

DISSENY DE FÀRMACS

ENRIQUE PÉREZ-PAYÁ

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Universitat de València.

Adreça per a la correspondència: Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Universitat de València. 46100 Burjassot. València. Adreça electrònica: *paya@uv.es*

INTRODUCCIÓ

Durant la primera meitat d'aquest segle, la química orgànica i en particular la síntesi orgànica va assolir el desenvolupament metodològic suficient per posar les bases de la química mèdica moderna. Aquesta metodologia, que comprèn la seqüència des del *lead compound* fins al *drug candidate*, xifrava entorn de les cinquanta molècules per any i químic el subministrament necessari per abastar el potencial d'assaigs biològics, realitzats majoritàriament amb tècniques *in vivo*. En aquestes condicions, el desenvolupament d'un fàrmac requeria la síntesi i assaig de centenars de molècules, un període superior en molts casos a deu anys per arribar al mercat i un cost mitjà de tres-cents cinquanta milions de dòlars (Hogan, 1997).

L'espectacular avenç experimentat per la bioquímica i per la biologia molecular, cel·lular i estructural a partir dels anys setanta i vuitanta ha conduït, entre altres assoliments, al desenvolupament d'un gran

potencial d'assaigs d'activitat biològica *in vitro*. Una de les característiques d'aquests assaigs ha estat la possibilitat d'automatitzar-los i robotitzar-los donant origen al que es denomina *high throughput screening* (HTS, cribratge d'alt rendiment), amb el qual la capacitat d'assaig dels laboratoris moderns en la indústria farmacèutica pot assolir els milers de molècules que alimenten la infraestructura de HTS. És en aquest context on pot inserir-se la creixent aplicació i l'enorme impacte experimentats per la química combinatòria en la dècada dels noranta. En realitat, existeix un ample consens en acceptar que el desenvolupament de la indústria farmacèutica, i per tant, el disseny de nous fàrmacs, en els propers anys, haurà d'estar basat en quatre pilars: el coneixement derivat de les investigacions genòmiques amb la consegüent aparició de noves dianes terapèutiques, la química combinatòria, l'HTS i el disseny racional. Comentaré breument cadascuna d'elles, per a continuació revisar amb detall el paper desenvolupat

i el potencial inherent de la química combinatòria en el disseny de fàrmacs.

La publicació de la seqüència completa del genoma de llevat el 24 d'abril de 1996 marcà l'inici de la que s'ha denominat l'era postgenòmica. Des de llavors s'han intentat desenvolupar tècniques que permetin abordar l'anàlisi global de les sis mil pautes obertes de lectura (ORF, de l'anglès *open reading frame*). L'assignació de funció a un determinat gen en un determinat context biològic, es considera com un dels reptes que cal assolir en els propers anys (Goffeau, 1998). Una de les tècniques més prometedores per definir xarxes de gens entrelaçats és la dels denominats *bioxips*. És a dir, la microdistribució de DNA en suports que permetin la quantificació dels nivells de mRNA, que a la vegada podria permetre la identificació de gens que, de forma específica, s'expressen en determinades condicions. Aquesta tècnica també s'està prenent com a base per al desenvolupament de la farmacogenètica, on mitjançant la definició de polimorfismes individualitzats podrà, en un futur, permetre l'administració individualitzada de les dosis convenients d'un fàrmac en particular. Per altra banda, de la publicació del genoma de llevat, també caldria destacar la identificació dels anomenats gens orfes (aproximadament un 30 % del total), o sigui gens de funció desconeguda. Si ens permetem una extrapolació dels esdeveniments derivats de la seqüenciació del genoma de llevat a la seqüenciació del genoma humà, és fàcil d'imaginar l'adveniment de tota una sèrie de noves dianes terapèutiques.

El nombre de gens orfes, dels quals es poden derivar nous receptors i senyalitzadors cel·lulars per als quals fóra interessant identificar molècules agonistes i/o antagonistes, podria disminuir en un futur proper gràcies a l'aparició de les noves tècniques experimentals que es poden englobar sota el nom de química combinatòria. El principi

comú a aquestes tècniques es basa en generar, *in vitro* o *in vivo*, col·leccions (biblioteques o també quimioteques) compostes per un gran nombre de molècules (pèptids, oligonucleòtids, molècules orgàniques) o bé per seqüències, o estructures aleatòries, d'entre les quals una o diverses poden tenir les propietats biològiques desitjades. En principi, sembla evident que com més diversitat posseeixi la quimioteca, més possibilitats hi haurà de trobar la molècula desitjada. Tanmateix, encara que la multiplicitat teòrica d'aquestes quimioteques és astronòmica, existeixen aspectes pràctics que imposen limitacions estrictes sobre el nombre de molècules que es pot manipular de forma experimental.

Els sistemes de HTS han estat plenament integrats en el procés de descobriment de nous fàrmacs per les grans companyies farmacèutiques. Tal com s'ha comentat, en un passat no gaire llunyà, l'assaig de l'activitat biològica de noves molècules de síntesi era un procés tediós i en ocasions car, però els recents avenços en la biologia han servit per proveir assaigs en què es poden analitzar múltiples productes al mateix temps. En general, els assaigs de quimioteques per mitjà de HTS impliquen la utilització d'assaigs en dissolució, per regla general en format de placa amb múltiples pouets de reacció i amb sistemes automatitzats de càrrega de reactius i anàlisis (Khosla, 1996). Els assaigs biològics per a qualsevol sistema de diversitat molecular cal que siguin altament sensibles, precisos i reproduïbles. Això fa que actualment s'estigui dedicant una especial atenció al desenvolupament de nous equips i eines de control per ordinador per tal de satisfer i, en la mesura del possible, millorar els requisits dels sistemes HTS.

