

---

# La chimica combinatoria: un potente strumento per la ricerca di base e la ricerca farmacologica

---

Jutta Eichler, PhD

Michal Lebl, PhD, DSc

---

**Questo articolo è un'introduzione all'area della chimica combinatoria. Benché non intenda rappresentare in alcun modo una rassegna esauriente dell'argomento, può essere utile come fonte di informazioni di base su questo campo. L'articolo discute numerosi elementi, come le misurazioni della diversità chimica, le metodiche di sintesi (sintesi in fase solida e in soluzione), il numero di composti necessari per un particolare progetto di screening, l'uso di miscele o di composti singoli nello screening, la progettazione di composti flessibili o di composti rigidi, l'importanza dell'applicazione di prodotti grezzi o purificati, e la quantità di ciascun composto necessaria per l'esecuzione di un particolare progetto.**

**Parole chiave: Combinatorial chemistry; Parallel synthesis; High throughput chemistry; Solid phase synthesis; Drug discovery techniques.**

*Journal of Clinical Ligand Assay 2000; 23: 262-272.*

---

## Introduzione

Il termine chimica combinatoria è stato coniato circa dieci anni fa per descrivere la rapida generazione di un elevatissimo numero di composti chimici, diretta principalmente alla ricerca di nuovi farmaci. La ricerca e lo sviluppo dei farmaci hanno determinato l'impiego di migliaia di sostanze chimiche medicinali da parte delle società farmaceutiche. In passato, la produttività era tuttavia limitata dagli strumenti e dalle tecniche a disposizione, e le "linee produttive" delle nuove IND (investigational new drugs, nuovi farmaci in fase di studio) si stavano lentamente prosciugando per vari motivi, fra cui le norme sempre più restrittive ed i requisiti di prestazione sempre più elevati. Anche se le metodiche computazionali di progettazione dei farmaci hanno riscosso un considerevole successo, i progetti di scoperta di nuovi farmaci non riuscivano a raggiungere un soddisfacente livello di sintesi di nuovi composti, ed a valutarli nei dosaggi biologici rilevanti. Benché i chimici riuscissero spesso a sintetizzare più di un composto alla volta, non avevano mai sognato di riuscire a produrre diverse migliaia di composti in un solo esperimento. Oggi, da quando il termine chimica combinatoria è diventato di uso comune, anche la sintesi parallela di cinque composti può essere definita sintesi combinatoria.

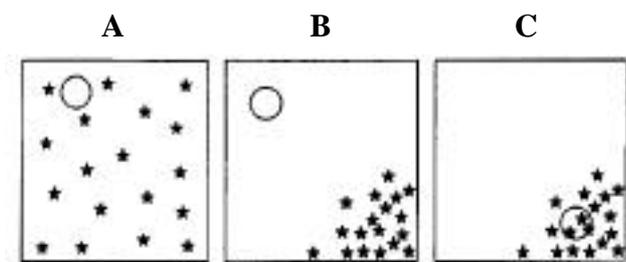
Tuttavia, per poter definire un processo come combinatorio, il chimico deve combinare insieme qualcosa almeno in un passaggio del suo processo di sintesi. Probabilmente, il termine più appropriato dovrebbe essere chimica ad elevata cadenza analitica (HTC), definizione in cui non sarebbe contenuta (ed usata in modo inappropriato) un'indicazione

della natura combinatoria del processo. Il vero approccio combinatorio alla sintesi verrà descritto più avanti. Tuttavia, possono essere classificate come combinatorie le tecniche in cui vengono eseguite contemporaneamente più operazioni della sintesi. Un esempio può essere rappresentato in questo caso dalla cosiddetta sintesi a "bustina di té", in cui il supporto solido viene compartimentalizzato in piccoli sacchetti di polipropilene che possono essere sottoposti a trattamento nella stessa fiasca senza miscelare il contenuto dei singoli compartimenti (1).

Scopo della HTC è velocizzare la scoperta, o l'ottimizzazione, di nuove entità chimiche (composti, composizioni o materiali) dalle proprietà specifiche desiderate, come l'attività biologica o catalitica, o la forza meccanica. Di conseguenza, le modalità con cui è stato generato il gran numero di composti chimici non sono così importanti. In questo articolo utilizzeremo il termine HTC invece del termine chimica combinatoria, o insieme ad esso, in quanto la nomenclatura non è stata ancora stabilita in modo preciso.

I primi articoli ad aver focalizzato tutta l'attuale attenzione sulla chimica combinatoria sono stati pubblicati nel 1991 (2-4). Curiosamente, in nessuno di questi articoli è stato usato il termine "chimica combinatoria". E' inoltre interessante che questi non fossero i primi articoli a descrivere le tecniche per la preparazione di miscele di composti per la valutazione biologica. Il laboratorio di Geysen aveva già preparato miscele di peptidi per l'identificazione di ligandi anticorpali nel 1986 (5, 6). Altri laboratori già fortemente impegnati nella sintesi di gruppi o miscele di peptidi erano quello di Houghten a San Diego (1), e quello di Furka a Budapest. Purtroppo, i risultati del laboratorio ungherese non erano facilmente reperibili o pubblicizzati (presentati come poster a due congressi internazionali [7, 8] o disponibili in forma di tesi [9]). Il riconoscimento del lavoro compiuto dagli autori di questi articoli storici è stato recentemente pubblicato nel numero inaugurale del *Journal of Combinatorial Chemistry* (10).

In effetti, la HTC è solo uno strumento utilizzato dai chimici al posto di metodiche adeguate alla progettazione razionale delle strutture chimiche, o delle composizioni con proprietà specifiche, quando le informazioni sui requisiti strutturali responsabili della proprietà desiderata nei composti bersaglio non sono sufficienti a predirne la struttura ottimale a priori. Questa situazione può essere comparata a quella degli alchimisti dei secoli passati, che cercavano di "trasmutare" il piombo in oro senza conoscere la struttura atomica dei due elementi (11). Coloro che più tardi ritennero di averla compresa ridicolizzarono gli alchimisti, e



**Fig. 1** Copertura dello spazio conformazionale (quadrato) da parte dei composti di sintesi (stelle). A. I composti sono uniformemente distribuiti nell'intero spazio; tre composti sono simili alla struttura ottimale (cerchietto), ma nessuno di essi riesce a "centrare" l'attività bersaglio. B. I composti sono più simili fra loro e coprono solo una frazione dello spazio conformazionale; nessuno dei composti si avvicina alla struttura ottimale. C. La stessa situazione di B, ma poiché l'attività bersaglio va a coincidere con la copertura dello spazio, numerose strutture riescono a "centrarsi". (Nella realtà, lo spazio è multidimensionale, con assi che vengono definite diversamente da diversi autori).

affermarono che la "trasmutazione" era impossibile. Tuttavia, gli esperimenti degli alchimisti produssero numerosi materiali nuovi e, fatto ancora più importante, migliorarono la nostra conoscenza della natura. Oggi è ben noto che un atomo può essere "trasmutato" in un altro; basta "solo" rimmescolare un po' i protoni e i neutroni nel nucleo atomico.

In considerazione di ciò, dobbiamo mantenere un atteggiamento di umiltà quando giudichiamo la nostra comprensione dei principi delle interazioni molecolari, intesa come la capacità di realizzare razionalmente i composti a partire da un progetto teorico, in particolare quando si hanno a disposizione scarse informazioni sui requisiti strutturali responsabili delle proprietà desiderate. Anche se in letteratura sono presenti alcuni esempi di progettazione e realizzazione computazionale di nuovi farmaci, la realtà di questi studi è spesso molto più prosaica, in quanto descrivono semplicemente osservazioni eseguite in precedenza in altri esperimenti.

