



Grundlagen der organischen Chemie II

Kombinatorische Chemie 1

Tim Clark

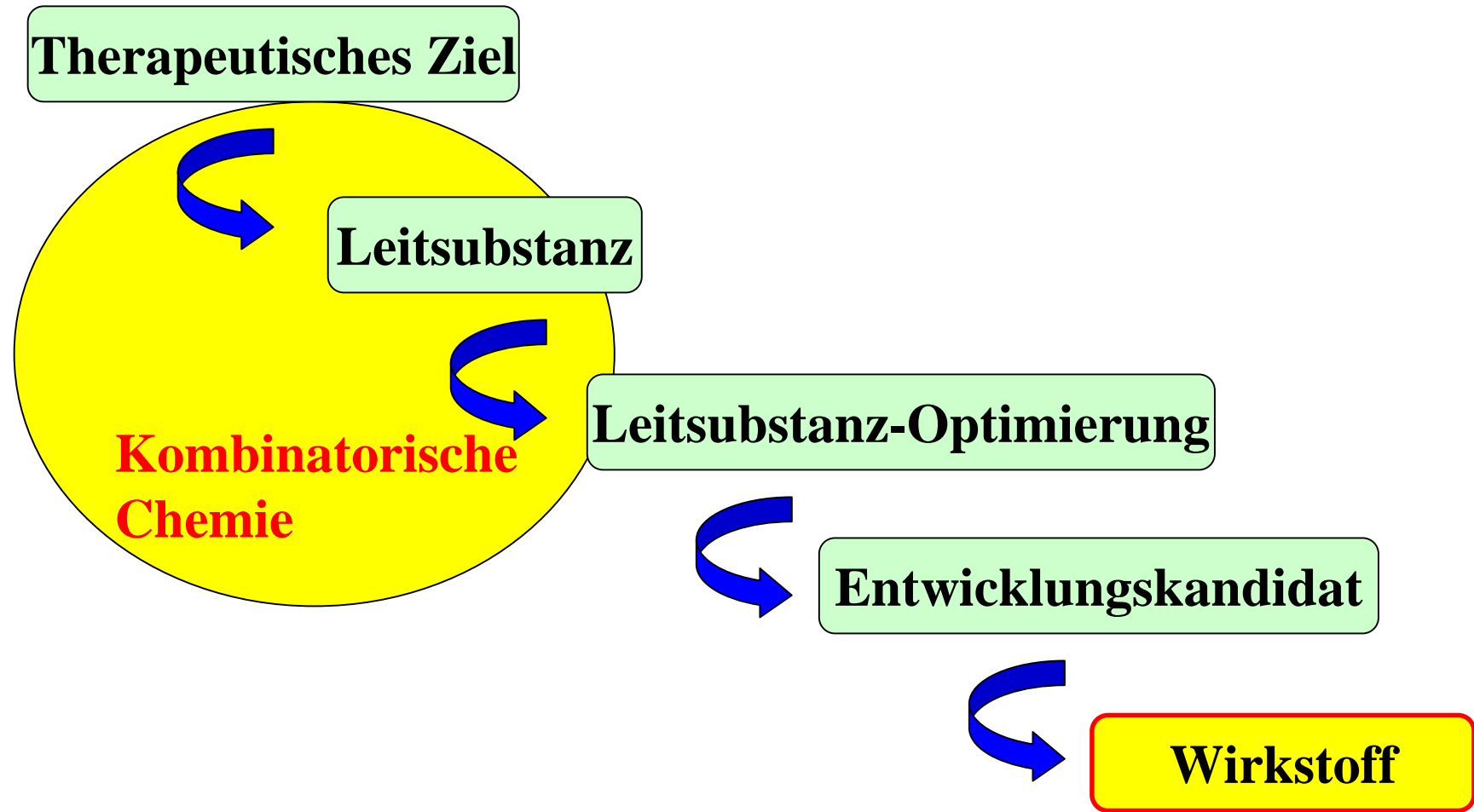
Computer-Chemie-Centrum

Universität Erlangen-Nürnberg

clark@chemie.uni-erlangen.de



Wirkstofffindung



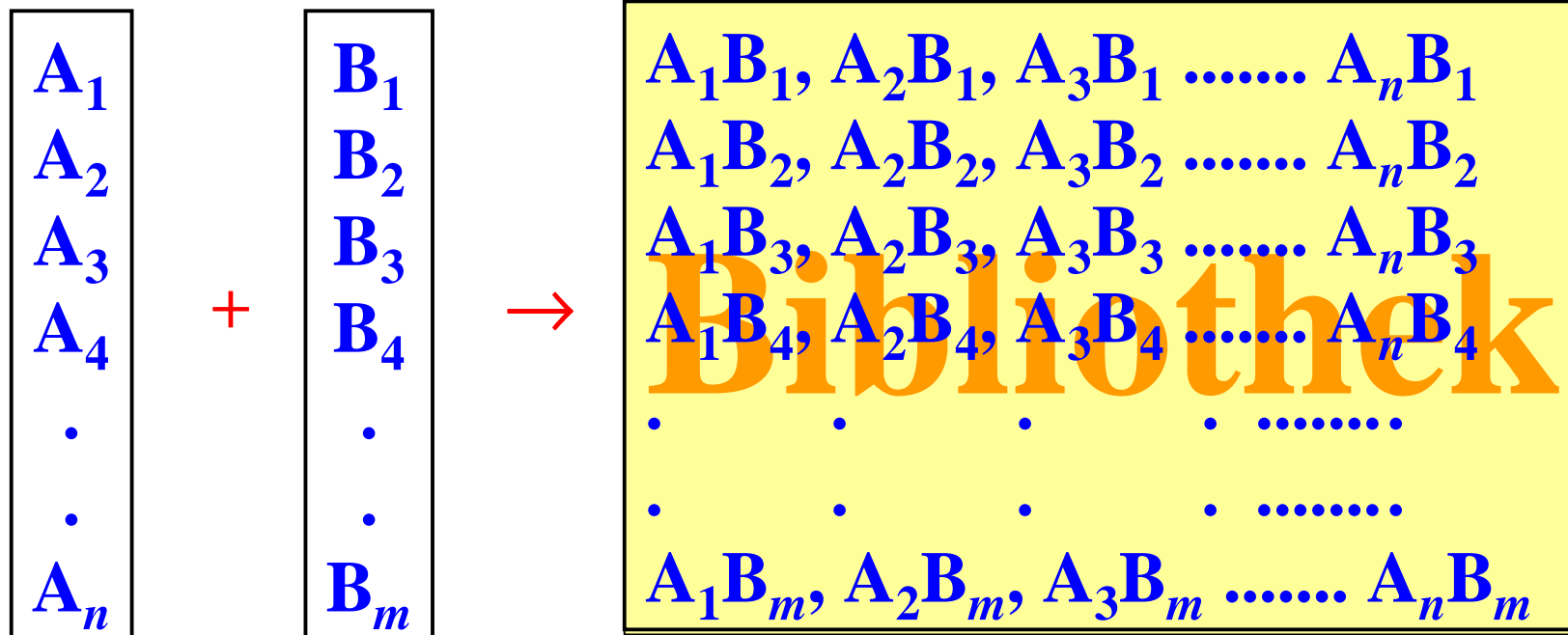


Kombinatorische Reaktionen

- Eine Reaktion:

