

## In memoriam Fonyó Zsolt



**Fonyó Zsolt**

**1943 - 2005**

Megdöbbenve és nagyon szomorúan állok itt most földi porhüvelyed szálnalmasan kicsiny maradványa előtt kedves jó barátom Zsolt, akit oly sok szempontból tiszteltek. Tiszteltek mindenek előtt mint embert a szó nemes értelmében, aki embertársaival, kollégáival, munkatársaival és tanítványaival szemben mindig jószándékról tett tanúságot, példamutató volt szorgalmával és sohasem hivatkozott képességeivel vagy eredményeivel. Az életed utolsó hónapjaiban rádmért nehéz sorsodat is olyan méltósággal és szerénységgel viselted, ami előtt fejet kell hajtanunk. Tiszteltek továbbá mint azt a kiváló tehetségű szakembert, aki a természettudományok terén talán legnehezebben megvalósíthatót testesítette meg számomra: ragyogóan egyesítetted a magasan képzett elméleti kutatót és a gyakorlati műszaki érzéket kívánó, alkotó mérnököt.

1967-ben szereztél meg vegyész mérnöki diplomádat a Veszprémi Vegyipari Egyetemen. Veszprémi egyetemi éveid alatt éppen nem találkozhattunk, mert az utánatok következő évfolyam volt az első, akiket oktathattam. Így sajnos nem szólíthatlak Téged tanítványomnak, pedig büszke volnék rá.

Mint fiatal diplomás előbb az Olajtervhez kerültél, majd 1974-ben a Budapesti Műszaki Egyetemre. Egy évig voltál a tokiói egyetemen, majd hat éven át a zürichi ETH-n – Európa egyik legrangosabb műszaki egyetemén – vendégprofesszor. Hazajövedted után, 1994-től kezdve egész haláloedig pedig mint egyetemi tanár vezetted a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Vegyipari Műveletek Tanszékét.

Igen gazdag szellemi termést és számos mérnöki alkotást hagyta az utókorra.

7 Könyvnek, 7 könyvrészletnek és több, mint 300, nemzetközi folyóiratokban megjelent tudományos közleménynek voltál

szerzője vagy társszerzője. Ez utóbbiaknak a tudomány fejlődésére gyakorolt hatását mintegy 1300 hivatkozás jelzi. Egyetemi előadásaid alapján 1971 óta hallgatók ezrei tanultak Tőled különböző vegyész mérnöki alapismereteket és több, mint két tucat PhD vagy kandidátusi kutatómunkát irányítottál. Könyveid közül a nívódíjas Rektifikálás, illetve a Vegyipari Művelettani Alapismeretek c. munkák a magyar vegyész mérnök-képzés általánosan használt tankönyveivé váltak.

Legfontosabb tudományos eredményeidből itt természetesen csak apró töredékeket tudok megemlíteni. Ilyen pl. a termikus elválasztási műveletek energetikai javításának termodinamikai megalapozása, a különleges kémiai komponens-elválasztási eljárások fejlesztése, az energiaintegrációs és hőszivattyús technológiák szintézisének korlátozásos módszerei, az ipari hőcserélő rendszerek szintézisének új szűkületi rendezőelve, vagy a teljes vegyipari folyamatok tervezésének integrált stratégiája, különös tekintettel ennek lehetőleg környezetbarát jellegére. Ezeket az Általad kidolgozott és publikált elveket ma világszerte felhasználják a vegyipari folyamatok tervezésénél és irányításánál.

Témavezetője, vagy résztvevője voltál nagyon sok – szám szerint 34 - megvalósított vegyipari, kőolajipari és petrokémiai üzem tervezésének vagy technológiai fejlesztésének. E szakmai alkotások közé olyan művek tartoznak, mint például a Dunai Finomító 3Mt/év kapacitású desztilláló üzemének szétválasztó oszlopai, számos hazai és svájci vegyipari és kőolajipari üzem intenzifikálása, műszaki kémiai eljárások környezetközpontú fejlesztése és energetikai javítása, szennyvizek újrahasznosításának környezetvédelmi célú felülvizsgálata, továbbá petrokémiai üzemek rekonstrukciójához kapcsolódó, kapacitást bővítő és termék minőséget javító programok megvalósítása.

Rendkívül aktív voltál a tudományos közéletben is: 6 nemzetközi szervezetben képviselted hazánkat, így pl. titkára voltál az EURECHA - nak, ennek a több mint 100 egyetemet tömörítő európai szervezetnek, amely a számítástechnikának a vegyész mérnöki oktatásban való felhasználását segíti elő, valamint tagja voltál a CHISA nemzetközi tanácsadó testületének. De természetesen a hazai tudományos közéletben is kivetted részedet mint az Akadémia Műszaki Kémiai Bizottságának elnöke, az Akadémia Doktori Tanácsának tagja, vagy a Magyar Kémikusok Egyesülete Műszaki Kémiai Szakosztályának elnöke.

Szerencsére nem maradt el munkád elismerése sem: 1995-ben az Év Oktatója lettél a Műszaki Egyetemen, 1998-ban a Varga József érmet nyerted el és a Magyar Tudományos Akadémia pedig 1998-ban levelező, majd 2004-ben rendes tagjává választott.

Fiatalon távoztál közülünk Zsolt, és bár teljes életművet hagytál magad után, de munkád gyümölcseit learatni korai elmeneteled miatt sajnos csak részben volt lehetőséged. Munkádat ezután már tanítványaid folytatják, akik gazdagon meríthetnek szakmai örökségedből, mindabból, amit alkottál.

Én pedig, aki most a Magyar Tudományos Akadémia és annak Kémiai Tudományok Osztálya nevében búcsúzom Tőled, ígérem, hogy emlékedet szeretettel megőrizzük.

Isten veled!

Inczédy János

## In memoriam Paulik Ferenc



**Paulik Ferenc**

**1922 - 2005**

A Műegyetem Általános és Analitikai Kémia Tanszéke, a Magyar Tudományos Akadémia Műszaki Analitikai Kutatócsoportja, a Nemzetközi Termoanalitikai és Kalorimetriás Szövetség, a tanítványok, kollégák és barátok nevében búcsúzom Dr. Paulik Ferencről. Fájdalommal állunk itt, és nehezen vesszük tudomásul, hogy Feri barátunk nincs már közöttünk életerejével és optimizmusával.

Paulik Ferenc a XX. századi magyar tudomány egyik kiemelkedő egyénisége volt, aki munkatársaival együtt lendületet és új irányt adott a termikus analízisnek, a kémiai anyagvizsgálati módszerek egy fontos családjának. Az 50-es évek elején, amikor Erdey László professzorral és öccsével, Paulik Jenővel együtt az analitikai csapadékokat vizsgálták, a fejlődés fő akadálya az volt, hogy az egyes termoanalitikai módszerek eredményei összehasonlíthatatlanok voltak. A nagy felismerések utólag már egyszerűnek tűnnek. Így volt ez hármójuk esetében is: a méréseket egyszerre, egyazon mintán kell elvégezni, és létre kell hozni egy olyan

berendezést, amely erre megbízhatóan képes. Így született meg a világ első, kereskedelemben kapható szimultán termoanalitikai műszere, a Derivatograph, melynek különböző, és egyre fejlettebb változatait a Magyar Optikai Művek gyártotta és exportálta a világ minden tájára. Ez lett minden idők legsikeresebb termoanalitikai berendezése, melynek számos megoldását a többi műszergyártó is átvette. Az alkotás jelentőségét jól érzékelteti, hogy sokan – és nem csak a magyar nyelvterületen – „derivatográfiának” nevezik a termikus analízis egészét.

A vezető szerephez újabb és újabb tudományos felismerésekre és műszaki alkotásokra, könyvekre, cikkekre és szabadalmakra, az alkalmazási lehetőségek állandó bővítésére volt szükség. Miközben a tanítványok, együttműködő kutatók és a készülékek az összes kontinensen jelen voltak, a fejlesztő munka középpontjában évtizedeken át a Paulik Ferenc vezette laboratórium állt, egy kis csapat, melynek magját Feri, korán elhunyt öccse, Jenő, és néhai Arnold Miklós kollégánk alkotta. A nagyszerű alkotó mellett – Feri esetében is – nagyszerű társ áll. Amikor most Ferinek megköszönjük életművét, e köszönet egy része Erzsébet asszonyt illeti.

Paulik Ferenc nem csak tudósként és mérnökként, hanem emberként is kivételes egyéniség volt. Azzá tette széleskörű érdeklődése, humora, nyílt, indulatoktól sem mentes stílusa, melyen mindig átsütött a jó szándék és segítőkészség. Sok elismerésben volt része külföldön és itthon, talán még többre is méltó lett volna. Meggyőződésem azonban, hogy számára többet jelentett a sok barát és tanítvány tisztelete és szeretete. Többször elmondta, legutóbb tavaly, mikor egy tudományos ülésen a Derivatograph megalkotásának ötvenedik évfordulójáról emlékeztünk meg: „Szerencsés ember vagyok, mert azt csinálhattam, amit szeretek.”

Kedves Feri! Köszönjük a tanítást, a segítséget, a barátságot. Emléked megőrizzük, munkádat igyekszünk tovább vinni. Nyugodj békében.

2005. október 27.

Pokol György

**Tisztelt Olvasó !**

A Magyar Kémiai Folyóirat jelen számában a gyógyszerkutatás forrongó területeiről olvashatók összefoglalók. Ezek sorrendben a következő témákkal foglalkoznak: A genom alapú kutatás egyik nélkülözhetetlen eszköze a *polimeráz láncreakció*, amelynek gyógyszerkutatási alkalmazását foglalják össze a szerzők. A korai felfedező szakasz meghatározó tevékenysége a megfelelő kis molekulák családjának, családjainak kiválasztása, amelyet nagymértékben felgyorsíthat a *virtuális szűrővizsgálatok* helyes alkalmazása. Napjaink gyógyszerjelöltjeinek egyik hátrányos tulajdonsága a kedvezőtlen vízdékonyság. A vezérmolekulák és gyógyszerjelöltek „gyógyszerszerűségének” (drugability) biztosítására *fiziko-kémiai tulajdonságaik szisztematikus vizsgálata* mind korábbi kutatási szakaszban kerül előtérbe. A vizsgálandó vegyületek, a gyógyszerjelöltek szintéziseinél egyre nagyobb teret nyer a *fémorganikus kémia* alkalmazása, amely terület fontosságát 2005 évben kémiai Nobel díjjal ismerték el. A vizsgálatra kerülő vegyületek előállítását forradalmasító kombinatorikus kémia egyik újabb változatát ismerteti át a *dinamikus kombinatorikus kémiáról* írt összefoglaló. A sorozatot a Gyógyszerkutató Intézetben az *AMPA antagonistá hatású 2,3-benzodiazepinek* területén végzett évtizedes kutatásokról készült áttekintés zárja.

Bízom abban, hogy a fenti összefoglalók szélesíthetik az olvasók gyógyszerkutatással kapcsolatos ismereteit.

2005. december

Hermez István

# A polimeráz láncreakció (PCR) és gyógyszerkutatói alkalmazásai

DEZSŐ Péter\* és NAGY József

Richter Gedeon Rt., Gyömrői út 19-21., 1103 Budapest, Magyarország

## 1. A PCR sikertörténete

A tudománytörténet úgy tartja, hogy a polimeráz láncreakció (PCR: *Polymerase Chain Reaction*) elve 1983 áprilisában, egy holdvilágos éjszakán született meg egy észak-kaliforniai országúton Kary Banks Mullis elméjében. A módszer elvét, egy gyakorlati eredmény bemutatásán keresztül, 1985-ben közölte le a *Science* magazinban.<sup>1</sup> Ettől az időponttól a PCR által, egy egyszerű elven alapuló, de zseniális technikával bővült a molekuláris biológia eszköztára. Ez a ciklikus, *in vitro*, enzimkatalizált, DNS-szintetizáló eljárás lehetőséget teremtett arra, hogy kimutatható szintre növeljék a vizsgálni kívánt DNS-szakaszt, lényegében megszüntetve így a DNS vizsgálatok mennyiségi korlátait. Az új módszer alkalmazásának következtében a publikációk száma e témában exponenciálisan növekedett. 1989-ben a PCR „motorja”, a Taq DNS-polimeráz enzim, elnyerte a *Science* magazin „Év molekulája” címét. E módszer kiemelkedő jelentőségének köszönhetően, Mullis 1993-ban kémiai Nobel Díjat kapott. Jelenleg az élettudományok szinte minden ágában, több, mint kétszáz ezer tudományos közleményben alkalmazták az alapjárásnak mintegy százféle speciális változataként ezt a technikát. A PCR-rel kapcsolatos termékek, reagensek és készülékek hatalmas tárháza áll ma már rendelkezésünkre; így kijelenthető, hogy ma már egy PCR készülék éppúgy alapfelszereltsége egy molekuláris biológiai laboratóriumnak, mint mondjuk egy hűtőszekrény.

## 2. A polimeráz láncreakció elve

Ez a forradalmian új technika tehát egy olyan *in vitro* (egyes speciális alkalmazásokban *in situ*) módszer, amelynek során meghatározott DNS szakaszokat lehet enzimatikus módon megsokszorozni (amplifikálás) két, az amplifikálandó szakaszt közrefogó, specifikus szekvenciájú oligonukleotid (primer) segítségével. A PCR elve a DNS függő DNS polimerázok aktivitásán alapul. Ezek az enzimek egy indító oligonukleotid, a primer segítségével képesek lemásolni, és így megkettőzni az eredeti DNS szálát. Ismételt működésük során az eredeti DNS molekula, a templát hatványozottan felsokszorozódik. Emiatt kapta ez a módszer a polimeráz láncreakció elnevezést. Akár 10000bp (bázispárban határozzák meg a DNS hosszát) DNS-szakasz is felsokszorozható ezzel a módszerrel. A PCR technika létrejöttét egy termotabil DNS-polimeráz, a Taq-polimeráz felfedezése és az automatizált fűtőblokkok (PCR készülék, thermocycler) kialakítása tette lehetővé, mivel a reakció általában 50-95°C-os hőmérsékleti tartományban zajló ciklikusan ismétlődő lépésekből áll. Az exponenciálisan felsokszorozott DNS agaróz vagy poliakrilamid-gélen mutatható ki, interkaláló DNS festék (etidium-bromid) segítségével.

### 2.1. A PCR reakció menete

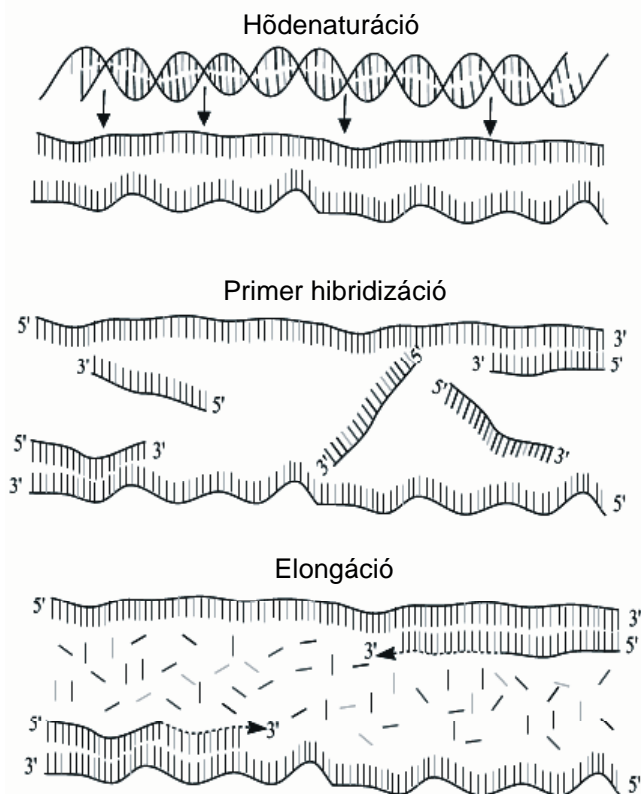
Az amplifikáció során a DNS-szintézis, majd a képződött termék denaturációjának ismétlődő ciklusai (25–40 ciklus) zajlanak. A PCR reakció rendkívül érzékeny, elméletileg alkalmas arra, hogy akár egyetlen DNS molekulát is felszaporítson és ezáltal vizsgálhatóvá tegyen. A sokszorosítani kívánt DNS-szakasz bázissorrendjét, szekvenciáját nem feltétlenül szükséges teljes egészében ismernünk (egyes speciális esetektől eltekintve), csupán a két végén elhelyezkedő 15-30 nukleotid sorrendjét kell tudnunk, ahová a primerek hibridizálnak. A primerek jelölik ki az amplifikálni kívánt DNS-szakaszt. A kettősszálú DNS szétválása, denaturációja után történik a primerek hibridizációja (anneálás). A primerek a denaturált, egyszálú templát DNS lánchoz H-hidak által kapcsolódnak a bázispárosodás elve szerint, azaz kizárólag adenin-timin (A-T), citozin-guanin (C-G) kapcsolatok jönnek létre. A primer utolsó nukleotidjában szereplő dezoxiribóz 3' helyén egy szabad OH csoport található, amelyhez a DNS függő DNS-polimeráz kapcsolja a soron következő komplementer nukleotid 5' foszfát csoportját. Ha csak egy primert használunk, a polimerizáció a primer 3' végén kezdődik és addig tart, amíg véget nem ér a templát, vagy amíg a DNS polimeráz le nem válik a megszintetizált kettősszálú DNS darabról. Adott hosszúságú DNS-szakaszok amplifikációjához legalább két primert használunk a PCR reakcióban, az egyik meghatározza a kiterjesztendő szekvencia elejét (forward primer), amely az úgynevezett *sense* DNS-szállhoz hibridizál, a másik pedig a végét (reverse primer), amely az *antisense* DNS-szállhoz kötődik a reakció során. Így a reakció végén csak a kívánt DNS-régió lesz jelen. Mivel a primerek sokkal nagyobb számban vannak jelen a reakcióelegybe, az eredeti parens DNS-láncok hibridizációja nem jön létre. Mivel az anneálás során a primerek az eredeti DNS láncokhoz is folyamatosan kapcsolódnak, nem csak az exponenciálisan (ideális esetben  $2^n$ , „n” a ciklusszám) sokszorozódó PCR-termékekhez, másodlagos és harmadlagos termékek is képződnek, de ezek mennyisége csak lineárisan növekszik.

A PCR reakció egy ciklusa tehát az alábbi három lépésből áll (1. ábra):

1. A DNS láncok szétválasztása 15-60 másodpercig tartó 94-97°C-ra történő felmelegítéssel (hődenaturáció).
2. A primerek hibridizálása (anneálás), az elegy 50-70°C-ra való lehűtésével (30-60 sec). Az anneálási hőmérséklet elsősorban a primerek olvadási hőmérsékletétől függ, de a módszer beállításánál ezt minden esetben optimálni kell.

\*Tel.: (1)4315535; fax: (1)2605000; e-mail: p.dezso@richter.hu

3. A DNS szál szintézise (extenzió). A reakció elegyben található dezoxiribonukleozid trifoszfátok (dNTP) polimerizációja elsősorban akkor történik, amikor a minta hőmérsékletét 72°C-ra, azaz a Taq-polimeráz optimális működési hőmérsékletére állítjuk be. A primerek elongációja 5'→3' irányban folyik meghatározott ideig, a PCR-termék méretétől függően 1-3 percig.



1. Ábra. A PCR reakció lépései

## 2.2. A PCR komponensei

Az általában 20-100 µl végtérfogatú reakcióelegybe az alábbi összetevőket kell bemérni, mielőtt a PCR-készülékbe helyezzük a rendszerint 200 µl-es műanyag reakcióedényt, a PCR-csővet:

- Templát-DNS: biológiai mintából izolált DNS, amely lehet genomiális- vagy extrakromoszomális DNS (plazmid) vagy RNS-ről reverz transzkripcióval átírt úgynevezett cDNS;
- Primerpár: a 15-30 bázis hosszúságú egyszálú forward és a reverse primer ekvimoláris mennyiségben;
- dNTP-keverék: egyenlő mennyiségben tartalmazza a DNS lánc építőköveit (dCTP, dATP, dGTP, dTTP);
- Taq-polimeráz: DNS függő DNS-polimeráz, optimális működési hőmérséklete 72 °C, jól tolerálja a 95 °C-on történő DNS denaturációs hőmérsékletet, aktivitása kb. 30-40 amplifikációs ciklust is elbírt;
- Puffer: a Taq polimeráz megfelelő működéséhez biztosítja az ideális pH-t, ionerősséget és sókoncentrációt;
- MgCl<sub>2</sub>: a Taq polimeráz működéséhez nélkülözhetetlen kofaktor.

## 2.3. Primertervezés

A primertervezés, azaz a primerek nukleotid sorrendjének meghatározása során információra van szükségünk a vizsgálni kívánt DNS szekvenciáját illetően. Jelenleg már hatalmas mennyiségű genetikai információ áll rendelkezésünkre, melynek nagy része letölthető az Interneten nyilvánosan elérhető adatbázisokból. A megfelelő primerek kiválasztása, megtervezése a sikeres PCR legfontosabb előfeltétele. Kereskedelmi forgalomban kapható primertervező szoftverek nagyban megkönnyítik ezt a feladatot. Ezek a programok a betöltött DNS-szekvencia birtokában megadják az adott kísérlet elvégzéséhez legalkalmasabb primerpár bázissorrendjét. Az oligonukleotidok szintézisére specializálódott cégek ma már akár néhány napon belül a rendelkezésünkre tudják bocsátani a kívánt primereket. A primerek hossza (15-30 nukleotid) és GC-tartalmuk, ami általában 40-60% között van, közel megegyező kell, hogy legyen. A primerpár hosszbeli és GC-aránybeli egyezésének a következménye, hogy az olvadáspontjuk (T<sub>m</sub> – az adott DNS szakaszra jellemző hőmérséklet, ahol 50-50%-ban van jelen az kettős szálú és az egyszálú lánc) is közel azonos. Ez biztosítja, hogy az annealási hőmérsékleten – amit első lépésben 5°C-kal az olvadáspont alatt érdemes beállítani – mindkét primer megfelelő hatékonysággal képes legyen hibridizálni a templát DNS-hez. Fontos továbbá, hogy a primer ne alakítson ki másodlagos-, hajtú-szerű struktúrát és kerülendő a primerek közti intermolekuláris kölcsönhatás is, így megakadályozható a nemkívánatos melléktermékek – pl. primer-dimerek – képződése.

## 2.4. Enzimek

Az amerikai Yellow Stone Nemzeti Park hőforrásaiban élő mikroorganizmusok különös jelentőségre tettek szert a PCR technika elterjedésével. A PCR során, a hődenaturációs lépésben alkalmazott magas hőmérséklet miatt a kezdetekben használt DNS polimerázok elvesztették aktivitásukat, így azokat minden ciklusban pótolni kellett. Egy termofil archaeobaktérium, a gejzírforrásokban honos *Thermus aquaticus* DNS függő DNS polimeráza (Taq polimeráz) viszont magas hőmérsékleten sem denaturálódik, ezért ezt az enzimet kezdték széles körben alkalmazni a PCR technológiában. Ma már a termotabil DNS-polimerázok széles köre áll rendelkezésre, kezdve a klasszikus Taq DNS-polimeráztól a reverz transzkriptáz aktivitással is rendelkező, a *Termus thermophilus*-ból származó Tth DNS-polimerázig. Ezzel az enzimmel egy reakcióedényben elvégezhető az mRNS-ről DNS-re történő átírás, azaz a reverz transzkripció és ezután az így létrehozott DNS-amplifikációja is.

Egyes speciális eljárásoknál szükség van arra, hogy a PCR-termék teljes mértékben megőrizze az amplifikálandó DNS-szakasz genetikai információtartalmát (pl. cDNS klónozása plazmidba). Ebben az esetben például a *Pyrococcus woesei* baktériumból származó Pwo DNS-polimerázt használhatjuk, amellyel a DNS szintézis nagy fokú pontosságát lehet elérni. Ez az enzim rögtön képes kivágni az esetlegesen hibásan beépített nukleotidot, tehát javító mechanizmussal – proof-reading aktivitással – is rendelkezik. A Pwo DNS-polimeráznak létezik egy rekombináns technikával

kialakított új, még hatékonyabb változata is, a Tgo DNS-polimeráz, ami kiválóan alkalmas hosszú DNS szakaszok pontos reprodukciójára.

Elterjedten alkalmazott enzimek a mesterségesen módosított Fast Start vagy Hot Start Taq DNS-polimerázok. Ezek az enzimek azért hasznosak, mert használatukkal rendkívüli mértékben lecsökkenthető az aspecifikus melléktermékek képződése. Mivel ezek a melléktermékek leginkább a reakcióelegy összemérése, vagyis a PCR reakció elindítása előtt képződnek, ezeket az enzimeket specifikus monoklonális ellenanyagokkal deaktiválják. A PCR ciklusok megkezdésekor ezek az enzimek egy egyszeri kb. tíz percig tartó 95°C-os hőkezeléssel aktiválhatóak, így elkerülhető, hogy már a PCR megkezdése előtt DNS szintézis történjen.

### 2.5. Gélelektroforézis

A PCR-reakcióban alkalmazott primerpárok bázispárra pontosan megszabják a PCR-termék méretét. Ezért ha a reakció végeztével meghatározzuk a felsokszorozott DNS-fragmentum hosszát, akkor megbizonyosodhatunk a vizsgálni kívánt DNS-szakasz jelenlétéről. Erre e feladatra alkalmazható az agaróz- és a poliakrilamid gélelektroforézis. Ezek olyan elektromigrációs módszerek, melyek alkalmasak különböző méretű DNS-fragmentumok elválasztására. Itt a negatív töltésű DNS-molekulák egyenáramú elektromos tér erő hatására a pozitív pólus, az anód felé vándorolnak az elektrolit oldatba helyezett térhálós gélfázisban ami biztosítja méretük szerinti elválasztásukat. Egy DNS molekula elektroforetikus migrációjának mértékét öt fő paraméter határozza meg: a DNS-molekula mérete, töltése, konformációja, a gél koncentrációja és az alkalmazott elektromos tér erő. A DNS-fragmentumok gélben történő detektálására legelterjedtebben alkalmazott vegyület az etidium-bromid, amely a DNS-molekulába interkalálódik és UV fény hatására narancssárgán fluoreszkál.

A gélelektroforézis eredményeinek kiértékeléséhez a kereskedelemben forgalmazott molekulatömeg markerek nyújtanak segítséget. A DNS-fragmentumok elektroforetikus mobilitása arányos azok bázispárban kifejezett méretének logaritmusával. A molekulatömeg markerek ismert méretű DNS-fragmentumokat tartalmaznak, ezért kalibrációs görbe szerkeszthető (lgbp vs. mobilitás[mm]) az azonos gélben futtatott ismeretlen méretű fragmensek méretének meghatározásához.

Génexpressziós vizsgálatoknál elterjedten alkalmazott szemi-kvantitatív eljárás a target mRNS-ből RT-PCR-rel (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction) felsokszorozott termék elektroforetikus képének denzitometriás módszerekkel történő elemzése. Ennél a módszernél egy végponton leállított PCR reakció után történik az analízis. Mivel ekkor a DNS-amplifikációt leíró PCR-kinetikai görbe már plató fázisban van, – ahol a reakció már kimerült – nem lehet egyértelműen következtetni a mintában lévő kiindulási nukleinsav mennyiségre. Manapság az RNS-szintű génexpresszió mennyiségi meghatározásához úgynevezett kvantitatív- (qPCR) vagy real-time RT-PCR technikát használnak.

## 3. PCR-készülékek

### 3.1. Hagyományos berendezések

A PCR-reakció hőmérséklet-profiljának kivitelezéséhez automatizált fűtőblokkok (thermocyclerek), azaz PCR-készülékek használatosak. Ezek olyan Peltier-elemes fűtés-hűtés rendszerrel rendelkező, mikroprocesszor által vezérelt, programozható berendezések, melyek nagy pontossággal képesek egyenletes hőmérsékletű környezetet ( $\pm 0,1$  °C) biztosítani a reakcióhoz. A különböző méretű PCR-csővek elhelyezésére jó hővezető-képességű fém (pl.: alumínium) készülő fűtőblokkok használatosak. A programozható hőmérséklet tartomány általában +4-től +99 °C-ig terjed és a maximális fűtési-hűtési sebesség 2-3 °C/sec. Manapság már a fémblokkok fűthető tetővel fedhetőek le, melynek hőmérsékletét 105 °C-ra állítva, megakadályozható a reakcióelegy elpárolgása. Ennek kiküszöbölésére korábban olajos fedőréteget vittek fel a reakcióelegy felszínére. Az úgynevezett gradiens PCR-ek, programozható hőmérséklet-gradiens kialakítására is képesek a fűtőblokkon belül. Ennek a segítségével rövidebb idő alatt optimalizálható az annealási hőmérséklet, valamint több, eltérő annealási hőmérsékletű PCR-reakció is futtatható egy időben.

### 3.2. Real-time PCR-ek

A valós idejű, real-time PCR-készülékek kifejlesztésével lehetőség nyílt az amplifikációs görbék, az úgynevezett PCR-kinetikai görbék felvételére.<sup>2</sup> E berendezések segítségével ciklusról ciklusra nyomon követhető a végtermék felsokszorozódása.

A valós idejű detektálás fluorimetriás úton történik. Ennek előfeltétele valamely arra alkalmas fluoreszcenciás jelzési technika használata. A SYBR Green I fluoreszcens DNS-festék (Molecular Probes) például a kettősszalú DNS-molekulákba épül be, lehetővé téve ezzel annak fluorimetriás detektálását. Speciális fluoreszcens próbákkal – például hibridizációs próbákkal vagy úgynevezett fluorogén 5' nukleáz-, más néven TaqMan próbákkal (Applied Biosystems) - a PCR-termék szekvensspecifikus kimutatása is megvalósítható. A hibridizációs próbapár két különböző fluoreszcens festékkel jelölt oligonukleotid, amely egymástól 1-3 nukleotid távolságban hibridizál a PCR-termékre. A gerjesztett donor festék fluoreszcens rezonancia energia transzfer révén gerjeszti az acceptor festéket, melynek fényemissziója detektálható. A TaqMan próba pedig egy olyan oligonukleotid, amely egy reporter és egy quencher festékkel van jelölve. A reporter festék emissziója csak akkor detektálható, amikor a DNS-polimeráz lehasítja azt az extenziós lépésben. A real-time PCR-ek különböző hullámhosszú gerjesztési fényforrást (LED vagy lézer) tartalmaznak és különböző hullámhosszú fluoreszkáló jelet képesek detektálni egyes esetekben nagy érzékenységű PMT-detektorral (fotoelektron-sokszorozó) vagy digitális CCD kamerával. A hagyományos fémblokkal rendelkező berendezéseken kívül manapság már léteznek ultragyors készülékek is. Ezek légbefújásos technológiával rendelkeznek, melynek segítségével akár 20 °C/sec fűtési-hűtési sebesség is megvalósítható (LightCycler, Roche).

Manapság már valamennyi real-time PCR-készülék rendelkezik olvadáspont analízis funkcióval. Ez lehetőséget ad a reakció elegyben lévő kettősszalú DNS-fragmentumok olvadási görbéjének felvételére. Megfelelő pozitív kontroll jelenlétében azonosítható a kívánt PCR-termék, tehát nem szükséges gélelektroforézissel leellenőrizni azt.

A real-time PCR-készülékek megjelenésével tehát nemcsak kvalitatív, hanem kvantitatív információhoz is juthatunk a vizsgálni kívánt nukleinsavat illetően. Az adott mérési rendszeren belül ezt az információt az úgynevezett áttörési pont ( $C_T$ ) adja meg. A  $C_T$  azt a ciklusszámot jelenti, ahol a minden egyes ciklusban detektált fluoreszcens jel exponenciálisan növekedni kezd. Egy standard sor segítségével, amely a az amplifikálható nukleinsavat ismert koncentrációkban tartalmazza, felvehető a kalibrációs görbe, azaz az áttörési ciklusszámok a koncentrációk logaritmusának függvényében. Így az ismeretlen mennyiségű cél nukleinsavat tartalmazó mintára jellemző áttörési pont megméréssel meghatározható annak koncentrációja. Kalibrációs görbe hiányában alkalmazhatunk komperatív  $C_T$  metodikát, amely az áttörési ciklusszámok közvetlen összehasonlítását teszi lehetővé.

#### 4. A PCR alkalmazási lehetőségei a gyógyszerkutatásban

A gyógyszerkutatás területén is számos lehetőség kínálkozik a polimeráz láncreakció alkalmazására; olyan molekuláris biológiai kérdésfelvetések megválaszolására, ahol szükség van egy adott nukleinsav – DNS vagy akár mRNS – minőségi vagy mennyiségi kimutatására. A PCR kiválóan alkalmas például transzgen állatmodellek ellenőrzésére, ahol a bevitt gén jelenlétét és annak kifejeződését kell visszaigazolni.<sup>3</sup> Hatásmechanizmus felderítés esetén vagy toxikológiai vizsgálatoknál alkalmazott microarray (DNS-chip) kísérletek találatának validálására szinte kizárólag real-time PCR-t alkalmaznak.<sup>4</sup> Hatóanyag hatására bekövetkező génexpresszió változás nyomon követésére vagy target-validálásra is használható ez a technika.<sup>5</sup> qPCR-rel lehet ellenőrizni pl. az RNS-interferenciával gátolt génműködést az egyes betegségmodellekben.<sup>6</sup> Egy adott indikáció szempontjából releváns génmutációk vagy SNP-k (Single Nucleotide Polymorphisms) azonosítása, genotipizálása is megvalósítható a PCR-rel.<sup>7</sup> Számos molekuláris biológiai eljárás van, ahol a PCR-rel felsokszorozott termék további felhasználása valósul meg (pl.: cDNS klónozás, in situ hibridizáció).<sup>8</sup>

Real-time PCR-rel vizsgálható egy adott sejtvonalba mesterségesen bevitt gyógyszer célpontot kódoló gén kifejeződése.<sup>9,10</sup> Ezáltal kiválasztható a legmagasabb expressziós szinttel rendelkező rekombináns sejtvonal, amely a továbbiakban alkalmas a hatóanyagok funkcionális tesztelésére. Ezt az utóbbi alkalmazási lehetőséget az alábbi konkrét gyakorlati példa szemlélteti.

##### 4.1. NR2B N-metil-D-aszpartát receptor alegység expressziójának kvantitatív vizsgálata

###### 4.1.1. Bevezető

Az NMDA receptorok a glutaminsav receptorok családjába tartozó, legalább egy NR1 és valamelyik NR2 alegységekből

felépülő heterooligomer fehérjék. Az NR2 alegységeket négy (NR2A-D), az NR1-et egyetlen gén kódolja, ami azonban 8 féle mRNS-sé íródhat át (splice variánsok).<sup>11</sup> Újabban felfedeztek NR3-nak elnevezett alegységeket is, melyeknek moduláló szerepet tulajdonítanak. Mivel a természetben az NMDA receptorok kevert alegység-összetételűek – feltehetően többféle NR2 alegység fordulhat elő akár egy receptoron belül is –, az NR2B szelektív NMDA antagonisták kutatása során, az alegység-szelektivitás vizsgálata céljából, szükség van olyan *in vitro* rendszerekre, amelyekben biztosított az azonos alegység-összetétel.<sup>12</sup> E célból olyan sejtvonalakat hoztunk létre, amelyek a kiválasztott receptor alegységeket (ugyanazt az NR1 ill. valamelyik NR2 altípust) stabilan expresszálják és működőképes receptorokat képeznek. E sejtvonalak felhasználásával lehetőség nyílik az egyes vegyületek funkcionális tesztelésére, alegység-szelektivitásuk ellenőrzésére.

Az NR2B N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptor alegység génexpresszióját humán embrionális vese (HEK293) sejtéből kialakított, patkány rekombináns NR2B alegységet stabilan expresszáló sejtvonalakon vizsgáltuk. A méréseket LightCycler (Roche) real-time PCR berendezéssel végeztük, A kalibráláshoz a tisztán patkány NR2B mRNS-t tartalmazó standard mintákat *in vitro* transzkripcióval hoztuk létre, és a pontos RNS koncentrációjukat fluorometrián határoztuk meg. Egy erősen illetve egy gyengén expresszáló, valamint negatív kontrollként a nem transzfectált eredeti sejtvonal vizsgálatát, a vektorkonstrukció által hordozott indukciós rendszernek az általunk bevitt patkány NR2B gén expressziójára gyakorolt hatását mutatjuk be. Míg a nem transzfectált sejtekben nem találtunk NR2B expressziót, a két létrehozott sejtvonal esetében az NR2B mRNS-ek mennyisége az indukáló ágens (muristeroneA) koncentrációjával nőtt.

Az így kidolgozott mérési módszer birtokában lehetőség van a patkány NR2B gén expressziójának abszolút kvantifikálására. A mérésekre alkalmas sejtvonalak kiválasztása során a nyilvánvaló kvalitatív szempontok mellett, azaz, hogy az adott receptor alegységeket expresszálják-e egyáltalán a sejtek, figyelembe kell venni a mennyiségi, kvantitatív szempontokat is. Összehasonlító mérések esetén szükség van a minták normalizálására, amely egy úgynevezett housekeeping gén expressziójának meghatározásával lehetséges. Mivel a housekeeping gének állandó expressziós szinttel rendelkeznek, felhasználhatóak az egyes vizsgálati minták anyagmennyiségének meghatározásához. Az NR2B mRNS mennyiségét az egyes minták humán porfobilinogén-dezamináz mRNS tartalmára vonatkoztattuk. E génekről átíródó mRNS-ek mennyiségének meghatározása alapján ki lehet küszöbölni az egyes minták között előforduló bemérési, vagy egyéb okokból származó eltéréseket.

##### 4.1.2. Anyagok és módszerek

RNS izoláláshoz High Pure RNA Isolation Kit-et (Roche) használtuk, melynek segítségével a rekombináns patkány NR1 és NR2B receptor alegységeket stabilan expresszáló, illetve a kontroll HEK293 sejtvonalakból totál RNS-t nyertünk. Egy reakció edényben (LightCycler esetén egy kapillárisban) elvégezhető RT-PCR-t alkalmaztunk, amelyet LightCycler (Roche) real-time PCR berendezésben



végeztünk el. LightCycler - RNA Master Hybridization Probes (Roche) kitet használtunk, melyben Tth DNS polimeráz enzim végzi el mind a két lépést RNS függő reverz transzkriptáz és DNS függő DNS polimeráz aktivitása révén. Az reakció optimalizálása során 3 mM Mn(OAc)<sub>2</sub> (a Tth enzim működése Mn<sup>2+</sup> függő), 0,5 μM primer és 0,2 μM hibridizációs próba koncentrációk bizonyultak megfelelőnek 20 μl végtérfogatra számolva. Az így létrehozott reakcióelegyhez 2 μl RNS mintát adtunk.

