

KIVONAT

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Új kombinatorikus fehérjemarker molekulakönyvtárak, eljárás azok előállítására és alkalmazására

~~ComGenex Rt., Budapest~~

~~A bejelentés napja: 2002.07.10.~~

A találmány tárgya kombinatorikus fehérjemarker molekula könyvtárak, amelyek egy közös molekuláris váz körül különböző térirányú pozíciókban egy oldalláncon keresztül kapcsolt módon kémiai vagy fotokémiai úton aktiválható csoportokat - riporter csoportokkal együtt vagy anélkül - tartalmaznak.

A találmány továbbá kombinatorikus marker egység könyvtár, amely kémiailag vagy fotokémiailag reaktív marker csoportokat, riporter csoportokat és különböző típusú oldalláncokat egy közös molekuláris-, előnyösen lizin-alapú, vázon variábilisen tartalmaz.

A találmány továbbá kombinatorikus kémiai pányvázási eljárás, amely abban áll, hogy szerkezeti diverzitás, illetve fehérje-kötődési hatékonyság szempontjából optimális pozícióban helyezik el az egy végcsoporttal, előnyösen amino csoporttal rendelkező oldalláncot, amelyhez, kívánt esetben marker egységet kapcsolnak.

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Szolgálati találmány

Új kombinatorikus fehérjemarker molekulakönyvtárak, eljárás azok előállítására és alkalmazására

ComGenex Rt., Budapest

Feltalálók:

dr. Darvas Ferenc, vegyészmérnök, Budapest	5%,
dr. Ürge László, vegyész, Budapest	5%,
Bucsai Ágota, vegyészmérnök, Budapest	23%,
dr. Béres Mariann, vegyész, Budapest	16%,
dr. Dormán György, vegyészmérnök, Budapest	35%,
dr. Krajcsi Péter, vegyész, Budapest	4%,
dr. Nagy Tamás, vegyészmérnök, Budapest	6%,
Szalay Dániel, villamos üzem mérnök, Budapest	3%,
dr. Kálmán Ferenc, vegyészmérnök, Budapest	3%.

A bejelentés napja: 2002.07.10.

A találmány tárgya új kombinatorikus fehérjemarker molekulakönyvtárak, eljárás azok előállítására és alkalmazására.

Ismert, hogy a humán genom feltérképezése eredményeként több ezer új fehérje vár azonosításra. A fehérjék potenciális gyógyszerargetként való azonosítása az elkövetkező évek legfontosabb gyógyszerkutatási kihívása. Számos módszert dolgoztak ki, amelyek a genom által azonosított új fehérjék betegség állapottal való kapcsolatát állapítják meg, ilyen például az összehasonlító 2D elektroforézis (A. Görg, *Proteomics*, 2000, July 3), illetve az izotópos jelölés tömegspektrometriával kombinált módszerei. (S.P. Gygi et al, *Proteomics*, 2000, July 31).

A fenti módszerek számos esetben nem vezetnek eredményre, például kis koncentrációban jelenlévő fehérjék esetén, valamint a nagyszámú fehérje együttes elválasztása, detektálása és felbontóképessége és azonosítása is nehezen megoldható. Új technológiai megoldásokra továbbá a legfontosabb igényt az jelenti, hogy nem elegendő a betegségállapottal kapcsolatba hozható fehérjét azonosítani, hanem annak funkcióját befolyásolni képes kis molekulák felfedezése a gyógyszerkutatás valódi célja.

Kismolekulák kötődése egy adott fehérjéhez egyben annak gyógyszer célponttá (targettá) válását (drugability: gyógyszerelhetőség) is validálja azáltal, hogy kismolekula egyáltalán képes kötődni hozzá, továbbá kiegészítő expressziós vizsgálatokkal azt is bizonyítani lehet, a kötődés útján a betegségállapot befolyásolható-e, ami a fehérje funkcióját is igazolja (G. Dormán, et al. *Current Drug Discovery*, 2001, 1, 21-24). Ismert és ismeretlen ligandumok segítségével ismert ill. még azonosításra váró fehérjék affinitás alapú tanulmányozására és jellemzésére számos lehetőség nyílik a mellékelt mátrix alapján:

Fehérje

Ismert célfehérje Lehetséges célfehérje

Ismert
gyógyszer

Ligandum/
Szubsztrát

Gyógyszer
jelölt

•Pozitív kontroll validálásnál •Ismert kölcsönhatás •Új kölcsönhatás •Mellékhatás	•Ismert funkció, osztály azonosítása új fehérjében •Új kötő fehérje azonosítása •Új mechanizmus felismerése
•Új aktív vegyület felfedezés •Drugability (gyógyszerelhetőség) megerősítése	•Új kölcsönhatás felfedezése •Drugability (gyógyszerelhetőség) meghatározása

A kombinatorikus kémia kifejlődésével, ahol az építőköveket azok minden lehetséges kombinációjában csatlakoztatjuk egy központi szerkezeti elemhez, lehetőség nyílt nagy számú új kismolekula, illetve a korábban ismert hatásos gyógyszer-molekulák nagyszámú analógjainak előállítására.

E felismerés eredményeképpen új, illetve már ismert fehérjék hatékony azonosítása, osztályokba sorolása nagyszámú kismolekulával való affinitás alapú kölcsönhatáson keresztül az előbbi mátrix szerint tömegszerűen vált lehetségessé és ezt bioanalitika és bioinformatika robbanásszerű fejlődése is támogatta.

Mivel az affinitás alapú módszerek elsősorban az újonnan felfedezett gének által kódolt fehérjék azonosítását, illetve funkcionális validálását többnyire szintetikusan előállított szerves kismolekulák alkalmazásával végzik el; ezt az új megközelítést kémiai genomikának, illetve proteomikának nevezték el.

Egyébként az affinitás alapú módszerek fehérjék izolálására és azonosítására már korábban alkalmazást nyertek.

Az affinitás kromatográfiában kismolekulák cellulózhoz, illetve különböző polimerekhez kikötve ún. affinitás oszlopokat eredményeznek, amelyeken a fehérje keveréket keresztül áramoltatva azok a kismolekulákhoz való kötődési erősségüktől függően különböző sebességgel, elkülönülve távoztak az oszlopról.

A másik affinitás alapú módszernél az affinitás jelzésnél egy reaktív marker csoport által specifikus kémiai vagy fotokémiai reakció játszódik le, melynek eredményeként egy stabil kovalens kötés épül ki a fehérje és a ligandum között, aminek a legnagyobb előnye az, hogy az addukt stabil marad a fehérje denaturálását követően is és ezzel a ligandum és a ligandumhoz kapcsolódó jelhordozó (ún. riporter csoportok) a fehérjéhez (annak kötőhelyéhez) kapcsolt állapotban maradnak.

Valójában az affinitás jelzési technika lényegi eleme ez, és amennyiben a ligandum tartalmaz egy ún. riporter csoportot, egy címkét (jelzést) juttat célba a kovalens addukt képződése révén. Az ún. "riporter" szerkezeti egység vagy csoport lehet fluoreszcens, radioaktív, biotin, spin vagy más jelző egység. (A "riporter" csoport elnevezés arra utal, hogy ezen keresztül nyerhetünk információt konformációról, kötődésről, stb.).

