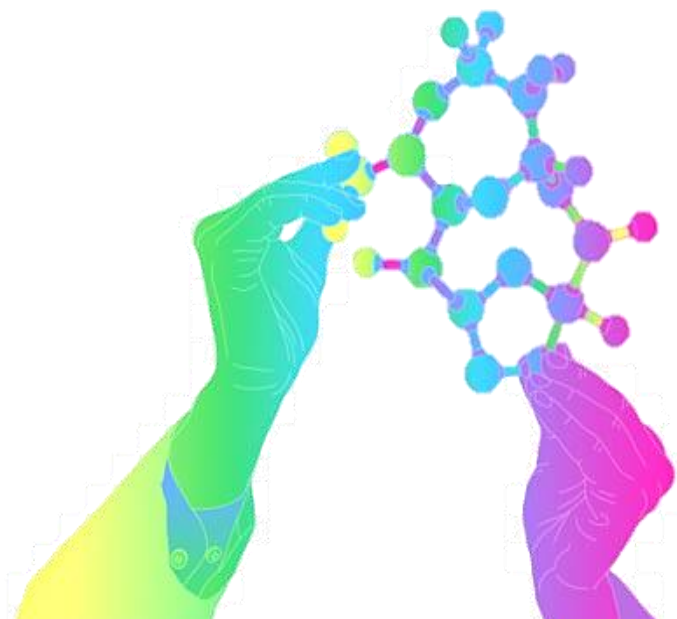


MÉTODOS HIGH-THROUGHPUT PARA LA SÍNTESIS DE NUEVOS FÁRMACOS



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

- FACULTAD DE FARMACIA -

María Luz Martín Alonso



MÉTODOS HIGH-THROUGHPUT

PARA LA SÍNTESIS DE NUEVOS FÁRMACOS.

TRABAJO DE FIN DE GRADO.

AUTORA: MARÍA LUZ MARTÍN ALONSO



Grado en Farmacia. Facultad de Farmacia

Departamento de Química Inorgánica

Universidad de Sevilla

Tipología del trabajo: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Tutor: Luis Bobadilla Baladrón

Cotutora: Laura López Santos

Sevilla, 5 de Septiembre de 2020

ÍNDICE.

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	5
3. OBJETIVOS DE LA REVISIÓN	8
4. METODOLOGÍA	8
5. DESARROLLO Y DISCUSIÓN	10
5.1. TÉCNICAS DE DESARROLLO Y DISEÑO DE FÁRMACOS	10
5.2. PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA HIGH-THROUGHPUT SCREENING	13
5.2.1. SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA	13
5.2.2. VENTAJAS DE LA SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA	13
5.2.3. ETAPAS DEL ENSAYO HTS	14
5.2.4. CRIBADO VIRTUAL	15
5.3. ETAPAS DEL DESARROLLO DE FÁRMACOS	16
5.3.1. IDENTIFICACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA DIANA	17
5.3.2. ESTUDIOS PRECLÍNICOS	19
5.3.3. FASE CLÍNICA	20
5.4. ANALISIS DE PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL MÉTODO HIGH THROUGHPUT SCREENING	23
5.5. EMPLEO DE MÉTODOS HIGH THROUGHPUT PARA COMBATIR ENFERMEDADES COMO LAS PRODUCIDAD POR <i>TRIPANOSOMA CRUZY</i> Y HCMV	25
5.6. INFLUENCIA DE LAS TÉCNICAS BIOFÍSICAS EN EL DESARROLLO DE FÁRMACOS MEDIANTE HTS	27

5.7. LIMITACIONES DEL ENSAYO HIGH THROUGHPUT SCREENING	29
5.8. ACTUALIDAD	30
6. CONCLUSIONES	32
7. REFERENCIAS	33

RESUMEN

Gracias al uso de métodos de alto rendimiento (High-throughput), se ha conseguido potenciar el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. En este dificultoso camino, el método de cribado de alto rendimiento HTS (High-Throughput screening) resulta ser un paso determinante aunque bastante costoso. Se expone una colección de un elevado número de compuestos con actividades biológicas diferentes frente a una diana terapéutica concreta y se obtienen rápidamente los compuestos que poseen la actividad buscada, adecuados para interactuar con el target. Asimismo, es de gran interés conocer en profundidad las etapas que forman parte del proceso de desarrollo y diseño de un fármaco. Así como también las distintas aplicaciones que presenta la metodología de alto rendimiento combinada con la química y medicina para abordar de forma exitosa los obstáculos que se presentan a la hora de encontrar nuevos medicamentos.

En consecuencia, este Trabajo de Fin de Grado recaba los conceptos necesarios para entender cómo se aborda el proceso de obtención de un fármaco. Se muestra una breve historia de la química y medicina, hasta llegar a lo que hoy se conoce como química combinatoria. Entender la importancia de esta rama de la química y las aplicaciones y características de métodos como HTS a la hora de desarrollar un fármaco, es otro de los puntos que se explican en este trabajo.

Palabras claves: diseño de fármacos, HTS (High-throughput synthesis), química combinatoria, diana terapéutica.

ABSTRACT

The application of high-throughput synthesis methods in, drug discovery and development process has been emerged in the last three decades. In spite of their expensive cost, the utilization of this technique has become a decisive step Using this difficult process, the high-throughput screening (HTS) method turns out to be a decisive step. For collecting a large number of compounds with different biological activities which are exposed against a specific therapeutic target. The compounds with the desired activity, suitable to interact with the target, are more rapidly obtained by using

this method. It is also of great interest to know in depth the stages that are part of the process of development and design of a drug. As well as the different applications presented by the high-performance methodology, it is combined with chemistry and medicine to successfully address the obstacles that arise when finding new drugs.

Consequently, this degree project provides the fundamental concepts to understand the drug production processes. Furthermore, a brief history of chemistry and medicine is shown, introducing the concept of combinatorial chemistry. Understanding the importance of this branch of chemistry and the applications and characteristics of methods such as HTS when developing a drug is another of the points explained in this work.

Keywords: drug design, HTS, combinatorial chemistry, therapeutic target.

INTRODUCCIÓN

El ser humano ha usado sus habilidades desde tiempos inmemoriales para satisfacer todas sus necesidades básicas nutricionales y para remediar cualquier problema de salud. El concepto de enfermedad se remonta al año 2800 a.C y su aparición se asociaba con hostiles castigos de los dioses. Siempre se han buscado alternativas en la naturaleza para tratar las enfermedades y es en este caso donde juegan un papel fundamental las plantas medicinales.

Los egipcios extraían de las plantas el aceite de ricino, que era usado como purgante y también como combustible para las lámparas. Esta civilización tenía grandes conocimientos sobre plantas y anatomía, y usaban todo tipo de productos para curar heridas o mejorar el sueño. Estos conocimientos quedaron reflejados en los papiros que elaboraban y gracias a los cuales tenemos constancia en la actualidad. Cabe destacar el “Papiro de Ebers” que se remonta alrededor del 1.500 a.C y contiene 110 páginas que incluyen 877 recetas y menciona en torno a 700 drogas (Fernández de Ramón, Criado, 2017). La medicina griega estaba fascinada por el concepto de veneno y todo lo que este incluía, es la ciencia que hoy se conoce como Toxicología. De hecho, el primer texto conocido sobre Toxicología fue descrito por Platón, donde queda plasmado el suicidio de Sócrates tras ingerir zumos que contenían cicuta y opio (Rubira, 2008).

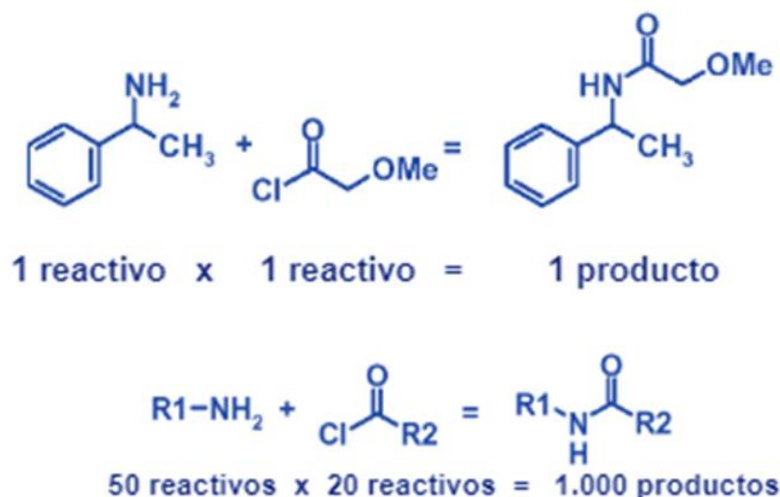
Cada civilización contemplaba la medicina de una manera diferente, ya que eran culturas muy distintas, pero en la mayoría la magia y los conjuros formaban parte del tratamiento de cualquier dolor o enfermedad. Fue con Hipócrates, conocido como “El Padre de la Medicina”, con quien la medicina paso a ser una ciencia.

Dando un salto considerable en el tiempo, es en el siglo XIX cuando aparece la Química Orgánica. Fue introducida por Jons Jacob Berzelius, en 1807, para estudiar los compuestos derivados de recursos naturales. Anterior a esto, todos los medicamentos procedían de la naturaleza pero con este importante avance se consiguió diferenciar el concepto de droga, del nuevo concepto llamado principio activo, entendido como la sustancia química contenida en la droga y responsable de su acción (Marín NL, Fernández R). El desarrollo de la química como ciencia revolucionó la medicina y gracias

al alto nivel de integración de ambas ciencias, cada vez se obtienen más avances y los fármacos son más específicos, eficaces y producen menos efectos adversos.

A día de hoy, la naturaleza sigue siendo una fuente importante de obtención de nuevos agentes terapéuticos, e incluso se conoce y se ha estudiado una ínfima parte de los ecosistemas naturales. Pero es igualmente necesaria la obtención de compuestos de la naturaleza, como la conservación de esta para mantener unas condiciones de vida adecuadas para el ser humano. La forma más óptima es conseguir un equilibrio entre ambas premisas, es decir poner en funcionamiento la naturaleza de forma controlada y responsable a favor de mejorar la calidad de la salud humana (Chivian, Bernstein, 2015).

