

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

GRADO EN FARMACIA

TRABAJO FIN DE GRADO



# **DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS BASADO EN FRAGMENTOS**

ALUMNA: AMANDA ZAMORA ROLDÁN

TUTOR: FERNANDO IGLESIAS GUERRA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y FARMACÉUTICA

TFG DE CARÁCTER BIBLIOGRÁFICO

## **RESUMEN**

El descubrimiento de fármacos basado en fragmentos, conocido como FBDD (Fragment Based Drug Design), es una estrategia para la búsqueda de nuevos fármacos, incluido en las técnicas de cribados sistemáticos. El proceso comienza seleccionando una biblioteca de fragmentos para encontrar los *hits* iniciales que pueden llegar a ser *leads*. Esta biblioteca es sometida a un cribado a altas concentraciones y sensibilidad, para detectar los fragmentos que son capaces de unirse de forma débil a la diana terapéutica. En este método, el cribado utilizado es el cribado basado en fragmentos (FBS), ya que presenta numerosas ventajas con respecto al cribado de alto rendimiento (HTS). El primer método biofísico empleado para detectar los enlaces débiles formados entre el fragmento y target fue la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR). Una vez detectados los *hits*, el objetivo es obtener el compuesto líder (*lead*), para ello se lleva a cabo la optimización de los fragmentos, es decir, sometemos a los *hits* a procesos de expansión o combinación.

En los últimos años, se han utilizado otras técnicas para mejorar la detección de los fragmentos y así obtener *leads* con mayor probabilidad de convertirse en fármaco. Entre estas técnicas destacamos la electroforesis capilar de afinidad (ACE), mediante este método se está investigando la proteína HSP90 como objetivo terapéutico en oncología, y los métodos computacionales, en el que destaca el cribado virtual que permite reducir de forma significativa el número de ensayos llevados a cabo y con ello reducir el tiempo del proceso.

Existen numerosos fármacos que se encuentran actualmente en ensayos clínicos obtenidos mediante FBDD como Venetoclax y Zelboraf.

**Palabras claves:** *hit*, *lead*, optimización, método computacional, NMR.

## ÍNDICE:

1. INTRODUCCIÓN.....	Pág.4.
2. OBJETIVOS.....	Pág.4.
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	Pág.5.
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	Pág.5.
4.1. DEFINICIÓN Y DESARROLLO DEL FBDD.....	Pág.5.
4.2. APLICACIÓN DE NUEVAS TÉCNICAS EN FBDD.....	Pág.13.
4.2.1. Electroforesis capilar.....	Pág.13.
4.2.2. Métodos computacionales.....	Pág.16.
5. EJEMPLOS REPRESENTATIVOS.....	Pág.18.
5.1. Descubrimiento a partir de fragmentos de un potente inhibidor de NAMPT.....	Pág.18.
5.2. Obtención mediante FBDD de potentes moduladores alostéricos positivos dirigidos a los receptores mGluR2.....	Pág.21.
6. CONCLUSIÓN.....	Pág.30.
7. BIBLIOGRAFÍA.....	Pág.31.

## **1. INTRODUCCIÓN**

El descubrimiento de fármacos basados en fragmentos, conocido como FBDD por sus siglas en inglés (Fragment Based Drug Desing), es un campo interdisciplinario, que se sirve de numerosas ciencias como la biología, química, física y la química farmacéutica entre otras.

La primera demostración relacionada con este campo fue en el año 1996, realizada por Laboratorios Abbott, de la mano de Suker et al. El documento fue publicado en 1996, el cual estaba enfocado como “relación estructura-actividad por resonancia magnética nuclear” (SAR por NMR).

La industria ha tenido un papel importante en el desarrollo de FBDD mediante la mejora de tecnologías emergentes y enfoque para su aplicación en el descubrimiento de fármacos.

También tiene gran importancia la Universidad en este campo, aportando la mayor parte del fundamento teórico.

En la década de los 2000, industria y universidad empezaron a formar una red de colaboración, demostrando que FBDD es un campo de investigación multidisciplinar de alta tecnología en el que especialistas de distintas áreas colaboran en el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos (Romasanta et al., 2018).

## **2. OBJETIVOS**

- Revisión bibliográfica con el fin de ofrecer una visión actual sobre el descubrimiento de fármacos basado en fragmentos (FBDD)
- Explicar el fundamento de la técnica del diseño de fármacos basado en fragmentos, enfocado como estrategia para la búsqueda de nuevos fármacos
- Comparar la técnica usada desde el comienzo con nuevas técnicas aplicadas al descubrimiento de fármacos basado en fragmentos
- Mostrar ejemplos de fármacos obtenidos a partir de fragmentos y desarrollar su procedimiento

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

Se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica, seleccionando artículos científicos relacionados con el descubrimiento de fármacos basados en fragmentos, la técnica de resonancia magnética nuclear para la detección de fragmentos, la aplicación de nuevas técnicas para el diseño de fármacos basados en fragmentos y fármacos obtenidos a partir de fragmentos. Esta búsqueda se hizo en las bases de datos Pubmed y Scifinder, a partir de palabras claves como FBDD (descubrimiento de fármacos basados en fragmentos), NMR (resonancia magnética nuclear), ACE (electroforesis capilar de afinidad y *computational approaches* (métodos computacionales).

Además, se recabó información de libros de Química Farmacéutica, los cuales hacía referencia a temas relacionados con el descubrimiento de fármacos basado en fragmentos y las técnicas utilizadas en el mismo.

### **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **4.1. DEFINICIÓN Y DESARROLLO DEL FBDD**

El descubrimiento de fármacos basado en fragmento ocupa un lugar importante en el ámbito de la química farmacéutica. Ésta tiene como objetivo principal el estudio de los fármacos desde el punto de vista químico y su metodología consiste en establecer la relación entre la estructura química del fármaco y su actividad biológica.

El FBDD es una estrategia para la búsqueda de nuevos fármacos, definiéndose fármaco como “sustancia pura, químicamente definida, extraídas de fuentes naturales o sintetizada en laboratorio, dotada de acción biológica, que puede o no ser aprovechada por sus efectos terapéuticos” (Avendaño, 2001). Está incluido en las técnicas de cribados sistemáticos. Las técnicas de cribados sistemáticos permiten explorar de modo preliminar el perfil farmacológico de una molécula, sirviéndose de amplias bibliotecas de compuestos que se someten a ensayos bioquímicos frente a una batería de dianas terapéuticas, es decir, macromoléculas biológicas donde el fármaco va a ejercer su acción (Cirilo et al., 2003).

El primer paso para llevar a cabo la estrategia del FBDD consiste en seleccionar una biblioteca de fragmentos, definiéndose fragmentos como moléculas orgánicas de peso molecular comprendido entre 100 y 300 Dalton (Da), para encontrar los *hits* iniciales que pueden convertirse en *leads*. Entendiendo por *hit*, compuesto que muestra selectividad biológica y cuya actividad excede de un determinado nivel y definiendo lead como un compuesto representativo de una serie con suficiente potencial como para ser considerado en un programa que desarrolla la búsqueda de un nuevo fármaco (Cirilo et al., 2003).

En el proceso de selección de la biblioteca se analizan fragmentos y bibliotecas de fragmentos que están disponibles comercialmente. Es importante seleccionar una biblioteca que cumpla algunos criterios primarios dependiendo del perfil de la diana terapéutica de interés, basándose en una diversidad tanto química como de tamaño. Entre estos criterios, está la elección de una biblioteca con compuestos de pequeño tamaño y que cumplan la regla del 3. Además, se descartan moléculas con grupos funcionales que puedan contribuir a una reacción química adicional, toxicidad o a la aparición de falsos positivos (Heidrich et al., 2019).

Una vez seleccionada la biblioteca, se hace un cribado a altas concentraciones y en condiciones de gran sensibilidad para detectar los fragmentos que se han unido débilmente al *target* o diana terapéutica de interés. Este cribado se conoce como cribado basado en fragmentos (FBS) y presenta numerosas ventajas frente al cribado de alto rendimiento (HTS) usado tradicionalmente.

HTS es un cribado farmacológico de alto rendimiento, que consiste en probar grandes colecciones de compuestos químicos o productos naturales para identificar moléculas biológicamente activas.

