LA INVESTIGACIÓN ACADÉMICA FRENTE AL DESAFÍO DE DESCUBRIR NUEVOS FÁRMACOS

POR LA ACADÉMICA ELECTA

ILMA. SRA. Da. OLGA Ma. ABIAN FRANCO

DISCURSO LEÍDO EN EL ACTO DE SU RECEPCIÓN COMO ACADÉMICA DE NÚMERO EL DÍA 26 DE OCTUBRE DE 2023

DISCURSO DE CONTESTACIÓN DEL ILMO. SR. D. JESÚS DE LA OSADA GARCÍA ACADÉMICO DE NÚMERO



ACADEMIA DE FARMACIA "REINO DE ARAGÓN" Zaragoza 2023

LA INVESTIGACIÓN ACADÉMICA FRENTE AL DESAFÍO DE DESCUBRIR NUEVOS FÁRMACOS

POR LA ACADÉMICA ELECTA

ILMA. SRA. Da. OLGA Ma. ABIAN FRANCO

DISCURSO LEÍDO EN EL ACTO DE SU RECEPCIÓN COMO ACADÉMICA DE NÚMERO EL DÍA 26 DE OCTUBRE DE 2023

DISCURSO DE CONTESTACIÓN DEL ILMO. SR. D. JESÚS DE LA OSADA GARCÍA ADÉMICO DE NÚMERO



ACADEMIA DE FARMACIA "REINO DE ARAGÓN" Zaragoza 2023



Edita:

Colegio Oficial de Farmacéuticos de Zaragoza

Distribuye:

Academia de Farmacia "Reino de Aragón"

Imprime:

Cometa, S.A. Ctra. Castellón, km 3,400 – 50013 Zaragoza

Depósito Legal: Z 1943-2023

Sumario

Disc	curso de Recepción Académica	
	a. Sra. Dra. Olga Mª Abian Franco	5
PRF	ESENTACIÓN Y AGRADECIMIENTOS	
1.	Breve presentación del tema: Moléculas pequeñas, sus dianas y cribado	
	de fármacos	11
2.	Dianas proteicas y su papel clave en el descubrimiento de nuevos fár-	
	macos.	12
	2.1. Las proteínas y su función biológica	12
	2.2. Plegamiento de proteínas	16
	2.3. Las proteínas como dianas terapéuticas	22
3.	Técnicas biofísicas aplicadas al proceso de descubrimiento de fármacos	25
	3.1. Técnicas biofísicas para caracterizar estructura proteica y su unión	
	de ligandos	25
	3.2. Fluorescencia como técnica biofísica en el estudio de proteínas y sus	
	ligandos	30
	3.3. Cribado de alto rendimiento (HTS)	34
	3.4. Cribado de alto rendimiento basado en fluorescencia: ensayo de	
	desplazamiento térmico	38
4.	Proteínas Intrínsecamente Desordenadas (IDPs)	41
	4.1. IDPs: ¿Qué son y qué función tienen?	41
	4.2. Importancia de las IDPs como potenciales dianas terapéuticas	44
5.	Identificación de potenciales fármacos en un laboratorio de investi-	
	gación académico	45
	5.1. ETAPA 1: Identificar un problema de salud no resuelto	45
	5.2. ETAPA 2: Identificar una diana terapéutica de interés para abordar	
	la patología que se pretende resolver	49
	5.3. ETAPA 3: Caracterización de la diana terapéutica	51
	5.4. ETAPA 4: Diseño y puesta en marcha de la estrategia de identifi-	
	cación de compuestos bioactivos frente a dicha diana	53
	5.5. ETAPA 5: Ensayos preclínicos de los compuestos identificados	63
CO ₃	NCLUSIÓN FINAL	67
BIB	LIOGRAFÍA	68
Disc	curso de Contestación	
Ilme	o. Sr. D. Jesús de la Osada García	75

La investigación académica frente al desafío de descubrir nuevos fármacos

Ilma. Sra. D^a. Olga M^a. Abian Franco Académica electa



AGRADECIMIENTOS

Excelentísimo Señor Presidente de la Academia de Farmacia «Reino de Aragón». Excelentísimos e Ilustrísimos Señoras y Señores Académicos Oueridos familiares y amigos Señoras y Señores:

Es para mí un verdadero honor poder optar a ser recibida como Académica en esta ilustre Academia de Farmacia «Reino de Aragón». Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a los miembros de la academia por considerar que mi trayectoria académica merece esta distinción y en particular a los profesores Julio Montoya, Jesús de la Osada y Ma Luisa Bernal, quienes me han avalado para entrar en la misma. Pueden contar con mi ilusión, esfuerzo y compromiso para desarrollar una labor que esté a la altura de la confianza que han depositado en mí.

Nacemos con una genética determinada y vivimos en una familia, un tiempo y lugar concreto. Quienes somos y en quienes nos convertimos son fruto de nuestra respuesta a las situaciones a las que nos vamos enfrentando en la vida, de las personas con las que nos encontramos y de las decisiones que tomamos.

El éxito profesional, especialmente en ciencia, no es sólo de uno mismo sino en gran medida se debe a las personas que le han acompañado en el camino. En mi caso puedo decir que he sido muy afortunada por haber tenido la suerte de encontrarme con tres personas claves en cada una de las etapas de mi vida científica gracias a las cuales estoy hoy aquí: José Manuel, mi director de tesis, que me mostró no sólo una forma efectiva de aplicar el método científico sino la importancia de ser colaborativo y amable con los que te rodean en laboratorio; Ángel, que generosamente confió en mí, sin apenas conocerme, dándome su apoyo y la oportunidad de comenzar mi etapa como investigadora senior dentro de su grupo de excelencia en investigación; y Adrián, mi compañero de vida científica desde hace 20 años, al que no le puedo estar más agradecida por todo lo que me ha enseñado y hemos compartido juntos.

Los tres tienen algo en común y es que no sólo son excelentes científicos reconocidos en el ámbito internacional, sino que son magníficas y buenas personas ejemplos a seguir en la ciencia y en la vida.

No quiero pasar por alto el agradecimiento a mis colaboradores en los diversos proyectos de investigación, así como a mis colegas del BIFI, del departamento de bioquímica y del grupo de digestivo del IIS Aragón. También recordar a los compañeros de laboratorio con los que he compartido poyata a lo largo de mi carrera, a los estudiantes de doctorado, de máster y grado a los que he supervisado, que han hecho posible el avance en el trabajo experimental. Y gracias a Sonia (compañera y amiga) por ayudarnos en el día a día del laboratorio.

A mis amigos y familia, mis suegros, mi hermana y especialmente a mi marido y a mis hijos, que siempre están ahí y aunque no entiendan del todo lo que haces y porqué a veces estás tan "liada" no dejan de animarte y de decirte que merecerá la pena. Y por supuesto, a mis padres, primero porque hicieron un esfuerzo para que estudiase Farmacia fuera de Zaragoza, la carrera que me había gustado desde la infancia y segundo porque siempre confiaron en que las decisiones que iba tomando desde el punto de vista laboral eran las adecuadas (aunque seguro que tuvieron dudas sobre mi acierto a la hora de dedicarme a investigar y no les culpo, ¿quién no?).

En estos momentos de alegría, los asientos vacíos pesan más y aunque hace 11 años que mi padre nos protege desde el cielo seguro que estará orgulloso de los logros profesionales de sus hijas.

Y a todos los que estáis hoy aquí, muchas gracias.

Lo que quiero compartir hoy comenzó hace muchos años, cuando era apenas una niña y quedé fascinada por el mundo de los medicamentos. Disfrutaba entrando en la farmacia de mi barrio, preguntándome cómo era posible que una simple pastilla tuviera el poder de curar. Fue entonces cuando empecé a soñar con la posibilidad de, algún día, yo también podría contribuir al descubrimiento de un fármaco. Los pasos que he ido dando a lo largo de mi carrera investigadora me han acercado a ese sueño, y no tengo ninguna duda de que lo lograremos.

1. BREVE PRESENTACIÓN DEL TEMA: MOLÉCULAS PEQUEÑAS, SUS DIA-NAS Y CRIBADO DE FÁRMACOS

Al igual que millones de ciudadanos trabajan y conviven en el ecosistema urbano, los componentes celulares, incluidas las moléculas pequeñas, interactúan constantemente entre sí y con su entorno, participando en innumerables transacciones de energía y materia que dan vida a nuestro organismo. Si bien la investigación biológica actual se enfoca en gran medida en las biomacromoléculas, las moléculas pequeñas también desempeñan un papel vital en el metabolismo, la biosíntesis y la señalización en las redes reguladoras y neuronales.

Históricamente, la industria farmacéutica ha recurrido a las moléculas pequeñas para combatir enfermedades. Estas moléculas pueden diseñarse para inhibir o promover reacciones enzimáticas mediante el bloqueo del sitio activo o mediante modificaciones alostéricas o covalentes de las enzimas o receptores diana. También pueden afectar interacciones proteína-proteína o proteína-ácido nucleico. Además, algunas moléculas pequeñas farmacéuticamente activas ejercen su efecto solo después de modificaciones químicas posteriores (enzimáticas o no) a la forma inicialmente administrada. [Rautio, J. et al. 2008].

Debido a la amplia gama de posibles interacciones (Figura 1), determinar y elucidar el mecanismo de acción preciso de una molécula pequeña activa específica es un desafío importante en el desarrollo de fármacos. La comprensión adecuada del mecanismo de acción de una molécula puede mejorar su especificidad, selectividad y eficacia, mientras se descubren nuevos mecanismos de enfermedad y dianas alternativas para el tratamiento.