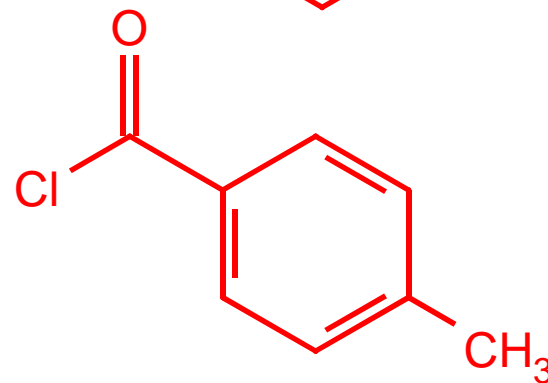
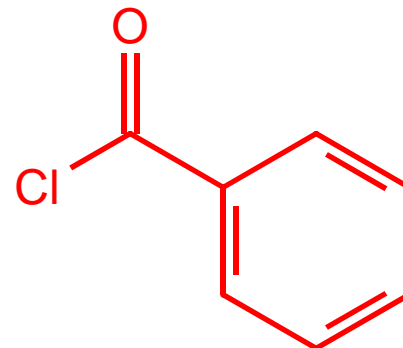
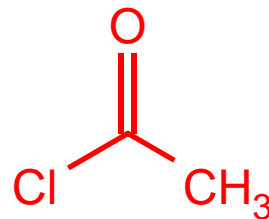
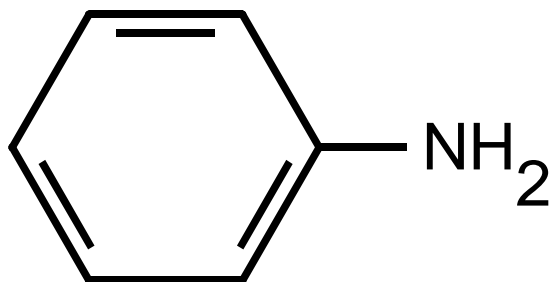
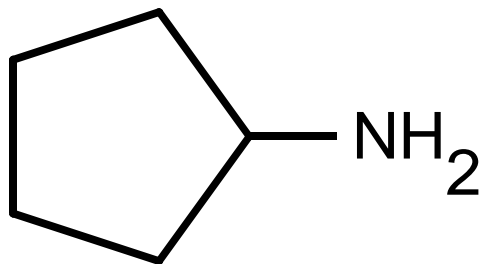
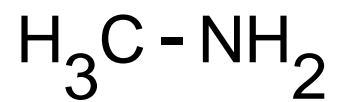


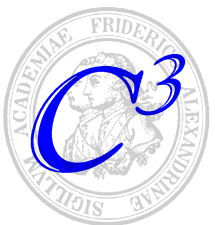
- Eine ($n \times m$) kombinatorische Synthese:



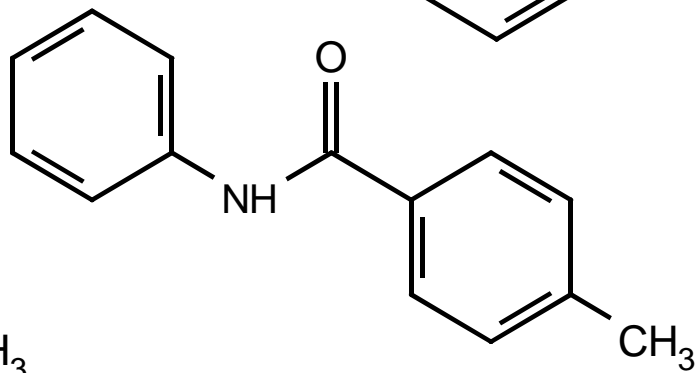
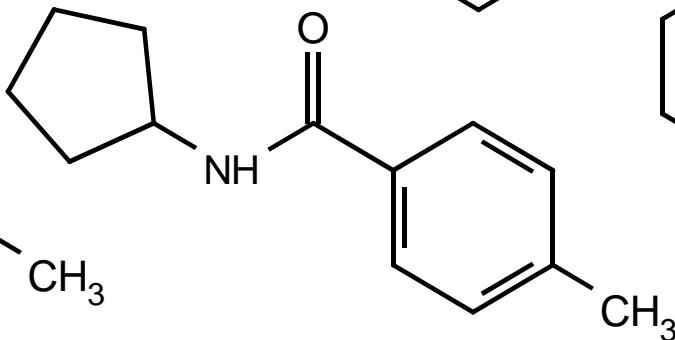
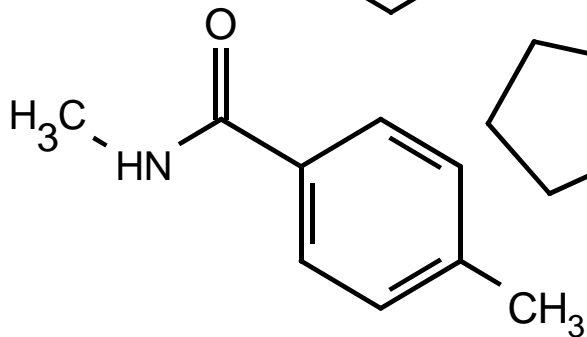
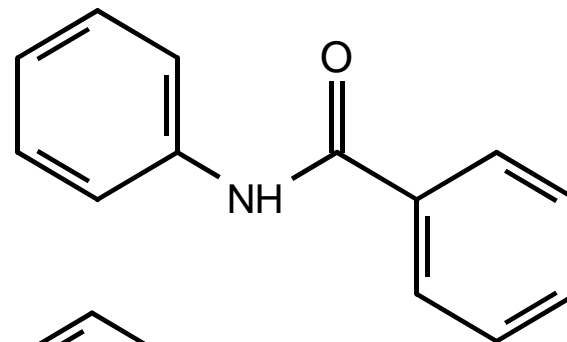
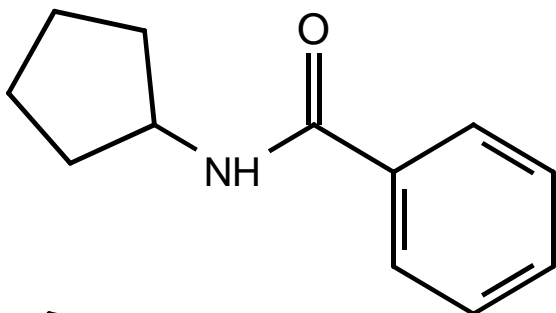
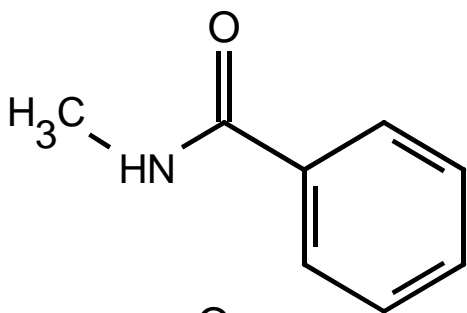
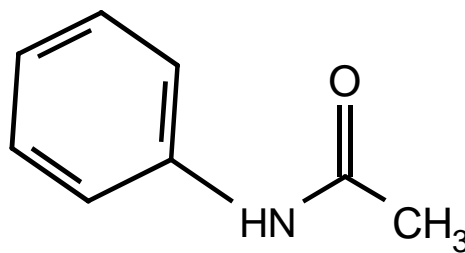
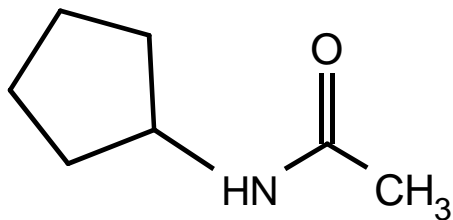
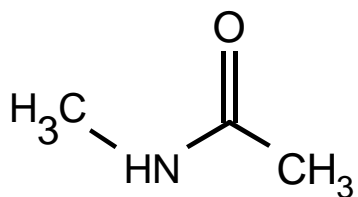


