



Dormán György

■ TargetEx Kft., SZTE Gyógyszerésztudományi Kar

A kombinatorikus kémia tündöklése, hanyatlása és újjászületése

Hatása a modern gyógyszerkutatásra | I. rész

Cikksorozatunkat Furka Árpád professzornak ajánljuk közelgő 90. születésnapjára a kombinatorikus kémia történetében betöltött, nemzetközileg elismert, úttörő szerepéért.

Négyrészes sorozatunkban a gyógyszerkutatás elmúlt 25 évében komoly szerepet játszó kombinatorikus kémia felmerülését, virágzását, hanyatlását, végül újjászületését kívánjuk bemutatni kitekin-téssel a hazai szakmai műhelyek hozzájárulására is.

Előzmények és kezdetek: a kombinatorikus kémia felmerülése, okai, létjogosultsága

A 90-es évek elején még évente kb. 50 új kémiai szerkezetet (NCE, new chemical entity) tartalmazó gyógyszert törzskönyveztek, az új évezred első évtizede második felében viszont ez a szám 20 alá került. A 90-es évek eleje óta évente törzskönyvezett új kémiai entitások stagnáló számát növekvő számú biológiai szűrésre bocsátandó molekulával kívánták újra növekvő pályára állítani. A stagnálás mellett a K+F ráfordítások is jelentősen emelkedtek az évek során. Ezt részben annak tudták be, hogy az a kémiai tér, ami a biológiai szűrés rendelkezésére állt, nagyon szűk volt.

A nyilvánvaló innovációs deficit eredményeként a gyógyszereszektor nagy erőket mozgósított új megközelítések, koncepciók és technológiák kifejlesztésére, hogy növeljék a felfedezés sikerarányát. Az új feltörekvő technológiák sorába tartozott a nagy kapacitású biológiai szűrés kifejlesztése. Eközben a 2000-es évek elejére a humán génállomány feltérképezésével 5–10 000 új célfehérje került be a gyógyszerkutatás folyamatába; melyek közül 1000–1500-ra becsülték a betegségállapottal kapcsolatba hozható és egyben kismolekulával befolyásolható (druggable) molekuláris fehérje célpontok (targetek) számát. Ez tovább növelte a nagy gyógyszergyárak molekula-

igényét, ill. a fehérje-célpontok különbözősége magasabb kémiai diverzitást is követelt.

A kombinatorikus kémia (röviden kombi-kem) csaknem 30 éves múltta tekint vizs-sza. Piaci igényét az előbb vázolt, több ok-ból megnövekedett molekulaigény hozta létre.

A gyógyszerkutatásban a 90-es évek kö-zepétől kezdve egyre elterjedtebben hasz-nálták a nagy molekulagyűjteményeket, pél-dául a historikus molekulabankokat, kombinatorikus könyvtárakat vagy az ezekből a szerkezeti sokszínűség szerint kiválasztott kisebb vegyülettárakat mg-nyi meny-nyiségben.

Az új gyógyszerek kifejlesztésére használt molekuláris mozgásteret általában 10^{18} és 10^{200} közé teszik a különböző közle-mények. *Bohacek* és munkatársai [1] 10^{63} gyógyszerjellegű (< 30 nem-hidrogénatom, molekulatömeg < 500 Dalton; C-, N-, O-, P-, S-, F-, Cl- és Br-atom) molekulát becsül. *Drew* és munkatársai [2] ennél kisebb szá-mot becsülnek (<100 szénatom, $3,4 \times 10^9$). A hiányzó molekulaszámot (20–25 millió ilyen vegyületet) a kombinatorikus kémia volt hivatott előállítani. A szintetikusan elérhető kémiai teret 10^{20} és 10^{24} vegyület kö-zé becsülik (400 kémiai reakcióval és kereskedelmi forgalomban elérhető építőele-mekkel számolva), míg az előállított szerves vegyületek számát akkoriban 10^8 -ra tették. Később *Reymond* és munkatársai megalkották a lehetséges kémiai teret lefedő univerzális könyvtárát. A virtuális, GDB-13 könyvtár 977 millió szerves molekulát tartalmaz (C, N, O, S, Cl ≤ 13 atom) kémiai stabilitás és szintetikus megvalósíthatóság figyelembevételével. [3]

A 90-es évek közepére a molekuláris bio-lógia fejlődése lehetővé tette a DNS-klóno-

zást és fehérjekifejeződést (expressziót). A nagy áteresztőképességű biológiai szűrés (HTS) elterjedését a rekombináns fehérjék rutinszerű elérhetősége tette lehetővé, és így lehetőség nyílt a fehérje-célpontokon nagyszámú kismolekula biológiai aktivitá-sának szűrésére reális időtartam alatt. Ez 100–200 000 adatpont/nap/teszt áteresztő-képességet jelent a klasszikus 96 lyukú mik-rotititer-lemezekben, de a miniaturizált tech-nológiákkal (nanoliter térfogatban, mikro-gramm vegyületigénnyel 384, ill. 1536 lyu-kú lemezekben) ennek sokszorosát is el le-het érni. Megjegyzendő, hogy a klasszikus 96 lyukú lemez 8×12 -es elrendezése *Ta-kátsy Gyula* magyar virológus nevéhez fű-ződik az 1950-es évekből. [4] Míg naponta 10–50 körüli mintát tudtak manuálisan szűrni, a lemezek mozgatásának, a minta adagolásnak, [5] és a lemezek leolvasásának automatizálása eredményeként napi több tízezer minta aktivitásának mérésére nyílt lehetőség.

A szerves kémiai szintézisek tekintetében hasonló hatékonyságnövekedés vált szük-ségessé, hogy ezt a magas mintaszámot el lehessen érni. A 90-es években egy hagyomán-yos gyógyszerkémikus évente átlago-san 40–50 különböző szerkezetű kismole-kulát állított elő egyedi szintézissel. [6] A kombinatorikus (és párhuzamos) kémia rea-gensek sorozatával izoláltan vagy keverék-ben nagyszámú analóg vegyületet tudott elkészíteni az alábbi képlet alapján.

Hagyományos reakció: $A + B \rightarrow A-B$

Kombinatorikus kémia:

$A(1-n) + B(1-n) \rightarrow A(1-n)-B(1-n)$

A kombi-kem a 80-as évek végén a szilárd fázisú peptidkémiai kiindulva fejlődött ki. Lényegében olyan molekulasoro-zatok, -könyvtárak előállítását jelenti, ame-



lyekben a szintézissorban minden felhasználható és rendelkezésre álló molekuláris építőelem minden lehetséges kombinációja képviselve van. [7] A kombinatorikus koncepció szerint az így előálló nagyszámú vegyület jobban kitölti a kémiai teret. A kombikem a biológiai rendszerek működéséhez hasonló alapelveken nyugszik; beleértve a diverzitást és funkcionalitást, és a nagymértékű változatosság teszi lehetővé a legalkalmasabb kiválasztódását.

