



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 bocsájtandó 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 múltra tekint vissza. Piaci igényét az előbb vázolt, több okból megnövekedett molekulaigény hozta létre.

A gyógyszerkutatásban a 90-es évek közepétől kezdve egyre elterjedtebben használták a nagy molekulagyűjteményeket, például a historikus molekulabankokat, kombinatorikus könyvtárakat vagy az ezekből a szerkezeti sokszínűség szerint kiválasztott kisebb vegyülettárakat mg-nyi mennyiségben.

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 számot 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 közé becsülik (400 kémiai reakcióval és kereskedelmi forgalomban elérhető építőelemekkel 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 biológia 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 aktivitásának szűrésére reális időtartam alatt. Ez 100–200 000 adatpont/nap/teszt áteresztőképességet jelent a klasszikus 96 lyukú mikrotiter-lemezekben, de a miniatürizált technológiákkal (nanoliter térfogatban, mikrogramm vegyületigénnyel 384, ill. 1536 lyukú lemezekben) ennek sokszorosát is el lehet érni. Megjegyzendő, hogy a klasszikus 96 lyukú lemez 8×12 -es elrendezése *Takátsy Gyula* magyar virológus nevéhez fűződik 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.

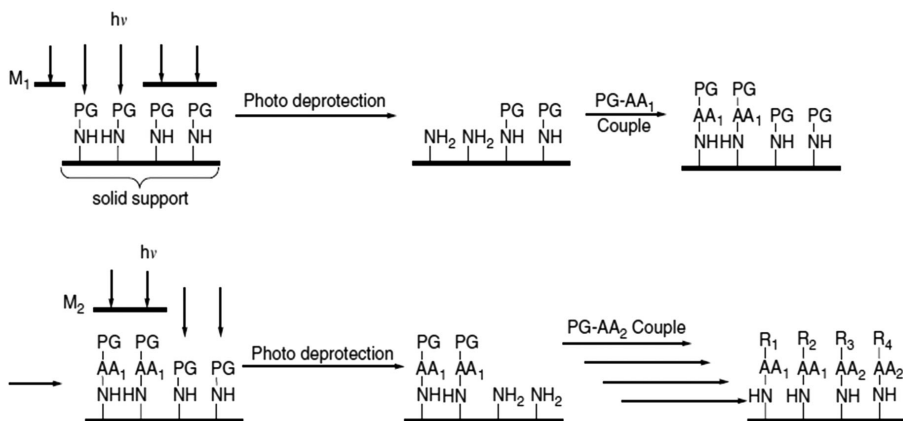
A szerves kémiai szintézisek tekintetében hasonló hatékonyságnövekedés vált szükségessé, hogy ezt a magas mintaszámot el lehessen érni. A 90-es években egy hagyományos gyógyszerkémikus évente átlagosan 40–50 különböző szerkezetű kismolekulát állított elő egyedi szintézissel. [6] A kombinatorikus (és párhuzamos) kémia reagensek sorozatával izoláltan vagy keverékben 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 molekulasorozatokat, -könyvtárakat előállítását jelenti, ame-



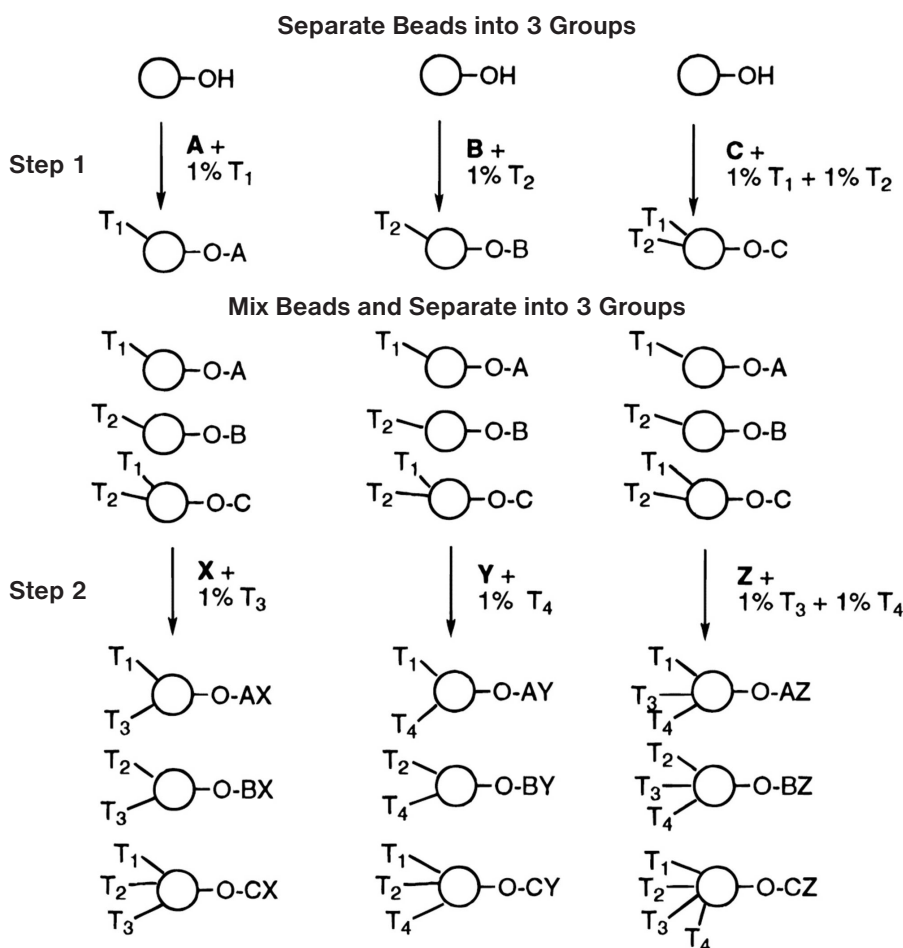
3. ábra. Fodor-féle fotolitografikus szintézis

zált sorozatára építettek ki peptidkönyvtártartat ellenőrzött (fotolitografikus) módon (3. ábra). Minden egyes aminosav fényre hasítható védőcsoportot tartalmazott, így megfelelő mintázatú 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-

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

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

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



A peptidszintézis osztásos-keveréses 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-féhérje-csatolt receptoron. Minden osztásos-keveréses lépésnél félretettek az intermedierekből, így az aktív vegyületeket tartalmazó alkönyvtárba tartozás alapján reszintézisek sorozatával és ismételt biológiai mérésekkel azonosították.

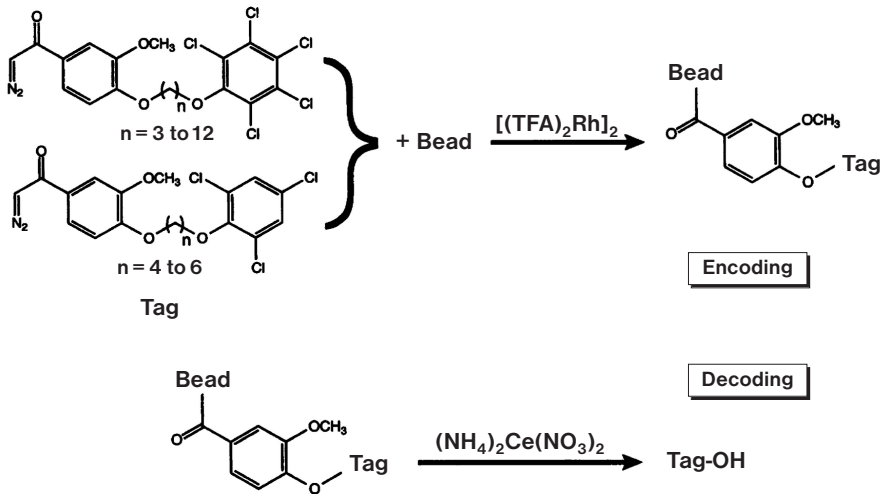
Szerkezet-visszakeresési (dekonvolúciós) törekvések keverék-könyvtárak esetén

Furka Árpád a hatásos anyag megtalálására egy iterációs módszert javasolt, ami az eltett intermedier-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.

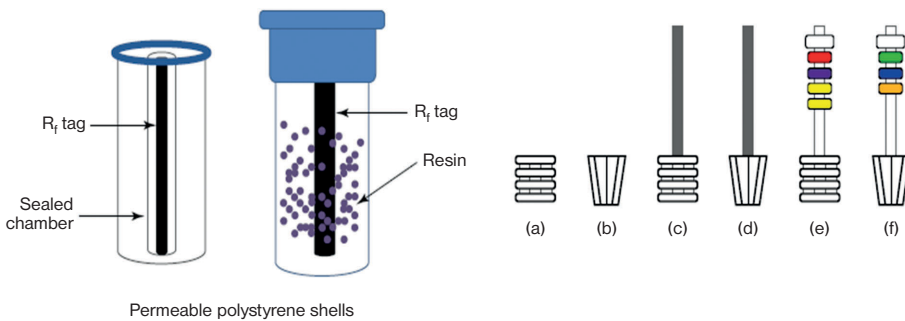
Míg peptidok és oligonukleotidok esetén az aktív vegyületek rutin szekvenálási módszerekkel azonosíthatók, ez kis-molekulák esetén kreatív megoldásokat igényelt. Still [19] és Baldwin [20] kifejlesztette az ún. címkével kódolt könyvtárakat (tag-encoded libraries) (4. ábra). Különböző mértékben helyettesített halogénaromás címkéket kapcsolnak a gyantaszemekhez (5. ábra), amit az aktívnek talált vegyületek esetén a gyantaszeméről 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.

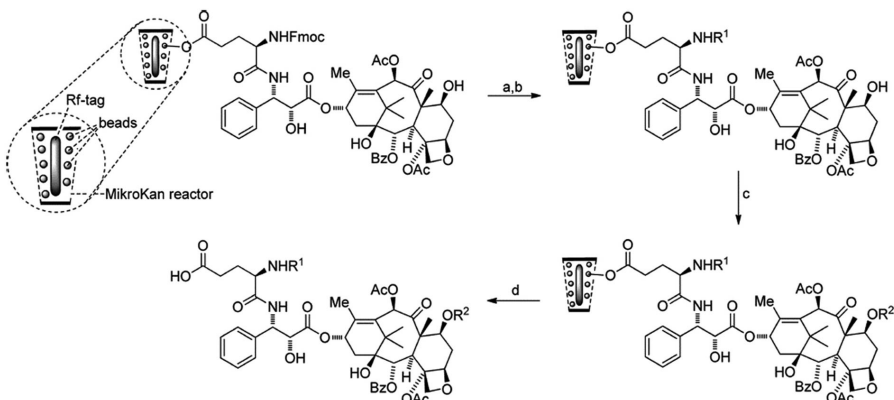
Nicolaou és munkatársai [22] keverék-könyvtárak aktív vegyületeinek visszafejtésére fejlesztették ki a rádiófrekvenciás kódolási módszert, aminek az az alapja, hogy



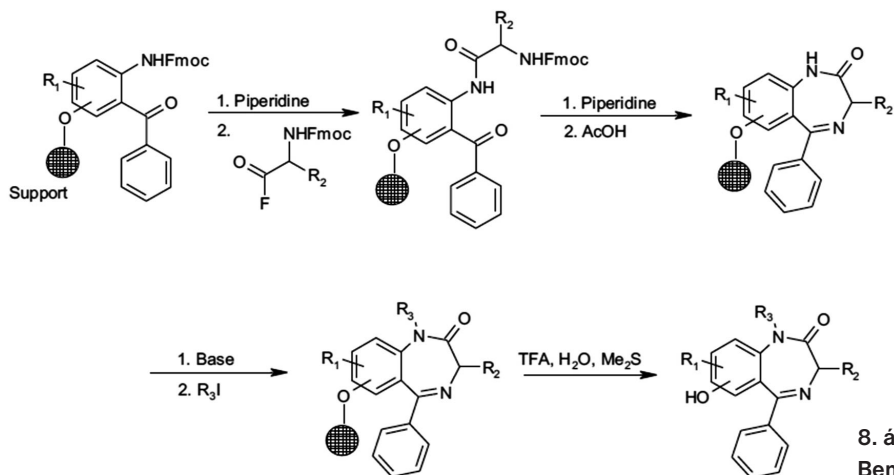
5. ábra. Halogénaromás címkék alkalmazása keverékszintézisben



6. ábra. Rádiófrekvenciás címkézés



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



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

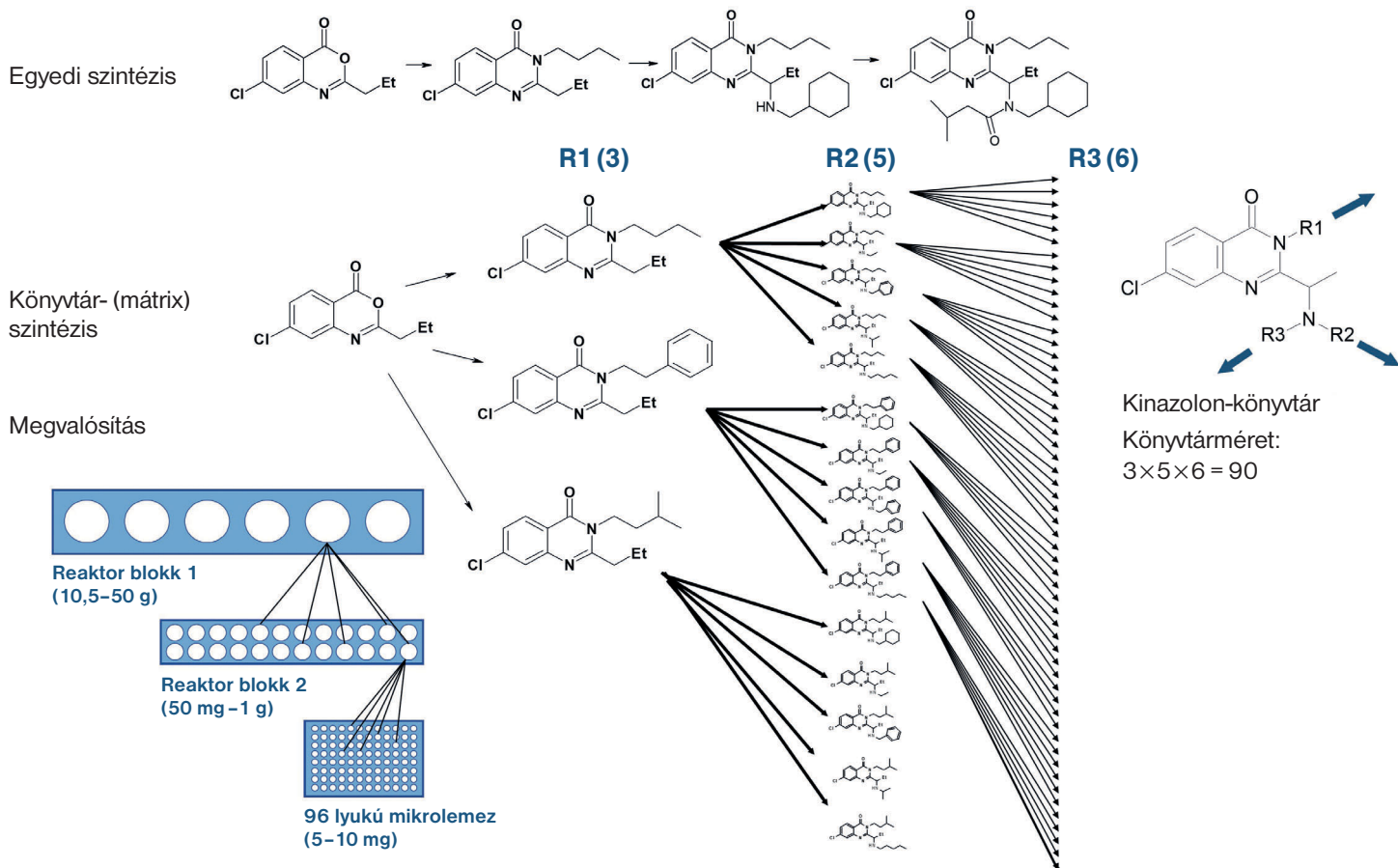
a gyantaszemek egy csoportját egy kémiai-lag inert porózus üveghordozóba (SMART memory device) helyezték egy miniatürizált memóriaegységgel együtt (6. ábra). Az osztásos-keveréses szilárd fázisú könyvtárszintézist követően a sugárzott rádiófrekvenciás mintázat alapján könnyen beazonosítható volt, hogy 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 analogjainak 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 aktív talált vegyületek esetén PCR- (polimeráz láncreakció) technikával sokszoroztak, majd szekvenálással azonosították. A technológia fejlődésével ez a módszer hozzájárult – mint később láthatjuk – a kombinatorikus kémia reneszánszához a 2010-es évek közepén.

Folyadékfázisú keverékszintézisek visszakeresésére a fluoros fázisú címkézés [26] teremtett lehetőséget. A könyvtárszintézis építőelemeit ellátták növekvő fluortartalmú szénhidrogéneket tartalmazó címkével. A keverékszintézisek 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 gyantaszemekre 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 gyantán történő szűréshez pedig alkalmas eszközt kellett kifejleszteni a gyantaszemekhez 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 gyantáról, 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 terméket 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 faszzerű 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 reagenssel 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 szűréssel	+		
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 oldószert használhatók	+
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 lépésként	+
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.

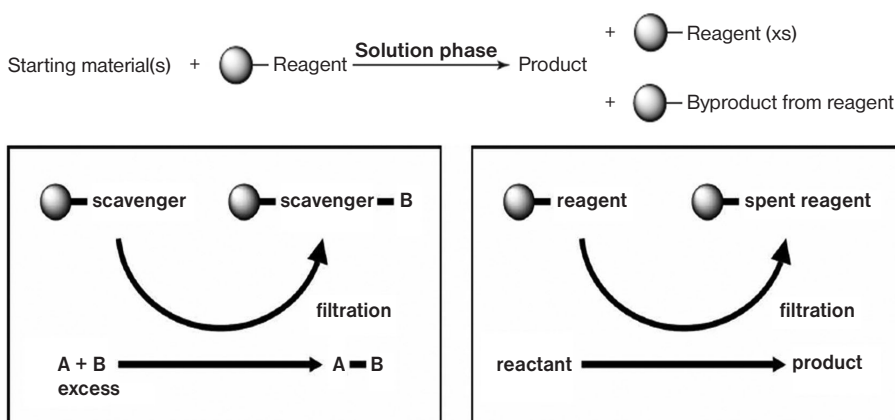
A szilárd fázisú hordozóhoz kötött reakcióval lehet javítani.

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

Ley és munkatársai [36] soklépésű 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.

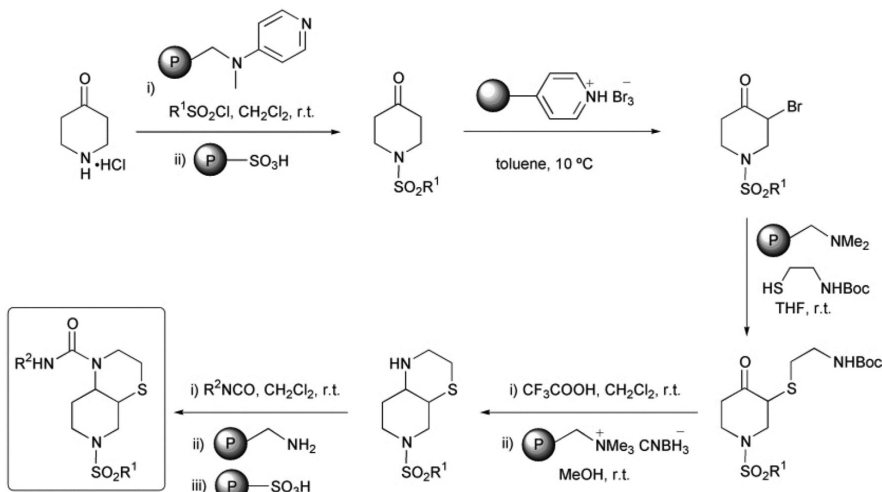
10. ábra. Szilárd fázisú hordozóhoz kötött reagensek és feleslegmegkötő gyanták alkalmazása párhuzamos szintézisekben



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] Braun T., Lomniczi B.: (2014) Egy itthon méltatlanul kezelt magyar találmány: a Takátsy-mikrotitrátor 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, A., Sebestyén, 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 RA. (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, F., 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., Oderaotshi, 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-inhibítort 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 egyik összetevője az RNáz-inhibitor. Használata lehetővé teszi, hogy az RNS-tartalmú minták ana-

lizise 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 termékeknél. Emellett kifejlesztettek egy pufferrendszert is, amellyel tovább növelhető a termék stabilitása. Végül kidolgozták a piacra vitelhez megfelelő léptékű fehérjetermelés és -tisztítás technológiáját is.



