

Ricardo L. E. Furlán, Guillermo R. Labadie, Silvina C. Pellegrinet y Viviana L. Ponzo

IQUIOS (Instituto de Química Orgánica de Síntesis) - CONICET - UNR - Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas - Universidad Nacional de Rosario - Casilla de Correo, 991 - 2000 - Rosario - Argentina

Recebido em 23/1/96; aceito em 6/5/96

COMBINATORIAL CHEMISTRY: STRATEGIES TOWARD MOLECULAR DIVERSITY. Combinatorial Chemistry is a novel strategy that allows the generation of large compound libraries providing a valuable source of structural diversity. This review aims to cover the main topics of Combinatorial Chemistry highlighting syntheses and screening methodologies and published examples of Combinatorial Synthesis applied to drug discovery.

Keywords: combinatorial libraries; molecular diversity; solid-phase synthesis.

INDICE

- I- Introducción
- II- Colecciones de péptidos y moléculas relacionadas
 - IIa- Preparación de colecciones por síntesis individual de componentes
 - La síntesis sobre varillas de polietileno (*Multipin*)
 - El procedimiento de los saquitos de te (*Tea-bags*)
 - La síntesis química en paralelo, ordenada espacialmente y dirigida por luz (*Light directed, spatially addressable, parallel chemical synthesis*)
 - IIb- Preparación de colecciones por síntesis en forma de mezclas de componentes
 - El procedimiento de "Mezcla y separación". (*Mix and split o Portioning and mixing*)
 - El procedimiento "un grano-un péptido" (*One bead - one peptide*)
 - El Barrido posicional
 - IIc- Polímeros no naturales
- III- Métodos de codificación y marcadores moleculares
- IV- Colecciones de moléculas pequeñas
 - IVa- Estrategias de síntesis
 - IVb- Preparación de colecciones de compuestos heterocíclicos
 - IVc- Preparación de colecciones de otros compuestos
- V- Conclusiones
- VI- Referencias

I. INTRODUCCIÓN

Una de las etapas iniciales en el descubrimiento de nuevos fármacos es la identificación de compuestos líderes que presenten actividades biológicas potencialmente útiles por unión a determinados receptores o enzimas (*targets*). Durante muchos años se han utilizado los productos naturales como fuente de compuestos líderes. El descubrimiento de nuevas moléculas *target* y la posibilidad de realizar el *screening* simultáneo de un alto número de compuestos en poco tiempo ha aumentado la demanda de moléculas potencialmente activas.

La Química Combinatoria es una estrategia que permite construir rápidamente grandes colecciones (*libraries*) de compuestos con una amplia diversidad estructural, los que posteriormente son sometidos a ensayos biológicos, constituyendo así una novedosa fuente alternativa de compuestos líderes. A diferencia, la síntesis clásica, busca obtener en cada etapa un solo compuesto permitiendo además una síntesis paralela de varios miembros de la misma clase.

Las colecciones se preparan, casi exclusivamente, a partir de bloques (*building blocks*) ensamblados bajo las mismas condiciones de reacción. Este proceso se puede llevar a cabo usando química en fase sólida o en solución, sin embargo, se prefiere la primera por razones de pureza y de rendimiento. Los compuestos de la colección se generan simultáneamente en forma individual o en mezclas. Al diseñar una síntesis de compuestos en forma de mezclas se debe tener en cuenta la manera en que luego se realizará la identificación de los componentes activos. En síntesis de compuestos individuales en paralelo se generan colecciones de menor número de componentes pero la identificación de las moléculas activas es inmediata.

El desafío de generar colecciones de compuestos con la mayor diversidad molecular posible condujo al desarrollo vertiginoso de nuevas tecnologías. En la actualidad se dispone de una amplia variedad de estrategias que, en principio, fueron diseñadas para colecciones de moléculas secuenciables y luego se extendieron a moléculas pequeñas.

Una vez conocido el compuesto líder es necesario optimizar su estructura procurando la máxima actividad, para lo cual se deben definir cuáles son los elementos clave de reconocimiento por parte del receptor o de la enzima y en este punto, la síntesis combinatoria se adapta perfectamente tanto para moléculas secuenciables como para moléculas pequeñas.

En el diseño de una colección combinatoria, la síntesis y el análisis de la misma son los aspectos fundamentales que deben considerarse. Dentro de este último, la elucidación estructural de los compuestos activos constituye un punto importante que se encuentra en constante desarrollo.

II. COLECCIONES DE PÉPTIDOS Y MOLÉCULAS RELACIONADAS

Las colecciones de péptidos, y de otras moléculas secuenciables como los oligonucleótidos, se han generado, casi exclusivamente, utilizando síntesis sobre un soporte sólido. El desarrollo de la Química Combinatoria en fase sólida se basa, esencialmente, en el clásico procedimiento de formación de enlaces peptídicos introducido por Merrifield¹. Es interesante destacar que por esta importante contribución Merrifield recibió el Premio Nobel de Química en 1984.

En 1963 Merrifield reportó la síntesis de bradiquinina utilizando una metodología novedosa que consistía en unir un aminoácido a un soporte sólido insoluble e ir extendiendo la cadena peptídica hasta unir el aminoácido terminal. Por filtración y lavados sucesivos se podían eliminar los excesos de reactivos y los subproductos, obteniéndose péptidos de alta

pureza y con alto rendimiento. Los grupos funcionales se protegían y desprotegían de la manera usual, usando dicitclohexilcarbodiimida para acoplar los aminoácidos, ácido trifluoroacético para desproteger, diisopropil amina para neutralizar y finalmente se separaban los péptidos de la resina usando ácido fluorhídrico (Fig. 1). La automatización de este procedimiento condujo al desarrollo de aparatos computarizados que realizan la síntesis de péptidos muy rápidamente.

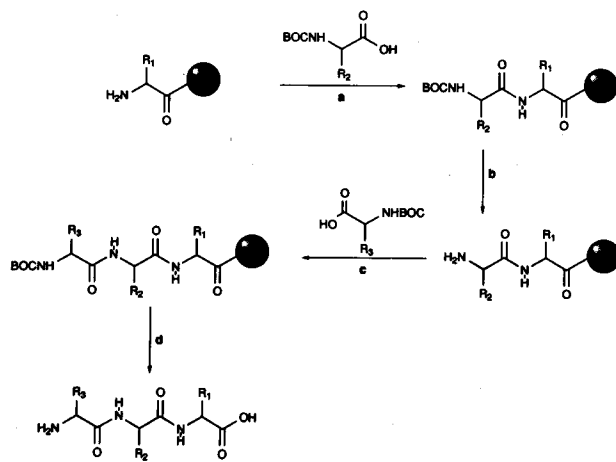


Figura 1. Reactivos y condiciones: a) diciclohexilcarbodiimida, CH_2Cl_2 ; b) i) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1); ii) diisopropilamina; c) diciclohexilcarbodiimida, CH_2Cl_2 ; d) i) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1); ii) diisopropilamina; iii) HF.

La síntesis en fase sólida posee varias ventajas con respecto a la síntesis en solución, en particular, la posibilidad de usar exceso de reactivos para completar las reacciones, los cuales se eliminan fácilmente junto con los subproductos mediante lavados sucesivos. Como el soporte sólido debe ser inerte a las condiciones de reacción se ha utilizado una gran variedad de resinas con distintas características. Las más comunes están constituidas por granos de poliestireno entrecruzado con un 1% de divinilbenceno, las que se pueden conseguir en una gran variedad de tamaños de granos.

Con las resinas hidrofóbicas, como las de poliestireno, las cadenas peptídicas (hidrofílicas) en crecimiento forman puentes de hidrógeno entre sí, lo que influye sobre el plegamiento de las mismas y, al hacer que el grupo amino terminal de la cadena en formación quede menos expuesto a los reactivos, disminuye la velocidad y el rendimiento de las reacciones. Para evitar este inconveniente se han desarrollado resinas hidrofílicas, como la Tentagel² y la de Sheppard³, las cuales, al igual que las cadenas peptídicas, pueden ser solvatadas por solventes polares apróticos, evitando los inconvenientes antes mencionados.

Por otro lado es necesario que el sustrato se una a la resina a través de un grupo ligante (*linker*) que permita la separación del producto final del soporte sólido mediante la ruptura selectiva de la unión producto-grupo ligante sin afectar las uniones peptídicas formadas. El tipo de grupo ligante elegido determina tanto el procedimiento a utilizar para liberar el producto de la resina como el grupo funcional terminal de este último. En la figura 2 se muestran los grupos ligantes de las conocidas resinas de Merrifield, de Wang y de Rink.

Los componentes de una colección pueden prepararse en forma de mezclas o individualmente. Las metodologías utilizadas para sintetizar y analizar la colección de compuestos están directamente relacionadas entre sí. La síntesis de los compuestos en forma individual ofrece la ventaja de que la etapa de identificación de las moléculas activas se puede hacer de forma inmediata, presentando la desventaja que, generalmente, el

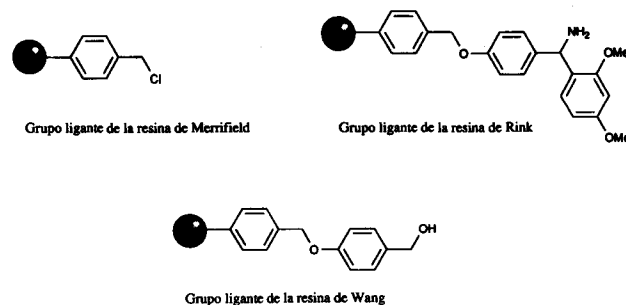


Figura 2. Representación esquemática de los grupos de las resinas de Merrifield, Rink y Wang.

número de componentes de la colección se ve reducido con respecto a la síntesis en forma de mezclas. Como ejemplos de estrategias de síntesis de compuestos en forma individual se pueden mencionar la síntesis sobre varillas de polietileno, el procedimiento de los saquitos de te y la síntesis química en paralelo, ordenada espacialmente y dirigida por luz. Cuando se planea la síntesis de una colección combinatoria en forma de mezclas se debe considerar que las reacciones tendrán que realizarse de una forma tal que el paso de identificación no sea demasiado complicado. Algunos de las metodologías que se desarrollaron con este fin son el procedimiento de "Mezcla y separación", el procedimiento "un grano-un péptido" y el Barrido posicional.

