

**KOMBİNATORİYAL (BÜTÜNLEŞTİRİCİ) KİMYA, KOMBİNATORİYAL
SENTEZ YÖNTEM ve TEKNOLOJİLERİ, KOMBİNATORİYAL
KÜTÜPHANELER VE YÜKSEK HIZDA AKTİVİTE TARAMA (YHAT)**

COMBINATORIAL CHEMISTRY, COMBINATORIAL SYNTHESIS METHODS
AND TECHNOLOGIES, COMBINATORIAL LIBRARIES AND HIGH
THROUGHPUT SCREENING (HTS)

Yasemin G. İŞGÖR, Serap YILMAZ and Süreyya ÖLGEN*

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı
06100 Tandoğan, ANKARA-TÜRKİYE

ÖZET

Kombinatoryal (bütünleştirici) kimya yeni kimyasal moleküllerin keşfi ve tasarımı için önemli bir araç haline gelmiştir. Bu teknik, çok sayıda farklı moleküllerin eş zamanlı olarak üretilmesini sağlar. Birçok ilaç endüstrisi kombinatoryal kimyayı ilaç tarama ve öncü bileşiğin optimizasyonunu sağlamada ve organik molekül kütüphanelerinin oluşturulmasında kullanır. Bu makale kombinatoryal kimyanın tanımlanması, kombinatoryal kütüphanelerin oluşturulması, katı, sıvı ve çözelti faz sentezleri, sentez teknolojileri, farmasötik ve biyoteknolojik araştırmada ve çoğu kez de kombinatoryal kimya uygulamalarını tamamlayıcı olarak kullanılan Yüksek Hızda Aktivite Tarama (YHAT; High Throughput Screening (HTS)) yöntemine genel bir bakış içermektedir.

Anahtar kelimeler: *Kombinatoryal kimya, katı faz sentezleri, sentez teknolojileri, kombinatoryal kütüphaneler, yüksek hızda aktivite tarama.*

ABSTRACT

Combinatorial chemistry has become an important tool for design and discovery of novel chemical molecules. This technique allows for the production of large numbers of different molecules simultaneously. Most pharmaceutical industries use combinatorial chemistry to create libraries of organic molecules for drug screening and lead optimisation. This review takes a look at the determination of combinatorial chemistry, generating of combinatorial libraries, solid, liquid and solution phase synthesis, synthesis technologies and High Throughput Screening (HTS) methodology which is used in pharmaceutical and biotechnological research and mostly as a complementary to the combinatorial chemistry applications.

Key words: *Combinatorial chemistry, solid phase synthesis, synthesis technologies, combinatorial libraries, high throughput screening.*

* olgen@pharmacy.ankara.edu.tr. Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, 06100, Tandoğan-Ankara, TÜRKİYE.

GİRİŞ

Kombinatoryal kimya, yapısal farklılıklar gösteren çok sayıda molekülün aynı anda sentezine olanak tanıyan tekniklerin genel adıdır. Farmasötik endüstri ve akademik araştırmacılar tarafından geliştirilen, etkili ve rekabetçi yeni ilaçların üretiminde zaman ve maliyeti azaltan yöntemlerden birisi haline gelen bu yeni teknik, aynı koşullar altında, aynı yöntemlerle ve aynı kap içerisinde bir dizi analog serinin sentezlenmesi olarak tanımlanır. Bu teknikteki gelişmeler sayesinde bugün yüzlerce, hatta yüzbinleri bulan moleküller (1) aynı anda sentezlenebilmektedir.

1990'dan günümüze kadar olan dönem içerisinde farmasötik endüstride görülen ana değişim süreci, araştırma ve geliştirmede olduğu kadar ticari amaçlı uygulamalarda da avantaj sağlayacak yönde olmuştur. Bu döneme damgasını vuran kombinatoryal kimya (2) ve yüksek hızda aktivite tarama (YHAT) (3) gibi yeni teknoloji ve yöntemler oldukça benimsenmiş ve olabilecek en yüksek seviyede birbirine paralel olarak gelişme göstermiştir. Son yıllarda farmasötik endüstri destekli ilaç keşif programlarında kombinatoryal kimya yöntemleri etkin bir şekilde kullanılmaktadır (1). Robot destekli ortamda, otomasyona dayalı, minyatürleştirilmiş (küçük ölçeklendirilmiş) analiz protokollerinin kullanılması ile binlerce molekülü aynı anda test edecek kapasiteye ulaşılması yanında molekül sayısı ve çeşitliliğindeki artışa duyulan acil ihtiyaca cevap olarak kombinatoryal kimya tekniklerinde evrimsel bir ilerleme kaydedilmiştir (4).

Literatürde halen gelişim sürecini tamamlamamış olan kombinatoryal kimyayı tanımlayan farklı terimler, bu alanda hayli çeşitlilik gösteren molekül kütüphanelerinin oluşturulmasında kullanılan tekniğe dayalı adlarla anılmasından kaynaklanmaktadır (5). Bu yaklaşımla ortaya çıkan terminoloji karmaşası aslında kombinatoryal kimya alanında kullanılan tekniklerin de sınıflandırılmalarına olanak tanımıştır. İlgili yerlerde kullanımlarında uyum ve tutarlılık olması için kombinatoryal kimyada kullanılan terimleri içeren sözlük ise 1999 yılında IUPAC tarafından yayınlanmıştır. Günümüzde kabul gören genel tanımı itibariyle kombinatoryal kimya birçok metod ve teknolojilerin birarada kullanılması ile kısa sürede çok sayıda ve çok çeşitlilik gösteren kimyasal moleküllerin oluşturulması, birbiriyle tepkimeye girebilecek eğilimdeki kimyasal yapıların olası ve mümkün olan tüm kombinasyonlarla biraraya getirilmesi tekniğidir (6).

Kombinatorial kimya uygulamalarında kimyasal molekül kütüphanelerini oluşturma yöntemi genellikle proje gereklerine ve amaca yönelik olarak değişiklik göstermektedir. Dolayısıyla molekül kütüphaneleri oluşturulurken kullanılan sentez metodları katı, sıvı ve çözelti faz sentezleri şeklinde olabilir. Bu kapsamda sentez işlevini daha açıkça vurgulamak amacıyla adı geçen metodların hepsine birden, *kombinatorial kimya* teriminden farklı olarak, *kombinatorial sentez* metodları denilmektedir (7,8). Bileşiklerin keşfinde ve sınıflandırılmalarında önemli ilerlemeler kaydedilmesini sağlayan kombinatorial sentez metodları ise günümüzde birçok endüstri ve akademik araştırma grubu tarafından etkin olarak kullanılmakta ve geliştirilmektedir (9,10).

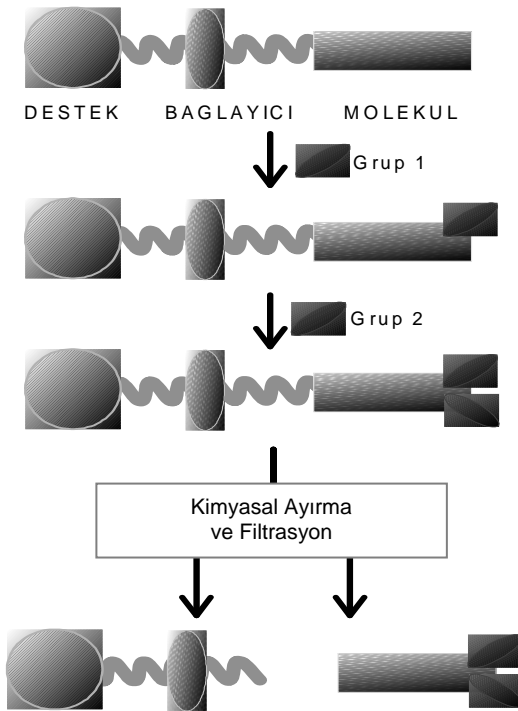
1980'li yıllarda hız kazanan ve on yıllık bir döneme dağılmış olan çalışmalarda kombinatorial sentez uygulamaları katı desteklerin kullanıldığı iğne (pin) teknolojisi, böl-birleştir (split-pool ya da split-mix), poşetleme (tea-bag), aktif tanecik fiziksel ayırım (physical isolation of active beads) yöntemleri gibi teknik farklılıklarına göre adlandırılmışlardır (11). İlk kombinatorial sentez kütüphane ve koleksiyon çalışması ise 1980'li yılların başında katı destekler üzerinde katı faz yöntemleri kullanılarak çok sayıda kimyasal peptid sentez çalışmasının gerçekleşmesiyle mümkün olmuştur (12). Temel olarak katı faz desteklerinin kullanıldığı ve yukarıda bahsedilen yöntemlere ek olarak 90'lı yılların sonunda, sıvı faz sentez yöntemi ürün çeşitliliği ve endüstriyel uygulamalarda otomasyona yatkınlıkları olması nedeniyle alternatif bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır (13). Sıvı faz yöntemi, eski yöntemlerin yeni bir yaklaşımla kullanılarak tamamen fiziksel özelliklere dayalı ayırmsal tekniklerle ürünün sıvı fazda oluşturulması ve saflaştırılması prensibine dayalı olarak geliştirilmiştir. Ancak uygulama ve kullanım zorlukları sebebiyle halen katı faz uygulamaları daha tercih edilen bir seçenek olarak görülmektedir. Dolayısıyla bugüne kadar oluşturulan kombinatorial kütüphanelerin çok büyük bir bölümü katı faz organik sentez yöntemlerinin kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir.