Ein Beispiel





Die 3 × 3 Bibliothek





Probleme

- Synthese muß immer funktionieren-
sonst fehlen Verbindungen
 - Sehr zuverlässige und allgemeine
Reaktionen
 - Synthesemethoden mit hohen Ausbeuten
- → Festphasen-Synthesen
- → Sehr oft Peptid-Bibliotheken



Merrifield-Harz

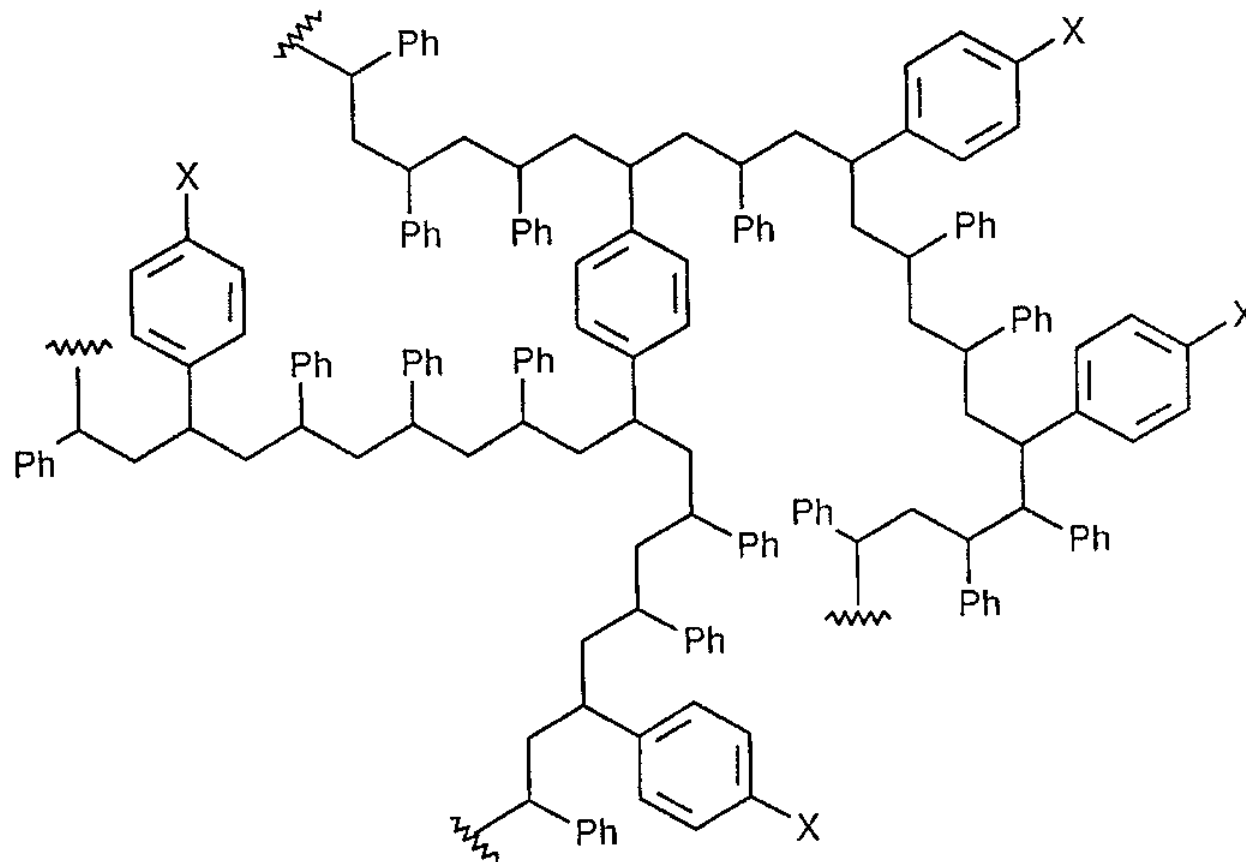


Abb. 2.2 Die molekulare Struktur von Polystyren. Die mit X markierten Gruppen können jede geeignete Funktionalität besitzen, sind aber meist von einer Chlormethyl-Gruppe abgeleitet.

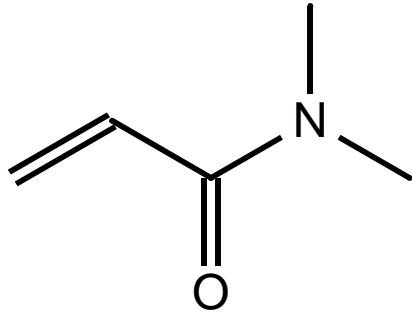


Merrifield-Harz - Nachteile

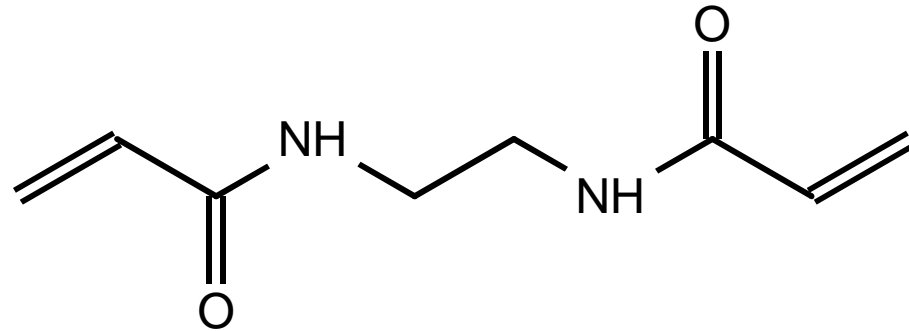
- **Verunreinigungen führen oft zu „falschen“ Bibliotheksmitglieder**
- **Polystyrol ist zu hydrophob**
 - Peptidenden falten zusammen und werden schwer zugänglich
 - Sehr wenig geeignete Lösungsmitteln
 - Biologische Tests am Polymer scheitern
- **Harz soll hydrophiler werden**



