

1. Las ómicas en el desarrollo de nuevos fármacos

MARÍA JOSÉ GÓMEZ-LECHÓN y
MARÍA CÁSCALES ANGOSTO

1. RESUMEN

Las nuevas metodologías *ómicas*, junto con las aportaciones de los métodos *in vitro* e *in silico*, constituyen en la actualidad una estrategia farmacológica multidisciplinar para el desarrollo de herramientas terapéuticas con una utilidad y eficacia sin precedentes. El desarrollo de un nuevo medicamento es un proceso largo y costoso cuyo objeto es investigar en distintas fases, preclínicas y clínicas, que el nuevo fármaco reúne los requisitos de eficacia terapéutica y seguridad, exigidos para su comercialización y administración al ser humano. El progreso de la Farmacología y, en lógica consecuencia, de la Terapéutica, se han relacionado estrechamente con el progreso de disciplinas tales como la química, la bioquímica, la clínica y muy particularmente con la biología molecular, la biotecnología y la bioinformática. En el desarrollo de un nuevo medicamento hay que considerar que la investigación ha de ir unida a una simultánea toma de decisiones. La interacción de todas estas disciplinas y tecnologías ha incrementado la eficacia del descubrimiento de fármacos mediante el diseño *in silico* de nuevas entidades moleculares de potencial acción farmacológica, cuya consecuencia es la generación rápida y eficiente de nuevas estructuras químicas. Gran parte de los estudios, que se llevan y se han llevado a cabo habitualmente en animales de experimentación, aún siendo de gran valor para la evaluación del riesgo tóxico, proporcionan resultados que no siempre han podido ser extrapolados al hombre. Por ello, conocer de antemano cuál es el modelo animal idóneo es la manera más eficaz de *reducir* el uso innecesario de animales y una de las maneras de contribuir a una investigación más racional y sólida desde el punto de vista científico y más humana desde el punta de vista ético

2. INTRODUCCIÓN

Durante cientos de años el poder terapéutico de las plantas ha sido la base de la farmacología, hasta que la química moderna las fue desplazando paulatinamente. A finales del siglo XIX se empezaron a aislar los principios activos de algunas especies vegetales, a modificar sus moléculas y a tratar de sintetizarlas en el laboratorio. Esto dio lugar a un sinnúmero de compuestos químicos que fueron los cimientos de los medicamentos de síntesis, y determinó el inicio de la Farmacología moderna. Hoy en día, el desarrollo de un nuevo medicamento es una empresa de elevado riesgo que requiere un notable esfuerzo humano y de recursos técnicos y económicos. Es un proceso complejo en el que la investigación y la simultánea toma de decisiones, van encaminadas a la identificación y validación de una diana de terapéutica, tratando de seleccionar, entre un importante número de compuestos derivados de un *cabeza de serie*, aquél que por sus características farmacológicas y menor toxicidad y/o efectos adversos sea más *eficaz, seguro* y de *fácil manejo clínico*.

En todo proceso de desarrollo farmacéutico se pueden distinguir dos fases bien diferenciadas (Tabla 1): *Pre-clínica* y *Clínica*. La *fase pre-clínica* (Figura 1) está destinada a identificar aquél compuesto que por sus prometedoras características puede ser administrado a seres humanos, bajo formas y modos controlados, con el fin de determinar su eficacia terapéutica en la fase siguiente o *fase clínica*.

Los estudios clínicos se desarrollan en varias etapas bien diferenciadas: desde los estudios en grupos de voluntarios seleccionados hasta los estudios mul-

Tabla 1. Fases en el desarrollo de un nuevo fármaco

Fase Pre-clínica

Fase Química: síntesis de nuevas moléculas "cabezas de serie" y de análogos

Fase Biológica: Farmacología y Toxicología en animales

Fase Clínica

Fase clínica I: voluntarios sanos

Fase clínica II: grupos seleccionados de enfermos

Fase clínica III: estudios multicéntricos controlados

Fase clínica IV: seguimiento del uso generalizado del fármaco

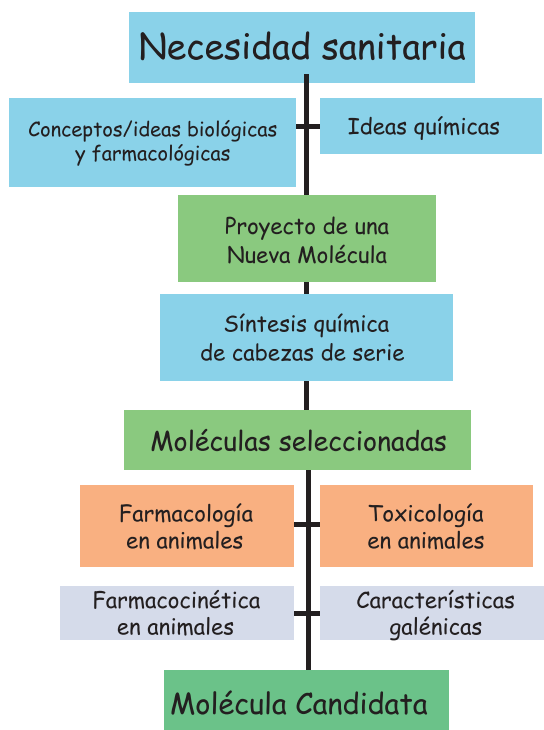


FIGURA 1. Fases pre-clínicas en el desarrollo de un nuevo medicamento. Selección de una molécula candidata para desarrollo a partir de varios derivados de un cabeza de serie, por sus características farmacológicas y menor toxicidad y/o efectos adversos para que sea eficaz, seguro y de fácil manejo clínico.

ticéntricos para conseguir el registro sanitario del nuevo fármaco y finalmente su comercialización (Figura 2). La experiencia demuestra que la probabilidad de que un compuesto termine convirtiéndose en un nuevo medicamento, es reducida. En líneas generales, la causa principal de la interrupción del desarrollo de un nuevo fármaco en su fase clínica, suele ser la existencia de efectos adversos inesperados, mientras que la falta de eficacia terapéutica contribuye de forma muy reducida.

En el proceso de evaluación de medicamentos confluyen numerosas actividades, todas ellas dirigidas a demostrar su eficacia, una relación beneficio-riesgo favorable y un coste-eficacia óptimo (1,2). El desarrollo y la introducción de un fármaco en el arsenal terapéutico ha exigido y exigirá un impresionante trabajo multidisciplinar en el que se incluye la colaboración de químicos, biólogos moleculares, toxicólogos, farmacólogos básicos y clínicos, economistas y estadísticos y

