الفصل الثالث

تقنيات الكيمياء التوافيقية

يطيب لنا فى بداية هذا الجزء أن نؤكد للقارىء أن هدفنا هو تعرُّف الأبعاد التكنولوجية للكيمياء التوافيقية فقط بالقدر الذى يساعد فى ادراك المتطلبات والأسس العلمية والتكنولوجية للتوافيقية باعتبارها وسيلة وباعتبارها منهجًا، وليس الخوض فى التفاصيل الدقيقة التى قد لا تلزم إلا للكيميائى الذى سيمارس العمل بنفسه. إن ما نود أن يصل اليه القارىء فى نهاية هذا الجزء هو إدراك عناصر التوليفة المعرفية والتكنولوجية، التى يمكن أن تجعل التوافيقية، وسيلة مجسمة، والتى يمكن فى الوقت نفسه أن تساعد فى تصور التطورات المستقبلية الممكنة للتوافيقية.

ومن المنظور التقنى نعود إلى المثال الذى تناولناه فى نهاية الفصل السابق، والخاص بإنتاج ٢٧ مركبًا متنوعًا فى التركيب البنائى (نتيجة تفاعل توافيقى لثلاث وحدات بنائية على مدى ثلاث خطوات تفاعل) ونجذب الانتباه إلى أن هذا المثال كان تمثيلاً لطريقة رئيسية فى الكيمياء التوافيقية، تسمى طريقة التجزىء والخلط ويطلق عليها بالإنجليزية عدة مسميات، نسردها كما يلى:

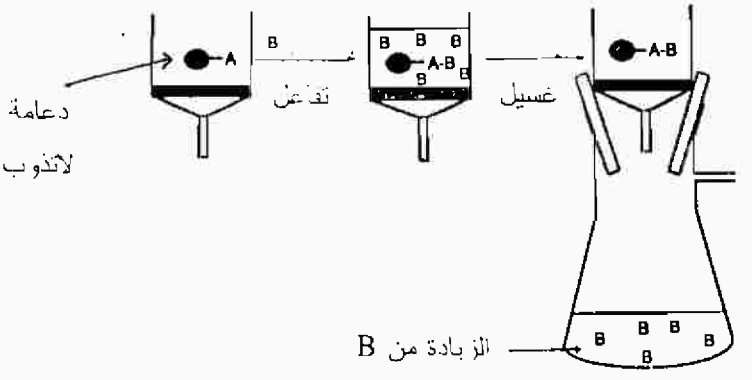
- portioning - mixed method.
- split synthesis method.
- divide, couple, and recombine method.

لقد اعتمدت الكيمياء التوافيقية فى بداياتها (أوائل الثمانينيات) على الطرق الرائدة للعالم R.B.Merrifield والتى نشرها عام ١٩٦٣* وأطلق عليها تخليق الوسط الصلبة Solid Phase synthesis .

وطبقاً لهذه الطريقة والموضحة فى الشكل (5)، فإن أحد وحدات البناء A (أو أحد أفراد مجموعة وحدات البناء من A_1 إلى A_n) يجرى ربطه بدعامة لاتذوب. وبعد ذلك تضاف وحدة البناء B (أو أحد أفراد مجموعة وحدات البناء من B_1 إلى B_n) والموجودة فى هيئة محلول. ويحدث تفاعل بين B وA فينتج المركب A-B، والذى لا يزال مرتبطاً عن طريق A بالدعامة الصلبة، بينما يتم التخلص من الزيادة من مركبات B. إن هذه الدورة يمكن إعادتها أو تكرارها مع وحدات بنائية أخرى. ومن الجدير بالذكر هنا أن الدعامة التى يجرى عليها التفاعل تكون عادة مادة بوليمرية.

(*) كانت هذه بداية عبقرية لاستخدام فكرة التوافيقية فى تشييد الببتيدات من ترتيبات مختلفة من الأحماض الأمينية.

Merrifield RB, J.A.C.S., 85,2149, 1963.



شكل (٥) : التفاعل التوافيقى بطريقة الوسط الصلب.

وجدير بالذكر هنا الإشارة إلى نقطة مهمة جداً، وهى أن الجديد المهم فى الكيمياء التوافيقية لا يتضمن فقط العدد الكبير للجزيئات الناتجة عن التفاعلات، ولكنه يتضمن أيضاً الاعتماد على تنوع فى التركيب البنائى للوحدات الداخلة فى التفاعل، وكذلك التنوع والتفرد فى التركيب البنائى للمركبات الناتجة عن التفاعل.

