

الفصل الثالث

تقنيات الكيمياء التوافقية

يطيب لنا في بداية هذا الجزء أن نؤكد للقارئ أن هدفنا هو تعرف الأبعاد التكنولوجية للكيمياء التوافقية فقط بالقدر الذي يساعد في ادراك المتطلبات والأسس العلمية والتكنولوجية للتوافقية باعتبارها وسيلة وباعتبارها منهجاً، وليس الخوض في التفاصيل الدقيقة التي قد لا تلزم إلا للكيميائي الذي سيمارس العمل بنفسه. إن ما نود أن يصل إليه القارئ في نهاية هذا الجزء هو إدراك عناصر التوليفة المعرفية والتكنولوجية، التي يمكن أن تجعل التوافقية، وسيلة مجسمة، والتي يمكن في الوقت نفسه أن تساعد في تصور التطورات المستقبلية الممكنة للتوافقية.

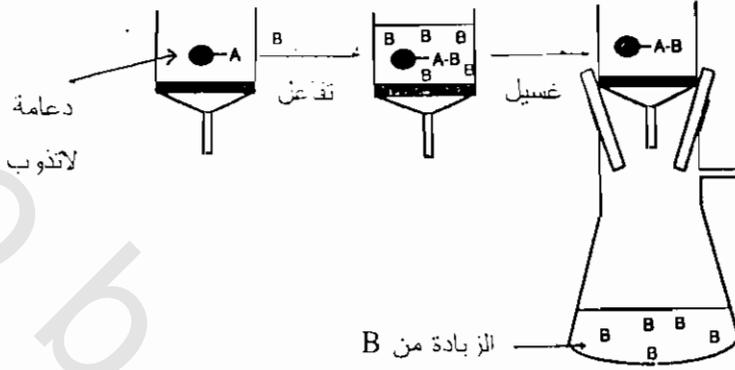
ومن المنظور التقني نعود إلى المثال الذي تناولناه في نهاية الفصل السابق، والخاص بإنتاج ٢٧ مركباً متنوعاً في التركيب البنائي (نتيجة تفاعل توافقى لثلاث وحدات بنائية على مدى ثلاث خطوات تفاعل) ونجذب الانتباه إلى أن هذا المثال كان تمثيلاً لطريقة رئيسية في الكيمياء التوافقية، تسمى طريقة التجزئ والخلط ويطلق عليها بالإنجليزية عدة مسميات، نسردها كما يلي:

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

لقد اعتمدت الكيمياء التوافقية في بداياتها (أوائل الثمانينيات) على الطرق الرائدة للعالم R.B.Merrifield والتي نشرها عام ١٩٦٣* وأطلق عليها تخليق الوسط الصلبة Solid Phase synthesis . وطبقاً لهذه الطريقة والموضحة في 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 في هيئة محلول. ويحدث تفاعل بين A وB فينتج المركب A-B، والذي 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 التي يجرى عليها التفاعل تكون عادة مادة بوليميرية.

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

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



شكل (٥) : التفاعل التوافقي بطريقة الوسط الصلب .

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

ولما كان التشييد التوافقي للمركبات الكيميائية للحصول على دواء لا بد وأن يتبع بغربة للأثر البيولوجي للمركبات المتكونة biological screening، فإن هذه الغربة قد تمارس مباشرة على المركبات، بينما هي مازالت متصلة بالدعامة البوليمرية، وقد تجرى الغربة بعد فصل المركبات عن الدعامة، وعموماً بمجرد اكتشاف فاعلية بيولوجية في مخلوط المركبات المتكونة فإنه يصبح من المطلوب تعرف المركبات المسؤولة عن الفاعلية البيولوجية، تمهيداً لتعرف تركيبها البنائي.

يوجد نوعان من الاستراتيجيات الخاصة بتعرف المركبات ذات الفاعلية البيولوجية: إستراتيجيات تستخدم عندما تفصل المركبات عن الدعامة البوليمرية بحيث تكون هذه المركبات في صورة مذابة (في محلول)، واستراتيجيات أخرى تستخدم عندما يجرى التقييم البيولوجي على المركبات الجديدة بينما هي لازالت مرتبطة بالدعامة.

