

Paradigmas actuales en las etapas tempranas del proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos

Fernando Peláez

Resumen: El proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos ha sufrido cambios profundos desde los años 90 hasta la actualidad. El moderno paradigma está basado en el concepto de diana terapéutica como punto de partida, identificándose moléculas que puedan interferir en su función usualmente a través de un proceso de búsqueda masiva (*screening*) a partir de colecciones de compuestos químicos. A partir de los compuestos identificados con mejores propiedades (*leads*) se generan derivados con propiedades optimizadas, hasta que se llega a un candidato a fármaco que pasará a las últimas etapas de desarrollo preclínico y ensayos clínicos antes de su comercialización.

Palabras clave: Fármacos, dianas, cribado, ADME.

Abstract: The process of discovery and development of new drugs has undergone profound changes from the 90s to date. The modern paradigm is based on the concept of therapeutic target as starting point, and molecules able to interfere with its function are usually identified through a massive screening of compound libraries. The compounds identified with the best properties (*leads*) are used to generate derivatives with improved properties, finally reaching a drug candidate that will still have to go through the late steps of preclinical development and clinical trials before marketing.

Keywords: Drugs, targets, screening, ADME.

Introducción

La industria farmacéutica de investigación destina cada vez mayores recursos al descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos (DDNF¹), pero a pesar del aumento de la inversión, el declive en la productividad del sector es evidente. La inversión en I+D creció exponencialmente desde los años 80 hasta alcanzar en 2003, sólo en EEUU, más de 30 mil millones de dólares, el triple de la cantidad gastada una década antes. Sin embargo, el número de nuevos medicamentos lanzados al mercado no ha crecido prácticamente desde los años 70, y desde el 2000 está estabilizado en alrededor de 20 productos al año.¹ Llevar un fármaco al mercado resulta cada

día más costoso, habiendo crecido los costes en progresión geométrica a un ritmo superior al 12% anual desde 1970, siendo hoy superiores a los 1500 millones de dólares, en un proceso que requiere unos 15 años de media.¹ En resumen, el número de nuevas moléculas aprobadas por las autoridades reguladoras en EEUU y Europa no ha crecido al ritmo necesario para mantener las expectativas de crecimiento esperadas por los inversores.

La falta de lanzamientos de nuevos productos está directamente relacionada con la baja tasa de éxito que se observa durante el desarrollo de nuevos fármacos. Las estadísticas recientes apuntan que sólo el 11% de los nuevos productos que entraron en la primera fase de desarrollo clínico durante la última década del siglo pasado llegaron al mercado.²

Las razones detrás de este declive en la productividad de la industria han sido analizadas por varios autores.^{1,2} Entre otras razones se cita el hecho de que la industria se ha enfocado en los últimos tiempos en enfermedades complejas para las que a menudo no existen tratamientos efectivos, en muchos casos existiendo un escaso conocimiento sobre su etiología, y con frecuencia faltando modelos animales con suficiente capacidad de predicción de la situación clínica. Incluso cuando se investiga en patologías mejor conocidas, se exploran nuevas dianas farmacológicas que no suelen estar validadas y que por tanto comportan un mayor riesgo. Los nuevos productos tienen que competir con fármacos ya implantados en el mercado, teniendo que demostrar algún tipo de ventaja para obtener la aprobación de las agencias reguladoras. Estas, por otra parte, y como reflejo de la propia demanda de la sociedad, han elevado paulatinamente las exigencias de seguridad para los nuevos fármacos que se someten a aprobación. Ante esta situación, no es raro que la industria farmacéutica se plantee constantemente cómo modificar sus estrategias de DDNF con el objetivo de incrementar la productividad.

En los años anteriores a la década de los 90, el DDNF se basaba en gran medida en la utilización de modelos animales,

¹ Abreviaturas: DDNF, descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos; HTS, *high throughput screening*; PN, productos naturales; GWAS, *genome wide association studies*; SNP, *single nucleotide polymorphism*; HPLC, *high performance liquid chromatography*; SGDD, *structure-guided drug design*; ADME, absorción – distribución – metabolismo – excreción; PCR, *polymerase chain reaction*.



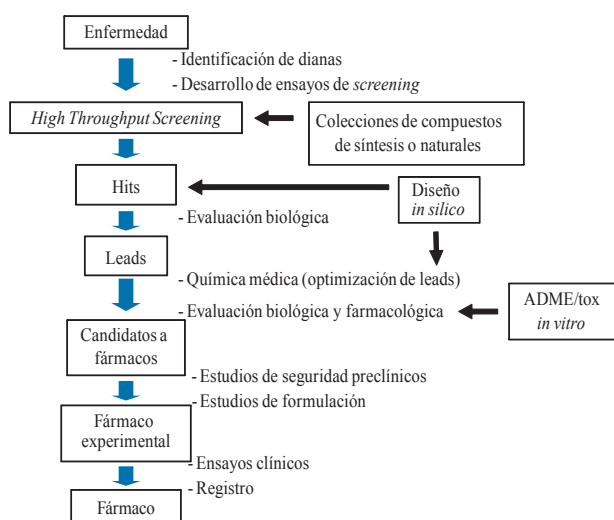
F. Peláez

Programa de Biotecnología. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
Melchor Fernández Almagro 3, 28029 Madrid
C-e: fpelaez@cnio.es

Recibido: 18/05/2010. Aceptado: 17/07/2010.

existiendo menos herramientas de análisis *in vitro* que hoy en día. La información existente sobre las dianas utilizables para el abordaje farmacológico era obviamente mucho más limitada. Por otra parte, en aquellos momentos los productos naturales representaban una importante fuente de estructuras para el desarrollo de nuevos fármacos, en comparación con las relativamente modestas colecciones de productos químicos de síntesis.

Durante la década de los 90 y el comienzo del nuevo siglo las estrategias de investigación de la industria farmacéutica han sufrido una serie de cambios profundos, facilitados por los avances en diversas áreas científicas y tecnológicas. Estos cambios forman ya parte esencial del moderno paradigma del proceso de DDFN (Esquema 1). Algunos de estos cambios y los aspectos más críticos en las etapas tempranas del proceso se discuten brevemente en esta revisión.



Esquema 1. El proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos.

Identificación y validación de dianas terapéuticas

El modelo moderno del proceso de DDFN se basa en el concepto de diana terapéutica. Una diana es un gen, producto génico o, por extensión, proceso celular sobre el que actúa un fármaco para producir un efecto clínicamente perceptible. El arsenal de fármacos disponibles hoy día actúa sobre un número de dianas difícil de precisar, pero relativamente limitado, estimado en algo más de 300.³

La identificación de nuevas dianas terapéuticas en la actualidad no se entiende sin contar con la genómica, la genómica funcional y tecnologías relacionadas, desarrolladas en la última década. Cuando el primer borrador del genoma humano fue publicado hace 10 años, se saludó este hito desde los medios de comunicación prácticamente como la solución a todas las enfermedades, pasando por alto la extremada complejidad del proceso que resulta en el lanzamiento de un fármaco a la clínica. Es cierto sin duda que la genómica proporciona un potencial para explotar un gran número de nuevas dianas, pero no menos cierto es que ello requiere examinar los más de 30.000 genes que componen nuestro genoma. Por tanto, el desciframiento

del genoma humano puede servir como punto de partida para el desarrollo de nuevas terapias, pero no es de esperar que salgan fármacos al mercado producto de este nuevo conocimiento antes de al menos una década.

