REVIEW

コンビナトリアルケミストリー

Combinatorial Chemistry

末 永 俊 朗*

Toshiro SUENAGA

(Received December 3, 1996)

Combinatorial chemistry is a novel and innovative technology to generate and screen a large number of compounds simultaneously. Traditionally, new drug lead compounds were discovered by screening sources of natural products or collections of compounds from chemical synthesis in pharmaceutical companies. Recently, computer assisted structure-activity based approaches enable the "rational drug design" to avoid laborious and serendipitous synthesis. More recently, combinatorial chemistry—sometimes referred to as "irrational drug design"—has emerged and is believed to give a big advantage over traditional methods.

1. はじめに

コンビナトリアルケミストリー (combinatorial chemistry), あえて直訳すれば“組み合わせ化学”が日本でも新薬開発の革新的な基盤技術として認識され, 化学の分野にとどまらず生物学, 分析学, 計算科学などの分野をも巻き込んで大きな注目を集めるに至っている^{1)~26)}.

医薬品開発を化合物の面から捉えると, 主に微生物, 動植物由来の天然物や製薬会社, 大学, その他の研究機関などがさまざまな目的で合成して保有している化合物ライブラリを対象にした新規リード化合物探索の段階 (lead generation) とリード化合物をもとにした種々の誘導体合成による化合物の最適化の段階 (lead optimization) に分けることができる. いずれもマンパワーが必要とされるところであり, 医薬品研究開発で効率化が望まれるところの一つである.

最近になってコンピュータの急激な高速化・低価格化と歩調を合わせコンピュータを使った薬物設計の分野が急速に発達し, 作用機作, 構造などに基いた分子設計が実用レベルに達しつつあり, 評価すべき化合物すなわち合成しなければならない誘導体の数を絞り込むことができるようになった. とはいえ, 最後には実際に合成または単離し評価した化合物とその数がものをいうわけであり, どうしてもマンパワーに頼らざるを得ない部分は依然として残っていた. そのような中で登場したのがコンビナトリアルケミストリーである. いくつかのユニット分子の組み合わせで, 数百から数百万に及ぶ極めて多種類の化合物群 (ライブラリ) を同時に合成することができ, 自動化も可能であるので, 評価系との組み合わせがうまくいけば, 極めて効率よく lead generation, lead optimization を行うことができると期待される. また, ライブラリは基本的に簡単かつ高収率な反応で合成されるため, 活性のある化合物が見いだされた時その化合物を臨床試験用に, さらに工業的に合成することも容易である. 天然物由

* 理化学研究所有機合成化学研究室 (〒351-01 埼玉県和光市広沢 2-1)

The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN) (Hirosawa 2-1, Wako, Saitama 351-01, Japan)

来の化合物が活性が強くても構造が複雑で工業的合成に適さない場合が多いのとは異なる。そのようなわけで、コンビナトリアルケミストリーは製薬・化学産業の研究開発の非効率性を打破するものとして大きな期待をかけられているのである。

2. コンビナトリアルケミストリーとは

コンビナトリアルケミストリーでは、上記のように多種類の化合物を同時に合成するところに最大の特徴がある。その基本的な考え方は自然界にある。自然は少数のユニット分子（アミノ酸、糖など）のさまざまな組み合わせの試行錯誤を経て、実に多様な機能をもった化合物（抗体、酵素などのタンパク、細胞表面糖鎖など）を作り出している。人工的に自然と同じことができれば、使えるユニット分子は天然の比ではないので、自然より効率的にとまでは言わないが、少なくともこれまで一つずつ合成していたときよりずっと効率的に必要な機能を持つ分子を作り出せる可能性がある。それを実現するのがコンビナトリアルケミストリーなのである。

コンビナトリアルケミストリーにおける基本的合成方法は非常に単純明快である。従来の合成法が、試薬 A と試薬 B を反応させて AB という生成物を得るものであるとすれば、コンビナトリアル合成では m 個からなる試薬グループ A (A_1 – A_m) と n 個からなる試薬グループ B (B_1 – B_n) を反応させ $n \times m$ 個の生成物グループ AB (A_1B_1 – A_mB_n) を得るのである (Fig. 1).

Fig. 1. Conventional synthesis vs. combinatorial synthesis.

同様のステップを繰り返すことにより、まさに指数関数的に生成物の数が増えていく。Table 1 にペプチドを例にとってコンビナトリアル合成においてアミノ酸の数を 5 種類、10 種類、20 種類と変えた場合のライブラリのサイズすなわち化合物の数を示した。コンビナトリアル合成ステップが増すにしたがって生成する化合物数が大きくなっていく様子がわかるであろう。

Table 1. Creating Molecular Diversity from Amino Acids

Peptides No. of AA	H-X ₁ -OH	H-X ₁ X ₂ -OH	H-X ₁ X ₂ X ₃ -OH	H-X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ -OH	H-X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ -OH
5	5 ¹ = 5	5 ² = 25	5 ³ = 125	5 ⁴ = 625	5 ⁵ = 3,125
10	10 ¹ = 10	10 ² = 100	10 ³ = 1,000	10 ⁴ = 10,000	10 ⁵ = 100,000
20	20 ¹ = 20	20 ² = 400	20 ³ = 8,000	20 ⁴ = 160,000	20 ⁵ = 3,200,000

3. ペプチドライブラリ

3.1 コンビナトリアルケミストリーの歴史はペプチドライブラリから始まった

コンビナトリアルケミストリーの興味の中心は、現在でこそ後述するように非ペプチド低分子に移っ

てきているが、歴史的にはペプチドライブラリとして始まり、基礎的な研究が行われた。そこで、本稿ではまずペプチドライブラリについて方法論を中心とした解説を行い、つづいて現在最も興味を持たれている非ペプチドライブラリに関する解説を行うことにする。

コンビナトリアルケミストリーという言葉自体は1990年代にはいつてからのものだが、歴史的には1960年代の Merrifield²⁷⁾ によるペプチドの固相合成に端を発すると考えられる。ペプチドを固相上で合成することにより、反応、後処理の各操作が簡便でしかも短時間で終わるようになった。合成の最終段階まで精製は行えないので、生成物の純度が問題視されることが多かったが、その後保護基、縮合剤などに改良が加えられ、反応条件も詳細に検討され、長鎖ペプチドでも高純度で合成できるようになった。さらに最近では合成ロボットを用いた自動合成も可能となり、生物学系の研究室に広く普及している。このようにペプチドの生産性が向上したことで、1980年代中頃からアミノ酸をランダムにつないだ短いペプチドを多数合成して図書館の本のように貯え（ペプチドライブラリ）、活性の評価をするさまざまな試みが行われるようになってきた。もちろん合成が容易になっただけではない。アミノ酸は天然のL-型だけでも20種類を数え、D-型、さらには α -アミノ酸以外のアミノ酸も豊富で入手が容易である。それらを組み合わせてペプチドを合成すれば、数百から数百万の化合物を容易に合成できたことも大きな要因である。

コンビナトリアルケミストリーの基本的な方法論は、ペプチドライブラリで確立されていった。以下にライブラリ構築へのさまざまなアプローチを紹介していく。ライブラリ構築には大きく分けてパラレル合成、スプリット合成がある。どちらを採用するかで、ライブラリのサイズ、化合物は単一化合物か混合物か、評価は溶液中か固相上かといったところに大きな違いが生じる。

3.2 パラレル合成法

3.2.1 パラレル合成とは パラレル合成とは読んで字のとおり、複数の化合物を同時並行的に合成する方法（混合物としてではなく単一の化合物として）である。自動合成機またはマルチピンを用いて、数十から千程度の化合物を同時に合成する方法が実用化され、現在の製薬企業におけるコンビナトリアル合成の主流となっている。スプリット合成と比較すると、最大の特徴は単一の化合物を合成できることである。スプリット合成法と比べると、ライブラリのサイズを大きくすることはむずかしいが、逆に化合物当たりの収量は多い。この方法で合成すると、各化合物はmg単位の収量があり、固相から切り出して溶液としてアッセイすることができる。このため、既存の評価系を適用できるのが製薬企業にとっての大きなメリットとなっている。

3.2.2 マルチピン (Multipin) 法 1984年 Geysen ら²⁸⁾ は8×12のポリエチレンピンの先端にアクリル酸ポリマーを連結したブロックを用い、96種のペプチドを同時合成する方法を発表した。最初の報告では50 nmol/pin 程度であったが、後に改良されて2 μ mol/pin も可能となり、ピンの先端を取り外しできるようになった²⁹⁾。現在ではオーストラリアの Chiron Mimotopes 社から5~7 μ mol/pin のものまで販売されており、ペプチドだけでなく低分子有機化合物の合成も可能であることが示されている。また、ブロックを複数用いれば、数百から数千の化合物を同時合成できる。合成ロボットを用いた自動合成だけでなく、マニュアルでも合成可能なため、初期投資が少なくて済む反面、ランニングコストはビーズを用いるのに比べると割高である。

マルチピン法で合成された化合物は、ポリマーと化合物の間に適当なリンカーを用いれば、合成完了後切り出してさまざまなアッセイを行うことが可能である。ペプチドがピン頭に結合したままでもELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) のようなアッセイは可能であり、例えばさまざまなウイルスタンパク上の抗体の結合部位がこの方法により解明された^{28), 30)~33)}。

3.2.3 ティーバッグ (Tea-Bag) 法 Houghten よって始められた、いわゆるティーバッグ法は、固

相合成用ビーズをポリプロピレン製の袋に封入して固相反応を行うものである³⁴⁾。マルチピン法や自動合成機などは、全操作を並行して行う必要があるが、本法ではカップリング反応などは個々の袋ごと別々の反応容器で行い、アミノ酸保護基の脱保護や洗浄などの共通操作は一つの反応容器で行うことにより、反応操作数を大幅に低減できるところが特徴である。得られる化合物は単一の化合物であるが、操作の面ではむしろ後述のスプリット合成に近いと言える。この方法ではティーバッグの大きさを変えれば、かなりの大量合成が可能であり一袋当たり 20 g (18.6 mmol) のビーズを用いた例も報告されている。