E qui entra in gioco la HTC. I chimici, come molte altre persone, sono ambiziosi e vogliono avere successo. Anche se potrebbero non essere capaci di raggiungere obiettivi scientifici sensazionali come l'accelerazione di minuscole particelle ad una velocità superiore a quella della luce, vogliono comunque riuscire a scoprire nuovi composti in grado di curare il cancro o almeno di stimolare la crescita dei capelli. Tuttavia, anche riuscendo a realizzare un nuovo composto alla settimana, obiettivo che fino a poco tempo fa era considerato rispettabilmente produttivo nel contesto dell'industria farmaceutica, un chimico può prevedere di produrre circa 1.500 nuove strutture nell'arco della sua intera carriera. Statisticamente, le possibilità che uno di questi composti diventi un nuovo farmaco approvato in tutto il mondo sono piuttosto ridotte. E se fosse invece possibile produrre 1.500 composti in un solo giorno? Bene, il chimico incrementerebbe le sue possibilità di successo di un fattore di 7.500. Questo è il semplice motivo per cui le metodiche di HTC sono state sviluppate, e stanno venendo rapidamente introdotte praticamente in tutte le strategie per la scoperta di nuove entità chimiche. Tuttavia, la HTC potrebbe avere l'impatto più considerevole nel campo della

ricerca farmacologica, se combinata con la chimica computazionale e lo screening biologico.

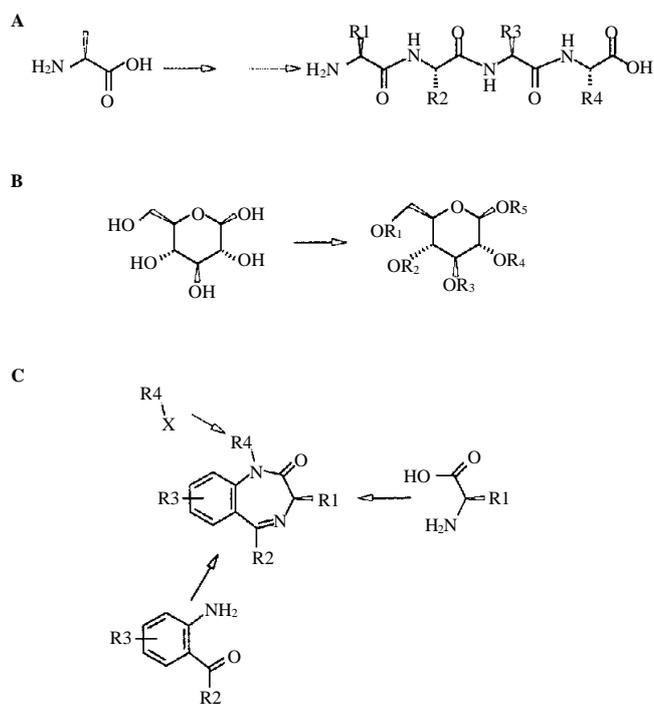
## Diversità chimica

Il nostro obiettivo non consiste solo nel realizzare il numero più elevato possibile di composti in meno tempo, ma anche nel renderli talmente diversi l'uno dall'altro da riuscire a coprire l'area più estesa di quello che viene definito come spazio conformazionale. Questo spazio si estende lungo tutte le possibili conformazioni teoriche di tutti i composti che ricadono in un dato intervallo di dimensioni. Quando le strutture di un insieme di composti realizzati tramite HTC sono uniformemente distribuite nel rispettivo spazio chimico, uno dei composti ha una possibilità statistica migliore di essere identico, o almeno simile, alla conformazione "ottimale" che conferisce la proprietà desiderata (ad es., l'attività biologica), rispetto ad un insieme di composti che coprono solo una frazione dello spazio chimico, anche se il numero totale di composti è lo stesso in entrambi gli insiemi (Fig. 1).

In altri termini, la preparazione di un insieme di composti che differiscono solamente nel numero di gruppi metilenici in un particolare sostituente coprirà probabilmente solo una piccola parte dello spazio chimico. Tuttavia, un singolo gruppo metilenico può fare la differenza, come per esempio nel caso dell'ormone ossitocina (peso molecolare 1.000 Da), in cui la sostituzione di un residuo di asparagina con uno di glutammina, che reca un gruppo metilenico in più nella catena laterale, determina la completa perdita dell'attività biologica.

Un ampio insieme di composti sintetici correlati è comunemente definito con il termine di library (o library combinatoria). Le library (biblioteche) hanno una complessità variabile da poche dozzine (una collezione di questo tipo dovrebbe essere definita scaffale, piuttosto che biblioteca) a svariati milioni di composti. La caratteristica che accomuna le library combinatorie è il fatto che tutte le molecole che compongono una library rappresentano una combinazione di uno o più "blocchi costruttivi" che vengono uniti tramite reazioni chimiche.

Le library combinatorie possono essere classificate sulla base della loro composizione o della loro storia sintetica (vedi Fig. 2). Le library peptide-simili (oligomeriche) (12) sono composte da unità ripetute di blocchi costruttivi simili, connessi dalla ripetizione della stessa reazione chimica (o di una reazione di tipo simile). Le library glucosio-simili (ad impalcatura) sono basate su un'impalcatura multifunzionale, i cui gruppi funzionali vengono selettivamente impiegati per il legame di vari blocchi costruttivi. La chimica alla base di questo tipo di library è stata suggerita da Hirschmann e collaboratori (13) con la sintesi di una molecola di glucosio modificata capace di mimare la funzione della somatostatina. Le library benzodiazepina-simili (condensate) (14) vengono create collegando blocchi costruttivi capaci di formare strutture uniche a dipendenza dell'ordine delle reazioni eseguite, in cui i blocchi costruttivi originali potrebbero non essere più facilmente riconoscibili nell'ambito della struttura risultante (possono essere usate varie strategie e tipologie di blocchi costruttivi per formare le stesse strutture finali). Le library possono essere strutturalmente omogenee o eterogenee; i composti possono cioè avere "impalcature" o "ossature" identiche oppure variabili. Inoltre, tutte le library combinatorie possono essere

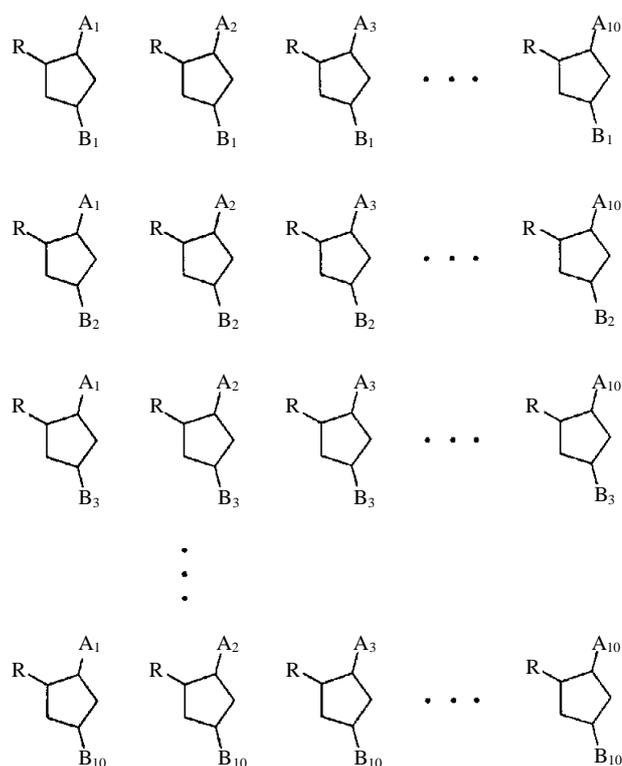


**Fig. 2** Diversi tipi di library. *A*: Library peptide-simili (oligomeriche), *B*: library glucosio-simili (ad impalcatura), e *C*: library benzodiazepina-simili (condensate). Le library oligomeriche vengono costruite collegando blocchi costruttivi simili tramite la ripetizione di una (o più) reazioni. Sono un tipico esempio i peptidi e gli oligonucleotidi. Le library ad impalcatura sono costruite tramite la modificazione di gruppi funzionali individuali sulla molecola bersaglio (impalcatura). Nelle library condensate potrebbe essere difficile individuare i blocchi costruttivi di partenza utilizzati per la costruzione.

complete (contenenti cioè tutte le possibili combinazioni teoriche dei blocchi costruttivi utilizzati), o incomplete (contenenti solo una frazione di tutti i composti possibili). Una library combinatoria completa è composta da tutte le possibili permutazioni dei blocchi costruttivi nelle loro rispettive posizioni. Se l'impalcatura della library possiede tre punti di attacco, (posizioni di diversità potenziale), e vengono usati dieci diversi blocchi costruttivi per ogni posizione di diversità, allora la library combinatoria completa sarà composta da 103 (1.000) composti (Fig. 3). La complessità e la diversità strutturale di una library combinatoria sono quindi proporzionali rispettivamente al numero di posizioni di diversità e di blocchi costruttivi ed alla differenza chimica fra questi ultimi.