ولما كان التشييد التوافيقى للمركبات الكيميائى للحصول على دواء لابد وأن يتبع بغربلة للأثر البيولوجى للمركبات المتكونة biological screening، فإن هذه الغربلة قد تمارس مباشرة على المركبات، بينما هى مازالت متصلة بالدعامة البوليمرية، وقد تجرى الغربلة بعد فصل المركبات عن الدعامة، وعموماً بمجرد اكتشاف فاعلية بيولوجية فى مخلوط المركبات المتكونة فإنه يصبح من المطلوب تعرُّف المركبات المسئولة عن الفاعلية البيولوجية، تمهيداً لتعرف تركيبها البنائى.

استيراتيجيات تعرُّف المركبات التى لها فاعلية بيولوجية:

يوجد نوعان من الاستيراتيجيات الخاصة بتعرف المركبات ذات الفاعلية البيولوجية: إستيراتيجيات تستخدم عندما تفصل المركبات عن الدعامة البوليمرية بحيث تكون هذه المركبات فى صورة مذابة (فى محلول)، واستيراتيجيات أخرى تستخدم عندما يجرى التقييم البيولوجى على المركبات الجديدة بينما هى لازالت مرتبطة بالدعامة.

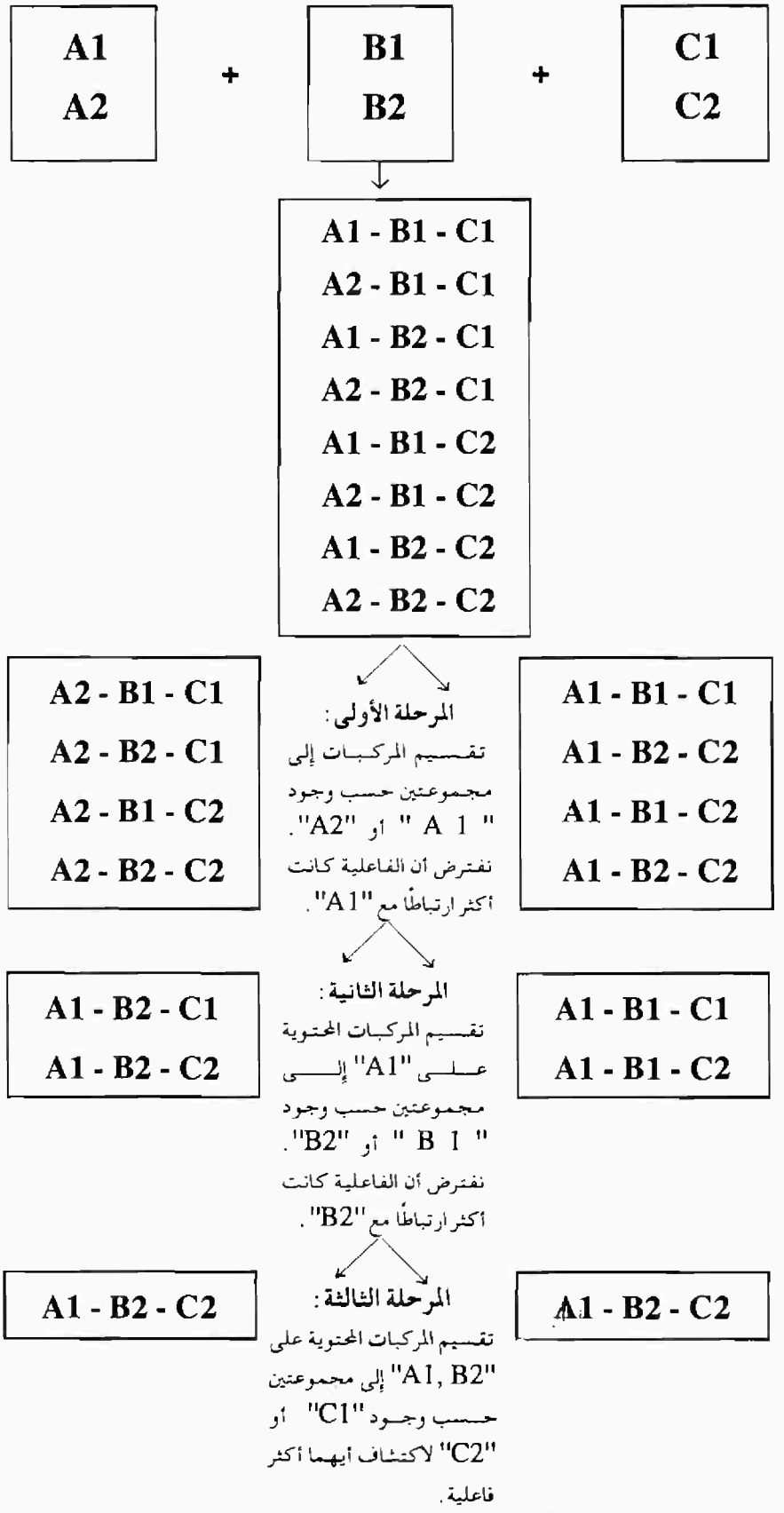
أولاً: عندما تكون المركبات قد فصلت من الدعامة الصلبة:

توجد ثلاثة أنواع من الطرق (أو الاستيراتيجيات) لاكتشاف المركب الأكثر فاعلية بيولوجية، وذلك عندما تكون المركبات الناتجة عن التفاعل التوافيقى مفصولة عن الدعامة وموجودة فى صورة مذابة.

١ - طرق الـ deconvolution (فض الالتفاف أو حل المخلوط):

ابتكرت هذه الطريقة بواسطة هوفتن* Houghten عام ١٩٩٢، وتقوم على الفحص المتكرر خطوة - خطوة iterative للمركبات بعد تكونها بطريقة تضمن تحديد المركب الفعَّال في النهاية. وكما هو في الشكل المرفق (شكل -6)، إذا فرضنا وجود ثلاث خطوات في التفاعل التوافيقي مع دخول مركبين في كل خطوة حيث ينتج عدد $N = (٢)^{٣} = ٨$ مركبات، فإن طريقة تعرف المركب الأنشط بيولوجيا تجرى على ثلاث خطوات رئيسية: الخطوة الأولى هي اكتشاف أى خليط يكون أكثر فاعلية، هل هو ذلك الذى يحتوى على A_1 فى المكان (1) م الذى يحتوى على A_2 فى هذا المكان (هنا نلاحظ أن المكانين 2و3 يتم شغلهما توافيقيًا بالمركبات BوC على الترتيب). وإذا افترضنا أن المخلوط الذى يحتوى على A_1 فى المكان (1) هو الأكثر فاعلية، بعد ذلك تثبت A_1 فى هذا المكان ثم يتم اختبار أيهما الأكثر فاعلية، هل هو المخلوط المحتوى B_1 فى المكان (2) أم هذا الذى يحتوى على B_2 فى هذا المكان؟ ذلك مع شغل المكان (3) توافيقياً بالمركبين C_1 و C_2. وإذا افترضنا أن المخلوط المحتوى على B_2 فى المكان (2) هو الأكثر فاعلية (ولا ننس هنا أن المكان (1) مشغول بالوحدة A_1)؛ فإن الاختبار الثالث يتضمن تثبيت A_1 فى المكان (1) وB_2 فى المكان (2) ثم الكشف على أيهما أكثر فاعلية هل هو المركب $A_1B_2C_1$ أم هو $A_1B_2C_2$؟

(*) Houghten, R.A. et al, Biotechniques, 13, 412,1992.

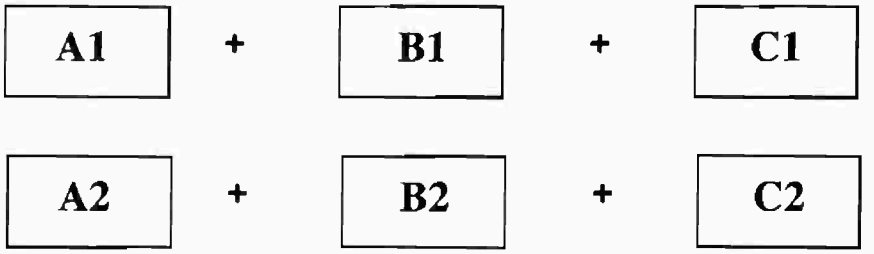


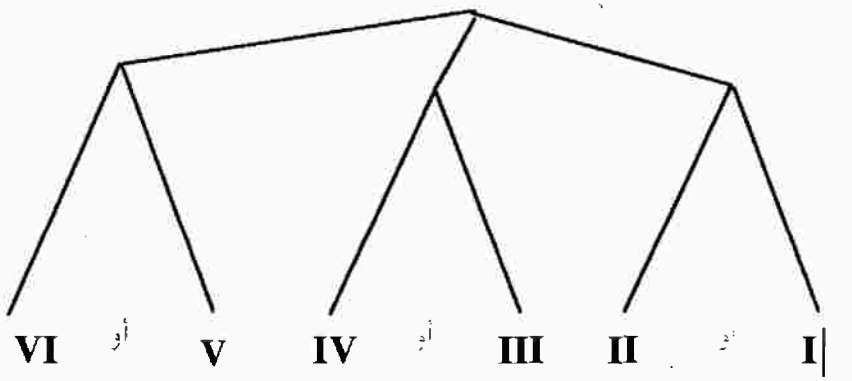
شكل (٦): طريقة حل المخلوط deconvolution.