IIa- Preparación de Colecciones por Síntesis Individual de Componentes

La Síntesis Sobre Varillas de Polietileno (Multipin)

Esta metodología desarrollada por Geysen y colaboradores posibilita la generación de 96 péptidos individuales en forma simultánea⁴. Los péptidos son sintetizados sobre varillas de polietileno (*pins*). Noventa y seis de estas varillas están unidas a un bloque formando ocho filas de manera que cada varilla coincida con un pozo de una placa *microtiter* (Fig. 3). La síntesis de los péptidos se lleva a cabo usando el método convencional en fase sólida.

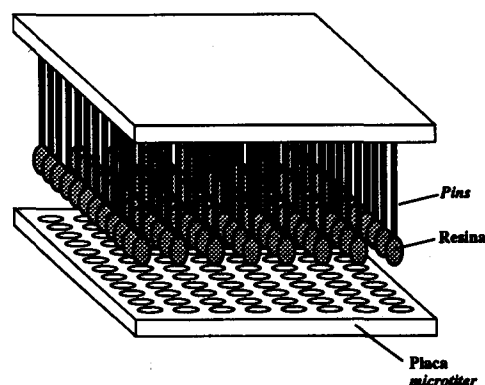


Figura 3. Representación esquemática de las varillas y de la placa *microtiter* utilizadas en la síntesis Multipin.

Los aminoácidos y los reactivos se colocan en los pozos de la placa *microtiter* y el acoplamiento se realiza sumergiendo las varillas dentro de los pozos. Cuando la reacción se completa, se realizan los lavados y la desprotección en grandes baños para realizar nuevos acoplamientos.

Una ventaja de esta metodología es que permite conocer la identidad de cada compuesto según su posición.

Los péptidos pueden someterse a ensayos biológicos separándolos previamente de las varillas o estando unidos a las mismas (de esta última manera los péptidos pueden usarse en varios bioensayos consecutivos)⁵.

Geysen utilizó esta técnica para localizar un epítopo inmunogénico del FMDV (*foot and mouth disease virus*)⁴. Para esto sintetizó 208 hexapéptidos que al superponerse cubrían por completo la secuencia de 213 aminoácidos de una proteína inmunológicamente importante (VP1) del FMDV. Sometió los 208 péptidos a un ensayo para determinar antigenicidad (ELISA) sin ser removidos del soporte sólido y una vez identificado el hexapéptido activo, reemplazó, por turno, cada aminoácido de éste por cada uno de los 20 aminoácidos naturales. Los 120 productos (20 x 6) se sometieron nuevamente al ensayo biológico, pudiendo de esta manera determinar que dos aminoácidos eran esenciales y las posiciones en las que debían estar en el hexapéptido.

También se reportaron síntesis de péptidos usando el método de *multipin*, en las que los productos se liberan del soporte quedando en solución, esta condición es la adecuada para muchos de los ensayos biológicos⁶. Estos péptidos han sido totalmente caracterizados mostrando ser de alta pureza⁵.

El Procedimiento de los Saquitos de Te (Tea-bags)

Este método, desarrollado por Houghten⁷, consiste en la síntesis de péptidos sobre porciones de resinas contenidas en pequeñas bolsas porosas de polipropileno (*tea-bags*) (Fig. 4).

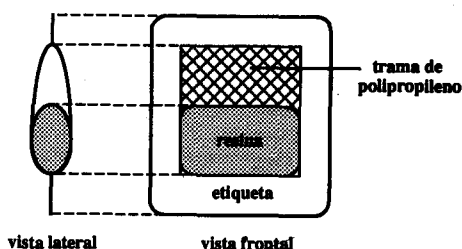


Figura 4. Representación esquemática de una bolsita que contiene resina (Tea-Bag).

Estas bolsitas se sumergen dentro de soluciones individuales de los aminoácidos activados, llevándose a cabo el acoplamiento. Los lavados y los pasos de desprotección se realizan simultáneamente en un único recipiente con agitación vigorosa. Posteriormente se separan las bolsitas para poder acoplar un nuevo monómero, este proceso se repite las veces que sean necesarias para lograr los productos deseados. Como cada bolsa fue sometida a una secuencia de acoplamientos definida, al final de la síntesis se obtiene un único péptido en cada una de ellas. Mediante el etiquetado de las bolsitas se conoce directamente la estructura de los péptidos sintetizados. Finalmente se separan los péptidos de la resina individualmente y se realizan los ensayos biológicos, identificándose la estructura de la molécula activa sin necesidad de efectuar ningún análisis adicional. Este método ha sido semi-automatizado, lo que hizo posible la síntesis simultánea de 120 péptidos diferentes⁸.

La Síntesis Química en Paralelo, Ordenada Espacialmente y Dirigida por Luz (Light directed, spatially addressable, parallel chemical synthesis)

Esta técnica posibilita la síntesis y el *screening* de un gran número de compuestos químicos ordenados espacialmente sobre un soporte sólido plano. La técnica combina la química de Merrifield en fase sólida, la fotolitografía y el uso de grupos protectores fotolábiles. La resolución espacial de la fotolitografía permite la reducción del proceso a escala pequeña⁹.

Como se muestra en la figura 5, los grupos amino terminales de los grupos ligantes se protegen con el grupo fotolábil 6-nitroveratriloicarbonylo (NVOC). Irradiando a través de una pantalla (P), en la que se alternan elementos opacos y transparentes, se desprotegen los grupos amino en zonas específicas de la superficie. Luego de este paso de activación selectiva, se expone el total de la superficie al primer monómero de la serie, por ejemplo un aminoácido, protegido también con un grupo fotolábil en su posición N-terminal. El acoplamiento se llevará a cabo entonces solamente en las zonas previamente desprotegidas. Posteriormente se elimina el exceso de monómero y se vuelve a irradiar utilizando una nueva pantalla (P'), la que permite la activación de una zona distinta a la anterior para la reacción con el segundo monómero. Este proceso se repite tantas veces como sean necesarias quedando la distribución de los distintos compuestos generados definida por la forma de las pantallas usadas y el orden de agregado de los monómeros.

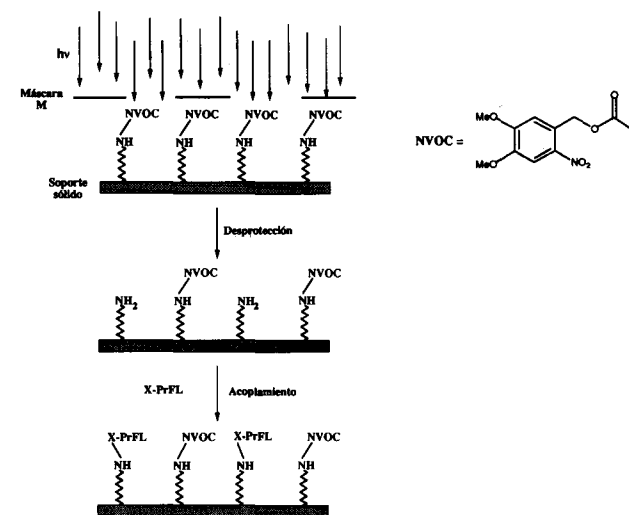


Figura 5. Mediante la irradiación a través de una pantalla (P) se desprotegen los grupos amino terminales de los grupos ligantes en zonas específicas de la superficie. El siguiente paso consiste en el acoplamiento del primer monómero (X), protegido con un grupo fotolábil (PrFL) en su posición N-terminal.

Para realizar los ensayos biológicos no es necesario liberar los productos del soporte sólido. Finalmente las moléculas activas se pueden identificar visualmente uniendo a la molécula objetivo (*target*) un compuesto fluorescente. Este procedimiento al poder ser automatizado permite la síntesis y el *screening* de una gran cantidad de compuestos.

Para ilustrar la generalidad de este método se sintetizaron dos pentapéptidos YGGFL y PGGFL (código de aminoácidos de una letra) que diferían en el aminoácido N-terminal. Este arreglo de péptidos se ensayó con un anticuerpo monoclonal anti β -endorfina que requiere tirosina (Y) en su amino terminal para mostrar alta afinidad. Se realizó una incubación con el anticuerpo marcado con fluoresceína para detectar las regiones que contenían los péptidos unidos al anticuerpo. Pudo observarse la distribución de los dos péptidos en cuadrados alternados (Fig. 6) y la unión selectiva del anticuerpo marcado con la molécula con tirosina N-terminal (YGGFL).

Iib. Preparación de Colecciones en Forma de Mezclas de Componentes

El Procedimiento de "Mezcla y Separación" (Mix and split o Portioning and mixing)

Esta metodología fue descrita por Furka^{10,11} y permite generar mezclas de un gran número de compuestos. El componente más

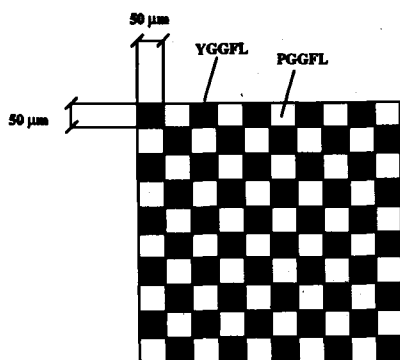


Figura 6. Luego de la incubación con el anticuerpo monoclonal anti β -endorfina marcado con fluoresceína se pudo observar la distribución de los 2 péptidos YGGFL y PGGFL en elementos de $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ y la unión selectiva del anticuerpo marcado con el pentapéptido YGGFL.

activo es identificado mediante un proceso iterativo de síntesis y *screening*.

En la práctica la resina se divide en partes iguales, cada una de las cuales se hace reaccionar con un monómero diferente. Una vez finalizada la reacción las porciones de resina se mezclan entre sí. La mezcla se vuelve a dividir en partes iguales y nuevamente se acopla un monómero diferente a cada porción de resina. Este proceso de mezclado, separación y acoplamiento se repite el número de veces necesarias para alcanzar la longitud del oligómero deseada.