### Metodiche di sintesi

Il processo di sintesi di una library combinatoria può essere piuttosto semplice, in quanto per tutti i composti viene tipicamente usato lo stesso protocollo, e quindi la metodica deve essere messa a punto soltanto una volta. Tuttavia, in alcuni casi questo può non essere semplice come potrebbe sembrare (considerando elementi come la scelta del tipo di supporto solido, la chimica di legame del primo blocco costruttivo, le strategie di protezione e deprotezione, ed il distacco dal supporto solido), poichè le condizioni di reazione ottimali possono variare enormemente fra i diversi

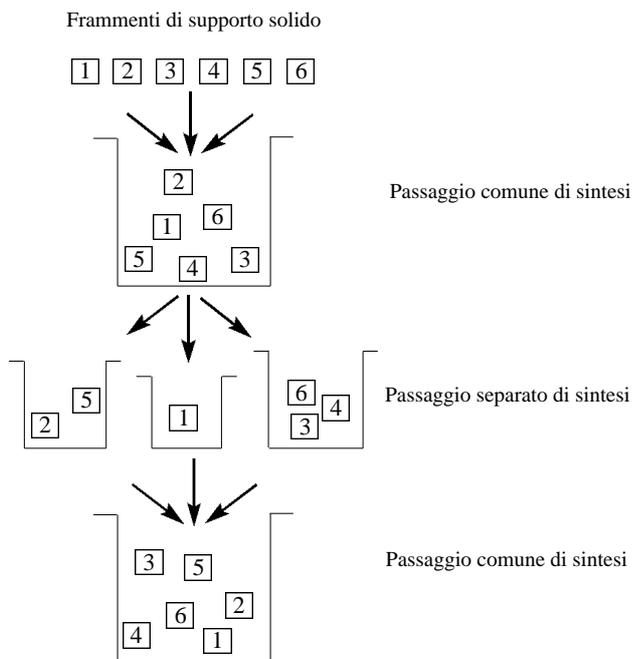


**Fig. 3** Library combinatoria di un'impalcatura ad anello a cinque membri con una posizione costante (R) e due posizioni variate (A e B). Quando per entrambe le posizioni variate vengono utilizzati 10 diversi blocchi costruttivi (da A1 ad A10 e da B1 a B10), la library completa sarà formata da 100 composti diversi.

blocchi costruttivi utilizzati per un particolare passaggio.

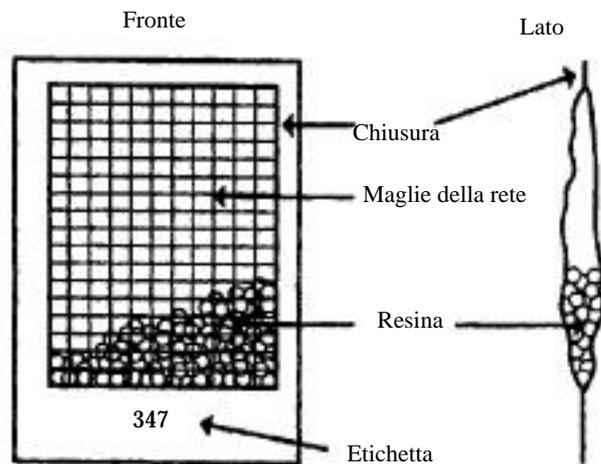
Alcuni potrebbero affermare che a causa dell'origine simile di tutti i composti contenuti in una data library combinatoria questa possa occupare solo una piccola frazione dello spazio chimico. Questa potenziale carenza delle library combinatorie può essere compensata sia utilizzando delle impalcature flessibili, che coprono uno spazio chimico più esteso rispetto a quelle rigide, sia variando non solo la combinazione dei blocchi costruttivi, ma anche la struttura dell'impalcatura nel contesto della library (ad es. diverse dimensioni degli anelli, oppure impalcature cicliche e lineari), mentre la metodica di sintesi rimane sempre la stessa per tutti i composti.

Un importante prerequisito della chimica combinatoria è la disponibilità di metodiche di sintesi parallela. Citiamone velocemente alcune. Abbiamo già citato la metodica della "bustina di tè" di Houghten (1). Questa tecnica si basa sulla segmentazione del supporto solido, ed è particolarmente adatta alla sintesi combinatoria. Un supporto di tipo membranoso (15), ad esempio, può essere facilmente suddiviso in un numero di frammenti pari a quello dei composti da analizzare. I passaggi di sintesi che sono identici per numerosi composti, o per tutti, possono quindi essere eseguiti in recipienti di reazione comuni senza che si verifichi una contaminazione crociata fra segmenti di supporto solido, che possono essere smistati e ridistribuiti nell'ambito



**Fig. 4** Processo di smistamento, combinazione e ri-smistamento dei frammenti del supporto per la sintesi parallela multipla in fase solida.

dei passaggi sintetici ogni volta che ciò si renda necessario (Fig. 4). Nella tecnica a “bustina di tè” il supporto solido (resina di polistirene funzionalizzata) viene racchiuso in pacchetti realizzati con una reticella di polipropilene (Fig. 5), permeabile ai solventi ed alle soluzioni dei reagenti. Nei comuni recipienti di reazione è possibile trattare contemporaneamente fino a diverse centinaia di questo tipo di pacchetti di resina. Dopo ogni passaggio, i pacchetti vengono smistati per il successivo passaggio di sintesi. Lo smistamento può essere basato su etichette alfanumeriche leggibili, oppure può essere semplificato includendo un’etichetta a radiofrequenza in ciascun sacchetto (16-18). In questo modo, è possibile sintetizzare fino ad un migliaio di composti utilizzando un numero ragionevole di recipienti di reazione. Nella sintesi peptidica, ad esempio, sono necessari solo 20 elementi di reazione contenenti i singoli aminoacidi per sintetizzare in parallelo un numero praticamente illimitato di peptidi (naturali) di qualsiasi lunghezza. Questa tecnica può essere estesa con la cosiddetta tecnica di “esplosione dei sacchetti”, in cui il contenuto di ciascun sacchetto viene ad un certo punto distribuito nei pozzetti di una piastra microtiter, in cui vengono eseguiti i passaggi successivi della sintesi, moltiplicando quindi il numero dei composti sintetizzati di un fattore di 96 (di 384, o superiore). Utilizzando questa metodica, è possibile preparare facilmente library contenenti fino a 100.000 composti (19). La sintesi in piastra microtiter è semplificata dall’uso della tecnica di “aspirazione superficiale”, in cui il solvente viene rimosso dai pozzetti contenenti il supporto solido sedimentato poggiando delicatamente una matrice di aghi sulla superficie del liquido. Questa tecnica esegue il trattamento parallelo di tutti i pozzetti, consentendo quindi di aggirare i problemi inerenti alla filtrazione a vuoto. Un’altra tecnica che consente di evitare la filtrazione è detta “centrifugazione inclinata” in cui le piastre microtiter ven-



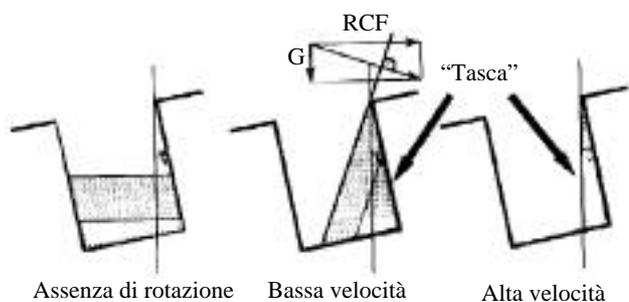
**Fig. 5** Rappresentazione schematica della “bustina di tè”.

gono sistemate sul perimetro di una piattaforma da centrifuga leggermente inclinata (da 1 a 9 gradi) verso il centro. Durante la centrifugazione, il supporto solido viene trattenuto all’interno di “tasche” (vedi Fig. 6) presenti nei pozzetti, che vengono create dalla forza centrifuga e dall’inclinazione, ed il liquido surnatante viene rimosso per “decantazione” (19, 20).