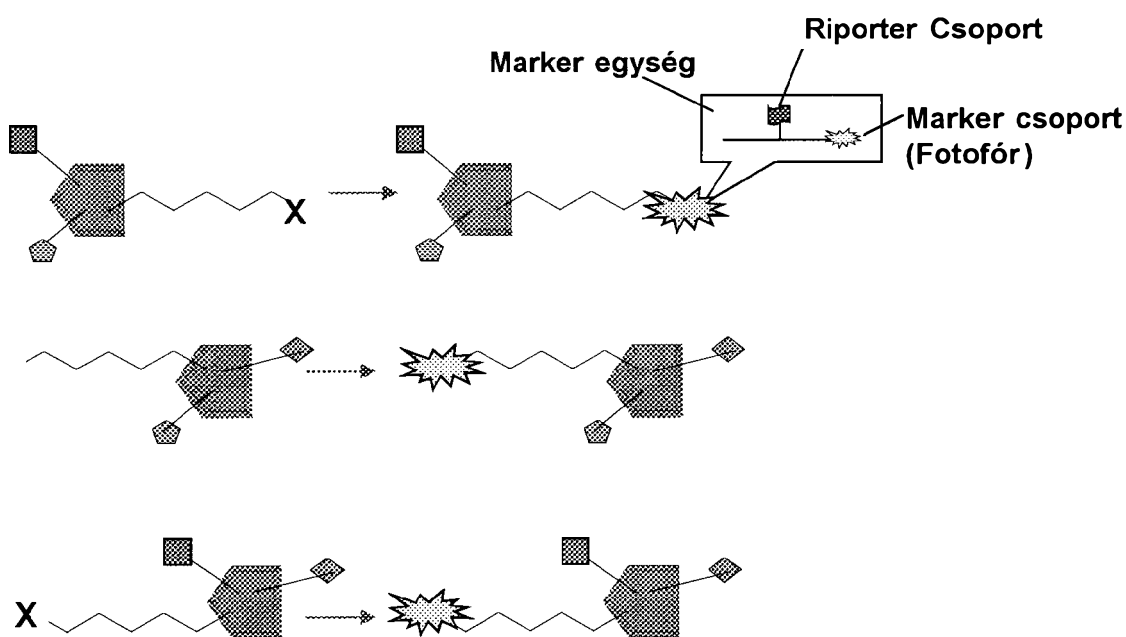
A kémiailag aktiválható csoportok (pl. aziridin, epoxid) esetén a ligandum vagy szubsztrát - még mielőtt kötési helyzetbe kerülne - gyakran elreagál nem-specifikus módon a nukleofilekkel.

A fotokémiailag aktiválható csoportok (fotofórok: pl. benzofenon, aromás azidok) elterjedése annak köszönhető, hogy távolról irányítható, 'tisztá reagensek' és számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek a pusztán kémiailag reaktív csoportokkal szemben. Így, „sötétben” stabilak és a biológiai nem-kovalens kötési helyzetben, csak a tanulmányozó beavatkozása (fénybesugárzás) hatására, jól időzíthető módon történik meg a kovalens kötést eredményező fotokémiai reakció. (Dormán Gy., Fénnyel aktiválható biológiailag hatékony vegyületek, Kémia Újabb Eredményei, 89. Kötet, Akadémiai Kiadó, 2001). Fontos feltétel, hogy a fehérjét kevésbé károsító hullámhosszú (>350 nm) fényirradiáció alkalmas legyen a gerjesztésre.

Normál esetben a kombinatorikus könyvtárak tervezésekor mind a kémiailag ill. mind a fotokémiailag aktiválható csoportok alkalmazását általában kerülik, éppen azon tulajdonságok miatt, hogy biológiai kötési helyzetben könnyen reagálnak a fehérjével.

Találmányunk azon a felismerésen alapul, hogy a kemogenomikai alkalmazásban a kombinatorikus könyvtárakat, ha megfelelő módon kémiai vagy fotokémiai affinitás jelző csoportokkal látjuk el, lehetőség nyílik nagy tömegű biológiai affinitás alapú információ gyors megszerzésére, kötési profilok meghatározására, célfehérjék gyors osztályba sorolására, kedvező esetben közvetlen azonosítására, nagyátersztőképességű biológiai szűrőrendszerekben való felhasználásra.

Meglepő módon a kombinatorikus marker könyvtárak előállításakor azt találtuk, hogy igen előnyös, ha a kémiaillag ill. fotokémiaillag reaktív marker csoportokat (pl. fotofórt) és a riporter csoportokat egy un. marker egységben csatlakoztatjuk a könyvtárhoz, egyetlen, párhuzamos, robotizálható lépésben az előre különböző diverzítású pontokban kiépített funkciós csoportokon keresztül. A funkciós csoport lehet közvetlenül a molekuláris hordozón vagy előnyösen egy un. kapcsoló oldallánc (pányva) végcsoportjaként helyezkedhet el.



A fentiek alapján a találmány tárgya kombinatorikus fehérjemarker molekula könyvtárak, amelyek egy közös molekuláris váz körül különböző térirányú pozíciókban egy oldalláncon keresztül kapcsolt módon kémiai vagy fotokémiai úton aktiválható csoportokat - riporter csoportokkal együtt vagy anélkül - tartalmaznak.

A találmány továbbá kombinatorikus marker egység könyvtár, amely kémiaileg vagy fotokémiaileg reaktív marker csoportokat, riporter csoportokat és különböző típusú oldallánccokat egy közös molekuláris-, előnyösen lizin-alapú, vázon variábilisen tartalmaz.

A találmány szerinti könyvtár marker-csoportokként benzofenon-, nitro-fenilazid-csoportokat, riporter-csoportként biotin-, fluoreszcens-csoportokat, valamint oldalláncként telített szénláncot, ill. polietilén-glikol egységeket tartalmaz.

A találmány továbbá kombinatorikus kémiai pányvázási eljárás, amely abban áll, hogy szerkezeti diverzitás, illetve fehérje-kötődési hatékonyság szempontjából optimális pozícióban helyezzük el az egy végcsoporttal, előnyösen amino csoporttal rendelkező oldalláncot, amelyhez, kívánt esetben marker egységet kapcsolunk.

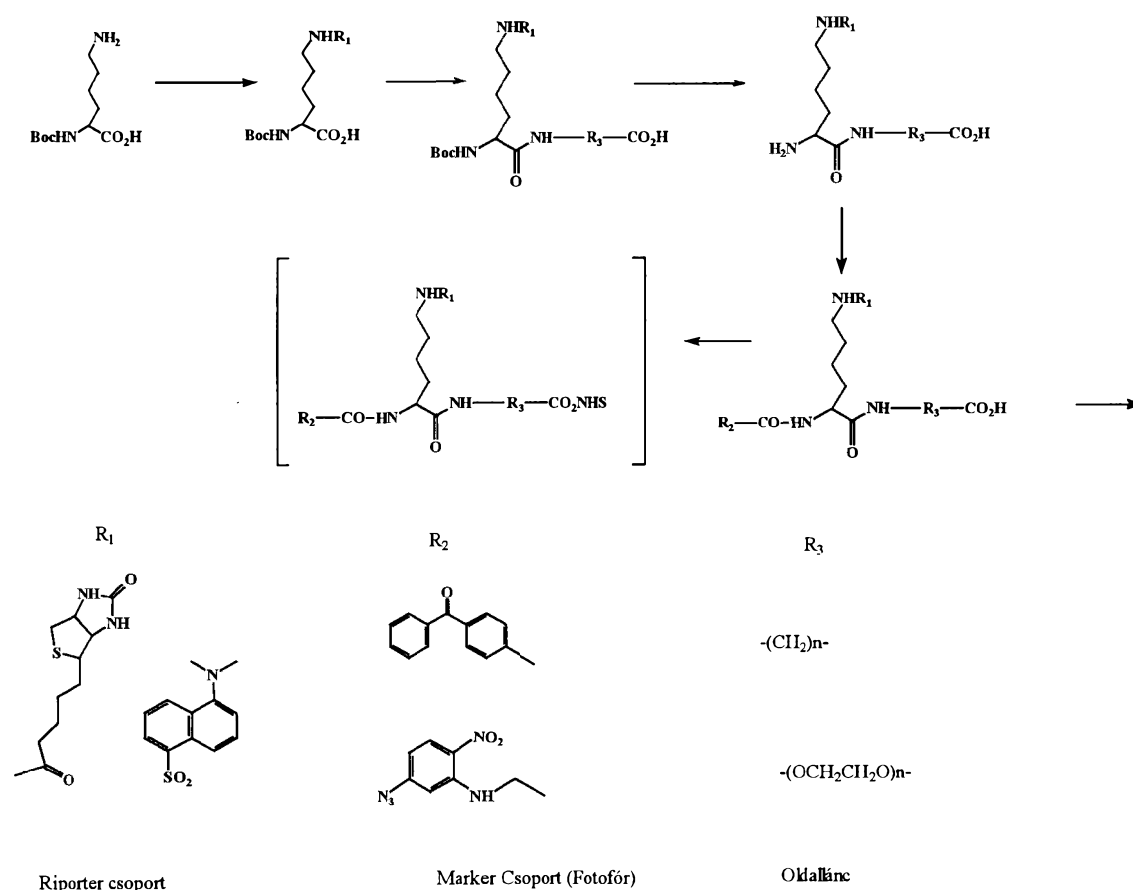
A találmány a fentiekben túlmenően pányvázott kombinatorikus könyvtárak alkalmazása nem-kovalens módon affinitás alapú biopolimer, előnyösen fehérje és kismolekula, így ligand, szubsztrát és mások kölcsönhatás-vizsgálatára közvetlen vagy szilárd hordozóhoz kötött formában, előnyösen affinitás kromatográfia vagy kémiai mikroarray, mikrochipek felhasználásával.