**استراتيجيات تعرف
المركبات التي لها فاعلية
بيولوجية:**

**أولاً: عندما تكون المركبات
قد فصلت من الدعامة
الصلبة:**

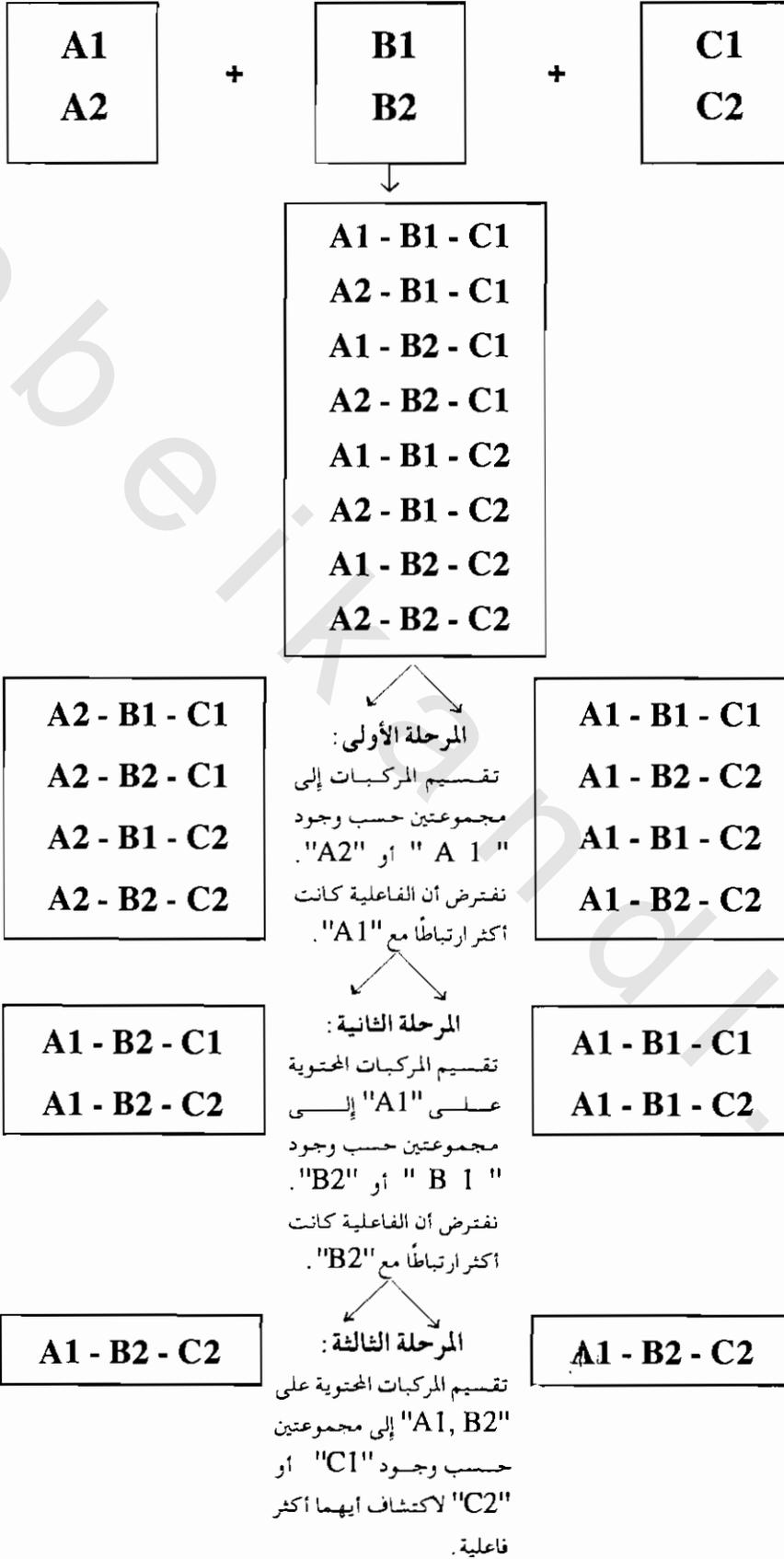
توجد ثلاثة أنواع من الطرق (أو الاستراتيجيات) لاكتشاف المركب الأكثر فاعلية بيولوجية، وذلك عندما تكون المركبات الناتجة عن التفاعل التوافقي مفصولة عن الدعامة وموجودة في صورة مذابة.