Un’altra semplice tecnica di sintesi parallela rapida si basa sull’uso di siringhe plastiche monouso dotate di filtri porosi. Questa tecnica è estremamente semplice ed economica, e può essere immediatamente implementata in qualsiasi laboratorio. Centinaia di composti possono essere sintetizzati manualmente senza grandi investimenti. Sono disponibili strumenti che ne semplificano la manipolazione, sia in forma di siringhe disposte in blocchi con accesso dall’alto (12) (Fig. 7), o in una disposizione che opera in presenza del vuoto, la cosiddetta disposizione a tessere di domino (21). In questo caso, le siringhe sono unite tramite il collettore alla fonte del vuoto tramite pistoni “bloccati” nella posizione superiore. Lo svuotamento delle siringhe per espulsione ed il riempimento tramite lo spostamento verso la fonte del liquido vengono ripetuti durante il ciclo di lavaggio prima di caricare la siringa con il reagente successivo. Il lavaggio di fino a 48 siringhe in parallelo viene eseguito tramite il semplice intervento di una valvola (fig. 8).

I puntali plastici funzionalizzati disposti nel formato di una micropiastra (22) rappresentano un altro diffuso supporto a segmenti per la sintesi parallela. La portata originariamente molto ridotta dei puntali è stata ampliata introducendo delle “corone” dall’area superficiale più ampia, che possono essere unite ai puntali in diversi strati (23, 24). In una variante di questa tecnica, i puntali vengono uniti ad un nastro, definendone così le singole posizioni (codificazione spaziale) (25).

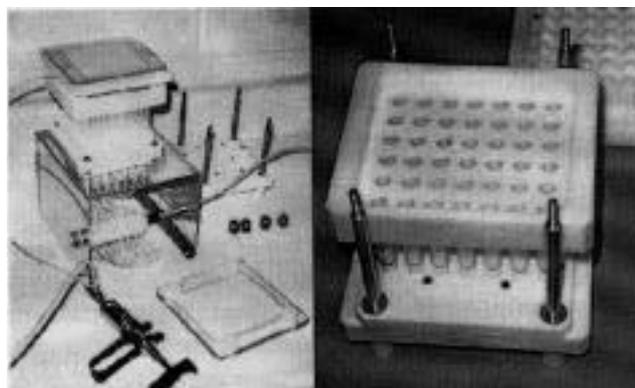
Una metodica potente, eppure semplice, per la sintesi in fase solida manuale o semi-automatizzata di miscele contenenti milioni di composti è l’approccio “una particella di resina-un composto” (4) (Fig. 9). Questa metodica è stata inoltre definita come approccio “dividi-e-miscela” (2) o “dividi-accoppia-ricombina” (3), ed è basata sull’accoppia-



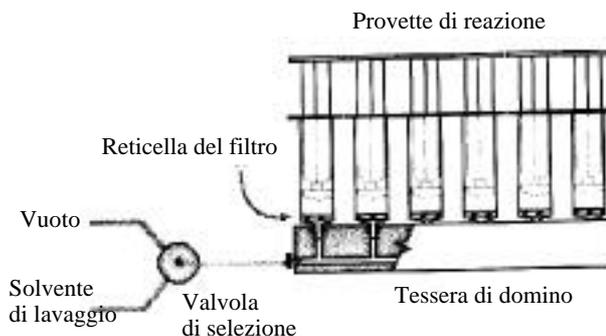
**Fig. 6** Principio della "centrifugazione inclinata". RCF = forza centrifuga relativa, G = forza gravitazionale.

mento di ciascun blocco costruttivo con porzioni separate della resina della fase solida, seguito dalla combinazione ed il miscelamento di tutte le porzioni di resina, prima di dividerle ancora per il successivo passaggio di sintesi (Fig. 9). Ripetendo questa procedura altre tre volte, ed utilizzando 20 diversi blocchi costruttivi per ciascun passaggio di sintesi, è possibile preparare facilmente una library di fino a 160.000 (204) composti. Questo processo genera library contenenti un unico e distinto composto in ciascuna particella di resina. Dopo aver assemblato la library sulla resina, questa può essere sia clivata per l'esecuzione di dosaggi biologici in soluzione, sia lasciata sulla resina per i dosaggi in fase solida. I dosaggi biologici vengono tipicamente eseguiti su singole particelle di resina, per cui il formato di screening delle library del tipo "una particella di resina-un composto" è quello di composti singoli, piuttosto che di miscele di composti (26). Il principio delle library "una particella di resina-un composto" è basato sulla distribuzione statistica delle particelle durante il processo. Tuttavia, questa natura statistica può essere eliminata utilizzando supporti solidi continuamente divisibili, come le membrane o i filamenti. In questo caso, viene garantito che vengano preparati tutti i membri della library, e che nessuno di essi venga preparato in più di una copia (27).

I seguenti fattori continuano ad essere fonte di discussioni, talvolta controverse, fra i ricercatori che si occupano



**Fig. 7** Multiblock: composizione di più siringhe per la sintesi parallela. Sinistra: Multiblock sulla piattaforma di lavaggio; Destra: dettaglio del bocchetto.



**Fig. 8** Schema del funzionamento delle tessere di domino.

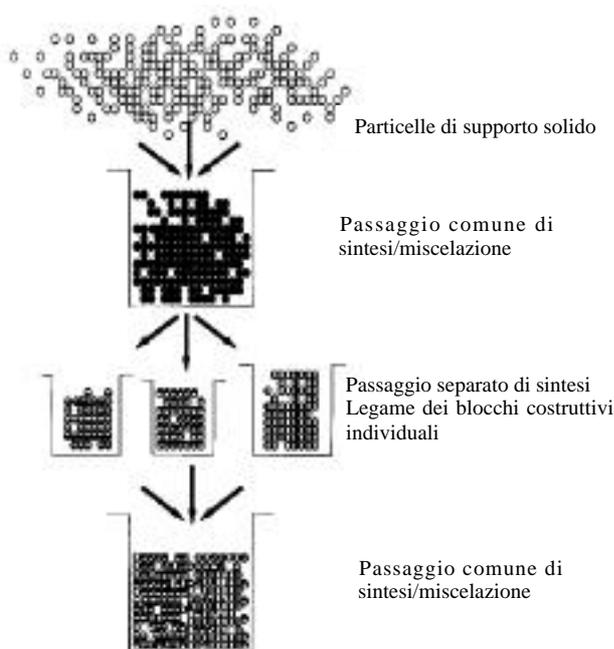
di HTC (per alcune di queste discussioni [romanzate] vedi [28]), poiché affrontano elementi salienti dell'argomento:

*Numero di composti necessari per l'esecuzione di un particolare progetto di screening:* Quanti composti dovrebbero essere presenti in una data library? più sono, meglio è; è semplice statistica. In realtà, tuttavia, vi sono delle limitazioni pratiche in termini sia di capacità di sintesi che di screening. Come regola generale, il numero di composti realizzati dovrebbe essere inversamente proporzionale alla quantità di conoscenze di cui si dispone sull'interazione studiata. Se si conoscono caratteristiche strutturali importanti per le proprietà desiderate del composto ricercato, non avrebbe molto senso generare composti che non possedano tali requisiti, a meno che lo scopo del progetto sia la scoperta di nuovi composti completamente differenti da strutture già note.

Se, viceversa, non si dispone di dati relativi alla struttura che il composto desiderato dovrebbe avere, come nel caso della ricerca di ligandi per una proteina appena scoperta, allora è consigliabile produrre il maggior numero possibile di composti chimicamente differenti.

Riflettendo queste considerazioni, le library di composti vengono spesso classificate come library di scoperta oppure library di ottimizzazione dei composti lead; le prime sono più vaste e coprono uno spazio chimico più ampio rispetto alle meno complesse e più focalizzate library di ottimizzazione.