El FBS en comparación con HTS presenta ventajas como son: el número de compuestos cribados es menor debido a que tienen una mayor probabilidad de enlazarse al *target* por su pequeño tamaño; la optimización química es más fácil de llevar a cabo debido a que la interacción ha sido validada y conocida estructuralmente; al partir de moléculas de pequeño tamaño, la optimización conduce a *leads* o líderes cuyas masas moleculares están en el rango apropiado; el fragmento seleccionado presenta una gran proporción

de átomos implicados en la interacción con el target, con lo que los fragmentos se pueden describir como enlazantes eficientes, es decir, con altas energía de enlace por unidad de masa molecular (Singh et al., 2018).

En HTS los compuestos identificados son más potentes pero son enlazantes con menor eficiencia.

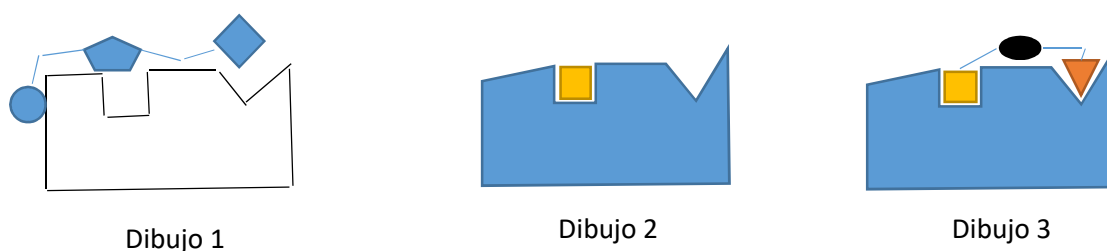


Figura 1. Comparación de fragmentos obtenido por HTS y por FBS

En la figura 1 se representa un *hit* obtenido por HTS. En el primer dibujo, podemos observar que, aunque el *hit* sea de un tamaño grande y presente numerosos puntos de contacto con la diana, no forma interacciones de calidad en los bolsillos claves de unión. Los bolsillos de unión representan la región específica del target al que se une el fragmento o *hit*.

En el dibujo número 2, podemos observar un fragmento de menor tamaño y capaz de establecer interacción con el sitio de unión de una mayor calidad, aunque posea menor afinidad global, ya que esa afinidad la puede adoptar en la etapa de optimización, añadiendo al fragmento otro fragmento adicional que establezca una interacción eficiente con otro bolsillo (dibujo 3), pudiéndose obtener el líder.

En general, FBS ofrece un mayor número de aciertos y eficiencias de enlace en comparación con HTS, aunque ambas técnicas han sido usadas en combinación por la industria farmacéutica y biotecnológica para acortar la fase inicial en el proceso de FBDD, llegándose a obtener series de compuestos líderes (Singh et al, 2018).

La eficiencia del enlace del ligando (Bembenek et al., 2009) se puede cuantificar como balance de energía libre por átomo pesado (no hidrógeno). La eficiencia del ligando (LE) se define como:

$LE = \Delta G / N^{\circ}$  átomos pesados

$\Delta G$  se obtiene de la constante de disociación del complejo:  $\Delta G = -RT \ln K_d$

También se puede expresar la eficiencia del enlace relacionándola con el peso molecular (PM):

PEI = % inhibición / PM donde PEI es el índice de eficiencia porcentual

BEI =  $pK_i$ ,  $pK_d$  o  $pIC_{50}$  / PM donde BEI es el índice de eficiencia del enlace.

Esta última, tiene como ventaja la inclusión de los hidrógenos.

Los fragmentos de la biblioteca de FBS deben cumplir la regla del 3 (Kirsch et al., 2019), ésta es una regla empírica para las propiedades *lead/fragment-like*, cuyas consideraciones son: peso molecular debe ser menor o igual a 300Da; el número de átomos donadores de puentes de hidrógeno debe ser menor o igual a tres; el número de átomos aceptores de puentes de hidrógeno debe ser menor o igual a tres; el logaritmo calculado (Hansch) del coeficiente de reparto n-octanol/agua debe ser menor o igual a tres. Además se incluye que la superficie del área polar sea igual a 60 Å<sup>2</sup> y que el número de enlaces rotables debe tener una media igual o menor a tres. Cumplir esta regla proporciona que en la etapa de optimización se siga dentro del rango farmacocinético favorable, es decir, nos facilita cumplir con la regla de Lipinski, que le confiere al fármaco una buena biodisponibilidad oral.

Existen diferentes métodos biofísicos para el cribado basado en fragmentos, es decir, para detectar los enlaces débiles entre el fragmento y *target*. Destaca la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR), ya que fue el primer método que se utilizó para tal fin y sigue en uso en la actualidad. En 1996, Shuker et al. publicó un estudio en el que convierte a la NMR en la técnica más popular para el cribado basado en fragmento, ya que puede detectar esa unión débil (Singh et al., 2018).

La espectroscopía de NMR se basa en una interacción entre los momentos magnéticos de los núcleos ( $\mu_n$ ) con un campo magnético externo ( $B_0$ ), produciéndose una separación de los niveles de energía, estando cada nivel asociado a una orientación diferente del momento magnético nuclear respecto al campo magnético externo. La diferencia de energía entre niveles sucesivos viene dada por:



$$\Delta E = \gamma_n \times \hbar \times B_0$$

Donde:

$$\mu_n = \gamma_n \times \hbar \times I_n$$

y:

-  $\hbar$  es la constante de Planck normalizada

-  $\gamma_n$  es la constante giromagnética

-  $I_n$  es el momento cinético del núcleo

En esta espectrometría la muestra es irradiada con radiación electromagnética en el rango de radiofrecuencias, produciendo la transición entre niveles de energía consecutivos (Carey y Giuliano, 2014).

Dentro de esta técnica los ensayos pueden dividirse en métodos que observan la proteína y métodos que observan el ligando (Jimenez, 2015). Los métodos basados en la proteína tienen una alta fiabilidad y sensibilidad, nos permiten detectar la unión de moléculas y estimar la energía enlazante. Como inconveniente requieren que la proteína sea marcada ( $^{15}\text{N}$  y/o  $^{13}\text{C}$ ) además de tener un peso molecular menor a 50kDa.

Los métodos basados en ligando requieren una menor cantidad de proteínas, ya que son muy sensibles, no requieren marcaje de la proteína ni limitan el peso molecular de la proteína. Nos permiten la identificación de los fragmentos que interactúan directamente con la proteína, pero no nos dan información sobre el sitio de unión del ligando.

Los métodos basados en la proteína son útiles para detectar la unión de moléculas y estimar la energía de la interacción enlazante. Se lleva a cabo mediante la técnica SAR by NMR (Relación estructura-actividad), requiriendo el marcaje  $^{15}\text{N}$  y un peso molecular menor a 40 KDa. El espectro de una proteína por NMR es complejo y requiere otras técnicas además de  $^1\text{H}$ -NMR. La primera técnica que se desarrolló después de la de protones fue la NMR de  $^{13}\text{C}$ , esta técnica se convirtió en una herramienta imprescindible para resolver los problemas estructurales biológicos. Posteriormente, se desarrollaron las técnicas bidimensionales, las cuales consisten en registrar espectros de dos núcleos diferentes, correlacionándolos. Para ello, se utilizan técnicas como el HSQC (correlación

heteronuclear) para detectar uniones  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  entre ligando y proteína. Se requiere la inserción de un plásmido con el gen que codifica la proteína, usando *Escherichia coli* como vector y haciendo que se pueda sobreexpresar. Se hace crecer al vector con el plásmido en medio enriquecido isotópicamente, es decir, en un medio que tenga solo  $^{15}\text{NH}_4\text{Ac}$  y glucosa como fuentes de carbono y nitrógeno. Con ello, conseguiremos que todos los núcleos del esqueleto tengan actividad en NMR, incluyendo hidrógeno, obteniéndose en el espectro un pico por cada aminoácido de la proteína (Sastre, 2017).

El procedimiento de la técnica bidimensional es el siguiente: en primer lugar se hace el HSQC de la proteína sola marcada con  $^{15}\text{N}$ , cumpliendo que su peso molecular sea menor a 40KDa. Después se hace el HSQC de la proteína más el ligando natural y por último, la proteína más los ligandos investigados (Zhang y Gellerstedt, 2007).

Los métodos basados en ligandos nos permiten una observación directa de la interacción del ligando con el receptor con alta sensibilidad y una identificación de fragmentos que interaccionan directamente con la proteína (mapeo de epítomos). Permite registrar todo tipo de espectros de NMR (Sastre, 2017).