Gracias a los recientes avances en las metodologías de análisis genómico, metabolómico y proteómico de alto rendimiento, ahora podemos elaborar mapas de interacciones de los diversos componentes celulares y evaluar el estado de una célula viva de forma dinámica y cuantitativa, lo que abre nuevas oportunidades para comprender la actividad de los fármacos y las enfermedades.

Al considerar el perfil de dianas de las moléculas pequeñas, es importante definir los términos utilizados. En este trabajo, una diana es el constituyente celular con el que la molécula pequeña interactúa, provocando un cambio en el comportamiento celular o iniciando una cascada de señalización que genera un efecto específico. En la mayoría de los casos, la diana es una proteína, una enzima a inhibir selectivamente o un receptor que debe incapacitarse o activarse. Aunque también puede haber otras dianas potenciales.

La detección y cuantificación de la interacción molécula pequeña-proteína permite la identificación de potenciales fármacos. Una de las estrategias más utilizadas para ello es el cribado cuantitativo de alto rendimiento (HTS) de moléculas pequeñas siendo una disciplina muy amplia y que abarca diversas tecnologías de ensayo, tanto cuantitativas como cualitativas, que implican un ensayo y un diseño cuidadosamente elaborados basados en el conocimiento de la diana terapéutica que se pretende abordar. Hay enfoques que involucran el cribado de toda una biblioteca de moléculas pequeñas generada por química combinatoria frente a miles de dianas potenciales a escala proteómica sin conocimiento previo, para lo que utilizan ensayos que se llevan a cabo *in silico, in vitro* e *in vivo*.

Aquí se mostrarán algunas de las tecnologías de HTS de moléculas pequeñas más comunes y se enfatizará en aquellas que identifican aquellas que se unen a una proteína determinada mediante un cribado químico de bibliotecas de compuestos. Se expondrá un ejemplo de cribado sobre una proteína con unas características estructurales especiales mediante la utilización de una estrategia pionera.

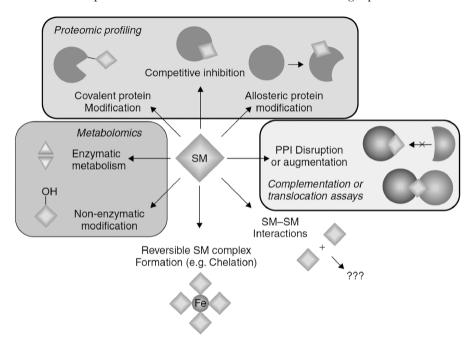


Figura 1. Algunas de los tipos de interacciones en los que participan las moléculas pequeñas dentro de un sistema celular vivo. Adaptada del libro *Osada, H. (2009). Protein Targeting with Small Molecules: Chemical Biology Techniques and Applications. Alemania: Wiley.*

2. DIANAS PROTEICAS Y SU PAPEL CLAVE EN EL DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS FÁRMACOS

2.1. Las proteínas y su función biológica

Las proteínas son moléculas esenciales para la vida y constituyen una de las cuatro clases principales de macromoléculas biológicas, junto con los ácidos nucleicos (como el ADN y el ARN), los lípidos (grasas) y los polisacáridos (azúcares). Lo que hace que las proteínas sean verdaderamente notables es su versatilidad y capacidad para realizar una amplia variedad de funciones vitales en los organismos.

Están formadas por cadenas de aminoácidos que se unen mediante enlaces peptídicos. Cada aminoácido, a su vez, consta de tres componentes clave: un grupo amino (–NH2), un grupo carboxilo (–COOH) y una cadena lateral única llama-

da grupo R (Figura 2). Es precisamente esta cadena lateral la que otorga a cada aminoácido sus características distintivas. Las cadenas laterales varían en tamaño, forma, carga e hidrofobicidad. Además, la mayoría de los aminoácidos son quirales, lo que significa que pueden existir en dos formas estereoisoméricas, conocidas como enantiómeros, siendo el enantiómero «L» el que se utiliza en la naturaleza para construir proteínas.

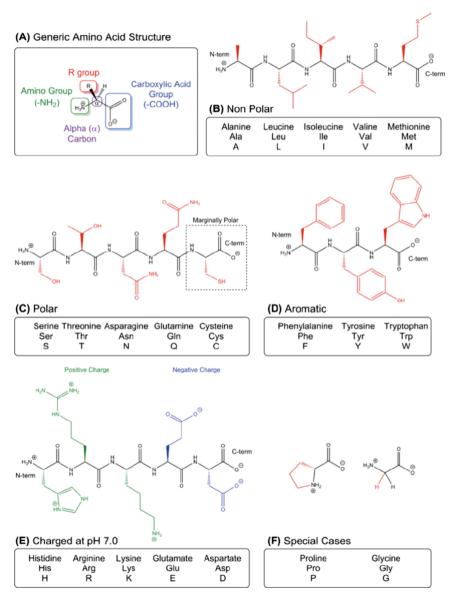


Figura 2. Figura extraída del libro Protein Structure Essays in Biochemistry 2020.

Cuando se ensamblan cadenas de aminoácidos, las proteínas no permanecen como cadenas lineales. Estas cadenas se pliegan sobre sí mismas debido a las interacciones débiles, pero fundamentales entre las cadenas laterales y los grupos del esqueleto peptídico. Estas interacciones incluyen enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones electrostáticas y efecto hidrofóbico. Esta capacidad de plegamiento permite que las proteínas adquieran una estructura tridimensional única.

La diversidad de proteínas es asombrosa y se debe a dos factores principales: la secuencia única de aminoácidos en una cadena y cómo esa cadena se pliega para formar una estructura tridimensional específica. Esta versatilidad estructural se traduce en una versatilidad funcional igualmente impresionante. Las proteínas pueden actuar como enzimas, catalizando reacciones químicas en el cuerpo. También pueden desempeñar un papel en la comunicación celular al unirse específicamente a otras moléculas, como hormonas. Además, algunas proteínas funcionan como elementos estructurales en las células y tejidos, proporcionando soporte y forma.

Así pues, las proteínas juegan roles fundamentales en los seres vivos, abarcando una amplia gama de funciones vitales, desde su función estructural como el colágeno y la queratina, hasta su papel regulador como la insulina y la hormona del crecimiento, pasando por su función como transportador en el caso de la hemoglobina y su importancia en el sistema inmunológico como anticuerpos [Berg, J. M. et al. 2015; Nelson, D.L. et al. 2017]. Además, ejercen funciones enzimáticas como la sacarasa y la pepsina, y son cruciales para la contracción muscular, en el caso de la actina y la miosina. Asimismo, participan en la homeostasis celular al mantener el pH y son esenciales en la transducción de señales a través de proteínas como la rodopsina, además de desempeñar funciones protectoras o defensivas mediante moléculas como la trombina y el fibrinógeno o los anticuerpos. La versatilidad y diversidad de las proteínas las convierten en componentes esenciales en los procesos bioquímicos de las células, lo que las convierte en dianas cruciales para una multitud de procesos. Algunas de las dianas proteicas más importantes en biología incluyen las proteínas transportadoras, las proteínas estructurales, las enzimas y los receptores. Estas dianas son puntos clave de regulación en las vías metabólicas y de señalización celular, lo que las hace altamente relevantes para el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos (Figura 3).

Cuando una pequeña molécula interacciona con una proteína, puede alterar su estructura o función, lo que puede tener consecuencias terapéuticas o tóxicas. Esta interacción selectiva con las dianas proteicas es la base para el diseño de fármacos que pueden actuar de manera específica en ciertos procesos celulares y abrir nuevas vías para el tratamiento de enfermedades.

Las interacciones entre una proteína y una molécula pequeña pueden ser de diversos tipos [Mannhold, R. et al. 2006], y entre las más frecuentes se encuentran las interacciones no covalentes. Estas interacciones son esenciales para que las proteínas y las moléculas pequeñas se unan temporalmente y se complementen entre sí para desencadenar una respuesta biológica específica. Los enlaces de hidrógeno son un tipo común de interacción no covalente que se da entre un átomo de hidrógeno y un átomo electronegativo (como oxígeno, nitrógeno o flúor). Estos enlaces son relativamente débiles, pero altamente específicos, lo que permite que se formen y rompan rápidamente para permitir cambios conformacionales y ajus-

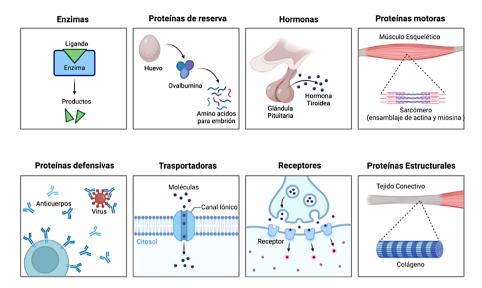
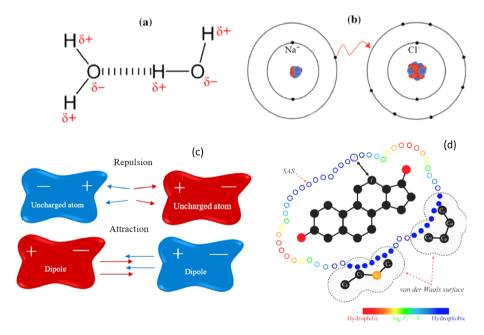


Figura 3. Figura que ilustra las funciones de las proteínas en los seres vivos. (Creado con BioRender.com)



 $\begin{tabular}{ll} Figura~4.~Figura~que~ilustra~los~tipos~de~interacciones~no~covalentes~que~pueden~presentarse~entre~una~proteína~y~mol\'eculas~peque\~nas.~https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169607.g001 \end{tabular}$

tes en la estructura de la proteína. Otra forma de interacción no covalente es la interacción iónica, que se produce entre grupos cargados opuestamente en la proteína y la molécula pequeña. Estas interacciones electrostáticas pueden ser muy fuertes y contribuyen a la estabilidad de la unión proteína-molécula pequeña. Las fuerzas de Van der Waals también son interacciones no covalentes cruciales. Estas fuerzas se deben a fluctuaciones momentáneas en la distribución de electrones alrededor de los átomos, lo que crea una atracción débil pero significativa entre la proteína y la molécula pequeña. Además, las interacciones hidrofóbicas juegan un papel importante en la unión de proteínas a moléculas pequeñas. Las partes hidrofóbicas de la proteína tienden a agruparse con las partes hidrofóbicas de la molécula pequeña, alejándose del ambiente acuoso y aumentando la afinidad entre ambos (Figura 4).