Si los grupos de monómeros utilizados en cada paso de acoplamiento están constituidos por el mismo número de monómeros, el número de componentes de la colección será igual al número de monómeros diferentes utilizados elevado al número de pasos de síntesis (Ecuación 1).

$$\text{número de compuestos} = m^p \quad (\text{Ecuación 1})$$

m = número de monómeros diferentes utilizados

p = número de pasos

En la figura 7 se muestra un ejemplo de la síntesis de una colección de $3 \times 3 \times 3$ utilizando la metodología de mezcla y separación.

Para identificar un compuesto activo se determina actividad en cada una de las mezclas finales, previa liberación de los productos de la resina. Como se sabe cuál fue el último monómero acoplado a cada una de estas mezclas, al determinar cuál es la mezcla más activa, se sabe cuál es el monómero terminal del compuesto activo. Teniendo porciones de las diferentes mezclas de la etapa anterior, se acopla este último monómero conocido a cada una de ellas y se vuelve a determinar actividad. Este nuevo paso de *screening* permite conocer el monómero adyacente. Mediante este proceso iterativo de síntesis y *screening* se puede identificar uno a uno los monómeros componentes del compuesto activo. En la figura 8 se muestra la identificación del compuesto más activo en una mezcla de $3 \times 3 \times 3$.

Furka demostró la eficiencia de su técnica al sintetizar más de 1 millón de hexapéptidos unidos a resina en sólo cinco días¹². Todos los hexapéptidos poseían el aminoácido glicina en su C-terminal y en las cinco posiciones restantes, cualquiera de otros 17 aminoácidos. Esta colección fue generada por sólo dos técnicas utilizando el método manual original.

En el año 1991 se publicaron otros dos métodos denominados "Síntesis por separación" (*Split synthesis*¹³) y "Dividir, acoplar y recombinar" (*Divide, couple and recombine* o DCR¹⁴) cuyas operaciones esenciales, según Furka¹², son las mismas que las de "Mezcla y separación".

Utilizando el método DCR, Houghten y colaboradores generaron una colección de más de 34 millones de hexapéptidos N-acetilados. Los ensayos realizados, previa separación de la

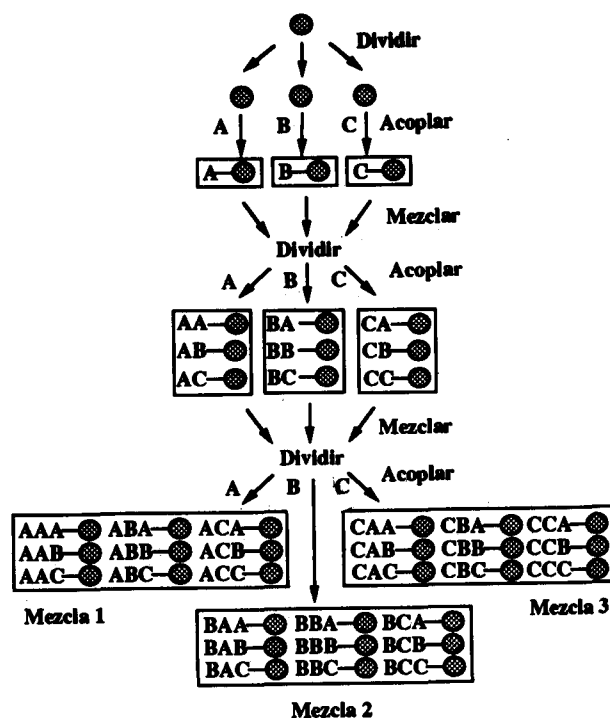


Figura 7. El procedimiento de "Mezcla y separación". Síntesis de una colección de $3 \times 3 \times 3$. Se divide la resina en 3 partes iguales, a cada una de ellas se acopla un monómero diferente (A, B o C), resultando 3 mezclas de un compuesto cada una. Estas se mezclan y, nuevamente, se divide la resina en 3 partes, para acoplar a cada una de ellas un nuevo monómero diferente (A, B o C); esto genera 3 mezclas de 3 compuestos cada una. Una última secuencia en la que las 3 últimas mezclas se juntan, separan y acoplan a un monómero diferente (A, B o C) genera 3 mezclas de 9 compuestos cada una. En este caso, $m = 3$ y $p = 3$, por lo tanto número de compuestos = $m^p = 27$.

resina, revelaron la afinidad sub-micromolar de un grupo de hexapéptidos al anticuerpo monoclonal 19B10¹⁴.

El Procedimiento "Un Grano - Un Péptido" (One bead-one peptide)

Esta metodología usa la "Síntesis por separación" (*vide supra*)¹³ para la generación y la evaluación de colecciones constituidas por millones de péptidos.

Las operaciones esenciales de este procedimiento son las mismas que las usadas en el método de "Mezcla y separación"¹². De esta manera se sintetiza sobre cada grano un único tipo de péptido y la colección completa contiene todos los péptidos posibles en cantidades aproximadamente equimolares.

El *screening* para encontrar el grano que posee el péptido que se une al receptor se hace de una forma muy rápida y sencilla. Se colocan los granos de resina en una placa de Petri y se agrega en forma soluble el aceptor al que previamente se le une un grupo que lo haga visible, por ejemplo, fluoresceína. De este modo se tiñe sólo el grano de resina que contiene el péptido buscado, el cual se puede ver a simple vista o utilizando microscopios de bajo poder. Este grano se separa por micromanipulación y se lava para separar el péptido del complejo aceptor-fluoresceína. Por último se determina la secuencia del péptido sobre el grano mediante microsecuenciación. De este modo se puede realizar el *screening* de una colección de millones de granos de resina en 10-15 placas de Petri en una tarde.

Lam y colaboradores¹³ generaron una colección de alrededor de 2 millones de pentapéptidos utilizando este procedimiento en pocos días. Siguiendo la técnica de "Síntesis por separación" usaron 19 recipientes, cada uno de los cuales

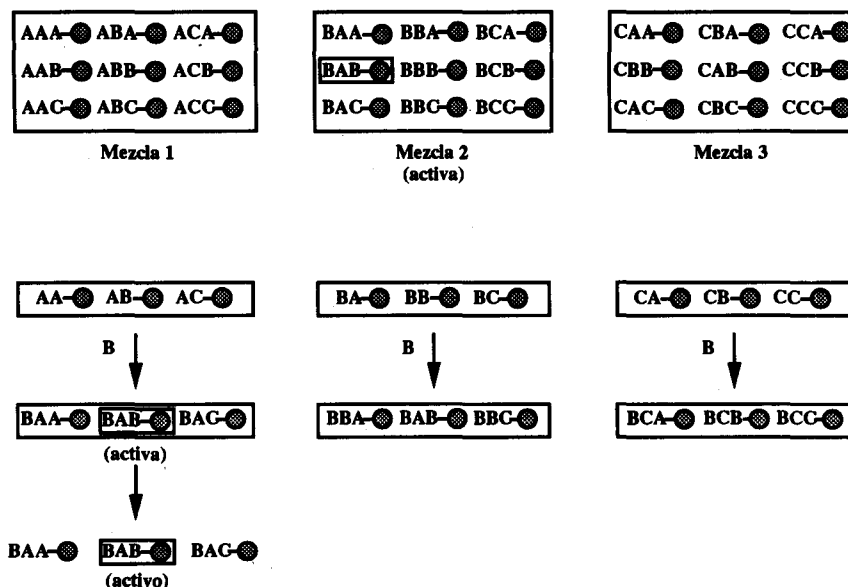


Figura 8. Identificación del compuesto activo de una colección de 3x3x3 sintetizada por el procedimiento de "Mezcla y separación". Determinando cual de las últimas mezclas (1, 2 ó 3) es la activa se conoce cuál es el monómero terminal de trímero activo (en este caso B). Acoplado B a porciones de las 3 mezclas de los dímeros obtenidos en el segundo acoplamiento y midiendo nuevamente actividad se conoce cuál es el monómero adyacente (A). Para conocer la secuencia completa basta con sintetizar los 3 trímeros posibles (BAA, BAB y BAC) y determinar sus actividades. Para este ejemplo el trímero activo es BAB.

contenía una solución de un aminoácido natural, exceptuando cisteína (para evitar la formación de enlaces disulfuro). La incorporación al azar de los 19 aminoácidos en los pentapéptidos puede generar, teóricamente, hasta 2.476.099 (19^5) péptidos distintos, con cada una de estas secuencias generada en, al menos, un grano de resina.

Realizaron el *screening* de esta colección de pentapéptidos, estudiando un anticuerpo monoclonal anti β -endorfina con alta afinidad por un epítopo de secuencia YGGFL (código de aminoácidos de una letra). Desarrollaron luego un método de inmunoensayo en el cual el anticuerpo monoclonal se acopla a la enzima fosfatasa alcalina, la que puede catalizar una reacción de color de modo tal que los granos que interaccionen con el anticuerpo se colorean y puedan ser separados del medio de incubación mediante un micromanipulador. De esta manera encontraron que 6 granos eran reactivos y que la secuencia YGGFQ poseía una afinidad muy similar a la del epítopo natural^{13,15}.

El Barrido Posicional

Fue desarrollado con el objetivo de encontrar el componente más activo de una colección combinatoria. Un procedimiento general para identificar un hexapéptido consiste en sintetizar seis colecciones con las siguientes fórmulas generales:

Colección 1	DXXXXX
Colección 2	XDXXXX
Colección 3	XXDXXX
Colección 4	XXXDXX
Colección 5	XXXXDX
Colección 6	XXXXXD

Cada colección incluye 20 sub-colecciones, cada una de las cuales contiene un aminoácido diferente definido en la posición **D** y en las posiciones restantes (X) todas las combinaciones posibles de los 20 aminoácidos. Determinando la actividad de las sub-colecciones y seleccionando la más activa de cada colección se puede conocer cuál es el o los aminoácido/s con mayor efectividad en cada una de las seis posiciones. Las secuencias más activas se resintetizan y se prueban.

Con esta técnica, Houghten sintetizó seis colecciones de hexapéptidos que contenían todas las combinaciones posibles de 18 aminoácidos proteínogénicos y los usó para identificar la secuencia con mayor afinidad por un receptor opiáceo. Los cinco primeros aminoácidos del hexapéptido más activo, coincidieron con los de Met-enkefalina, que es un conocido pentapéptido natural con alta afinidad por el receptor opiáceo¹⁶.