Le dimensioni e la complessità di una particolare library di composti dipendono inoltre dalla decisione di usare o meno blocchi costruttivi chirali stereochimicamente puri per la sintesi. Anche in questo caso, se è noto che uno o l'altro enantiomero di un particolare blocco costruttivo è importante per la proprietà desiderata della molecola, allora la scelta ricadrà su quella particolare conformazione strutturale. Se non sono note le preferenze stereochimiche, tuttavia, si potrebbe usare solo un gruppo di enantiomeri, riducendo del 50% le probabilità di trovare la molecola giusta (supponendo che sia attivo un solo isomero della molecola), o includere entrambi gli enantiomeri dei blocchi costruttivi chirali (se disponibili), scelta che raddoppia l'impegno di sintesi. In alternativa, i blocchi costruttivi chirali possono essere usati in forma di miscele racemiche, e le miscele isomeriche attive dei composti possono essere successivamente separate, o ri-sintetizzate, in forma di iso-



**Fig. 9** Principio della sintesi delle library “una particella di resina-un composto”. Le particelle di resina vengono esposte ad un solo reagente alla volta, e quindi ognuna di esse può contenere una sola struttura. Il processo di separazione del supporto solido in aliquote e di miscelazione viene ripetuto tante volte quanti sono i passaggi della realizzazione della library utilizzando i blocchi costruttivi individuali. Una sintesi a sette passaggi, in cui tre di questi utilizzano i vari blocchi costruttivi (in ciascun passaggio vengono utilizzati 10 diversi blocchi costruttivi), genererà  $10 \times 10 \times 10 = 1.000$  diverse popolazioni di particelle. Se si utilizza per la sintesi 1g di particelle di polistirene da  $130 \mu\text{m}$  (1.000.000 di particelle), ci saranno in media 1.000 particelle che recano lo stesso composto. Se per la sintesi venissero usate solo 1.000 particelle (una situazione piuttosto improbabile), la possibilità di avere una qualsiasi particolare struttura rappresentata nella library sarebbe solo del 70% circa.

mero puro allo scopo di identificare l'isomero attivo del composto. Questo richiede ovviamente il consenso generale nei confronti dell'utilizzo di miscele di composti, il che ci porta all'elemento di discussione successivo.

*Miscele di composti contro composti singoli:* le metodiche di chimica combinatoria sono state sviluppate ed usate per la prima volta per la generazione di library di peptidi sintetici (12, 29). Questo tipo di library erano composte da numerosi milioni di peptidi, che venivano preparati sia come miscele organizzate (3, 6) che come library di composti del tipo “una sferetta di resina-un composto” (4) (vedi sopra). Il concetto di testare vaste miscele di composti è stato in effetti preso dalla natura, e non è quindi così insensato come affermato da alcuni. Potenzialmente, tutte le interazioni altamente specifiche che avvengono nei contesti biologici fra i ligandi e le loro molecole accettrici hanno luogo in un ambiente piuttosto eterogeneo, vale a dire in presenza di numerose altre molecole, senza interferenze. Inoltre, miscele piuttosto complesse di composti in forma di estratti vegetali o animali, brodi di fermentazione, e simili, continuano a rappresentare una fonte importante di

nuovi composti bioattivi. Di conseguenza, non deve sorprendere che numerosi nuovi composti possano essere identificati tramite lo screening di miscele altamente complesse di composti sintetici. Se confrontata con il laborioso processo di isolamento ed identificazione di un composto sconosciuto da una miscela di prodotti naturali, la deconvoluzione (cioè il processo di identificare singoli composti attivi nell'ambito di miscele sintetiche di composti sintetizzando miscele sempre meno complesse ed alla fine composti singoli) rappresenta un processo semplice e lineare.

Tuttavia, sussiste un persistente scetticismo nei confronti della generazione e dello screening di ampie miscele di composti sintetici, motivo per cui l'orientamento più diffuso della HTC rimane verso la realizzazione di matrici di singoli composti o di miscele dalla portata molto ridotta (meno di 100 composti per miscela). I principali dubbi che riguardano l'uso di miscele sono: 1) che la concentrazione relativa dei composti attivi nell'ambito della miscela sia troppo bassa per essere rivelata dal dosaggio biologico; 2) che l'agonista e l'antagonista presenti nella miscela possano annullarsi l'un l'altro; e 3) che l'attività rilevata nelle miscele possa essere causata da artefatti come la presenza di impurità o di prodotti secondari, che potrebbero non essere riproducibili nella nuova sintesi dei composti singoli presenti nelle miscele attive.

Anche se questi dubbi potrebbero rappresentare delle valide ragioni per non utilizzare miscele per uno o l'altro progetto, non rappresentano una generale controindicazione all'uso delle miscele, come discusso in dettaglio da Houghten e collaboratori (30). In generale, le miscele devono essere sottoposte a screening a concentrazioni molto più elevate dei composti singoli, avendo una concentrazione finale di screening inversamente proporzionale al livello di complessità della miscela in cui sono contenuti. Nei dosaggi funzionali, un antagonista potente potrebbe in effetti mascherare l'attività di un agonista ugualmente potente presente nella stessa miscela. Questo non è altrettanto vero per i dosaggi di legame, in cui l'antagonista e l'agonista creano lo stesso segnale. Ed una metodica di sintesi riproducibile, ben messa a punto e provata ripetutamente, è un requisito essenziale per la sintesi di qualsiasi library combinatoria, sia questa rappresentata da miscele o da composti singoli.

Inoltre, l'utilizzo di miscele è decisamente molto più economico in termini di tempo e denaro, in particolare nei progetti che prevedono la generazione e lo screening di grandi quantità di composti, come illustrato dall'esempio seguente. Un singolo screening di una library di 50.000 composti formattati come sostanze singole, ad una cadenza analitica di 2.500 composti al giorno, richiederebbe circa un mese. Se lo screening ha un costo per composto pari a un dollaro, lo screening di tutta la library costerà in tutto 50.000 dollari. Viceversa, se formattata in miscele di 20 composti, lo screening della stessa library potrà essere eseguito in un solo giorno, con un costo totale di 2.500 dollari. Supponendo che la metodica di sintesi sia stata messa a punto in modo riproducibile, il processo di ri-sintesi e di valutazione dei singoli composti a partire dalle miscele attive non dovrebbe richiedere più di una settimana, per cui il risparmio di tempo totale sarà di almeno il 75%. Se i singoli composti non devono essere ri-sintetizzati, il risparmio è ancora maggiore. Inoltre, lavorando con le miscele è necessario utilizzare molta meno molecola bersaglio, ele-

mento di particolare importanza quando il bersaglio dello screening, o altri reagenti di dosaggio, siano costosi e/o disponibili solo in quantità limitate (ad es. una proteina appena isolata o espressa).

Nel caso di library relativamente piccole (meno di 50.000 composti), potrebbe essere una buona idea sintetizzare tutti i composti separatamente, e quindi miscelare aliquote di ogni composto per lo screening, lasciando una quantità sufficiente di ciascun composto per l'esecuzione degli studi di follow-up con le singole molecole. Un'alternativa può essere rappresentata dal sintetizzare i composti singoli e le miscele contemporaneamente. Questo approccio elimina la necessità di ri-sintetizzare i composti singoli dalle miscele attive. Tuttavia, questi approcci sono meno pratici nel caso di library più vaste.

*Composti flessibili contro composti rigidi:* Questa è una questione piuttosto controversa. Alcuni sostengono che le molecole rigide hanno una maggiore propensione al legame ad alta affinità rispetto alle molecole più flessibili, in quanto ogni legame capace di ruotare su se stesso sottrae energia potenziale all'interazione con il bersaglio. Per potersi adattare al rispettivo sito di legame, questo tipo di molecole rigide devono essere presentate esattamente nella corretta struttura e conformazione. La scoperta a priori di nuovi ligandi rigidi ad alta affinità è un gioco piuttosto rischioso del tipo "tutto o nulla", poiché non sarà possibile individuare le molecole attive anche nella library più vasta e complessa se questa manca proprio di quel composto perfetto, seppure dovessero esservi presenti molecole analoghe simili.

Viceversa, le possibilità di trovare un ligando per una particolare molecola bersaglio in una library di composti flessibili sono più elevate, poiché questo tipo di strutture sono capaci di adottare una gamma di conformazioni, che con un po' di fortuna includeranno quella capace di adattarsi al sito di legame del bersaglio. In alcuni tipi di interazione, tale "conformazione di legame" è adottata dalla molecola solo quando questa viene a trovarsi in prossimità del sito di legame del bersaglio (adattamento indotto). Questo tipo di molecole flessibili, tuttavia, sono spesso solo dei leganti ad affinità modesta o ridotta, e richiedono una discreta quantità di ottimizzazione strutturale per poter essere trasformate in un ligando accettabile.

In conclusione, anche se intendiamo individuare ligandi rigidi ad alta affinità, il nostro approccio di ricerca dovrebbe essere flessibile.