原理的には各ティーバッグで得られる化合物は上述したとおり単一の化合物であるが、Houghtenらはスプリット合成のための“反応容器”として用いている場合が多い。合成完了後は樹脂から切り出し各種アッセイに利用されている。

3.2.4 光リトグラフ法 Fodor ら³⁵⁾は光リトグラフと固相合成法の組み合わせで、顕微鏡のスライドガラス上にペプチドの行列を作成する方法を開発した (Fig. 2)。まずガラス表面上のアミノ基を光で切断できる NVOC (6-nitroveratryloxycarbonyl) 基 (図では X と表記) で保護しておく。リトグラフマスクで覆って光照射すると、照射された部分の保護基が脱保護される。光で切断可能な基で保護されたアミノ酸 X-A をカップリングさせると、光を照射した部分だけにアミノ酸を導入することができる。マスクのパターンを変えて同様の操作を繰り返せば、望みの位置 (マス目) に望みの配列を持ったペプチドライブラリができる。スライドガラス上でアッセイを行えば、活性な化合物の構造はマス目の位置でわかるわけである。

マスクパターンの代表的な例を Fig. 3 に示した。Orthogonal な方法では n^m の化合物を作るのに $n \times m$ 反応が必要であり、binary な方法では $2^n - 1$ の化合物を作るのに n 反応が必要である。ライブ

Fig. 2. Concept of light-directed spatially addressable parallel synthesis.

Fig. 3. Masking strategies.

ラリのサイズはマス目の細かさ、すなわちリトグラフマスクの解像度に依存するが、 1 cm^2 より少し広いエリアに $2^{16}=65,536$ の化合物を作ることが可能であるとされている。

3.2.5 自動合成機 最後に自動合成機について述べておきたい。パラレル合成では、数十から千程度の化合物を同時合成することが要求されるが、一化合物ずつ一つの容器で合成するのが基本である。溶媒、試薬の投入に始まり反応終了後の洗浄、溶媒除去までの一連の反応操作の合計は一化合物ずつ合成する従来の方法に比べて減るというわけではない。一つひとつの操作は簡単であっても何十、何百の操作を順番に人手で行うのは、効率向上どころか操作ミスを誘発しやすく、何らかの自動化は必須である。この 1, 2 年の間にパラレル型コンビナトリアル合成用自動合成機が、各社から一斉に発表されている。これらはもはやペプチドライブラリをターゲットとしたものではなく、低分子有機化合物ライブラリ合成にも対応できることが売りとなっている。すなわち $-70\sim 150^\circ\text{C}$ 程度までの反応温度制御、不活性ガス雰囲気下での反応などが可能であるとされている。いずれも数十から百程度の独立した反応容器を備え、ビーズを用いる固相合成が主流ではあるが、液相反応も可能としたものもある。製薬企業におけるコンビナトリアルライブラリの主流が、スプリット合成からパラレル合成にシフトしてきたのは、これらの自動合成機が開発され市販されるようになってきたことも一因である。Advanced ChemTech 社、Argonaut 社、ArQule 社、Bohdan Automation 社、Chiron Mimotopes 社、Combi-Chem 社、ComGenex 社、3-Dimensional Pharmaceuticals 社、Ontogen 社、Parke-Davis 社、Servier 研究所、Tecan 社などが自動合成機を示している。

3.3 スプリット (Split) 合成

3.3.1 スプリット合成とは コンビナトリアルケミストリーを象徴するといってもよいスプリット合成は、Split-Pool, Split-Mix, Portioning-Mixing, Divide-Couple-Recombine (DCR) などとも呼ばれる。ハンガリーの Eotvos Lorand 大学の Furka らにより 1988 年にブダペストとプラハで開かれた国際会議においてその概念が初めて示された^{36), 37)}が、雑誌に発表されたのは 1991 年になってからのことである³⁸⁾。同じ年 Lam³⁹⁾, Houghten⁴⁰⁾らがスプリット合成法を用いたペプチドライブラリの合成を発表し、今日のコンビナトリアルケミストリーブームの発端となった。

多数の化合物を混合物として同時に得ようと考えた場合、誰でも考えるのは、原料に対して反応剤の混合物を反応させることである。各反応剤の反応性が等しいか反応性が非常に高く、合計 1 等量の反応剤で反応が完結するならば、期待どおりにうまくいくであろう。だが、普通は反応剤により反応性が異なり、しかも反応を完結させるためには小過剰の試薬を用いる必要があるので生成物の比が等しくならず偏ってしまう。何ステップも繰り返すと化合物間の比率に大きな差が生じ、全く生成しない化合物もできてくる。このような問題を鮮やかに解決したのが、固相合成用のビーズを用いたスプリット合成であり、生成する混合物はほぼ等モルの混合物となる (3.3.4 で後述するが統計的には幅がある)。ここでは 3 種類のアミノ酸 (A, B, C) を使用してビーズ上でトリペプチドをライブラリとして合成する例を示す (Fig. 4)。まずビーズを三つの反応容器に等分して入れ、それぞれアミノ酸 A, B, C と反応させる。得られたビーズを一つの容器に入れ、洗浄や保護基の脱保護など共通操作を行い、再び 3 等分しそれぞれを反応容器に入れる。各反応容器には 3 種類のビーズが等量ずつ入っている。それぞれをアミノ酸 A, B, C と反応させると、アミノ酸 A と反応させた容器では、ジペプチド AA, BA, CA が結合した 3 種類のビーズができています。残りの二つの容器でも同様に 3 種類のビーズができていますので、合計 9 種類のビーズができたことになる。再度同じ工程を繰り返すと、合計 27 種類のビーズが生成している。

スプリット合成の重要なポイントを二つほど挙げておく。一つは、基質と試薬の反応性の差に基づく生成物の比率の偏りが生じないことである。各反応容器は多種類の基質を含むが、過剰の反応剤を用い

Fig. 4. Preparation of a combinatorial library by the split synthesis.

たり、同じ反応を繰り返すことが容易なため、反応を完結させることができる。もっとも基質と試薬の組み合わせによっては、反応しない場合も考えられ、その場合は欠損メンバーが生じることは避けられない。もう一つは、一つのビーズには単一の化合物しか結合していない (one bead one compound) ことである。それゆえ、ビーズ1個、すなわち単一の化合物を対象としたアッセイ・構造決定も可能である。

スプリット合成では、少ない工程数で大きなサイズのライブラリができるのが大きな特長である。20種類のアミノ酸によるライブラリ合成を例に、スプリット合成とパラレル合成の合成ステップ数について比較した表を示した (Table 2)。ライブラリのサイズが指数関数的 (20^n) に増えていくのは本稿の冒頭でも示したが、スプリット合成法では合成ステップ数は掛け算 ($20 \times n$) でしか増えない。一方、パラレル合成では完全に並行して合成すれば $n \times 20^n$ 工程が必要である。原料合成を共通にしたとしても $(1 - 20^{n+1}) / (1 - 20) - 1$ 工程で、指数関数的な増え方をすることには変わりがない。スプリット合成がいかに効率がよいかがわかるであろう。

Table 2. Number of Synthetic Steps and Library Entities

Peptide	Library entities	Number of synthetic steps	
		split synthesis	parallel synthesis
H-X ₁ -OH	$20^1 = 20$	$20 \times 1 = 20$	20
H-X ₁ X ₂ -OH	$20^2 = 400$	$20 \times 2 = 40$	$20 + 400 = 420$
H-X ₁ X ₂ X ₃ -OH	$20^3 = 8,000$	$20 \times 3 = 60$	$420 + 8,000 = 8,420$
H-X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ -OH	$20^4 = 160,000$	$20 \times 4 = 80$	$8,420 + 160,000 = 168,420$
H-X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ -OH	$20^5 = 3,200,000$	$20 \times 5 = 100$	$168,420 + 3,200,000 = 3,368,420$
H-X ₁ —X _n -OH	20^n	$20 \times n$	$\frac{1 - 20^{n+1}}{1 - 20} - 1$

3.3.2 アッセイ パラレル合成では、0.1 μ mol から 1 mmol 程度の単一の化合物が得られるので、既存のアッセイ系を用いてアッセイを行うことができる。一方、スプリット合成では、サイズが数万から数百万に及ぶため、1化合物当たりでは 0.1 nmol 弱 (ビーズ1個分) から多くても 100 nmol 程度と微量である。パラレル合成に比べると3桁以上少ない。さらに、これらは混合物として得られるので、何らかの工夫をしなければ、どの化合物が活性を示したのか容易にはわからないのである。そのためアッセイおよび構造決定にさまざまな工夫が試みられている。

(a) ビーズ1個を対象とするアッセイ ビーズ1個が保持する化合物の量は、0.1 nmol 弱が平均的なところである。このように極微量の化合物を対象にアッセイを行い、しかも、その構造まで決めなければならない。一般的に、アッセイは化合物をビーズ上に結合させたままできる ELISA を用いるほか、色素、蛍光、放射性同位体、磁石などでラベルした化合物との相互作用を検出する方法がとられる。この方法では、ビーズの色、蛍光などの強弱から、視覚的もしくは物理的に相互作用の強弱のレベルを判断できる。そこで、強い相互作用を示したビーズを取り出して、ビーズ上の化合物の構造決定をするのである。やりかたによっては、1回のアッセイでライブラリの全メンバーを含むような量のビーズを使用してアッセイを行うこともでき、たいへん効率的な方法である。このようなアッセイ法で有用な化合物が見つかった例も多数報告されている。しかし、固相上のアッセイ結果は、溶液中でのアッセイ結果とは異なる可能性を否定できない。例えば、化合物の水素原子をメチル基に変えるだけで活性が大きく異なる例などいくらでもある。この場合、水素原子がメチル基どころか巨大なポリマーに変わっているわけであり、立体配座も溶液中とは異なっている可能性があるからである。そのため化合物を最終的には溶液中で用いたい場合は、できれば溶液中でアッセイを行うことが望ましい。しかし、いったんビーズから切り出してしまうとビーズと溶液が1対1対応していなければ、活性があっても構造まで決めることはできないし、何万、何百万もの溶液を作ってアッセイすることは事実上不可能である。

そこでビーズ上の化合物を1/3 ずつ (Selectide 社^{41)~43)} もしくは1/2 ずつ (Pharmacoepia 社^{44), 45)}) 順に切り出してアッセイを行う方法が開発されている。ここでは Selectide 社の方法を紹介する (Fig. 5)。まずビーズ500個ずつをフィルター付きのマイクロタイタープレートに入れ、化合物の1/3を切り出して500化合物ずつの混合物溶液を得る。各溶液のアッセイを行い、最も強い活性を示した溶液に対応するビーズ500個を1個ずつマイクロタイタープレートに入れ、同様の操作を繰り返す。最も強い活性を示した溶液に対応するビーズを取り出して、その構造を決定するというものである。構造決定は残りの1/3の化合物を使用して直接決定するか、タグをデコードすることによって行うことができる (3.3.3(b) 参照)。

Fig. 5. Aliquot cleavage and two stage testing.