Az RT-PCR során a következő paramétereket alkalmaztuk: reverz transzkripció lépésnél: 61 °C 20 percig., 95 °C 2 percig, PCR-nél: 95 °C 2 másodpercig, 54 °C 5 másodpercig, 72 °C 10 másodpercig 40 cikluson keresztül. A fluoreszcencia mérés az 54 °C-os anneálás végén történt. A patkány NR2B kimutatásához alkalmazott primerek és próbák megtervezéséhez az LC Probe Design (Roche) szoftvert használtuk és az U11419-es hivatkozási számú (NCBI GenBank) nukleotid szekvenciát vettük alapul. Az alkalmazott oligonukleotidok következők voltak: forward primer: 5'-ATGGAATTGCCATCATCAC-3' (1234-1262), reverse primer: 5'-CCATTTCCCCACCCTC-3' (1472-1487), fluoreszcenciával jelölt hibridizációs próba: 5'-CCGAACACAGTTTCATCCCT-3' (1276-1295), LC640-nel jelölt hibridizációs próba: 5'-GCCCAAGAGCAGTTGCTACA-3' (1298-1317). A PCR-termékeket 1,5%-os agarózgélen elektroforetizáltuk és etidium-bromiddal festettük (2. ábra).



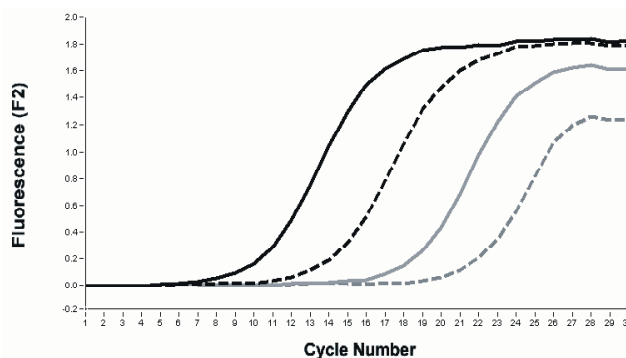
2. Ábra. PCR-termékek elektroforetikus képe, 1.: DNS-molekulatömeg marker (Sigma); 2.: *In vitro* transzkripcióval átírt NR2B standard, 3-6.: A10/C6 jelű sejtvonallal 0; 0,1; 0,3; 1,0 μM MuA indukció esetén; 7-10.: G1 jelű sejtvonallal 0; 0,1; 0,3; 1,0 μM MuA indukció esetén; 11-14.: ECR jelű sejtvonallal 0; 0,1; 0,3; 1,0 μM MuA indukció esetén; 15.: Templát nélküli negatív kontrol; 16.: DNS-molekulatömeg marker (Sigma)

Housekeeping gén expresszió meghatározásához LightCycler - h-PBGD Housekeeping Gene Set-et (Roche) használtuk követve a gyártó által leírt utasításokat. A porfobilinogén-dezamináz (PBGD) a harmadik enzim a tetrapirolok bioszintetikus útjában. Így képződik pl. a hem makrociklusos proszitetikus csoport. A tisztán patkány NR2B mRNS-t tartalmazó standard kialakításához egy KpnI restrikciós endonukleázzal linearizált, patkány NR2B cDNS inzertet tartalmazó pGEM-4 plazmidot alkalmaztunk, amely SP6 promoterrel rendelkezik. Az *in vitro* transzkripciót UniScript SP6 Transcription Kit-tel (Sigma) végeztük el követve a gyártó által leírt utasításokat. Az RNS koncentráció meghatározására RiboGreen RNA Quantitation Kit-et (Molecular Probes) használtunk.

#### 4.1.3. Eredmények

Általunk kialakított A10/C6 és G1 jelű, rekombináns patkány NR1 és NR2B receptor alegységeket stabilan expresszáló sejtvonallal ill. egy nem transzfektált kontroll

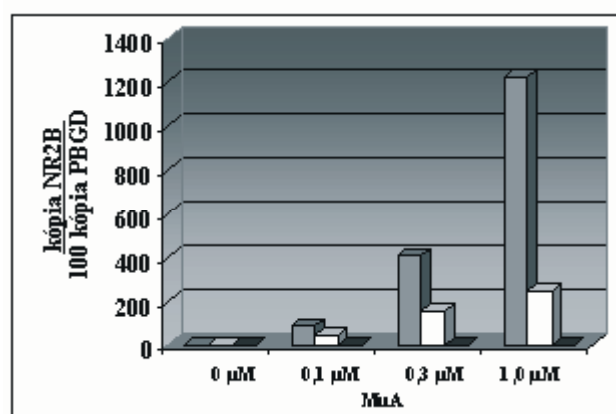
HEK293 sejtvonallal esetében vizsgáltuk a muristeroneA (MuA) induktor anyag NR2B transzkripcióra gyakorolt hatását. Mértük a különböző koncentrációkban (0; 0,1; 0,3; 1 μM) alkalmazott 24 órás MuA előkezelés hatására bekövetkező mRNS koncentráció-változásokat. Minden egyes mintában meghatároztuk az NR2B és a housekeeping gén expressziójára jellemző áttörési pontokat, majd mindkét gén esetében, a megfelelő kalibrációk segítségével intrapolációval kiszámítottuk az abszolút mRNS koncentrációkat (3. ábra).



3. Ábra. *In vitro* transzkripcióval átírt NR2B standardsor amplifikációs görbéi, fekete folytonos vonal: 2,8\*10<sup>9</sup> kópia, fekete szaggatott vonal: 3,3\*10<sup>8</sup> kópia, szürke folytonos vonal: 2,9\*10<sup>7</sup> kópia, szürke szaggatott vonal: 2,3\*10<sup>6</sup> kópia

Az NR2B mRNS koncentrációkat a housekeeping mRNS koncentrációkra vonatkoztattuk, így a nyert adatok egymással összevethetőkké váltak.

A mérési adatokból megállapítható volt, hogy a nem transzfektált HEK293 sejtvonallal nincs NR2B expresszió. Ugyancsak nem tudtunk NR2B expressziót kimutatni a bemutatott két sejtvonallal (A10/C6 és G1) abban az esetben, ha azokat nem kezeltük az induktor ágenssel. Ezzel szemben MuA hatására, az alkalmazott koncentrációval folyamatosan emelkedő NR2B expressziót detektáltunk ez utóbbi sejtekben (4. ábra).



4. Ábra. A vizsgált sejtvonallal NR2B expressziójának összehasonlítása, ahol szürke oszlop: A10/C6-; fehér oszlop: G1-; fekete oszlop: ECR jelű sejtvonallal

A két sejtvonallal összehasonlítva, 0,1 μM MuA koncentrációnál 2-szeres, 0,3 μM-nál 2,6-szoros és 1 μM MuA jelenléte esetén pedig 5-szörös NR2B mRNS szintbeli különbség figyelhető meg az A10/C6 jelű sejtvonallal javára.

Hasonló eredményeket kaptunk mind a fehérjeszintű expressziós (immuncitokémia), mind pedig a funkcionális (elektrofiziológiai ill. citoplazmatikus kalcium koncentráció meghatározáson alapuló) vizsgálataink során.<sup>9</sup> Ezek alapján ezt a sejtvonalat választottuk ki az NMDA receptoron ható vegyületek *in vitro* teszteléséhez.

#### Hivatkozások

1. Saiki, R. K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich, H. A.; Arnheim, N. *Science* **1985**, *230*, 1350–1354.
2. Higuchi, R.; Dollinger, G.; Walsh, P. S.; Griffith, R. *Biotechnology* **1992**, *10*, 413–417.
3. Hanneman, W. H.; Schimenti, K. J.; Schimenti, J. C. *Gene* **1997**, *200*, 185–192.
4. Rajput, A.; Singh, B. *J. Autoim.* **2004**, *23*, 311–321.
5. Fehér, L. Z.; Kálmán, J.; Puskás, L. G.; Gyülvérsi, G.;

- Kitajka, K.; Penke, B.; Palotás, M.; Samarova, E. I.; Molnár, J.; Zvara, Á. et al. *Neurochem. Int.* **2005**, *47*, 271–280.
6. Caroll, P. M.; Dougherty, B.; Ross-Macdonald, P.; Browman, K.; FitzGerald, K. *Pharm. Therap.* **2003**, *99*, 183–220.
7. Hiratsukaa, M.; Naraharaa, K.; Kishikawaa, Y.; Hamdya, S. I.; Endoa, N.; Agatsumaa, Y.; Matsuuraa, M.; Inouea, T.; Tomiokaa, Y.; Mizugakia, M. *Clin. Biochem.* **2002**, *35*, 35–40.
8. Niesler, B.; Frank, B.; Kapeller, J.; Rappold, G. A. *Gene* **2003**, *310*, 101–111.
9. Nagy, J.; Boros, A.; Dezső, P.; Kolok, S.; Fodor, L. *Neurochem. Int.* **2003**, *43*, 19–29.
10. Kurkó, D.; Dezső, P.; Boros, A.; Kolok, S.; Fodor, L.; Nagy, J.; Szombathelyi Zs. *Neurochem. Int.* **2005**, *46*, 369–379.
11. Bigge, C.F. *Current Opinion in Chemical Biology* **1999**, *3*, 441–447.
12. Lynch, R.D.; Shim, S.S.; Seifert, M.K.; Kurapathi, S.; Mutel, V.; Gallagher, J.M.; Guttmann, P.R. *E. J. Pharmacol.* **2001**, *416*, 185–195.

#### Polymerase Chain Reaction (PCR) and its applications in drug discovery

The principle of the polymerase chain reaction (PCR) is the repeated copying of a chosen segment of DNA using specific sense and anti-sense primers, usually separated by 200–400 nucleotides on the genome or nucleic acid of interest. Sequence-specific primers are required, and that means that the DNA sequence of the region flanking the amplified DNA must be known. With the availability of thermostable DNA polymerases derived from thermophilic bacteria this repetitive copying of the DNA can be done in a single tube by repeatedly heating the DNA to high temperature (94°C) to dissociate the DNA duplex, cooling to allow annealing of the primers to the template (37–60°C, depending on the primers used) and finally heating to the optimum temperature (72°C) for the polymerase to copy the template to produce a new DNA strand. The cycles are repeated 25–35 times (25 cycles theoretically increases the concentration of starting template DNA 107 times) to produce a DNA product which can be directly visualised by ethidium bromide staining on an agarose gel. The size of the DNA product is exactly defined by the location of the two primers. Messenger RNA cannot be reproduced directly by PCR but must first be copied into DNA, by reverse transcription, and then amplified in a two-step reaction known as Reverse Transcription – Polymerase Chain reaction (RT-PCR).

Higuchi et al. pioneered the analysis of PCR kinetics by constructing a system that detects PCR products as they accumulate. This “real-time” system includes fluorogenic dye or sequence specific fluorogenic probes in each amplification reaction, an adapted thermal cycler to irradiate the samples laser or LED, and detection of the resulting fluorescence with a computer-controlled cooled CCD camera or PMT-detector. Amplification produces increasing

amounts of double-stranded DNA, resulting in an increase in fluorescence. By plotting the increase in fluorescence versus cycle number, the system produces amplification plots that provide a more complete picture of the PCR process than assaying product accumulation after a fixed number of cycles. The ability to monitor the real-time progress of the PCR completely revolutionized the way one approaches PCR-based quantitation of DNA and RNA.

One example for using quantitative PCR technique in drug discovery is also described. To find new drugs acting on a defined molecular target, the generation of stable cell lines expressing the target protein is essential. These cell lines or the isolated and purified target proteins produced by them can be used for the purposes of screening chemicals and for the guarantee of selectivity. Here we showed how a real-time quantitative RT-PCR method was used in the development and selection of cell lines expressing recombinant N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptors. Online monitoring the amount of the PCR reaction products was based on fluorescence measurement with a LightCycler (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland). Using this method a cell line expressing the highest level of subunits could be chosen. Furthermore, it was confirmed that an ecdyson-inducible mammalian expression system can be used properly for controlling the expression of the NR1a and NR2B subunits in human embryonic kidney (HEK) 293 cells. In order to examine the inducibility, we compared the expression of the NR2B subunit in cells treated with the inducing agent muristeroneA (MuA) with that in untreated control cells. As it is shown in Fig. 1, whereas no apparent expression was detected in cells untreated with the inducing agent, the NR2B mRNA level was increased concentration-dependently in the presence of MuA.

# Szerkezet alapú virtuális szűrővizsgálatok a felfedező kutatásban

KESERŰ György Miklós\*

CADD&HTS, Richter Gedeon Rt., Gyömrői út 19-21, H-1103 Budapest

## 1. Bevezetés

A mechanizmus alapú gyógyszerkutatás kémiai szempontból egyik legnagyobb kihívása a kutatási program alapjául szolgáló vezérmolekula azonosítása. A gyógyszerkutatás hőskorában a vezérmolekula azonosítását jórészt in vivo kísérletek segítségével végezték, amelyek általában megfelelő hatékonyságú és elfogadható farmakokinetikai tulajdonságokkal rendelkező vegyületeket eredményeztek. Ez a megközelítés jóllehet meglehetősen lassúnak és kiszámíthatatlannak bizonyult jelentős teret engedve a véletlen, sokszor mégis jelentős felfedezéseknek. Napjaink orvosi kihívásai, az emberi életminőség javításának programja, valamint a gyógyszeripari befektetők hozamelvárásai ugyanakkor nem támogatják egy ilyen, nehezen tervezhető stratégia alkalmazását. Ez a felismerés vezetett a modern gyógyszerkutatás egyik legfontosabb felismeréséhez, a molekuláris célpontokon alapuló kutatási stratégia kidolgozásához. A megfelelő állatmodellek hiánya, valamint a hatásmechanizmus utólagos felderítésének nehézségei nagyban hozzájárultak ehhez a paradigmaváltáshoz, amelynek eredményeképpen az addigi in vivo modellek helyett in vitro eljárások kerültek a kutatási programok első vonalába. Az in vitro tesztek elterjedése jótékony hatással volt a racionális megközelítések elterjedésére is, ezek a módszerek voltak először képesek megfelelő minőségű adatokat szolgáltatni a szerkezet-hatás összefüggések számítógéppel segített vizsgálatához, elősegítve ezzel a molekulatervezési (CADD) módszerek elterjedését. Napjainkban az in vitro módszerek által szolgáltatott adatok, mint a gyógyszerkémiai erőfeszítések indikátorai, alapvető szerepet játszanak a vezérmolekula azonosítás és optimalálás szakaszában. A molekuláris biológia, a biofizika, valamint az információs technológiák és a robotika területén bekövetkezett drámai változások a 90-es évek közepén újabb változást hoztak a vezérmolekula azonosítás gyakorlatában, a nagy áteresztőképességű tesztelés (High Throughput Screening, HTS) a korai fázisú gyógyszerkutatás meghatározó módszerévé vált. A HTS korai alkalmazásai egyértelműen a tömegmértű, többmillió kampányok irányába mutattak, jóllehet mára világossá vált, hogy a vezérmolekula azonosítás hatékonysága nem növelhető egyszerűen csak a vizsgált vegyületek, illetve a megvalósított kampányok számának növelésével. Egyfelől könnyen belátható, hogy még a manapság elérhetővé vált áteresztőképesség ( $> 10^6$  vegyület/nap) mellett sem lehetséges a gyógyszereszerű vegyületeket magába foglaló kémiai tér (nagyságrendileg kb.  $10^{40}$  molekula) teljes feltérképezése. Másfelől viszont, az áteresztőképesség növelésének ellenére, a célfehérje farmakológia validálásának nehézségei, a HTS-re alkalmas biológiai tesztek kidolgozásának problémái, valamint a tesztelésre kerülő vegyületek kezelésének és minőségbiztosításának

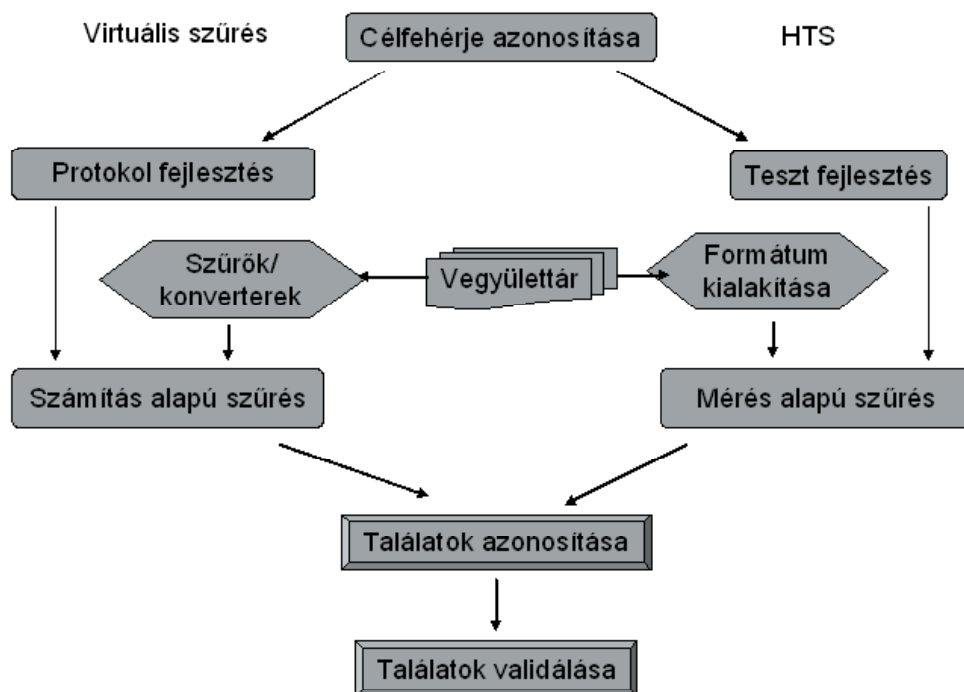
kérdései a megközelítés jelenlegi határait egyértelműen megmutatják. Tekintetbe véve a korábban általánosan alkalmazott tesztelési stratégia korlátait, a véletlen tesztelés olyan eljárásokkal kell felváltani, amelyek egyesítik a HTS áteresztőképességét a CADD módszerek racionális megközelítéseinek előnyeivel. A virtuális szűrővizsgálatok (virtual screening, VS) éppen ezt a koncepciót testesítik meg, amikor nagy áteresztőképességű molekulatervezési módszereket használunk fel nagy vegyületadatbázisok idő- és költségtakarékos vizsgálatára.

A HTS eljárások kidolgozása során elsőként a célfehérjét választjuk ki, ezt követi a vegyületek vizsgálatára alkalmas teszt kifejlesztése és a vizsgálandó vegyületek tesztelésre alkalmas formátumának kialakítása. A HTS kampányokat tipikusan automatizált környezetben valósítjuk meg, amelynek során a nagy számú vegyületnek köszönhetően nagy mennyiségű mérési adat keletkezik. A kampány kísérleti részének befejezését követi az adatok feldolgozásának, értelmezésének és kiértékelésének fázisa, amely jelentős számítógépes kapacitást és felkészültséget igényel.

A HTS és a virtuális szűrés közti rokonságot a megvalósítás főbb lépéseinek hasonlósága is jelzi (1. ábra). A célfehérje azonosítását követően ebben az esetben is az első feladat az aktivitás előrejelzésére szolgáló algoritmus kifejlesztése és optimalálása, ezt tekinthetjük a HTS-ben alkalmazott in vitro teszt in silico megfelelőjének. A virtuális szűrővizsgálatok végrehajtása előfeltételezi a vizsgálandó vegyületeket tartalmazó adatbázis megfelelő előkészítését. Maga a tényleges szűrés a számítógép memóriájában történik, ennél fogva nagymértékben automatizált és a HTS-hez hasonlóan nagy mennyiségű adatot szolgáltat, amelyet tárolni, elemezni és értékelni szükséges.

A technikai megvalósítás mellett a HTS és VS módszerek koncepciójukban is számos hasonlóságot mutatnak. Mindkét eljárás nagy számú vegyület gyors, korlátozott pontosságú vizsgálatára alkalmas, ebben az értelemben tehát inkább klasszifikációra mintsem a biológiai aktivitás kvantitatív meghatározására szolgálnak. Ebből következően e módszerek valójában nem megerősített találatokat, hanem jelölteket azonosítanak, amelyek további, immár hagyományos, jól reprodukálható módszerekkel történő vizsgálata vezet a valódi találatokhoz. A nagy áteresztőképességű módszerek, jellegükönél fogva - a megvizsgált vegyületek számához képest csak kis mértékben - hamis eredményeket is szolgáltathatnak. Lesznek olyan vegyületek, amelyeket ezek a vizsgálatok aktívnak jeleznek, de a validáló vizsgálatokban ezt az aktivitást nem tudjuk megerősíteni, ezek a hamis

\* Tel.: +36-1-4314605 ; fax: +36-1-4326002 ; e-mail: gy.keseru@richter.hu



1. Ábra. A virtuális illetve valós szűrővizsgálatok legfontosabb lépései

pozitívok. Ugyanakkor bizony számíthatunk olyan vegyületekre is, amelyeket tényleges aktivitásuk ellenére a nagy áteresztőképességű módszerekkel nem tudunk azonosítani, ezek a hamis negatívok. Bár a hamis eredmények elkerülése érdekében, mind a HTS, mind a VS vizsgálatok során a vizsgálati teszt gondos optimálásával mindent el kell követni, ezek valójában e módszerek közös működési filozófiáját és alkalmazását nem befolyásolják. Mindaddig, amíg az eljárások képesek az adott kutatási program kémiai kiindulópontjával szolgáló szerkezeti kör azonosítására, a hamis pozitív és hamis negatív találatokat mint zajt kezeljük és számukat minimálisra szorítva jelenlétüket elfogadjuk.

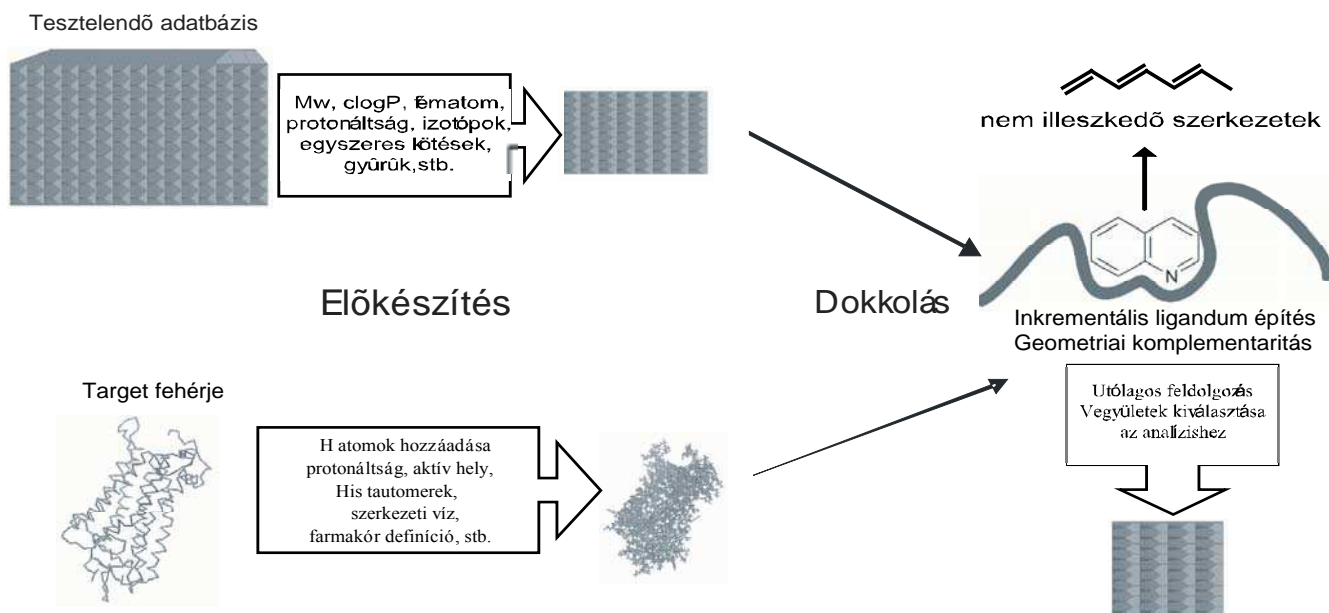
A HTS és VS módszerek közti leglényegesebb különbség az alkalmazott kísérleti illetve elméleti megközelítésben van. A VS elméleti megközelítéseinek köszönhetően 1) hatékonyabb költség-, idő-, és erőforrás-gazdálkodást eredményez; 2) a gyógyszereszerű vegyületek szélesebb – akár eddig elő nem állított – körének vizsgálatára alkalmas; 3) a random tesztelésnél nagyobb találati arányt eredményez. A közelmúlt összehasonlító vizsgálatai ugyanakkor nyilvánvalóvá tették, hogy a virtuális szűrés nem helyettesíti a HTS vizsgálatokat, ezek a módszerek valójában kiegészítik egymást<sup>1-3</sup>. A HTS megközelítés a rendelkezésre álló vegyületek gyors vizsgálatára szolgál, míg a VS legfőbb alkalmazási területe az adott célfehérjére vagy célfehérje családra fókuszált vegyülettárak előállítására és a kereskedelmi forgalomban beszerezhető vegyületeket tartalmazó adatbázisok szűrése.

A VS módszerek, nagy áteresztőképességű molekulatervezési módszerek lévén, a CADD eljárásokhoz hasonlóan ligandum-, illetve szerkezet alapú megközelítés alapján dolgoznak. A ligandum-alapú módszerek a kismolekulás kémiai térben azonosított aktív illetve inaktív molekulák

alján kísérlelnek meg új aktív vegyületeket azonosítani. A szerkezet alapú eljárások ezzel szemben a célfehérje 3D szerkezetének felhasználásával vizsgálják a potenciális ligandum és az aktív helyet alkotó aminosavak között kialakuló kölcsönhatásokat. Ebben az értelemben tehát a HTS módszerek in silico analógjai a szerkezet alapú VS eljárások, ezekkel foglalkozunk a továbbiakban.

## 2. Szerkezet alapú virtuális szűrővizsgálatok

Erlich szerint a gyógyszerhatás a gyógyszer és makromolekulás célfehérje között kialakuló molekulás felismerési folyamat eredménye. A racionális megközelítés ennek megfelelően igényli e folyamat szerkezet alapú kvalitatív és kvantitatív energetikai leírását<sup>4</sup>. A szerkezet alapú módszerek e kölcsönhatások vizsgálatát tűzik ki célul. A molekulatervezésben már régóta alkalmazott módszerek teljesítőképességét a korlátozott számítási teljesítmény mellett a jobbra csak alacsony felbontásban rendelkezésre álló fehérjeszerkezetek korlátozták. Mára mindkét területen jelentős előrelépés történt. A számítógépklaszterek és a Linux operációs rendszer olcsó számítási kapacitást kínál, míg a szerkezeti biológia a széles körben hozzáférhető szinkrotron forrásokkal a jobb minőségű szerkezeteket eredményez. Ebben a megváltozott környezetben a szerkezet alapú szűrővizsgálati módszerek gyógyszereszerű molekulák tömegét dokkolják a fehérje aktív helyére ahol a kötőmód predikcióját követően sor kerül a térbeli, elektrosztatikus és hidrofób illeszkedés értékelő-függvényeken alapuló kvantitatív vizsgálatára<sup>5,32-35</sup>. Az így kapott pontszámok alkalmasak a vizsgált vegyületek affinitás alapú rangsorolására, amely alapját képezi a legkedvezőbb pontszámú vegyületek további, elsősorban kísérleti vizsgálatára. A szerkezet alapú virtuális szűrővizsgálatok folyamatábráját a 2. ábra mutatja.



2. Ábra. A szerkezet alapú szűrővizsgálatok legfontosabb lépései.

### 2.1. A célfehérje szerkezeti előkészítése

A szerkezet alapú szűrővizsgálatok első lépése a célfehérje szerkezetének előállítás. A nagy áteresztőképességű vizsgálatok általában nagy felbontású szerkezetet igényelnek, amelynek leginkább a röntgendiffrakcióval, illetve NMR-rel meghatározott szerkezetek felelnek meg leginkább. Számos esetben azonban, amikor a célfehérje nem, vagy csak nehezen kristályosítható, illetve mérete kívül esik az NMR mérésstartományon, homológiamodellek használatára is sor kerülhet<sup>6</sup>. Bár jelenleg az ismert fehérjék közel 56%-ról tudunk ilyen módon szerkezeti információt szerezni, ezek a modellek korlátozott felbontásuk miatt általában csak durva szűrőként alkalmazhatók. A közelmúltban, elsősorban GPCR fehérjékre<sup>7</sup> bevezetett, ligandum-támogatott homológiamodellezés a modellek aktív helye környezetében elért minőségjavulás következtében reményeink szerint javíthat ezen a helyzeten<sup>8</sup>.

A nagy áteresztőképességű módszerek nem képesek a fehérje felszínének teljes feltérképezésére, így kezdeti feltételként igénylik az aktív hely meghatározását. Ezt a feladatot a szokásos kísérleti módszerek mellett (egykristály diffrakció, NMR, irányított mutációk) elméleti szinten leginkább a fehérjefelszín üregeit érzékelő algoritmusok alkalmazásával oldhatjuk meg<sup>9,10</sup>, de azonosításuk fizikai-kémiai vagy geometriai leírók segítségével is lehetséges<sup>11</sup>. Az azonosított aktív hely előkészítése alapvetően az alkalmazott dokkoló algoritmustól függ, általában magába foglalja a szükséges hidrogén atomok pótlását, a titrálható aminosavak protonálódási állapotának meghatározását, a megfelelő tautomer forma, valamint a kötésben szerepet játszó szerkezeti vízmolekulák azonosítását. Bár a nagy áteresztőképesség biztosítása érdekében a legtöbb dokkoló algoritmus az aktív helyet merev testként kezeli és a dokkolás során csak a ligandumok flexibilitásával számol, az aktív hely aminosav oldalláncainak flexibilitása a kötőkölsönhatások kialakulásában lényeges szerepet játszik. A napjainkban használatos módszerek a fehérje flexibilitását csak korlátok között képesek kezelni. Ennek következtében a megfelelő

célfehérje szerkezet kiválasztása elsődleges fontosságú, amennyiben a célfehérjéről több szerkezet is rendelkezésre áll, a kiválasztott szerkezetnek reprezentatívnak kell lennie. Több konformációs család esetén családonként egy szerkezet figyelembevétele indokolt.

### 2.2. Dokkoló algoritmusok

A leggyakrabban alkalmazott dokkoló algoritmusokat az 1. táblázat foglalja össze. Bár a dokkolás során csak a célfehérje aktív helyét vesszük figyelembe, az ezt kialakító aminosavak leírása az eredmény szempontjából egyáltalán nem közömbös. Az erre a célra általánosan alkalmazott térgeometriai deskriptorok magukban<sup>12</sup> vagy fizikai-kémiai jellemzőkkel kombinálva<sup>27,28</sup>, illetve kölcsönhatási pontok vagy felszínek<sup>29</sup>. A korai algoritmusok a ligandumokat is merev testként kezelték, manapság azonban a dokkoló programok többsége képes a potenciális ligandumok flexibilitásának figyelembevételére.

Erre a célra alapvetően két megközelítést használnak, ismertek a flexibilitást a teljes molekulán illetve annak fragmensein értelmező eljárások. A korai merev test dokkolások egyik tipikus kiterjesztése lehetővé teszi a konformációs flexibilitás figyelembevételét. A DOCK programban megvalósított merev test dokkolás során geometriai illesztési kritériumok segítségével illesztették a ligandumot az aktív hely „negatívjára”. Ezt a megoldást a későbbiek folyamán erőter alapú értékelő-függvénnyel, optimáló algoritmussal egészítették ki. Az ilyen módon továbbfejlesztett módszer képes kis energiájú kötőkonformációk azonosítására oly módon, hogy a ligandumok előre elkészített konformereit tartalmazó multi-konformer alkonyvtárakat dokkolnak az aktív helyre. Bár a multi-konformer dokkolás már képes a ligandumok flexibilitásának részleges figyelembevételére, ez a stratégia a ligandumok konformációs szabadsági fokainak növekedésével egyre körülményesebbé válik. Ezt a problémát kezelik hatékonyan a fragmens alapú módszerek,

amelyek a ligandumból képzett fragmenseket elkülönülten vagy inkrementálisan helyezik a fehérje aktív helyére.

Program	Módszer	Ref.
DOCK	Geometriai illesztés, inkrementális ligandépítés	12
FlexX	Geometriai illesztés, inkrementális ligandépítés	13,14
SLIDE	Geometriai illesztés, multikonformer ligandumkönyvtár	15
AutoDock	Energia alapú/sztochasztikus Monte Carlo szimulált hőkezelés	16
ICM	Monte Carlo minimálás, Pszeudo-Brown mintavételezés és lokális minimálás	17
QXP	Monte Carlo minimálás	18
MDD	Molekuladinamika	19
Glide	Szisztematikus keresés	20
GOLD	Genetikus algoritmus	21
PRO_LEADS	Tabu keresés	22
MOE-Dock	Tabu keresés vagy szimulált megeresztés	23
FRED	Szisztematikus keresés, multikonformer ligandumkönyvtárak	24,25
FLOG	Szisztematikus keresés	26

### 1. Táblázat. A legismertebb dokkoló algoritmusok

A szerkezet alapú virtuális szűrővizsgálatok egyik legnagyobb kihívása a fehérje flexibilitásának kezelése, amelyet több összefoglaló munka is tárgyal<sup>30,31</sup>. A flexibilitás figyelembevétele a különböző megoldásokban igen változatos mértékben valósul meg. A jelenleg rendelkezésre álló módszerek a merev fehérjeszerkezet kismértékű változtatásán, az aktív hely fehérje oldalláncainak mozgatóján, illetve több fehérjeszerkezet egyidejű figyelembevételén alapulnak. A következőkben röviden ismertetjük a ligandum, illetve fehérje flexibilitás figyelembevételére alkalmas algoritmusokat.

#### 2.2.1. Szisztematikus módszerek

Ezek a módszerek a ténylegesen meglévő konformációs szabadsági fokok teljes feltérképezését tűzik ki célul, azonban a szabadsági fokok számának növekedésével teljesítőképességük erősen korlátozottá válik:

$$N_{\text{konformer}} = \prod_{i=1}^N \prod_{j=1}^{n_{\text{inkrementum}}} \frac{360}{\theta_{i,j}}$$

ahol  $\theta_{i,j}$  az  $i$ -ik kötéshez tartozó  $j$  forgási inkrementum,  $N$  a forgatható kötések száma. E probléma elkerülésére vezették be a ligandumok aktív helyen történő inkrementális felépítésének módszerét, amelyet a FlexX algoritmusban implementáltak. A FlexX algoritmus alapját az a felismerés képezi, amely szerint a ligandum fizikai-kémiai tulajdonságai alapvetően meghatározzák majdani elhelyezkedését a fehérje aktív helyén. Az eljárás a ligandum alapfragszékének

dokkolásával kezdődik, majd ennek kedvező orientációjában a teljes ligandum inkrementális felépítésével folytatódik. Az inkrementális építkezés alapját a gráfelmélet fakereső algoritmus szolgáltatja. Természetesen a fa kiterjedésének növekedésével a teljes keresés nem ésszerű, ezért az egyes csomópontokban a kötődési szabadentalpia értékelő-függvényekkel történő becslése alapján irányított keresést valósítunk meg.

A DOCK algoritmusban a ligandumokat egy merev alapfragszékre és flexibilis oldalláncokra bontják. A dokkolás során a szterikus komplementaritás optimalizálásával kapunk alacsony energiájú kötőkonformációkat.

A ligandumok előre elkészített konformációinak merev dokkolása szintén a szisztematikus módszerek közé sorolható, ez valósul meg a FLOG programban<sup>26</sup>. Jóllehet ebben az esetben a ligandumok konformációs terének feltérképezése valójában nem az aktív helyen történik, így a generált konformációk relevanciája kérdéses lehet.

#### 2.2.2. Sztochasztikus módszerek

A legismertebb sztochasztikus módszerek általában Monte Carlo keresést, genetikus algoritmusok alkalmazását vagy a „tabu search” eljárást használják fel. A Monte Carlo algoritmusok véletlenszerű kezdőkonformációkat állítanak elő a ligandumokra a fehérje aktív helyén, majd a kialakult kölcsönhatások pontozásával meghatározzák az adott konformáció jószágát. Ezt követően a konformer generálási és pontozási lépésekből álló ciklusok által előállított konfigurációkat a Metropolis kritérium alapján osztályozzák. Ennek megfelelően egy konfigurációt újnak fogadunk el, ha a hozzá tartozó pontérték kedvezőbb, mint a korábbi konfigurációra kapott érték. Amennyiben az új konfiguráció ezt a feltételt nem teljesíti, úgy az új konfigurációt csak abban az esetben tartjuk meg, ha a konfiguráció megtartásának valószínűsége ( $P$ ) az alábbi egyenletben leírt Boltzmann-eloszlást követi:

$$P = \exp \left[ \frac{-(E_{\text{új}} - E_{\text{régi}})}{kT} \right]$$

ahol  $P$  az új konfiguráció elfogadásának valószínűsége.

Ezt a koncepciót használja az ICM algoritmus<sup>17</sup>, amely egy globális Monte-Carlo minimáláson alapuló dokkolást valósít meg. Az algoritmus további gyorsítása érdekében a kölcsönhatási energiákat egy előre számított rács segítségével határozzák meg.

A genetikus algoritmusok (GA-k) az evolúciós verseny és a populációs dinamika alapelveit alkalmazzák számítási problémák megoldására. A GA-k valójában sztochasztikus optimalizációs módszerek, ahol az optimalizációs probléma általánosságban genetikai leírásban kerül tárgyalásra. A kezdeti állapotban az algoritmusok egy véletlenszerű populációt állítanak elő, amely az adott probléma lehetséges megoldásait reprezentálja. A populáció tagjait kromoszómák írják le, ahol a gének az optimalizációs probléma változóinak felelnek meg. Egy dokkolási feladat esetében a gének kódolják a molekula külső (transzlációs és rotációs), valamint belső konformációs szabadsági fokait (torziók).