La técnica usada es la de NMR de Diferencia de transferencia de Saturación (STD NMR), la cual permite la observación de las señales del ligando, independientemente del tamaño del receptor. El protocolo de dicha técnica consiste en escoger una frecuencia de irradiación de manera que afecte solo a señales de la proteína, permitiendo así la identificación del componente biológicamente activo por análisis directo de una mezcla (Singh et al., 2018).

Por último, una vez se han detectados los fragmentos de interés, el objetivo es obtener el compuesto líder (*lead*). Para ello, se lleva a cabo la optimización, que consiste en someter a los fragmentos seleccionados a procesos de expansión o combinación, generando así moléculas de mayor tamaño, afinidad, selectividad y con mejor farmacocinética.

La optimización se puede llevar a cabo mediante métodos de crecimiento, fusión y/o vinculación. El primero y más sencillo, nos permite obtener moléculas con mejores propiedades enlazantes, partiendo del fragmento y extendiendo sus interacciones a lo largo de toda la molécula objetivo (Aymami y Martinell, 2008).

Un ejemplo de optimización por crecimiento es un inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina (CDK), AT7519 (Singh et al., 2018). Partiendo de 500 fragmentos, se identificaron 30, los cuales poseían una estructura indazólica, pudiendo interactuar con el sitio de unión del ATP de CDK. En la siguiente figura, podemos observar los pasos de crecimiento desde el fragmento indazol hasta el fármaco AT7519.

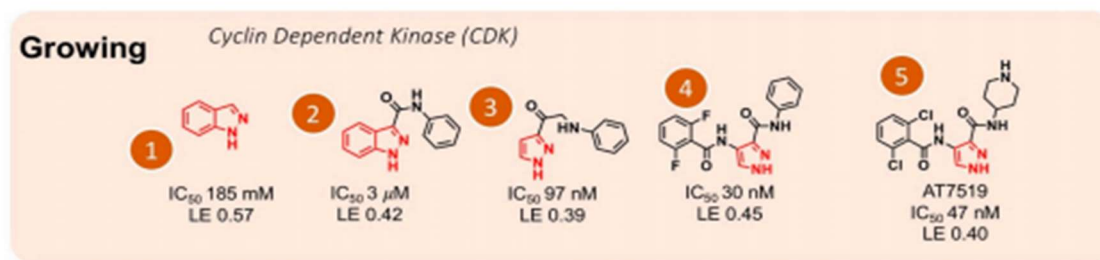


Figura 2. Optimización por crecimiento del fragmento.

Como se observa en la figura 2, partiendo del indazol, mediante crecimiento del fragmento, se obtuvo el compuesto **2**, el cual posee una mayor potencia. La eliminación del anillo del fenilo en el indazol, dio lugar a un compuesto **3** con una  $IC_{50}$  (concentración para 50% de inhibición) de 97 nM con una pequeña disminución de la eficiencia del ligando. El fármaco AT7519 ha mostrado buenas indicaciones contra líneas celulares tumorales humanas.

El proceso de fusión se aplica cuando dos fragmentos diferentes tienen características estructurales comunes y se unen a sitios superpuestos en la diana objetivo, alcanzándose así una molécula con mayor potencia.

Un ejemplo de fármaco obtenido por fusión es un inhibidor del citocromo de la tuberculosis micobacteriana P450 CYP121 (Singh et al., 2018).

Se detectaron dos fragmentos con anillos aromáticos similares y superpuestos, se llevó a cabo la fusión para obtener un inhibidor eficiente con una afinidad de unión más potente, que la afinidad de cada fragmento por separado.

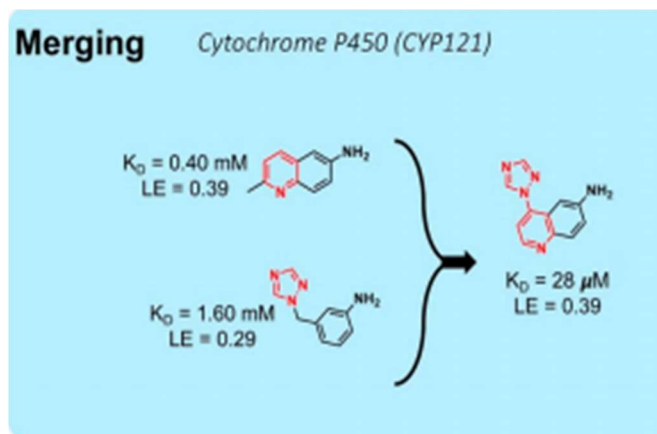


Figura 3. Optimización por fusión de fragmentos.

El proceso de vinculación se aplica cuando dos fragmentos se unen a sitios de la diana próximos en el espacio. Este es el proceso más difícil debido a que se debe mantener la orientación de los fragmentos de forma exacta.

Un ejemplo de optimización por vinculación son fragmentos, detectados por NMR, contra la proteína BCL-XL (Singh et al., 2018). Partiendo de dos fragmentos, se realiza la vinculación mediante un grupo alqueno, llamando grupo funcional de enlace, obteniéndose el compuesto **2** de la figura 4, con una potencia mayor que cada fragmento por separado. Posteriormente, se realizó un cambio por otro grupo funcional de enlace (compuesto **3**). Éste fue sometido a distintas modificaciones, obteniéndose el compuesto ABT263 (compuesto **4**). Este compuesto presenta una mayor potencia, convirtiéndose en un fármaco utilizado actualmente en ensayos clínicos de fase II como antineoplásico.

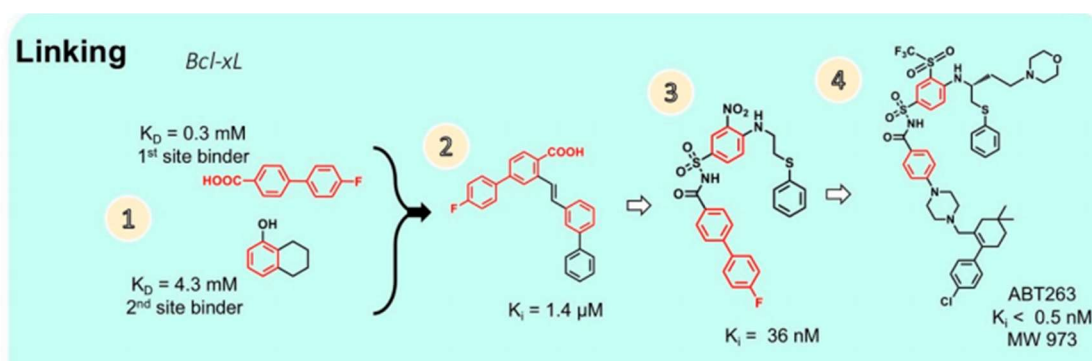


Figura 4. Optimización por vinculación de fragmentos.

## **4.2. APLICACIÓN DE NUEVAS TÉCNICAS EN FBDD**

La resonancia magnética nuclear fue el primer método usado para la detección de los fragmentos, pero posteriormente se han aplicado distintas técnicas en el contexto de FBDD con el fin de mejorar la detección de los fragmentos para obtener el *lead* que pueda convertirse en fármaco.

A continuación, describimos las diferentes técnicas:

### **4.2.1. Electroforesis capilar**

Es demostrable que la electroforesis capilar de afinidad (ACE) se puede implementar con éxito en FBDD, debido a que es una técnica simple, fiable y con capacidad para la identificación y cuantificación de interacciones débiles en condiciones muy similares a las fisiológicas. Es un método selectivo y robusto para ligandos de afinidad débil (Farças et al., 2017).

Es una técnica analítica de separación que se basa en la migración diferencial de moléculas sometidas a la acción de un campo eléctrico (de 100 a 500 V/cm) en el seno de un medio líquido contenido en un tubo capilar de menos de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro. El interior del capilar está formado por sílice fundida y se llena con el tampón que va a ser el medio de separación. Los cationes se van a desplazar hacia la zona negativa y los aniones hacia la parte positiva. A su vez, las moléculas de mayor peso molecular se desplazarán más lentamente que las de menor peso (Chopin, 2012).

Como inconveniente, en esta técnica solo podemos analizar moléculas cargadas positivamente y capaces de absorber en ultravioleta-visible.

Como solución a esto, podemos estudiar la unión del ligando a la diana de forma indirecta, es decir, midiendo la capacidad del mismo para desplazar la unión de un "informador" (ligando sonda, PL). A esta variante de la técnica se le denomina unión competitiva, por la competencia que tienen el ligando sonda y el ligando en estudio por el mismo sitio de unión (Farças et al., 2018).

