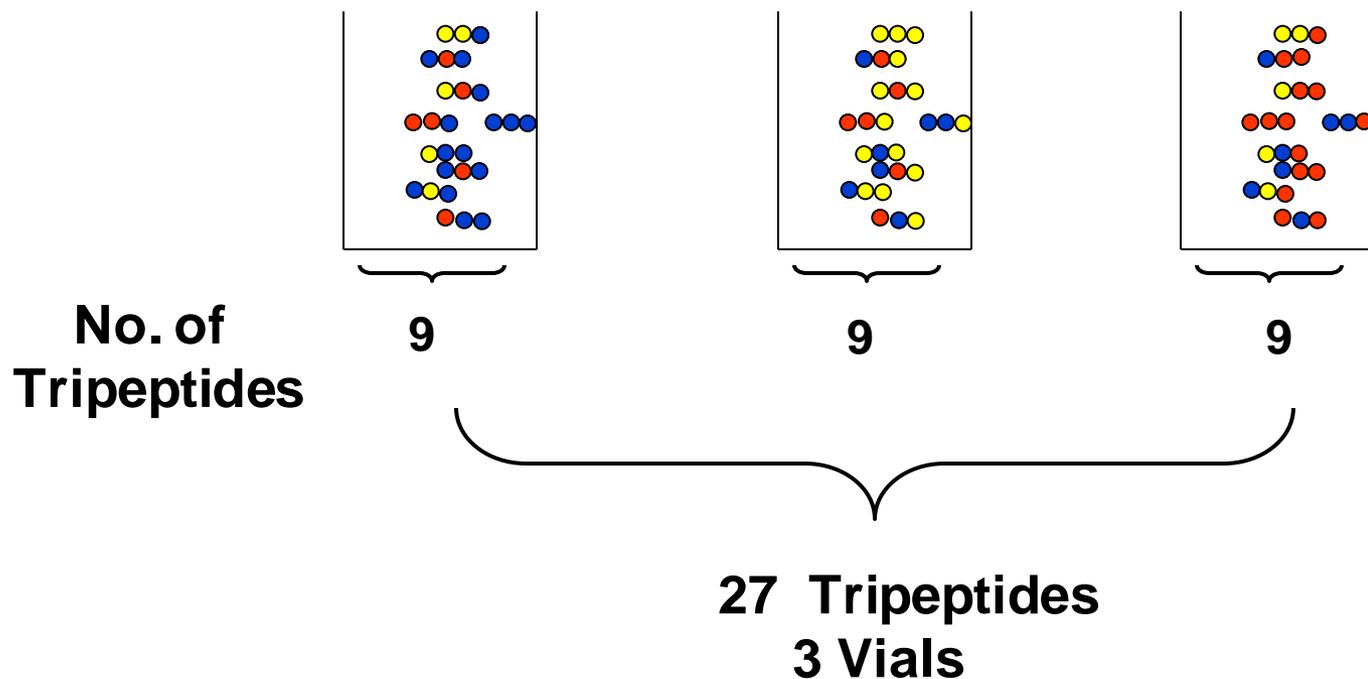


9

No. de
Tripeptídeos

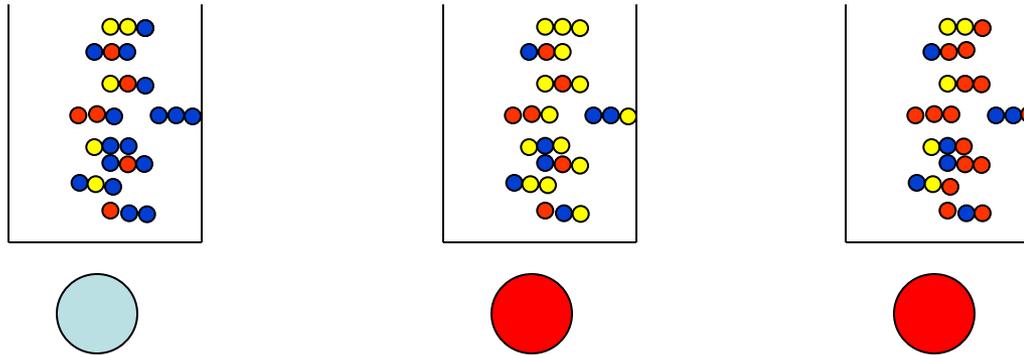
Mix & Split

Síntese de todos os tripetídeos possíveis empregando 3 aminoácidos



Mix & Split

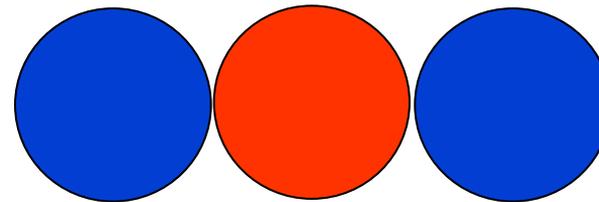
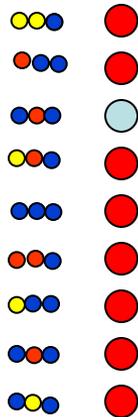
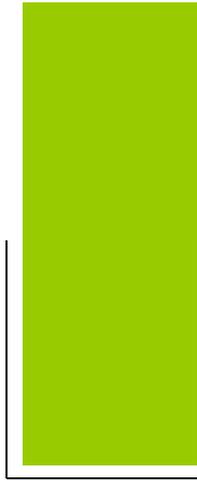
Síntese de todos os tripetídeos possíveis empregando 3 aminoácidos



Testar atividades das misturas

Mix & Split

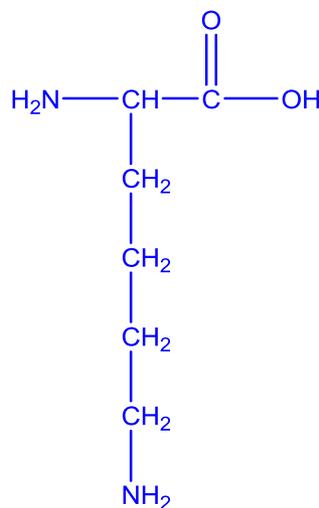
Síntese de todos os tripetídeos possíveis empregando 3 aminoácidos



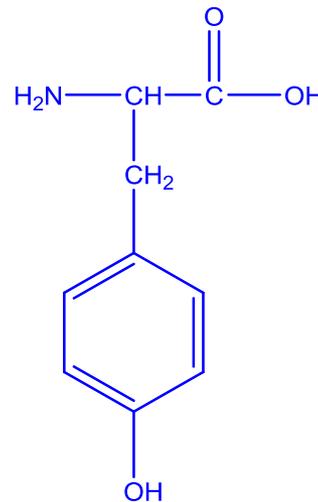
Sintetizar cada tripeptídeo e testar

Exercício 1: Uma farmoquímica deseja sintetizar todos os possíveis dipeptídeos contendo os aminoácidos tirosina (tyr), lisina (lys), fenilalanina (phe) e leucina (leu). Identifique o número de dipeptídeos possíveis e explique como esta farmoquímica poderia desenvolver essas reações empregando técnicas combinatórias.

Exercício 2: Quais precauções deveriam ser tomadas em termos sintéticos relativos aos aminoácidos lisina e tirosina.



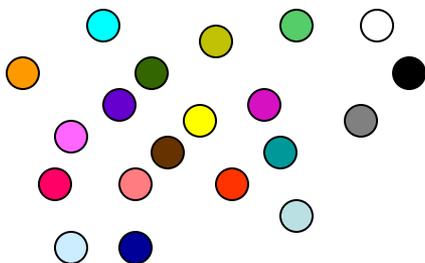
Lisina (Lys)



Tirosina (Tyr)

Mix & Split

20 Aminoácidos



Hexapeptídeos



34 Milhões de produtos
(1,889,568 hexapeptides / vial)

Identificação de estruturas por síntese combinatória

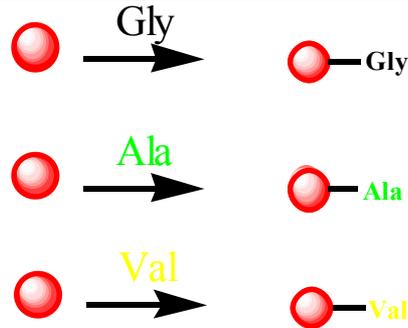
Deconvolução Recursiva

Método de identificação do componente ativo numa mistura.