Se ha descrito una estrategia relacionada denominada SURF (*Synthetic unrandomization of randomized fragments*^{17,18}) que también puede usarse para identificar a las moléculas responsables de la actividad biológica en una colección combinatoria sin necesidad de realizar secuenciación. Esta técnica fue utilizada por Houghten para identificar un determinante antigénico conocido partiendo de una colección compuesta por más de 34 millones de hexapéptidos¹⁴. Además sometió la misma colección a ensayos para determinar actividad antimicrobiana contra la bacteria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, contra las bacterias Gram-negativas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y contra la levadura *Candida albicans* y luego identificó péptidos con potencial uso terapéutico¹⁴. Este método mostró ser útil para identificar epítopos discontinuos^{19,20}.

Utilizando simulaciones por computadora se compararon el SURF y el Barrido Posicional. En este trabajo se incorporaron al sistema errores experimentales razonables y también se tuvo en cuenta la presencia en la mezcla de compuestos con actividad poco inferior al componente más activo (ligandos de actividad sub-óptima). Los resultados sugieren que en presencia de errores experimentales el Barrido Posicional es menos exitoso que el SURF para encontrar el componente de mayor actividad²¹.

Otra metodología que facilita la identificación del componente activo de una mezcla es la síntesis de Colecciones Combinatorias Ortogonales, utilizando este procedimiento, Tartar descubrió un nuevo ligando del receptor V2, de vasopresina²².

IIc. Polímeros no naturales

Debido a las pobres propiedades farmacológicas que presentan los péptidos, pudiendo mencionar que son susceptibles de ser degradados por peptidasas, poseen baja biodisponibilidad, etc., sólo son usados como drogas en muy pocas ocasiones.

Se ha sugerido que la generación de moléculas que presenten una estructura polimérica, con un esqueleto de mayor estabilidad, podrían presentar las mismas actividades que los péptidos y serían aptos como fármacos. El desarrollo de este tipo de moléculas originó distintas clases de polímeros no naturales, entre los que se encuentran los peptoides,²³ oligocarbamatos²⁴, oligoureas, oligosulfonas, péptidosulfonamidas y peptifosforamidas²⁵ (Fig. 9). Se han preparado colecciones de estos compuestos encontrando que algunos de ellos poseían actividades biológicas.

Algunos autores opinan que los péptidos-miméticos²⁶, compuestos que actúan como péptidos en su interacción con receptores, podrían constituir una alternativa a los péptidos, ya que presentan las ventajas comparativas de poseer mayor estabilidad metabólica, mejor biodisponibilidad y larga duración de acción. En la figura 9b se muestran dos ejemplos de estructuras de péptidos naturales con actividad biológica y los correspondientes peptidomiméticos.

Se podrían generar colecciones basadas en peptidomiméticos usando un esqueleto al que se incorporarían variedad de restos para encontrar compuestos activos que posean la estructura necesaria.

III. MÉTODOS DE CODIFICACIÓN Y MARCADORES MOLECULARES

La elucidación de estructuras es uno de los escollos más grandes que presenta la Síntesis Combinatoria especialmente dentro de las moléculas no secuenciables. Es por ello que para salvar este problema se han ideado distintas estrategias de forma de facilitar la determinación de estructuras que incluyen nuevos métodos cromatográficos, espectroscópicos y de codificación. Este último consiste en la codificación de las unidades agregadas. La idea se basa en que por cada unidad que se incorpora a la cadena se agrega una molécula conocida denominada MARCADOR MOLECULAR, que está unida al soporte o a una cadena lateral que se pueda codificar de forma de saber cual es la unidad incorporada (Fig. 10). Una vez terminada la síntesis e identificado el compuesto activo se traduce el código y se determina así la estructura del compuesto. Esta forma de codificar puede ser considerada como un registro de la *historia individual* de los distintos miembros de la colección. Idealmente cada *marcador* deberá poseer un alto contenido de información, ser detectado y decodificado en forma altamente sensible y ser estable a las condiciones de reacción usadas en la síntesis del ligando.

Actualmente existen tres formas de codificar cadenas según la naturaleza del marcador :

- con oligonucleótidos, los ácidos nucleicos se amplifican usando PCR y luego son secuenciados²⁷.
- con péptidos, usando la degradación de Edman para codificarlos²⁸.
- con compuestos halo-aromáticos, se acoplan directamente a la resina. Se codifica mediante una cromatografía gaseosa con captura de electrones, que da un pico por cada marcador presente^{29,30}.

En los dos primeros casos se debe hacer la síntesis paralela de la cadena de ligandos y la de los marcadores moleculares. La resina debe poseer sitios específicos de unión para el ligando y para el marcador, además debe poseer una protección ortogonal de forma que las etapas de desprotección y acoplamiento sean específicas a cada cadena.

IV. COLECCIONES DE MOLÉCULAS PEQUEÑAS

IVa. Estrategias de síntesis

Si bien la síntesis combinatoria de péptidos y otros polímeros naturales ha permitido crear numerosas colecciones de

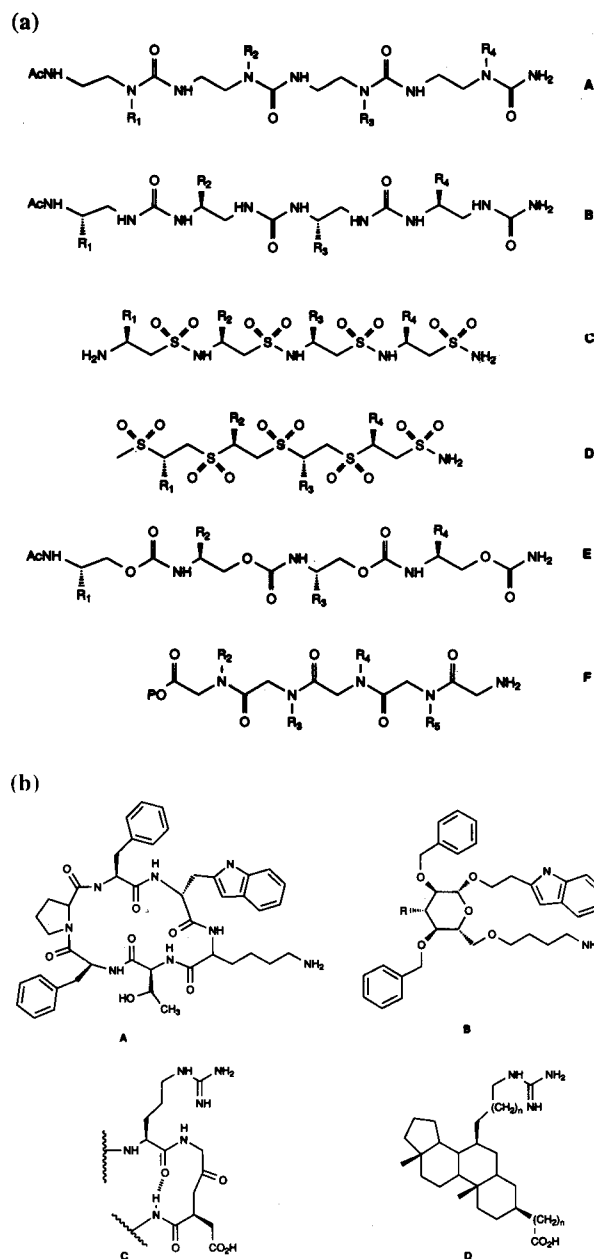


Figura 9. a) Distintas cadenas de polímeros no naturales: A) y B) oligoureas, C) peptidosulfonamidas, D) oligosulfonas, E) oligocarbamatos y F) peptoides. b) A) Hexapéptido cíclico antagonista de somatostatina, B) peptidomimético de A basado en un esqueleto de β -D-Glucosa, C) giro β tipo 1, D) peptidomimético de C con un esqueleto esteroide.

compuestos con una gran diversidad de estructuras y de actividades biológicas; es la opinión de numerosos autores que no constituyen potenciales agentes terapéuticos debido principalmente a la imposibilidad de administrarse oralmente. Es por ello que surge la necesidad de crear bibliotecas combinatorias de moléculas orgánicas de bajo peso molecular.

Esta rama de la síntesis combinatoria se encuentra aún en etapa de desarrollo debido a que es necesario crear nuevas metodologías para llevarlas a cabo, no obstante, en los últimos tiempos han aparecido numerosos trabajos en los que se reporta la síntesis de bibliotecas combinatorias de moléculas pequeñas.

La existencia de estructuras farmacóforas provee un punto de partida favorable para el diseño de dichas colecciones, ya que se dispone de información acerca de su biodisponibilidad, de la toxicidad de determinadas estructuras y de la habilidad

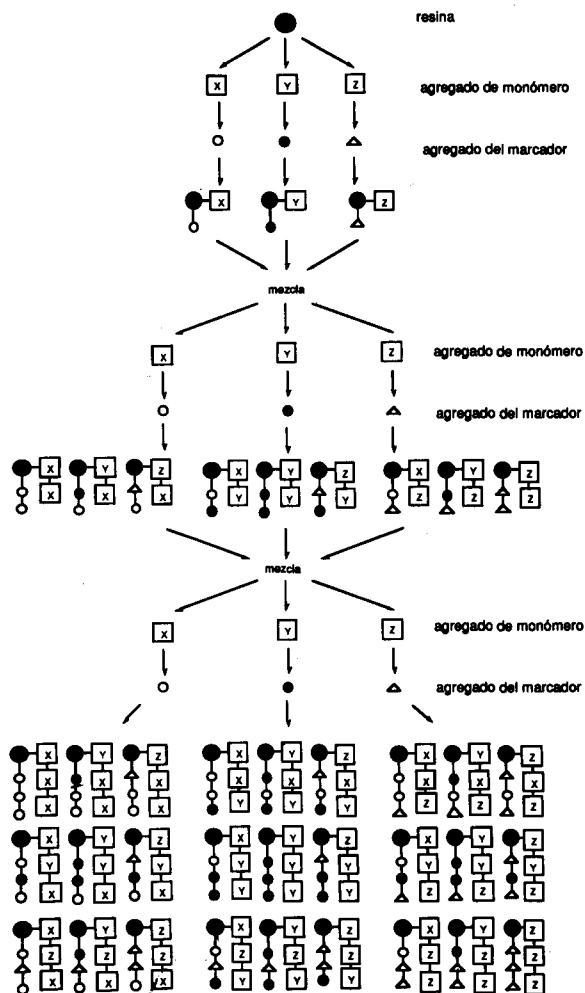


Figura 10. Representación de la síntesis de una colección de 3x3x3 moléculas usando marcadores moleculares. X, Y, Z representan los monómeros.

de las mismas de proveer compuestos que reaccionen con diversos receptores y enzimas.