A találmány szerinti szilárd hordozóhoz kötött pányvázott vegyületek alkalmazhatók makromolekulák, előnyösen fehérje és kismolekula kölcsönhatás-vizsgálatára, olyan módon, hogy más technikával kialakított mikrochipekhez vagy mikroarraykhez rögzített molekulák vizsgálatára kidolgozott protein, DNS vagy bármilyen leolvasó chipek használatára kialakított protokollokban, eljárásokban használjuk.

A találmány ezen kívül robotizált parallel derivatizálási eljárás, amely abban áll, hogy az oldalláncot vagy közvetlenül a marker egységet a molekulakönyvtár intermedierjeihez kapcsoljuk.

A találmány továbbá HT analitikai módszer alkalmazása, amely alkalmas a kovalensen kötött fehérjék tömegspektrometriás módszerekkel való szekvenálására és ismert szekvencia adatbázisokkal való összehasonlításra.

Előnyösen ez egy lizin-alapú elágazó rendszert alkot, ahol a marker, és riporter csoportokat, valamint az oldallánc minőségét lehet variálni.



A találmány szerinti marker könyvtárak kombinatorikus affinitás ligandumok tervezésére is alkalmasak. Megállapítottuk, hogy az alábbiakat kell biokémiai szempontból figyelembe venni az affinitás ligandumok tervezésénél:

1. Az affinitás alapú próbavegyületek kötődése várhatóan ugyanazon a helyen következzen be, mint az azt nem tartalmazó módosítás nélküli vegyületek esetén, és biológiai aktivitásuknak legalább egy nagyságrendben kell lennie azzal;
2. A kovalens kötés kialakítása és az azzal járó irreverzibilis aktiválás vagy inaktíválás legyen arányos a riporter csoport által közvetített jel intenzitásával azaz a kötőfehérjén kívül minimális legyen a nem-specifikus jelzés.
3. Fotokémiai aktiválás esetén a fény gerjesztési hullámhossz ne károsítsa a fehérjét azaz ne legyen kisebb, mint 320 nm, valamint ezen a hullámhosszon a $\epsilon_{\max}$ (moláris extinkciós tényező) értéke magas legyen.
4. A kovalens addukt stabil legyen a kémiai és enzimatisz fehérje fragmentálás körülményei között. Ez az alkalmazott kémiai vagy fotokémiai reaktív csoportok sajátos mechanizmusában rejlik.
5. A fehérje kovalens módosítása legyen lehetőség szerint valamilyen mértékben pont-ill. régió szelektív, ami egy vagy két szomszédos aminosav jelzésével egyetlen módosított vagy jelzett fehérje fragmenset szolgáltat, és ez a fehérje azonosítását megkönnyíti, az MS alapú szekvencia azonosítása ill. a szekvencia adatbázisokkal való összehasonlítása által.

A találmány szerinti affinitás jelzés során a célfehérjét tartalmazó szövetpreparátumot inkubáljuk rövid ideig a ligandummal. Kémiailag aktiválható csoportok esetén a keresztkötés közvetlenül kialakul, míg fotoreaktív csoportok esetén, ha ezt "sötétben" végezzük az így kialakuló nem-kovalens kötést a fényérzékeny csoportnak megfelelő hullámhosszú lámpával megvilágítva játszódik le az adott csoportra jellemző fotokémiai reakció és irreverzibilis kötés épül ki a receptor és a ligandum között. Ez a kötés a riporter csoport által detektálható többféleképpen:

Mivel a ligandummal együtt a megfelelő riporter csoport is beépül a fehérjébe, (a kötőhely régiójába), így az aktivitást nem mutató polipeptidektől könnyen megkülönböztethetjük a ligandum kötő fehérjét/fehérjéket.

Biológiai jellegű riporter csoportok a detektáláson kívül alkalmasak elválasztásra is pl. biotin egységet tartalmazó fehérje – ligandum adduktot avidin affinitás oszlopon könnyen elkülöníthetők. Az elkülönített fehérjéket enzimatis ill. kémiai módszerekkel kisebb szakaszokra bonthatjuk, amelyeket vagy tömegspektrometriás vagy klasszikus szekvencia analízisnek vetjük alá. Amennyiben a kötőhelyet tartalmazó fehérje fragmens ismert, akkor jelzés nélkül közvetlenül az MS fragmentációs mintázatból (fingerprint) lehet meghatározni a kötőhely pontos helyét elhelyezkedését.

A találmány szerinti kémiai vagy fotokémiai reaktív alakított ligandumokkal való affinitás alapú kölcsönhatási kísérlet 5 szinten nyújt információ:

- Azonosít egy fehérje- ligandum kölcsönhatást egy adott lizátumban, szövetpreparátumban, ahol a ligandummal interakcióba lépő fehérje lehet ismert vagy ismeretlen funkciójú, de szekvenciája azonosítható a humán génállomány DNS szekvencia adatbázisai által,
- Azonosítani lehet a fehérjén belül a kötőhelyet tartalmazó régiót,
- Azonosítani lehet a fehérjén belül a kötőhely aminosav sorrendjét, több nézetből is, ami alapján a kötőhely minimum aktív fragmense meghatározható,
- Irreverzibilis aktiválás ill. inaktiválás által azonosítani lehet kedvező esetben a fehérje funkcióját, szerepét a sejtek közötti ill. sejten belüli kémiai kommunikációban,
- Adott fehérje kifejeződési (expressziós) szintjének megállapítására alkalmas betegség állapotban ill. egészséges állapotban,
- nem funkcionális, transzport folyamatok jellemzése pl. efflux pumpák (MDR).

A találmány szerinti megoldásban a reaktív marker csoportokat/ egységeket kapcsoljuk a várhatóan biológiailag aktív vegyülethez. Mint ismert, az affinitás jelző analogonok egy csoportjában (un. exo-típusú pányvázott ligandumok esetében; elnevezést lásd: Baker: *Design of Active Site Directed Irreversible Enzyme Inhibitors*, 1967, John Wiley & Sons, Inc.:New York.) a fényérzékeny csoport egy oldalláncon át kapcsolódik a ligandumhoz, ez a módszer a receptor elkülönítésénél előnyös. Míg olyan esetekben, amikor a reaktív csoport a farmakofór része mimikálva annak szerkezeti egységeit, a receptor kötőhely pontos feltérképezése (“mapping”) válik lehetségessé (endo-típus). Az exo-típusú affinitás próbavegyület esetében a reaktív csoportot távol a

farmakofórtól sztérikusan flexibilis helyen kell bevezetni, hogy ne változtassa meg a vegyület konformációját.