El disseny racional de fàrmacs assistit per ordinador ha suscitat multitud de controvèrsies en els darrers anys. A la dècada dels vuitanta s'augurava un futur brillant

per a aquesta tècnica però, com en moltes altres facetes de la ciència, analitzant els resultats obtinguts vint anys després, podem considerar-los, si no decebedors, sí per sota de les expectatives creades. Possiblement, encara avui, podríem fer la reflexió que existeixen paràmetres que cal desenvolupar, i que cal profunditzar en certs aspectes abans de decidir un disseny molecular final. Per exemple, la complexitat, la interdependència i les redundàncies de la fisiologia humana seguiran essent un obstacle a les solucions, una mica simplistes, aportades en alguns casos pel disseny assistit per ordinador, en què a partir de l'estructura terciària d'una proteïna pretenem dissenyar una molècula que s'uneixi al centre actiu i bloquegi l'acció fisiològica. En ocasions, el desconeixement dels detalls, en particular els detalls d'integració de funcions a escala fisiològica, condueix a composts inefectius o amb efectes secundaris no acceptables. Per tant, el disseny racional seguirà essent una poderosa eina en el disseny de fàrmacs, però s'haurà d'intentar dotar d'una major informació (derivada de la bioquímica i de la fisiologia) els programes informàtics. També caldria destacar que la unió d'esforços derivats del disseny racional i de l'irracional (química combinatòria), davant d'un mateix problema farmacològic, serà una estratègia que s'haurà de considerar.

QUÍMICA COMBINATÒRIA EN EL DISSENY DE FÀRMACS

Definim la química combinatòria com un terme molt ampli que cobreix un gran espectre d'aplicacions amb implicacions sintètiques i analítiques. Entre aquestes aplicacions es poden incloure la síntesi en paral·lel de molècules orgàniques, la síntesi de mesclures complexes de molècules orgàniques, la síntesi de biblioteques d'expressió

en fags i totes les tècniques de maneig en la pràctica experimental d'aquestes biblioteques i l'anàlisi dels resultats.

La química combinatòria s'ha utilitzat per generar biblioteques o quimiotèques inespecífiques amb l'objecte d'identificar noves funcionalitats químiques capaces de realitzar una determinada funció biològica (Houghten *et al.*, 1991; Pinilla *et al.*, 1995; Ferrer-Montiel *et al.*, 1998; Silen *et al.*, 1998), o bé per crear col·leccions de molècules més petites, amb una menor diversitat funcional, i en general basades en una molècula o esquelet (*scaffold*) determinat, dels quals ja es coneix algun tipus d'activitat biològica (Gordon *et al.*, 1994; Blondelle *et al.*, 1996; Thompson i Ellman, 1996). L'optimització d'un producte cap de sèrie (*lead compound*) fóra un bon exemple d'aquest segon cas. Per raons de confidencialitat hi ha poca cosa publicada sobre aquest tema, però per exemple, tant Pfizer com Eli Lilly han comunicat que utilitzant aquesta estratègia han optimitzat un producte cap de sèrie en un període de sis a dotze mesos (Myers, 1997). Pfizer ha aconseguit augmentar en dos ordres de magnitud l'activitat antiescleròtica d'un cap de sèrie mitjançant la síntesi múltiple i anàlisi d'aproximadament mil anàlegs. De manera similar, Lilly ha descrit el descobriment d'un nou fàrmac antimigranya després de tan sols sis mesos d'iniciar un projecte de desenvolupament basat en la síntesi combinatòria en paral·lel.

La química combinatòria va néixer en el camp dels pèptids a principis d'aquesta dècada i va tenir la seva expressió inicial en la construcció de quimiotèques de molt elevat nombre de molècules (fins a milions), per tal d'avaluar-les en la major gamma possible d'assaigs (Houghten *et al.*, 1991; Lam *et al.*, 1991). La construcció d'aquestes quimiotèques es va veure afavorida pel domini de la tecnologia de síntesi en fase sòlida en el camp dels pèptids i va donar lloc al desco-

briment de nous caps de sèrie per a diverses aplicacions terapèutiques. Aquests èxits inicials representaren un gran impuls per a la introducció i futura expansió de la metodologia. De fet, la química combinatòria no ha substituït el treball de disseny dels grups que investiguen sobre molècules bioactives.

Una característica fonamental d'aquestes quimioteques, i que és la clau que permet accelerar la recerca dels compostos actius que s'hi troben, és el disseny estructurat de les mescles o combinacions de productes que les formen, el qual ha d'assegurar l'organització necessària que faci possible la identificació de compostos individuals amb activitats concretes. En principi, les mescles obtingudes s'hauran construït de manera que serà sempre possible determinar l'estructura dels components més actius i portar a terme les seves síntesis específiques. Un segon format de disseny de quimioteques el constitueix la seva construcció a través d'un procés de síntesi per separat de cada component. És el que es coneix com a síntesi múltiple en paral·lel i s'ha aplicat fonamentalment a l'optimització de caps de sèrie, encara que aquests darrers anys és el format que es va imposant en el sector industrial.

Quimioteques de pèptids sintètics

En l'actualitat existeixen diferents estratègies sintètiques basades en la síntesi de pèptids en fase sòlida (Merrifield, 1963) per preparar conjunts d'alta diversitat química en formats que possibiliten la seva utilització en assaigs biològics (Blondelle *et al.*, 1995; Pérez-Payá, 1997).