Polyamidharze (Sheppard)



Monomer



Vernetzungsreagenz



Funktionalisiertes Monomer

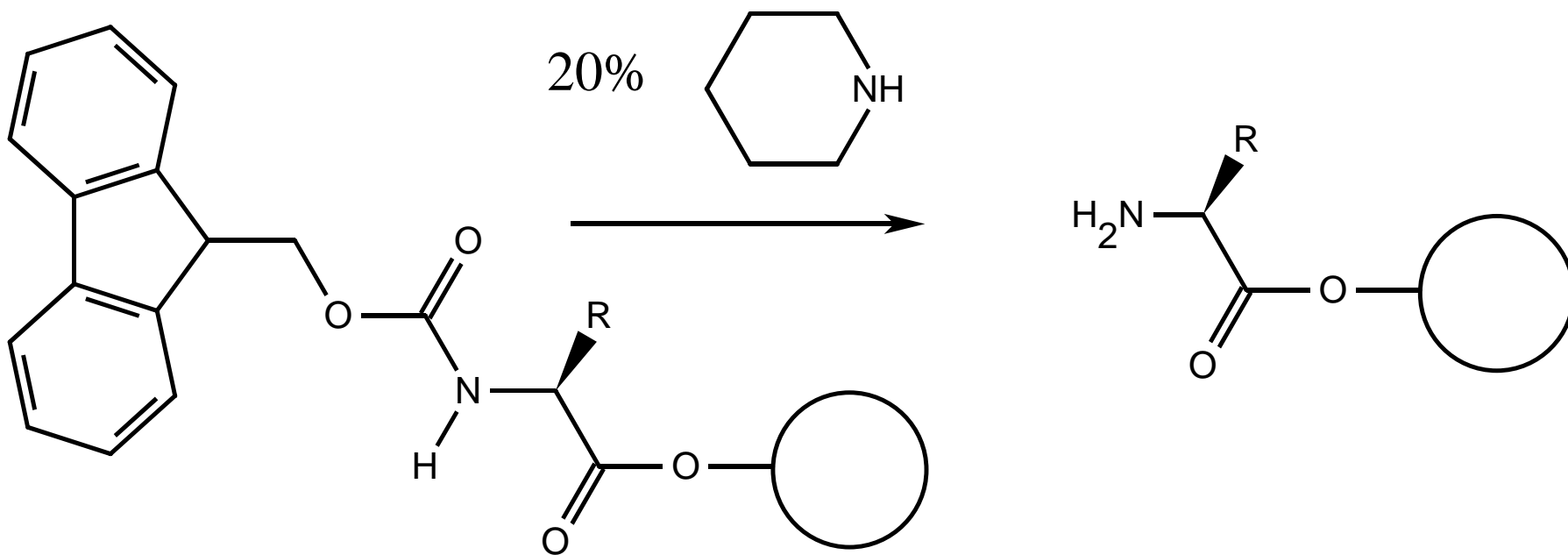


Polyamidharze (Sheppard)

- Quillt in polaren Lösungsmitteln
- Nur begrenzt quellfähig in nichtpolaren Lösungsmitteln wie CH_2Cl_2
- Entfernung der Boc-Schutzgruppe führt aber oft zu Beschädigung des Produktes (ca. 30 Min. mit CF_3COOH reagieren)
- Deshalb wurde die *Fmoc*-Schutzgruppe entwickelt



Fmoc (Fluorenylmethoxycarbonyl)



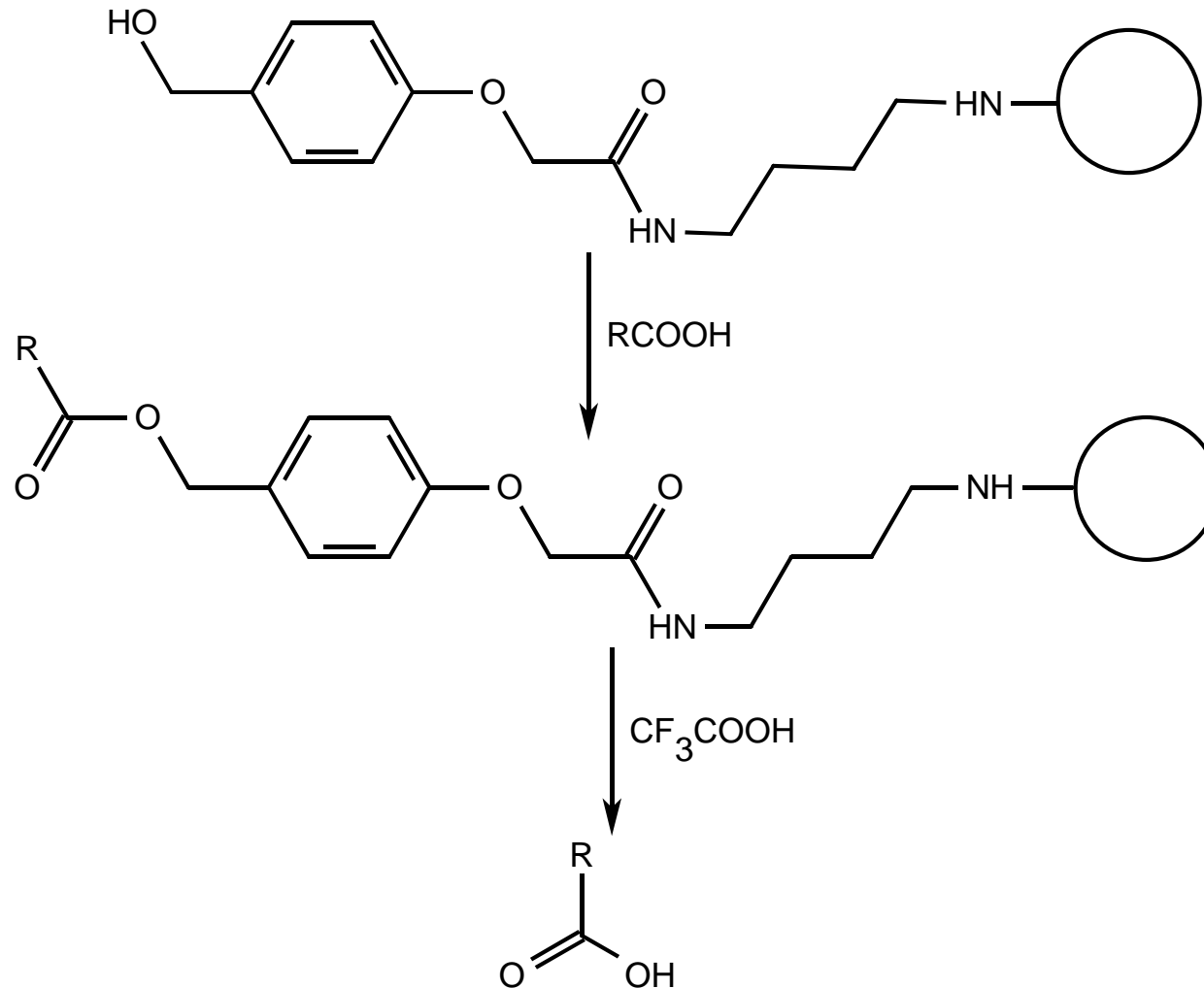


Standard-Methode

- Polyamid-Harz
- Fmoc-Schutzgruppe für *backbone*-Aminogruppen
- Boc-Schutzgruppen für Seitenketten-Aminogruppen
- t-Butylether-Schutzgruppen für Seitenketten-Alkohole
- t-Butylester-Schutzgruppen für Seitenketten-Säuregruppen