A kezdeti innovációk kora („sok vegyületet, gyorsan”)

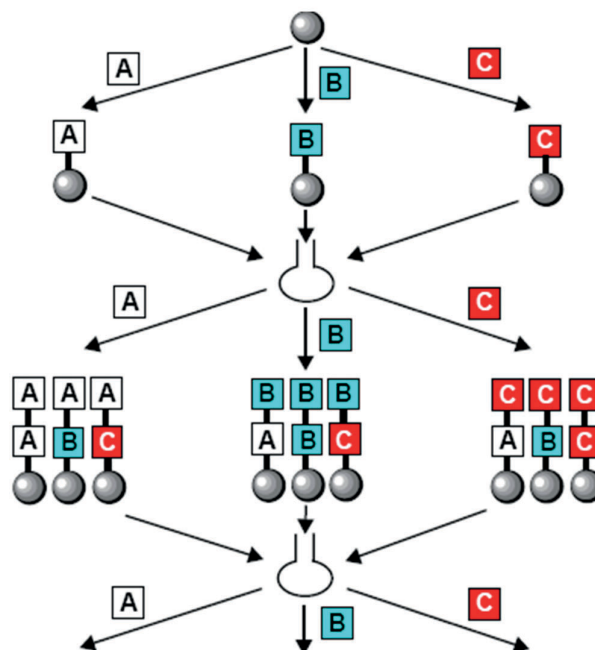
A kombinatorikus és párhuzamos kémia alapelveit több helyszínen egymástól függetlenül közel egy időben fektették le. Mind egyik gyökere a szilárd fázisú peptid- és oligonukleotid-szintézisekben keresendő, ami elsősorban Merrifield 1960-as években megvalósított úttörő munkájához kapcsolódik. [8] A korai idők számos igen kreatív fejlesztést eredményeztek, amelyek egy része azóta már inkább tudománytörténet.

Közjegyzői dokumentumok alapján úgy tekintjük, hogy a kombikem legfontosabb alapelveit elsőként Furka Árpád professzor (ELTE) fektette le a világon a 80-as évek elején [9, 10] a szilárd fázisú peptidszintézisek tapasztalatai alapján, ahol egyetlen univerzális kapcsolási reakció rendszeres ismétlésével az aminosavsorrend tetszőleges kombinációját lehetett elérni azok keverékeként.



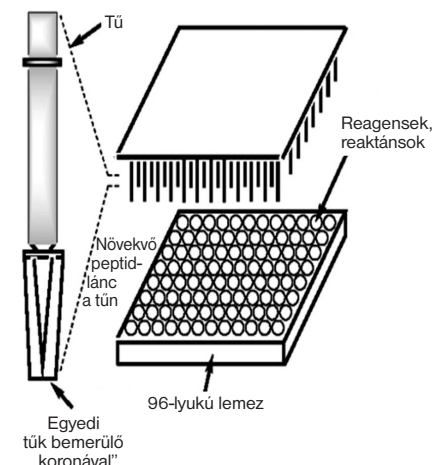
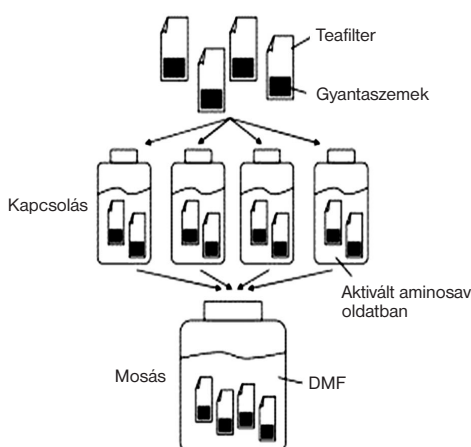
Furka Árpád

Felfogni is képtelenség, hogy például a 245 aminosavat tartalmazó peptidek esetén, amelyekben minden egyes pozícióban a 20 természetes aminosav valamelyike lenne beépítve, ez elméletben összesen 20^{245} ($= 5,65 \times 10^{318}$) különböző szekvenciát jelentene, a kapcsolási lépések számáról nem is beszélve, ha egyedi szintézisben állítanánk elő. Mégis a Furka-féle, ún. osztásos-keveréses eljárás szerint a tetrapeptidek ekvimoláris keverékének előállítása csupán 80 reakciólépést igényelne. Ez esetben a keverék a 20 különböző aminosav összes lehetséges variációját, 160 000 különböző tetrapeptidet tartalmazna. Az eljárás lénye-



1. ábra. Osztásos-keveréses kombinatorikus technológia

2. Ábra. „Teafilter” (balra) és többszörös tűsoros (jobbra) technológiák (DMF = dimetilformamid)



ge, hogy minden egyes peptidkapcsolás után (amit akár 20 aminosavval is külön, de párhuzamosan végeztek el) a terméket összekeverik, majd annyi részre osztják, ahány aminosavval kívánják kapcsolni a következő lépésben.

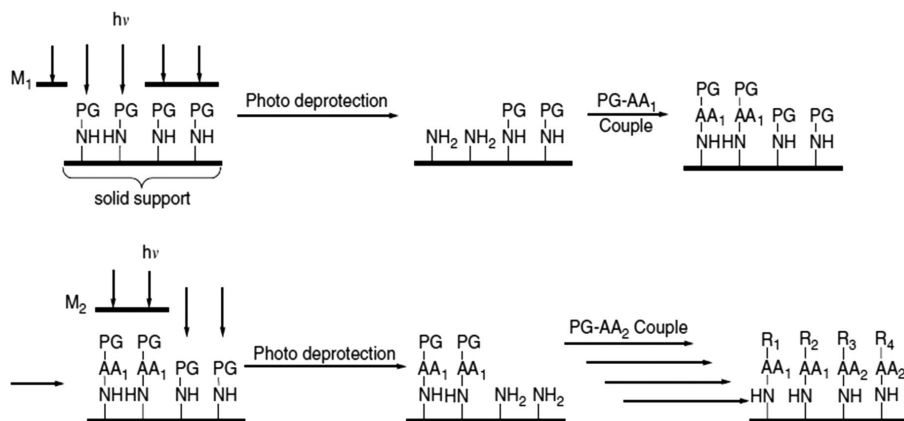
A Furka által kidolgozott osztásos-keveréses eljárás (1. ábra) egy „klónja” a Lam által közölt [11] „one-bead-one-compound” („egyetlen gyantaszem, egyetlen vegyület”) módszer, ahol az aminosav-kombinációk ekvimolekuláris keverékét oly módon állították elő, hogy minden egyes gyantaszem csak egyféle molekulát tartalmazott.