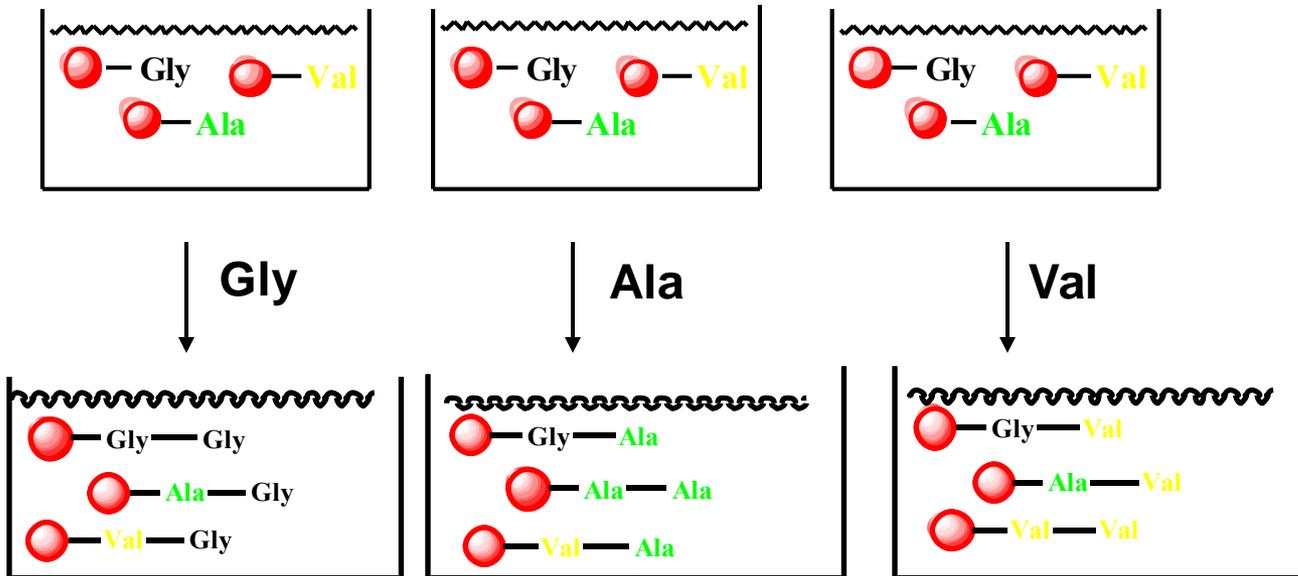
- Mais rápido do que sintetizar separadamente todos os possíveis componentes.
- Necessita guardar amostras antes de cada estágio de mix & split.

Exemplo

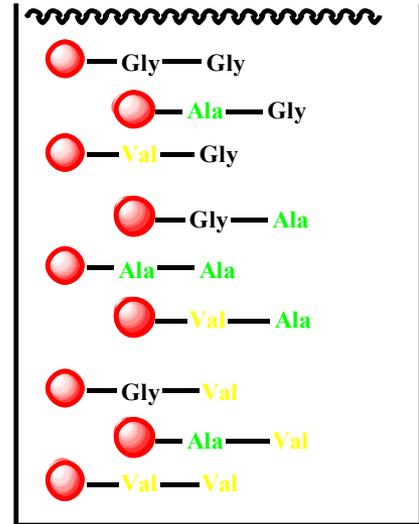
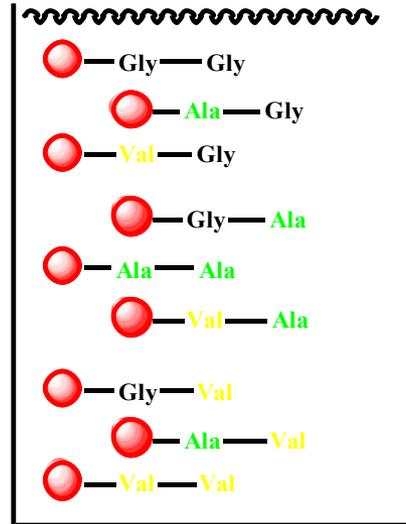
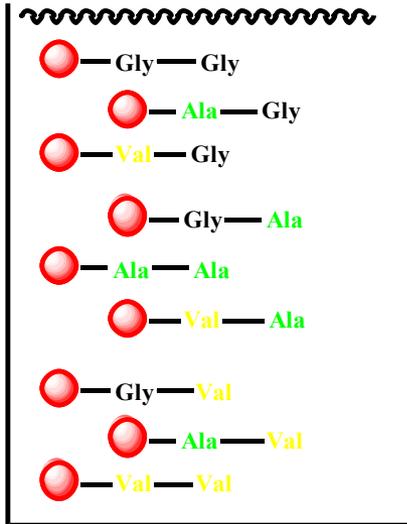
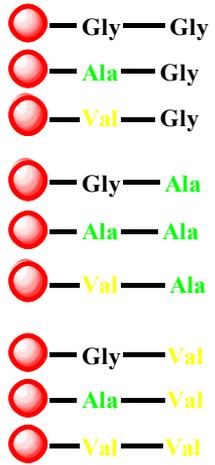
Considere todos os 27 tripeptídeos sintetizados por mix & split a partir da glicina, alanina e valina



Mix and Split



Todos os dipeptídeos possíveis em 3 frascos
 Guardar uma amostra de cada frasco

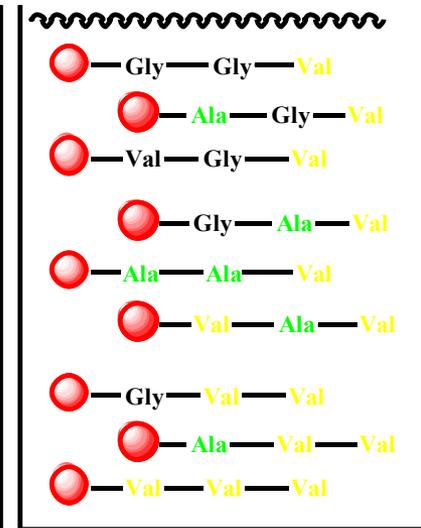
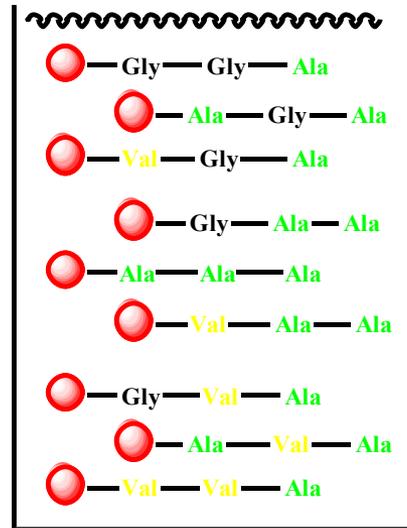
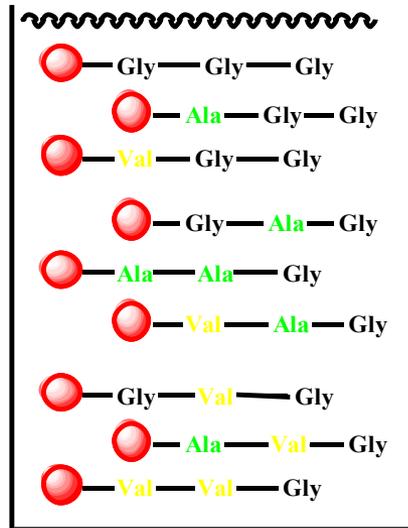