Kombinatorial Katı Faz Organik (KFOS) Sentez Yöntemleri

Katı faz organik sentez (KFOS) yöntemi ilk kez 1963 yılında Merrifield'in peptid sentezini katı faz desteklere bağlayarak gerçekleştirmesiyle yeni bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır (9). Merrifield'in bu tekniği temel alınarak oligopeptid ve

oligonükleotidlerin çok hızlı bir şekilde sentezlenmesi mümkün olmuş, daha sonrasında da bu teknik standart bir yöntem haline gelmiştir (14). KFOS, Merrifield'in başlattığı ve Houghten'ın geliştirdiği poşetleme ve böl-birleştir yöntemlerini kapsayan, hedef ürünü katı bir destek üzerinde oluşturma yönteminin genel adı olarak tanımlanabilir (10).

KFOS yöntemi temel olarak katı destek, birleştirici eleman (bağlayıcı) ve buna bağlanmış olan molekül (başlangıç molekülü ya da ürün) unsurlarını içeren bir sistemden oluşur (Şekil 1). Bu yöntem diğer geleneksel sentez yöntemleriyle



Şekil 1: KFOS metodunu oluşturan temel unsurlar ve metodun şematik gösterimi

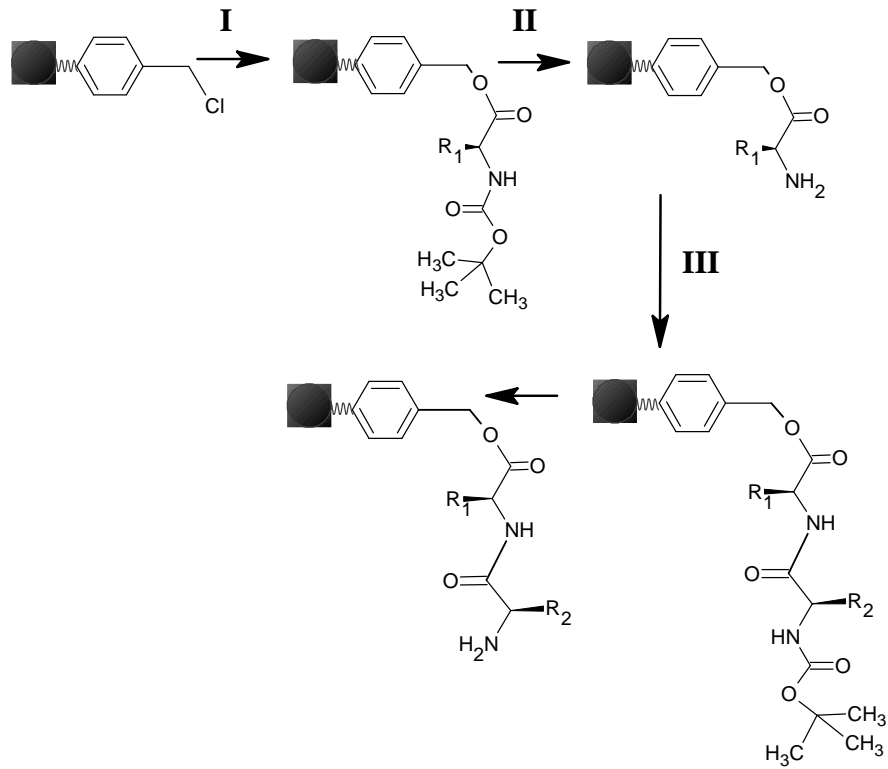
ara ürünlerin izolasyon ya da saflaştırılmasına gerek duyulmaması 5) Tepkime işleyişinin ve otomasyonunun kolay olması (12-14).

Poşetleme yönteminde poşet adı verilen küçük polipropilen malzemeden yapılmış geçirgen kaplar içerisinde peptid zincirlerini oluşturacak terminal aminoasitlerin bağlı olduğu küçük katı destekler (resin ya da reçine) bulunur (4). Bu yöntemde kullanılan sentez işlemi hücresel protein sentezinin tam tersi yönünde gelişir (Şekil 2). Kısaca özetlenirse, hedeflenen peptid zincirinin terminal amino asidi karboksil grubundan katı desteğe bağlanır, daha sonra zincirde olması gereken bir sonraki

karşılaştırıldığında sahip olduğu avantajlar arasında ürün verim ve çeşitliliğini olumlu etkileyen aşağıdaki özellikler sayılabilir.

- 1) Tepkime hızını sınırlanmaksızın daha fazla reaktif kullanımının mümkün olması ve bu yolla ürünün kantitatif olarak artması, 2) Ürünün basit yöntemler ile (filtrasyon, yıkama v.s.) ortamdan kolayca uzaklaştırılması ve saflaştırılması, 3) Sentez aşamalarında duyulan ihtiyaca göre koruyucu grupların kullanılmasına imkan tanınması ve bu yolla kalitatif ve kantitatif olarak ürün verim ve çeşitliliğinin artması, 4) Çok aşamalı sentezlerde

amino asit desteğe bağlı olan amino asite bağlanır. Zincirin hızlı büyümesi ve amino asit yan zincirleri üzerinde tepkime olmasını önlemek amacıyla, eklenen amino asidin amin ve varsa diğer reaktif grubu koruyucu gruplarla bağlanır, yani bloke edilir (Şekil 2). Bağlanma basamağında (I) sonra amino grubundan koruyucu blok kaldırılır (II) ve bir sonraki amino asitle tepkime tekrarlanır (III). Bu aşamalar hedeflenen peptid/protein zinciri tamamlanana kadar devam eder. Daha sonra bu zincir katı destekten ayrılır ve zincirdeki tüm koruyucu gruplar kaldırılır. Son aşamada ise peptid ürünü uygun bir yöntemle saflaştırılarak hatalı, istenmeyen yan ürünler ile artık ve atık maddeler ortamdaki uzaklaştırılır (10).

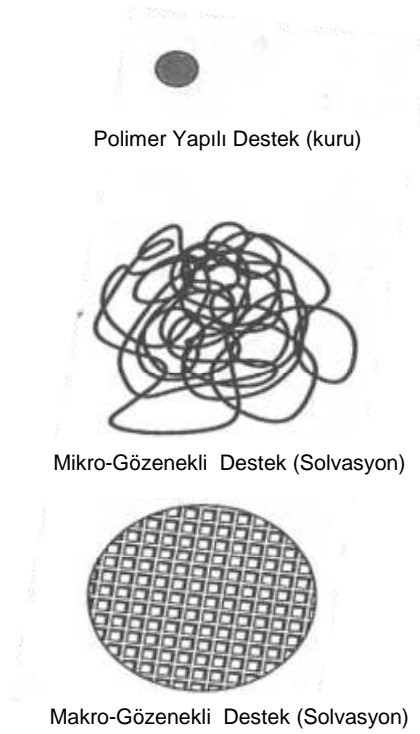


Şekil 2 : Merrifield'in katı destek üzerinde peptid sentezi.