A biológiai szűrés során a szintézisben kapott keverékből az aktív vegyület csak egyfajta visszakeresés (dekonvolúció) által határozható meg, amiről később lesz szó. Houghten „teafilter” módszere [12] a fentiekhez hasonló elven alapszik, viszont itt a polisztirol gyantát tartalmazó „teafilter-

rek” címkézése alapján a szerkezet egyszerűen visszakereshető. A módszer kiterjesztése, technikai méretnövelése viszont korlátozott volt (2. ábra, bal oldal).

A párhuzamos szintézis elvét először Geysen és munkatársai alkalmazták peptidok szintézisére 1984-ben (Geysen-féle multipin array – többszörös tűsort vagy tűsormátrixot tartalmazó készülék). [13] Itt minden „tű” visszakereshetően egyetlen szerkezetet tartalmazott. (2. ábra, jobb oldal). Furka Árpád az osztásos-keveréses technológia térbeli visszakereshetősége érdekében a tűsort összekötötte („zsinór”-szintézis), a keverékben végrehajtott reakciólépéseket egy szortírozótálcán rögzítette, majd a következő lépést egy előre meghatározott szisztéma szerint hajtotta végre. [14]

Fodor és munkatársai [15] kreatív módon aminosavak mikrolemezre immobiliz-



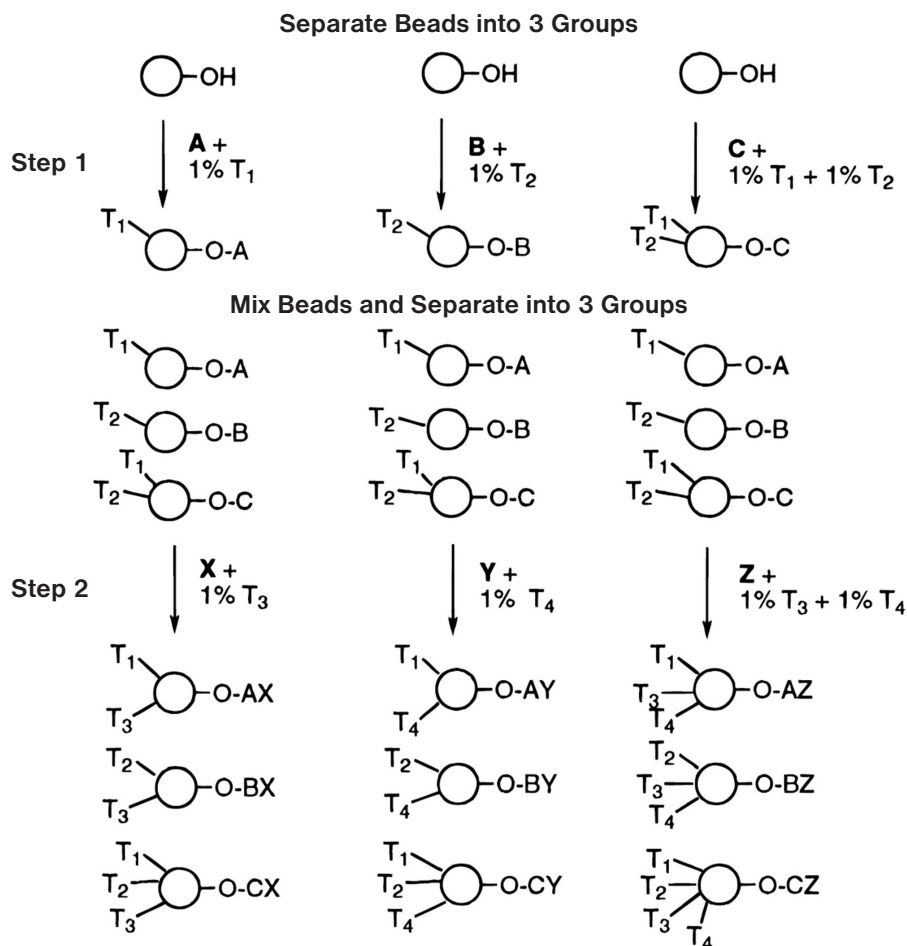
3. ábra. Fodor-féle fotolitografikus szintézis

zált sorozatára építettek ki peptidkönyvtár ellenőrzött (fotolitografikus) módon (3. ábra). Minden egyes aminosav fényre hasítható védőcsoportot tartalmazott, így megfelelő mintázatu rácsok és adott hullámhosszú fény besugárzása segítségével a peptidok bizonyos térbelileg meghatározott csoportján a védőcsoport eltávolításával újabb aminosavakat lehetett a szekvenciába beépíteni. Ezzel „a fény által vezérelt, térben címkézhető párhuzamos szintézissel” (light-directed spatially address-

sable parallel chemical synthesis) 1024 különböző peptidet állítottak elő 10 lépésben, és fluoreszcens antitestekkel való kölcsönhatásukat közvetlenül a mikrolemezre inkubálva tesztelték.

Meg kell még említeni a Frank-féle „spot”- („folt”) szintézist; az eljárás során kémiaiag reaktívva módosított cellulóz-membránokon hajtottak végre párhuzamos peptidszintézist. [16] E két módszer alapozta meg később a kémiai mikrosorok (mikrochip, mikroarray) alkalmazását.

4. ábra. Osztásos-keverékes szintézis többszörös címkézéssel (T1–T4)



A peptidszintézis osztásos-keverékes szilárd fázisú technológiáját tetszőleges kis-molekula-könyvtár előállítására is kiterjesztették lineáris szintézissel, ahol a kapcsolási reakciókban a szerkezeti diverzitást hordozó építőelemek változatainak sokféle kombinációjával állítottak elő keverékvegyületkönyvtárakat gyors és költséghatékony módon. [17] Willoughby és munkatársai 320 alkönyvtárban (400 vegyület/alkönyvtár) összesen 128 aminoalkil-2-arylindol-származékot állítottak így elő. A biológiai szűrést a gyantáról lehasított formában a keverék-alkönyvtárakkal végezték el számos G-féherje-csatolt receptoron. Minden osztásos-keverékes lépésnél felretettek az intermedierekből, így az aktív vegyületeket tartalmazó alkönyvtárba tartozás alapján reszintézisek sorozatával és ismételt biológiai mérésekkel azonosították.