A keresztezés és mutációk alapján kialakuló új populáció egyedeit ezt követően dekódoljuk és számítjuk az adott konformációra a kötődési szabadentalpiát. Ezt a folyamatot addig folytatjuk, amíg egy előre rögzített generációs számot elérünk. A GA alapú virtuális szűrés legjellemzőbb példája a GOLD algoritmusahol a különböző, hidrogénkötésben résztvevő szerkezeti részleteket a génekben direkt módon kódolják. A szintén népszerű AUTODOCK programban alkalmazott GA az energiaminimálást lokális kereséssel oldja meg.

A Monte Carlo és GA eljárások mellett a PRO\_LEADS programban egy további heurisztikus algoritmust, a tabu search módszert találjuk. Ebben az eljárásban a véletlenszerűen generált orientációkat egy tabu lista alapján vizsgálják. Ez a lista előre elkészített megoldásokat tartalmaz és peremfeltételeket szolgáltat a keresés számára. Például a ligandum véletlenszerű elmozdulása akkor tiltott, ha ez olyan megoldáshoz vezet, amely magasabb energiájú és nem különbözik számottevően a korábban kapott, már tárolt megoldásoktól.

### 2.3. Értékelő-függvények

A ligandum és a fehérje aktív helye között kialakuló kölcsönhatások a virtuális szűrővizsgálatok során reverzibilis egyensúlyt eredményeznek, amelyet kvantitatív módon a kötődési szabadentalpia számításával írhatunk le. Sajnálatos módon a kötődési szabadentalpia még jelentős számítási kapacitást igénylő módszerek alkalmazásával is csak korlátozott pontossággal számítható. A virtuális szűrővizsgálatok során a vizsgált ligandumok nagy tömegére számítandó kötődési szabadentalpia racionális idő alatt csak becsléssel határozható meg, ezt a célt szolgálják a különböző értékelő-függvények. A leggyakrabban használt értékelő-függvényeket a 2. táblázatban foglaltuk össze. Valamennyi függvény közös jellegzetessége, hogy a kötődési szabadentalpia becsléséhez azt a közelítést használják fel, amely szerint a teljes entalpia különböző entalpiájárulékok összegeként írható fel. Fontos megjegyeznünk, hogy a kötődési szabadentalpia állapotfüggvény és mint ilyenre az additivitás szigorú értelemben nem teljesül.

A kötődési szabadentalpia becslésére szolgáló különböző értékelő-függvényeket három csoportra oszthatjuk, megkülönböztetünk erőtér alapú, empirikus, és tudásbázis alapú függvényeket.

Valamennyi ma ismert értékelő-függvény alkalmas a kötődési szabadentalpia becslésére, ugyanakkor mindegyikük számos korláttal bír. A pontatlanságok jórésze abból származik, hogy minden értékelő-függvényt kísérleti adatokhoz illesztettek, ezért értelemszerűen magukban foglalják a mérési hibát. Mivel az illesztésbe bevont kísérleti adatok mennyisége mindenképpen véges, elmondhatjuk, hogy univerzálisan alkalmazható értékelő-függvény nem áll rendelkezésre. Ugyanakkor az illesztésbe bevont röntgenszerkezetek csak kísérletileg mért kedvező kölcsönhatásokat tartalmaznak és nem hordoznak információt a kedvezőtlen kölcsönhatásokról, ami a értékelő-függvények használati értékét tovább korlátozza. Hasonló korlátokat támaszt a bizonytalan protonálódási állapot, valamint a szerkezeti vizek által közvetített kölcsönhatások figyelembevétele is.

2. Táblázat. A leggyakrabban használt értékelő-függvények

Típus	Függvény	Ref.
Erőtér-alapú	CHARMM	
	AMBER	
	LIE	
	OWFEG	36, 37
	MM PB/SA	
	GOLD/Gold(G)	
Empirikus	DOCK/Dock(D)	
	PLP	
	FlexX	
	ChemScore	14,38,39
	ScreenScore	
	HINT	
Tudásbázis-alapú	DrugScore	
	PMF	40,41,42
	BLEEP	

A függvények által szolgáltatott, a kötődési szabadentalpiával arányos pontszámok gyakran mutatnak összefüggést a molekulamérettel, jóllehet ezt a jellegzetességet a biológiai vizsgálatok nem erősítik meg. Mindezen hiányosságok részben csökkenthetők a különböző értékelő-függvények kombinációjának alkalmazásával. A konszenzus pontozásnak nevezett megoldás egyesíti a komponensként alkalmazott függvények egyes kölcsönhatástípusok leírásában mutatkozó előnyös sajátosságait és így általában jobb eredményt szolgáltat mint amilyen a komponensek egyedi alkalmazásával elérhető.

#### 2.3.1. Erőtér-alapú értékelő-függvények

Az erőtérre alapuló függvények a rendszer energiáját a molekulamechanikából ismert energiategyekkel fejezik ki, ilyen például a DOCK és a GOLD pontozás. A fehérje-ligandum kölcsönhatás kvantitatív jellemzésére a molekulamechanikában használatos energiategyek közül elsőként a nemkötő kölcsönhatások leírására alkalmas tagokat használták fel. A ligandum és kötőhelye között fellépő kötési kölcsönhatási energia számítását leggyakrabban az elektrosztatikus és van der Waals tagok összegzésével becslik. Az ilyen elven működő erőtér alapú pontozási módszerek legnagyobb hiányossága, hogy a fehérje-ligandum kölcsönhatásokat eredetileg gázfázisú számításokra kifejlesztett összefüggésekkel írják le, amelyek elhanyagolják a biológiai rendszerekben meghatározó jelentőségű solvatációs- és entrópia-effektusokat. Szintén gyakori hiba a dokkolás során kialakuló sztérikus ütközések kezelése. Az erőtér alapú értékelő-függvények a van der Waals kölcsönhatások számítására általánosan alkalmazott Lennard-Jones 12-6 potenciál kis távolságoknál jelentkező nagy meredeksége miatt a közeli kölcsönhatásokra jelentős taszítással válaszolnak (pl. DOCK pontozás). Az ilyen félrevezető effektusok csökkentése érdekében a Lennard-

Jones tagot a korszerűbb értékelő-függvényekben skálázzák (pl. GOLD pontozás).

A GOLD értékelő-függvény különlegessége a H-hidas kölcsönhatások számítása. A pontozás figyelembe veszi a donorok és akceptorok deszolvatációját, a bevezetett diszperziós tag felelős a hidrofób kölcsönhatások leírásáért, míg hagyományos molekulamechanika energiátagek szolgálnak a ligandum belső energiájának meghatározására. Ennek következtében ez a értékelő-függvény elsősorban azokban az esetekben ad megbízható eredményt a ligandum és az aktív hely kölcsönhatásában a poláris kölcsönhatások meghatározóak.

A GOLD értékelő-függvény<sup>36</sup> a ligandum-fehérje kölcsönhatásra:

$$E_{vdW} + E_{H-bond} = \sum_{protein} \sum_{ligand} \left[ \left( \frac{A_{ij}}{d_{ij}^8} - \frac{B_{ij}}{d_{ij}^4} \right) + (E_{da} + E_{ww}) - (E_{dw} + E_{aw}) \right]$$

a ligandum belső energiája pedig:

$$E_{vdW} + E_{torsion} = \sum_{ligand} \left( \frac{C_{ij}}{d_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{d_{ij}^6} \right) + \sum_{ligand} \frac{1}{2} V \left[ 1 + \frac{n}{|m|} \cos(n|\omega|) \right]$$

ahol  $A_{ij}$ ,  $B_{ij}$ ,  $C_{ij}$  és  $D_{ij}$  az  $i$  és  $j$  atomok van der Waals paraméterei,  $d_{ij}$  az  $i$  és  $j$  atom távolsága.

A DOCK függvény mind elektrosztatikus, mind pedig hidrofób kölcsönhatási tagot tartalmaz, azonban az entrópia-effektusokat nem veszi figyelembe<sup>37</sup>. A poláris kölcsönhatásokat távolságfüggő dielektromos állandó segítségével vissza lehet skálázni.

$$E_{vdW} + E_{electrostatic} = \sum_{protein} \sum_{ligand} \left[ \left( \frac{A_{ij}}{d_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{d_{ij}^6} \right) + 332 \frac{q_i q_j}{\epsilon(d_{ij}) d_{ij}} \right]$$

ahol  $\epsilon(d_{ij})$  a távolságfüggő dielektromos állandó.

### 2.3.2. Empirikus értékelő-függvények

Az empirikus értékelő-függvények a kötődési szabadentalpia becslését a fehérje-ligandum kölcsönhatásban résztvevő explicit hidrogénkötések és hidrofób kontaktok súlyozott összegzésével valósítják meg, ilyen függvény például a LUDI, a FlexX és a ChemScore. A különböző megoldások nemcsak az adott kölcsönhatások számítására használt formalizmusban térnek el, hanem a különféle értékelő-függvényekben számos további kiegészítő tag bukkanhat fel. Így egyes függvények a hidrogén kötések leírására távolságfüggvényt használnak, amely az ideális geometriától való eltérést bünteti, míg más esetekben ezeket a kölcsönhatásokat szögfüggőként írják le. A kötődési szabadentalpia számításához feltesszük, hogy  $\Delta G_{bind} \cong \sum \Delta G_i f_i$  ahol  $\Delta G_i$  a megfelelő súlyfaktor,  $f_i$  pedig az  $i$ -ik kölcsönhatáshoz tartozó kölcsönhatási tag. A súlyfaktorokat kísérletileg meghatározott kötődési szabadentalpia értékek és 3D szerkezeti információk alapján regressziós analízissel állítják elő.

Az empirikus értékelő-függvények kétségtelenül legnagyobb előnye, hogy gyors és hatékony lehetőséget teremtenek a kötődési szabadentalpia becslésére. Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy ezek a értékelő-függvények az erőtér alapú függvényekhez hasonló elhanyagolásokkal élnek, így a gyakorlati alkalmazás korlátai is hasonlóak. Az empirikus függvények teljesítőképessége természetesen függ a súlyfaktorok meghatározására felhasznált kísérleti adatkészlettől.

Az empirikus értékelő-függvényeket az entrópia-effektus becslése érdekében forgási taggal is kiegészíthetik, de a leggyakrabban használt függvények a szolvatációs effektusokat továbbra is csak részben képesek kezelni.

A LUDI pontozás a hidrogénkötő kölcsönhatásokat semleges és ionos jellegű kölcsönhatásokra bontja, míg a hidrofób kölcsönhatásokat a molekulafelszín számításával veszi figyelembe<sup>29</sup>.

$$\Delta G_{köt} = \Delta G_{H-köt} \sum_{H-köt} f(\Delta R, \Delta \alpha) + \Delta G_{ionos} \sum_{ionos} f(\Delta R, \Delta \alpha) + \Delta G_{hidrofob} \sum_{hidrofob} |A_{hidrofob}| + \Delta G_{rotor} N_{rotor} + \Delta G_0$$

ahol  $A_{hidrofob}$  a molekula hidrofób felszíne.

A széles körben alkalmazott FlexX pontozás az ideáltól eltérő hidrogén-hidas, ionos, aromás és egyéb kölcsönhatásokat geometria változókat tartalmazó büntetőpotenciálokkal írja le<sup>14</sup>.

$$\Delta G_{köt} = \Delta G_{H-köt} \sum_{H-köt} f(\Delta R, \Delta \alpha) + \Delta G_{ionos} \sum_{ionos} f(\Delta R, \Delta \alpha) + \Delta G_{aromás} \sum_{aromás} f(\Delta R, \Delta \alpha) + \Delta G_{kontakti} \sum_{kontakti} f(\Delta R, \Delta \alpha) + \Delta G_{rotor} N_{rotor} + \Delta G_0$$

A ChemScore tanító adatkészlete összesen 82 különböző típusú fehérje-ligandum komplexet tartalmazott<sup>38</sup>. A függvény a hidrogénkötő és hidrofób kölcsönhatások mellett a fehérjékben gyakorta előforduló fémekkel kialakuló kölcsönhatásokat, valamint a ligandum flexibilitáscsökkenése következtében fellépő entrópia-effektust is figyelembe veszi.

$$\Delta G_{köt} = \Delta G_{H-köt} \sum_{H-köt} f(\Delta R, \Delta \alpha) + \Delta G_{fém} \sum_{fém} f(\Delta R, \Delta \alpha) + \Delta G_{lipo} \sum_{lipo} f(\Delta R) + \Delta G_{rotor} \sum_{rotor} f(P_{nl}, P'_{nl}) + \Delta G_0$$

### 2.3.3. Tudásbázis-alapú értékelő-függvények

A tudásbázis-alapú értékelő-függvények a fehérje-ligandum komplexekben implicit módon kódolt tudás hasznosítására jöttek létre. Az ilyen típusú függvények a Boltzmann törvény inverz megfogalmazására épülnek, amely szerint:

$$E_{ij} = -kT \ln(p_{ijk}) - kT \ln(Z)$$

ahol  $E_{ij}$  az átlagos potenciál,  $p_{ijk}$  a valószínűségi sűrűség,  $Z$  az állapotösszeg

Ezt a megközelítést arra lehet felhasználni, hogy fehérjeszerkezeteket tartalmazó adatbázisok felhasználásával olyan értékelő-függvényt állítsunk



elő, amely a fehérjeszerkezetek kvantitatív elemzését a szerkezetpredikciók aspektusából valósítja meg. Ennek érdekében az  $i$ ,  $j$ , és  $k$  változókat a fehérje és ligandum atomtípusainak illetve a köztük lévő távolságoknak feleltetik meg. Az így definiált kölcsönhatások előfordulási gyakorisága pedig meghatározza az adott kölcsönhatás hozzájárulásának mértékét a kötődési szabadentalpiához. A széles körben használt DrugScore és a PMF (Potential of Mean Force) értékelő-függvények ezt a koncepciót valósítják meg:

DrugScore:

$$\Delta W = \gamma \sum_{\text{fehérje ligand}} \Delta W_{ij}(r) + (1-\gamma) \times \left[ \sum_{\text{ligand}} \Delta W_i(SAS, SAS_0) + \sum_{\text{fehérje}} \Delta W_j(SAS, SAS_0) \right]$$

ahol  $SAS$  az oldószer által elérhető molekulafelszín,  $W_{ij}$  a távolságfüggő párpotenciál.

$$\text{PMF: } PMF = \sum_{\text{fehérje ligand}} A_{ij}(d_{ij})$$

$$A_{ij}(d_{ij}) = -k_B T \ln \left[ f_{\text{terfogatkorr}}^j(r) \frac{\rho_{\text{seg}}^{ij}(r)}{\rho_{\text{tomb}}^{ij}(r)} \right]$$

ahol  $k_B$  a Boltzmann állandó.

#### 2.4. Utólagos feldolgozás

A jelenleg elterjedt értékelő-függvények az előzőekben ismertetett korlátok miatt nem alkalmasak a kötődési szabadentalpia megbízható, pontos számítására. Ezt a hiányosságot további, utólagos számításokkal kísérhetjük meg csökkenteni. E megközelítés szerint az egyszerű és gyors értékelő-függvények segítségével a részletesebb vizsgálatok számára egy racionális módon szűkített, a rendelkezésre álló számítási kapacitással feldolgozható dimenziójú problémát állítunk elő. Ezekben a számításokban már lehetőség nyílik a szolvatációs- és entrópia-effektusok megfelelő szintű figyelembevételére is. A szűrt ligandumokra elvégzett szabadenergia-perturbációs számítások, illetve a manapság népszerű lineáris válasz-elmélet alkalmazásával a kötődési szabadentalpiát szerencsés esetben 1-2 kcal/mol pontossággal becsülhetjük.

Az utólagos vizsgálatok egyik leggyakrabban alkalmazott módszere az újrapirozás, illetve a konszenzus pontozás<sup>43</sup>. Az újrapirozás során annak lehetőségét vizsgáljuk meg, hogy az elsődleges értékelő-függvény segítségével kiválasztott kötőkonformációkat egy, vagy több további függvénnyel pontozva javítani tudjuk –e a kötődési szabadentalpia becslését. A konszenzus pontozás során olyan kötőkonformációkat választunk ki, amelyek nem egyetlen értékelő-függvénnyel mutatkoznak optimálisnak, hanem olyan konformációkat keresünk, amelyeket több különböző értékelő-függvény is kedvezőnek ítél. Ebben a megoldásban a különböző értékelő-függvényeket súlyfaktoruk függvényében azonos, illetve különböző súllyal vehetjük figyelembe. A konszenzus pontozást külön is alkalmazhatjuk a kötőkonformáció kiválasztására, illetve a ligandumok affinitás szerinti sorrendjének kialakítására is.

Az utólagos vizsgálatok egy speciális típusát az aktívnaq jósolt vegyületek mesterséges dúsulásának elkerülésére

irányuló kísérletek. Ezek során a értékelő-függvények azon hiányosságát próbáljuk meg javítani, hogy általában a nagyobb méretű molekulák tényleges aktivitásuktól függetlenül is kedvező pontszámot kaphatnak. Szokásos eljárásként a vizsgálandó ligandumok fizikai kémiai paraméterek alapján történő szűrés jön szóba, gyakori azonban a pontszámok molekulatömeggel, illetve lipofilicitási paraméterekkel történő skálázása is<sup>44</sup>.

Az utólagos vizsgálatok közül nem hagyhatjuk ki a leghatékonyabbnak becsült ligandumok kötőkonformációinak vizuális vizsgálatát sem. Ez a nehezen automatizálható lépés jelentős mértékben hozzájárul az eredmények értelmezéséhez, az esetleges szisztematikus hibák felismeréséhez és ahhoz, hogy a vezérmolekulakeresés fázisát követően értékes szerkezeti információkkal segítsük az optimalizálást.

#### 2.5. Sikeres alkalmazások

A dokkoló algoritmusok és értékelő-függvények folyamatos fejlődése eredményeképpen mára számos a szerkezet alapú virtuális szűrővizsgálatoknak számos sikeres alkalmazása ismert (lásd még ref. 45-49). A 3. táblázatban ezeket igyekeztünk összegyűjteni megadva célfehérjét, az alkalmazott módszert, a tesztelt ligandumok forrását, valamint a szűrés hatékonyságára jellemző dúsitási faktorok (EF) ideális és ténylegesen elért mértékét. A dúsitási faktorokat a szűrt, rangsorolt adatbázis adott százalékának megfelelő vegyületre számítják, ezt az adott faktorok mellett minden esetben megadjuk.

#### 3. Következtetések

Napjainkra a szerkezet alapú virtuális szűrés a nagy áteresztőképességű szűrővizsgálatok családjának sikeres tagjává vált. Ezek a módszerek az irodalom és saját tapasztalataink alapján (3, 54-57) a vezérmolekula azonosításának stádiumában jól kiegészítik a kísérleti megközelítéseket, különösen pedig a HTS vizsgálatokat. Ezek a tapasztalatok arra utalnak, hogy a virtuális szűrés, a rendelkezésre álló vegyülettáron alkalmazva, az adott célfehérjére fókuszált alkönyvtárak kialakításával jelentős mértékben javíthatja a HTS hatékonyságát. Másfelől a virtuális szűrés alkalmas az adott kutatóhelyen meg nem található, de kereskedelmi forrásból beszerezhető vegyületek vizsgálatára is. Ez utóbbi alkalmazás lehetővé teszi, hogy a vezérmolekula keresés ne csupán a rendelkezésre álló vegyületek által lefedett kémiai térre korlátozódjon.

Bár a sikeres alkalmazások a metodika hasznosságát egyértelműen jelzik, a módszer korlátairól is fontos megemlékeznünk. A jelenleg rendelkezésre álló dokkoló algoritmusok legnagyobb hiányossága a fehérje flexibilitásának hiányos kezelése. A értékelő-függvények teljesítőképessége a kívánalmaktól elmarad, a szolvatációs- és entrópia-effektusok figyelembevétele, valamint a mért kötődési affinitásértékkel való korreláció javítása változatlanul a kutatások középpontjában áll. Végezetül nem elhanyagolható, hogy a szerkezet alapú virtuális szűrővizsgálatok továbbra is jelentős számítási kapacitást, szoftver és hardver oldalról jelentős ráfordítást igényelnek.

3. Táblázat. A szerkezet alapú virtuális szűrővizsgálatok sikeres alkalmazása (A: az aktív vegyületek száma, EF: a dúsítási faktor)

Célfehérje	Program	Jellemzők				Ref.	
		Szűrt adatbázis	A	EF	Ideális EF		EF/Ideális EF
Timidine kináz	DOCK	ACD: 990; (szűrők: $M_w$ reagensek, inorganic), véletlen válogatás, Gasteiger-Marsili töltések	10	7(10)	10	0.7	50
	FlexX			8(10)	10	0.8	
	GOLD			10(10)	10	1	
Estrogen receptor alfa	DOCK		10	7(10)	10	0.7	
	FlexX			8(10)	10	0.8	
	GOLD			10(10)	10	1	
Protein Tirozin Foszfátáz-1B	DOCK	ACD: 179805; (szűrők: fémek, izotópok, clogP), véletlen válogatás, Gasteiger-Marsili töltések, ionizált	1327	7(10)	10	0.7	51
	FlexX			9(10)	10	0.9	
	Glide			9(10)	10	0.9	
Protein Kináz B	DOCK		266	0.1(10)	10	0.01	
	FlexX			1(10)	10	0.1	
	Glide			5(10)	10	0.5	
Ciklooxygenáz-2	FRED	WDI: 7528; (szűrők: $M_w$ hasonlóság, forgatható kötések, makrociklus és szteroid kizárása, farmakofor pontok, ionizált pH 7)	128	5(10)	10	0.5	52
	FlexX			6.2(10)	10	0.62	
	Glide			6.3(10)	10	0.63	
Estrogen Receptor béta	FRED		55	7.9(10)	10	0.79	
	FlexX			5.8(10)	10	0.58	
	Glide			7.5(10)	10	0.75	
p38 MAP kináz	FRED		72	1.9(10)	10	0.19	
	FlexX			7.9(10)	10	0.79	
	Glide			4.1(10)	10	0.41	
Giráz B	FRED		36	4.1(10)	10	0.41	
	FlexX			7(10)	10	0.7	
	Glide			5.8(10)	10	0.58	
Trombin	FRED		67	7.9(10)	10	0.79	
	FlexX			8.1(10)	10	0.81	
	Glide			8.3(10)	10	0.83	
Gelatináz A	FRED		43	4.1(10)	10	0.41	
	FlexX			6.3(10)	10	0.63	
	Glide			6.1(10)	10	0.61	
Neuraminidáz	FRED	51	8.3(10)	10	0.83		
	FlexX		6.2(10)	10	0.62		
	Glide		9.8(10)	10	0.98		
Ciklooxygenáz-2	FlexX	128	20(1)	68	0.29	53	
Estrogen Receptor beta	FlexX	55	39(1)	100	0.39		
p38 MAP kináz	FlexX	72	18(1)	100	0.18		
Giráz B	FlexX	36	21(1)	100	0.21		
Trombin	FlexX	67	25(1)	100	0.25		
Gelatináz A	FlexX	43	16(1)	100	0.16		
Neuraminidáz	FlexX	51	22(1)	100	0.22		
Neuraminidáz	GOLD	ATLAS (vállalati adatbázis): ~3.1 millió	15	43(1)	100		0.43
PTF-1B			25	20(1)	100	0.2	
CDK-2 kináz $M_w < 250$			41	10(1)	100	0.1	
CDK-2 kináz $M_w > 250$			23	23(1)	100	0.23	
Estrogen Receptor béta (agonisták)			20	60(1)	100	0.6	
Estrogen Receptor béta (antagonisták)?			17	58(1)	100	0.58	

Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy a szerkezet alapú virtuális szűrés a vezérmolekula azonosításának kétségkívül hasznos, de távolról sem kiváltságos módszere. Meggyőződésünk, hogy legnagyobb hatékonyságát a már alkalmazásban lévő metodikákkal, a HTS-sel, a kémiai analóg kutatással és a de novo tervezéssel kombinálva érheti el.

### Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Polgár Tímeának a kézirat elkészítése során nyújtott segítségéért.

### Hivatkozások

- Doman, T. N.; McGovern, S. L.; Witherbee, B. J.; Kasten, T. P.; Kurumbail, R.; Stallings, W. C.; Connolly, D. T.; Shoichet, B. K. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2213-21.
- Paiva, A. M.; Vanderwall, D. E.; Blanchard, J. S.; Kozarich, J. W.; Williamson, J. M.; Kelly, T. M. *Biochim. Biophys. Acta.* **2001**, *1545*, 67-77.
- Polgár, T.; Baki, A.; Szendrei-Ignác, Gy.; Keserű, G. M. *J. Med. Chem.* beküldve
- Böhm, H.-J.; Klebe, G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2588 – 2614.
- Paul D. Lyne. *Drug Discov. Today* **2002**, *7*, 1047-1055.
- Hillish, A.; Pineda, L.F.; Hilgenfeld, R. *Drug Discov. Today* **2004**, *9*, 659-669.
- Becker, O. M.; Y.Marantz, Y.; Shacham, S.; Inbal, B.; Heifetz, A.; Kalid, O.; Bar-Haim, S.; Warshaviak, D.; Fichman, M.; Noiman, S. **2004**, *PNAS*, *101*, 11304 – 11309.
- Evers, A.; Klebe, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 248-251.
- Hendlich, M.; Rippmann, F.; Barnickel, G. *J. Mol. Graph. Model.* **1997**, *15*, 359-363.
- Brady, G.P.; Stouten, P.F. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2000**, *14*, 383-401.
- Schmitt, S.; Hendlich, M.; Klebe, G. *Homology.* **2001**, *40*, 3141 – 3144.
- Kuntz, I.D.; Blaney, J.M.; Oatley, S.J.; Langridge R.; Ferrin T.E. *J. Mol. Biol.* **1982**, *161*, 269-288
- Hindle, S. A.; Rarey, M.; Buning, C.; Lengau, T. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2002**, *16*, 129-149.
- Rarey, M.; Kramer, B.; Lengauer, T.; Klebe, G. *J. Mol. Biol.* **1996**, *261*, 470-489.
- Schnecke, V.; Swanson, C.A.; Getzoff, E.D.; Tainer, J.A.; Kuhn, L.A. *Proteins* **1998**, *33*, 74-87.
- Goodsell, D.S.; Olson A.J. *Proteins* **1990**, *8*, 195-202.
- Abagyan, R.; Totrov, M.; Kuznetsov, D. *J. Comput. Chem.* **2004**, *15*, 488 – 506.
- McMartin, C.; Bohacek, R.S. *J. Comput.-Aided Mol. Design.* **1997**, *11*, 333 – 344.
- Di Nola, A.; Roccatano, D.; Berendsen, H.J.C. *Proteins* **1994**, *19*, 174-182.
- Halgren, T.A.; Murphy, R.B.; Friesner, R.A.; Beard, H.S.; Frye, L.L.; Pollard, W.T.; Banks, J.L. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1750-1759.
- Friesner, R.A.; Banks, J.L.; Murphy, R.B.; Halgren, T.A.; Klicic, J.J.; Mainz, D.T.; Repasky, M.P.; Knoll, E.H.; Shaw, D.E.; Shelley, M.; Perry, J.K.; Sander, L.C.; Shenkin, P.S. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1739-1749.
- Jones, G.; Willett, P.; Glen, R.C. *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 43-53.
- MOE (Molecular Operating Environment), Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbrooke St. West, Suite 910, Montreal, Quebec, H3A 2R7, Canada.
- Baxter, C.A.; Murray, C.W.; Clark, D.E.; Westhead, D.R.; Eldridge M.D. *Proteins* **1998**, *33*, 367-382.
- FRED, OpenEye Scientific Software, 3600 Cerrillos Rd., Suite 1107, Santa Fe, NM 87507
- Miller, M.D.; Kearsley, S.K.; Underwood, D.J.; Sheridan, R.P. *J. Comput.-Aided Mol. Design* **1994**, *8*, 153-174.
- Jianga, F.; Kimb, S.-H. *J. Mol. Biol.* **1991**, *219*, 79-102.
- Burkharda, P.; Taylora, P.; Walkinshawa, M.D. *J. Mol. Biol.* **1998**, *277*, 449-466.
- Böhm, H.-J. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1992**, *6*, 61-78.
- Carlson, H.A.; McCammon, J.A. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *57*, 213-218.
- Claussen, H.; Buning, C.; Rarey, M.; Lengauer, T. *J. Mol. Biol.* **2001**, *308*, 377-395.
- Taylor, R.D.; Jewsbury, P.J.; Essex, J.W. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2002**, *16*, 151-166.
- Halperin, I.; Ma, B.; Wolfson, H.; Nussinov, R. *Proteins* **2002**, *47*, 409-443.
- Schneider G.; Böhm, H.-J. *Drug Discov. Today.* **2002**, *7*, 64-70.
- Kitchen, D.B.; Decornez, H.; Furr, J.R.; Bajorath, J. *Nature Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 935-949.
- Vieth, M.; Hirst, J.D.; Kolinski, A.; Brooks, C.L. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1612-1622.
- Shoichet, B.K.; Leach, A.R.; Kuntz, I.D. *Proteins* **1999**, *34*, 4-16.
- Eldridge, M.D.; Murray, C.W.; Auton, T.R.; Paolini, G.W.; Mee, R.P. *J. Comput.-Aided Mol. Design.* **1997**, *11*, 425-445.
- Stahl, M.; Rarey, M. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1035-1042.
- Gohlke, H.; Hendlich, M.; Klebe, G. *J. Mol. Biol.* **2000**, *295*, 337-356.
- Muegge, I.; Martin, Y. C. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*; 791-804.
- Mitchell, J.B.O.; Laskowski, R.A.; Alex, A.; Thornton, J.M. *J. Comput. Chem.* **1999**, *20*, 1165-1176.
- Clark, R.D.; Strizhev, A.; Leonard, J.M.; Blake, J.F.; Matthew, J.B. *J. Mol. Graph. Mod.* **2000**, *20*, 281-295.
- Verdonk, M.L.; Berdini, V.; Hartshorn, M.J.; Mooij, W.T.M.; Murray, C.W.; Taylor, R.D.; Watson, P. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2004**, *44*, 793-806.
- Muegge, I.; Enyedy, J. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 693-707.
- Davis, T.G.; Pratt, D.J.; Endicott, J.A.; Johnson, L.N.; Noble, M.E.M. *Pharm. Therap.* **2002**, *93*, 125-133.
- Furet, P.; Caravatti, G.; Lydon, N.; Priestle, J.P.; Sowadski, J.M.; Trinks, U.; Traxler, P. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1995**, *9*, 465-472.
- Lyne, P. D.; Kenny, P. W.; Cosgrove, D. A.; Deng, C.; Zabudoff, S.; Wendoloski, J. J.; Ashwell *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1962-1968.
- Barril, X.; Hubbard, R.E.; Morley, S.D. *Mini Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 779-791.
- Bissantz, C.; Folkers, G.; Rognan, D. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4759-4767.
- Klon, A.E.; Glick, M.; Thoma, M.; Acklin, P.; Davies, J.W. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2743-2749.
- Schulz-Gasch, T.; Stahl, M. *J. Mol. Mod.* **2003**, *9*, 47-57.
- Stahl, M.; Rarey, M. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1035-1042.
- Bauer, A.; Kovári, Z.; Keserű, G. M. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **2004**, *676*, 1-7.
- Virág, I.; Polgár, T.; Keserű, G. M. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **2005**, *725*, 239-242.
- Polgár, T.; Keserű, G. M. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3749-3755.
- Polgár, T.; Baki, A.; Szendrei, Gy.; Keserű, G. M. *J. Med. Chem.* **2005**, <http://dx.doi.org/10.1021/jm050504d>.

**Structure-based virtual screening**

Recent improvements in genomics yielded a substantial increase of potential, novel targets for drug discovery. Whereas combinatorial chemistry and high-throughput screening were supposed to produce a vast number of new drugs, neither of them has met fully the expectations. Virtual screening applies rule-based, property-based, pattern recognition and docking methods to screen large databases of virtual compounds. Hereby the number of compounds to be

assayed is drastically decreased and virtual screening can speed up the lead discovery process. This review summarizes the recent developments in structure-based virtual screening focusing the problems of docking algorithms and scoring functions. A collection of success stories is enclosed for supporting further applications in the lead discovery field.

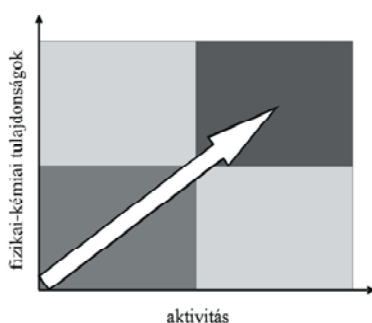
# A fizikai-kémiai jellemzés helye és módszerei a gyógyszerkutatásban

TAKÁCSNÉ NOVÁK Krisztina\* és VÖLGYI Gergely

Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet, Hőgyes E. u.9. 1092 Budapest

## Bevezetés

A szerkezet-hatás összefüggések első felismerései óta a gyógyszerkémikusok számára az újonnan szintetizált vegyületek fizikai-kémiai tulajdonságainak jellemzése mindig is hasznos információval szolgált a várható biológiai hatás és farmakokinetikai paraméterek előre jelzésére. Mégis a gyógyszerkutatásban a 90-es években bekövetkezett stratégiaváltás teljesen új alapokra helyezte a fizikai-kémiai jellemzés (*physico-chemical profiling*) kérdését<sup>1</sup>.

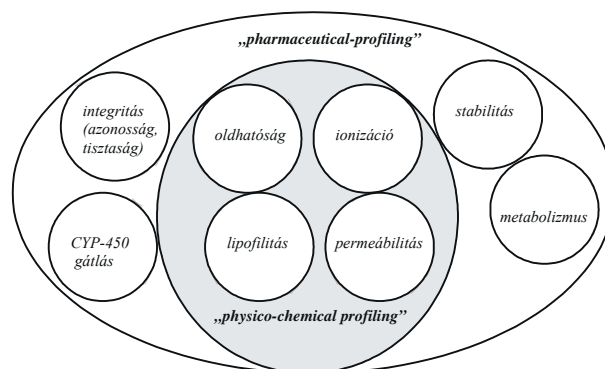


1. Ábra. Az aktivitás és a farmakokinetikai tulajdonságok párhuzamos fejlesztése a gyógyszerkutatás sikerességének új lehetősége

Az új technológiák, mint a kombinatorikus kémia, a nagy áteresztőképességű (biológiai aktivitást jelző) szűrő módszerek (*high throughput screening*, HTS), az új gyógyszer-támadáspontokat (target) feltáró genomika és proteomika térnyerésével az aktív vegyületek megtalálásának (*hit*) lehetősége ugrásszerűen megnövekedett. Ezzel szinte egyidőben megfogalmazódott az igény a gyógyszerre fejleszthetőség egy minél korábbi fázisban való megítélésére. A felmérések alapján ismertté vált ugyanis, hogy a gyógyszerkutatás későbbi fázisaiban kihulló molekulákat kb. 40%-ban a nem megfelelő farmakokinetikai tulajdonságok miatt veszítik el. A fejlesztésre való kiválasztás eszközeként a biohasznosít-hatóságot, a várható ADME (abszorpció, disztribúció, metabolizmus és exkrécio) tulajdonságokat meghatározó fizikai-kémiai paraméterek látszottak a legjobb lehetőségeknek. Az új gyógyszerkutatási stratégia tehát egyforma hangsúlyt fektet a biológiai aktivitás megtalálására és optimalizálására, valamint a gyógyszer-szerű (*drug-like*) tulajdonságok fejlesztésére. A kettőt nem egymást követően, hanem párhuzamosan kell művelni (1. ábra).

A fenti célra leggyakrabban használt fizikai-kémiai paraméterek az *oldhatóság*, az *ionizáció*, a *lipofilitás* és a *permeabilitás* (ezek tartoznak a *physico-chemical profiling* témakörébe), de az utóbbi időben a szélesebb értelemben vett u.n. *gyógyszerészeti-jellemzésbe* (*pharmaceutical profiling*) már a vegyületek azonosságának és tisztaságának

(*integrity*), valamint a metabolikus és kémiai stabilitásának a jellemzését, a gyógyszer-interakciókra utaló CYP450 enzimgátlás vizsgálatát is beleértik<sup>2</sup> (2. ábra).



2. Ábra. A fizikai-kémiai jellemzés és a gyógyszerészeti-jellemzés viszonya

A gyógyszerkutatás korai fázisában igen nagyszámú (több százezer, esetleg néhány millió) vegyület fizikai-kémiai szempontból történő vizsgálata új igényeket fogalmazott meg az alkalmazható módszerekkel szemben is. Előtérbe kerültek a nagy áteresztőképességű (HT), gyors, nagyon kis anyagigényű, automatizált technikák. Az angol nyelvű irodalomban a fizikai-kémiai jellemzés korszerű HT módszereiről számos kiváló áttekintés jelent meg az elmúlt néhány évben<sup>3-11</sup>. Ez a bőséges irodalom feleslegessé tenné egy magyar nyelvű összefoglalás készítését, ha annak más célja nem lenne.

Jelen munka olyan áttekintést kíván adni a fizikai-kémiai jellemzés új lehetőségeiről, mely figyelembe veszi a hazai sajátosságokat. Nevezetesen azt, hogy gyógyszer-gyaráinkban folyó originális kutatásoknál inkább jól szelektált, célzott, közepes méretű (*medium*) molekula-könyvtárakkal dolgoznak<sup>12</sup>, így a vegyületek fizikai-kémiai jellemzésénél nem annyira a HT jelleg, mint inkább a megbízhatóság és a pontosság dominál.

Ezért az oldhatóság, az ionizáció, a lipofilitás és a permeabilitás meghatározására alkalmazott módszereknél, a HT eljárások vázlatos, táblázatokban összefoglalt bemutatása mellett, azokra az eljárásokra helyezzük a hangsúlyt, melyek validáltak, pontos fizikai-kémiai állandót szolgáltatnak és alkalmasak egyfelől a gyógyszerkutatás korai fázisában a fejlesztésre való kiválasztásnál a döntést elősegíteni, másrészt a későbbi fejlesztési munka során értékes információt jelentenek a gyógyszerforma kialakításánál, vagy a farmakokinetikai adatok értelmezésénél.