Idealmente, una síntesis combinatoria debe ser corta, debido a que al aumentar el número de pasos se introducen restricciones en cuanto a generalidad, confiabilidad y compatibilidad con un amplio rango de funcionalidades.

Como fuera mencionado, los primeros trabajos de síntesis sobre un soporte polimérico realizados por Merrifield aplicados a la síntesis de péptidos, condujeron al desarrollo de ésta técnica como una nueva estrategia de síntesis en Química Orgánica.

A priori ofrece ciertas ventajas:

- permite realizar la síntesis simultánea de múltiples compuestos
- las reacciones pueden completarse usando exceso de reactivos
- los lavados sucesivos permiten obtener las mezclas en forma relativamente puras.

Sin embargo existen varios inconvenientes, uno de ellos es encontrar la forma de unir el soporte sólido al material de partida a través de una unión compatible con las condiciones de reacción y lábil frente a la ruptura del enlace producto-soporte sólido.

Para algunas colecciones orgánicas los grupos ligantes desarrollados para la síntesis de péptidos y oligonucleótidos resultan útiles, pero para muchas otras colecciones aún faltan ser encontrados. Actualmente numerosos grupos se encuentran

desarrollando nuevos grupos ligantes especialmente diseñados para moléculas pequeñas que permitan obtener nuevas colecciones en medios heterogéneos y resinas resistentes a numerosas condiciones de reacción abriendo de esta manera nuevos horizontes en la preparación de colecciones de moléculas orgánicas biológicamente activas.

Otro aspecto a tener en cuenta, es que la conformación del compuesto puede verse ampliamente afectada por el soporte sólido, y la medida de actividad biológica, en caso de ser determinada sobre el mismo, puede no reflejar la verdadera actividad del compuesto en solución. Es por ello que la tendencia general es ensayar los compuestos liberados de las resinas o contrastar la actividad: unido vs separado.

Como se verá más adelante la construcción de bibliotecas combinatorias de moléculas pequeñas se halla dirigida a la optimización de estructuras que posean actividad biológica conocida, a la búsqueda de nuevas actividades de las mismas o la síntesis de colecciones usando algún farmacóforo que se sepa provee actividad.

Las colecciones pueden estar constituidas por cadenas lineales donde cada constituyente de la cadena es un componente distinto y de esta forma se introduce la diversidad de la misma manera que en los polímeros naturales o bien partiendo de una estructura central (*CORE*) que es común a todos los compuestos; procediendo a introducir distintos grupos que provocan así la diversidad de moléculas. La ventaja de trabajar con un *core* es que se puede optimizar posición por posición (estructural y conformacionalmente) encontrando el mejor compuesto para el objetivo biológico buscado. Un ejemplo que aplica esta metodología es un trabajo de Rebek y colaboradores³¹, quienes en forma exploratoria han investigado la síntesis y *screening* de colecciones químicas de moléculas semirígidas pequeñas en solución utilizando un *core* y una mezcla de "building blocks", cada *building block* contiene un grupo funcional complementario capaz de formar un enlace covalente con el *core* (Fig. 11).

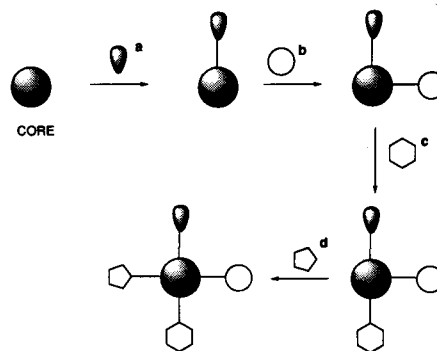


Figura 11. Estructura general para la síntesis de una colección usando un *core* y varios *building blocks* (a,b,c,d)

En este caso se han elegido como *core* tetracloruro de ácido cubano-1,3,5,7-tetracarboxílico (1) y tetracloruro de ácido 9,9-dimetilxanteno-2,4,5,7-tetracarboxílico (2) (Fig. 12) y 21 *building blocks* constituidos por aminoácidos y heterociclos. Sólo uno de los compuestos de la colección mostró actividad inhibitoria frente a la ruptura de un enlace amida catalizado por tripsina.

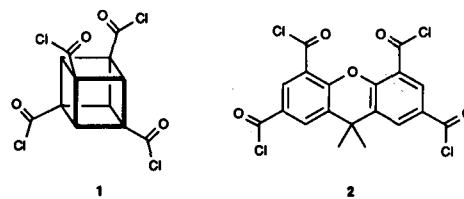


Figura 12.

Recurriendo a la misma estrategia Ellman y colaboradores³² realizaron una síntesis en fase sólida de derivados del ácido fenilacético **8** que son una clase importante de inhibidores de ciclooxigenasa. Dichos derivados fueron construidos a partir de ácido fenilacético como estructura *core* e incorporan 3 elementos que proporcionan diversidad, un grupo alquilo (R1), un sustituyente alquilo, arilo o heteroarilo sobre el anillo aromático (R2) y un grupo ácido o amida (X) (Fig. 13).

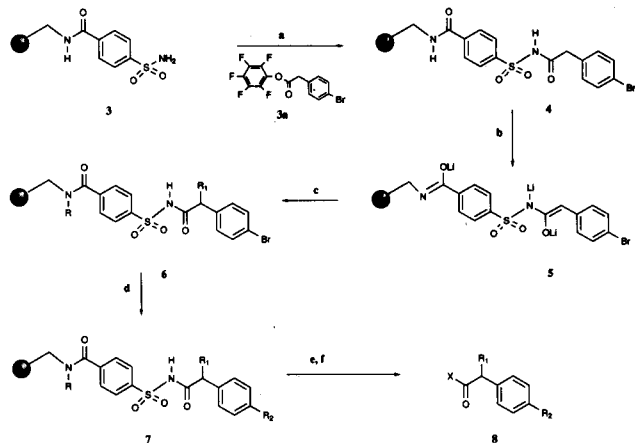


Figura 13. Reactivos y condiciones: a) 4-(dimetilamino) piridina; b) LDA, THF, 0°C; c) haluro de alquilo, 0°C; d) alquil-9-BBN o ácido arilborónico, Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, THF, 65°C; e) CH₂N₂; f) HO o amina.

Se utilizó una acilsulfonamida **3** como grupo ligante, desarrollada por Kenner para la síntesis de péptidos que satisfacía los requerimientos de la síntesis.

Las etapas clave de formación de enlaces C-C, en las que se introduce una gran variabilidad en la secuencia de síntesis son una alquilación de enolato para introducir R1 (**4**→**6**), y un acoplamiento de Suzuki mediado por Pd para introducir R2 sobre el anillo aromático (**6**→**7**).

El paso final en la síntesis es la separación del producto del soporte sólido mediante una ruptura nucleofílica. Pueden observarse (Tabla I) los distintos derivados que se obtienen por acción de los distintos agentes derivatizantes y nucleófilos, entre ellos se encuentran los conocidos fármacos ibufenac (**8a**), ibuprofeno (**8b**) y felbimac (**8i**).

Tabla 1.

Compuesto	R1	R2	Nu	Rto (%)
8a	H	(Me) ₂ CHCH ₂	H ₂ O	100
8b	Me	(Me) ₂ CHCH ₂	H ₂ O	96
8c	Me	(Me) ₂ CHCH ₂	BnNH ₂	96
8d	Bn	(Me) ₂ CHCH ₂	BnNH ₂	98
8e	Et	(Me) ₂ CHCH ₂	BnNH ₂	92
8f	i-Pr	(Me) ₂ CHCH ₂	BnNH ₂	91
8g	Me	(Me) ₂ CHCH ₂	piperidina	96
8h	Me	(Me) ₂ CHCH ₂	anilina	0
8i	H	Ph	H ₂ O	93
8j	Me	Ph	BnNH ₂	95
8k	Me	4-F ₃ CPh	BnNH ₂	87
8l	Me	4-MeOPh	BnNH ₂	88
8ll	Me	2,4-Cl ₂ Ph	BnNH ₂	88

IVb. Preparación de colecciones de compuestos heterocíclicos

Una de las fuentes de diversidad más rica son los anillos heterocíclicos pequeños, que además de exhibir frecuentemente actividad biológica, sirven de *scaffolds* rígidos para desplegar futuras funcionalidades.

No resulta sorprendente entonces, que las estructuras de la 1,4-benzodiazepinas (**14**) hayan sido usadas como primeros ejemplos para el desarrollo de colecciones de moléculas orgánicas, debido a la amplitud de actividades biológicas que poseen (Fig. 14). El miembro más conocido de esta familia es 7-cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona, el tranquilizante conocido comercialmente como valium de la firma Hoffmann-La Roche³³. Sin embargo, los derivados de las benzodiazepinas interaccionan también con un amplio rango de receptores biológicos que no se hallan relacionados con el receptor diazepam, el cual es responsable de los efectos ansiolíticos y tranquilizantes del valium y compuestos relacionados. Por otro lado su núcleo posee un alto grado de funcionalización, presenta buena biodisponibilidad y se han encontrado derivados que poseen una alta afinidad y especificidad hacia diversos receptores como ansiolítico, antihipnótico, antiepiléptico³⁴, antagonista contra la colecistoquinina³⁵, antagonista de receptores opiáceos³⁶, antagonista HIV tat³⁷, inhibidor de transcriptasa reversa del virus HIV³⁸ y antagonista del factor de activación de plaquetas³⁹.

