

SVILUPPO DI METODI CHIMICI E BIO-CATALITICI “IN FLOW” PER LA SINTESI DI MOLECOLE BIOLOGICAMENTE ATTIVE



NPCF8 e Premi DCF-Farmindustria 2014

Lo scorso giugno è stata organizzata, dalla Divisione di Chimica Farmaceutica (DCF) e dal Dipartimento di Farmacia dell'Università di Parma, l'8^a edizione del Meeting 'Nuove Prospettive in Chimica Farmaceutica (NPCF)'. Il Meeting,

presieduto da Gabriele Costantino, ha visto la partecipazione di 180 delegati, gran parte dei quali giovani ricercatori dell'accademia e dell'industria.

I Meeting della serie NPCF rappresentano, oramai da più di dieci anni, l'occasione in cui la Divisione di Chimica Farmaceutica offre spazio ai più giovani colleghi per discutere in un ambiente informale, ma molto focalizzato, i risultati delle proprie ricerche.

Come di consuetudine, il meeting è stato aperto da una opening lecture, tenuta da Roberto Pellicciari (TES Pharma, Perugia) che ha proposto la sua visione sulla capacità dell'università e della piccola media impresa innovativa di sostenere progetti di drug discovery. È seguita la plenary lecture di Diego Ardigò di Chiesi Farmaceutici, che si è soffermato sullo sviluppo di terapie biologiche, un argomento di grande interesse e non ancora pienamente coperto nel percorso di formazione universitaria.

Il meeting ha poi visto sei sessioni parallele, ciascuna introdotta da un keynote speaker, in cui hanno relazionato un totale di 42 ricercatori.

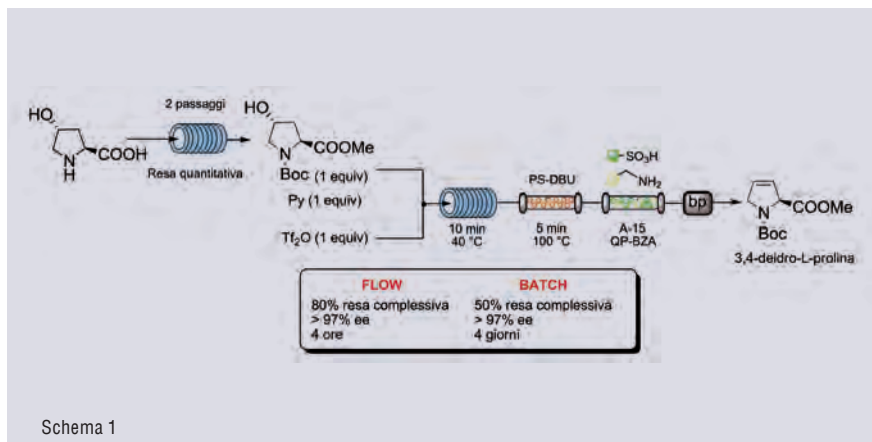
Un interessante highlight della cerimonia introduttiva è stato il conferimento dei Premi DCF-Farmindustria a due giovani ricercatori, provenienti rispettivamente dall'ambito accademico e dall'ambito industriale. I premi per l'anno 2014 sono stati consegnati da Girolamo Cirrincione (Presidente della Divisione di Chimica Farmaceutica della SCI) e da Alessandro Chiesi (membro della Giunta di Farmindustria) a Lucia Tamborini (Università di Milano) e a Maria Pia Catalani (Aptuit Srl, Verona). Le vincitrici hanno poi presentato due brevi conferenze in cui hanno illustrato i principali risultati del loro recente lavoro di ricerca. In queste pagine sono riportati i riassunti di queste due conferenze, unitamente ai curricula delle stesse vincitrici, alle quali vengono rinnovati i complimenti per questo importante risultato ed i migliori auguri per le loro future carriere, anche a nome delle Organizzazioni che hanno sponsorizzato i premi, la Divisione di Chimica Farmaceutica e Farmindustria, e degli Organizzatori di NPCF8.

Daniele Donati

Direttivo della Divisione di Chimica Farmaceutica della Società Chimica Italiana
daniele.donati@nervianoms.com

La tecnologia della sintesi a flusso continuo (*flow chemistry*) rappresenta una delle strategie introdotte negli ultimi anni per aumentare la sostenibilità e l'efficienza della sintesi organica e mostra diversi vantaggi rispetto ai metodi di sintesi tradizionali, come il controllo preciso dei parametri di reazione, la maggiore sicurezza, la riproducibilità, la possibilità di automatizzazione e di effettuare analisi e purificazioni *in-line*¹.

