**Тема: Методи встановлення структури індивідуальних компонентів бібліотек.**

План

1. Індексні бібліотеки.
2. Ітераційна процедура розпізнавання речовин.
3. Позиційне сканування. Перспективи розвитку комбінаторного синтезу.

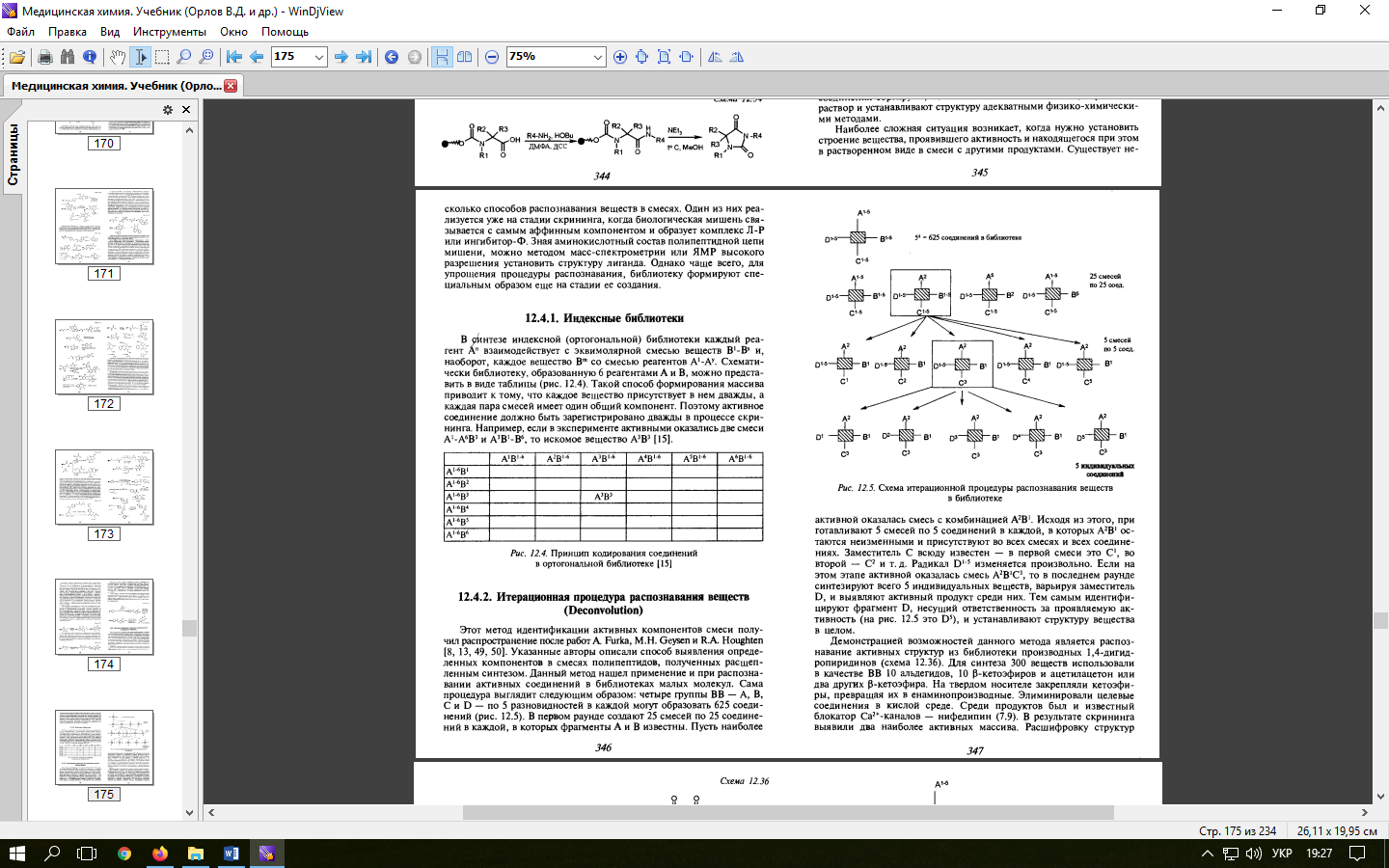
После проведения скрининга возникает необходимость в установлении структуры активных веществ, Если библиотека создана методом параллельного синтеза индивидуальных соединений, то проблем с идентификацией структур не возникает. Достаточно легко установить строение активных веществ и в том случае, когда скрининг проводится среди веществ, закрепленных на твердом носителе: полимерные гранулы могут иметь соответствующие метки, с помощью которых соединения сортируют, после чего снимают с носителя, переводят в раствор и устанавливают структуру адекватными физико-химическими методами.