Ellman y colaboradores, realizaron la primera síntesis de una colección de 192 derivados de 1,4-benzodiazepinas de estructura diversa, conteniendo una amplia variedad de funcionalizaciones químicas incluyendo amidas, ácidos carboxílicos, aminas, fenoles e indoles a partir de 2-amino benzofenonas **9**, aminoácidos y agentes alquilantes utilizando el aparato de *multipin* de Geysen (*vide supra*)⁴. En primer lugar, se procede a unir el ácido 4-hidroxiacetilfenilacético usado como grupo ligante a las dos aminobenzofenonas de partida proviniendo un intermediario que es unido a las varillas de polietileno.

A continuación se realiza la síntesis como fuera descrito anteriormente y según la figura 14⁴⁰. Una vez finalizada la misma, se separan los derivados obtenidos del soporte sólido y se distribuyen en recipientes individuales de la placa *microtiter* para ser ensayados en solución.

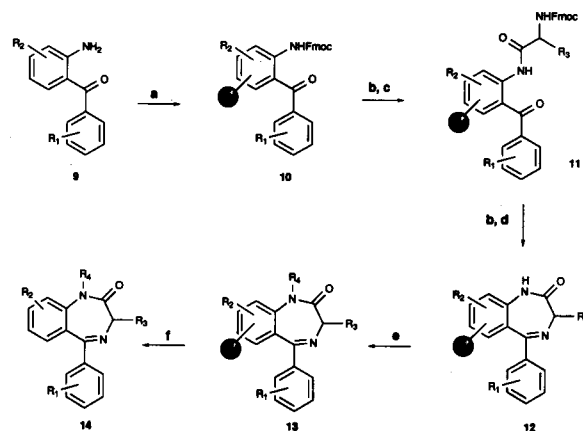


Figura 14. Reactivos y condiciones: a) i) KN(SiMe₃)₂ en DMF; ii) Cloruro de F-moc piridina en CH₂Cl₂; iii) Pd(PPh₃)₄, SnBu₃H CH₂Cl₂; b) Piperidina en DMF al 20%; c) Fluoruro de N-Fmoc-amino ácido, 4-Metil-2,6-di-tert-butilpiridina; d) Acido acético en DMF al 5%, 60°C; e) 5-(ferilmetil)-2-oxazolidinona litiada en THF, -78°C, seguido del agente alquilante y DMF; f) TFA/H₂O/Me₂S (95:5:10).

Se evaluó la integridad química y los rendimientos de una colección representativa de diversos derivados por cromatografía líquida de alta presión en fase reversa y los compuestos

correspondientes a los picos de mayor intensidad fueron aislados y sometidos a espectrometría de masa por bombardeo atómico rápido (FABMS).

También se determinó la capacidad de unión al receptor de colestistoquinina A mediante un ensayo competitivo de unión a un radioligando, proporcionando una detallada información acerca de la relación existente entre estructura y actividad.

Los resultados reportados por Ellman y col.⁴⁰, indican que la síntesis combinatoria de moléculas orgánicas no poliméricas, realizadas a través de varias secuencias de reacción, incorporando una amplia variedad de funcionalidades provee un efectivo y confiable acceso a colecciones de compuestos con el fin de identificar estructuras capaces de mostrar actividad.

Por otro lado, Pavia y colaboradores han desarrollado un equipo capaz de realizar la síntesis en fase sólida simultánea de compuestos orgánicos, que es compatible con numerosos reactivos y rangos de temperaturas, el cual genera extensas colecciones de compuestos denominados "Diversómeros"⁴¹. Se conoce como "Diversómero" al aparato que genera estas colecciones. Este aparato y esta metodología incrementan la flexibilidad y diversidad de estructuras que pueden producirse mediante esta tecnología de síntesis múltiple y simultánea.

Como se observa en la figura 15 el aparato está formado de tubos de dispersión de gas denominados *pins* cerrados en el fondo con un filtro de vidrio sinterizado (a), dichos tubos se encuentran unidos mediante un soporte sólido (b), un recipiente con *pocillos* (c), un *manifold* en la parte superior de los tubos de dispersión de gas (d) y una tapa de goma (e) que va sellada con una placa que posee un orificio para cada tubo (f).

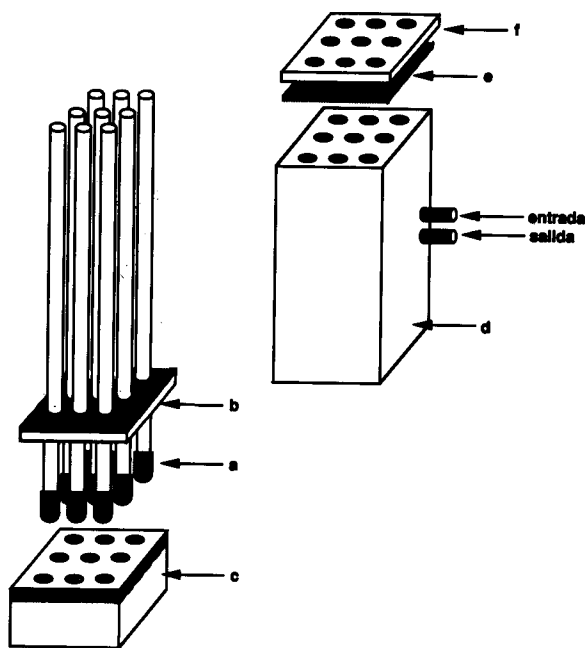


Figura 15. Representación esquemática de un Diversómero.

A diferencia de lo visto anteriormente las resinas se hallan colocadas dentro de los tubos retenidas por la placa de vidrio sinterizado, el tubo se sumerge dentro de los *pocillos* del recipiente que esta diseñado para que la cantidad exacta de reactivo entre en contacto con la resina, esto permite llevar a cabo y monitorear las reacciones individualmente. Los tubos de dispersión de gas se introducen dentro del *manifold* que posee un sistema de circulación que puede funcionar como refrigerante y permite mantener condiciones de atmósfera inerte. La placa de la parte superior permite inyectar reactivos a través de la tapa de goma. Es importante lograr una buena agitación debido a la naturaleza heterogénea de las reacciones, lo que se consigue por agitación magnética, sonicación o plataformas rotacionales de agitación. El ciclo de síntesis es similar al que se realiza normalmente en síntesis heterogénea, salvo que se coloca una corriente positiva de nitrógeno para eliminar exceso de reactivos, solvente y subproductos al final de cada reacción y los solventes de lavado en cada ciclo. Los reactivos se pueden colocar desde la parte superior del aparato o bien pueden estar en los pocillos correspondientes.

Usando esta metodología⁴¹ (Fig. 16) se sintetizaron 40 benzodiazepinas partiendo de 8 iminas de 2-aminobenzofenona **16** y 5 aminoácidos **15** unidos a la resina. La síntesis consiste de dos etapas, en la primera se une la amina con la imina formando un intermediario, que en el paso siguiente al ser separado de la resina, se cicla espontáneamente. La etapa final constituye un método interesante ya que no sólo libera el compuesto de la resina ciclándose simultáneamente, sino que provee compuestos finales puros. Se probó su actividad como inhibidores de fluoronitrazepam.

Con esta misma metodología⁴¹ (Fig. 17) se prepararon 40 hidantoinas **22** incluyendo el conocido fármaco dilantin (**22a**), usando 3 etapas sintéticas partiendo de 5 grupos de 8 aminoácidos unidos a resinas y 8 grupos de 5 isocianatos. La síntesis se llevó a cabo con un aparato de 40 *pins*, los aminoácidos se tratan con los isocianatos seguido de tratamiento con ácido clorhídrico 6 M para generar las 40 hidantoinas.

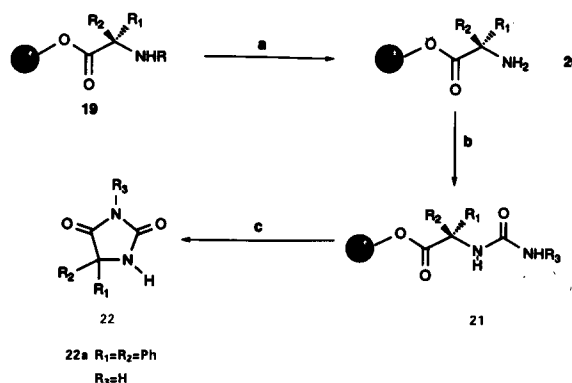


Figura 17. $R=F\text{-Moc}$ o Boc . Reactivos y condiciones: a) piperidina/DMF o TFA/DMF, 6hs, N_2); b) $R_3\text{NCO/DMF}$ (5-20 equivalentes), 6hs, N_2); iii) HCl 6M, 85-100°C, 2hs.

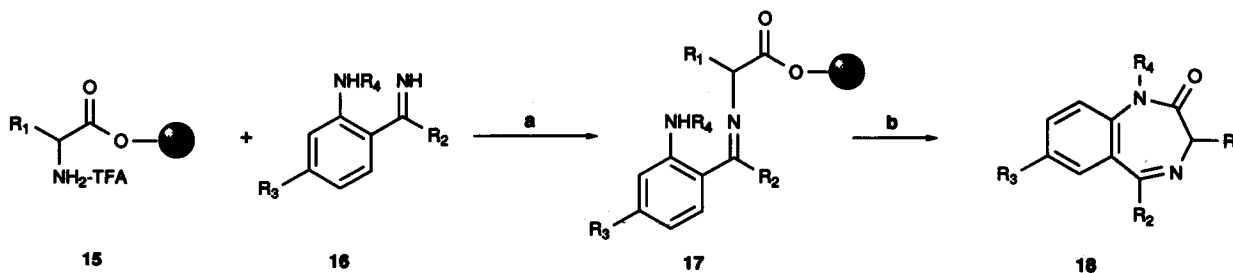


Figura 16. Resina de Merrifield. Reactivos y condiciones: (a) 1,2-dicloroetano, 60°C, 2hs; (b) TFA, 60°C, 20 hs.

Otros dos heterociclos de gran importancia por su actividad biológica son las tiazolidinonas y metiazanonas. Se ha reportado que las tiazolidinonas poseen un amplio espectro de actividades biológicas incluyendo, entre otras actividad antifúngica, antibacteriana, antihistamínica, antimicrobiana y antiinflamatoria⁴².