El método indirecto con unión competitiva tiene como principal ventaja el poder analizar todo tipo de fragmentos, incluidos los que no tienen carga neta a pH fisiológico o los que no posean absorbancia UV-VIS.

A pesar de que la ACE competitiva permite la detección de fragmentos en un contexto casi fisiológico, apenas es utilizada en el contexto de FBDD. Austin y sus colaboradores demostraron la capacidad de la ACE competitiva para detectar interacciones débiles entre pequeños fragmentos y HSP90, la cual es una proteína chaperona que favorece el plegamiento de otras proteínas, permitiéndoles adquirir su conformación tridimensional nativa y, con ello, llevar a cabo su función biológica. Además, estabiliza proteínas en situaciones de estrés térmico y permite que se degraden aquellas que tengan un mal plegamiento, evitando así la formación de agregados amiloides. Al ser una proteína chaperona, su expresión se ve incrementada en situaciones de estrés térmico. Actualmente, HSP90 está siendo investigada como objetivo terapéutico en oncología (Wandinger et al., 2008).

Otro de los estudios (Farças et al., 2017) para demostrar la utilidad de la ACE en FBDD tuvo como objetivo el desarrollo de un enfoque de unión por desplazamiento que fuese genérico, sensible, robusto y fiable, para poder aplicarlo a la búsqueda de una biblioteca heterogénea de fragmentos con el fin de guiar la síntesis de agentes antitrombóticos dirigidos a la trombina. Se clasifican los fragmentos analizados según la afinidad que presentan con la diana, es decir, la afinidad que presentan con la trombina. Esta afinidad se determinó mediante el porcentaje de inhibición, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\%inh = \frac{M_{Tt} - M_{Tc}}{M_{Tt} - M_{TBGE}} \times 100$$

donde:

$M_{Tt}$  es el tiempo de migración del pico del PL en presencia del target en el BGE,

$M_{Tc}$ , el tiempo de migración del PL en presencia de la proteína objetivo y el ligando cribado en el BGE, y

$M_{TBGE}$ , el tiempo de migración del PL en el BGE puro.

El estudio se llevó a cabo con controles negativos y positivos, siendo éstos últimos los inhibidores de la trombina conocidos.

El primer paso del estudio fue la optimización de las condiciones experimentales, monitorizando el tiempo de migración ( $M_t$ ) del ligando sonda (PL), es decir, el tiempo que tarda en desplazarse el inhibidor conocido, en tres condiciones distintas.

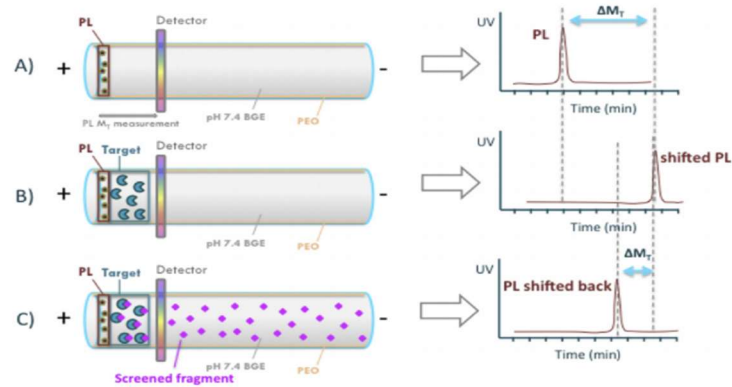


Figura 5. Estudio de optimización en tres condiciones distintas.

La primera condición es en un electrolito de fondo (BGE) puro, la segunda es en un BGE que contiene la proteína objetivo y la tercera condición es en el BGE que contiene la proteína objetivo y el fragmento cribado.

En la figura 5 se puede observar que, si el fragmento cribado desplaza el PL del objetivo, se obtiene el llamado “cambio hacia atrás”. Esto se debe a la competitividad entre el PL y el fragmento por el sitio de unión común o la interacción con el sitio de unión alostérico, conduciendo a una disminución de afinidad del PL por su bolsillo de unión.

El punto de partida del estudio fue el método de llenado parcial, que consiste en un ensayo de afinidad directa en el que se controla los cambios de migración del ligando en presencia de trombina dentro del capilar. Este cambio de migración va a depender de la naturaleza del ligando y de la concentración de trombina. La trombina es neutra a pH 7,4 y con recubrimiento neutro de polietilenglicol no migra durante el análisis, con lo cual, no interfiere al alcanzar el detector.

El ligando sonda seleccionado fue inhibidor competitivo de trombina, NAPAP, ( $N\alpha$ -(2-Naphthylsulfonylglycyl)-4-amidino-(D,L)-phenylalanine piperidide acetate), por su afinidad con la proteína objetivo y porque presenta interacción con tres bolsillos del sitio de unión (S1, S2 y S4) permitiendo así encontrar fragmentos con afinidad para cualquiera de estos sitios de unión.

La concentración de trombina seleccionada para el ensayo fue de 10mM, manteniendo así un bajo consumo de proteínas y un impacto significativo en la migración de PL.

La concentración del ligando de estudio no modifica la migración del PL, con lo que se utilizó una concentración baja para eliminar problemas de solubilidad entre otros.

El voltaje utilizado fue de 8Kv (corriente de 36mA), ya que es el que mejor respetaba el tiempo de análisis.

Se determinó el valor  $IC_{50}$  de dos fragmentos conocidos inhibidores de la trombina (benzamidina y *p*-aminobenzamidina) y de un inhibidor débil, como es el nafamostat [(6-carbamimidoilnaftalen-2-il) 4-(diaminometilidenamino) benzoato], para así demostrar la precisión y fiabilidad del método (Farças et al., 2017).

También se construyó una biblioteca química que permite evaluar el rendimiento y ventajas del ensayo en comparación con el método directo.

Podemos concluir que el método indirecto se caracteriza por su universalidad, ya que pueden seleccionarse todo tipo de moléculas, independientemente de su carga y de la absorbancia en UV-VIS. Nos permite señalar los fragmentos más interesantes y calcular la  $IC_{50}$ , de forma directa, de los fragmentos seleccionados, ofreciendo información en las primeras fases del descubrimiento de fármacos (Farças et al., 2018).

#### **4.2.2. Métodos computacionales**

En los últimos años, los métodos computacionales han formado parte del proceso del FBDD, contribuyendo al análisis eficiente de datos, al cribado de bibliotecas, a aportar hipótesis que ayuden al estudio del mecanismo de acción de los fármacos y al diseño de nuevas estructuras químicas entre otras. Además, han servido para el desarrollo de fármacos que se encuentran en ensayos clínicos.

Los métodos computacionales forman parte del diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC). Éste pretende estudiar las relaciones estructura-actividad de moléculas y tiene como objetivo diseñar nuevas estructuras con actividad biológica frente a dianas de interés terapéutico, filtrar las moléculas de mayor interés para llevarlas a estudio y mejorar las propiedades de los fragmentos, así como disminuir sus efectos adversos (Prieto-Martínez y Medina-Franco, 2018).



El DIFAC es un proceso que requiere una gran preparación, análisis para realizar una buena interpretación de los resultados obtenidos del ordenador.

Dentro de los métodos computacionales se pueden destacar tres métodos empleados en la identificación de fragmentos y su optimización. El primero es el acoplamiento molecular automatizado, cuyo objetivo es buscar la conformación y orientación óptima del ligando dentro de la diana de interés. La primera etapa de este método es el *docking* o búsqueda de la conformación y orientación de moléculas, y la segunda etapa es el *scoring*, proceso en el que se asigna un valor que va a medir la interacción entre fragmento y proteína. Esta última etapa es la más difícil de calcular de manera rápida, con lo que actualmente el acoplamiento molecular es útil para describir un modelo de unión, pero no para calcular con precisión la energía de interacción. Glide, Gold y SurFlock-Dock son programas de acoplamiento usados en la actualidad.

El segundo método dentro de los métodos computacionales es el modelo farmacóforo (Prieto-Martínez y Medina-Franco, 2018). Éste consiste en diseñar un fragmento de forma tridimensional con las características mínimas necesarias tanto estéricas como electrónicas, para así asegurar las interacciones óptimas con la diana de interés, desencadenando una respuesta biológica. Este farmacóforo no va a representar una molécula real, pero puede ser considerado como partida para el posterior desarrollo de un conjunto de moléculas activas.