Mix & Split

Gly ↓

↓ Ala

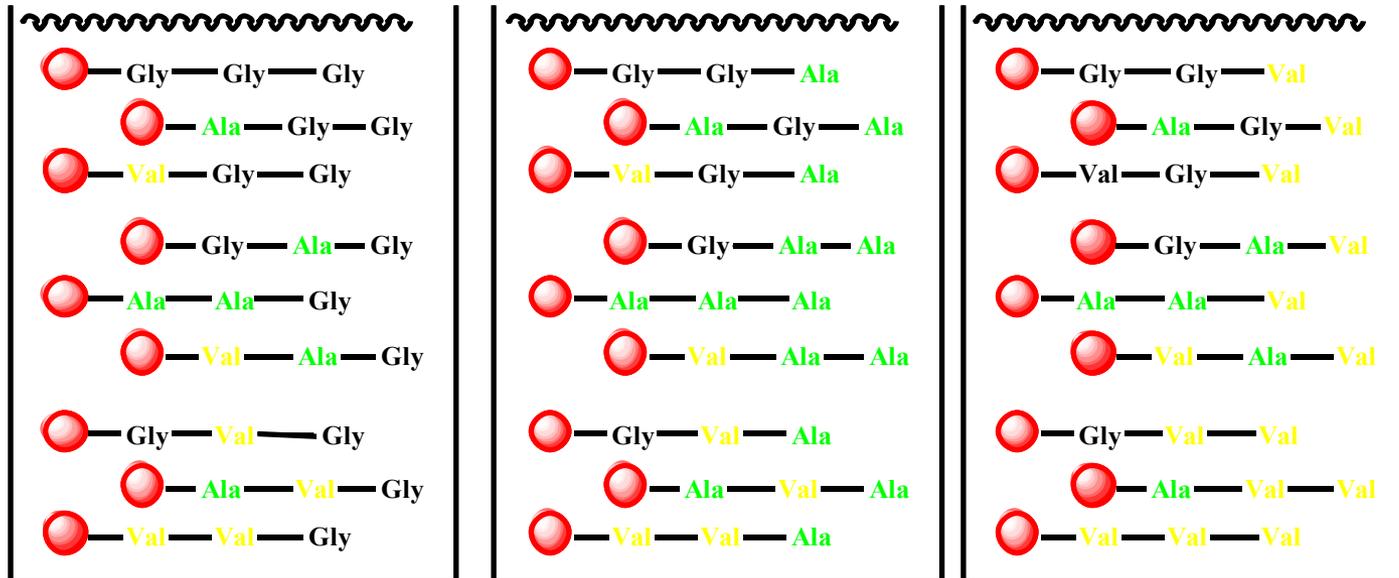
↓ Val



Todos tripeptídeos possíveis em três frascos

Identificação de estruturas por síntese combinatória

Deconvolução Recursiva



**Mixture
Inactive**

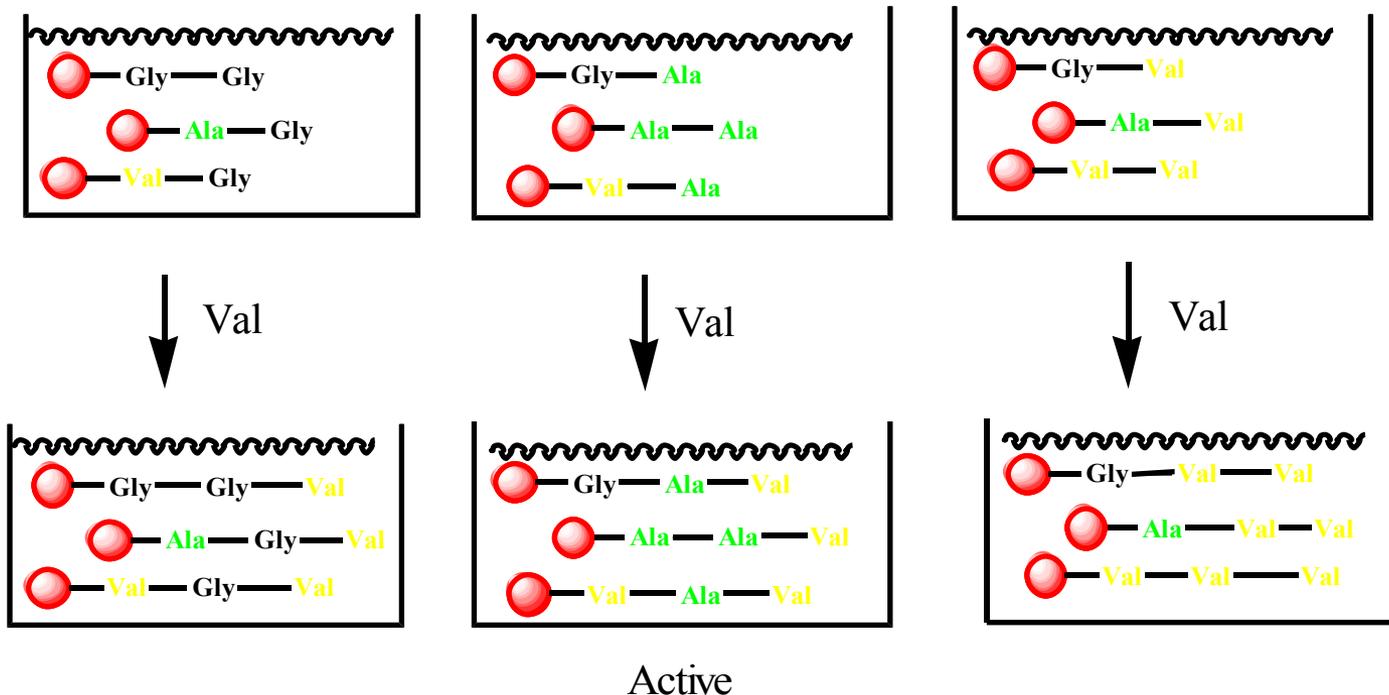
**Mixture
Inactive**

**Mixture
Active**

- 9 Tripeptídeos possíveis na mistura ativa.
- Todos terminam em valina.
- Adicionar valina nas três misturas de dipeptídeos guardadas.

Identificação de estruturas por síntese combinatória

Deconvolução Recursiva



- Componentes ativos estreitados para um dos três possíveis conjuntos de tripeptídeos.
- Sintetizar cada tripeptídeo e testar.

Química Combinatória Dinâmica

- Utilizado na busca por novos compostos líderes
- Método alternativo ao mix & split
- Misturas são prospectadas *in situ* assim que o composto é formado
- O alvo desejado está presente no frasco reacional juntamente com os blocos de construção para síntese
- As reações são reversíveis
- Os produtos formados estão em equilíbrio com seus blocos de construção
- Permite amplificação dos compostos ativos
- É necessário “congelar” o equilíbrio reacional para identificar os compostos ativos
- Este processo é realizado fazendo uma nova reação capaz de converter produtos que estejam em equilíbrio em compostos estáveis

Química Combinatória Dinâmica

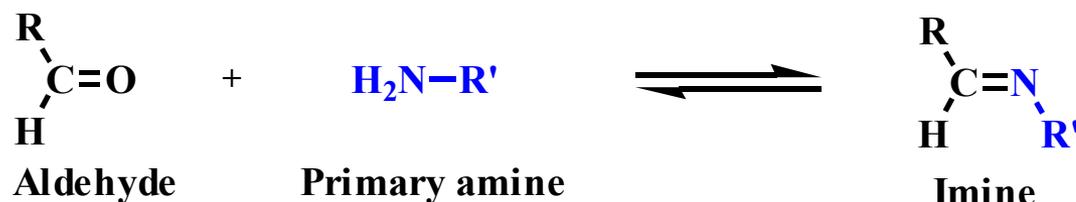
Amplificação

- Compostos ativos, quando formados, ligam-se ao alvo
- Basicamente, são removidos da mistura em equilíbrio
- Equilíbrio é modificado sendo que maior quantidade do composto ativo é formado
- Alvos são utilizados para identificação de compostos ativos e suas amplificações

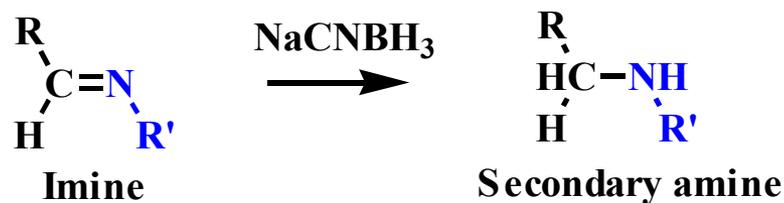
Química Combinatória Dinâmica

Exemplo – Ligantes para anidrase carbônica

- Reação reversível: formação de iminas



- Reação realizada na presença de anidrase carbônica
- Três aldeídos e quatro aminas presentes como blocos de construção
- Cianoboroidreto de sódio adicionado para “congelar” a mistura

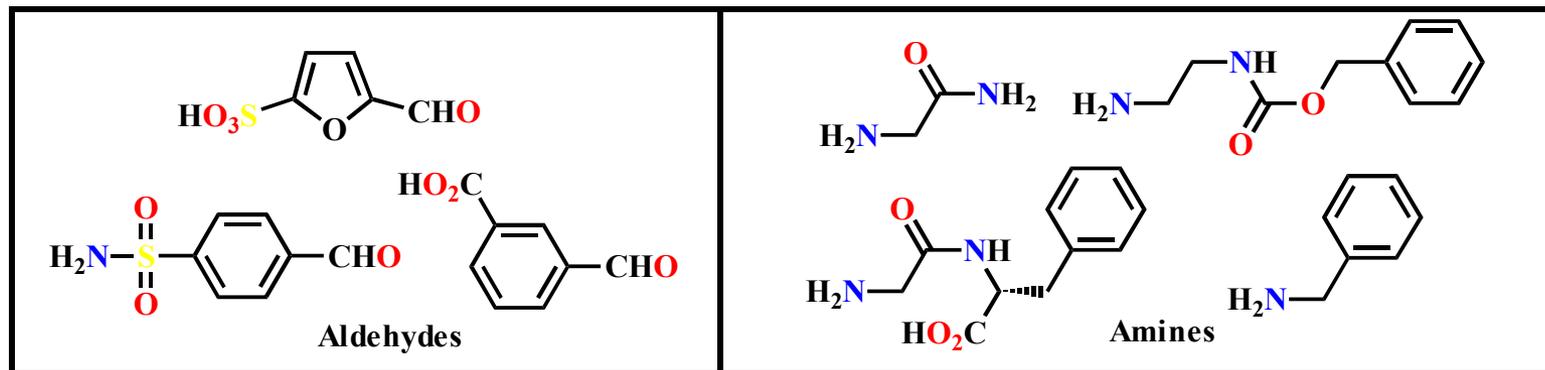


- Produtos quantificados e identificados
- Experimento repetido na ausência do alvo para identificação de produto(s) amplificados
- Produto amplificado não está necessariamente presente nas melhores quantidades

Química Combinatória Dinâmica

Exemplo – Ligantes para anidrase carbônica

Blocos de construção



Reação é realizada na ausência da enzima para ver qual(is) produto(s) são amplificados. Produtos são separados por HPLC.