Les estratègies de síntesi de quimioteques, prenen com a punt de partida els mètodes de síntesi múltiple de pèptids desenvolupats per Geysen (Geysen *et al.*, 1984) i Houghten (Houghten, 1985). Ambdós mètodes de síntesi múltiple de pèptids es basen en el fet que durant la síntesi en fase sòlida,

tots els rentats, neutralitzacions i etapes de desprotecció són idèntics i per tant no dependents de la seqüència; únicament l'etapa en què es realitza l'addició de l'aminoàcid protegit a la cadena peptídica immobilitzada en creixement, és específica per a una seqüència peptídica donada. Les dues aproximacions difereixen principalment en la naturalesa del suport sòlid on es desenvolupa la síntesi: múltiples segments plàstics en el mètode conegut com *pin* de Geysen front a múltiples partícules de resina compartimentades en bosses de polipropilè en el mètode anomenat *T-bag* d'Houghten. El producte final és l'obtenció d'un pèptid diferent per a cada *pin* en el primer mètode i un pèptid diferent en cada bossa en el mètode d'Houghten.

Les diferents aproximacions utilitzades fins ara per a l'obtenció de quimioteques de pèptids es poden classificar en tres àmplies categories depenent de la forma en què les seqüències peptídiques són sintetitzades o assajades. Dins d'una primera categoria es podrien considerar aquells mètodes sintètics en què les mescles de pèptids, després d'ésser sintetitzades i tallades del suport sòlid, són assajades com a pèptids lliures en dissolució. En aquesta categoria s'inclouen les peptidoteques combinatorials sintètiques (PCS). En una segona categoria, s'inclourien els mètodes sintètics en què les mescles de pèptids són sintetitzades i assajades mentre romanen unides al suport sòlid, ja sigui aquest segments plàstics o partícules de resina (Lam *et al.*, 1991; Gallop *et al.*, 1994). La tercera categoria estaria formada pels mètodes basats en biologia molecular, en els quals els pèptids són expressats en la superfície de fags filamentosos (Burritt *et al.*, 1996; Lowman, 1997).

El 1991, l'equip d'investigació de Richard A. Houghten (Torrey Pines Institute for Molecular Studies, San Diego, CA, EUA) va desenvolupar quimioteques de pèptids

solubles que, per la seva naturalesa, es poden utilitzar en tot tipus d'assaig biològic (Houghten *et al.*, 1991). Això representa un avantatge important sobre altres procediments, atès que en un gran nombre d'interaccions moleculars es veuen embolcallades en membranes localitzades en diferents teixits.

Les PCS solubles descrites abasten des de tres fins a deu aminoàcids en la seqüència peptídica, i el nombre de pèptids per peptidoteca varia des de milers fins a milers de milions. Les PCS es poden preparar en diferents formats, i poden estar compostes per seqüències de L-aminoàcids, de D-aminoàcids, o per combinacions de L-, D-, i aminoàcids no naturals. A més, la possibilitat de sintetitzar peptidoteques d'hexapèptids o àdhuc decaapèptids en un format de rastreig posicional ha permès, en ocasions, la identificació de seqüències amb l'activitat desitjada, a partir de desenes de milions de seqüències, d'un dia per altre (Pinilla *et al.*, 1995).

Quimiotèques de molècules orgàniques

Malgrat la gran utilitat de les quimiotèques de pèptids i el consegüent desenvolupament de pèptids específics com a potencials fàrmacs (Blondelle i Houghten, 1995; Rutter i Santi, 1995; Blondelle *et al.*, 1998), es va veure molt aviat la necessitat d'ampliar el camp de la química combinatòria a les molècules orgàniques més convencionals en la química mèdica; és a dir, aquelles de pes molecular mitjà, generalment més estables i susceptibles d'oferir una major diversitat química i determinats avantatges a l'hora de la seva manipulació. Així i tot, en aquest camp es partia d'un desavantatge en comparació amb el cas dels pèptids: el pràctic desconeixement de la metodologia de síntesi en fase sòlida necessària per escometre la construcció d'a-

questa mena de quimiotèques. Aquest inconvenient es convertí en un esperó, de tal manera que tan sols en uns anys des de la publicació de la primera síntesi múltiple d'una quimioteca de benzodiazepines (Bunin i Ellman, 1992), s'han produït avenços suficientment importants com per pensar que la metodologia de síntesi ja no constitueix un obstacle insuperable per al desenvolupament d'una quimioteca de molècules orgàniques. A tall d'exemple, en un monogràfic de la revista *Biorganic and Medicinal Chemistry Letters* (vol 8, 1998) es descriu la síntesi de compostos derivats de diazepines, de tiomorfolinones, mimètics de girs- β , derivats d'estatines, tetrasacàrids, derivats d'àcid iminodiacètic, piperazinil-poliiazacilofans, piperazindiones, hidantoïnes i difenils.

Síntesi de quimiotèques i estratègies d'assaig

Síntesi múltiple en paral·lel

Des d'un punt de vista conceptual, aquesta és la forma més simple de preparar una quimioteca: sintetitzar molts compostos en paral·lel i mantenir cada compost en un vial diferent. Al final de la síntesi, la identitat de cadascun dels compostos és coneguda i pot ser fàcilment confirmada per mètodes analítics. A més, l'avaluació de l'activitat biològica de la quimioteca podrà aportar informació específica de cadascun dels seus components. Com s'ha comentat, els primers mètodes de síntesi múltiple es basaren en la síntesi de pèptids (Geysen *et al.*, 1984; Houghten, 1985), i actualment el mètode de compartimentalització de resina s'ha adaptat també a la síntesi de molècules orgàniques de baix pes molecular (Nefzi *et al.*, 1997). Quant a la instrumentalització, en l'actualitat existeixen multitud de propostes de diferents cases comercials amb instru-

ments capaços de portar a terme síntesi múltiple automàtica, generalment basats en una organització múltiple de vials de reacció i programació i automatització de tasques.

Utilitzant la compartimentalització de la fase sòlida on es porta a terme la reacció, bé mitjançant *T-bags* o bé per separació de vials de reacció, s'han estimat que es poden sintetitzar quimiotèques de fins a deu mil compostos individuals. La síntesi de quimiotèques d'ordre superior, o sigui de cents de mils o milions de compostos individuals, no és assequible per aquests procediments. Per tal de superar aquesta limitació, s'ha realitzat la preparació de quimiotèques utilitzant mètodes fotolitogràfics que han servit per preparar quimiotèques de més de cent mil compostos individuals (Jacobs i Fodor, 1994).