Dormán György

■ TargetEx Kft., SZTE Gyógyszerésztudományi Kar

A kombinatorikus kémia tündöklése, hanyatlása és újjászületése

Hatása a modern gyógyszerkutatásra | II. rész

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

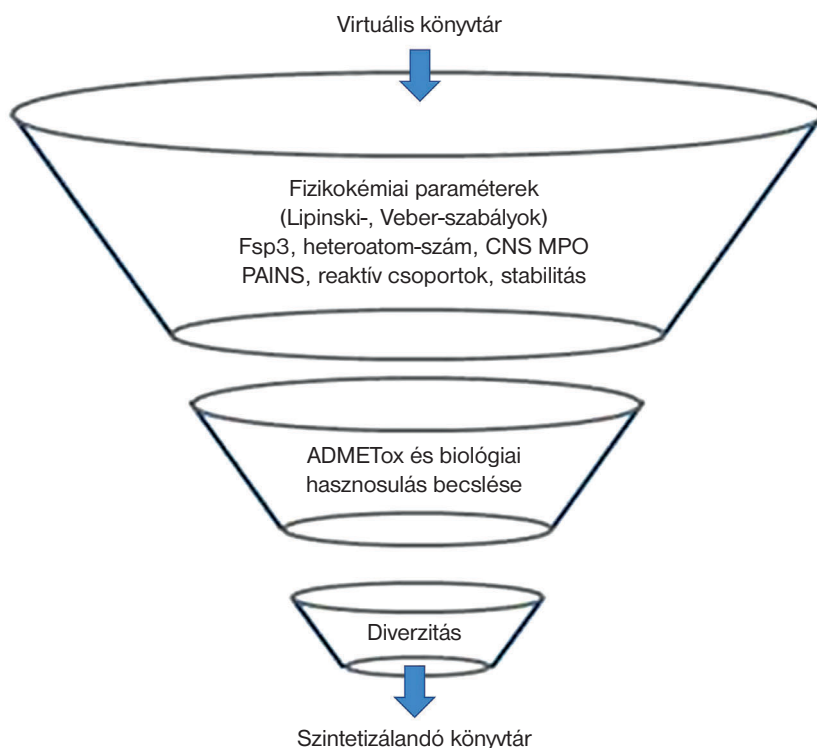
Négyrészes sorozatunkban a gyógyszerkutatás elmúlt 25 évében komoly szerepet játszó kombinatorikus kémia felmerülését, virágzását, hanyatlását, végül újjászületését kívánjuk bemutatni kitekintéssel a hazai szakmai műhelyek hozzájárulására is.

1. Mennyiségből átmenet a minőség irányába

Az innovációk korai szakaszában elsősorban azok a technológiai megoldások domináltak, amelyek nagyszámú vegyület gyors előállítására irányultak, a minőség különösen a keverékkönyvtárak esetén háttérbe szorult. Időközben rájöttünk, hogy bár a kombikem elve az, hogy minden egyes szerkezeti kör összes lehetséges variációját előállítsák, a HTS találati aránya csak 0,01–0,14% [1] között mozgott, azaz nagyszámú szerkezetiileg hasonló hatástalan vegyületet mértek.

Emellett az is nyilvánvalóvá vált, hogy a nagyszámú új molekula önmagában nem javítja a gyógyszerfejlesztés kiesési rátáját, tehát azt, hogy a fejlesztés során a gyógyszerjelölt molekuláknak hány százaléka hullik el különböző okokból. Statisztikák szerint ugyanis az *in vitro* aktív vegyületek 80%-a kiesik a későbbi fázisokban a nem megfelelő farmakokinetikai tulajdonságok, illetve a nem várt toxicitás miatt. [2,3] Az egy gyógyszerre vonatkoztatott kb. 800 millió dolláros ráfordítási költség 75%-a a fejlesztés során elbukott vegyületekre fordítódik.

Ezt a felismerést követően a nagy gyógyszergyárak arra törekedtek, hogy minél korábbi fázisban derüljön ki a molekula alkalmatlansága a későbbi fejlesztésekre, amivel jelentősen csökkenthetik a ráfordításaikat („fail fast, fail cheap”). [4]



1. ábra. Virtuális könyvtár *in silico* szűrési lépései

A következő időszak trendjét tehát a szerkezeti diverzitás, a molekulák magasabb minősége, illetve az adott gyógyszerfejlesztésben releváns tulajdonságok korai figyelembevétele jelentette.

A biológiai szűrésben, illetve gyógyszerfejlesztésben releváns tulajdonságok *in silico* szűrésével kisebb méretű, gazdaságosan szintetizálható könyvtárakat nyertek (1. ábra). [5] Ez csökkentette a költségeket, a munka- és környezeti terhelést is. Természetesen ehhez még a szintetizálhatóság előértékelése is igen fontos, mivel ez bizonyos könyvtárakat kiejthet, ami torzíthatja az eredetileg eltervezett diverzitást. [6] Ugyancsak fontos volt a könyvtár alapjául szolgáló vázszerkezet- (kemotípus) új-

donság vizsgálata is, valamint a költséghatékonyság előzetes becslése.

Diverzitás és könyvtárméret

A számítógépes modellezés fejlődésével a lehetséges összes szerkezeti variációból képzett hatalmas virtuális könyvtárakból diverzitásalapú válogatással [7] képezett kisebb molekulaszám is elegendőnek bizonyult a biológiai szűrések tapasztalatai alapján. Jacoby molekuláris ujjlenyomaton alapuló számításai szerint a kémiai tér lefedéséhez 1000–5000 könyvtárméret elegendő. [8] Ennek ellenére a 2001-re a publikált könyvtárak 3/4-e 100 vagy kisebb tag-számú könyvtárat jelentett, elsősorban a



szintetikus kihívások vagy sikertelenség miatt. [9]

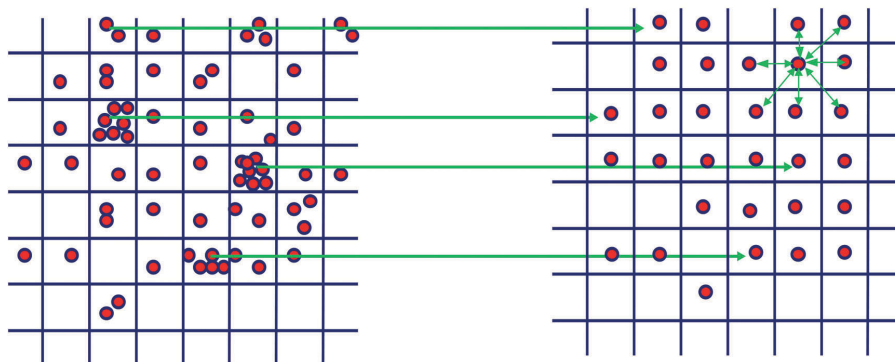
A legfontosabb könyvtártípusok jelentősen eltérnek a diverzitás és a könyvtár-méret szempontjából

1. Felfedező („találomra” szintetizált – „random”)
2. Diverz, kisebb méretű, válogatott könyvtár (2. ábra)
3. „Találatra” fókuszált analógon-könyvtár (3. ábra)
4. Fehérje-célpontra fókuszált könyvtár
5. Fragmentum- vagy vezérmolekula-jellegű könyvtárak

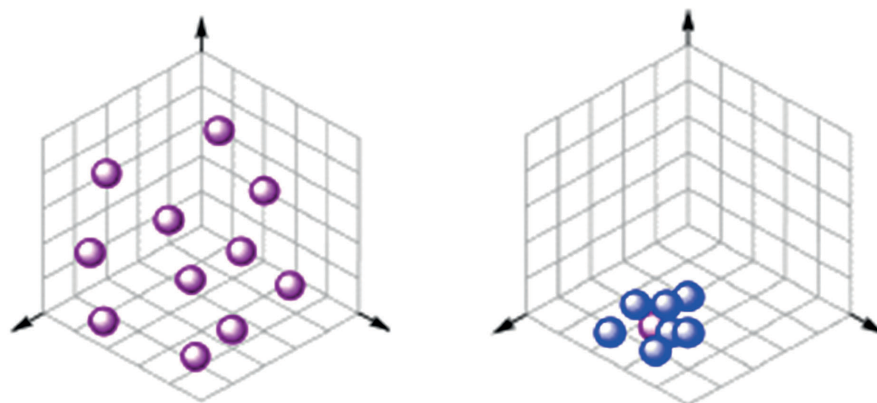
A diverzitás kemoinformatikai megközelítése a vegyületek 2D molekuláris „ujjlenyomatának” (alszerkezeteik bináris kódjának) hasonlóságán és különbözőségén alapszik. [10] Ha a vegyületek egymáshoz való átlagos hasonlósága (vagy a szerkezeti legközelebb álló vegyületek hasonlósága) alacsony, akkor a vegyületek diverz.

A korai nagy tagszámú (> 5000), ún. felfedező könyvtárak a szintetikusan elérhető összes szerkezeti variációt a szintézis sikerességétől függően véletlenszerűen tartalmazták. Ennek gazdaságosságát és hatékonyságát hamar megkérdőjelezték, így a 2000-es évek közepétől a kisebb célzott/előszűrt molekulakönyvtárak párhuzamos szintézise terjedt el. Első lépésként számítógéppel itt is legenerálták az összes lehetséges szerkezeti variációt, majd az így nyert (gyakran többmillió) virtuális könyvtárat diverzitás, fizikokémiai és gyógyszerjellegűsége jellemző paraméterek becslésével *in silico* leszűrték. [11] A fókuszált analógon-könyvtárak alkalmazási célja az aktív kémiai szerkezet megerősítése, ill. a szerkezet és biológiai aktivitás összefüggésének feltárása volt. E lépés során a találat („hit”) szerkezetéhez közeli analógonokat generáltak le, amelyek az aktív vegyületek legfontosabb szerkezeti motívumait tartalmazták vagy a diverz könyvtár lyukait töltötték ki. [12]

Fehérje-célpontra fókuszált könyvtárakat az ismert aktív ligandumok 2D/3D szerkezeti hasonlósága vagy a célfehérje 3D szerkezetéhez történő dokkolás alapján, ún. virtuális szűréssel generálhatunk. A kemoinformatikai módszerek alkalmasak fizikailag még nem rendelkezésre álló, csak „papíron” elképzelt vegyületek szűrésére, ami lehetővé teszi, hogy csak a virtuálisan aktívnek tekintett vegyületeket állítsák elő. A humán genom DNS és fehérje szekvenciáinak megismerését követően kialakult kemogenomika elve kiterjeszti az egyes fehérje-célpontra célzott könyvtárakat fe-



2. ábra. A diverzitás-szelekció sematikus ábrázolása. A mátrix a kémiai teret jelképezi



3. ábra. A diverz és találatra fókuszált könyvtár szemléltetése a virtuális kémiai térben

hérjecsaldókra, amelyek a szervezetben rokon funkciót látnak el, mechanisztikus és szekvenciahasonlóság kapcsolja össze őket. A fehérjecsaldók tagjaival gyakran hasonló vázszerkezetű kismolekulák (ún. kiváltságos szerkezetek, pl. benzodiazepin) lépnek kölcsönhatásba. Így virtuális szűréssel például a kinázcsaldóra [13] vagy G-fehérje-csatolt receptorok családjára [14] célzott (fókuszált) inhibitor- vagy antagonistakönyvtárakat generálhatunk. Az aktív vegyületek találati aránya az ilyen könyvtárak esetében jóval magasabb, mint a felfedező könyvtárak esetén tapasztalt 0,1–5%. [15]

Fragmentum- vagy vezérmolekula-jellegű könyvtárak esetében a Lipinski-féle 5-ös szabály mintájára 3-as szabályt alkalmaznak (Rule-of-3, $Mwt \leq 300$ Da ; $\log P \leq 3$). A fragmentum-könyvtárak biológiai szűrésekor azonosított aktív vegyületek optimalizálása hatékonyabb diverz szerkezetű, sok esetben lipofil csoportok bevezetésével, összehasonlítva a nagyobb molekula-tömegű aktív vegyületek vezérmolekula optimalizációjával.

A könyvtárak minősége, ami biológiai szűréskor fontos

E tekintetben az alábbi tulajdonságokat tartalmazó vegyületek nem kívánatosak:

1. Gyakori nem specifikus találatok (frequent hitter, pan-assay interference compounds – PAINS) [16], például aggregációra képes vegyületek, fluoreszcens vegyületek, melyek fluoreszcencián alapuló HTS esetén hamis pozitív eredményt adnak [17]
2. Reaktív csoportokat tartalmazó vegyületek (pl. alkil-halogenidek, epoxidok, diszulfidok stb.)
3. Nem megfelelő tisztaságú anyagok

A korábbi, elsősorban nagy vegyület-igény kielégítésére irányuló törekvések után előtérbe kerültek az új vegyületekkel szemben támasztott minőségi követelmények. Míg korábban az elsődleges szűrésnél 85% volt az ipari sztenderd, a későbbiekben nagy tisztaságú (> 95%) vegyületekre volt igény, ami megerősítette, hogy ténylegesen az adott kémiai szerkezet felelős a biológiai aktivitásért. Ha nem a kívánt szerkezetű vegyületet nyerték és az nem mutatott aktivitást, akkor hamis negatív, ha pedig egy szennyező felelt az aktivitásért, akkor hamis pozitív találatot kaptak. Ez korszerű elválasztási és detektálási technikákat igényelt, amilyen például a tömegspektrométer által [18] vagy UV-elnyelés által vezérelt HPLC vagy NMR alkalmazása, [19] valamint az ehhez kapcsolódó magas szintű adatkezelés és kiértékelés. Míg korábban az egyedileg előállított (nem keve-



rék) vegyületek kis hányadán ($\leq 10\%$) végeztek teljes analitikai vizsgálatot (tisztaság, azonosság), ezt később a teljes könyvtárra kiterjesztették. Ez azért is vált fontossá, mert a nagy gyógyszergyárak jelentős molekulabankokat építettek ki, ahol a minőség, a hosszú távú, bomlás nélküli eltarthatóság vált kulcskérdéssé a szűrési kampányok között.

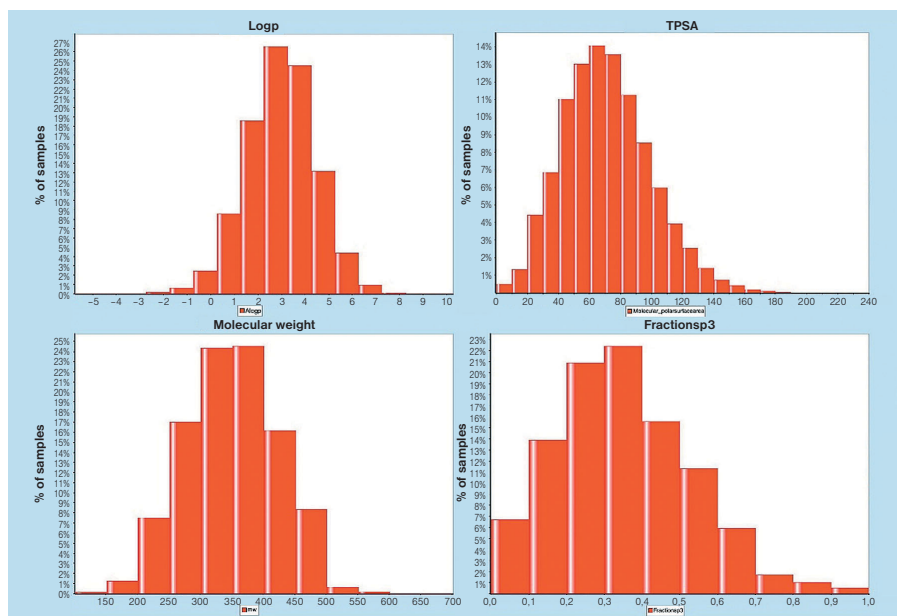
A vegyületkönyvtárak lejárati idejének becslésére Darvas és munkatársai kidolgoztak egy nagy kapacitású analitikai rendszert, amely gyorsított módon határozta meg a termikus stabilitást. Ennek alapján megfelelő extrapolálással a vegyületek, szerkezeti klaszterek lejárati ideje becsülhetővé vált. [20] A gyakorlatban a leghatékonyabbnak a tiszta állapotban, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ -on, argon alatti tárolás bizonyult, de praktikus okokból a DMSO-oldatban való lefagyaszthatás terjedt el. Itt a stabilitás jelentősen függött a vegyület eredeti tisztaságától is. [21] A DMSO-oldatban való tárolás esetén az időleges biológiai szűrések a felolvasztás-lefagyasztás ciklusait követelték meg, melyek hatással voltak a vegyületek és az oldat stabilitására. [22]

A gyógyszerfejlesztésben releváns tulajdonságok korai kiszűrése

A Pfizer gyógyszerkutatói folyamatában korábban felmerült nagyszámú vegyület elemzése során született meg az ún. Lipinski-féle 5-ös szabály. [23] (Molekulatömeg < 500 , hidrogénkötés-donorok száma $(\text{OH}+\text{NH}) < 5$, hidrogénkötés-akceptorok $(\text{O}+\text{N}) < 10$, $\log P < 5$), amit a vegyületkönyvtárak számítógépes (*in silico*) előszűrésére használtak oly módon, hogy ha legalább 2 feltételnek nem felelt meg a vegyület, akkor várhatóan orálisan rosszul szívódik fel. Az 5-ös szabály hamarosan ipari sztenderddé vált. Későbbiekben további kritériumokat azonosítottak: a Veber-szabály [24] szerint a forgatható csoportok száma < 10 és a poláris felület területe $< 140\text{ \AA}^2$.

A molekulák 3 dimenziós jellege a planáris szerkezetekhez képest kedvező a biológiai kötődés és szelektivitás szempontjából, és javította a gyógyszerfejlesztés sikerarányát, így az fsp^3 érték (sp^3 szénatomok száma/összes szén atomok száma) előnyösen $> 0,4$. [25]

Hasonlóan a nem hidrogénatomok száma („heavy atom count”) < 20 , és a gyűrűk száma < 3 is kedvező a későbbi sikerarány szempontjából. A központi idegrendszerbe való bejutás több tényezőtől álló empirikus kritériuma az ún. CNS MPO érték (CNS MPO kritérium > 4). [26] A szer-



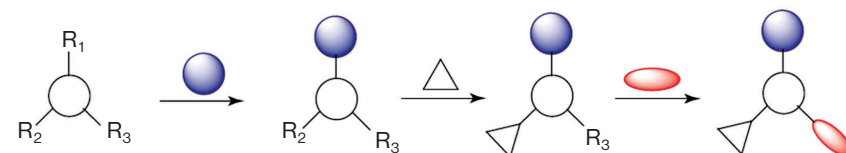
4. ábra. Egy tipikus vegyületkönyvtár 4 jellemző paraméterének eloszlása ($\log P$, molekulatömeg, topografikus poláris felület területe (TPSA), sp^3/sp^2 arány) [27]

(a) Linear, divergent synthesis

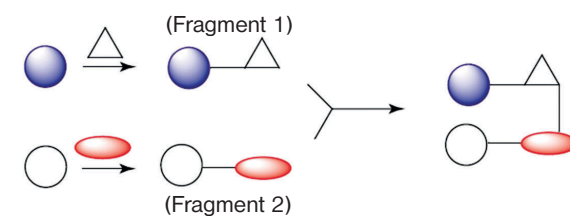
(i) Oligomer synthesis



(ii) (Eq 2): Scaffold modification



(b) Convergent synthesis



5. ábra. Különböző tipikus könyvtárkiépítési stratégiák [34]

kezeti diverzitás mellett a fizikokémiai paraméterek szabályos (Gauss-) eloszlása ugyancsak fontos a biológiai szűrésre szánt könyvtárakban (4. ábra).