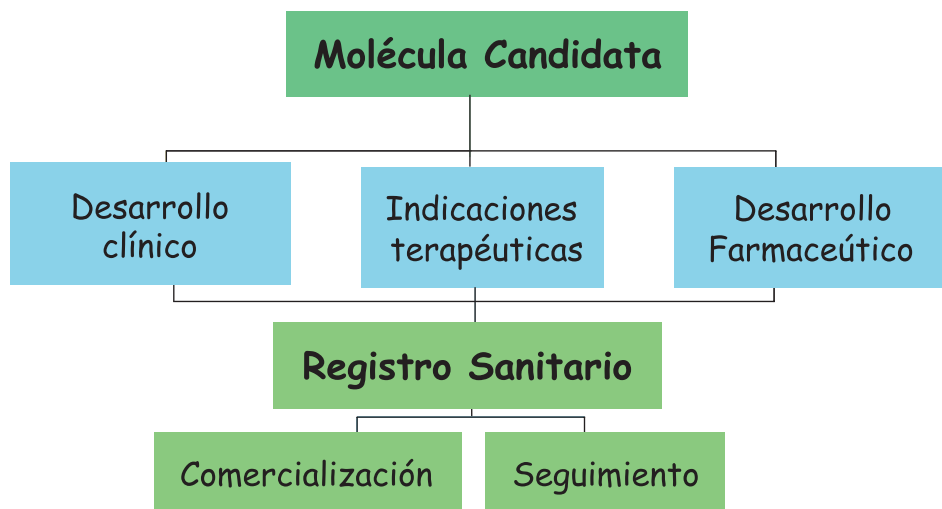


FIGURA 2. *Fases clínicas en el desarrollo de un nuevo medicamento. Los estudios clínicos se desarrollan en varias etapas bien diferenciadas, desde los estudios en grupos seleccionados de voluntarios hasta los estudios multicéntricos necesarios para conseguir el registro sanitario del nuevo fármaco y su comercialización.*

supone un considerable esfuerzo intelectual y un enorme costo económico. Y ello en condiciones óptimas, cuando no se detectan efectos adversos que obligan a suspender el desarrollo del fármaco en fases avanzadas o una vez comercializado. La farmacoepidemiología se ocupa de velar por este asunto. En todo caso tenemos que aceptar el riesgo que implica el uso de los medicamentos, como aceptamos los riesgos de otras muchas actividades cotidianas. En los albores del siglo XXI, a diferencia con el pasado, los fundamentos para la investigación y desarrollo de nuevos fármacos se han de apoyar sobre todo en la *biología molecular*, el *genoma* y *proteoma*, la *biotecnología*, la *química combinatoria*, la *bioinformática* y la *robótica*, al margen de la Farmacología y la Clínica.

Los progresos en conocimiento de los mecanismos moleculares por los que se producen las enfermedades han conseguido llegar al diseño de fármacos que actúan sobre moléculas concretas. Estos fármacos intentan reproducir aquellas funciones celulares que se han alterado por el estado patológico. Sin embargo, las relación entre la funcionalidad celular y las múltiples acciones de las sustancias son siempre muy complejas. Así, una misma sustancia puede llevar a producir efectos completamente opuestos dependiendo de la situación en que se encuentre el organismo. Por ello, el desarrollo de nuevos fármacos continua enfrentándose a la barrera de la eficacia.

En resumen, los compuestos son examinados durante la fase *pre-clínica* bajo dos criterios básicos:

- a) que ejerzan una actividad farmacológica definida y
- b) que posean una tolerancia lo suficiente elevada de manera que exista una ventana terapéutica suficientemente amplia.

Se puede afirmar que han cambiado las técnicas pero no los objetivos. En este sentido, la farmacología se ha beneficiado extraordinariamente de la posibilidad de utilizar, no sólo la estrategia multidisciplinar anteriormente mencionada, sino también los nuevos métodos *in vitro* e *in silico*, y las nuevas tecnologías denominadas genéricamente ÓMICAS (genómica, proteómica, metabolómica y citómica), de gran ayuda para descubrir y desarrollar nuevas herramientas terapéuticas (Figura 3).

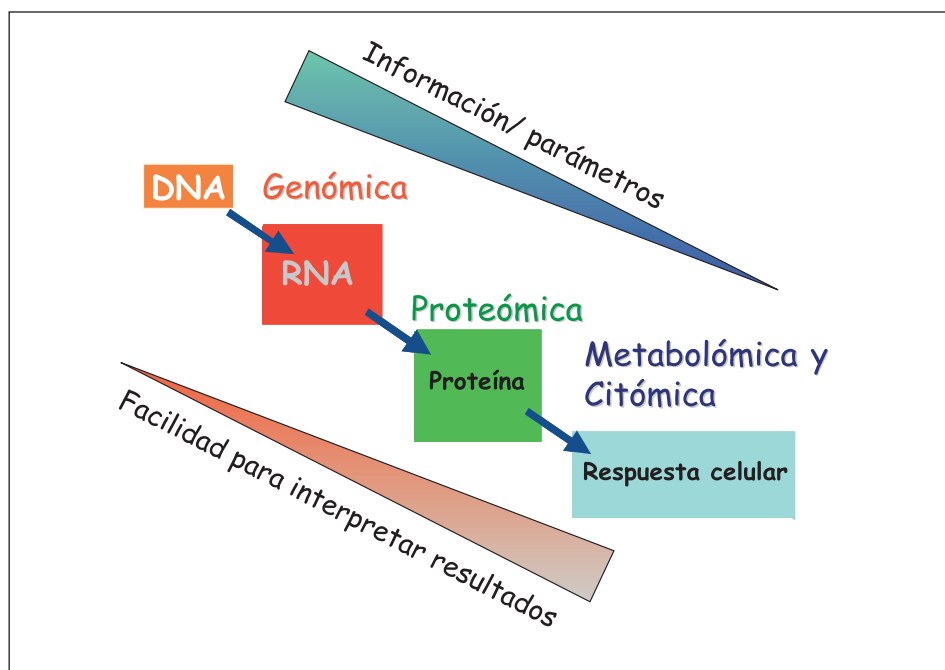


FIGURA 3. Integración de las nuevas tecnologías Ómicas para el estudio de nuevos fármacos. La genómica se ocupa de descifrar el genoma de los seres vivos, así como sus funciones, su regulación y su transmisión. La proteómica se ocupa de investigar la función y regulación de las proteínas codificadas por el genoma (proteoma), por ejemplo las modificaciones postraduccionales. La citómica y metabolómica, las más recientes ómicas, se encargan de relacionar el proteoma con la estructura y función celulares.

3. NUEVAS ESTRATEGIAS PARA EL DESCUBRIMIENTO Y ESTUDIO DE NUEVOS FÁRMACOS

El estudio *pre-clínico* comprende una fase inicial de desarrollo químico en-caminado a la síntesis y selección de nuevas moléculas candidatas, seguida por la investigación de su potencial acción farmacológica, y finalmente de la evaluación de su seguridad. La clave del éxito durante el proceso de investigación y desarrollo de nuevas moléculas es que posean ciertas propiedades favorables: actividad biológica y solubilidad adecuadas, capacidad para atravesar barreras críticas (intestinal y/o hematoencefálica), razonable estabilidad metabólica, y seguridad en su administración al hombre.

3.1. Descubrimiento de moléculas candidatas

La búsqueda de moléculas prototipo es la fase más arriesgada del proceso del desarrollo de un fármaco (Figura 4A).

¿Qué es un prototipo? Es un producto, de cualquier origen, con actividad en relación con una determinada diana terapéutica. La búsqueda de prototipos se puede realizar utilizando diferentes aproximaciones:

- a) la mejora de fármacos ya existentes
- b) el aprovechamiento de la información biológica ya existente (etnofarmacología, efectos secundarios, productos industriales, observaciones en animales)
- c) las aproximaciones racionales
- d) el cribado sistemático (extensivo, indiscriminado o de alto rendimiento).