Como último método, describimos el cribado virtual (Bian y Xie, 2018), el cual es un filtrado computacional de fragmentos para así seleccionar a los candidatos, llamados *hits computacionales*, para su posterior estudio y evaluación experimental. Esto nos ayuda a reducir de forma significativa el número de ensayos que se tendría que llevar a cabo sin esta filtración.

El cribado virtual consta de cinco fases principales. En la primera, se establece una biblioteca de fragmentos diversa. Esto nos va a permitir analizar una gran cantidad de fragmentos, en un tiempo reducido, garantizando una gran diversidad de fragmentos, aumentando así la probabilidad estadística para encontrar el fragmento óptimo para la diana de interés. La segunda fase consiste en cribar de forma virtual la biblioteca de fragmentos para así obtener los *hits*, es decir, aquellos que puedan tener interacción

con el *target*. Esto se puede conseguir evaluando las interacciones de enlace de hidrógeno o hidrófobas. En la tercera fase, se procede a diseñar los *leads* a partir de los *hits*. En esta fase se lleva a cabo la optimización de los fragmentos explicada anteriormente. La cuarta fase consiste en verificar los nuevos *leads* mediante ensayos biológicos, que nos va a proporcionar la información de la efectividad que poseen los nuevos compuestos. En la última fase, se va a confirmar la unión, es decir, se revela las interacciones *lead-target* y se obtiene información del mecanismo de activación o inhibición de la diana.

Un ejemplo del éxito de este método se puede comprobar en el diseño de moduladores alostéricos en mGluR5, en el trabajo publicado por Xie et al. En este trabajo se informa de la aplicación del FBDD mediante métodos computacionales para la búsqueda de nuevos moduladores alostéricos en el receptor metabotrópico del glutamato 5. Este receptor es un objetivo de interés para el desarrollo de fármacos, debido a su relación con múltiples enfermedades del sistema nervioso central.

## **5. EJEMPLOS REPRESENTATIVOS**

### **5.1. Descubrimiento a partir de fragmentos de un potente inhibidor de NAMPT (nicotinamida fosforribosil transferasa) (Korepanova et al., 2018).**

La NAMPT es una enzima que aparece sobreexpresada en numerosos tipos de cáncer, convirtiéndola en una diana para su estudio.

Esta enzima es un factor limitante para la recuperación del cofactor NAD<sup>+</sup> (nicotamida adenina dinucleótido), el cual actúa como intercambiador de electrones en reacciones redox que van a generar ATP, que es la fuente principal de energía para un gran número de procesos celulares.

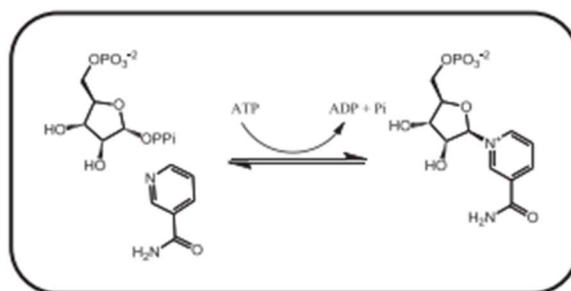


Figura 6. Reacción catalizada por NAMPT

Se utilizó NMR para la detección de fragmentos y ensayos de unión bioquímicos. Se obtuvo estructuras cristalinas para dos de los fragmentos unidos a NAMPT. Además, se aplicó la técnica de acoplamiento molecular para obtener la conformación y orientación próxima de los fragmentos. El nuevo inhibidor del NAMPT se consiguió por la unión de estos fragmentos a NAMPT ligada a FK866, el cual es un inhibidor conocido de la misma.

Se llevó a cabo un cribado basado en fragmentos mediante NMR. Se utilizó nicotinamida (NAM) como elemento informativo, ya que se une a NAMPT y da lugar a un buen espectro de MNR. El FK866 fue usado como control positivo y su adición provocó que las señales en el espectro desaparecieran. Estas señales se deben a la unión de NAM a NAMPT.

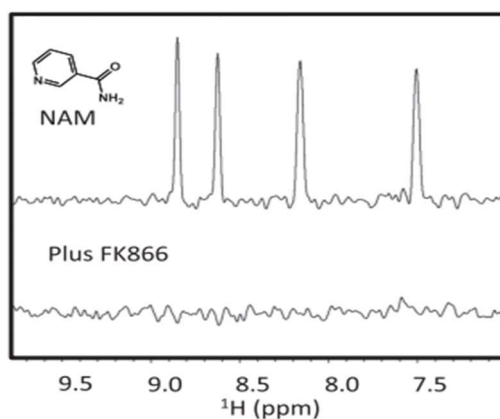


Figura 7. Espectro de NMR del FK866.

Posteriormente, se realizó un cribado de una biblioteca de 6000 fragmentos, de los cuales, 4 fragmentos provocaron una disminución de al menos un 80% en la intensidad de la señal del espectro de NMR. A continuación, se determinó la afinidad de estos fragmentos mediante ensayos de unión.

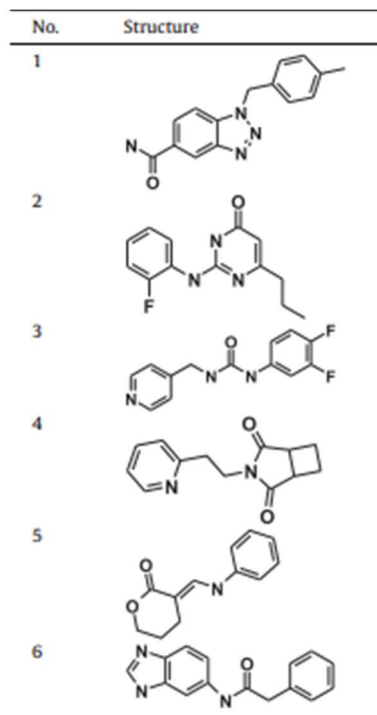


Figura 8. Fragmentos seleccionados de la biblioteca.

Para mejorar la eficiencia, se elaboró una hipótesis estructural. Se busca una estructura cristalina, solo dos fragmentos (**2** y **5**) dieron cristales de calidad óptima para que se pudiese obtener la estructura. Los otros fragmentos de interés (**1**, **3**, **4** y **6**), se sometieron a acoplamiento molecular para así obtener la disposición espacial correcta para su interacción con la proteína, mediante el programa Glide.

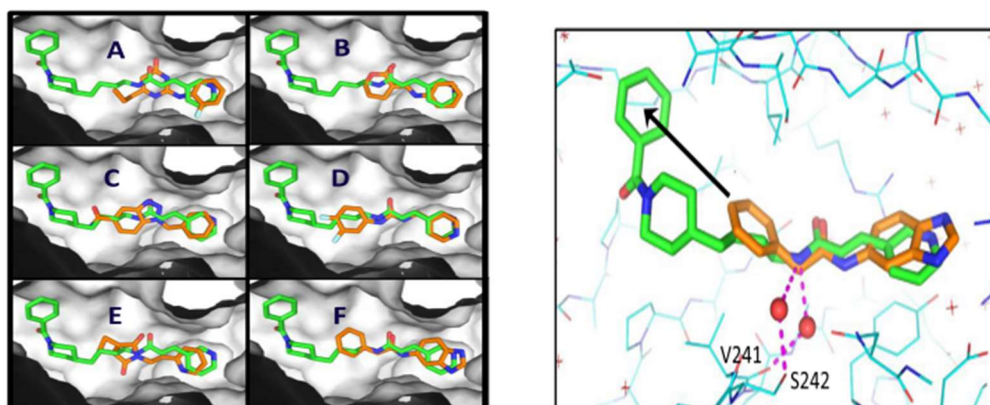


Figura 9. Estructuras cristalinas de fragmentos superpuestas con FK866.

Como se puede observar en la figura 9, los seis fragmentos se unen a la parte posterior del bolsillo de unión llenando el espacio que estaría ocupado por la nicotinamida. Esto implica que haya solo una dirección para el diseño de los fragmentos, debido a la

superposición de cada fragmento con FK866. Los fragmentos A y E son los que poseen mayor eficiencia para NAMPT, el fragmento F es el que posee la mejor opción para la elaboración sintética. La superposición del fragmento F, unido al bolsillo de unión de NAMPT, con FK866 muestra que el metileno del fragmento se superpone al nitrógeno amida de FK866. Esta amida de nitrógeno va a formar dos puentes de hidrógeno con la proteína, en presencia de agua. Uno se une al hidroxilo de la cadena lateral de S241 y el otro se une al carbonilo principal de V242 (figura9). Esto ofreció un nuevo punto de vista, y se demostró que la sustitución de metilnamida del fragmento por un resto de urea proporcionaría un aumento de la potencia. Además, debido a la superposición del fragmento 6 con FK866, se produciría un espacio hidrofóbico adicional, ocupado por un grupo fenilo terminal de FK866. Todo esto dirigió el estudio en el diseño del compuesto **7**, que presenta una mayor afinidad y potencia.