A találmány szerinti reaktív marker próbavegyületek szintézisének az alábbiakat kell figyelembe venniük:

1. A marker könyvtár elemek szintézise során (pl. a marker egység kapcsolása a pányvázott könyvtárhoz) a kémiai reaktív csoport, ill. fotoför nem szenvedhet bomlást, így előnyösen egy stabil prekursorát alakítjuk ki vagy építjük be a molekulába és a reakciósor utolsó lépésében alakítjuk át fotoreaktív csoporttá (lineáris megközelítés);
2. A reaktív csoportot vagy prekursorát legegyszerűbben közvetlenül a természetes ligandum egy meglévő funkciós csoportjához kapcsolhatjuk (endo-típus), ill. egy egyszerű csoport közvetlen hozzátoldásával alakíthatjuk ki a fotoreaktív csoportot (szemi-szintetikus megközelítés, pl. aromás gyűrű direkt benzoilezésével nyerhetünk helyettesített benzofenont).
3. Megfelelő funkciós csoport hiányában előnyösen egy nukleofil csoportot vezetünk be a molekulába oldalláncon keresztül "pányva" vagy anélkül és ehhez kapcsoljuk utolsó lépésben a fotofort tartalmazó szintont vagy heterobifunkcionális reagenssel (konvergens megközelítés).

Találmányunk esetében ez utóbbi megoldás, mind szintetikus, párhuzamosítási, mind pedig tervezési okokból a legelőnyösebbnek tűnik.

Sztérikusan nagyméretű reaktív marker egységek (pl. benzofenon fotoför) még ilyen helyzetben is komoly befolyással lehetnek a molekula egészének konformációjára és a biológiai aktivitására. Ekkor célszerűen a molekula szabadon változtatható szerkezeti egységéhez egy kis teret elfoglaló oldallánc ("pányva", tether) kapcsolható, ami egy funkcionálásra alkalmas végcsoportot tartalmaz. Erre a "pányvára" lehet azután "rákötni" a reaktív vagy fotoreaktív csoportot előnyösen a riporter csoporttal együtt, amely így egy külön marker egységet alkot. Az előbb vázolt "pányvázott" ligandum módszer további nyilvánvaló előnye, hogy az oldalláncon át szilárdfázisú hordozóhoz is köthető a bioaktív ligandum és a kötőfehérje előtisztítására nyílik lehetőség a későbbiekben affinitás kromatográfia segítségével.

A találmány szerinti affinitás alapú marker könyvtárak készítésénél figyelembe kell venni az alábbiakat:

Fotoaffinitás és más affinitás alapú biokonjugációs technikák szükségessé teszik a gondos tervezést, modellezést annak érdekében, hogy a biológiai aktivitás fenn maradjon. A pányvázott kismolekula könyvtárak esetén a szintézis tervezés során a legfontosabb feladat olyan funkciós csoportok kiépítése a molekuláris váz különböző diverzitású pontjain, amihez közvetlenül vagy egy további oldalláncon keresztül a marker egységet kapcsolni lehet a szintézis lehetőleg utolsó lépésében. A szintézis tervezésnél tehát olyan bifunkcionális vagy maszkírozott kémiai reagenseket (építőelemeket) kell standard reagens készletbe bevenni, amely ilyen vegyületeket eredményez. Így az előállítás párhuzamosítható és robotizálható.

A biológiai aktivitás változatlanul tartása érdekében a pányva elhelyezésének megállapítása 3 módon lehetséges akkor, ha ismert fehérjén kívánunk tesztelni analóg molekulákat:

Az irodalomban ismert hasonló affinitás próbavegyületek vagy affinitás kromatográfiás tapasztalatokból kiindulva vagy QSAR adatok ill. 3D dokkolási eredmények alapján, amennyiben fehérje 3D szerkezete ismert.

Nagyobb valószínűséggel talál elérhető funkciós csoportot a gerjesztett fotoför, ha flexibilis alkil oldallánchoz kapcsolódik (un. "pányvához", lásd később).

A találmány szerinti eljárásban alkalmazott kapcsoló oldallánc szerepét az alábbiakban elemezzük:

A kapcsoló oldallánc ("pányva") flexibilitása komolyan befolyásolja az affinitás jelzés sikerét. Választása függ a kitűzött céltól és a feltételezett célfehérje sajátosságaitól. A rigid vagy flexibilis linker választása általában két egymás ellen ható tényező kompromisszumát jelenti. Flexibilis és hosszabb oldallánc növeli a szabadsági fokot és nagyobb esélyt ad kovalens kötés kialakítására, bár a jelzés helye így távolabb kerülhet a kötőhelytől, valamint a többszörös támadási ponttal is számolhatunk. Túl rövid "pányva" esetén a ligandum konformációjától függően a fotoreaktív csoport esetleg mélyen beágyazódik a ligandum funkciós csoportjai közé és nem képes hatékony jelzésre, valamint intramolekuláris reakció is elképzelhető. Merev "pányva" várhatóan pont-

szelektíven jelöl egyetlen aminosavat, bár a hatékonyság várhatóan alacsonyabb, hiszen a reagáló fehérje részek elérési valószínűsége a flexibilitással arányos.

Összegezve; a "pányva" flexibilitása és hossza a kitűzött céltól nagymértékben függ. Új ismeretlen receptor fehérje azonosításánál, (mint pl. a természetes anyagok esetén) egy hosszabb, flexibilis oldallánc a megfelelőbb. Más esetekben, amikor a receptor térbeli feltérképezése az elsődleges cél, egy merev, ismert méretű oldallánc adhat valódi információt. Ezutóbbi esetben célszerű a fotoreaktív csoportot a bioaktív ligandum több különböző helyzetében is kipróbálni, azaz több különböző "nézetből" is vizsgálni a kovalens kötés létesítésének regiospecifitását és eredményességét.

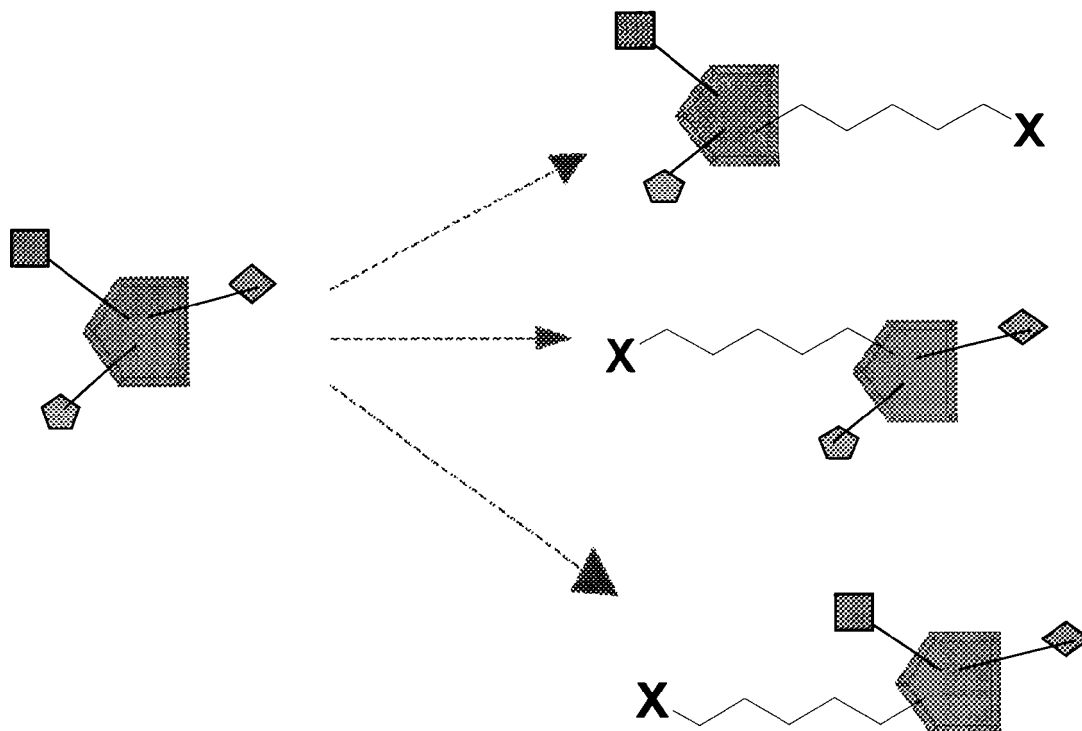
A flexibilis kapcsoló oldallánc hidrofilitásával vagy hidrofóbicitásával a hozzákapcsolódó fotoreaktív csoport különböző fehérje régiók felé irányítható. Membránba ágyazódott fehérjeszakaszok jelzésére a hidrofób jellegű "pányvát" célszerű választani (kivéve ion-csatorna esetét), míg a receptor intercelluláris szakaszain hidrofíll oldallánc alkalmazása előnyös. Ez utóbbi az affinitás ligandum általános vízdoldhatóságát is növeli.