A nagy kapacitású biológiai szűrőrendszerek *in vitro* természetük miatt nem adnak választ arra, hogy a „találatok” biológiai hasznosulása, farmakokinetikai tulajdonságai alkalmasak-e gyógyszerfejlesztésre vagy sem.

A predikciós szakértői rendszerek elterjedése és pontosságuk javulása azt eredményezte, hogy a vegyületeket még szintetizálásuk előtt virtuális ADMETox- (orá-

lis felszívódás (A), eloszlás (D), metabolizmus (M), kiürülés (E) és toxicitás (T)) szűrésnek lehet alávetni, ami további jelentős költségcsökkentést eredményez, mivel csupán az előszűrt gyógyszerjelölt vegyületeket kell előállítani. Az *in silico* ADME predikciós módszerek [28] bekerültek a kombinatorikus könyvtárakat előállító vállalkozások és nagy gyógyszergyárak napi rutintevékenysébe, így a várhatóan nem megfelelő vegyületeket már a könyvtárak tervezésénél ki tudták szűrni. [29, 30] A toxicitás korai előrejelzésére számos szakértői rendszer [31] mellett a könyvtárak to-



xikogenomikai profilozása jelentett új lehetőséget. [32]

2. Szintetikus megközelítések szerkezeti diverzitás kiépítésére

A könyvtárak szerkezete szempontjából a diverzitás fogalmát több módon közelíthetjük meg:

1. Toldalékdiverzitás – szerkezeti változatosság a központi váz körül
2. Funkcióscsoport-diverzitás
3. Sztereokémiai diverzitás
4. Váz- (szkaffold) diverzitás [33]

A központi vázon (többnyire gyűrűn vagy gyűrűrendszeren) alapuló könyvtártervezés során 3-4 különböző térirányba vezetünk be különböző szubsztituenseket (előnyösen farmakofor elemeket). A diverzitásért felelős szubsztituenseket hordozó reagensek és az azokat beépítő reakciólépések szempontjából lineáris, divergens, vázdekoráló („feldíszítő”) és konvergens szintéziseket különböztethetünk meg (5. ábra).

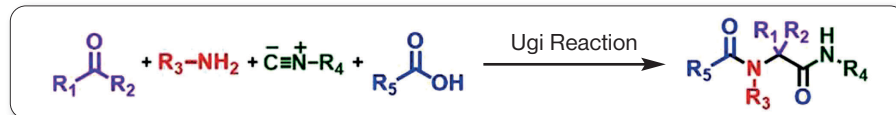
A 2000-es évek közepére a természetes anyagokat imitáló központi váz és sztereokémia sokféleségére törekvő diverzitásorientált szintézis (DOS) komoly áttörést jelentett a gyakran redundáns szerkezetű, többnyire sikserű heterociklusos könyvtárakhoz képest.

A lineáris könyvtárépítési stratégiában a diverzitást hordozó elemeket egymást követően építjük be, de köztük lehetnek olyan lépések, amelyekben csak funkcióscsoport-csere valósul meg annak érdekében, hogy a következő diverzitást hordozó elemet beépíthessük. A diverzitás kiépítésének hatékonysága: a diverzitást hordozó elemek száma osztva az összes reakciólépéssel. E tekintetben a leghatékonyabb módszert a több mint 100 éves múltra visszatekintő többkomponensű reakciók jelentik (Passerini, Biginelli, Ugi stb.). [35] Tipikus példa erre az Ugi-reakció (6. ábra), ahol egy lépésben 4-5 diverzitási elemet is be lehet építeni.

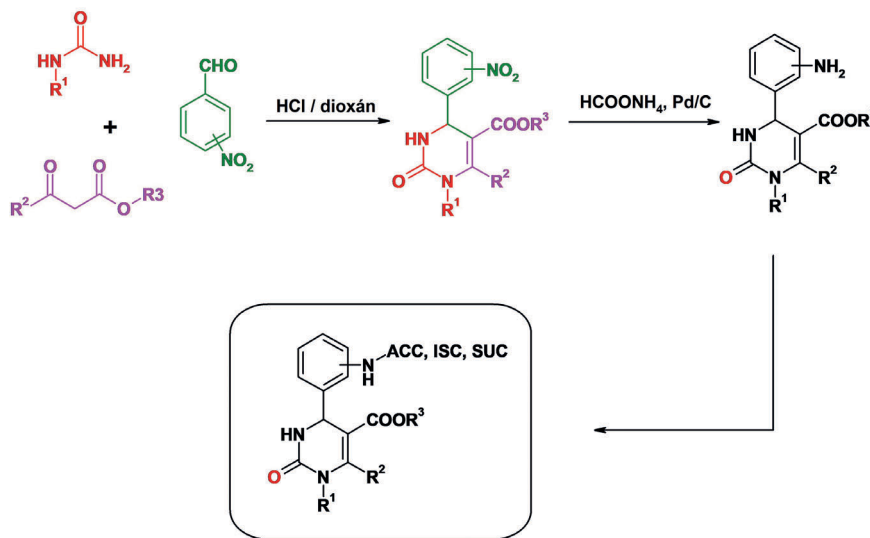
A Biginelli-reakció az egyik legsokoldalúbban alkalmazható többkomponensű reakció, amivel különböző (akár 4 diverzitási ponton át) szubsztituált vagy módosított dihidropirimidinon-könyvtárakat lehet előállítani (7. ábra). [36]

Ennek kiterjesztéseként a többkomponensű reakciókkal nyert vegyületeket poszt-szintetikus gyűrűzárással további nagy diverzitású könyvtárrá lehet alakítani (8. ábra). [37]

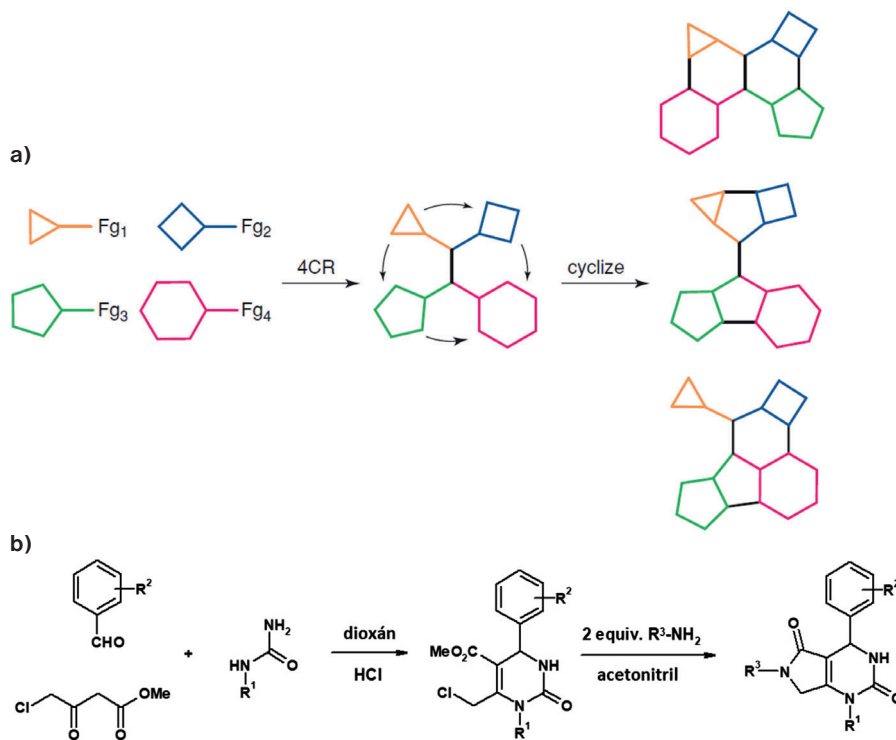
A szintetikus könyvtárak jelentős mértékben tartalmaznak sikserű, főleg *N*-he-



6. ábra. Az Ugi-féle többkomponensű reakció általános sémája



7. ábra. Biginelli-féle többkomponensű reakció alkalmazása dihidropirimidinon-könyvtárak szintézisére – (ACC = acil-klorid, ISC = izotiocianát, SUC = szulfonil-klorid) – *in memoriam* Lukács András (1969–2015)



8. ábra. Többkomponensű reakció poszt-szintetikus gyűrűzárással. a) Long et al. [37], b) Gerencsér J., Lukács A. nem közölt eredményei (2005)

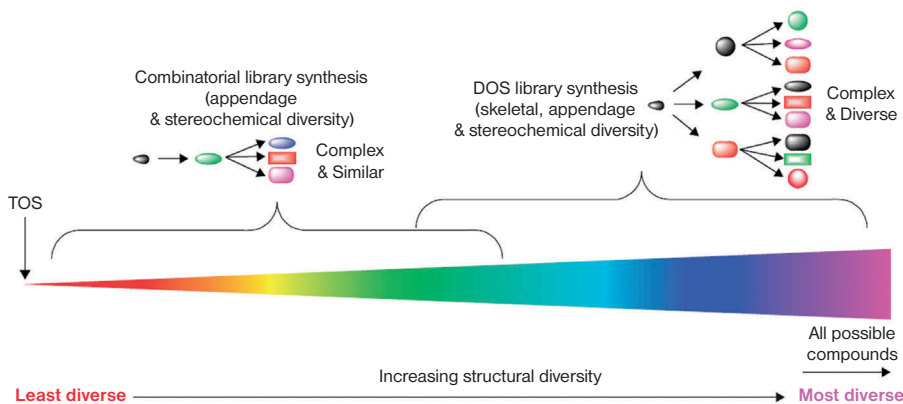
terociklikus, akirális vegyületeket, melyek biológiai aktivitása korlátozott, és a sejten belül számos célpontra hatástalannak bizonyultak. A természetes anyagok fokozott biológiai aktivitása miatt a figyelem az ilyen komplex szerkezetű vegyületek felé fordult. Ganesan és mtsai összehasonlí-

tották a természetes anyagok, bevezetett gyógyszerek és szintetikus vegyületek (benn a könyvtárak) szerkezeti és fizikokémiai tulajdonságait (1. táblázat). Megállapították, hogy a természetes anyagok több királis centrummal rendelkeznek, a C–O kötések aránya magasabb a C–N kö-

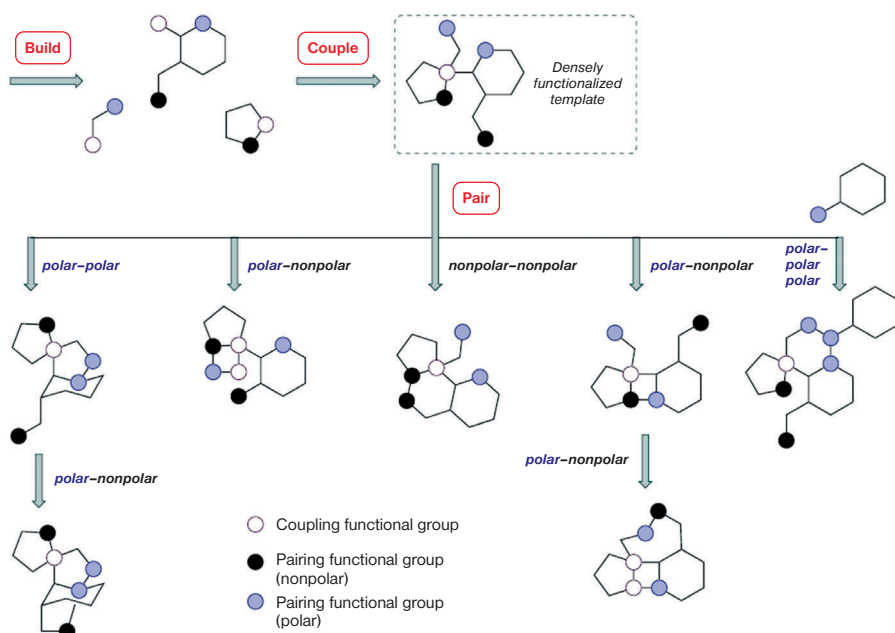


	Természetes anyagok	Törzskönyvezett gyógyszerek	Szintetikus könyvtárak
Molekulatömeg	387	348	393
LogP	2,65	2,15	4,3
Királis centrumok száma	4,7	1,75	0,25
N-atomok száma	0,84	1,64	2,69
O-atomok száma	5,9	4,03	2,77
Aromás gyűrűk aránya	31%	55%	80%

1. táblázat. Természetes anyagok, gyógyszerek és szintetikus könyvtárak tulajdonságainak összehasonlítása [38] (A táblázat a paraméterek átlagértékét tartalmazza.)



9. ábra. A klasszikus kombinatorikus szintézis és a DOS lényegi összehasonlítása (TOS = targetorientált szintézis, azaz egyedi molekulaszintézis) [6]



10. ábra. A diverzitásorientált szintézisek B/C/P algoritmuson alapuló stratégiája [40]

tésekénél, valamint kevesebb aromás (plánaris) gyűrűt tartalmaznak, és a molekuláris vázak igen nagy változatosságban fordulnak elő. [38]

A természetes anyagok által inspirált diverzitásorientált szintézis (DOS) stratégia [39, 40] alapjait Schreiber és Mitsunaga fektették le. A DOS olyan szintetikus eljárás,

aminek során egyetlen kiindulási anyagot reagáltatnak különböző reagensekkel, ami különböző szerkezeti vázú intermedierekhez vezet. [41] Ezekből nagy vázdiverzitású, komplex, 3D térszerkezetű (magas fsp³ aránnyal rendelkező), szerkezeti és funkcionálisan is diverz kombinatorikus könyvtárakat lehet nyerni. A DOS által

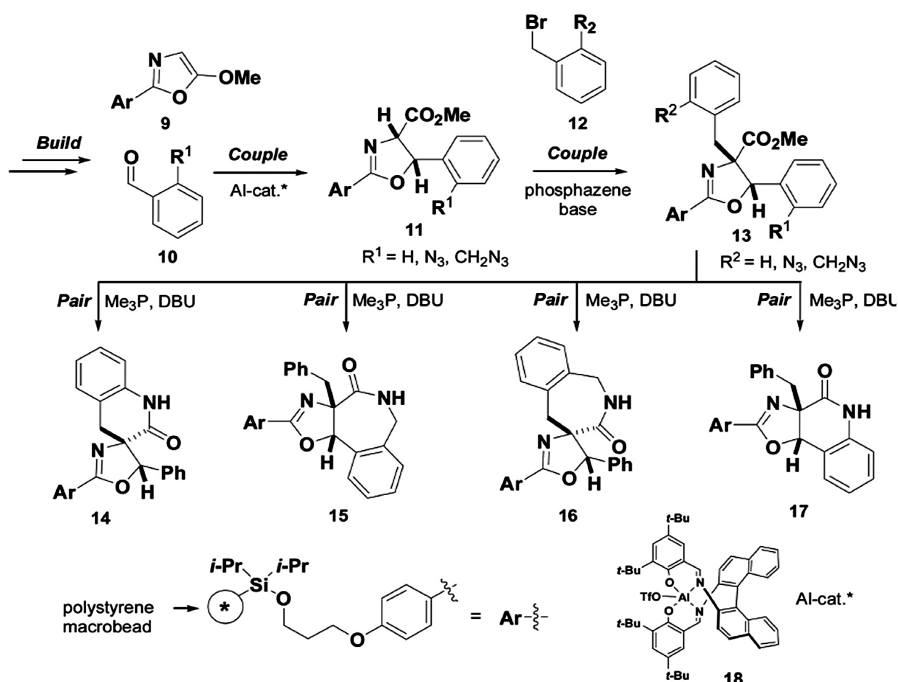
nyert diverzitás messze felülmúlja a klasszikus kombinatorikus lineáris vagy konvergens stratégiáival előállított könyvtárak diverzitását (9. ábra). [6]

A humán génállomány DNS- (fehérje-) szekvenciájának azonosítását követően a nagyszámú új fehérje-célpont felmerülése a gyógyszerkutatás számára új terápiás lehetőséget hordoz. Schreiber víziója az volt, hogy a DOS által előállított nagy diverzitású vegyületekkel minden új célfehérje számára sikerül szelektív moduláló (gátló) szert azonosítani, így a betegségben játszott szerepük azonosítható az adott fehérje, illetve jelátviteli útvonal időleges gátlásával (ami sejtes esszében sejtalapú – fenotípusos – változások formájában jelentkeznek). [42] Konceptióját kémiai genetikának nevezte a funkcionális genetikai analógiájára, ahol a sejtalapú változásokat mutáció révén érik el. [43] A kémiai genetikai/genomikai kismolekulák sokaságával (magasan diverz kombinatorikus könyvtárakkal) sejtalapú biológiai esszében vizsgálja a kismolekulák a sejtet alkotó összes fehérjével való direkt vagy a jelátviteli hálózatokon át kiváltott kölcsönhatását, ami fenotípusos (morfológiai stb.) vagy gényexpressziós változásokat, sejtválaszt vált ki. [44,45,46]

A DOS egy jól megtervezett, 3 lépésből álló szintetikus algoritmust követ. A B/C/P (build/couple/pair = felépít/kapcsol/párosít) algoritmus első lépéseként a kiindulási vegyületeket állítja elő, amelyek királisak, és alkalmas csoportokkal rendelkeznek, hogy a második lépésben komplex és diverz módon funkcionálított intermedierek molekulát eredményezzenek. A harmadik lépésben a különböző karakterű funkcionális csoportok „párosításával” adott reakciókörülmények között nagy vázdiverzitású, komplex, természetesanyag-szerű vegyületekhez jutnak (10–11. ábra). [47]

A DOS stratégiát az elmúlt évtizedben számos módon továbbfejlesztették, például a kismolekulákkal kevésbé kölcsönható fehérje-fehérje interakciók kiváltására is adaptálták makrociklusos vázak előállítására. [48] A DOS-hoz hasonló Waldmann megközelítése a biológiai orientált szintézis (BIOS), [49] amelyben a természetes anyagokban fellelhető vázak köré épített könyvtárakat.

Komoly kritika érte a DOS által szintetizált molekulákat abban a tekintetben, hogy megsértik a Lipinski-féle 5-ös gyógyszer-szerűségekre vonatkozó szabályt. Valóban, a gyógyszerre fejlesztés során más innovatív megoldások szükségesek, hogy orálisan felszívódó készítményt nyerjenek. [50]



11. ábra. Példa a diverzitásorientált szintézisek B/C/P algoritmuson alapuló stratégiájára [47]

A cikksorozat 3. részében a molekulagyárak és molekulabankok létrehozását és gyógyszerkutatói alkalmazását, valamint a nagyszámú hazai műhelyt mutatjuk be.

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

IRODALOM

[1] Zhu, T., Cao, S., Su, P. C., Patel, R., Shah, D., Chokshi, H. B., et al. (2013). Hit identification and optimization in virtual screening: practical recommendations based on a critical literature analysis: miniperspective. *J. Med. Chem.*, 56(17), 6560–6572.

[2] Kennedy, A. (1997). Managing the Drug Discovery/Development Interface. *Drug Discov. Today*, 2, 436–444.

[3] Leeson, P. D. (2016). Molecular inflation, attrition and the rule of five. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 101, 22–33.

[4] Eddershaw, P. J., Beresford, A. P., Bayliss, M.K. (2000). ADME/PK as Part of a Rational Approach to Drug Discovery. *Drug Discov. Today*, 5, 409–414.

[5] Dandapani, S., Rosse, G., Southall, N., Salvino, J. M., & Thomas, C. J. (2012). Acquiring, and Using Small Molecule Libraries for High-Throughput Screening. *Curr. Protoc. Chem. Biol.*, 4, 177–191.

[6] Galloway, W.R., Spring, D.R. (2009). Is synthesis the main hurdle for the generation of diversity in compound libraries for screening? *Expert Opin. Drug Discov.*, 4(5), 467–472.

[7] Gorse, A.-D., Diversity in medicinal chemistry space. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2006, 6(1), 3–18.

[8] Jacoby, E., Schuffenhauer, A., Popov, M., Azaoui, K., Havill, B., Schopfer, U. et al. (2005). Key aspects of the Novartis compound collection enhancement project for the compilation of a comprehensive chemogenomics drug discovery screening collection. *Curr. Top. Med. Chem.*, 5(4), 397–411.