٢- طرق الترتيب المكانى (أو الاستعراض المكانى) : Positional Scanning

إذا أخذنا المثال السابق فى الاعتبار فإن طريقة الاستعراض المكانى تعتمد ليس على التقييم بطريقة الخطوة – خطوة iterative procedure، ولكن على التقييم البيولوجى لعدد ستة مجموعات فى الوقت نفسه (انظر شكل3) :

* المجموعة الأولى ويرمز لها بالرمز A_1XX، تحتوى على A_1 فى المكان الأول، وكل من B (أى B_1 أو B_2) وC (أى C_1 أو C_2) بشكل توافيقى فى المكانين التاليين على الترتيب، ونلاحظ أن المجموعة الأولى تحتوى على عدد أربعة مركبات.
* المجموعة الثانية تماثل المجموعة السابقة، فيما عدا احتوائها على A_2 وليس A_1 (حيث يرمز لها A_2XX) تحتوى على عدد أربعة مركبات وبالمثل يجرى نمط التخليق (أو التشييد) للمجموعات التالية والتى يتكون كل منها من أربعة مركبات حيث نجد المجموعة الثالثة يرمز لها بالرمز XB_1X، والمجموعة الرابعة يكون رمزها XB_2X ، بينما الخامسة يكون رمزها XXC_1 ، والسادسة يكون رمزها XXC_2.





A1 - B1 - C2	A1 - B1 - C1	A1 - B2 - C1	A1 - B1 - C1	A2 - B1 - C1	A1 - B1 - C1
A1 - B2 - C2	A1 - B2 - C1	A1 - B2 - C2	A1 - B1 - C2	A2 - B1 - C2	A1 - B1 - C2
A2 - B1 - C2	A2 - B1 - C1	A2 - B2 - C1	A2 - B1 - C1	A2 - B2 - C1	A1 - B2 - C3
A2 - B2 - C2	A2 - B2 - C1	A2 - B2 - C2	A2 - B1 - C2	A2 - B2 - C2	A1 - B2 - C2

نفترض أن الأكثر فاعلية هو خليط "I" أى "A1XX"

نفترض أن الأكثر فاعلية هو خليط "IV" أى "XB2X"

نفترض أن الأكثر فاعلية هو خليط "V" أى "XXC1"

فى النهاية تكون النتيجة أن المركب القائد فى الفاعلية هو A1B2C1.

شكل (٧) : طريقة الاستعراض المكانى .

ومن الاختبار البيولوجى للمجموعات الستة كل على حدة يمكن الإجابة عن ثلاث أسئلة روتينية، وهى:

السؤال الأول: أيهما أقوى بيولوجيًا، المجموعة A_1xx أم المجموعة A_2XX.

السؤال الثانى: أيهما أقوى بيولوجيًا، المجموعة XB_1X أم المجموعة XB_2X.

السؤال الثالث: أيهما أقوى بيولوجيًا، المجموعة XXC_1 أم المجموعة XXC_2.

ومن الإجابة عن الأسئلة الثلاثة السابقة يتضح أى نوع من الاتحاد بين الوحدات البنائية C,B,A سيكون الأكثر فاعلية بيولوجية.