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 الفعّال 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 $N = 2^3 = 8$ مركبات، فإن طريقة تعرف المركب الأنشط بيولوجياً تجري 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 2 و3 يتم شغلها توافيقياً بالمركبات B وC 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) و B_2 فى المكان (2) ثم الكشف على أيهما أكثر فاعلية هل هو المركب $A_1 B_2 C_1$ أم هو $A_1 B_2 C_2$ ؟

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



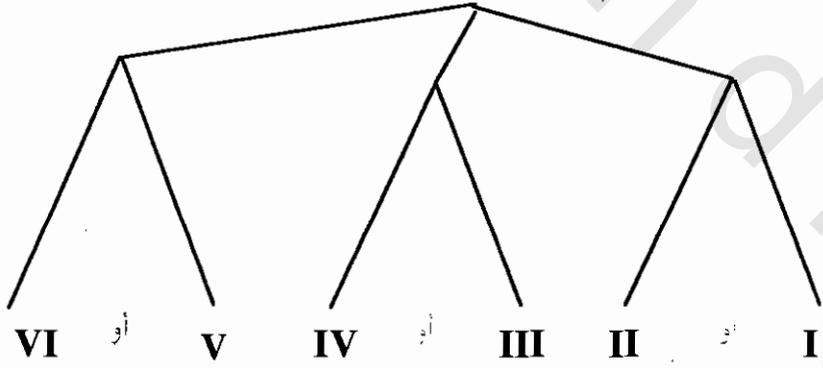
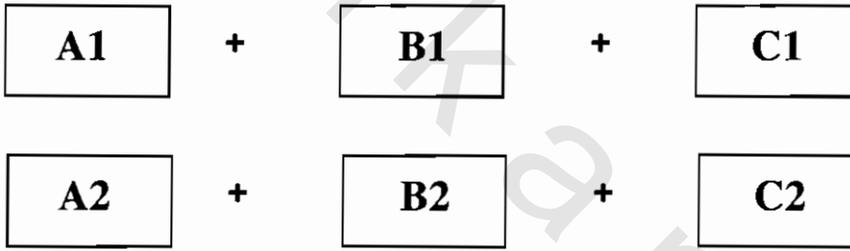
شكل (٦): طريقة حل المخلوط deconvolution.

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

إذا أخذنا المثال السابق في الاعتبار فإن طريقة الاستعراض المكاني تعتمد ليس على التقسيم بطريقة الخطوة - خطوة iterative procedure، ولكن على التقسيم البيولوجي لعدد ستة مجموعات في الوقت نفسه (انظر شكل 3):

* المجموعة الأولى ويرمز لها بالرمز A_1XX ، تحتوي على A_1 في المكان الأول، وكل من B (أى B_1 أو B_2) و C (أى C_1 أو C_2) بشكل توافقي في المكانين التاليين على الترتيب، ونلاحظ أن المجموعة الأولى تحتوي على عدد أربعة مركبات.

* المجموعة الثانية تماثل المجموعة السابقة، فيما عدا احتوائها على A_2 وليس A_1 (حيث يرمز لها A_2XX) تحتوي على عدد أربعة مركبات وبالمثل يجرى نمط التخليق (أو التشييد) للمجموعات التالية والتي 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"

في النهاية تكون النتيجة أن المركب القائد في الفاعلية هو $A1B2C1$.
شكل (٧): طريقة الاستعراض المكاني.

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

السؤال الأول: أيهما أقوى بيولوجياً، المجموعة A_1XX أم المجموعة A_2XX .
السؤال الثاني: أيهما أقوى بيولوجياً، المجموعة XB_1X أم المجموعة XB_2X .
السؤال الثالث: أيهما أقوى بيولوجياً، 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.