Sulla scorta dell'esperienza fatta durante il dottorato, nel gruppo di Steven V. Ley presso il Dipartimento di Chimica dell'Università di Cambridge, da alcuni anni ho incentrato parte della mia ricerca, che attualmente si svolge nel gruppo del prof. De Micheli presso l'Università di Milano, sullo sviluppo di procedure sintetiche efficienti basate sull'utilizzo di meso-reattori per *flow chemistry*. Il fine ultimo è l'ottenimento di molecole interessanti da un punto di vista farmaceutico e nutraceutico, sfruttando anche l'utilizzo di reattivi immobilizzati e *scavenger*, nell'ottica di ridurre o eliminare lunghi e costosi passaggi di purificazione, migliorando molte procedure tradizionali di sintesi, come illustrato dagli esempi seguenti. La 3,4-deidro-L-prolina opportunamente protetta, è un intermedio fondamentale della sintesi di numerosi composti biologicamente attivi riportati in letteratura, quali inibitori di cistein-proteasi², antagonisti di NK1 umano³ e inibitori del virus dell'epatite C⁴, nonché di molti dei ligandi dei recettori del glutammato progettati nel nostro laboratorio. La sintesi tradizionale richiede almeno 4 giorni lavorativi



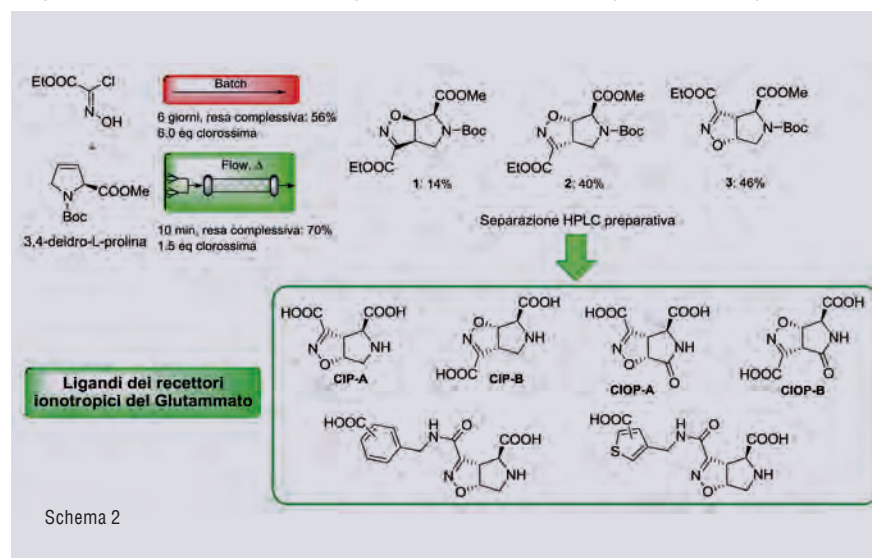
con ripetuti passaggi di *work-up* e purificazioni cromatografiche e prevede l'utilizzo di un reagente tossico quale il difenildiselenuro⁵. Sfruttando la possibilità di pressurizzare il sistema, le reazioni di protezione alla funzione carbossilica e amminica dell'amminoacido di partenza, la *trans*-4-idrossi-L-prolina, sono state effettuate in pochi minuti anziché in ore. Inoltre, facendo fluire la miscela di reazione in colonne contenenti *scavenger*, è stato possibile ottenere il prodotto finale senza ulteriori purificazioni (Schema 1)⁶. Questa ricerca mi ha permesso anche di dimostrare che le condizioni, ottimizzate sulla *trans*-4-idrossi-L-prolina possono essere applicate alla protezione con diversi gruppi funzionali di altri amminoacidi, ottenendoli rapidamente *on-demand*. La generazione del doppio legame della 3,4-deidro-L-prolina è stata effettuata con una reazione di eliminazione, previa attivazione della funzione alcolica come triflato, che è stato sintetizzato in fase omogenea in un reattore tubulare e direttamente fatto reagire con DBU supportata su polimero (PS-DBU). L'eliminazione del triflato è completa in soli 5 minuti e, di particolare rilevanza, non viene intaccata l'integrità stereochimica del centro α -amminoacidico. Il protocollo sviluppato consente di ottenere grammi di 3,4-deidro-L-prolina protetta in circa 4 ore. La drastica diminuzione dei tempi è dovuta sia ad una riduzione considerevole dei tempi di reazione, sia all'utilizzo di reagenti immobilizzati e *scavenger*, che rendono superflue le purificazioni richieste nella procedura tradizionale. In ambito chimico-farmaceutico, le nostre ricerche sono incentrate su progettazione