Böl-birleştir yönteminde ise katı destek fiziksel olarak eşit parçalara bölünür ve her bir parçaya farklı başlangıç molekülü, mesela bir amino asit, bağlanır. Eşit miktarlarda olmak şartıyla farklı aktif amino asitler içeren tepkime kabına katı destek daldırılır. Hem koruyucu grupların eklenmesi ve ayrılması, hemde yıkama işlemleri tek kaplı sistemle gerçekleştirilir. Bu yöntem sonuç olarak eşit miktarlarda, olası ve farklı tüm kombinasyon ürünlerinin oluşumuna olanak tanır (15). Poşetleme ve böl-

birleştir yöntemleri beraber kullanılarak ürün çeşitliliğini artırmak mümkündür. Bu tip uygulama da ise öncelikle poşet yöntemi uygulanır ve daha sonra böl-birleştir yöntemi ile tek kaplı sistem içerisinde senteze devam edilir (4).

KFOS Uygulamalarında Katı Destekler ve Bağlayıcılar



Şekil 3: Mikro (jel tipi) ve makro gözenekli desteklerin solvasyon ile genişlemelerinin büyütülmüş gösterimi.

KFOS yönteminin başarısı için katı desteklerin bazı minimum kriterleri sağlayan bir malzemeden seçilmiş olması gereklidir. Özellikle sentez şartlarında ve çok farklı solventlerle tepkime vermeyen kararlılıkta (inert), çözünmez, çapraz bağlı polimerik bir malzemeden yapılmış olan, değişik tepkime şartlarında ve değişen sıcaklıklarda stabilesini koruyabilen malzemeler katı destek olarak seçilirler (Şekil 3). Aynı şekilde katı desteğin bir moleküle (substrat) bağlanmasını sağlayan birleştirici grubun da (linker) substrata seçici olarak bağlanabilmesi ve istenildiğinde katı destekten, üründen ya da her ikisinden de seçici olarak ayrılabilmesi, koruyucu grupların eklenmesi ve kaldırılması aşamalarında inert olabilmesi gereklidir (16). Bağlayıcı olarak adlandırılan yapılar çok çeşitli kimyasal moleküller olup bir

sentezin başlangıç molekülünü seçici olarak bağlamak, bu molekül ile katı destek arasında uygun bir boşluk yaratarak kimyasal tepkimenin en uygun koşullarda (difüzyon hızına etkiyerek) gerçekleşmesine yardımcı olmak ve oluşan ürünün destekten ayrılmasında kolaylık sağlamak gibi KFOS uygulamalarında avantajlar yaratırlar. Burada kullanılan katı destek bağlayıcıları, molekülün sadece bir tarafından desteğe sabitlenip, fonksiyonel özellik kazandırılacak bölümünün serbest bırakılmasıyla, bir tür koruyucu grup rolü de oynarlar. KFOS uygulamalarında kullanılan katı desteğin kimyasal ve fiziksel özellikleri sentez tepkime hızına direkt etkidiği için oldukça önemlidir. Reajanların ve ürünlerin destek kalıbına girme ve bundan ayrılmasıyla belirlenen difüzyon hızı, desteği oluşturan partikül ve gözenek

boyutu, desteği oluşturan malzemenin solvasyon etkileri gibi değişkenlere de bağlıdır (17). Yapılan alışmalar destek yapısının değişen partikül boyutlarında olmasının ortamdaki büyük partiküllerin difüzyon hızını sınırladığını ortaya koymuştur. Düşük oranda çapraz bağlara sahip polisitiren gibi destek malzemeleri çok gözenekli bir doku ve böylece çok sayıda aktif tepkime alanı yarattıklarından mikro gözenekli destek malzemeleri olarak adlandırılırlar. Bu malzemeler solvasyon ile katı hacimlerinin 2-3 katına çıkabilirler (şekil 3) .

Günümüzde kombinatorial sentez uygulamalarında genel olarak kullanılan mikro ve makro gözenekli destekler arasında:

- Selüloz tabanlı destekler,
- Gözenek kontrollü cam,
- Çapraz bağlı etoksilat akrilat reçineler,
- Polietilen yamalı kompozit malzeme bazlı destekler,
- Kieselguhr-poliakrilamid kompozit destekler,
- Merrifield reçine desteği,
- Polietilen glikol-poliakrilamid kompozit (PEGA) desteği,
- Polietilen glikol-polistiren (POEPS) ve polietilen glikol-polioksipropilen (POEPOP),
- Polistiren yamalı polietilen glikol desteği,
- Polistiren-poliakrilamid kompozit desteği, ve
- Silika jel ve diğer silika bazlı destekler

sayılabilir (1, 18). Tablo 1’de yaygın kullanımı olan polisitiren ve poliamid bazlı destekler ile bunların bağlayıcı fonksiyonel grupları verilmiştir. Bu desteklerden Tentajel ve Sheppard’ın poliamid desteği polar katı destekler olarak bilinmekle beraber peptid olmayan organik moleküllerin sentezinde tercih edilmektedirler (2).

Katı faz sentezleri için kullanılan destekler genellikle polistiren bazlıdır. Bunlardan en çok tercih edileni ise hem bağlayıcı ve hem de substratın bağlanması için verecek fonksiyona sahip, jel şeklindeki polistirenin (% 1-2 divinilbenzen) kısmi çapraz bağ yaparak oluşturduğu küresel tanecikler, ve poli(sitiren-oksietilen) ortak polimerleridir (kopolimer) (2).

Tablo 1: Katı faz organik sentezlerinde kullanılan genel katı destekler

Destek Yapısı	Ticari isim	Bağlayıcı	Açıklama	Yapı
Polistiren/ divinilbenzen	Merrifield reçinesi	Karboksimetil grup (Asit ile kararsız)	Karboksilik asit bağlayıcısı	
Hidroksimetil polistiren/ divinilbenzen	Wang veya Sasrin reçinesi	X=H Wang bağlayıcı X=OMe Sasrin bağlayıcı (Asit ile kararsız)	Karboksilik asit bağlayıcısı	
Polistiren-poli (etilen glikol)	TentaGel Argojel		X= -OH, -NH ₂ Tentajel, n ≈70 Argojel, n≈30-40	
Polistiren/ divinilbenzen	Sieber	9-ksantaniil bağlayıcısı (Asit ile kararsız)	Karboksamid bağlayıcısı	
Polistiren/ divinilbenzen	Veber reçinesi	Silil bağlayıcı (Kalıntısız)	C-C veya C-H bağlarından yarılma sağlar.	
Polistiren/ divinilbenzen	Kenner reçinesi	Sülfonamid bağlayıcısı	İlımlı koşullar altında ayırım sağlar	
Poliamid	Sheppard reçinesi		Çok polar. DMF ve H ₂ O'da şişer.	

Düşük sayıda çapraz bağlar yapan kısmi çapraz bağlı ve genellikle jel şeklindeki polistiren destek (JPD) malzemeleri, kolay bulunabilmesi ve ekonomik olması sebebiyle çok tercih edilen katı desteklerdendir. Seçici bağlanma ve solvan etkisinin artırılması amacıyla çeşitli bağlayıcılara fonksiyon kazandırılarak kullanılırlar. Bu malzemeyi oluşturan tanecikler çok farklı organik çözüciyi yüksek oranda absorblayarak şişme yeteneğindedirler. Solvan etkisi de denen bu durumda, jel yapıyı oluşturan tanecikler çözücü ile etkileşerek kuru hacimlerinin bir kaç katına

ulaşacak şekilde kabarırlar ve şişkin görüntü oluştururlar. Bu şişme sonucunda tanecikler katı fazdan çözücü ile şişmiş jel fazına geçerler ve üzerlerindeki aktif gruplar difüzyon yoluyla çözücü içerisindeki diğer aktif rejanlara ulaşılmasına olanak sağlarlar. JPD için en uygun çözücü düşük ve orta polaritedeki çözücülerdir (19). Peptid sentezi için ise polar, aprotik solvanlar (DMF, N-metil pirolidon) tercih edilir. Jel polistiren destekler arasında özellikle poli(stiren-oksietilen) ortak polimer, taneciklerinin sudan toluene kadar çok değişen polaritedeki çözücülerle genleşme göstermesi nedeniyle çok tercih edilen bir destek materyalidir (15). Ancak bu ortak polimer desteğin de uygulamalar esnasında bazı dezavantajları olduğu ortaya çıkmıştır. JPD'lere kıyasla bağlayıcı olarak daha az fonksiyonel grup taşıyor olması, polietilen glikol iskeletinin Lewis asitleriyle kompleks oluşturabilmesi, dayanıksız bir polimer olması ve üründen ayrılmasının zorluğu uygulamalarda problem oluşturmaktadır (20). Polistiren bazlı destekler farklı ortak polimerler oluşturularak zenginleştirilmiş, böylece uygulamada karşılaşılan zorluklar aşılmaya çalışılmıştır. Poliakrilamid reçinelerin fonksiyonlarına benzer şekilde, polar bir tepkime çevresinde kullanılacak polimerler hazırlamak için, polietilen glikol içeren Tentajel çapraz bağlı polistirene eter bağıyla bağlanmıştır. Bu şekilde polietilen glikol desteğinin çözünürlük yeteneğiyle, polistiren taneciklerinin çözünmezlik özelliği birleştirilmiştir. Diğer taraftan Sheppard peptid zincirinin özelliklerine yakın, çözünme ve şişme özellikleri gelişmiş poliakrilamid polimerler geliştirmiştir. Burada Merrifield'in kullandığı *t*-bütoksikarbonil (Boc) grup ile benzil ester bağlama esasına dayalı polimerler yerine daha ılımlı bir koruyucu grup olan ve bazla (genellikle piperidin) ayrılabilen Fmoc (fluorenilmetoksikarbonil) sistemine dayalı polimerler geliştirilmiştir (21).