Наиболее сложная ситуация возникает, когда нужно установить строение вещества, проявившего активность и находящегося при этом в растворенном виде в смеси с другими продуктами. Существует несколько способов распознавания веществ в смесях. Один из них реализуется уже на стадии скрининга, когда биологическая мишень связывается с самым аффинным компонентом и образует комплекс Л-Р или ингибитор-Ф. Зная аминокислотный состав полипептидной цепи

мишени, можно методом масс-спектрометрии или ЯМР высокого разрешения установить структуру лиганда. Однако чаще всего, для упрощения процедуры распознавания, библиотеку формируют специальным образом еще на стадии ее создания.

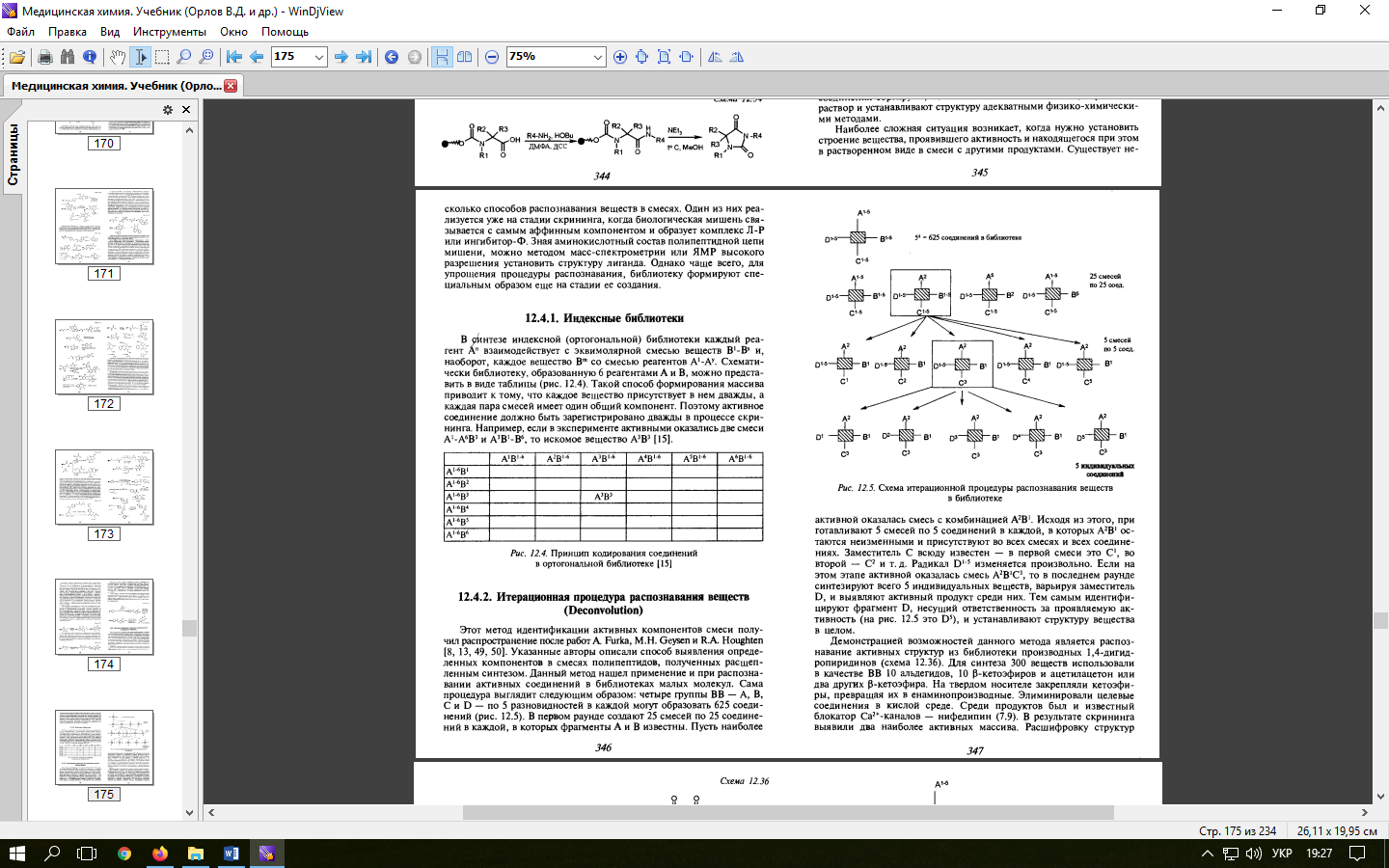
**Индексные библиотеки**

В синтезе индексной (ортогональной) библиотеки каждый реагент Ап взаимодействует с эквимолярной смесью веществ В'-Вх и, наоборот, каждое вещество Вт со смесью реагентов А'-Ау. Схематически библиотеку, образованную 6 реагентами А и В, можно представить в виде таблицы (рис. 1). Такой способ формирования массива приводит к тому, что каждое вещество присутствует в нем дважды, а каждая пара смесей имеет один общий компонент. Поэтому активное соединение должно быть зарегистрировано дважды в процессе скрининга. Например, если в эксперименте активными оказались две смеси А'-А6В3 и А3В'-В6, то искомое вещество А3В3.