[9] Dolle, R.E. (2002) Comprehensive survey of combinatorial library synthesis: 2001. *J. Comb. Chem.*, 4, 369–418.

[10] Maldonado, A. G., Doucet, J. P., Petitjean, M., & Fan, B. T. (2006). Molecular similarity and diversity in chemoinformatics from theory to applications. *Mol. Divers.*, 10(1), 39–79.

[11] Paricharak, S., Méndez-Lucio, O., Chavan Ravindranath, A., Bender, A., IJzerman, A. P., & van Westen, G. J. (2018). Data-driven approaches used for compound library design, hit triage and bioactivity modeling in high-throughput screening. *Brief Bioinform.*, 19(2), 277–285.

[12] An, Y., W. Sherman, and S. L. Dixon, (2012). Hole filling and library optimization: Application to commercially

available fragment libraries. *Bioorg. Med. Chem.*, 20(18), 5379–5387.

[13] Jacoby, E., Wroblowski, B., Buyck, C., Neefs, J. M., Meyer, C., Cummings, M. D., & van Vlijmen, H. (2018). Protocols for the Design of Kinase-focused Compound Libraries. *Mol. Inform.*, 37(5), e1700119.

[14] Guo, T., & Hobbs, D. W. (2003). Privileged structure-based combinatorial libraries targeting G protein-coupled receptors. *Assay Drug Dev. Technol.*, 1(4), 579–592.

[15] Zhang, X., Betzi, S., Morelli, X., & Roche, P. (2014). Focused chemical libraries—design and enrichment: an example of protein–protein interaction chemical space. *Future Med. Chem.*, 6(11), 1291–1307.

[16] Baell, J. B., G. A. Holloway, (2010). New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *J. Med. Chem.*, 53(7), 2719–2740.

[17] Senger, M. R., Fraga, C. A., Dantas, R. F., & Silva Jr, F. P. (2016). Filtering promiscuous compounds in early drug discovery: is it a good idea? *Drug Discov. Today*, 21(6), 868–72.

[18] Cheng, X., & Hochlowski, J. (2002). Current application of mass spectrometry to combinatorial chemistry. *Anal. Chem.*, 74(12), 2679–2690.

[19] Karancsi, T., Gödörházy, L., Szalay, D., & Darvas, F. (2005). UV-triggered main-component fraction collection method and its application for high-throughput chromatographic purification of combinatorial libraries. *J. Comb. Chem.*, 7(1), 58–62.

[20] Darvas F., Dormán G., Karancsi T., Nagy T., Bágyi I. (2002). Estimation of Stability and Shelf Life for Compounds, Libraries and Repositories in Combination with Systematic Discovery of New Rearrangement Pathways. In: *Handbook of Combinatorial Chemistry* (Eds. Nicolau KC, Hanco R and Hartwig W), 806–828, Wiley-VCH, New York, Weinheim.

[21] Ilouga, P.E., Winkler, D., Kirchoff, C., Schierholz, B., & Wölcke, J. (2007). Investigation of 3 industry-wide applied storage conditions for compound libraries. *J. Biomol. Screen.*, 12(1), 21–32.

[22] Kozikowski, B. A., Burt, T. M., Tirey, D. A., Williams, L. E., Kuzmak, B. R., Stanton, D. T., et al. (2003). The effect of freeze/thaw cycles on the stability of compounds in DMSO. *J. Biomol. Screen.*, 8, 210–215.

[23] Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 23, 3–25.

[24] Veber, D. E., Johnson, S. R., Cheng, H.-Y., Smith, B. R., Ward, K.W., Kenneth, D.K. (2002) Molecular properties

that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem.*, 45, 2615–2623.

[25] Lovering, F., Bikker, J., Humblet, C. (2009). Escape from flatland: increasing saturation as an approach to improving clinical success. *J. Med. Chem.*, 52, 6752–6756.

[26] Wager, T. T., Villalobos, A., Verhoest, P. R., Hou, X., & Shafer, C. L. (2011). Strategies to optimize the brain availability of central nervous system drug candidates. *Expert Opin. Drug Discov.*, 6(4), 371–381.

[27] Besnard, J., Jones, P. S., Hopkins, A. L., & Pannifer, A. D. (2015). The joint european compound library: Boosting precompetitive research. *Drug Discov. Today*, 20(2), 181–186.

[28] Darvas F., Keserű G., Papp Á., Dormán G., Úrge L., Krajcsi P. (2002). In Silico and Ex Silico ADME Approaches for Drug Discovery. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2, 1269–1277.

[29] High-throughput ADMETox Estimation: In vitro & in silico approaches, (2002) BioTechniques Press, Eaton Publishing Eds Darvas F and Dormán G, BioTechniques Press, Eaton Publishing, Westborough, MA, USA.

[30] Darvas F., Dormán G., Papp Á. (2000). Diversity Measures for Enhancing ADME Admissibility of Combinatorial Libraries. *J. Chem. Inf. Comp. Sci.*, 40, 314–322.

[31] Smithing, M. P., Darvas, F. (1992). HazardExpert: an expert system for predicting chemical toxicity. In: *Food safety assessment*, Eds. J. W. Finley, S. F. Robinson and D. J. Armstrong. ACS-Symposium-series-American-Chemical-Society (USA), (no. 484) p. 191–200.

[32] Vass L., Kis Z., Fehér L. Z., Zvara Á., Lórinicz Z., Borbola I., Cseh S., Kulín S., Úrge L., Dormán G., Puskás L.G. (2006). Medium-Throughput Microarray-Based Approach for Toxicogenomic Profiling of Small Molecules. *QSAR Comb. Sci.*, 25(11), 1039–1047.

[33] Burke, M.D., Berger, E.M., Schreiber, S.L. (2004). A Synthesis Strategy Yielding Skeletally Diverse Small Molecules Combinatorially. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 14095–14104.

[34] Beeler, A.B., S.E. Schaus, J.A. Porco Jr. (2005). Chemical library synthesis using convergent approaches. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 9(3), 277–284.

[35] Ugi, I. (2001). Recent progress in the chemistry of multi-component reactions. *Pure Appl. Chem.*, 73(1), 187–191.

[36] Kappe, C.O. (2000). Recent advances in the Biginelli dihydropyrimidine synthesis. New tricks from an old dog. *Acc. Chem. Res.*, 33(12), 879–888.

[37] Long, A. (2012). Parallel chemistry in the 21st century. *Curr. Protoc. Pharmacol.*, 58(1), 9–16.

[38] Ortholand, J. Y., Ganesan, A. (2004). Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 8(3), 271–280.

[39] Tan, D. S. (2005). Diversity-oriented synthesis: exploring the intersections between chemistry and biology. *Nature Chem. Biol.*, 1(2), 74.

[40] Galloway, W. R., A. Isidro-Llobet, D. R. Spring (2010). Diversity-oriented synthesis as a tool for the discovery of novel biologically active small molecules. *Nat. Commun.*, 1(1), 1–13.

[41] Schreiber, S. L. (2000.) Target-oriented and diversity-oriented organic synthesis in drug discovery. *Science*, 287(5460), 1964–1969.

[42] Galloway, W.R.J.D., Spring, D.R. (2013) Towards drugging the undruggable: enhancing the scaffold diversity of synthetic small molecule screening collections using diversity-oriented synthesis. *Divers. Oriented Synth.*, 1, 21–28.

[43] Schreiber, S.L. (1998). Chemical genetics resulting from a passion for synthetic organic chemistry. *Bioorg. Med. Chem.*, 6(8), 1127–1152.

[44] Darvas F., Dormán G., Krajcsi P., Puskás L. G., Kovári Z., Lórinicz Z., Úrge L., (2004). Recent Advances in Chemical Genomics. *Curr. Med. Chem.*, 11, 3119–3145.

[45] *Chemical Genomics and Proteomics*, (2013). Eds. Darvas F., Guttman A., Dormán G., Taylor and Francis/CRC Press, New York, Basel.

[46] Dormán, G. (2011). Fenotípus alapú megközelítések, kémia genomika Gyógyszerkutatók kémiája (szerk. Keserű Gy.), Akadémiai Kiadó, Budapest, 116–152 old.

[47] Nielsen, T.E., Schreiber, S.L. (2008) Diversity-oriented synthesis – towards the optimal screening collection: a synthesis strategy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 47(1), 48–56.

[48] Beckmann, H. S. G., Nie, F., Hagerman, C. E., Johansson, H., Tan, Y. S., Wilcke, D., Spring, D. R. (2013) A strategy for the diversity-oriented synthesis of macrocyclic scaffolds using multidimensional coupling. *Nature Chem.*, 5, 861–867.

[49] Wetzel S., Bon R.S., Kumar K., Waldmann H. (2011). Biology-oriented synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 50, 10800–10826.

[50] Hajduk, P. J., Galloway, W. R. J. D., Spring, D. R. (2011) A question of library design. *Nature*, 470, 42–43.

Dormán György

■ TargetEx Kft., SZTE Gyógyszerésztudományi Kar

A kombinatorikus kémia tündöklése, hanyatlása és újjászületése

Hatása a modern gyógyszerkutatásra | III. 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 kitekintéssel a hazai szakmai műhelyek hozzájárulására is.

Hazai szakmai műhelyek

A magyar kutatók, egyetemek, gyógyszergyárak és vállalkozások nagymértékben hozzájárultak a kombinatorikus kémia és a nagy áteresztőképességű biológiai szűrés gyors fejlődéséhez és térhódításához.

Hazai egyetemek

A hazai egyetemi és akadémiai kutatóműhelyek között első hely illeti meg az ELTE TTK Szerves Kémiai Tanszék Peptidkémiai Kutatócsoportját, ahol Furka Árpád professzor munkatársaival a kombinatorikus kémia alaptechnológiájának számítósztásos-keveréses peptidszintézist fejlesztette ki, majd kidolgozta a string- („zsinór”) szintézist. (Ezeket sorozatunk első részében bemutattuk).

A Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Karán Fülöp Ferenc és munkatársai korábbi szintetikus kutatásaikban keletkező vegyületekből, ill. célzott könyvtárszintézisekből [1,2] (**1. ábra**) létrehoztak egy többezres molekulabankot, ami számos gyógyszerkutatási projektben eredményezett aktív vegyületeket.

A Debreceni Tudományegyetem Szerves Kémiai Tanszékén Patonay Tamás (1951–2015) hasonló többezres kereshető molekulabankot hozott létre szintetikus munkáiból.

Hazai gyógyszergyárak

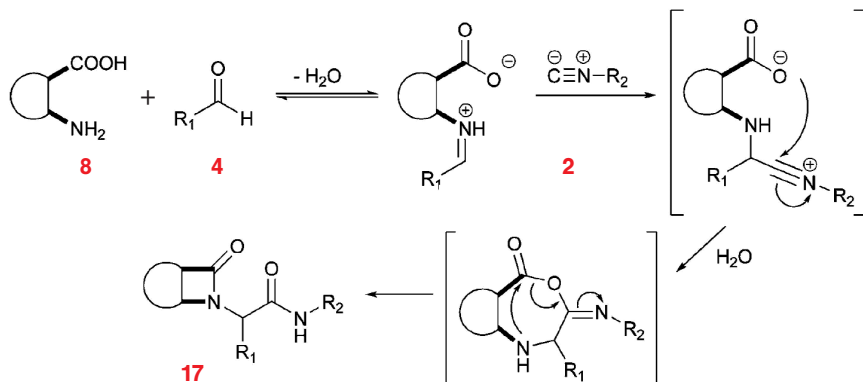
Hazai gyógyszergyáraink hamar felismerték a kombinatorikus kémiában rejlő lehetőségeket.

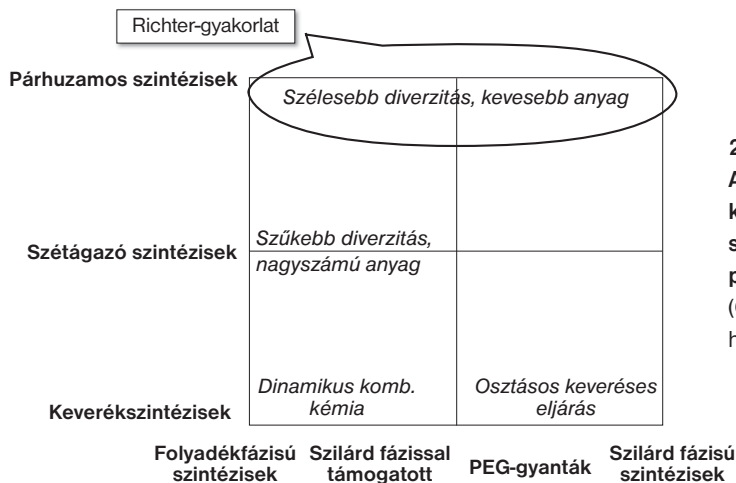
Chinoin/Sanofi Gyógyszergyár. 1994-ben, egy nemzetközi gyógyszerkémiai szimpóziumot követően, Arányi Péter kezdeményezésére Bata Imre vállalta el, hogy kombinatorikus kémiai módszerekkel bővítsse a Chinoin frissen létrehozott vegyülettárát. A kezdetben manuális szintézisek sikerén felbuzdulva 1997-ben szintetikus kapacitást építettek ki egy német SYRO

robot megvásárlásával, mellyel 60 párhuzamos reakciót lehetett végrehajtani szilárd hordozón vagy oldatban. 2004-ben sorozatos összeolvadások után létrejött a Sanofi-Aventis, Európa legnagyobb gyógyszergyára, így ennek megfelelő méretű közös Molekulabankkal rendelkezett. Miután az Aventis korábban felvásárolta a Seletride kombikem-céget, valamint már rendelkezett egy teljesen automatizált oldatfázisú szintézisekkel foglalkozó csoporttal, így a budapesti helyszín elvesztette létjogosultságát. A Chinoin-csoport Hermeicz István (1944–2011) közreműködésével a kombinatorikus kémia első hazai, magyar nyelvű összefoglaló műveit jelentette meg, [3,4,5,8] amit 2011-ben egy újabb követett. [6]

A Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Nyrt. 1997-ben hozta létre kombinatorikus kémiai kutatócsoportját Greiner István irányításával. [7,8] Ebben az évben szereztek be egy Tecan automata szintetizátort, amit később kibővítettek a bepárláshoz szükséges centrifugál-vákuumbepárlóval és az analitikát-tisztítást segítő HP-Gilson kombinált HPLC–MS rendszerrel. Számos új szintézist dolgoztak ki szilárd hordozón és folyadékfázisban, amelyek alkalmas voltak az automata szintetizátoron történő könyvtár szintézisre. [9–12] A későbbiekben a már megszerzett tapasztalatok alapján kidolgozták a kombinatorikus kémiai mátrixot (**2. ábra**), mely szemléletesen ábrázolja a kombinatorikus kémia alkalmazási fajtáinak egymáshoz való viszonyát, és amely egyetemi oktatási anyag részét is képezi már (BME gyógyszer-vegyéssz mérnöki MSc). A kombinatorikus kémia ma a Richter K+F területén mindennapos; [13–15] hasznosságát mi sem bizonyítja jobban, mint hogy a ma már „blockbuster” cariprazine kutatásának során is alkalmazták. [16,17]

1. ábra. 17 tagszámú bi- és triciklusos β -laktám-könyvtár előállításának vizes közegben (Kanizsai et al. [2])





2. ábra. A Richter Gedeon kombinatorikus szintézisének portfóliója (Greiner István hozzájárulásával)

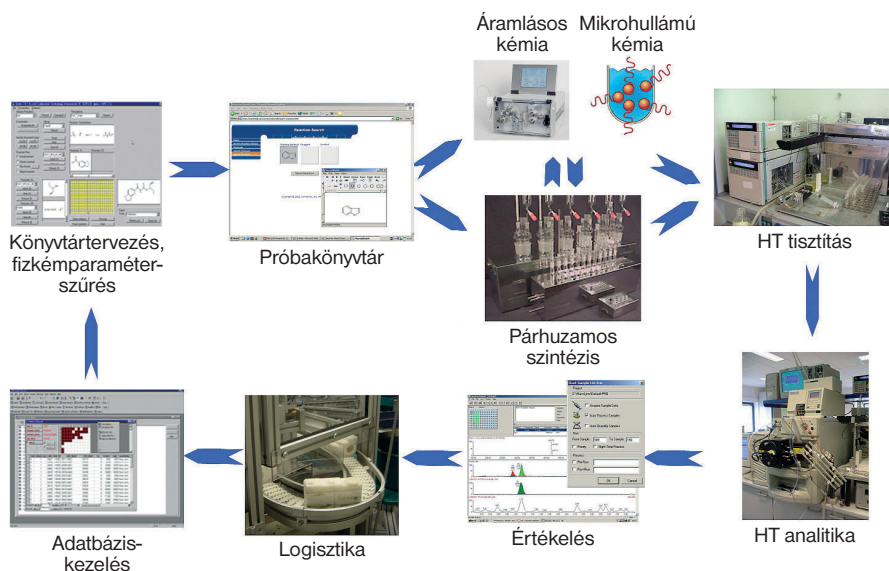
Ezzel párhuzamosan Keserő György és munkatársai virtuális szűrési kapacitást építettek ki, ami egyrészt a könyvtárak korai ADMETox-jellemzését [18,19] és a CNS-aktivitás [20] becslését célozta meg, másrészt elsőként valósították meg fehérjécpontok 3D szerkezetalapú szűrését [21] Magyarországon. Ez utóbbi módszer számos célpont esetén aktív vegyületet eredményezett, és jól kiegészíti a nagy áteresztőképességű biológiai szűrését. [22]

Hazai vállalkozások

A 90-es évek vége felé a nagy farma-cégek egymás után alapítottak kombinatorikus kémiai csoportokat abból a célból, hogy a cég profiljába vágó régi és új célpontok farmakológiailag releváns kémiai terét lefedjék. Az előállított relatíve kis, ill. közepes méretű könyvtárak izolált, egyedi molekulákat tartalmaztak, nem pedig keverékeket, és elsősorban folyadékfázisú párhuzamos szintézissel állították elő ezeket.

3. ábra. A ComGenex folyadékfázisú párhuzamos szintézisrendszere (1997–2006)

Forrás: Darvas Ferenc előadása, Vegyészkonferencia, 2011, Sopron



A könyvtárszintézisek egy részét kihelyezték kisebb CRO (Contract Research Organization) cégekbe, amelyekkel elsősorban FTE-alapon szerződtek, azaz adott számú vegyészeti adott időtartamra „szerződtek”.

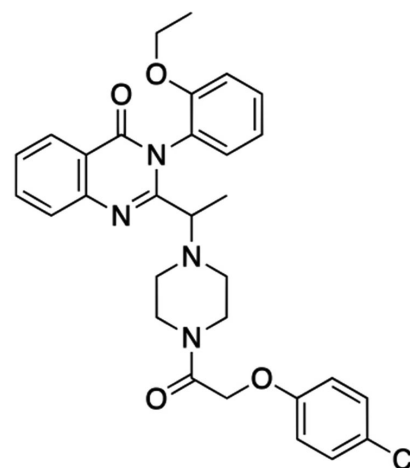
A 90-es években így létrehozott kombinatorikus kémiai vállalkozásokkal (pl. Trega, Arqule, Pharmacoepia, ChemDiv) párhuzamosan Magyarországon is megjelentek hasonló vállalkozások.

ComGenex/AMRI/ComInnex. A hazai szintéren kiemelt helyet foglal el ez az egymáshoz köthető 3 vállalkozás. Az 1993-ban Európában elsőként alapított ComGenex (CGX) a 2000-es évek elejére a világ egyik vezető kombinatorikus kémiai cégévé nőtte ki magát. Az alapító, Darvas Ferenc és munkatársai a folyadékfázisú párhuzamos szintézis technológiáját komplex rendszerré („molekulagyárrá”) fejlesztették (CMT: ComGenex Mátrix Technológia), [23,24] ami robotokkal, párhuzamos reak-

torblokkokkal, nagy áteresztőképességű (HT) tisztítással, analitikával, [25] logisztikával, központi adatbázissal és predikciós szakértői rendszerekkel támogatott, nagy hatékonyságú szintézisrendszer volt (3. ábra).