Produto amplificado (composto ativo – amplificado pela enzima)



Química Combinatória Dinâmica

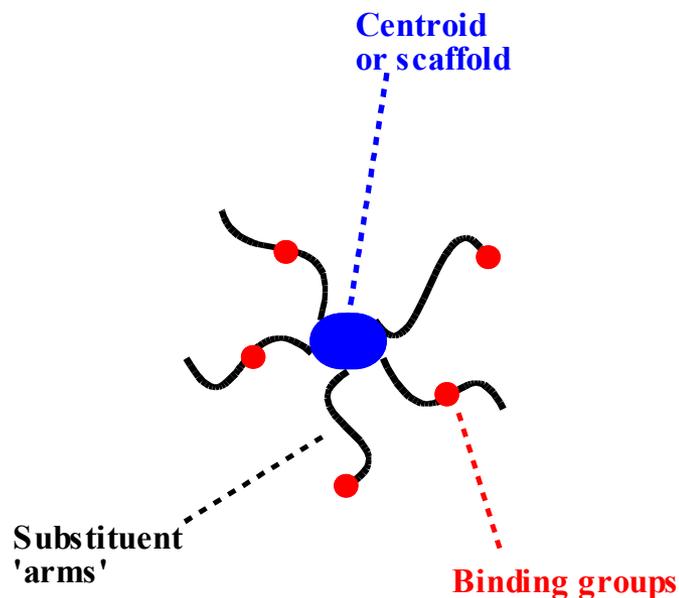
Limitações

- Alvo não deve reagir com os blocos de construção
- Alvo deve ser estável nas condições reacionais
- Alvo geralmente encontra-se em sistemas aquosos que estão “vizinhos”
- Reação deve ser realizada em solução aquosa
- Reações devem sofrer rápido equilíbrio para permitir amplificação
- Escolher reagentes onde um produto não seja significativamente mais favorecido do que qualquer outro possível – do contrário, isto irá dificultar a identificação do produto amplificado

Planejando uma síntese combinatória

Objetivos

- Gerar uma grande quantidade de compostos
- Gerar uma grande diversidade de compostos
- Aumentar as chances de achar um composto líder que se ligará no sítio ligante
- Síntese é baseada em gerar um core ou scaffold molecular que facilite a diversificação e funcionalização



Planejando uma síntese combinatória

Desenvolvimento de fármacos com biodisponibilidade oral

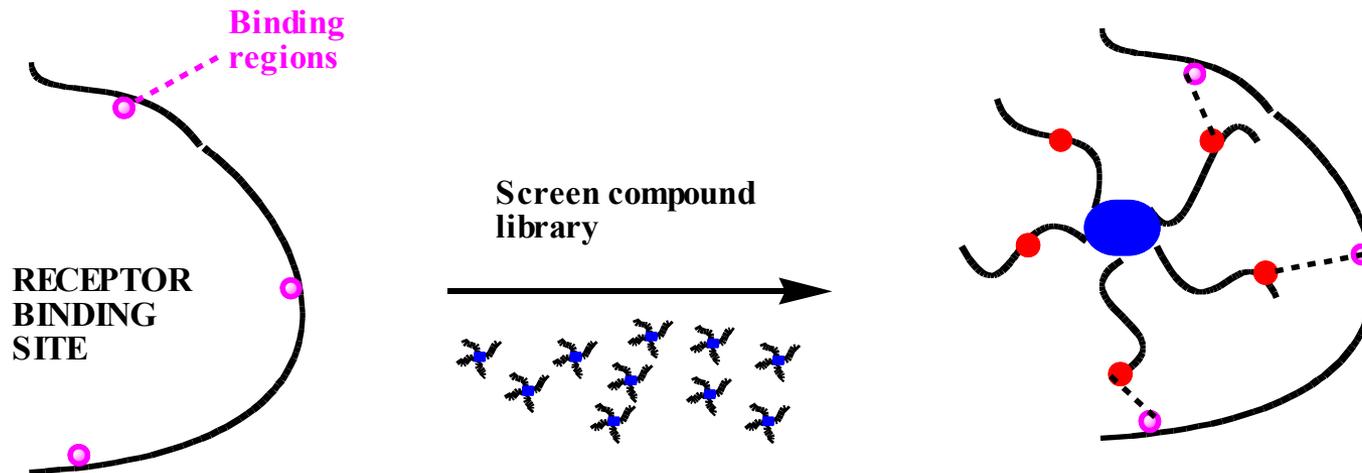
Moléculas alvo devem obedecer as regras de Lipinski (regra dos cinco) para atividade oral:

- massa molecular abaixo de 500
- $\log P$ menor que +5
- Até 5 grupos doadores de H-
- Até 10 grupos aceptores de H

Planejando uma síntese combinatória

Scaffolds

- Scaffolds do tipo 'aranha' são preferíveis para exploração do espaço químico/conformacional
- Permitem variações de grupos funcionais ao redor da molécula inteira a fim de aumentar as chances de achar interações ligantes disponíveis



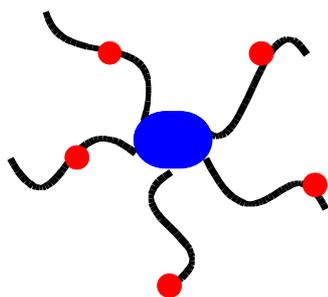
- Massa molecular do scaffold deve ser baixa para permitir uma vasta variação de funcionalidades
- Evitar compostos com $MM > 500$

Planejando uma síntese combinatória

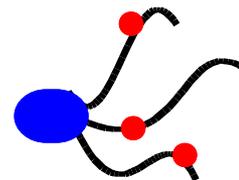
Scaffolds

Tadpole Scaffolds

- variação restrita a uma região específica em volta da molécula
- menor chance de favorecer interações favoráveis com o sítio ligante



'Spider' Scaffold with
'dispersed' substituents



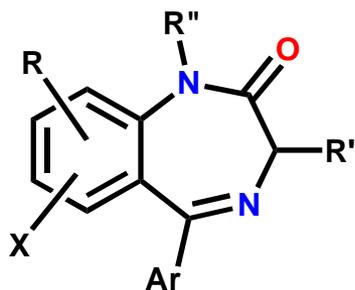
'Tadpole' scaffold with
'restricted' substituents

Scaffolds Privilegiados

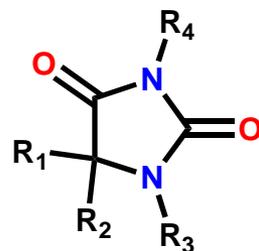
- scaffolds que são comuns em química medicinal e que estão associados uma grande quantidade de atividades:
- benzodiazepinas, hidantoinas, benzenosulfonamidas, etc.

Planejando uma síntese combinatória

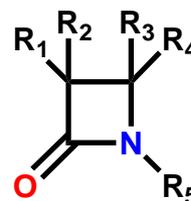
Scaffolds



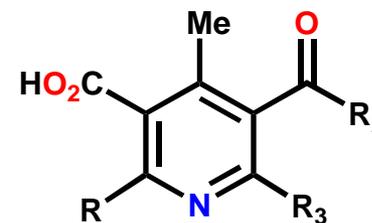
Benzodiazepinas



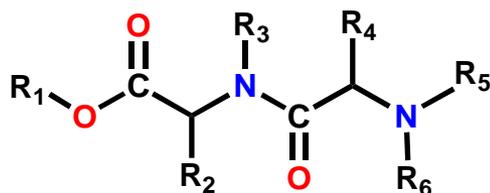
Hidantoinas



β -Lactamas



Piridinas

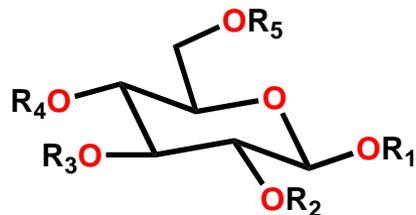


Dipeptídeos

- Bons scaffolds
- Tipo aranha
- baixa massa molecular
- Várias rotas sintéticas disponíveis

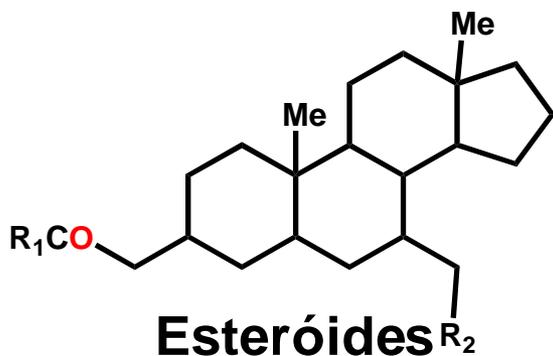
Planejando uma síntese combinatória

Scaffolds



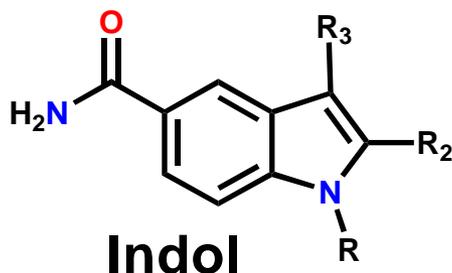
Glicose

- Tipo aranha e baixa massa molecular (MM)
- Vários grupos OH
- Dificuldade para variação R_1 - R_5 independente (necessidade de protocolos de proteção/desproteção)