この方法は、スプリット合成で構築された大規模なライブラリのアッセイ法として知られているなかでは効率、正確さなどの点で最も優れたものである。次に述べる deconvolution 法や positional scanning 法では、最も活性の強い化合物を逃すおそれが十分にあるが、この方法ではその可能性が大幅に減少する。ビーズ1個が保持している化合物を3回に分けて切り出せば、1回当たり30 pmol 程度であるが、その程度の量でアッセイが可能でありかつ構造決定が可能となれば、この方法はアッセイ法として理想的な方法であるといえる。そのためには現在にも増してアッセイの微小化、高速化が必要であり、質量分析法 (MS) などによる直接構造決定の技術が進歩することが望まれる。

(b) 混合物を対象とするアッセイ 固相上でのアッセイを避けて溶液中でアッセイを行う方法は、

上記のほかに次の構造決定の項で詳しく説明する deconvolution, positional scanning, orthogonal libraries などが開発されている。いずれもビーズ1個を対象としたアッセイではなく、混合物をアッセイの対象とするところが上記の方法と異なる。これらの方法では固相上で行うことのデメリットがなくなるが、混合物でアッセイすることによるデメリットも浮上する。つまり、化合物間の拮抗作用、相乗作用が生じ、期待される各化合物の活性の相加平均が得られない可能性があるというものである。どういうアッセイ法を使うかはライブラリ合成時に決まってしまうので、このような点に留意した上でライブラリの合成を開始しなければならない。

3.3.3 構造決定法 スプリット合成により合成されたライブラリは混合物となっており、パラレル合成では必要なかった活性な化合物の構造決定が必須である。さまざまな方法が考案されており、いずれも合成法、アッセイ法と密接に関連しているが、この項では構造決定法という面からスプリット合成によるライブラリを分類してみる。

(a) **直接法** ビーズ上の化合物もしくはビーズから切り出された化合物の構造を、機器分析により直接決定できれば理想的である。ペプチドライブラリの場合は、アミノ酸配列分析器で直接構造を決定できる³⁹⁾。pmol オーダーの感度があるため、ビーズ1個分のペプチドでも十分分析可能である。オリゴヌクレオチドライブラリの場合は、polymerase chain reaction (PCR) 法によって十分な量を確保した上で構造決定を行うことができる。しかし、非ペプチド系化合物すなわち普通の有機化合物では、このような方法を使うことができない。やはり一般の有機化合物の構造決定で大きな力を発揮する NMR と MS が頼みの綱となる。

Varian 社は NMR による固相上の化合物の構造決定法の開発を積極的に進めており^{46), 47)}、最近、固相に結合したままビーズ1個の ¹H-NMR および ¹³C-NMR を測定できることを報告した⁴⁸⁾。現段階では高い置換率のビーズ (800 pmol/ bead) を用いても、500 MHz の装置で数時間の積算が必要であり、得られたスペクトルの分解能も十分とは言えないので、スプリット合成されたビーズの構造決定に直ちに利用できるわけではない。今後のさらなる装置、測定法の開発に期待したいと思う。

一方、MS は NMR に比較すると圧倒的に感度が高く、pmol から fmol オーダーは言うに及ばず amol (10^{-18}) レベルまで検出・構造決定が可能である。したがって、スプリット合成されたビーズの構造決定をするには十分な感度をもっているといえる。ペプチドの構造決定に応用されたのが最初の例であるが、前処理としてペプチドの部分分解が必須であった⁴⁹⁾。その後 ESI, MALDI といった新しいタイプのイオン化法の開発・応用が進歩し、そのような前処理を行うことなく構造決定することが可能になってきた。ペプチド⁵⁰⁾、ペプチド⁵¹⁾、非ペプチド⁵²⁾の構造決定例が報告されている。非ペプチドの例では置換率が 50~200 pmol/ bead のビーズでもビーズが保持する化合物の 10% を使用すれば、分子イオンピークおよびフラグメントイオンの検出が可能であることが示されている。装置が高価で誰でも使えると言うわけではないが、MS/MS に続き MSⁿ という超高感度かつ精密質量分析が可能なシステムも開発されている。これらを用いれば、一般的な低分子有機化合物ライブラリの構造決定もかなり容易にできるようになるであろう。このように MS は one bead one compound ライブラリの構造決定法としては、最も将来性のある方法の一つであると考えられる。操作の自動化の推進と低価格化が普及の鍵となりそうである。

(b) **Encoded libraries** MS などによる直接構造決定法がまだ一般的とは言えない現在、スプリット合成された非ペプチド系化合物ライブラリのビーズ1個の構造を間接的に決定する方法として、ライブラリをエンコード (encode) する方法が広く用いられている。タグ (tag=荷札) と呼ばれる分子を用いてライブラリ合成の履歴をビーズに記録し (エンコード)、アッセイで活性を示すビーズが見つかったなら、そのビーズのタグを解析する (デコード=decode) ことでビーズ上の化合物の構造を決

めるのである。

最初に報告されたタグはヌクレオチド^{53)~55)}とペプチド^{56)~58)}である。これらはライブラリ合成時に並行して合成され、ヌクレオチドの場合は polymerase chain reaction (PCR) 法で増幅した後、ペプチドの場合は配列分析器でデコードされる。ヌクレオチドタグは微量でも増幅することでデコードが可能であるが、化学的に安定でなく、ライブラリ合成に用いることのできる反応が限られるという欠点を持つ。Still らはこれらとは異なるタイプのタグ分子を開発した^{59), 60)}。彼らのタグ分子 (Fig. 6) は次のような特徴を持つ。1) ω 位にハロゲン化ベンゼン核を持つ直鎖アルコールであり、ベンゼン環のハロゲン置換様式とアルコールの長さの組み合わせで 30 種類近いタグ分子を得ることができ、キャピラリー GC で分離可能である。2) ハロゲン化物は電子捕獲 (electron capture: EC) 検出器で非常に高感度 (1 pg/ハロゲン) に検出することが可能であり、このタグの場合ビーズ上の化合物 (~100 pmol) の 0.5 mol % でも十分に検出可能である。3) 疎水性分子なので生体物質との相互作用は起こしにくく、0.5 mol % でコード化が可能であるため、ペプチドやヌクレオチドのタグよりもアッセイに影響を及ぼす可能性が大幅に少ない。4) タグ自身は化学的に安定であり、特にアゾケトン誘導体⁶⁰⁾はポリマーを構成するベンゼン核に直接付加するので、特別にタグを付加する置換基を持つ必要がなく、低分子有機化合物ライブラリのエンコードも可能である。

Fig. 6. Electrophoric tags which create a binary synthesis code and linkers to attach the tag to the solid support.

コード化の方法はユニークである (Fig. 7)。各ビルディングブロックを二進法で表記し、そのパターン (1 と 0 の組み合わせになる) をタグ分子のあるなしで表現するのである。例えば A を 01, B を 10, C を 11 と二進法で表記するなら A に対してはタグ 1, B に対してタグ 2, C に対してはタグ 1 とタグ 2 を用いる。以降のステップも使用するタグの組み合わせを変えて同様に行う。タグ分子が 25 個あれば原理的には $2^{25}=33,554,432$ の化合物をコード化できるので実用上十分である。デコードは

Fig. 7. Preparation of an encoded combinatorial library by the split synthesis.

用いたリンカーの種類により光分解または酸化的分解を行ってビーズからタグを遊離させ、得られたアルコールをシリル化して EC-GC により分析することによって行われる。ピークの位置から用いたビルディングブロックを決定でき、ビーズ上の化合物の構造を確定することができる。Gallop らも最近 Still らとよく似た方法を発表した⁶¹⁾。彼らはタグ分子として 2 級アミンを用い、デコードは加水分解して得られたアミンをダンシル化して HPLC による分析、蛍光による検出を行った。このほか ESIMS を用いてタグをデコードする方法⁶²⁾も報告されている。

Nicolaou ら⁶³⁾ および Moran ら⁶⁴⁾ は、高周波による書き込み・読み出しが可能なマイクロチップ (大きさは $8 \times 1 \times 1$ mm) に合成ステップを記録する方法を発表した。マイクロチップとビーズが封入されたマイクロリアクター (Nicolaou) またはカプセル (Moran) を用いてスプリット合成を行っているが、ライブラリサイズはそれぞれ 24, 125 でしかなく、本格的なスプリット合成への応用はまだ先のこととなりそうである。

エンコード法には、ライブラリ合成時にコード化のプロセスが入り合成に手間がかかるという欠点がある。しかし、NMR, MS などでは構造決定できない立体異性体や、ビーズ上の化合物の純度が悪い場合でも構造決定が容易であるという利点があり、直接法と並んでスプリット合成されたライブラリの構造決定に欠くことのできない方法である。また、直接法とエンコード法を組み合わせる方法も考えられる。例えば、MS による直接構造決定の補助をするためにタグを一部だけ用いれば、多数のタグを用意する必要がない。合成の手間が減るとともに、MS だけで構造を解析決定するよりは迅速・確実に構造決定ができるものと考えられる。

(c) **Deconvolution** Houghten ら⁴⁰⁾ は、スプリット合成により得られたライブラリ中の活性化化合物の構造を、スプリット合成を逆に辿るようにして確定する方法を開発した。複雑な混合物を少しずつ単純な混合物にしていくことから、絡み合った糸をほぐすという意味で deconvolution (デコンボリューション) と言われる。4 種類のアミノ酸を用いて合成したトリペプチドライブラリの中の最も活性なペプチド (例えばここでは ACA だとする) を deconvolution で同定する例を Fig. 8 に示す。スプリット合成の最終段階では四つの反応容器にそれぞれ 16 種類ずつのトリペプチドが入っており合計 64 種類である。容器ごとにペプチドをビーズから切り出してアッセイを行うと ACA が含まれている混合物、すなわち末端が A で終わっている混合物が最も強い活性を示すであろう。末端が A となるラ

Fig. 8. Deconvolution process.