\*Tel.:215 5241; fax: 2170891; e-mail: NOVKRI@HOGYES.SOTE.HU

E mellett, külön specifikumként, jelen munka kitér a vízben rosszul oldódó vegyületek problémájára is, hiszen közismert, hogy az elmúlt 10 évben a kutatásba került vegyületek egyre lipofilebbekké, vízben egyre rosszabbul oldódókká váltak, ami újabb kihívást jelentett a módszerfejlesztők számára. Saját kutatásból vett példákön szemléltetjük, milyen megoldási lehetőségek közül választhatunk, ha a minta vízben nem vagy nagyon rosszul oldódik.

### Oldhatóság

Biohasznosíthatóság szempontjából a gyógyszerjelölt vegyületek talán legfontosabb tulajdonsága az oldhatóság. Az orális alkalmazhatóság feltétele ugyanis a hatóanyag kioldódása (felszabadulása) a szilárd gyógyszerformából és felszívódása a gasztro-intesztinális traktusból, mely folyamatokat a molekula vízben való oldhatósága nagymértékben meghatároz. Az oldhatóság ismerete fontos abból a szempontból is, hogy a biológiai vizsgálatoknál, a minta oldatban kell, legyen, egyébként hamis információhoz vezet az eredmény. A mai gyógyszerkutatási gyakorlat szerint ugyanis a szintetizált vegyületeket tipikusan DMSO-ban oldják, ebből készül a vizes hígítás, ami a biológiai tesztlésre kerül. Mivel az anyag a szerves oldószerben már oldott állapotba jutott, a vízzel hígított oldat koncentrációja nagyobb lehet, mint a termodinamikai oldhatóság által megszabott.

A termodinamikai oldhatóság meghatározása során a szilárd anyagot a vizes közegben, anyagfelesleg biztosítása mellett, adott hőmérsékleten 24-48 óráig kevertetik, majd ülepítik (esetleg szűrik vagy centrifugálják) és a telített oldat koncentrációját alkalmas módon (UV, HPLC) mérik. Az u.n. *kinetikai oldhatóságot* viszont úgy vizsgálják, hogy a mintát előbb kb. 10-20 µg/ml koncentrációban DMSO-ban oldják, majd ennek kis térfogatait adják a vizes tompító oldathoz. Az anyagkiválás első pillanatában az oldatlan anyagrészt eltávolítják és az ilyen körülmények között képződött oldat koncentrációját mérik. A két oldhatóság adat közötti különbség abból ered, hogy ez utóbbinál a DMSO-ban történt előzetes oldás miatt nincs szükség a kristályrács-energia legyőzésére a vízmolekulák által, valamint nincs biztosítva az oldódás termodinamikai egyensúlyának elérése. A kinetikai oldhatóság mérése elegendő a kémiai felfedező kutatás (*discovery*) stádiumában a gyors szűrésre, a vegyületek rangsorolására, de a termodinamikai (egyensúlyi) oldhatóság meghatározása mindenképp szükséges a fejlesztésre kiválasztott molekulák esetében.

Számos módszert fejlesztettek ki mindkét típusú oldhatóság meghatározására. Az 1. táblázat nyújt áttekintést a leggyakrabban használt eljárásokról, feltüntetve a módszerek teljesítőképességét, HT ill. nem-HT jellegét, anyag és időigényét, valamint a kereskedelemben kapható célkészülékek nevét és gyártóját.

Általában az 50 vegyület/nap teljesítménynél nagyobb kapacitású módszereket tekintik HT-nak. A *Lipinski és mtsai*<sup>13</sup> által bevezetett *turbidimetriás* eljárásnál, a fent már említett elv szerint, egy 20 µg/ml koncentrációjú DMSO törzsoldatból percenként 0,5 µl-es részleteket adnak egy 2,5 ml térfogatú pH 7-es foszfát tompító oldathoz, mindaddig, amíg az UV detektor 620-820 nm tartományban, a már

nem oldódott részecskék miatti zavarosságból eredő fény-szóródást nem jelez. A *nefelometriás*<sup>14</sup>, *direkt UV*<sup>15</sup> és az *ultrafiltrációs*<sup>16</sup> módszerek esetén pedig a szilárd részecskék eltávolítását követően különböző módon (lézer nefelométer, UV detektor, LC/MS) határozzák meg a telített oldat koncentrációját. Ezek a módszerek már kihasználják a 96 vagy nagyobb mérőhelyes mikrotálcák nyújtotta, kapacitást megsokszorozó lehetőséget. A módszerek kinetikai oldhatósági adatot (logS<sup>APP</sup>) szolgáltatnak és a pontosságuk is csak korlátozott, mivel igen kis térfogatadagolások sorozatát kell elvégezni, általában egy mérés történik, egy adott pH-n, valamint a kristályformák, polimorfok közötti különbségek elvesznek a DMSO-ban való oldás miatt. A termodinamikai (egyensúlyi) oldhatóság (logS) meghatározására szolgáló standard eljárás a *telítéssel rázó tölcéses* módszer. Ennek igen nagy időigénye és meglehetősen nagy anyagigénye (10-50 mg) nem teszi alkalmassá a felfedező gyógyszerkutatásban való széleskörű felhasználásra, de tudni kell, hogy mint referencia módszer ez a törzskönyvező hatóságok (pl. FDA) által elfogadott eljárás. Az igen régóta való alkalmazás ellenére átfogó validálási tanulmány nem készült az eljárásról. *Yalkowsky* munkáiban<sup>17,18</sup> viszont részletesen kitér a legfontosabb hibaforrásokra, így a termostálás fontosságára, a mintavétel problémájára, az átkristályosodás lehetőségére, aggregátumok, micellák ill. kolloid oldat képződésére, stb. Saját méréseink szerint<sup>21</sup> a legpontosabb analitikai munka mellett is, a módszer hibája 3-10 % között mozog, de előfordulhat akár 30 %-os hiba is a vizsgált minta egyedi tulajdonságaitól függően. Törekvések történtek ennek a módszernek az automatizálására és a használt oldószertérfogat miniaturizálására, azonban eddig még nem sok sikerrel.

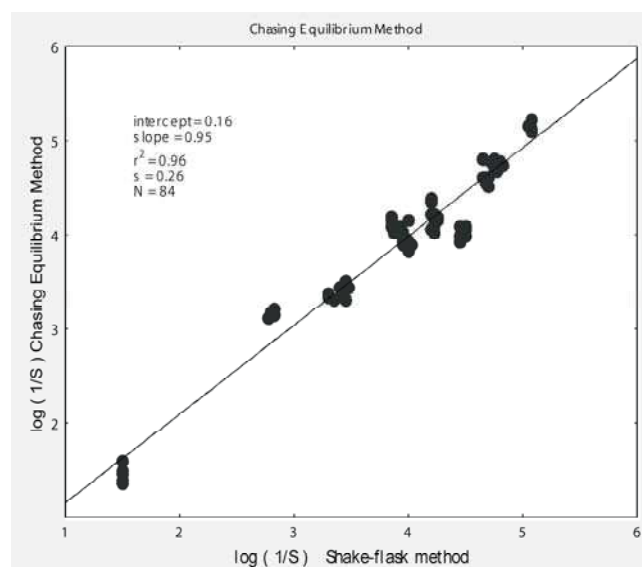
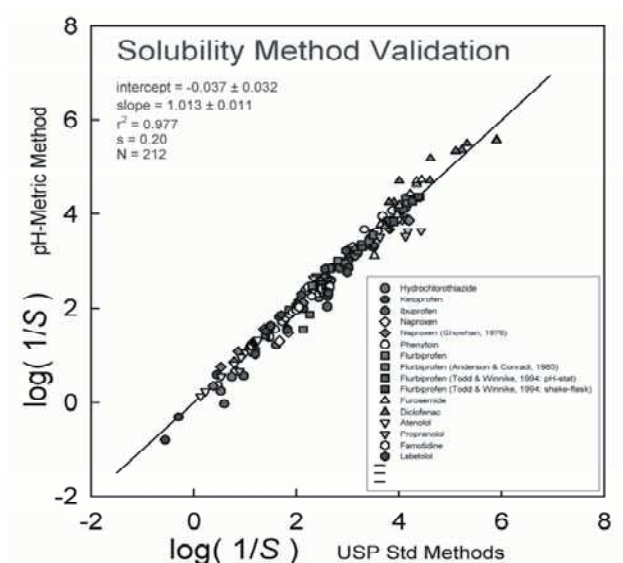
Sokkal ígéretesebbek a más elven – a potenciometriás titrálással – működő módszerek, melyekkel ionizálódó vegyületek mérhetők. Két új eljárást írtak le és mindkettőhöz a kereskedelemben célkészülék kapható. A DTT-módszer<sup>19</sup> (*dissolution template titration*) esetén input adatként betáplált pK<sub>a</sub> és logP<sub>ow</sub> értékekből a szoftver egy elméleti titrálási görbét szimulál, ez szolgál mintaként a mérési protokollnál. Növekvő anyagkoncentrációnál potenciometriás titrálásokat végzünk pH 1-12 tartományban az ionizált formát biztosító pH irányából kiindulva. A pH változásra bekövetkező deprotonálódás (bázisok) és protonálódás (savak) miatt fellépő anyagkiválás torzulást okoz a titrálási görbén, melyből az egyensúlyi oldhatóság alkalmas szoftver segítségével kiszámítható. A módszer hátránya, hogy egy-egy titrálás ideje az oldhatósági egyensúly beállása érdekében 3-10 óra. Ezt küszöböli ki a legújabb módszer, az u.n. „*chasing equilibrium method*”<sup>20</sup>, mely szintén potenciometriás titrálás elvén működik. Egy normál titrálást követően, olyan anyagkoncentrációnál is elvégezzük a titrálást, ahol a minta nemionizált formája (B vagy HA) kiválik. A kiválást a cellába vezetett optikai kábel segítségével UV detektor érzékeli, mely azonnal a titrálás leállítását vonja maga után. Ezután sav ill. bázis térfogatok adagolásával, igen kis pH változásokat idézünk elő, melynek következtében a minta hol oldatba megy, hol újra kiválik. Vizsgálatok szerint nyolc ilyen pont meghatározása elegendő az egyensúly beállításához. Az egyensúly „kergetése” (*chasing*), pontosabban kikényszerítése után, az ahhoz a ponthoz tartozó titrálási adatból a termodinamikai oldhatóság számítható. Egy mérés ideje 60-90 percre rövidül. A módszer validálásában munkacsoportunk is részt

1. Táblázat. Az oldhatóság meghatározására használt módszerek

Módszer	Oldhatóság típusa	Méréshatár	Sebesség <sup>a</sup> (perc/vegyület)	Kapacitás <sup>b</sup> (vegyület/nap)	Készülék/gyártó
Turbidimetriás <sup>13</sup>	kinetikai	5 µg/ml	15	45	Nincs (robot mintaadagoló + diódasoros spektrofotométer) Nepheloskan Ascent (ThermoLabSystem)
Nefelometriás <sup>14</sup>	kinetikai	5 µg/ml	4	300	Nephelostar (BMG) Solubility Scanner (BD Gentest)
Direkt UV <sup>15</sup>	kinetikai	0,1 µg/ml	4	300	µSOL (pION)
Ultrafiltrációs <sup>16</sup>	kinetikai	0,1 µg/ml	6	200	Nincs (96 lyukú ultrafiltrációs tálca, LC/MS)
Telítési rázótlcsérés <sup>17</sup>	egyensúlyi	1 µg/ml	75 óra	<1	Nincs (nem automatizálható)
Generator column <sup>18</sup>	egyensúlyi	0,1 µg/ml	60-180	6-12	Nincs (kolonnában, üvegyöngyön rögzített mintán vizet pumpálnak át, az eluálódó mintát HPLC-vel mérik)
Potenciometriás „DTT” <sup>19</sup>	egyensúlyi	5 ng/ml	180-600	2-6	pSOL (pION)
Potenciometriás „chasing equilibrium” <sup>20</sup>	egyensúlyi	0,1 µg/ml	60-90	10-15	GLpKa (Sirius)

<sup>a</sup> becült idő/minta a hivatkozott irodalom szerint.

<sup>b</sup> becült mérhető mintaszám/nap, 24 órás, felügyelet nélküli folyamatos működést véve alapul



3. Ábra. A két potenciometriás oldhatóság meghatározó módszer validálása<sup>19,21</sup>.

vett<sup>21</sup>. A hagyományos módszerrel való összehasonlítás mindkét potenciometriás eljárást megbízhatónak és igen pontosnak találta (3. ábra).

A vízben nagyon kevésbé (gyakorlatilag nem) oldódó anyagok esetén leírtak módszereket oldószerkeletben történő meghatározásra, azonban ezeknek túl sok létjogosultságuk, az elméleti háttér teljes tisztázatlansága miatt, ma még nincs.

### Ionizáció

Az ionizációra képes vegyületeknél a  $pK_a$  érték (ionizációs

konstans; savi disszociációs állandó) meghatározása a gyógyszerkutatásban alapvető, mivel ez a fizikai-kémiai paraméter határozza meg, hogy a molekula milyen ionizáltsági állapotban van különböző pH értékeknél.

Ennek pedig döntő fontossága van a gyógyszer szerkezetbeni sorsát illetően. A nemionizált (töltést nem hordozó) forma az u.n. „*transport-forma*”, mely (inkább) képes a lipid barrieren átjutni, míg az ionos forma, az u.n. „*receptor-forma*” az, amely (inkább) kötődik a célmolekulához, ill. transport fehérjékhez. Például egy 7,4  $pK_a$  értékű vegyület, szöveti pH-n (7,4) 50 %-ban van ionizált ill. nemionizált formában. A  $pK_a$  érték ismerete nélkülözhetetlen a logP meghatározáshoz és minden egyéb pH-függő molekuláris tulajdonságot is befolyásol.

2. Táblázat. A  $pK_a$  meghatározás módszerei

Módszer	Anyagigény (mg)	Szükséges oldhatóság (M)	Sebesség <sup>a</sup> (perc/vegyület)	Kapacitás <sup>b</sup> (vegyület/nap)	Készülék/gyártó
potenciometria <sup>8</sup>	3-5	$5 \times 10^{-4}$	20-40	30-40	GLpKa (Sirius)
UV/pH titrálás <sup>8</sup>					
• hagyományos módon	1-2	$10^{-5}$	6-8 óra	1	Nincs (pH mérő + UV spektrofotométer)
• automatizált módon	1-2	$10^{-5}$	30	30-40	GLpKa + DPAS (Sirius)
• HT módon (SGA) <sup>22</sup>	1-2	$10^{-2}$ (DMSO)	4	200	ProfilerSGA (Sirius)
CE					
• normál mód <sup>11</sup>	0,01	$10^{-5}$ - $10^{-6}$	30	20	CE készülék (bármely gyártó)
• multiplexed <sup>9</sup> (96 kapilláris)	0,01	$10^{-5}$ - $10^{-6}$	30	100	CePro 9600 (CombiSep)

<sup>a</sup> becült idő/minta a hivatkozott irodalom szerint.

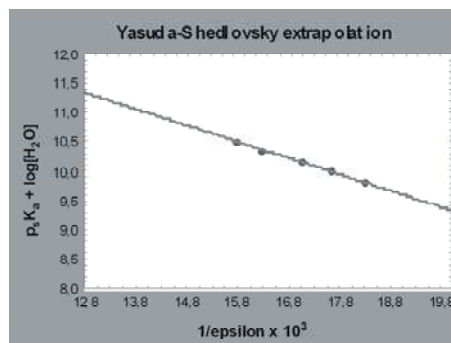
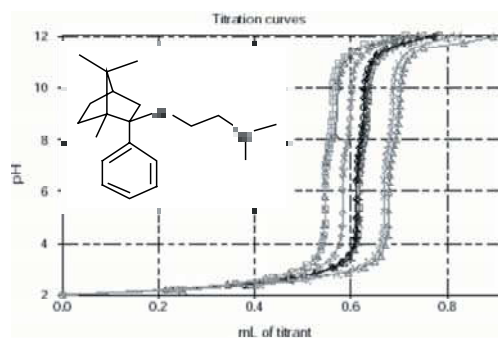
<sup>b</sup> becült mérhető mintaszám/nap, 24 órás, felügyelet nélküli folyamatos működést véve alapul

A 2. táblázat foglalja össze a  $pK_a$  meghatározásra használt módszereket. A *potenciometria*<sup>8</sup> vizes közegben a leggyakoribb eljárás, ennek feltétele, hogy a vizsgálandó anyag legalább 0,5 mM koncentrációban oldódjék vízben a titrálás teljes tartományában. Alternatív lehetőség az *UV/pH titrálás*<sup>8</sup>, amennyiben a molekula UV spektruma pH-függő. Ilyen esetekben a (fajlagos abszorpciós koefficiens-től függően) akár két nagyságrenddel alacsonyabb koncentrációban is mérhetünk. Újabb lehetőség a *kapilláris elektroforézis*<sup>11</sup> (CE) módszer használata, melynek alapja, hogy az elektroforetikus mobilitás függ a minta ionizáltsági állapotától. Ennek előnyeként a szelektivitást és a kis anyagigényt említhetjük. További alternatíva lehet az *NMR/pH titrálás*<sup>23</sup> ill. a *CD/pH titrálás*<sup>24</sup>, azonban ezek a módszerek nem tekinthetők rutin eljárásoknak, inkább egy-egy speciális probléma esetén - más módon nem mérhető vegyületnél - indokolt a használatuk.

Az automatizált potenciometriás (GLpKa) és az UV/pH titrálás (GLpKa + DPAS) közepes kapacitású, nagy pontosságú módszerek (SD:  $\pm 0,01$ ). Igazán HT jellegű  $pK_a$  meghatározó eljárásnak a *spectral gradient analysis* (SGA) és a *multiplex CE* technika tekinthető. Előbbi során alkalmas savas és bázikus puffer oldatok elegyítésével időben lineáris pH-grádiens állítanak elő, majd a mintát injektálják. Diódasoros UV detektorral regisztrálják a pH változásra bekövetkező spektrum-változást. Egyetlen pontból, 4 perc alatt kielégítő megbízhatósággal nyerhető a  $pK_a$  adat.

A vízben nem oldódó vegyületek  $pK_a$  értékének meghatározására legelfogadottabb az oldószerkeletben való mérés (*co-solvent method*), ami mind potenciometriás, mind spektrofotometriás eljárás esetén használható. Szerves oldószer-víz elegyekben meghatározzuk az ott érvényes u.n. *látszólagos ionizációs állandót* ( $p_s K_a$  értéket), majd extrapolálunk a nulla szerves oldószertartalomra, azaz a vizes közegre. A gyakorlatban leginkább a MeOH/víz rendszer és a Yasuda-Shedlovsky extrapoláció terjedt el. E szerint  $p_s K_a + \log[H_2O] = a/\epsilon + b$ , ahol  $\epsilon$  az oldószerkelet relatív permittivitása,  $[H_2O]$  az elegy víztartalmának mól koncentrációja. A közelmúltban végzett validálási

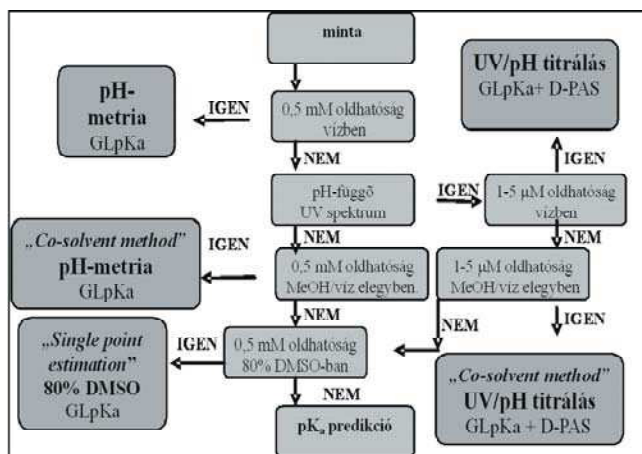
vizsgálataink szerint<sup>25</sup>, megfelelő kivitelezés esetén (helyes elektród-kalibráció; minimum 3 különböző MeOH %-nál végezve a mérést; a lehető legalacsonyabb szervesoldószer koncentrációt használva) az eljárás pontossága SD:  $\pm 0,05$ . Távoli extrapoláció (40-60 % MeOH tartalom) esetén a hiba megnő. Példaként a deramciklán  $pK_a$  meghatározását mutatjuk be, amely vegyületnek vízben való oldhatósága 0,5 mM-nál kisebb, nincs pH-függő UV spektruma, viszont ideális az oldószerkeletben való mérésre. Öt különböző szerves oldószer aránynál, 30-55 % MeOH tartományban 3-3 párhuzamos titrálást végeztünk. A Yasuda-Shedlovsky extrapolációval (4. ábra) nyert vizes  $pK_a$  érték:  $9,61 \pm 0,03$ <sup>26</sup>.



4. Ábra. Titrálási görbék és a Yasuda-Shedlovsky összefüggés a deramciklán látszólagos  $pK_a$  értékei és a MeOH/víz oldószerkelet relatív permittivitása között<sup>26</sup>



Még rosszabbul oldódó anyagok esetén további lehetőség az egyetlen pontból való extrapoláció (*single point extrapolation*), általános összefüggés segítségével. Erre a célra *Fini és mtsai*<sup>27</sup> a 80% DMSO-t találták alkalmasnak. Karbonsav-típusú vegyületekre meghatározták az általános érvényű összefüggést:  $pK_a = -0,80 + 0,67 p_s K_a$  ( $n=33$ ,  $r=0,992$ ,  $s=0,08$ ), ennek segítségével egyetlen titrálásból a vizes  $pK_a$  kiszámítható. Sajnos bázisokra jelenleg nem ismert hasonló általános érvényű kalibrációs egyenlet.



5. Ábra. A  $pK_a$  meghatározás módszerének kiválasztása

A  $pK_a$  meghatározáshoz választandó módszert mindig az adott minta tulajdonságai kell, hogy megszabják. Egy - a kutatócsoportunkban használt - lehetséges döntési sémát mutat be az 5. ábra.

### Lipofilitás

A lipofilitás a legrégebben használt fizikai-kémiai paraméter a gyógyszerkutatásban. Sokáig a jellemzésre szolgáló  $\log P$  (megoszlási hányados logaritmus) adat volt az egyetlen molekuláris jellemző a QSAR vizsgálatokban. A gyógyszerkémikusok – talán túlzó mértékben is – kiemelt jelentőséget tulajdonítottak e mérőszámnak. Mára, amint ezt ez a közlemény is bemutatni igyekszik, elmozdulás történt az u.n. komplex fizikai-kémiai jellemzés irányába, de az egyértelműen kijelenthető, hogy ebben a folyamatban a  $\log P$  meghatározása ma is nélkülözhetetlen.

Mi az oka, ennek a kivételes szerepnek? Röviden úgy adható meg a válasz, hogy a lipofilitás az a molekuláris tulajdonság, mely leginkább megszabja egy molekula sorsát a szervezetben, mind a farmakokinetikai mind a farmakodinámiai (a receptorral való kölcsönhatás) fázisban. Ez az adat, információtartalmát tekintve sokkal több, mint egy pusztán szám, mivel kialakításában ugyanazok a kölcsönhatások játszanak szerepet, mint amelyek létrejönnek a molekula és a biológiai környezete között.

Kétféle megoszlási hányadost különböztetünk meg, a nernsti definíció szerinti u.n. *valódi* megoszlási hányadost ( $\log P$ ), amely azonos molekuláris állapotban lévő részecskére, azaz a nemionizált, semleges formára vonatkozik, míg a *látszólagos* megoszlási hányados, vagy *disztribúciós koefficiens* ( $\log P_{app}$ ;  $\log D_{pH}$ ), amely az adott pH-jú vizes fázisban aktuálisan jelenlévő valamennyi részecskét

figyelembe veszi. A kísérletileg meghatározott látszólagos megoszlási hányadosból a valódi megoszlási hányados, a  $pK_a$  érték ismeretében kiszámítható<sup>8</sup>. Gyógyszerkémiai szempontból, azaz a várható transzport tulajdonságok megítélése szempontjából, mindig a valódi  $\log P$  a lényeges, mivel – a pH-megoszlás hipotézis szerint – passzív diffúzióval a lipofil membránokon csak a nemionizált, lipofil forma tud áthaladni.

A megoszlási hányadost korábban szinte kizárólagosan *oktanol/víz* rendszerben határozták meg, *C. Hansch* úttörő munkássága nyomán<sup>28</sup>. Később kiderült, a membránok sokfélesége miatt egyetlen oldószerrendszer nem lehet alkalmas a biológiai megoszlás modellezésére, ezért javaslat történt egyéb oldószerrendszerek, pl. a „kritikus kvartett” (*oktanol/víz*, *kloroform/víz*, *alkán/víz* és *PGDP/víz*) használatára. Ma egyre nagyobb szerep jut a nemizotróp rendszereknek, így a *liposzóma/víz* megoszlásnak is.

A  $\log P$  meghatározás elméleti és gyakorlati vonatkozásairól könyvek<sup>19,36</sup> és összefoglaló munkák sorozata<sup>4,8,15</sup> jelent meg, külön kiemeljük azokat, amelyek a GLP szerinti kísérleti protokollt tárgyalják<sup>29-31</sup>. A 3. táblázat mutatja be a legfontosabb kísérleti módszereket, jelezve a mérési tartományt, anyagigényt és kapacitást.

A direkt eljárások közül a rázótolcséres módszert tekintjük a referencia eljárásnak, de ismert korlátai miatt (nagy időigény, a termosztálás nehezen megoldható, lipofil molekulák nem mérhetők, stb.), ma már a pH-metriás eljárást nevezik az irodalomban a „gold standard” módszernek<sup>15,19</sup>. A módszer elve, hogy azonos körülmények között két potenciometriás titrálást végzünk. Az elsőt vizes közegben, a másodikat pedig a megosztó szerves fázis (pl. *oktanol*) jelenlétében. Az anyag megoszlása esetén a két görbe nem esik egybe, a különbségből a megoszlási hányados számítható. Ez az eljárás megbízható, pontos, de nem nagy kapacitású.

A hagyományos rázótolcséres eljárás HT módszerrel alakításával többen próbálkoztak és kifejlesztettek egy célkészüléket is, melynél 96 mérőhelyes mikrotálcán történik a fázisok érintkeztetése a megoszlási egyensúly eléréséig, majd robotizált mintavételt követően, diódasoros UV detektorral ill. kemilumineszcenciás nitrogén detektorral mérik a koncentrációt. A módszer pontosságáról és megbízhatóságáról még nincs elegendő információ<sup>32,36</sup>.

Az indirekt vagy u.n. *alternatív* mérés technikák (fordított fázisú kromatográfiás módszerek) során a lipofilitástól függő kromatográfiás ( $\log k'$  ill.  $R_M$ ) paramétert határozzuk meg, majd kalibrációs egyenes felhasználásával  $\log P$  értéket számolunk. *Valkó és mtsai*<sup>34</sup> által bevezetett *kromatográfiás hidrofóbicitási index* - CHI érték - önmaga is alkalmas jellemzője a vegyületek lipofilitásának és meghatározása a gradiens elúció és a rövid (5 cm) kolonna használata miatt gyors, így megfelel a felfedező gyógyszerkutatás igényeinek. További HT lehetőség a *mikroemulziós elektrokinetikus kromatográfia* (MEEKC) alkalmazása<sup>35</sup>. A vizsgált anyag lipofilitásától függően megoszlik a nátrium-dodecilsulfátból képzett micellák és a tompított oldat között, és ez befolyásolja a migrációs idejét. A CE kapacitási faktor szoros korrelációt mutat a  $\log P$  értékkel. Legújabb lehetőség a  $\log P$  automatizált meghatározására a folyadék-folyadék

## 3. Táblázat. A logP meghatározás módszerei

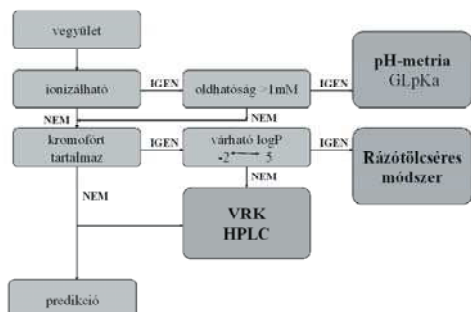
Módszer	Mérési tartomány (logP)	Anyagigény (mg)	Sebesség <sup>a</sup> (perc/vegyület)	Kapacitás <sup>b</sup> (vegyület/nap)	Készülék/gyártó
<b>Direkt</b>					
• rázótolcséses <sup>29,31</sup> (shake-flask)	-2 ↔ 3	10-50	180-360	2	Nincs (termosztálható rázógép + centrifuga + UV spektrofotométer)
• HT módon <sup>32</sup> (96 lyukú mikrolemez)	-2 ↔ 4	1-5	10	100	AlogPW (Analiza)
• potenciometriás <sup>8</sup>	-2 ↔ 6	5-10	60	20	GLpKa (Sirius)
<b>Indirekt</b>					
• RP-TLC <sup>33</sup>	0 ↔ 5	1-3	120	50	Nincs (Camag autolayer + UV lámpa)
• RP-HPLC					
• normál módon <sup>34</sup>	-1 ↔ 6	1	10	120	HPLC készülék (bármely gyártó)
• HT módon <sup>8</sup>	-1 ↔ 6	0,01	15	100	Profiler LDA (Sirius)
• CE (MEEKC) <sup>35</sup>	-1 ↔ 6	1	10	120	CE készülék (bármely gyártó)

<sup>a</sup> becsült idő/minta a hivatkozott irodalom szerint.

<sup>b</sup> becsült mérhető mintaszám/nap, 24 órás, felügyelet nélküli folyamatos működést véve alapul

megoszláson alapuló kromatográfiás módszer, ahol a kolonna oktanollal borított és a poláris mozgófázissal eluálódó mintát diódasoros UV detektorral érzékelik (*ProfilerLDA*)<sup>8</sup>.

Az alternatív eljárások alkalmazásának a nagy teljesítőképesség mellett további okai is lehetnek. Saját gyakorlatunk alapján az *RP-TLC módszer* előnyeit kívánjuk kiemelni. A vékonyréteg-kromatográfia – validált módon – alkalmas lipofil, UV inaktív és ionizációs csoportot nem tartalmazó, esetleg szennyezett minták esetén is a megbízható logP meghatározásra<sup>33</sup>. Lényeges azonban, hogy a kromatográfiás rendszer optimalizált legyen, a kalibrációhoz használt vegyületek szerkezete és tulajdonságai közel álljanak a vizsgált vegyületekéhez. A kísérleti körülmények gondos betartásával elérhető a logP érték ± 0,05 pontosságú meghatározása.



6. Ábra. A logP meghatározás módszereinek kiválasztása

A fentiekből nyilvánvaló, hogy nincs egyetlen kizárólagos módszer a logP meghatározására. A bemutatott eljárások mindegyikének megvannak az előnyei és alkalmazásuk korlátai. Ezért a legalkalmasabb módszer kiválasztása kellő mérlegelést igényel, és mindig a vizsgált vegyület

tulajdonságaiból kell, hogy kiinduljon. Ehhez kíván segítséget nyújtani a 6. ábra.

### Permeabilitás

A fizikai-kémiai jellemzés legfiatalabb és egyre fontosabbá váló paramétere a permeabilitás. A molekula membránon keresztül való áthatolóképességét fejezi ki. Növekvő jelentőségét az magyarázza, hogy jelenleg a legjobb prediktora a gyomor-bél traktusból való felszívódásnak, ezáltal az orális biohasznosíthatóságnak. Ha tekintetbe vesszük, hogy az összes gyógyszer 84%-a orális alkalmazású, érthető e paraméter minél korábbi fázisban való meghatározásának igénye és alkalmazása a legígéretesebb gyógyszerjelölt vegyületek kiválasztására.

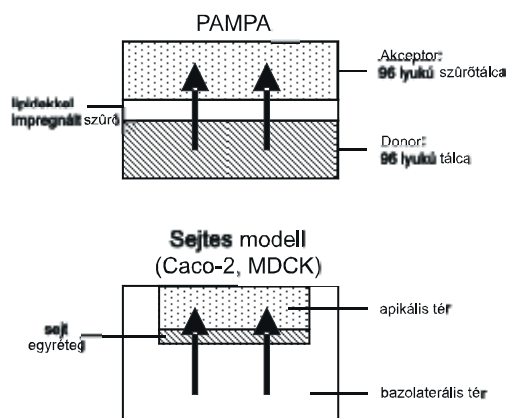
Az előző paraméterekhez viszonyítva, a permeabilitásnak szentelt átfogó irodalmi munkák száma sokkal szerényebb. Ki kell emelnünk *A. Avdeef* e területen végzett, mind elméleti, mind gyakorlati szempontból úttörő munkásságát<sup>4,15,19,37</sup>, és az idézett irodalmakat ajánljuk a téma iránt részletesebben érdeklődő olvasók számára. E helyett csak annyit jegyzünk meg, hogy a permeabilitás kinetikai paraméter, jelölésére (elég szerencsétlen módon)  $P_0$  (intrinsic, azaz a semleges részecskére vonatkozó) ill.  $P_e$  (effektív, azaz az ionizált részecskére vonatkozó) használatos, mértékegysége cm/sec.

A permeabilitás mérésére az *in vivo* vizsgálat lenne a legjobb, de erre a korai fázisban nincs lehetőség. Így *in vitro* módszereket fejlesztettek ki, közülük több HT módon is megvalósítható.

Kétféle *in vitro* mérési eljárást ismerünk. A PAMPA (*parallel artificial membrane permeability assay*) technika mesterséges membránokat (foszfolipideket) használ a permeáció vizsgálatára, míg a másik sejtes modelleket

alkalmaz (Caco-2, MDCK). A PAMPA módszerénél egy „szendvics” kamra alsó (donor) és felső (akceptor) fázisát 96 lyukú mikrotiter tálcák képezik, a kettőt pedig 125 µm vastagságú mesterséges membrán választja el (7. ábra). Az alkalmazott membránok típusa különböző lehet, például DOPC (dioleilfoszfátidilkolin) vagy PE (foszfátidiletanolamin) stb. dodekános oldata, melyet mikrofilter lemezen rögzítenek. A donor fázisba jutott anyagot vagy UV *plate-reader* vagy LC/MS módszerrel mérik. Az így nyert permeabilitási adat csak a passzív diffúzió alapuló transzportra ad információt.

A sejtes modellek bonyolultabbak, drágábbak, hosszabb időt vesznek igénybe, de az általuk szolgáltatott információ is gazdagabb. A *Caco-2* modellt, humán colon adenocarcinoma sejteket tartalmaz, melyben számos transzporter is expresszálódik, így Pgp (P-glikoprotein) és PEPT1 (dipeptid transzporter), tehát a rajta mért permeabilitási adat, a passzív diffúzió mellett, már aktív transzport mechanizmusokat is figyelembe vesz. A másik gyakran használt sejtes egyréteg modell az *MDCK* (*Madin-Darney canine kidney*) *sejtvonal*, melyben ugyan kevesebb transzporter van, így inkább a passzív diffúziót modellezi, azonban morfológiai és funkcionális szempontból mégis nagyobb a biológiai relevanciája, mint a mesterséges membránoknak. A sejtes modelleknek is kidolgozták már a nagykapacitású mérési lehetőségét (7. ábra).



7. Ábra. A permeabilitás in vitro módszereinek sematikus vázlata

## Összegzés

A gyógyszerkutatás új igényeinek megfelelően az elmúlt évtizedben a fiziko-kémiai jellemzés módszereiben jelentős fejlődés történt. Az irány kétség kívül a minél nagyobb teljesítmény, rövid idő alatt igen nagyszámú vegyület mérésének biztosítása (HT technikák), kielégítő pontosságú adatok szolgáltatása volt. Elmozdulás történt ugyanakkor az egy-egy kiemelt, korábban kizárólagosan használt fiziko-kémiai paraméter meghatározása helyett a komplex jellemzés felé. Ezen információk holisztikus kezelésével jó eszköz kerül a gyógyszerkutatás korai stádiumában a döntéshozók kezébe. A megbízható oldhatósági, lipofilitási, ionizációs, permeabilitási adatok birtokában lehetővé válik a hatékonyan talált vegyületek közül a gyógyszerre fejleszthető korai kiválasztása. Ezzel az új szemlélettel, vagyis a hatás és a gyógyszer-szerű tulajdonságok párhuzamos fejlesztésével csökkenthető a

később kieső vegyületek száma, ezáltal a fejlesztés költsége, és növelhető a gyógyszerkutatás eredményessége, több új gyógyszermolekula sikeres bevezetésével.