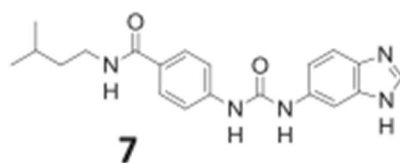


Figura 10. Compuesto **7**

## 5.2. Obtención mediante FBDD de potentes moduladores alostéricos positivos dirigidos a los receptores mGluR2 (Szabó et al., 2018).

El receptor metabotrópico de glutamato 2 (mGluR2) es un receptor acoplado a proteína G. Estos receptores están localizados ampliamente en el sistema nervioso central, interviniendo en numerosos procesos neuropsiquiátricos.

El glutamato es un aminoácido no esencial y el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central. Interviene en la plasticidad sináptica en personas adultas, en la neurogénesis y neurodegeneración. Al ser un aminoácido no esencial, no atraviesa la barrera hematoencefálica. Es sintetizado en la mitocondria neuronal, partiendo de glucosa entre otros precursores. Una vez sintetizado, el glutamato es liberado al citoplasma, donde se acumula en vesículas sinápticas. Este proceso es dependiente de  $Mg^{2+}$  y ATP. Posteriormente, el glutamato es liberado al espacio sináptico, promovido por la propagación del impulso nervioso hacia la terminal axónica. Este mecanismo es dependiente de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular y se da por exocitosis. Una vez que

el glutamato está en el espacio sináptico es capaz de interactuar con sus receptos específicos.

El receptor metabotrópico es un tipo de receptor del glutamato, llamados mGluR. Estos receptores están acoplados a proteínas G, por lo que la unión del glutamato al receptor no provoca la apertura de un canal intrínseco, sino que se produce una regulación en la transmisión sináptica y excitabilidad neuronal mediante la activación o inhibición de diversos sistemas efectores que están acoplados a proteínas G. Debido a esto, dichos receptores al inicio son más lentos mientras que su tiempo de acción es de mayor durabilidad, con lo que son capaces de modular la actividad neuronal un mayor tiempo (Flores-Soto et al., 2012).

Con respecto a su estructura, consta de siete dominios transmembrana, que se encuentran separados por pequeñas asas intracelulares y extracelulares.

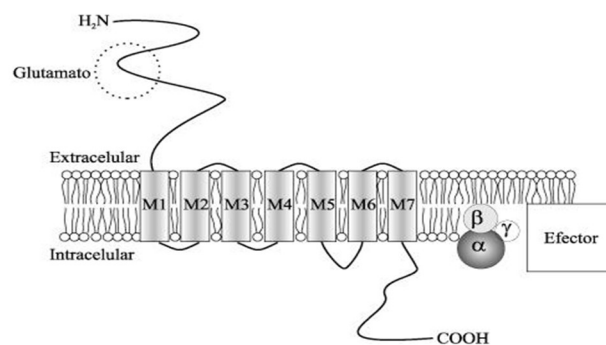


Figura 11. Estructura de los receptores metabotrópicos del glutamato (Alcibíades et al., 2012)

Dentro de los mGluR existen ocho subtipos, los cuales están divididos en tres grupos. Con respecto al grupo dos, su activación conlleva la inhibición de la adenilciclase, la cual es la encargada de convertir el ATP en AMPc, provocando una disminución de este último, liberándose menor cantidad de glutamato, actuando como neuroprotectivo, es decir, manteniendo la transmisión del glutamato dentro del rango fisiológico, evitando que se dé una hiperexcitabilidad y que el cerebro se vea afectado.

En relación con la patología de la esquizofrenia, según hipótesis, la hiperactividad de la transmisión del glutamato en regiones límbicas es el mecanismo que subyace en dicha patología. Se ha postulado que las moléculas agonistas de mGluR2 podrían llevar a cabo

una disminución de los síntomas esquizofrénicos, debido a su acción farmacológica, es decir, al ser capaces de reducir la transmisión del glutamato en la sinapsis, obteniéndose una nueva línea de investigación para el tratamiento de la esquizofrenia.

Los agonistas de mGluR2 de acción directa han sido utilizados en ensayos clínicos, demostrándose que mejora la sintomatología positiva en los pacientes, siendo comparable con la olanzapina, fármaco utilizado en el tratamiento de la esquizofrenia, pero no se ha sido capaz de demostrar que aumente la prolactina o los síntomas extrapiramidales.

Por esto, las líneas de investigación centraron nuevos objetivos, como son los moduladores alostéricos positivos (PAM) selectivos de subtipo. Los moduladores alostéricos positivos del mGluR2 se han incluido como farmacología potencial para el tratamiento de enfermedades psiquiátricas. El mecanismo de acción de estos ligandos consiste en activar el mGluR2 en el sitio de unión alostérico potenciando la activación inducida por el glutamato.

Existen dos moléculas de mGluR2 PAM que han formado parte de la clínica (Szabó et al., 2018). Son AZD8529 y ADX71149, la primera llegó hasta la fase dos del ensayo clínico en AstraZeneca, ensayada en pacientes esquizofrénicos, pero fue abandonada debido a la falta de eficacia. La segunda, investigada por Addex Therapeutics y Janssen Pharmaceuticals como fármaco para la esquizofrenia y la depresión ansiosa, mostró resultados favorables en pacientes esquizofrénicos pero no en la patología depresiva ansiosa.

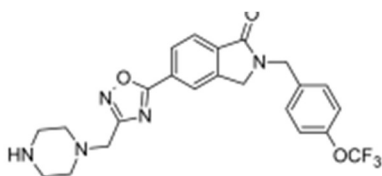


Figura 12. AZD8529

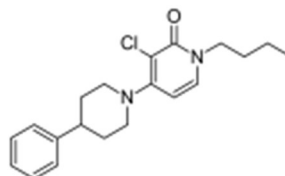


Figura 13. ADX71149

El estudio para la obtención de fragmentos de mGluR2 PAM comenzó con la búsqueda en una biblioteca de compuestos, identificándose como *hit*, un fragmento de benzotriazol sustituido con bencilo, el cual posee una mayor eficiencia de ligando (LE=0,49) y un pequeño tamaño ( $N_{hev}=16$ ) en comparación con los ya conocidos mGluR2

PAM, los cuales tienen una media de  $N_{hev}=29 \pm 4$  y  $LE=0,25 \pm 0,4$ . Una vez identificado el *hit*, se procedió a la optimización obteniéndose un derivado de biarilo, consiguiéndose una mejora en la potencia. Pero mostró virtualmente una baja estabilidad metabólica en los microsomas humanos, de ratón y de rata, con lo cual, el objetivo posterior fue mejorar esa estabilidad metabólica, manteniéndose los mismos niveles de potencia y eficiencia.

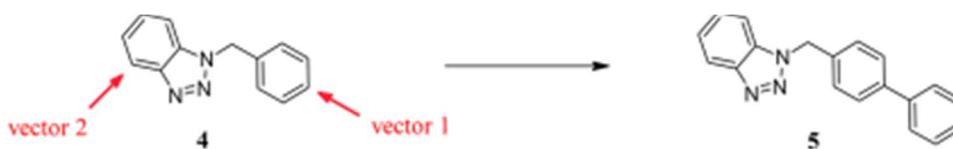
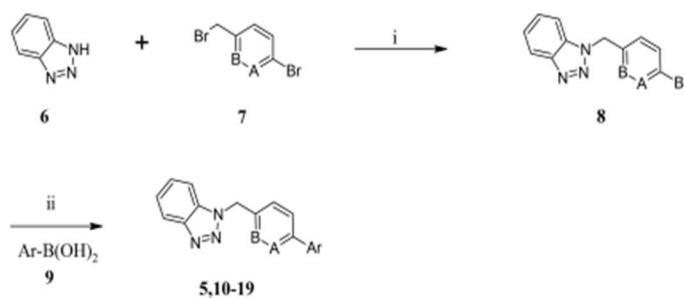


Figura 14. Optimización del *hit*

En relación con la química, se realizó una selección funcional, en la biblioteca elegida, en células que sobreexpresaban mGluR2, dando como resultado un *hit*, bencilbenzotriazol (compuesto 4), con una potencia aceptable y una alta eficiencia de ligando. La comparación estructural con compuestos de referencia conocidos de mGluR2 PAM, reveló que existen dos líneas de crecimiento potenciales: uno de ellos, está localizado en la posición 4 del núcleo del benzotriazol (vector 2) y el otro se encuentra en la posición *para* del grupo bencilo (vector 1). Los primeros ensayos se centraron en la posición *para* del grupo bencilo, intentando mejorar la estabilidad metabólica del biarilbenzotriazol (compuesto 5), a través del ensayo con distintos sustituyentes en el anillo fenil terminal. Los mejores resultados con respecto a la potencia se obtuvieron con la disustitución de 2,4 en el anillo de fenilo.