Estas interacciones no covalentes son reversibles, lo que permite que la proteína se una y se separe de la molécula pequeña en respuesta a señales o cambios en el entorno celular. Esta plasticidad en las interacciones proteína-molécula pequeña es fundamental para la regulación precisa de procesos biológicos y para que los fármacos puedan ejercer su acción de manera selectiva y temporal.

En resumen, las interacciones no covalentes entre proteínas y moléculas pequeñas son fundamentales para una amplia variedad de procesos biológicos y son el punto de partida para el diseño de fármacos que pueden modular específicamente las respuestas celulares.

2.2. Plegamiento de proteínas

2.2.1. Estructura de las proteínas

Recordemos que las proteínas exhiben una jerarquía estructural compuesta por cuatro niveles distintos que determinan su forma y función:

- 1. Estructura Primaria: Este nivel describe la secuencia específica de aminoácidos en una cadena polipeptídica. Cada aminoácido se denomina residuo y se une al siguiente mediante un enlace peptídico. La estructura primaria también incluye la ubicación de los enlaces disulfuro, que son enlaces covalentes entre residuos de cisteína. Estos enlaces son cruciales para estabilizar la estructura proteica.
- 2. Estructura Secundaria: La estructura secundaria se forma debido a los enlaces de hidrógeno regulares entre los grupos C=O y NH en el esqueleto peptídico. Los enlaces peptídicos no pueden rotar debido a su carácter de doble enlace debido a la estabilización por resonancia. Esto da lugar a la formación de dos tipos principales de estructuras secundarias: hélices α y láminas β. Las hélices α son hélices diestras, mientras que las láminas β son cadenas polipeptídicas extendidas que pueden ser paralelas o antiparalelas.
- 3. Estructura Terciaria: La estructura terciaria se refiere a la disposición tridimensional de los motivos estructurales secundarios en una proteína y es el resultado de las interacciones entre las cadenas laterales (grupos R) de los aminoácidos y cómo las estructuras secundarias se pliegan y se organizan en la proteína

- completa. Esta estructura determina la forma global de la proteína y es esencial para su función biológica.
- 4. Estructura Cuaternaria: Solo se aplica a proteínas compuestas por múltiples cadenas polipeptídicas llamadas subunidades. En la estructura cuaternaria, estas subunidades interactúan y se organizan para formar un complejo proteico más grande. Un ejemplo clásico es la hemoglobina, que consta de cuatro subunidades. La estructura cuaternaria es esencial para la función de proteínas que funcionan como complejos multicomponentes.

En resumen, la estructura de una proteína es una jerarquía compleja que comienza con la secuencia de aminoácidos (estructura primaria), se organiza en patrones regulares (estructura secundaria), se pliega en una forma tridimensional única (estructura terciaria), y en algunos casos, se combina con otras subunidades (estructura cuaternaria) para realizar su función biológica. Esta diversidad de niveles estructurales permite a las proteínas llevar a cabo una amplia variedad de funciones vitales en los organismos (Figura 5).

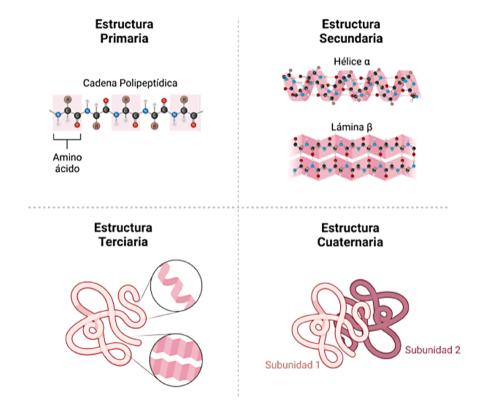


Figura 5. Figura que los diferentes niveles de plegamiento de una proteína. (*Creado con BioRender.com*)

2.2.2. El Plegamiento de Proteínas: Cómo adquieren su estructura biológicamente activa

La estructura tridimensional (3D) que exhibe una proteína es crucial para su función. El proceso de plegamiento de proteínas es el camino que una cadena de aminoácidos sigue para adoptar su estructura 3D nativa y biológicamente activa. Este proceso es fundamental para la vida y ha sido un área de estudio fundamental durante más de seis décadas.

Los Primeros Pasos en Comprender el Plegamiento de Proteínas:

Linus Pauling y los Enlaces de Hidrógeno: En la primera mitad del siglo XX, Linus Pauling y sus contemporáneos sentaron las bases para el estudio del plegamiento de proteínas. Identificaron los enlaces de hidrógeno y los enlaces peptídicos como elementos cruciales que estabilizan las estructuras proteicas [Pauling, L. et al. 1951A; Pauling, L. et al. 1951B].

William Astbury y la Estructura Proteica: William Astbury contribuyó significativamente al entendimiento de las estructuras de proteínas, investigando tanto proteínas fibrosas como globulares. Su trabajo proporcionó las bases para exploraciones futuras sobre cómo se pliegan las proteínas [Astbury, W. T. et al. 1931].

Dorothy Hodgkin y Max Perutz: Científicos notables como Dorothy Hodgkin y Max Perutz avanzaron en el campo al determinar las estructuras de proteínas clave, como la insulina y la hemoglobina, utilizando la cristalografía de rayos X. Estos logros revelaron detalles esenciales sobre las conformaciones proteicas [Cordes, M.H. et al. 1996].

La Termodinámica del Plegamiento de Proteínas:

Experimento de Anfinsen: En 1961, Christian Anfinsen realizó un experimento trascendental que estableció la base termodinámica del plegamiento de proteínas. Utilizando ribonucleasa A, una enzima de 124 aminoácidos, demostró que el plegamiento hacia una estructura biológicamente activa es independiente de factores celulares que podrían afectar a los parámetros cinéticos, hasta que se alcanza una estructura termodinámica estable bajo condiciones fisiológicas particulares [Anfinsen, C.B. et al. 1961]. Con este hallazgo obtuvo el Premio Nobel en 1972 e introdujo la idea de plegamiento de proteínas in vitro. Aunque parecía que el código de plegamiento de una proteína estaba incrustado en la secuencia de aminoácidos subyacente y el entorno celular tenía poca influencia en las propiedades de plegamiento de una proteína, era imperativo descifrar las propiedades celulares que influyen en la estabilización de las conformaciones secundarias y terciarias.

La paradoja de Levinthal: Es un concepto intrigante que aparece con un hallazgo importante surgido de las observaciones de Cyrus Levinthal en 1969. Esta paradoja está relacionada con la rapidez con la que una proteína podría plegarse de manera aleatoria y espontánea en su estructura tridimensional nativa. Levinthal observó por primera vez que las proteínas podían adoptar rápidamente sus estados nativos en solo unos pocos microsegundos, lo que contradecía fuertemente la idea de que las proteínas realizaran una búsqueda aleatoria de todas las configuraciones posibles.

Aquí está el meollo de la paradoja: si una proteína tuviera que probar todas y cada una de las posibles conformaciones tridimensionales para encontrar su estruc-

tura nativa, esto tomaría un tiempo astronómicamente largo. Es decir, una proteína grande podría tener una cantidad prácticamente infinita de configuraciones posibles, y, si se probara una por una, llevaría mucho más tiempo del que realmente se requiere en la naturaleza para que la proteína se pliegue correctamente. Sin embargo, en la realidad, las proteínas se pliegan de manera sorprendentemente rápida y eficiente, en cuestión de milisegundos o menos, en lugar de los millones de años que tomarían según el enfoque de prueba y error sugerido por la paradoja de Levinthal.

La resolución de esta aparente paradoja radica en el concepto de que el plegamiento de proteínas no sigue un proceso completamente aleatorio. En cambio, las proteínas parecen seguir rutas de plegamiento específicas, altamente organizadas y energéticamente favorecidas. Estas rutas de plegamiento están influenciadas por las propiedades intrínsecas de la secuencia de aminoácidos y las interacciones entre los residuos de aminoácidos.

En otras palabras, en lugar de explorar todas las configuraciones posibles, las proteínas siguen una serie de pasos dirigidos por la energía, que les permiten encontrar rápidamente su estructura nativa. Esto se debe a que existen fuerzas de atracción y repulsión entre los átomos en la cadena de proteínas, y estas fuerzas energéticas dirigen la proteína hacia su conformación más estable, que es su estructura nativa funcional.

Por tanto, la paradoja de Levinthal plantea una pregunta fundamental sobre cómo las proteínas pueden plegarse tan rápido y eficientemente, y la respuesta radica en la naturaleza altamente organizada y guiada por la energía del proceso de plegamiento de proteínas en lugar de un enfoque aleatorio puro. Esto demuestra la asombrosa eficiencia de la maquinaria molecular en nuestras células.