Com s'ha comentat anteriorment, la síntesi de quimiotèques de molècules orgàniques de pes molecular mitjà és el format que més acceptació està tenint en la indústria farmacèutica. El treball que es pot considerar pioner en aquest camp és la síntesi en fase sòlida d'1,4-benzodiazepines pel grup liderat per J. Ellman (Bunin i Ellman, 1992). S'utilitzaren tres fonts de diversitat química com a punt de partida: 2-aminobenzofenones, aminoàcids i agents alquilants (Figura 1). En el procediment inicial, s'acoblà mitjançant síntesi en dissolució una 2-N-Fmoc-aminoben-

zofenona hidroxi-substituïda a un espaiador [4-(hidroximetil)fenoxi] derivat d'àcid acètic (espaiador HMP). L'aminobenzofenona derivatitzada amb l'espaiador HMP s'acoblà a la fase sòlida utilitzada per tècniques emprades en la síntesi de pèptids en fase sòlida. A continuació, es desprotegí el Fmoc i es realitzà l'acoblament del Fmoc-aminoàcid escollit. La consegüent desprotecció del Fmoc i tractament amb medi àcid generà la benzodiazepina. Finalment, mitjançant una reacció d'alquilació s'obtenen els corresponents derivats d'1,4-benzodiazepines.

Síntesi de quimiotèques combinatòries basades en mescles

Existeixen dues formes de portar a terme la síntesi d'aquestes quimiotèques: el primer és el mètode conegut com *split and mix* (separació i barreja), és a dir, separar la fase sòlida en conjunts, procedir a l'etapa sintètica i recombinar la fase sòlida (figura 2); i en segon lloc, el mètode de mescla química (figura 3), en què, prèviament a la reacció química, les funcionalitats químiques que es pretenen utilitzar en una posició de diversitat es barregen en relacions predefinides en funció de criteris cinètics i termodinàmics, per tal d'assegurar l'equimolaritat del producte.

El procediment de *split and mix* s'utilitzà per a la síntesi de la primera quimioteca de

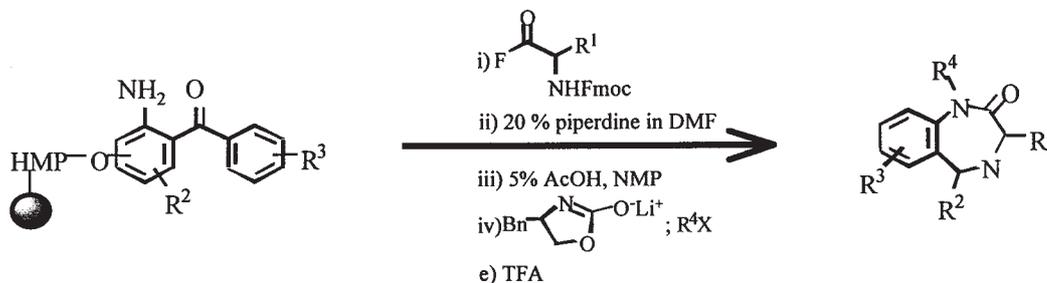


FIGURA 1. Esquema de síntesi de 1,4-benzodiazepines (Bunin i Ellman, 1992).