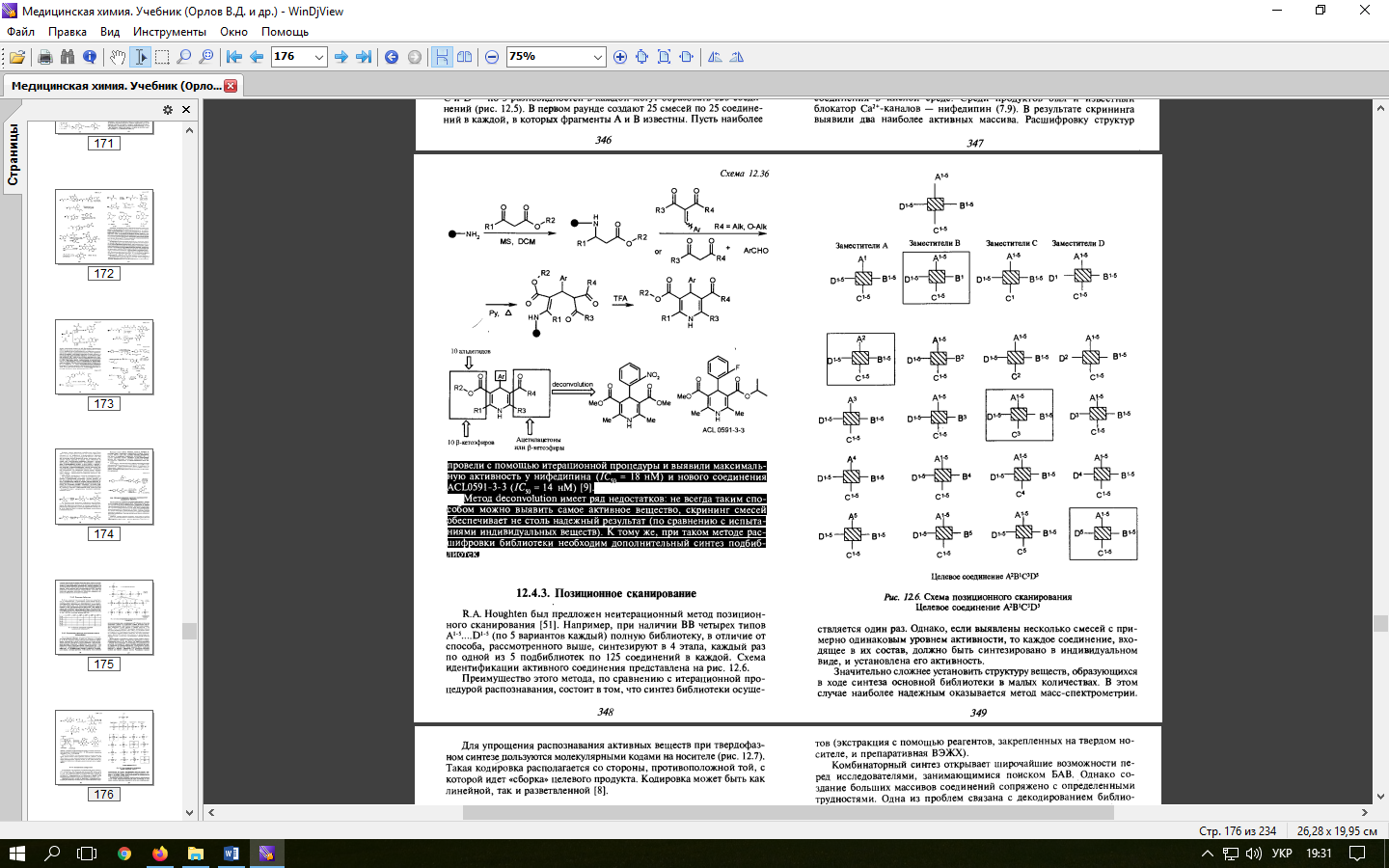


**Итерационная процедура распознавания веществ (Deconvolution)**

Этот метод идентификации активных компонентов смеси получил распространение после работ A. Furka, M.H. Geysen и R.A. Houghten. Указанные авторы описали способ выявления определенных компонентов в смесях полипептидов, полученных расщепленным синтезом. Данный метод нашел применение и при распознавании активных соединений в библиотеках малых молекул. Сама процедура выглядит следующим образом: четыре группы ВВ — А, В, С и D — по 5 разновидностей в каждой могут образовать 625 соединений (рис. 12.5). В первом раунде создают 25 смесей по 25 соединений в каждой, в которых фрагменты А и В известны. Пусть наиболееактивной оказалась смесь с комбинацией А2В'. Исходя из этого, при готавливают 5 смесей по 5 соединений в каждой, в которых А2В' остаются неизменными и присутствуют во всех смесях и всех соединениях. Заместитель С всюду известен — в первой смеси это С1, во второй — С2 и т.д. Радикал D15 изменяется произвольно. Если на этом этапе активной оказалась смесь А2В'С3, то в последнем раунде синтезируют всего 5 индивидуальных веществ, варьируя заместитель D, и выявляют активный продукт среди них. Тем самым идентифицируют фрагмент D, несущий ответственность за проявляемую активность (на рис. 12.5 это D5), и устанавливают структуру вещества в целом.