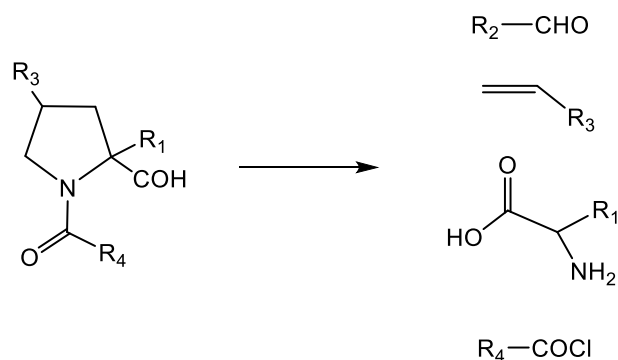
La química aplicada a la terapéutica es lo que se conoce como química farmacéutica, mezcla de medicina, farmacología y la química llevada a cabo en laboratorios en los cuales, siempre, se ha intentado obtener fármacos inspirados en los principios activos naturales. Gracias a la aparición de la química combinatoria se pueden sintetizar de forma simultánea cientos de miles de compuestos, lo cual reduce claramente el tiempo empleado en esta tarea y además lo hace a un costo asequible. Concretamente, se ha demostrado que se pueden sintetizar entre 1.000-10.000 compuestos, todos ellos relacionados (congéneres), los cuales quedan registrados en bibliotecas combinatorias. A esta tecnología se han unido métodos de alto rendimiento (High-throughput), cambiando de forma notable el panorama de la síntesis de fármacos. Este método se basa en el uso de ordenadores y robots para analizar miles de compuestos de forma simultánea. Destacan entre estos métodos el cribado de alto rendimiento cuyas siglas en inglés son HTS (Marín NL, Fernández R). El número total de productos obtenidos mediante química combinatoria es igual al número de posibilidades de cada reactivo, elevado al número de reactivos de la reacción (Molina I, 2019). Como se observa en el esquema 1, si en lugar de combinar el reactivo 1 con el reactivo 2 para obtener el producto indicado (química convencional), se hacen reaccionar 50 reactivos del tipo 1 y 20 reactivos del tipo 2 y que se combinan, el resultado es la obtención de 1.000 productos diferentes. A este conjunto de compuestos obtenidos, se le conoce como colección combinatoria (Fullana, 2017).



En una secuencia de 2 pasos: 50 x 20 x 20 reactivos = 20.000 productos

Esquema 1. Ejemplo de síntesis orgánica y de síntesis combinatoria (Molina I, 2019).

Actualmente, las bibliotecas de compuestos recogen compuestos inorgánicos, orgánicos y además sus propiedades fisicoquímicas y farmacológicas. En GSK Tres Cantos, existe una biblioteca con dos millones de compuestos químicos almacenados con información sobre su pureza, cantidad, estructura y características físicas y químicas entre otras cosas. De ellos se espera obtener drogas potencialmente activas para las dianas ya estudiadas. Estas bases de datos con información sobre tanta cantidad de compuestos, forman una parte muy importante del descubrimiento y desarrollo de fármacos. En la Figura 2 se muestra un ejemplo de biblioteca combinatoria de pirrolidina y además los sintones que componen su esqueleto.



Esquema 2. Muestra una biblioteca combinatoria de pirrolidina (Marín NL, Fernández RR).

El HTS permite investigar una gran cantidad de compuestos, los cuales presentan distinta actividad biológica, sobre múltiples dianas bioquímicas ya estudiadas. Es por tanto, una de las fases más tempranas en la industria farmacéutica, donde resulta un método imprescindible y estándar a la hora de desarrollar nuevos fármacos (González I, Sanz A, 2013; Arranz, Sanz A, 2014) El método de alto rendimiento (HTS) ha supuesto un nuevo enfoque aplicable a muchas ramas de la ciencia como la química y la biología. Aportando un crecimiento en la eficacia, precisión, en el rendimiento de la secuenciación y aumento de la miniaturización y automatización (Kampf et al., 2019). Pero como cualquier metodología emergente, requiere más estudios y mejora en determinados aspectos experimentales.

A pesar de los grandes avances que se han dado a lo largo del tiempo, la lucha contra las enfermedades sigue siendo, en muchos casos, un obstáculo a solventar para la ciencia. Por ello, el descubrimiento de nuevos fármacos capaces de combatir esas enfermedades y de métodos que faciliten su desarrollo, resulta una tarea sumamente importante. La simbiosis de las dos herramientas mencionadas anteriormente constituye una de las técnicas más eficaces a la hora de enfrentar esta problemática.

A continuación, se van a resaltar los aspectos más relevantes y actuales de la técnica de alto rendimiento como método para la obtención de fármacos.

OBJETIVOS DE LA REVISIÓN

El objetivo principal del presente trabajo fue llevar a cabo una revisión bibliográfica a partir de diferentes fuentes para obtener una visión actualizada sobre la utilidad e importancia del descubrimiento de nuevos compuestos potencialmente activos, en el diseño de fármacos, mediante métodos combinatorios y computacionales (High-throughput) como herramienta fundamental.

METODOLOGÍA

En la realización de esta revisión bibliográfica se han consultado artículos científicos principalmente publicados en los últimos seis años, utilizando para ello las bases de datos Scopus, Google Scholar, PubMed, Web of Science principalmente.

Con la base de datos Scopus se comenzó buscando los términos “HTS” y “drug synthesis” y, limitando la búsqueda a los últimos 4 años (2020,2019,2018,2017), la cantidad de documentos obtenida fue de 137 documentos. Filtrando por áreas de investigación “Chemistry (61)”, “Chemical Engineering (8)”, “Computer Science (5)” y “Medicine (15)” se obtienen 76 documentos, de los cuales se hace una selección según el impacto en el descubrimiento de fármacos que pudieran tener. En una segunda búsqueda sin limitación del período temporal, el número de artículos encontrados fue mayor, y de entre todos ellos se buscaron revisiones y artículos relacionados con los pasos para realizar las técnicas High-throughput.

En el caso de la base de datos Google Scholar al buscar las siglas “HTS” y “cribado de alto rendimiento” se obtuvieron 291 resultados. Con los filtros “desde 2019”, “desde 2018” y “desde 2013” se limitó la búsqueda a 48, 73 y 195 respectivamente.

En la base de datos PubMed, se utilizaron también los últimos cuatro años de investigación y se cambió a buscar el término “drug development” obteniéndose 46 resultados. Además, se volvió a realizar en esta misma base de datos una nueva búsqueda sin filtros de tiempo y los resultados fueron 136 documentos.

Scopus y PubMed permiten organizar los resultados por año, observando que los métodos High-throughput son aún una línea de investigación limitada. Para analizar los datos obtenidos en las bases de datos y poder compararlos a nivel global, se ha realizado la gráfica que se muestra a continuación (figura 1). En ella se observa que la base de datos PubMed ofrece un mayor número de artículos en los diez últimos años que Scopus.

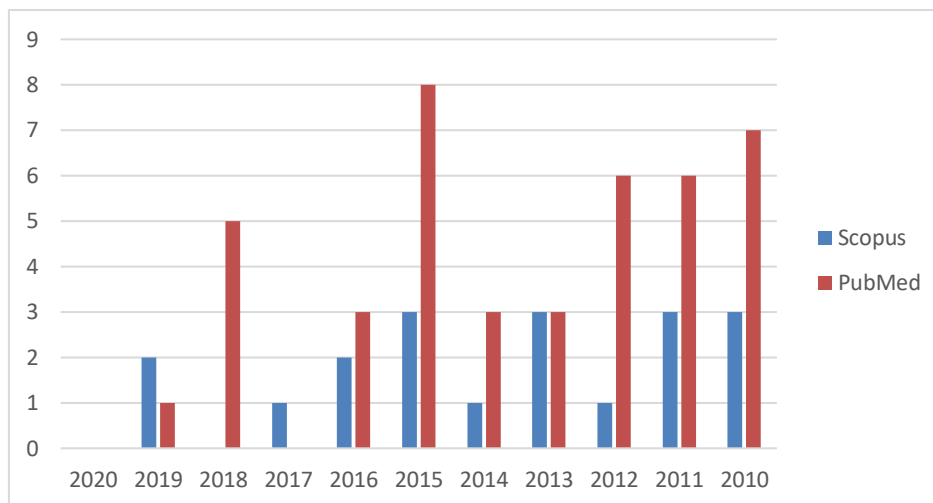


Figura 1. Publicaciones al buscar por los términos “HTS” y “drug synthesis” organizadas por año de las bases de datos Scopus y PubMed.

En la última base de datos en la que se buscó, Web of Science, se filtró mediante los términos “drug synthesis” “HTS” y “methods of synthesizing drugs”, siendo los resultados obtenidos 688, 82 y 23.

El filtro final para la selección ha consistido en una lectura crítica de artículos, para reunir información de todos ellos y mostrar los datos obtenidos de mayor interés.

DESARROLLO Y DISCUSIÓN

5.1. TÉCNICAS DE DESARROLLO Y DISEÑO DE FÁRMACOS:

De forma general, los fármacos que se conocen actualmente, han sido sintetizado por dos vías: mediante métodos de ensayo-error o a partir de la búsqueda concreta de una molécula con una actividad deseada. El descubrimiento de nuevos fármacos es un proceso complejo y competitivo que requiere una gran inversión, pero de gran expectación debido al impacto negativo que generan las enfermedades hoy en día como demuestra en la actualidad la crisis generada por el COVID-19. El coste económico y temporal que conlleva el desarrollo de fármacos está asociado en gran medida al elevado número de moléculas que van fallando en las diferentes etapas del proceso. Dentro del panorama actual, resulta esencial la innovación en este campo para conseguir nuevos avances y mejoras (Saldívar-González et al., 2017). La gran mayoría de

los fármacos que se comercializan actualmente han pasado por este arduo proceso de selección (Medina-Franco, 2013).

El desarrollo de técnicas computacionales y de la robótica han generado un antes y un después en el desarrollo racional y eficiente de obtención de nuevos fármacos (Roca, 2019). En la última década, se han multiplicado por tres el número de programas computacionales y herramientas diseñadas para desarrollar nuevos fármacos (Albadalejo, 2016).