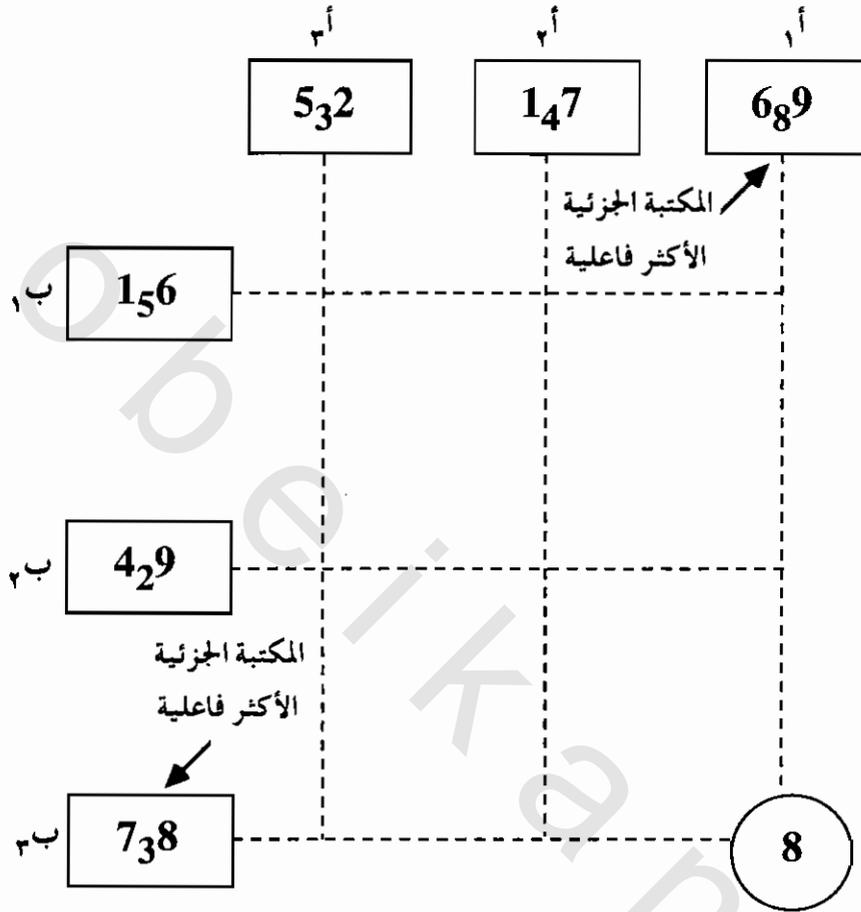
فمثلاً إذا اتضح أن الفاعلية تكون أعلى ما يمكن عندما تكون A_1 (وليس A_2) فى المكان الأول، وعندما تكون B_2 (وليس B_1) فى المكان الثانى، وأيضاً عندما تكون C_1 (وليس C_2) فى المكان الثالث، فإن ذلك يعنى أن المركب القائد $lead\ Compound$ (أو المركب الرائد أو المركب المرشد) هو الذى سيكون رمزه $A_1-B_2-C_1$.

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

ظهرت هذه الطريقة عام ١٩٩٥، وتعتمد على تقسيم مكتبة المركبات الناتجة من التشبيد التوافيقى إلى مجموعتين من المكتبات مكتبة «أ» ومكتبة «ب»، بحيث تحتوى المكتبة «أ» على مكتبات أصغر (مثلاً: $A_1 - A_2$ - $A_3 \dots$ إلخ)، وتحتوى المكتبة «ب» على مكتبات أصغر (مثلاً: $B_1 - B_2 - B_3 \dots$ 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»، (أ_١ 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 $lead\ compound$ (انظر الشكل 8).

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

٣- طريقة المكتبات المتعامدة Orthogonal libraries



شكل (٨): * طريقة المكتبات المتعامدة

المركب المشترك بين المكتبتين الأكثر

فاعلية «أ» و «ب» 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 أ_١ أو أ_٢ أو أ_٣) وأى مكتبة جزئية من ب (أى ب_١ أو ب_٢ أو ب_٣) لا تحتوى إلا على مركب واحد مشترك، وبالتالي فإن التقاطع بين أكثر المكتبات الجزئية فاعلية من مجموعة «أ» وأكثر المكتبات الجزئية فاعلية من مجموعة «ب»، سيقود إلى تعرف المركب الوحيد المشترك بينهما، والذي هو المركب القائد.

٣ - إذا كانت أكثر المكتبات الجزئية فاعلية من مجموعات «أ» هى «أ١» 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 أ_٢، وأكثر المكتبات الجزئية فاعلية فى مجموعات «ب» هى «ب١»، فإن المركب الوحيد المشترك بينهما هو المركب رقم «١٠»، والذي يتوقع أن يكون هو المركب القائد.