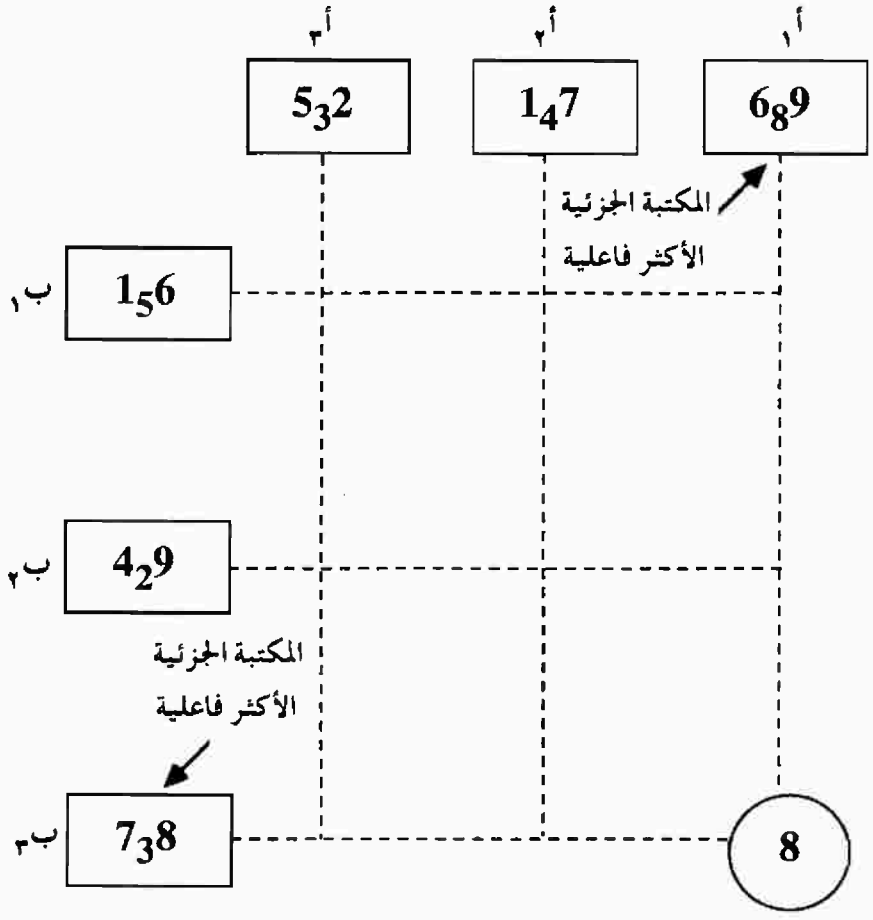
فمثلاً إذا اتضح أن الفاعلية تكون أعلى ما يمكن عندما تكون A_1 (وليس A_2) فى المكان الأول، وعندما تكون B_2 (وليس B_1) فى المكان الثانى، وأيضاً عندما تكون C_1 (وليس C_2) فى المكان الثالث، فإن ذلك يعنى أن المركب القائد lead Compound (أو المركب الرائد أو المركب المرشد) هو الذى سيكون رمزه A_1-B_2-C_1.

لقد استخدمت هذه الطريقة بنجاح عام ١٩٩٢ للتوصل إلى مركبات تعالج الألم، وكذلك عام ١٩٩٤ للكشف على مضادات بكتيرية.

٣- طريقة المكتبات المتعامدة
Orthogonal libraries

ظهرت هذه الطريقة عام ١٩٩٥، وتعتمد على تقسيم مكتبة المركبات الناتجة من التشييد التوافيقى إلى مجموعتين من المكتبات مكتبة «أ» ومكتبة «ب»، بحيث تحتوى المكتبة «أ» على مكتبات أصغر (مثلاً: أ١ - أ٢ - أ٣ ... إلخ)، وتحتوى المكتبة «ب» على مكتبات أصغر (مثلاً ب١ - ب٢ - ب٣ .. إلخ). ويجرى توزيع المركبات الناتجة نفسها مرة على «أ»، وكذلك مرة على «ب» بطريقة معينة، يشترط فيها أن المركبات التى توجد مع بعضها البعض فى إحدى المكتبات الصغرى المسماة «أ»، (أ٢ مثلاً) لا توجد مجتمعة ابداً فى أى من المكتبات الصغرى الأخرى المرموز لها «ب»، والهدف من هذا التوزيع هو جعل التنوع أقصى ما يمكن. وبعد الاختبار البيولوجى لكل مكتبة جزئية من «أ» وكل مكتبة جزئية من «ب»، يقوم الباحث بالبحث عن المركب المشترك فى التقاطع بين المكتبة الجزئية صاحبة أعلى فاعلية فى «أ» مع المكتبة الجزئية صاحبة أعلى فاعلية فى «ب»، حيث من المتوقع أن يكون هذا المركب هو المركب القائد lead campaund (انظر الشكل 8).

لقد طبقت هذه الطريقة على مكتبة تحتوى على ١٥٦٢٥ مركبًا تم تقسيمها إلى ١٢٥ مكتبة جزئية، أمكن من خلالها تعرف مركب فعال كمضاد لهرمون Vasopressin.



شكل (٨) :* طريقة المكتبات المتعامدة

المركب المشترك بين المكتبتين الأكثر فاعلية «أ١» و «ب٣» هو رقم ٨.

*** ملاحظات خاصة بشكل (٨)**

١ – الخطوط المتقطعة توضح التقاطعات بين المكتبات الجزئية.