El Paisaje Energético del Plegamiento: La «nueva visión» o «visión del paisaje energético», surgida en la década de 1990, cambió nuestra comprensión del proceso de plegamiento (Figura 6). Esta visión describe el proceso como un diagrama de embudo, donde la anchura del embudo representa las conformaciones posibles y la profundidad representa la estabilidad. Las estructuras nativas se ubican en el punto más bajo, mientras que las conformaciones no nativas tienen mayor entropía. Esta visión ayuda a comprender cómo las proteínas encuentran su estructura nativa en un espacio conformacional vasto [Dill, K.A. et al. 1997].

Modelos y Caminos en el Plegamiento de Proteínas

A lo largo del tiempo, se han propuesto varios modelos para explicar cómo las proteínas se pliegan. Estos incluyen el modelo de crecimiento de nucleación, el modelo de difusión-colisión-adhesión, el modelo de marco, el modelo de colapso hidrofóbico, el modelo de rompecabezas y el modelo de condensación de nucleación [Wetlaufer, D.B. et al. 1973; Karplus, M. et al. 1976; Baldwin, R.L. et al 1989; Dill, K.A. et al. 1985; Harrison, S.C. et al 1985; Fersht, A.R. et al. 2002; Fersht, A.R. et al. 1995]. Cada uno de estos modelos aborda el proceso de plegamiento desde una perspectiva única, lo que ha contribuido a nuestra comprensión.

Factores que Regulan la Velocidad de Plegamiento

La velocidad de plegamiento de una proteína se relaciona con su topología estructural. Por ejemplo, las hélices α y los giros tienden a plegarse más rápidamente

que las láminas β. Otros factores, como la longitud de la cadena, el contenido de estructura secundaria y la distancia de contacto entre residuos, también influyen en la velocidad de plegamiento [*Grantcharova*, *V. et al. 2001; Plaxco, K.W. et al. 1998*].

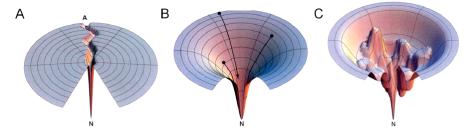


Figura 6. Ilustración de posibles paisajes energéticos. En el eje vertical se representa la energía libre sin considerar la entropía conformacional, una "energía libre interna». Un punto en la superficie representaría una conformación, que a su vez contiene un número elevado de grados de libertad. Frente a un escenario en el que el paisaje energético es plano excepto para el estado nativo, como se asume en la paradoja de Levinthal que implicaría una búsqueda al azar entre conformaciones equiprobables, el estado nativo (N) podría ser alcanzado más rápidamente desde un estado desnaturalizado (A) si existiera un camino en la superficie energética preferente (A). Un paisaje en forma de embudo (B) permitiría considerar conjuntos estadísticos de conformaciones energéticamente más favorables. De este modo la proteína alcanzaría el mínimo de energía (control termodinámico) pero habría múltiples caminos. En un paisaje más realista (C) hay que considerar que la superficie no es suave porque existen fuentes de frustración. https://doi.org/10.1038/nsb0197-10.

Avances en Predicción y Diseño de Proteínas

Los avances en informática y bioinformática han permitido desarrollar algoritmos de predicción de estructuras secundarias y, en algunos casos, estructuras terciarias a partir de secuencias de aminoácidos. Esto es fundamental para la investigación biomédica y la ingeniería de proteínas [Rost, B. et al. 2001].

Regulación Celular y Enfermedades: El Papel de las Chaperonas

Son componentes esenciales del proceso de plegamiento de muchas proteínas en las células. Su papel principal radica en garantizar que las proteínas se plieguen adecuadamente hacia su estructura tridimensional nativa y funcional. Esta función es de suma importancia, ya que el plegamiento incorrecto de las proteínas puede tener graves consecuencias, incluyendo enfermedades y disfunciones celulares [Fersht, A.R. et al. 2002].

Estas proteínas especializadas tienen múltiples funciones, pero una de las más importantes es actuar como «guías» para las proteínas recién sintetizadas o parcialmente desplegadas. A medida que una proteína emerge de la maquinaria de síntesis proteica o si se despliega debido a condiciones estresantes celulares, las chaperonas pueden interactuar con ella.

Las chaperonas ayudan a evitar que las proteínas se plieguen incorrectamente o se agreguen en agregados no funcionales. Esto es crucial porque, en condiciones normales, las proteínas pueden tener múltiples caminos posibles para plegarse, algunos de los cuales pueden llevar a estructuras incorrectas o a la formación de agregados que son tóxicos para la célula (Figura 7).

Las chaperonas funcionan de diferentes maneras. Algunas actúan como «bolsas de protección», envolviendo parcialmente a la proteína y evitando así que interactúe con otras proteínas o superficies hidrofóbicas. Otras chaperonas pueden ejercer una fuerza mecánica sobre la proteína, ayudándola a alcanzar su estructura nativa. En algunos casos, las chaperonas pueden proporcionar un entorno local óptimo para el plegamiento al crear un ambiente menos polar y más propicio para las interacciones hidrofóbicas.

La importancia de las chaperonas se hace evidente en enfermedades relacionadas con el plegamiento de proteínas, como las enfermedades priónicas y las amiloidosis (ej: enfermedad de Alzheimer), donde las proteínas se pliegan de manera incorrecta y forman agregados perjudiciales. En resumen, las chaperonas proteicas son guardianes celulares esenciales que desempeñan un papel fundamental en garantizar que las proteínas se plieguen correctamente y que las células funcionen de manera saludable.

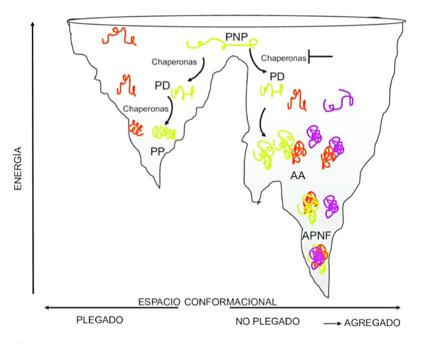


Figura 7. En este diagrama se representan los posibles estados energéticos por los que puede pasar un polipéptido durante su plegamiento/desplegamiento. Los factores proteostásicos que dirigen los cambios de estado del péptido desde un estado de « péptido no plegado « (PNP) hasta un péptido en estado nativo o péptido plegado (PP) pasando por estados intermedios de « proteína desplegada « (PD). Este último estado es proclive a formar agregados amorfos (AA) que pueden unirse entre si generando agregados proteínicos no funcionales e imposibles de degradar (APNF). https://onx.la/0aed2.

Aplicaciones Futuras (y presentes)

Predecir la estructura 3D de las proteínas es uno de los grandes desafíos fundamentales en biología. Al resolver este desafío, podemos profundizar drásticamente nuestra comprensión de la salud humana, las enfermedades y nuestro medio ambiente, especialmente en áreas como el diseño de medicamentos y la sostenibilidad. En la actualidad, se están desarrollando aplicaciones que proporcionan acceso abierto a más de 200 millones de predicciones de estructuras de proteínas para acelerar la investigación científica.

Un ejemplo en este momento de este tipo de aplicaciones es AlphaFold [*Jumper, J. et al. 2021*] (https://alphafold.ebi.ac.uk). Se trata de una plataforma desarrollada por DeepMind que utiliza el aprendizaje profundo para predecir la estructura tridimensional de las proteínas con una precisión sin precedentes.

Esta tecnología tiene una serie de aplicaciones y beneficios potenciales:

- Comprender la Biología Molecular al ofrecer una visión detallada de cómo se pliegan las proteínas, paso fundamental para comprender la biología molecular y ayudar a responder las preguntas sobre cómo funcionan las proteínas y cómo interactúan en los procesos biológicos.
- Diseño de Medicamentos al ayudar a identificar dianas farmacológicas y diseñar fármacos que se unan de manera específica a estas proteínas.
- Biología Sintética para diseñar nuevas proteínas o modificar las existentes para realizar funciones específicas, como la detección de enfermedades o la producción de productos químicos.
- *Investigación en Enfermedades*, por ejemplo, en el caso de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson, comprender cómo se pliegan ciertas proteínas puede arrojar luz sobre su papel en estas enfermedades.
- *Biotecnología* para la ingeniería de enzimas y proteínas con aplicaciones industriales, como la producción de bioplásticos o biocombustibles.
- Detección de Patógenos para ayudar en la identificación de posibles blancos para el desarrollo de vacunas y terapias antivirales.
- Agricultura y Alimentación para mejorar variedades de cultivos o para entender mejor cómo las proteínas en los alimentos afectan la nutrición y la salud.

2.3. Las proteínas como dianas terapéuticas

En el contexto del descubrimiento y desarrollo de fármacos, el término «diana» hace referencia a las proteínas u otras biomoléculas, como el ADN, el ARN, la heparina y los péptidos, a las cuales el fármaco se une directamente con el propósito de ejercer su acción terapéutica [Scott, D.E. et al. 2016]. Estas dianas son fundamentales para el éxito y la eficacia del fármaco, ya que representan los puntos clave en los procesos biológicos que se pretenden modular o inhibir para reconducir el proceso patológico durante el tratamiento de enfermedades. La definición precisa de las dianas es esencial para diseñar fármacos con una alta selectividad y especificidad, minimizando los efectos secundarios y maximizando la eficacia terapéutica. Además, conocer las dianas de un fármaco es fundamental para entender cómo

este interactúa con el organismo y cómo puede influir en otras vías o procesos biológicos [Santos, R. et al. 2017].