## Hivatkozások

1. Wang, J.; Urban, L. *Drug Disc. World* **2004**, (Fall), 73–86.
2. Kerns, E.H.; Di, L. *Drug Disc. Today* **2003**, *8*, 316–323.
2. Kerns, E.H. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90*, 1838–1858.
4. Avdeef, A.; Testa, B. *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 1681–1689.
5. Kerns, E.H.; Di, L.; Petusky, S.; Kleintop, T.; Huryn, D.; McConnell, O.; Carter, G. *J. Chromatogr. B* **2003**, *791*, 381–388.
6. Kerns, E.H.; Di, L. *Drug Disc. Today Techn.* **2004**, *1*, 343–348.
7. Ansele, J.H.; Thakker, D.R. *J. Pharm. Sci.* **2004**, *93*, 239–255.
8. Comer, J.E.A. In *Drug Bioavailability. Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability*; van de Waterbeemd, H.; Lennernas, H.; Artursson, P. Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, **2004**; pp 21–45.
9. Pang, H.; Kenseth, J.; Coldiron, S. *Drug Disc. Today* **2004**, *9*, 1072–1080.
10. Kerns, E.H.; Di, L. *JALA* **2005**, *4*, 114–123.
11. Jia, Z. *Curr. Pharm. Anal.* **2005**, *1*, 41–56.
12. Keserü, Gy. *Acta Pharm. Hung.* **2004**, *74*, 5–10.
13. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Deliv.* **1997**, *23*, 3–25.
14. Bevan, C.; Lloyd, R. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1781–1787.
15. Avdeef, A. In *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research*; Testa, B.; van de Waterbeemd, H.; Folkers, G.; Guy, R. Eds.; Wiley-VHC: Zurich, **2001**; pp 305–326.
16. Hayward, M.; Hargiss, L.; Munson, J.; Mandiyan, S.; Wennogle, L. *48th Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Long Beach, CA., **2000**.
17. Yalkowsky, S. H.; Banerjee, S. *Aqueous Solubility. Methods of Estimation for Organic Compounds*; Marcel Dekker: New York, **1992**; pp 11–40.
18. May, W.; Wasik, S.; Freeman, D. *Anal. Chem.* **1978**, *50*, 175–179.
19. Avdeef, A. *Absorption and Drug Development. Solubility, Permeability and Charge State*; Wiley & Sons Inc.: New York, **2003**.
20. Stuart, M.; Box, K. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 983–990.
21. Box, K.; Völgyi, G.; Baka, E.; Stuart, M.; Takács-Novák, K.; Comer, J. E. A. *J. Pharm. Sci.* (közlésre benyújtva)
22. Box, K.; Comer, J. E. A.; Hoshing, P.; Tam, K.; Trowbridge, L.; Hill, A. In *High Throughput Screening: The Next Generation*; Dixon, G.; Major, J.; Rice, M. Eds.; Bios Sci. Pub.: Oxford, **2000**; pp 67–74.
23. Szakács, Z.; Béni, Sz.; Varga, Z.; Örfi, L.; Kéri, Gy.; Noszál, B. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 249–255.
24. Hegedüs, H.; Gergely, A.; Horváth, P.; Noszál, B. *J. Chem. Res.-M.* **1999**, 1331–1342.
25. Takács-Novák, K.; Box, K.; Avdeef, A. *Int. J. Pharm.* **1997**, *151*, 235–248.
26. Takács-Novák, K. *Acta Pharm. Hung.* **1999**, *69*, 123–127.
27. Fini, A.; De Maria, P.; Guarnieri, A.; Varoli, L. *J. Pharm. Sci.* **1987**, *76*, 48–52.
28. Leo, A.; Hansch, C.; Elkins, D. *Chem. Rev.* **1971**, *71*, 525–616.
29. Dearden, J. C.; Bresnen, G. M. *Quant. Struct.- Act. Relat.* **1988**, *7*, 133–144.
30. Hersey, A.; Hill, A.; Hyde, R.; Livingstone, D. *Quant. Struct.- Act. Relat.* **1989**, *8*, 288–296.
31. Takács-Novák, K. *Acta Pharm. Hung.* **1997**, *67*, 179–191.
32. Zaslavsky, B.; Chait, A. In *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research*; Testa, B.; van de Waterbeemd, H.; Folkers,

- G.; Guy, R. Eds.; Wiley-VHC: Zurich, **2001**; pp 305-326. Supplemental CD ROM
33. Takács-Novák, K.; Perjési, P.; Vámos, J. *J. Planar Chromatogr.* **2001**, *14*, 42-46.
34. Valkó, K.; Bevan, C.; Reynolds, D. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2022-2029.
35. Poole, S.; Durham, D.; Kibbey, C. *J. Chromatogr. B* **2000**, *745*, 117-126.
36. Sangster, J. *Octanol-water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry*; Wiley & Sons: New York, **1997**.
37. Avdeef, A. *In Drug Bioavailability. Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability*; van de Waterbeemd, H.; Lennernas, H.; Artursson, P. Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, **2004**; pp 46-71.

### Physico-chemical profiling in drug research

The new paradigm in drug research introduced in the early 90-ies has increased the rate of finding of biologically active molecules. The high throughput screening technologies have been proved to be effective in lead discovery. However the bottleneck of drug research has shifted from hit and lead discovery to lead optimization and even more to the selection of potentially drug-like molecules. This required the physico-chemical profiling in early stage of drug development. New, high capacity methods have been developed.

This review is focused on the experimental methods used to determine the four key physico-chemical properties: solubility, ionization, lipophilicity and permeability. The methods are summarized in tables (Table 1-4) and their scope and limits are highlighted. The paper devotes more attention to the methods with high accuracy and precision than to high capacity, HT techniques. Based on own experimental practice, methods are useful for the characterization of poorly soluble compounds are also presented.

Both kinetic and thermodynamic (equilibrium) solubility methods are surveyed. The new potentiometric methods, the “dissolution template titration” (DTT) and the “chasing equilibrium” approach are presented.

Remarkable development was achieved in the field of  $pK_a$  determination, some new and effective methods are discussed. Flow-chart figure (Figure 5) shows a possible way for the selection

of the most appropriate method.

The classical logP determination method is the shake-flask technique but the “gold standard” is the dual phase pH-metry using automated instrument (GLpKa). This method provides fast, reliable and precise logP value within the range from -2 to 6, for ionizable molecules. Alternative techniques (RP-TLC, RP-HPLC, CE) have advantages in high capacity and in the case of poorly soluble (lipophilic) molecules, or samples containing some impurities. Figure 6 helps to select the best method based on the chemical properties of the compound examined.

Two in vitro methods are discussed for the measurements of permeability, a physico-chemical property useful for the prediction of oral bioavailability. PAMPA (parallel artificial membrane permeability assay) applies phospholipids to study the permeation from a donor to an acceptor phase. A commercial instrument provides HT permeability measurements using 96-well microtiter plates and UV-plate reader. The cell monolayer models (Caco-2, MDCK) are more complicated and expensive however they are more “biological” systems.

The review concludes that the complex physico-chemical profiling in early stage of discovery is an essential tool to make good decisions in the selection of drugable compounds for further development.

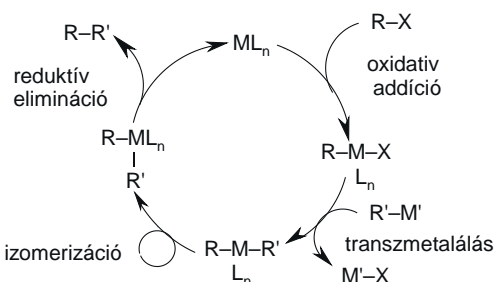
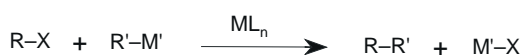
# Keresztkapcsolási reakciók gyógyszerkémiai alkalmazásai

TIMÁRI Géza

Chinoi Rt. 1045 Budapest, Tó u. 1-5

## Bevezetés

Új szén-szén kötés kialakítása minden időben a szintetikus szerves kémia meghatározó átalakításai közé tartozott. A klasszikus C-C kötést létrehozó módszerek (pl. Grignard-reakció, Wittig-reakció, cikloaddíció stb.) mellett az elmúlt 30 évben az átmenetifémek (Pd, Ni, Cu) által katalizált keresztkapcsolási (cross-coupling) reakciók<sup>1</sup> jelentősen kiterjesztették a szintetikus lehetőségeket. Ezek a kapcsolási reakciók a kezdeti egyetemi és akadémiai kutatóhelyekről kikerülve nagyon hamar ipari alkalmazást nyertek. Az 1. ábrán látható ma már névvel jelölt reakciók többségénél a katalizátorok és reagensek kereskedelmi forgalomban kaphatók. A keresztkapcsolási reakciók aktív katalizátorai alacsony oxidációs állapotú palládium-, és nikkelvegyületek, melyekhez legtöbbször valamilyen ligandum is kapcsolódik ezáltal stabilizálva a komplexet és lehetővé téve, hogy a reakció homogén fázisban játszódjon le. Számos esetben a katalitikusan aktív 0-oxidációs állapotú fémet *in situ* generálják a fém-sóból (pl. Pd(OAc)<sub>2</sub>, Ni(acac)<sub>2</sub>).



ML<sub>n</sub>: Pd(0), Ni(0)    X: I, Br, Cl, OTf, OSO<sub>2</sub>R, SOR, SR, -N<sub>2</sub><sup>+</sup>,

M'    B Suzuki-Miyaura kapcsolás    Sn Stille kapcsolás  
      Mg Kharasch kapcsolás        Zn Negishi kapcsolás  
      Cu Sonogashira kapcsolás    Si Hiyama kapcsolás

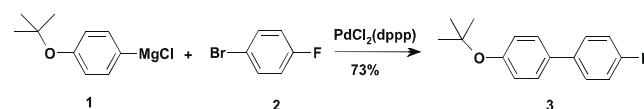
## 1.Ábra.

A folyamat nyitó lépése ebben az esetben az átmenetifém redukciója valamely jelenlévő redukálószer (foszfán, fémorganikus reagens, trietilamin) hatására. A katalitikus folyamat első lépése egy szerves (halogén) vegyület oxidatív addíciója a 0 oxidációs állapotú átmenetifémre, melynek során fém-szén kötés alakul ki és az átmenetifém oxidációs állapota +2-re nő. A kapcsolni kívánt másik szerves molekularészlet (R'M') transzmetalálással kerül az átmenetifémre ezzel kialakítva a *transz*-diaril-fém komplexet. Ezt követően a *transz*-szerkezetű komplex cisz-származékká izomerizálódik át. Ily módon térbelileg lehetővé válik, hogy a redukív eliminációs reakció végbemenjen, amely a végtermék képződéséhez, illetve az

aktív katalizátor regenerálásához vezet. A következőkben áttekintjük a keresztkapcsolási reakciók legelterjedtebb változatait, amely rendszerezés egyúttal bemutatja a módszer fejlődésének folyamatát is. A megadott példákon keresztül ismertetjük a módszer gyógyszerkémiai (gyógyszeripari) alkalmazásait.

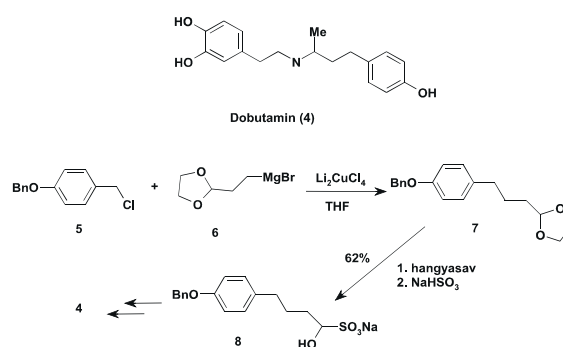
## A. Kharash-reakció

Történetileg a Kharash-reakció volt az első eljárás (1941), amely biarilok hatékony szintézisét tette lehetővé. Ebben a reakcióban arilmagnézium-halogenideket reagáltattak arilhalogenidekkel megfelelő katalizátor jelenlétében. A Grignard reakció már komoly nagyüzemi múlttal rendelkezett, így nem véletlen, hogy a Kharash-reakció volt az első kapcsolási reakció, amely ipari alkalmazást nyert. A Hokko Chemical Industry kutatói beszámoltak<sup>2</sup> (2. ábra) a gyógyszeripari alapanyagának számító 4-fluor-4'-*tert*-butoxi-bifenil (3) 200t/év volumenű szintéziséről.



## 2. Ábra.

A Grignard reagens nukleofil jellegéből adódóan azonban ez a kapcsolás az alkalmazható szubsztrátok viszonylag szűk körére korlátozódik, mivel aldehid, keton, észter és nitro funkcióscsoportokkal nem rendelkezhetnek a reakciópartnerek.

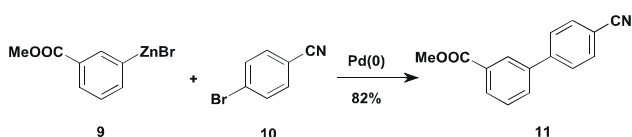


## 3. Ábra.

Így ezt a reakciót a polifunkciós gyógyszermolekulák szintézisében a kevés funkcióscsoportot tartalmazó intermedierek előállításánál alkalmazzák. Ennek egy példája a dobutamin szintéziséhez használt  $\gamma$ -arilbutanolok ipari szintézise (3. ábra). A reakció során<sup>3</sup> a 4-benzyloxi-benzilkloridot (5) rézkatalizátor jelenlétében a C3 egységet tartalmazó Grignard reagenssel kapcsolják és 62%-os hozammal izolálják az aldehidet biszulfid-addukt formában.

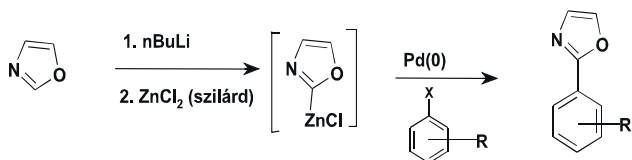
## B. Negishi-reakció

A keresztkapcsolási reakciók következő változata a Negishi kapcsolás, amely kiindulási fémorganikus vegyületei leggyakrabban arilcink-származékok. Az arilcink vegyületeket legtöbbször a megfelelő arilhalogenid litiálásával előállított lítiumorganikus vegyület cinkkloriddal történő kezelésével *in situ* állítják elő. A cinkorganikus vegyület csökkent nukleofilitása, összehasonlítva a Grignard reagenssel, lehetővé teszi aldehidek, ketonok és észter funkciós csoportokat tartalmazó reagensek használatát is. Ily módon lehetőség van arra, hogy reaktív csoportokat tartalmazó **11** biarilvegyület a megfelelő **9** cinkorganikus származék és 4-brómbenzonitril kapcsolási reakciójában Pd-katalizátor jelenlétében jó hozammal keletkezzen<sup>4</sup> (4. ábra).



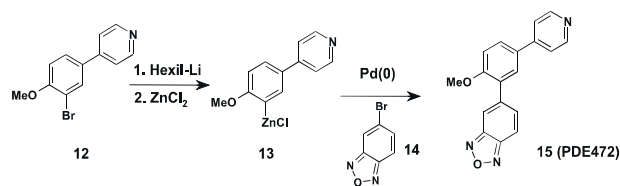
4. Ábra.

A Pfizer kutatói egy iparilag is alkalmazható eljárást közöltek<sup>5</sup> az oxazol és a tiazol cinkszármazékainak előállításáról és kapcsolási reakcióikról. Eljárásukban nem a korábban alkalmazott 2-haloazolokat litiálták, hanem az azolok közvetlen litiálásával nyert lítiumorganikus vegyületeket cinkkloriddal kezelve kapták a kapcsoláshoz szükséges reagenst. A kapcsolási reakciót Pd(0)-katalizátor jelenlétében THF-ban 60°C-on elvégezve számos oxazol-, és tiazolgyűrűt tartalmazó intermediert állítottak elő (5. ábra).



5. Ábra.

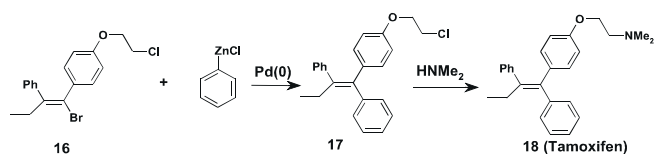
A foszfordiészteráz enzim gátló hatású PDE472 jelzésű Novartisnál fejlesztett vegyület szintézisé<sup>6</sup> során sikerrel alkalmazták a Negishi kapcsolást (6. ábra).



6. Ábra.

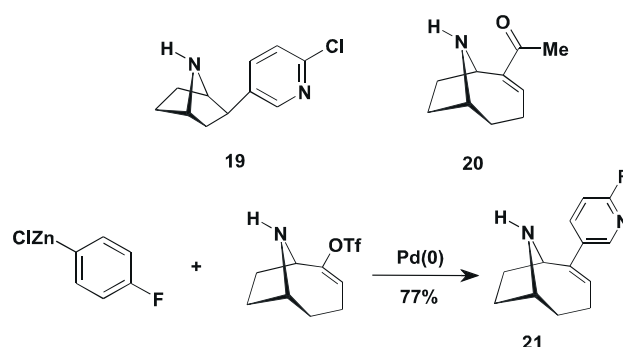
A **12** biarilvegyületet, amit korábban Kharash reakcióban állítottak elő, hexillítiummal litiálták, majd szilárd cinkkloriddal kezelve, az *in situ* képződött **13** cinkorganikus vegyületet 5-brómbenzoxadiazollal reagáltatva nyerték a végterméket. A szerzők felhívják a figyelmet arra, hogy ebben az esetben a termék jóval kevesebb palládiumszennyeződést tartalmazott, mint amikor ezt a reakciót a Suzuki-kapcsolás körülményei között hajtották végre. A tumorelles hatású Tamoxifen (**18**) kulcs intermedierjének a **17** tetrasubsztituált etilénnek az előállítása (7. ábra) a megfelelő **16** vinilbromid-származékból szintén a Negishi-reakcióval oldható meg.

A többi kapcsolási reakció nem volt regioszelektív és az inaktív *cis*-izomer is képződött<sup>7</sup>.



7. Ábra.

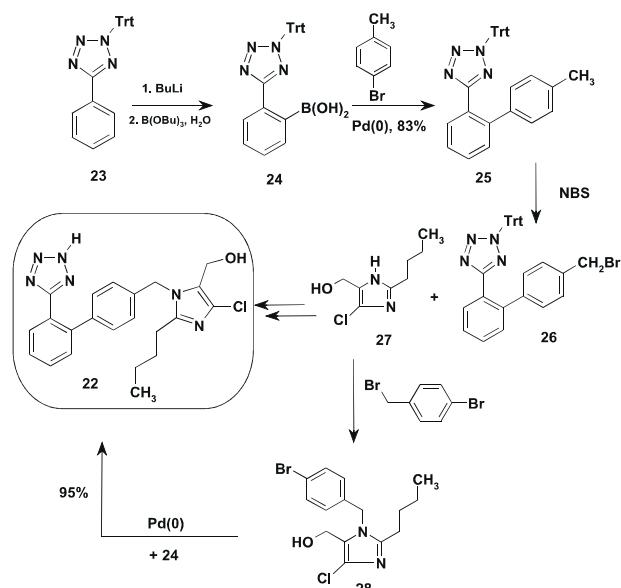
Angol kutatók az (-)epibatidin (**19**) és (+)anatoxin (**20**) alkaloidok szerkezeti elemeit tartalmazó **21** jelzésű vegyület racém szintézisé<sup>8</sup> alkalmazták a Negishi-kapcsolást. A korábbi reakcióktól eltérően itt példát találhatunk a megfelelő karbonil vegyületekből előállítható trifluormetánszulfonátok (triflátok) használatára is (8. ábra).



8. Ábra.

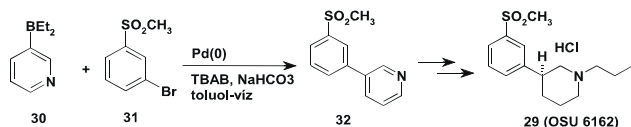
## C. Suzuki-kapcsolás

A Suzuki-reakció talán a keresztkapcsolási reakciók legsokoldalúbb fajtája. A felhasznált bórorganikus vegyületek szintén csökkent nukleofil karakterrel rendelkeznek, ezért számos funkciós csoport jelenlétét tolerálják, valamint oxigénnel és nedvességgel szemben stabilak. A módszer további értékes tulajdonsága, hogy a kiindulási boronsavak és származékaik nem toxikusak, a reakció vizes közegben is elvégezhető és a képződő bórsav nem zavarja a tisztítási eljárásokat. Szükséges megemlíteni, hogy a sikeres kapcsolás kivitelezéséhez elengedhetetlenül szükséges valamilyen bázis (pl.  $\text{NaHCO}_3$ ) jelenléte, mivel csak annak hatására lesz elegendően nukleofil karakterű a fémorganikus partner. A Suzuki-reakció első gyógyszeripari megvalósítását a magas vérnyomás kezelésére használt Lozartán-kálium (**22**) szintézisé<sup>9</sup> során a Merck kutatói végezték el (9. ábra). A korábbi soklépéses eljárás jelentősen rövidült a kapcsolási reakció alkalmazásával, amely során a tetrazolgyűrűt tartalmazó bifenil részt a kereskedelmi forgalomban kapható feniltetrazolból állították elő. A feniltetrazol tritilcsoporttal való védelem után az un. irányított *ortho*-metallálási reakcióban (angol rövidítés szerint, *directed ortho metallation*, DoM) litiálták majd tributilboráttal való kezelést követő vizes feldolgozás után nyerték a boronsavat (**24**). A kapcsolási reakció vizes közegben Pd-katalizátor jelenlétében 4-brómtoluollal kiváló termeléssel adta a **25** biaril terméket, melyből bromozással kapták a **26** benzilbromid származékokat. A trisubsztituált **27** imidazol reakciója a biarilvegyülettel bázis jelenlétében már a védett végterméket szolgáltatta<sup>9</sup>.



9. Ábra.

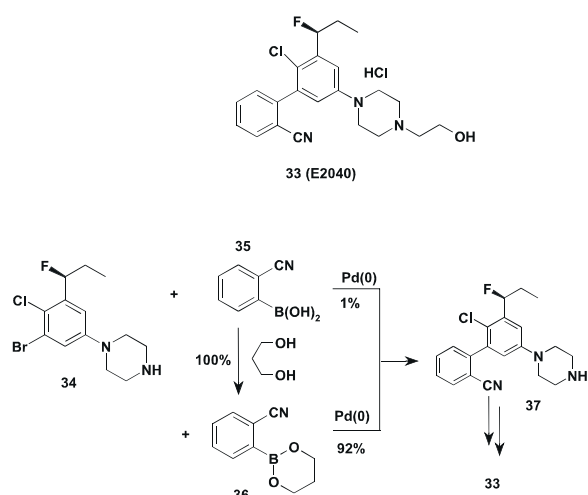
A kapcsolási reakció lehetőséget ad a funkciócsoportok felcserélésére és az optimalizációs folyamat kiterjesztésére. A végterméket abban az esetben is megkapták,<sup>10</sup> ha először a **27** imidazol származékot benzilezték 4-brómbenzilbromiddal, majd ezt követően hajtották végre a kapcsolási reakciót a **24** boronsavval. Az OSU 6162 (**29**) jelzésű központi idegrendszerre ható optikailag aktív 3-arilpiperidin-származék 200 kg-os szintézisének a Pharmacia kutatói sikeresen alkalmazták a Suzuki reakciót.<sup>11</sup> Ebben az eljárásban (10. ábra) a boronsav helyett a dietil-3-piridilboránt (**30**) kapcsolták Pd jelenlétében toluol-víz heterogén rendszerben. A kísérletek azt mutatták, hogy fázistranszfer-katalizátor (tetrabutilammonium bromid, TBAB) alkalmazása nagymértékben (96%) növelte a termelést.



10. Ábra.

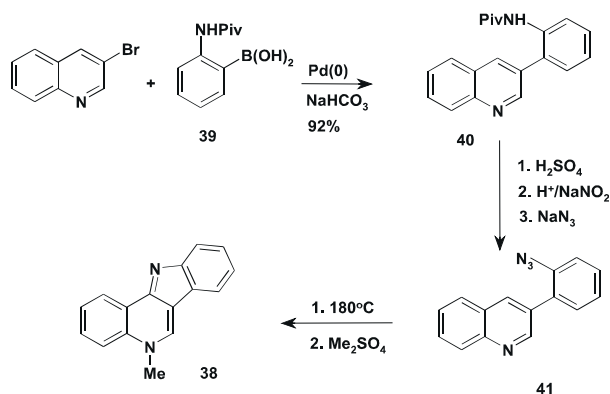
Japán kutatók a  $D_2/5HT_2$  receptor antagonistá E 2040 (**33**) jelzésű vegyület kémiai fejlesztése során tapasztalták, hogy a korábban közepes (50-60%) termelés a méretnövelés során<sup>12</sup> a kapcsolási reakcióban 1%-ra csökkent. A jelenséget az *o*-ciano-fenilboronsav (**35**) termikus instabilitásával és a cianocsoport részleges hidrolízisével magyarázták. A boronsavak stabilitása az észterképzéssel nagymértékben növelhető. A boronsavat 1,3-propándiollal vesztesség nélkül észterre alakították, melyből a kapcsolást a szubsztituált **34** fenilpiperazinnal már 92%-os hozammal tudták elvégezni (11. ábra).

A termék tisztaságát vizsgálva megállapították, hogy a palládium tartalom 2000 ppm volt, ami nagyon magas, mivel a végtermékben csupán 10 ppm mennyiség a megengedett. Egy általánosítható eljárást közölnek<sup>13</sup> a termék Pd tartalmának csökkentésére, amely a többi kapcsolási reakcióban is alkalmazható. Polimerhez kötött etiléndiamin



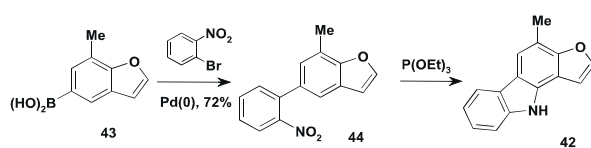
11. Ábra.

nagymértékben megköti a Pd(0)-t és a Pd(II) sókat is, így a minta korábbi 2000-3000 ppm palládium tartalmát 90%-kal tudták csökkenteni. A Suzuki-reakciót nagyon gyakran használják polikondenzált heteroaromás alkaloidok és más természetes anyagok szintézisére is. Nemrégiben számoltunk be<sup>14</sup> a *Criptolepis sanguinolentis* növény egyik minor alkaloidja a cryptosanginolentin (**38**) szintéziséről. A szintézis során 3-brómkínolint kapcsolunk a védett **39** anilino-boronsavval és a kapott **40** biarilvegyületet ismert reakciókkal a megfelelő **41** azidá alakítottuk (12. ábra). Az azid termikus bomlásakor képződő nitrén intermedier gyűrűzárása eredményezte a várt heterociklust, melynek regioselektív metilézésével kaptuk a végterméket.



12. Ábra.

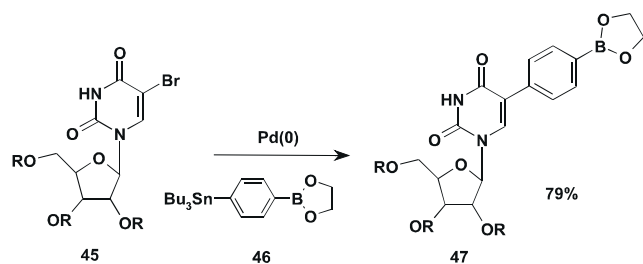
Hasonlóan az előbbiekhöz egy sikeres Suzuki-reakció volt a kulcs lépés a furostifolin (**42**) nevű furo-karbazol alkaloid előállításánál (13. ábra). A **43** benzofuril-boronsav 2-brómnitrobenzollal történő kapcsolása a **44** biaril vegyületet adta, melynek nitrocsoportjából trietilfoszfittal generáltuk a gyűrűzáródáshoz szükséges nitrén intermediert<sup>15</sup>.



13. Ábra.

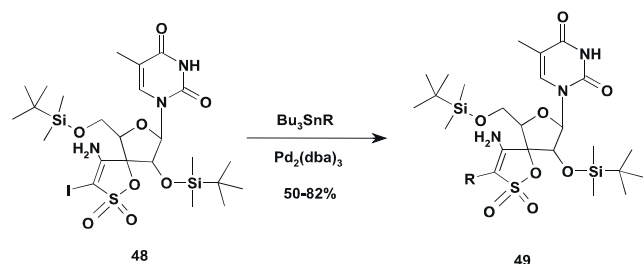
## D. Stille-kapcsolás

Széles körben alkalmazható kapcsolási reakció a fémorganikus reagensként szerves ónvegyületeket használó Stille-reakció. A korábban ismertetett fémorganikus reagensekkel összehasonlítva az ónorganikus reagensek előnye a nagyfokú stabilitás, valamint az hogy oxigénre és nedvességre nem érzékenyek. A Stille-kapcsolás hátránya viszont az ónvegyületek közismert toxikus hatása és a reakcióban keletkező trialkilón-halogenidek eltávolításának problémája a terméktől. Japán kutatók a neutron befogásos terápiában (NCT) használatos bóratomot tartalmazó nukleozidok szintézisének érdekében alkalmazták a Stille-reakciót.<sup>16</sup> A **45** 5-bromuridin származékot Pd(0) katalizátor jelenlétében a boronsav és trialkilónt funkciót is tartalmazó **46** reagenssel reagáltatták. Mivel mindkét funkciócsoport alkalmas a kapcsolási reakcióra, a szelektivitást úgy érték el, hogy bázist nem alkalmaztak, így ekkor csak a Stille-reakció ment végbe, míg a bázissal aktiválható Suzuki-kapcsolás nem (14. ábra).



14. Ábra.

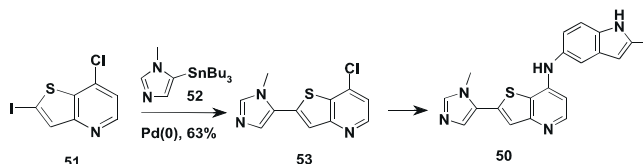
Az anti HIV-1 és HIV-2 hatású **48** jódtimin származék funkcionálizálása során spanyol kutatók azt találták,<sup>17</sup> hogy kizárólag Stille-reakciót alkalmazva sikerült a kívánt **49** származékokat előállítani, míg más (Heck, Sonogashira) körülmények között csak dehalogéneződés történt (15. ábra).



15. Ábra.

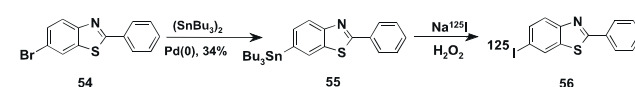
A heteroaromás ónvegyületek nagyfokú stabilitását kihasználva a Pfizer kutatói<sup>18</sup> a VEGFR kináz inhibitor hatással rendelkező **50** tienopiridin-származék szintézisének érdekében alkalmazták a Stille-reakciót. Több kapcsolási reakciót is kipróbáltak, végül az 5-tributylsztannil-1-metilimidazol (**52**) Pd(0) által katalizált Stille-kapcsolása **51** jód-tienopiridinnel tette lehetővé a **53** kulcsintermedier nagy mennyiségű előállítását (16. ábra).

A gyógyszerkutatás késői fázisában jelentős szerepet kap az aktív molekula és a receptor vagy enzim közötti kölcsönhatás vizsgálata. Ezeket a vizsgálatokat sok esetben sugárzóizotóppal jelzett vegyületekkel végzik el. A jód 125-ös izotópját gyakran használják ilyen vizsgálatokhoz.



16. Ábra.

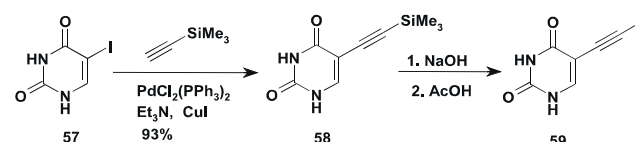
A jelzett molekula kialakítása a nemsugárzó jód- vagy brómvegyületből rendkívül egyszerűen megoldható a Stille reakció körülményei között. Amerikai kutatók a 17. ábrán látható **54** bróm-benzotiazol származék halogénatomját hexabutil-disztannánnal Pd(0) katalizátor jelenlétében tributilsztannil csoportra cserélték ki. Az **55** ónvegyületből radioaktív jódforrásként Na<sup>125</sup>I/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rendszert alkalmazva nyerték az izotóppal jelzett vegyületet. Az enyhe reakciókörülmények lehetővé teszik ennek a módszernek a széleskörű alkalmazhatóságát.



17. Ábra.

## E. Sonogashira-kapcsolás

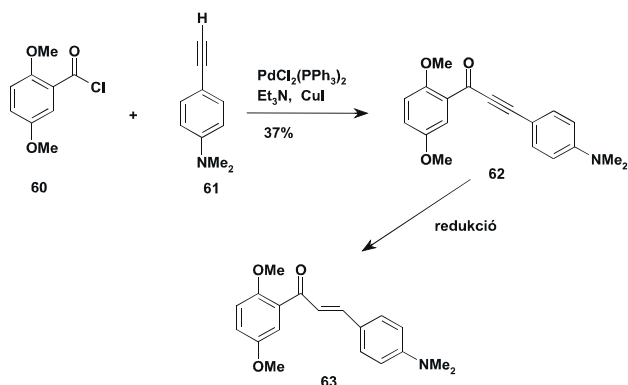
A rézorganikus reagensek alkalmazása a szerves szintézisekben hosszú múltra tekint vissza. Az első kapcsolási reakciót még preparált, sokszor robbanékony alkinilréz vegyületekkel hajtották végre (Stephens-Castro reakció). Sonogashira nevéhez fűződik az a felismerés, hogy *in situ* előállított alkinilréz reagensek palládium jelenlétében kapcsolhatók aril és alkenil-halogenidekkel. A folyamat rézre (legtöbbször CuI) nézve is katalitikussá tehető ekvivalens mennyiségű bázis (általában dietilamin) alkalmazásával. Az eniluracil (**59**) egy hatásos dihidropirimidin dehidrogenáz enzim gátló, amely az enzim gátlásán keresztül nagymértékben fokozza az ismert tumorellenes 5-fluoruracil (5-Fu) hatását. A Pfizer kutatói sikeresen alkalmazták<sup>20</sup> a Sonogashira-kapcsolást az eniluracil (**59**) nagy méretű (>60kg) előállítására. A folyamatban 5-jóduracilt (**57**) reagáltattak trimetilszilil-acetilénnel 1.2 mol% PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> és 10 mol% CuI valamint trietilamin jelenlétében és a **58** kapcsolt vegyületet 95%-os termeléssel izolálták. Csontszén tisztítást alkalmazva sikerült a fémtartalmat (Pd és Cu) 2 ppm alá csökkenteni. A védőcsoportot vizes NaOH oldattal történő kezeléssel távolították el majd a termék dinátriumsójának vizes oldatát szűrés után ecetsavval semlegesítve kapták 99.9%-os tisztasággal 1 ppm-nél kisebb fémtartalommal az eniluracilt (18. ábra).



18. Ábra.

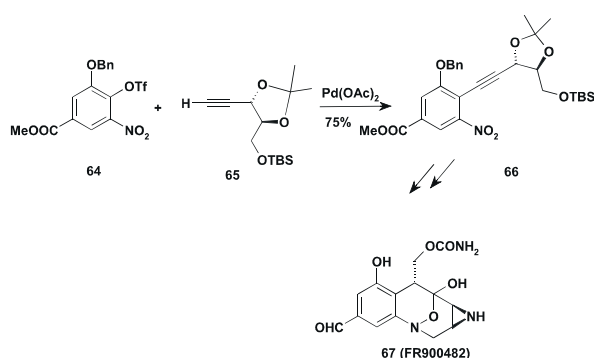
A Sonogashira-reakcióban savkloridokat alkalmazva ketonok képződnek. A következő példában<sup>21</sup> (19. ábra) az antimiotikus hatású 63 kalcinon szintézisének érdekében ezt a reakciót a 62 ketonrészlet kialakítására. A hármaskötés szelektív hidrogénezése után tisztán kapták a transz izomert.





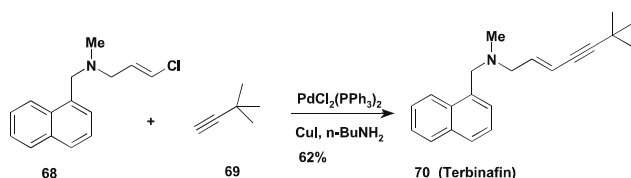
19. Ábra.

A tumorelles FR 900482 jelzésű antibiotikumnak (**67**) több totálszintézise is ismert. Egy nemrég megjelent eljárás<sup>22</sup> első lépése az optikailag aktív **65** acetilén-származékkal elvégzett Sonogashira-kapcsolás. A példában (20. ábra) jól látható, hogy a kapcsolási reakció körülményei és a reagensek lehetővé teszik reaktív csoportokat tartalmazó (észter, nitro) reaktánsok (**64**) alkalmazását is.

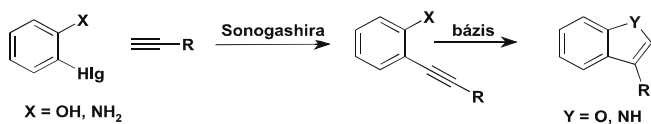


20. Ábra.

A Novartis gombaellenes terméke a Terbinafin (**70**) egyik nagyipari előállítási módja<sup>23</sup> a **68** klóralil származék Sonogashira-kapcsolása terc-butil-acetilénnel (**69**). Ez az eljárás (21. ábra) felváltotta a korábbi sok halogénezett reagenst (HBr, PBr<sub>5</sub>) alkalmazó szintéziseket. Az *ortho*-halogén-fenolok és anilinszármazékok Sonogashira-reakciójával kapott intermedierek intramolekuláris gyűrűzáródása benzofurán- és indolváz vegyületek képződéséhez vezet (22. ábra). Ezzel az egyszerű eljárással számos benzofurán és indol tartalmú természetes anyag és bioaktív molekula szintézisét oldották meg.

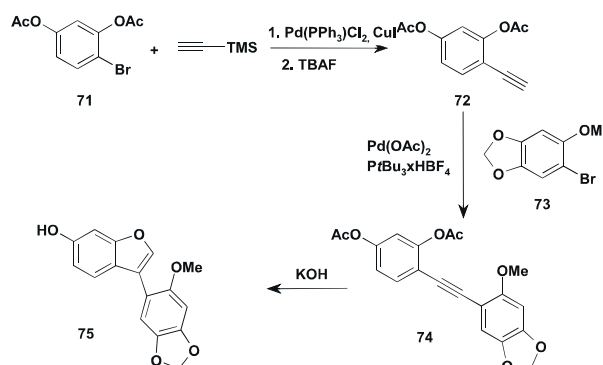


21. Ábra.



22. Ábra.

Nemrégiben leírtuk egy a csicseriborsóból izolált hidroxibenzofurán-származék (**75**) totálszintézisét<sup>24</sup>. **71** brómrezorcin származékot első lépésben trimetilszilil-acetilénnel palládium jelenlétében reagáltattuk, majd a védőcsoport eltávolításával nyertük a második Sonogashira-kapcsoláshoz szükséges **72** szubsztituált acetilént. Sesamolból két lépésben előállított **73** brómtartalmú vegyületet sikeresen kapcsoltuk a rezorcin származékkal és a kapott **74** intermediertől a védőcsoport eltávolítását követő gyűrűzárással kaptuk a cicerfurant (**75**) 62%-os hozammal (23. ábra). Az eljárást sikeresen kiterjesztettük egyéb természetes eredetű benzofurán származékok előállítására is<sup>24</sup>.



23. Ábra.