Actualmente, el diseño y desarrollo racional de fármacos se lleva a cabo mediante dos vías: en primer lugar, el diseño basado en el sitio activo y en su estructura, y por otra parte el diseño basado en los compuestos químicos que interactúan con la diana. Si se conoce cuál es la diana donde hay que actuar, se pueden aplicar métodos computacionales que se centren en las interacciones establecidas entre ligando-sitio activo. En caso contrario, los estudios se centran en las propiedades que presenta el ligando (Zuñiga A et al., 2002).

En los últimos años, las técnicas computacionales han conseguido integrarse en el campo de la síntesis y desarrollo de nuevos fármacos. Los métodos computacionales han contribuido en numerosas aplicaciones entre las que pueden encontrarse el filtrado de colecciones de compuestos para llevar a cabo la selección de moléculas, la generación de hipótesis para ayudar a entender el mecanismo de acción de fármacos y al diseño de nuevas estructuras químicas. Aunque aún quedan muchos retos por afrontar, las técnicas computacionales han logrado aportar avances significativos en el desarrollo de medicamentos, lo que estimula la innovación y mejora de estos métodos y del proceso de descubrimiento de novedosos fármacos (Saldívar-González et al., 2017).

Entre los métodos experimentales y computacionales que existen para identificar un compuesto que posea cierta actividad y llegue a convertirse en cabeza de serie, cabe nombrar los siguientes: optimización de fármacos ya aprobados para su uso clínico, uso de información biológica disponible, diseño de fármacos asistido por ordenador (DIFAC) y Ensayo biológico sistemático de colecciones de compuestos entre los que se encuentran las pruebas HTS (Saldívar-González et al., 2017).

Los sistemas de alto rendimiento se establecieron a finales de la década de 1990 (Hertzberg, Pope, 2000). La técnica **High-throughput screening** (HTS), como método de obtención de compuestos susceptibles a ser fármacos, implica sistemas robotizados y totalmente automatizados, lo que le confiere la capacidad de testar una gran cantidad de compuestos en un tiempo reducido. Presenta cuatro estaciones separadas pero interconectadas, y cada una realiza un estudio sobre muestras (Bader et al., 2018). Por ello la técnica **High-throughput screening** se ha convertido en una herramienta clave. Para la simplicidad con la que procede este método, cuenta con una plataforma de operación automatizada, robótica moderna, software de control sofisticado, métodos de detección altamente sensibles, modelo de cribado específico (in vitro), amplia biblioteca de compuestos, ya sea de compuestos peptídicos a moléculas pequeñas, y un sistema de procesamiento y adquisición de datos (Pupo M, Borges M, Cezar P, 2007). Existen ya en el mercado compuestos cuyo diseño está basado en la utilización de estas nuevas tecnologías. Entre ellos se encuentran los inhibidores de tirosin quinasas (gefitinb, erlotinib, sorafenib y lapatinib) empleados para el tratamiento del cáncer (Díez, 2011).



Figura 2. Robot de cribado de alto rendimiento. (https://es.qwe.wiki/wiki/High-throughput_screening)

5.2. PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA HIGH THROUGHPUT SCREENING:

5.2.1. SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA:

Los compuestos empleados para HTS proceden de las bibliotecas de química combinatoria, los cuales se sintetizan mediante química en fase sólida o en solución (Eldridge et al., 2002). Normalmente, es más usada la fase sólida por el simple hecho de que aporta más ventajas que con la otra técnica. Se llama así porque presenta como elemento principal lo que se conoce como un soporte sólido polimérico e insoluble, al cual se van uniendo productos para llevar a cabo la síntesis. Este proceso evita la necesidad de aislamiento y purificación de los intermedios de síntesis, la purificación se lleva a cabo dando exhaustivos lavados al soporte para eliminar los restos de reactivo (Fullana, 2017).

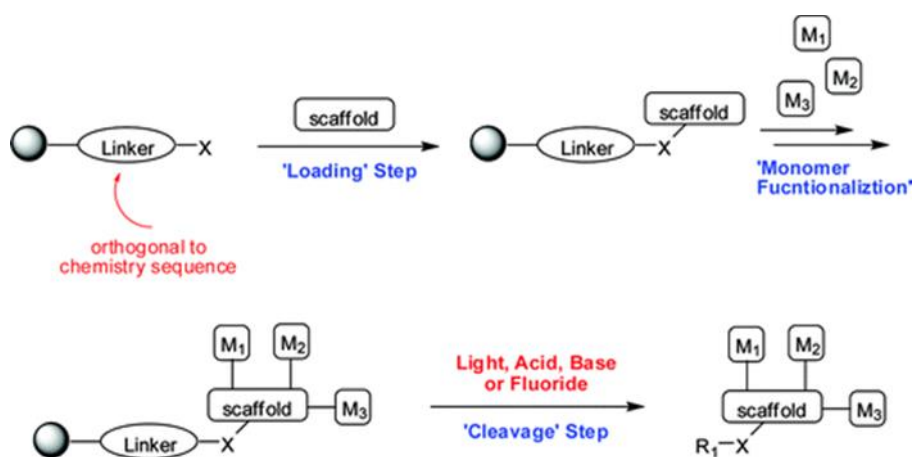


Figura 3. Esquema general de síntesis en fase sólida (Kennedy et al., 2008)

Fue en la década de 1960 cuando el científico Merrifield llevó a cabo la síntesis de una enzima, ribonucleasa pancreática bovina A, a partir de la síntesis en fase sólida. Recibió el Premio Nobel por ello, ya que demostró un método rápido, simple y práctico de sintetizar proteínas y péptidos y que actualmente se aplica a la síntesis de gran cantidad de compuestos debido a los buenos resultados obtenidos (Sierra, 2017).

5.2.2. VENTAJAS DE LA SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA:

La síntesis en fase sólida de compuestos, es considerada una disciplina idónea para el desarrollo de moléculas potencialmente activas. Esto es consecuencia de las múltiples ventajas que presenta, entre las que se pueden destacar: el fácil manejo del proceso y sencillez, ya que solo consta de tres pasos (adición al soporte, filtración y lavado del

soporte). Se pueden utilizar reactivos en exceso y luego ser reciclados. La única purificación necesaria es un lavado de la resina; sólo el producto final de la síntesis necesita ser purificado. Al estar la molécula unida a la resina, en el caso de que sea tóxica, es más segura su manipulación. Presenta secuencias de reacción sencillas de automatizar debido a la sencillez del proceso (Furlán, Mata, 2012; Albericio et al., 2004).

5.2.3. ETAPAS DEL ENSAYO HTS:

-VALIDAR DIANA:

Uno de los requisitos fundamentales para realizar un correcto ensayo de HTS, es conocer todo lo posible la diana terapéutica, de este modo se selecciona de manera adecuada la tecnología a utilizar y las características adecuadas para conseguir ensayos con robustez. Cuando el primer objetivo está cumplido, se procede a diseñar el ensayo en el laboratorio (González, Sanz, 2013).

Una vez conseguido todo lo anterior, se genera un documento llamado AESOP (Assay Electronic Source of Protocols), en este documento se recoge de forma detallada información como la diana, área terapéutica en la que está involucrada, reactivos, volúmenes, tiempo de incubación, etc. Es fundamental contar con una placa de microtitulación para poder realizar el ensayo HTS. Se trata de un recipiente de plástico, que contiene pequeños agujeros llamados “pocillos”, los cuales son usados como pequeños tubos de ensayo, donde se depositan de uno a cinco compuestos por pocillo (Real Academia de Ingeniería).

-SET UP O PUESTA PUNTO DEL ENSAYO A GRAN ESCALA:

Todos los ensayos y estudios llevados a cabo hasta ahora, han sido en el laboratorio y a pequeña escala. En la fase que nos concierne, lo que se lleva a cabo es una adaptación y optimización de estos ensayos antes realizados a gran escala. Esto es posible gracias al uso de plataformas robotizadas. Además, se usan diferentes parámetros estadísticos para controlar que el proceso se realice con una capacidad alta y un coste bajo. Gracias a las herramientas informáticas existentes se analizan los datos estadísticamente y se consigue apreciar con claridad los resultados, sabiendo así si el ensayo es capaz de identificar hits con precisión (Arranz, Sanz, 2014; Bejarano, 2013)

Los hits son moléculas que presentan actividad biológica capaces de servir de base para el desarrollo de nuevos fármacos. Cuando estos se han identificado, lo siguiente es seleccionar compuestos que presenten propiedades farmacéuticas de interés, entre las que se incluyen baja toxicidad, adecuada solubilidad, buena estabilidad. Los compuestos obtenidos de esta segunda selección son llamados «líderes o cabezas de serie». Normalmente, los hits son encontrados por tamizaje de una gran cantidad de moléculas, mientras que los compuestos líderes se consiguen a través de modificaciones químicas de los hits (Saldívar-González et al., 2017)

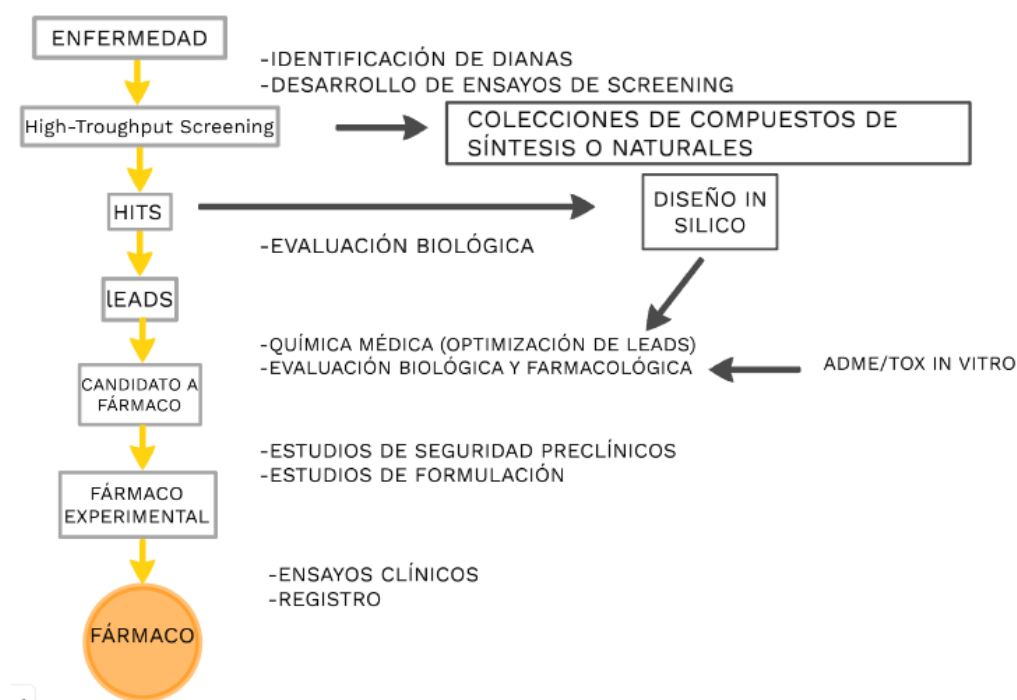


Figura 4. Proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos (Modificada. Peláez, 2011)

5.2.4. CRIBADO VIRTUAL:

El Cribado Virtual (vHTS) consiste en un filtrado computacional (*in silico*) dirigido a seleccionar candidatos que presenten la actividad deseada sobre una diana terapéutica concreta, a partir de moléculas sintéticamente accesibles depositadas en bases de datos. Combina varios métodos computacionales para la selección de los candidatos a fármacos, todo ello lo lleva a cabo a través de diversos filtros, los cuales se van aplicando de forma secuencial en función del nivel de requerimientos computacionales que utiliza cada método y la complejidad de la información necesaria para ellos (Skiba, 2005).