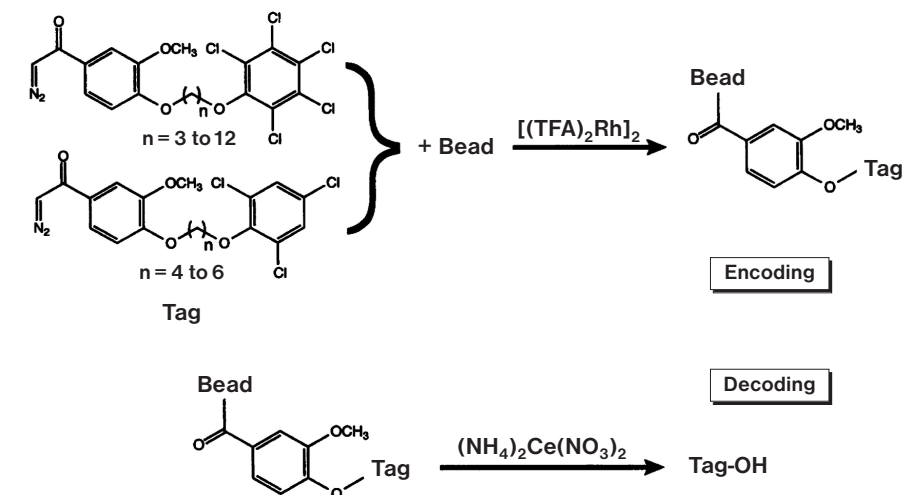
Szerkezet-visszakeresési (dekonvolúciós) törekvések keverékkönyvtárak esetén

Furka Árpád a hatásos anyag megtalálására egy iterációs módszert javasolt, ami az eltett intermedierek-keverékek felhasználásával ismételt, célzott szintézist és aktivitásmérést igényelt. [18] Bár a megoldás logikus, mégis látható, hogy keverékek biológiai szűrése esetén azt, amit a szintézis megvalósítása során időben nyerünk, az aktív vegyületek szerkezetazonosítása során részben el is veszítjük.

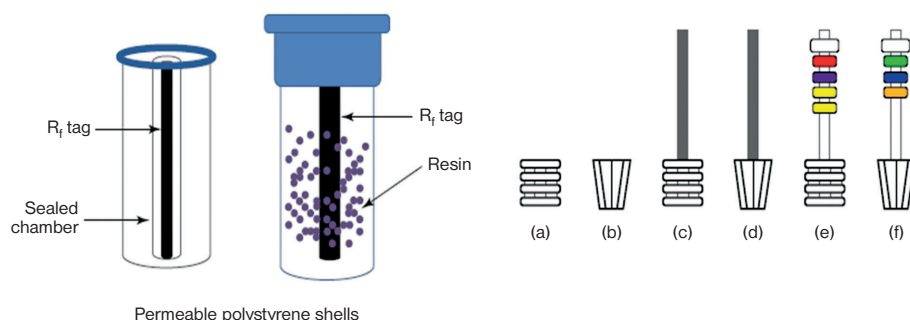
Míg peptidok és oligonukleotidok esetén az aktív vegyületek rutin szekvenálási módszerekkel azonosíthatók, ez kis-molekulák esetén kreatív megoldásokat igényelt. Still [19] és Baldwin [20] kifejlesztette az ún. címkével kódolt könyvtárakat (tag-encoded libraries) (4. ábra). Különböző mértékben helyettesített halogénaromás címkéket kapcsolnak a gyantaszemekhez (5. ábra), amit az aktívknak talált vegyületek esetén a gyantaszemekről lehasítva elektroncsapdás gázkromatográfiával azonosítottak. A biológiai aktivitásszűrés itt is gyantához kötötten történt.

Geysen és munkatársai [21] olyan változatos szerkezetű, stabilizotóp-összetételű címkéket kapcsolnak a gyantához az adott szintetikus lépések után, amelyek jellegzetes mintázatot eredményeztek a tömegspektrumban, és a mintázathoz hozzá tudták rendelni a szintézistörténetet.

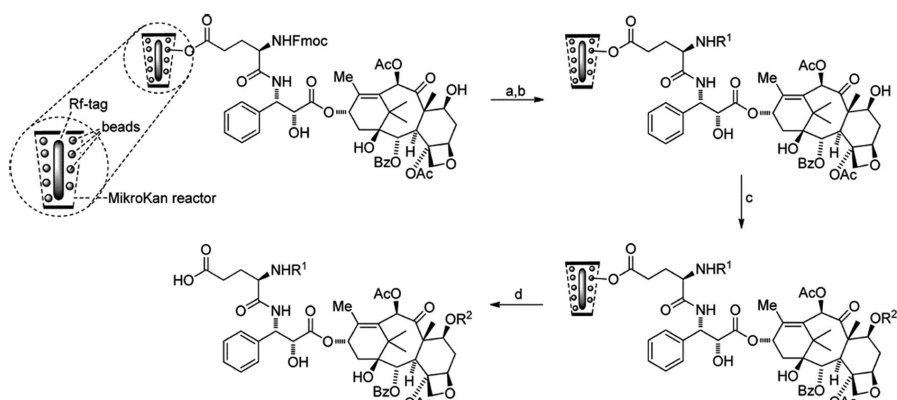
Nicolaou és munkatársai [22] keverékkönyvtárak aktív vegyületeinek visszafejtésére fejlesztették ki a rádiófrekvenciás kódolási módszert, aminek az az alapja, hogy



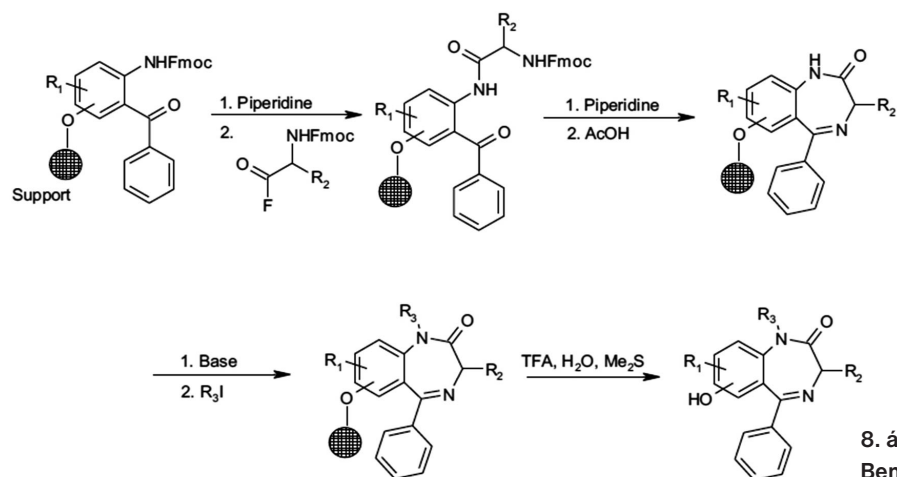
5. ábra. Halogénaromás címkék alkalmazása keveréksztézisben



6. ábra. Rádiófrekvenciás címkézés



7. ábra. Taxolanalagon-könyvtár szintézise rádiófrekvenciás címkézéssel [24]