Entre las estrategias utilizadas hoy día para la identificación de nuevas dianas destacan los *genome-wide association studies*, la genómica comparada y el análisis diferencial de la expresión génica. Todas ellas utilizan tecnologías de reciente desarrollo, como la hibridación en *microarrays* de DNA, o la secuenciación de alta densidad o ultrasecuenciación (*next-generation sequencing*), que permite secuenciar genomas completos en un tiempo mínimo. Acompañando estos avances se han tenido que desarrollar herramientas bioinformáticas que permitan interpretar la enorme cantidad de información derivada de la secuenciación de genomas completos.⁴

Genome-wide association studies (GWAS)

El análisis genético clásico en familias con miembros afectados por ciertas enfermedades ha permitido determinar los genes causantes de un alto número de enfermedades monogénicas (producidas por alteraciones en un solo gen). Ejemplos clásicos serían la enfermedad de Huntington o la fibrosis quística.⁵ Sin embargo, pocas enfermedades están causadas por alteraciones en un solo gen, la mayoría son multifactoriales e incluyen asociaciones de múltiples genes (además de cambios epigenéticos y factores ambientales). Los estudios denominados GWAS se basan en el rastreo global del genoma para buscar variantes genéticas asociadas con determinadas patologías. Habitualmente estos estudios se realizan utilizando análisis de SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) del genoma, mediante hibridación en DNA *arrays* en plataformas automatizadas, sobre una población relativamente grande de sujetos con una patología, comparados con una población control. Aquellas variantes alélicas más frecuentes a la población con la enfermedad que en la población sana pueden representar genes involucrados en el proceso patológico y por tanto candidatos a dianas. Sin embargo, lo habitual es que la significancia estadística de las asociaciones observadas en este tipo de estudios sea débil, y no siempre (o pocas veces) se puede establecer una relación mecanística entre el gen y la enfermedad.⁶

Genómica comparada

La comparación de secuencias de genomas puede dar información sobre dianas o genes útiles para el diagnóstico. La genómica comparada como herramienta para la identificación de dianas comenzó a utilizarse en el ámbito de la microbiología a finales de los años 90, cuando empezaron a acumularse genomas de especies bacterianas. La comparación de estos genomas con los datos procedentes de eucariotas permite seleccionar genes exclusivos de bacterias (o con un grado de divergencia muy alto con respecto a su ortólogo en eucariotas) como dianas potencialmente selectivas. Igualmente, la comparación de genomas bacterianos proporciona información sobre genes conservados entre organismos patógenos, lo que puede ayudar en el diseño de antibióticos de amplio espectro o de espectro más reducido. También puede proporcionar información sobre genes necesarios para la virulencia o la patogenicidad, comparando cepas de la misma especie o género.⁷

Otro ámbito en el que recientemente se está aplicando la genómica comparada para la identificación de dianas es el cáncer. Teniendo en cuenta que en el proceso de formación de tumores se acumulan mutaciones y múltiples cambios genéticos somáticos, algunos de los cuales son responsables de la transformación de una célula normal en maligna, la comparación de los genomas de tumores con los de tejidos sanos del mismo paciente puede proporcionar información muy útil sobre los cambios genéticos asociados al cáncer, y llevar a la identificación de nuevas dianas (así como identificar genotipos asociados a distinto pronóstico). Existen en la actualidad iniciativas internacionales que se han planteado como objetivo la secuenciación completa de múltiples pacientes en diversos tipos de tumores, con este objetivo.⁸

Análisis diferencial de la expresión génica

Durante la última década se han puesto a punto diversas tecnologías que permiten analizar las diferencias en la expresión de genes entre muestras abarcando todo el genoma. Esta capacidad puede aplicarse a la búsqueda de nuevas dianas, ya que de la comparación de la expresión génica entre tejidos u órganos enfermos vs. sanos se deberían poder deducir alteraciones en los niveles de transcripción o traducción de una serie de genes, entre ellos algunos sobre los que presumiblemente se pueda actuar para devolver a la célula a su estado original.

La tecnología más utilizada para el análisis de la expresión génica global a nivel de mRNA (transcriptómica) está basada en los *arrays* de DNA, que permiten detectar los niveles de un alto número de mRNAs mediante hibridación a sondas de oligonucleótidos fijados a una superficie de cristal en un *chip*.⁹ Últimamente también se están aplicando las tecnologías de la secuenciación de alta densidad para analizar el conjunto de mRNAs presente en una célula o tejido.¹⁰ Es habitual que los hallazgos que se detectan en este tipo de análisis global necesiten confirmarse mediante PCR cuantitativa, que permite determinar con mayor precisión los niveles de mRNAs específicos.

El análisis transcriptómico permite detectar genes que se transcriben en mayor o menor medida en una situación patológica, comparando con una situación normal, pero las diferencias observadas en la abundancia de mRNAs no siempre se trasladan en una diferencia en los niveles de las proteínas codificadas por ellos. Para examinar en detalle las diferencias en los niveles de proteínas se requieren las tecnologías que proporciona la proteómica. Hoy en día las herramientas principales en este campo derivan todas de la espectrometría de masas (habitualmente acoplada a equipos de HPLC). Los avances recientes en este campo están permitiendo cuantificar niveles de proteínas con una exactitud y sensibilidad imposibles hace años, así como detectar modificaciones postraduccionales (fosforilaciones, etc.).¹¹

Validación de dianas

Cualquiera de las técnicas y estrategias mencionadas arriba pueden proporcionar hipótesis sobre posibles dianas terapéuticas, pero si bien dianas hipotéticas hay muchas, dianas válidas hay muy pocas. La validación definitiva de una diana tiene lugar una vez que existe un fármaco clínicamente eficaz que actúa sobre la misma. Como es natural, el proceso de DDNF intenta utilizar dianas sobre cuya validez exista la mayor certeza

za posible. Por ello lo habitual es que las hipótesis sobre dianas sean confirmadas por evidencias desde varios puntos de vista, incluyendo, además de las tecnologías ya mencionadas, otras estrategias que proporcionen un soporte adicional.

De forma general (existen excepciones) los fármacos suelen interferir en la actividad de una proteína (enzima, receptor, canal iónico, etc.) impidiendo que se realice el proceso mediado por la misma. Este mismo efecto se puede conseguir por métodos diversos en modelos celulares o en animales, y el resultado de estos experimentos puede ayudar a determinar la validez de la diana, si el efecto observado coincide con el esperado. Por ejemplo, se puede utilizar la tecnología del RNA de interferencia (RNAi), que permiten abolir la expresión de un determinado gen, o bloquear directamente la diana mediante anticuerpos monoclonales.¹² También es posible hoy día manipular genéticamente animales, anulando genes (modelos *knock-out*) o introduciendo genes nuevos (*knock-in*) con mutaciones presumiblemente asociadas a una determinada patología. Cuando un modelo de estas características recapitula el fenotipo de una patología, supone una evidencia sustancial de la implicación del gen alterado en esa enfermedad.¹³ Habitualmente este tipo de experimentación se hace en ratones, aunque existen otros modelos animales de gran utilidad en estas fases del proceso, incluyendo también no-mamíferos (pez cebra, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*).¹⁴ El desarrollo de tecnologías de imagen molecular no invasivas permite la utilización de estos modelos para el seguimiento del curso de la enfermedad y el efecto de los tratamientos experimentales (Figura 1).