Scheme 1. Synthesis of Unsubstituted Benzotriazoles<sup>42</sup>



<sup>42</sup>Reagents and conditions: (i) THF, NaHMDS,  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  to rt, 2 h, 35–40% yield; (ii) toluene/EtOH/H<sub>2</sub>O, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, reflux, 2 h, 75–90% yield.

Figura 15. Esquema de la síntesis de benzotriazoles no sustituidos

En el esquema se muestra la síntesis general de benzotriazoles no sustituidos. Partimos del benzotriazol disponible comercialmente y lo hacemos reaccionar con los derivados de bromobencilo en THF (tetrahidrofurano) usando NaHMDS (hexametildisilazano de sodio), obteniéndose un intermedio de bromoarilo. A éste se le hizo reaccionar con ácido aril borónico mediante acoplamiento de Suzuki, obteniéndose el *hit* **5** y derivados.

Esta disustitución en las posiciones 2 y 4 permitió conseguir seis compuestos derivados del *hit* **5** con una mayor potencia y estabilidad metabólica, siendo el mejor perfil el derivado **11**:

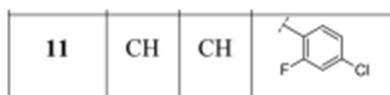


Figura 16. Estructura del compuesto **11**

Como inconveniente, estos derivados tienen un alto carácter lipofílico dando lugar a una solubilidad limitada. Por ello, se introdujo átomos de nitrógeno al anillo, obteniéndose cuatro derivados más. Entre estos últimos derivados, el **16** fue el que mostró una estabilidad metabólica y potencia aceptable con la lipofilia mejorada, nombrando este derivado como *lead*.

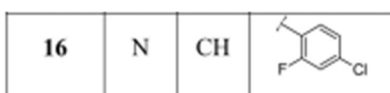


Figura 17. Estructura del compuesto **16**

Este compuesto **16**, fue sometido a numerosos ensayos ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción), de farmacocinética y modelos de eficacia *in vivo*. Los

resultados de estos ensayos demostraron que era necesaria una mejoría en la potencia y en las propiedades ADME para alcanza una eficacia *in vivo* deseable para tratar enfermedades.

Debido a este resultado, se fijó como objetivo una línea de investigación que abarcara el vector de crecimiento de la posición 4 del núcleo del benzotriazol. Pero al mejorar la eficacia se produjo un aumento de la lipofilia, con lo que se abandonó esta línea de investigación y se volvió a estudiar el *hit* 4 (benzil-benzotriazol).

Se procedió a la optimización del *hit* 4. La mayor parte de FBDD está basado en el estudio de la estructura mediante técnicas de NMR entre otras. Los métodos de optimización como el crecimiento, fusión y vinculación, utilizan la información de la estructura para obtener una mejor afinidad de unión. Pero en este caso, los mGluR2 PAM están en conformación activa, con lo que no podemos obtener su estructura. Este estudio se desarrolló careciendo de la información estructural del complejo receptor-ligando, por ello, los métodos computacionales podrían tener error en la identificación del modo de unión entre *hit* y *target*, no teniendo utilidad en este ensayo.

Se implementó una estrategia basada en la eficiencia de ligando (LE) para la identificación de *lead*. Mediante la identificación de los vectores de crecimiento, obtenemos una información de estructura-actividad (SAR). A partir de aquí, podemos sugerir que los derivados con una LE mayor a 0,4 son los adecuados para someterlos al proceso de optimización.

Otra estrategia (Szabó et al., 2018) está basada en la eficiencia de grupo (GE), aplicada para la identificación de puntos calientes en proteínas y el análisis de partes de un ligando que intervienen de manera importante en la unión.

Esta estrategia asume que las moléculas comparadas, se unen de forma similar y realiza una evaluación de la contribución relativa de los grupos estructurales a la energía libre de unión ( $\Delta G$ ). La eficiencia de grupo, se calcula dividiendo esa contribución de  $\Delta G$  de cada grupo por el número de átomos pesados en el grupo.

### Scheme 2. Synthesis of Substituted Benzotriazoles<sup>a</sup>



<sup>a</sup>Reagents and conditions: (i) AcCN, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, rt, 18 h, 74–90% yield; (ii) MeOH/H<sub>2</sub>O, SnCl<sub>2</sub>, conc HCl, 50 °C, 12 h, 52–65% yield; (iii) AcOH, NaNO<sub>2</sub>, 60 °C, 3 h, 32–73% yield.

Figura 18. Esquema de la síntesis de benzotriazoles sustituidos

En el esquema 2 (figura 18), se muestra la síntesis de benzotriazoles sustituidos (*hit 4*). Partimos de derivados del 1-fluoro-2-nitrobenceno (compuesto **20**), y lo hacemos reaccionar con derivados aminometilo (compuesto **21**), obteniendo nitroanilinas (compuesto **22**). Ésta se somete a reducción en presencia de cloruro de estaño en metanol/agua, dando dianilinas (compuesto **23**), que se ciclaron a compuestos benzotriazol en presencia de ácido acético y nitrito sódico.

A partir de este esquema, se sintetizaron y probó una serie de análogos alrededor del núcleo del *hit*, se evaluaron las contribuciones de los sustituyentes individuales y se seleccionan los que tienen una eficiencia de grupo menor para someterlos a la optimización.

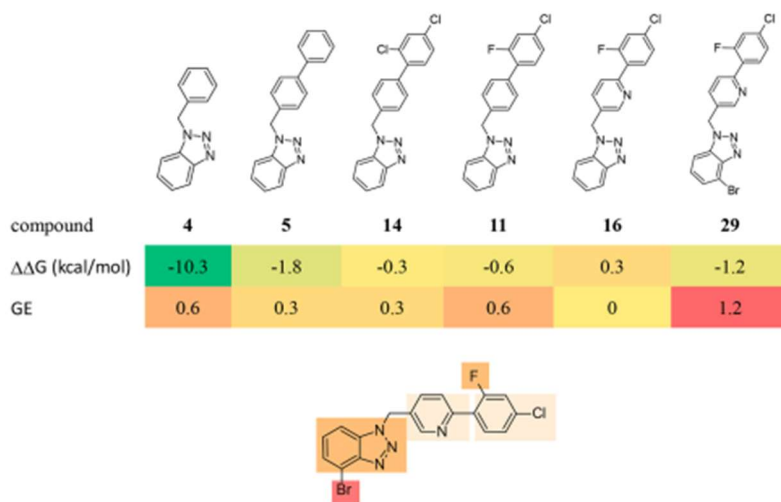


Figura 19. Análisis de la eficiencia de grupo del compuesto **29**

El análisis de la eficiencia de grupo del compuesto **29** (figura 19) reveló que el núcleo del benzotriazol con el sustituyente bromo en la posición 4 se debería mantener. La parte seleccionada para la modificación es la del biarilo, ya que aporta menor  $\Delta G$ . Se procedió a la eliminación del grupo 2-fluoro-4-clorofenilo en el compuesto **29**, dando el compuesto número **30**, con una reducción de la potencia pero compensada por una disminución del tamaño, mejorando el valor de LE (de 0,47 a 0,59). El compuesto **30** en comparación con el hit **4**, con el bromo como sustituyente en la posición 4, tiene una mayor potencia.