٢ – نلاحظ أن التقاطعات بين أى مكتبة جزئية من أ (أى أ١ أو أ٢ أو أ٣) وأى مكتبة جزئية من ب (أى ب١ أو ب٢ أو ب٣) لا تحتوى إلا على مركب واحد مشترك، وبالتالى فإن التقاطع بين أكثر المكتبات الجزئية فاعلية من مجموعة «أ» وأكثر المكتبات الجزئية فاعلية من مجموعة «أ» وأكثر المكتبات الجزئية فاعلية من مجموعة «ب»، سيقود إلى تعرف المركب الوحيد المشترك بينهما، والذى هو المركب القائد.

٣ – إذا كانت أكثر المكتبات الجزئية فاعلية من مجموعات «أ» هى «أ» وأكثر المكتبات الجزئية فاعلية من مجموعات «ب» هى «ب٣»، فإن المركب الأكثر فاعلية على الإطلاق فى جميع المكتبات الجزئية سيكون المركب رقم (٨).

٤ – ولو افترضنا – كمثال آخر – أن أكثر المكتبات الجزئية فاعلية فى مجموعات «أ» هى أ٢، وأكثر المكتبات الجزئية فاعلية فى مجموعات «ب» هى «ب١»، فإن المركب الوحيد المشترك بينهما هو المركب رقم «١»، والذى يتوقع أن يكون هو المركب القائد.

ثانياً: عندما تكون المركبات مرتبطة بالدعامة البوليمرية

تعتمد هذه الاستيراتيجيات على منهج التجزىء والخلط (أو Split Synthesis method) والذى تمت الاشارة إليه من قبل، وفيها تضاف وحدات البناء (مثلاً O,D,C .. إلخ) إلى وحدة البناء الأولى (A) المثبتة على الدعامة الصلبة (resin)، وذلك مع إضافة عملية جديدة من ابتكار فوركا * Furka وزملائه قدمت لأول مرة فى المؤتمر الدولى للكيمياء الحيوية ببراغ بتشيكوسلوفاكيا عام ١٩٨٨. إن هذه الإضافة الابتكارية تتلخص فى تقسيم الدعامة الصلبة resin قبل كل تفاعل توافيقى، بحيث تتفاعل كل وحدة بناء على حدة مع نوع واحد من وحدات البناء فى وعاء خاص، وبعد التفاعل تجمع مفردات المادة الصلبة resin وعليها المركبات المتكونة ويعاد تقسيمها قبل أن تتعرض إلى التفاعل مع وحدة بناء جديدة، وهكذا. يتضح هنا أن كل جزئية مفردة من الدعامة (تسمى خرزة bead) تتفاعل فى كل مرة (فى كل خطوة تفاعل، أى فى كل وعاء تفاعل) مع واحدة فقط من وحدات البناء، وهكذا. وذلك يعنى أنه فى نهاية التفاعلات التوافيقية سيكون لدينا عدد ضخم من خرزات المادة الصلبة، وعلى كل منها مركب كيميائى ليس له مثيل unique بالمقارنة بالمركبات المرتبطة ببقية الآلاف أو عشرات الآلاف من الخرزات beads الأخرى. إن هذه الإضافة الابتكارية تعنى مفهومًا جديداً ومهمًّا، وهو «خرزة واحدة لكل مركب»، أو "one-bead, one compound"، ومعنى ذلك أن عدد المركبات الكيميائية الجديدة لايزيد عن عدد الخرزات beads والتى يصل عددها بالنسبة إلى وزنها إلى ١٠-١٠٠ مليون خرزة لكل جرام من الدعامة الصلبة. الجميل فى الأمر أن تقنيات الغربلة البيولوجية، وكذلك تقنيات تعرف التركيب البنائى قد وصلت إلى الدقة، التى يمكن من خلالها اختبار الفاعلية البيولوجية لمركب، واحد على خرزة واحدة، وأيضاً تعرف التركيب البنائى لهذا المركب، والذى تصل كميته إلى مجرد أجزاء من البليون من الوزن الجزيئى.