¿Qué hacer cuando se dispone de un prototipo? Como muestra la Figura 4B, existen varias estrategias para estudiar y/o modificar la molécula y convertirla en un compuesto *cabeza de serie*, candidato para ser desarrollado. En la actualidad las técnicas de la química combinatoria predominan sobre cualquier otro tipo de aproximación, sin perder de vista la creciente influencia que la biología molecular tiene también en este campo. Nos encontramos en una nueva era para el descubrimiento de fármacos (*drug discovery*), en la cual es posible desarrollar nuevos agentes cuya diana terapéutica sea una proteína o una actividad biológica determinada de la célula. La clave de todo ello ha sido el extraordinario progreso en el conocimiento de la biología celular y molecular y los recientes avances

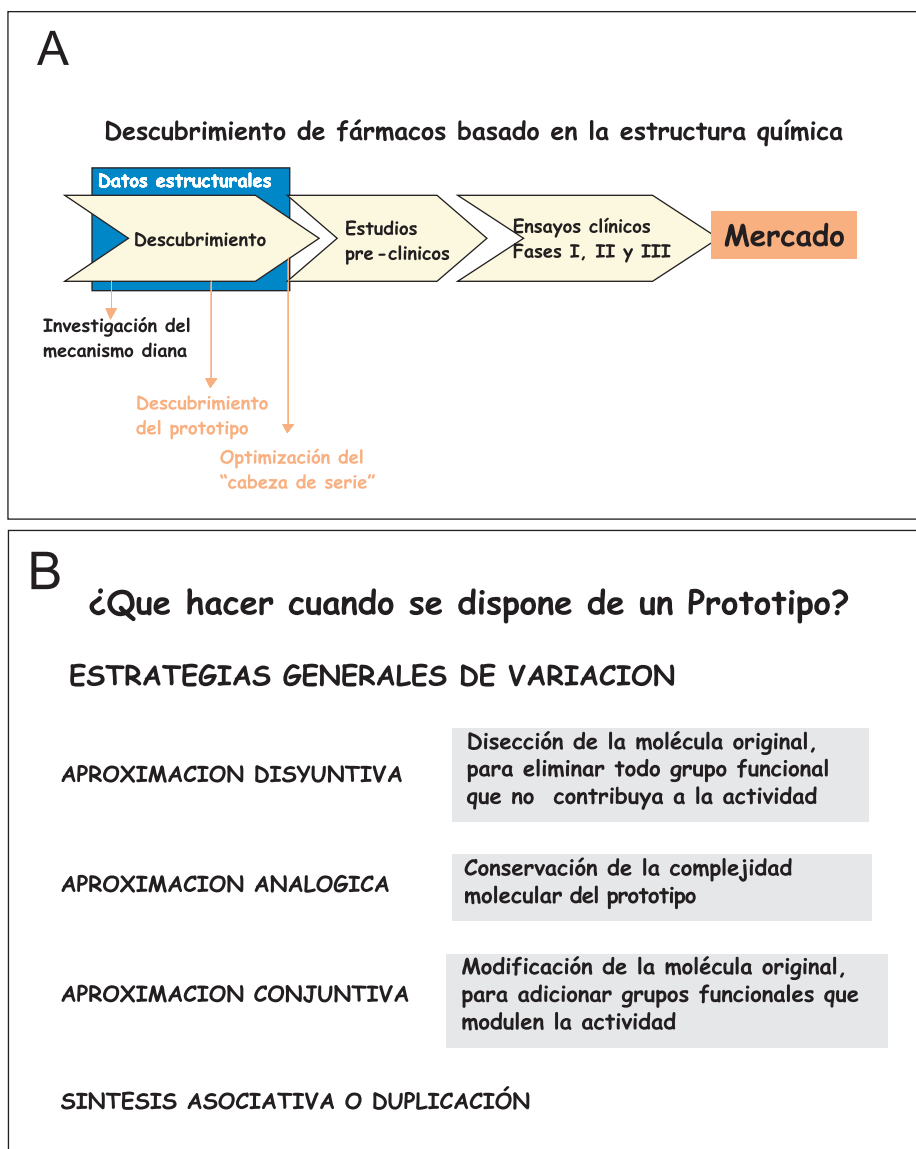


FIGURA 4. Descubrimiento de nuevos fármacos. (A) Búsqueda de una molécula prototipo. (B) Estrategias para modificar un prototipo y convertirlo en una molécula cabeza de serie.

científicos y técnicos que han permitido la secuenciación del genoma humano, sin olvidar el incremento de nuevos métodos de cribado (*throughput*) para descubrimiento y desarrollo de fármacos (3, 4).

La química combinatoria constituye una estrategia emergente en respuesta a la necesidad de la industria farmacéutica de generar de forma rápida y eficiente nuevas estructuras químicas y de optimizar y agilizar la selección de nuevas moléculas *cabeza de serie* con potencial actividad biológica. Todo ello ha contribuido de forma decisiva en los últimos años a aumentar el éxito en el descubrimiento de nuevos fármacos (5-7). Esto es así hasta el punto de ser posible identificar entre múltiples moléculas aquellas que puedan tener una potencialidad farmacológica y en última instancia terapéutica. La química combinatoria en fase sólida o líquida representa el avance de mayor relieve en nuestros días en el área de la química de síntesis. La tecnología actualmente disponible permite identificar, obtener y separar compuestos con posible interés farmacológico con una rapidez que era impensable hace pocos años. Los métodos matemáticos QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*) se basan en el hecho de que la actividad biológica de un fármaco es función de su estructura. Por tanto, mediante la definición de una serie de descriptores moleculares es posible predecir, a partir de una serie de exploración moderadamente pequeña, un comportamiento general para una familia de estructuras, y sobre esta base diseñar nuevos fármacos. Por otra parte, la utilización de descriptores moleculares topológicos para el diseño de fármacos hace posible la obtención de nuevos compuestos *cabeza de serie* sin necesidad de conocer su mecanismo de acción (8). Asimismo, la adición o cambio de ciertos sustituyentes en las moléculas, permite modificar un gran número de propiedades tales como la solubilidad, la densidad electrónica, la conformación, la biodisponibilidad o las posibles interacciones. El desarrollo de los llamados uHTS (*ultra-high throughput screening methods*) o métodos de cribado ultrarrápido de alto rendimiento, está permitiendo, mediante el uso de sistemas celulares, caracterizar y cuantificar con rapidez, precisión seguridad y sensibilidad las moléculas obtenidas; hasta 50-60.000 por semana. Claro está que cuando se trata de estudios sobre metabolismo y farmacocinética (*DNPK. Drug Metabolism and Pharmacokinetic*), los métodos de cribado rápido no superan las 100 moléculas por semana. En cuanto a los métodos de cribado *in vivo*, un rendimiento de 10 moléculas por semana puede considerarse elevado si se piensa que la metodología convencional a duras penas puede evaluar un solo compuesto. La química combinatoria ha permitido disponer de grandes y valiosas bibliotecas de moléculas con muchos cabezas de serie con potencial interés farmacológico. Hace tan solo pocos años cerca del 40% de los medicamentos autorizados fueron obtenidos mediante química combinatoria. Este progreso no habría sido posible sin la colaboración de una disciplina puntera, la bioinformática, que permite el tratamiento de datos a una escala impensable hace pocos años.