イブラリを合成し同じようにアッセイすると、今度は末端が CA となる混合物が最も強い活性を示すはずである。最後は末端が CA で終わるトリペプチド 4 種を合成してアッセイすれば ACA が最も強い活性を示し、64 種の混合物の中で最も活性の強かったペプチドの構造が判明することになる。

Deconvolution ではアッセイを溶液中で行うため、既存のアッセイ系を用いることができることから、よく使われる方法の一つとなっているが、以下のようないくつかの問題点も指摘されている。1) アッセイの項で述べたように混合物でアッセイしているために結果が相加平均にならず結果の判定に影響を及ぼす可能性がある。2) 相加平均になったとしても、最も強い活性を示した混合物に最も活性な化合物が入っているとは限らないので、最も活性の強い化合物を逃す可能性がある。3) 構造が決まるまでライブラリを何回か再合成する必要がある。4) 後で説明するが化合物当たり少なくとも 50 から 100 個ぐらいのピーズを用いなければ混合物中の化合物の濃度のばらつきが大きくなり、しかも再合成したときのライブラリの再現性に問題が生じるので、あまり大きなサイズのライブラリのアッセイに用いることはできない。などである。このうち労力のかかる再合成を避ける目的で Houghten らは次に述べる positional scanning という方法を発表した^{65), 66)}。また Janda らはスプリット合成の途中の樹脂を一部保存しておくことで再合成の手間を省くことができることを報告している⁶⁷⁾。

(d) **Positional scanning** 同じように 4 種類のアミノ酸によるトリペプチドライブラリを例に説明する (Fig. 9)。Positional scanning では図に示したように O の位置を特定のアミノ酸に固定し X はアミノ酸 A~D の混合物であるような positional ライブラリーを合成する。この例ではトリペプチドなので 3 種類の positional ライブラリ (OXX, XOX, XXO) を合成する。それぞれの positional ライブラリは、アミノ酸が固定されたサブライブラリを 4 種類ずつ含むので、合計 $3 \times 4 = 12$ 種類のサブライブラリが合成される。各サブライブラリは $4 \times 4 = 16$ 種類のペプチドを含んでいる。ライブラリの合成はティーバッグ法を用いれば容易である。例えば positional ライブラリ OXX は四つのティーバッグを用いて合成する。第一ステップは四つの反応容器で A~D のアミノ酸とそれぞれ反応させる。残りの 2 ステップは四つのティーバッグを一つの反応容器に入れ A~D のアミノ酸等量混合物と反応させる。スプリット合成でライブラリを合成するのと同じかそれ以下の労力で全 positional ライブラリを合成することができるので、deconvolution に比べればかなりの労力節減となり、大規模なライブラリにも対応できる。

それぞれのサブライブラリごとにアッセイし、positional ライブラリ OXX の中では AXX, XOX の中では XCX, XXO の中では XXA が強い活性を示した場合 ACA が活性を示した化合物であると決定することができる。

Positional Libraries	Sublibraries			
OXX	AXX	BXX	CXX	DXX
XOX	XAX	XBX	XCX	DXO
XXO	XXA	XXB	XXC	XXD

$X = A + B + C + D$

Fig. 9. Positional libraries.

Deconvolution より合成の労力が減るというメリットは確かにあるが、ビルディングブロックの混合物を反応させるため反応性の差で生成物が均等にできない可能性がある。また、それぞれの位置で活性の強いビルディングブロックを決めてもその組み合わせが必ず活性のある化合物になるという保証はなく、この点では deconvolution より活性の強い化合物を逃す可能性が高くなってしまふ。

(e) **Indexed library** Pirrung ら^{68)~70)} は indexed library を発表した. Positional scanning では大規模なライブラリの合成・構造決定が容易にできることがメリットであったが, 結果の信頼性は犠牲にされていた. ところが, 変化させる位置を2か所に限定して positional library を合成してアッセイを行えばかなり正確に活性のある化合物を同定できるのである. ここでも4種類のアミノ酸によるジペプチドライブラリを例に説明する (Fig. 10). Positional ライブラリは OX, XO の2種類ができるが, それぞれの positional library の中にすべての化合物が1個ずつ含まれているので, OX, XO のサブライブラリのどの組み合わせでもその中に共通に含まれる化合物はただ一つである. したがってある化合物 (例えば BC) が活性を示すなら二つのサブライブラリ (BX と XC) で活性が現れることになり, 逆に BX と XC で活性が強ければそれは BC の活性であることが特定できるのである.

Fig. 10. Indexed libraries and their assay.

(f) **Orthogonal library** Indexed library では positional scanning において変化させる位置を2か所にすることによって結果の信頼性を上げることに成功したが, 3か所以上を変化させる場合は対応がむずかしい. Tartar ら⁷¹⁾ はこれを巧妙に解決する方法を示した. 彼らが orthogonal library と呼ぶライブラリを9種のアミノ酸でトリペプチドライブラリ ($9^3=729$ 種のペプチドを含むライブラリ) として合成する例について説明する (Fig. 11). まず9種のアミノ酸 (A~I) を3種類ずつ三つのグループに別けてそれぞれを L (A, B, C), M (D, E, F), N (G, H, I) と名付けよう. L, M, N をそれぞれ単独の化合物として捉えてコンビナトリアル合成を行うと27種類のサブライブラリ (LLL, LLM, ...NNN) ができる (Library 1). これらのサブライブラリは実際には3種類のアミノ酸によるトリペプチドライブラリとなっているからそれぞれ27種類のペプチドを含んでおり, 全体では $27 \times 27 = 729$ 種すべて

Fig. 11. Preparation of orthogonal libraries .

のペプチドが含まれている。一方、X (A, D, G), Y (B, E, H), Z (C, F, I) のように別のグループ分けをして同じように 27 種のサブライブラリを合成する (Library 2)。

このライブラリの中で例えば HBC が強い活性を示すとすると Library 1 のアッセイではサブライブラリ NLL が強い活性を示し、Library 2 ではサブライブラリ YYZ が強い活性を示すのは自明である。逆に Library 1 で NLL が強い活性を示した場合を考えてみよう。NLL に含まれている 27 種のうち 1 種類が強い活性を示したとすれば、最初の位置のアミノ酸は G, H, I のうちの一つであり、2 番目、3 番目の位置はいずれも A, B, C のうちの一つである。同じペプチドは Library 2 にも含まれているから、それを含むサブライブラリは強い活性を示すであろう。YYZ が強い活性を示したとすれば、最初と 2 番目の位置は B, E, H のいずれかであり 3 番目は C, F, I のいずれかであるから、両方の解析結果を合わせれば両者に共通に含まれるペプチドの配列が HBC であることは容易にわかる。

活性のある化合物を逃してしまう可能性は deconvolution, positional scanning に比べるとかなり低くなるが、問題点がないわけではない。いちばんの問題点は複数のサブライブラリが活性を示したときである。実際には五つのペプチドしか活性を示さなかったとしても Library 1, Library 2 とともに最大で五つのサブライブラリが活性を示すことになり 25 の候補が浮上してくる。ところが、これらを合理的に五つに絞り込むことはできないので 25 種のペプチドをパラレル合成で再合成して活性を調べるしかない。

3.3.4 ビーズの数とライブラリサイズ スプリット合成で気になるのは、あるサイズのライブラリを合成する時どのくらいの量のビーズを使用すればいいか、言い換えると一化合物当たり何個のビーズを使用すればいいかということである。これには統計的な処理が必要となる。何種類かの方法が提出されている^{72)~75)}が、ここでは計算式が簡単な Boutin らの方法⁷⁵⁾を紹介する。話を簡単にするため、 n 個のアミノ酸を用いて q mer のペプチドライブラリを合成することを考える。1 化合物当たり m 個のビーズを用いるとすれば必要なビーズの数は $m \times n^q$ である。この時ある化合物が持つビーズの数 k の分布 $P(k)$ は古典的な二項分布に従う。ここで n^q が十分に大きい ($n^q > 1000$) ならば k の分布 $P(k)$ は n や q には無関係で、唯一ビーズの数 m に依存するポワソン分布 $P(k) = m^k \times e^{-m} / k!$ で表される。これを元にビーズ 1 個を対象にアッセイを行う場合 (直接法やデコードで構造を決める) と混合物でアッセイを行う場合 (deconvolution などの場合) の二つに分けて考えてみることにする。それに先立って m に依存するポワソン分布というのは一体どのような関数なのかわかってもらうために $m=1, 5, 15$ の場合についてグラフに示した (Fig. 12)。縦軸はパーセントで横軸は k すなわちビーズの数の分布であり、 k が 0 から無限大までの値を合計すると 100% となるような関数である。 $m=1$ の場合で k が 0 の場合は $P(0) = e^{-1} = 0.368$ である。すなわち、1 化合物当たり 1 個のビーズを用いてスプリット

Fig. 12. Poisson distribution.