*Prodotti grezzi e purificati:* Anche in questo caso, si tratta di trovare un equilibrio fra rischi e risorse. L'utilizzo di composti puri è senza dubbio il modo più sicuro per generare dati chiari e non ambigui, poiché la valutazione dei composti grezzi porta sempre con sé il rischio che l'attività osservata sia dovuta a prodotti secondari piuttosto che al composto stesso. Inoltre, un composto interessante potrebbe essere scarsamente presente, o non essere presente affatto, nel prodotto della sintesi, e non essere quindi individuato durante il processo di screening. Tuttavia, l'eliminazione di questi rischi spesso non giustifica il tempo impiegato a purificare ogni composto, a meno che il frazionamento dei prodotti di sintesi non rappresenti il fine ultimo della generazione della library, che includerà in questo caso tutti i prodotti secondari separatamente, anche senza che siano note le strutture di gran parte di essi.

Gli standard di purezza per i prodotti grezzi dipendono

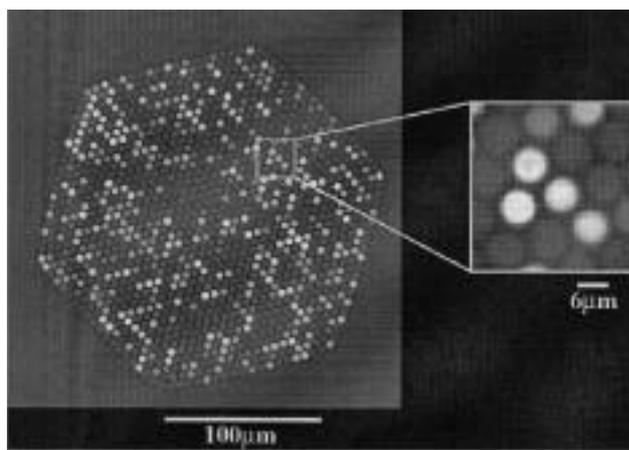
ampiamente dall'efficienza della metodica di sintesi, oltre che dalla robustezza del dosaggio biologico, e ricadono tipicamente nel range di >70-80% (misurato tramite l'analisi di un campione statistico dei singoli composti, di solito con l'HPLC-preferibilmente insieme alla spettrometria di massa).

Quando si lavora con i prodotti non purificati è assolutamente essenziale che la metodica di sintesi sia riproducibile, in modo che ogni possibile prodotto secondario attivo possa essere facilmente generato. Questi prodotti secondari potrebbero in effetti essere nuovi lead farmacologici più interessanti degli stessi composti intenzionali, poiché alcuni di essi potrebbero rappresentare strutture completamente nuove.

*Quantità di ciascun composto:* Storicamente, ai chimici organici è sempre piaciuto preparare quantità "decenti" di composto, vale a dire più di 100 mg. Nella chimica combinatoria, e nella sintesi parallela in generale, questo tipo di sintesi su vasta scala diventa economicamente sconsigliata in termini sia di costi della sintesi che di spazio di conservazione. Inoltre, 100 mg di un composto dal peso molecolare di circa 500 D producono circa 2 litri di una soluzione 100  $\mu$ M, decisamente molto più del necessario, anche se il composto dovesse essere testato in quadruplicato a diverse concentrazioni in centinaia di dosaggi biologici. In considerazione di ciò, le metodiche di sintesi stanno ora venendo miniaturizzate fino all'ordine delle picomoli allo scopo di rendere più economica la sintesi (31). Infatti, esistono diversi tipi di approccio alla sintesi nell'ordine di singole particelle del supporto solido (vedi sopra) dal diametro di circa 100  $\mu$ m. La capacità tipica di questo tipo di particelle è di circa 100 pmol, per cui il composto presente su una sola di esse può produrre tipicamente 10  $\mu$ L di una soluzione 10  $\mu$ M. Anche se questa quantità potrebbe essere sufficiente a testare il composto in un dosaggio biologico, forse anche in duplicato, non sarebbe sufficiente a stabilire curve dose-risposta, o a testare il composto in più di un dosaggio biologico. Viceversa, il legame alla molecola bersaglio può agevolmente essere osservato anche con particelle più piccole: 60.000 particelle di 3  $\mu$ m di diametro possono essere immobilizzate su una sezione da 1 mm<sup>2</sup> di un fascio di fibre ottiche, consentendo di osservare le interazioni specifiche sulle singole particelle (vedi Fig. 10) (32). In ogni caso, gli approcci di sintesi altamente miniaturizzata portano sempre con sé la potenziale necessità di ri-sintetizzare successivamente tutti o alcuni dei composti attivi per gli studi di follow-up o per progetti di screening ulteriori.

In generale, la quantità di ciascun composto da preparare in una particolare library dovrebbe dipendere da: 1) le risorse finanziarie e di spazio disponibili per quel particolare progetto; 2) la capacità e la scala della strumentazione di sintesi utilizzata; 3) se i composti sono purificati, la resa attesa dei composti purificati; e 4) il numero dei dosaggi biologici in cui il composto sarà testato, oltre che i volumi e le concentrazioni delle soluzioni di composto necessarie per ciascun dosaggio. La sintesi che ecceda le quantità di materiale "veramente necessario" sarà probabilmente presto considerata un completo spreco di risorse. La miniaturizzazione dei dosaggi biologici dirigerà la domanda di quantità di composti a livello nanomolare.

*Sintesi in fase solida e sintesi in soluzione:* Come discusso in precedenza, le tecniche di chimica combinatoria



**Fig. 10** Sezione di un fascio di fibre ottiche con le sferette incluse nei "pozzetti" individuali. (Autorizzata dalla Illumina, Inc. [San Diego, CA]).

sono state sviluppate per la prima volta per la sintesi parallela multipla di peptidi e di library combinatorie di peptidi. La maggior parte di queste metodiche impiegano il concetto di Merrifield di sintesi peptidica in fase solida (33), basato sull'assemblaggio a tappe delle catene peptidiche in seguito al legame covalente dell'aminoacido C-terminale ad un supporto solido polimerico. Diversamente dalla sintesi in soluzione, in cui gli intermedi ed i prodotti finali vengono tipicamente isolati e purificati tramite estrazione e precipitazione, nella sintesi in fase solida queste procedure sono rimpiazzate dal semplice lavaggio del supporto solido, a cui il peptide in crescita rimane legato fino a che non viene tipicamente clivato dopo il completamento della sintesi.

Oltre a facilitare ed accelerare enormemente il processo di sintesi, la metodica in fase solida è inoltre adattabile all'automazione, grazie al carattere altamente ripetitivo del processo (la ripetizione del ciclo: legame-lavaggio-deprotezione-lavaggio). Sono ora disponibili vari strumenti per la sintesi parallela automatizzata di fino a centinaia di composti (34-36), e numerose ditte stanno dedicando molte risorse ai programmi interni per lo sviluppo di sistemi propri di sintesi parallela automatizzata (vedi ad es. [19]).

I classici materiali di supporto per la sintesi in fase solida sono delle particelle di resina polimerica funzionalizzata, basate su polistirene con legami crociati, glicole polietilenico, o altri polimeri. Oggi, i materiali di supporto utilizzati per la sintesi in fase solida vengono realizzati in molte forme e strutture, come aghi plastici, dischetti di cellulosa, e membrane e vetrini spazialmente indirizzabili. Una esauriente trattazione di questo argomento è contenuta nella raccolta di Hudson sulle descrizioni personali dei ricercatori dedicati allo sviluppo di nuovi materiali e tecniche di supporto solido (37, 38).

Anche se la sintesi in fase solida è diventata piuttosto popolare e perfezionata nella chimica dei peptidi durante gli anni '80, non ha immediatamente riscosso una particolare attenzione da parte dei chimici organici. È stato solo dopo l'enorme successo delle library combinatorie di peptidi sintetici che il principio della fase solida è stato rapidamente adottato per la chimica organica ad elevata cadenza analitica (39). Infatti, molti degli iniziali articoli sulla generazione di library combinatorie non peptidiche erano

dedicati al solo adattamento di reazioni organiche generali e ben affermate alla sintesi in fase solida, allo scopo di "portare la chimica organica sul supporto solido". Oggi, la sintesi in fase solida è diventata la metodica di elezione per la maggior parte dei progetti di chimica combinatoria. Su questo argomento sono stati pubblicati numerosi articoli di rassegna e numerose raccolte (40-45).