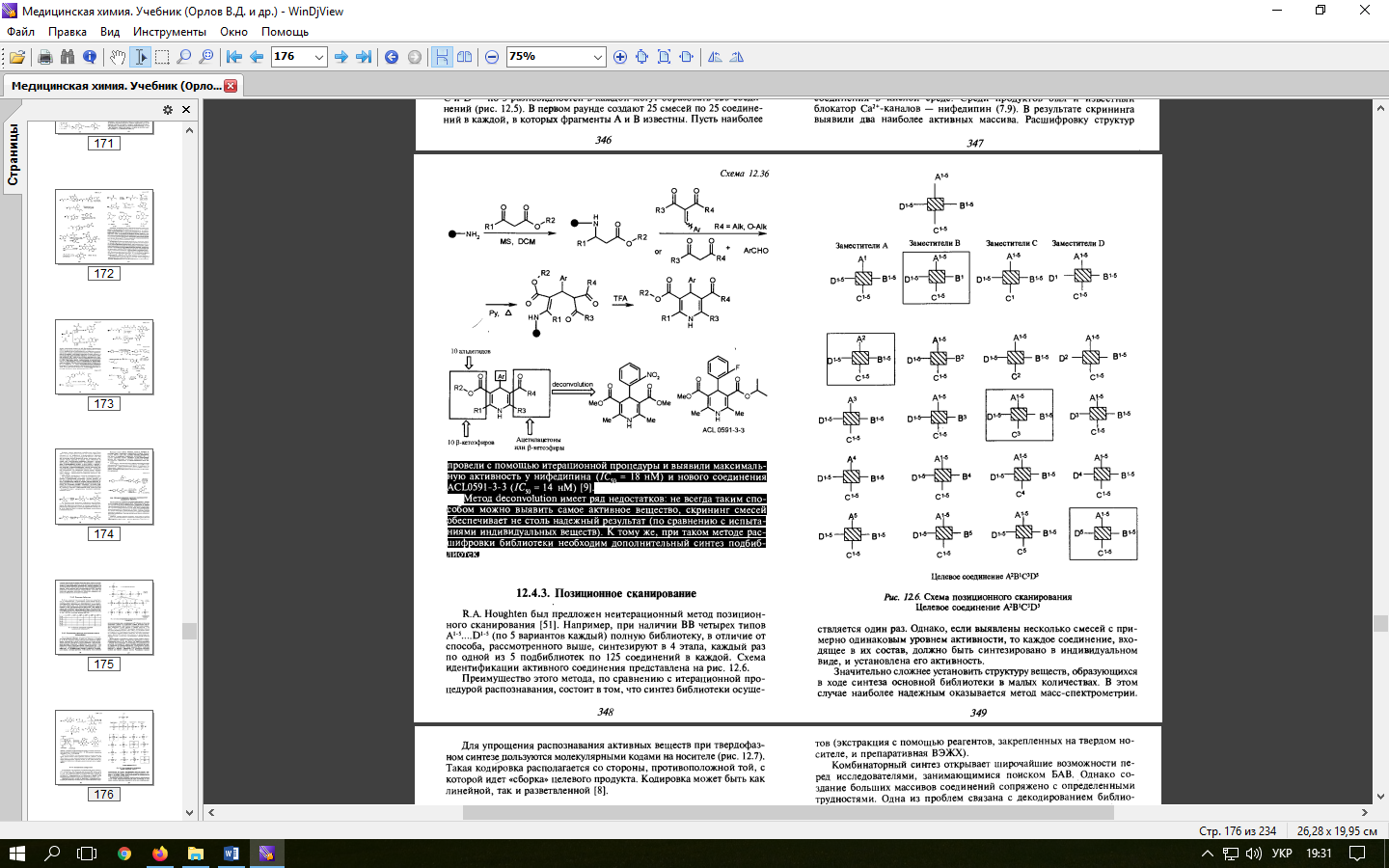


Демонстрацией возможностей данного метода является распознавание активных структур из библиотеки производных 1,4-дигид- ропиридинов (схема 12.36). Для синтеза 300 веществ использовали в качестве ВВ 10 альдегидов, 10 Р-кетоэфиров и ацетилацетон или два других Р-кетоэфира. На твердом носителе закрепляли кетоэфиры, превращая их в енаминопроизводные. Элиминировали целевые соединения в кислой среде. Среди продуктов был и известный блокатор Са2+-каналов — нифедипин (7.9). В результате скрининга выявили два наиболее активных массива. Расшифровку структурпровели с помощью итерационной процедуры и выявили максимальную активность у нифедипина (/С50 = 18 нМ) и нового соединения ACL0591-3-3 (/С50 = 14 нМ). Метод deconvolution имеет ряд недостатков: не всегда таким способом можно выявить самое активное вещество, скрининг смесей обеспечивает не столь надежный результат (по сравнению с испытаниями индивидуальных веществ). К тому же, при таком методе расшифровки библиотеки необходим дополнительный синтез подбиблиотек.