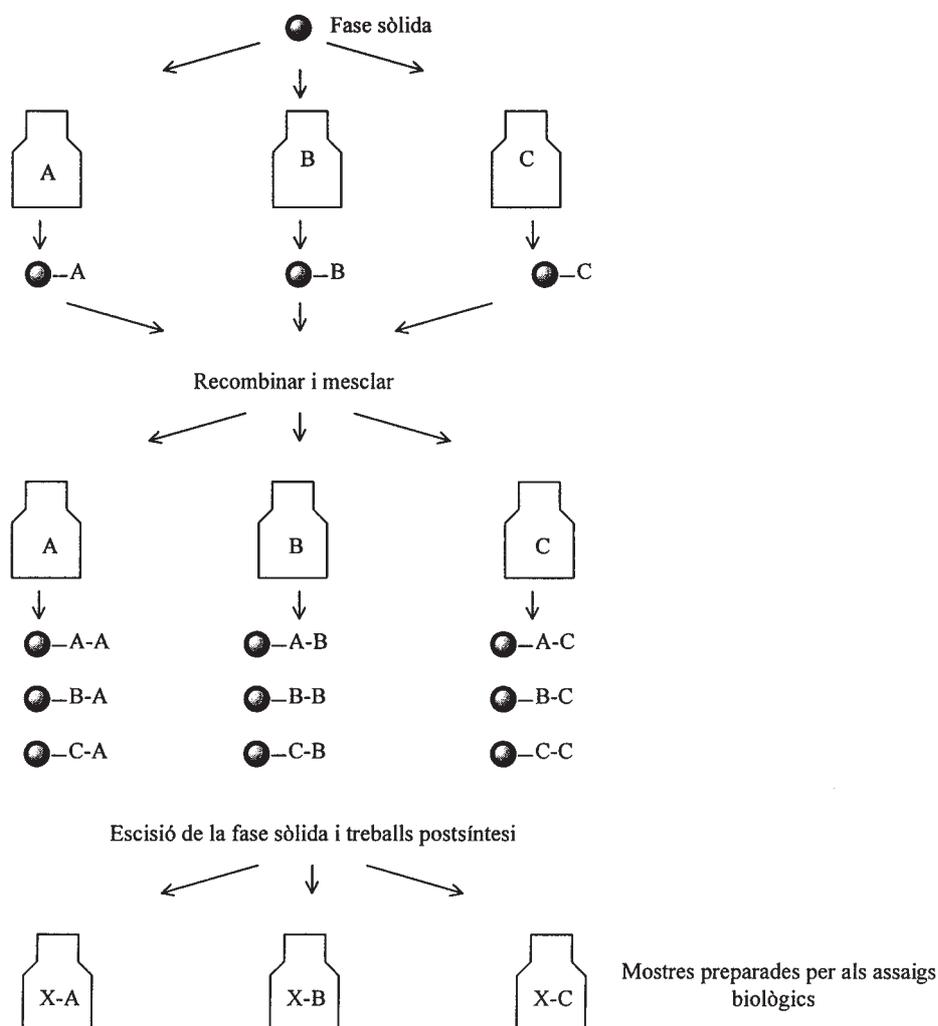
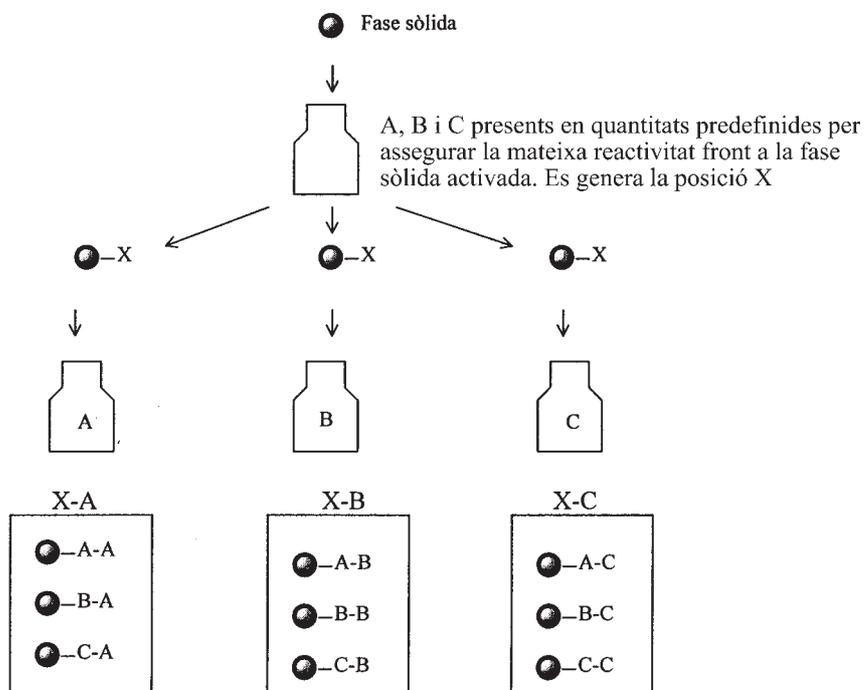


FIGURA 2. Síntesi pel mètode de *split and mix* d'una quimioteca dimèrica utilitzant tres funcionalitats químiques diferents. Nombre total de compostos que cal sintetitzar $3^2 = 9$.

pèptids soluble descrita pel grup d'Houghten (Houghten *et al.*, 1991). Els dos primers aminoàcids en cada cadena peptídica foren definits individualment i específica, mentre que els quatre restants consistien en una mescla aproximadament equimolar de dinou dels vint L-aminoàcids naturals. Aquestes peptidoteques es poden representar per les fórmules O^1O^2XXXX on O^1 i O^2

representen AA, AC, AD, etc. fins a YV, YW i YY, per a un total de quatre-centes combinacions (20^2), i cada posició X representa una mescla equimolar dels dinou aminoàcids (la cisteïna es va ometre de les posicions de mescla). Quatre posicions de mescla resulten en un total de 130.321 possibles combinacions (19^4). Cadascuna de les quatre-centes mescles de pèptids diferents que



Cal repetir el procediment per augmentar bé la posició definida, bé la posició de mescla

FIGURA 3. Síntesi pel mètode de mescla prèvia d'una quimioteca dimèrica utilitzant tres funcionalitats químiques diferents. Nombre total de compostos a sintetitzar $3^2 = 9$.

formen la peptidoteca consisteix, per tant, en 130.321 hexàmers individuals que en total representen 52.321.400 pèptids. Quan la quimioteca s'assaja en un determinat assaig biològic d'interès, les posicions de barreja es defineixen per mitjà d'un procés interactiu de selecció dirigit a la identificació de la més activa de les seqüències possibles (figura 4).

En els assaigs inicials d'activitat d'una peptidoteca, cadascuna de les mescles de pèptids s'acostumen a assajar a concentracions pròximes a 2,5 mg/ml. Les mescles de pèptids que mostren una activitat significativa són seleccionades i es tornen a assajar utilitzant el mètode de les dilucions consecutives per determinar els valors d' IC_{50} (per

exemple, en estudis antígen-anticòs, la concentració necessària per inhibir en un 50 % la unió de l'anticòs a l'antigen). Aquest mètode permet la selecció de la mescla, o mescles, de pèptids més activa a l'assaig inicial. A continuació es porta a terme un procés iteratiu en el qual la següent posició X de les mescles de pèptids es defineixen individualment amb cadascun dels vint L-aminoàcids naturals. En cada etapa del procés iteratiu, les mescles de pèptids amb una o més posicions definides s'assagen per identificar la mescla peptídica més activa. Aquest procés comporta selecció i reducció en el nombre de seqüències peptídiques, mentre que al mateix temps es defineix sintèticament una posició més en cada etapa.