ثانياً، عندما تكون المركبات مرتبطة بالدعامة البوليمرية

تعتمد هذه الاستراتيجيات على منهج التجزئ والخلط (أو Split Syn-thesis method) والذي تمت الإشارة 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 في المؤتمر الدولي للكيمياء الحيوية ببراغ بتشيكوسلوفاكيا عام ١٩٨٨. إن هذه الإضافة الابتكارية تتلخص في تقسيم الدعامة الصلبة resin قبل كل تفاعل توافقي، بحيث تتفاعل كل وحدة بناء على حدة مع نوع واحد من وحدات البناء في 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 في كل مرة (في كل خطوة تفاعل، أي في كل وعاء تفاعل) مع واحدة فقط من وحدات البناء، وهكذا. وذلك يعني أنه في نهاية التفاعلات التوافقية سيكون لدينا عدد ضخم من خرزات المادة الصلبة، وعلى كل منها مركب كيميائي ليس له مثيل unique بالمقارنة بالمركبات المرتبطة ببقية الآلاف أو عشرات الآلاف من الخرزات beads الأخرى. إن هذه الإضافة الابتكارية تعني مفهوماً جديداً ومهماً، وهو «خرزة واحدة لكل مركب»، أو "one-bead, one compound"، ومعنى ذلك أن عدد المركبات الكيميائية الجديدة لا يزيد عن عدد الخرزات beads والتي يصل عددها بالنسبة إلى وزنها إلى ١٠-١٠٠ مليون خرزة لكل جرام من الدعامة الصلبة. الجميل في الأمر أن تقنيات الغرلة البيولوجية، وكذلك تقنيات تعرف التركيب البنائي قد وصلت إلى الدقة، التي يمكن من خلالها اختبار الفاعلية البيولوجية لمركب، واحد على خرزة واحدة، وأيضاً تعرف التركيب البنائي لهذا المركب، والذي تصل كميته إلى مجرد أجزاء من البليون من الوزن الجزيئي.

وفي إطار إستراتيجية مركب واحد على خرزة واحدة one-bead,one compound نمت طريقتين مهمتين لتخليق أعداد كبيرة من المركبات المتنوعة في دقة بالغة وفي وقت واحد، بحيث يكون كل منها مرتبطاً بمكان مختلف على الدعامة الصلبة. الطريقة الأولى تسمى طريقة «الدبابيس المتعددة multipin method» والطريقة الثانية تسمى طريقة التخليق الموجه ضوئياً light directed synthesis، وفيما يلي عرض للطريقتين:

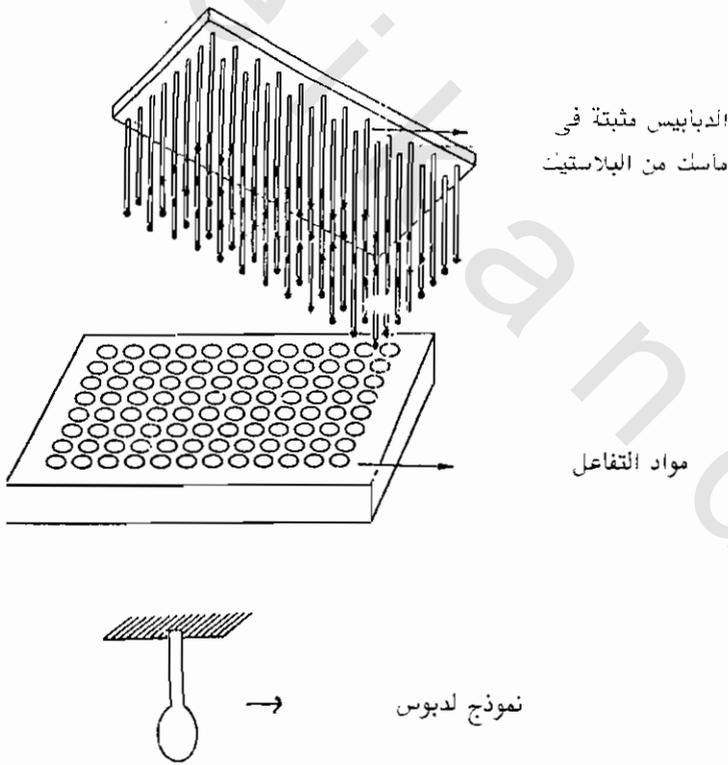
في هذه الطريقة والتي ابتكرها جيسين وزملاؤه عام ١٩٨٤* يتم تخليق كل مركب من المركبات المتنوعة على طرف دبوس، مصنوع من مادة بوليمرية، حيث تكون هناك خلية من ٩٦ دبوساً (١٨×١٢) كما في شكل (٩) يتم

١- تشييد مكتبات توافقية من
المركبات بطريقة الدبابيس
المتعددة

multipin method

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

غرسها مرة بعد أخرى (وحسب خطة التفاعل التوافيقي) في ستة وتسعين بئراً دقيقاً wells ، وذلك باستخدام إنسان آلي robot. إن المركبات المختلفة المتكونة على أطراف الدبابيس يمكن بعد ذلك اختبارها بيولوجيا سواء وهي مازالت مثبتة على دعاماتها، والتي تكون في صورة دبابيس Pins أو إذا ما تم الحصول عليها بعد ذلك في شكل محلول وطبقاً لتصميم وتقنيات التجربة، حيث في حالة الرغبة في 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 .