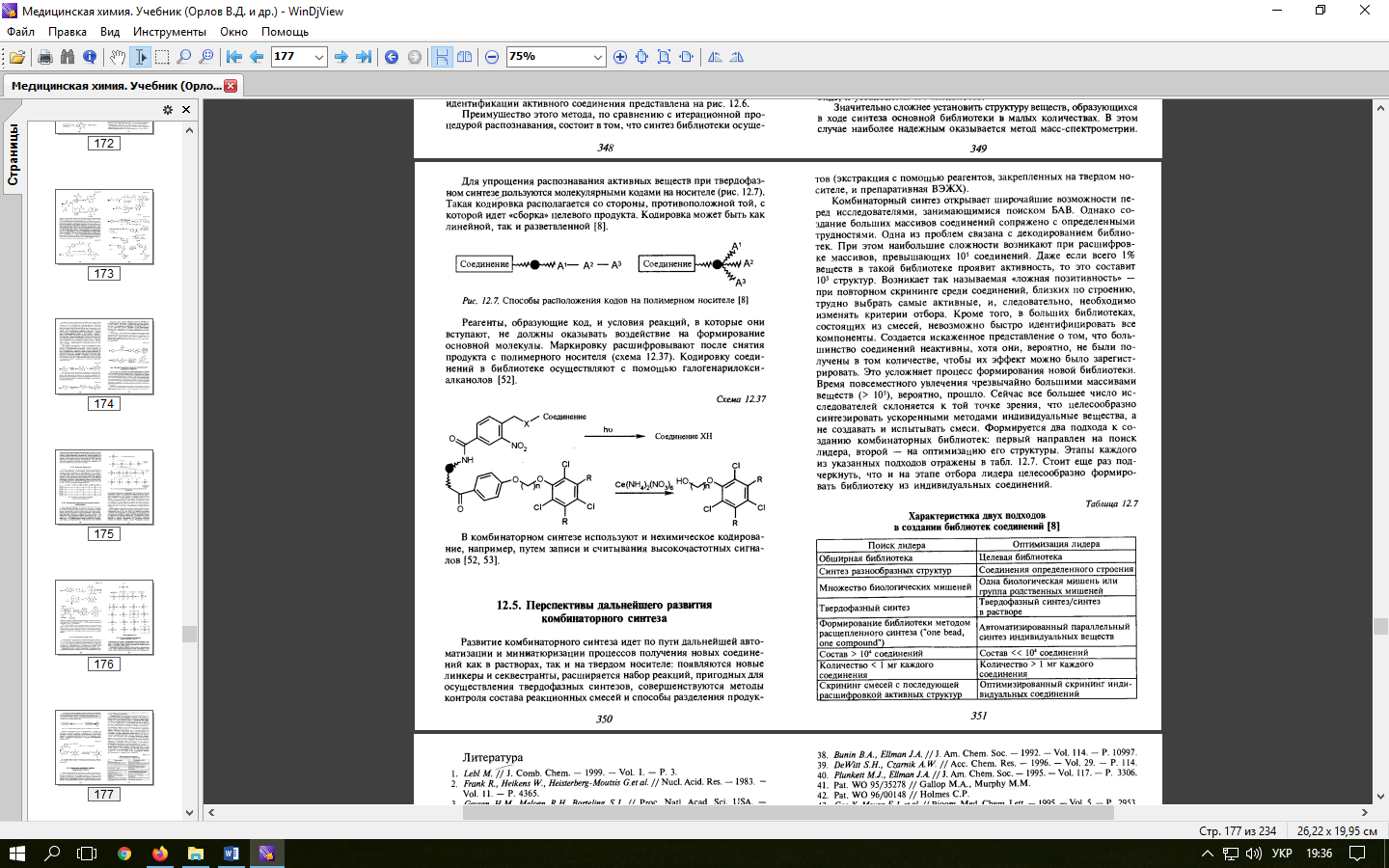


**Позиционное сканирование**

R.A. Houghten был предложен неитерационный метод позиционного сканирования. Например, при наличии ВВ четырех типов AM....DM (по 5 вариантов каждый) полную библиотеку, в отличие от способа, рассмотренного выше, синтезируют в 4 этапа, каждый раз по одной из 5 подбиблиотек по 125 соединений в каждой. Схема идентификации активного соединения представлена на рис. 12.6. Преимущество этого метода, по сравнению с итерационной процедурой распознавания, состоит в том, что синтез библиотеки осуществляется один раз. Однако, если выявлены несколько смесей с примерно одинаковым уровнем активности, то каждое соединение, входящее в их состав, должно быть синтезировано в индивидуальном виде, и установлена его активность. Значительно сложнее установить структуру веществ, образующихся в ходе синтеза основной библиотеки в малых количествах. В этом случае наиболее надежным оказывается метод масс-спектрометрии.