A találmány szerinti megoldás legfőbb előnye, hogy a pányvázott kombinatorikus könyvtár jó termeléssel állítható elő. Fontos körülmény az is, hogy robotizálható körülmények között, azaz a ligandum/ könyvtár funkcionális ill. "pányvázás" a ligandum/ könyvtár ismert és hatékony szintézissorának minimális módosításával megvalósítható.

A találmány egy előnyös változatában a marker csoportokat kombinatorikus megközelítéssel (marker könyvtárak) hozzuk létre. Így; ismeretlen fehérje ill. kismolekula család esetén, ahol nincs a fentieknek megfelelő információnk a kombinatorikus megközelítést alkalmazhatjuk, aminek eredményeként a pányvát a molekuláris váz különböző pontján helyezzük el a diverzitást (szerkezeti különbséget) hordozó helyzetekben.

Új kombinatorikus könyvtárakhoz kapcsolt kémiai vagy fotomarker egységekkel meghatározhatjuk a vegyületek gyógyszerelhetőségét ("drugability") valamint egy lépésben lehet azonosítani egy fehérje targetet valamint a hozzákötődő biológiailag aktív ligandumot/ szubsztrátot.

A találmány szerinti kombinatorikus kémiai könyvtárak tipikusan 3 vagy 4 variálható pontot tartalmaznak, amelyek általában a tér különböző irányába mutatnak.



A könyvtárak egy megfelelő kisebb reprezentatív csoportjában a variálható pontokon elhelyezhetünk a reaktív marker csoportokat, oly módon, hogy az minimális mértékben befolyásolja csak a módosítatlan vegyület várható biológiai aktivitását.

A találmány előnyeit az alábbiakban foglaljuk össze:

A kombinatorikus könyvtárak nagy kapacitású, párhuzamos derivatizálása kovalens kötést eredményező származékokká (előnyösen fotoreaktív csoportokkal), valamint affinitás jelzési kísérletet és detektálást nagy áteresztőképességűvé téve számítógépes adatfeldolgozással kiegészítve egy gyors fehérje profilizációs módszerként alkalmazható, ami lehetőséget ad a megjelölt fehérjék detektálására és elválasztására, továbbá azok szerkezet alapú, szekvenciális vagy funkcionális jellemzésére, osztályba sorolására.

A módszer kifejleszthető riporter csoport nélkül is egységes előnyösen rekombináns fehérjék alkalmazása esetén tömegspektrometria (MS) alkalmazásával, egy ún. fotoför MS ujjlenyomatok (fingerprintek) keresése által. Ez esetben olyan

(foto)kémiai aktiválható csoport alkalmazása szükséges, amely jellegzetes MS fragens mintát ad.

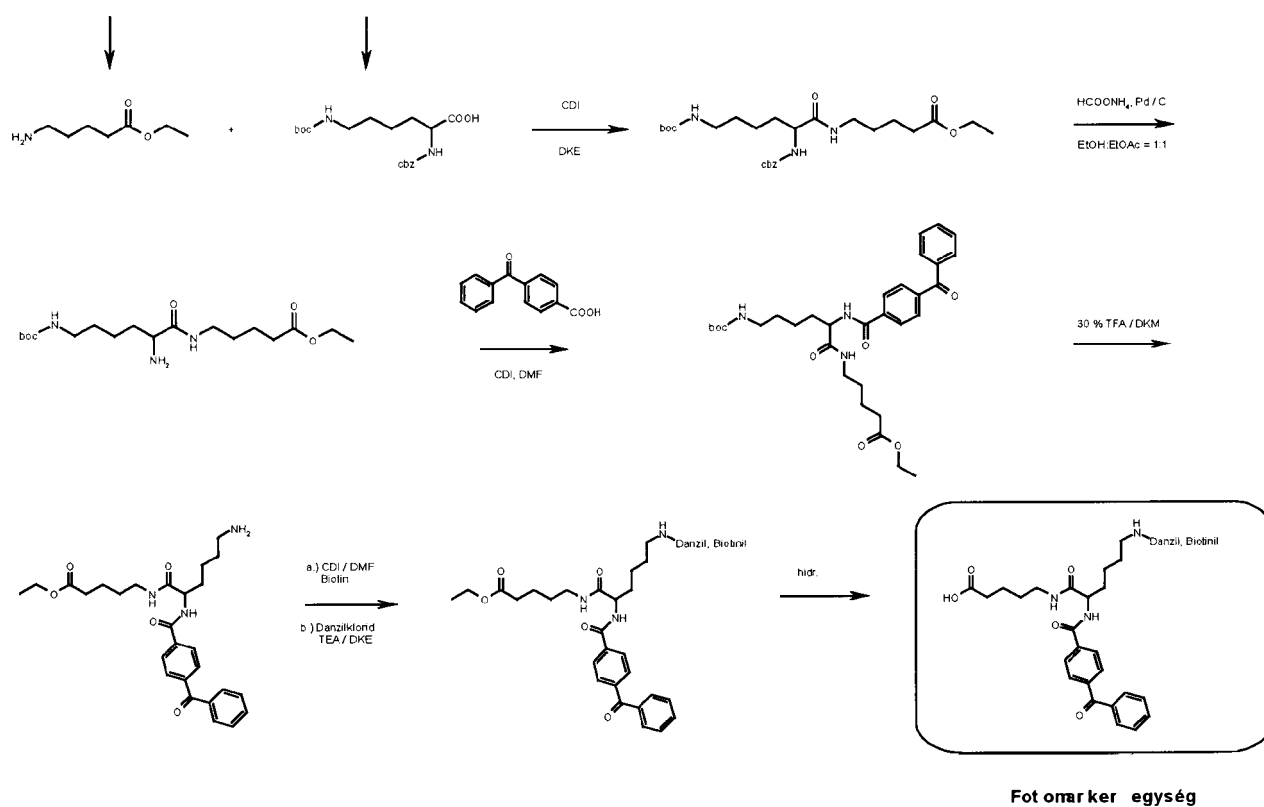
A találmányt az alábbi példákon mutatjuk be, anélkül, hogy találmányunk oltalmi körét csak ezekre korlátoznánk:

Példák:

1. példa

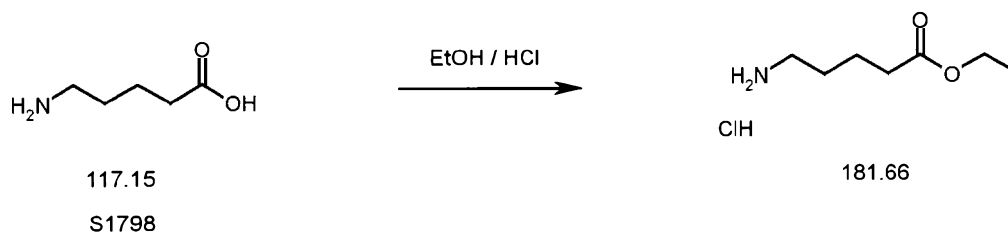
Benzofenon-biotin és benzofenon-danzil fotomarker-egység szintézise

Reakcióséma:



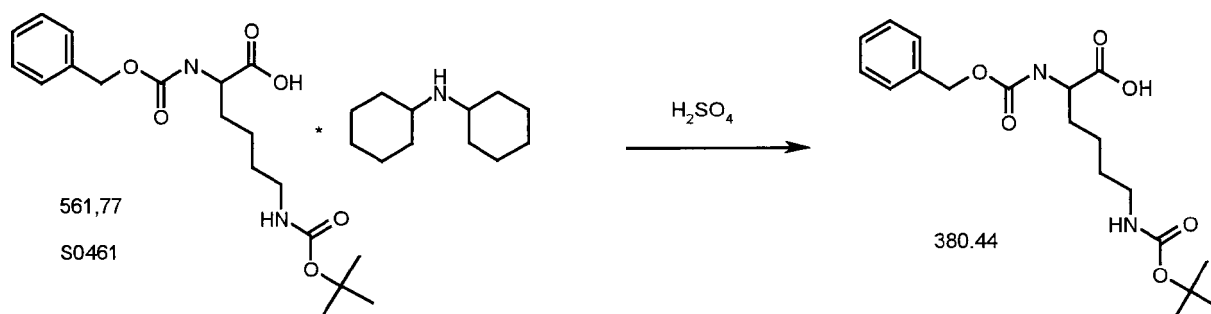
A./ Alapanyag előállítása:

5-aminovaleriánsav dietilészter hidroklorid:



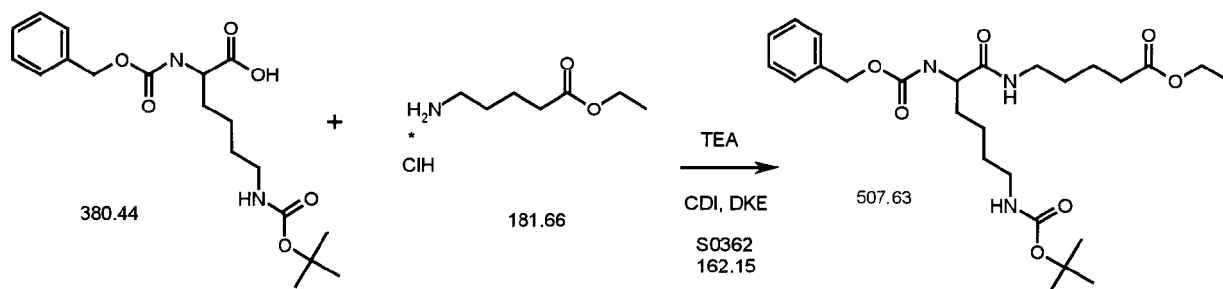
5 g (42,7 mmól) 5-aminovaleriánsavat oldunk kb. 40 ml sósavas etanolban, és szobahőfokon kevertetjük 2-3 órán keresztül. VRK: CHCl_3 : MeOH = 4:1, R_f : 0.3. Ha a kiindulási anyag elfogyott, a reakcióelegyet rotán bepároljuk, a kapott olajos terméket sósavas éterrel kristályosítjuk, szűrjük, éterrel mossuk. Termelés: 85-95%.

Cbz-Boc-lizin:



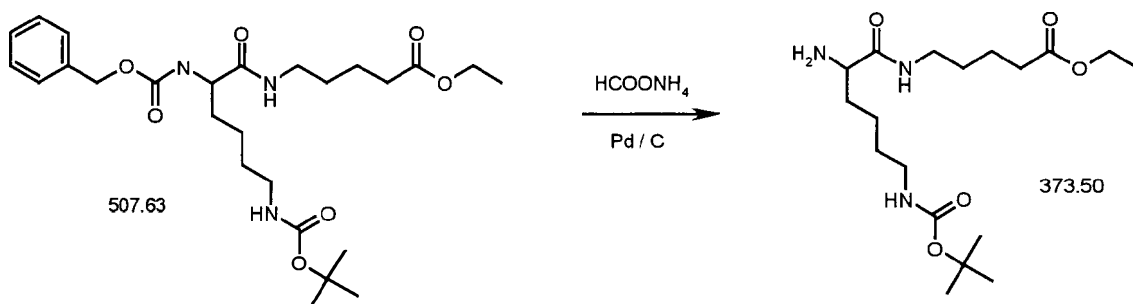
10 g (17.8 mmól) kiindulási diciklohexilaminsót 2 ekv. cc. H_2SO_4 és kb. 40 g jég elegyével kevertetjük jeges vizes hűtés mellett 1.5-2 órán keresztül. VRK: CHCl_3 : MeOH = 4:1, R_f : 0.7, a termék és a kiindulási anyag R_f -je megegyezik, jódozva látszik a különbség. A reakcióelegyet etilacetáttal 3-szor extraháljuk, a szerves fázist szárítjuk, bepároljuk. Termelés: gyakorlatilag 100 % (Mivel az olajos termékről nehéz maradék nélkül az etilacetátot eltávolítani, mindig túlsúlyt mérünk.)

1. Lépés: Cbz-Boc-lizin kapcsolása 5-aminovaleriánsav dietilészter hidrokloriddal



6.25 g (16.4 mmól) Cbz-Boc-lizint oldunk 50 ml diklóretánban (HPLC minőségű), hozzáadunk 1,05 ekv. CDI-t és fél órát kevertetjük szobahőmérsékleten (CaCl₂ cső), majd hozzáadunk 2 ekv. trietilamint és 1 ekv. 5-aminovaleriánsav dietilészter hidrokloridot. A reakcióelegyet 12 órán keresztül kevertetjük szobahőmérsékleten. VRK: CHCl₃ : MeOH = 4:1, R_f: 0.8. Feldolgozás: extrakció 1-szer 1%-os citromsav vizes oldatával, egyszer 5%-os NaHCO₃ oldattal és egyszer desztillált vízzel. A szerves fázist szárítjuk, bepároljuk. Termelés: 53-75 %.

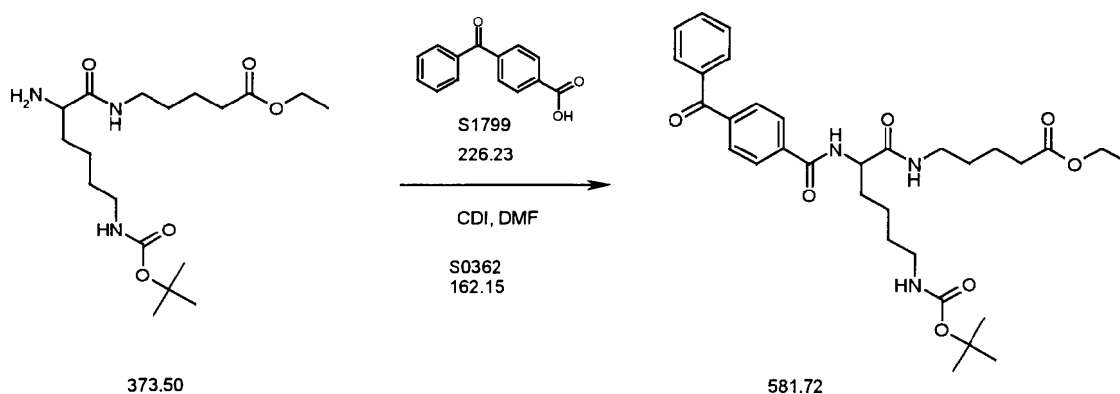
2. Lépés: Cbz védőcsoport eltávolítása



4.9 g kiindulási anyagot (1. lépés termékét) oldunk 100 ml etilacetát : etanol 1:1 arányú elegyében, hozzáadunk 4 ekv. ammónium-formiátot és 10 tömeg %-nyi (kiindulási anyagra számolva) palládium csontszén. A reakcióelegyet 4 órán keresztül refluxoltatjuk. Ha a kiindulási anyag elfogyott, hűtés után a reakcióelegyet celiten átszűrjük, a szűrőréteget diklórmetánnal mossuk, és az összegyűjtött szerves fázisokat bepároljuk. A bepárolt nyersterméket diklórmetánban feloldjuk és egyszer desztillált vízzel kirázzuk, a szerves fázist szárítjuk, bepároljuk.