En el caso de las proteínas, éstas se convierten en dianas terapéuticas cuando se identifica su participación clave en un proceso patológico específico. Estas proteínas pueden estar sobreexpresadas, mutadas o desreguladas en una enfermedad, lo que las convierte en dianas para el desarrollo de terapias dirigidas. La interacción del fármaco con estas proteínas puede tener efectos beneficiosos al restaurar la función normal, inhibir su actividad excesiva o bloquear las señales que promueven el crecimiento descontrolado de células cancerosas. Por ejemplo, los inhibidores de quinasa son una clase importante de fármacos que bloquean determinadas enzimas implicadas en enfermedades como el cáncer y los trastornos inflamatorios. En el cuerpo humano hay cientos de quinasas, por lo que conocer la «diana» quinasa de cada fármaco es esencial para desarrollar estrategias de tratamiento exitosas (Figura 8) [Klaeger, S. et al. 2017].

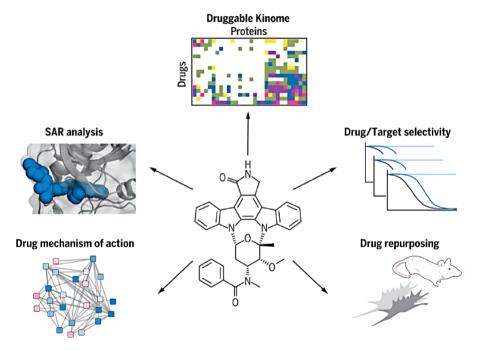


Figura 8. Representación esquemática de la identificación de las quinasas susceptibles a ser dianas de fármacos. Un enfoque químico proteómico reveló perfiles cuantitativos de interacción de 243 moléculas pequeñas que fueron evaluadas clínicamente y que cubrían la mitad de las quinasas de humano. Los resultados pueden explorarse interactivamente en ProteomicsDB y servir de base para la biología básica, el descubrimiento de fármacos y la toma de decisiones clínicas. https://doi.org/10.1126/science.aan4368

Un artículo de la revista «*Nature Reviews* | *Drug Discovery*» [*Santos, R. et al. 2017*] publicado en enero de 2017 presentó un exhaustivo y actualizado mapa de las

dianas moleculares de los fármacos aprobados. Se analizaron un total de 893 biomoléculas humanas y derivadas de patógenos que son dianas de 1.578 fármacos aprobados por la FDA de Estados Unidos. Entre estas biomoléculas se incluyen 667 proteínas derivadas del genoma humano que son diana de fármacos contra enfermedades humanas.

La inclusión de una amplia variedad de biomoléculas, como proteínas humanas y de patógenos, permite obtener una visión completa de las interacciones medicamento-biomolécula, proporcionando una sólida comprensión de los mecanismos de acción y potenciales dianas terapéuticas. Este análisis profundo y actualizado de las dianas farmacológicas destaca el papel fundamental de las proteínas como dianas de numerosos fármacos en el tratamiento de diversas enfermedades humanas.

El estudio también arroja luz sobre las familias de dianas privilegiadas, mostrando que ciertos mecanismos biológicos son comunes a varias áreas terapéuticas (Figura 9). Asimismo, se destaca el surgimiento de nuevos mecanismos pioneros, especialmente en el campo de la oncología, lo que sugiere un potencial significativo para desarrollar terapias innovadoras y específicas para abordar enfermedades complejas.

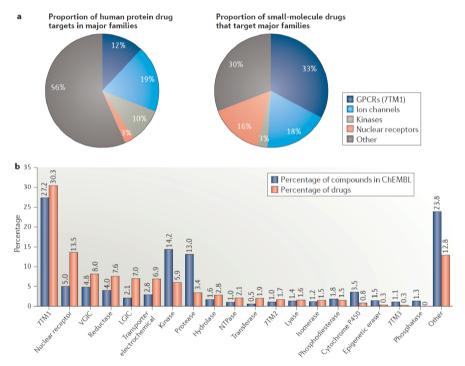


Figura 9. Principales familias de proteínas utilizadas como dianas terapéuticas. https://doi. org/10.1038/nrd.2016.230

Es preciso continuar con la búsqueda de nuevos fármacos que permitan cubrir necesidades médicas no resueltas, y para ello, sigue siendo necesario la identificación de nuevas dianas terapéuticas. A pesar del creciente esfuerzo económico en

este empeño, el número de nuevos fármacos que llegan al mercado no se incrementa de forma equiparable. De hecho, antes del año 2000, solo el 21,5% de los fármacos que ingresaban en ensayos de fase I eran finalmente aprobados para su comercialización [De la Torre, B.G. et al. 2019], y entre 2006 y 2015, la tasa de éxito disminuyó a solo el 9,6% [DiMasi, J.A. et al. 2003], variando significativamente en diferentes áreas terapéuticas [Hutchinson, L. et al. 2011; Moreno, L. et al. 2013]. Estas altas tasas de fallo pueden atribuirse a la falta de fiabilidad de los datos publicados y a problemas biofarmacéuticos, incluida la farmacocinética subóptima [Schuhmacher, A. et al. 2016]. Para evitar costosos fracasos, una cuidadosa toma de decisiones durante el descubrimiento y desarrollo de fármacos es esencial [Wang, Y. at al. 2012].

3. TÉCNICAS BIOFÍSICAS APLICADAS AL PROCESO DE DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS

3.1. Técnicas biofísicas para caracterizar estructura proteica y su unión de ligandos

El objetivo central del descubrimiento de fármacos es proporcionar compuestos candidato seleccionados y optimizados para los programas de desarrollo farmacológico, desde estudios preclínicos hasta ensayos clínicos de fase III, con el fin de comercializar un nuevo fármaco (nueva entidad molecular o biológica) o una nueva indicación terapéutica (reposicionamiento de fármacos).

En las últimas tres décadas, los logros significativos relacionados con el descubrimiento de fármacos (por ejemplo, los primeros inhibidores clínicos de la proteasa del virus de la inmunodeficiencia humana-1) han sido posibles gracias al desarrollo de diversas herramientas y técnicas biofísicas que permiten el estudio en profundidad de la estructura de biomoléculas, como la difracción de rayos X, la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la microscopía crioelectrónica (proporcionan información estructural detallada del complejo diana-ligando a nivel atómico), así como a las herramientas computacionales, incluyendo el docking molecular, cribado virtual y simulaciones moleculares. Otras técnicas biofísicas, pueden ser utilizadas para: 1/ determinar la afinidad de unión y las interacciones intermoleculares fundamentales y cambios conformacionales que dan lugar a la formación del complejo diana-ligando (como la calorimetría de titulación isotérmica, ITC); 2/ determinar los parámetros cinéticos de la formación del complejo diana-ligando (como la resonancia de plasmón superficial (SPR); 3/ desarrollar nuevas metodologías de aplicación en el cribado de fármacos (como las técnicas espectroscópicas UV-Vis, fluorescencia y dicroísmo circular) [Macarron, R. et al. 2009].

Es decir, una disciplina como la biofísica ofrece una amplia gama de técnicas para estudiar la interacción, función y actividad de las proteínas, que cuando se utilizan en combinación a lo largo de diferentes etapas del descubrimiento y desarrollo de fármacos, pueden proporcionar información valiosa para reducir la tasa de abandono en el proceso de desarrollo de fármacos que antes comentamos [Renaud, J.P. et al. 2016; Holdgate, G. et al. 2013].

En la tabla que se muestra a continuación, se ofrece un breve resumen de algunas de las técnicas.

Tabla 1. Resumen de algunas de las técnicas biofísicas utilizadas en un laboratorio para caracterizar estructura proteica y su unión de ligandos. Se podrían agrupar en: Técnicas Espectroscópicas (Absorción UV-Vis, Fluorescencia y CD); Técnicas de detección de Interacciones (SPR e ITC); Técnicas de Resolución de Estructuras (ME, RMN y Rayos X); Técnicas computacionales (*Docking* Molecular, Cribado Virtual y Simulaciones Moleculares).

* Hay que tener en cuenta que los tiempos y el número de muestras pueden variar según las condiciones específicas del experimento y el equipo utilizado. Estos valores son aproximados y pueden ajustarse en función de las circunstancias experimentales.

Técnica	Concepto científico	De qué informa	Tiempo y n° muestras*
Espectroscopía Ultravioleta-	UV-Vis mide la absorción de luz en la región UV y visible de espectro electromagnético. Se basa en la absorción de fotones por electrones de valencia en moléculas.	Proporciona información sobre la concentración y absorción de sustancias químicas o biomoleculares en una muestra. Typical Protein UV Spectrum	Las medidas son rápidas, general- mente en segun- dos o minutos. Se puede usar una
Visible (UV- Vis): [Tissue, B. M. et al 2012]	protein backbone, salts, phenol 250mm nucleic acids protein- contaminated nucleic acid nucleic acid 280mm aromatic protein rings wavelength (\(\))	2 240 240 200 320 340 MM	sola muestra a la vez.
Fluorescencia: [Ladokhin, A. S. et al. 2000]	La fluorescencia implica la emisión de luz por una sustancia (fluoróforo) después de absorber luz a una longitud de onda específica. Se basa en la relajación de electrones excitados.	Proporciona información sobre la concentración, localización y cinética de moléculas etiquetadas con fluoróforos, así como cambios en estructura y entorno molecular.	Las medidas son rápidas y pueden realizarse en se- gundos o minu- tos. Se requiere una sola muestra con fluoróforos.
Dicroísmo Circular (CD): [Mcmillin, C. R. et al. 1974]	El CD mide la diferencia en la absorbancia de luz polarizada circularmente a diferentes longitudes de onda. Se basa en la interacción de la luz con la estructura quiral de las moléculas.	Proporciona información sobre la estructura secundaria y terciaria de proteínas y ácidos nucleicos, incluyendo la conformación de hélices α , láminas β , etc.	Las medidas son relativamente rápidas, generalmente en minutos. Se requiere una sola muestra para adquirir un espectro CD.