Kombinatoryal Sıvı Faz Organik Sentez (SFOS) Yöntemleri

Kombinatoryal kimya uygulamalarının ilk gelişmeye başladığı yıllarda, özellikle de 1960-1980 yılları arasında, sıvı faz organik sentez yöntemleri teknik şartlardaki yetersizlikler ve katı faz yöntemlerinin kombinatoryal sentez uygulamaları için daha kolay olması sebebiyle gereken ilgiyi uzun yıllar görmemiştir. Klasik organik kimya sentez yöntemlerinin minyatürleştirilerek kombinatoryal sıvı faz organik sentez (SFOS) yöntemine dönüşümü ile, sentezlenmiş ve otomasyona geçilerek çok sayıda maddenin saflaştırılma sürecinin doğurduğu ağır çalışma şartları ortadan kaldırılmıştır (22).

Klasik anlamıyla organik sentez, sıvı faz içinde gerçekleşen tepkimelerde, ürün ve ara ürünlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre ortamdan uzaklaştırılmalarını ve bu yapıların analizlerini kapsayan deneysel aşamaların bütünüdür. Sentez çok basamaklı olduğunda bile her basamakta oluşan ürünler izole edilir, saflaştırılır ve tanımlanır. Ancak bu işlemler sonucunda hedeflenen organik molekül sentezinde başarılı olunursa bir sonraki basamağa geçilebilir. Geleneksel organik sentez yöntemlerinden yola çıkılarak geliştirilen SFOS yöntemi, geleneksel yöntemlerin küçük ölçeklendirilmesiyle (minyatürleştirilme) zaman, ekonomi ve iş gücü tasarrufu sağlayan, ürün izolasyonu, saflaştırılması ve analizinde pratik uygulamaların geliştirilmesine olanak sağlayan bir yöntem olup, miktarca az ancak sayı ve çeşitlilik açısından zengin ürünlerin oldukça çabuk sentezlenmesini mümkün hale getirmiştir (23).

Prensip olarak ele alındığında her tepkimenin SFOS uygulamaları kapsamında etkin bir şekilde kullanımı mümkün olabilir, ancak pratikte bu tepkimelerin SFOS'a adaptasyonu bir çok problemi de beraberinde getirir. Bu problemler arasında tepkime gidişatının kontrolündeki zorluklar, standartların minyatürizasyon problemleri, çok aşamalı sentezlerin ara basamaklarında oluşan artık ve atık kimyasalların ortamdan uzaklaştırılmasındaki güçlükler sayılabilir. SFOS'a adaptasyonda önemli olan ürün aktivite ve kalitesinin korunması için iyi bir planlama ve kontrollü deneylerle olası problemlerin çözümlenmesidir. Normal şartlarda KFOS'a uyumlu bir sentez protokolünün SFOS'a uyumunda ciddi sorunların ortaya çıkması beklenen bir şeydir. Sıvı fazda yürütülen geleneksel organik sentez protokollerinden farklı olarak SFOS uygulamasında en kritik nokta, ortamdaki fazla ve sınırlayıcı maddelerin tepkime

gidişatına etkilememesini sağlamaktır. Geleneksel ve yüksek hacimli çalışmalarda bu kontrol kolayca sağlanırken, minyatür ve otomasyona uyumlu bir protokolda ortamdaki tepkime gidişatına etkiyen atık ve artık madde miktarlarının kontrolü zordur. Bu aşamada KFOS uygulamalarındaki tecrübelerle geliştirilmiş olan çöpçü polimerler ve polimer-bağlı kimyasalların kullanımı ile artık ve atıkların ortamdaki basit bir filtrasyonla uzaklaştırılması ve tepkime gidişatının kontrolü sağlanabilir. Çöpçü polimer olarak adlandırılan sentetik reçineler ihtiyaca göre seçici ve aktif bir fonksiyonel grup bağlanarak oluşturulurlar. Böylece tepkime başlangıcında tepkimeyi ileri yöne sürüklemek amacıyla ortama fazlaca verilmiş olan maddeler daha sonra ortama verilen bu çöpçü polimerlerle seçici etkileşime girerek katı faza geçirilirler. Katı polimerlere bağlı olarak ortamdaki basit bir filtrasyonla uzaklaştırılmalarıyla tepkime hızı ve ürün kalitesi de korunmuş olur (22).

Başlangıç maddelerinin katı bir desteğe bağlanması, ortama daha sonra seçiciliği yüksek çöpçü polimerlerin verilmesi yerine kullanılacak diğer bir tekniktir. Bu teknikte başlangıçta kullanılan polimer-bağlı maddeler solvana bağlı olarak ya çözünecek ya da çökecektir. Ancak zaman ve ekonomi dengesi açısından başlangıç maddesinin desteğe bağlanması, ya da bu maddelere seçici bağlanacak çöpçülerin oluşturulması tercih edilmeyebilir. Bütün bu tekniklere alternatif olarak seçici çözünürlük özelliğine dayalı florlanmış başlangıç maddelerinin kullanılması da mümkündür. Florlu solvanların organik solvanların çoğuyla karışmazlık özelliği olması temeline dayanan bu yaklaşımda, florlanmış başlangıç ürünleri tepkimede kullanılan florlanmış solvan sisteminde çözünür haldedir. Oluşan ürün florlanmış grupları içermediğinden basit bir sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile fazla olan florlu maddeler ortamdaki uzaklaştırılır. Ürün kalitesini artırmak amacıyla bu seçeneklerden hangisinin SFOS uygulamalarında kullanılacağı, zaman ve ekonomi dengesinden çok tepkime ve ürün kimyası göz önüne alınarak belirlenmektedir (24).

SFOS'da, ortamdaki artık maddelere ek olarak, tepkimelerin devam ettiği sıvı faza hem koruyucu grupların hem de ara ve son ürünlerin salınması, bu fazın kimyasal ve fiziksel özelliğini değiştireceğinden, bir sonraki basamağın tepkime ya da saflaştırma şartlarını olumsuz yönde etkileyebilir. Bu tip problemler ise preparatif HPLC gibi uygulamalarla ortadan kaldırılmaya çalışılmaktadır (25).

Molekül çeşitliliğinin artırılmasında en önemli rol, koruyucu grupların etkin kullanımından geçmektedir. Ancak bu grupların işlevini tamamladıktan sonra ortama salınması sonucunda, özellikle “boc” gibi grup kullanıldığı durumlarda, ortamda uçucu madde miktarında artışa neden olmaktadır. Eğer fazın uçuculuğunda ve akışkanlığında değişme olursa, bu durumda sıvıların transferinde kullanılan otomatik sıvı dağıtım sistemlerinin kullanımında da problemler ortaya çıkar. SFOS için uygulama sınırlaması getiren en kritik aletsel problemlerden birisi ise, küçük miktarlardaki madde dağıtımını sağlayan otomatik sıvı dağıtım sistemlerinin uçuculuk ve yoğunluk değişimine bağlı olarak hassas madde dağıtımını esnasında ciddi hatalar yapmasıdır. Çok aşamalı SFOS uygulamalarında doğru bir yaklaşım ve uygun bir planlama yoluyla sıcaklık (20-150°C) ve solvan etkilerinin kontrolü sağlanabilir. Uçuculuğu daha düşük solvanların kullanımı, tepkimede oluşan su buharının yoğunlaşması ve sıvı faz uçuculuğunun sıcaklık kontrolü bu problemlerin aşılmasına yardımcı olmaktadır (26). Bu yolla artık ve atık madde miktarının kontrolü ve bunun sonucunda da tepkime gidişatının kontrolü mümkün hale gelmektedir. Çok aşamalı SFOS uygulamalarında ürünün kantitatif ve kalitatif olarak eldesi temelde bu kontrollerin etkinleştirilmesine bağlıdır. Zaman içerisinde farklı tekniklerin birleştirilmesiyle, KFOS’e kıyasla SFOS yönteminin otomasyon uygulamalarında daha tercih edilen bir yöntem olacağını söylemek mümkündür. Uzun yıllar uygulamada olan ve bu yüzden avantaj ve dezavantajları daha iyi bilinen KFOS yöntemine kıyasla daha az tanınan SFOS uygulamalarının son yıllarda yoğun ilgi görmesinin pek çok sebebi vardır. Bunlar arasında klasik sentez yöntemleriyle elde edilen veri ve bilgilerin direkt kullanılabilirliği, yeni ve geleneksel yöntemlerin birleştirilmesine daha yatkın olması, çeşitlilik açısından daha zengin ürünler sunması, KFOS uygulamaları sırasında geliştirilen tekniklerin de kullanılmasına olanak