Una variante della sintesi in fase solida è stata definita come "cattura su resina"; in questa procedura, la sintesi viene eseguita in soluzione, e la molecola desiderata viene intrappolata nel supporto solido mentre l'eccesso di reagenti viene allontanato con dei passaggi di lavaggio. Il requisito di questa strategia è la mancanza di funzionalizzazione, che consente la reazione con il supporto solido sia del materiale di partenza che dei prodotti secondari (46). Una strategia alternativa, in cui il supporto in fase solida interagisce con l'eccesso del materiale di partenza e dei prodotti secondari lasciando in soluzione solo il prodotto desiderato, è detta "quenching sostenuto dal polimero" (47).

Tuttavia, molti chimici organici sono rimasti fedeli alla sintesi convenzionale in soluzione per l'esecuzione della sintesi parallela (48). Questa può apportare dei benefici alla sintesi che prevede reazioni non facilmente eseguibili su fase solida, o quando i prodotti della sintesi in fase solida siano considerevolmente meno puri degli stessi composti realizzati in soluzione. In generale, tuttavia, la sintesi altamente parallela in soluzione richiede una quantità di strumentazione di sintesi decisamente superiore (ad es. per il trasferimento parallelo di liquidi e le estrazioni liquido/liquido).

Allo scopo di combinare i vantaggi di entrambe le metodiche, è stato ideato un sistema di sintesi ibrido fra la fase solida e la fase liquida (49). Come nella sintesi in fase solida, le molecole vengono assemblate mentre sono legate ad un supporto solido che, diversamente dalla sintesi in fase solida, è solubile nel mezzo di reazione, consentendo cinetiche di reazione comparabili a quelle della sintesi in soluzione. Dopo la reazione, il supporto polimerico può essere precipitato per la rimozione dell'eccesso di reagenti. Il solvente e le condizioni di reazione per la precipitazione devono essere scelti ed ottimizzati attentamente per prevenire l'inclusione nelle particelle precipitate del reagente residuo, che potrebbe interferire con il passaggio di sintesi successivo dopo la nuova dissoluzione del polimero. Questo approccio è stato originariamente sviluppato per la sintesi peptidica (50) ed è stato ora adattato all'HTC.

Un'altra tecnologia emergente intesa a combinare i benefici della sintesi in fase liquida ed in fase solida è la sintesi in fase fluorosa (51, 52), in cui la molecola in crescita viene legata ad un'etichetta chimica contenente un'alta proporzione di fluoro. La sintesi è eseguita in un sistema liquido trifasico (un solvente organico, una fase acquosa, ed un solvente fluorocarbonico); il composto etichettato è preferibilmente solubile nella fase "fluorosa", per cui è possibile estrarre il reagente in eccesso e i prodotti secondari nella fase acquosa o nella fase organica.

## Prospettive

Il campo della chimica combinatoria sta subendo uno sviluppo esponenziale, come evidenziato dalla crescita della banca dati contenente gli articoli relativi alla diversità molecolare, alla generazione ed allo screening delle library, ed alla chimica in fase solida, accessibile via Internet (53).

Questa banca dati rappresenta un'ottima fonte di letteratura dettagliata ed approfondita per il lettore interessato all'argomento. Sono stati inoltre pubblicati numerosi libri sulla chimica combinatoria (54-68). Vogliamo citare *The Combinatorial Index* di Barry Bunin (40), una raccolta dettagliata di centinaia di procedure per la sintesi ad elevata cadenza analitica, ed il recente lavoro pubblicato da Kevin Burgess, *Solid-Phase Organic Synthesis* (69). Entrambi rappresentano un'appropriata fonte di conoscenze dei vari aspetti della chimica combinatoria e della sintesi parallela.

I vari approcci e filosofie della chimica combinatoria e ad elevata cadenza analitica sono stati discussi, difesi e confutati in numerose occasioni. Noi riteniamo che l'approccio più appropriato a questo settore sia quello di rimanere aperti a nuove idee e concetti, anche se questi sembrano negare teorie precedenti, e di utilizzare la tecnologia più adatta alla soluzione del problema, che potrebbe non essere sempre la più diffusa al momento. Le menti curiose e creative sono necessarie per far progredire oltre la tecnologia dell'HTC, e le questioni irrisolte dovrebbero essere viste come una sfida dai neofiti di questo impegnativo settore.

## Ringraziamenti

Si ringrazia il Dott. Gianmatteo Micca (Cuneo) per la rilettura critica della traduzione italiana.

## Bibliografia

- Houghten RA: General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: Specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:5131-5135.
- Furka A, Sebastyen F, Asgedom M, Dibo G: General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures. *Int J Peptide Prot Res* 1991;37:487-493.
- Houghten RA, Pinilla C, Blondelle SE, Appel JR, Dooley CT, Cuervo JH: Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery. *Nature* 1991;354:84-86.
- Lam KS, Salmon SE, Hersh EM, Hruby VJ, Kazmierski WM, Knapp RJ: A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity. *Nature* 1991;354:82-84.
- Geysen HM, Rodda HM, Mason TJ, Porter R, Wheelan J (eds): The delineation of peptides able to mimic assembled epitopes, in *Synthetic Peptides as Antigens*, CIBA Foundations Symposium 119, New York, Wiley, 1986, pp 131-149.
- Geysen HM, Rodda SJ, Mason TJ: A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. *Mol Immunol* 1986;23:709-715.
- Furka A, Sebastyen F, Asgedom M, et al: Cornucopia of peptides by synthesis, in *Highlights of Modern Biochemistry*, Proceedings of the 14th International Congress of Biochemistry, Prague, Czechoslovakia, 1988. Utrecht, The Netherlands, VSP, 1988, 13, p 47.
- Furka A, Sebastyen F, Asgedom M, Dibo G: More peptides by less labour. Poster presented at Xth International Symposium on Medicinal Chemistry, Budapest 1988.
- Asgedom M: Synthesis of peptide mixtures and examination of their composition. Thesis, Eotvos Lorand University, Budapest, Hungary, 1987.
- Lebl M: Parallel personal comments on "classical" papers in combinatorial chemistry. *Journal of Combinatorial Chemistry* 1999;1(1):3-24.
- Grataroli G: *Verae alchemiae artisque metallicaecitra aenigmata doctrina certusque modus*. Bibliotheca Palatina ed., Basileae, Petri & Perma, 1561.
- Lebl M, Krchnak V: Synthetic peptide libraries. *Methods Enzymol* 1997;289:336-392.
- Hirschmann R, Nicolaou KC, Pietranico S, Salvino J, Leahy EM, Sprengeler PA, Furst G, Smith ABI, Strader CD, Cascieri MA, et al: Nonpeptidic peptidomimetics with beta-D-glucose scaffolding: A partial somatostatin agonist bearing a close structural relationship to a potent, selective substance P antagonist. *J Amer Chem Soc* 1992;114:9217-9218.
- Bunin BA, Plunkett MJ, Ellman JA: The combinatorial synthesis and chemical and biological evaluation of 1,4-benzodiazepine library. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4708-4712.
- Frank R, Doring R: Simultaneous multiple peptide synthesis under continuous flow conditions on cellulose paper discs as segmental solid supports. *Tetrahedron* 1988;44(19):6031-6040.
- Nicolaou KC, Xiao XY, Parandoosh Z, Senyei A, Nova MP: Radio-frequency encoded combinatorial chemistry. *Angew Chem Int Ed* 1995;34:2289-2291.
- Xiao X, Zhao C, Potash H, Nova MP: Combinatorial chemistry with laser optical encoding. *Angew Chem Int Ed* 1997;36(7):780-782.
- Moran EJ, Sarshar S, Cargill JF, Shahbaz MM, Lio A, Mjalli AMM, Armstrong RW: Radio frequency tag encoded combinatorial library method for the discovery of tripeptide-substituted cinnamic acid inhibitors of the protein tyrosine phosphatase PTP1B. *J Amer Chem Soc* 1995;117:10787-10788.
- Lebl M, Krchnak V, Ibrahim G, Pires J, Burger C, Ni Y, Chen Y, Podue D, Mudra P, Pokorny V, et al: Solid-phase synthesis of large tetrahydroisoquinolinone arrays by two different approaches. *Synthesis-Stuttgart* 1999;(11):1971-1978.
- Lebl M: New technique for high-throughput synthesis. *Bioorg Med Chem Lett* 1999;9(9):1305-1310.
- Krchnak V, Padera V: The domino blocks: A simple solution for parallel solid-phase organic synthesis. *Bioorg Med Chem Lett* 1998;8(22):3261-3264.
- Geysen HM, Meloen RH, Barteling SJ: Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:3998-4002.
- Maeji NJ, Valerio RM, Bray AM, Tribbick, G Spellmeyer DC, Brown SA, Stauber GB, Geysen HM: Multiple peptide synthesis on radiation grafted supports, in Yanaihara N (ed): *Peptide Chemistry 1992*, Proc. 2<sup>nd</sup> JSPC, Leyden, The Netherlands, Ecom, 1993 pp 657-658.
- Maeji NJ, Valerio RM, Bray AM, Campbell RA, Geysen HM: Grafted supports used with the multipin method of peptide synthesis. *React Polym* 1994;22:203-212.
- Smith JM, Gard J, Cummings W, Kanizsai A, Krchnak V: Necklace-coded polymer-supported combinatorial synthesis of 2-arylaminobenzimidazoles. *Journal of Combinatorial Chemistry* 1999;1(5):368-370.
- Lam KS, Lebl M, Krchnak V: The "one-bead one-compound" combinatorial library method. *Chem Rev* 1997;97(2):411-448.
- Stankova M, Wade S, Lam KS, Lebl M: Synthesis of combinatorial libraries with only one representation of each structure. *Peptide Res* 1994;7(6):292-298.
- Krchnak V, Lebl M: Synthetic library techniques: Subjective (biased and generic) thoughts and views. *Mol Diversity* 1996;1(3):193-216.
- Gallop MA, Barrett RW, Dower WJ, Fodor SPA, Gordon EM: Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 1. Background and peptide combinatorial libraries. *J Med Chem* 1994;37(9):1233-1251.
- Houghten RA, Pinilla C, Appel JR, Blondelle SE, Dooley CT, Eichler J, Nefzi A, Ostresh JM: Mixture-based synthetic combinatorial libraries. *J Med Chem* 1999;42(19):3743-3778.
- Freemantle M: Downsizing chemistry: Chemical analysis and synthesis on microchips promise a variety of potential benefits. *C&EN* 1999;77(8):27-36.
- Michael KL, Taylor LC, Schultz SL, Walt DR: Randomly ordered addressable high-density optical sensor arrays. *Anal Chem* 1998;70(7):1242-1248.
- Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J Amer Chem Soc* 1963;85:2149-2154.
- Cargill JF, Lebl M: New methods in combinatorial chemistry: Robotics and parallel synthesis. *Curr Opin Chem Biol* 1997;1(1):67-71.