3.2. Genómica y proteómica

La biología molecular ha impulsado el proyecto Genoma Humano que se inició en 1990 y los avances tecnológicos han hecho posible que su secuencia haya sido terminada el año 2000. El *genoma* humano parece estar compuesto de alrededor de 40.000 genes que se transcriben en aproximadamente 250.000 moléculas de RNA (*transcriptoma*) que tras ser procesadas se traducen en proteínas, cuya modificación post-traducciona resulta en más de un millón de proteínas que constituyen el *proteoma*.

Se define como *genómica* a la disciplina que se ocupa de descifrar el *genoma* de los seres vivos, es decir el conjunto de los genes de una especie dada, así como sus funciones, su regulación y su transmisión. Por extensión, la genómica es también la ciencia que permite influir sobre los genes con un objetivo particular. El desarrollo reciente de la tecnología de *microarrays* de DNA, también llamados *chips* o *microchips* de DNA permite fijar covalentemente a un soporte sólido (vidrio, nitrocelulosa, nylon etc.), desde centenares hasta decenas de miles de sondas moleculares (fragmentos de DNA de secuencia conocida, proteínas, etc), o bien genotecas completas, en un espacio muy reducido. Esto supone un gran avance tanto en escalado como en sensibilidad de detección, ya que los volúmenes de trabajo son muy pequeños, lo que supone a su vez mayores concentraciones de reactivos y cinéticas de hibridación más rápidas. Los *microarrays* de DNA son las herramientas que permiten investigar de forma amplia la respuesta celular a través de los cambios en la transcripción del genoma a nivel del mRNA. Como consecuencia de lo anterior, la cantidad de información que se está generando es enorme y por tanto ha sido necesario el desarrollo en paralelo de potentes herramientas bioinformáticas que permitan almacenar y analizar los datos obtenidos. La identificación de genes proporciona una nueva y paradigmática forma de entender la enfermedad humana, al nivel más fundamental. Por otra parte el conocimiento del control genético de las funciones celulares constituirá la piedra angular de futuras estrategias para la prevención y tratamiento de la enfermedad. Desde el punto de vista farmacológico el conocimiento del genoma y con ello la identificación y validación de nuevas dianas a nivel molecular, representa una herramienta de incalculable valor para el desarrollo de nuevos fármacos con potencialidad terapéutica en el futuro (9). De hecho casi cada semana se publica un nuevo abordaje terapéutico para ciertas enfermedades como consecuencia del desarrollo exponencial de las nuevas dianas a nivel molecular.

La farmacogenética en nuestros días se ha convertido en una herramienta para optimizar la eficacia terapéutica (10). Esta disciplina estudia la relación entre el genotipo individual y la capacidad para metabolizar sustancias exógenas; fárma-

cos en este caso particular. Se puede entender perfectamente qué diferencias en el metabolismo de fármacos pueden ocasionar signos de toxicidad severa o fallos terapéuticos no menos graves (11). Por ejemplo la isoenzima del citocromo P-450, CYP 2D6, metaboliza más de 40 fármacos corrientemente prescritos y el polimorfismo de este gen afecta la respuesta terapéutica de no menos del 20% en ciertos grupos étnicos. ¿Quién duda ahora del interés de los técnicos de genotipado en la clínica? Además en el campo del diagnóstico molecular la existencia de polimorfismos genéticos de un solo nucleótido abre la posibilidad de asociar alteraciones genéticas puntuales con alteraciones patológicas mayores.

La **proteómica** consiste en el estudio del **proteoma**. El término proteoma fue acuñado para definir el conjunto de proteínas codificadas por el genoma de un organismo dado (12, 13). La proteómica se ocupa de investigar la función y regulación de las proteínas codificadas por el genoma, por ejemplo las modificaciones post-traduccionales (fosforilación, glicosilación, acetilación, y sulfatación), el plegamiento tridimensional y la degradación e interacción entre proteínas, así como su localización específica subcelular, su abundancia relativa y los cambios en respuesta a estímulos, con objeto de identificar su función en el contexto del organismo (14, 15). Las técnicas utilizadas para el análisis proteómico incluyen la extracción de las proteínas de un tejido dado, seguido de su separación y cuantificación mediante electroforesis bidimensional y posterior análisis por espectrofotometría de masas (MS) e identificación con la ayuda de bancos de datos que almacenan información sobre estructuras de polipéptidos (14). Finalmente, se procede a la caracterización, secuenciación de los aminoácidos, las modificaciones post-traduccionales y las interacciones entre ellas. La proteómica ofrece un abordaje alternativo, y complementario de la tecnología genómica, para la identificación y validación de dianas proteicas para los fármacos y para la descripción de los cambios en la expresión proteica bajo la influencia de la enfermedad o el tratamiento con fármacos. Las proteínas son las principales dianas para el descubrimiento fármacos. De hecho la industria farmacéutica tiene un gran interés en la proteómica con vistas al valor de este tipo de tecnología aplicada al estudio de la toxicidad, descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos (16).

3.3. Metabolómica y citómica

Las mas recientes **ómicas** (citómica y metabolómica) se encargan de relacionar el **proteoma** con la estructura y función celulares. La multitud de proteínas que constituyen el **proteoma** participan en complejas vías de transducción de señales que controlan el metabolismo del organismo y los tejidos, y conse-

cuentemente influyendo en la síntesis y degradación de pequeñas moléculas. En este contexto, la *metabolómica* es una *ómica* emergente que se ocupa de estudiar el *status* fisiológico de un organismo, órgano, tejido o célula determinados mediante el análisis de la concentración del número mas amplio posible de pequeñas moléculas no proteicas o metabolitos sintetizados endógenamente. Este conjunto de moléculas de un organismo o tejido determinado constituye su perfil bioquímico o *metaboloma*, y los estudios comparativos del metaboloma permiten detectar y analizar de forma muy sensible la naturaleza de cualquier cambio de la fisiología celular o tisular (17, 18). Los recientes avances en los métodos bioanalíticos (LC, MS, LC-MS, NMR, etc), han hecho posible la medida rutinaria de cientos de parámetros metabolómicos con gran sensibilidad y precisión. A diferencia de otras ómicas, las determinaciones metabolómicas pueden ser cuantitativas, abriendo la posibilidad de realizar estudios estadísticos y recoger la información en bancos de datos. Determinar la relevancia bioquímica de las moléculas analizadas constituye la base del análisis metabolómico.