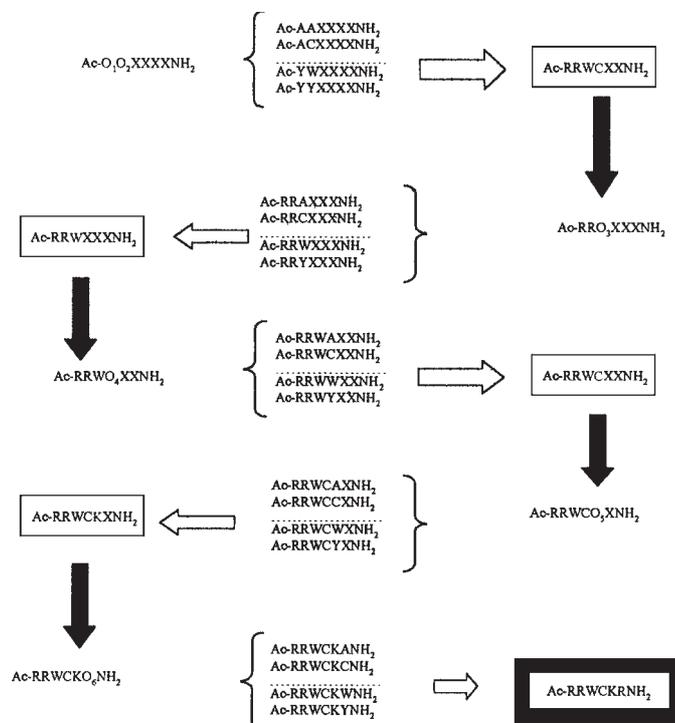


FIGURA 4. Rastreig d'una quimioteca utilitzant el mètode de format iteratiu. Les fletxes negres indiquen les etapes sintètiques. Les fletxes blanques indiquen les etapes de selecció de les seqüències més actives a l'assaig biològic. *Ac*, acetil; *O*, aminoàcid definit; *X*, mescla equimolar dels vint L-aminoàcids.

Amb l'objecte de reduir el temps necessari per a la identificació de pèptids actius a partir d'una mescla de milions de compostos, es desenvolupà el concepte de format en rastreig posicional. Aquestes quimiotèques peptídiques s'acostumen a sintetitzar pel procediment de barreja prèvia d'aminoàcids activats. Aquestes quimiotèques estan compostes per subquimiotèques individuals en les quals una posició queda definida mentre que les altres s'ocupen amb mescles d'aminoàcids. La posició definida es «mou» al llarg de tota la seqüència. D'aquesta manera, el nombre de subquimiotèques posicionals és igual al nombre de residus en cada pèptid de la quimioteca. Cal destacar que amb cadascuna de les subquimiotèques posicionals, s'obté informació

sobre una única posició de la seqüència. A partir de la informació global obtinguda amb cadascuna de les posicionals, es defineixen els aminoàcids més importants en cadascuna de les posicions al llarg de la seqüència. Amb aquesta informació, es sintetitzen les molècules individuals que representen totes les possibles combinacions dels aminoàcids més importants en cada posició. La següent etapa, consisteix en l'assaig d'activitat biològica dels pèptids sintetitzats.

La primera PS-PCS (peptideca combinatorial sintètica per rastreig posicional) descrita fou una quimioteca d'hexapèptids de L-aminoàcids. Constava de sis subquimiotèques posicionals diferents, cadascuna composta per vint mescles peptídiques diferents

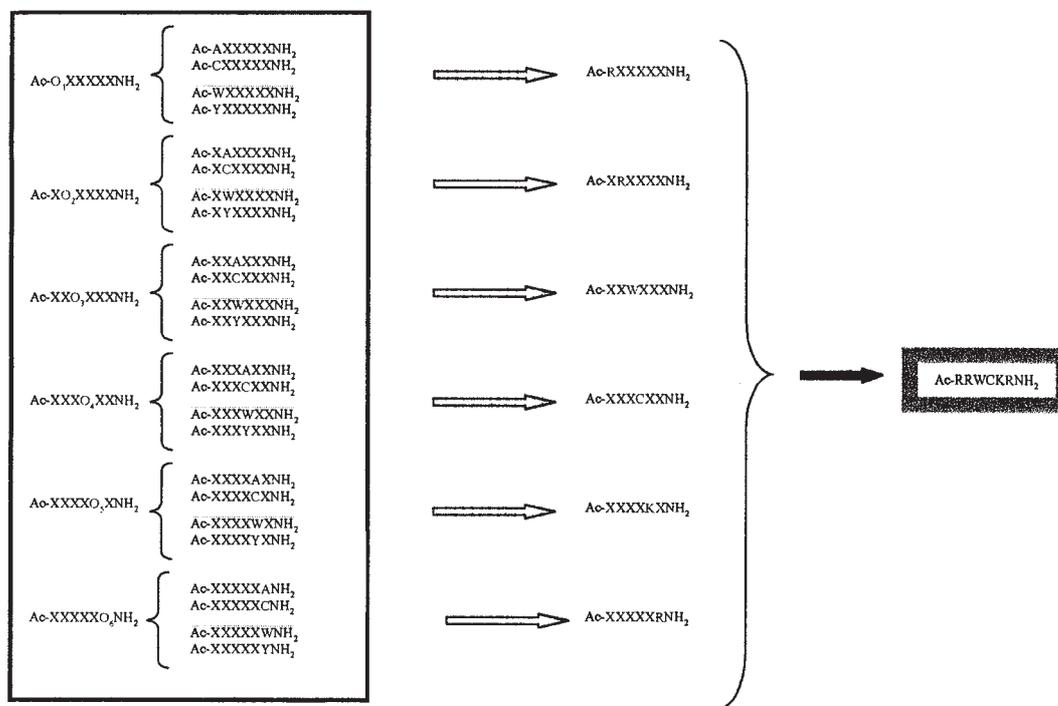


FIGURA 5. Rastreig d'una quimioteca en format de rastreig posicional. La fletxa negra indica l'etapa sintètica. Les fletxes blanques indiquen el procés de selecció de la posició definida més activa. *Ac*, acetil; *O*, aminoàcid definit; *X*, mescla equimolar dels 20 L-aminoàcids.