Esteróides

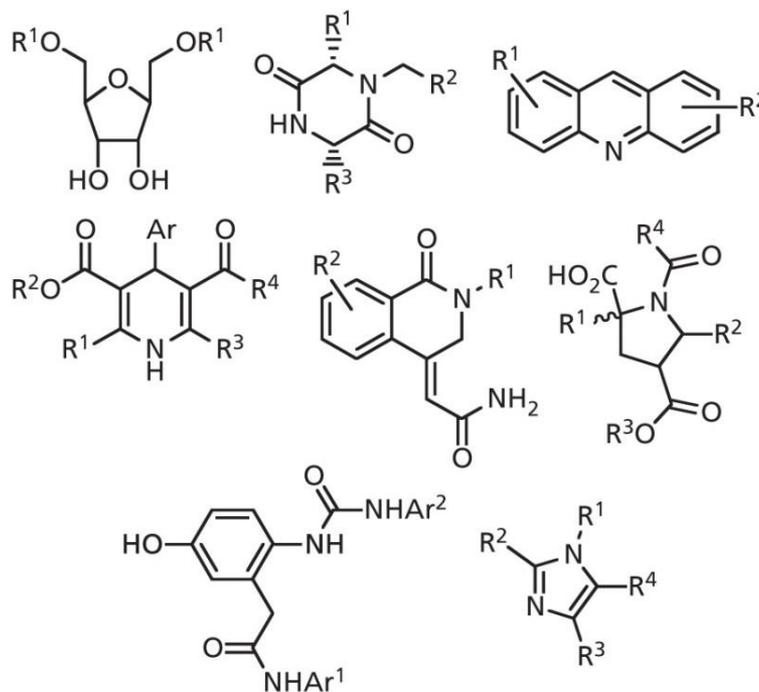
- MM relativamente alta
- restrição no número de grupos funcionais permitidos devido a alta MM
- Relativamente poucas posições onde substituintes podem ser adicionados



Indol

- Scaffold do tipo Tadpole
- Variabilidade restrita a uma região embora possível de variação na posição 5 seja possível)

Exercício: identifique as vantagens e desvantagens das seguintes estruturas como scaffolds:



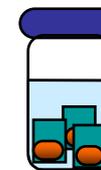
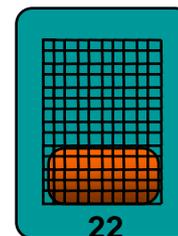
Síntese paralela

Objetivos

- Utilização de rotas sintéticas para gerar uma gama de análogos, sendo este análogo isolado de modo puro em casa poço, tubo, frasco...
- A identidade de cada estrutura é conhecida
- Adequado para produzir uma grande quantidade de análogos a fim de desenvolver-se REA (SAR) e otimização de drogas.

Síntese paralela

Procedimento de Houghton (saquinho de chá)



- Procedimento manual para síntese paralela
- Cada saquinho contém *beads*
- Diferentes reações ocorrem em cada saquinho
- Saquinhos são combinados de forma a realizarem o mesmo tipo de reação e tratamento reacional
- Um único produto é sintetizado em cada saquinho de chá
- Produtos diferentes são formados em cada saquinho de chá
- Procedimento econômico em termos de tratamento reacional
- Procedimento barato que pode ser realizado na maioria dos labs sem necessitar de equipamentos especiais
- Não é adequado para produzir grandes quantidades de produtos diferentes

Síntese paralela

Síntese paralela automatizada



Síntese paralela

Síntese paralela automatizada



Lab stations for microwave-assisted organic reactions

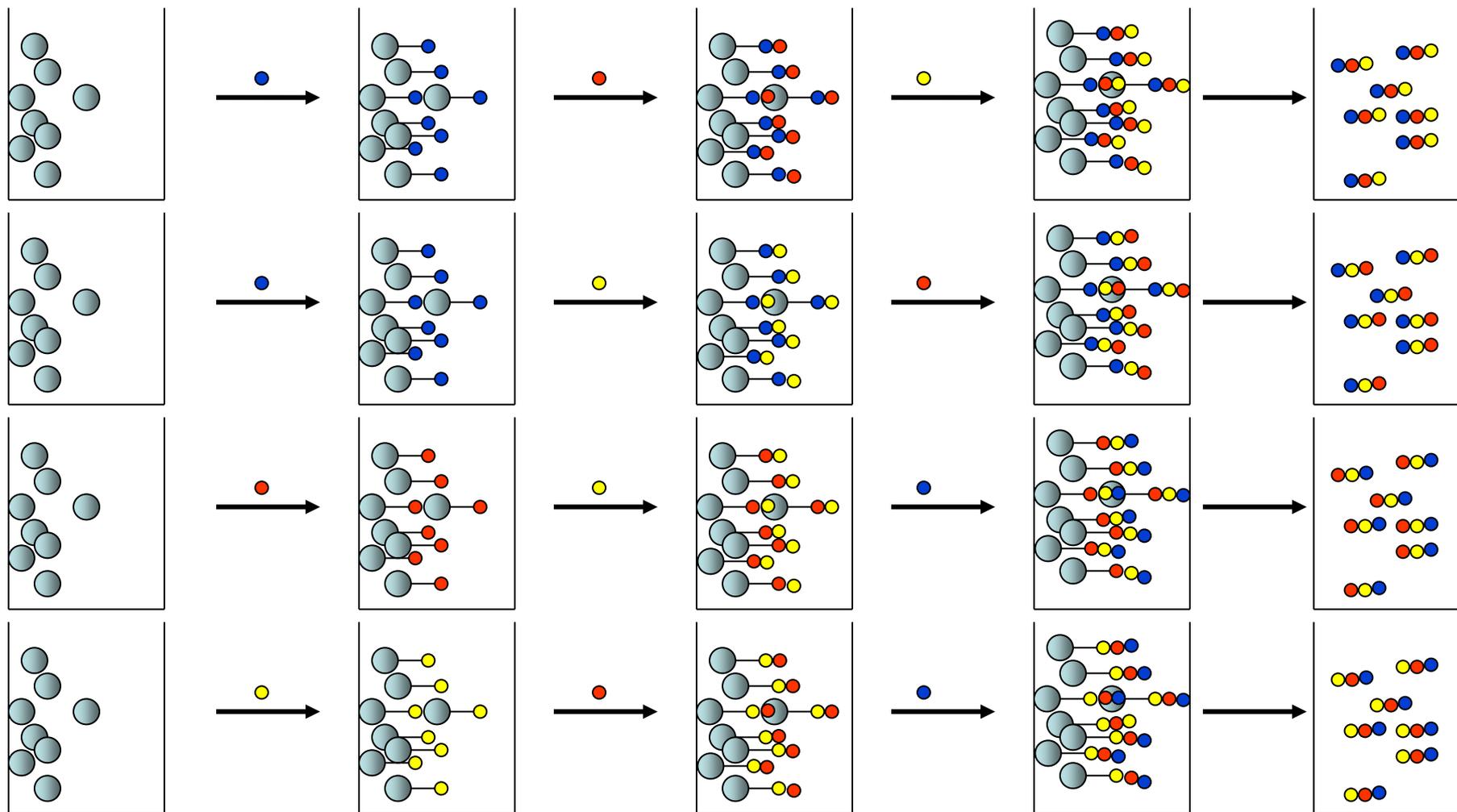
Síntese paralela

Síntese paralela automatizada

- Sintetizadores automatizados estão disponíveis para placas de 42, 96 ou 144 poços ou recipientes
- Reações e tratamento reacionais são realizados automaticamente
- Mesma rota sintética, porém com reagentes diferentes para cada recipiente.
- Produtos diferentes são obtidos para cada recipiente.