La *metabolómica* posee un gran potencial para los programas de desarrollo de fármacos. Los programas deben empezar definiendo el perfil metabolómico del estado fisiológico normal o sano, de tal modo que cualquier desviación con respecto al perfil normal, por definición, se considera anormal o indicativo de cualquier enfermedad (19). La información que ofrece esta nueva *ómica* es de extraordinario valor y utilidad en el desarrollo de nuevos fármacos. Por una parte, el descubrimiento de potenciales dianas terapéuticas puede realizarse analizando las diferencias entre los perfiles metabolómicos de tejidos normales y enfermos. Se considera una diana potencial aquella que devuelve el equilibrio fisiológico a la normalidad. Esta metodología puede aplicarse también para la optimización de los compuestos candidatos a cabeza de serie. Para ello, la estrategia consiste en determinar cuál de ellos muestra el perfil bioquímico más próximo al de la línea celular en la cual el gen diana ha sido inactivado, o cuál de ellos produce menos reacciones secundarias en un determinado modelo biológico. Esta información permite a su vez controlar el proceso de desarrollo de los candidatos seleccionados. Finalmente, puede llevarse a cabo la recuperación de candidatos que en el uso clínico no han mostrado eficacia terapéutica en algunos pacientes, realizando un estudio comparativo de los metabolomas de pacientes en los que el fármaco ha sido eficaz y en los que no lo ha sido.

La *citómica* se define como la ciencia de análisis celular que integra los conocimientos de la genómica y la proteómica con la función dinámica de los sistemas celulares complejos, es decir de los *citomas* mediante el análisis de células individuales. La proteómica está muy relacionada con la genómica

funcional (15), y próxima a la citómica como el área de investigación de la función dinámica de las células vivas. La morfología y estructura celulares influyen a menudo en el metabolismo y en la función celular. La función o la pérdida de la función induce al organismo a comportarse con normalidad o de forma anormal. La *citómica* tiene como objetivo definir exhaustivamente el fenotipo molecular aparente de una célula, que resulta de la interacción entre el genotipo del individuo y la exposición a factores externos e internos. El futuro de muchas áreas de la biotecnología, tal es el caso del desarrollo de nuevos agentes terapéuticos requiere un conocimiento profundo del *citoma*. La citómica constituye el nexo de unión entre la biología molecular y celular y su desarrollo ha sido posible gracias a las nuevas y potentes tecnologías citofotométricas, especialmente la citometría de flujo y la microscopía confocal, basadas en el análisis multiparamétrico de células individuales. La integración de estas técnicas unida a los análisis bioinformáticos constituye una poderosa herramienta para el estudio de la funcionalidad celular de especial relevancia para el descubrimiento de potenciales dianas terapéuticas, así como para investigar y predecir efectos a nivel celular de los fármacos en tejidos normales y enfermos (20).

4. NUEVAS ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO PRECLÍNICO DE NUEVOS FÁRMACOS

4.1. Modelos *in vitro* para el estudio de fármacos

En el desarrollo de un nuevo medicamento se utiliza un importante número de animales de experimentación, con el ánimo de detectar aquellos compuestos, o dosis, potencialmente tóxicas para el hombre. Las actuales regulaciones internacionales (OCDE, EMEA, FDA) requieren que los datos de eficacia clínica y seguridad se hayan llevado a cabo en, al menos, dos especies animales (Tabla 2). Nada se dice sin embargo sobre qué especies debiera utilizarse, si bien lo más frecuente es que se escoja un roedor (ratón o rata) y un no roedor (perro, mini cerdo) o un primate.

La opinión pública, que por una parte demanda compuestos más eficaces y también más seguros, está, por otro lado, cada vez más sensibilizada en contra de la utilización de animales para este tipo de ensayos. Sin embargo, una nueva conciencia sobre un uso limitado y más racional de los animales de experimentación ha tomado carta de naturaleza en nuestro entorno cultural próximo, y la demanda social, expresada a través de distintos grupos sociales y políticos, se ha traducido

Tabla 2. Evaluación de la toxicidad de nuevos fármacos en animales

Toxicidad aguda (DL_{50}): 7 días, ratón
 Toxicidad sub-crónica: 28 días, dos especies animales
 Toxicidad crónica: 3 meses a 1 año
 Toxicidad organoespecífica
 Carcinogénesis
 Alteraciones de la reproducción
 Efectos teratogénicos

en una mayor presión sobre industrias y gobiernos para sustituir los ensayos con animales por métodos alternativos. El propio Parlamento Europeo se hizo eco de esta demanda social tomando la iniciativa legislativa en su directiva (86/609/CEE). Ello ha potenciado de forma extraordinaria el desarrollo de los modelos *in vitro*, alternativos a la experimentación animal, para estudios de actividad farmacológica y toxicológica en estas fases iniciales del desarrollo que permiten de manera eficaz, reducir el número de posibles candidatos a fármaco (Figura 5).

Por otra parte, no se puede olvidar que si el destino último del fármaco es su utilización en seres humanos y éstos, por razones éticas, no pueden ser utilizados en las etapas iniciales del desarrollo del fármaco, parece que sería lógico, el utilizar para estudios de farmaco-toxicología aquellos modelos *in vitro* que más se aproximen al ser humano. Ello permite una correcta elección del modelo animal, lo que es determinante a la hora de extrapolar los datos de animales al ser humano. La idea de que la mayor parte de los efectos observables en el animal (tanto farmacológicos como toxicológicos), son escalables en función de parámetros tales como peso, tamaño relativo del órgano, superficie corporal, etc. tienen en el metabolismo quizás la prueba más evidente de su inexactitud. La acción farmacológica de un compuesto *in vivo* depende de la accesibilidad de dicho compuesto al órgano(s) diana, y que lo haga en un rango de concentración determinado, por encima o por debajo del cual o no ejercerá una acción eficaz o bien manifestará reacciones adversas. Conocer si el modelo animal que pretende utilizarse se comporta de manera similar al ser humano, es esencial de cara a un uso racional

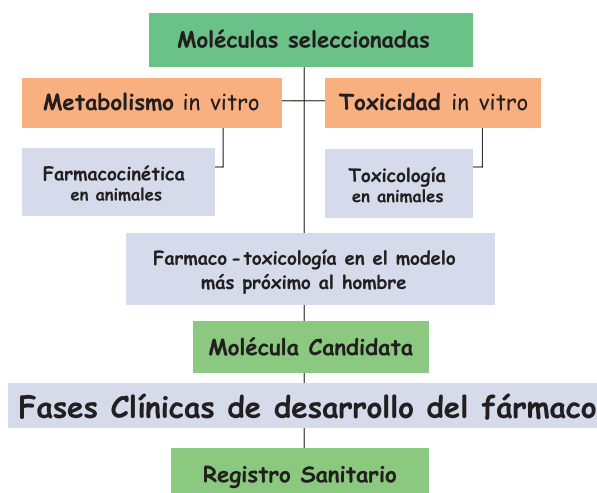


FIGURA 5. *Nuevas estrategias para el desarrollo preclínico de nuevos fármacos. Si el destino último del fármaco es su utilización en seres humanos y éstos, por razones éticas, no pueden ser utilizados en las etapas iniciales del desarrollo del fármaco, parece que sería más lógico, el utilizar para estudios de farmaco-toxicología aquellos modelos in vitro que más se aproximen al ser humano. Ello permite una correcta elección del modelo animal, lo que es determinante a la hora de extrapolar los datos de animales al ser humano.*

de los animales, en aquellos experimentos en los que ineludiblemente deba hacerse uso de ellos. Dado que en la fase pre-clínica del desarrollo no sería éticamente aceptable el que dicho compuesto pudiese ser administrado a seres humanos, y que sin saber cuál sería su comportamiento es difícil decidir cuál es el modelo animal idóneo para su estudio, se entra en un círculo vicioso del que sólo es posible salir mediante estudios comparativos del metabolismo hechos en células humanas y de animales. La disponibilidad de cultivos de células humanas de diferentes órganos y tejidos permite una mayor aproximación al ser humano. En este contexto, los modelos celulares hepáticos de origen humano, constituyen la herramienta idónea para abordar estudios encaminados a predecir en humanos la toxicidad y el metabolismo hepáticos de nuevas moléculas (21,22)