合成した場合 36.8% のライブラリメンバーの数が 0, つまり合成されないということになる。

本題に戻ろう。ビーズ 1 個ごとにアッセイを行い構造決定する場合は、すべてのライブラリメンバーが少なくとも 1 個含まれている確率を求めればよい。これを求めるには $P(0)=e^{-m}$ すなわち 1 個も含まれない可能性を計算すればよい。 $m=1$ の場合は既に述べた。 $m=5$ なら 0.67%, $m=10$ で $4.54 \times 10^{-3}\%$, $m=15$ で $3.06 \times 10^{-5}\%$ である。どこまで要求するかにもよるが 99% 以上の確率を求めるのであればライブラリサイズの 5 倍, 99.9% なら 7 倍のビーズを用いばよいという結果である。具体的に 1 g 当たり 200 万個のビーズで考えてみるとサイズが 100 万のライブラリの場合 500 万個のビーズ, 2.5 g が必要となる。これは 1 回のアッセイに必要な量でもある。したがって同じライブラリで何種類かアッセイを行うなら、合成しなければならない量はその整数倍になる。実用的な意味では 10 万ぐらいのサイズがビーズ 1 個ずつのアッセイを行う場合の限界となるであろう。

混合物でアッセイを行う場合はどうだろうか。この場合各化合物の濃度ができるだけ一定になるようにしなければならないので、上記の場合より多くのビーズを用いなくてはならない。例えば $m=5$ では $k=3$ から 7 の間になる確率は 74.2%, 2 から 8 で 89.1%, 1 から 9 でやっと 96.1% である。濃度差を 9 倍まで許容したとしても全体の 96% あまりしか入っていないことになる。許容濃度差が 1.5, 2.0, 3.0 の場合に必要なビーズの数を、含まれる化合物の割合の設定を変えて Table 3 に示した。これによれば許容濃度差を 2 倍としたとき 99% の化合物がその範囲に含まれるには 61 個のビーズが必要であり, 99.9% なら 100 個が必要であることがわかる。これはビーズ 1 個ずつのアッセイを行う場合より 1 桁以上多い。もちろんこれは理想的なスプリット合成が行われた場合のことであり、実際にはこれよりも多くのビーズを用いる必要がある。また Burgess ら⁷²⁾ はライブラリサイズが小さい場合はこの計算で得られた値より多くのビーズを使用しなければならないことを報告している。

Table 3. Number of Beads per Compound as a Function of Concentration Range and Range for Number of Compounds

Concentration range	(Ratio)	Range for number of compounds				
		90 %	95 %	98 %	99 %	99.9 %
100±20 %	(1.5)	64	91	130	161	270
100±33 %	(2.0)	25	35	49	61	100
100±50 %	(3.0)	10	14	21	26	44

3.4 生物学的合成

ペプチドライブラリは、これまで述べてきたような化学的手法だけではなく生物学的手法でも合成されている。組み替え DNA の技術がその根幹をなすものである。プラスミドやポリソーム上のペプチドライブラリも報告されているが、最も有用なのはファージ上のライブラリであろう^{76)~80)}。1985 年 Smith は繊維状ファージ上にペプチドライブラリを構築する方法を発表し⁷⁶⁾ 1988 年に改良法を報告した⁷⁷⁾。このライブラリは何千万もの繊維状ファージを含み、それぞれが表面に異なるペプチドを保持していて、そのゲノムはペプチドに対応する DNA 配列を持っている。スクリーニングで抗体に対する最も強い親和性を示したファージを選び、*E. coli* 中で増殖させたのち DNA を解読しファージ上のペプチドの配列を決定する方法がとられる。何千万ものペプチドのアッセイを短時間で行うことができる優れた方法であるが、ビルディングブロックとして天然のアミノ酸しか用いることができないこと、ファージの環境がアッセイにどのような影響を与えるかがほとんど知られていないことが欠点である。

4. 非ペプチドライブラリ

4.1 ペプチドから非ペプチドへ

コンビナトリアルケミストリーはペプチドライブラリから始まり、さまざまなライブラリ構築法、アッセイ法、構造決定法が開発されてきたことを前章で述べた。だが、創薬を目的とした場合、ペプチドは経口吸収性および体内動態（化学的安定性、血液脳関門の通過など）に問題があり、そのまま薬物として利用するのはむずかしい。さらに、ペプチドからペプチドミミックをデザインする一般法が未だに存在しないので、ペプチドをリード化合物として、経口投与が可能なペプチドミミックに誘導するのもむずかしい。また、側鎖の構造の違いによる多様性はあるものの、ペプチドの基本骨格は同一である。したがって、天文学的サイズのライブラリを合成するのはやさしいが、ライブラリサイズから期待されるほど多様な化合物を含むわけではなく、活性な化合物を同定するのもむずかしくなる。このような理由から、この1,2年でライブラリの主流はペプチドミミック、有機低分子化合物へと移ってきており、数多くの研究例が報告されている。もちろんペプチドライブラリで培われたさまざまな技術は、これら非ペプチドライブラリにおいても大部分は応用可能である。本節では、前節と同様に非ペプチドライブラリについて方法論を中心に紹介していくが、有機低分子化合物のライブラリについては最近 Ellman ら¹⁷⁾、Balkenhohl ら²⁶⁾ が非常に優れた総説を発表しており、固相上で可能な反応例については Hermkens ら²⁵⁾ が詳細なリストを発表しているので是非参考にしていただきたい。

4.2 ペプチドミミック

4.2.1 ペプチドライブラリ Chiron 社の Zuckermann らは“ペプチド”ライブラリを開発した^{81), 82)}。ペプチドとは *N*-置換グリシンのオリゴマーであり次のような特徴を持つ。1) モノマーの合成が容易。2) 置換基に多様性を持たせることが可能。3) 高いカップリング収率を期待できる。4) α -炭素の代わりに窒素原子上に置換基を有するので化合物はアキラルである。5) ペプチドより酵素的加水分解を受けにくい。彼らは実際にペプチドライブラリから生理活性なペプチドを見いだすことに成功している。

Fig. 13. Structures of peptides and peptoids.

4.2.2 オリゴカルバメート Cho ら^{83), 84)} はアミノ酸を還元して得られる光学活性アミノアルコールをモノマーとして、オリゴカルバメートライブラリを合成した。オリゴマーは酵素加水分解に対して安定である。光リトグラフ法を用いて 256 種のオリゴマーを合成し、モノクローナル抗体を用いてアッセイを行い活性な化合物を見いだすことに成功した。同時に、ガラスプレート上では活性のない部類に属した化合物が溶液中では強い活性を示すケースがあり、固相もしくはリンカーがアッセイを妨害することも明らかにした。

Fig. 14. Preparation of oligocarbamate.

4.3 ヘテロ環状化合物

4.3.1 ベンゾジアゼピン 1,4-ベンゾジアゼピン類は広範な生物活性を示すことが知られているが、その骨格は 2, 3 工程で合成することができることからコンビナトリアル合成に適した化合物であると言える。1992 年に発表された Bunin と Ellman による 1,4-ベンゾジアゼピンライブラリの合成⁸⁵⁾は、ペプチドミミックのようなオリゴマーでない低分子有機化合物ライブラリを最初に実現したものとして画期的なものである。彼らは、フェノール性水酸基またはカルボキシル基をもつアミノベンゾフェノン 2 種類とアミノ酸 12 種類、アルキル化剤 8 種類を用いて、Fig. 15 に示したような工程で 192 種のベンゾジアゼピン誘導体をマルチピン法で合成している。幾つかの化合物については FAB-MS による構造確認、収率の決定を行っているが、ほとんどが HPLC で 1 ピークであり平均収率は 86% であった。

Fig. 15. Ellman's combinatorial synthesis of a 1,4-benzodiazepine library.

一方、同じ時期に Parke-Davis の DeWitt さんもベンゾジアゼピン、ヒダントインのコンビナトリアル合成を発表している⁸⁶⁾。DeWitt らのベンゾジアゼピンライブラリ合成は 1974 年の Camps らの方法⁸⁷⁾に基づいて行われた。すなわち、Fig. 16 に示したようにアミノ酸 5 種類とアミノベンゾフェノイミン 8 種類を用い、2 工程で 40 種類のベンゾジアゼピン誘導体を得た。合成は、彼らが開発した Diversomer と呼ばれるマルチピン法に基づく半自動パラレル合成機を用いて行われ、収率は 9~63% であった。彼らの合成の特徴は、ビーズからの切断と同時に環化が起るためビーズとの結合に用いた官能基が化合物に残らないことである。

Fig. 16. DeWitt's combinatorial synthesis of a 1,4-benzodiazepine library.

一方、Ellman らは、その後アミノアリルケトンをもつ固相上で酸クロライドとアミノアリルスタナンの Stille カップリングを用いて合成する方法を開発した⁸⁸⁾。Stille カップリングは温和な条件で進行するので、各種官能基の存在下行うことができ、酸クロライドは 500 種類以上が市販されているため、多数のアミノアリルケトンを得ることができる (Fig. 17)。彼らはこの手法を用いて 11,000 種類以上のベンゾジアゼピンライブラリのパラレル合成を報告している。また化合物を固相から切断した時に官能基が残る問題を解決するためのリンカーとして、シリルリンカーを開発した (Fig. 17)⁸⁹⁾。シリル基を介して化合物の芳香環部分を固相に結合させておくと、HF 処理により脱シリル化がおり、芳香環上には官能基が残らない。芳香環を含む化合物のライブラリ合成には広く用いることができると期待される。

Fig. 17. Ellman's new synthesis of a 1,4-benzodiazepine library by Stille coupling and a new silyl linker.