Este método ya se encuentra sustituyendo al tradicional (HTS), sobretodo porque permite identificar compuestos hits en un menor tiempo y con menos recursos disponibles. Las tasas de aciertos de vHTS son hasta 10 veces superiores a las técnicas empíricas de cribado (Pérez-Sánchez et al., 2015).

Para realizar la técnica vHTS, hay que realizar una búsqueda en quimiotecas virtuales aquellos compuestos que sean activos frente a nuestra diana terapéutica. El cribado virtual se lleva a cabo mediante cálculos de docking y se filtran en tres niveles diferentes, según la especificidad y en función del score que tengan, aquellos compuestos que interaccionen con el centro activo de la diana. Las categorías se muestran de menor a mayor especificidad del compuesto con la diana, estas categorías serían: 'general' (compuestos válidos para un amplio grupo de proteínas), 'enfocado' (para un grupo concreto de proteínas relacionadas entre sí) y 'dirigido' (para una diana específica). De los únicos inconvenientes que presenta el método vHTS es que elabora una amplia lista de compuestos sin tener en cuenta factores como la tautomería o los estados de ionización en distintos medios (Borroto OM, Hernández Y, García JM et al., 2013).

Las novedosas técnicas de síntesis combinatoria y los métodos High-throughput screening, aunque han agilizado el proceso de diseño de fármacos de manera exponencial, siguen siendo procesos que consumen mucho tiempo y materiales empleados; vHTS además de ser más novedosa, es una técnica mejorada que permite predecir la afinidad de una gran cantidad de compuestos, organizados en bibliotecas virtuales, con el blanco terapéutico de interés y empleando menos recursos. Desde una perspectiva más general, la química computacional ha conseguido no solo predecir la afinidad de un compuesto frente a una diana terapéutica, sino también una optimización de las propiedades farmacocinéticas (ADME) (Albadalejo, 2014).

5.3. ETAPAS DEL DESARROLLO DE FÁRMACOS:

El proceso de desarrollo y descubrimiento de fármacos, no es un proceso estático, ha ido evolucionando a lo largo del tiempo (Peláez, 2011). Hay muchas etapas en la investigación y desarrollo de un fármaco, en las que se trata de demostrar la eficacia y seguridad, para que este pueda ser recetado con un uso clínico. Los ensayos clínicos son necesarios para entender cómo actúa el compuesto frente a una patología dada. El

proceso de producción de moléculas exitosas, a las que llamarán hits, destinadas a subsanar una necesidad clínica concreta consta entonces de estas diferentes etapas según la FDA (Food and Drug Administration)⁴ (Marovac, 2001).

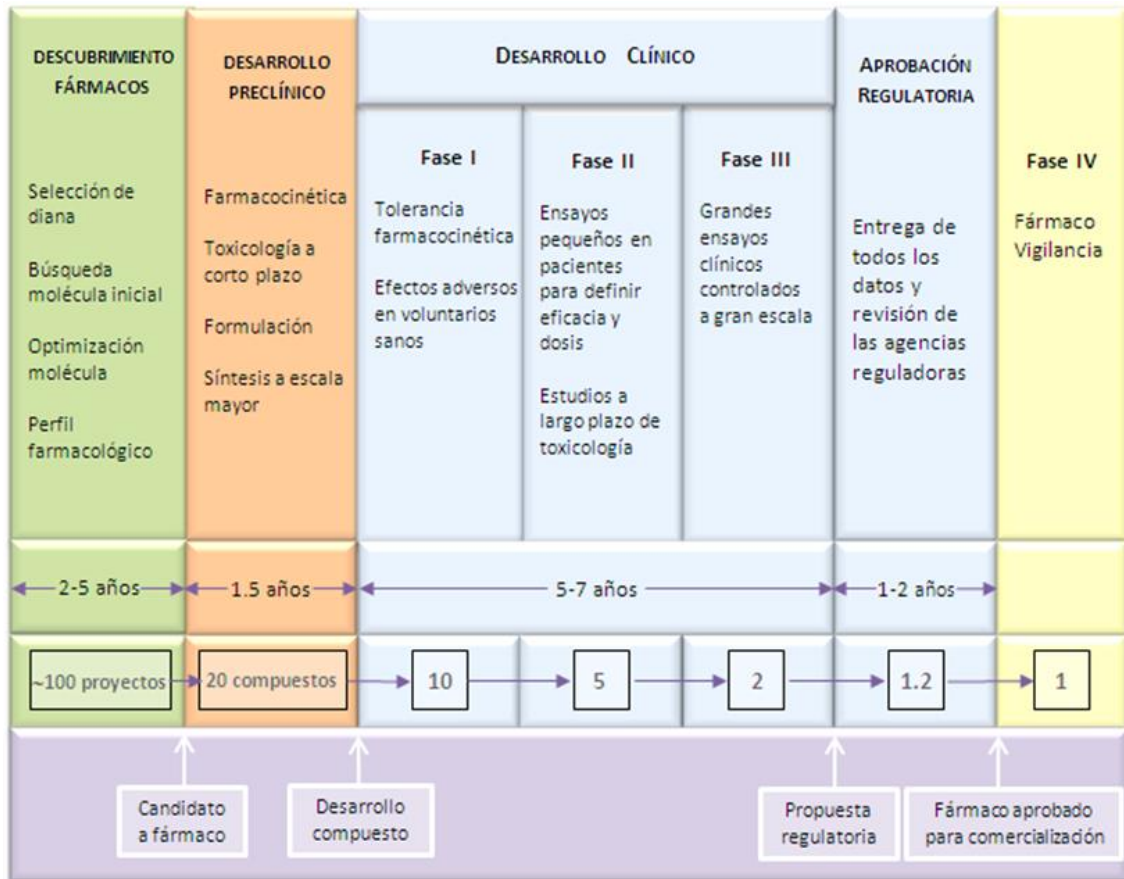


Tabla 1. Proceso completo del desarrollo de un fármaco (Portal del Medicamento)

5.3.1. IDENTIFICACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA DIANA:

Mayoritariamente suele ser una proteína involucrada en algún proceso patológico. Es una de las premisas más importantes para llevar a cabo el proceso de obtención de un fármaco ya que no se puede conseguir ningún fármaco que sea eficaz sin saber dónde tiene que ejercer su acción, de ahí que el primer paso se base en la determinación de la diana terapéutica (San Román, 2013). Como ejemplo se muestra el siguiente: la trombina es una enzima fisiológica que actúa sobre el fibrinógeno dando lugar a la formación de fibrina, ayudando así a la coagulación de la sangre. Los NACOs (Nuevos Anticoagulantes Orales) actúan inhibiendo a esa enzima para evitar así la coagulación sanguínea (Oyonarte M, 2015). Queda claro entonces que la diana en la que el fármaco debe ejercer su acción farmacológica es la trombina.

Una vez identificada, debe ser validada, demostrando así el papel determinante que tiene en la patología. La validación requiere que se lleven a cabo experimentos in vivo e in vitro. Las dianas más estudiadas en HTS han sido: GPCR, Canales iónicos, Receptores nucleares y Proteínquinasas (González I, Sanz A, 2013).

Cabe destacar, que en muchas ocasiones el efecto clínico es responsabilidad de la interacción de un fármaco con más de una diana terapéutica. Surge así el concepto de polifarmacología. En este caso, el diseño del fármaco debería ir enfocado simultáneamente a varios blancos terapéuticos (Saldívar-González et al., 2019). Posiblemente aún queden por estudiar posibles miles de dianas farmacológicas (Ritter J, Flower R, Henderson G et al., 2020).

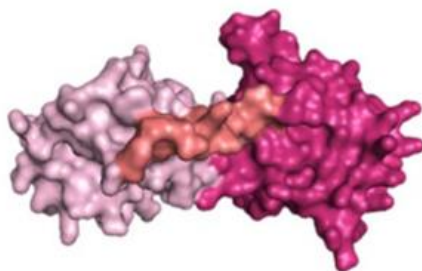


Figura 5. Representación tridimensional de SFRP1, nueva diana terapéutica para tratar el Alzheimer. (Carrasco-Rubio et al., 2019)

Una vez identificado el objetivo terapéutico, se lleva a cabo un tamizaje (*screening*) de millones de sustancias para poder seleccionar las que tengan la acción deseada. Es aquí donde actúan las técnicas de alto rendimiento, permitiendo encontrar la molécula activa y adecuada para combatir un microorganismo o bloquear, inhibir o activar alguna enzima del organismo. Se utilizan como herramientas sistemas robóticos y automatizados y se cuenta con las bibliotecas de compuestos químicos (Banerjee P, Rosfsky M, 1997). Estos compuestos pueden obtenerse de la naturaleza ya que se consiguen de las plantas o lo producen determinados microorganismos, como ocurrió con el gran descubrimiento de la penicilina que es un antibiótico (San Román, 2013). Aunque los compuestos también pueden ser creados en laboratorios a partir de técnicas como la química combinatoria de alta velocidad, genómica, diseño racional de moléculas. Pueden ser visualizados y modificados tridimensionalmente en pantallas

computacionales. Se tiene como ejemplo a la insulina recombinante, que fue el primer fármaco obtenido mediante ingeniería genética, seguido de la hormona del crecimiento. Una vez que se selecciona el compuesto, se procede a comprobar si es seguro y efectivo como futuro medicamento, este proceso es conocido como la validación del compuesto *leader*, e incluyen ensayos *in vivo*, dentro de un organismo vivo, en animales, e *in vitro*, llevados a cabo en el laboratorio y fuera de un organismo vivo. Una vez conseguido todo esto, se da un salto a la siguiente etapa del descubrimiento de un fármaco, etapa conocida como los estudios preclínicos (Marovac, 2001).