sağlaması ve özellikle de son yıllardaki gelişmeler çerçevesinde ürünlerin aktifliğinin taranması için kullanılan YHAT yöntemlerine daha uyumlu hale getirilebilmesi sayılabilir. Tüm bunlara ek olarak geleneksel analitik test ve kontrollerin uygulanabilirliği de SFOS yöntemini cazip bir seçenek haline getirmiştir (27).

Kombinatoryal Sentez Teknolojileri ve Kombinatoryal Kütüphanelerin

Oluşturulması

Kombinatoryal kütüphaneler, farklı tekniklerin bir araya getirilmesiyle sentezlenmiş, sayı ve çeşitlilik açısından zenginlik gösteren moleküllerden oluşturulmuştur. Yaklaşık iki yüz ve üzeri sayıdaki molekülleri içeren her bir molekül seti uygun bir çözücü içerisinde mikropalakalara yüklenir. Hem kimyasal bilgi hem de molekül olarak depolanmaları sebebiyle bu setlere kombinatoryal kütüphaneler adı verilmiştir. Burada moleküller, kimyasal ve fiziksel özelliklerini kapsayan bilgilerle beraber analize hazır olarak depolanır. Bilgi ve verilerin depolanmasında çeşitli yöntemler kullanılabilir. Genellikle moleküller ile ilgili veriler genişletilebilir işaretleme dili (XML-extensible markup language) ile depolanır ve istenilen zamanda bu verilere kolaylıkla ulaşılabilir (28).

1970-1980 yılları arasında KFOS peptid kütüphaneleriyle başlayan kombinatoryal molekül kütüphaneleri oluşturma yaklaşımı, günümüzde KFOS ve SFOS uygulamalarıyla farklı moleküllerinde sentezlenip depolandığı bir bilgi ve molekül kütüphanesine dönüşmüştür. Kombinatoryal kütüphanelerin tasarlanmasındaki asıl amaç kütüphanedeki çeşitliliği azaltmadan diğer birçok molekülü eleyerek istenilen molekülün sentezlenmesini sağlamaktır. Bu yaklaşımda benzer yapıdaki moleküller elenerek daha az molekül test edildiğinden, potansiyel öncü moleküller daha hızlı bulunabilir. Özellikle yeni ilaç keşfindeki yarış da farmasötik endüstri tarafından ilgi

gören kombinatoriyal kütüphaneler akademik çevrelerce de yeni ilaç ön ve iz moleküllerin bulunmasında kullanılmaktadır (29).

Milyonları bulan moleküllerden oluşan bu kütüphanelerin hazırlanmasında yukarıda sözü edilen tüm yöntemlerden faydalanılır ve bu kütüphaneler bilinen farmakolojik etkiden sorumlu (farmakofor) elementler çerçevesinde geliştirilir (30). 2005 yılında her araştırma grubuna hizmet veren NCCG araştırma merkezi'nin (National Center for Chemical Genomics, ABD) kurulmasıyla ilgili kütüphanelerin analizi endüstriden bağımsız olarak, devlet ve akademik araştırmacıların kontrolünde, ve sonuçlarının halka açık veri bankalarında (PUBMED) saklanması mümkün olmuş ve kombinatoriyal kütüphaneler ve analizleri konusundaki çalışmalara verilen destek artırılmıştır. Bu merkez ve Amerikan Ulusal Küçük Molekül Kütüphaneleri (Molecular Library Screening Centers Network, MLSCN) Tarama Ağı'nda bulunan çok sayıdaki molekül ve analizleriyle ilgili bilgilerin depolandığı verilere ücretsiz erişim sağlanmıştır. Böylece biyolojik ve moleküler hedefle ilişkili diğer analizleri içeren yeni analogların ve moleküllerin sentezi için gerekli ön bilgilerin sağlanması ve paylaşılması kolaylaşmıştır.

Kombinatoriyal Paralel Sentez Teknolojileri

Bütünleştirici kimya yeni kimyasal moleküllerin tasarımı ve keşfi için önemli bir araç haline gelmektedir ve bunun temeli bir dizi analog serinin aynı tepkime koşulları altında sentezlenmesine dayanır (31). Bu teknikde başlangıç ve tepkimede sırasında ortama verilen birim elemanlardan kombinasyon ve permutasyon olasılarla birçok farklı molekülün üretilmesi söz konusudur (Şekil 4). Genel olarak paralel ve böl-birleştir teknikleri olarak iki ana grupta incelenen sentez teknikleri, teknolojik uygulamalar açısından proje ihtiyaçlarına bağlı olarak farklılıklar gösterebilir. Bu durum teknolojik olarak kombinatoriyal sentezin çok farklı sistem ve parametrelerin biraraya getirilmesinden kaynaklanmaktadır (32).

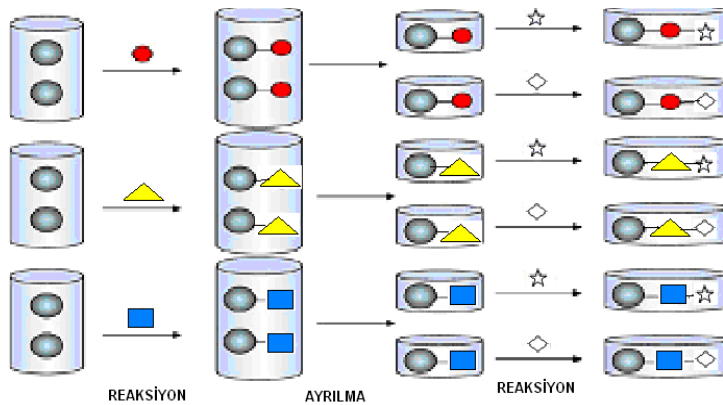
Kombinatoriyal Sentez teknolojisinin:

- Otomasyon derecesi (manual, yarı-otomatik, otomatik veya robotik, Şekil 5),
- Uyumlu olduğu sentez tekniği (katı veya çözelti fazı),

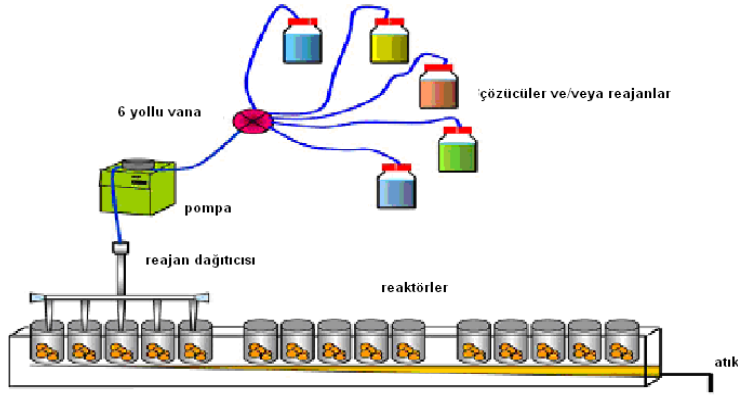
- Tepkime için uyumlu cihaz ve malzemeler
 - Tepkime kap ve kanallarının özellikleri (kapalı reaktörler, cam, polipropilen, 12 ya da 96 kanallar, vs),
 - Otomatik sıvı dağıtım ve uzaklaştırma sistem ve yöntemleri (robot kolları, pompalama ve aspirasyon kolları ve iğneleri, filtrasyon, faz ayrımı için aspirasyon, vs),
 - Sentez ve saflaştırma tekniğine uyumlu otomasyon (sıcaklık kontrolü, manyetik karıştırma, çalkalama, vorteksle karıştırma, vs),
- gibi teknik özelliklere bağlı olarak teknolojik açıdan farklı uygulamaları olabilir (33).