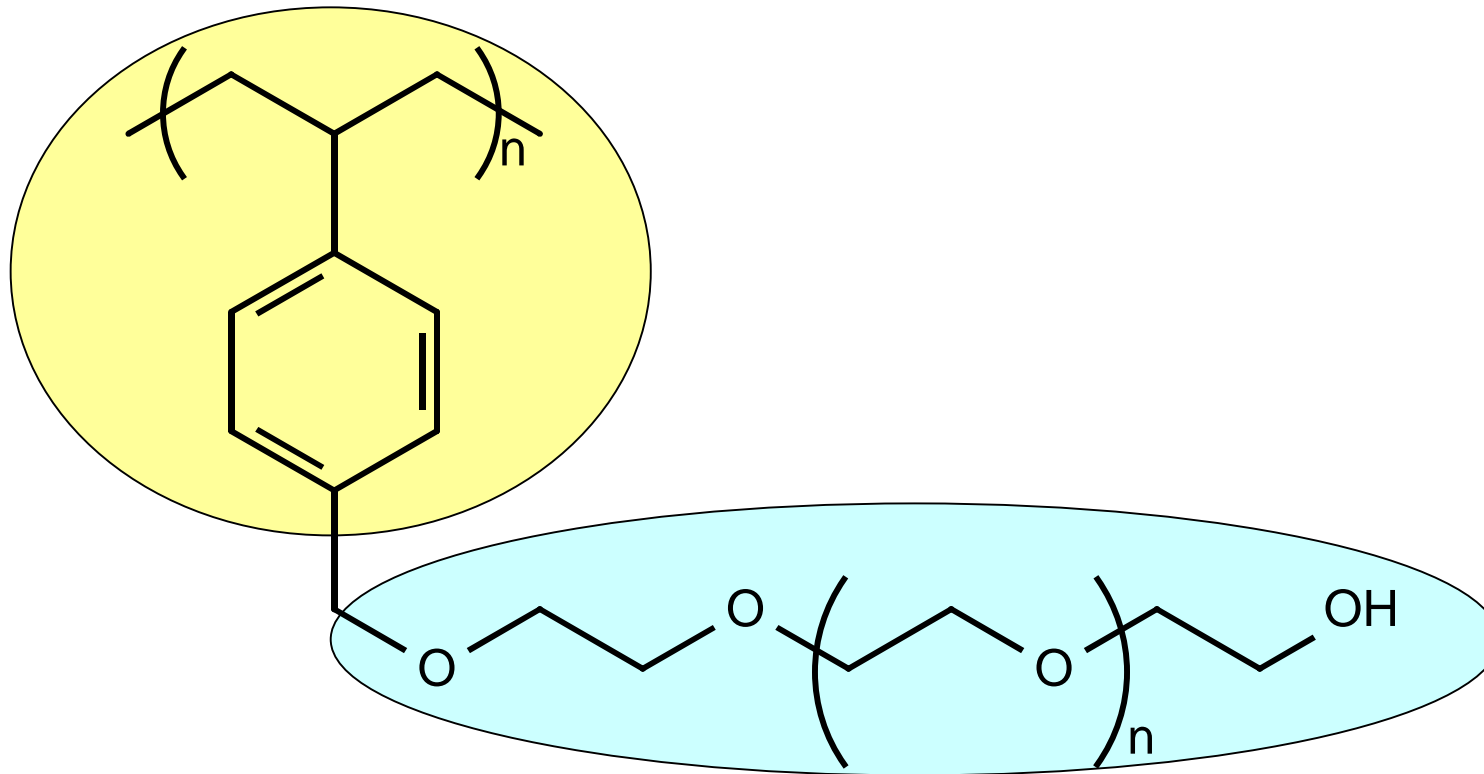


Festphasenlinker – Hydroxymethylphenoxyessigsäure (HMPA)





Alternative Harzsysteme



TentaGel-Harz (Rapp Polymere GmbH)

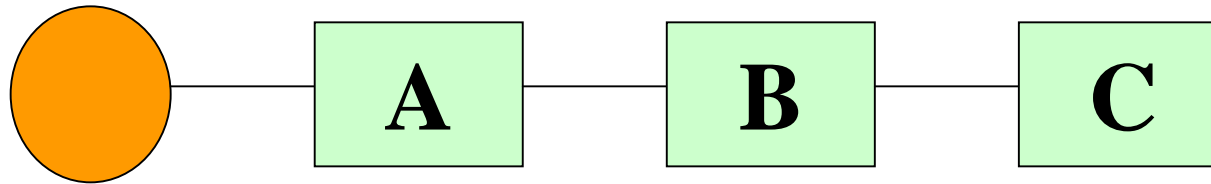


„Split and Mix“

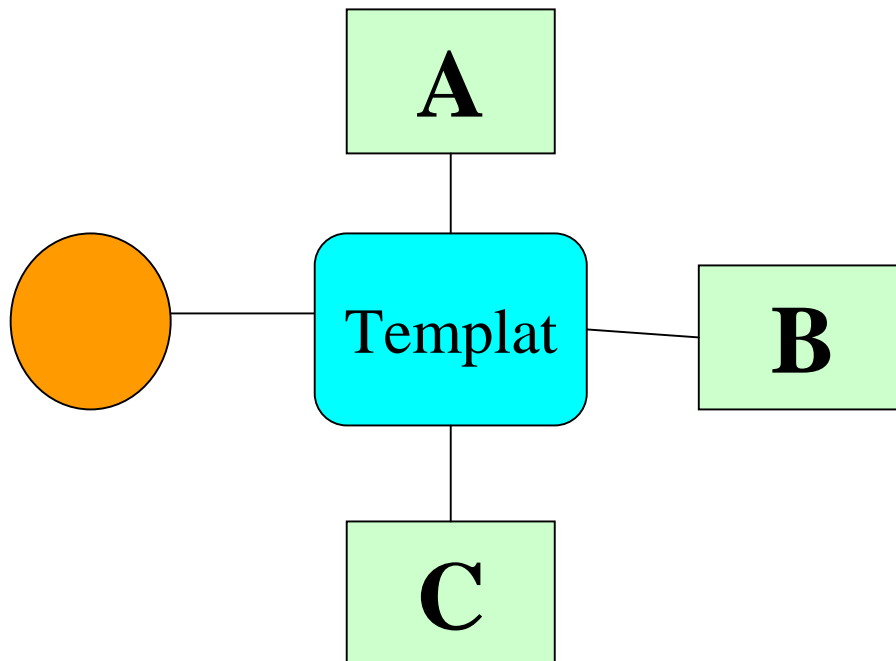
	Gesamtzahl der Verbindungen in einer Bibliothek				
Zahl der Monomere	Dimere	Trimere	Tetramere	Pentamere	Hexamere
3	9	27	81	243	729
5	25	125	625	3125	15625
10	100	1000	10^4	10^5	10^6
20	400	8×10^3	1.6×10^5	3.2×10^6	6.4×10^7
100	10^4	10^6	10^8	10^{10}	10^{12}