Técnica	Concepto científico	De qué informa	Tiempo y nº muestras*
Resonancia de Plasmón Superficial (SPR): [Kodoyianni, V. et al. 2011]	SPR detecta cambios en el índice de refracción en la superficie de un sensor cuando se unen moléculas a esa superficie. Se basa en la propagación de ondas de plasmones superficiales. Superficio de un sensor cuando se unen moléculas a esa superficie. Se basa en la propagación de ondas de plasmones superficiales.	Proporciona información cinética y termodinámica sobre las interacciones biomoleculares, incluyendo la afinidad, la cinética de asociación y disociación, y la concentración de analitos.	Las medidas cinéticas son rápidas y se pueden obtener en minutos. Se requieren varias muestras para realizar experimentos de titulación.
Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC): [Bastos, M. et al. 2023]	ITC mide los cambios en el flujo de calor asociados con reacciones químicas o interacciones biomoleculares mientras se titula una solución con otra. Se basa en el principio de que las reacciones exotérmicas o endotérmicas liberan o absorben calor.	Proporciona información sobre la termodinámica de una interacción, incluyendo la constante de afinidad (Ka), la entalpía (ΔH), la entropía (ΔS) y el número de sitios de unión.	Las titulaciones pueden durar des- de minutos hasta horas, dependien- do de la velocidad de la interacción. Se requieren va- rias muestras para generar una curva de titulación com- pleta.
Microscopía Electrónica: [Kuo, J. et al. 2008]	La microscopía electrónica utiliza haces de electrones en lugar de luz para obtener imágenes de alta resolución de muestras. Puede ser de transmisión (TEM) o de barrido (SEM).	Permite la observación detallada de estructuras y objetos a nivel microscópico, incluyendo características subcelulares, nanomateriales y partículas.	El tiempo varía según la preparación de la muestra y el tipo de microscopía. Se necesita una muestra específicamente preparada.

Técnica	Concepto científico	De qué informa	Tiempo y n° muestras*
Resonancia Magnética Nuclear (RMN): [Kay, L. E. et al. 1997]	RMN es una técnica que explora la interacción de núcleos atómicos con campos magnéticos y ondas de radio. Se basa en el comportamiento magnético de ciertos núcleos atómicos en presencia de un campo magnético externo. $B_{\text{eff}} = B_0$ $B_{\text{eff}} = B_0 + B_0$ AE ΔE ΔC Δ	Proporciona información sobre la estructura y dinámica de las moléculas en solución, incluyendo la identificación de átomos específicos, sus entornos químicos y las interacciones moleculares.	El tiempo varía según la complejidad de la muestra y el experimento. Las muestras pueden variar desde microlitros hasta millilitros, y se requieren varias para obtener datos significativos.
Difracción de Rayos X (Rayos X): [Ringe, D. et al. 1985]	La difracción de rayos X es una técnica que utiliza la dispersión de rayos X por los átomos de una muestra cristalina para determinar su estructura tridimensional. Se basa en el principio de que los rayos X se difractan cuando pasan a través de una red cristalina, creando patrones característicos que se pueden utilizar para determinar la disposición de los átomos en la muestra. X-Ray Crystallography	Proporciona información detallada sobre la estructura atómica y molecular de una sustancia cristalina, incluyendo la posición de los átomos y la distancia entre ellos.	El tiempo requerido depende de la complejidad de la estructura y la calidad de los datos. Por lo general, puede tomar desde horas hasta días. Se requiere una sola muestra cristalina de alta calidad.

Técnica	Concepto científico	De qué informa	Tiempo y n° muestras*
Docking Molecular: [Śledź, P. et al. 2018]	El docking se refiere a la predicción de la orientación y la energía de interacción entre dos moléculas, generalmente una proteína y un ligando pequeño, en una estructura tridimensional. Las herramientas computacionales utilizan algoritmos para predecir cómo se unirá un ligando a una proteína.	Proporciona información sobre la forma en que una molécula se une a un diana biológica, lo que puede llevar al diseño de inhibidores o fármacos.	El tiempo para un cálculo de docking puede variar desde minutos hasta horas, dependiendo de la complejidad del sistema. Se pueden realizar múltiples cálculos con diferentes ligandos.
Cribado Virtual: [Cosconati, S. et al. 2010]	El cribado virtual es un proceso com- putacional utilizado para seleccionar compuestos químicos de una base de datos que puedan tener actividad contra una diana terapéutica. Impli- ca la evaluación de miles o millones de moléculas en busca de candidatos prometedores.	Proporciona información sobre qué compuestos tienen el potencial de interactuar con una proteína o diana específica, lo que puede acelerar el proceso de descubrimiento de fármacos.	El tiempo requerido para el cribado virtual depende del tamaño de la base de datos y de la capacidad computacional. Se pueden evaluar grandes cantidades de compuestos en un solo análisis.
Simulaciones Moleculares: [van Gunsteren, W. F. et al. 2018]	Las simulaciones moleculares son cálculos computacionales que modelan el comportamiento de átomos y moléculas en sistemas biológicos. Utilizan ecuaciones y fuerzas físicas para predecir dinámicas moleculares y propiedades termodinámicas.	Proporciona información detallada sobre la dinámica, la estabilidad y las propiedades termodinámicas de sistemas biomoleculares, lo que permite comprender mejor las interacciones y los cambios conformacionales.	Las simulaciones pueden variar en tiempo, desde na- nosegundos hasta microsegundos o más, dependien- do de la pregunta científica. El número de muestras también varía según el estudio, desde una sola estructura hasta miles de simulaciones.

3.2. Fluorescencia como técnica biofísica en el estudio de proteínas y sus ligandos

Vamos a profundizar un poco más en una de las técnicas biofísicas mencionadas anteriormente.

La fluorescencia es un fenómeno en el que las moléculas emiten luz de cierta longitud de onda después de absorber luz de una longitud de onda más corta, un proceso conocido como desplazamiento de Stokes. Este fenómeno se produce cuando un electrón en una molécula (conocida como fluoróforo), una vez excitado, emite fotones al regresar desde el estado excitado a su estado fundamental [*Albani, J.R. et al.* 2007] (Tabla 1). Además de la emisión de fluorescencia, la relajación electrónica puede ocurrir a través de procesos no radiativos, como la disipación de calor, o procesos radiativos no fluorescentes, como la fosforescencia. También puede ser influenciada por interacciones secundarias, como la extinción de fluorescencia o la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Las propiedades específicas de la fluorescencia, como las longitudes de onda de excitación y emisión, el rendimiento cuántico (eficiencia del proceso de fluorescencia) y el tiempo de vida, dependen de la molécula en cuestión.

En el caso de las proteínas, la fluorescencia intrínseca es principalmente resultado de la excitación de sus residuos de triptófano, aunque también se ven afectados por tirosinas y fenilalaninas en menor medida (Figura 10). Generalmente, el triptófano exhibe una longitud de onda máxima de absorción alrededor de 280 nm y emite luz en un intervalo de 300 a 350 nm en el espectro de fluorescencia, y esto varía según el microambiente local y su polaridad [*Lakowicz, J.R. et al. 2006*]. Esta propiedad de fluorescencia de las proteínas se aprovecha como una herramienta para investigar la conformación de la proteína y su interacción con ligandos.

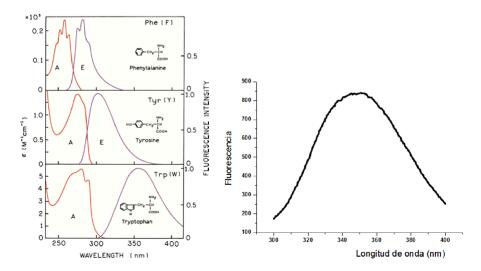


Figura 10. Espectros de fluorescencia intrínseca de Absorción (en rojo) y excitación (morado) de los aminoácidos aromáticos de las proteínas (Izquierda). Espectro de fluorescencia de una proteína en solución (lisozima 2 μMolar en fosfato sódico) obtenido tras excitar a 280nm y recoger el espectro de emisión de 300 a 400nm (Derecha).

Cuando se realizan experimentos de desnaturalización de proteínas, ya sea térmica o química, el entorno de los residuos de triptófano experimenta cambios notables (Figura 11). Por ejemplo, durante el proceso de desplegamiento, se puede observar un cambio de intensidad debido a la interacción dinámica con las moléculas de agua, lo que conduce a una menor intensidad de fluorescencia.

La representación de la intensidad de fluorescencia obtenida a temperaturas crecientes o concentraciones de agente químico desnaturalizante mayores da como resultado una curva de desnaturalización tras cuyo análisis se puede obtener como parámetro la temperatura media de desnaturalización $(T_{\rm m})$ o la concentración media agente desnaturalizante $(D_{\rm m})$ característica de una proteína en concreto en un solvente determinado.