Paralel sentez yöntemi, aynı anda farklı bileşiklerin eş zamanlı olarak ve işlem sırasında herhangi bir değişim olmadan tepkime kanal veya mikrokomponentler içerisinde fiziksel ayırım sağlanarak üretilmesi teknolojisidir.

Paralel sentez, n tane $SR_1, SR_2, SR_3 \dots SR_n$ bileşiğini oluşturmak için substratın (S) birçok reaktifle ($R_1-R_2-R_3 \dots R_n$) tepkimesi olarak tanımlanabilir. YHAT tekniği kullanılarak, bileşiklerin sadece minimal tanımlamayla ve genellikle saflaştırılmadan kütüphane içerisinde taranması mümkün olmaktadır (34).



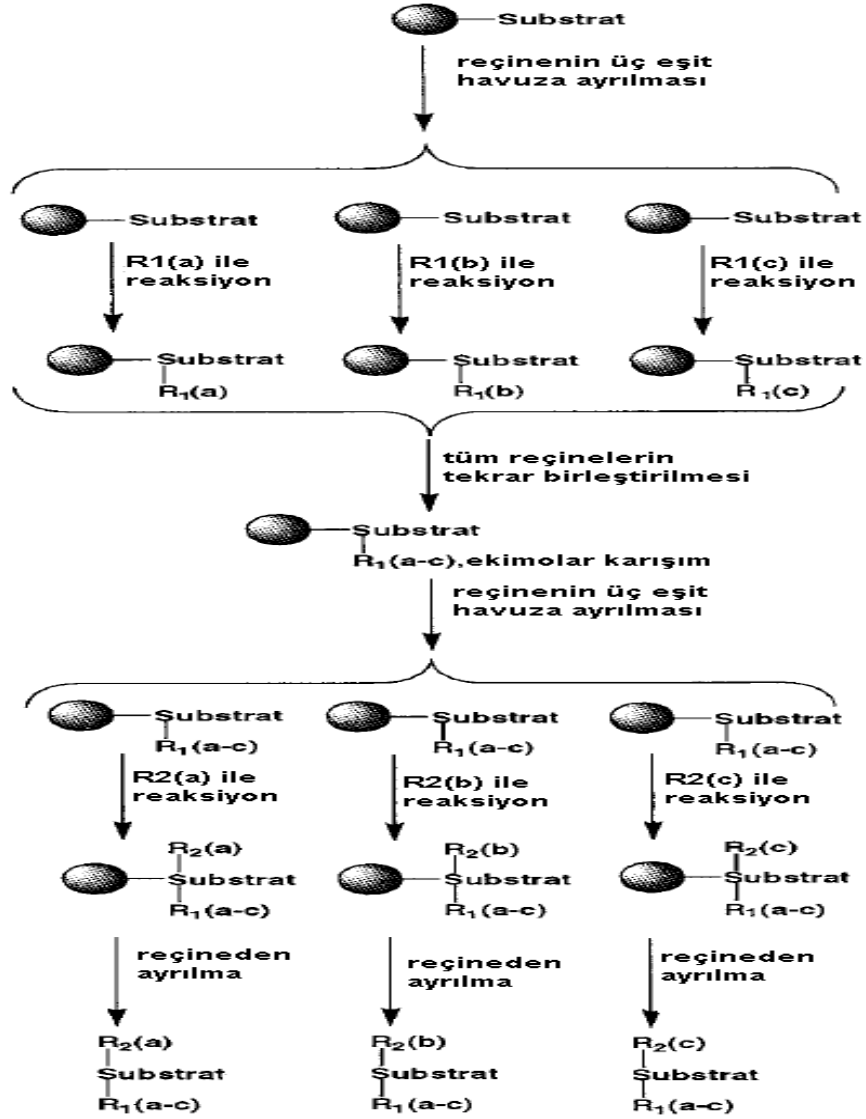
Şekil 4: Moleküllerin kütüphanelerinin oluşturulmasında bütünleştirici paralel sentez uygulama örneği



Şekil 5: Otomatikleştirilmiş bütünleştirici paralel sentez

Ayrıştırma-havuzlama (the split-pool) yönteminde, tek bir substrat reçine ile bağlanır, sonrasında reçine çok sayıda eşit havuzlara ayrılır (Şekil 6). Bu havuzlarda sentezlerin ilk basamağında kullanılacak olan birçok değişik başlangıç maddeleri bulunur. Her havuzda, belirlenmiş olan başlangıç maddeleriyle ve ayrı tepkime kanallarında, uygun tepkime şartları altında tepkimenin tamamlanması sağlanır. Tepkimeyi takiben her havuzdaki tepkime, fazla reajanın uzaklaştırılması için filtre edilir ve solvanla yıkanır. Bütün havuzlardan gelen polimerler yeniden birleştirilir ve iyice karıştırılır. Birleştirilmiş olan reçineler yeniden sentezlerin ikinci basamağını oluşturan başlangıç maddelerini içeren havuzlara ayrılır. Bu esnada her reçine havuzu, ilk basamakta sentezlenen her üründen ekimolar miktarda içermelidir. Bu işlemin defalarca tekrar edilmesiyle sentez kütüphaneleri oluşturulur (35).

Ayrıştırma-havuzlama tekniği, tepkime basamaklarını önemli ölçüde azaltır. Her ayrılan bileşiğin kolayca analiz edilmesi ve zaman kaybı olmaması gibi gibi avantajlara sahiptir. Bütün bu avantajlarına rağmen, hala yıkama ve ayırma basamaklarında daha gelişmiş uygulamalara ihtiyaç duyulmaktadır (36).



Şekil 6: Ayırıştırma-havuzlama uygulama şeması

Yüksek Hızda Aktivite Tarama (YHAT; High Throughput Screening-HTS)

Kimyasal sentez hızını ve sentezlenen moleküllerin biyolojik aktivite analiz hızını arttıran gelişmeler ve etkin teknolojiler, ilaç araştırmada temel yaklaşımların değişmesine neden olmakla beraber, farmasötik endüstride yeni kimyasal moleküllerin keşfi ve tasarımı için önemli bir araç haline gelmiş ve ilaç keşif sürecinde olumlu etkilere neden olmuştur. 1990'dan günümüze kadar olan dönem

içerisinde farmasötik endüstride görülen ana değişim süreci, araştırma ve geliştirmede olduğu kadar ticari amaçlı uygulamalarda da avantaj sağlayacak yönde olmuştur. Bu döneme damgasını vuran kombinatoryal kimya ve YHAT gibi yeni teknoloji ve yöntemler oldukça benimsenmiş ve olabilecek en yüksek seviyede birbirine paralel gelişme göstermiştir (37). YHAT, maddelerin otomatik tarama sistemleri kullanılarak farmakolojik etki taramalarından geçirilmesi işlemidir. Birçok farmasötik ve biyoteknolojik şirketin ilaç keşif sürecinde önemli bir fonksiyon üstlenmiştir. 1970'lerin sonu, 1980'lerin başında itibaren ilk modern YHAT laboratuvarlarının oluşturulması için gerekli bileşenler (küçük ölçekli robotik aygıtlar, bilgisayarlar ve mikropalakalar) bir araya getirilmiş, bu alet ve tekniklerin zaman içerisinde geliştirilmesiyle bugünkü YHAT laboratuvar şartları sağlanmıştır (38).