8. ábra. Szilárd fázisú egyedi szintézis. Benzodiazepin-könyvtár szintézise

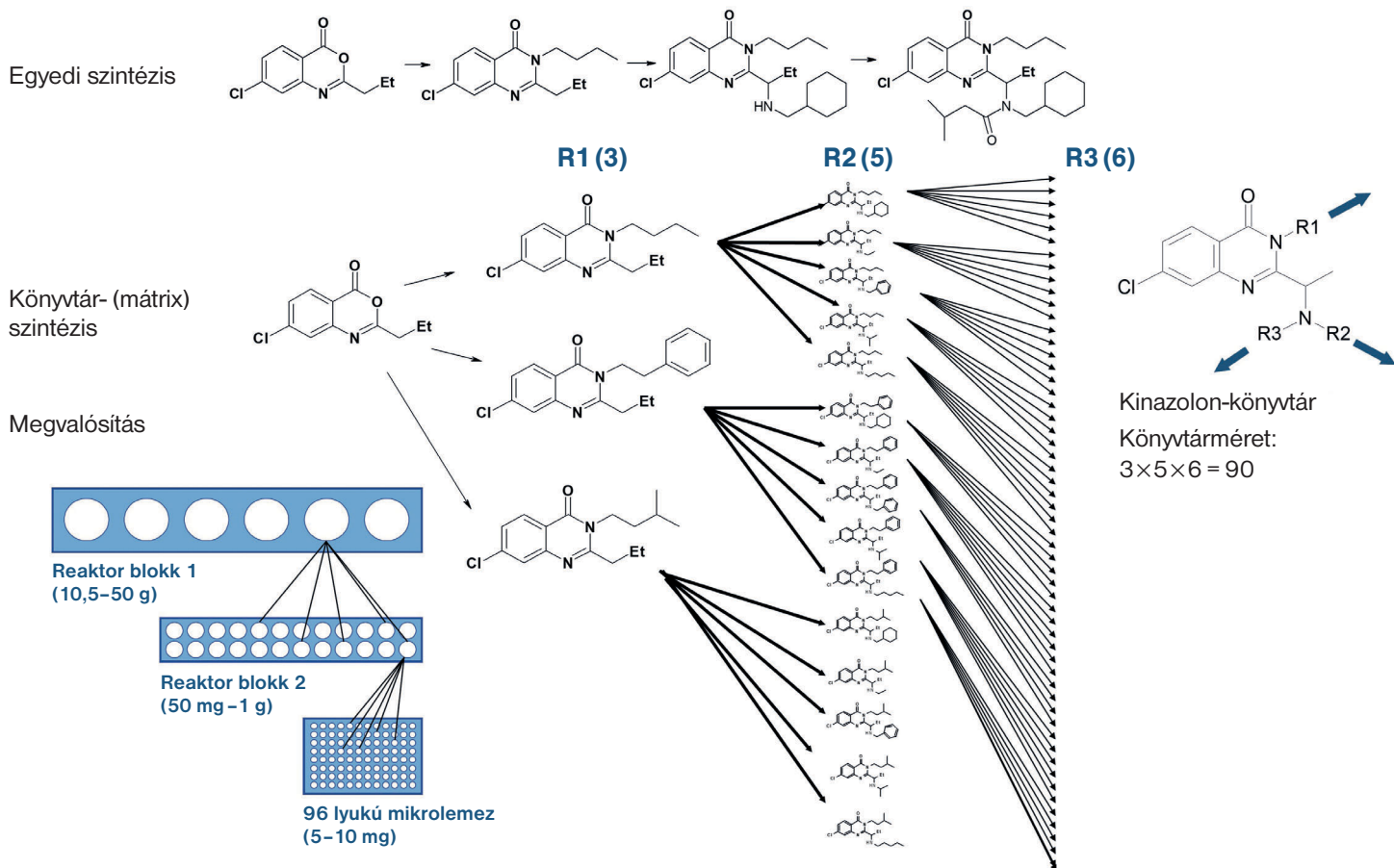
a gyantaszemek egy csoportját egy kémiai-lag inert porózus üveghordozóba (SMART memory device) helyezték egy miniatűrített memóriaeegységgel együtt (6. ábra). Az osztásos-keveréses szilárd fázisú könyvtárszintézist követően a sugározott rádiófrekvenciás mintázat alapján könnyen beazonosítható volt, hogy mely gyantaszemek keverékét tartalmazza, amivel a szintézistörténet kiolvasható volt. Ezen az alapon működtek az IRORI Mikrokan-reaktorok, melyek segítségével Nicolaou Taxol, epotilon- és más természetes anyagok analógjainak könyvtárát állította elő keverékben (7. ábra). [23]

Lerner [25] és Brenner 1992-ben fektették le a szilárd fázisú DNS-kódolt könyvtárszintézis (DNA encoded library, DEL) alapjait. A gyantához kapcsolt címkéként egyedi nukleotidszekvenciákat használtak, amelyeket az aktívnak talált vegyületek esetén PCR- (polimeráz láncreakció) technikával sokszoroztak, majd szekvenálással azonosítottak. A technológia fejlődésével ez a módszer hozzájárult – mint később láthatjuk – a kombinatorikus kémia reneszánszához a 2010-es évek közepén.

Folyadékfázisú keveréksztézisek vizsgálására a fluoros fázisú címkézés [26] teremtett lehetőséget. A könyvtárszintézis építőelemeit ellátták növekvő fluortartalmú szénhidrogénekkel tartalmazó címkével. A keveréksztézisek végrehajtása után a termékeket fluoros kromatográfiával szétválasztották, majd a címkét lehasították, és a vegyületeket azonosították a fluortartalomtól függő retenciós idők alapján.

Párhuzamos (nem keverék) szilárd fázisú szintézissel elsőként Bunin és Ellman állított elő nem-peptid kismolekula-könyvtárát, [27] amely 192 benzodiazepin-származékot tartalmazott. A párhuzamos egyedi szintézis szükségtelenné tette a visszakeresést (8. ábra).

Bár a szilárd fázisú szintézis elterjedését a könnyű automatizálás is támogatta, és a gyantaszemekben való biológiai szűrés robusztus technológia, sikerességéhez számos feltételnek kellett megfelelni. Ilyen feltétel például az azonos gyöngyméret és az uniform helyettesítés, kompatibilitás, ill. stabilitás vizes és szerves közegben, így a módszernek számos korlátja van. A gyan-tán történő szűréshez pedig alkalmas eszközt kellett kifejleszteni a gyantaszemek-hez történő nem specifikus kötődés elkerülésére, [28] valamint sejtalapú assay-ben ez nem is használható. Schreiber és mun-



9. ábra. Párhuzamos (mátrix) szintézis folyadékfázisban (ComGenex Rt., 1994–2006, Darvas és munkatársai, Pure Appl Chem, 2001, 73, 1487–1498.)

katársai [29] ezért a gyöngyöket egy „szortírozó” mikrorácsra helyezték, a kismolekulákat fotokémiai úton lehasították a gyantról, a gyantaszemeket mosták, majd eltávolították, és a keletkező 50–150 nanoliter térfogatú cseppecskéket nanolemezekre már egyedileg szűrték.