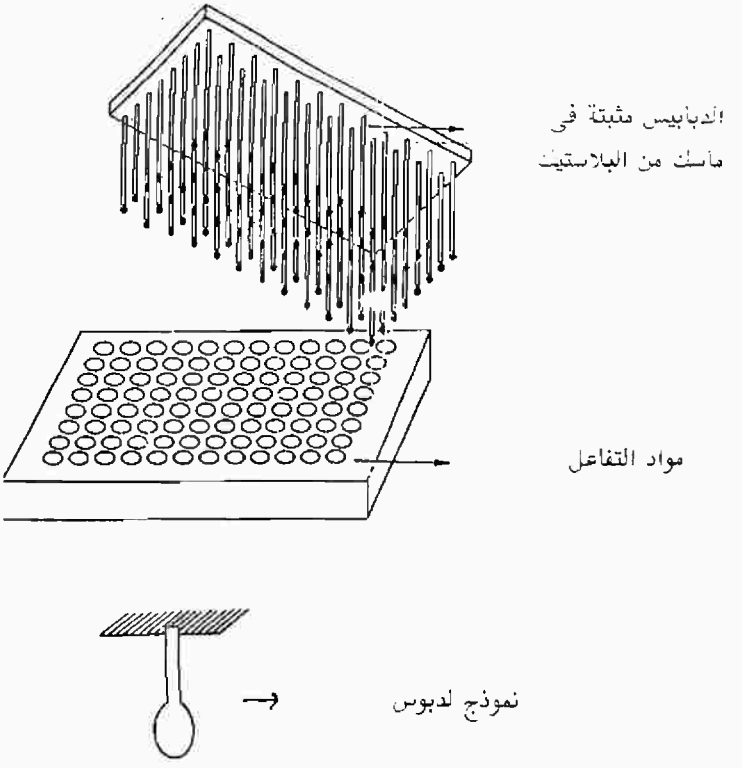
وفى إطار إستيراتيجية مركب واحد على خرزة واحدة one-bead,one compound تمت طريقتين مهمتين لتخليق أعداد كبيرة من المركبات المتنوعة فى دقة بالغة وفى وقت واحد، بحيث يكون كل منها مرتبطًا بمكان مختلف على الدعامة الصلبة. الطريقة الأولى تسمى طريقة «الدبابيس المتعددة multipin method". والطريقة الثانية تسمى طريقة التخليق الموجه ضوئياً light directed synthesis، وفيما يلى عرض للطريقتين:

١- تشييد مكتبات توافيقية من المركبات بطريقة الدبابيس المتعددة multipin method

فى هذه الطريقة والتى ابتكرها جيسين وزملاؤه عام ١٩٨٤* يتم تخليق كل مركب من المركبات المتنوعة على طرف دبوس، مصنوع من مادة بوليمرية، حيث تكون هناك خلية من ٩٦ دبوساً (١٢X٨) كما فى شكل (٩) يتم

* Furka, A, et al, 14th. Intl. Cong Biochem.. Prague, 5, 47, 1988.

غرسها مرة بعد أخرى (وحسب خطة التفاعل التوافيقى) فى ستة وتسعين بئراً دقيقاً wells ، وذلك باستخدام إنسان آلى robot. إن المركبات المختلفة المتكونة على أطراف الدبابيس يمكن بعد ذلك اختبارها بيولوجيا سواء وهى مازالت مثبتة على دعاماتها، والتى تكون فى صورة دبابيس Pins أو إذا ما تم الحصول عليها بعد ذلك فى شكل محلول وطبقاً لتصميم وتقنيات التجربة، حيث فى حالة الرغبة فى تحويل المركبات المتكونة على قمة الدبابيس إلى هيئة المحلول... فإنه توضع مادة فاصلة من البداية بين قمة الدبوس وأول وحدة بناء ترتبط به، وذلك بحيث تكون مهمة هذه المادة تسهيل فصل المركب المتكون عن الدعامة المرتبطة به.



شكل (٩) : تشييد مركبات بطريقة الدبابيس المتعددة .

٢- طريقة التخليق الموجه ضوئياً light directed synthesis

فى هذه الطريقة (شكل ١٠) تتضافر تقنيات الضوء مع تقنيات الدقة والتصغير والنمنمة فى أداء التخليق (أو التشييد) الكيميائى بالمنهج التوافيقى. وبوجه عام تتشابه هذه الطريقة مع طريقة Merrifield ، والتى يجرى فيها التخليق الكيميائى على دعامة صلبة من خلال عمليات خلط وفصل متتابعة،

* Geysen, H.M.et al, Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 3998, 1984.

إلا أن الترتيب التوافيقى هنا يتم باستعمال ثلاثة أشياء إضافية هى :

أ – مجموعة كيميائية تتكسر بالضوء، ويرمز لها X .

ب– ضوء معين .

جـ – حائل Mask يحمى من الضوء .