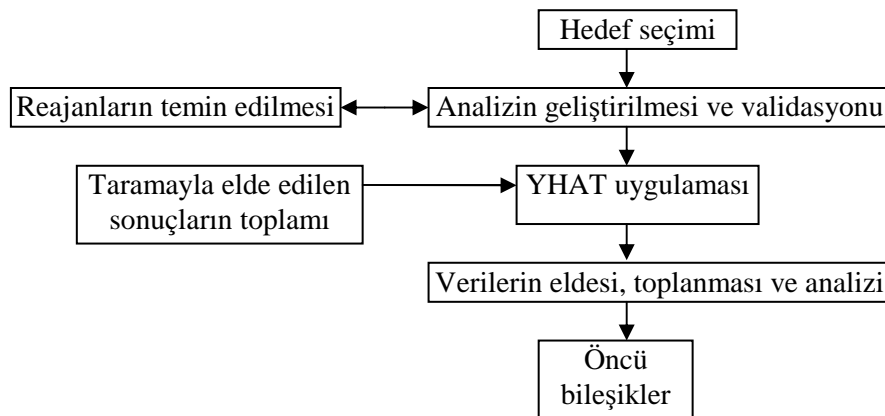
YHAT'nın ilk farmasötik uygulamaları doğal kaynaklı bileşiklerin aktivitelerinin taranması şeklinde olmuştur. National Instituted of Health (NIH) tarafından patenti alınmış bir yöntem olarak YHAT, "değişik maddelerin ortak bir analiz protokolü ile ard arda ve/veya tekrarlanarak test edilmesi" olarak tanımlanmaktadır. YHAT analiz protokolü, bir maddenin ilgili biyolojik sürece olan etkisinin incelenmesi amacıyla kusursuz tanımlanmış, hassas, hızlı ve verimli olacak şekilde dizayn edilmiş deneysel analiz protokolüdür (39). Spektroskopik mikropalaka okuyucularının daha geniş kapasiteli 96, 348 ve 1536 kuyulu plakaları okuma yeteneğine kavuşmasıyla, YHAT metodu daha hızlı ve otomasyona daha uygun hale gelmiştir. Uygulanan YHAT analizleri ile ilaç öncül maddesi olmaya aday aktif bir molekülün aynı ortamda bir veya birden fazla hedef üzerine olan etkinliklerinin istatistiksel yöntemlerle (Zhang'ın Z parametresi) incelenmesi de mümkün olmuştur (40). Dolayısıyla klasik tek molekül-tek tepkime yaklaşımına ek olarak kombinatoryal kütüphanelerin taranmasında kullanılan çok molekül-tek analiz yaklaşımı günümüzde

ekonomi ve zaman tasarrufu sağlayan bir yöntem olarak geliştirilmiştir. Bu yaklaşımda örneğin bir mikroplakadaki her bir kuyuda bulunan çok sayıda moleköl (N) içeren kombinasyonlar aktiflik açısından analiz edildiğinde, aktif sonuç veren kuyudaki bileşenler ayrıştırılır ve elde edilen bu saf moleküller ya da daha küçük gruplu moleküller tek tek veya küçük gruplar halinde analiz edilir. Dolayısıyla her kuyusu N moleköl içeren 96 kuyulu plakada 96XN molekölün bir defada ön taramayla analizi mümkün olur. Sadece aktivite olduğu belirenen kuyudaki N molekölünden aktif olanların belirlenmesi için ayrıştırma ve detaylı analiz ile de kısa zamanda çok sayıda molekölün kombinasyonlar halinde incelenmesi mümkün olmaktadır. Kombinatorial kimya kapsamında moleköl ağırlıkları 1000 daltondan daha az olan ve literatürde küçük organik moleküller olarak tanımlanan moleküller ve bu moleküllerin oluşturduğu kütüphanelerin YHAT ile taranması amacıyla homojen ve heterojen adı altında toplanan iki grup yöntem geliştirilmiştir (41). Bunlardan homojen teknikler “karıştır ve ölç” prensibine dayalı olarak geliştirilmiştir. Moleköl kütüphanelerinden alınan moleküllerin bir biyolojik hedefe olan etkileri, tepkime bileşenlerinin belirli bir sıra ile eklenmesi, inkübasyonu ve ortamdaki reajan varlığı ya da yokluğu fluoresan, kemoluminesan gibi bir spektrofotometrik analizle takip edilmektedir. Bu teknikte analizin aşamasının herhangi bir basamağında ortamda fazla olan reaktif, biyolojik materyal ya da küçük organik moleküllerin uzaklaştırılmasına gerek yoktur. Mikroplaka okuyucuları ile plakaların kimyasal yüklenme ve analiz platformları arasında transferi sağlayan robot ve bilgisayar destekli otomatik plaka sürücöleri yerleştirilerek el değmeden gerçek anlamda otomasyon sağlanmıştır. Kombinatorial sentezin etkin olarak kullanılmasıyla oluşturulan kütüphaneler direk incelenebildiği gibi, daha seçici ve hassas olarak terapötik ya da diagnostik etkinliğin belirlenebilmesi amacıyla YHAT

uygulamalarında arka plan etkileşimini azaltan ve hatta ihmal edilebilir düzeye indiren diğert bazı teknikler mevcuttur ve bunların uygulama alanları da her geçen gün artmaktadır (42).

Günümüzde hızla büyüyen bu otomasyon teknolojisi küçük, basit çalışmalardan fabrika tipi entegre sistemlere kadar çok çeşitli olarak uygulanabilmektedir. Bu yöntem ile günde saniyede 1 trilyondan fazla işlemci gücü olan aletler ile binlerce protein taraması yapılabilmekte ve bu sayının günde milyonlara çıkması hedeflenmektedir.

Tarama için maddelerin miktarının azalması eğilimiyle birlikte birçok bileşiğin sentezinin hızla artması kombinatoriyal kimyada küçük ölçeklendirmeye gidilmesine neden olmuştur ve hızlı sentezleme ve tarama yöntemi için mikroaletler geliştirilmiştir (4, 37). YHAT, çok sayıda ve çok çeşitli molekül kütüphanelerin hızla oluşturulmasını sağlaması, analiz performansının yüksek olması, işlem hacminin çokluğu, otomasyonunun kolaylığı ve maliyetinin düşük olması nedeniyle çok değerli bir yöntem olarak kabul edilmektedir. YHAT işlemi ilaç keşif sürecinin alt fonksiyonu şeklindedir ve hedeften yola çıkarak öncü moleküle giden bir dizi basamaklar serisi olarak tanımlanabilir (Şekil 7).



Şekil 7: YHAT uygulama şeması

Biyolojik olarak anlamlı ve iyi bir taramanın düzenlenmesinde hedef seçimi ve analiz yöntemi büyük önem taşır. Hedefin seçilmesi ve analiz geliştirme aşaması

boyunca, tedaviyle ilgili birimler, analiz geliştirme grupları ve taramayı gerçekleştiren bilim adamları arasında mutlaka iyi bir iletişim olmalıdır (43).

Reajan temini esnasında gelişmesi olası zorluklar, YHAT uygulamalarında işlerin yürümesini engelleyebilecek önemli nedenlerden biridir. YHAT uygulamasına başlamadan önce tüm ürünlerin taranması için gerekli reajanların yeterli ve hazır halde olmaları gerekir. Aksi takdirde ürünlerin tarama işlemi yarıda kesilerek tarama robotlarının yeniden programlanması gerekir. Reajan temin birimi ve YHAT grupları arasındaki dikkatli zamanlama ile robot ve insan kullanımı en elverişli şekilde ayarlanmalıdır (37).

Başarılı bir YHAT uygulaması multidisipliner bir çalışma gerektirir. Bu çalışma grubu içerisinde, YHAT otomasyonunun kurulum ve desteğinden sorumlu teknoloji uzmanları, konuyla ilgili bilgiyle donanmış biyolog ve biyokimyagerler, veri gruplarının analizi ve toplanmasıyla ilgili bilişim teknolojisi uzmanları, taramalar sonucu öncü grupların tanınmasını ve ayırımını sağlayan kimyagerler yer alır. Bu birçok değişik uzmanlık alanının birleşmesi sonucu terapötik hedeflerin belirlenmesi, YHAT ile birlikte öncü bileşiklerin keşfi ve ortaya çıkması sağlanır.

SONUÇ

Kimyasal sentez hızını ve sentezlenen moleküllerin biyolojik aktivite analiz hızını arttıran gelişmeler kimyanın bütün branşlarını, özellikle de ilaç araştırma ve geliştirme çalışmalarını derinden etkilemektedir. Bu yeni ve etkin teknolojiler ilaç

araştırmada temel yaklaşımların değişmesine neden olması yanında, farmasötik endüstride yeni kimyasal moleküllerin keşfi ve tasarımı için önemli bir araç haline gelmiş ve teknolojidaki gelişmelerle ilaç keşif süreci olumlu yönde etkilenmiştir.