Por su propia naturaleza los modelos *in vitro* son una simplificación de una realidad mucho más compleja como es el ser vivo, y por ello la información que son capaces de proporcionar es en muchas ocasiones parcial. Aún así, hoy en día, no cabe ninguna duda de que ofrecen ventajas intrínsecas muy destacables para la evaluación de nuevos fármacos, dada su simplicidad, disponibilidad, bajo coste, fácil control de las variables experimentales, necesidad de cantidades muy pequeñas de la molécula en estudio, y la posibilidad de realizar los estudios en etapas muy tempranas del desarrollo.

4.2. Investigación del ADMET en fases preclínicas

En las última década, la consecuencia de la implementación de sistemas de cribado de alto rendimiento (HTS) en las fases de descubrimiento de fármacos (*drug discovery*), ha sido el aumento considerable del número moléculas cabeza de serie que podrían ser seleccionadas para desarrollo. La investigación preclínica de los parámetros del ADME: absorción, distribución, metabolismo y excreción de nuevos fármacos ha experimentado recientes avances técnicos. La molécula candidata a desarrollo ha de ser activa en humanos, con un adecuado ADME y segura. La utilización de modelos *in vitro* e *in silico*, así como la introducción de métodos automatizados de análisis de las moléculas y procesamiento computarizado de los datos, permite realizar este tipo de estudios mucho antes de lo que era habitual, hace tan solo una década, e incrementar significativamente la eficiencia y el número de moléculas analizadas, todo ello con gran ahorro de tiempo y costos (23-26). Gran parte del esfuerzo se ha dirigido al diseño de modelos matemáticos, denominados *in silico*, para la predicción y evaluación experimental de las propiedades farmacocinéticas de forma fiable a partir de la estructura química de un compuesto con el uso de técnicas bioinformáticas (24, 27-29). Los modelos matemáticos actualmente disponibles para la predicción del ADME, por ejemplo los QSAR / QSPR (*Quantitative Structure Property Relationship*), debido a su naturaleza empírica adolecen de total fiabilidad y seguridad en las predicciones. Todavía requieren una mayor y más adecuada definición de los parámetros necesarios para implementar el análisis. Además de la solubilidad, la absorción y el metabolismo de la molécula, es necesario considerar otros aspectos como la conjugación, las proteínas transportadoras del fármaco, mejores descriptores moleculares, etc., para optimizar los modelos (28, 30). Actualmente los modelos *in silico* no son capaces de reemplazar totalmente a los modelos convencionales tanto *in vitro* como *in vivo*, sin embargo, constituyen un complemento muy valioso para cualquiera de ellos (27, 31). Por tanto, el futuro de los estudios de ADME *in silico* está en el desarrollo de modelos mas robustos y con mayor capacidad predictiva.

4.2.1. Estudios de metabolismo

La estabilidad metabólica de una nueva molécula (*New Chemical Entity, NCE*) hace referencia a su susceptibilidad para ser biotransformada. Los fármacos, además de ejercer una acción farmacodinámica específica sobre un determinado tejido diana, sufren modificaciones químicas en su tránsito a través del organismo.

El metabolismo (M) de los fármacos es uno de los factores que más influyen en la biodisponibilidad, el efecto farmacológico y la toxicidad. Es un factor determinante en su aclaramiento, es responsable de la variabilidad interindividual de la farmacocinética y en consecuencia, de la variación en la respuesta terapéutica tras su administración clínica (32).

Disponer de esta información en etapas tempranas del desarrollo es clave para la selección y/o el diseño de nuevos fármacos con propiedades farmacocinéticas más favorables. Es de gran interés para la industria farmacéutica el poder analizar y optimizar la estabilidad metabólica de un nuevo fármaco durante las fases pre-clínicas, cuando todavía no es posible administrarlas al hombre (23). Sin embargo, la predicción de estas propiedades, durante estas fases iniciales, solamente puede realizarse *in vivo* en animales o *in vitro* utilizando modelos celulares, subcelulares o modelos *in silico*.

4.2.2. Estudios de toxicidad

Unido al ADME, la toxicidad (T) de las moléculas candidatas para el desarrollo, es otro aspecto que debe ser investigado en las fases pre-clínicas.

Tarea primordial durante las fases de descubrimiento de fármacos es determinar el balance entre el riesgo de toxicidad y el beneficio terapéutico del nuevo fármaco en su posterior uso clínico. Así, un nuevo medicamento se considera tanto más seguro cuando posee un elevado potencial terapéutico y un riesgo de toxicidad mínimo o inexistente para el hombre. Estos estudios, que se llevan a cabo habitualmente en animales de experimentación, aún siendo de gran valor para la evaluación del riesgo tóxico, como se ha indicado anteriormente, proporcionan resultados que no siempre son extrapolables al hombre (33, 34) De hecho, la literatura médica está llena de ejemplos de fármacos, que habiendo sido considerados seguros en los estudios rutinarios realizados con animales, han resultado ser tóxicos para el ser humano al ser administrados al hombre al llegar a las fases clínicas (35).

Los recientes avances en el desarrollo de modelos experimentales *in vitro* (co-cultivos, micromasas, cultivos organotípicos, células madre, células manipuladas genéticamente, etc.) y la tecnología básica en cribado (HTS) abren nuevas y prometedoras perspectivas para estudios de toxicidad pre-clínica en las fases iniciales del descubrimiento de fármacos (36). Aunque solamente algunos métodos *in vitro* se han aceptado desde el punto de vista regulatorio, otros se encuentran en fase muy avanzada de prevalidación o validación.

Dos aspectos clave en el desarrollo de fármacos son la predicción y la evaluación del potencial riesgo de toxicidad de una molécula, y para ello es esencial el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en el efecto tóxico. Durante las fases muy tempranas del desarrollo de fármacos, los métodos *in vitro* se usan principalmente para el cribado rápido y clasificación de las moléculas por su toxicidad. La genómica, la proteómica y las más reciente metabolómica y citómica constituyen nuevas y eficaces aproximaciones tecnológicas para realizar estudios toxicológicos mecanísticos (37). El desarrollo de bancos de datos sobre perfiles de expresión génica de células diana expuestas a tóxicos modelo y a nuevos compuestos, acompañado de la creación de modelos matemáticos para analizar e interpretar los datos, hacen posible la predicción del potencial tóxico de una molécula a partir de los cambios en el patrón de expresión génica (19). Examinando estos cambios de expresión, en células y tejidos, en respuesta a los fármacos, es posible a su vez elaborar hipótesis sobre el mecanismo de toxicidad. La toxicología *in vitro* es un área muy prometedora para abordar estudios mecanísticos considerados clave hoy día para evaluar adecuadamente el riesgo de toxicidad de fármacos. El desarrollo de nuevos modelos y estrategias experimentales permitirá abordar estudios de citotoxicidad, respuesta celular, toxicocinética, modelización, metabolismo, toxicidad del desarrollo, cáncer, predicción de la alergia, desarrollo de biomarcadores, etc., problemas algunos de ellos para los que no existen aún modelos *in vitro* fiables y reproducibles.