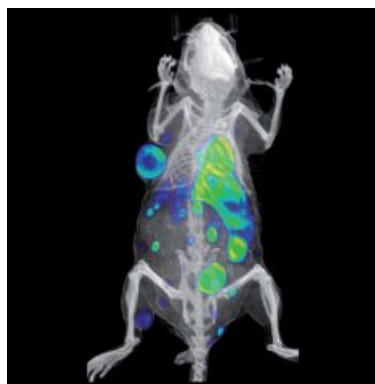


Figura 1. Imagen de PET (tomografía por emisión de positrones) y CT (tomografía computerizada) de un modelo de melanoma de ratón. Las zonas coloreadas muestran la captación de ¹⁸F]-fluorodesoxiglucosa por los tumores, visualizada por PET, sobre la estructura anatómica del ratón obtenida por CT.

Identificación de leads

Uno de los puntos centrales del proceso de DDNF es la selección de *leads* (cabezas de serie), o lo que es lo mismo, compuestos seleccionados con actividad sobre una diana terapéutica, que aunque no han sido optimizados aún, presentan propiedades que les permiten convertirse en precursor de un fármaco. A menudo un *lead* muestra alguna actividad relevante en modelos *in vivo*, pero no está optimizado en sus propiedades farmacocinéticas ni en su especificidad. La industria

farmacéutica puede obtener *leads* para sus proyectos utilizando diversas estrategias. Es habitual que se utilicen múltiples aproximaciones en un mismo proyecto, seleccionando finalmente aquel *lead* que presenta propiedades más atractivas. Las fuentes de *leads* de las que se nutren los procesos de DDNF se detallan en las siguientes secciones.

High throughput screening (HTS)

El término *screening* (cribado) hace referencia al ensayo de un gran número de compuestos de origen sintético o natural, en un test biológico *in vitro* sobre una diana de potencial utilidad terapéutica. Los procesos de DDNF utilizaron estrategias de *screening* desde los años 40 y las décadas siguientes en las que se descubrieron la mayoría de los antibióticos conocidos, si bien las metodologías utilizadas durante esas primeras décadas eran necesariamente rudimentarias y permitían un *throughput* muy modesto.

A principios de la década de los 90 se desarrolló el concepto de *high throughput screening* (HTS) o cribado de alta densidad, como resultado de la conjunción de una serie de factores, incluyendo tanto una serie de avances científicos y tecnológicos que lo hicieron posible, como las necesidades y estrategias de las empresas del sector, relacionadas principalmente con el incremento en el número de dianas terapéuticas accesibles (como consecuencia del desarrollo de la genómica antes mencionado), y el aumento en el tamaño de las colecciones de compuestos (como se comenta posteriormente).

Sin duda el principal factor tecnológico que hizo posible la aparición del HTS fue el desarrollo de las tecnologías de la robótica y la automatización, que permiten la realización de los ensayos con una mínima intervención humana, y con la posibilidad de reducir sustancialmente el tiempo necesario. El pleno desarrollo de este concepto requiere además la implementación de tecnologías de ensayo susceptibles de ser completamente automatizadas. Se desarrollaron así una serie de sistemas de detección que permiten la realización de ensayos biológicos en formato “homogéneo” (mezclar, incubar y leer), sin necesidad de recurrir a etapas de separación (filtración u otras) habituales en las tecnologías de ensayo más clásicas. Muchos de estos nuevos sistemas se basan en el uso de tecnologías de fluorescencia, sumamente sensibles y más “limpias” que las tecnologías basadas en el uso de radioisótopos.¹⁵ Para cualquier diana sobre la que se quiera realizar un *screening* es necesario un paso previo de desarrollo de un ensayo compatible con la plataforma de HTS accesible para el proyecto.

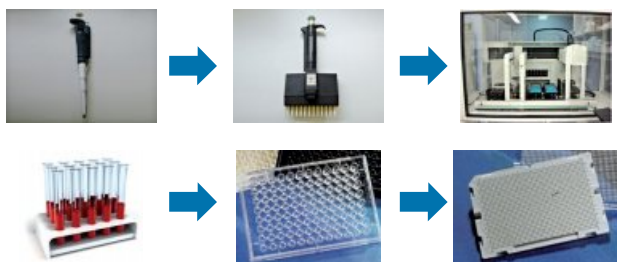


Figura 2. Evolución de las tecnologías de *screening*. Desde el tubo de ensayo y la pipeta monocanal hasta la placa de 1536 pocillos y las estaciones automáticas de pipeteo, pasando por la placa de 96 pocillos y la pipeta multicanal.

El desarrollo del HTS lleva igualmente asociada una necesidad de miniaturizar los formatos de ensayo y los volúmenes de reacción. El formato tradicional de tubo de ensayo fue reemplazado por la placa de 96 pocillos, que facilita la manipulación por estaciones robóticas de elevados números de muestras a ensayar. La tendencia a la miniaturización se acentuó con el desarrollo de la placa de 384 pocillos, en las que los ensayos se realizan en volúmenes significativamente menores, con la consiguiente disminución de costes en reactivos, aunque con el reto de una disminución de la señal detectable en el ensayo. A finales de los 90 se llega todavía más allá en esta tendencia a la miniaturización, con la implantación de las placas de 1536 y de 3456 pocillos, en una especie de “más difícil todavía”.¹⁶ En estas placas los ensayos se realizan en volúmenes de unos pocos microlitros, lo cual requiere la dispensación de cantidades del orden de nanolitros, otro reto tecnológico que se ha resuelto mediante el uso de estaciones de pipeteo basadas en sistemas acústicos o piezoeléctricos (entre otros), y no en los habituales sistemas de presión mediante jeringas y émbolos, utilizados para dispensar cantidades mayores de un microlitro (Figura 2).¹⁵

Otro factor determinante en el desarrollo del HTS fue el aumento en el tamaño de las colecciones de compuestos químicos disponibles para las grandes compañías farmacéuticas. Estas librerías crecieron durante los años 90 como resultado de una estrategia generalizada en el sector,¹⁷ de adquisición de colecciones de compuestos procedentes del entorno académico o de compañías especializadas, y al menos en parte, también como resultado del cambio profundo en las tecnologías de síntesis química, que llevaron al nacimiento a principios de la década de los 90 de la llamada “química combinatoria”, inicialmente basada en los procedimientos de síntesis de péptidos en fase sólida desarrollados por Merrifield, y mediante la cual se hace posible la síntesis rápida de cientos o miles de compuestos.¹⁸ Si bien la química combinatoria no ha sido en realidad capaz de construir librerías de compuestos con la diversidad esperada de forma tan rápida, eficiente y barata como se prometía, las tecnologías asociadas a la química combinatoria (lo que se puede denominar “síntesis en paralelo”, por contraposición a los procedimientos de síntesis química tradicionales, compuesto a compuesto), facilitaron de forma definitiva la expansión de las colecciones de compuestos químicos disponibles, además de resultar en herramientas indiscutiblemente útiles en los procesos de optimización de *leads*, posteriores al proceso de HTS.¹⁹

En la actualidad, los procesos de *screening* pueden estar dirigidos a colecciones masivas de compuestos (usualmente $>10^6$), en lo que se suele denominar ultraHTS, o alternativamente, a librerías “enfocadas” (*focused libraries*), de tamaño mucho menor (del orden de 10^4), que contienen (o están enriquecidas en) compuestos pertenecientes a familias estructurales “privilegiadas”, es decir, con capacidad para interactuar con dianas de la misma familia que la que estamos sometiendo a *screening*. Un ejemplo son las librerías enriquecidas en inhibidores de proteína cinasas. Mientras que el ultraHTS requiere de instalaciones especializadas, en las que los procesos suelen estar completamente automatizados, el *screening* de colecciones pequeñas puede realizarse en el entorno de un laboratorio más convencional,

aunque dotado de algunos equipamientos específicos tales como estaciones automáticas de dispensación de líquidos, lectores de placas, etc.