amb una posició definida amb cadascun dels vint L-aminoàcids naturals (representada com *O*, figura 5). Les cinc posicions restants estan compostes per mescles dels dinou aminoàcids (representades amb *X*; la cisteïna es va ometre). Les sis diferents subquimioteques posicionals difereixen únicament en la localització de la posició definida en la seqüència i es poden representar com O^1XXXXX , XO^2XXXX , XXO^3XXX , $XXXO^4XX$, $XXXXO^5X$, i $XXXXXO^6$ (per a un total de cent vint mescles de pèptids). Cadascuna de les mescles representa aproximadament 2,5 milions (19^5) de seqüències individuals; per tant, cadascuna de les sis subquimioteques conté al voltant de cinquanta milions d'hexàmers (figura 5).

A TALL DE CONCLUSIÓ

Els canvis conceptuals són un element constant en tots els camps de la investigació. En ocasions aquests canvis no sols excedeixen en magnitud les consideracions inicials, sinó que poden afectar profundament disciplines científiques relacionades amb aquella on s'originà el canvi. Possiblement la química combinatòria sigui un d'aquests canvis conceptuals. Les possibilitats obertes per la química combinatòria des d'un punt de vista tant conceptual com d'aplicació, estan accelerant notables avenços en la disciplina que l'originà, la química orgànica sintètica, influïnt entre altres, sobre disciplines com la química mèdica, la farmacologia, la

biologia estructural i fins i tot la catàlisi. L'aparició de cada cop més col·leccions de compostos estructuralment relacionats, està originant, a més, la necessitat d'adaptació dels sistemes d'anàlisi i assaig biològic; per tant, també s'hi està implicant l'enginyeria tècnica per mitjà d'una demanda d'equips cada cop més especialitzats a les necessitats pròpies de la química combinatòria.

Possiblement es pot definir com a paràmetre d'acceptació d'un canvi conceptual el moment en què des dels laboratoris d'investigació es trasllada a les aules universitàries. Per a la química combinatòria, aquesta acceptació acadèmica es produí el 1996 a la Universitat de Louisville (EUA). Els químics de promocions futures no es sorprendran quan en els seus treballs se'ls encomani la síntesi d'uns quants cents d'anàlegs per a un determinat projecte, els assaigs d'activitat dels quals començaran en un parell de setmanes. Si això es compara amb el fet que tan sols fa uns anys, quan s'exposava un projecte de química combinatòria a una empresa farmacèutica la resposta era d'escepticisme i convenciment que mai s'aplicaria a disciplines de química mèdica, el canvi és clar. En l'actualitat totes les multinacionals del sector disposen de grups de química combinatòria en els seus departaments d'investigació i desenvolupament. A més d'això, està sorgint tot un univers d'aliances empresarials amb l'objecte d'assegurar un aprofitament màxim de la potencialitat de la tècnica (Hogan, 1997).

Per tant, i en opinió del signant d'aquesta comunicació (que no té perquè ésser la més encertada), en un futur que ja es confon amb el present, s'identificarà una nova diana farmacològica des del departament de genòmica; es dissenyarà un assaig *in vitro* i s'optimitzarà per a la seva utilització en HTS; es passaran per HTS quimioteques pròpies, començant per les bàsiques (per exemple de pèptids) d'alta diversitat que

puguin oferir indicis de les funcionalitats químiques necessàries per tal de portar a terme l'acció biològica desitjada. Durant aquest temps inicial d'assaigs, s'intentarà obtenir el màxim possible d'informació estructural sobre la nova diana farmacològica i aquesta informació serà recollida pel departament de disseny racional, que més que dissenyar un candidat a fàrmac final, proposarà esquelets (*scaffolds*) sobre els quals es dissenyaran quimioteques (de compostos definits) utilitzant la informació obtinguda de les quimioteques bàsiques. Aquests compostos individualitzats de nou abastaran l'HTS, de manera que generin resultats de relació estructura-activitat.

Però, per sobre de tot, el futur del disseny de fàrmacs segueix estant en la investigació científica. S'ha de seguir posant atenció a la investigació bàsica, sense la qual el procés biotecnològic es pot quedar orfe d'idees, fet que podria passar en camps com la química combinatòria, que poden representar una revolució conceptual i metodològica amb implicacions múltiples en diverses àrees de coneixement.

AGRAÏMENTS

Als doctors Antonio Ferrer-Montiel (Universitat Miguel Hernández, Elx) i Àngel Messeguer (Centre d'Investigació i Desenvolupament, CSIC, Barcelona) per la lectura crítica del manuscrit inicial. El grup de l'autor és finançat per la CICYT (SAF 97-0067) i la Comunitat Europea (Biotechnology Grant BIO4-CT97-2086).

BIBLIOGRAFIA

- BLONDELLE, S. E.; R. A. HOUGHTEN (1995). «Peptides of the Formula (KFmoc)ZZZ and their Uses». *Patent núm. 5.440.016*.