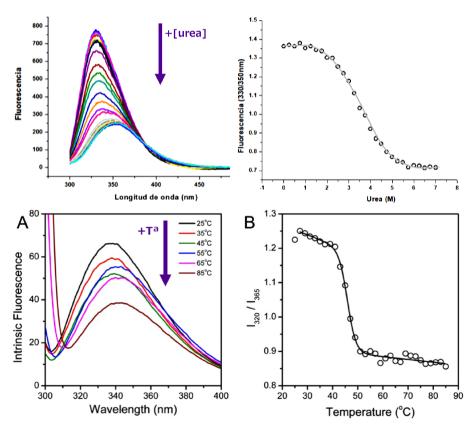


Figura 11. Espectros de fluorescencia durante procesos de desnaturalización química (superior izquierda) o térmica (inferior izquierda). Análisis de los datos de fluorescencia obtenidos tras analizar las curvas de desnaturalización química (superior derecha) o térmica (inferior derecha)

De manera similar, cuando un ligando se une a una proteína, éste puede modificar el microentorno local de un residuo aromático, lo que se refleja en cambios espectrales en la fluorescencia, tanto en términos de intensidad como de desplazamiento de longitud de onda, de manera proporcional al proceso de unión (saturación de unión). Para observar este efecto, además se pueden utilizar sondas extrínsecas que cuentan con diversas propiedades espectrales, ya sea como marcadores independientes o unidos covalentemente a moléculas biológicas. Estas propiedades de fluorescencia de las sondas extrínsecas también dependen en gran medida del entorno local. Uno de los usos más comunes de estas sondas es el análisis termoestabilizante o fluorimetría diferencial de barrido (TSA o DSF, por sus siglas en inglés) (Figura 12). Otra aplicación incluye el uso de tintes fluorescentes específicos, como la tioflavina o el rojo Congo, como marcadores para detectar la agregación o formación de fibras proteicas, lo que facilita la identificación de compuestos que modulan estos procesos.

Differential Scanning Fluorimetry

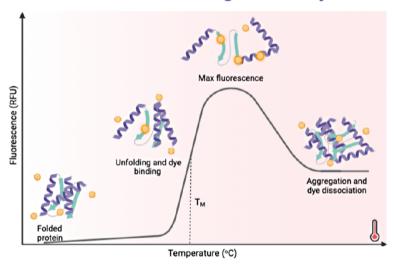


Figura 12. La Fluorimetría Diferencial de Barrido (DSF, por sus siglas en inglés) es una técnica espectrofotométrica que se utiliza para seguir el proceso de despliegue térmico de las proteínas. Este método emplea colorantes que emiten fluorescencia en entornos no polares, incluyendo las regiones hidrofóbicas expuestas de la estructura de la proteína. (*Creado con BioRender.com*)

Las mediciones de fluorescencia se pueden llevar a cabo de manera eficiente mediante lectores de placas equipados con filtros de paso de banda o monocromadores, y que cuentan con capacidad de control de temperatura. Estas mediciones permiten un mayor desempeño y rendimiento, y son versátiles y útiles en diversas aplicaciones, incluyendo:

1. Actividad de proteínas: Se utilizan sustratos fluorescentes adecuados para monitorizar la actividad de proteínas (Figura 13).

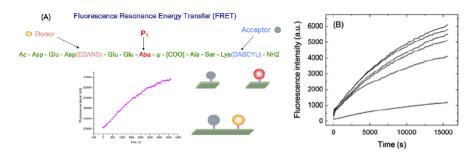


Figura 13. Ejemplo de determinación de la actividad enzimática de la proteasa del virus de la hepatitis C (HCV) utilizando como sustrato un compuesto basado en FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*). Se trata de fenómeno físico y una técnica experimental utilizada en biología y química para estudiar la proximidad entre dos sondas fluorescentes o etiquetas unidas a moléculas específicas. El FRET se basa en la transferencia de energía entre estas sondas cuando están lo suficientemente cerca una de la otra (A). Ejemplo de determinación de la fluorescencia por mediante FRET de la proteasa HCV a concentraciones crecientes de un compuesto inhibidor de la misma. Con la determinación de la velocidad de la reacción (a través de la pendiente de la curva) se puede conocer la constante de inhibición de dicho compuesto.

2. Unión de proteínas: Pueden detectar cambios espectrales en proteínas o cofactores proteicos después de la unión de un ligando, o emplear ligandos competidores fluorescentes previamente unidos (Figura 14).

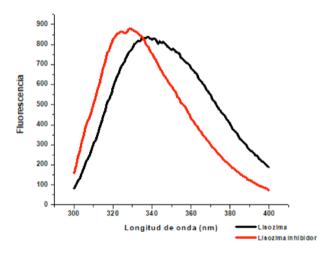


Figura 14. Ejemplo de cambio de señal de fluorescencia de la proteína lisozima (negro) tras unión de un ligando que inhibidor (rojo).

3. Cambios conformacionales: Se emplean sondas fluorescentes intrínsecas o extrínsecas para detectar cambios en la conformación de biomoléculas (Figura 15).

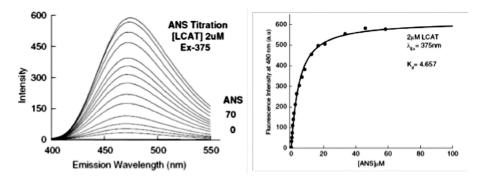


Figura 15. Ejemplo de cambio de señal de fluorescencia tras unión con concentraciones crecientes de ANS (Ácido 8-anilino-1-naftalenosulfónico)

Existen diferentes tipos de ensayos de fluorescencia que se pueden poner a punto en función de la proteína en estudio y de lo que se desea identificar. En resumen, la fluorescencia es una herramienta valiosa en investigación debido a su versatilidad y sensibilidad, lo que la convierte en una opción efectiva para una amplia gama de aplicaciones experimentales.

3.3. Cribado de alto rendimiento (HTS)

El descubrimiento y desarrollo de fármacos es un proceso que implica una serie de pasos críticos para identificar moléculas candidatas que puedan convertirse en medicamentos efectivos. Aunque el diseño de fármacos basado en la estructura es una parte fundamental de este proceso, los procedimientos experimentales de cribado molecular de alto rendimiento (HTS) también desempeñan un papel crucial y, a menudo, necesario. En este contexto, el HTS se refiere a la evaluación sistemática de compuestos químicos para identificar aquellos que tienen el potencial de interactuar con una diana proteica específica. Aunque conceptual y operativamente diferentes del diseño racional, los ensayos moleculares experimentales no deben considerarse «irracionales», sino más bien una aplicación sistemática del procedimiento de «ensayo y error» [Ciulli, A. et al. 2013].

La base de este proceso radica en el hecho de que, para desarrollar un medicamento eficaz, es esencial comprender cómo interactúan las moléculas con sus dianas biológicas. El objetivo final es encontrar compuestos que puedan modular la actividad biológica de una proteína de interés, ya sea inhibiendo o potenciando dicha actividad. Estos compuestos se conocen como «hits» y se someten a un proceso de optimización posterior para convertirse en «leads», que son candidatos prometedores para el desarrollo de fármacos.

Para llevar a cabo un programa de cribado de alto rendimiento HTS en el descubrimiento de fármacos, es necesario seguir una serie de pasos cuidadosamente planificados. A continuación, desglosamos estos pasos clave:

- 1. Obtención de información estructural y funcional de la diana proteica: Antes de embarcarse en cualquier ensayo de cribado, es crucial realizar una investigación exhaustiva de la diana proteica de interés. Esto implica obtener información detallada sobre su estructura tridimensional, si está disponible, o al menos, sobre sus regiones funcionales y sitios activos. Además, es fundamental comprender su función biológica y su papel en procesos fisiológicos o patológicos. Esta información puede obtenerse mediante técnicas como la cristalografía de rayos X, la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), la modelización por ordenador y experimentos funcionales. Además, es importante conocer la variabilidad de la proteína en diferentes condiciones, como variaciones de pH, fuerza iónica y temperatura, ya que esto puede influir en su comportamiento y estabilidad.
- 2. Selección de la técnica biofísica adecuada: El corazón del HTS es la técnica experimental utilizada para evaluar la interacción entre los compuestos y la diana proteica. Como ya hemos comentado anteriormente, existen numerosas técnicas biofísicas disponibles, como la calorimetría isotérmica de titulación (ITC), la resonancia de plasmón superficial (SPR), la espectroscopia de fluorescencia, la cristalografía de rayos X, entre otras. La elección de la técnica depende de la naturaleza de la diana y los objetivos del ensayo. El ensayo de HTS debe ser un ensayo sencillo, que proporcione una respuesta "Sí" o "No", no un ranquin de eficacia de compuestos ensayados, y tiene que ser una técnica que permita un desempeño y rendimiento adecuados para ensayar muchos compuestos en un tiempo razonable. Esto hace que muchas técnicas (ej. ITC) sean inviables para HTS.
- **3. Validación y optimización del ensayo HTS**: Antes de comenzar el cribado a gran escala, es esencial validar y optimizar el ensayo HTS. Esto implica establecer parámetros de calidad que garanticen la confianza en los resultados. Entre los aspectos a considerar se encuentran:
- Definición de umbrales de selección de hits para minimizar falsos positivos y falsos negativos [Zhang, J.H. et al. 1999].
- Evaluación de la reproducibilidad del ensayo mediante controles de calidad internos.
- Optimización de condiciones experimentales, como concentraciones de proteína y compuestos, para maximizar la sensibilidad y especificidad del ensayo.

La validación y optimización rigurosas aseguran que los resultados del cribado sean confiables y que los compuestos seleccionados sean realmente prometedores.

- **4. Selección de la biblioteca química**: La elección de la biblioteca de compuestos químicos es un paso estratégico en el proceso de cribado. Existen diferentes tipos de bibliotecas, que varían en tamaño y diversidad. La elección de la biblioteca depende de varios factores, incluyendo la etapa del proceso de descubrimiento y las características de la diana proteica.
- Las bibliotecas grandes y diversas son útiles en etapas tempranas del descubrimiento, donde se busca una exploración amplia de la actividad biológica y la diversidad química.