A klasszikus szerves kémia párhuzamosítása (folyadékfázisú párhuzamos szintézis)

A 90-es évek végére világossá vált, hogy nem-peptid kismolekulák esetében a szilárd fázisú szintézisút kidolgozása, keverék esetén az analízis és az aktívak vizsgálata, ill. a gyantán való szűrés is nehézségbe ütközik. A koncepció viszont alkalmas volt nagy áteresztőképességű, folyadék- (oldat-) fázisú, párhuzamos szintézistechnológiák kialakítására is a klasszikus szerves kémia több ezer ismert reakciójának közvetlen alkalmazásával, amit mátrix- vagy array-szintézisnek is neveztek. Eszerint a párhuzamos könyvtárszintézis úgy valósítható meg, hogy elvben az összes a számú A reagens (építőelem) és az összes b számú B reagens (építőelem) reakciója $a \times b$ számú AB termék eredményez egy $a \times b$ számú izolált, többtu-

busú mátrix-reaktorblokkban. A párhuzamos szintézis lényegében az osztásos-keveréses stratégiához hasonló elvet követ, csak nem keverékben, hanem elkülönített edényzetben. Itt is nagyobb mennyiségben kezdik a szintézist, majd adott részre osztják, és új reagensszettel végzik el a következő reakciólépést párhuzamosan, célszerűen általánosított reakciókörülmények között. Minden egyes diverzitást kialakító lépést követően a termékeket annyi részre osztják, ahány reagenssel a következő diverzitási elem beépítésekor reagáltatják. Így a vegyületek száma a többlépéses mátrixszintézis során nő, de mennyisége ennek arányában csökken. Az utolsó milligrammos mennyiségben végrehajtott lépést általában már 96 lyukú mikrotiterlemezeken automatikus folyadékkezelő robotokkal valósítják meg. Ezt a faserű könyvtár kiépítési stratégiát mutatja a 9. ábra.

Például 3 diverzitási pont (R_1 , R_2 , and R_3) kiépítése esetén $nR_1 \times nR_2 \times nR_3$ lehetséges szerkezetet tudunk generálni az R_1 , R_2 , R_3 szubsztituenseket hordozó reagenssel való párhuzamos szintézis eredményeként.

A folyadékfázisú párhuzamos szintézisek térhódítása a 2000-es években

A 2000-es évek során a szilárd fázisú szintézis a reakciók adaptálásával (és annak időigényével) együtt drágának bizonyult, és így fokozatosan háttérbe szorult a folyadékfázisú párhuzamos szintézis mellett. A szilárd fázisú (egyedi/keverék) és folyadékfázisú párhuzamos szintézisek előnyeit és hátrányait foglalja össze az 1. táblázat. [30,31,32]

Míg a folyadékfázisú párhuzamos szintézisek lényegében a szerves kémia összes reakcióját alkalmazzák, a szilárd fázisú reakciók esetén néhány népszerűvé vált reakció variálásával képezik a könyvtárakat (aromás nukleofil szubsztitúció, Mitsunobu-alkilezés, keresztkapcsolási reakciók C–C kötés, ill. C–N kötés kialakítására stb.). [33]

Folyadékfázisú párhuzamos kémia lényegében a standard szerves kémiai reakciók megvalósítását jelenti annyi különbséggel, hogy a reakcióutat „könyvtárasítani” kell; lineáris esetben diverzitást kialakító lépések és funkciócsoport-cserék váltják egymást. A diverzitást kiépítő lépéseket különböző reagensekkel párhuzamo-



Szilárd fázisú (egyedi/keverék) szintézisek		Folyadékfázisú parallel szintézisek	
Nagy reagensfelesleg alkalmazható a teljes konverzió elérése érdekében	+	A reagensfelesleg és melléktermék eltávolítása szilárd hordozóhoz kötött, ún. takarító gyantákkal lehetséges, vagy preparatív HPLC-vel	–/+
A reagensfelesleg és a melléktermék egyszerű eltávolítása szűrőssel	+		
Könnyen automatizálható	+	Nehezebben automatizálható, minden reakció külön edényzetet igényel	–
Bifunkcionális reagensek használata védőcsoport nélkül	+	Védőcsoport használata szükséges	–
Komoly technikai kihívások: a gyantához kötés pontos mennyiségi viszonyai/a gyanta duzzadása miatt bizonyos oldószerek nem használhatók, a hordozó behatárolja a kémiát	–	A technikai kihívások kisebbek, bármilyen kémia és oldószer használható	+
Számos reakció megvalósítása nem rutinszerű: hosszú (4–6 hónap) adaptációs idő, nagyobb költségek	–	Több ezer szerves kémiai reakció közvetlenül alkalmazható, új reakciók is	+
Speciális eszközök szükségesek, nagyobbak a költségek	–	Standard laboratóriumi eszközök használhatók, kisebb költségek	+
Csak lineáris szintézisút valósítható meg	–	Lineáris és konvergens szintézisút is megvalósítható	+
Reakció követése nehéz szilárd fázison (IR, Magic Angle Spinning, NMR stb. speciális műszer szükséges), nincs tisztításra és azonosításra lehetőség a lépések közt	–	Reakciókövetés hagyományos eszközökkel, tisztítás, azonosítás lehetséges lépésenként	+
Méretnövelés kevésbé lehetséges	–	Méretnövelés lehetséges, 0,1–0,2 mmol (~10 mg) többévi biológiai szűrésre elegendő	+
Plusz lépések kellenek a gyantához kötéshez és lehasításhoz	–	Nem szükséges plusz lépés	+
A gyantáról hasítás helyén azonos „függelék” van, ami a diverzitást csökkenti	–	Nincs ilyen „függelék”	+
Heterogén reagensek nem használhatók	–	Heterogén reagensek használhatók	+
Szűk paraméterter (t/p) alkalmazható	–	Kiterjesztett paraméterter (t/p) alkalmazható, Mw is	+
Többmillió keverék-könyvtár előállítható, főleg az elsődleges találat azonosításra használják	+	Kiseb egyedi vegyületeket tartalmazó könyvtár (aktív találatok validálása, vezérmolekula azonosítása optimalizálás céljából)	–
Az aktív vegyület dekonvolúciója szükséges	–	Az aktív, egyedi vegyület azonossága ismert	+

1. táblázat. A szilárd és folyadékfázisú szintézisek előnyei/hátrányai

san végzik el azonos, standardizált körülmények között a megfelelő edényzetben. A könyvtárszintézisnél a tipikus szerves kémiai problémák jelentkeznek, mint például a hosszú reakcióidő vagy az alacsony konverzió, amit a hőmérséklet emelésével és a mikrohullámú technológia alkalmazásával lehet javítani. [34] Az időközben kifejlesztett új technológiák nagyban hozzájárultak a hatékonyság növeléséhez: pl. a robotizált, automata reagensdagolás, az automatizált mintakezelés/monitorálás, a kétdimenziós reaktorsorok.