Geleneksel analitik kontrollerin uygulanabilirliği, klasik sentez yöntemleriyle elde edilen veri ve bilgilerin kullanılabilirliği, SFOS yöntemini cazip bir seçenek haline getirmiştir. Ancak geniş kapsamlı SFOS'e dayalı kombinatoriyal molekül kütüphanelerinin hazırlanması için kullanılabilir saflaştırma seğenekleri sınırlıdır. Genellikle saflaştırma işlemleri çözünürlük, pH gibi özelliklere dayalı olarak geręekleřtirilir. Diğer taraftan organik ve su fazı arasındaki dağılıma dayalı ekstraksiyon tekniği kullanılarak da çözünebilen polimerler, hidrojen bağı yapabilen ve pH değişikliğine duyarlı moleküller ve ürüne seçici olarak bağlanabilen moleküllerin kullanılmasıyla SFOS uygulamalarında otomasyona uyumlu saflaştırma teknikleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Günümüzde KFOS ve SFOS kaynaklı kütüphaneler YHAT ile analiz edilmekte ve yeni ilaç ve iz moleküllerin tanımlanmasında etkin olarak kullanılmaktadır.

Kombinatoriyal kimya ve son yıllarda ortaya koyduğu gelişmeler, sadece farmasötik endüstride değil birçok alanda sentez kimyasını değiştirecek yönde ilerlemektedir. Katı, çözelti ve sıvı faz sentezleri yardımıyla kombinatoriyal kütüphaneler hızla geliştirilmekte ve buradaki verilerden birçok endüstride özellikle ilaç endüstrisinde yararlanılmaktadır. YHAT uygulamalarındaki gelişmeler sayesinde moleküllerin farmakolojik aktiviteleri kısa sürede taranarak öncü molekül belirlenmesi hızlanmaktadır. Bu yöntemlerin bilgisayara dayalı ilaç tasarımı, ilaç-protein etkileşmesindeki gelişmeler, enzimatik tepkimelerin mekanizmalarının aydınlatılması, hedef proteinlerin üç boyutlu yapılarının çözümlenmesi, gen araştırmaları, moleküler biyoloji ve daha birçok alanda yapılan çalışmalarla

ilişkilendirilmesi sonucunda terapötik aktif bileşiklerin keşfi ve tasarımında büyük gelişmeler olması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

1. Combinatorial Chemistry Review,[<http://www.combichemistry.com/index.html>] erişim tarihi: 28.09.2007.
2. **Di'az-Garci'a, M.E., Pina-Luis, G., Rivero, I.A.** *Trends in Analytical Chemistry* **25**, 112-121 (2006).
3. TUBITAK tarafından HTS için kullanılan iki terminoloji: Hızlı tarama ve Yüksek Çıktılı Tarama, vizyon 2003 Teknoloji Öngörü Projesi, Sağlık ve İlaç Paneli raporundan alındı, Ocak 2003.
4. **Van Hijfte, L., Marciniak, G., Froloff, N.** *J. Chromatog. B*, **725**, 3–15 (1999).
5. **Ivanov, V.T., Kato, Y., Shaw, A., Schenider, P., Gordon, E.M.** *J. Comb. Chem.*, **2**, 562-78 (2000).
6. **Bunin, B.A.** *The Combinatorial Index*. Academic Press, San Diego, CA, p.213-235 (1998).
7. **Maclean, D., Baldwin, J.J., Ivanov, V.T., Kato, Y., Shaw, A., Schenider, P., Gordon, E.M.** *Comb Chem.* **2**, 562-78 (2000).
8. **Danishefsky, S.J., McClure, K.F., Randolph, J.T., Ruggeri, R.B.** *Science* **260**, 1307 (1993).
9. **Merrifield, R.B.** *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149 (1963).
10. **Houghten, R.A.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 5131-5135 (1985).
11. **Nilsson, U.J.** *J. Chromatog. A*, **885**, 305–319 (2000).
12. **Boyle, N.A., Janda, K.D.** *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **6**, 339–346 (2002).
13. **Thorpe, D.S.**, *The Pharmacogenomics Journal* **1**, 229–233 (2001).
14. **Koinuma, H., Aiyer, H.N., Matsumoto, Y.** *Science and Technology of Advanced Materials* **1**, 1–10 (2000).
15. **Oliver, F.S., Abell, C.** *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 299-306 (1999).
16. **Seneci, P.** *Solid phase synthesis and combinatorial technologies*, John Wiley & Sons p.1-26 (2000).
17. **Jacobs, J.W., Ni, Z.J.** *Combinatorial and Molecular Diversity in Drug Discovery*, E.M. Gordon, J.F. Kerwin Jr. (Eds.), Wiley–Liss, New York, p. 271 (1998).
18. **Nielsen, J.** *Chemical Biology* **6**, 297–305 (2002).
19. **Jandeleit, B., Weinberg, W.H.** *Chem. Ind.* **19**, 795 (1998).

20. **Geysen, H.M., Meloen, R.H., Barteling, S.J.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3998 (1984).
21. **Garr, C.D., Peterson, J.R., Schultz, L., Oliver, A.R., Underiner, T.L., Cramer, R.D., Ferguson, A.M., Lawless, M.S., Patterson, D.E.** *J. Biomol. Screen* **1**, 179–186 (1996).
22. **Whitten, J.P., Xie, Y.F., Erickson, P.E., Webb, T.R., DeSouza, E.B., Grigoriadia, D.E., McCarthy, J.R.** *J. Med. Chem.* **39**, 4354–4357 (1996).
23. **DeWitt, S.H.** Automated synthesis. In W.H. Moos, M.R. Pavia, B.K. Kay & A.D. Ellington (Eds.), *Annual Reports in Combinatorial Chemistry and Molecular Diversity*. pp. 69-77 (1997)
24. **Weller, N.H.** ‘An Introduction to Combinatorial Chemistry’ *Analytical Techniques in Combinatorial Chemistry* Marcel Dekker, New Jersey p.9-10 (2000).
25. **Yan, B., Fang, I., Irving, M., Zhan, S., Boldi, A.M., Woolard, F., Johnson, C.B., Shirsagar, T.K., Figliozzi, G.M., Krueger, C.A.** *J. Combin. Chem.* **5**, 547-559 (2003).
26. **Takahashi R, Kubota H, Murakami M, Yamamoto Y, Matsumoto Y, Koinuma H.** *Comb. Chem.* **6**, 50-53 (2004).
27. **Ann, H.Y., Cook, P.D.** *Chem. Rev.* **100**, 3311-3340 (2000).
28. **Meguro, S., Lippmaa, M., Ohnishi, T., Chikyow ,T., Koinuma, H.** *Applied Surface Science* **252**, 2634–2639(2006).
29. **Xiang, X. D., Takeuchi, I.** (eds). *Combinatorial Material Synthesis*, Marcel Dekker, New York, 2003.
30. **Dewitt, S.H., Kiely, J.S., Stankovic, C.J., Schroeder, M.C., Cody, D.M.R., Pavia, M.R.** *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **90**, 6909-6913 (1993)
31. **Darvas, F., Dorman, G., Urge, L., Szabo, I., Ronavi, Z., Sasvari-Szekely, M.** *Pure Appl. Chem.* **73**, 1487-1498 (2001).
32. **Weber, A., von Roedern, E., Stilz, H.U.** *J. Combin. Chem.* **7**, 178-184 (2005).
33. **Cargill, J.F., Lebl, M.** *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1**, 67-71 (1997).
34. **Kenseth, J.R., Coldiron, S.J.** *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**, 418-423 (2004).
35. **Lam, K.S., Salmon, S.E., Hersh, E.M., Hurby, V.J., Kazmierski, W.M.** *Nature* **354**, 82-84 (1991).

36. **Haughten, R.A., Pinilla, C., Blondelle, S.E., Appel, J.R., Dooley, C.T.** *Nature* **354**, 84-86 (1991).
37. **Maier, W.F., Stöwe, K., Sieg, S.** *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **46**, 6016-6057 (2007).
38. **Yarrow, J.C., Feng, Y., Perlman, Z.E., Kirchhausen, T., Mitchison, T.J.** *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening* **6**, 79-99 (2003).
39. **Huc, I., Nguyen, R.** *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening* **4**, 109-130 (2001).
40. **Gao, C., Wei, T., Duwer, F., Xiang, X.D.** *Appl. Phys. Lett.* **71**, 1872-1874 (1997).
41. **Cook, N. D.** *Drug Discovery Today* **1**, 287-294 (1996).
42. **Geysen, H.M., Meloen, R.H., Barteling, S.J.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3998-4002 (1984).
43. **Lazo, J.S., Wipf, P.,** *J. Pharm. Exp. Ther.* **293**, 705-709 (2000).