A ComGenex számos gyógyszeripari céggel (Bayer, Merck stb.) kötött exkluzív együttműködési szerződést, mely során több millió vegyületet állítottak elő.

A kombinatorikus kémiai cégek nem exkluzív („nyílt”) molekulakönyvtáraik adatbázisait elérhetővé tették. Ezekből a biológiai szűréssel foglalkozó cégek „szemelgethettek” („cherry-picking”). A ComGenex vegyületkönyvtára (kb. 200 000 vegyület) a „medchem tractability” (gyógyszerkémiai alkalmasság) szempontjából az egyik legjobb volt 23 további vendorkönyv-



4. ábra. Erastin/ CGX596987 antitumor-hatású vegyület

tárral összehasonlítva 2004-ben. [26] A többmilliók könyvtárból a partnerek számos biológiaiilag aktív vegyületet azonosítottak. Közülük a legismertebb az antitumorhatású, apoptózist indukáló, CGX596987 kódú kinazolonszármazék, amely Erastin néven vált ismertté [27] (4. ábra).

A CGX-könyvtárból 2D/3D kemoinformatikai módszerekkel számos fókuszált könyvtárat választottak ki, melyek közül említésre méltó a kinázcsaládra fókuszált, ill. a specifikus foszfatidilinozitol-3-kinázgátló könyvtár, amely számos aktív vegyületet eredményezett. [28,29] A CGX molekulabankjának *in silico* kiterjesztése által prediktált metabolitokat és retrometabolitokat (prodrugokat), ill. T. Fujita (Kiotói Egyetem) professzor útmutatásai alapján bioizosztér/bioanalóg helyettesítéseket tartalmazó könyvtárakat kínáltak partnereiknek. [30] A molekulabank folyamatos bővítése során nagyszámú új molekuláris vázat tartalmazó könyvtárat állítottak elő.



Közülük számos váz új, szintetikus megoldásokat igényelt. [31–33]

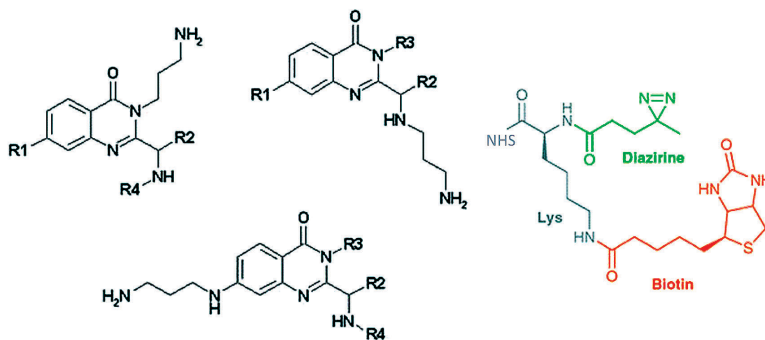
A kémiai genomika előtérbe kerülésével komoly érdeklődés irányult a sejtesszében aktivitást mutató vegyületek azonosítására és egy lépésben történő célfehérje-azonosításra. Ennek érdekében a CGX kutatói célfehérjék fotokovalens jelzésére alkalmas fotoreaktív csoportokat (diazirin, benzofenon) vezettek be a kismolekulákba kombinatorikus módon elhelyezett pályván (linkeren) keresztül, és ún. fotomarker-könyvtárakat hoztak létre. [34,35] A koncepció 10 évvel előzte meg a hasonló célú, Cravatt és munkatársia által tervezett multifunkcionális, fotoreaktív-könyvtárakat [36] (5. ábra).

A pályvázott könyvtár másik alkalmazásában a vegyületeket reaktív üveg mikroszkóplemezre horgonyozták ki („rányomtatták”). Az így nyert kémiai mikrosorokkal a sejtet alkotó fehérjék sokaságának és kismolekulák sokaságának párhuzamos kölcsönhatás-vizsgálatát végezték uniformizált körülmények között. [37]

2006-ban a ComGenexet megvásárolta az amerikai AMRI cég, majd miután 2012-ben magyarországi telephelyét megszüntette, a korábbi tulajdonos a régi szakmai törzsgárdát a ComInnex vállalkozásába integrálta. A ComInnex a könyvtárszintézis új követelményeihez igazodva a ThalesNano által kifejlesztett áramlósos reaktorok kiterjesztett paraméterterével új gyűrűrendszereket állított elő. [38] A ComInnex hazánkban elsőként adaptálta a DEL- (DNS által kódolt) könyvtárak szintézisét (a témáról sorozatunk 4. részében szólnunk), és folyamatosan fejleszti tovább a technológiát.

A CGX egykori leányvállalata, a ReComGenex 2007-ben **Targetex Kft.** néven, Cseh Sándor vezetésével, önálló biotechnológiai kisvállalattá vált. A cég molekuláris biológiai, esszéfejlesztési és kémiai informatikai szolgáltatásokat nyújt. Az elmúlt években több fehérjecélpontra célzott (PDE4/5, [39] glutaminil-cikláz, [40] lizil-oxidáz, [41] CIs [42]) inhibitorfókuszált könyvtárak generáltak elsősorban 2D/3D ligandumalapú módszerekkel, amelyek biológiai validálása során számos aktív vegyületet azonosítottak. A ligandumalapú „molekulahalászat” a „hasonló tulajdonságok alapelvein” nyugszik, amely szerint a kémiailag hasonló molekulák biológiai szempontból is hasonló tulajdonságokkal rendelkeznek. A vegyületek molekuláris „ujjlenyomatán” alapuló 2D hasonlóság alapú válogatás jól alkalmazható új, adott fehérjecélponton nem vizsgált kémiai szerkezetek felkutatására,

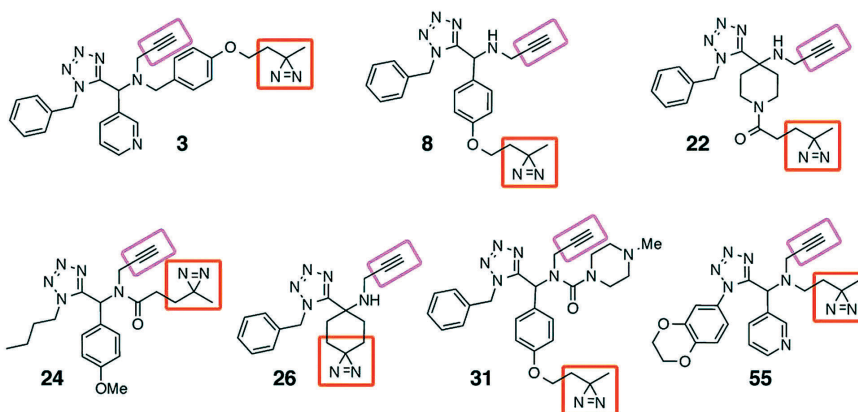
CGX-módszer (2002)



Cravatt et al. (2012)

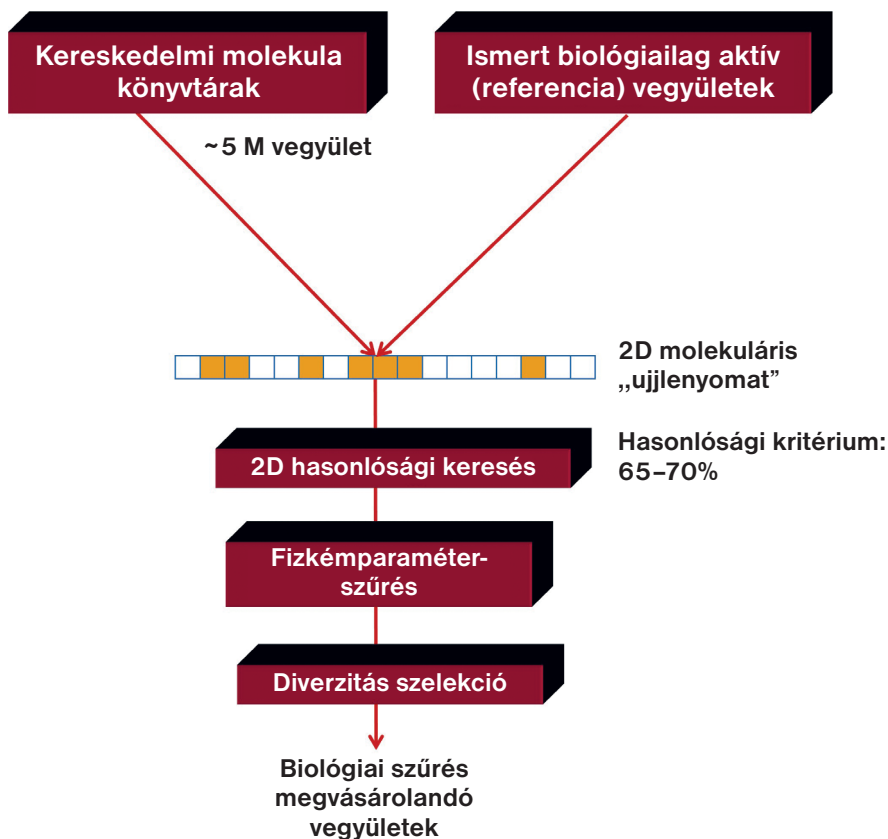
Photocrosslinking group (diazirine)

Latent affinity handle (alkyne)



5. ábra. A ComGenex és Cravatt multifunkcionális fotoreaktív-könyvtára

6. ábra. A 2D ligandumalapú hasonlósági keresés folyamata többmillió kereskedelmi adatbázisokból kiindulva Forrás: TargetEx Kft.





ha azok hasonlítanak az ismert, biológiai-
ilag aktív, referenciavegyületek szerkezeté-
hez.

A **6. ábra** a 2D ligandumalapú virtuális
szűrés folyamatát mutatja be. A kívánt ha-
sonlóságot (~65–70%) elérő vegyületek szá-
mát fizikai kémiai paraméterekre megál-
lapított kritériumok és diverzitásszelekció
alapján lehet szűkíteni. A vásárolható ve-
gyületek adatbázisai (PubChem, Zinc stb.)
mellett addigra rendelkezésre álltak már
olyan adatbázisok is, amelyek tartalmaz-
ták nagyszámú vegyület biológiai aktivitá-
si adatait (ChemBL, BindingDB, DrugBank
stb.).

A **Vichem Chemie Kutató Kft.**-t az
Axxima Pharmaceuticals AG alapította 1999-
ben, gyógyszerkémiai leányvállalataként.
A cég első ügyvezetője Kéri György (1950–
2016) volt. Órfi László közreműködésével
kinézőgátlók fejlesztése területén értek el
nemzetközi szempontból is kiemelkedő
eredményeket. Kifejlesztették a Nested
Chemical Library™ (NCL) [43] elnevezésű,
kinázokra fókuszált (kb. 17 000 inhibitor)
vegyülettárat és technológiát, ami 600 vál-
tozatosan szubsztituált alapstruktúra köré
szerveződik, és több mint 160 kináz ellen
tartalmaz ismert gátlószert. Az elmúlt 20
évben a technológia alkalmazásával szá-
mos sejten belüli jelátvitelben szerepet ját-
szó patológiás kinázcélpont [44] ellen sike-
rült új gátlószert kifejleszteniük (pl. AXL,
[45] CDK9, [46] EGFR/cMet, [47] FGFR4,
[48,49] FLT3), melyeket 43 fő – nemzeti
fázisokban több mint 130 – szabadalmi
bejelentésben védtek. A korábbi tapaszta-
latok alapján az utóbbi években allostéri-
kus enzim-inhibitor/modulátor fókuszált ve-
gyülettárat (Allosteric Library, 1400 vegyü-
let) fejlesztettek ki 40 irodalmi allostéri-
kus enzim-inhibitor/modulátor szerkezet
köré, ami kiváló kiindulási pont új terápi-
ás jelentőségű, allostérikus módon kötő-
dő gyógyszerjelöltek azonosítására. Kova-
lensen kötődő és hordozóhoz vagy fluo-
reszcens molekulához kapcsolható (tool
compound) vegyülettáruk a kinázinhibi-
tor-kutatás új irányait követi.

Az **Infarmatik Kft.**-t (Magyarorszá-
gon és az USA-ban) Kovács László alapí-
totta 1994-ben. A cég fő profilja nem
szokványos szerkezetű molekuláris építő-
elemek szintézise volt kombinatorikus
könyvtárak számára. Később, a 2000-es
évek közepétől a cég figyelme önálló frag-
mentumkönyvtár tervezése felé fordult, és
számos célzott könyvtárat hoztak forgal-
omba (diverz 3D szerkezetű, GPCR, [50]
kináz). Emellett a piacon elsőként jelentek
meg akrilamid-fragmentum-könyvtárral,

amelynek tagjai kovalens kötést képesek
létesíteni a kötőfehérje térközelségben lé-
vő cisztein aminosavjaival tartós kölcsön-
hatást biztosítva.

Az **Avicor/Avidin Biotech** vállalkozá-
sokat Puskás László alapította 2002-ben.
Az eredetileg molekuláris biológiai háttérrel
rendelkező biotech-cég immobilizált
DNS-, fehérje- és kismolekula-könyvtár mi-
krosorokat fejlesztett ki és alkalmazott ge-
nomikai és proteomikai vizsgálatokban.
[51] Később számos gyógyszerkutatói
(rák-, ill. Alzheimer-kór-ellenes) projektet
indítottak, melyeknek támogatására rész-
ben saját szintetikus kapacitás felhasználá-
sával százezres nagyságrendű eredeti kis-
molekulából álló exkluzív könyvtárat hoz-
tak létre, amiből számos aktív vegyületet
azonosítottak.

Kiss Róbert 2011-ben 4 társával alapí-
totta meg az **Mcule.com** internetes gyó-
gszerkutatói platformot, [52] amely szá-
mos kemoinformatikai keresési lehetősé-
get biztosít a mintegy 45 millió megvásá-
rolható vegyületet magába foglaló adatbá-
zisban. Emellett az Mcule bevezette saját
fejlesztésű, kombinatorikus reakciószabá-
lyokon alapuló, jelenleg mintegy 126 mil-
lió szintetizálható vegyületet tartalmazó
Ultimate adatbázisát. A platform a kivá-
lasztott vegyületek online megvásárlását is
biztosítja mindkét adatbázis esetén.

Meg kell még említeni a **ChemAxon
Kft.**-t, amely Csizmadia Ferenc szakmai
irányításával szoftverek sokaságát hozta
létre molekulakönyvtárak generálására,
[53] adatbázis-kezelésre, [54] analízisére,
2D/3D hasonlósági keresésére, [55] fiziko-
kémiai és ADMETox-alapú virtuális szűré-
sére.

A 2016-ban Makara Gergely szakmai írá-
nyításával alapított **ChemPass Kft.** a
gyógyszerfelfedezés számára generál és kí-
nál mesterséges intelligenciával (AI) támo-
gatott szintetikus megvalósítható, inno-
vatív szerkezetű virtuális könyvtárakat.

A kombinatorikus kémia nemzetközi és hazai szerveződése

A kombinatorikus kémia hazai szervező-
dése szorosan kapcsolódott a nemzetközi,
elsősorban európai szervezetekhez. 2000
előtt a nagy áteresztőképességű biológiai
szűrés és molekuláris diverzitás tematikája
körébe tartozott a kombinatorikus kémia.
A terület 2. Európai Konferenciáját 1995-
ben Budapesten rendezték, majd 1996-ban
megalakult a Biomolekuláris Szűrés Társaság
(1996). Ezt követte 2000-ben a Kom-
binatorikus Tudományok Európai Társa-

ságának alapítása Morten Meldal vezeté-
sével. A szervezet első hivatalos konferen-
ciáját 2001-ben Budapesten rendezték meg
(Eurocombi-1) és itt *Furka Árpádot meg-
választották a szervezet tiszteletbeli elnö-
kévé.* Ebben az évben alakult meg a Ma-
gyar Kémikusok Egyesülete Gyógyszerké-
miai Szakosztály Kombinatorikus Kémiai
Szakcsoportja Darvas Ferenc vezetésével.
A szakcsoportot 2005–2010 között Dor-
mán György, 2010 után Gerencsér János
vezette, miközben a szakcsoport aktivitá-
sát kiterjesztette Kombinatorikus Kémiai
és Új Szintézistechnológiai Szakcsoport el-
nevezéssel, és így működött a 2010-es évek
közepéig, amikor érdektelenség okán meg-
szűnt. A szakcsoport a 2000-es években
számos előadói programot szervezett és a
terület oktatási tevékenységét is felkarol-
ta, „Nagy áteresztőképességű és kombina-
torikus technológiák a szerves kémiában”
címmel mérnöktovábbképző tanfolyamot
szervezett a BME-n, az ELTE, a Chinoi, a
ComGenex és a Richter szakértőinek be-
vonásával. A Magyar Kémikusok Lapja már
a kezdetektől fórumot biztosított a kom-
binatorikus kémia művelői számára; 1999-
ben és 2003-ban tematikus számot szerve-
zett, és később is lehetőséget nyújtott a té-
ma új eredményeinek bemutatására.

Cikksorozatunk befejező részében a klasz-
szikus kombinatorikus kémia válságát és
elmúlt években tapasztalt újjászületését mu-
tatjuk be.



Köszönetnyilvánítás. A szerző köszönettel tartozik
Bata Imrénének, Batori Sándornak, Darvas Ferencnek, Fülöp
Ferencnek, Greiner Istvánnak, Kiss Róbertnek, Kova-
cs Lászlónak és Órfi Lászlónak. Külön köszönet illeti
Gerencsér Jánost a kézirat szakmai lektorálásáért.

IRODALOM

- [1] Fülöp, Gedy, S., Van der Eycken, J., Fülöp, F. (2002).
Liquid-phase combinatorial synthesis of alicyclic β -
lactams via Ugi four-component reaction. *Org. Lett.*,
4(11), 1967–1969.
- [2] Kanizsai, I., Gyónfalvi, S., Szakonyi, Z., Sillanpää, R.,
Fülöp, F. (2007). Synthesis of bi- and tricyclic β -lac-
tam libraries in aqueous medium. *Green Chem.*, 9(4),
357–360.
- [3] Hermecz I., Bata I. (1999). Kombinatorikus kémia.
Bevezetés, fogalmak és módszerek. Magyar Kémiku-
sok Lapja, 54(5), 211–213.
- [4] Bata I., Báthori S., Várkonyiné Schlovicskó E., Her-
mecz I., Arányi P. (1999). Kismolekulák kombinatori-
kus szintézise, Magyar Kémikusok Lapja, 54(5), 214–
222.
- [5] Bata I., Arányi P., Podányi B., Erősné Takácsy T., Haj-
dú F. (1999). A kombinatorikus szintézisek analitikai
módszerei. Magyar Kémikusok Lapja, 54(5), 239–244.
- [6] Bata I. (2011). Célzott vegyülettárak a vezérmolekula
keresésében. Gyógyszerkutatás kémiája, Szerk.: Ke-
serű Gy., Akadémiai Kiadó, Budapest
- [7] Greiner I., Keserű Gy. M., Szobathelyi Z. (2004).
Nagy áteresztőképességű módszerek a gyógyszerku-
tatásban, Magyar Kémikusok Lapja, 59(6–7), 208–
213.
- [8] Greiner I. (2005). Kombinatorikus kémia. Vegyületek
gombnyomásra. Természet Világa, 2005/I. különszám
36–38.