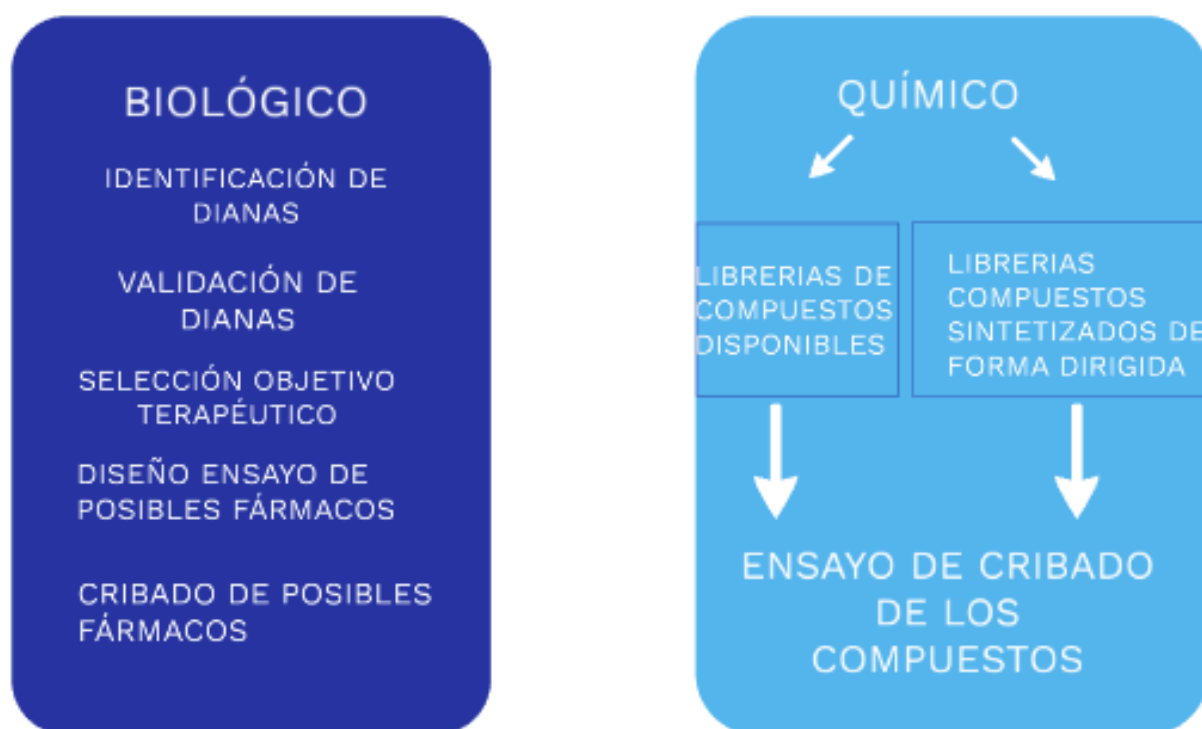


Figura 6. Abordaje biológico y químico en el desarrollo de un nuevo fármaco (Modificada. Patel, 2006).

5.3.2. ESTUDIOS PRECLÍNICOS:

A continuación, antes de que el compuesto escogido sea probado en humanos se ensaya detalladamente en animales y modelos fisiológicos en el laboratorio para establecer un primer perfil de seguridad y eficacia. Se analizan las propiedades fisicoquímicas del candidato a fármaco, utilizando modelos informáticos y pruebas de laboratorio. Lo que se pretende determinar con estas pruebas es el grado de absorción y cómo se distribuye, elimina o metaboliza en el organismo (Herrera, Ruíz, 2013). Se llevan a cabo también,

estudios de toxicidad aguda y crónica, los efectos que tiene en la reproducción y progenie. Las moléculas en esta etapa del proceso deben ser ensayadas en varias especies de animales, debido a que posiblemente afecten a cada especie de manera distinta (Marovac, 2001). Si los estudios resultan ser esperanzadores, se solicita la patente del compuesto. Además, se solicita un permiso a la FDA en EEUU (Estados Unidos) o a EMEA (Agencia Europea de Medicamentos). Este permiso llamado IND (investigational New Drug Application) por la FDA, autoriza al patrocinador, generalmente una compañía farmacéutica, a realizar los estudios clínicos. Ya se podría continuar con la siguiente fase que conlleva realizar estudios en humanos (Cruces, 2015).

5.3.3. FASE CLÍNICA:

En este punto de la investigación, se observa el comportamiento del fármaco en los seres humanos y así poder confirmar si se trata de un compuesto adecuado para tratar la enfermedad. Los estudios realizados en esta fase deben llevarse a cabo de acuerdo a las Buenas Prácticas de Laboratorio. Esto le da la validez adecuada a los estudios realizados en Europa para el registro de productos de EEUU o Japón (Marovac, 2001). Los investigadores deben redactar de forma detallada los ensayos clínicos que van a hacerse: número de participantes, criterios de selección de pacientes entre otros parámetros a tener en cuenta.

Hay que tener en cuenta que cuando se trata de un medicamento destinado al uso humano, estos ensayos clínicos requieren la aprobación de comités éticos de investigación clínica, los cuales se encargan de supervisar que no se abolan los derechos y el bienestar de los pacientes (Merck et al., 2016). Este punto ha generado siempre cierta controversia, fundamentalmente con la participación de mujeres y niños en los ensayos clínicos. Es por eso, que los niños no están incluidos en los ensayos hasta que el fármaco ya se ha estudiado por completo en adultos y se conoce, a no ser que el medicamento sea de uso pediátrico. Las mujeres fértiles en un principio fueron excluidas, pero luego volvieron a tenerse en cuenta a la hora de realizar estos estudios, evitando a las embarazadas (Marovac, 2001). Lo cierto es que cuanto más heterogéneos

sean los grupos de estudio, más se asemejarán a la población real y más exactos serán los resultados.

Se estima que muchos de los efectos secundarios producidos por los fármacos en estudio, no se identifican en la fase preclínica, sino que estos aparecen en los ensayos clínicos que se realizan a humanos (Guerrero, Lorenzana-Jiménez, 2009).

-FASE UNO: es llamada fase de farmacología clínica, es donde por primera vez se pone en contacto el fármaco con los humanos. Los estudios se realizan en voluntarios sanos, siendo estos entre 20-100 y se prueban en ellos varias dosis. En esta fase se pretende determinar la toxicidad, perfil de seguridad, rango de dosis eficaz y vía de administración. También se empiezan a observar las primeras reacciones adversas comunes. Las pruebas realizadas suelen ser no ciegas, es decir, tanto el investigador como el sujeto en estudio son conscientes del fármaco que se está administrando y suelen durar entre seis meses y un año (Guerrero, Lorenzana-Jiménez, 2009).

-FASE DOS: si el fármaco supera con éxito la fase 1, pasa a ser probado en pacientes con una enfermedad concreta a tratar. El propósito primordial de esta etapa es valorar la eficacia, mediante la relación dosis-respuesta, frente a la enfermedad para la cual ha sido desarrollado. Esta etapa, requiere a un número de 50-500 pacientes con la enfermedad. El personal encargado de realizar esta fase debe estar lo suficientemente cualificado y debe ser conocedor en profundidad de la patología a tratar. Se realizan dos grupos, a uno de ellos se les dará el fármaco en cuestión y al otro grupo un placebo. Con lo cual los estudios se realizan en ciego, donde los sujetos desconocen el tratamiento que se les está administrando. Todo este proceso suele transcurrir entre 2 y 5 años y es la etapa donde más moléculas son eliminadas del estudio por no superar los requisitos exigidos. Aquí se decide si avanzar a la siguiente fase y proceder a realizar los ensayos clínicos a un número de personas mucho mayor (Bustamante, 2001).

-FASE TRES: antes de esta fase se ha establecido la eficacia y seguridad del fármaco en estudio. (Manual MSD) Lo que se procede a hacer entonces es un estudio a gran escala, donde el número de pacientes es de decenas de miles; para lograrlo, el mismo ensayo se lleva a cabo en distintos centros hospitalarios y hasta en distintos países. En estos estudios la selección de sujetos es mucho menos estricta que en las dos fases anteriores.

Por tanto, las características con las que cuentan estos estudios son: de acceso expandido, multicéntricos, emplean investigadores menos especializados, una población más general y son de más larga duración (Campillo, Fernández, 2018). Para evitar sesgos, los participantes son asignados aleatoriamente al grupo donde se administra el fármaco o al grupo control (donde se administra el placebo), con el fin de que los grupos sean homogéneos. Además, los estudios son realizados en doble ciego, donde ni el investigador ni los pacientes sometidos al estudio tienen conocimiento del tratamiento que se les está dando. En esta fase se pretenden documentar la mayoría de los efectos adversos, incluso efectos secundarios graves que no han aparecido en las fases anteriores. Por último, en esta fase se incluyen también los estudios de superioridad y los de no inferioridad, todo ello se lleva a cabo exponiendo la droga en estudio con un comparador y así poder establecer el efecto terapéutico. Este es el último paso antes de ser aprobado para que se comercialice (Rendón-Macías, 2019).