Bibliotheken



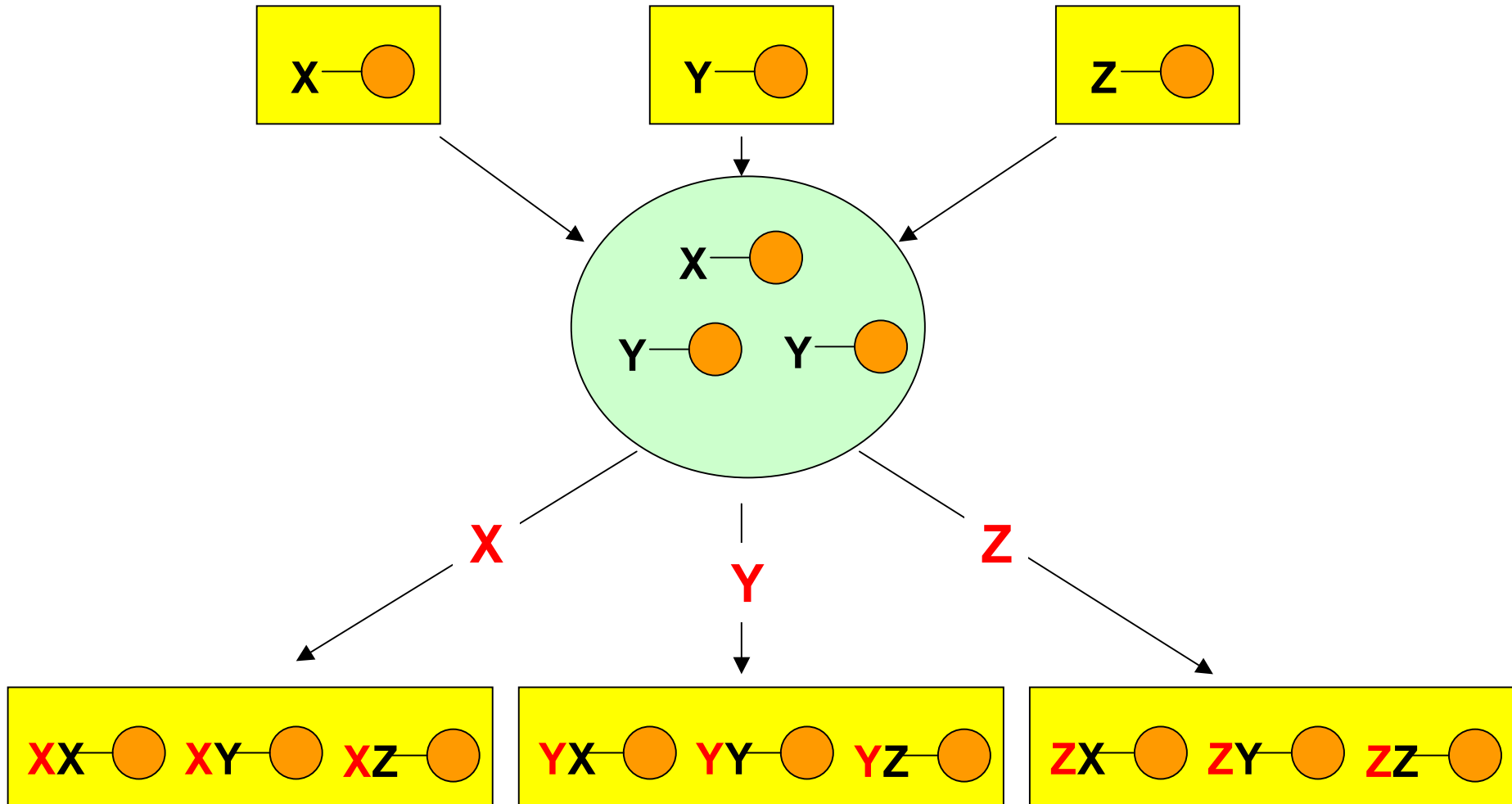
Lineare Bibliothek



Templat-Bibliothek

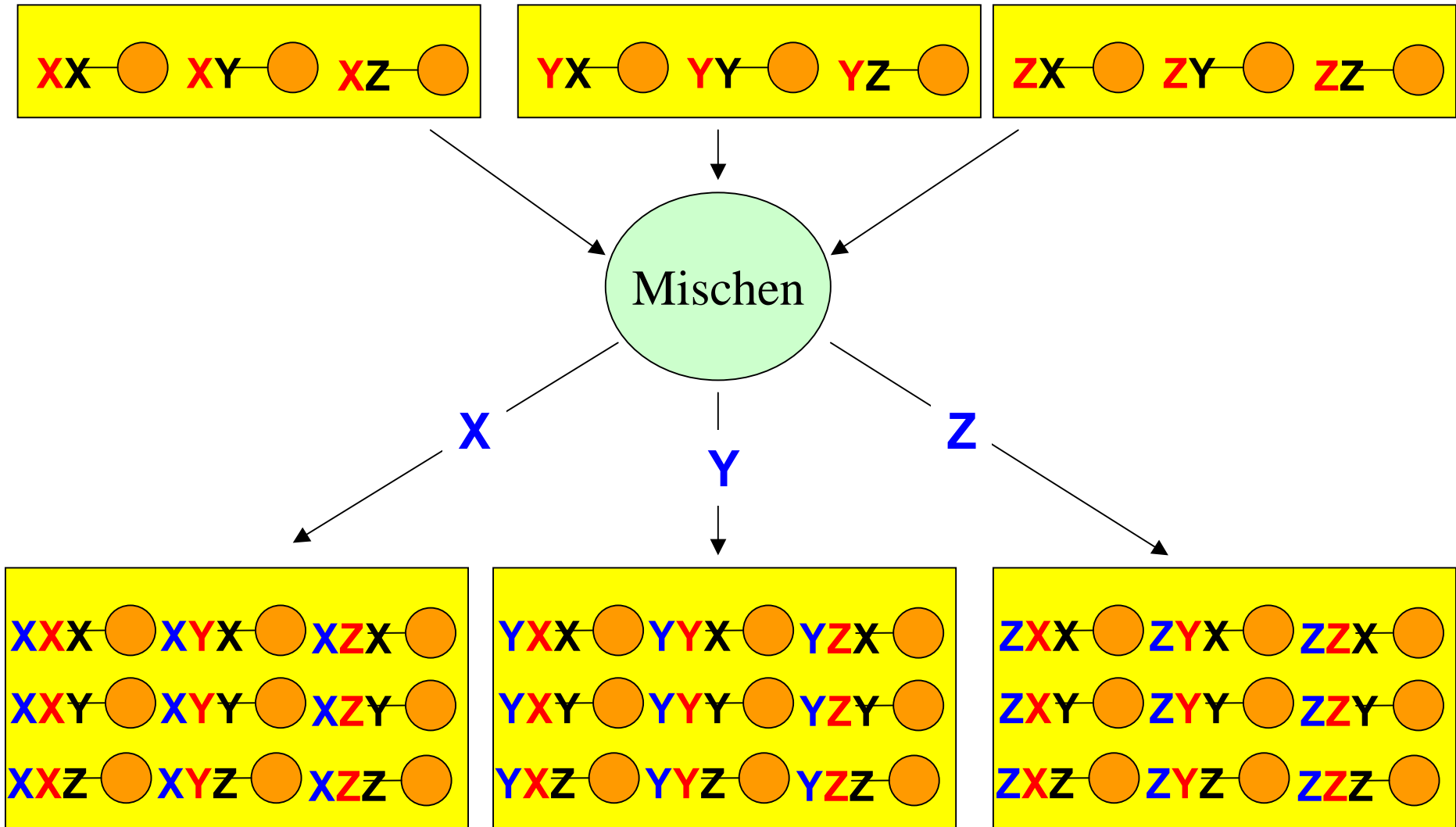


„Split and Mix“



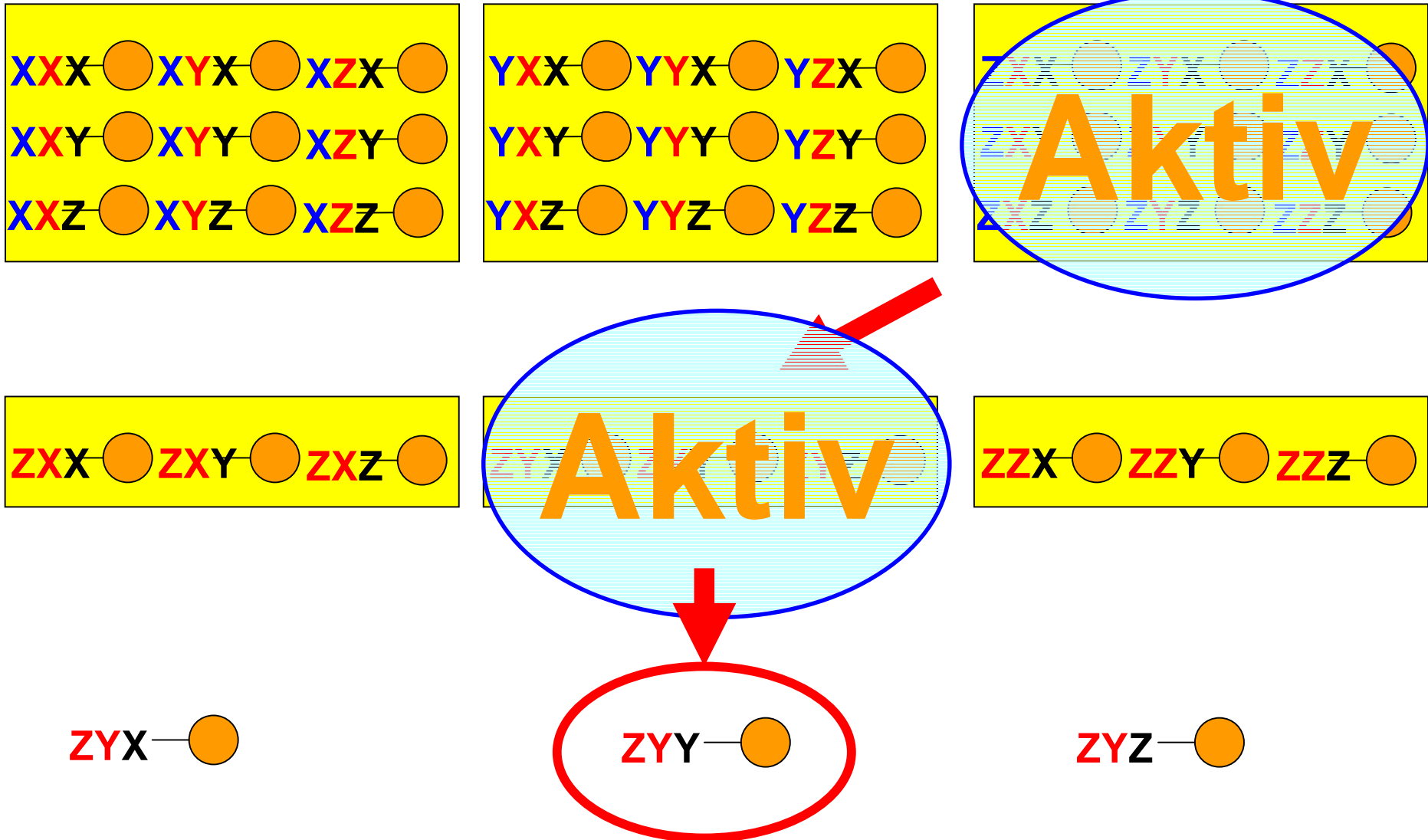


„Split and Mix“





„Split and Mix“ Screening





Eine Peptidbibliothek

16 Aminosäuren (ohne Cystein und Tryptophan)
→ 34×10^6 Verbindungen als 324 Mischungen von jeweils
104.976 (18^4) Sequenzen



Sequenzen wurden vom Harz abgespalten und gegen
Antikörper 19B10 gescreent



Erwies sich als aktivste Mischung



Eine Peptidbibliothek



Erwies sich als aktivste Mischung. Deshalb wurden Bibliotheken von jeweils 5832 (18^3)



Sequenzen synthetisiert.



wurde identifiziert.



Eine Peptidbibliothek



Wiederholung mit 18²- und 18-Sequenz Mischungen führt zu



als aktivste Einzelverbindung.