Síntese paralela

Síntese paralela automatizada de todos os 27 tripeptídeos formados a partir de 3 aminoácidos

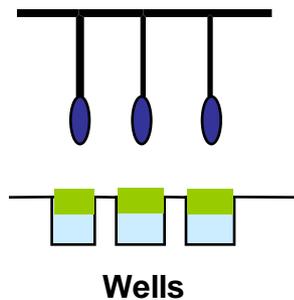
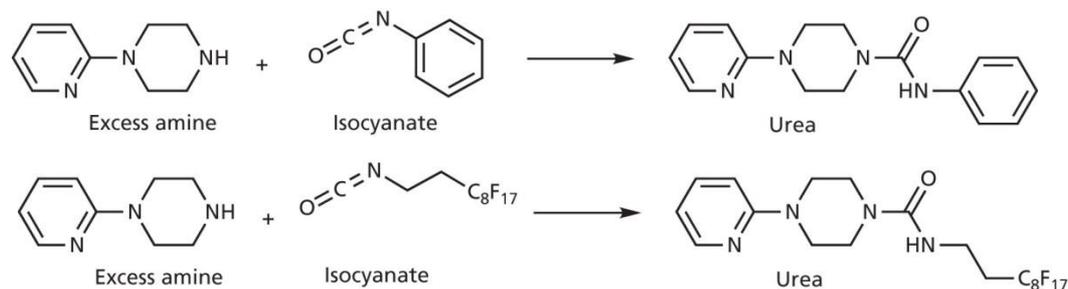


ETC

Síntese paralela

Métodos – Extração em fase sólida

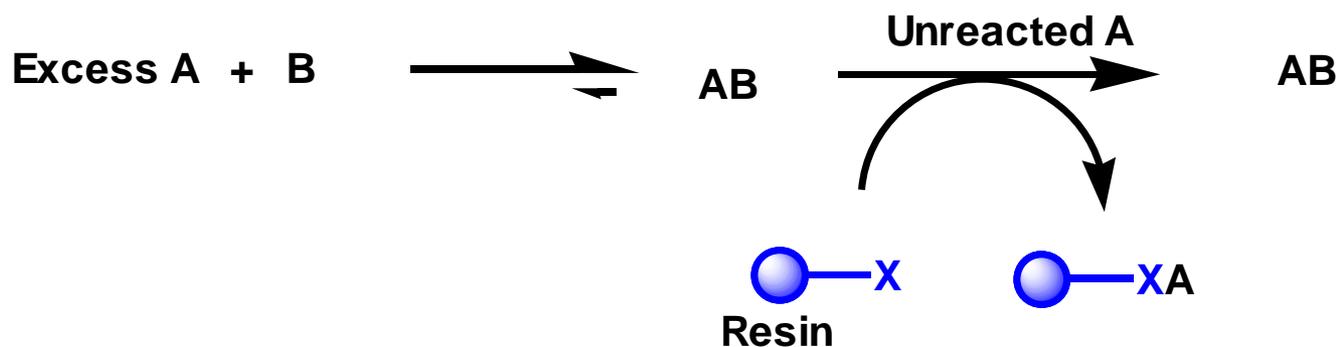
- Utilizado em substituição a extrações convencionais do tipo líquido-líquido
- Mais eficiente
- Soluções reacionais são passadas em colunas
- Colunas ácidas removem impurezas básicas
- Colunas básicas removem impurezas ácidas
- Extração de fluor em fase sólida: utilizado para remover compostos fluorados
- Excesso de reagentes podem reagir com agentes fluoração e então removidos
- Fase quassa pode ser congelada e removida – método do pirulito



Síntese paralela

Métodos – Síntese orgânica com resinas em solução

- Resinas podem ser usadas para remover excesso de reagentes e impurezas
- Possibilidade de utilização de resinas nucleofílicas, eletrofílicas, ácidas e básicas
- Reações são forçadas para o lado do produto
- Remoção do reagente com uma resina “scavenger” adequada



Síntese paralela

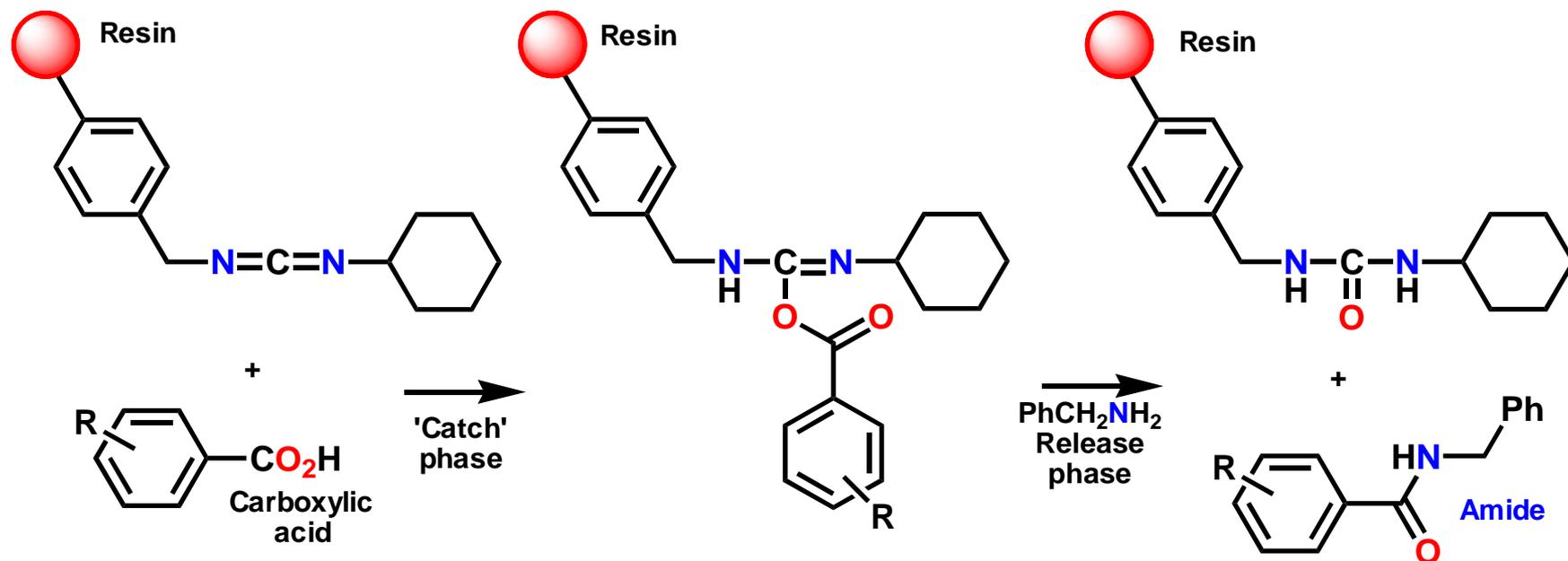
Métodos – estratégia pegar e soltar

Reagente ligado ao suporte sólido

Reagente-resina “pega” o reagente em solução

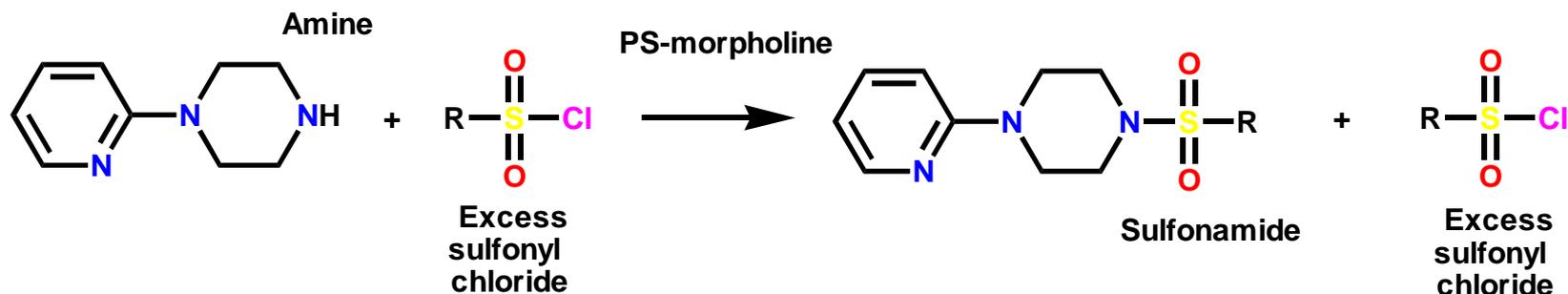
Reação ocorre e o produto é liberado

Subprodutos permanecem ligados à resina

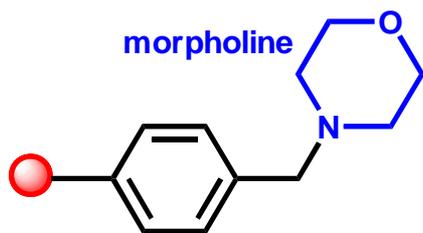


Síntese paralela

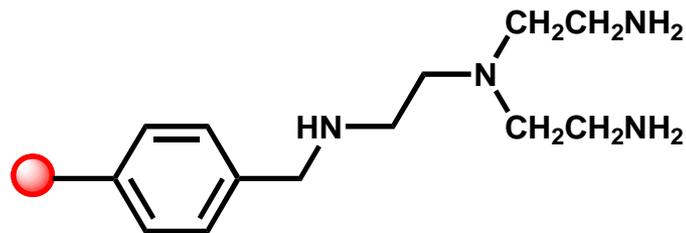
Métodos - Síntese de sulfonamidas



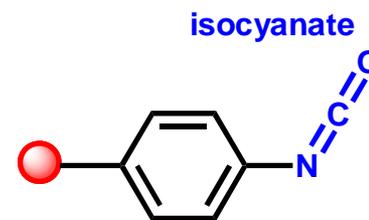
- PS-morfolina utilizada como catalisador em suporte sólido
- PS-trisamina (resina básica) utilizada para reagir com excesso de cloreto de sulfonila
- PS-isocianato (resina eletrofílica) utilizado para reagir com excesso de amina