Aunque los sistemas de HTS ocupan hoy un papel central en el descubrimiento de *leads*, también presentan limitaciones, y no siempre una campaña de *screening* resulta en una molécula sobre la que establecer un proceso de optimización. Entre estas limitaciones cabe citar aquellas inherentes a la calidad de las colecciones de compuestos, las características de la diana terapéutica en sí misma, así como la adecuación entre estos dos factores uno con respecto a otro (puede ocurrir que la colección disponible sea adecuada para ciertas dianas pero no para otras). Las consideraciones de coste, sobre todo cuando se trata de ultraHTS, pueden ser también muy relevantes.

La fuente de compuestos para el *screening* alternativa a las colecciones de compuestos sintéticos son los productos naturales (PN). Por otra parte, la alternativa más conceptual a los procesos de *screening* es el denominado diseño racional de fármacos o “*structure-guided drug design*”. De ambos temas se trata a continuación.

Productos sintéticos vs productos naturales

En la segunda mitad de la década de los 90 se produce un declive en el interés de la industria farmacéutica por los PN, que habían representado hasta entonces una fuente prioritaria de nuevos fármacos. Las razones detrás esta tendencia estriban en factores tales como la falta de éxito en la obtención de fármacos a partir de PN desde los últimos años de la década de los 80 (pese a excepciones tales como las equinocandinas²⁰) y la tradicional identificación de los PN como antibióticos, los cuales a su vez iban perdiendo el favor de las grandes compañías farmacéuticas principalmente por razones de índole económica y por una percepción equivocada de falta de auténtica necesidad médica.²¹ Este declive estuvo además muy influido

por la adopción por parte de la industria de los sistemas de HTS y la química combinatoria como forma de generar la diversidad química que anteriormente se esperaba de la naturaleza.^{21,22}

En concreto, la introducción del HTS en los procesos de descubrimiento de fármacos conllevó dos consecuencias negativas para la investigación en PN. En primer lugar, la percepción de que los extractos complejos habitualmente generados a partir de cultivos microbianos o plantas eran incompatibles con las modernas técnicas de detección utilizadas en los ensayos de HTS. Es verdad que los extractos muy coloreados tienden a interferir con algunos sistemas de detección, pero esto no ha sido un obstáculo para el uso con éxito de colecciones de PN en campañas de *screening* usando tecnologías basadas en fluorescencia.^{22,23} En segundo lugar, la idea de que el tiempo necesario para avanzar desde la detección de un extracto con actividad biológica hasta un compuesto activo y eventualmente un *lead* era demasiado largo y los costes demasiado altos para competir con eficacia con el *screening* de colecciones de compuestos sintéticos. Ciertamente, aunque hoy en día existen tecnologías que permiten reducir este tiempo, éste es aún el principal cuello de botella en el proceso de descubrimiento de nuevos PN. Sin embargo, la novedad estructural a la que sólo se tiene acceso mediante la explotación del metabolismo secundario puede justificar la inversión de tiempo y recursos.²²

La complejidad estructural de muchos PN ha sido a menudo percibida también como un obstáculo, ya que puede imponer un auténtico desafío para la síntesis química y la derivatización durante los procesos de optimización de *leads*.²¹ Esta dificultad puede tener también un impacto cuando se hace necesario el suministro de cantidades grandes de producto, necesarias en las fases tardías de desarrollo y de cara a la comercialización, especialmente para productos derivados de plantas u otros macroorganismos.

Sin embargo, es importante recordar que la complejidad estructural de los PN es muy diversa (Figura 3), y lo que es más importante, ello no ha sido un obstáculo para el desarrollo de numerosos PN como medicamentos útiles, con ejemplos tales como los antibióticos vancomicina y daptomicina, el antitumoral taxol o los inmunosupresores ciclosporina y tacrolimus. Además, el campo de la síntesis de PN ha experimentado avances importantes en tiempos recientes.^{22,24} Por otra parte, cada vez se conocen mejor las rutas de biosíntesis de poliquétidos y péptidos no-ribosomales, los dos grupos principales de PN a los que pertenecen la mayoría de los fármacos de origen natural. Este conocimiento puede añadirse a las tecnologías habitualmente utilizadas por los químicos médicos para facilitar la manipulación de las estructuras de PN y generar nuevos compuestos con mejores propiedades.²⁵

En contraste, la diversidad estructural que se puede encontrar en los PN es muy superior a la de cualquier librería generada a través de la química combinatoria, y además los PN poseen propiedades ventajosas, tales como una rigidez comparativamente mayor, propiedad que ha sido asociada a un menor coste entrópico en su unión a macromoléculas y una mejor disponibilidad oral.²⁴ En realidad, se puede decir que los PN han sido diseñados por la evolución para favorecer las propiedades necesarias para interactuar con macromoléculas.

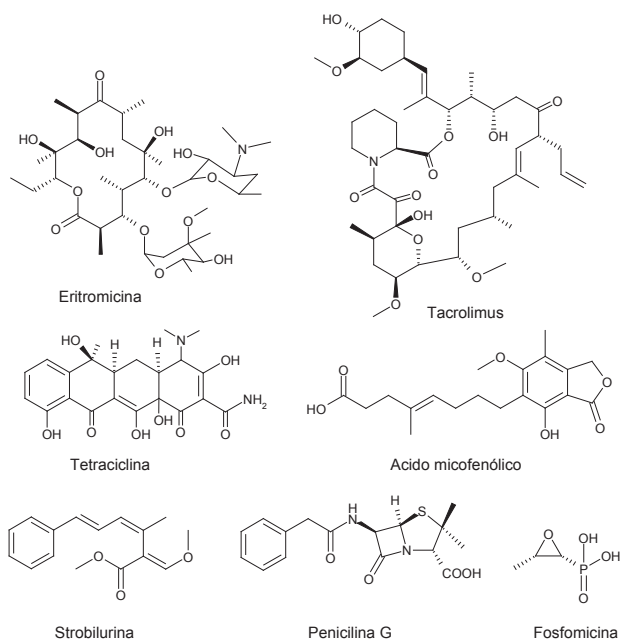


Figura 3. Ejemplos de productos naturales de utilidad terapéutica o en agroquímica, con diversos grados de complejidad estructural.

Diseño racional de fármacos

Ya a finales de la década de los años 80 se empezó a trabajar sobre la idea del llamado “diseño racional” de nuevos fármacos, o diseño de fármacos guiado por estructura (SGDD, de “*structure-guided drug design*”), entre otras denominaciones. La idea inicial, conceptualmente sencilla, era usar las tecnologías relacionadas con la biología estructural para generar la estructura tridimensional de una proteína diana (habitualmente por difracción de rayos X sobre la proteína cristalizada), y a partir de este conocimiento generar *in silico* pequeñas moléculas que pudieran servir de base para el desarrollo de fármacos.²⁶ Habitualmente, una vez se tiene la estructura 3D, se utilizan programas informáticos para predecir la conformación y orientación de un ligando en el sitio de unión al receptor (*docking*).

De alguna forma, en origen se pretendía contraponer este paradigma al del *screening* empírico, en el cual se confía en el azar para encontrar un punto de partida útil. En la práctica, estas estrategias no han reemplazado al paradigma del *screening*, y tras casi dos décadas de evolución el HTS se encuentra firmemente establecido como la piedra angular sobre la que descansa gran parte del proceso de DDNF en la industria, aunque complementado por otras herramientas, entre las que las técnicas computacionales ocupan una posición preeminente.

Inicialmente este tipo de abordajes empezaron aplicándose en el marco de los procesos de optimización de *leads*, pero posteriormente se han extendido también al descubrimiento de *leads de novo*, mediante estrategias tales como el *screening* virtual o el diseño de fármacos basado en fragmentos (FBDD, o *fragment-based drug design*).