VRK: diklórmetán : etanol = 5:1, R_f : 0.2. Termelés: 60-90 %.

3. Lépés: kapcsolás benzoil-benzoésavval



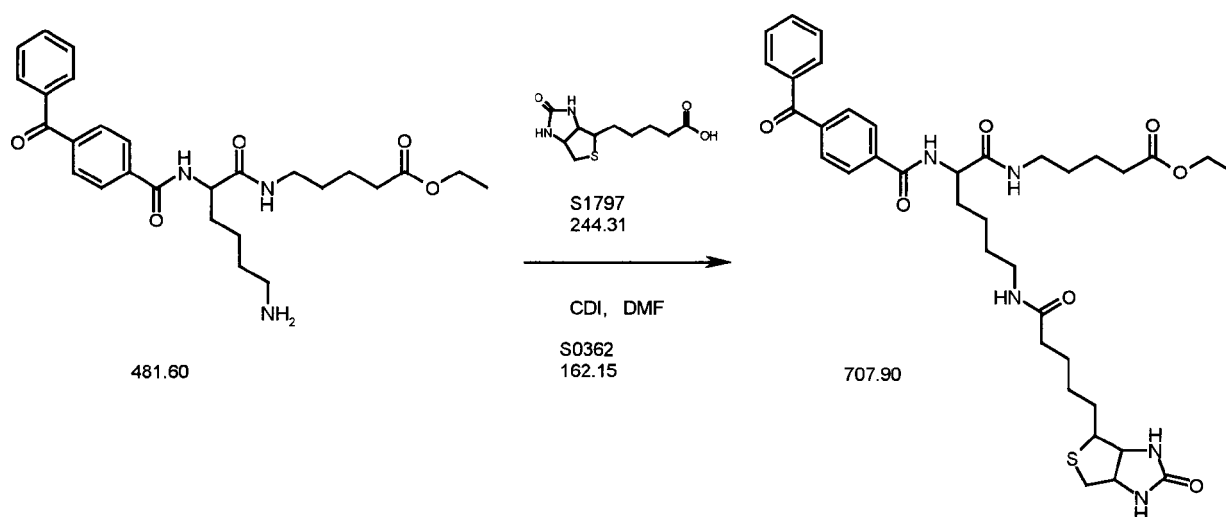
A kiindulási anyagra (második lépés terméke) számított 1 ekv. 4-benzoil-benzoésavat, (ebben az esetben 1.99 g, 8.8 mmól) oldunk 20 ml DMF-ben (jó minőségű, szilikán átszűrt) és hozzáadunk 1.05 ekv. CDI-t. 1 óra keverés után hozzáadunk 3.3 g (8.8 mmól) kiindulási anyagot (második lépés termékét) majd a reakcióelegyet 20 órán keresztül kevertetjük. Feldolgozás: a reakcióelegyet bepároljuk, a kapott nyersterméket diklórmetánban feloldjuk és extraháljuk 1-szer 1%-os citromsav vizes oldatával, egyszer 5%-os NaHCO_3 oldattal és egyszer deszt.vízzel. A szerves fázist szárítjuk, bepároljuk.

VRK: CHCl_3 : MeOH = 4:1, R_f : 0.8.

Termelés: 76 %.

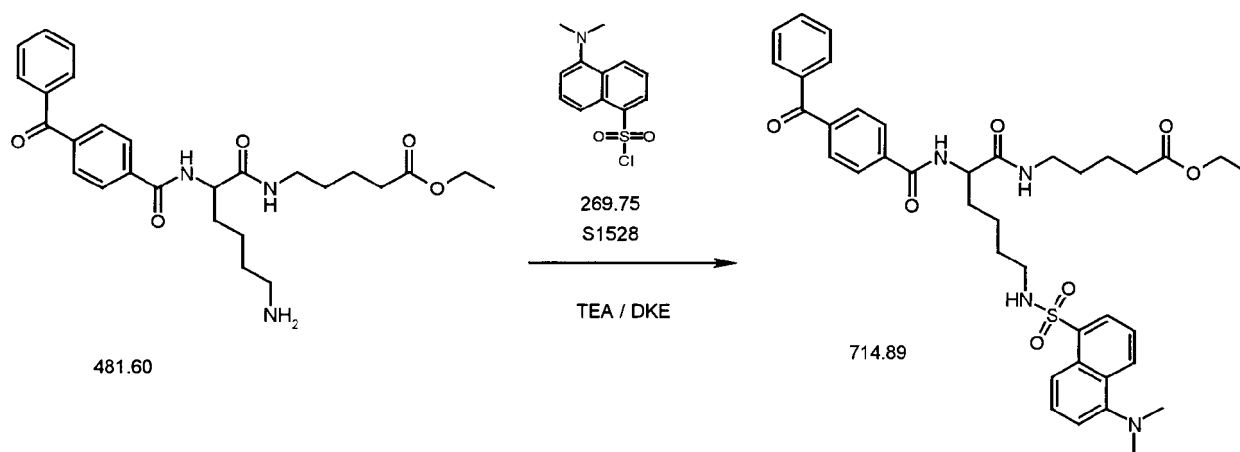
Megjegyzés: ha a termékből nem folytatjuk a következő lépést, akkor még az első bepárlás után kapott trifluoracetát só formában eltartható bomlás nélkül, s a következő lépés előtt közvetlenül felszabadítható a szabad amin.

5.a. Lépés: kapcsolás biotinnal



A kiindulási anyagra (előző lépés terméke) számított 0.8 ekv., jelen esetben 1.11 g biotint oldunk 30 ml DMF-ben 80 °C-on majd hozzáadunk 0.8 ekv. (kiindulási anyagra) CDI-t. A reakcióelegyet a pezsgés befejeztéig 80 °C-on tartjuk (kb. 10 perc), majd hagyjuk lehűlni s összesen 2 órán keresztül kevertetjük. Ezután hozzáadjuk a kiindulási anyag 30 ml DMF-es oldatát, és a reakcióeleget további 20 órán keresztül kevertetjük. Feldolgozás: a reakcióelegyet bepároljuk, a maradékot diklórmétánban felfuszpendáljuk, szűrjük, 1-szer diklórmétánnal mossuk, majd 1%-os citromsavval, 5%-os NaHCO₃ oldattal s végül 2-szer desztvízzel. VRK: CHCl₃ : MeOH = 4:1, R_f: 0.6. Termelés: 50 %.

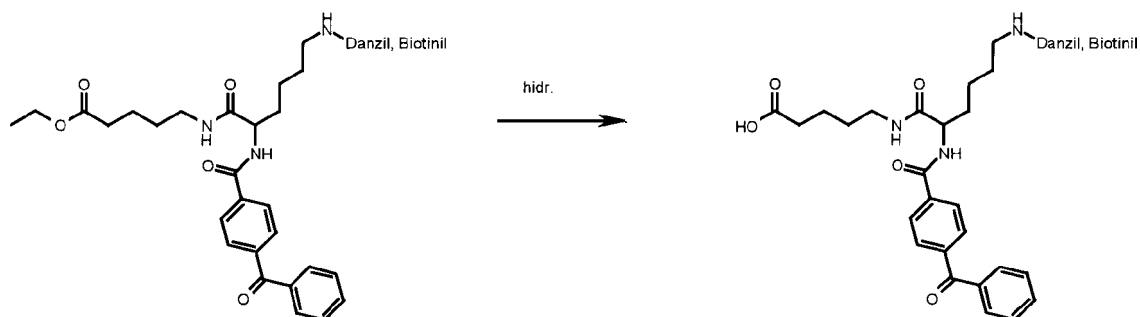
5.b. Lépés: kapcsolás danzilkloriddal



1.5 g (3.1 mmól) kiindulási anyagot oldunk 20 ml diklóretánban, majd hozzáadunk 2 ekv. trietilamint és 1 ekv. danzilkloridot. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertetjük több órán keresztül. Ha a kiindulási anyag elfogyott, a reakcióelegyet egyszer 1%-os citromsavval, majd kétszer deszt.vízzel extraháljuk, a szerves fazist szárítjuk, bepároljuk. A terméket n-hexánnal kristályosítjuk. VRK: hexán : etilacetát = 10:1, R_f : 0.3. Termelés: 80 %.