A szilárd fázisú hordozóhoz kötött reakcióval lehet javítani. [34] Az időközben kifejlesztett új technológiák nagyban hozzájárultak a hatékonyság növeléséhez: pl. a robotizált, automata reagensdagolás, az automatizált mintakezelés/monitorálás, a kétdimenziós reaktorsorok.

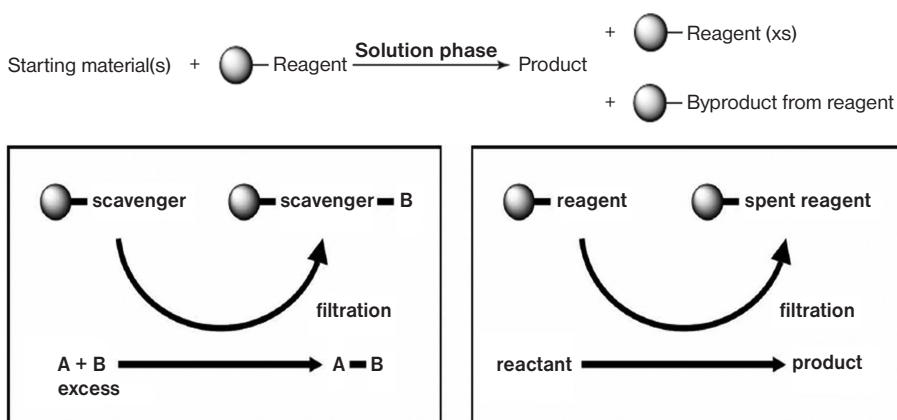
A szilárd fázisú hordozóhoz kötött reakcióval lehet javítani.

gensek és feleslegmegkötő (scavenger) gyanták alkalmazása révén a szilárd és folyadékfázisú szintézisek pozitív elemeit lehetett ötvözni (10. ábra). [35]

Ley és munkatársai [36] soklépéses könyvtárszintéziseket valósítottak meg ilyen módon tisztítás nélkül („telescoping”) folyadékfázisban (11. ábra, a következő oldalon). A módszer a későbbiekben megteremtette a folyamatos áramlásos reaktorokban való könyvtárszintézist, ami az átteresztőképességét jelentősen megnövelte.

A cikksorozat 2. részében a minőségi könyvtártervezés módszereit és a szerkezeti diverzitás kiépítését célzó szintetikus megközelítéseket mutatjuk be.

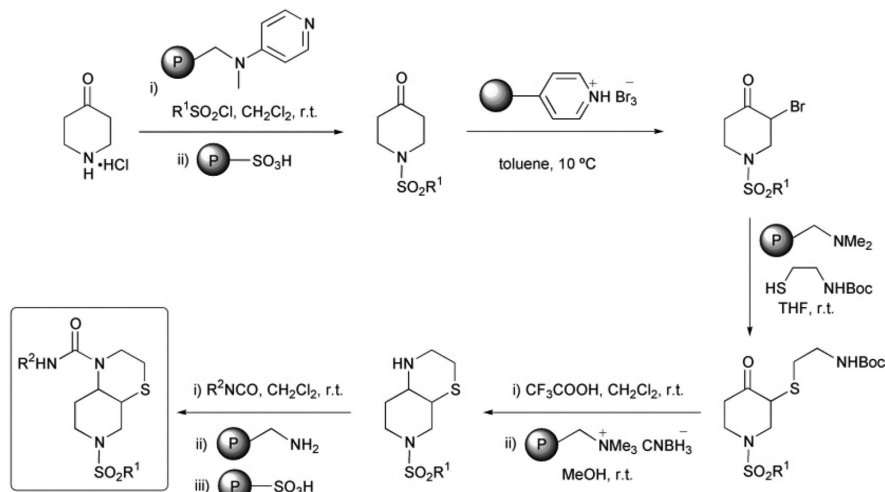
10. ábra. Szilárd fázisú hordozóhoz kötött reagensek és feleslegmegkötő gyanták alkalmazása párhuzamos szintézisekben



Köszönetnyilvánítás. A szerző köszönettel tartozik dr. Gerencsér Jánosnak a kézirat szakmai lektorálásáért.

IRODALOM

- [1] Bohacek, R.S., McMartin, C., Guida, W.C. (1996) The art and practice of structure-based drug design: a molecular modeling perspective. *Med. Res. Rev.* 16, 3–50.



11. ábra. Könyvtárszintézis szilárd hordozós reagensekkel és feleslegmegkötő gyantákkal – 480 piperidin-tiomorfolin könyvtár szintézise (Ley et. al.) [36]

- [2] Drew, K. L., Baiman, H., Khwaounjoo, P., Yu, B., & Reynisson, J. (2012). Size estimation of chemical space: how big is it? *J. Pharm. Pharmacol.*, 64(4), 490–495.
- [3] Blum, L. C., & Reymond, J. L. (2009). 970 million drug-like small molecules for virtual screening in the chemical universe database GDB-13. *J. Am. Chem. Soc.* 131(25), 8732–8733.
- [4] Blum, L. C., Lomniczi, B. (2014) Egy itthon méltatlanul kezelt magyar találmány: a Takátsy-mikrotitrator és a laboratóriumi mikrolap világsikere, *Magyar tudomány*, 175(9), 1097–1104.
- [5] Schnorrenberg, G., & Gerhardt, H. (1989). Fully automatic simultaneous multiple peptide synthesis in micromolar scale-rapid synthesis of series of peptides for screening in biological assays. *Tetrahedron*, 45(24), 7759–7764.
- [6] Merritt, A. (2014). Parallel Synthesis and Library Design. In: *The Handbook of Medicinal Chemistry* (pp. 32–65).
- [7] Bata I., Hermecz I., *Kombinatorikus Kémia* (2000). (A kémia újabb eredményei sorozat, 87. kötet), Akadémiai Kiadó, Budapest.
- [8] Merrifield, R. B. (1963). Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, 85(14), 2149–2154.
- [9] Furka, Á. (2002). Combinatorial chemistry: 20 years on... *Drug. Discov. Today*, 7, 1–4.
- [10] Furka, Á., Sebastyán, F., Asgedom, M., & Dibó, G. (1991). General method for rapid synthesis of multi-component peptide mixtures. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 37(6), 487–493.
- [11] Lam, K. S.; Salmon, S. E.; Hersh, E. M.; Hruby, V. J.; Kazmierski, W. M.; Knapp, R. J. (1991). A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity. *Nature* 354(6348), 82–4.
- [12] Houghten R.A. (1985) General-method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides – specificity of antigen-antibody interaction at the le-