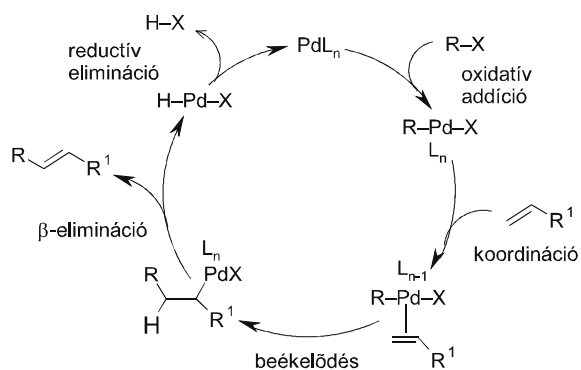
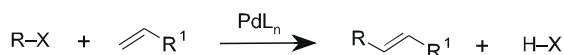
## F. Heck-reakció

Az arilhalogenidek és alkének Pd-katalizálta, diszubsztituált-alkéneket eredményező reakciója, amelyet felfedezőjéről Heck-reakciónak neveznek, a keresztkapcsolási reakciók mellett szintén nagy jelentőségre tett szert a C-C kötés kialakítása területén. A 24. ábrán látható katalitikus ciklus első lépése ebben az esetben is a aril-halogenid és a palládium között lejátszódó oxidatív addíció. A kialakult  $\sigma$ -kötésű palládiumorganikus vegyülethez koordinálódik az alkén, majd karbopalladálást (beékelődést) követően olyan alkil-palládium-komplexhez jutunk, melyből rotációt követően kialakul az eliminációhoz szükséges *syn-periplanáris* Pd-C-C-H elrendeződés, így lehetőség nyílik a  $\beta$ -elimináción keresztül megvalósuló stabilizációra, eredményezve az alkén terméket. Az elimináció után keletkező palládium(II)-komplex redukatív eliminációval a katalitikus ciklust kezdő aktív palládium(0) formává alakul. A melléktermékként keletkező sav (HX) megkötéséről a Heck-reakcióban a hozzáadott bázis gondoskodik.

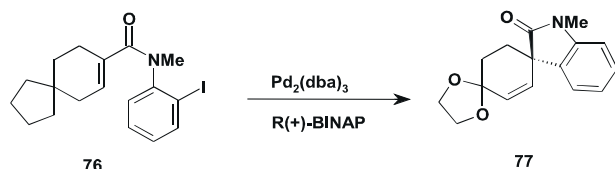
Olyan Heck-reakciókban amikor a  $\beta$ -elimináció során nem a kiindulási alkénkötést kapjuk vissza, a reakcióban általában új kiralitáscentrum alakul ki. Ilyen esetekben királis ligandumokat alkalmazva lehetőség van enantioszelektív átalakításokra. Ennek a megközelítésnek egy alkalmazását használták<sup>25</sup> amerikai kutatók a **77** spiro-oxiindol származék enantioszelektív előállítására (25. ábra). Az intramolekuláris Heck-reakcióban királis foszfin ligandum mellett 71%-os enantiomer felesleggel rendelkező spiro-terméket nyertek.

Az antivirális hatású C-nukleozidek nagyobb kémiai és metabolikus stabilitása az N-nukleozidekkel összehasonlítva eredményezte e vegyületsalád iránti

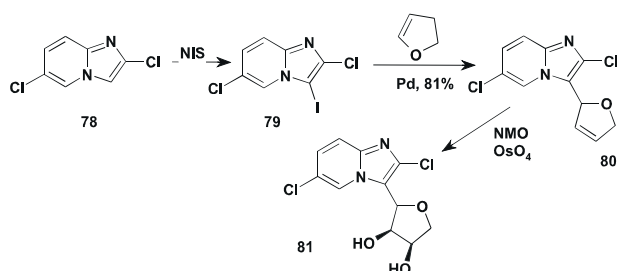
fokozott érdeklődést. Amerikai kutatók nemrégiben alkalmazták<sup>26</sup> a Heck-reakciót **81** C-nuklozidok



24. Ábra.



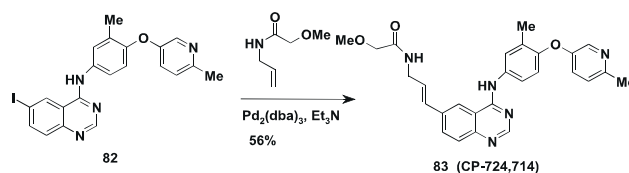
25. Ábra.



26. Ábra.

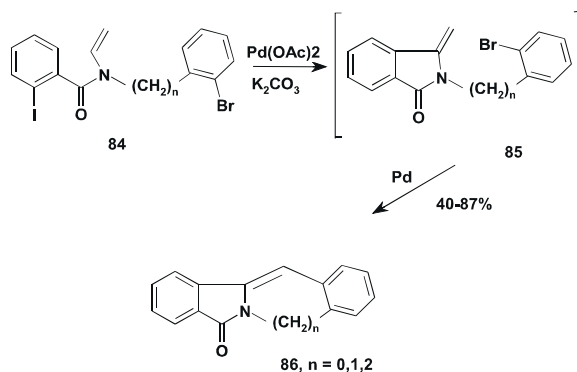
kulcsvegyületének tekinthető **80** dihidrofuran tartalmú vegyület szintézisére. A diklór-imidazopiridinből (**78**) előállított **79** 3-jód származékot  $\text{Pd}$  jelenlétében dihidrofuránnal reagáltatva a **80** racém terméket nyerték. A kettőskötés cisz-dihidroxilálását katalitikus mennyiségű ozmiumtetroxid jelenlétében *N*-metilmorfolin-*N*-oxiddal elvégezve kapták az epimer diolokat, melyeket királis folyadékromatográfiával választottak szét enantiomerjeikre (26. ábra). A Pfizer kutatói a tumorelles hatással rendelkező CP-724,714 (**83**) vegyület üzemi méretű (50 kg) szintézisének a különböző kapcsolási reakciókat ill. a Heck-reakciót összehasonlítva<sup>27</sup> az utóbbit találták a legbiztonságosabb, környezetkímélő eljárásnak. A **82** jódkinazolín származékot a végtermékben is megtalálható allilaminnal sikerült kapcsolni és megfelelő hozammal és tisztasággal izolálni a **83** célvegyületet (27. ábra).

A kapcsolási reakciók első lépésében a palládium-komplex kialakulását eredményező oxidatív addíció általában gyorsabb a szén-jód kötést tartalmazó, mint szén-bróm



27. Ábra.

kötésű vegyületeknél. Ezt a különbséget kihasználva több kapcsolható centrumot tartalmazó vegyületnél lehetőség van az egymást követő (tandem) reakciók elvégzésére. Különböző kondenzált indolokat<sup>28</sup> (**86**) két egymást követő Heck-reakcióval sikerült ily módon előállítani (28. ábra). A kiindulási **84** *N*-vinil-*ortho*-jód-benzamid-származékokból  $\text{Pd}$  katalizátor jelenlétében először az öttagú heterociklus alakul ki a C-I kötés részvételével. Az *exo*-ciklusos kettőskötést tartalmazó **85** intermedier következő Heck-reakciója a C-Br kötésű résszel eredményezte a végtermékeket jó termeléssel.

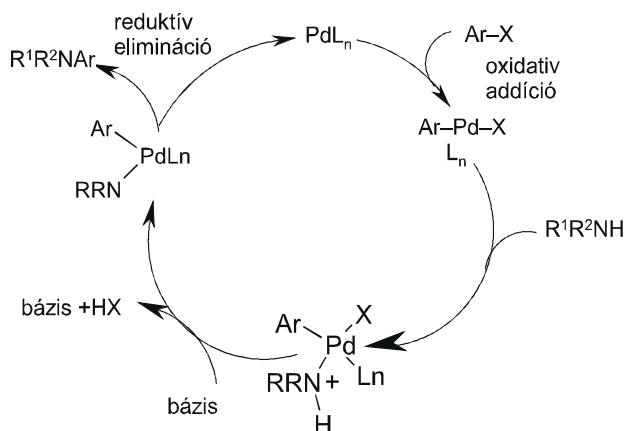
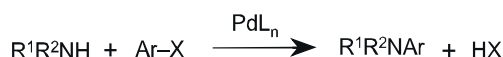


28. Ábra.

## E. Buchwald-Hartwig reakció

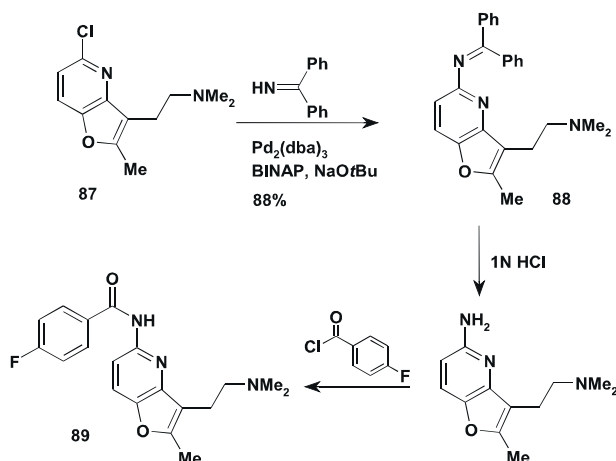
A C-C kötés kialakítására bemutatott reakciók mellett legújabban a szén-heteroatom kötés kialakítására alkalmazható keresztkapcsolási reakciók jelentősen kiterjesztették az aromás nukleofil szubsztitúciós reakciók alkalmazhatóságát. A Buchwald és Hartwig által kifejlesztett katalitikus folyamat kezdeti lépése ebben az esetben is az oxidatív addíció (29. ábra). Eltérően a korábbi kapcsolási reakcióktól, a transzmetalálási lépés helyett a primer vagy szekunde amin nukleofil szubsztitúciója játszódik le a palládiumon. A folyamatban keletkező komplex bázis hatására bekövetkező dehidrohalogéneződése után nyerjük a két kapcsoló ágenst tartalmazó  $\text{Pd}(\text{II})$ -komplexet, melyből reductív eliminációval kapjuk a terméket és a katalizátort eredeti aktív formában. A reakcióban aromás halogenidek mellett triflát és tozilát (!) is használható. A palládium mellett ligandumként általában BINAP-ot, vagy ferrocénvázon alapuló kétfogú ligandumokat (pl. *dppf*) alkalmaznak. A folyamatban ekvivalens erős bázisként nátrium-terc-butoxidot vagy céziumkarbonátot használnak.

A folyamat ammóniával nem játszódik le, de a benzofenon-imin, készségesen kapcsolható az alkalmazott körülmények között, majd a keletkező triariliminből könnyen eltávolítható a benzofenon rész és nyerjük az



29. Ábra.

anilinvegyületet. Az Eli Lilly kutatói alkalmazták<sup>29</sup> ezt a technikát az aminocsoport kialakítására a 5-HT<sub>1f</sub> receptor agonista hatású **89** furopiridin előállításánál (30. ábra).

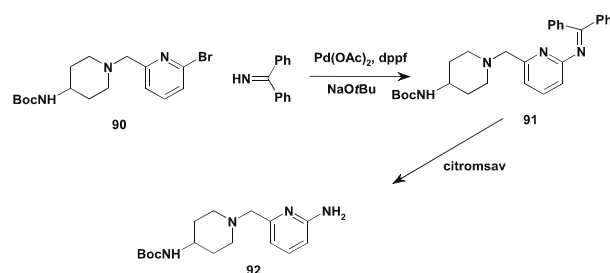


30. Ábra.

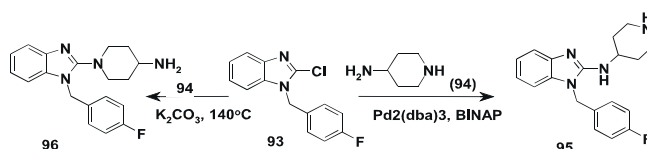
Hasonlóan sikeres<sup>30</sup> volt a Banyu és a Merck munkatársainak kg-os méretű szintézise a muszkarin receptor antagonistáknak vegyületek előállításánál, ahol a célmolekula egy aminopiridin származék (**92**) volt. A benzofenonimint toluolos oldatban palládiumacetát, ferrocéntartalmú foszfin és nátrium-terc-butilát jelenlétében kapcsolták a brómpiridinnel (**90**), majd a terméket egyszerű citromsavas vizes extrakcióval nyerték ki a reakcióelegyből (31. ábra).

Az antihisztamin hatású Norastemizol (**95**) szintézisének a Septacor kutatói összehasonlították<sup>31</sup> a termikus és a palládiummal katalizált aminálási folyamat szelektivitását (32. ábra). A szubsztituált 2-klórbenzimidazol (**93**) klóratomja elegendően reaktív ahhoz, hogy magas hőmérsékleten (145°C) lejátszódjon aminokkal az aromás nukleofil szubsztitúció. Nem meglepő módon a 4-aminopiperidin (**94**) nukleofilabb karakterű gyűrűnitrogénjével ment végbe a termikus aminálás, ami nem a célmolekula eredményezte. Ezzel szemben a Buchwald-Hartwig kapcsolás nagyon jó

szelektivitással adta a végterméket.

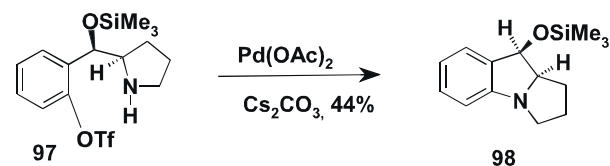


31. Ábra.



32. Ábra.

A kapcsolási reakció intramolekulárisan is lejátszódhat, így lehetőség van gyűrűzárással N-heterociklusok szintézisére. A mitomicin nevű antibiotikum gyűrűvázát alkotó pirroloindol váz (**98**) kialakításánál alkalmazták ezt a technikát<sup>32</sup>. A reakcióban palládiumacetát és céziumkarbonát jelenlétében alakították ki a C-N kötést a molekulában lévő pirrolidin részlet és triflátcsoport részvételével (33. ábra). Egy nemrégiben megjelent közlemény<sup>33</sup> hívja fel a figyelmet a módszer ipari alkalmazhatóságára.



33. Ábra.

## Összefoglalás.

A névvel jelölt keresztkapcsolási reakciók (Kharash, Negishi, Suzuki, Stille, Sonogashira, Heck és Buchwald-Hartwig) jelentősen kibővítették a szén-szén és szén-nitrogén kötés kialakítására alkalmas reakciók körét. Az összefoglaló az egyes reakciótípusok bemutatása mellett kitér ezek gyógyszerkémiai (gyógyszeripari) felhasználásainak bemutatására is.

## Hivatkozások

- (a) de Meijere, A.; Diederich, F. *Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions I-III*. Wiley-VCH: Weinheim, **2004**. (b) Faigl Ferenc, Kollár László, Kotschy András, Szepes László, *Szerves Fémvegyületek Kémiaja*, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, **2001**. (c) Miyaura, N. *Cross-Coupling Reaction, Topics in Current Chemistry*, vol. 219. Springer, **2002**.
- Banno, T.; Hayakawa, Y.; Umeno, M.; *J. Organomet. Chem.* **2002**, 653, 288-291.
- Monte, W.T.; Lindbeck, A.C. *Org. Proc. Res. Dev.* **2001**, 5, 267-269.
- Zhu, Z.; Wehmeyer, R.M.; Rieke, R.D. *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 1445-1450.
- Reeder, M.R.; Gleaves, H.E.; Hoover, S.A.; Imbordino, R.J.; Pangborn, J.J. *Org. Proc. Res. Dev.* **2003**, 7, 696-699.

6. Manley, P.W.; Acemoglu, M.; Marterer, W.; Pachinger, W. *Org. Proc. Res. Dev.* **2003**, *7*, 436-445.
7. Potter, G.A.; McCague, R. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 6184-6187.
8. Sutherland, A.; Gallagher, T.; Sharples, C.G.V.; Wonnacott, S. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2475-2478.
9. Smith, G.B.; Dezeny, G.C.; Hughes, D.L.; King, A.O.; Verhoeven, T.R. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 8151-8156.
10. Larsen, R.D.; King, A.O.; Chen, C.Y.; Corley, E.G.; Foster, B.S.; Roberts, F.E.; Lieberma, D.R. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6391-6394.
11. Lipton, M.F.; Mauragis, M.A.; Maloney, M.T.; Veley, M.F.; VanderBor, D.W.; Newby, J.J.; Appel, R.B.; Daus, E.D. *Org. Proc. Res. Dev.* **2003**, *7*, 385-392.
12. Urawa, Y.; Naka, H.; Miyazawa, M.; Souda, S.; Ogura, K. *J. Organomet. Chem.* **2002**, *653*, 269-278.
13. Urawa, Y.; Miyazawa, M.; Ozeki, N.; Ogura, K. *Org. Proc. Res. Dev.* **2003**, *7*, 191-195.
14. Timári, G.; Soós, T.; Hajós, Gy. *Synlett*, **1997**, 1067-1068.
15. Soós, T.; Timári, G.; Hajós, Gy. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 8607-8609.
16. Yamamoto, Y.; Seko, T.; Nemoto, H. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 4734-4736.
17. Lobaton, E.; Barrios, F.B.; Gako, F.; Perz, M.J.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; Camarasa, M.J.; Velazquez, S. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3934-3445.
18. Rgan, J.A.; Raggon, J.W.; Hill, P.D.; Jones, B.J.; McDermott, R.E.; Munchhof, M.J.; Marx, M.A.; Casavant, J.M.; Cooper, B.A.; Doty, J.L.; Lu, Y. *Org. Proc. Res. Dev.* **2003**, *7*, 676-683.
19. Zhuang, Z.P.; Kung, M.P.; Hou, C.; Skovronsky, D.M.; Gur, T.L.; Plossl, K.; Trojanowski, J.Q.; Lee, V.M.L.; Kung, H.F. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1905-1914.
20. Cooke, J.W.B.; Bright, R.; Coleman, M.J.; Jenkins, K.P. *Org. Proc. Res. Dev.* **2001**, *5*, 383-386.
21. Edwards, M.L.; Stemerick, D.M.; Sunkara, P.S. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1948-1954.
22. Suzuki, M.; Kambe, M.; Tokuyama, H.; Fukuyama, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4686-4687.
23. Stütz, A.; Petronyi, G. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 1539-1543.
24. Novák, Z.; Timári, G.; Kotschy, A. *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 7509-7513., Csékei, M.; Novák, Z.; Timári, G.; Kotschy, A. *ARKIVOC*, **2004**, *7*, 285-291.
25. Ashimori, A.; Overman, L.E. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4571-4572.
26. Gudmundsson, K.S.; Williams, J.D.; Drach, J.C.; Townsend, L.B. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1449-1455.
27. Ripin, D.H.B.; Bourassa, D.E.; Brandt, T.; Castaldi, M.J.; Frost, H.N.; Hawkins, J. *Org. Proc. Res. Dev.* **2005**, *9*, 440-450.
28. Garcia, A.; Rodriguez, D.; Castedo, L.; Saa, C.; Dominguez, D. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1903-1905.
29. Mathes, B.M.; Filla, S.A. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 725-728.
30. Mase, T.; Houpins, I.N.; Akao, A.; Dorziotis, I.; Emerson, K.; Hoang, T.; Iida, T.; Itoh, T. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6775-6786.
31. Hong, Y.; Senanayake, C.H.; Xiang, T.; Vandenbossche, C.P.; Tanoury, G.J.; Bakale, R.P.; Wald, S.A. *Tetrahedron Letters*, **1998**, *39*, 3121-3124.
32. Coleman, R.S.; Chen, W. *Org. Lett.*, **2001**, *3*, 1141-1144.
33. Schlummer, B.; Scholz, U. *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 1599-1626.

### Cross-coupling reactions in Medicinal Chemistry

The cross-coupling reaction of organometallic reagents with organic electrophiles in the presence of group 8-10 metal catalysts, notably nickel and palladium complexes, is the method of choice for a wide range of C-C and C-N bond forming process. These reactions, now accessible with a variety of organometallic reagents and electrophiles, provide a common class of synthetic transformations, commonly referred to as cross-coupling reactions. These methods have profoundly changed the protocols for the constructions of

natural products, building blocks for supramolecular chemistry and self-assembly, organic materials and polymers, and lead compounds in medicinal chemistry from simpler entities. In this paper we gave an overview of the most commonly used (Kharash, Negishi, Suzuki, Stille, Sonogashira, Heck and Buchwald-Hartwig) cross-coupling reactions. Carefully selected examples and references demonstrate the significant research effort in the last decades in medicinal chemistry laboratories.

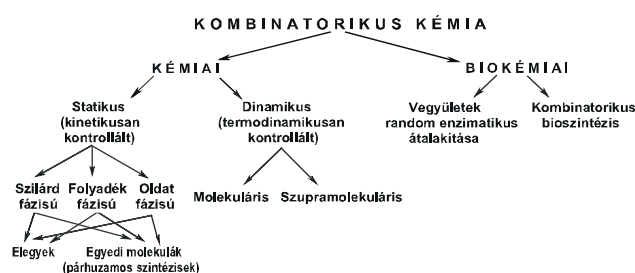
# Dinamikus kombinatorikus kémia

HERMECZ István, TÖRÖK Zoltán

Chinoin Rt. (H-1045 Budapest, Tó utca 1-5., Magyarország)

## 1. Bevezetés

A nagyátersztő képességű biokémiai vizsgálatok (HTS,  $\mu$ HTS) molekulaéhségének kielégítésére, a nyolcvanas évek elején megfogalmazott gondolat óta [1], a kombinatorikus kémia többféle változata alakult ki (1. ábra) [2-4].



1. Ábra. A kombinatorikus kémia változatainak szemléltetése

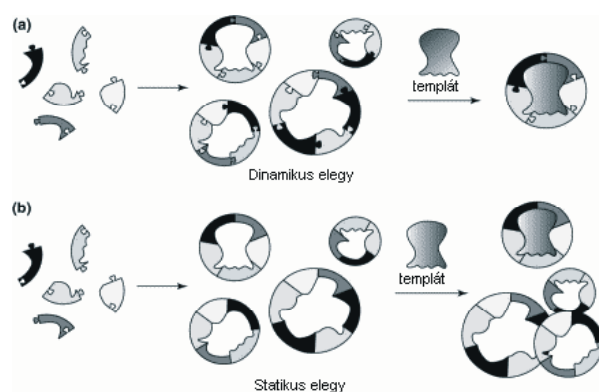
A hagyományos statikus megközelítés során a reaktánsok kombinatorikus variációjának számos változatát alkalmazzák [5]. Az oldatban vagy hordozón (folyadék vagy szilárd fázisban) megvalósított szintézisek során vegyületelemeket, vagy párhuzamos utakon egyedi molekulákat állítanak elő. Ezek közös jellemzője, hogy az előállított nagyszámú vegyület közül csak néhány bizonyul aktívnak a biokémiai vizsgálatok során. A lépésről-lépésre építkező, több-kevesebb kémiai lépésben előállított vegyületek szerkezetét és tisztaságát időigényes, részben nagyátersztő képességű kombinált technikák alkalmazásával határozzák meg.

A jelző molekula kiválasztásának/megtalálásának ideje és költségei nagymértékben csökkenthetők lennének, ha a biológiai célpontot közvetlenül bevonhatnánk a fenti eljárásokba, a legjobban kötődő ligandjának kiválasztására. Előnyös lenne, ha a kémiai könyvtár összetétele változna az aktív molekula kiválasztása során, azaz ha a biokémiai screen elősegítené a kedvező ligand képződését, és detektálását. További előny lenne, ha a kötődő aktív vegyületet közvetlenül elemezhetnénk.

A fenti célokat valósítja meg a kilencvenes évek második felében kialakuló új diszciplína, a dinamikus kombinatorikus kémia [6,7].

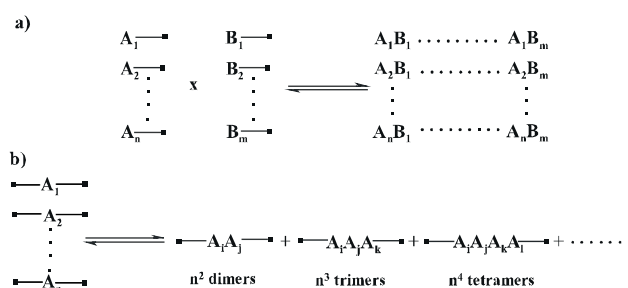
A dinamikus kombinatorikus kémia a biológiai vagy egyéb célmolekula tulajdonságait figyelembe véve, megnöveli a kialakított vegyülettárban a jó minőségű, erősebben kötődő molekulák számát a nem vagy gyenge válasz kiváltására képes molekulákhoz képest. A dinamikus kombinatorikus kémia, ellentétben a hagyományos statikus kombinatorikus kémiával, a vegyülettárakat önszerveződő eljárásokkal állítja elő. A dinamikus kombinatorikus kémiában alkalmazott eljárások lehetővé teszik a kialakult könyvtár tagjai között a folyamatos átalakulást, interkonverziót. Az építőelemek önmaguktól megvalósuló kapcsolódása

reverzibilis reakciókon keresztül virtuálisan az összes lehetséges kombinációt magában foglalja, és lehetővé teszi az alkalmazkodást egy jelenlévő templát molekulához (biológiai vagy egyéb célponthoz), így a legjobban, leghorribabban kötődő tagok dúsulását a vegyülettár tagjai közötti fennálló dinamikus csere következtében (2. ábra).



2. Ábra. A dinamikus kombinatorikus kémia (a) és a hagyományos, statikus kombinatorikus kémia (b) szemléltetése

A dinamikus kombinatorikus könyvtár, az alkotó elemektől függően, nyitott vagy zárt rendszert képezhet (3. ábra). A kialakuló könyvtárt a nyitott rendszerben elvben végtelen számú, míg a zárt rendszerben véges számú könyvtártag alkothatja [8].

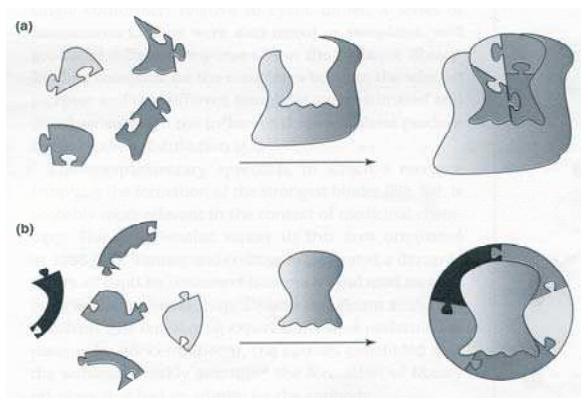


3. Ábra. A nyitott (b), elvben végtelen számú és a zárt (a), meghatározott számú elemet tartalmazó dinamikus kémiai könyvtár szemléltetése

Az alapvető különbség a dinamikus kombinatorikus kémia és a hagyományos statikus kombinatorikus kémia között, hogy a dinamikus kombinatorikus kémia reverzibilis reakciókat, kölcsönhatásokat, míg a hagyományos kombinatorikus kémia irreverzibilis reakciókat alkalmaz az építőelemek kapcsolódásánál. A dinamikus kémiai könyvtár tagjainak építőkövei között folyamatos cserélődés történik, azaz a dinamikus kombinatorikus kémiai könyvtár összetétele termodinamikailag, és nem kinetikailag kontrollált, mint a hagyományos statikus kombinatorikus kémiai könyvtár.

Ennek következtében a dinamikus kombinatorikus kémia könyvtár képes külső hatásokra reagálni. Pontosabban, a molekula felismerési folyamatok, amelyek szelektívek a dinamikus kombinatorikus kémia könyvtár egy tagjára, e tagot stabilizálják, azaz a dinamikus rendszer összetételét a stabilizált molekula irányába eltolják a kölcsönhatásokra nem, vagy csak a gyenge kölcsönhatások kialakítására képes molekulákkal szemben. Ez a legnagyobb előnye a dinamikus kombinatorikus kémiának a hagyományos kombinatorikus kémiával szemben.

A célmolekula lehet pl. egy receptor a legjobban kötődő szubsztrátok kiválasztására (e folyamat „szubsztrát öntő”, angolul „substrate casting” folyamat), vagy egy ligand a legelőnyösebb szintetikus receptor kiválasztására („receptor formázó”, angolul „receptor moulding” eljárás). Előbbi közelebb áll a gyógyszerkémiail alkalmazáshoz. Ekkor a dinamikus kombinatorikus könyvtár dinamikus egyensúlyban lévő szubsztrátok elegyéből, míg a másik esetben, egyensúlyban lévő mesterséges receptorok elegyéből áll (4. ábra).



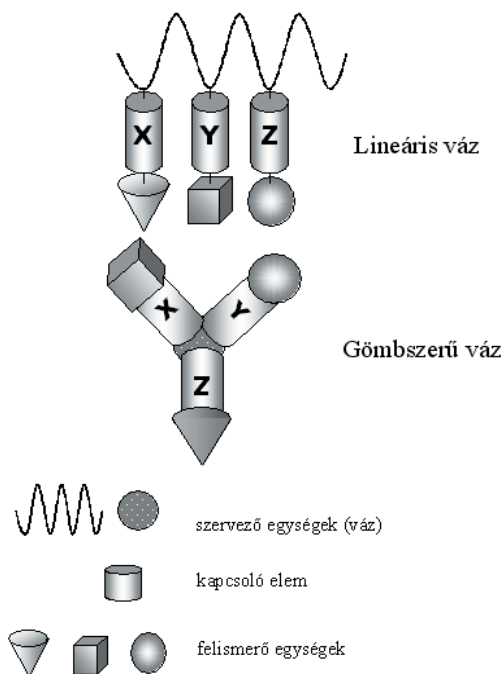
4. Ábra :A „szubsztrát öntő” (substrate casting) (a), és szintetikus „receptor formázó” (receptor moulding) (b) eljárások sematikus ábrázolása a megfelelő dinamikus kombinatorikus könyvtárból.

## 2. Dinamikus kémiai könyvtár kialakítása

Egy dinamikus könyvtár létrehozásánál három lépést különböztetünk meg: a reverzibilis kapcsolatok kialakítására képes építőelemek kiválasztása, a könyvtár képződéséhez szükséges körülmények megválasztása, amely körülmények között a képződött molekulák interkonverziója biztosított, és végül a kiválasztás feltételeinek biztosítása, például egy biomolekula jelenléte, amelynek receptorához valamely könyvtártag hatékonyan kötődik [6].

Az építőelemeknek néhány fontos tulajdonsággal kell rendelkeznie. Először, reverzibilis kapcsolódásra képes funkciós csoportokat kell tartalmazniuk. Másodsor, a potenciális célmolekulák geometriai és funkcionális terét a lehető legnagyobb mértékben le kell fedniük, különösen a cél-molekulához kapcsolódó felismerő csoportokat illetően. Hasonlóan a statikus kombinatorikus könyvtár tervezéséhez, a kötődésben szerepet játszó kölcsönható csoportok megválasztása elsősorban a korábbi tapasztalatokon, vagy a célmolekulák (kristály) szerkezetének gondos tanulmányozásán alapul. Harmadsor, a felismerő egységek optimális kötődéshez megfelelő geometriát kell

biztosítanunk, amelyet a szervezőegységek (scaffold) megválasztásával érhetünk el (5. ábra). A szervezőegységek lehetnek a felismerő csoportok részei, vagy előnyösebben ezektől el is különülhetnek. Esetenként kapcsoló egységeket és a szervezőegységeket külön kapcsoló egységek köthetik össze. Ezek dinamikus kölcsönhatásokat alakítanak ki egymással.



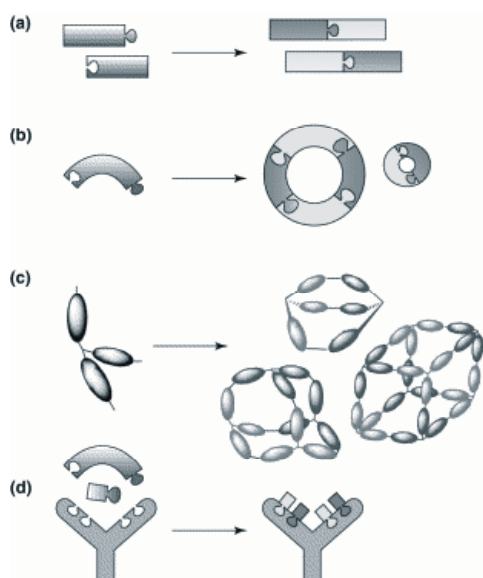
5. Ábra. A dinamikus kémiai könyvtár kialakításához alkalmazott különböző alkotó részek

A szervezőegységek biztosítják a dinamikus kombinatorikus könyvtár alkotóinál az alapeometriát és a reverzibilis kapcsolatok létrehozására alkalmas helyek számát (topicity). A külön szervezőegységek, kapcsolóelemek és kölcsönható felismerő egységek alkalmazása lehetővé teszi, hogy ugyanazon elemeket alkalmazzuk eltérő célmolekuláknál is. Továbbá ilyenkor a geometria és a topicitás könnyen variálható, és a hatékony molekula erőteljesebb dúsulása érhető el. Az alap egységhez kapcsolt jelző elemekkel (tag/reporter group) a könyvtár könnyebb ellenőrzése is elérhető.

A kívánt vegyület koncentrációjának növelése elegendő lehet arra, hogy a jó hozammal, elegendő mennyiségben izolálják a vegyületet a könyvtárból, ami további fontos előny. Kedvező esetben a vegyület könyvtár előállítását és screening-jét egy lépésben lehet elvégezni. Azonban néha szükség lehet további kísérletre, amelyben csak a kiválasztott vegyület alkotóelemeit reagáltatják sztöchiometrikus mennyiségben, nagyobb mennyiség előállítására céljából.

Az egyszerűbb építőelemek esetén a dinamikus és a hagyományos statikus kombinatorikus kémia hasonló szerkezetű vegyületeket generál. Például specifikus kölcsönhatások jelenléte nélkül az egy funkciós építőelemek dimer könyvtárai hasonló összetételűek, függetlenül attól, hogy vajon azok kinetikusan vagy termodinamikailag kontrollált folyamatok eredményei (6a. ábra). Ha az építő elemek vegyértékét, funkciós csoportjainak számát növeljük,

termodinamikai körülmények között, reverzibilis kötések kialakításával komplexebb szerkezetű vegyületek kialakulása érhető el (6b-d. ábrák). A komplexebb szerkezeteknél a kinetikus körülmények nagy valószínűséggel polimerek képződéséhez vezetnek. Ugyanakkor a kis koncentrációban elvégzett az entrópia vezérelt, azaz termo-dinamikailag kontrollált könyvtár elsősorban a kis-molekulasúlyú zárt szerkezetekből áll. Ezen összetettebb szerkezetek más úton sokkal nehezebben hozzáférhetőek.



**6. Ábra.** Különböző topicitású építőelemből dinamikus körülmények között képződő molekulák típusának sematikus ábrázolása: a) a monofunkciós építőelemek dimereket, b) a bifunkciós építőelemek makrociklusokat, c) a trifunkciós építőelemek kapszula-szerű molekulákat, d) a vegyes funkciós építőelemek komplex összetételű könyvtárakat szolgáltathatnak

A dinamikus kombinatorikus kémiának nemcsak a fentiekben említett előnyei, de hátrányai is vannak (7. ábra). Ezek közül talán a legfontosabb, hogy egy dinamikus kombinatorikus kémiai könyvtár minden tagjának elegendően oldhatónak kell lennie. Gyakran a kivált termék újra-oldódása olyan lassú, hogy a terméket alkotó építő elemek egyensúlya kinetikusan eltolódik a kivált termék irányába. Továbbá az építőelemek reverzibilis kapcsolata szigorú követelményeket támaszt a dinamikus kombinatorikus kémia könyvtár felépítésénél alkalmazható reakciókkal szemben. Ez nagymértékben csökkenti az alkalmazható reakciók számát. Végezetül a hagyományos kombinatorikus kémiában a reakciók ellenőrzésének lehetősége felülmúlja a dinamikus kombinatorikus kémiában alkalmazhatókét, ahol a kialakult kötések csak a cserélődés leállítása, befagyasztása után rögzíthetők. A hagyományos kombinatorikus kémiában minden létrejött kötés végleges és a későbbi reakciók általában már nem befolyásolják ezeket. Ebből következik, hogy a hagyományos kombinatorikus kémiában kifejlesztett eljárások többsége (pl. a „split-and-mix” eljárás) nem alkalmazható a dinamikus kombinatorikus kémiában.

Dinamikus kombinatorikus könyvtár kialakításakor a megfelelően megválasztott reverzibilis kapcsolódásra képes alkotóelemeket olyan reakciókörülmények között reagáltatják, amelyek biztosítják a dinamikus

egyensúly fennállását a képződött könyvtártagok között. A dinamikus kombinatorikus könyvtár kapcsolatba hozva egy célmolekulával, az egyensúly megbomlik a célmolekulával legkedvezőbb kölcsönhatást kialakító könyvtártag eltávolításával. Ezt követően az átmenetileg megbomlott egyensúly helyre áll az eltávolított könyvtártag újraképződése közben. Minden építőelem reverzibilis kapcsolat kialakítására képes a kombinatorikus elegy egy vagy több tagjával, amely lehetővé teszi egyszerűbb,

Hagyományos kombinatorikus kémia
- A felismerési folyamat nem befolyásolja a koncentrációt
- A kiválasztott vegyületeket újra kell szintetizálni.
- Komplex szerkezetek elérése nehéz
- Számos irreverzibilis reakció alkalmazható
- Az oldhatatlan könyvtártagok nem okoznak problémát
- Az egyes reakciók lépésenként ellenőrizhetők.
Dinamikus kombinatorikus kémia
- A felismerési folyamat dúsíthatja a hatékony vegyület(ek)et.
- A kiválasztott vegyületek a könyvtárból izolálhatók.
- A komplex szerkezetű vegyületek elérése könnyebb
- Az alkalmazható reverzibilis reakciók száma korlátozott.
- Az összes könyvtártagnak oldhatónak kell lennie.
- Reverzibilis reakciók ellenőrzésére kevesebb lehetőség van

**7. Ábra.** A kombinatorikus kémia előnyei és hátrányai (előnyöket normál betűkkel szedett, hátrányokat dőlt betűvel szedettek mondatok jelzik).

vagy összetettebb könyvtártagok kialakulását. Így valódi dinamikus kombinatorikus könyvtárak alakulnak ki, és minden könyvtártag az építőelemek kombinációja, és minden könyvtártag más lehetséges alkotó elemekkel is folyamatosan kölcsönös átalakulásban van.