4.3.2 ペンゾジアゼピンジオン 1,4-ベンゾジアゼピンライブラリの成功に触発され、1,4-ベンゾジアゼピン-2,5-ジオンのライブラリも Ellman ら⁹⁰⁾や Zuckermann ら⁹¹⁾のグループから報告されている (Fig. 18).

Fig. 18. Synthesis of a 1,4-benzodiazepine-2,5-dione library.

Fig. 19. Cycloaddition of support-bound imine to yield 4-thiazolidinones, 4-metathiazanones, pyrrolidines, and β -lactams.

4.3.3 イミンへの環化付加 Gallop らは固相上でイミンを合成し⁹²⁾, 1,3-双極環化付加反応によるピロリジンライブラリの合成⁹³⁾やマルチコンポーネント反応による 4-thiazolidinone などのライブラリの合成⁹⁴⁾を報告した。さらに、ケテン類との [2+2]-環化付加反応による β -ラクタムライブラリの合成⁹⁵⁾も報告している。 β -ラクタムの環化は高い *cis*-選択性で進行したが、アミノ酸の不斉による不斉誘起は低かった。

4.4 液相でのライブラリ合成

4.4.1 固相か液相か コンビナトリアル合成は、ほとんどの場合固相上で行われているがそのメリット、デメリットを考えてみる。液相反応での典型的な反応操作は「溶媒・試薬との混合→反応のモニタ→反応停止→分液→乾燥→溶媒留去→再結晶・蒸留・カラムクロマトグラフなどによる精製」のようになる。固相反応では「溶媒・試薬の投入→反応のモニタ→樹脂の洗浄」と至って単純である。後処理の段階が大幅に簡略化されており、大規模なライブラリをスプリット合成する場合だけでなく、数十から数百の化合物ライブラリをパラレル合成する際でもメリットが大きい。何よりも自動化に適しているのである。デメリットもある。固相上で使える反応に限られていること、樹脂に原料を結合し生成物を切り出すリンカーが必要なこと（使える反応をさらに狭めることにもなる）、樹脂からの切り出しでリンカー部分が残る場合があること、反応のモニタが液相ほど容易でないこと、液相に比べると反応性が悪いこと（もっとも過剰の試薬を用いれば解決することも多く、逆に過剰の試薬を用いることができる点が液相法より優れていると言うこともできる）、樹脂が高価であり、置換率は樹脂の種類にもよるが 0.2~0.7 mmol/g ぐらいなので大量合成には向かないこと、固相上での精製は一切できないこと、などが挙げられ、それぞれ改善の努力が続けられている。

液相法では固相法とメリット、デメリットが逆になる。特にあらゆる種類の反応ができることおよび大量合成が可能なのが大きなメリットであり、液相でのコンビナトリアル合成は魅力的である。液相法では正確な意味でのスプリット合成はできないので indexed library などの混合物の合成もしくはパラレル合成による単一化合物合成が可能である。パラレル合成に関しては、液相の反応を“同時に”行うということに他ならず、これまでの合成法とコンビナトリアル合成との境界線は明瞭ではないのだが、ここでは液相で試みられているコンビナトリアル合成について紹介し、“液相コンビナトリアル合成”の可能性を探りたい。

4.4.2 マルチコンポーネント反応 液相でのコンビナトリアル合成のいちばんの問題点は後処理である。後処理を簡略化できなければ液相でのコンビナトリアル合成は何のメリットもなくなる。一つの解決法はマルチコンポーネント反応の利用である⁷⁾。1 段階の縮合で 3 成分、4 成分のビルディングブロックを縮合できれば、多数の化合物が容易に得られる。

Armstrong らは Passerini 反応により 8 種類のアルデヒド、8 種類のカルボン酸、1 種類のイソニトリルを縮合させ、64 種類の α -アシルオキシアミドライブラリを得た⁹⁶⁾。反応は 1 等量の酸とイソニトリルに 2 等量のアルデヒドを加え室温で行われ、反応溶媒の留去のみの後処理により 80% ほどの収率で生成物を得ている (Fig. 20)。

同じく Armstrong らは Ugi 反応を用いて、さまざまな種類のライブラリを構築する方法を報告している^{97), 98)}。Ugi 反応はカルボン酸、アミン、アルデヒド、イソニトリルの縮合反応であるが、イソニトリルとしてイソニトリルシクロヘキセンを用いるとエナミドを得ることができる。エナミドを酸加

Fig. 20. Passerini reaction for synthesis of a α -acyloxyamide library.

水分解するとカルボン酸が得られ、アルコール、チオールによりアルコリススするとそれぞれエステル、チオエステルが得られる。アルキンとの環化付加を行えばピロール誘導体となる (Fig. 21).

Fig. 21. Ugi reaction with 1-isocyanitrocyclohexene gives reactive enamide.

Kobayashi らは、希土類トリフラート存在下、アルデヒド、アミン、アルケンの 3 成分を混合すると、対応するキノリン誘導体が高収率で得られることを報告した^{99)~101)}。ライブラリ合成に当たり、彼らは希土類トリフラートの高分子上への固定化を検討し、高分子触媒ポリアリルスカンジウムトリフィルアミドジトリフラート (PA-Sc-TAD) を開発した¹⁰²⁾。この触媒は、ゴム状の固体であるが、塩化メチレン-アセトニトリル中では分散、一部溶解し、ヘキサンを加えると再び固まるという性質を持つ。このため、反応中は溶解していて、通常の溶媒に不溶な高分子触媒より高い触媒活性を示すと期待され、反応終了後は固体に戻してろ過し、ろ液を濃縮するだけで生成物を得ることが可能である。この反応に用いることが可能な市販の試薬は、アルデヒド、アミンがそれぞれ 200 種以上、アルケンが 50 種以上であり、計算上は 200 万を超ええるキノリン誘導体を得ることができる (Fig. 22).

Fig. 22. Three components coupling reactions to afford quinoline library.

4.4.3 高収率反応 もう一つの考え方は、高収率かつ後処理の必要ない反応を使うことである。試薬は反応後の溶媒留去（揮発性低分子試薬）やろ過（イオン交換樹脂に代表される高分子触媒や適当な樹脂による試薬などの吸着除去）で除かれるような反応が好ましい。そのような反応をうまく組み合わせることができれば 2 工程、3 工程の反応も液相で可能になるであろう。実際、ArQule 社、Panlabs 社、Combichem 社などは液相法によるパラレル合成で 10,000 以上のサイズのライブラリを合成している。前項に挙げた Kobayashi らのキノリンライブラリの例¹⁰²⁾もこれに該当する。

4.5 反応のモニタ

液相の反応であればさまざまな手段で反応のモニタが可能であるが、固相では液相ほど容易ではない。唯一、ペプチドなら過去の膨大なデータの蓄積からカップリング、脱保護などの反応条件は既知となっている。そのため、反応のモニタは必要ないと言ってもいいし、モニタする場合でもさまざまな方法が知られているため、適した方法を選べばよい。しかし、非ペプチドのライブラリを合成する際には、何らかの手段を用いて反応をモニタしなくてはならない。

最も一般的なのは、代表的な化合物を何種類か実際に合成し、樹脂から切り出して、通常の液相での反応と同様のチェックを行い、ライブラリ合成時の反応条件を決定する方法である。パラレル合成であれば、実際の合成中にもこの方法で反応の進行をモニタできる。

化合物を固相に保持したままでモニタするには、3.3.3 構造決定法の (a) 直接法の項で述べたゲル相-NMR 法^{46)~48), 103)~106)} (パラレル合成), MS 法^{49)~52), 107)} (パラレル合成, スプリット合成) の他に IR^{108), 109)} (パラレル合成, スプリット合成) も使用できる。いずれの場合も混合物を合成している場合は分析が困難である。

5. デザイン

コンビナトリアルケミストリーは、しばしばこれまでの薬物設計が“rational drug design”と表現されるのに対し“irrational drug design”と言われてきた。従来型の薬物設計は理論的・経験的に薬物をデザインし、実際に合成、評価する化合物を絞り込むことに主眼が置かれており、成功例も多数報告されてはいるが、必ずしも大幅な効率（ヒット率）向上には結び付いていなかった。これに対し、コンビナトリアルケミストリーはできるだけ多数の多様な化合物をランダムに合成し、その中から活性化化合物を見つけようという全く逆の発想に基づくものである。コンビナトリアルケミストリーが知られるようになったころは、これまでに人間が作った化合物の数にも匹敵する何百万、何千万の化合物が一人の化学者の手で合成できると言われていた。それだけの化合物があればどんな活性のものでも見つかるのではないだろうか。そんな期待感からコンビナトリアルケミストリーは製薬企業に瞬く間に浸透していった。

しかし、最近になって軌道修正が施されつつある。対極的關係にあると考えられていた rational design がコンビナトリアルケミストリーでも必要なのである。ペプチドを例にとれば、20 種類のアミノ酸を使ってせいぜい酵素の 10 分の 1 程度の長さしかない 20 mer を作ると 10^{26} のサイズとなり、軽くアボガドロ数を越える。各化合物当たり 1 分子ずつしか含まれていないとしても 500 kg 程度の重さになる。ここまで極端でなくても、アルデヒド、ケトン、カルボン酸、アミン、酸ハロゲン化物などを始めとするビルディングブロックはいずれも 100 種以上が市販されており、容易に数万、数十万のサイズのライブラリは設計可能である。それらをすべて合成しアッセイするのは、スプリット合成法を用いたとしても現実的には容易ではないから、何らかの手段でライブラリメンバーを絞り込むことが必要となる。そこに計算機科学が必要となる。目指すところは「天網恢恢疎にして漏らさず」である。具体的には最少の化合物で最大の molecular diversity すなわち分子の多様性が得られるように設計をする。そうすることで、仮想的に可能な化合物すべてを少数の化合物で代表させるのである。アッセイで活性化化合物が見つければ、その化合物が代表した化合物群を優先的に合成しアッセイすることによって、効率よく活性化化合物にたどり着くことができる。Molecular diversity の評価に基づくライブラリの設計を行うソフトウェアもすでに幾つか市販されている。Selector (Tripos), Jarpot (Daylight Chemical Information Systems; <http://www.daylight.com>), C²-Diversity (Molecular Simulations; <http://www.msi.com>), Chem-X (Chemical Design Ltd.) が代表的なところである。