- vel of individual amino-acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; 82, 5131–5135.
- [13] Geysen HM, Meloan RH, Barteling SJ. (1984). Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 3998–4002.
- [14] Furka, Á., Christensen, J. W., Healy, E., Tanner, H. R., & Saneii, H. (2000). String synthesis. A spatially addressable split procedure. *J. Comb. Chem.*, 2(3), 220–223.
- [15] Fodor SPA, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D. (1991). Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*. 251, 767–773.
- [16] Frank, R. (1992). Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron*, 48(42), 9217–9232.
- [17] Willoughby, C. A., Hutchins, S. M., Rosauer, K. G., Dhar, M. J., Chapman, K. T., Chicchi, G. G., ... & Di Salvo, J. (2002). Combinatorial synthesis of 3-(amidoalkyl) and 3-(aminoalkyl)-2-arylindole derivatives: discovery of potent ligands for a variety of G-protein coupled receptors. *Bioorg. Med. Chem. Letters*, 12(1), 93–96.
- [18] Furka Á.: (2001) A kombinatorikus kémia, *Természet Világa*, 131: 265–269.
- [19] Nestler, H. P., Bartlett, P. A., & Still, W. C. (1994). A general method for molecular tagging of encoded combinatorial chemistry libraries. *J. Org. Chem.*, 59(17), 4723–4724.
- [20] Burbaum, J. J., Ohlmeyer, M. H., Reader, J. C., Henderson, I., Dillard, L. W., Li, G., Baldwin, J. J. (1995). A paradigm for drug discovery employing encoded combinatorial libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92(13), 6027–6031.
- [21] Geysen, H. M., Schoenen, E., Wagner, D., & Wagner, R. (2003). Combinatorial compound libraries for drug discovery: an ongoing challenge. *Nature Rev. Drug Discov.*, 2(3), 222–230.

- [22] Nicolaou, K. C., Xiao, X. Y., Parandoosh, Z., Senyei, A., & Nova, M. P. (1995). Radiofrequency encoded combinatorial chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34(20), 2289–2291.
- [23] Nicolaou, K. C., Sorensen, E. J., & Winssinger, N. (1998). The art and science of organic and natural products synthesis. *J. Chem. Educ.*, 75(10), 1225.
- [24] Rizzo, S., & Waldmann, H. (2014). Development of a natural-product-derived chemical toolbox for modulation of protein function. *Chem. Rev.* 114(9), 4621–4639.
- [25] Brenner, S., & Lerner, R. A. (1992). Encoded combinatorial chemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(12), 5381–5383.
- [26] Luo, Z., Zhang, Q., Oderaotoshi, Y., & Curran, D. P. (2001). Fluorous mixture synthesis: a fluorous-tagging strategy for the synthesis and separation of mixtures of organic compounds. *Science*, 291(5509), 1766–1769.
- [27] Bunin BA, Ellman JA. (1992). A general and expedient method for the solid-phase synthesis of 1,4-benzodiazepine derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 10997–10998.
- [28] Komnatny, V. V., Nielsen, T. E., & Qvortrup, K. (2018). Bead-based screening in chemical biology and drug discovery. *Chem. Comm.* 54(50), 6759–6771.
- [29] You, A. J., Jackman, R. J., Whitesides, G. M., & Schreiber, S. L. (1997). A miniaturized arrayed assay format for detecting small molecule-protein interactions in cells. *Chem. Biol.*, 4(12), 969–975.
- [30] Boger, D.L., Desharnais, J., Capps, K. (2003) Solution-Phase Combinatorial Libraries: Modulating Cellular Signaling by Targeting Protein-Protein or Protein-DNA Interactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 42(35), 4138–4176.
- [31] Baldino, C.M., (2000). Perspective articles on the utility and application of solution-phase combinatorial chemistry. *J. Comb. Chem.* 2(2), 89–103.
- [32] Aubé, J., S.A. Rogers, and C. Santini, (2014). Enabling Technologies in High Throughput Chemistry. In: *Comprehensive Organic Synthesis II*, Volume 9. Eds: P. Knochel, G. A. Molander, (pp. 1–27.), Elsevier, Amsterdam.
- [33] Gerencsér, J., Balázs, Á., & Dormán, G. (2014). Transition Metal-Catalyzed Coupling Reactions in Library Synthesis. In *Synthesis and Modification of Heterocycles by Metal-Catalyzed Cross-coupling Reactions* (pp. 305–358). Springer, Cham.
- [34] Szommer T, Gerencsér J, Dormán G, Úrge I, Darvas F. (2006). A mikrohullámú technika alkalmazása a kombinatorikus kémiában, *Magyar Kémikusok Lapja* 61, 41–45.
- [35] Kirschning, A., Monenschein, H., & Wittenberg, R. (2001). Functionalized polymers – emerging versatile tools for solution-phase chemistry and automated parallel synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 40(4), 650–679.
- [36] Ley, S. V., Baxendale, I. R., Bream, R. N., Jackson, P. S., Leach, A. G., Longbottom, D. A., Taylor, S. J. (2000). Multi-step organic synthesis using solid-supported reagents and scavengers: a new paradigm in chemical library generation. *J. Chem. Soc. Perkin 1*, (23), 3815–4195.

A TargetEx Kft. új RNáz-inhibitor fejlesztett ki molekuláris biológiai és diagnosztikai célokra

A TargetEx Kft. 2019-ben 75 millió forint vissza nem térítendő támogatást nyert a Mikro- és Kisvállalkozások Innovációs Tevékenységének Támogatása című pályázaton. A több mint 112 millió forintos összköltségvetésből a „Piackész, innovatív RNáz-inhibitorok fejlesztése molekuláris biológiai, diagnosztikai célokra” című projekt valósult meg. A kifejlesztett termék és a technológia már elérhető a nemzetközi piacon.

A molekuláris biológiában, illetve diagnosztikában nagy mennyiségben használt kereskedelmi reagensek egyike az RNáz-inhibitor. Használata lehetővé teszi, hogy az RNS-tartalmú minták ana-

lízise során végrehajtott reakciókban (pl. RT-PCR) az RNS-t ne bontsák le az RNázok, így ne kapjunk téves eredményt. Ezeket az eljárásokat széles körben alkalmazzák a tudományos kutatásban és a humán diagnosztikában – így például a Covid-diagnosztikában is. A TargetEx a feladatot olyan fehérje előállításával oldotta meg, amely speciális aminosavcsere miatt stabilabb a piacon levő termékekhez. Emellett kifejlesztettek egy puffrendszerrel, amellyel tovább növelhető a termék stabilitása. Végül kidolgozták a piacra vitelhez megfelelő léptékű fehérjetermelés és -tisztítás technológiáját is.