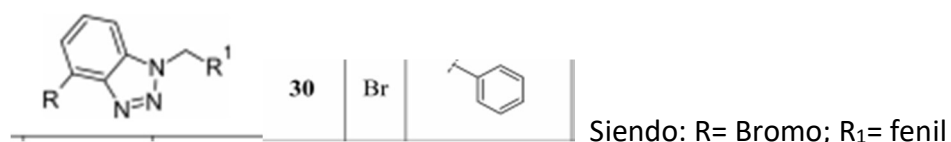


Figura 20. Estructura del compuesto **30**

Con lo que el *lead*, debía incluir el núcleo de 4-bromobenzotriazol. Además, se debería intentar mejorar la potencia de mGluR2 PAM y la estabilidad metabólica del sistema de anillo. Por ello, se optimizaron los sustituyentes del bencilo del compuesto **30**, evitando el crecimiento de la molécula.

Para conseguir reducir la lipofilia, se reemplazó el grupo bencilo del compuesto **30** por una serie de sustituyentes alquilo y cicloalquilo. Se obtuvo una serie de derivados, el

compuesto más destacado fue el **45** mostrando una potencia y estabilidad metabólica favorable. Por ello, lo seleccionamos para una posterior optimización.

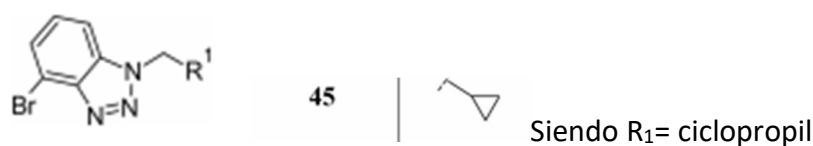


Figura 18. Estructura del compuesto **45**

Para mejorar la estabilidad metabólica del compuesto **45**, se exploró la posición 6, introduciendo distintos sustituyentes. Los sustituyentes de mayor tamaño conllevaron a una disminución en la potencia en comparación con sustituyentes halógenos, pero no hubo una mejora en la estabilidad metabólica. Posteriormente, se probó el efecto de distintos sustituyentes en la posición 4, donde se obtuvieron derivados con una menor potencia con respecto al derivado **45**, con bromo como sustituyente. Excepto por el cloro y el análogo de trifluorometilo (compuesto **60**). Éste último, fue considerado el *lead*, debido a que poseía potencia y perfil metabólico equilibrados.

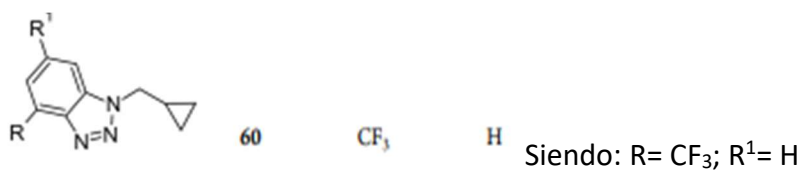


Figura 21. Estructura del compuesto **60**

El compuesto **60**, fue sometido a ensayos ADME mostrando propiedades mejoradas en relación con la solubilidad, permeabilidad y unión a proteínas plasmáticas en comparación con el compuesto **16**.

La mejora en dichas propiedades hizo que el compuesto fuera objeto de estudios en pruebas *in vivo*, en las que se reveló que era un prometedor lead de PAM dirigido a los receptores mGluR2.

## **6. CONCLUSIÓN**

Podemos afirmar que el descubrimiento de fármacos basado en fragmentos se ha convertido en una estrategia muy útil para la búsqueda de nuevos fármacos. Así, partiendo de pequeños fragmentos se puede obtener un *lead*, con altas probabilidades de convertirse en un medicamento.

Este método ha evolucionado en los últimos años, sirviéndose de nuevas técnicas como son las computacionales, que han sido capaz de optimizar todo el proceso en tiempo y recursos, sin abandonar las técnicas convencionales.

Actualmente, hay numerosos fármacos obtenidos a partir de fragmentos que se encuentran en fase clínica, como Zelboraf y otros que ya están en el mercado como Venetoclax.

Como futura perspectiva, el descubrimiento de fármacos basado en fragmento podría ser de ayuda para la obtención de medicamentos para enfermedades desatendidas que afectan a grandes poblaciones y las inversiones en ellas son muy bajas, representando una buena alternativa a los métodos convencionales y costosos.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

1. Romasanta A., van der Sijde P., Hellsten I., Hubbard R., Keseru G., van Muijlwijk-Koezen J. et al. When fragments link: a bibliometric perspective on the development of fragment-based drug discovery. *Drug Discovery Today*. 2018; 23(9): 1596-1609.
2. Avendaño López C. *Introducción A La Química Farmacéutica*. Madrid: McGraw-Hill; 2001.
3. Cirilo A. D., Llombart C. M., & Tamargo J. J. *Introducción a la química terapéutica*. Ediciones Díaz de Santos; 2003.
4. Heidrich J. Sperl LE, Boeckler FM. Adopción de la diversidad de motivos de enlace halógeno en el descubrimiento de fármacos basados en fragmentos: construcción de una biblioteca de fragmentos enriquecidos con halógenos optimizados para la diversidad. *Frente Chem*. 2019; 7: 9.
5. Singh M., Tam B., & Akabayov, B. NMR-fragment based virtual screening: A brief overview. *Molecules*. 2018; 23(2): 233.
6. Bembenek SD, Tounge BA, Reynolds CH. Ligand efficiency and fragment-based drug discovery. *Drug Discov Today*. 2009;14(5–6):278–83.
7. Kirsch P., Hartman A. M., Hirsch A. K., & Empting M. Concepts and core principles of fragment-based drug design. *Molecules*. 2019; 24 (23): 4309.
8. Carey F. A. & Giuliano R. M. *Química orgánica. Ed.9a*. México: McGraw Hill; 2014.
9. Jimenez L. P. C. *RMN y reconocimiento molecular: relación estructura-actividad de péptidos implicados en el dolor e interacciones proteína-carbohidrato*. Doctorado. Universidad Complutense de Madrid; 2015.
10. Sastre J. *Reconocimiento molecular basado en técnicas de RMN*. Doctorado. Universidad Complutense de Madrid; 2017.
11. Zhang L. & Gellerstedt G. Quantitative 2D HSQC NMR determination of polymer structures by selecting suitable internal standard references. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2007; 45(1): 37-45.
12. Aymami Bofarull J. & Martinell M. B2D2-La integración de las técnicas biofísicas en el descubrimiento de fármacos. *Farmaespaña Industrial*. 2008, Julio/agosto; 2-5.

13. Farçaş E, Bouckaert C, Servais AC, Hanson J, Pochet L, Fillet M. Partial filling affinity capillary electrophoresis as a useful tool for fragment-based drug discovery: A proof of concept on thrombin. *Anal Chim Acta*. 2017; 984:211–22.
14. Chopin M. Principios básicos de electroforesis capilar: Técnica analítica de separación de analitos. *Rev Tecnol y Salud*. 2012; 1(2): 86-9.
15. Farçaş E, Hanson J, Pochet L, Fillet M. Capillary electrophoretic mobility shift displacement assay for the assessment of weak drug-protein interactions. *Anal Chim Acta*. 2018;1034:214–22.
16. Wandinger SK, Richter K, Buchner J. The Hsp90 chaperone machinery. *J Biol Chem*. 2008;283(27):18473–7.
17. Prieto-Martínez FD, Medina-Franco JL. Diseño de fármacos asistido por computadora: cuando la informática, la química y el arte se encuentran. *TIP Rev Espec en Ciencias Químico-Biológicas*. 2018;21(2):124–34.
18. Bian Y & Xie X-Q. Computational Fragment-Based Drug Design: Current Trends, Strategies, and Applications. *The AAPS journal*. 2018;20(3):59.
19. Korepanova A, Longenecker KL, Pratt SD, Panchal SC, Clark RF, Lake M, et al. Fragment-based discovery of a potent NAMPT inhibitor. *Bioorganic Med Chem Lett* 2018;28(3):437-40.
20. Szabó G, Túrós GI, Kolok S, Vastag M, Sánta Z, Dékány M, et al. Fragment Based Optimization of Metabotropic Glutamate Receptor 2 (mGluR2) Positive Allosteric Modulators in the Absence of Structural Information. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2018; 62(1):234-246.
21. Flores-Soto ME, Chaparro-Huerta V, Escoto-Delgadillo M, Vazquez-Valls E, González-Castañeda RE, Beas-Zarate C. Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA. *Neurología*. 2012; 27(5):301-310
22. Alcibíades P, Guillermo V, Carmen C, Rafael P, Francisco G, Maria GY. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*. 2012;31(3):67–71.