6. 評価

コンビナトリアルケミストリーと切っても切れない関係にあるのが、高速大量評価法 (High throughput screening: HTS) である。96 穴マイクロタイタープレートの出現により、それまで試験管 1 本ごとに行われていたアッセイが 1 枚のプレート上で行われるようになった。それに合わせて周辺機器が開発・改良され、手動型から自動型ついにはすべての操作を完全自動で行うアッセイロボットが開発された²¹⁾。このロボットの出現によって評価すべき化合物の不足は決定的となった。アッセイ系の効率は何百倍何千倍にもなったのに化合物を供給するほうの効率は、合成にしろ天然物の単離にしろほとんど向上しなかったからである。そういう状況下コンビナトリアルケミストリーが生まれた。最初のころ

は混合物やスプリット合成が主流であったが、HTS で大量の化合物が処理できるので、製薬会社におけるコンビナトリアル合成の主流はパラレル合成に移っている。現在では 96 穴から 384 穴マイクロプレート、さらには 1536/2400/3456 穴のナノプレートを備え 20,000/h の分析能力を持つものも開発されており、ますます効率は向上している。

得られた大量のデータは、これまでの化合物情報システムでは対応できないので、ライブラリ用のシステムが開発されている²⁰⁾。これらは化合物の構造をビルディングブロックの組み合わせで表現することによって、データ量の軽量化と検索時間の短縮を実現しているのが特徴である。また混合物のデータにも対応できるようになっている。

7. ま と め

以上コンビナトリアルケミストリーを合成を軸として解説してきた。ライブラリの合成から評価まで多岐に渡り、それぞれが深く関連しているので分類が必ずしも適当でない部分もあった。すでに記したこともあるが、ここでもう一度主な合成法別の比較を Table 4 に掲げて理解の助けとしたい。

ここに記した方法はそれぞれ一長一短があり、どの方法がベストであると断言することはできない。実際いずれの方法でも活性を示す化合物は見つかっているので、目的によって最適と思われる方法を選べばよい。最も大事なことはライブラリのデザインである。基本骨格はもとより、ビルディングブロックの選択を誤ると、活性を示す化合物が全く得られないという結果に陥る。特にパラレル合成でライブラリメンバーの数を絞り込む場合は注意が必要であり、開発されて間もないライブラリデザイン用のソフトウェアの進歩が重要な鍵を握るのではないと思われる。

今後の課題としては次のようなものが挙げられる。

- 固相合成用反応の開発・確認
- 固相反応のモニタ
- 高収量の固相合成法
- リンカーの開発
- 安価なパラレル合成装置
- ライブラリ設計・評価のソフトウェア（計算機科学）
- ビルディングブロックの開発

Table 4. Characteristics of Combinatorial Synthesis Methods

	Solid phase		Liquid phase	
	Split synthesis		Parallel synthesis	
	Encoded library	Deconvolution	Discrete	
Lead generation	○		○	
Lead optimization	×		○	
Library size	big ($\sim 10^7$)		small	
Type of reaction	less		unlimited	
Diversity	less		unlimited	
Synthetic steps	multistep		few steps	
Amount of compound	0.1 ~ 100 nmol		~ 1 mmol	> 1 mmol
Reaction monitoring	difficult		easy	easy
Automation	easy		easy	difficult
Purification	impossible		after cleavage	each step
Assay	solution or solid few assay	solution few assay	solution many assay	

- ・タグ（エンコード、デコードが容易で迅速かつ汎用性があるもの）の開発
- ・高速大量評価とその情報管理
- ・コストの低減（自動合成機、アッセイロボット、計算機、ソフトウェアなどを揃えるとなるとかなりの出費になる）

何でもコンビナトリアルケミストリーでやってしまおうという過大な期待は失望の原因となるので禁物であるが、コンビナトリアルケミストリーで確実に全体的な研究開発の効率は向上すると期待できる。コンビナトリアルケミストリーは医薬品の研究開発以外にも分子認識や触媒開発などを始めとして、さまざまな分野に応用できる可能性を秘めており、これらの分野への応用も含めて今後の発展が大いに期待できる。

文 献

- 1) M. A. Gallop, R. W. Barrett, W. J. Dower, S. P. A. Fodor, and E. M. Gordon, *J. Med. Chem.*, **37**, 1233 (1994).
- 2) E. M. Gordon, R. W. Barrett, W. J. Dower, S. P. A. Fodor, and M. A. Gallop, *J. Med. Chem.*, **37**, 1385 (1994).
- 3) J. Nielsen, *Chem. Ind.*, 902 (1994).
- 4) G. Lowe, *Chem. Soc. Rev.*, **24**, 309 (1995).
- 5) N. K. Terrett, M. Gardner, D. W. Gordon, R. J. Kobylecki, and J. Steele, *Tetrahedron*, **51**, 8135 (1995).
- 6) S. H. Dewitt and A. W. Czarnik, *Acc. Chem. Res.*, **29**, 114 (1996).
- 7) R. W. Armstrong, A. P. Combs, P. A. Tempest, S. D. Brown, and T. A. Keating, *Acc. Chem. Res.*, **29**, 123 (1996).
- 8) J. A. Ellman, *Acc. Chem. Res.*, **29**, 132 (1996).
- 9) E. M. Gordon, M. A. Gallop, and D. V. Patel, *Acc. Chem. Res.*, **29**, 144 (1996).
- 10) W. C. Still, *Acc. Chem. Res.*, **29**, 155 (1996).
- 11) L. C. Hsieh-Wilson, X. D. Xiang, and P. G. Schultz, *Acc. Chem. Res.*, **29**, 164 (1996).
- 12) R. Baum and S. Borman, *C & EN*, Feb. 12th, pp. 28-54 (1996).
- 13) A. M. Thayer, *C & EN*, Feb. 12th, pp. 57-64 (1996).
- 14) J. H. Krieger, *C & EN*, Feb. 12th, pp. 67-73 (1996).
- 15) 末永俊朗, *ファルマシア*, **32**, 425 (1996).
- 16) 井上佳久, *JCPE Newsletter*, **8**, 11 (1996).
- 17) L. A. Thompson and J. A. Ellman, *Chem. Rev.*, **96**, 555 (1996).
- 18) W. H. Moos, 岡島伸之, *化学*, **51**, 472 (1996).
- 19) N. J. Maeji, 有國, *化学*, **51**, 477 (1996).
- 20) 清水 良, *化学*, **51**, 480 (1996).
- 21) 新宮保彦, 橋本正治, *化学*, **51**, 484 (1996).
- 22) 深瀬浩一, *化学*, **51**, 487 (1996).
- 23) 軒原 清, *化学と生物*, **34**, 610, 670 (1996).
- 24) 深瀬浩一, *化学と生物*, **34**, 752, 823 (1996).
- 25) P. Hermkens, H. Ollehnijm, and D. Rees, *Tetrahedron*, **52**, 4527 (1996).
- 26) F. Balkenhol, C. von dem Bussche-Hünefeld, A. Lansky, and C. Zechel, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **35**, 2288 (1996).
- 27) R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149 (1963).
- 28) H. M. Geysen, R. H. Meleon, and S. J. Barteling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 3998 (1984).
- 29) R. M. Valerio, A. M. Bray, R. A. Chempbell, A. Dipasquale, C. Margellis, S. J. Rodda, H. M. Geysen, and N. J. Maeji, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **42**, 1 (1993).
- 30) H. M. Geysen, S. J. Barteling, and R. H. Meleon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 178 (1985).
- 31) J. M. Middeldorp and R. H. Meleon, *J. Virol. Meth.*, **21**, 147 (1988).
- 32) F. Gombert, W. Blecha, M. Tahtinen, A. Ranki, S. Pfeiffer, W. Troger, R. Braun, N. Muller-Lantzsch, G. Jung, H. Rubsamens-Waigmann, and K. Krohn, *Virology*, **176**, 458 (1990).
- 33) G. Jung and A. G. Beck-Sickinger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **31**, 367 (1992).
- 34) R. A. Houghten, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 5131 (1985).