- [9] Weber, C., Bielik, A., Szendrei, G. I., Greiner, I. (2002). Novel solid-phase synthesis of 2, 6-disubstituted 4 (3H)-quinazolinones for combinatorial library generation. *Tetrahedron Lett.*, 43(16), 2971–2974.
- [10] Weber, C., Bielik, A., Szendrei, G. I., Keserű, G. M., & Greiner, I. (2004). Solid-phase synthesis of an N-(phenylalkyl) cinnamide library via Horner–Wadsworth–Emmons reaction. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14(5), 1279–1281.
- [11] Weber Cs., Bielik A., Demeter Á., Borza I., Szendrei I. Gy., Keserű Gy. M., Greiner I. (2005). Solid-phase synthesis of 6-hydroxy-2,4-diaminoquinazolines, *Tetrahedron* 61(39), 9375–9380.
- [12] Weber Cs., Demeter Á., Greiner I. (2006). An efficient solid-phase synthesis of 2-alkyl-4,6-diaminopyrimidines and 2,4,6-triaminopyrimidines, *Tetrahedron*, 62(10), 2304–2312.
- [13] Borza I., Kolok S., Ignác-Szendrei Gy., Greiner I., Tárkányi G., Galgóczy K., Horváth Cs., Farkas S., Domány Gy. (2005). Indole-2-carboxamides as novel NR2B selective NMDA receptor antagonists, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15(24), 5439–5441.
- [14] Wágner G., Weber Cs., Nyéki O., Nógrádi K., Bielik A., Molnár L., Bobok A., Horváth A., et al. (2010). Hit to lead optimization of disubstituted oxadiazoles and tetrazoles as mGluR5 NAMs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 3737–3741.
- [15] Galambos J., Bielik A., Krasavin M., Orgován Z., Domány Gy., Nógrádi K., Wágner G., Balogh G.T., et al. (2017). Discovery and Preclinical Characterization of 3-(4-(4-Chlorophenyl)-7-fluoroquinoline-3-yl)sulfonyl benzonitrile, a Novel Non-acetylenic Metabotropic Glutamate Receptor 5 (mGluR5) Negative Allosteric Modulator for Psychiatric Indications. *Journal of Medicinal Chemistry* 60(6), 2470–2484.
- [16] Ágai-Csongor É., Nógrádi K., Galambos J., Vágó L., Bielik A., Magdó I., Ignác-Szendrei Gy., Keserű Gy. M., Greiner I., et al. (2007). Novel sulfonamides having dual dopamine D2 and D3 receptor affinity show in vivo antipsychotic efficacy with beneficial cognitive and EPS profile, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17(19), 5340–5344.
- [17] Domány Gy., Greiner I. (2016). A kémia, ami a cariprazine-hoz vezetett. *Magyar Kémiai Folyóirat* 122(2–4), 112–116.
- [18] Keserű, G. M. (2001). A virtual high throughput screen for high affinity cytochrome P450cam substrates. Implications for in silico prediction of drug metabolism. *J Comput Aided Mol Des*, 15(7), 649–657.
- [19] Molnár, L., Keserű, G. M., Papp, Á., Lőrincz, Z., Ambrus, G., & Darvas, F. (2006). A neural network based classification scheme for cytotoxicity predictions: Validation on 30,000 compounds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16(4), 1037–1039.
- [20] Keserű, G. M., Molnár, L., Greiner, I. (2000). A neural network based virtual high throughput screening test for the prediction of CNS activity. *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 3(6), 535–540.
- [21] Polgár, T., Keserű, G. M. (2005). Virtual screening for β -secretase (BACE1) inhibitors reveals the importance of protonation states at Asp32 and Asp228. *J Med Chem*, 48(11), 3749–3755.
- [22] Polgár, T., Baki, A., Szendrei, G. I., Keserű, G. M. (2005). Comparative virtual and experimental high-throughput screening for glycogen synthase kinase-3 β inhibitors. *J Med Chem*, 48(25), 7946–7959.
- [23] Darvas F., Nagy T., Kovács L., Papp Á., Dormán G. (1999). Nagyszámú vegyület robotizált kombatóriumi szintézise gyógyszerkutatói célra. A CMT párhuzamos szintézisrendszer nagy diverzitású kombatórikus könyvtárak előállítására. *Magyar Kémikusok Lapja*, 54, 230–236.
- [24] Darvas F., Kovács L. (1997). CMT: A solution phase combinatorial approach. Synthesis and yield prediction of phenazines. In: *High-Throughput Screening* (Ed. Devlin JP), 223–242. Marcell Dekker Inc., New York
- [25] Karancsi T., Gödörházy L., Darvas F. (1999). Nagy kapacitású tömegspektrometriás rendszer kombatórikus könyvtárak analízisére, *Magyar Kémikusok Lapja*, 54(5), 237–238.
- [26] Baurin, N., Baker, R., Richardson, C., Chen, I., Folloppe, N., Potter, A., et al. (2004). Drug-like annotation and duplicate analysis of a 23-supplier chemical database totalling 2.7 million compounds. *J Chem Inf Comput Sci*, 44(2), 643–651.
- [27] Dolma, S., Lessnick, S. L., Hahn, W. C., Stockwell, B. R. (2003). Identification of genotype-selective anti-tumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer Cell*, 3(3), 285–296.
- [28] Decornez H., Gulyás-Forró A., Papp A., Szabó M., Sármay G., Hajdú I., Cseh S., Dormán G., Kitchen D. B. (2009). Design, selection, and evaluation of a general kinase-focused library. *ChemMedChem*. 4(8), 1273–8.
- [29] Compounds having inhibitive activity of phosphatidylinositol 3-kinase and methods of use thereof (2004). PCT: 21958–2004; PCT: 21780–2004. (ComGenex – Echelon Bioscience, SLC, UT)
- [30] Papp A., Szommer T., Barna L., Gyimesi G., Ferdinandy P., Spadoni C., Darvas F., Fujita T., Úrge L., Dormán G. (2007). Enhanced hit-to-lead process using bioanalogous lead evolution and chemogenomics: application in designing selective matrix metalloprotease inhibitors, *Expert Opin. Drug Discov*, 2(5), 707–723.
- [31] Varga L., Nagy T., Kövesdi L., Bene-Buchholz J., Dormán G., Úrge L. and Darvas F. (2003). Solution-Phase Parallel Synthesis of 4,6-Diaryl-Pyrimidine-2-ylamines and 2-Amino-5,5-Disubstituted-3,5-Dihydro-Imidazol-4-ones via a Rearrangement, *Tetrahedron*, 59, 655–662.
- [32] Gerencsér J., Panka G., Nagy T., Egyed O., Dormán G., Úrge L. and Darvas F. (2005). A Versatile Procedure for the Parallel Preparation of 3-Imidazo[1,2-a]Pyridin-3-yl-Propionic acid Derivatives Involving Meldrum's Acid, *J. Comb. Chem.* 7, 530–538.
- [33] Varga L., Nagy T., Dormán G., Kálmán F., Úrge L. and Darvas F. (2006). Solution-Phase Parallel Synthesis of a Pyridinium-pyrazol-3-olate Inner Salt Library Using a Novel Three-Component Reaction *J. Comb. Chem.* 8, 338–343.
- [34] Dormán G., Krajcsi P., Úrge L., Darvas F. (2002). Novel Chemical Genomics Approaches to One-Step Hit Discovery and Target Identification/Validation, *Pharmachem* 1, 13–16.
- [35] Új kombatórikus fehérjemarker molekulakönyvtárak, eljárás azok előállítására és alkalmazására (2002). Hung. Pat. Appl. P02–02212. (ComGenex)
- [36] Cisar, J. S., & Cravatt, B. F. (2012). Fully functionalized small-molecule probes for integrated phenotypic screening and target identification. *J. Am. Chem. Soc.*, 134(25), 10385–10388.
- [37] Hackler L. Jr., Dormán G., Kele Z., Úrge L., Darvas F., Puskás L.G. (2003). Development of Chemically Modified Glass Surfaces for Nucleic Acid, Protein and Small Molecule Microarrays, *Mol. Divers.*, 7, 25–36.
- [38] Lengyel, L. C., Sipos, G., Sipocz, T., Vágó, T., Dormán, G., Gerencsér, J., Makara, G. and F. Darvas, F. (2015). Synthesis of Condensed Heterocycles by the Gould–Jacobs Reaction in a Novel Three-Mode Pyrolysis Reactor, *Org. Process Res. Dev.* 19 (3), 399–409.
- [39] Dobi K., Hajdú I., Flachner B., Fabó G., Szaszko M., Bognár M., Magyar C., Simon I., Szisz D., Lőrincz Z., Cseh S. and Dormán G. (2014). Combination of 2D/3D ligand-based similarity search in rapid virtual screening from multimillion compounds' repositories. Selection and biological evaluation of potential PDE4 and PDE5 inhibitors. *Molecules*, 19(06), 7008–7039.
- [40] Szaszko M., Hajdú I., Flachner B., Dobi K., Magyar C., Simon I., Lőrincz Z., Kapui Z., Pázmány T., Cseh S., Dormán G. (2017). Identification of potential glutaminyl cyclase inhibitors from lead-like libraries by in silico and in vitro fragment-based screening, *Mol. Divers.*, 21(1), 175–186.
- [41] Hajdú, I., Kardos, J., Major, B., Fabó, G., Lőrincz, Z., Cseh, S., Dormán, G. (2018). Inhibition of the LOX enzyme family members with old and new ligands. selectivity analysis revisited. *Bioorg. Med. Chem. Letters*, 28 (18), 3113–3118.
- [42] Szilágyi, K., Hajdú, I., Flachner, B., Lőrincz, Z., Balczér, J., Gál, P. Závodszy, P., Pírl, C., Balogh, B., Mándity, I. M., Cseh, S., Dormán, G. (2019). Design and selection of novel CLs inhibitors by in silico and in vitro approaches. *Molecules*, 24(20), 3641–3651.
- [43] Keri G., Szekelyhídi Z., Banhegyi P., Varga Z., Hegyemegi Barakonyi B., Szantai Kis C., Hafenbradl D., Klebl B., Muller G., Ullrich A., et al. (2005). Drug discovery in the kinase inhibitory field using the Nested Chemical Library (TM) technology. *Assay Drug Dev Technol.*, 3(5), 543–551.
- [44] Kéri Gy., Órfi L., Eros D., Hegyemegi-Barakonyi B., Szántai-Kis Cs., Horváth Z., Wáczek E., Marosfalvy J., Szabadkai I., et al. (2006). Signal Transduction Therapy with Rationally Designed Kinase Inhibitors *Curr. Signal Transduct. Ther.*, 1(1), 67–95.
- [45] Szabadkai I., Torka R., Garamvolgyi R., Baska F., Gyulavari P., Boros S., Illyes E., Choidas A., Ullrich A., Órfi L. (2018). Discovery of N-[4-(Quinolin-4-yloxy)phenyl]benzenesulfonamides as Novel AXL Kinase Inhibitors *J Med Chem* 61(14), 6277–6292.
- [46] Czudor Z., Balogh M., Bánhegyi P., Boros S., Breza N., Dobos J., Fábán M., Horváth Z., Illyés E., Markó P., Sipos, A., et al. (2018). Novel compounds with potent CDK9 inhibitory activity for the treatment of myeloma. *Bioorg Med Chem Lett* 28(4), 769–773.
- [47] Szokol B., Gyulavári P., Kurkó I., Baska F., Szántai-Kis C., Greff Z., Órfi Z., Peták I., Péntes K., Torka R., Ullrich A., Órfi L, et al. (2014). Discovery and biological evaluation of novel dual EGFR/c-Met inhibitors *ACS Med. Chem. Lett.* 5(4), 298–303.
- [48] Ho H. K., Németh G., Ng Y. R., Pang E., Szántai-Kis C., Zsákaai L., Breza N., Greff Z., Horváth Z., Pató J., Szabadkai I., et al. (2013). Developing FGFR4 inhibitors as potential anti-cancer agents via in silico design, supported by in vitro and cell-based testing. *Curr. Med. Chem.* 20(10), 1203–1217.
- [49] Baska, F., Sipos, A., Órfi, Z., Nemes, Z., Dobos, J., Szántai-Kis, C., et al. (2019). Discovery and development of extreme selective inhibitors of the ITD and D835Y mutant FLT3 kinases. *Eur. J. Med. Chem.*, 184, 111710.
- [50] Kelemen, A. A., Kiss, R., Ferenczy, G. G., Kovács, L., Flachner, B., Lorincz, Z., Keserű, G. M. (2016). Structure-based consensus scoring scheme for selecting class A aminergic GPCR fragments. *J Chem Inf Model*, 56(2), 412–422.
- [51] Puskás L. G., Hackler L. Jr., Dormán G. (2004). Kismolekula chipek a kémiai genomikában, *Biokémia*, 28, 61–67.
- [52] Kiss, R., Sandor, M., Szalai, F. A. (2012). <http://Mcu->le.com: a public web service for drug discovery. *J. Cheminformatics.* 4(S1), 17.
- [53] Pirok, G., Máté, N., Varga, J., Szegezdi, J., Vargyas, M., Dóránt, S., Csizmadia, F. (2006). Making “real” molecules in virtual space. *J Chem Inf Model.* 46(2), 563–568.
- [54] Csizmadia, F. (2000). JChem: Java applets and modules supporting chemical database handling from web browsers. *Journal of chemical information and computer sciences*, 40(2), 323–324.
- [55] Kalászi A., Szisz, D., Imre, G., Polgar, T. (2014). Screen 3D: a novel fully flexible high-throughput shape-similarity search method. *J Chem Inf Comput Sci*, 54(4), 1036–1049.

Dormán György

■ TargetEx Kft., SZTE Gyógyszerésztudományi Kar

A kombinatorikus kémia tündöklése, hanyatlása és újjászületése

Hatása a modern gyógyszerkutatásra | IV. 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 kitekintéssel a hazai szakmai műhelyek hozzájárulására is.



1. ábra. A szintetikus ráfordítások és az előállított molekulák számának, minőségének összefüggése [5]

A klasszikus kombinatorikus kémia válsága

1995-ben Ecker és Crooke megfogalmazta a kombinatorikus gyógyszerfeldedezés iránti elvárásokat. Idetartozott a gyógyszerjelöltek minőségének és teljesítményének javítása, a gyorsított vezérmolekula-azonosítás, a vezérmolekulák gyorsabb eljuttatása a klinikáig, nagyobb szelektivitás, farmakokinetikai tulajdonságok javítása, alacsonyabb toxicitás.

A hangsúlyt az újdonságra és a megnövelt kémiai térre helyezte, illetve arra, hogy a kombikem olyan vegyületeket eredményezzen, amelyeket a hagyományos szerves kémiai módszerekkel nem sikerülne előállítani. Viszont amennyiben kizárólag a molekulaszám nő, de a kémiai tér ugyanabban a szerkezeti körben marad, mint korábban, akkor nem várható áttörés. Ez a „prófétai jóvendülés” beigazolódott. [1]

A kombikem azt a paradigmaváltást is ígérte, hogy az automatizált, robotizált molekulagyárak tehermentesítik a szerves kémikust a rutin kísérleti tevékenységtől. Illúzió volt azt is feltételezni, hogy a nagy tagszámú könyvtárak már közvetlenül tartalmazzák a klinikai jelölt molekulákat, illetve hogy a szintetikus erőfeszítéseket meg lehet spórolni azzal, hogy egyszerűen megnöveljük az olcsón előállítható vegyületek számát (1. ábra).

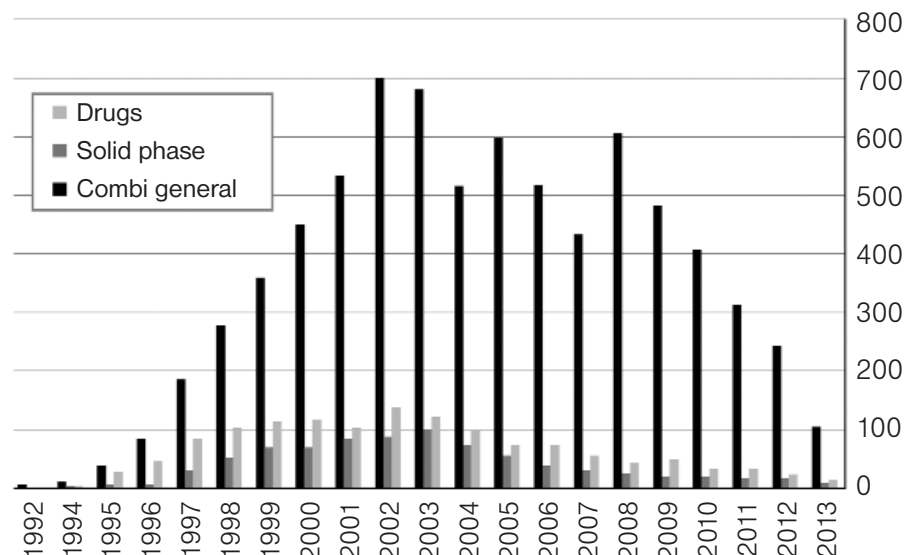
Évekkel később fel is tették a kérdést, hogy hány gyógyszer kifejlesztéséhez járult hozzá a kombikem. Egyes vélekedések

szerint: a kombikem kitermelt tonnányi haszontalan vegyületet nagyon sok vegyész alkalmazva. [2] Emellett a HTS gyakran gyenge minőségű adatokat szolgáltatott, ill. számos fehérje célpont esetében nem sikerült egyetlen aktív vegyületet sem azonosítani. A nagy molekulaszám nem várt, relatíve alacsony találati arányt (0,01% és 0,14% között) eredményezett, [3,4] ami különösen az első időkben a vegyületek alacsony tisztaságának és a tervezett szintéziságak részbeni sikertelenségének volt betudható.

A vegyületek hasonló vázszerkezete a változatos „dekoráció” ellenére sem hozott több találatot. A szintetikus komplexitás és diverzitás elérésére és a nagyszámú vegyület biológiai szűrésére drága berendezéseket fejlesztettek, de a nyert vegyületek értéke nem volt arányban a ráfordításokkal. Az automatizált technológiák és a kémia könyvtárításának időskálája ugyancsak aránytalanul hosszú volt a kapott vegyületek hasznosságához képest. [5]

Bár új technológiai megoldások szület-

2. ábra. Évenkénti publikációk a kombinatorikus kémia területén (kombinatorikus kémia – általánosságban; szilárd fázisú szintézis és kombinatorikus kémia; kombinatorikus kémia és gyógyszerek)





tek, mint pl. a HTS, az automatizálás, a virtuális könyvtárszűrés és a kombinatorikus/párhuzamos szintézis módszerek, ezek a költségek jelentős emelkedését eredményezték. A várt áttörés nem következett be, az NCE-k száma nem növekedett, a gyógyszer-szektor bevételei tovább csökkentek. A valóság ennél árnyaltabb: 1991 és 2008 között 58 törzskönyvezett gyógyszer közül 19 felfedezéséhez járult hozzá a HTS és a kombikem, a fejlesztés valamelyik fázisában. Idetartozik több rákellenes tirozinkináz-gátló (gefinitib, erlotinib, sorafenib, dasatinib), ill. HIV-ellenes (Tiptanivir, Maraviroc) szer felfedezése is. [6] Bár Dolle szerint ez idő alatt több mint 5000 könyvtárat közöltek az irodalomban. [7] A publikáció évenkénti eloszlása szépen mutatja a kombikem felfutását és lecsengését. [8] A publikációs csúcspont 2002–2003-ra esik (2. ábra).

A kombikem időközben „tabu” kifejezéssé vált, és fokozatosan felváltotta a nagy áteresztőképességű kémia elnevezés (high-throughput chemistry). [9] Ez magába olvasztott minden területet az analóg tervezéstől, párhuzamos és kombinatorikus szintézisen át a tisztításig és a molekulák automatizált kezeléséig.

Az 1999-ben alapított Journal of Combinatorial Chemistry 2010-ben kiterjesztett szakmai területtel, új névvel (ACS Combinatorial Science) jelent meg. A korábbi QSAR-ról 2003-ban QSAR & Combinatorial Science-ra kiterjesztett Wiley folyóirat pedig 2010-ben megszűnt, szakmai területének informatikai vonatkozásait a Molecular Informatics vette át. Az 1995-ben alapított Molecular Diversity (Springer) több válságot és megszakítást átélve egyes tartalmú szintetikus, informatikai orgánummá vált.

A kombikem sikertelensége miatt a gyógyszeripar nagy nyomás alá került, mert a felfedező kutatás költségeit jelentősen csökkenteniük kellett. Egy mítosz szertefoszlott. A legtöbb kombinatorikus csoport 2008-ra lényegében feloszlott (a „molekulagyárak” ideje lejárt), a vegyészeket más területek szívták fel.