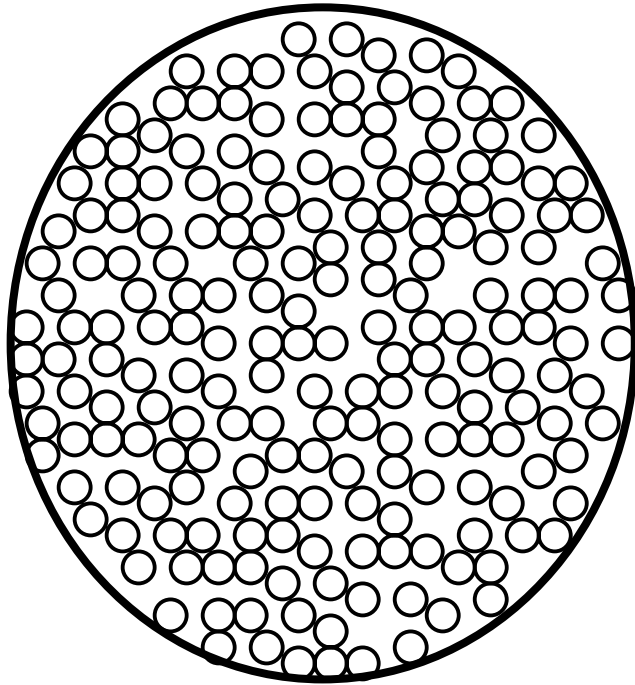


Aktivitätssteigerung

Durchlauf	Sequenz	IC ₅₀ (nM)	N
1	Ac-Asp-Val-XXXX-NH ₂	250	104.976
2	Ac-Asp-Val-Pro-XXX-NH ₂	41	5.832
3	Ac-Asp-Val-Pro-Asp-XX-NH ₂	4,4	324
4	Ac-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-X-NH ₂	0,38	18
5	Ac-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala-NH ₂	0,03	1



„One-Compound-One-Bead“

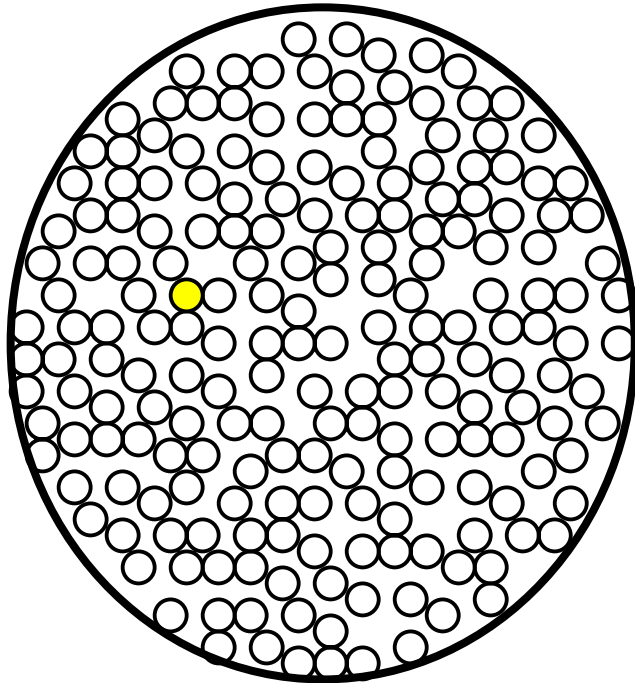


Eine Bibliothek wird durch das „Split and Mix“ Verfahren hergestellt, so daß jedes Mitglied der Bibliothek auf mindestens einen Harzkorn vorhanden sein soll.

Jeder Harzkorn enthält aber eine einzige Verbindung.



„One-Compound-One-Bead“

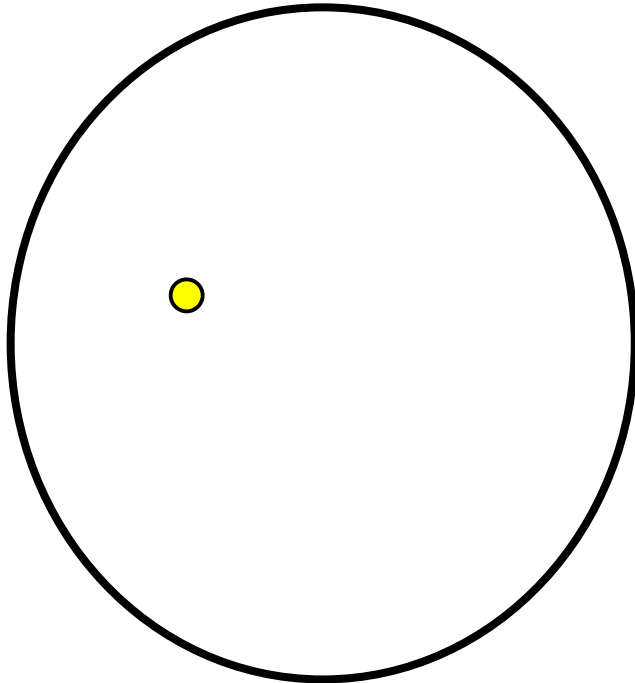


Die löslichen Akzeptormoleküle werden an Fluorescein gekoppelt. Die Harzkörner werden mit dieser Akzeptormoleküle in Lösung behandelt.

Peptide, die stark an das Rezeptormolekül binden, verursachen eine Fluoreszenz des Harzkorns.



„One-Compound-One-Bead“



Fluoreszierende Harzkörner werden isoliert und die Peptidsequenz identifiziert.

2×10^6 Harzkörner lieferten 6 Sequenzen, die besser binden als das natürliche Peptid.



„One-Compound-One-Bead“

	Sequenz	K_i (nM)
Nativer Ligand	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	17,5
Neue Liganden	Tyr-Gly-Gly-Phe-Gln	15,0
	Tyr-Gly-Gly-Phe-Ala	32,9
	Tyr-Gly-Gly-Phe-Thr	36,9
	Tyr-Gly-Gly-Leu-Ser	726
	Tyr-Gly-Ala-Leu-Gln	1980
	Tyr-Gly-Gly-Met-Gln	8780

500×



Nachteile

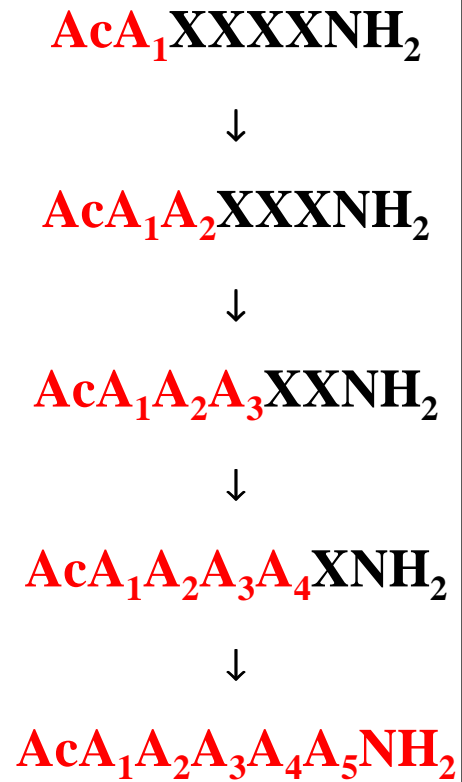
- Screening-Reagenz muß löslich sein
- Peptidsequenz muß am Harzkorn zugänglich sein (Hydrophobie!)
- Bindet die Harzgebundene Sequenz genau so wie die in Lösung vorhandene Konformation?
- Die Natur des *Spacer* beeinflusst die Bindungsaffinität sehr stark

(β -Ala- β -Ala > Gly-Gly > Pro-Pro)



Ligandidentifizierung

Iteratives Verfahren



Positional scanning