### 3. A dinamikus kombinatorikus könyvtár típusai

A dinamikus kombinatorikus könyvtár kialakítására három változat alakult ki, amelyek azonos módon alakítják ki a könyvtár tagjainak dinamikus egyensúlyát, de eltérnek a screenelési/szelektálási fázisban.

#### 3.1. Adaptív (alkalmazkodó) dinamikus kombinatorikus könyvtár (adaptive dynamic combinatorial library)

A dinamikus kombinatorikus könyvtár kialakítását az alkotó elemekből a célmolekula jelenlétében végzik. A célmolekulával a legjobb kölcsönhatást mutató könyvtártag feldúsulását eredményezi a dinamikus reverzibilis reakció következtében a célmolekulát nem tartalmazó dinamikus kombinatorikus könyvtárhoz képest. A screen párhuzamosan történik a könyvtár kialakulásával, ugyanabban az elegyenben.

A legjobb kölcsönhatást mutató könyvtártag kölcsönhatás következtében kikerül a dinamikus kombinatorikus könyvtárból. A dinamikus kombinatorikus könyvtár a reverzibilis reakciók következtében minden fizikai (pH, hőmérséklet, elektromos potenciálváltozás, stb.), vagy kémiai (a rendszerhez új elemek hozzáadása, vagy kivonása) változásra reagál, a megváltozott feltételeknek megfelelő egyensúly kialakításával. Ha tehát a célmolekulának legelőnyösebb kölcsönhatást mutató könyvtártag a kölcsönhatás következtében kikerül a rendszerből, a dinamikus egyensúly következtében pótlódik, így mennyisége feldúsul. A dúsulás mértéke néhány tényezőtől függ, különösképpen a kölcsönhatás (kötődés) erősségétől, és a könyvtár kialakítás módjától.

### 3.2. Előegyensúlyi dinamikus kombinatorikus könyvtárak (*pre-equilibrated dynamic combinatorial libraries*)

A könyvtár kialakítása dinamikus körülmények között történik, majd a reverzibilis átalakulásokat befagyasztyják a körülmények megváltoztatásával, így az azonosítás/screenelés statikus körülmények között történik. Ebben az esetben nem történik dúsulás. Ennek ellenére ez a megközelítés hasznos lehet, amikor érzékeny, kényes biológiai célpontot alkalmaznak, amely nagy mennyiségben nem hozzáférhető. A screen fázist a klasszikus statikus kombinatorikus kémia módszerei szerint végzik. Az aktív komponens azonosítását különböző visszafejtési (dekonvolúció) technikával végzik.

Ugyanezt a technikát alkalmazzák, ha a biológiai célpont nem kompatibilis a dinamikus kombinatorikus könyvtár kialakítási körülményeivel.

### 3.3. Iteratív (ismétlődő) dinamikus kombinatorikus könyvtárak (*iterativ dynamic combinatorial libraries*)

A harmadik megközelítés az iteratív előegyensúlyi eljárás. A dinamikus kombinatorikus könyvtár kialakítása után az elegyet ugyanabban az edényben vagy elkülönítve hozzák kapcsolatba az immobilizált vagy csapdába ejtett molekulával. A megkötött könyvtártagokat elválasztják a nem kötött tagoktól. A kombinatorikus elegyet visszahelyezve a reakcióedénybe hagyják az egyensúlyt újra kialakulni. Ezután megint kölcsönhatásba hozzák a célmolekulával. A fenti műveletek néhányszori ismétlése után, az összegyűjtött aktív vegyületeket elemzik.

## 4. Molekuláris/szupramolekuláris kölcsönhatások dinamikus kombinatorikus könyvtárak kialakítására

Dinamikus kombinatorikus elegyeket reverzibilis fizikai vagy kémiai folyamatok alkalmazásával hozhatunk létre, amelyekben az egymásba átalakuló állapotok megfelelően kontrollálhatók, és a végtermékek azonosíthatók. Számos kovalens és nem-kovalens reverzibilis kapcsolat (molekuláris/szupramolekuláris) alkalmazható dinamikus könyvtár létrehozására (1-3. táblázatok).

### 4.1. Molekuláris alapú, reverzibilis kovalens kötéseket alkalmazó dinamikus kombinatorikus könyvtár

A dinamikus kombinatorikus könyvtárak kialakításában a stabil reverzibilis kötés kialakítására képes funkciócsoportok fontos szerepet töltenek be [9]. Néhányat a 1. táblázatban foglaltunk össze. Mindegyiknek jellegzetes előnyös és hátrányos tulajdonságai vannak.

1. Táblázat. Dinamikus könyvtár képzésére alkalmas reverzibilis, kovalens kötést eredményező reakciók

Karbonilcsoport reakciói	
Imin képződés	$\text{>C=O} + \text{H}_2\text{N-R} \rightleftharpoons \text{>C=N-R}$
Hemiketál képződés	$\text{>C=O} + \text{HO-R} \rightleftharpoons \text{>C(OH)(OR)}$
Átacilezés	$\text{>C(OR}^1\text{)C(OR}^2\text{)} + \text{Y-R}^2 \rightleftharpoons \text{>C(OR}^1\text{)C(OR}^2\text{)} + \text{X-R}^1$
Aldol képződés	$\text{>C(OR}^1\text{)H} + \text{>C(OR}^2\text{)H} \rightleftharpoons \text{>C(OR}^1\text{)CH(OH)C(OR}^2\text{)H}$
Michael reakció	$\text{>C=C(OR}^1\text{)C(OR}^2\text{)} + \text{H-X} \rightleftharpoons \text{X-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(OR}^1\text{)C(OR}^2\text{)}$
Diszulfid képződés	$\text{-SH} + \text{HS-} \rightleftharpoons \text{-S-S-}$
Diels-Alder reaction	$\text{>C=C} + \text{>C=C} \rightleftharpoons \text{Cyclohexene}$
Metatézis reakció	$\text{>C=C(R}^1\text{)C(R}^2\text{)} + \text{>C=C(R}^1\text{)C(R}^2\text{)} \rightleftharpoons \text{>C=C(R}^1\text{)C(R}^2\text{)} + \text{>C=C(R}^1\text{)C(R}^2\text{)}$
Bórsav észter képződés	$\text{R-B(OH)}_2 + \text{HO-C(R}^1\text{)(OH)-C(R}^2\text{)(OH)} \rightleftharpoons \text{R-B(O-C(R}^1\text{)(OH)-C(R}^2\text{)(OH))}_2$

Fontos szerepet töltenek be a karbonilcsoport addíciós-eliminációs reakciói, elsősorban az imin, kisebb mértékben a (hemi)acetál, aminál képzés és az aldol kondenzáció. Finom szabályozás érhető el a karbonilcsoport és a nukleofil elektromos tulajdonságainak változtatásán keresztül. Ugyan a primer aminok gyors reverzibilis reakcióban képeznek aldehidekkel imineket, de ebben az esetben vizes közegben az egyensúly erősen a kiindulási vegyületek felé van eltolódva ezért ezek kevésbé alkalmazhatók dinamikus kombinatorikus könyvtárak létrehozására. Hidroxilaminokkal és hidrazinokkal fordított a helyzet: a reakció kinetikája lassúbb, de a kialakult iminek (oximok és hidrazonok) kellő stabilitásúak.

Reverzibilis körülmények között átacilezési reakciók (észterek és alkoholok, illetve savamidok és aminok) átészterezési reakciók szintén alkalmasak dinamikus kombinatorikus könyvtárak létrehozására. További lehetőség az  $\alpha,\beta$ -telítetlen ketonok, nukleofilek Michael reakciója, és a periciklusos reakciók (Diels-Alder reakció) alkalmazása. Az alkének katalitikus metatézise, különösen



vizes oldatban, vonzó lehetőség. Nem-szénatom centrumon történő cserélődési reakciók szintén lehetőséget nyújtanak dinamikus kombinatorikus könyvtár kialakítására. Különösen a tiol – diszulfid interkonverzió, alkohol – borát, és bizonyos mértékig az alkohol – vanadát rendszerek.

#### 4.2. Szupramolekuláris alapú dinamikus kombinatorikus könyvtár

Átmeneti fémek koordinációja hasznos, és jól kontrollálható reverzibilis folyamat, amelyeket gyakran alkalmaznak dinamikus kombinatorikus könyvtárak létrehozására (2. táblázat). A létrejövő komplex stabilitása és geometriája módosítható a megválasztott fémion és ligandumok típusával. A kialakult komplexek versengő elemekkel gyorsan és könnyen megbonthatók. E megközelítés fő hátránya lehet a koordinációs centrum mérete, amelynek ligandumok megkötésére alkalmasnak kell lennie.

Elektrosztatikus kölcsönhatások, hidrogénhidak kialakulása is létrehozhat dinamikus rendszereket, melyeket összetételét szerencsés esetben kovalens kötések kialakításával rögzíteni lehet. Hátrány, hogy vizes közegben nagyon nehéz ilyen rendszereket kialakítani.

2. Táblázat. Dinamikus könyvtár képzésére alkalmas szupramolekuláris kölcsönhatások

Fém koordináció	$M^{n+}$	$nL$	$\rightleftharpoons$	$(ML_n)^{n+}$
Elektrosztatikus kölcsönhatás	$R-COO^-$	$H_3N^+-R^1$	$\rightleftharpoons$	$R-COO^{\dots}H_3N^+-R^1$
Hidrogénhíd kialakulása	$>C=O$	$H-N-C=O$	$\rightleftharpoons$	$>C=O \cdots H-N-C=O$
Donor-akceptor kölcsönhatás	D	A	$\rightleftharpoons$	(D,A)

#### 4.3. Reverzibilis intramolekuláris folyamatokon alapuló dinamikus kombinatorikus könyvtár

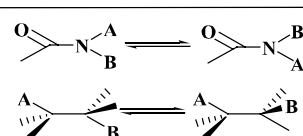
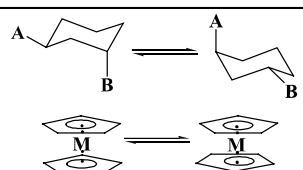
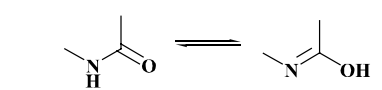
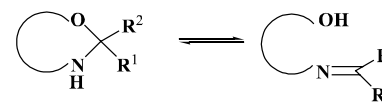
A molekulák konfigurációs és konformációs mobilitása, változása inherensen dinamikus folyamatok, amelyek elvben alkalmasak dinamikus kombinatorikus könyvtárak létrehozására (3. táblázat). Különösen azokban az esetekben, amelyeknél az egyes konfigurációs/konformációs változások önmagukban komplexként, vagy egy liganddal/receptorral kölcsönhatásban kellő stabilitásúak ahhoz, hogy tanulmányozhatók legyenek.

Ilyen folyamat lehet egy kettőskötés E-Z izomerizációja, gyűrű inverzió és kötés körüli rotáció. Különösen a fotokémiailag vagy termikusan mobil kettőskötés izomerizációja eredményezhet kellően stabil dinamikus kombinatorikus könyvtárat. A gyorsan változó folyamatok nehezen izolálható eredményei (pl. rotamerek) néha in situ oldatban tanulmányozhatóak.

Folyamatosan változó (fluxionális) rendszerek szerkezeti változásai [mint pl. a tautomeria és az intramolekuláris átrendeződések (ilyen a bullvalin folytonos Cope-átrendeződése)], „intrinsic” dinamikus karaktere potenciálisan hasznos dinamikus kombinatorikus könyvtárak előállítására. Ezeket ez ideig azonban nem alkalmazták, részben az általuk reprezentált korlátozott

virtuális könyvtár, másrészt a folyamatok limitált kontrollálhatósága és befagyaszthatósága következtében.

3. Táblázat. Dinamikus könyvtár képzésére alkalmas reverzibilis intramolekuláris folyamatok

Konfigurációs	$Z-E$ izomerizáció	$\text{>C=C<} \rightleftharpoons \text{>C=C<}$
Konformációs	Belső rotáció	
	Gyűrű inverzió	
Szerkezeti	Tautomeria	
	Gyűrű-lánc	
	Fluxionális	$X \cdots \cdots \rightleftharpoons \cdots X$

Ahhoz, hogy a fenti molekuláris/szupramolekuláris rendszerek előnyösen alkalmazhatók legyenek a dinamikus kombinatorikus kémiában, fontos, hogy a kialakult dinamikus kombinatorikus könyvtár összetétele rögzíthető legyen, azaz a reverzibilis dinamikus folyamatok befagyaszthatók legyenek. Például külső paraméterek (pH, hőmérséklet, oldószer elegy összetétel) változtatásával, vagy adott reagens (oxidáló/redukáló reagens) hozzáadásával. Ily módon könnyebb a rögzített könyvtár analizését elvégezni és a legelőnyösebb könyvtárat azonosítani.

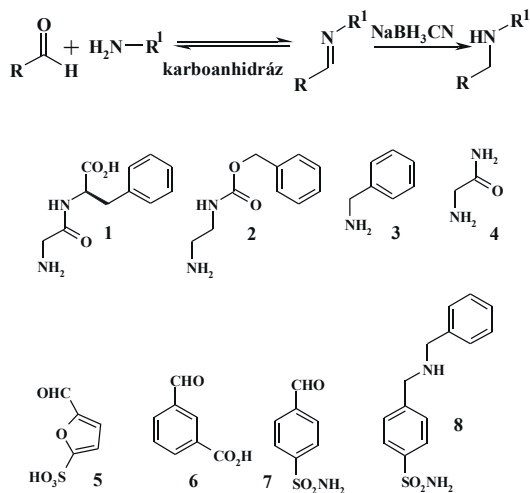
Egy dinamikus kombinatorikus könyvtár létrehozásánál egyidejűleg nem csak egy típusú kölcsönhatást alkalmazhatunk. Két vagy több reakció, kölcsönhatás alkalmazása nagymértékben megnövelheti a vegyülettár diverzitását. Az egyensúlyok eltérő irányokban működhetnek igen komplex sokdimenziós dinamikus kombinatorikus könyvtár kialakulását eredményezve, amely ezáltal sokkal hatékonyabban fedi le a farmako-kémiai teret.

Az alkalmazott kémiai/fizikai rendszereket előnyösen egymást kiegészítő módon választják meg, hogy ezek külön-külön kontrollálhatóak legyenek. Ilyen rendszer lehet például a fémkoordináció és imin csere folyamatának kombinációja.

A megnövelt diverzitás kevesebb építőelem alkalmazását teszi lehetővé, ezzel egy kisebb, arányosabb, jobban ellenőrizhető vegyülettár hozható létre.

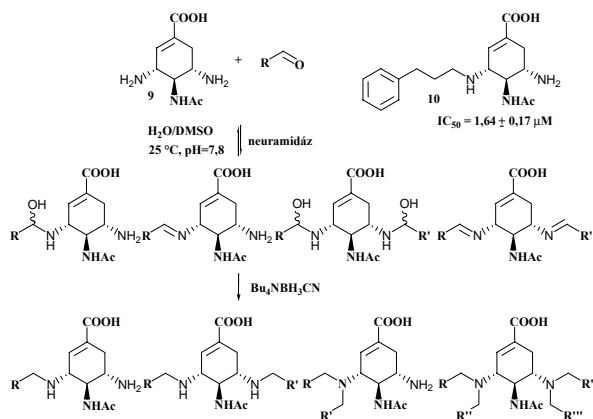
## 5. Alkalmazási példák

Az imin-képződés és -cseré (transziminálás) az egyik vonzó reakció dinamikus kombinatorikus könyvtár kialakítására, mert vizes közegben is megvalósítható, és gyors cserélődés mellett gyorsan vezet egyensúlyra.



8. Ábra. Vizelethajtó, karboanhidráz gátló vegyületeket tartalmazó kémiai könyvtár előállítása

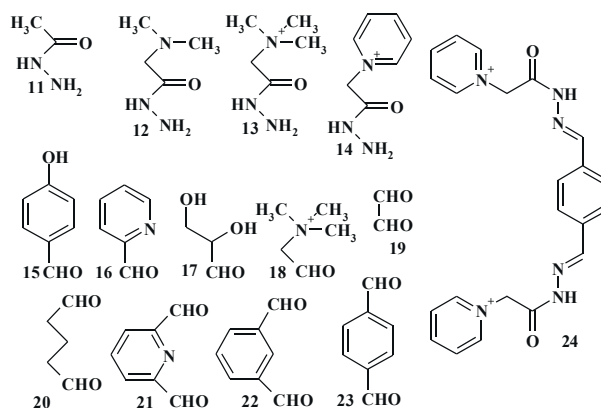
*Huc* és *Lehn* a 8. ábrán látható 1-4 aminokat és 5-7 aldehideket karboanhidráz enzim jelenlétében reagáltatták közel fiziológias körülmények között vízben (25 °C, pH = 6) [10]. A reagáló partnerek megválasztásánál ismert inhibitorok szerkezetét vették figyelembe. A megválasztott komponensek között volt olyan, amely az enzim Zn<sup>2+</sup> iont tartalmazó kötőhelyével kölcsönhatás kialakítására képes szulfonamidcsoportot tartalmazott, továbbá voltak olyanok, amelyek az enzim szomszédos hidrofób felületével léphettek kölcsönhatásba lipofil karakterük következtében. Az aminokat feleslegben alkalmazták, hogy az enzim felületén található aminocsoportok reakcióját visszaszorítsák. A cserélődési reakciókat a kialakult imincsoportok NaBH<sub>3</sub>CN-del végzett redukciójával szüntették be. Az egyensúlyi elegyek kialakítását enzim jelenléte nélkül és jelenlétében is elvégezték. Utóbbi esetben a legerősebben kötődő 8 szulfonsavamid mennyisége megduplázódott a többiek rovására.



9. Ábra. Influenza vírus ellenes vegyületek azonosítása

*Hochgürtel* és munkatársai aldehidek és a 9 diamin vizes reakcióelegyből neuramidáz és tetrabutilammonium-cianobórhidrid jelenlétében a hatékony (IC<sub>50</sub> = 1,64±0,17 μM) influenza ellenes hatású 10 neuramidáz gátló vegyületet azonosították (7. ábra) [11]. Enzim jelenléte nélkül egy komplex reakcióelegy képződött. Enzim jelenlétében végezve az inkubálást a 10 vegyület mennyisége igen jelentősen feldúsult.

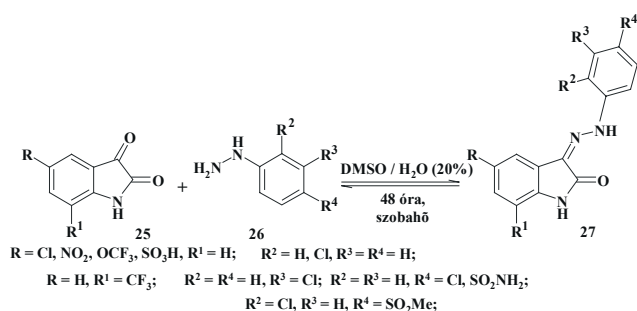
Az elektromos rájából (*Torpedo marmorata*) izolált acetilkolin-észteráz gátlását vizsgálták 11-14 savhidrazinból 15-18 aldehiddel és 19-23 dialdehiddel képzett egyensúlyi reakcióelegyben, amely mind a 66 lehetséges acilhidrazont tartalmazta [12]. Ez esetben a termékek nagyobb stabilitása lehetővé tette, hogy redukció nélkül azonosítsák a C=N kettőskötést tartalmazó termékeket. Az enzim két egymáshoz közeli kötőhelyet tartalmaz. Az egyik aktív hely egy mélyedés alján, a másik, amelyet „perifériás” kötőhelynek hívnak, a mélyedés peremén található. Az enzim hatékony gátlásához a két kötőhely egyidejű gátlása szükséges. Mindkét kötőhely szelektíven köt meg pozitív töltésű funkciócsoportot, mint amilyen például kvaterner ammóniumcsoport. A legaktívabb származéknak (K<sub>i</sub> = 1,09 nM, α<sub>Ki</sub> = 2,80 nM) az a 14 hidrazinból és a 23 dialdehiddel képződött 24 dipiridinium származék bizonyult, amely az optimális távtartó elemet tartalmazta. Ezt az aktív vegyületet dinamikus visszafejtéssel (dekonvolúcióval), a kiindulási elemek fokozatos eltávolításával azonosították.



10. Ábra. Acetil kolinészteráz enzim gátló acilhidrazon könyvtár szintézise

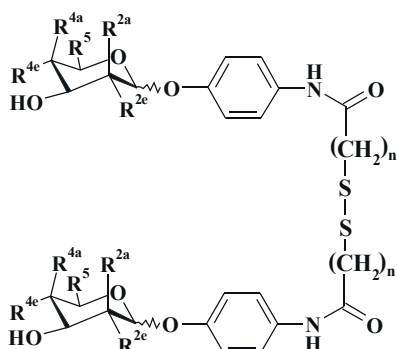
*Congreve* és munkatársai röntgendiffrakciós módszert alkalmaztak a dinamikus egyensúlyban lévő reakcióelegy leghatékonyabb vegyületének azonosítására (11. ábra) [13]. A 25 izatin származékok és 26 hidrazinok reakciójában képződő lehetséges harmincféle 27 hidrazon reakcióelegybe ciklin-függő kináz-2 fehérje egykristályait merítve horgászták ki a leghatékonyabb gátló vegyületet (27, R = Cl, R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>). Az egykristály komplex röntgendiffrakciós vizsgálata a szerkezet meghatározása mellett információt nyújtott a kötődés módjáról is. A dinamikus kombinatorikus kémia ezen változatát a szerzők dinamikus kombinatorikus röntgendiffrakciós krisztallográfiának nevezték el.

Diszulfid cserélődési reakciót a 12. ábrán látható 28-33 cukor homo-dimereket tartalmazó dinamikus könyvtár kialakításánál alkalmazták [14]. A kiindulási homo-



11. Ábra. Ciklin-függő kináz-2 gátló dinamikus kémiai könyvtár kialakítása

dimerekben a két cukor egységet összekötő elemben UV aktív fenilamid egységeket és  $(\text{CH}_2)_n\text{-S-S-(CH}_2)_n$  láncot helyeztek el, melynek hosszát a metilén csoportok számával ( $n=2,3$ ) szabályozták. A kialakított dimer könyvtárakat a hisztokémiai festésben alkalmazott Concovalin A-hoz történő kötődés vizsgálatára alkalmazták. Az adaptív körülmények alkalmazásakor **28-31** homo-dimerekből, az előegyensúlyi körülmények alkalmazásakor pedig **28-33** homo-dimerekből indultak ki.



Vegyület	$\alpha/\beta$	R <sup>2a</sup>	R <sup>2c</sup>	R <sup>4a</sup>	R <sup>4c</sup>	R <sup>5</sup>	n
<b>28 Man/Man</b>	$\alpha$	OH	H	H	OH	CH <sub>2</sub> OH	3
<b>29 Ara/Ara</b>	$\beta$	H	OH	OH	H	H	2
<b>30 Xyl/Xyl</b>	$\beta$	H	OH	H	OH	H	2
<b>31 GalC<sub>2</sub>/GalC<sub>2</sub></b>	$\beta$	H	OH	OH	H	CH <sub>2</sub> OH	2
<b>32 GalC<sub>3</sub>/GalC<sub>3</sub></b>	$\beta$	H	OH	OH	H	CH <sub>2</sub> OH	3
<b>33 Glc/Glc</b>	$\beta$	H	OH	H	OH	CH <sub>2</sub> OH	2

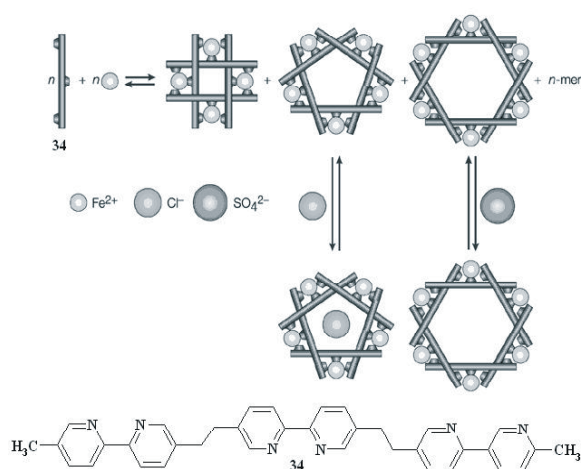
**Man = D-mannóz; Ara = L-arabinóz; Xyl = D-xilóz;**  
**Gal = D-galaktóz; Glc = D-glukóz**

12. Ábra. Concovalin-A gátló cukor vegyületek dinamikus kémiai könyvtár kialakítása.

Puffer oldatban pH=7,4 értéken az egyes dimerek között dinamikus cserélődés áll fenn, így mind a 10 ill. 21 lehetséges dimer képződött közel azonos mennyiségben. A cserélődést a pH érték 5-re állításával fagyasztották be. Adaptív körülmények között, a szefaróz gyöngyökhöz kötött Concovalin-A jelenlétében a tíztagú könyvtárból egy homo-dimer (Man/Man) és 3 hetero-dimer (Man/Xyl, Man/Alu, és Man/GalC<sub>2</sub>) kötődött, míg a 21 tagú előegyensúlyban képződött vegyületkönyvtárból 6 kötődő dimert azonosítottak (az említett 4 dimer mellett még a Man/GalC<sub>3</sub> és Man/Glu hetero-dimereket). Mindkét esetben

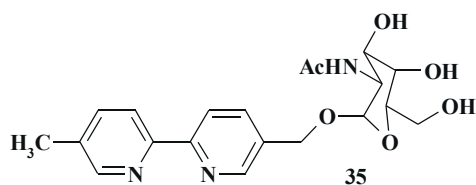
a homo-dimer **28** Man/Man volt a legjobban kötődő cukor vegyület, amelynek mennyisége kb. 2,1-szer több volt az adaptív könyvtárban, mint az előegyensúlyal létrehozott könyvtárban.

Érdekes példa található biológiai dinamikus könyvtár alkalmazására [15]. Phe-Leu és Tyr-Gly-Gly di- és tripeptidből termolizin oldható proteázzal reverzibilis peptidkönyvtárat képeztek. Az edényt termolizin számára átjárhatatlan félig áteresztő membránnal kettéválasztották, és az edény másik felébe endorfint kiválasztó antitestet helyeztek el. Az első kamrában a termolizin a peptidket aminosavakra bontotta, míg a másik kamrában az antitest az aminosavakat a Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu összetételű pentapeptidé konvertálta, és így fokozatosan eltolta az egyensúlyt, feldúsítva e komponenszt.



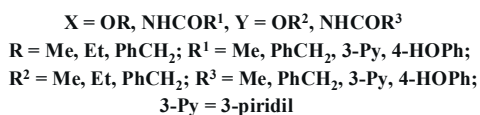
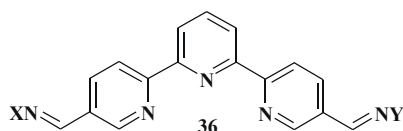
13. Ábra. A **34** trisz-2,2'-piridil és vas(II) sók dinamikus kémiai könyvtára.

A **34** trisz-2,2'-bipiridil fém kationokkal különböző kör alakú spirális négyszögű, ötszögű, hatszögű komplex kationt képezhet (virtuális könyvtár) a piridin-gyűrűk nitrogénatomjai és a fém kation részvételével [16, 17]. A **34** 2,2'-bisz-bipiridilből és vas(II)kloridból etilénligandokban 170 °C-on egy a trisz-2,2'-bipiridilt és vas(II) iont 1:1 arányban tartalmazó öt egységet tartalmazó ötszögű kör alakú dupla csavar képződik, amely egy 1,75 Å átmérőjű belső üreget képez, amely magában foglal egy kloridiont (átmérője 1,8 Å) (13. ábra). E komplexben minden fém ion hat nitrogénatommal van koordinálva, amelyek közül minden két-két nitrogén atom más-más **34** trisz-2,2'-bipiridilhez tartozik. Ha a kloridiont, a nagyobb térgényű szulfát anionra cserélték, akkor egy hat egységéből álló hatszögű, ugyancsak kör alakú duplacsavar képződött, amely egy nagyobb belső üreget képez [17]. Ha a szulfát aniont kloridionra cserélték, melegítés után visszakapták az ötszögű komplexet. Ugyancsak hatszögű komplexek képződtek Fe(BF<sub>4</sub>)<sub>2</sub> és FeSiF<sub>6</sub> sók alkalmazásakor, míg FeBr<sub>2</sub> só jelenlétében az öt- és hattagú komplex kb. 1:1 arányban volt jelen. Ez esetekben az anionok templátként működtek, amelyek szabályozzák a létrejövő komplexek szerkezetét. Nikkel sók jelenlétében eltérő szerkezetű, [Ni<sub>3</sub>L<sub>3</sub>]<sup>6+</sup> összetételű tripla csavart komplex kation képződik függetlenül az anion minőségétől [18].

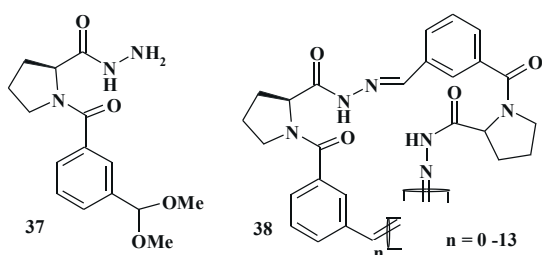


A nem-szimmetrikusan helyettesített **35** 2,2'-bipiridil oldatát vas(II)kloriddal reagáltatva négy sztereoizomer komplex jött létre, amelyben egy vas(II)ion három **35** 2,2'-bipiridillel koordinálódik. Ha az egyensúlyi elegyhez egy ekvivalens *Vicia villosa* B<sub>4</sub> lektint adtak, az egyensúlyi elegy összetétele megváltozott, és az eredetileg 15%-ban jelenlévő sztereoizomer mennyisége 85%-ra nőtt. Ha más eredetű lektint alkalmaztak, másik diasztereomer dúsult fel. [19].

Egy dinamikus kémiai könyvtár létrehozásánál egyidejűleg két vagy több reverzibilis elemet is alkalmazhatnak.

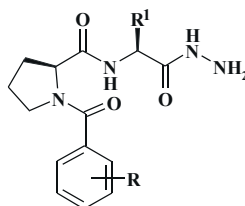


Goral és munkatársai a háromtagú **36** tripiridin származékokat kobalt(II)ionnal reagáltatták [20]. A hidrazon és oxim részek cseréje savas körülmények között játszódik le. A pH értékét semleges értékre állítva a cserélődési folyamat leáll. E mellett a kobalt(II)ion két tripiridin származékkal reverzibilis komplexet alkot. A kobalt(II)ion körüli koordinatív cserét a kobalt(II)ion kobalt(III)ionná történő oxidációval lehet megszüntetni. Ily módon egy nagyon komplex könyvtárt hoztak létre.



Az **37** prolin származék kloroformos oldata trifluoecetsav jelenlétében 6 óra reakcióidő után 2-15 tagú ciklusos **38** vegyületek elegyét tartalmazta, amelyben a ciklusos trimer a fő termék. Három nap múlva az egyensúly beállása után reverzibilis elegyben kb. 88%-ban a ciklusos dimer a főtermék. Az oligomerek belső üregükben kvaterner ammónium sók képesek megkötni. A kvaternersótól függően az egyensúlyi oligomerek összetétele változik. Az elegyhez négy mól tetraetilammónium-jodidot adva az egyensúlyi elegyben a ciklusos dimer mennyisége kb. 60%-ra csökkent, míg a ciklusos trimer mennyisége kb. 18%-ra, és a magasabb ciklusos oligomereké 22%-ra nőtt. Etiltrimetilammónium-jodid jelenlétében az összetétel: kb. 20% ciklusos dimer, 77% ciklusos trimer, és ciklusos 3% magasabb oligomer.

Acetilcolin klorid jelenlétében az egyensúlyi elegy mintegy egy 90% ciklusos trimert, és csak 10% ciklusos dimert tartalmaz [21].



Sanders és munkatársai **39-41** dipeptid-hidrazidokat is alkalmazta dinamikus kombinatorikus könyvtárak létrehozására [22,23]. A kialakuló könyvtár tagjai többféle nem-kovalens kölcsönhatás kialakítására képesek, beleértve a hidrogén-híd képzést, a Lewis sav-bázis, a π-π, és a kation-π kölcsönhatásokat. Sav katalizálta körülmények között CHCl<sub>3</sub>-MeOH 98:2 térfogatarányú elegyében a termodinamikai egyensúly 1-5 napon belül állt be. Templát molekula jelenléte nélkül képzett egyensúlyi elegyben dimert és különböző tagszámú ciklusos oligomert azonosítottak HPLC és elektron-spray ionizációs tömegspektrometriás vizsgálatokkal. A **39** és **41** vegyületekből képzett egyensúlyi elegyben a tetramer, míg a **40** vegyületből képzett egyensúlyi elegyben a dimer volt a főtermék.

Az egyensúlyi elegyekhez LiI-ot és NaI-ot adva **39** és **41**-ből képzett könyvtárakban legalább 95%-ban trimer termék dúsult fel a többi könyvtártag rovására. A **40** építő elemből, amely az aldehid-funkciót meta helyzetben tartalmazza, eltérő koordinációs képességű könyvtár alakult ki. Az említett sók hatására a már kezdetben is domináns dimer felé tolódott el az egyensúlyi összetétel több mint 98%-ban. Az anion változtatása (Cl<sup>-</sup>, CF<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>) nem befolyásolta az egyensúlyokat, jelezve, hogy a jód anionnak nincs szerepe a komplex képzésben.

Újabbán Sanders és munkatársai **39** építő elemből CHCl<sub>3</sub>-DMSO 95:5 térfogatarányú oldatában képeztek dinamikus kémiai könyvtárt. A könyvtár kialakulását NMR-rel kísérték nyomon **39** 20 mM-os oldatában 43 ekvivalens CF<sub>3</sub>COOH jelenlétében. Néhány perc elteltével lineáris oligomereket detektáltak. 1 óra elteltével 2-6 tagú ciklusos oligomerek voltak jelen döntően. Az egyensúly 3 nap múlva állt be. Az egyensúlyi elegyben az előbbi oligomerek mellett nagyobb tagszámú ciklusos oligomerek is kimutathatók voltak.

Az egyensúlyi elegyhez 200 mM acetilcolin kloridot adva a ciklusos oligomerekkel összemérhető mennyiségben lineáris oligomerek is megjelentek. Három nap elteltével a ciklusos dimer volt a fő termék, de a 25. perctől kezdődően megjelent egy, két ciklusos trimert tartalmazó [2]-katenán (**42**), amely 44 nap elteltével 70%-ra dúsult. Ezt az 1:1 arányú katenán-acetilcolin komplexet 67%-ban izolálni is tudták. Nem tudták meghatározni, hogy a két lehetséges diasztereomerből melyik izomert kapták. Ezúttal a ligand hatására olyan molekula képződött, amelyet a ligand nélküli egyensúlyi elegyben nem tudtak kimutatni. Úgy becsülték, hogy a ligand jelenléte több mint három nagyságrenddel növelte meg a **42** [2]-katenán mennyiségét. A statisztikailag jelentősen kedvezőtlen katenán képződés az acetilcolin erős exoterm kötődése következtében került előtérbe.



42

Izotermál titrálási kaloriméterrel több komplex kötődési állapotát is meghatározták [katenán-acetilcolin komplex  $K = 1,4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  (entalpia változás:  $\Delta H = 22,9 \text{ kJ M}^{-1}$ , entrópia változás:  $\Delta S = +17,8 \text{ kJ M}^{-1}$ ), ciklusos trimer-acetilcolin komplex  $K = 1,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ , ciklusos tetramer-acetilcolin komplex  $K = 5,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ]. Megállapították, hogy az erős kötődésért az acetilcolin trimetilammónium része a felelős. Az egyik metilcsoportot etilcsoportra cserélve a kötődési állandó század részre csökkent ( $K = 1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ). Ezzel szemben az acetilcsoport cseréje butiril-csoportra minimális változást eredményezett. A 41 ciklohexil-csoportot tartalmazó építőelemből képzett dinamikus kombinatorikus könyvtár hasonló eredményt adott, jelezve, hogy az aromás fenilcsoport alapvetően nem vesz részt a kötődési folyamatban. Ez esetben a katenán-acetilcolin komplex kötődési állandója  $K = 3,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  volt.

## 6. Összefoglalás

A kombinatorikus kémia egyik újabb változata az oldatban, építőelemek reverzibilis kapcsolódásával megvalósuló dinamikus kombinatorikus kémia. A dinamikus kémiai könyvtár kialakításánál reverzibilis kovalens kötések és/vagy szupramolekuláris kölcsönhatások játszanak szerepet. A dinamikus kémiai könyvtárban a reverzibilis folyamatok révén az összes, virtuális szerkezet előfordulhat. Külső hatásokra (pl. hőmérséklet, pH, koncentrációváltozás) a termodinamikailag egyensúlyban lévő könyvtár összetétele megváltozhat. Biológiai célmolekula jelenlétében a legjobban kötődő komponens az oldatból kiválik, és a megbomlott egyensúly a többi könyvtártag rovására helyre áll. Ez lehetőséget ad biológiailag aktív jelző molekulák gyors azonosítására. Az áttekintés második része számos irodalmi példát mutat be a dinamikus kombinatorikus kémia gyakorlati alkalmazására.