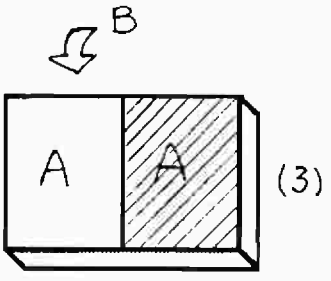
وعن طريق هذه الأشياء الثلاثة، يستخدم الضوء فى توجيه التفاعلات التوافيقية بطريقة نذكرها موجزة كما يلى :

أولاً : تغطى الدعامة الصلبة والتى تكون نوعاً من الزجاج (على غرار شرائح الميكروسكوب) بالمجموعة الأولى من وحدات البناء، ولتكن "A" والتى تحمل كل وحدة منها المجموعة الكيميائية "X" التى تتكسر بالضوء، وكأنها طبقة واقية لا تتم إزالتها إلا بالضوء المشار إليه .

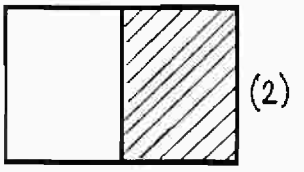
ثانياً : يوضع حائل فوق الدعامة بحيث يغطى أجزاء محددة منها وبالتالى يحميها من الضوء (أو الإشعاع) المشار إليه، ذلك بينما لا تتمتع الأجزاء غير المغطاة بالحماية من الضوء؛ حيث تتكسر المجموعة الكيميائية المذكورة تحت تأثير الضوء تاركة تحتها وحدات البناء الكيميائى عارية وعرضة لأى تفاعل .

ثالثاً : يجرى تعريض الدعامة (بما عليها من وحدات بناء عارية وأخرى محمية) إلى التفاعل مع وحدات بناء جديدة ولتكن "B" . وهنا نجد أن الوحدات الجديدة تتفاعل فقط مع وحدات البناء غير المحمية، فتكون المركبات المثبتة على الدعامة إما "A" مغطاة بـ"X"، وهى التى كانت مغطاة بالحائل وقت التعرض للضوء المشار إليه، أو هى B-A مغطاة بـ"X" والتى كانت فى الأصل مركبات X-A تعرضت للضوء دون حماية الحائل، فتكسرت المجموعة "X" من جراء ذلك ، وبالتالى تمكنت وحدات "B" (المغطاة بـ"X" هى الاخرى) من التفاعل معها لتكوين مركب جديد من وحدتين "B-A" .

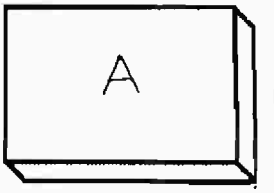
وهكذا مع تكرار التغطية بحائل لمناطق معينة، وتسليط الضوء على المناطق غير المغطاة، ثم إتاحة تفاعل هذه المناطق غير المغطاة مع وحدات بناء جديدة (C مثلاً)يحدث التفاعل التوافيقى على عدة مراحل، وهذا هو ما يسمى « التخليق التوافيقى الموجه بالضوء» . وبعد ذلك يمكن غربلة هذه المركبات للكشف عن الفاعلية البيولوجية باستخدام واحدة من وسائل عديدة (مثل التفاعل مع أجسام مضادة)، حسب نوع المركبات المتوقعة .



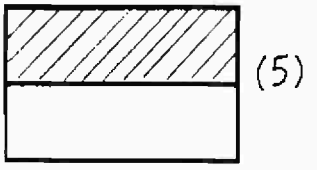
بعد وضع الحائل فوق الدعامة والتعريض للضوء يصبح المكان غير المظلل هو فقط المعرض للتفاعل مع الوحدات الجديدة "B".



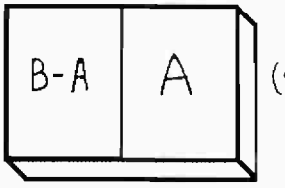
« الحائل الأول »
وفيه المكان المظلل
لا يسمح بمرور الضوء



الدعامة التى يجرى عليها التشييد، وعليها أول وحدة بناء "A"

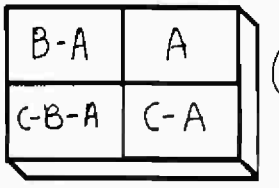


« الحائل الثانى »



الدعامة وعليها نوعان من المركبات وهما "A" و "B - A".

(6) مع الحماية بالحائل الثانى والتعرض للضوء، ثم التعرض للوحدات البنائية الجديدة "C" تأخذ المركبات التى على الدعامة الترتيب التالى:



وهكذا نجد أنه قد تم تكوين أربعة أنواع من المركبات على الدعامة، وهى "A" و "B - A" و "C - B - A"، وباستمرار التفاعل التوافيقى تتكون مركبات جديدة مختلفة عن بعضها.

شكل (١٠): التشييد الكيميائى التوافيقى الموجه ضوئيًا.