- BLONDELLE, S. E.; R. A. HOUGHTEN; E. PÉREZ-PAYÁ (1998). «Peptide Inhibitors of Calmodulin». *Patent núm. 5.840.697*.
- BLONDELLE, S. E.; E. PÉREZ-PAYÁ; C. T. DOOLEY; C. PINILLA; R. A. HOUGHTEN (1995). «Soluble Combinatorial Libraries of Organic, Peptidomimetic and Peptide Diversities». *Trends Anal. Chemistry*, pàg. 1483-1492.
- BLONDELLE, S. E.; E. TAKAHASHI; R. A. HOUGHTEN; E. PÉREZ-PAYÁ (1996). «Rapid Identification of Compounds with Enhanced Antimicrobial Activity by Using Conformationally Defined Combinatorial Libraries». *Biochemistry Journal*, núm. 313, pàg. 141-147.
- BUNIN, B. A.; J. A. ELLMAN (1992). «A General and Expedient Method for the Solid-phase Synthesis of 1,4-benzodiazepine Derivatives». *Journal of American Chemistry Society*, núm. 114, pàg. 10997-10998.
- BURRITT, J. B.; C. W. BOND; K. W. DOSS; J. A. JESAITIS (1996). «Filamentous Phage Display of Oligopeptide Libraries». *Anal. Biochemistry*, núm. 238, pàg. 1-13.
- FERRER-MONTIEL, A.; J. M. MERINO; S. E. BLONDELLE; E. PÉREZ-PAYÁ; R. A. HOUGHTEN; M. MONTAL (1998). «Selected Peptides Targeted to the NMDA Receptor Channel Protect Neurons from Excitotoxic Death». *Nature Biotechnology*, núm. 16, pàg. 286-291.
- GALLOP, M. A.; R. W. BARRET; W. J. DOWER; S. P. A. FODOR; E. M. GORDON (1994). «Applications of Combinatorial Technologies to Drug Discovery. 1. Background and Peptide Combinatorial Libraries». *Journal of Medical Chemistry*, núm. 37, pàg. 1233-1251.
- GEYSEN, H. M.; R. H. MELOEN; S. J. BARTELING (1984). «Use of Peptides Synthesis to Probe Viral Antigens for Epitopes to a Resolution of a Single Amino-acid». *Proceedings National Academy of Sciences USA*, núm. 81, pàg. 3998-4002.
- GOFFEAU, A. (1998). «Genomic-scale Analysis Goes Upstream?». *Nature Biotechnology*, núm. 16, pàg. 907-908.
- GORDON, E. M.; R. W. BARRETT; W. J. DOWER; S. P. A. FODOR; M. A. GALLOP (1994). «Applications of Combinatorial Technologies to Drug Discovery. 2. Combinatorial Organic Synthesis, Library Screening Strategies, and Future Directions». *Journal Medical Chemistry*, núm. 37, pàg. 385-401.
- HOGAN, J. C. (1997). «Combinatorial Chemistry in Drug Discovery». *Nature Biotechnology*, núm. 15, pàg. 328-34.
- HOUGHTEN, R. A. (1985). «General Method for the Rapid Solid-phase Synthesis of Large Numbers of Peptides: Specificity of Antigen-antibody Interaction at the Level of Individual Amino-acids». *Proceedings National Academy of Sciences USA*, núm. 82, pàg. 5131-5135.
- HOUGHTEN, R. A.; C. PINILLA; S. E. BLONDELLE; J. R. APPEL; C. T. DOOLEY; J. H. CUERVO (1991). «Generation and Use of Synthetic Peptide Combinatorial Libraries for Basic Research and Drug Discovery». *Nature*, núm. 354, pàg. 84-86.
- JACOBS, J. W.; S. P. A. FODOR (1994). «Combinatorial chemistry: Applications of Light Directed Chemical Synthesis». *Trends Biotechnology*, núm. 12, pàg. 19-26.
- KHOSLA, C. (1996). «Combinatorial Chemistry and Biology: an Opportunity for Engineers». *Curr. Op. Biotechnology*, núm. 7, pàg. 19-22.
- LAM, K. S.; S. E. SALMON; E. M. HERSH; V. J. HRUBY; W. M. KAZMIERSKI; R. J. KNAPP (1991). «A New Type of Synthetic Peptide Library for Identifying Ligand-binding Activity». *Nature*, núm. 354, pàg. 82-86.
- LOWMAN, H. B. (1997). «Bacteriophage Display and Discovery of Peptide Leads for Drug Development». *Annuals Review Biophysics and Biomolecular Structures*, núm. 26, pàg. 401-424.
- MERRIFIELD, R. B. (1963). «Peptide synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide». *Journal of American Chemistry Society*, núm. 85, pàg. 2149-2154.
- MYERS, P. L. (1997). «Will combinatorial Chemistry Deliver Real Medicines?». *Curr. Op. Biotechnology*, núm. 8, pàg. 701-707.
- NEFZI, A.; J. M. OSTRESH; R. A. HOUGHTEN (1997). «The Current Status of Heterocyclic Combinatorial Libraries». *Chemistry Review*, núm. 97, pàg. 449-472.
- PÉREZ-PAYÁ, E. (1997). «Péptidos en biología y biomedicina». A: ANDREU, D. ; L. RIVAS, [ed.]. *Peptidotecas combinatoriales sintéticas*. Madrid: Consejo Superior Investigaciones Científicas 9, pàg. 239-254.
- PINILLA, C.; J. R. APPEL; S. E. BLONDELLE; C. DOOLEY; B. DÖRNER, J. OSTRESH; R. A. HOUGHTEN (1995). «A Review of the Utility of Soluble Peptide Combinatorial Libraries». *Biopolymers (Peptide Science)*, núm. 37, pàg. 221-240.
- RUTTER, W. J.; D. V. SANTI (1995). «Method of Obtaining a Peptide with Desired Target Property». *Patent núm. 5.438.119*.
- SILEN, J. L.; A. T. LU; D. W. SOLAS; M. A. GORE; D. MACLEAN; N. H. SHAH; J. M. COFFIN; N. S. BHINDERWALA; Y. WANG; K. T. TSUTSUI *et al.* (1998). «Screening for Novel Antimicrobials from Encoded Combinatorial Libraries by Using a Two-dimensional Agar Format». *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, núm. 42, pàg. 1447-1453.
- THOMPSON, L. A.; J. A. ELLMAN (1996). «Synthesis and Applications of Small Molecule Libraries». *Chemical Review*, núm. 96, pàg. 555-600.