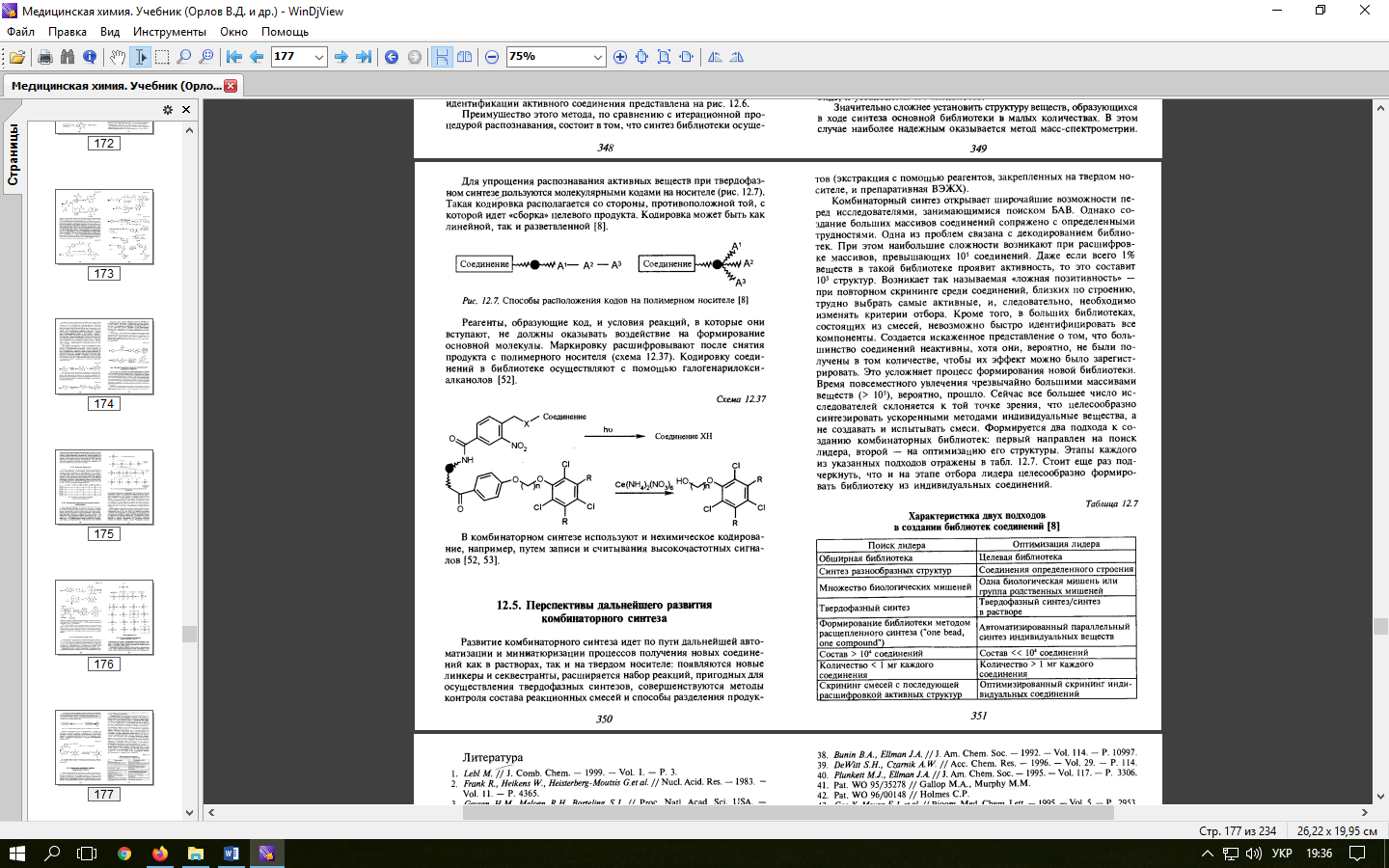


Для упрощения распознавания активных веществ при твердофазном синтезегюльзуются молекулярными кодами на носителе (рис. 12.7). Такая кодировка располагается со стороны, противоположной той, с которой идет «сборка» целевого продукта. Кодировка может быть как линейной, так и разветвленной.



Реагенты, образующие код, и условия реакций, в которые они вступают, не должны оказывать воздействие на формирование основной молекулы. Маркировку расшифровывают после снятия продукта с полимерного носителя (схема 12.37). Кодировку соединений в библиотеке осуществляют с помощью галогенарилокси-

алканолов.



В комбинаторном синтезе используют и нехимическое кодирование, например, путем записи и считывания высокочастотных сигналов.

**Перспективы дальнейшего развития комбинаторного синтеза**

Развитие комбинаторного синтеза идет по пути дальнейшей автоматизации и миниатюризации процессов получения новых соединений как в растворах, так и на твердом носителе: появляются новые линкеры и секвестранты, расширяется набор реакций, пригодных для осуществления твердофазных синтезов, совершенствуются методы контроля состава реакционных смесей и способы разделения продуктов (экстракция с помощью реагентов, закрепленных на твердом

носителе, и препаративная ВЭЖХ).