El principio básico del FBDD es que la descomposición de los *leads* en fragmentos más pequeños, llegando incluso al nivel de grupos funcionales discretos, permitiría simplificar el análisis computacional de unión de ligandos. A partir de pequeños fragmentos que se unen a distintos sitios de la proteína diana con una afinidad débil (del orden de micro- o incluso milimolar), se busca optimizar las interacciones de cada fragmento con su sitio particular de unión, y posteriormente se integrarían todos estos fragmentos optimizados en una sola entidad molecular, cuya afinidad por la diana sería la suma de las interacciones individuales de cada fragmento. Dado que el análisis *in silico* aún no permite hacer predicciones exactas de la afinidad con que un fragmento se uniría a una diana, para poder utilizar este concepto de forma efectiva es necesario disponer de una herramienta experimental que permita ensayar la afinidad de pequeñas moléculas en número suficiente (habitualmente unos pocos miles). Entre las tecnologías utilizables, la resonancia magnética nuclear es la que probablemente ha tenido un mayor impacto.²⁷

En el caso del *screening* virtual, como su nombre sugiere, se enfrenta una colección de moléculas a una diana terapéutica *in silico* mediante un programa de *docking*, lo cual permite seleccionar un subconjunto, dentro de esa colección, con una mayor probabilidad de contener auténticos *leads*. Posteriormente se ensaya experimentalmente sólo esa parte de la colección. Existen abundantes ejemplos sobre diversas dianas de cómo esta estrategia ha permitido aumentar significativamente las probabilidades de detectar *hits* y *leads*, disminuyendo significativamente los costes asociados al proceso de *screening*.²⁸

Otras estrategias que se suelen englobar bajo el concepto de “diseño racional” incluyen el estudio de modelos de farmacóforos generados a partir de datos empíricos procedentes de ligandos con afinidad conocida por el receptor. Este tipo de modelos no suelen cuantificar la afinidad de los ligandos teóricos, pero pueden proporcionar ideas sobre el potencial de las moléculas diseñadas para interaccionar con su diana. También se analizan colecciones químicas *in silico* mediante búsquedas de similitud estructural, etc.

Existen algunas limitaciones obvias a la utilización de las estrategias de tipo SGDD, desde el hecho evidente de que no todas las dianas farmacológicas son susceptibles de ser abordadas *in silico*, hasta la dificultad para sintetizar en el laboratorio algunas de las moléculas que eventualmente pueden resultar de un proceso virtual, y lo que puede ser más crítico, las limitaciones existentes en las aplicaciones informáticas utilizadas para modelar interacciones moleculares, que aún no son capaces de responder con la precisión necesaria. Hay que considerar que las interacciones entre proteínas y ligandos están influidas por multitud de parámetros (energía conformacional, efectos de solvatación, múltiples modos de unión, etc.), y además con frecuencia el proceso de unión es sumamente dinámico, ocurriendo cambios conformacionales en la proteínas o en el ligando que afectan a la unión óptima. En resumen, los resultados de este tipo de análisis son muy dependientes de los programas de *docking* empleados.²⁶

Sin embargo, es indudable que estas herramientas se han incorporado ya de hecho al abanico de tecnologías disponibles para las compañías de investigación, y se utilizan de forma habitual. Existen numerosos fármacos en el mercado y en ensayos clínicos que reclaman en su origen alguna intervención de este tipo de estrategias. Algunos ejemplos serían los de nelfinavir, amprenavir y otros inhibidores de la proteasa del virus del VIH, o el zanamivir, un inhibidor de la neuraminidasa del virus de la gripe, fármacos generados a partir de la estructura cristalizada de la proteína diana en cada caso.²⁸ También ha sido particularmente relevante la contribución de estos métodos en el desarrollo de las nuevas generaciones de inhibidores de tirosina cinasas de utilidad en oncología.^{28,29} Hay que apuntar también que, en prácticamente todos estos casos, se ha utilizado el SGDD más bien durante la optimización de *leads*, siendo más excepcional el diseño completamente *de novo* de una cabeza de serie que haya resultado en un candidato clínico.^{27,30}

Inteligencia competitiva

Curiosamente, por importantes que sean las contribuciones de los sistemas de *screening* y el SGDD, a menudo la mejor fuente de *leads* es sencillamente otro *lead* anterior (la frase “*drugs come from drugs*” resume bien este concepto). Esto tiene relación con la “inteligencia competitiva”, o lo que es lo mismo, el análisis de la información proporcionada por grupos competidores en el ámbito industrial o académico, accesible a partir de la bibliografía de patentes, publicaciones científicas, congresos especializados, etc. Es evidente que cualquier compuesto de suficiente interés termina siendo patentado antes o después, aunque también que las patentes no suelen describir compuestos únicos sino familias de compuestos relacionados, siendo a menudo oscuro cuál de los muchos compuestos cubiertos por una

patente es en realidad el más interesante. Sin embargo, la redacción de la misma patente puede proporcionar pistas sobre qué compuestos son los más interesantes (probablemente aquellos de los que se hacen reivindicaciones (*claims*) específicas, o de los que se detalla su síntesis a gran escala, o detalles de formulación). En realidad, el esconder los candidatos más interesantes en el cuerpo de una patente donde se protegen múltiples compuestos es todo un arte, al igual que lo es el descubrir cuál de ellos es el más importante. Con respecto a las publicaciones en revistas científicas, la gran mayoría de las publicaciones en este área resumen proyectos antiguos (como mínimo porque las estructuras han tenido que ser patentadas con anterioridad) o fallidos, pero en ocasiones puede encontrarse información útil. En general, los artículos que aparecen en revistas de alto impacto suelen indicar estructuras interesantes.

Un tema relacionado es la reutilización (*reprofiling* o *repositioning*) de fármacos, que pretende encontrar indicaciones nuevas para fármacos ya en el mercado (a veces en áreas alejadas de la indicación original). Este abordaje puede abreviar significativamente el proceso de desarrollo, ya que el fármaco original ha pasado todas las etapas necesarias para su comercialización. Existen varias compañías cuyo modelo de negocio se basa en este concepto.³¹

¿Qué características tiene un buen *lead*?

Los procesos de *screening* suelen resultar en la identificación de una serie de compuestos activos o *hits*, a menudo en un número muy alto (una tasa de activos del 0,1% en un ensayo de *screening*, que ya es bastante baja, implica que del *screening* de una colección de 10^6 compuestos se obtendrían 1000 *hits*). Habitualmente el proceso de *screening* primario se sigue de una evaluación más detallada de los *hits* para determinar sus propiedades biológicas y farmacológicas, que permiten seleccionar de entre ellos los que pueden ser puntos de partida apropiados para un proceso de optimización. Esta caracterización inicial suele incluir, además de datos físico-químicos básicos (solubilidad, polaridad, etc.) ensayos *in vitro* para determinar la potencia sobre la diana primaria, además de su especificidad utilizando ensayos sobre dianas relacionadas. Igualmente, se pueden realizar ensayos secundarios sobre líneas celulares, y según los casos ensayos en modelos animales, estimaciones de farmacocinética y estudios de ADME *in vitro* e *in vivo*. El tipo de ensayos, el orden en que se realizan, y la importancia que se asigna a los datos obtenidos a la hora de decidirse por una estructura determinada es muy variable, dependiendo del tipo de diana, el número de *hits*, los recursos disponibles, y las estrategias establecidas por los grupos de investigación, a menudo basadas en sus experiencias previas. Un buen *lead* debe ser potente (aunque a menudo el compuesto más potente no es el mejor), específico, de bajo peso molecular, soluble en agua, estructuralmente sencillo, sin grupos reactivos (epoxi, nitroso, etc.), e idealmente con biodisponibilidad oral. Los criterios para seleccionar un buen *lead* dependen del área terapéutica, en última instancia.