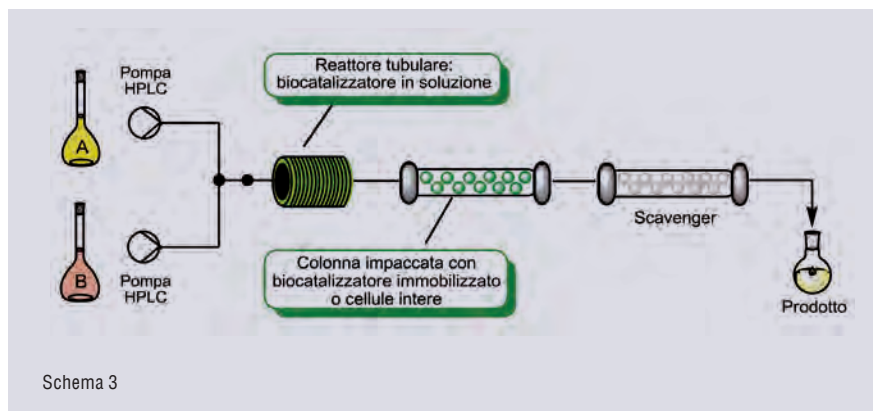
e sintesi di nuovi antagonisti selettivi per i sottotipi dei recettori ionotropici NMDA e KA del glutammato, con l'obiettivo di indagarne il ruolo fisiopatologico. La reazione chiave utilizzata nella generazione del nucleo isossazolinico o pirazolinico, presente in molti derivati, è la reazione di cicloaddizione 1,3-dipolare ad esempio la 3,4-deidro-L-prolina protetta, e un sistema 1,3-dipolare. Pertanto, ho ritenuto interessante e utile mettere a punto la sintesi *in flow* dei suddetti sistemi eterociclici che, successivamente, possono essere opportunamente decorati ottenendo derivati con attività biologica sui bersagli selezionati. Le classiche procedure di cicloaddizione riportate in letteratura presentano rilevanti problematiche, quando coinvolgono dipolarofili poco reattivi: sono necessari tempi molto lunghi nonché l'utilizzo di un largo eccesso di uno dei due reagenti, che influenza in modo negativo il

processo di isolamento e purificazione del derivato desiderato.

La reazione di cicloaddizione 1,3-dipolare, condotta *in flow*, utilizzando diverse clorossime come precursori del dipolo, ha fornito ottimi risultati in termini di incremento di resa e diminuzione dei tempi e dei costi, associati soprattutto alla purificazione⁷. Infatti, sfruttando l'efficiente miscelazione dei reagenti e l'omogeneo riscaldamento ottenibili con l'impiego di un reattore per *flow chemistry*, la reazione ha luogo in soli 10-30 minuti, contro i 3-6 giorni necessari con la procedura tradizionale. Inoltre, la reazione fornisce i cicloaddotti desiderati con buone rese (60-70%) utilizzando solo 1,5 equivalenti di clorossima (4-6 equivalenti nella procedura tradizionale), semplificando notevolmente il processo di purificazione. Un esempio è riportato nello Schema 2. Le condizioni ottimizzate sono state estese a reazioni di cicloaddizione con diversi sistemi 1,3-dipolari e svariati dipolarofili.

Recentemente, in collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Molinari del Dipartimento di Scienze per gli Alimenti la Nutrizione, l'Ambiente (DeFENS) dell'Università di Milano, stiamo sviluppando una piattaforma, basata sull'impiego di trasformazioni enzimatiche in reattori a flusso continuo, che abbiamo chiamato *Flowzyme* (o *Flowcells*, nel caso in cui il biocatalizzatore sia rappresentato da cellule intere). Il principale scopo di questa piattaforma è quello di mettere a punto processi ecosostenibili combinando la tecnologia della *flow chemistry* con la biocatalisi. L'utilizzo di enzimi in reattori per *flow chemistry* consente di superare alcune problematiche