A nagy gyógyszergyárak addigra többmillió, saját kutatási irányukat kiszolgáló molekulabankokat létesítettek. A Bayer és AstraZeneca-könyvtárak esetén < 20%-nyi vegyület mutatott szerkezeti hasonlóságot egymáshoz, amelyek többsége külső könyvtárellátótól származott. [10] A már létrehozott molekulabankokat később is megtartották, időnként szűkítették tisztaság alapján, ill. új molekulák hozzáadásával egészítették ki.

A nagy tagszámú könyvtárak szintézisének ideje végleg lejárt, a figyelem kisebb fókuszált, ill. analógvirtuális felé fordult. A vegyületszám csökkenésével az osztásos-keveréses szintézis háttérbe szorult, a kisebb nemkeverék-könyvtárak klasszikus vagy párhuzamos szintézismódszereket igényeltek. A trendet támogatta a 2D/3D alapú virtuális szűrés intenzív fejlődése, sebességének és pontosságának növekedése.

A kombikem- és kombinatorikus könyvtárak gyenge pontjai

1. Szerkezeti redundancia, a kémiai tér alacsony lefedettsége, alacsony újdonságtartalom

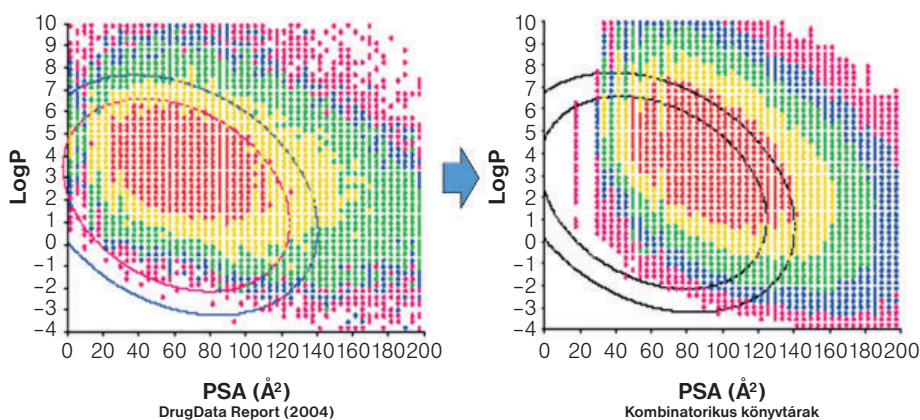
A szerkezeti redundancia (ismétlődés) részben az építőelemek, reagensek korlátozott elérhetőségében, ill. a néhány viszonylag egyszerű kémiai lépés alkalmazásában rejlik. [11] Ez a diverzitás mértékét eleve korlátozta, így a különböző laborokban készült könyvtárak nagyban hasonlítottak egymásra. Shang és munkatársai 11 kereskedelmi könyvtárat hasonlítottak össze vázdiverzitás szempontjából, és nagyszámú gyűrűrendszert azonosítottak, amely mindegyik könyvtárban nagy arányban fordult elő. [12] Ezek közé tartoztak a számos gyógyszerben megtalálható ún. „kiváltságos” váz-szerkezetek is, amelyek számos fehérjecélponton mutattak biológiai aktivitást a helyettesítésektől függően. Kimutatták, hogy 2013-ig az új gyógyszereknek csupán 28%-a tartalmazott új gyűrűrendszereket, és évente átlagosan 6 új gyűrűrendszer került be az új gyógyszerek kémiai terébe. [13] A trendhez hozzájárult a jól bevált „me-too” („én is”) stratégia alkalmazása is, miszerint az új hatóanyag felfedezésekor egy régi gyógyszerből indulunk ki. A UCB kutatói legenerálták a lehetséges 5 és 6 tagú

heterociklusokból képezhető mono- és biciklikus gyűrűrendszereket (24 847); ez alkotja a VEHICLe (virtual exploratory heterocyclic library) virtuális felfedező heterociklusos könyvtárat. [14] Irodalomkutatás szerint csupán 1701-et szintetizáltak a megjelenés időpontjáig. Megállapították, hogy kb. 3000 gyűrűrendszer szintézise megvalósítható. Ez a tanulmány megerősítette a gyógyszerfejlesztés szempontjából releváns kémiai tér alacsony lefedettségét a gyógyszerjelöltek és a kombinatorikus könyvtárak által.

2. A könyvtárak nagy része planáris (síkszerű) gyűrűrendszereket tartalmaz

A különböző könyvtárak molekuláinak alakja, térbeli elrendeződése (topológiája) hasonló volt. Emögött részben az a tényező állt, hogy a molekuláris váz milyen pozícióban és térbeli irányban tartalmazott diverzitás bevezetésére alkalmas funkcióscsoportokat, melyben gyakran az elérhető reagensek és a kémia egyszerű megvalósíthatósága volt korlátozó tényező. A topológikus hasonlóság oka volt az is, hogy a molekulák főleg planáris (síkszerű) gyűrűrendszereket tartalmaztak. [15] Ebben komoly szerepet játszottak a nagy népszerűsége szert tett átmenetifémek által katalizált keresztkapcsolásos reakciók (Suzuki, Heck stb.), amelyek új sp^2-sp^2 kötések létesítettek. [16] A 3 dimenziós térszerkezetű, sp^2-sp^3 vagy sp^3-sp^3 kötések tartalmazó, nem síkszerű, flexibilisebb vegyületek nagyobb valószínűséggel kötődnek célfehérjeikhez, így találati arányuk is magasabb. A természetes anyagokat imitáló, nagy vázdiverzitású, számos aszimmetriacentrumot tartalmazó könyvtárak lennének a legalkalmasabbak, viszont ezek általában soklépéses, nehezen párhuzamosítható szintézist igényelnek.

3. ábra. Törzskönyvezett gyógyszerek (DrugData report, 2004) (balra) és kereskedelmi molekulakönyvtárak LogP- és PSA-eloszlása (D. Reynolds nyomán – nem közölt)



3. A molekulák „elzsírosodása”¹

Leeson elemzése szerint 18 gyógyszeripari cég 2000 és 2011 közötti gyógyszerjelölt-szabadalmaiban a leírt molekulák szignifikánsan nagyobb molekulatömeggel bírtak és lipofilebbek voltak a forgalomban lévő orálisan felszívódó gyógyszereknél. [17] Más elemzések ugyanezt találták a kombinatorikus könyvtárakra is (3. ábra). Ennek egyik oka, hogy a diverzitás növelése érdekében minden funkció csoport származékoltatva van (elsősorban lipofil csoportokkal), ezáltal a LogP érték folyamatosan nő, és nem illeszkedik a gyógyszerek LogP értékeihez. [18]

Bár a Lipinski-féle 5-ös szabály kritériumait többen komolyan vitatták, [19] mégis azokat figyelembe véve, a törzskönyvezett gyógyszerek kiterjesztett LogP értékeinek eloszlási határvonalán a kereskedelmi könyvtárak nagy arányban kívül esnek. Ez ugyanúgy érvényes a Veber-szabályokban lévő PSA (poláris felület terület) eloszlására is.

Összegezve, kisebb tagszámú könyvtárak, kisebb molekulatömegű, kevésbé lipofil molekulák, új gyűrűrendszerekkel, sp³-dús 3D térszerkezetű, számos aszimmetriacentrumot tartalmazó molekulák várhatóan nagyobb sikerarányt eredményeztek volna. A fenti megállapítások ugyancsak hozzájárultak a fragmentum- és vezérmolekula-jellegű könyvtárak elterjedéséhez, amiről később lesz szó.

A kombinatorikus kémia reneszánsza

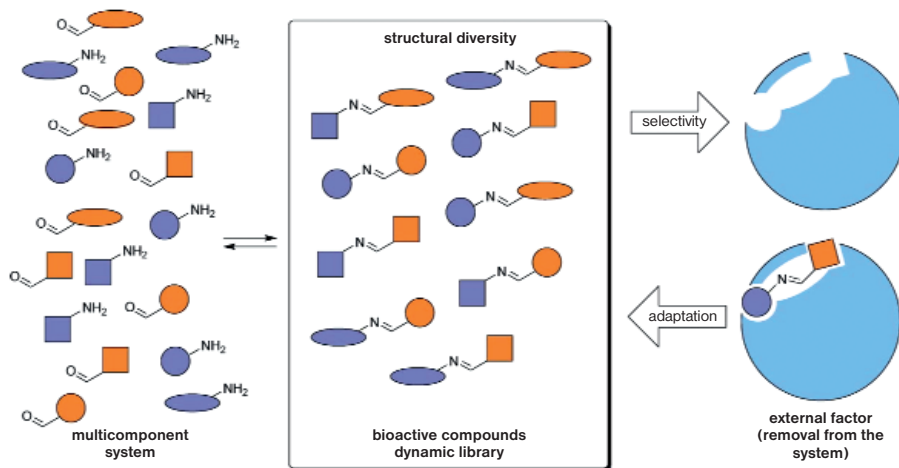
A kombikem újjászületése valójában néhány korábbi koncepció forradalmi megújításának köszönhető. Idetartozik a dinamikus kombinatorikus kémia, a DNS-kódolt könyvtárak (DEL) innovatív alkalmazása, könyvtárszintézis áramlós rendszerekben és az új könyvtártípusok felmerülése.

Dinamikus kombinatorikus kémia

Számos új közlemény született az elmúlt években a dinamikus kombikem korszerű alkalmazásairól. [20,21]

A dinamikus kombikem eredeti koncepciója a Nobel-díjas J. M. Lehn-től származik. [22] Itt a vegyülettár az építőelemek reverzibilis kovalens kapcsolódásával *in situ* képződik, elméletileg az összes lehetséges kombinációt magában foglalja, és a fe-

¹ Az „elzsírosodás” kifejezést Keserű György használta számos előadásában



4. ábra. A dinamikus kombinatorikus kémia elve és megvalósítása [23]

hérjéhez legszorosabban kötődő tagok dúslását eredményezi a könyvtár tagjai között fennálló dinamikus versengés következtében. A dinamikus kémiai könyvtárban az építőelemeknek a szerkezeti diverzitás mellett reverzibilis kapcsolódásra képes funkció csoportokkal is kell rendelkezniük (pl. amin- és aldehidcsoport), ami egyensúlyi reakcióban Schiff-bázis-könyvtárhoz vezet (4. ábra). A találat validálásaként az azonosított aktív vegyület irreverzibilis kovalens kötést tartalmazó analógját szintetizálják meg és szűrik a célhérjén.

A koncepció újrafelfedezése az időközben megvalósult technológiai újításoknak is köszönhető. Ezek egyikében áramlós rendszerben valósul meg az építőelemek reverzibilis kombinációja és kölcsönhatása a fehérjecélponttal. A legjobban kötődő molekulát méretkizárásos kromatográfiával, majd fehérjedenaturációt követően tömegspektrometriával azonosítják (5. ábra). [24]

DNS-kódolt könyvtárak (DEL)

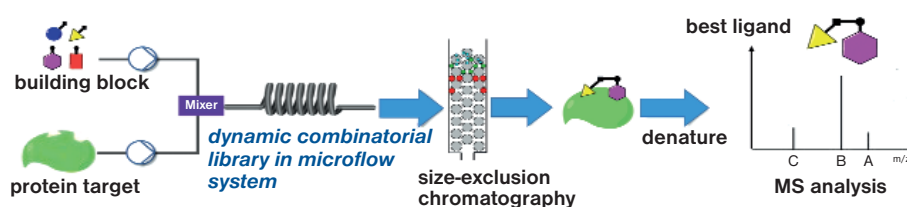
A szilárd fázisú osztásos-keveréses könyvtárszintézis DNS-kódolt (címkézett) változatának újrafelfedezése Lerner korai koncepciójára épül, ami a biológiai szűrést követő PCR- (polimeráz láncreakció) amplifikációs (sokszorozó) és gyors DNS-szekvenálási technológia kiegészítésével gyors,

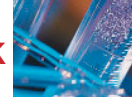
nagy kapacitású és hatékony módszerrel fejlődött az elmúlt években. [25,26] Ily módon rövid idő alatt akár 10⁹ tagszámú keverékkönyvtárat is elő lehet állítani és le lehet szűrni (lásd a címlapon szereplő ábrát).

A többlépéses osztásos-keveréses szintézis mindegyik lépésében egy oligonukleotid-fragmentumot kapcsolunk a keletkező keverék molekuláihoz, ami azonosíthatóvá teszi az adott lépésben beépített építőelemeket. A könyvtárszintézis egy többfunkciós építőelem rövid DNS-szekvenciához való kapcsolásával indul, majd egyesítik a termékeket, és szétosztják különböző reakcióedényzetbe. Ezt edényzetenként új reakció követi, újabb építőelemekkel, majd az oligonukleotid-szálat újabb, a lépésre jellemző DNS-szekvenciával meghosszabbítják ligálás útján. Több lépés után a DNS-kódolt keverékkönyvtárat affinitásalapú biológiai szűrővizsgálatnak vetik alá, amely kötődési képesség alapján megkülönbözteti, szétválasztja a molekulákat. A kötődést mutató molekulák DNS-lánca relatív mennyiségének sokszorosítása polimeráz-láncreakció (PCR), majd azt követő azonosítása nagy áteresztőképességű szekvenálás alkalmazásával történik.

A módszer kétségtelen előnye a relatív kis mennyiség: kis reagensigény, nanomólnyi termékek elegendők több ezer szűrés végrehajtásához, a módszer gyorsasága, nagy könyvtárak generálása stb. A szilárd

5. ábra. Dinamikus kombinatorikus kémia megvalósítása folyamatos áramlós rendszerben





fázisú szintézis és az oligonukleotid-címke azonban korlátozza az alkalmazható kémiai reakciók sorát. A DEL technológia sikerét és növekvő népszerűségét bizonyítja, hogy például a GSK kutatói a DEL-találatok kisebb módosításával rövid idő alatt jutottak klinikai jelölt molekulához RIPI (Receptor Interacting Protein 1) és sEH (soluble epoxide hydrolase) célpontok ellen. [27]

Könyvtárszintézis folyamatos áramlásos rendszerekben

A könyvtárszintézis reneszánszára komoly hatással volt az áramlásos kémia gyors fejlődése és általános elterjedése. [28] Ezt valójában a szilárd (polimer) hordozós reagensek és reagensmegkötő gyanták széles körű elterjedése és többlépcsős reakciókban való alkalmazása alapozta meg.

Damiao és munkatársai [29] egyetlen folyadékáramban elosztott folyadékcseppekben (szegmensekben) állítottak elő szubsztituált triazolkönyvtárat (6. ábra). Itt valójában a párhuzamos szintézis helyett a könyvtár kiépítése rövid reakcióintervallumokkal szekvenciálisan (egymást követően) történik. A különböző reakciót hordozó és a mosásra használt folyadékszegmenseket nem elegyedő fluoros oldószerrel szétválaszthatjuk (7. ábra) [30]

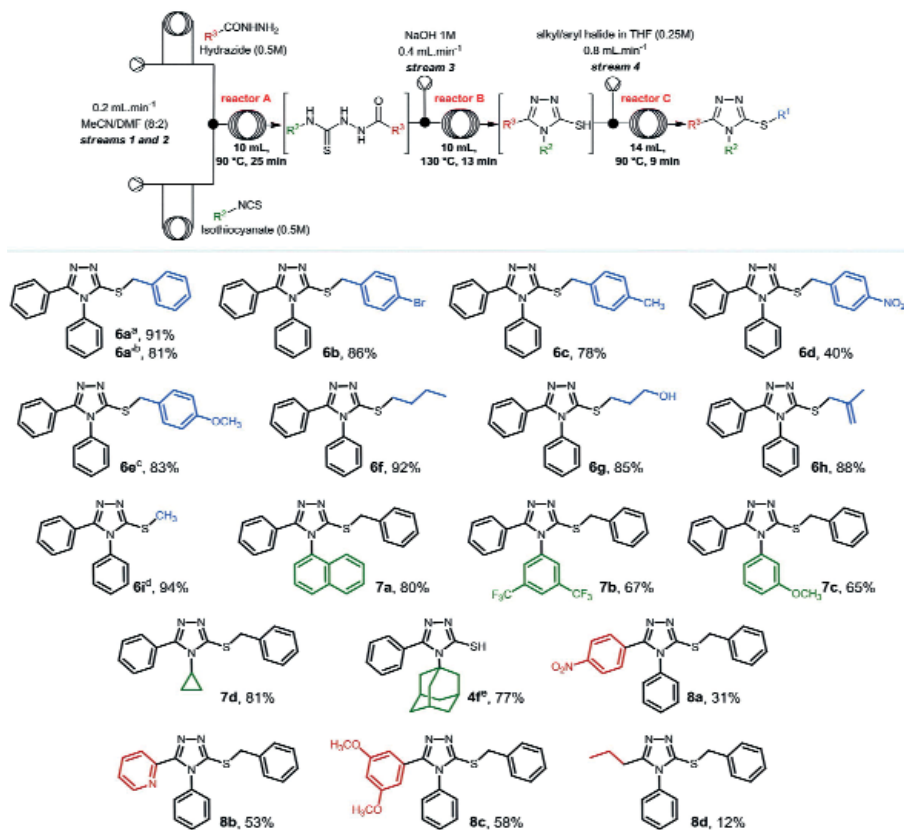
Az áramlásos kémia új lehetőségeket teremtett a kémiai tér új típusú, elsősorban 3 dimenziós (nem síkszerű) gyűrűrendszerekkel való kiterjesztésére is. Ezt az aromás (planáris) gyűrűrendszerek részleges vagy teljes telítésével valósították meg. Ez utóbbit a ThalesNano által kifejlesztett H-Cube® áramlásos hidrogénező reaktorban végezték. A módszer lényegében megfelel a „könyvtárból könyvtárba” stratégiának. Varga és munkatársai a 3 komponensű reakcióval előállított piridinium-pirazolát-könyvtár [31] néhány tagjának részleges telítését hajtották végre áramlásos rendszerben (8. ábra).

Az áramlásos kémia alkalmazásával jött létre az automatizált vagy integrált gyógyszerkémia. [32,33] Itt ciklikus hatás-szerkezet optimalálás által automatikusan generált könyvtártagok szekvenciális *in situ* szintézise és közvetlen biológiai szűrése valósul meg (9. ábra).