La inmensa mayoría de los *hits* detectados en cualquier *screening* carecen de las propiedades necesarias para convertirse en *leads*, pero es poco frecuente que una campaña

de *screening* no consiga detectar al menos una estructura útil para iniciar un proceso de optimización, aunque a veces ocurre. Por ejemplo, las interacciones proteína-proteína han sido consideradas tradicionalmente como poco adecuadas para la intervención farmacológica, aunque existen ejemplos de éxito.³²

Uno de los trabajos más influyentes en la forma de abordar los procesos de selección de *leads* (*hit-to-lead process*) por parte de la industria es el publicado en 1997 por Lipinski *et al.*,³³ quienes realizaron un análisis de las características físico-químicas que comparten las moléculas que han llegado a comercializarse como fármacos o alcanzar ensayos clínicos avanzados. Según este estudio, es más probable que una molécula tenga una biodisponibilidad pobre cuando cumple al menos dos de estas cuatro reglas (*rule-of-five*, porque en ellas aparece el número 5 o un múltiplo):

- Peso molecular > 500
- $\text{clogP} > 5$ (ratio de solubilidad en octanol vs agua)
- > 5 grupos donadores de enlaces de H (OH o NH)
- >10 átomos aceptores de enlaces de H (O y N)

Aunque estas observaciones son sin duda interesantes, la aplicación de estas reglas de manera indiscriminada sobre cualquier listado de *hits* obtenido de un proceso de *screening* ha llevado probablemente a descartar injustificadamente moléculas interesantes. Así, tanto los fármacos basados en PN como los sustratos de transportadores incumplen estas reglas de manera general. Estudios posteriores han identificado otros parámetros físico-químicos que correlacionan con la biodisponibilidad, tales como el área de superficie polar.³⁴ A pesar de que las reglas de Lipinski pueden considerarse superadas, dicho trabajo tiene el mérito adicional de haber puesto de manifiesto la importancia de considerar las propiedades farmacocinéticas de los candidatos a fármacos en las etapas más tempranas del proceso, una tendencia que se ha consolidado en el sector, como se comenta más adelante.

Optimización de *leads*

Por muy buenas propiedades que tenga un *lead*, estas moléculas son muy rara vez, por no decir nunca, candidatos directos a fármacos, y es necesario un proceso de optimización, esto es, la síntesis de derivados de la molécula original, en rondas sucesivas. En cada ronda de derivatización las nuevas moléculas son sometidas a un proceso de caracterización biológica y farmacológica, y los mejores derivados son utilizados para una nueva ronda de modificación, procediéndose de esta forma a una mejora en todos los aspectos estudiados (Figura 4). Con frecuencia son necesarios cientos o incluso miles de derivados para llegar a una molécula con las características necesarias para convertirse en auténtico candidato a fármaco.

Posiblemente las excepciones más notables a este paradigma son una vez más algunos PN, que pasaron directamente de su descubrimiento en el *screening* a su utilización como fármacos. Hay múltiples ejemplos en el ámbito de los antibióticos (eritromicina, vancomicina, y tantos otros)

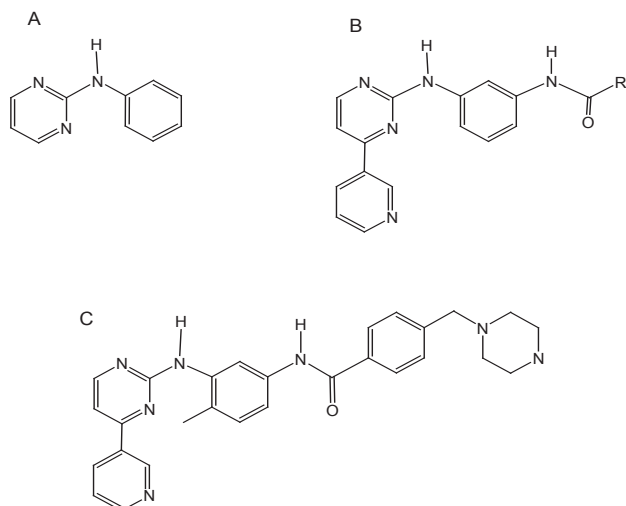


Figura 4. Optimización de un *lead* hasta llegar a un fármaco: el ejemplo del imatinib (Glivec[®]), un inhibidor de tirosina cinasas útil en varios tipos de cáncer. El *lead* de partida (A) fue identificado en un *screening* contra proteína quinasa C. La adición de un grupo 3'-piridil en la pirimidina aumentó la actividad en células, mientras que el grupo amido proporcionó actividad frente a tirosina cinasas (B). El grupo metilo en el anillo diaminofenil eliminó la actividad inhibitoria de serina-treonina cinasas, y la adición de una *N*-metil-piperazina (C) aumentó la solubilidad y la disponibilidad oral.³⁵

y en otras áreas terapéuticas (ciclosporina, tacrolimus y rapamicina entre los inmunosupresores, lovastatina entre los hipocolesteremiantes, etc.).³⁶ Sin embargo, también es verdad que con frecuencia la modificación química de estas estructuras ha llevado a fármacos con mejores propiedades que el producto natural original (por ejemplo, los antibióticos derivados de la eritromicina, como la claritromicina o la azytromicina, que tienen mejores propiedades farmacocinéticas y un espectro más amplio, o la simvastatina, un derivado de la lovastatina (Figura 5) de características superiores).³⁶

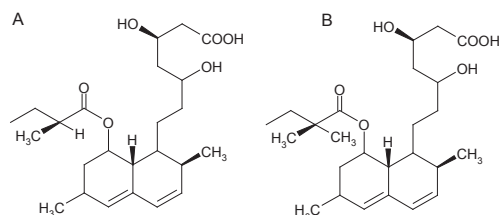


Figura 5. Estructuras de la lovastatina (A) y su derivado la simvastatina (B). La adición de un grupo metilo proporciona a esta última una mayor eficacia *in vivo*, a dosis menores.

El tipo de estudios que se realizan sobre los compuestos sintetizados durante los procesos de optimización de *leads* no difieren mucho de los que se aplican en el proceso *hit-to-lead*, aunque pueden tener un grado de complejidad variable en función del estadio en que se encuentre el proyecto. Por razones de costes, este tipo de ensayos se realizan hasta cierto punto de forma secuencial, de manera que los ensayos más costosos (generalmente *in vivo*) se reservan para moléculas que son positivas en ensayos *in vitro* más preliminares. El tipo

de ensayos a los que se suele someter los compuestos obtenidos durante un proceso de optimización de *leads* se pueden resumir en las siguientes categorías:

1. Ensayos sobre la diana farmacológica
 - a. Ensayos *in vitro* (bioquímicos, o en células completas)
 - b. Ensayos *in vivo* (modelos animales)
2. Efecto sobre dianas relacionadas (especificidad) –habitualmente *in vitro*
3. Toxicidad (*in vitro*)
4. Farmacocinética e interacciones entre fármacos
 - a. ADME *in vitro*
 - b. ADME *in vivo*