associate a reazioni enzimatiche condotte in modo tradizionale, come i lunghi tempi di reazione, l'inibizione da substrato e/o prodotto e la scalabilità. Abbiamo già valutato diverse modalità di applicazione di biocatalizzatori in meso-reattori, utilizzando enzimi, sia in soluzione o sospensione, sia immobilizzati; abbiamo anche studiato l'impiego di cellule intere, come tali o immobilizzate (Schema 3). Un primo studio in questo ambito è stato la risoluzione cinetica del flurbiprofene catalizzata da una lipasi da *Candida antarctica* supportata su polimero, disponibile in commercio (Novozyme 435), oppure da cellule intere liofilizzate di *Aspergillus oryzae*⁸. Questi biocatalizzatori vengono impaccati in opportune colonne di vetro attraverso cui viene fatto passare il substrato e l'agente esterificante. Sia utilizzando l'enzima puro

immobilizzato che le cellule intere si sono osservati una drastica riduzione dei tempi di reazione e un notevole aumento della produttività. La possibilità di effettuare purificazioni *in-line* ha permesso la separazione del prodotto dal substrato, che è stato poi racemizzato, recuperato e sottoposto nuovamente a risoluzione cinetica biocatalizzata, implementando significativamente l'economia del processo. L'innovativa combinazione della biocatalisi con la tecnologia della *flow chemistry* appare molto promettente. In particolare, l'utilizzo di cellule intere in un reattore per *flow chemistry* consente di combinare i vantaggi di un biocatalizzatore facile ed economico da produrre con una tecnologia in grado di implementare la produttività e la scalabilità dei processi biocatalizzati.

BIBLIOGRAFIA

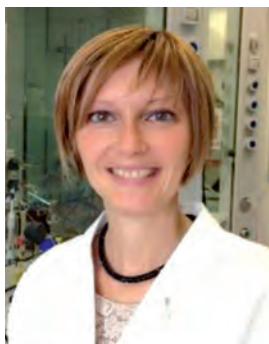
- ¹S.V. Ley, *Chem. Rec.*, 2012, **12**, 378.
- ²Y. Wang *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005, **15**, 1327.
- ³G.J. Morriello *et al.* *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, **16**, 2156.
- ⁴K.X. Chen *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, **44**, 7024.
- ⁵E.S. Greenwood *et al.*, *Tetrahedron* 2003, **59**, 3307.
- ⁶L. Tamborini *et al.*, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2010, **21**, 222.
- ⁷a) S. Castellano *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2010, **75**, 74397; b) S. Castellano *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2011, **54**, 7663; c) L. Tamborini *et al.*, *Arkivoc*, 2013, iv, 377.
- ⁸a) L. Tamborini *et al.*, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2012, **84**, 78; b) L. Tamborini *et al.*, *Tetrahedron Letters*, 2013, **54**, 6090.

LUCIA TAMBORINI

DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACEUTICHE
(DISFARM)

UNIVERSITÀ DI MILANO

LUCIA.TAMBORINI@UNIMI.IT



Lucia Tamborini ha conseguito la Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche (2004) ed il Dottorato di ricerca in Chimica del Farmaco (2007) presso l'Università di Milano, Dipartimento di Scienze Farmaceutiche. L'attività di ricerca, nell'ambito del Dottorato, è stata in parte svolta (2006-2007) presso l'Innovative Technology Centre, diretto dal Prof. S.V. Ley, Department of Chemistry, University of Cambridge, UK. Nel periodo 2007-2012, è stata titolare di un assegno per la collaborazione alla ricerca nell'area disciplinare "Scienze Farmaceutiche e Farmacologiche", lavorando su un progetto dal titolo: "Progettazione, sintesi, valutazione dell'attività farmacologica e discussione delle relazioni struttura/attività di nuovi antagonisti chirali dei recettori ionotropici NMDA dell'acido glutammico", risultando poi (2012) vincitrice del concorso per un posto di Ricercatore a tempo determinato del settore scientifico-disciplinare 03/D1 presso il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Milano.

Le principali tematiche di ricerca riguardano: a) lo studio di metodologie sintetiche innovative basate sull'utilizzo di un reattore per *flow chemistry*, in combinazione con l'impiego di reattivi supportati, enzimi e *scavenger*, per l'ottenimento di molecole biologicamente attive; b) la progettazione, sintesi e studio delle relazioni struttura/attività di analoghi a ridotta libertà conformazionale di amminoacidi endogeni (glutammato, aspartato, e GABA) quali agenti neuroprotettivi e anticonvulsivanti; c) la progettazione e la sintesi di inibitori enzimatici come agenti antiparassitari e antitumorali.

La sua attività scientifica trova riscontro in 37 pubblicazioni su rinomate riviste a diffusione internazionale peer reviewed e indicizzate.