4.3. ¿Qué información pueden aportar los modelos celulares en estudios farmacotoxicológicos preclínicos?

Los modelos celulares constituyen una alternativa capaz de reemplazar a los animales para determinados estudios del desarrollo pre-clínico, o de complementar los estudios realizados con éstos. En cualquier caso, su utilización contribuye sin lugar a dudas a mejorar el diseño de los estudios pre-clínicos, a aumentar la seguridad en la futura administración del fármaco en las fases clínicas, y son de gran ayuda para la toma de decisiones durante el desarrollo, hasta el punto de detenerlo, si los estudios así lo aconsejaran, con el ahorro en tiempo y costo económico que ello puede representar en el la inversión global que requiere llevar a término el desarrollo de un nuevo fármaco (25,38-40).

Son varios los modelos celulares de los que se dispone, y debe realizarse una elección adecuada del tejido y la especie, así como un diseño experimental correcto para responder a cada una de las preguntas durante el desarrollo de un fármaco. Es evidente que la extrapolación *in vivo* de los resultados experimen-

tales observados *in vitro* es, sin lugar a dudas, el aspecto crucial en la utilización de los modelos celulares. Su valor predictivo, en la evaluación del riesgo de toxicidad para el hombre de nuevas moléculas, depende de un análisis muy cuidadoso de la información obtenida *in vitro* y de su correcta elaboración e interpretación. En líneas generales, se pueden enumerar varios aspectos en los que la contribución de los estudios *in vitro* pueden ser clave:

- a) Clasificar y ordenar un grupo de moléculas candidatas potenciales para desarrollo en función de su toxicidad molar. Ello permite identificar los candidatos más seguros, es decir, seleccionar de un grupo de aquéllas moléculas farmacológicamente activas y que a su vez manifiesten menor toxicidad.
- b) Investigar los efectos de las moléculas a nivel del genoma (*genómica*), de la expresión proteica (*proteómica*), sobre la síntesis de metabolitos endógenos (*metabolómica*), y sobre funciones bioquímicas o estructuras específicas del órgano diana (*citómica*), así como los mecanismos moleculares responsables de la toxicidad
- c) Estimar *in vitro* la máxima concentración no tóxica de una molécula dada. Se puede estimar el riesgo y la toxicidad potencial *in vivo*, en caso de que la molécula tomara contacto con las células diana a concentraciones superiores a la máxima concentración no tóxica.
- d) Estudiar y predecir en humanos el metabolismo de nuevos fármacos (metabolitos mayoritarios, metabolitos tóxicos, velocidad y grado de metabolización, parámetros cinéticos).
- e) Identificar en humanos la(s) isoenzima(s) del citocromo P450 implicadas de forma específica en el metabolismo de una molécula dada, así como identificar las isoformas del P450 implicadas en la producción de cada uno de los metabolitos.
- f) Analizar factores que pudieran influir sobre el metabolismo: el estudio de posibles interacciones medicamentosas y el potencial efecto inducción/inhibición del fármaco sobre las isoenzimas del citocromo P450.
- g) Ayudar a elegir la especie animal que se comporta de forma más parecida al hombre, desde el punto de vista del metabolismo, frente a un compuesto determinado para realizar estudios toxicológicos.
- h) Es posible simular experimentalmente situaciones difíciles de analizar en modelos animales.

5. PERSPECTIVAS PARA EL DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS DE CARA AL TERCER MILENIO

Se pueden formular un sin fin de preguntas que es de desear seamos capaces de dar respuesta en un futuro no muy lejano (41, 42):

¿Qué impacto farmacoterapéutico tendrá el conocimiento detallado del genoma humano, ya totalmente secuenciado?

¿Hasta dónde los fármacos antirrechazo y la fabricación de órganos de reemplazo a la carta?

¿Qué haremos con las enfermedades emergentes, las del porvenir, el SIDA, las nuevas enfermedades virales o por priones?

¿Qué haremos con la creciente resistencia de los gérmenes a los antibióticos?

¿Hasta donde llegará el diseño molecular de fármacos? ¿Qué aportará la química combinatoria, la bioinformática y los ordenadores en el campo terapéutico?

¿Seguirán ocupando un lugar estratégico los productos naturales como fuente de medicamentos?

¿En qué quedará los efectos adversos de los fármacos?

¿Hasta dónde llegará el problema de los medicamentos huérfanos?

¿Hasta dónde podrá la economía soportar el coste creciente para el desarrollo y uso clínico de los medicamentos?

Aunque ésta no sea una visión completa de la Farmacología futura, y de sus grandes problemas y soluciones, de lo que no cabe duda es que se investigarán problemas básicos y aplicados desde el punto de vista científico y tecnológico, político, económico, social y sanitario. Vendrán otras enfermedades, pero dispondremos de nuevos medicamentos para su prevención o cura más específicos, eficaces y con menos efectos adversos que además permitirán mejorar la calidad de vida.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Frank, R.G. (2003) New estimates of drug development costs. *J Health Econ* **22**, 325-330.
- (2) Dimaxi, J.A., Hansen, R.W. & Grabowski, H.G. (2003) The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ* **22**, 151-85.

- (3) Garrett, M.D., Walton, M.I., McDonald, E., Judson, I. & Workman, P. (2003) The contemporary drug development process: advances and challenges in preclinical and clinical development. *Prog Cell Cycle Res* **5**,145-158.
- (4) Bleicher, K.H., Bohm, H.J., Muller, K & Alanine, A.I. (2003) Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. *Nat Rev Drug Discov* **5**,369-378.
- (5) Baldino, C.M., Caserta, J., Goetzinger, W., Harris, M., Hartsough, D., Yohannes, D., Yu, L. & Kyranos, J.N. (2004) High-throughput medicinal chemistry for efficient drug discovery. *www.urrentdrugdiscovery.com*
- (6) Goodnow, R.A. Jr., Guba, W. & Haap, W. (2003) Library design practices for success in lead generation with small molecule libraries. *Comb Chem High Throughput Screen* **6**,649-660.
- (7) Muegge, I. (2003) Selection criteria for drug-like compounds. *Med Res Rev* **23**, 302-21.
- (8) Duart, M..J., Garcia-Domenech, R., Anton-Fos, G..M. & Galvez, J. (2001) Optimization of a mathematical pattern for the prediction of antihistaminic activity. *J. Comput Aid Mol Desig* **15**,561-572.
- (9) Lord, P.G. (2004) Progress in applying genomics in drug development. *Toxicol Lett* **149**,371-375.
- (10) Wilkin, M.R. (2002) What do we want from proteomics in the detection and avoidance of adverse drug reactions. *Toxicol Lett* **127**,245-249.
- (11) Baldrick, P. (2003) Toxicokinetics in preclinical evaluation. *Drug Discov Today* **8**,127-133.
- (12) Lan, N., Montelione, G.T. & Gerstein, M. (2003) Ontologies for proteomics: towards a systematic definition of structure and function that scales to the genome level. *Curr Opin Chem Biol* **7**,44-54.
- (13) Neumann, T. (2001) Adventis Research & Development, Department of Biological Chemistry & Proteomics website (<http://www.proteomics.com/intro.htm>)
- (14) Giometti, C.S. (2003) Proteomics and bioinformatics. *Adv Protein Chem* **65**,353-369.
- (15) Stephens, F. (2001) Argonne Functional genomics Link (<http://www.ipd.anl.gov>)
- (16) Walgren, J.L. & Thompson, D.C. (2004) Application of proteomic technologies in the drug development process. *Toxicol Lett* **149**,377-385.
- (17) German, J.B., Bauman, D.E., Burrin, D.G., Failla, M.L., Freake, H.C., King, J.C., Klein, S., Milner, J.A., Pelto, G.H., Rasmussen, K.M. & Zeisel, S.H. (2004) Metabolomics in the opening decade of the 21st century: building the roads to individualized health. *J Nutr* **134**,2729-2732.
- (18) Robosky, L.C., Robertson, D.G., Baker, J.D., Rane, S. & Reily, M.D. (2002) In vivo toxicity screening programs using metabonomics. *Comb Chem High Throughput Screen* **5**,651-662.