Detección temprana de efectos adversos y propiedades de ADME

Una tendencia visible en la industria farmacéutica durante los últimos años ha sido la implantación de sistemas para detectar la existencia de efectos adversos y caracterizar, al menos parcialmente, las propiedades relacionadas con la farmacocinética (ADME) en etapas muy tempranas del desarrollo de fármacos. El objetivo es reducir la tasa de fracaso asociada al descubrimiento de una inadecuada farmacocinética o de efectos adversos una vez que los candidatos a fármacos han llegado ya a las fases de desarrollo clínico, o lo que es peor, con posterioridad a su comercialización. Así, la mayoría de las compañías farmacéuticas utilizan ya una serie de ensayos *in vitro* y de herramientas *in silico* que permiten obtener información relevante sobre el potencial de los compuestos analizados para producir algún tipo de efecto no deseable.³⁷

El clásico ejemplo de este tipo de abordaje es sin duda la cardiotoxicidad mediada por interacción con los canales de potasio hERG (IKr), que causó la retirada de varios fármacos del mercado en la pasada década (terfenadina, astemizol y otros). La inhibición de este canal de potasio, responsable de la corriente de repolarización tardía del músculo cardiaco, puede resultar en una prolongación de la onda QT, y eventualmente en una arritmia ventricular de consecuencias fatales. Las autoridades reguladoras exigen ya a las compañías farmacéuticas, además de la realización de ensayos de riesgo cardiovascular en modelos animales, evidencias de que los futuros fármacos no bloquean de forma significativa el canal hERG mediante ensayos *in vitro*.³⁸

Otro tipo de efectos no deseados que se suelen caracterizar en etapas muy tempranas se refieren a las posibles interacciones entre fármacos. Existe un gran interés en evitar que los medicamentos que se van a lanzar al mercado presenten interacciones con otros ya existentes, debido al cada vez mayor número de pacientes tratados durante largos periodos de tiempo con múltiples fármacos. La mayoría de los eventos de interacción entre fármacos se deben a fenómenos de inhibición o inducción de los citocromos CYP450 implicados en el metabolismo de fármacos, existiendo ensayos *in vitro* que permiten establecer el potencial de los compuestos generados durante el proceso de optimización de cabezas de serie para inhibir estos enzimas o inducir su expresión.³⁹ Aunque la capacidad de este tipo de ensayos para predecir un fenómeno visible en la clínica dista de ser perfecta, los datos generados con este tipo de ensayos, que se pueden realizar en gran número y con un

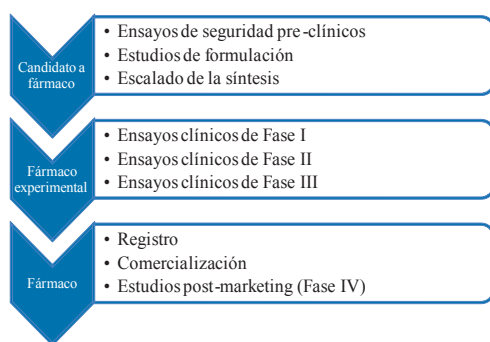
coste relativamente bajo, permiten seleccionar candidatos con menores posibilidades de presentar problemas en posteriores etapas del desarrollo.^{37,40}

Existe, en fin, una cada vez mayor tendencia a la evaluación temprana de las características que pueden hacer que un candidato fracase en su carrera hacia el mercado. Otros muchos parámetros tales como la capacidad de unión a proteínas de plasma, el potencial para modificar covalentemente proteínas, la capacidad para atravesar la barrera intestinal o hemato-encefálica, o el potencial de los compuestos evaluados para ser sustratos de transportadores son estudiados ahora en etapas tempranas de desarrollo, mucho antes de que los compuestos lleguen a los ensayos clínicos.² También es frecuente que los compuestos candidatos a desarrollo clínico pasen por un amplio panel de ensayos *in vitro* (actividades enzimáticas esenciales, receptores de membrana, etc.) al objeto de detectar posibles actividades “*off-target*”. El conocimiento obtenido a partir de este tipo de estudios pretende garantizar que los compuestos tengan las mayores probabilidades de éxito al pasar a los ensayos clínicos, que es donde de verdad el futuro fármaco tiene que demostrar su eficacia y su seguridad.

Candidatos a fármacos

Al finalizar el proceso de optimización se alcanza una estructura que tiene las deseadas propiedades farmacológicas y farmacocinéticas, incluyendo no sólo una adecuada actividad sobre la diana *in vitro* y en los modelos animales disponibles, sino una serie de características fisicoquímicas y farmacocinéticas que incluirían una buena solubilidad en agua, una alta biodisponibilidad y características farmacocinéticas aceptables para el régimen de dosificación y la ruta de administración deseada, poco efecto “*first-pass*” (metabolismo tras el primer paso por el hígado), unión moderada a proteínas de plasma (<90%), mínimo potencial para la modificación covalente de proteínas, generar un número limitado de productos metabólicos y que éstos nos sean farmacológicamente activos (salvo que se trate de un profármaco) ni químicamente reactivos (por su potencial tóxico), metabolismo catalizado por múltiples isoenzimas de los citocromos CYP450 (y no polimórficas), y un mínimo potencial de inhibición e inducción de CYP450.

La molécula resultante de este largo proceso, que constituye el denominado “candidato a fármaco”, todavía debe pasar una serie de estudios antes de llegar al mercado (Esquema 2).



Esquema 2. Etapas necesarias para el desarrollo de un fármaco a partir de un candidato.

En el sector se suelen considerar las etapas descritas en las secciones anteriores como fase de descubrimiento, considerándose las restantes como fases de desarrollo. Estas incluyen la realización de estudios extensivos de seguridad y toxicidad preclínicas sobre modelos animales, estudios de formulación y el escalado de la síntesis del compuesto desde la escala de laboratorio hasta la industrial. Una vez resueltas estas etapas, el candidato pasa a ensayarse en seres humanos, en una serie de ensayos clínicos en varias fases secuenciales. En la fase I se evalúa la seguridad del fármaco experimental en un número reducido de voluntarios sanos (en ciertas circunstancias pueden ser pacientes). De ser los resultados satisfactorios, se procede a la fase II, en la que se prueba su efecto en un número también reducido de pacientes, buscando evidencias de eficacia. De ser así, se procede a la fase III, en la cual el fármaco se expone a miles de pacientes, habitualmente comparándolo con el tratamiento estándar para la misma indicación, y se obtienen datos sobre su eficacia comparada, así como sus efectos adversos en una población más significativa. Habitualmente es tras completar la fase III cuando se solicita a las autoridades sanitarias la aprobación y registro del fármaco para su comercialización, aunque en algunos casos este proceso se realiza directamente tras la fase II (en general para enfermedades muy graves para las que no hay alternativas terapéuticas satisfactorias).