PS-morpholine



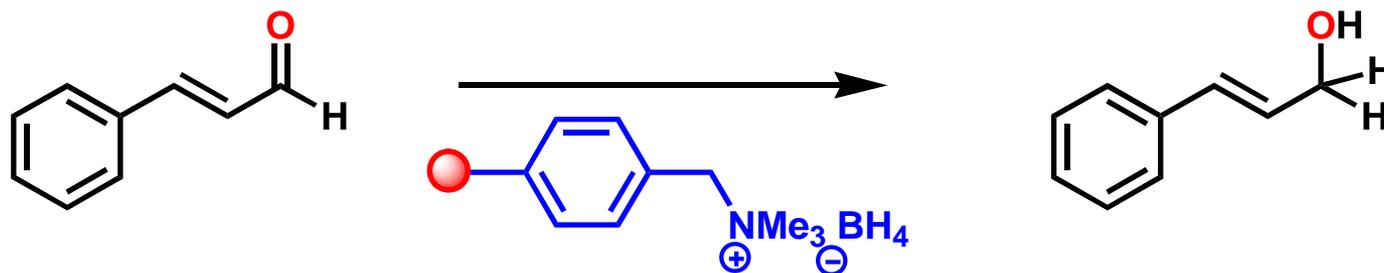
PS-trisamine



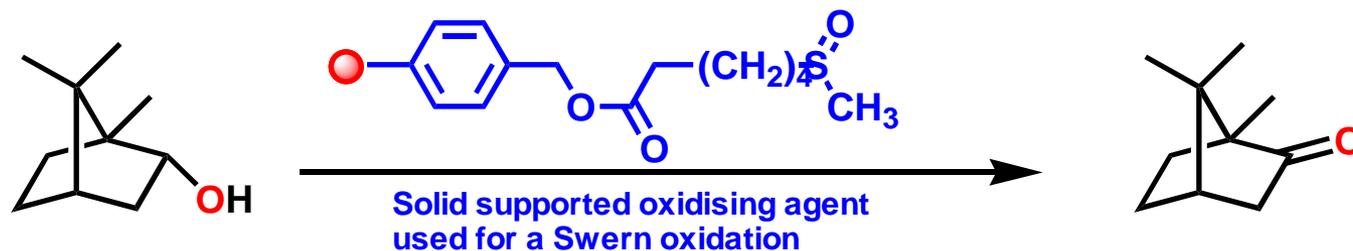
PS-isocyanate

Síntese paralela

Métodos – reagentes presentes em suportes sólidos



Borohydride reducing agent
linked to a solid support resin

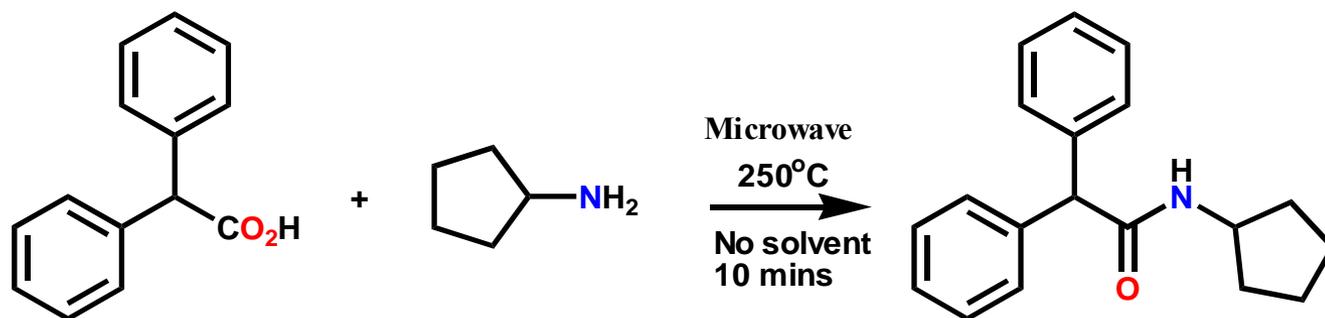


Solid supported oxidising agent
used for a Swern oxidation

Síntese paralela

Tecnologia em microondas

- Geralmente oferece vantagens em relação ao aquecimento convencional
- Reações são geralmente mais rápidas e eficientes
- Grande eficiência na transferência de calor
- Rendimentos algumas vezes são superiores
- Muitas vezes as reações são mais rápidas devido ao aumento de temperatura e pressão.



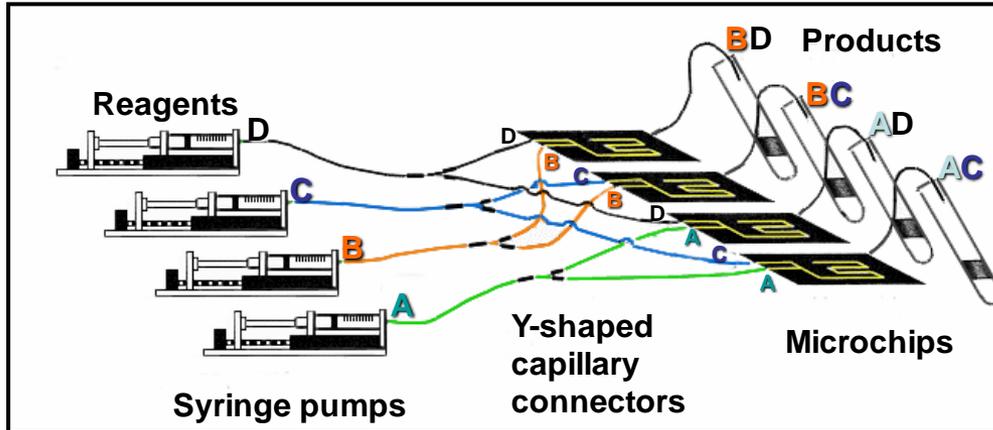
Síntese paralela

Microfluidos

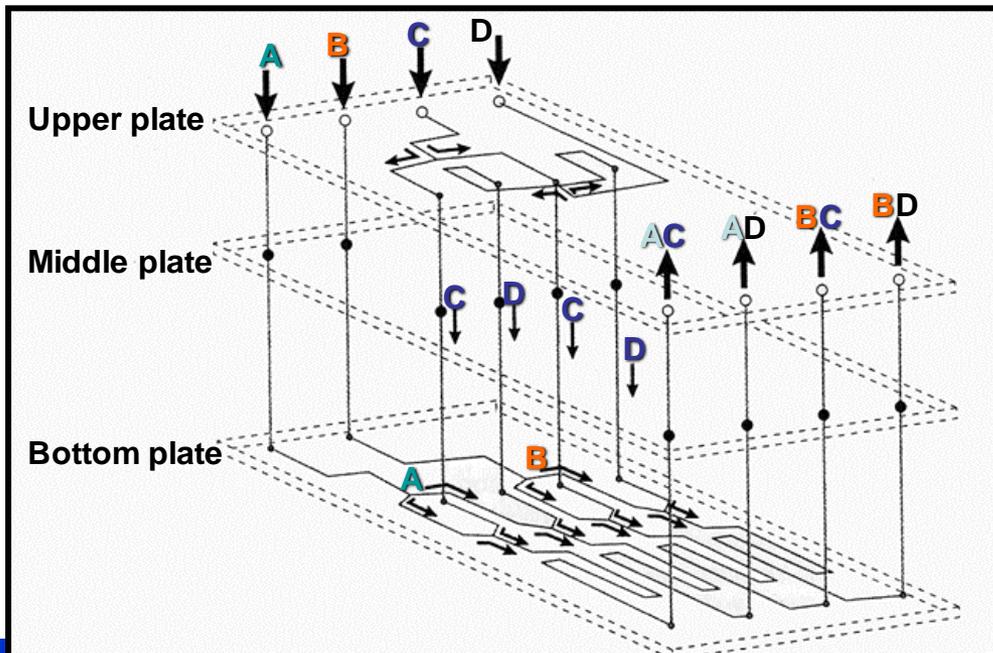
- Manipulação de diminutas quantidades de volumes de líquidos dentro de microchips
- Reações realizadas em microchips utilizando-se microfluidos
- Velocidades reacionais mais rápidas
- Reações algumas vezes ocorrem com maiores rendimentos e com menos subprodutos
- Possibilidade de grande controle de temperatura
- Microreatores permitem síntese paralela em microchips 3D