Las 4-tiazolidinonas y 4-metatzolidinonas (heterociclos de 5 y 6 miembros respectivamente) han sido sintetizadas en solución y en fase sólida por condensación de tres componentes: un aminoácido, un aldehído y un ácido α -mercapto carboxílico (Fig. 18)⁴³.

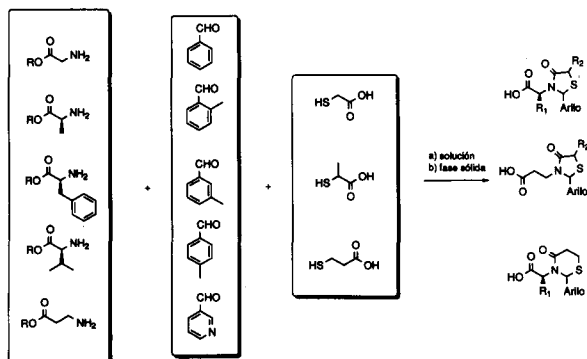


Figura 18. Reactivos y condiciones: a) i) Clorhidrato del éster del aminoácido (1 eq.), aldehído (2 eq.), mercaptoácido (3 eq.), benceno, 80°C, trampa de Dean-Stark; ii) NaOH, MeOH; b) i) aminoácido unido al soporte polimérico, aldehído (0,25 M), mercaptoácido (0,5 M), THF, tamices moleculares 3A, 70°C; ii) 50% TFA/CH₂Cl₂.

IVc. Preparación de Colecciones de Otros Compuestos

Finalmente, resulta de interés analizar la aplicación de los métodos desarrollados para generar colecciones combinatorias en fase sólida a la síntesis de 60 análogos estructurales del potente agente inhibidor de tirosina quinasa lavendustín A (28), reportado por Green (Fig. 19)⁴⁴.

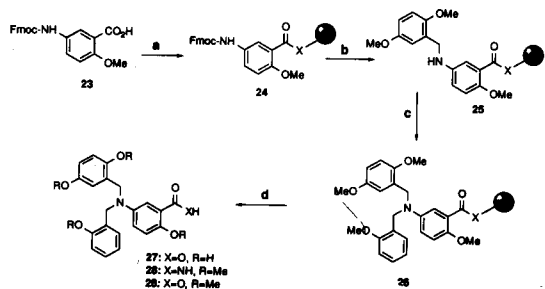


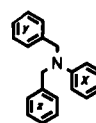
Figura 19. Reactivos y condiciones: 1) R=Me, X=NH. Resina de Rink: a) Hexafluorofosfonato de 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU), hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), Pr₂NEt, resina, DMA, 2hs; b) i) piperina 20%, DMA; ii) 2,5-dimetoxibenzaldehído, NaCNBH₃, AcOH 1%, DMA, 18 hs.; c) bromuro de 2-metoxibencilo, DBU, DMSO, 3 hs; d) TFA 5%, CH₂Cl₂, 30 min. 2) R=Me, X=O. Resina de Wang: a) i) SOCl₂, THF, reflujo, 1 h; ii) Resina de Wang, THF, piridina, DMAP, 2 hs; b) i) piperidina 20%, DMA; ii) 2,5-dimetoxibenzaldehído, NaCNBH₃, AcOH 1%, DMA, 18 hs.; c) bromuro de 2-metoxibencilo, DBU, DMSO, 3 hs; d) TFA 50%, CH₂Cl₂, 30 min. 3) R=H, X=O. Resina de (Hidroxi metil) poliestireno: a) i) SOCl₂, THF, reflujo, 1 h; ii) resina, THF, piridina, DMAP, 2 hs; b) i) piperidina 20%, DMA; ii) 2,5-dimetoxibenzaldehído, NaCNBH₃, AcOH 1%, DMA, 18 hs.; c) bromuro de 2-metoxibencilo, DBU, DMSO, 3 hs; d) BBr₃ 1M, CH₂Cl₂, 4 hs.

Lavendustín A es un ácido carboxílico aromático multihidroxiado, siendo los fenoles y los ácidos carboxílicos grupos funcionales adecuados para unión al soporte sólido. La estructura

del lavendustín es sintéticamente accesible a partir de tres subunidades simples tales como un aminoácido aromático o aminofenol, un aldehído aromático y un agente alquilante como bromuro de bencilo, haciendo a la síntesis combinatoria una técnica útil para generar un gran número de análogos del mismo.

Los estudios iniciales se llevaron a cabo usando como soporte sólido la resina de poliestireno de Rink, y una vez optimizada cada etapa de síntesis se repitió la secuencia sobre la resina de Wang y sobre una resina de poliestireno hidroximetilada, se comprobó por cromatografía líquida de alta presión que los rendimientos obtenidos oscilaban entre el 85 y 90% (Fig. 19).

Para concretar la síntesis se utilizaron tres aminoácidos protegidos con F-moc (X), cinco benzaldehídos metoxi-sustituídos (Y) y cuatro bromuros de bencilo (Z) (Fig. 20). La síntesis se llevó a cabo usando la resina de Wang como soporte sólido y elementos básicos de laboratorio. Luego de separar los productos de la resina, la pureza de cada producto fue determinada por cromatografía líquida de alta presión y cromatografía en capa delgada, y los rendimientos determinados por resonancia magnética nuclear.



	X	Y	Z
1			
2			
3			
4			
5			

Figura 20.

Chen y colaboradores⁴⁵, han realizado la síntesis de 9 β -mercaptocetonas distintas (Fig. 21) 37 mediante el método de Furka en fase sólida, utilizando 2 pasos sintéticos y 3 recipientes por reacción, demostrando que mediante procedimientos simples y con los elementos disponibles en cualquier laboratorio pueden construirse colecciones de compuestos orgánicos apropiadas para realizar ensayos de actividad biológica.

Previo a la construcción de la colección de compuestos, cada etapa de la síntesis fue probada como una secuencia sintética en fase sólida de modo de establecer la validez de las mismas, y cada transformación fue controlada haciendo el espectro infrarrojo del compuesto unido al polímero (Fig. 21).

La síntesis consistió en hacer reaccionar el aldehído 32 con tres diferentes iluros dando 33 por una reacción tipo Wittig. Luego fueron tratados con tres donores de Michael distintos (Fig. 22). Previo a recombinar los contenidos de cada recipiente fue tomada una muestra, separado el compuesto de interés de la resina y analizado por cromatografía gaseosa encontrando que cada mezcla de la sub-colección contenía únicamente los tres productos esperados.

A pesar que no hubo etapas de purificación involucradas en la síntesis, los productos fueron obtenidos con un alto grado de pureza debido a los lavados realizados entre etapa y etapa.

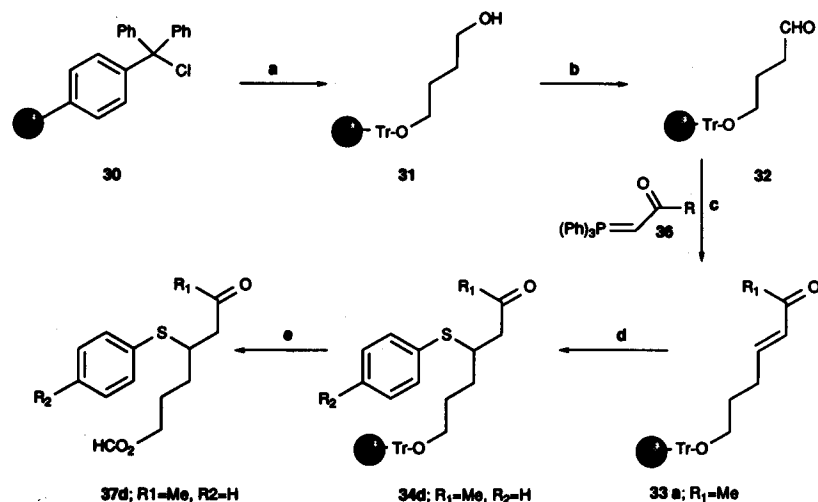


Figura 21. Reactivos y condiciones: a) 1,4-butanodiol, piridina, 2 días, TA; b) $\text{pir}.\text{SO}_3$, DMSO, Et_3N , 2h, TA; c) 36, THF, 60°C , 2 días; d) $\text{R}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{SH}$, NaOMe (cat.), THF, TA, 2 días; e) HCO_2H , THF, 2 días, TA.

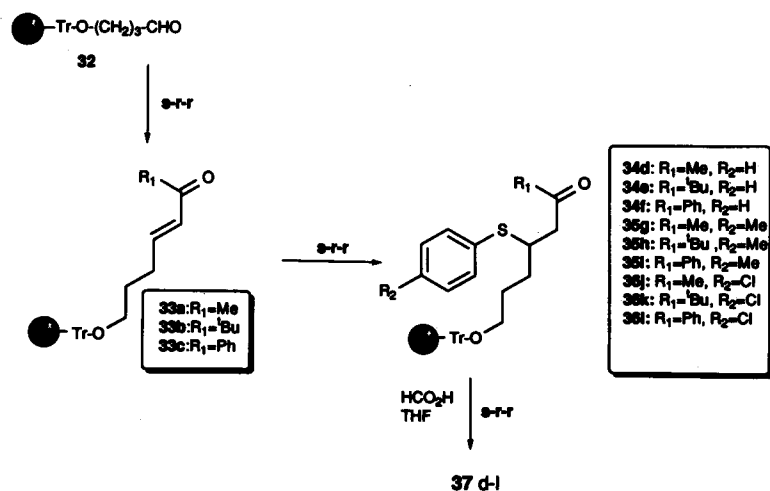


Figura 22. s-r-r: secuencia de separación-recombinación.

Existen en la literatura^{46,47} trabajos recientes de síntesis de colecciones de moléculas pequeñas en solución, pero esta variante de la síntesis combinatoria se encuentra en un desarrollo temprano.

V. CONCLUSIONES

La Química Combinatoria es una metodología novedosa que se presenta como una alternativa interesante en el descubrimiento de nuevos fármacos. Debido a la importante demanda de compuestos líderes es indudable que la misma crea nuevas perspectivas en su búsqueda. Si bien la mayoría de los líderes de los fármacos existentes hasta el momento provienen de fuentes naturales y de la química clásica, no quedan dudas que en este momento las aproximaciones más racionales se encuentran en una etapa temprana de búsqueda y desarrollo.