En este contexto, hay que mencionar otro aspecto en el que la genómica está contribuyendo al desarrollo de fármacos, basado en la aplicación del concepto de la “terapia personalizada”, según la cual se utilizarían los fármacos más apropiados para cada paciente en función del genotipo de éste. Ello permitiría reducir la elevada tasa de fracaso en el actual modelo de terapia empírica, por tanteo y error, ya que se estima que de forma general sólo un tercio de los pacientes sometidos a medicación se benefician del tratamiento prescrito.⁴¹ Aunque ello también significa que los mercados potenciales de dichos fármacos serían menores, es posible que el coste del desarrollo sea menor, ya que se podría disminuir el tamaño de los ensayos necesarios para estudiar la eficacia de un nuevo fármaco, utilizando sólo la población que por su genotipo tiene mayores probabilidades de beneficiarse de éste.⁴² Algunos de los conceptos básicos de la terapia personalizada se están aplicando ya hoy en día, especialmente en campos como la oncología.⁴³

Conclusiones

¿Han servido los profundos cambios vividos en el seno de la industria farmacéutica para aumentar la productividad en la investigación? Las voces más críticas auspician que a pesar de la enorme inversión en nuevas tecnologías, este aumento de la productividad no se producirá a tiempo para evitar que un buen número de las compañías existentes en la actualidad desaparezcan del mercado, al menos tal y como las conocemos ahora.³⁸ Además, se ha argüido que el modelo basado puramente en la búsqueda de compuestos que interfieren con dianas terapéuticas perfectamente identificadas (“*target-based drug discovery*”) ha generado una tendencia que puede pecar de un excesivo reduccionismo, al enfocarse demasiado en la diana al nivel molecular, subestimando a veces el papel fisiológico de esa diana en el organismo intacto, y pasando por alto en general la complejidad inherente al funcionamiento de las células, órganos y seres vivos completos.⁴⁴

Es evidente que no se puede esperar que los cambios realizados en las etapas más tempranas de investigación se plasmen en nuevos lanzamientos al mercado hasta pasado un tiempo, que desde luego no es menor de 10 ó 15 años, siguiendo los plazos habituales en la industria. Ello significa que los frutos de las tecnologías implementadas en la década de los 90 deberían empezar a plasmarse en nuevos productos en estos momentos, y es cierto que aunque el lanzamiento de nuevos productos sigue sin proporcionar la renovación de productos a la que la industria aspira, también lo es que los “pipelines” de las compañías farmacéuticas están ahora mismo constituidos por candidatos a fármacos en cuyo desarrollo han contribuido en mayor o menor medida las nuevas tecnologías y estrategias implementadas durante la década de los 90. Sin embargo, abundan los comentarios en la literatura especializada sobre el fracaso del nuevo modelo en cuanto a su capacidad para generar los números prometedidos de nuevos compuestos en el mercado, si bien se añade la reflexión de que seguramente las expectativas eran poco realistas. Sólo el tiempo dirá si las largas listas de productos en desarrollo de las que suelen hacer gala las compañías farmacéuticas, que parecen en general prometedores en las fases más tempranas de desarrollo clínico y preclínico, se traducen en verdaderos fármacos que superen todas las fases de los ensayos clínicos y se puedan lanzar al mercado.

Agradecimientos

La imagen de la Figura 1 ha sido cedida amablemente por Marisol Soengas (Grupo de Melanoma) y Francisca Mulero (Unidad de Imagen), del CNIO.

Referencias

1. a) B. Munos, *Nature Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 959–968. b) B. Hughes, *Nature Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 89–92.
2. I. Kola, J. Landis, *Nature Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 711–715.
3. J. P. Overington, B. Al-Lazikani, A. L. Hopkins, *Nature Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 993–996.
4. D. B. Searls, *Drug Discov. Today* **2000**, *5*, 135–143.
5. M. A. Lindsay, *Nature Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 831–838.
6. a) T. M. Frayling, *Nature Rev. Genetics* **2007**, *8*, 657–662. b) C. S. Carlson, M. A. Eberle, L. Kruglyak, D. A. Nickerson, *Nature* **2004**, *429*, 446–452.
7. a) S. D. Mills, *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *71*, 1096–1112. b) D. J. Payne, M. N. Gwynn, D. J. Holmes, D. L. Pompilano, *Nature Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 29–40.
8. The International Cancer Genome Consortium, *Nature* **2010**, *464*, 993–998.
9. S. V. Chittur, *Comb. Chem. High Through. Screen.* **2004**, *7*, 531–537.
10. Z. Wang, M. Gerstein, M. Snyder, *Nature Rev. Genet.* **2009**, *10*, 57–63.
11. a) M. Baker, *Nature Methods* **2010**, *7*, 157–161. b) M. Gstaiger, R. Aebersold *Nature Rev. Genet.* **2009**, *10*, 617–627.
12. J. D. Thompson, *Drug Discov. Today* **2002**, *7*, 912–917.
13. N. E. Sharpless, R. A. DePinho, *Nature Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 741–754.
14. a) R. Kramer, D. Cohen, *Nature Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 965–972. b) T. Kaletta, M. O. Hengartner, *Nature Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 387–399.
15. a) J. Wölcke, D. Ullmann, *Drug Discov. Today* **2001**, *6*, 637–646. b) C. Eggeling, L. Brand, D. Ullmann, S. Jäger, *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 632–641.
16. T. Garyantes, *Drug Discov. Today* **2002**, *7*, 489–490.
17. a) P. Gribbon, A. Sewing, *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 17–22. b) B. A. Posner, *Curr. Op. Drug Discov. Develop.* **2005**, *8*, 487–494.
18. A. Mitscher en *Textbook of drug design and discovery* (Eds.: P. Krogsgaard-Larsen, T. Liljefors, U. Madsen), Taylor & Francis, London, **2002**, pp. 1–34.
19. L. J. Gershell, J. H. Atkins, *Nature Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 321–327.
20. F. Vicente, A. Basilio, A. Cabello, F. Peláez, *Clin. Microbiol. Infect.* **2003**, *9*, 15–32.
21. F. Peláez, *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *71*, 981–990.
22. F. E. Koehn, G. T. Carter, *Nature Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 206–220.
23. A. D. Buss, M. S. Butler, *Drug Develop. Res.* **2004**, *62*, 362–370.
24. D. S. Tan, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2004**, *7*, 631–643.
25. C.T. Walsh, *Science* **2004**, *303*, 1805–1810.
26. a) T. Liljefors, I. Pettersson en *Textbook of drug design and discovery* (Eds.: P. Krogsgaard-Larsen, T. Liljefors, U. Madsen), Taylor & Francis, London, **2002**, pp. 86–116. b) G. Schneider, U. Fechner, *Nature Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 649–663.
27. a) P. J. Hajduk, J. Greer, *Nature Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 211–219. b) R. A. E. Carr, M. Congreve, C. W. Murray, D. C. Rees, *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 987–992.
28. M. Congreve, C. W. Murray, T. L. Blundell, *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 895–907.
29. R. L. M. von Montfort, P. Workman. *Trends Biotech.* **2009**, *27*, 315–328.
30. L. W. Hardy, A. Malikayil, *Curr. Drug Discov.* **2003**, 15–20.
31. a) D. Bradley, *Nature Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 446. b) T. T. Ashburn, K. B. Thor, *Nature Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 673–683.
32. M. R. Arkin, J. A. Wells, *Nature Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 301–317.
33. C. Lipinski et al. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, *23*, 3–25.
34. P. D. Leeson, B. Springthorpe, *Nature Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 881–890.
35. N. Lydon, *Nature Med.* **2009**, *15*, 1153–1157.
36. a) F. Peláez en *Mycology Series Vol. 22: Handbook of Industrial Mycology* (Ed.: Z. An), Marcel Dekker Inc., New York, **2005**, pp. 49–92. b) S. B. Singh, O. Genilloud, F. Peláez, en *Comprehensive Natural Products II. Chemistry and Biology. Vol. 2* (Eds.: L. Mander, H.-W. Lu), Elsevier, Oxford, **2010**, pp. 109–140.
37. T. Wunberg et al., *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 175–180.
38. K. Finlayson, H. J. Witchel, J. McCulloch, J. Sharkey, *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *500*, 129–142.
39. N. Plant, *Drug Discov. Today* **2004**, *9*, 328–336.
40. L. C. Wienkers, T. G. Heath, *Nature Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 825–833.
41. R. M. Norton, *Drug Discov. Today* **2001**, *6*, 180–185.
42. D. F. Horrobin, *Nature Biotech.* **2001**, *19*, 1099–1100.
43. R. L. Schilsky, *Nature Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 363–366.
44. F. Sams-Dodd, *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 139–147.