- 35) S. P. A. Fodor, R. J. Leighton, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, and D. Solas, *Science*, **251**, 767 (1991).
- 36) A. Furka, F. Sebestyen, M. Asgedom, and G. Dibo, Abstracts of Papers, 14th Int. Congr. Biochem., Prague, Czechoslovakia, vol. 5, p. 47 (1988).
- 37) A. Furka, F. Sebestyen, M. Asgedom, and G. Dibo, Abstracts of Papers, 10th Intl. Symp. Med. Chem., Budapest, Hungary, p. 288 (1988).
- 38) A. Furka, F. Sebestyen, M. Asgedom, and G. Dibo, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **37**, 487 (1991).
- 39) K. S. Lamb, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, and R. J. Knapp, *Nature*, **354**, 82 (1991).
- 40) R. A. Houghten, C. Pinilla, S. E. Blondelle, J. R. Appel, C. T. Dooley, and J. H. Cuervo, *Nature*, **354**, 84 (1991).
- 41) M. Lebl, M. Patek, P. Kocis, V. Krchnak, V. J. Hruby, S. E. Salmon, and K. S. Lam, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **41**, 201 (1993).
- 42) S. E. Salmon, K. S. Lam, M. Lebl, A. Kandola, P. S. Khattry, S. Wade, M. Patek, P. Kocis, V. Krchnak, D. Thorpe, and S. Felder, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 11708 (1993).
- 43) P. Kocis, V. Krchnak, and M. Lebl, *Tetrahedron Lett.*, **34**, 7251 (1993).
- 44) J. J. Baldwin, J. J. Burbaum, I. Henderson, and M. H. J. Ohlmeyer, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 5588 (1995).
- 45) J. J. Burbaum, M. H. J. Ohlmeyer, J. C. Reader, I. Henderson, L. W. Dillard, G. Li, T. L. Randle, N. H. Sigal, D. Chelsky, and J. J. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 6027 (1995).
- 46) W. L. Fitch, G. Detre, C. P. Holmes, J. N. Shoolery, and P. A. Keifer, *J. Org. Chem.*, **59**, 7955 (1994).
- 47) P. A. Keifer, *J. Org. Chem.*, **61**, 1558 (1996).
- 48) S. K. Sarkar, R. S. Garigipati, J. L. Adams, and P. A. Keifer, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 2305 (1996).
- 49) B. T. Chait, R. Wong, R. C. Beavis, and S. B. H. Kent, *Science*, **262**, 89 (1993).
- 50) R. S. Youngquist, G. R. Fuentes, M. P. Lacey, and T. Keough, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 3900 (1995).
- 51) R. A. Zambias, D. A. Boulton, and P. R. Griffin, *Tetrahedron Lett.*, **35**, 4283 (1994).
- 52) C. L. Brummel, J. C. Vickerman, S. A. Carr, M. E. Hemling, G. D. Roberts, W. Johnson, J. Weinstock, D. Gaitanopoulos, S. J. Benkovic, and N. Winograd, *Anal. Chem.*, **68**, 237 (1996).
- 53) S. Brenner and R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 5381 (1992).
- 54) J. Nielsen, S. Brenner, and K. D. Janda, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 9812 (1993).
- 55) M. C. Needels, D. G. Jones, E. H. Tate, G. L. Heinkel, L. M. Kochersperger, W. J. Dower, R. W. Barrett, and M. A. Gallop, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 10700 (1993).
- 56) J. M. Kerr, S. C. Banville, and R. N. Zuckermann, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 2529 (1993).
- 57) V. Nikolaiev, A. Stierandova, V. Krchnak, B. Seligmann, K. S. Lam, S. E. Salmon, and M. Lebl, *Peptide Res.*, **6**, 161 (1993).
- 58) E. R. Felder, G. Heizmann, I. T. Matthews, H. Rink, and E. Spieser, *Mol. Diversity*, **1**, 109 (1995).
- 59) M. H. J. Ohlmeyer, R. N. Swanson, L. W. Dillard, J. C. Reader, G. Asouline, R. Kobayashi, M. Wiegler, and W. C. Still, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 10922 (1993).
- 60) H. P. Nestler, P. A. Bartlett, and W. C. Still, *J. Org. Chem.*, **59**, 4723 (1994).
- 61) Z. J. Ni, D. Maclean, C. P. Holmes, M. M. Murphy, B. Ruhland, J. W. Jacobs, E. M. Gordon, and M. A. Gallop, *J. Med. Chem.*, **39**, 1601 (1996).
- 62) B. B. Brown, D. S. Wagner, and H. M. Geysen, *Mol. Diversity*, **1**, 4 (1995).
- 63) K. C. Nicolaou, X. Y. Xiao, Z. Parandoosh, A. Senyei, and M. P. Nova, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **34**, 2289 (1995).
- 64) E. J. Moran, S. Sarshar, J. F. Cargill, M. M. Shahbaz, A. Lio, A. M. M. Mjalli, and R. W. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 10787 (1995).
- 65) R. A. Houghten, J. R. Appel, S. E. Blondelle, J. H. Cuervo, C. T. Dooley, and C. Pinilla, *BioTechniques*, **13**, 412 (1992).
- 66) C. T. Dooley and R. A. Houghten, *Life Sci.*, **52**, 1509 (1993).
- 67) E. Erb, K. D. Janda, and S. Brenner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 11422 (1994).
- 68) M. C. Pirrung and J. Chen, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 1240 (1995).
- 69) M. C. Pirrung, J. H.-L. Chau, and J. Chen, *Chem. Biol.*, **2**, 621 (1995).
- 70) P. W. Smith, J. Y. Q. Lai, A. R. Whittington, B. Cox, and J. G. Houston, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **4**, 2821 (1994).
- 71) B. Dérez, X. Williard, L. Bourel, H. Coste, F. Hyafil, and A. Tartar, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 5405 (1995).
- 72) K. Burgess, A. I. Liaw, and N. Wang, *J. Med. Chem.*, **37**, 2985 (1994).

- 73) P.-L. Zhao, R. Zambias, J. A. Bolognese, D. Boulton, and K. Chapman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 10212 (1995).
- 74) P.-L. Zhao, R. B. Nachbar, J. A. Bolognese, and K. Chapman, *J. Med. Chem.*, **39**, 350 (1996).
- 75) J. A. Boutin and A. L. Fauchère, *Trends in Pharmacol. Sci.*, **17**, 8 (1996).
- 76) G. P. Smith, *Science*, **228**, 1315 (1985).
- 77) S. F. Parmley and G. P. Smith, *Gene*, **73**, 305 (1988).
- 78) S. Cwirla, E. A. Peters, R. W. Barrett, and W. J. Dower, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 6378 (1990).
- 79) J. K. Scott and G. P. Smith, *Science*, **249**, 386 (1990).
- 80) J. J. Devlin, L. C. Panganiban, and P. E. Devlin, *Science*, **249**, 404 (1990).
- 81) R. J. Simon, R. S. Kania, R. N. Zuckermann, V. D. Huebner, D. A. Jewell, S. Banville, S. Ng, L. Wang, S. Rosenberg, C. K. Marlowe, D. C. Spellmeyer, R. Tan, A. D. Frankel, D. V. Santi, F. E. Cohen, and P. A. Bartlett, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 9367 (1992).
- 82) R. N. Zuckermann, E. J. Martin, D. C. Spellmeyer, G. B. Stauber, K. R. Shoemaker, J. M. Kerr, G. M. Figliozzi, D. A. Goff, M. A. Siani, R. J. Simon, S. C. Banville, E. G. Brown, L. Wang, L. S. Richter, and W. H. Moos, *J. Med. Chem.*, **37**, 2678 (1994).
- 83) C. Y. Cho, E. J. Moran, S. R. Cherry, J. C. Stephans, S. P. A. Fodor, C. L. Adams, A. Sundaram, J. W. Jacobs, and P. G. Schultz, *Science*, **261**, 1303 (1993).
- 84) E. J. Moran, T. E. Wilson, C. Y. Cho, S. R. Cherry, and P. G. Schultz, *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **37**, 213 (1995).
- 85) B. A. Bunin and J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 10997 (1992).
- 86) S. H. DeWitt, J. K. Kiely, C. J. Stankovic, M. C. Schroeder, D. M. R. Cody, and M. R. Pavia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 6909 (1993).
- 87) F. Camps, J. Castells, and J. Pi, *Ann. Quim.*, **70**, 848 (1974).
- 88) M. J. Plunkett and J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 3306 (1995).
- 89) M. J. Plunkett and J. A. Ellman, *J. Org. Chem.*, **60**, 6006 (1995).
- 90) C. G. Boojamara, K. M. Burow, and J. A. Ellman, *J. Org. Chem.*, **60**, 5742 (1995).
- 91) D. A. Goff and R. N. Zuckermann, *J. Org. Chem.*, **60**, 5744 (1995).
- 92) G. C. Look, M. M. Murphy, D. A. Campbell, and M. A. Gallop, *Tetrahedron Lett.*, **36**, 2937 (1995).
- 93) M. M. Murphy, J. R. Schullek, E. M. Gordon, and M. A. Gallop, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 7029 (1995).
- 94) C. P. Holmes, J. P. Chinn, G. C. Look, E. M. Gordon, and M. A. Gallop, *J. Org. Chem.*, **60**, 7328 (1995).
- 95) B. Ruhland, A. Bhandari, E. M. Gordon, and M. A. Gallop, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 253 (1996).
- 96) R. W. Armstrong, see ref. 26.
- 97) A. M. Strocker, T. A. Keating, P. A. Tempest, and R. W. Armstrong, *Tetrahedron Lett.*, **37**, 1149 (1996).
- 98) T. A. Keating and R. W. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 2574 (1996).
- 99) S. Kobayashi, M. Araki, H. Ishitani, S. Nagayama, and I. Hachiya, *Synlett*, 233 (1995).
- 100) S. Kobayashi, H. Ishitani, and S. Nagayama, *Chem. Lett.*, 423 (1995).
- 101) S. Kobayashi, H. Ishitani, and S. Nagayama, *Synthesis*, 1195 (1995).
- 102) S. Kobayashi and S. Nagayama, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 8977 (1996).
- 103) R. C. Anderson, J. P. Stokes, and M. J. Shapiro, *Tetrahedron Lett.*, **36**, 5311 (1995).
- 104) G. C. Look, C. P. Holmes, J. P. Chinn, and M. A. Gallop, *J. Org. Chem.*, **59**, 7588 (1994).
- 105) R. C. Anderson, M. A. Jarema, M. J. Shapiro, J. P. Stokes, and M. Ziliox, *J. Org. Chem.*, **60**, 2650 (1995).
- 106) R. S. Garigipati, B. Adams, J. L. Adams, and S. K. Sarkar, *J. Org. Chem.*, **61**, 2911 (1996).
- 107) N. J. Haskins, D. J. Hunter, A. J. Organ, S. S. Rhaman, and C. Thom, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **9**, 1473 (1995).
- 108) B. Yan and G. Kumaravel, *Tetrahedron*, **52**, 843 (1996).
- 109) B. Yan, G. Kumaravel, H. Anjaria, A. Wu, R. C. Petter, C. F. Jewell, and J. R. Wareing, *J. Org. Chem.*, **60**, 5736 (1995).

Keywords

Combinatorial chemistry
 Combinatorial library
 Combinatorial synthesis
 Solid phase synthesis
 Molecular diversity