Dentro de la Química Combinatoria queda mucho por desarrollar, un aspecto clave para su aplicación exitosa es contar con un proceso coordinado y estrechamente interrelacionado que integre la síntesis y el *screening*. Hasta ahora se han obtenido casi exclusivamente colecciones de péptidos, los cuales no son muy interesantes a nivel farmacológico por su alta degradabilidad enzimática y baja biodisponibilidad por vía oral. Es de esperar que los métodos existentes sigan siendo mejorados y que se desarrollen nuevas tecnologías para la síntesis simultánea de compuestos de estructuras variadas con mayor posibilidad de aplicación terapéutica.

Si bien la síntesis combinatoria es un método esencialmente empírico es claro que provee innumerables compuestos que serían imposibles de preparar de otra forma. Lo más ventajoso de esta técnica no es la reducción de costos en la producción de fármacos sino el tiempo que se puede ahorrar.

Existen diferentes opiniones⁴⁸ respecto del potencial y la aplicabilidad de este nuevo tipo de química. Es nuestra opinión que, debido a lo novedoso de la aplicación de los principios combinatorios a la química, hoy es difícil evaluar su impacto. Como ha ocurrido en tantos otros aspectos de la Ciencia sólo el paso del tiempo podrá decir si la química combinatoria reemplazará a las estrategias tradicionales o si simplemente será un complemento de las mismas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Prof. Dr. Edmundo A. Rúveda por fomentar la realización de este trabajo y por las cuidadosas revisiones de los manuscritos, al Dr. Ernesto G. Mata por sus valiosas sugerencias y al CONICET por las becas otorgadas.

VI. REFERENCIAS

Otros Artículos de revisión de aparición reciente son: Terrett, N. K.; Gordon, D. W.; Kobylecki, R. J.; Steele, J.; *Tetrahedron* 1995, 51, 8135; Gallop, M. A.; Barrett, R. W.; Dower,

- W. J.; Fodor, S. P. A.; Gordon, E. M.; *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1233; Gordon, E. M.; Barrett, R. W.; Dower, W. J.; Fodor, S. P. A.; Gallop, M. A.; *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1385; Lowe, G.; *Chem. Soc. Rev.* **1995**, *309*; Thompson, L. A.; Ellman, J. A.; *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 555
1. Merrifield, R. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.
 2. Grubler, G.; Stoeva, S.; Echner, H.; Voelter, S.; *Peptides: Chemistry, Structure and Biology*, Hodges, R.A.; Smith, J.A., Eds.; Leiden: ESCOM-I11; 1994, p 51.
 3. Atherton, E.; Sheppard, R. C.; *Solid phase peptide synthesis: a practical approach*; IRL Press at Oxford University Press, 1989.
 4. Geysen, H. M.; Meloan, R. H.; Barteling, S.; *J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 3998.
 5. Bray, A. M.; Maeji, N. J.; Geysen, H. M.; *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 5811.
 6. Bray, A. M.; Maeji, N. J.; Valerio, R. M.; Campbell, R. A.; Geysen, H. M.; *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 6659.
 7. Houghten, R. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1985**, *82*, 5131.
 8. Beck-Sickinger, A. G.; Duerr, H.; Jung, G.; *Pept. Res.* **1991**, *4*, 88.
 9. Fodor, S. P. A.; Read, J. L.; Pirrung, M. C.; Stryer, L.; Lu, A.T.; Solas, D.; *Science* **1991**, *251*, 767
 10. Furka, A.; Sebestyén, F.; Asgedom, M.; Dibo, G.; *Abstr. 14th Int. Congr. Biochem., Prague, Czechoslovakia 1988*, *5*, 47.
 11. Furka, A.; Sebestyén, F.; Asgedom, M.; Dibo, G.; *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, *37*, 487.
 12. Sebestyén, F.; Dibó, G.; Kovács, A.; Furka, A.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 413.
 13. Lam, K. S.; Salmon, S. E.; Hersch, E. M.; Hruby, V. J.; Kazmierski, W. M.; Knapp, R. J.; *Nature* **1991**, *354*, 82.
 14. Houghten, R. A.; Pinilla, C.; Blondelle, S. E.; Appel, J. R.; Dooley, C. T.; Cuervo, J. H.; *Nature* **1991**, *354*, 84.
 15. Lam, K. S.; Hruby, V. J.; Lebl, M.; Knapp, R. J.; Kazmierski, W. M.; Hersh, E. M.; Salmon, S. E.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 419
 16. Dooley, D. T.; Houghten, R. A.; *Life Sci.* **1993**, *52*, 1509.
 17. Ecker, D. J.; Vickers, T. A.; Hanecak, R.; Driver, V.; Anderson, K.; *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 1853.
 18. Wyatt, J. R.; Vickers, T. A.; Roberson, J. L.; Buckheit, R. W. Jr.; Klimkait, T.; DeBaets, E.; Davis, P. W.; Rayner, B.; Imbach, J. L.; Ecker, D. J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 1356.
 19. Geysen, H. M.; Rodda, S.; Mason, T.; Tribbick, G.; Schoffs, P.; *J. Immunol. Meth.* **1987**, *102*, 259.
 20. Geysen, H. M.; Rodda, S.; Mason, T. J.; *Mol. Immunol.* **1986**, *23*, 709.
 21. Freier, S. M.; Konings, D. A. M.; Wyatt, J. R.; Ecker, D. J.; *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 344.
 22. Déprez, B.; Williard, X.; Bourel, L.; Coste, H.; Hyafil, F.; Tartar, A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5405.
 23. Simon, R. J.; Kania, R. S.; Zuckermann, R. N.; Huebner, V. D.; Jewell, D. A.; Banville, S. C.; Ng, S.; Wang, L.; Rosenberg, S.; Marlowe, C. K.; Spellmeyer, D. C.; Tan, R.; Frankel, A. D.; Santi, D. V.; Cohen, F. E.; Bartlett, P. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 9367.
 24. Cho, C. Y.; Moran, E. J.; Cherry, S. R.; Stephans, J. C.; Fodor, S. P. A.; Adams, C. L.; Sundaram, A.; Jacobs, J. W.; Schultz, P. G.; *Science* **1993**, *261*, 1303.
 25. Liskamp, R. M.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 633.
 26. Giannis, A.; Kolter, T.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1244; Hirschmann, R.; Sprengler, P. A.; Kawasaki, T.; Leahy, J. W.; Shakespeare, W. C.; Smith III, A. B.; *Tetrahedron* **1993**, *49*, 17, 3665.
 27. Needels, M. N.; Jones, D. G.; Tate, E. H.; Heinkel, G. L.; Kochersperger, L. M.; Dower, W. J.; Barrett, R. W. E. M.; Gallop, M. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10700.
 28. Kerr, J. M.; Banville, S. C.; Zuckermann, R. N.; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2529.
 29. Nestler, H. P.; Bartlett, P. A.; Still, W. C.; *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4723.
 30. Baldwin, J. J.; Burbaum J. J.; Henderson, I.; Ohlmeyer, M. H. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5588
 31. Carell, T.; Wintner, E. A.; Bashir-Hashemi, A.; Rebek, J. Jr.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 2059, 2061.
 32. Ellman, J. A.; Backes, V. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11171.
 33. Baum, R. M.; *C & E N* **1994**, *72*, 20.
 34. Sternbach, L. H.; *J. Med. Chem.* **1979**, *22*, 1.
 35. Bock, M. G.; Dipardo, R. M.; Evans, B. E.; Rittle, K. E.; Whitter, W. L.; Veber, B. F.; Anderson, P. S.; Freidinger, R. M.; *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 2235.
 36. Romer, D.; Bucher, H. H.; Hill, R. C.; Maurer, R.; Petcher, T. J.; Zeugner, H.; Benson, W.; Finner, E.; Milkowski, W.; Thies, P. W.; *Nature* **1982**, *298*, 759.
 37. Hsu, M. C.; *Science* **1991**, *254*, 1799.
 38. Pauwels, R.; Andries, K.; Desmyter, J.; Schols, D.; Kukla, M. J.; Breslin, H. J.; Raeymaeckers, A.; Van Gelder, J.; Woestenborghs, R.; Heykants, J.; Schellekens, K.; Janssen, M. A. C.; Clercq, E. D.; Janssen, P. A. J.; *Nature* **1990**, *343*, 470.
 39. Kornecki, E.; Ehrlich, Y. H.; Lenox, R. H.; *Science* **1984**, *226*, 1454.
 40. Bunin, B. A.; Ellman, J. A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10997
 41. DeWitt, S. H.; Kiely, J. S.; Stankovic, C. J.; Schroeder, M. C.; Reynolds Cody, D. M.; Pavia, M. R.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 6909
 42. La química de las tizolidinonas ha sido revisada: (a) Newkome, G. R.; Nayak, A.; *Advances in heterocyclic Chemistry, Vol 25*; Academic Press: New York, 1979; pp 83. (b) Singh, S. P.; Parmar, S.S.; Raman, K.; Stenberg, V. I.; *Chem Rev.* **1981**, *81*, 175.
 43. Holmes, C. P.; Chinn, J. P.; Look, G. C.; Gordon, E. M.; Gallop, M. A.; *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7328.
 44. Green, J.; *J. Org Chem* **1995**, *60*, 4287.
 45. Chen, C.; Ahlberg Randall, L. A.; Miller, R. B.; Jones, A. D.; Kurth, M. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 2661.
 46. Smith, P. W.; Lai, J. Y. Q.; Whittington, A. R.; Cox, B.; Houston, J. G.; Stylli, C. H.; Tiller, P. R.; *Biomed. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2821.
 47. Pirrung, M. C.; Chen, J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1240.
 48. a) Ellman, J. A.; *Chemtracs-Organic Chemistry* **1995**, *8*, 1; b) Pirrung, M. C.; *Chemtracs-Organic Chemistry* **1995**, *8*, 5; c) Czarnick, A. W.; *Chemtracs-Organic Chemistry* **1995**, *8*, 13; d) Mitcher, L. A.; *Chemtracs-Organic Chemistry*, **1995**, *8*, 19.