Комбинаторный синтез открывает широчайшие возможности перед исследователями, занимающимися поиском БАВ. Однако создание больших массивов соединений сопряжено с определенными трудностями. Одна из проблем связана с декодированием библиотек. При этом наибольшие сложности возникают при расшифровке массивов, превышающих 105 соединений. Даже если всего 1%

веществ в такой библиотеке проявит активность, то это составит I03 структур. Возникает так называемая «ложная позитивность» — при повторном скрининге среди соединений, близких по строению, трудно выбрать самые активные, и, следовательно, необходимо изменять критерии отбора. Кроме того, в больших библиотеках, состоящих из смесей, невозможно быстро идентифицировать все компоненты. Создается искаженное представление о том, что большинство соединений неактивны, хотя они, вероятно, не были получены в том количестве, чтобы их эффект можно было зарегистрировать. Это усложняет процесс формирования новой библиотеки. Время повсеместного увлечения чрезвычайно большими массивами веществ (> 105), вероятно, прошло. Сейчас все большее число исследователей склоняется к той точке зрения, что целесообразно синтезировать ускоренными методами индивидуальные вещества, а не создавать и испытывать смеси. Формируется два подхода к созданию комбинаторных библиотек: первый направлен на поиск лидера, второй — на оптимизацию его структуры. Этапы каждого из указанных подходов отражены в табл. 12.7. Стоит еще раз подчеркнуть, что и на этапе отбора лидера целесообразно формировать библиотеку из индивидуальных соединений.