Új könyvtártípusok

a) Kovalens kötést létesítő vegyületeket tartalmazó könyvtárak

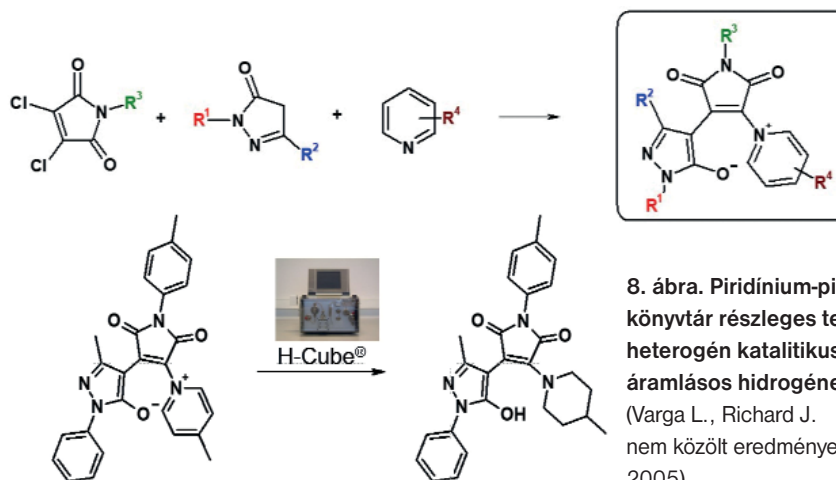
A kovalens kötést létesítő molekulákat korábban eltávolították a könyvtárakból. Évek-

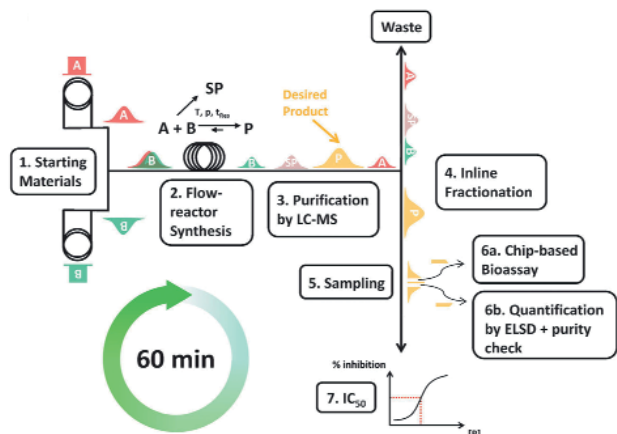


6. ábra. Helyettesített triazolkönyvtár előállítása egyetlen folyadékáramban áramlásos reaktorokban

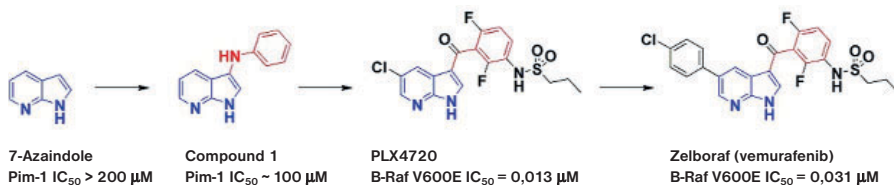


7. ábra. A fluoros oldószerrel szétválasztott folyadékáramok (cseppek) lehetőséget nyújtanak gyors egymást követő reakcióra és könyvtárszintézisre





10. ábra. Vemurafenib kifejlesztése elsődleges fragmentumtalálattól kiindulva többlépcsős optimalizáció útján



kel később rájöttek, hogy a kovalens kötés célzott, specifikus kialakítása a célfehérjén a biológiai hatás tartós fennmaradásához vezethet. A kovalensen kötődő ligandumok [34] lehetnek mechanizmusalapú [35] vagy általános elektrofil, [36] ill. Michael-akceptor molekulák, melyek elsősorban a ciszteinek tiolcsoportjaival lépnek kölcsönhatásba. [37]

b) Fragmentumkönyvtárak

Hann és munkatársai már 2001-ben [38] azt találták, hogy a vezérmolekula-felfedezés sikeressége fordított arányban áll a molekulák komplexitásával. Ez teljességgel ellentmond a diverzitásorientált szintézis természetesanyag-szerű vegyületeit megcélzó koncepciójának. A kombinatorikus könyvtárak alacsony sikeraránya és elméleti megfontolások vezettek a fragmentumkönyvtárak elterjedéséhez [39] és az erre épülő fragmentumalapú gyógyszertervezéshez. [40] Itt a Lipinski-féle 5-ös szabályt (LogP < 3, molekulatömeg < 300, max. 3 hidrogénkötés-donor, ill. -akceptor, 3 vagy kevesebb rotálható csoport és a poláris felület területe < 60 Å²) kielégítő vegyületekből, építőelemekből álló könyvtárak létesítenek és mérnek a HTS-ben. A koncepció szerint az ún. vezérmolekula-szerű vegyületekhez hasonlóan ezekből a fragmentumokból a későbbi optimalizációs lépésekben további csoportokkal ellátva vagy éppen más aktív fragmentumokkal összekapcsolva sikeresen lehet gyógyszerjellegű vegyületeket kifejleszteni. A korábbi koncepció szerint a Lipinski-féle 5-ös szabályt kielégítő vegyületek

9. ábra. Hatás-szerkezet alapú könyvtárgenerálás, szintézis, tisztítás és biológiai szűrés automatizált optimalizációs ciklusa folyamatos áramlásos rendszerben

biológiai szűrésekor kapott találatok optimalizálása során további csoportokat kapcsolnak hozzájuk, ami által a vegyületek molekulatömege és lipofilicitása tovább nőtt, megnehezítve ezzel az orális felszívódást. Számos tanulmány [41,42] szerint a fragmentumokra jellemző az entalpiavezérelt kötődés, amit szubsztituensek bevezetése által entrópiaorientált módon lehet optimalizálni. Elemzésük alapján a fragmentumok révén a kémiai tér lefedettsége is sokkal nagyobb.

A vemurafenib volt az első FDA-engedélyezett gyógyszer, amit fragmentumalapú gyógyszertervezés útján fejlesztettek ki. [43] A kiindulási nagy diverzitású, „vázjellegű” fragmentumokat (150–350 Da) tartalmazó könyvtárak (20 000 vegyület) először 200 µM koncentráción tesztelték, majd a kinázgátló aktivitást mutató találatokat szisztematikusan, szelektivitást és biológiai hasznosulást figyelembe véve építették tovább (10. ábra).

Mit kaptunk a kombinatorikus kémiától az elmúlt 25 évben? Mi épült be a modern gyógyszerkutatásba?

Bár a klasszikus kombinatorikus kémia ideje lejárt, mégis komoly hatással volt a korszerű gyógyszerkutatásra. [5] A korai lelkesedést felváltotta a kombikem realisztikus megítélése, és betagozódott a standard technológiák, eszköztárak sorába. Bár már ritkán használjuk a „kombinatorikus” kifejezést, a „könyvtár” (vegyülettár) elne-

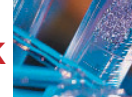
vezésben legfontosabb eleme tovább él. A kombikem jelentősen gyarapította a szintetizált molekulák számát, így nagy molekulabankok jöhettek létre. A gyógyszertervezés manapság a kombinatorikus analógtervezés és párhuzamos szintézismódszerek alkalmazásával gyorsabban és kisebb erőfeszítéssel képes diverz analógvagytervet előállítani. Ezek a módszerek és technikák mára a legtöbb gyógyszerfelfedező laboratóriumban rutinszerűvé váltak.

A kombikem hatása 4 csoportba sorolható

1. A kombikem legfontosabb hatása a kombinatorikus gondolkodás elterjesztésében érhető tetten. Ez magában foglalja a produktivitás növelését és a kémiai tér szisztematikus feltérképezését annak érdekében, hogy maximalizálja az elérhető kémiai, szerkezeti, szintetikus és biológiai hatásra vonatkozó információk kihasználását az adott projekten belül. [44] A kombinatorikus variációkban és a kémiai térben való globális molekuláris gondolkodás kétségtelenül jövőbe mutató új szemléletet hozott a gyógyszerkutatásba. A gyógyszerkémikus már nem egyetlen szintetizálandó molekulában, hanem azok analóg sorozatában, „könyvtárakban” gondolkodik. Ehhez kapcsolódik a tulajdonságok statisztikus eloszláson alapuló elemzése. A kombinatorikus gondolkodás átterjedt az anyagtudomány és a katalizátorfejlesztés területére is, ahol a szerkezeti sokféleség mellett az alkalmazott paraméterek lehetséges variációi is megjelennek. [45] Ezzel lényegében a kombinatorikus gondolkodás egy új, általános felfedező kutatási paradigmává vált. [46]

2. Az előbbi ponthoz szorosan kapcsolódik a kemoinformatica rohamos fejlődése, aminek egyik fő mozgatója a kombinatorikus kémia és gondolkodás volt. Idetartozik a virtuális könyvtártervezés és generálás, a 2D/3D virtuális szűrés egyre pontosabb végrehajtása, a kémiai tér analízise, a diverzitátszámolás és a szelekció, a fizikokémiai (ADMETox) paraméterek becslése, a szintézistervezés, a párhuzamosítás, a szintetizálhatóság becslése, a nagy adatbázisok kezelése stb.

3. A kombikem hozzájárult a szintézismódszerek megújításához is. Az ismert szerves kémiai reakciókra szilárd és folyadékfázisú párhuzamos szintézisprotokollok születtek. A diverzitás kiépítését célzó új szintetikus módszerek (MCR, DOS) és a diverzitást hordozó funkciók beépítését célzó új reakciók (keresztkapcsolás) jelentősen hozzájárultak a szerves kémia fejlődéséhez. A kombinatorikus kémia meg-



gyorsította az ún. szintézist könnyítő (enabling chemistry) [47] módszerek elterjedését is. Idetartoznak a szilárd-hordozós reagensek, a feleslegmegkötő gyanták, a MAOS (mikrohullámmal gyorsított szintézisek), az áramlások kémia stb. Új gyűűrendszer-ek szintézise érdekében a hagyományos laboratóriumi paramétertér [48] kiterjesztésére is számos kísérlet történt – pl. az Új Eljárás Ablak (Novel Process Windows) „kitárásával”. [49]

4. A kombinatorikus kémia ugyancsak meggyorsította a technológiai innovációk beépítését a szintetikus, tisztítási, biológiai szűrési és logisztikai folyamatokba. A robotizált mintakezelés, és kiszérelés, az automata tisztítási és analitikai rendszerek, a párhuzamos kémiai mikrosorok, az áramlások reaktorok, az automatizált nagy átteresztőképességű biológiai szűrés mind-mind hozzájárultak a gyógyszerkutatás megújításához, kapacitásnöveléséhez és a fejlesztési ciklusidők csökkentéséhez.

A 25 évvel ezelőtt kifejlődött kombinatorikus kémia – bár maga az elnevezés tekintetében „kikopott” a szakmai köztudatból – mégis visszavonhatatlanul nyomot hagyott a korszerű gyógyszerkutatásban és jelenleg tanúi lehetünk az újjászületésének.

Cikksorozatunkat dr. Furka Árpád professzornak ajánlottuk, akinek hozzájárulása elvülhetetlen a kombinatorikus kémia alapjainak lerakásában, és az általa lefektetett elvek köszönnek vissza a DNS-kódolt könyvtárakban is, ami fontos mérföldkő a kombi-kémia újjászületésében, megújításában.

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

IRODALOM

[1] Ecker, D.J. and S.T. Crooke, *Combinatorial drug discovery: which methods will produce the greatest value?* *Bio/Technology*, 1995. 13(4), 351.
 [2] https://blogs.sciencemag.org/pipeline/archives/2014/10/14/combichem_into_drugs_how_many
 [3] Lowe, D.B., (2014). Drug discovery: Combichem all over again. *Nature Chem.* 6(10), 851–2.
 [4] Zhu, T., Cao, S., Su, P. C., Patel, R., Shah, D., Chokshi, H. B., et al. (2013). Hit identification and optimization in virtual screening: practical recommendations based on a critical literature analysis: miniperspective. *J Med Chem.* 56(17), 6560–6572.
 [5] Campbell, I.B., S.J.F. Macdonald, and P.A. Procopiou, (2018). Medicinal chemistry in drug discovery in big pharma: past, present and future. *Drug Discov Today*, 23(2), 219–234.
 [6] Macarron, R., Banks, M. N., Bojanic, D., Burns, D. J., Cirovic, D. A., Garyantes, T., et al. (2011). Impact of high-throughput screening in biomedical research. *Nat Rev Drug Discov* 10(3), 188–195.
 [7] Dolle, R. E., Le Bourdonnec, B., Goodman, A. J., Morales, G. A., Thomas, C. J., Zhang, W. (2009) Comprehensive survey of chemical libraries for drug discovery and chemical biology: *J Comb Chem*, 11, 755–802.
 [8] Czechtizky, W. and P. Hamley, (2015) Small molecule medicinal chemistry: strategies and technologies. *John*

Wiley & Sons. Marcel Patek, Martin Smrcina, Eric Wegrzyniak, Victor Nikolae, and Andres Mariscal, *Solid-Phase Combinatorial Chemistry*, 103.
 [9] Merritt, A., (2011). High throughput chemistry in drug discovery, in *New Synthetic Technologies in Medicinal Chemistry*. 6–41.
 [10] Kogej, T., Blomberg, N., Greasley, P. J., Mundt, S., Vainio, M. J., Schamberger, J., et al. (2013). Big pharma screening collections: more of the same or unique libraries? The AstraZeneca–Bayer Pharma AG case. *Drug Discov. Today*, 18(19–20), 1014–1024.
 [11] Roughley, S. D.; Jordan, A. M. (2011). The Medicinal Chemist's Toolbox: An Analysis of Reactions Used in the Pursuit of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* 54, 3451–3479.
 [12] Shang, J., Sun, H., Liu, H., Chen, F., Tian, S., Pan, P., et al. (2017). Comparative analyses of structural features and scaffold diversity for purchasable compound libraries. *J Cheminform* 9(1), 25.
 [13] Taylor, R. D., M. MacCoss, and A. D. Lawson, (2014). Rings in drugs. *J Med Chem*, 57(14), 5845–59.
 [14] Pitt WR, Parry DM, Perry BG, Groom CR (2009). Heteroaromatic rings of the future. *J. Med. Chem.* 52, 2952–2963.
 [15] Kennedy, J. P., Williams, L., Bridges, T. M., Daniels, R. N., Weaver, D., Lindsley, C. W. (2008). Application of combinatorial chemistry science on modern drug discovery. *J. Comb. Chem.*, 10(3), 345–354.
 [16] Gerencsér J.; Balázs Á.; Dormán G. (2014) Transition-metal catalyzed coupling reactions in high-throughput library synthesis (Topics in Heterocyclic Chemistry, Vol. 45., Synthesis and Modification of Heterocycles by Metal-Catalyzed Cross-coupling Reactions, Editors: T. Patony, K. Kónya, 305–358.
 [17] Leeson, P.D., (2016). Molecular inflation, attrition and the rule of five. *Adv Drug Deliv Rev*, 101, 22–33.
 [18] Keserű, G. M., Makara, G. M. (2009). The influence of lead discovery strategies on the properties of drug candidates. *Nat. Rev. Drug Discov* 8(3), 203–212.
 [19] Zhang, M. Q., Wilkinson, B. (2007). Drug discovery beyond the 'rule-of-five'. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18(6), 478–488.
 [20] Mondal, M. and A. K. Hirsch, (2015). Dynamic combinatorial chemistry: a tool to facilitate the identification of inhibitors for protein targets. *Chem Soc Rev*, 44(8), 2455–88.
 [21] Frei, P. R., Hevey, and B. Ernst, (2019). Dynamic Combinatorial Chemistry: A New Methodology Comes of Age. *Chemistry*, 25(1), 60–73.
 [22] Ramström, O., Lehn, J. M. (2002). Drug discovery by dynamic combinatorial libraries *Nat. Rev. Drug Discov.* 1(1), 26.
 [23] Herrmann, A. (2009). Dynamic mixtures and combinatorial libraries: imines as probes for molecular evolution at the interface between chemistry and biology. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 7(16), 3195–3204.
 [24] Qiu, C., Fang, Z., Zhao, L., He, W., Yang, Z., Liu, C., Guo, K. (2019). Microflow-based dynamic combinatorial chemistry: a microscale synthesis and screening platform for the rapid and accurate identification of bioactive molecules. *React. Chem. Eng.* 4(4), 658–662.
 [25] Neri, D., Lerner, R. A. (2018). DNA-encoded chemical libraries: A selection system based on endowing organic compounds with amplifiable information. *Annu Rev Biochem* 87, 479–502.
 [26] Goodnow, R. A., Dumelin, C. E., Keefe, A. D. (2017). DNA-encoded chemistry: enabling the deeper sampling of chemical space. *Nat Rev Drug Discov* 16(2), 131–147.
 [27] Belyanskaya, S. L., Ding, Y., Callahan, J. F., Lazaar, A. L., Israel, D. I. (2017). Discovering Drugs with DNA-Encoded Library Technology: From Concept to Clinic with an Inhibitor of Soluble Epoxide Hydrolase. *Chem BioChem*, 18(9), 837–842.
 [28] Watts, P., Haswell, S. J. (2003). Microfluidic combinatorial chemistry. *Curr Opin Chem Biol*, 7(3), 380–387.
 [29] Damião, M. C., Galaverna, R., Kozikowski, A. P., Eubanks, J., Pastre, J. C. (2017). Telescoped continuous flow generation of a library of highly substituted 3-thio-1, 2, 4-triazoles. *React. Chem. Eng.*, 2(6), 896–907.

[30] Bogdan, A. R., Organ, M. G. (2018). Flow chemistry as a drug discovery tool: a medicinal chemistry perspective. In *Flow Chemistry for the Synthesis of Heterocycles* (319–341). Springer, Cham.
 [31] Varga L, Nagy T, Dormán G, Kálmán F, Ürge L and Darvas F (2006). Solution-Phase Parallel Synthesis of a Pyridinium-pyrazol-3-olate Inner Salt Library Using a Novel Three-Component Reaction *J. Comb. Chem.* 8, 338–343.
 [32] Schneider, G. (2017). Automating drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 17(2), 97.
 [33] Werner, M., Kuratli, C., Martin, R. E., Hochstrasser, R., Wechsler, D., Enderle, T. et al. (2014). Seamless Integration of Dose-Response Screening and Flow Chemistry: Efficient Generation of Structure–Activity Relationship Data of β -Secretase (BACE1) Inhibitors. *Angew Chem Int Ed Engl*, 53(6), 1704–1708.
 [34] Vasudevan, A., Argiriadi, M. A., Baranczak, A., Friedman, M. M., Gavrilyuk, J., Hobson, A. D., et al. (2019). Covalent binders in drug discovery. In *Progress in medicinal chemistry* (Vol. 58, 1–62). Elsevier.
 [35] Evans, M. J., Cravatt, B. F. (2006). Mechanism-based profiling of enzyme families. *Chem. Rev.* 106(8), 3279–3301.
 [36] Tolmachova, K. A., Moroz, Y. S., Konovets, A., Platonov, M. O., Vasylenko, O. V., Borysok, P., et al. (2018). (Chlorosulfonyl) benzenesulfonyl Fluorides–Versatile Building Blocks for Combinatorial Chemistry: Design, Synthesis and Evaluation of a Covalent Inhibitor Library. *ACS Comb. Sci.*, 20(11), 672–680.
 [37] Ábrányi-Balogh, P., Petri, L., Imre, T., Szijj, P., Scarpino, A., Hrast, M., Keserű, G. M. (2018). A road map for prioritizing warheads for cysteine targeting covalent inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, 160, 94–107.
 [38] Hann, M. M., Leach, A. R., Harper, G. (2001). Molecular complexity and its impact on the probability of finding leads for drug discovery. *J Chem Inf Comput Sci*, 41(3), 856–864.
 [39] Keserű, G. M., Erlanson, D. A., Ferenczy, G. G., Hann, M. M., Murray, C. W., Pickett, S. D. (2016). Design principles for fragment libraries: maximizing the value of learnings from pharma fragment-based drug discovery (FBDD) programs for use in academia. *J Med Chem*, 59(18), 8189–8206.
 [40] Murray, C. W., Rees, D. C. (2009). The rise of fragment-based drug discovery. *Nat Chem*, 1(3), 187–192.
 [41] Ferenczy, G. G., Keserű, G. M. (2016). On the enthalpic preference of fragment binding. *MedChemComm*, 7(2), 332–337.
 [42] Ferenczy, G. G., Keserű, G. M. (2020). Thermodynamic profiling for fragment-based lead discovery and optimization. *Expert Opin. Drug Discov*, 15(1), 117–129.
 [43] Bollag, G., Tsai, J., Zhang, J., Zhang, C., Ibrahim, P., Nolop, K., Hirth, P. (2012). Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nat Rev Drug Discov* 11(11), 873–886.
 [44] Seneci, P., Fassina, G., Freccer, V., Miertus, S. (2014). The Effects of Combinatorial Chemistry and Technologies on Drug Discovery and Biotechnology – a Mini Review. *Nova Biotechnol. et Chim.* 13(2), 87–108.
 [45] Potyrailo, R. A., Maier, W. F. (Eds.). (2006). *Combinatorial and high-throughput discovery and optimization of catalysts and materials*. CRC Press.
 [46] Dormán György (2000): Paradigmaváltás a felfedezőkutatásban (BME MBA Mérnököknek, szakdolgozat)
 [47] Kirschning, A., Solodenko, W., Mennecke, K. (2006). Combining enabling techniques in organic synthesis: continuous flow processes with heterogenized catalysts. *Chem. Eur. J.* 12(23), 5972–5990.
 [48] Keserű, G. M., Soós, T., Kappe, C. O. (2014). Anthropogenic reaction parameters – the missing link between chemical intuition and the available chemical space. *Chem. Soc. Rev.* 43(15), 5387–5399.
 [49] Hessel, V. (2009). Novel process windows-gate to maximizing process intensification via flow chemistry. *Chemical Engineering & Technology: Industrial Chemistry-Plant Equipment-Process Engineering-Biotechnology*, 32(11), 1655–1681.