-FASE CUATRO: una vez superados los estudios preclínicos y las tres etapas de la fase clínica, el fármaco queda validado y puede ser comercializado. Pero la incertidumbre sobre la eficacia y seguridad del fármaco siguen existiendo, como su influencia sobre la morbilidad y mortalidad. En esta fase los estudios que se realizan son estudios de cohortes, realizados a poblaciones mucho más grandes y en períodos de tiempo más largos que los implicados en el resto de fases anteriores. Otra de las diferencias con los estudios de las otras fases recae en que carecen de grupo control, ya que se trata de estudios epidemiológicos. El principal objetivo en este punto del proceso es evaluar el beneficio/riesgo del medicamento ya comercializado tras administrarlo en largos períodos de tiempo (Herrero F, Tato F, 1999). El control en esta etapa es esencial por parte de las agencias regulatorias, cada tres meses, durante el primer año, cada seis meses, durante el segundo y finalmente cada año, se deben mandar informes sobre posibles efectos adversos, daños colaterales, reacciones alérgicas o posibles errores a la hora de ejercer su acción farmacológica (Magos, Lorenzana-Jimenez, 2009). Se han dado casos en los que fármacos aprobados por la FDA, tras haber pasado los estudios de fase 3, han sido retirados del mercado debido a que se han detectado efectos adversos graves en la fase 4 (Armijo JA, Adin J, 2003).

Para que se den interferencias confiables, los grupos de estudio a comparar deben ser similares. Por eso, el sesgo de selección continúa siendo un problema relevante en la investigación de fármacos (Marañon T, León R, 2015).

FASE	OBJETIVO
FASE 0 O PRECLÍNICA	Estudios de toxicidad y establecimiento del índice terapéutico del fármaco.
FASE I EN VOLUNTARIOS	Seguridad del fármaco.
FASE II Y III	Eficacia y seguridad del medicamento y establecimiento de la relación eficacia-toxicidad.
FASE IV POSTCOMERCIALIZACIÓN	Valoración de la seguridad del fármaco en las condiciones habituales de uso.

Tabla 2. Fases del desarrollo de un fármaco (Armijo et al., 2001).

5.4. ANÁLISIS DE PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL MÉTODO HIGH THROUGHPUT SCREENING:

En primer lugar, para conseguir que la técnica de detección de compuestos sea exitosa y robusta se deben tener en cuenta una serie de factores, como pueden ser:

-Conseguir un funcionamiento óptimo basándose en parámetros estadísticos como Z (coeficiente de ventana), CV (coeficiente de variación), S/B (ventana del ensayo, representa la separación entre C1 (control del 100% de actividad biológica) y control del 0% de actividad biológica), y en que dichos parámetros se encuentran dentro de los límites fijados.

-Alto rendimiento.

-Alta precisión.

-Sensibilidad adecuada (capacidad de detectar compuestos débilmente activos).

-Minimizar costes y tiempo siempre y cuando sea posible.

Finalmente, una vez verificado que el ensayo cumple con los requisitos establecidos, se puede proceder a la fase HTS propiamente dicha (González I, Sanz A, 2013).

El método HTS produce una gran cantidad de datos, los cuales deben ser procesados de manera adecuada y eficiente. La calidad de los datos obtenidos depende mayoritariamente de la precisión del ensayo HTS, ya que el objetivo final es poder identificar un compuesto hit de uno que no lo es, además los volúmenes con los que se trabaja suelen ser muy pequeños, por lo tanto, para que el proceso llegue a ser exitoso es necesario contar con varios parámetros de control que validen y supervisen el rendimiento y la precisión del proceso (Ji-Hu Z, Chung T, Oldenburg R). El coeficiente de ventana (Z) es uno de los parámetros estadísticos más significativos, y representa la capacidad que tiene el ensayo para identificar un hit con unas condiciones y screening definidos. Se considera un coeficiente de ventana óptimo cuando $Z' \geq 0.4$. Estos parámetros pueden verse obstaculizados por diversos problemas que afectan a la calidad del resultado del ensayo. Estos son específicos del ensayo o del compuesto, y como ejemplo se puede hacer referencia a los falsos positivos, que no son más que compuestos biológicamente inactivos que parecen ser activos en el ensayo. Este tipo de compuestos causa un problema bastante notable ya que pueden obtenerse como resultado final más falsos positivos que aparecen como aciertos, que compuestos verdaderamente activos. Igualmente, los falsos negativos, son compuestos que aparecen como inactivos biológicamente siendo todo lo contrario, esto conlleva a que se pierdan compuestos que podrían ser útiles en la obtención de fármacos. Afortunadamente existen técnicas de reconocimiento de patrones para ayudar a identificar y corregir algunos de estos problemas (Harper G, Pickett SD, 2006).

Otro problema clave en el HTS es la prevalencia de inhibidores inespecíficos. Estas moléculas actúan sobre otros objetivos no relacionados con el estudiado en el ensayo y por tanto pueden alterar los resultados. Esto puede conducir a resultados engañosos (Feng, B et al., 2005). En la figura 6 se observa que los compuestos que parecen ser activos contra la quinasa y los objetivos de la proteasa actúan en el cribado de quinasas a través de un mecanismo no específico.

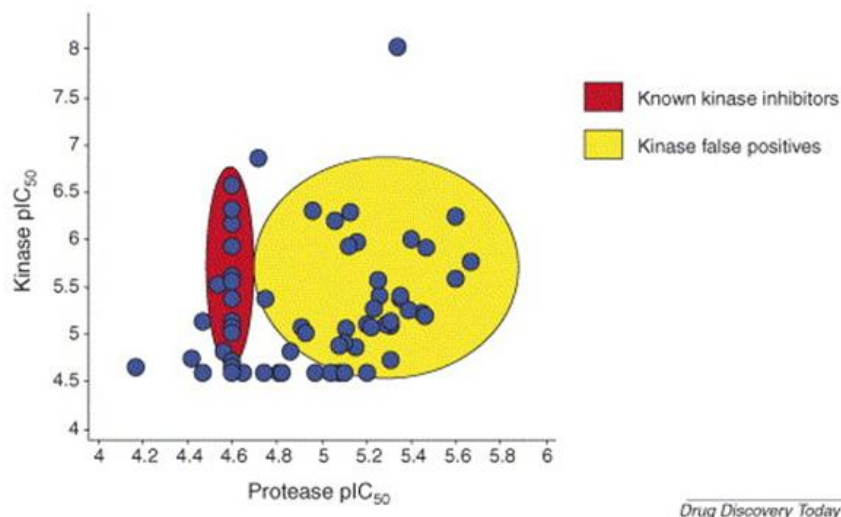


Figura 7. Ejemplo de compuestos con mecanismo inespecífico (Feng, B et al., 2005).

Para poder analizar los datos que se obtienen a partir de ensayo, son necesarias una serie de aplicaciones y programas informáticos con los que poder trabajar. Entre las más importantes se podrían destacar:

- ActivityBase, capaz de calcular actividades de miles de compuestos al mismo tiempo.
- Spotfire, se trata de una plataforma informática de software que permite manipular gran cantidad de datos y compararlos.
- SODA, herramienta que nos permite ver en tiempo real la calidad de nuestro ensayo, mostrando los valores de Z' y los CV (González I, Sanz A, 2013).

$M\sigma$ COEFICIENTE DE VENTANA: $Z' = 1 - (3\sigma_{C+} + 3\sigma_{C-}) / |\mu_{C+} - \mu_{C-}|$

$CV = 100 \times SD / \text{Mean}$

$S/B = (\text{mean signal} / \text{mean background}) \times d$

5.5. EMPLEO DE MÉTODOS HIGH THROUGHPUT PARA COMBATIR ENFERMEDADES COMO LAS PRODUCIDAS POR HCMV Y TRIPANOSOMA CRUZY:

El citomegalovirus (HCMV) es un herpesvirus que causa infecciones en humanos. Presenta el genoma de ADN más grande dentro de toda su subfamilia (Dunn et al., 2003;

Fields et al., 2007 ; Sijmons et al., 2014 ; Marti-Carreras y Maes, 2019). Es capaz de infectar a células endoteliales, epiteliales, células derivadas de linajes mieloides y fibroblastos (Sinzger et al., 2008). El HCMV es un virus que establece interacciones complejas con el hospedador, lo cual dificulta el estudio de este en el organismo y como consecuencia también el desarrollo de un fármaco capaz de combatir a tal patógeno.

Ayudarse de los métodos de alto rendimiento como herramienta para estudiar las interacciones huésped-virus que se establecen concretamente con este tipo de patógeno, ha dado importantes contribuciones en el caso del HCMV. Como estrategias de alto rendimiento para poder analizar las complejas interacciones que se dan entre un huésped y un virus, pueden mencionarse la secuenciación de ARN (utilizada para cuantificar los niveles de ARN) y la espectrometría de masas que permiten monitorizar la expresión de los factores virales y del huésped en el proceso de la infección (Weekes et al., 2014; Beltran et al., 2016).

La técnica de Splicing alternativo (AS) es un proceso que se da de forma espontánea en el organismo y genera múltiples isoformas de ARNm mediante el uso de diferentes combinaciones de exones, es decir, genera distintos mensajes genéticos a partir de una única secuencia genómica (Valcárce, Centro de Regulación Genómica. Barcelona, 2013). Utilizando la técnica RNA-seq se puede analizar cómo AS produce alteraciones en el ARN del huésped tras la infección en este caso por HCMV. Esto es un paso hacia delante de todo lo que supone la integración de métodos de alto rendimiento, guiarán hacia un futuro atractivo para la investigación de HCMV y sobre todo para el descubrimiento de nuevas terapias antivirales (Chen-Hsuin, Gray, 2020).

La enfermedad de Chagas (EC), causa al año solamente en América más de 10.000 muertes. El tratamiento farmacológico que existe tiene una eficacia baja y presenta importantes efectos adversos. Partiendo de este problema, se trató de diseñar un fármaco que fuese más específico por las moléculas dianas y solventar así los problemas de eficacia y toxicidad. El blanco terapéutico en esta enfermedad sería la cruzaina, es una cisteín proteasa perteneciente a la familia de las catépsinas (Herrera E, Elsa V, 2019). Se llevó a cabo un cribado de alto rendimiento (HTS) de una biblioteca de compuestos, ZINC15, empleando la estructura N-acilhidrazona para acotar la selección de

compuestos y posteriormente se llevó a cabo un estudio de acoplamiento molecular junto con la enzima cruzaina. Tras el proceso de selección, se escogieron cuatro compuestos con posible actividad tripanocida y capaces de inhibir la enzima, esto se estudió *in vitro* y se obtuvo que uno de los compuestos, mostraba en ratones actividad tripanocida y efecto inhibitorio sobre las proteasas del parásito. Aunque actualmente se siga buscando un tratamiento eficaz que cuente con inhibidores dirigidos a la enzima cruzaina, los métodos de alto rendimiento ya han supuesto un importante avance y posiblemente permitan encontrar nuevos y mejorados compuestos (Stoppani A, 1999).