Síntese paralela

Microfluidos

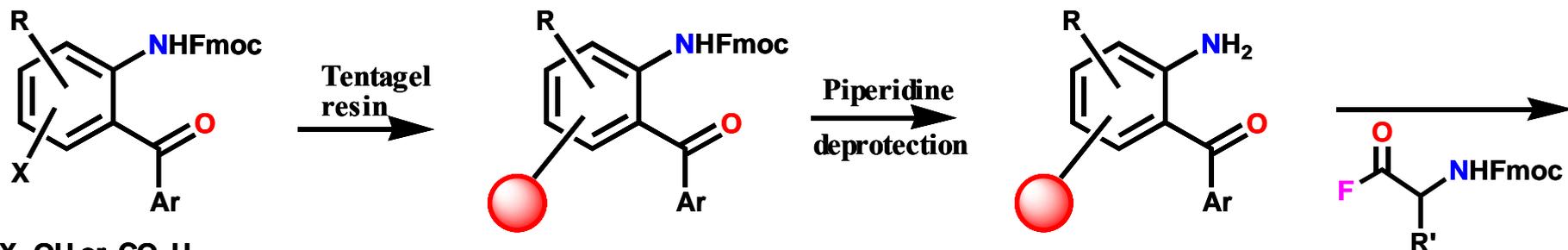


Síntese paralela de 4 produtos utilizando-se 4 microchips

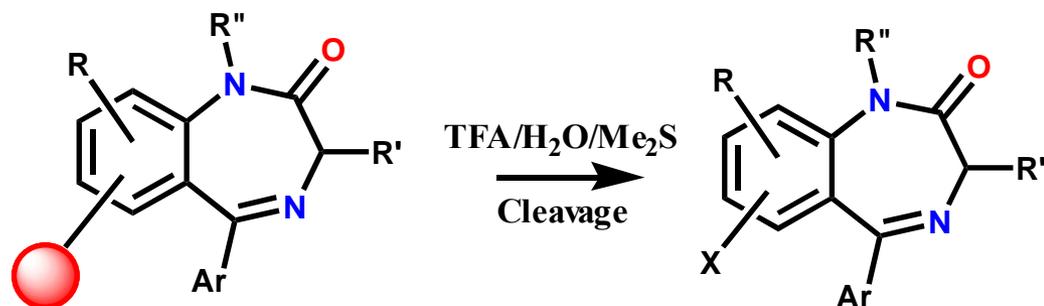
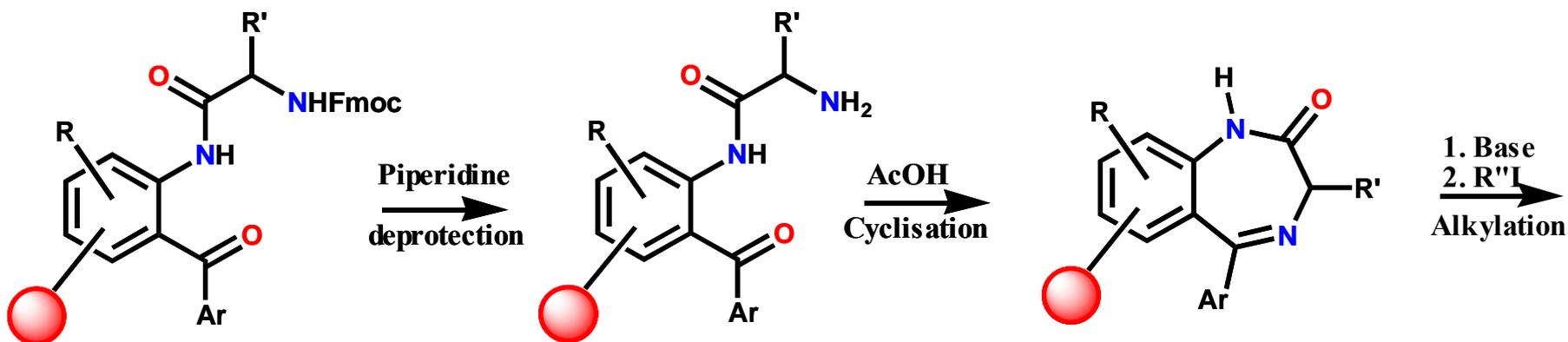


Síntese paralela de 4 produtos utilizando-se um microchip 3-D

Síntese de Heterociclos - 1,4-benzodiazepines

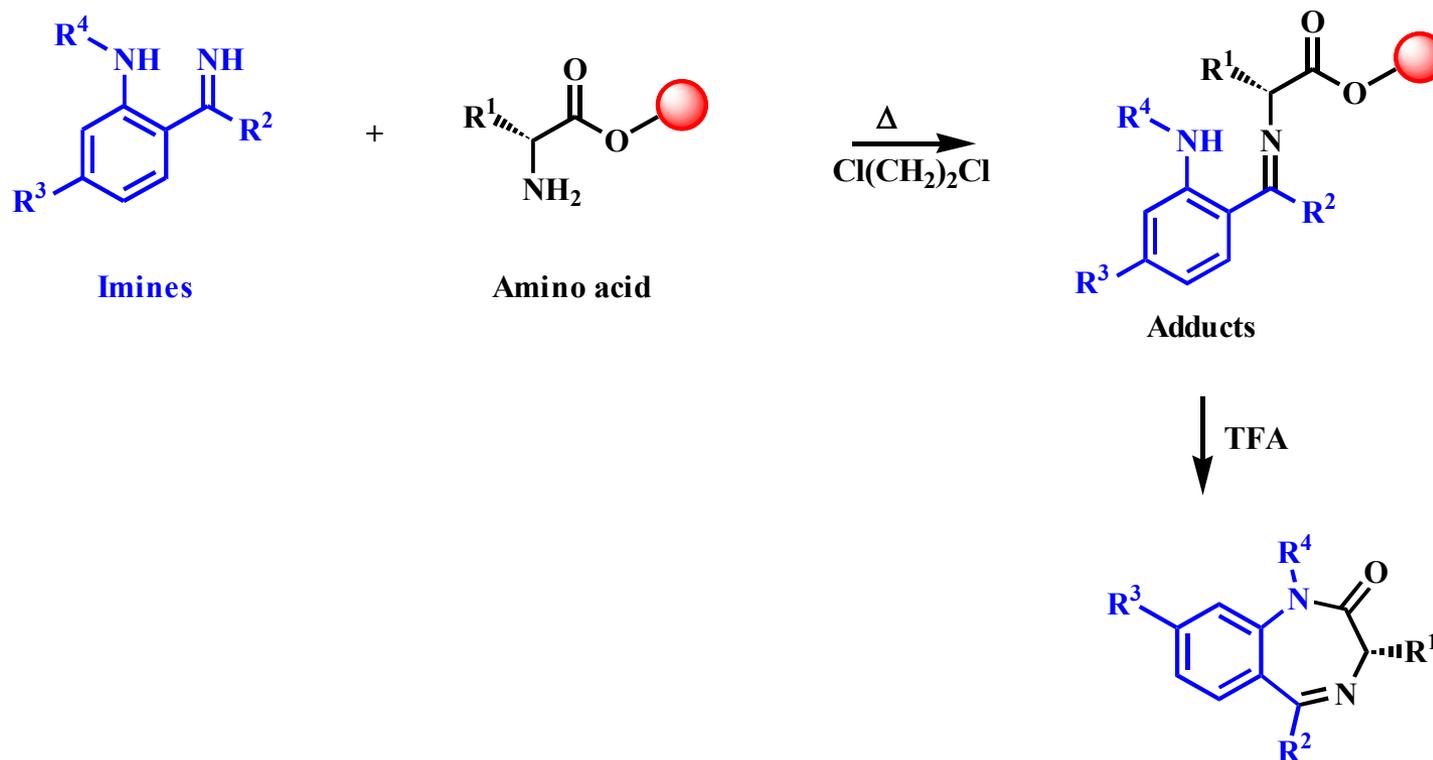


$\text{X}=\text{OH}$ or CO_2H
 $\text{Fmoc}=\text{protecting group}$



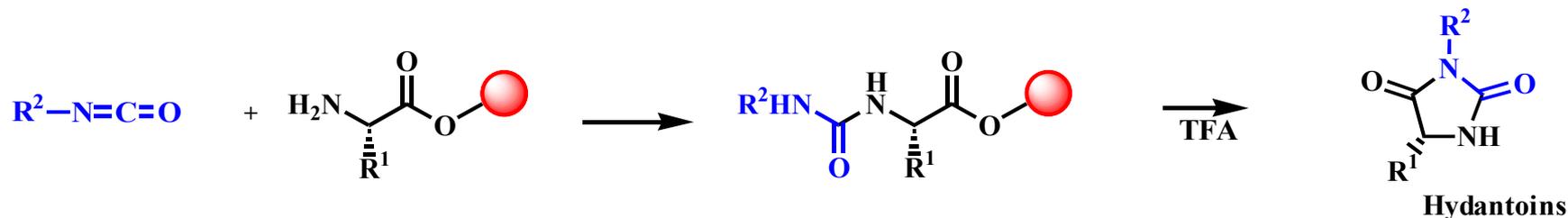
Pontos negativos:
 Produto final deve
 conter $\text{X}=\text{OH}$ ou CO_2H

Síntese de Heterociclos – melhorando a síntese de benzodiazepinas



- Grupo funcional que é clivado da resina participa da ciclização final para formação da benzodiazepina.
- Nenhum grupo indesejável permanece no produto final formado.

Síntese de Heterociclos – síntese de hidantoínas



- O grupo funcional clivado da resina participa da ciclização para formação do produto.
- Assim, nenhum grupo indesejável e sem utilidade permanece na molécula.