35. Hoeplich PD Jr.: Automated solid phase synthesis of small organic molecules. *Nat Biotech* 1996;14:1311–1313.
36. Bondy SS: The role of automation in drug discovery. *Curr Opin Drug Disc Develop* 1998;1(1):116–119.
37. Hudson D: Matrix assisted synthetic transformations: A mosaic of diverse contributions. II. The pattern is completed. *Journal of Combinatorial Chemistry* 1999;1(6):403–457.
38. Hudson D: Matrix assisted synthetic transformations: A mosaic of diverse contributions. I. The pattern emerges. *Journal of Combinatorial Chemistry* 1999;1(5):333–360.
39. Fruchtel JS, Jung G: Organic chemistry on solid supports. *Angew Chem Int Ed* 1996;35:17–42.
40. Bunin BA: *The Combinatorial Index*. San Diego, Academic Press, 1998.
41. Dolle RE, Nelson KH Jr.: Comprehensive survey of combinatorial library synthesis: 1998. *Journal of Combinatorial Chemistry* 1999;1(4):235–282.
42. Gordon K, Balasubramanian S: Recent advances in solid-phase chemical methodologies. *Curr Opin Drug Disc Develop* 1999;2(4):342–349.
43. Hall SE: Recent advances in solid phase synthesis. *Mol Diversity* 1999;4(2):131–142.
44. Kingsbury CL, Mehrman SJ, Takacs JM: A comprehensive review of the applications of transition metal-catalyzed reactions to solid phase synthesis. *Current Organic Chemistry* 1999;3(5):497–555.
45. James IW: Recent publications in solid-phase chemistry: Part 2. *Mol Diversity* 1998;3(3):181–190.
46. Keating TA, Armstrong RW: Postcondensation modifications of Ugi four-component condensation products: 1-Isocyanocyclohexene as a convertible isocyanide. Mechanism of conversion, synthesis of diverse structures, and demonstration of resin capture. *J Amer Chem Soc* 1996;118(11):2574–2583.
47. Booth RJ, Hodges JC: Solid-supported reagent strategies for rapid purification of combinatorial synthesis products. *Account Chem Res* 1999;32(1):18–26.
48. Suto MJ: Developments in solution-phase combinatorial chemistry. *Curr Opin Drug Disc Develop* 1999;2(4):377–384.
49. Gravert DJ, Janda KD: Organic synthesis on soluble polymer supports: Liquid-phase methodologies. *Chem Rev* 1997;97(2):489–510.
50. Bayer E, Mutter M: Liquid phase synthesis of peptides. *Nature* 1972;237:512–513.
51. Curran DP: Combinatorial organic synthesis and phase separation: Back to the future. *Chemtracts Org Chem* 1996;9:75–87.
52. Curran DP, Hoshino M: Stille couplings with fluorinated tin reactants: Attractive features for preparative organic synthesis and liquid-phase combinatorial synthesis. *J Org Chem* 1996;61:6480–6481.
53. Leblova Z, Lebl, M: Compilation of papers in molecular diversity field. 1996, <http://www.5z.com>
54. Abelson JN (ed): *Combinatorial Chemistry*. San Diego, Academic Press, 1996.
55. Cabilly S (ed): *Combinatorial Peptide Library Protocols*. Totowa, NJ, Humana Press, Inc., 1997.
56. Chaiken IM, Janda KD (eds): *Molecular Diversity and Combinatorial Chemistry. Libraries and Drug Discovery*. ACS Conference Proceedings ed. Washington, DC, American Chemical Society, 1996.
57. Cortese R (ed): *Combinatorial Libraries: Synthesis, Screening and Application Potential*. New York, Walter de Gruyter, 1996.
58. Czarnik AW, DeWitt SH, (ed): *A Practical Guide to Combinatorial Chemistry*. Washington, DC, American Chemical Society, 1997.
59. Epton R (ed): *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis and Combinatorial Libraries*. Birmingham, Mayflower Scientific Ltd, 1999.
60. Fields GB (ed): *Solid-Phase Peptide Synthesis*. San Diego, Academic Press, 1997.
61. Gordon EM, Kerwin JFJ (eds): *Combinatorial Chemistry and Molecular Diversity in Drug Discovery*. New York, John Wiley & Sons, 1998.
62. Houghton RA (ed): *Combinatorial Libraries: The Theory and Practice of Combinatorial Chemistry*. Leiden, The Netherlands, ESCOM, 1995.
63. Jung G (ed): *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries: A Handbook*. Weinheim, New York, VCH, 1996.
64. Miertus S, Fassina G (eds): *Combinatorial Chemistry and Technology. Principles, Methods, and Applications*. New York, Marcel Dekker, Inc., 1999.
65. Moos WH, Pavia MR, Kay BK, et al (eds): *Annual Reports in Combinatorial Chemistry and Molecular Diversity*. Leiden, The Netherlands, ESCOM, 1997.
66. Obrecht D, Villalgorido JM (eds): *Solid-Supported Combinatorial and Parallel Synthesis of Small-Molecular-Weight Compound Libraries*. 1998.
67. Terrett NK (ed): *Combinatorial Chemistry*. New York, Oxford University Press, 1998.
68. Wilson SR, Czarnik AW (eds): *Combinatorial Chemistry: Synthesis and Applications*. New York, John Wiley & Sons, Inc., 1997.
69. Burgess K (ed): *Solid-phase Organic Synthesis*. New York, John Wiley & Sons, 2000.

From Spider Instruments, Inc., San Diego, CA.

Corrispondenza e richiesta di estratti a: Michal Lebl, PhD, Dsc, Spider Instruments, Inc., 9390 Towne Centre Drive, Suite 200, San Diego, CA 92121.