5.6. INFLUENCIA DE TÉCNICAS BIOFÍSICAS EN EL DESARROLLO DE FÁRMACOS MEDIANTE HTS:

Durante la última década, se ha demostrado que la aplicación de técnicas como la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) o la Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC) en el método HTS conduce a resultados más precisos debido a su alta capacidad de detección de interacciones proteína-ligando por muy débiles que sean (Rutger, 2016). Un falso positivo implicaría un gran coste económico además del tiempo invertido para que finalmente se tenga que rechazar el compuesto. El objetivo de acoplar estas técnicas no es más que centrarse en evitar que los cabezas de serie resulten ser falsos positivos. O en el caso de que el compuesto sí sea adecuado, brindar confianza y dar solidez al ensayo (Pita, Pértegas, 2003).

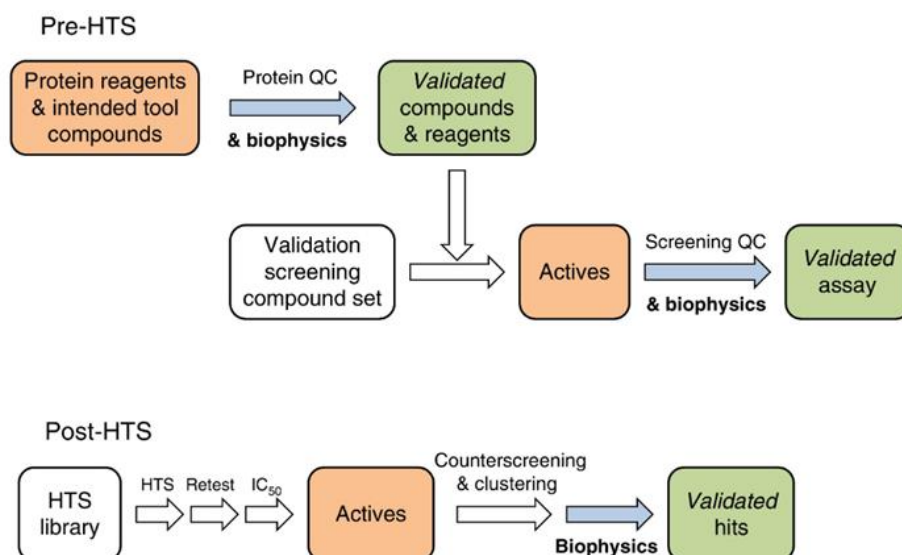


Figura 8. Integración de la biofísica en proyectos de búsqueda de resultados impulsados por HTS. Las flechas azules indican estudios biofísicos de compromiso con el objetivo. Los recuadros naranja y verde indican herramientas y resultados sin procesar y validados, respectivamente (Rutger, 2016).

En la siguiente tabla, se muestran varios proyectos en los que se llevó a cabo un método de alto rendimiento (HTS). Los compuestos que presentan una baja capacidad de interacción con la diana, pueden acabar no siendo exitosos. Ya que esta característica determina la probabilidad de que puedan modular un blanco terapéutico, asociado a una patología. Como consecuencia de lo explicado, se pueden generar falsos positivos. En la tabla 3, se ilustra lo sucedido. En la primera columna se indica el tipo de proteína, seguido del tipo de ensayo HTS que se lleva a cabo, la técnica biofísica empleada tras encontrar un problema en el proceso y por último la solución que dicha técnica biofísica habría conseguido dar.

	Tipo de ensayo	Perfiles biofísicos	*cpds perfilados	Problema observado	Impacto actividad elaboración de perfiles	Hallazgos y/o alcances para un impacto adicional
Oxidasa	Ensayo basado en células que monitorizan la inhibición de la liberación de peróxido por medio de un colorante fluorescente	RMN	28	La mayoría de los hits no se unieron de forma reversible a la proteína. Posteriormente, se demostró que la mayoría tenía actividad redox	Ninguno de los compuestos redox progresó químicamente.	El perfil biofísico previo a HTS habría identificado problemas redox, que habrían remodelado el ensayo HTS, o dado como resultado un cribado secundario más riguroso
Aspartil proteasa	Secreción de sustrato del sistema celular.	RMN, SPR, ITC, Tm	65	Todos los ensayos biofísicos mostraron una gran caída de la potencia en el ensayo celular debido a afinidades débiles.	Ninguna de las series exitosas fue seleccionada para obtener compuestos	El perfil biofísico previo al HTS habría evitado que el HTS se ejecutara con estas condiciones

Tabla 3. Muestra las características de dos proyectos fallidos en el intento de desarrollar nuevos fármacos (Rutger, 2016).

5.7. LIMITACIONES DEL ENSAYO HIGH THROUGHPUT SCREENING:

Como cualquier proceso, el método de cribado de alto rendimiento (HTS) presenta algunas limitaciones y puntos concretos del proceso que aunque se están abordando, hay que combatirlos. Las necesidades más notables de dicho método en el laboratorio suelen ser la falta de ensayos más robustos y un equipo más numeroso, seguidos de mejoras en los procesos y equipos de manipulación de líquidos y una mejoría también en las bibliotecas de compuestos. Mejorando la calidad de estos cuatro elementos las probabilidades de éxitos serían aún mayores (Granados G et al., 2014). En la figura 9 se observa gráficamente cuales son los cuatro principales requisitos a mejorar en el método HTS, destacando en primer lugar la robustez de los ensayos, en segundo lugar,

un aumento del equipo de laboratorios y ambos seguidos de mejoras en el proceso y manejo de los equipos con compuestos líquidos y una mayor diversidad de compuestos.

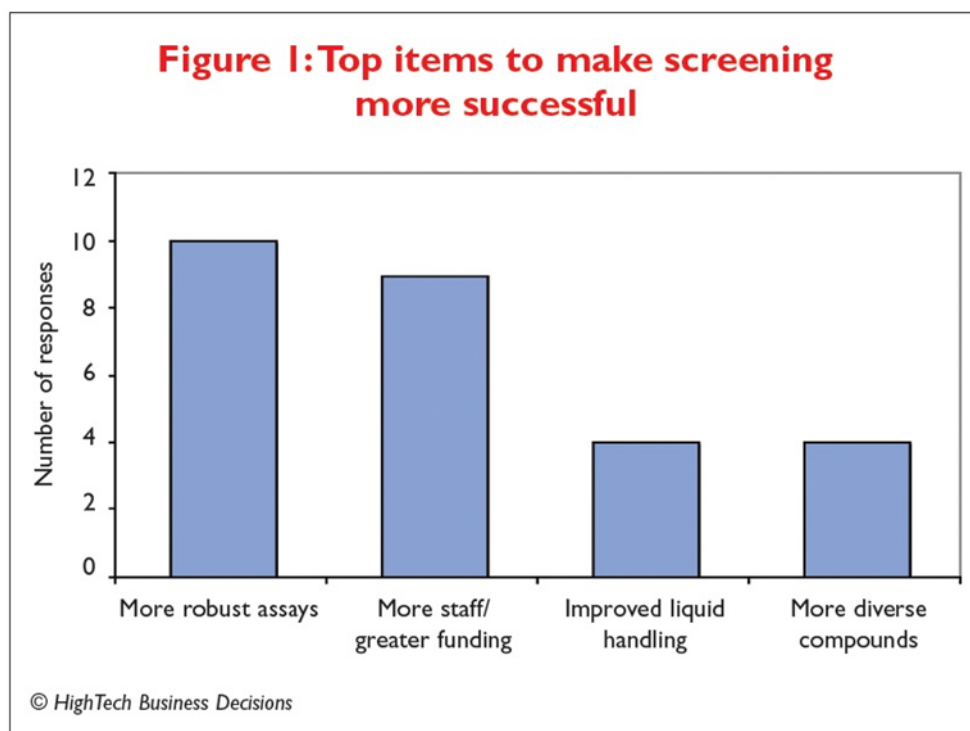


Figura 9. Muestra los cuatro elementos a mejorar según varias entrevistas a directores de laboratorios especializados en HTS (HighTech Business Decisions, 2007).

Las técnicas para obtener fármacos, deben cambiar conforme se van dando más avances. Afortunadamente, los métodos de alto rendimiento están tratando de acoplarse a las nuevas exigencias y así vencer los principales obstáculos que se les presentan:

1. Métodos de ensayo y detección (bioware).
2. Manejo de líquidos y robótica (hardware).
3. Flujo de procesos y gestión de la información (software).

5.8. ACTUALIDAD:

Los métodos computacionales de alto rendimiento podrían acabar teniendo un papel crucial en la investigación de la COVID19 ya que, ayudarían a conseguir acelerar el

desarrollo de alguna terapia o vacuna efectiva contra este virus. Los sistemas de cómputo de alto rendimiento con altísimas capacidades de rendimiento (FLOPS) podrían ampliar en gran medida la capacidad de analizar nuevos compuestos con actividad antivírica y permiten experimentar a gran velocidad la búsqueda de algún compuesto activo frente a una enfermedad. Contar con una plataforma de cribado da la posibilidad de probar las colecciones de posibles compuestos antivirales, ya sean naturales o productos sintéticos, junto con la propia enfermedad. La plataforma entonces obtiene qué compuestos son activos a determinado patógeno productor de la enfermedad. El método High-throughput screening (HTS), presenta una gran amplitud de detección, lo que evita tener que realizar pruebas *in vivo* (Charlebois et al., 2020). Esta técnica podría llegar a ser un gran aliado en el descubrimiento de nuevos antivirales.

6. CONCLUSIONES

Como consecuencia de los numerosos avances desarrollados en los últimos tiempos, el largo camino del descubrimiento de nuevos fármacos por medio de los métodos High-throughput, ha supuesto un aumento de las posibilidades de encontrar nuevas moléculas activas que llegan a ser comercializadas, por ser eficaces frente a determinadas enfermedades. Afortunadamente, a día de hoy la gran mayoría de enfermedades agudas cuentan con su tratamiento específico, el problema recae en las de origen crónico, tales como diabetes, artritis reumatoide, SIDA. El desafío para la ciencia es entonces encontrar terapias que consigan actuar en el blanco exacto, es decir fármacos lo más específicos posibles con el fin de minimizar efectos adversos y mejorar la calidad de vida de pacientes con enfermedades de carácter crónico. Las técnicas High-throughput podrían conseguir que la meta estuviera un poco más cerca.