6.a. és 6.b. Lépés: hidrolízis

A következő recept egyaránt jó mind a biotinos mind a danzilos anyagra:



Fotomarker egység

1 g kiindulási anyagot 10-15 ml etanolban oldunk és hozzáadunk 2 ekv. 1N NaOH oldatot. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertetjük amíg a kiindulási anyag elfogy. VRK: a danzillal szubsztituált származéknál $DKE : EtOH = 5:1$, a biotinnal szubsztituált származék esetében: $CHCl_3 : MeOH = 4:1$. Feldolgozás: a reakcióelegyről az etanolt rotán lepároljuk, majd 5%-os sósavval megsavanyítjuk. A kivált kristályokat szűrjük, vízzel mossuk.

Termelés: 90 %.

2.példa

Aminok kapcsolása a benzofenon-biotin egységhez

Az un. benzofenon-biotin fotomarker egységet $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on DMF ben oldjuk (0.2 mmólt 2-3 ml-ben) majd hozzáadunk 1 ekv. CDI-t és egy órán keresztül kevertetjük, közben a reakcióelegyet hagyjuk kihűlni. Ezután hozzáadunk 1 ekv. primer vagy szekunder amin reagenst, és 20 órán keresztül szobahőfokon kevertetjük. Ezután a reakcióelegyet bepároljuk, a maradékot felvesszük kloroformban amit 1%-os citromsavval, 5%-os $NaHCO_3$ oldattal majd desztvízzel extrahálunk. A szerves fázist szárítjuk, bepároljuk. További tisztítást preparatív HPLC-vel végzünk.

3.példa

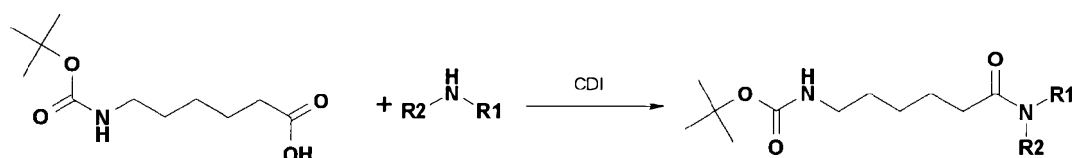
Aminok kapcsolása a benzofenon-danzil egységhez

Az un. benzofenon-danzil fotomarker egységet diklóretánban oldjuk (0.2 mmólt 2-3 ml-ben) majd hozzáadunk 1 ekv. CDI-t és egy órán keresztül kevertetjük. Ezután hozzáadunk 1 ekv. primer vagy szekunder amin reagenst, és 20 órán keresztül szobahőfokon kevertetjük. Ezután a reakcióelegyet diklórmétánnal rázótolcsérbe mossuk és 1%-os citromsavval, 5%-os $NaHCO_3$ oldattal majd deszt.vízzel extraháljuk. A szerves fázist szárítjuk, bepároljuk. További tisztítást preparatív HPLC-vel végzünk.

4.példa

Tetherálási receptek

1. Aminok kapcsolása 6-Boc-aminokaprónsavval



1 mmol 231 mg 6-boc-aminokaprónsavat 5 ml diklóretánban (Romil SPS tisztaságú) oldunk majd hozzáadunk 1.05 mmol 170,1 mg 1,1-karbonil-diimidazolt. A pezsgés befejeződése után (kb.0.5-1 h) hozzáadunk 1.05 eqv. amint. A reakció előrehaladását vékonyréteg kromatográfiásan diklóretán : etanol 5:1 elegyben követjük majd jódban előhívjuk. Ha a reakció lement a reakcióelegyet extraháljuk 3%-os HCl oldattal, 5%-os Na₂CO₃ oldattal, majd vízzel. Az anyag tisztaságát vékonyréteg kromatográfiával ellenőrizzük. Szükség esetén az extrakciót megismételjük. A szerves fázist bepároljuk majd továbbvisszük a következő lépésre.

2. Védőcsoport hasítás



Az előző lépésben kapott Boc védett aminosavamidot 2 ml diklórmétánban oldjuk. Jeges vízben hűtjük és a diklórmétánnal azonos mennyiségű trifluorecetsavat csepegtetünk bele. A reakció előrehaladását vékonyréteg kromatográfiásan diklóretán-etanol 5:1 elegyben követjük. Ha a kiindulási anyag elfogyott (kb. 1 h) a reakcióelegyet rotadeszten

bepároljuk, vízben felvesszük, éterrel extraháljuk a kiindulási anyag esetleges maradékát, a vizes fázist 20%-os nátrium-karbonát oldattal lúgosítjuk majd diklórmétánnal kiextraháljuk a terméket. A szerves fázist magnézium szulfáton szárítjuk majd rotadeszten bepároljuk.

Szabadalmi igénypontok

1. Kombinatorikus fehérjemarker molekula könyvtárak, azzal jellemezve, hogy egy közös molekuláris váz körül különböző térirányú pozíciókban egy oldalláncon keresztül kapcsolt módon kémiai vagy fotokémiai úton aktiválható csoportokat - riporter csoportokkal együtt vagy anélkül - tartalmaznak.
2. Kombinatorikus marker egység könyvtár, azzal jellemezve, hogy kémiai vagy fotokémiai reaktív marker csoportokat, riporter csoportokat és különböző típusú oldallánccokat egy közös molekuláris-, előnyösen lizin-alapú, vázon variábilisen tartalmaz.
3. A 2. igénypont szerinti könyvtár, azzal jellemezve, hogy marker-csoportokként benzofenon-, nitro-fenilazid-csoportokat, riporter-csoportként biotin-, fluoreszcens-csoportokat, valamint oldalláncként telített szénláncot, ill. polietilén-glikol egységeket tartalmaz.
4. Kombinatorikus kémiai pányvázási eljárás, azzal jellemezve, hogy a szerkezeti diverzitás, illetve fehérje-kötődési hatékonyság szempontjából optimális pozícióban helyezzük el az egy végcsoporttal, előnyösen amino csoporttal rendelkező oldalláncot, amelyhez, kívánt esetben marker egységet kapcsolunk.
5. Pányvázott kombinatorikus könyvtárak alkalmazása nem-kovalens módon affinitás alapú biopolimer, előnyösen fehérje és kismolekula, így ligand, szubsztrát és mások kölcsönhatás-vizsgálatára közvetlen vagy szilárd hordozóhoz kötött formában, előnyösen affinitás kromatográfia vagy kémiai mikroarrayk, mikrochipek felhasználásával.
6. Az 5. pont szerinti szilárd hordozóhoz kötött pányvázott vegyületek alkalmazása makromolekulák, előnyösen fehérje és kismolekula kölcsönhatás-vizsgálatára, azzal jellemezve, hogy más technikával kialakított mikrochipekhez vagy mikroarraykhoz rögzített molekulák vizsgálatára kidolgozott protein, DNS vagy bármilyen leolvasó chipek használatára kialakított protokollokban, eljárásokban használjuk.

7. Robotizált parallel derivatizálási eljárás, azzal jellemezve, hogy az oldalláncot vagy közvetlenül a marker egységet a molekulakönyvtár intermedierjeihez kapcsoljuk.
8. HT biológiai teszt alkalmazása, amely szövetkeverékből nagyszámú minta párhuzamos affinitás jelzését teszi lehetővé, beleértve a kovalensen kötött fehérjék detektálását, elkülönítését.
9. HT analitikai módszer alkalmazása, amely alkalmas a kovalensen kötött fehérjék tömegspektrometriás módszerekkel való szekvenálására és ismert szekvencia adatbázisokkal való összehasonlításra.



ComGenex Rt.

ComGenex Kutató-Fejlesztő Rt.

nyílt vállalat

2004. 01. 26

TK