- (19) Lindon, J.C., Holmes, E., Bollard, M.E., Stanley, E.G. & Nicholson, J.K. (2004) Metabolomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis. *Biomarkers* **9**,1-31.
- (20) Figeys, D. (2004) Combining different 'omics' technologies to map and validate protein-protein interactions in humans. *Brief Funct Genomic Proteomic* **2**,357-365.
- (21) Castell, J. V. & Gómez-Lechón, M. J. (1997) *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*. Academic Press. London.
- (22) Rodrigues, A.D. (1997): Preclinical drug metabolism in the age of high-throughput screening: an industrial perspective. *Pharm. Res* **14**, 1504-1510.
- (23) Masimirembwa, C.M., Bredberg, U.& Andersson,T.B. (2003) Metabolic stability for drug discovery and development: pharmacokinetic and biochemical challenges. *Clin Pharmacokinet* **42**,515-528.
- (24) Gombar, V.K., Silver, I.S. & Zhao, Z. (2003) Role of ADME characteristics in drug discovery and their in silico evaluation: in silico screening of chemicals for their metabolic stability. *Curr Top Med Chem* **3**,1205-1225.
- (25) Vanparys, P. (2002) ECVAM and pharmaceuticals. *Altern Lab Anim.* **2**,221-223.
- (26) Shen, M., Xiao, Y., Golbraikh, A., Gombar, V.K. & Tropsha, A. (2003) Development and validation of k-nearest-neighbor QSPR models of metabolic stability of drug candidates. *J Med Chem* **46**,3013-3020.
- (27) Etkins, S. (2003) In silico approaches to predict drug metabolism, toxicology and beyond. *Biochem Soc Trans* **31**,611-614.
- (28) Beresford, A.P., Segall, M. & Tarbit, M.H. (2004) In silico prediction of ADME properties: are we making progress? *Curr Opin Drug Discov Devel* **7**,36-42.
- (29) Lombardo, F., Gifford, E. & Shalaeva, M.Y. (2003) In Silico ADME Prediction: Data, Models, Facts and Myths. *Mini Rev Med Chem* **3**, 861-875.
- (30) Wilson, A.G., White, A.C. & Mueller, R.A. (2003) Role of predictive metabolism and toxicity modeling in drug discovery—a summary of some recent advancements. *Curr Opin Drug Discov Devel* **6**,123-128
- (31) Oprea, T.I. (2002) Virtual screening in lead discovery: A viewpoint. *Molecules* **7**,51-62.
- (32) Gómez-Lechón, M. J., Donato, M. T., Castell, J. V. & Jover. R. (2003) Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism. *Curr Drug Metab* **4**,292-312.
- (33) Donato, M. T., Castell, J.V. & Gómez-Lechón, M.J. (1999) Characterization of drug metabolizing activities in pig hepatocytes for use in bioartificial liver devices. Comparison with other hepatic cellular models. *J Hepatol* **31**,542-549.
- (34) Lin, J. H. (1995) Species similarities and differences in pharmacokinetics. *Drug Metab Dispo* **23**, 1008-1021.

- (35) Donato, M. T., Goethals, F., Gómez-Lechón, M.J., Deboyser, D., De Coster, I., Roberfroid, M. & Castell, J. V. (1992) Toxicity of the antitumoral drug datelliptium in hepatic cells: use of models in vitro for the prediction of toxicity in vivo. *Toxicol. In Vitro* **6**, 295-302.
- (36) Carere, A., Stammati, A. & Zucco F. (2002) In vitro toxicology methods: impact on regulation from technical and scientific advancements. *Toxicol Lett* **127**,153-160.
- (37) Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B.J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J.C., Pieters, R. & Kleiner, J. (2002) Methods of in vitro toxicology. *Food Chem Toxicol* **40**,193-236.
- (38) Andersson, T.B., Sjöberg, H., Hoffmann, K-J., Boobis, A. R., Watts, P., Edwards, R. J., Lake, B. G., Price, R. J., Renwick, A. B., Gómez-Lechón, M. J., Castell, J. V., Ingelman-Sundberg, M., Hidestrand, M., Goldfarb, P. S., Lewis, D. F. V., Corcos, L., Guillouzo, A., Taavitsainen, P. & Pelkonen. O. (2001) An assessment of human liver-derived *in vitro* systems to predict the *in vivo* metabolism and clearance of almokalant. *Drug Metab Disp* **29**, 712-720.
- (39) Pelkonen, O., Myllynen, P., Taavitsainen, P., Boobis, A. R., Watts, P., Lake, B. G., Price, R. J., Renwick, A. B., Gómez-Lechón, M.J., Castell, J. V. Ingelman-Sundberg, M., Hidestrand, M., Guillouzo, A., Corcos, L., Goldfarb, P. S. & Lewis D. F. V. (2001) Carbamazepine: a “blind” assessment of CYP-associated metabolism and interactions in human liver-derived in vitro systems. *Xenobiotica* **31**, 321-343.
- (40) Salonen, J. S., Nyman, L., Boobis, A. R., Watts, P., Lake, B. G., Price, R. J., Renwick, A. B., Gómez-Lechón, M.J., Castell, J. V., Ingelman-Sundberg, M., Hidesstrand, M., Guillouzo, A., Corcos, L. & Goldfarb, P. S (2003) Comparative studies on the CYP-associated metabolism and interaction potential of selegiline between human liver-derived in vitro systems. *Drug Meta. Disp* **31**,1093-1102.
- (41) Sánchez García, P. (1999) Investigación y desarrollo de nuevos fármacos en el umbral del siglo XXI. *An R Acad Nac Med* **116**,16-19.
- (42) Castell Ripoll, JV (2004) Desarrollo farmacéutico y metabolismo: los problemas, las necesidades, las herramientas. En Citocromo P-450 (M. Cascales y MJ Gómez-Lechón eds) Real Academia Nacional de Farmacia / Instituto de España. Madrid. pp 469-494.