## Dynamic combinatorial chemistry

Dynamic combinatorial chemistry is based on the reversible combination of different building blocks to form dynamic combinatorial libraries. Since the formation of products occurs under thermodynamic control, product distributions depend only on the relative stabilities of the members of libraries. Spontaneous assembly of the building blocks through reversible chemical reactions (reversible covalent bond formation and/or supramolecular interactions) virtually encompasses all possible

## Irodalom

1. Furka, Á. *Drug Discovery Today* **2002**, 7, 1-4.
2. Furka, Á.; Sebestyén, F.; Asgedom, M.; Dibó, G. *Int. J. Peptide Protein. Res.* **1991**, 37, 487-493.
3. Houghten, R.A.; Pinilla, C.; Blondelle S. E.; Appel, J.R.; Dooley, C. T.; Cuervo, J. H. *Nature* **1991**, 354, 84-86.
4. Lam, K. S.; Salmon, S. E.; Hers, E. M.; Hruby V. J.; Kazmierski, W. M.; Knapp R. J. *Nature* **1991**, 354, 82-84.
5. Bata, I.; Hermech, I. *Kombinatorikus Kémia, A Kémia Újabb Eredményei*, Akadémiai Kiadó: Budapest **2000**, 87, 1-224.
6. Ramström, O.; Lehn, J.-M. *Nature Reviews Drug Discovery* **2002**, 1, 26-36.
7. Otto, S.; Furlan, R. L. E.; Sanders, J. K. M. *Drug Discovery Today* **2002**, 7, 117-125.
8. Huc, I.; Nguyen, R. *Comb. Chem. High T. Scr.* **2001**, 4, 53-74.
9. Rowan, S. J.; Cantrill, S. J.; Cousins, G. R. L.; Sanders, J. K. M.; Stoddart, J. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 898-952.
10. Huc, I.; Lehn, J.-M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 2106-2110.
11. Hochgürtel, M.; Kroth, H.; Piecha D.; Hofmann, M.W.; Nicolau, C.; Krause, S.; Schaaf O.; Sonnenmoser, G.; Eliseev, A. V. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 3382-3387.
12. Bunyapiboonsri, T.; Ramström, O.; Lohmann, S.; Lehn, J.-M.; Peng, L.; Goeldner M. *ChemBioChem* **2001**, 2, 438-444.
13. Congreve, M. S.; Davis, D. J.; Devine, L.; Granata, C.; O'Reilly, M.; Wyatt, P. G.; Jhoti, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 4479-4482.
14. Ramström, O.; Lehn, J.-M. *ChemBioChem* **2000**, 1, 41-48.
15. Swann, P. G. *Biopolymer* **1996**, 40, 617-625.
16. Hasenknopf, B.; Lehn, J.-M.; Kneisel, B. O.; Baum, G.; Fenske, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, 35, 1838-1840.
17. Hasenknopf, B.; Lehn, J.-M.; Boumediene, N.; Dupont-Gervais, A.; Van Dorsselaer, A.; Kneisel, B.; Fenske, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 10956-10962.
18. Krämer, R.; Lehn, J.-M.; De Cian, A.; Fischer, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, 32, 703-706.
19. Sakai, S.; Shigemasa, Y.; Sasaki, T. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 8145-8147.
20. Goral, V.; Nelen, M. I.; Eliseev, A. V.; Lehn, J.-M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 1347-1352.
21. Furlan, R. L. E.; Ng, Y.-N.; Cousins, G. R. L.; Redman, J. E.; Sanders, J. K. M. *Tetrahedron* **2002**, 58, 771-778.
22. Robert, S. L.; Furlan, R. L. E.; Otto, S.; Sanders, J. K. M. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 1625-1633.
23. Lam, R. T. S.; Belenguer, A.; Roberts, S. L.; Naumann, C.; Jarrosson, T.; Otto, S.; Sanders, J. K. M. *Science* **2005**, 308, 667-669.

combinations. It allows the establishment of adaptive processes owing to the dynamic interchange of the library constituents. Presence of a target ligand or receptor creates a driving force that favours the formation of the best-binding member in a self-screening process. The second part of this article presents some practical application of the dynamic combinatorial chemistry surveying the literature.

# AMPA antagonistá 2,3-benzodiazepinek: Metabolitok és heterociklusos származékok szintézise

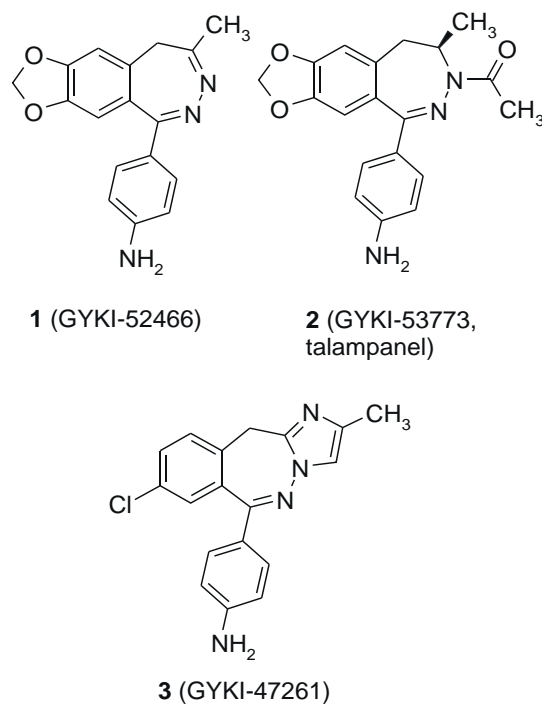
SÓLYOM Sándor\*, ÁBRAHÁM Gizella, CSUZDI Emese, KERTÉSZ Máriusz és HÁMORI Tamás  
 IVAX Gyógyszerkutató Intézet Kft, Berliu u. 47-49, 1045 Budapest

## 1. Bevezetés

A glutaminsav a legfontosabb izgató hatású idegi átvivő anyag a központi idegrendszerben. Hatását több ioncsatornához és G-fehérjéhez kapcsolódó receptor közvetíti, melyek közül az AMPA receptor által szabályozott ioncsatorna felelős a gyors szinaptikus válaszokért. (AMPA = 2-amino-3-metil-(3-hidroxi-5-metil-izoxazol-4-il)-propionsav; a receptorhoz kötött ioncsatornát e természetes, agonista hatású ligandjáról nevezték el.) Ma már közismert, hogy ez az ioncsatorna - többek között - jelentős szerepet játszik az idegsejtek fejlődésénél, változásánál (idegen szóval: plaszticitás) valamint a tanulás és memória folyamataiban. Az AMPA receptor egyes fajtáinak kóros túlműködése a sejtekbe nagy mennyiségű kalcium beáramlását okozhatja, mely sejtizgatást és neurodegenerációs folyamatokat indíthat el. Az AMPA receptor antagonisták legfontosabb terápiás felhasználási lehetőségei: görcsgátlás, epilepszia ellenes hatás, akut és krónikus neurodegenerációs betegségekben (pl. agyvérzés, Parkinson kór, Alzheimer kór, stb.) az idegsejt védelme.<sup>1</sup> A hatásmechanizmus azonban további alkalmazásokat is lehetővé tehet, különösen ha figyelembe vesszük, hogy e receptorok centrális és perifériás szerepe még távolról sem eléggé ismert.<sup>2</sup>

Intézetünkben a 80-as évek végén Körösi és munkatársai nyugtató hatású 2,3-benzodiazepinek vizsgálata során figyeltek fel 1 származékra, mely centrális görcsgátló hatást mutatott és a részletes vizsgálatok elsőként igazolták a nem-kompetitív AMPA antagonistá hatásmechanizmust (1. ábra). E vegyület GYKI-52466 kódszámmal azóta a terület farmakológiai standardjává vált. A nem-kompetitív hatásmechanizmus azért jelentős, mert hatását függetlenül fejtí ki az egyébként endogén körülmények között általában jelenlévő agonistától, a glutaminsavtól. Ez különféle terápiás előnyöket eredményezhet.

Hatékonyabb molekulák keresése során több jelentős hatású vegyületet találtunk, ezeket valamint a területen 2002-ig közzétett egyéb eredményeket egy összefoglaló közleményünk tartalmazza.<sup>3</sup> A 2 képletű vegyülettel (GYKI-53773, talampanel) jelenleg előrehaladott fázis II klinikai vizsgálatok folynak, elsősorban epilepsziás betegeken. A különféle AMPA antagonistá hatású vegyületcsalád közül talán az egyik legfontosabb felismerés az volt, hogy a 2,3-benzodiazepin váz 3,4-helyzetéhez kondenzált 5-tagú heterociklusos származékok körében igen jelentős hatású vegyületek fordulnak elő.<sup>3</sup> Ezek közül pl. 3 (GYKI-47261) kevésbé a görcsgátló hatásával, mint inkább a neuroprotektív sajátosságával tűnt ki.<sup>4</sup>



1. Ábra. AMPA antagonistá 2,3-benzodiazepinek

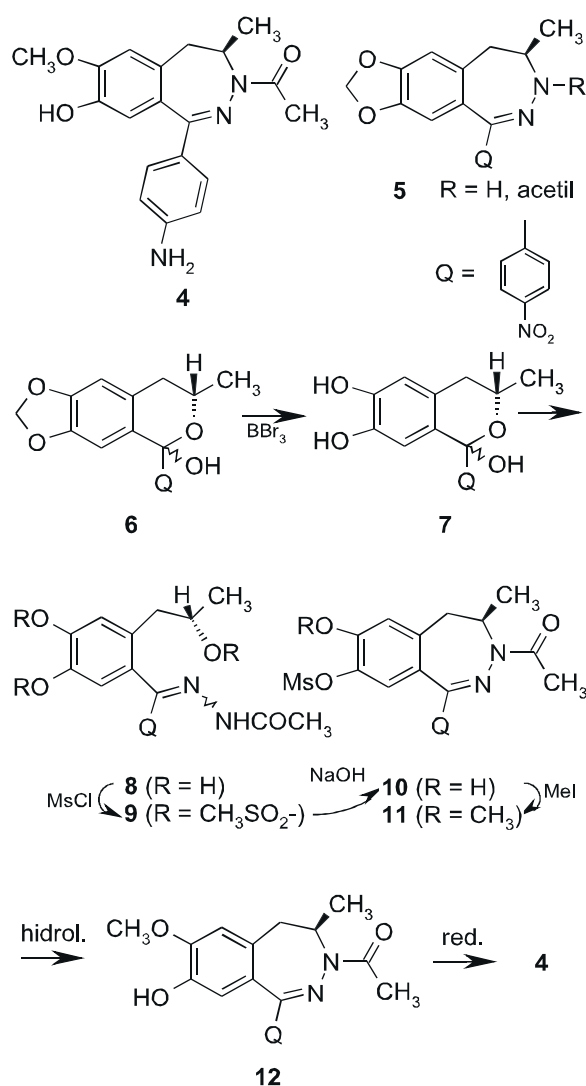
Jelen közleményben néhány kiemelt vegyület metabolitjainak előállítását, a 2,3-benzodiazepinek szintézisének néhány újabb megoldását, valamint egy új vegyületcsaláddal kapcsolatos eredményeinket mutatjuk be.

## 2. Néhány metabolit előállítás

4-Aminofenil-csoporttal helyettesített aktív 2,3-benzodiazepinek elsődleges metabolikus dezaktiválódási folyamatoként az aminocsoport acetileződését állapították meg.<sup>5</sup> Ilyen vegyületek előállítása a kiválasztott vegyület egyszerű acetilezésével megoldható és többnyire a kutatási fázisban már erre sor kerül. A másodlagos metabolikus folyamatokban keletkező vegyületek szintézise esetenként több-kevesebb nehézségbe ütközhet. A klinikai fázisban lévő 2 vegyület humán metabolitjai között folyadékromatográfia-tömegspektroszkópia (HPLC-MS) vizsgálatokkal többek között 4 származékot és acetilezett analógjait mutatták ki.<sup>6</sup> Ezért 4 előállítását tűztük ki célul (2. ábra).

A dioxolángyűrű felnyitására savas és bázikus módszerek jöhetnek számításba. Protikus és Lewis savas

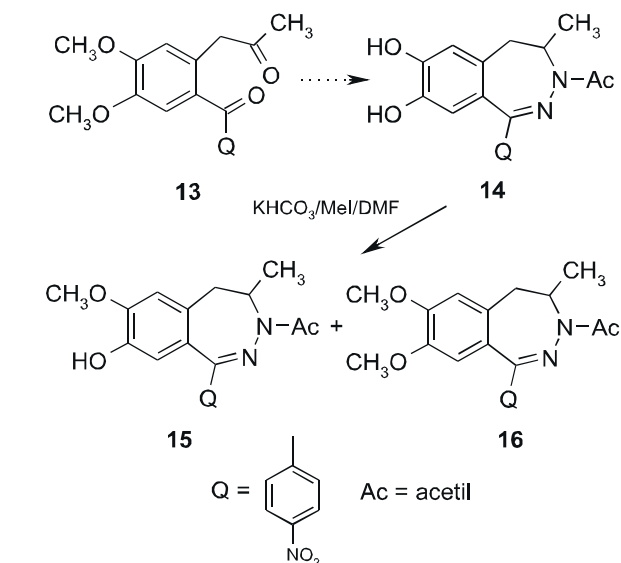
\* Főszerző. Tel.: 36-1-399-3471; fax: 36-1-399-3356; e-mail: sandor.solyom@idri.hu



2. Ábra. Talampanel metabolit szintézis-vázlata

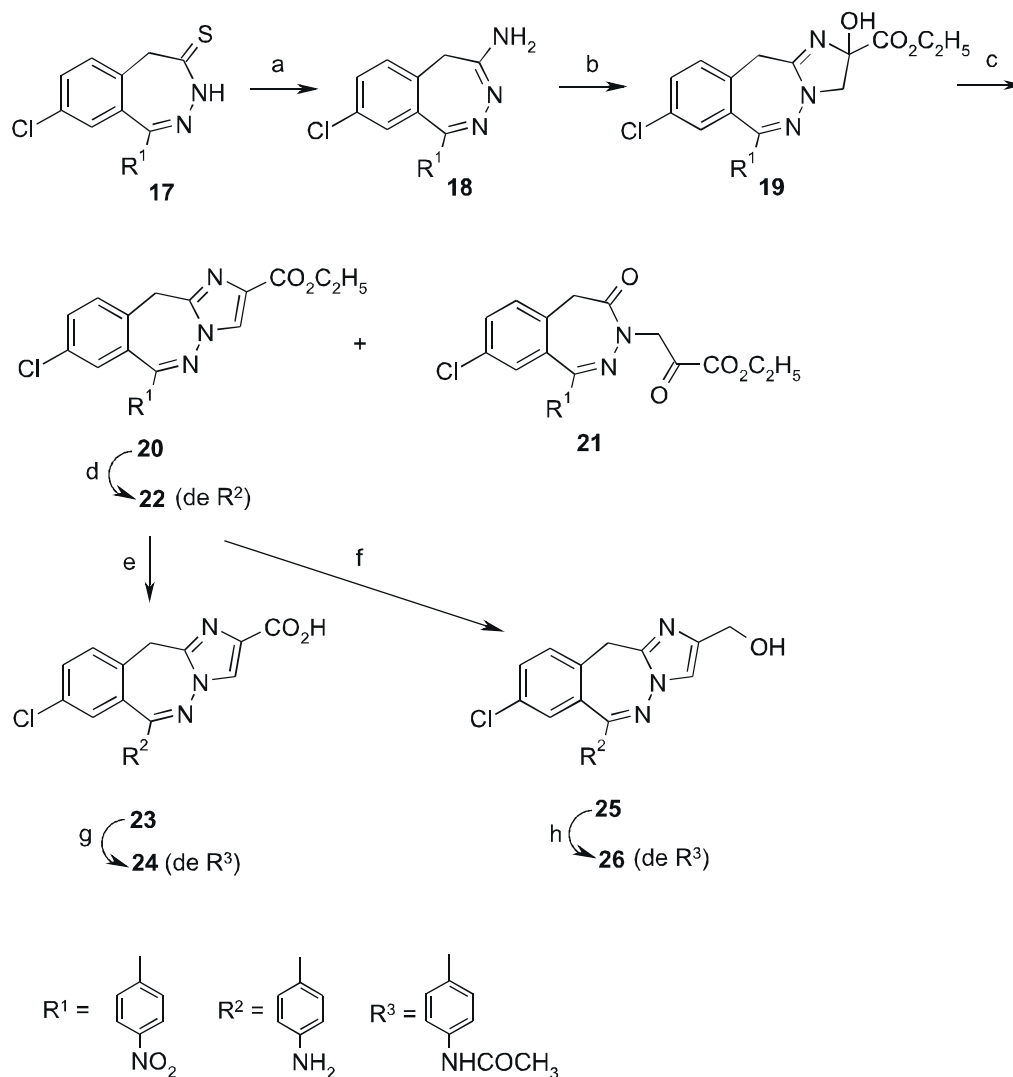
megoldások az 5H-2,3-benzodiazepin gyűrű esetén (lásd 1 gyűrűrendszerét) a vegyület elbomlásához vezetnek. Ugyanezen módszerek 1 szintézise során alkalmazott benzopirilium só típusú intermediereknél alkalmasak ugyan a benzolgyűrű fenoléter szubsztituenseinek hasítására, de mindezen eljárások elvileg sem alkalmazhatók tiszta enantiomer 4 vagy rokon szerkezet létrehozására. Ezért mindenképpen 2 szintézisének enantiomer egységes intermedierei között kellett kiindulási anyagot keresni. Ismeretes, hogy elektronszívó csoporttal helyettesített metiléndioxi-benzol származékok esetén alkáli-alkoxid anionnal dipoláros aprotikus oldószerben a dioxolángyűrű felnyitható és a megfelelő alkoxi- és hidroxicsoportot orto helyzetben tartalmazó benzolszármazékok keletkeznek.<sup>7</sup> Sajnos a reakciókörülmények számos változtatásával sem sikerült 5 típusú vegyületekből fenolos hidroxilt tartalmazó vegyület keletkezését kimutatni. Végül a dioxolángyűrű Lewis savas hasításához tértünk vissza és a talampain (2) ismert szintézisének<sup>8</sup> egy olyan intermediert használtuk kiindulási vegyületté, ahol a kiralitás centrum már optikailag aktív vegyület formájában adott, de a vegyület még nem tartalmazza a benzodiazepin gyűrűt (2. ábra). Ennek megfelelően 6 hemiketált nagy feleslegben bórtribromiddal reagáltattuk és a fenolos frakcióként izolált

termékelegyet, mely 7 sztereoizomerek elegyét valamint a megfelelő hidroxiketon nyílt láncú tautomert (az ábra nem mutatja) tartalmazza, ecetsav-hidraziddal sav katalízis mellett reagáltattuk. A kapott 8 hidrazon sztereoizomer keveréket metánszulfonil-klorid (MsCl) feleslegével mezileztük, majd a kapott háromszorosan szulfonilezett terméket (9) számított mennyiségű nátrium-hidroxiddal kezeltük. A főtermékként kromatográfiásan izolált 10 esetén a mezilcsoport helyzetét <sup>1</sup>H-NMR-NOE mérésekkel igazoltuk. 10 Intermediert fenolos hidroxilcsoportját metiljodiddal kálium-hidrogén-karbonát jelenlétében alkileztük, majd a 8 meziloxi-csoportot hidrolizáltuk.



3. Ábra. Racém referens előállítás

Végül a nitrocsoport redukciója vezetett a kívánt metabolithoz (4), melynek igen gyenge AMPA antagonist hatását csak *in vitro* vizsgálatokkal tudtuk igazolni. A kapott 4 metabolit optikai tisztaságát királis folyadékkromatográfiás úton bizonyítottuk, oly módon, hogy 13 ismert diketonból a kezdeti benzodiazepin szintézisek analógiájára,<sup>3</sup> racém 14 dihidroxibenzodiazepin-származékot állítottuk elő, majd ezt részlegesen metileztük és így 15 monometoxi- valamint 16 dimetoxi-származékok 1:0,3 elegye keletkezett (3. ábra). A kapott keverék valamint 4 királis folyadékkromatográfiás összehasonlítása azt igazolta, hogy 4 tiszta enantiomer és a dioxolángyűrű bórtribromidos felnyitása az izokromán gyűrűben található királis centrumot nem érinti. A kondenzált gyűrűs AMPA antagonist vegyületek közül intézetünkben 3 került farmakokinetikai vizsgálatra. A már említett aminocsoport acetileződése itt is a metabolikus átalakulás egyik fő iránya,<sup>9</sup> de további átalakulások is valószínűsíthetőek voltak. Ezúttal oly módon jártunk el, hogy előbb néhány potenciális metabolitot állítottunk elő kémiai szintézissel, majd ezeket hasonlítottuk össze egy *ex vivo* technikával 3 kiindulási vegyületből kapott termékeleggyel.<sup>10</sup> A 4. ábra néhány 3 vegyületből várható potenciális metabolit szintézisét tartalmazza. A kiindulási vegyület 17 tiooxo származék,<sup>4</sup> mely nyomás alatt tetrahydrofuranban ammóniával higany-klorid jelenlétében 18 képlettel jellemezhető tautomer amidrazon vegyületté alakult. Utóbbit bróm-piroszólósva etil-észterrel alkilezve egyetlen termék 19 gyűrűs vegyület keletkezett, melynek savas kezelése mintegy 2:1 arányban 20 és 21 termékekhez



4. Ábra. Reagensok és körülmények: (a)  $\text{NH}_3/\text{THF}/\text{HgCl}_2$ , autokláv,  $70^\circ\text{C}$ , 81 %; (b) bróm-piroszőlősav-etilészter, DMF,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , sz.h., 65 %; (c) kat. pTsOH, EtOH/ $\text{CHCl}_3$ , 58 % (**20**), 28 % (**21**); (d)  $\text{RaNi}$ ,  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 87 %; (e) NaOH, EtOH, reflux, 63 %; (f)  $\text{LiAlH}_4$ , THF, 59 %; (g)  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , sz.h., 79 %; (h)  $\text{AcCl}$ , piridin, sz.h., 41 %.

vezetett. (**21** Jelű nyíltláncú melléktermék keletkezése az alkilezés regioszelektív lefutását is igazolja.) A **20** jelű benzodiazepin karbonsav-észter csoportjának redukciója, illetve hidrolízise, valamint ezek acilezése eredményezte a **23-26** potenciális metabolit származékokat. Az *ex vivo* metabolizmus kísérletet patkány májon történő perfúzióval végeztük.<sup>11</sup> A kapott mintát folyadékromatográfia-tömegspektroszkópiai módszerrel elemeztük. Ilyen módon **3** kiindulási vegyületen kívül **25** metilcsoporton hidroxilált származék, valamint mindkét vegyület N-acetil származéka volt azonosítható. (Hasonló, metilimidazo-csoporttal kondenzált benzodiazepin-származék metabolikus hidroxileződését mások is megfigyelték.<sup>12</sup>) A biológiai vizsgálatok szerint **25** csak jelentéktelen AMPA antagonistá hatással rendelkezik, így megállapítható, hogy **3** vegyületből nagy valószínűséggel nem keletkezik aktív metabolit.

### 3. Néhány, talampanellel (**2**) rokon vegyület előállítás

Szerkezet-hatás összefüggések tanulmányozásához **27** (2 meta-izomerje) valamint **28** előállítását céloztuk

meg (5. ábra). Utóbbi esetén tanulmányozni kívántuk az aminocsoport teljes szterikus árnyékolásának a biológiai hatására való befolyását, ugyanis EGIS kutatók leírták, hogy egyetlen orto-metil helyettesítő előnyösen módosította **2** és rokon vegyületek metabolikus dezaktiválódását és ezen keresztül a hatásidőtartamot.<sup>13</sup> A kívánt vegyületek szintézisét **2** előállításának jól bevált útján kívántuk végrehajtani.<sup>8</sup> (Metiléndioxi-fenil)acetone mikrobiológiai redukciójával kapott S-konfigurációjú **29** izopropanolból a megfelelő benzaldehiddel **30a,b** izokromán vegyületeket állítottuk elő. A következő, hemiketál képzési reakciót **2** szintézise során DMSO-DMF oldószer keverékben levegővel történő oxidációval hajtják végre erősen bázikus körülmények során. Ez az egyébként igen jó hozamú reakció **30a** esetén nem megy végbe, **30b**-ből pedig egy használhatatlan termékelegy képződött. Előbbi esetben nyilván a meta helyzetű nitrocsoport egy olyan elektronikusan előnytelen átmeneti állapotot eredményez, mely gátolja a benziles, kétszeresen aktivált proton leválását. Másik esetben (**30b**) viszont további reaktív benzil-helyzetű protonok ellenőrizhetetlen folyamatokat indíthatnak el. Emiatt más mechanizmust követő hemiketál képzési



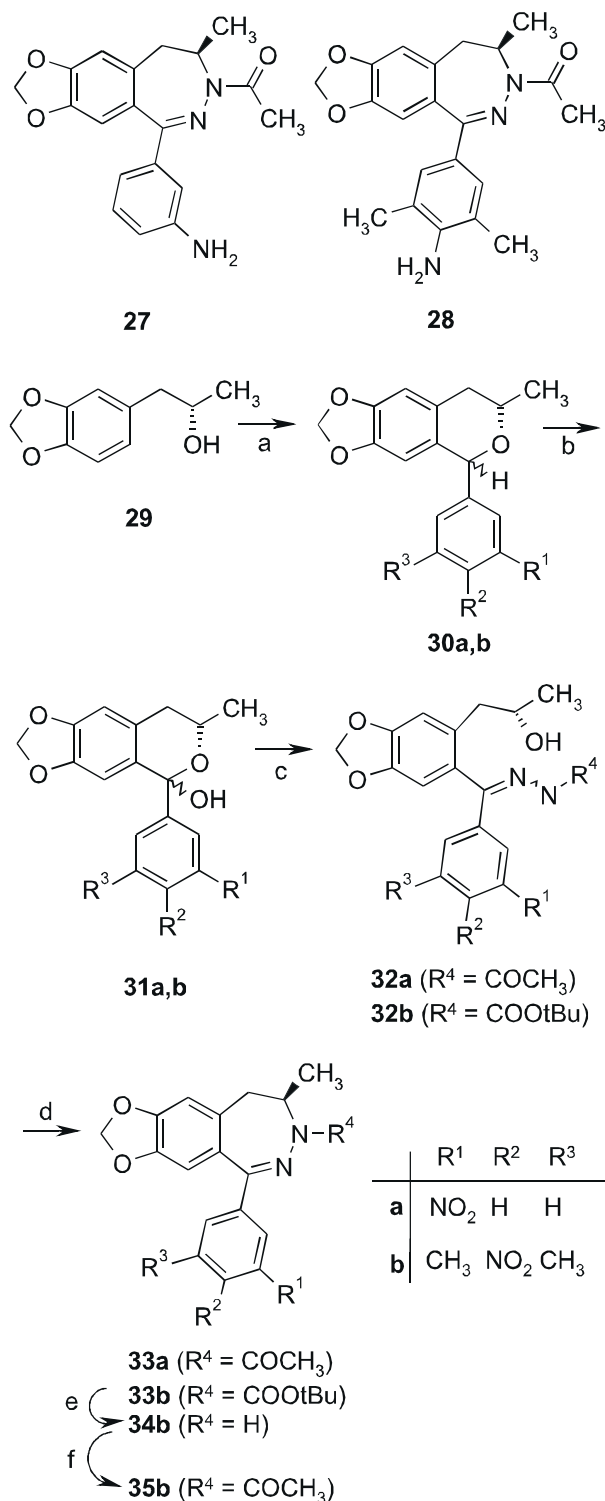
eljárást kellett kidolgozni.<sup>14</sup> Segítségül vettük azt az ismert reakciót, mi szerint oxigén atommal szomszédos benzil helyzetű szénatomot CrO<sub>2</sub>-dal, vagy cérium-ammónium-nitráttal illetve 2,3-diklór-5,6-diciánbenzoquinonnal (DDQ) oxidálva oxokarbénium ion keletkezhet, mely azután alkohol vagy víz jelenlétében acetállá, hemiketállá vagy laktonná alakul.<sup>15-17</sup> Ennek megfelelően, amikor **30a,b** izokrománokat csekély feleslegű DDQ-val reagáltattuk diklórmetánban kevés víz jelenlétében, gyakorlatilag kvantitatív hozammal és jó tisztasággal **31a,b** hemiketál származékok keletkeztek. Utóbbiakat a megfelelő savhidraziddal savkatalízis mellett toluolban vízválasztás mellett forralva nyertük **32a,b** hidrazonokat, melyekből **2** szintézisével analóg módon<sup>8</sup> állítottuk elő **33a,b** nitroszármazékokat.<sup>14</sup> **33b** Vegyületből a könnyen hidrolizálható védőcsoport eltávolításával jutottunk a helyettesítést nem tartalmazó **34b**-hez, majd ennek acetilezésével **35b** származékhoz. Végül **33a** és **35b** nitros csoportjait redukálva állítottuk elő a szerkezet-hatás tanulmányokhoz szükséges **27,28** vegyületeket. Utóbbiak AMPA antagonistá hatást gyakorlatilag nem mutattak. A részleteket illetően a megfelelő közleményre utalunk.<sup>14</sup>

#### 4. Heterociklussal helyettesített 2,3-benzodiazepinek

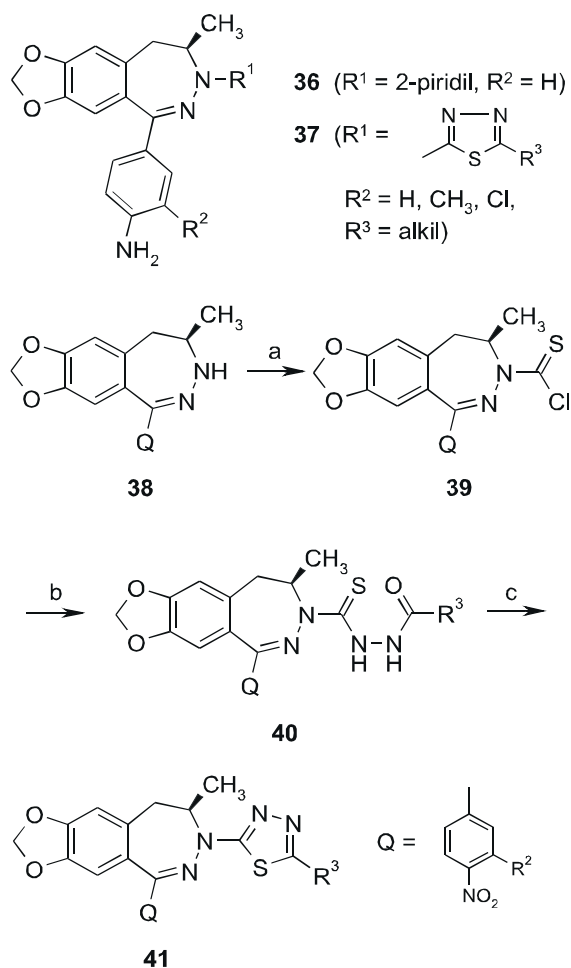
Korábbi hatásos AMPA antagonistá 2,3-benzodiazepinek jellegzetes szerkezeti elemeit figyelembe véve DISCO számítások segítségével egy 4-pontos farmakofor modellt szerkesztettünk.<sup>18</sup> Érdekes módon két, egymástól csak egy H-híd donor kapcsolódási helynél különbséget mutató modell jött létre. Arra is felfigyeltünk, hogy az egyik modellhez tartozó vegyületek (ilyen pl. **3** és rokon származékai) körében nagyobb gyakorisággal fordulnak elő az in vitro vizsgálatokban kisebb IC<sub>50</sub> értéket mutató anyagok, mely a kötőhelyhez való nagyobb affinitásra utalhat. Ennek megfelelően flexibilis, az adott donor helyhez heteroatommal kapcsolódó, heterociklussal helyettesített 2,3-benzodiazepinek előállítását kezdtük el (6. ábra). Már az első vegyületek is igazolták, hogy hatásos vegyületek remélhetően e körben. Az időközben az Eli Lilly kutatói által publikált 36 2-piridil-származék talampanel megközelítő hatékonysága csak fokozta igyekezetünket.<sup>19</sup> Számos, különféle 5- és 6-tagú heterociklussal helyettesített 2,3-benzodiazepint állítottunk elő.<sup>20</sup>

A nagyobb biológiai aktivitás egyértelműen az 5-tagú valamint a kén- és nitrogén tartalmú heterociklusos vegyületek körében volt megfigyelhető. Kiemelkedő, a referensek (pl. **2**, **3**) hatását jelentősen meghaladó aktivitással **37** származékok (R<sup>3</sup>=1-3 szénatomszámú alkilcsoport) rendelkeztek. A jelentős szélesspektrumú görcsgátló tulajdonság mellett egyes vegyületek a humán stroke valamint a szklerózis multiplex patkány modelljeiben mutattak erős aktivitást.<sup>20</sup> A heterociklusos vegyületek előállítására számos szintézis módszert alkalmaztunk, melyek részletes ismertetésére itt nincs mód. Zömmel a szubsztituálatlan **38** típusú származékokból kiindulva építettük fel a heterociklust ismert módszerekkel. (**38** Szubsztituálatlan kiindulási vegyületeket az 5. ábrában bemutatott szintézishez hasonlóan, terc-butoxi-karbonil védőcsoport alkalmazásával készítettük el.) A 6. ábra az 1,3,4-tiadiazol-származékok egyik szintézisét mutatja be. Tiofoszfént használunk **39** tiokarbamoil-kloridok

előállítására, majd ezekkel savhidrazidot acilezünk (**40**), végül a gyűrűzárást savas közegben melegítéssel hajtjuk végre (**41**). Biológiai vizsgálatra mindenkor csak az aminofenil-származékok kerültek.



**5. Ábra.** Reagensok és körülmények: (a) megfelelő benzaldehydszármazékok, toluol, kat. HCl, 60°C, 63-75 %; (b) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5 % H<sub>2</sub>O, DDQ, 96 %; (c) acethidrazid vagy *tert*-butil-karbazát, toluol, kat. HCl, reflux, 80-85 %; (d) 1. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Et<sub>3</sub>N, MsCl, 0°C; 2. EtOH, NaOH, 52-78 %; (e) HCl/etil-acetát, sz.h., 88 %; (f) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Ac<sub>2</sub>O, sz.h., 99 %.



**6. Ábra.** Reagensok és körülmények: (a) benzol,  $Et_3N$ ,  $CSeCl_2$ , sz.h.; (b) sav-hidrazid, DMF,  $Et_3N$ ,  $50^\circ C$ ; (c) EtOH, kat. HCl, reflux.

## 5. Összefoglalás

Eljárást dolgoztunk ki a legfontosabb AMPA antagonisták 2,3-benzodiazepinszármazékok fő metabolitjainak előállítására. Az optikailag aktív 2,3-benzodiazepinek szintézisét újabb szintézis módszerek bevezetésével alkalmassá tettük olyan vegyületek előállítására is, melyekre a korábbi módszer nem volt alkalmazható.

Új, heterociklussal helyettesített 2,3-benzodiazepineket állítottunk elő, melyek AMPA antagonisták hatása a korábbi referensekét meghaladta. Több fejlesztésre alkalmas vegyület került kiválasztásra.

## Recent Results in Synthesis of AMPA Antagonist 2,3-Benzodiazepines

A summary of a study on the preparation of a human metabolite (4) of talampanel (2), an AMPA antagonist in Phase II clinical investigations, is disclosed. Some putative metabolites of another leading, AMPA antagonist benzodiazepine (3) were also synthesized and compared to constituents prepared by an *ex vivo* experiment with 3 in rat liver. A modified hemiketal formation reaction and the

## Hivatkozások

- Parsons, G. C.; Danysz, W.; Quack, G. *Drug News Perspect.* **1988**, *11*, 523-569.
- Gitto, R.; Barreca, M. L.; De Luca, L.; Chimirri, A. *Expert Opin. Ther. Patents* **2004**, *14*, 1199-1213.
- Sólyom, S.; Tarnawa, I. *Curr. Pharm. Design* **2002**, *8*, 913-939.
- Ábrahám, G.; Sólyom, S.; Csuzdi, E.; Berzsenyi, P.; Ling, I.; Tarnawa, I.; Hámori, T.; Pallagi, I.; Horváth, K.; András, F.; Kapus, G.; Hársing, L. G. J.; Király, I.; Patthy, M.; Horváth, Gy. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 2127-2147.
- Eckstein, J. A.; Swanson, S. P. J. *Chromatogr. B. Biomed. Appl.* **1995**, *668*, 153-158.
- Nem publikált információ.
- Imakura, Y.; Okimoto, K.; Konishi, T.; Hisazumi, M.; Yamazaki, J.; Kobayashi, S.; Yamashita, S. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 1691-1696.
- Anderson, B. A.; Hansen, M. M.; Harkness, A. R.; Henry, C. L.; Vicenzi, J. T.; Zmijewski, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12358-12360.
- Migléczi, K.; Hazai, I.; Jemnitz, K.; Pátfalusi, M. *J. Planar Chrom.* **2001**, *14*, 226-271.
- Csuzdi, E.; Migléczi, K.; Hazai, I.; Berzsenyi, P.; Pallagi, I.; Horváth, Gy.; Lengyel, G.; Sólyom, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4662-4665.
- Kukan, M. *The Isolated Perfused Liver as a Tool in Drug Metabolism Studies. Handbook of Drug Metabolism*; Wolf T. F., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York **1999**.
- Elger, B.; Huth, A.; Neuhaus, R.; Ottow, E.; Schneider, H.; Seilheimer, B.; Turski, L. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4618-4627.
- Greff, Z.; Szabó, G.; Barkóczy, J.; Rátkai, Z.; Blaskó, G.; Simig, Gy.; Gigler, G.; Markó, Martonné B.; Lévay, Gy.; Tihanyi, K.; Egyed, A.; Simó, A. PCT Int. Appl. WO 01 04122; *Chem. Abstr.* **2001**, *134*, 100896a.
- Sólyom, S.; Pallagi, I.; Ábrahám, G.; Kertész, M.; Horváth, Gy.; Berzsenyi, P. *Medicinal Chemistry* **2005**, *1*, 481-485.
- Isobe, K.; Takeda, N.; Mohri, K.; Tsuda, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 3390-3392.
- Oikawa, Y.; Yoshioka, T.; Yonemitsu, O. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 889-892.
- Xu, Y.-C.; Lebeau, E.; Gillard, J. W.; Attarda, G. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *24*, 3841-3844.
- Rezessy, B.; Sólyom, S. *Lett. in Drug Design & Disc.* **2004**, *1*, 217-223.
- Anderson, B. A.; Harn, N. K.; Hansen, M. M.; Harkness, A. R.; Lodge, D.; Leander, J. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1953-1956.
- Sólyom, S.; Ábrahám, G.; Hámori, T.; Berzsenyi, P.; András, F.; Kurucz, I. U. S. Patent 6 858 605, **2005**; (PCT Int. Appl. WO 2004 069197), *Chem. Abstr.* **2004**, *141*, 174197.

application of an easily removable protecting group rendered the synthesis of 2 suitable for preparation of some types of derivatives the original procedure had not been suited for. A reference is made to another biologically active group of 2,3-benzodiazepine derivatives, substituted by 5- and 6-membered heterocycles, and the synthesis of the most active compounds is presented.