Hasta la fecha, no se conoce ningún tratamiento contra la COVID-19, encontrar una terapia o un compuesto capaz de destruir al virus patógeno es desde hace varios meses el principal objetivo de la ciencia. Estos ensayos computacionales podrían acelerar el desarrollo de un fármaco efectivo. De cualquier manera, se espera que las aportaciones de los métodos de alto rendimiento mejoren el diseño de fármacos prácticamente en todos los aspectos.

7. REFERENCIAS

Albaladejo G. "Diseño de fármacos basado en la estructura." 2016.

Albericio F. "Developments in peptide and amide synthesis." *Current opinion in chemical biology*. 2004; 211-221.

Arranz JN, Sanz AI. Empleo de ensayos de High Throughput Screening (HTS) aplicado al estudio de canales iónicos y otras dianas terapéuticas. *Dianas (UAH)*. 2014; 1:8.

Armijo JA, Adin J. "Farmacología clínica: objetivos y metodología." *Farmacología humana*, 4ª ed. Barcelona: Masson. 2003; 191-218.

Bader A, Onken A, Tracht K. "Order Release for Temporary Paced Sequences in Flexible High Throughput Systems." *Procedia CIRP*. 2018; 689-694.

Banerjee P, Rosfsky M, 1997.

Bejarano Alberto. Cell-Based High-Throughput Screening Assay for Identification of G-Protein-Coupled Receptors Agonists and Antagonists. *Dianas*. 2013; 2.

Borroto OM, Hernández Y, García JM, Grau R, Marrero Y, Cruz M. "Perspectiva general sobre el proceso de desarrollo de fármacos y las técnicas de cribado virtual basadas en la similitud molecular." *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. Vol. 79. No. 4. Real Academia Nacional de Farmacia, 2013.

Bustamante C. Fases del desarrollo de un nuevo medicamento. *Farmacología Clínica Universidad de La Sabana*. 2001; 123-134.

Campillo N, Fernández MC. *Cómo se fabrica un medicamento*. Los Libros de la Catarata, 2018.

Carrasco-Rubio L, González E, Martínez J, Martínez I. "Estudio teórico de SFRP1 como nueva diana terapéutica para el tratamiento del Alzheimer." Universidad Alcalá de Henares. Facultad de Medicina.

Chen-Hsuin L, Gray F. "Virología de sistemas y citomegalovirus humano: uso de enfoques de alto rendimiento para identificar nuevas interacciones huésped-virus

durante la infección lítica". *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10. 2020; 280.

Chivian, E, Bernstein A. *Preservar la vida: de cómo nuestra salud depende de la biodiversidad*. Fondo de Cultura Económica, 2015.

Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. *Origen de los Medicamentos*. 2017 [en línea]. [Consultado en Agosto 2020]. Disponible en:

<https://www.portalfarma.com/Ciudadanos/saludpublica/consejosdesalud/Paginas/2212origenmedicamentos.aspx>

Cruces ME. "Estudios pre-clínicos de toxicidad de futuros fármacos." 2015.

Eldridge G, Vervoort H, Lee CM, Cremin P, Williams C, Hart S et al. Método de alto rendimiento para la producción y análisis de grandes bibliotecas de productos naturales para el descubrimiento de fármacos. *Química analítica*. 2002; 74 (16), 3963-3971.

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas Universidad Nacional del Rosario. *Guía de trabajos prácticos. "Introducción a la Química Orgánica en fase sólida y diversidad molecular."* 2016.

Feng B, Shelat A, Doman T, Kip G, Shoichet K. "High-throughput assays for promiscuous inhibitors." *Nature chemical biology* 1.3. 2005; 146-148.

Fullana Alzamora, Coloma. "Síntesis en fase sólida y química combinatoria. Ejemplos en el campo de los heteroclitos." 2017.

Furlán R.L.E, Mata E.G. *Química Combinatoria. Metodologías relacionadas con la generación de diversidad molecular*. Editorial Fondo de Cultura Económica, México. 2012.

Gavin H, Pickett S. "Methods for mining HTS data." *Drug Discovery Today* 11.15-16. 2006; 694-699.

Gómez de Vírgala A. "Comparativa de cultivos en 2D versus 3D como modelo de ensayo para fases preclínicas del desarrollo de fármacos anti-tumorales y su aplicación al cribado de alto rendimiento de una librería de compuestos comerciales." 2019.

González I, Sanz A. Parámetros estadísticos que respaldan la calidad de un ensayo HTS a lo largo de sus etapas: GPCR orexigénico como diana. 2013.

Gonzalez D. Implantación de una plataforma de cribado de alto rendimiento para el descubrimiento de nuevos compuestos anti-sars-cov-2. CSIC. [Actualizado el 12 de mayo de 2020]. [Consultado en 2020]. 171.

Granados G, Waksman de Torres N, Castro R, Salazar R. "Ensayos de alto rendimiento utilizados en farmacognosia: Selección, optimización y validación de métodos de inhibición enzimática por espectrofotometría UV-visible." *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research* 2.1. 2014; 1-13.

GSK ESPAÑA. Informe corporativo. 2017.

Guerrero A, Lorenzana-Jiménez M. "Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos." *Rev Facultad Medicina. UNAM.* 52.6. 2009.

Herrera E, Elsa V. "Diseño racional de nuevos inhibidores de tripanosoma cruzi para el tratamiento de la enfermedad de Chagas". (2019).

Herrero F, Tato F. Bases metodológicas del ensayo clínico. Univ Santiago de Compostela, 1999.

Hertzberg R, Pope A. "Cribado de alto rendimiento: nueva tecnología para el siglo XXI". *Opinión actual en biología química.* 2000; 445-451.

Ji-Hu Z, Chung T, Oldenburg R. "Un parámetro estadístico simple para su uso en la evaluación y validación de ensayos de detección de alto rendimiento". *Journal of biomolecular screening* 4.2. 1999; 67-73.

Kämpf C, Specht M, Scholz A, Puppel SH, Doose G, Reiche K et al. Uap: análisis de datos HTS robusto y reproducible. *BMC Bioinformática.* 2019; 20 (1): 664.

Marañón T, León R. "La investigación clínica. Un primer acercamiento." *Humanidades Médicas* 15.1. 2015; 163-184.

Marín N, Fernández R. "Uso de bibliotecas químicas virtuales para el diseño de medicamentos."

Medina-Franco JL, Giulianotti MA, Welmaker GS, Houghten RA. "Cambio del paradigma único al de múltiples objetivos en el descubrimiento de fármacos". *Drug discovery today*. 2013; 495-501.

Merck Sharp & Dohme. "Proceso de investigación, desarrollo y aprobación de un fármaco." Informe de MDS. Madrid: MDS; 2016. NOND-1117228-0050.

Molina Pinilla I. Tema 7: Química combinatoria. *Química Farmacéutica 1*. Facultad de Farmacia. 2019.

Oyonarte M. Tema central: Enfermedades pulmonares en el adulto. *Revista Médica Clínica Las Condes*. Vol. 26. Núm. 3. 2015; 313-324.

Peláez F. "Paradigmas actuales en las etapas tempranas del proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos." *Anales de Química*. Vol. 107. No. 1. 2011.

Pérez-Sánchez H, Cano G, García-Rodríguez J, Cecilia JM. "Descubrimiento de fármacos basado en cribado virtual refinado con enfoques neuronales paralelos." *Revista Internacional de Métodos Numéricos para Cálculo y Diseño en Ingeniería*. 2015; 207-211.

Pita S, Pértegas S. "La fiabilidad de las mediciones clínicas: el análisis de concordancia para variables numéricas [Internet]." *Atención Primaria en la red*. Fistera.com.[Actualizado el 12 de Enero de 2004].[Consultado en 2020]. Disponible en: http://www.fistera.com/mbe/investiga/conc_numerica/conc_numerica.asp (2013).

Pupo M, Borges M, Cezar P. "Biología química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais." *Química Nova*. 2007; 1446-1455.

Ramírez R, Soto NE. "Estudios Pre-clínicos y Clínicos." 2013; 1-20.

Rendón-Macías E, Valenzuela M, Villasis-Keever MA. Sesgos en los estudios de pruebas de diagnóstico: implicación en la estimación de la sensibilidad y especificidad. *Rev. alerg. Méx.* vol.66 nº2, 2019.

Ritter J, Flower R, Henderson G, Kong Y, MacEwan D, Rang H. Rang y Dale. *Farmacología*. 9ª ed. Madrid. Elsevier; 2020.

Roca A, Gutierrez L, Gavilán H, Fortes ME, Veintemillas-Verdaguer S, Del Puerto M. "Estrategias de diseño para nanopartículas de óxido de hierro magnético de forma controlada". Revisiones avanzadas de entrega de medicamentos. 2019; 68-104.

Rubira E. Medicamentos: Un viaje a lo largo de la evolución del descubrimiento de fármacos. Vol. 1. Universidad Santiago de Compostela, 2008.

Saldívar-González F, Prieto-Martínez F, Medina-Franco JL. "Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional." Educación química 28.1. 2017; 51-58.

San Román L. Lección inaugural: "Desarrollo de Nuevos Fármacos desde La Invención de la Farmacia." Universidad de Salamanca. Facultad de Farmacia. 2013.

Sierra A. "Desarrollo histórico y perspectivas de la síntesis de péptidos en fase sólida." 2017.

Sinzger C, Digel M, Jahn G. "Tropismo de células de citomegalovirus". Citomegalovirus humano. Springer, Berlín, Heidelberg. 2008; 63-83.

Skiba Y. "Métodos y esquemas numéricos: un análisis computacional". UNAM, 2005.

Stoppani A. "Quimioterapia de la enfermedad de Chagas." Medicina-Buenos Aires-59. 1999; 147-165.

Weekes M, Tomasec P, Huttlin E, Fielding C, Nusinow D, Stanton R. "Quantitative temporal viromics: an approach to investigate host-pathogen interaction." Cell 157.6. 2014 ;1460-1472.

Zúñiga, A, Padilla J, Rojo A. "Simulación del reconocimiento entre proteínas y moléculas orgánicas o docking. Aplicación al diseño de fármacos." Mensaje Bioquímico. 2002; 129-145.