في هذه الطريقة (شكل ١٠) تتضافر تقنيات الضوء مع تقنيات الدقة والتصغير والنممة في أداء التخليق (أو التشييد) الكيميائي بالمنهج التوافيقي. وبوجه عام تتشابه هذه الطريقة مع طريقة Merrifield ، والتي يجرى فيها التخليق الكيميائي على دعامة صلبة من خلال عمليات خلط وفصل متتابعة،

٢- طريقة التخليق الموجه ضوئياً
light directed
synthesis

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

إلا أن الترتيب التوافيقي هنا يتم باستعمال ثلاثة أشياء إضافية هي:

أ - مجموعة كيميائية تنكسر بالضوء، ويرمز لها X .
ب - ضوء معين .

ج - حائل Mask يحمى من الضوء .

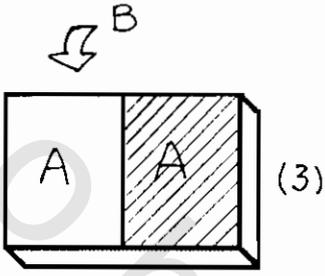
وعن طريق هذه الأشياء الثلاثة، يستخدم الضوء في توجيه التفاعلات التوافقية بطريقة نذكرها موجزة كما يلي:

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

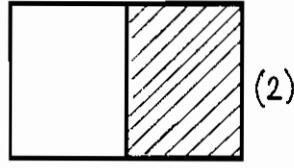
ثانياً: يوضع حائل فوق الدعامة بحيث يغطي أجزاء محددة منها وبالتالي يحميها من الضوء (أو الإشعاع) المشار إليه، ذلك بينما لا تتمتع الأجزاء غير المغطاة بالحماية من الضوء؛ حيث تنكسر المجموعة الكيميائية المذكورة تحت تأثير الضوء تاركة تحتها وحدات البناء الكيميائي عارية وعرضة لأي تفاعل.

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"، وهي التي كانت مغطاة بالحائل وقت التعرض للضوء المشار إليه، أو هي B-A مغطاة بـ "X" والتي كانت في الأصل مركبات X-A تعرضت للضوء دون حماية الحائل، فتكسرت المجموعة "X" من جراء ذلك، وبالتالي تمكنت وحدات "B" (المغطاة بـ "X" هي الأخرى) من التفاعل معها لتكوين مركب جديد من وحدتين "B-A".

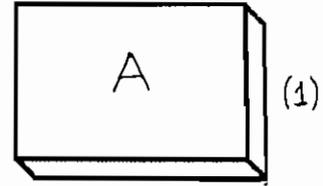
وهكذا مع تكرار التغطية بحائل لمناطق معينة، وتسليط الضوء على المناطق غير المغطاة، ثم إتاحة تفاعل هذه المناطق غير المغطاة مع وحدات بناء جديدة (C مثلاً) يحدث التفاعل التوافيقي على عدة مراحل، وهذا هو ما يسمى «التخليق التوافيقي الموجه بالضوء». وبعد ذلك يمكن غريلة هذه المركبات للكشف عن الفاعلية البيولوجية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



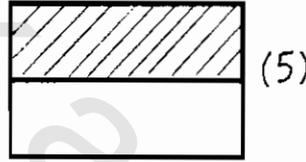
بعد وضع الحائل فوق
الدعامة والتعريض
للضوء يصبح المكان غير
المظلل هو فقط المعرض
للتفاعل مع الوحدات
الجديدة "B".



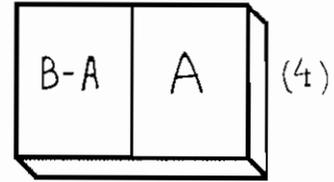
« الحائل الأول »
وفيه المكان المظلل
لا يسمح بمرور الضوء



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

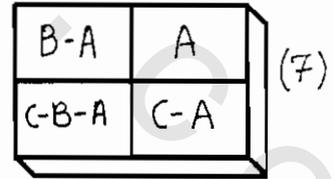


« الحائل الثاني »



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

(6) مع الحماية بالحائل الثاني والتعرض للضوء، ثم التعرض للوحدات البنائية
الجديدة "C" تأخذ المركبات التي على الدعامة الترتيب التالي:



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

شكل (١٠): التشييد الكيميائي التوافيقي الموجه ضوئياً.