- Las bibliotecas orientadas a la diana se diseñan específicamente para interactuar con la diana proteica de interés, lo que puede ser relevante en etapas posteriores.
- Las bibliotecas basadas en fragmentos contienen pequeñas moléculas que pueden ensamblarse para formar compuestos más grandes y complejos.

La elección de la biblioteca debe estar en línea con los objetivos del cribado y el conocimiento previo de la diana proteica [McGovern, S.L. et al. 2002].

- **5. Realización de ensayos HTS**: Una vez que se ha seleccionado la biblioteca química, se procede a realizar los ensayos HTS a gran escala. Cada compuesto de la biblioteca se evalúa sistemáticamente en busca de interacciones con la diana proteica. Los datos resultantes se registran y analizan para identificar *hits* potenciales. Este proceso puede ser intensivo en términos de recursos y tiempo, ya que se pueden evaluar miles o incluso millones de compuestos. Por lo tanto, es esencial contar con sistemas automatizados y procesos eficientes para llevar a cabo estos ensayos de manera efectiva.
- **6. Validación de compuestos seleccionados**: Una vez que se han identificado los *hits* en el HTS, es necesario llevar a cabo una validación adicional. Esto implica confirmar y comprender en detalle la interacción directa entre los compuestos seleccionados y la diana proteica mediante técnicas experimentales adicionales.

Las técnicas de validación pueden incluir la determinación de la constante de disociación, la resolución de estructuras tridimensionales de complejos proteínaligando y la evaluación de efectos funcionales en células o ensayos biológicos relevantes.

Esta validación garantiza que los compuestos seleccionados sean prometedores y proporciona información valiosa para el desarrollo posterior de fármacos, incluyendo la optimización de compuestos y los estudios preclínicos. En última instancia, este proceso de cribado biofísico y validación es esencial para avanzar en la búsqueda y desarrollo de nuevos medicamentos que mejoren la salud y el bienestar de las personas.

Todo este proceso descrito se correspondería con un cribado biofísico (Figura 16A), que utiliza dianas proteicas aisladas y purificadas. Otro enfoque valioso en la investigación y el desarrollo de fármacos son los cribados fenotípicos (Figura 16B), en los que el proceso de evaluación de compuestos químicos se realizaría en sistemas biológicos completos para identificar aquellos compuestos que pueden tener efectos terapéuticos basados en cambios observables en el fenotipo observable en células, tejidos u organismos vivos. La elección entre estos enfoques depende de los objetivos de la investigación y de la etapa del proceso de desarrollo de fármacos.

A través de un cribado biofísico exitoso, es posible identificar candidatos prometedores como compuestos biológicamente activos para una diana conocida. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el efecto biológico en células o *in vivo* no está garantizado, ya que otros procesos adicionales, como la permeabilidad de la membrana o la degradación metabólica, pueden afectar a la bioactividad del compuesto. Por otro lado, un cribado fenotípico satisfactorio puede llevar a la iden-

tificación de compuestos bioactivos en ensayos celulares o *in vivo*, pero estos compuestos no proporcionan información directa sobre la diana proteica involucrada en el efecto observado. Ambos enfoques, el cribado biofísico y el cribado fenotípico (Figura 17), ofrecen perspectivas valiosas y complementarias en el proceso de descubrimiento de fármacos [*Zhang, J.H. et al. 1999*].

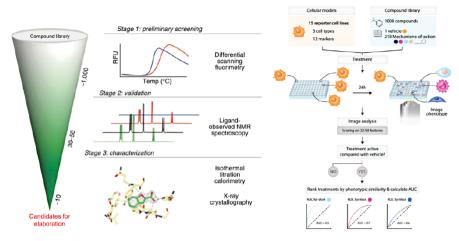


Figura 16. A/ (Izquierda) Esquema cribado de compuestos biofísico. Imagen de: https://doi.org/10.1038/nprot.2013.130. B/ (Derecha) Esquema cribado fenotípico. Imagen extraída de https://doi.org/10.1038/s41598-020-69354-8

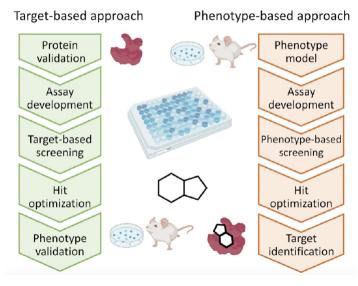


Figura 17. Comparación cribado biofísico y fenotípico. Imagen extraída de https://doi.org/10.1038/s41598-020-69354-8

Es posible aprovechar sus fortalezas para obtener una imagen más completa y precisa de los efectos de los compuestos en sistemas biológicos. Aquí hay algunas formas en que se pueden complementar:

- 1. Identificación de dianas y mecanismos de acción: El cribado biofísico puede ayudar a identificar dianas moleculares específicas y comprender cómo interactúan los compuestos con estas proteínas. Una vez identificada una diana potencial, el cribado fenotípico puede evaluar cómo afecta esa interacción a nivel celular o del organismo completo.
- **2.** Validación de las dianas: Después de identificar una proteína que puede ser diana potencial mediante el cribado fenotípico, el cribado biofísico puede confirmar y validar la interacción entre el compuesto y la diana.
- **3.** Descubrimiento de nuevas dianas: Si el cribado fenotípico revela un efecto biológico, pero no se conoce la diana, el cribado biofísico puede ayudar a identificar proteínas específicas responsables de esos efectos.
- 4. Optimización de compuestos: Una vez que se han identificado compuestos candidatos mediante el cribado fenotípico, el cribado biofísico puede ayudar a optimizar estos compuestos para mejorar su afinidad y selectividad hacia la diana.
- 5. Comprensión de mecanismos de resistencia: La combinación de enfoques puede ser útil para investigar mecanismos de resistencia en el desarrollo de fármacos. El cribado fenotípico puede revelar resistencia en sistemas biológicos, y el cribado biofísico puede analizar cómo los cambios en la estructura de la diana están relacionados con la resistencia.
- **6.** Evaluación de efectos secundarios: El cribado fenotípico puede identificar efectos secundarios no anticipados en sistemas biológicos. El cribado biofísico puede ayudar a entender los mecanismos subyacentes de estos efectos y a diseñar compuestos con menor probabilidad de causarlos.
- 7. Validación de compuestos *in vivo*: Después de identificar compuestos candidatos mediante el cribado biofísico y fenotípico in vitro, se pueden realizar estudios in vivo para validar la eficacia y la seguridad en modelos animales.

3.4. Cribado de alto rendimiento basado en fluorescencia: ensayo de desplazamiento térmico

Debido a una propiedad general de las proteínas, cuando un ligando se une preferentemente a un estado conformacional específico de la proteína, ese estado tiende a estabilizarse, aumentando la población o fracción molar de dicho estado. Eso se traduce en un aumento en la temperatura desplegamiento térmico, conocida como $T_{\rm m}$. Si el estado nativo de la proteína se une preferentemente al ligando, veremos un aumento en la $T_{\rm m}$, pero si los estados desplegados o parcialmente desplegados tienen una unión preferente a dicho ligando, la $T_{\rm m}$ disminuirá (ya que lo que se estabiliza serán esos estados desplegados). Aunque existen instrumentos comerciales para experimentos automatizados de desnaturalización química de proteínas, la desnaturalización térmica es más común debido a su practicidad. Esta tecnología aplicada en el cribado de alto rendimiento y se conoce fluorimetría di-

ferencial de barrido (DSF por sus siglas en inglés) y fue inicialmente desarrollada por 3D Pharmaceuticals bajo la marca Thermofluor [Pantoliano, M.W. et al. 2001].

Para seguir el proceso de desplegamiento térmico de una proteína en presencia de diversos compuestos, se pueden utilizar sondas intrínsecas como los residuos de triptófano o los cofactores, o sondas extrínsecas como el ácido 8-anilinonaftaleno-1-sulfónico (ANS) o el SYPRO Orange. Algunos instrumentos comerciales permiten medir la intensidad de emisión del triptófano. Sin embargo, la mayoría de las proteínas se prestan a la aplicación de una amplia variedad de sondas fluorescentes y a la utilización de instrumentación de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR) como equipos lectores de fluorescencia con control de temperatura, lo que hace que esta técnica se puede aplicar de forma amplia. Las sondas fluorescentes extrínsecas están diseñadas para unirse de manera no específica a regiones de superficie hidrofóbica en la proteína diana. Cuando la proteína se despliega, las áreas hidrofóbicas expuestas se unen a la sonda fluorescente. Esta interacción con la sonda conduce a un aumento en el rendimiento cuántico de la sonda, lo que facilita la determinación de la T_m como la temperatura en el punto de máxima pendiente, o punto de inflexión [Vedadi, M. et al. 2006; Velazquez-Campoy, A. et al. 2016] (Figura 18).

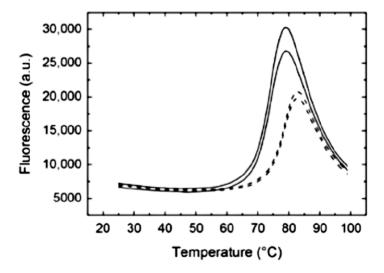


Figura 18. Ejemplo de un desplegamiento térmico de una proteína con sonda ANS

Este ensayo de DSF se utiliza, como ya se ha comentado, en las primeras fases del descubrimiento de fármacos y en la mejora de compuestos candidato en la industria farmacéutica. Además, desempeña un papel importante en la genómica estructural y en esfuerzos de ingeniería de proteínas de alto rendimiento, como la selección de variantes de proteínas estables, el control de calidad de la producción de proteínas y la determinación de condiciones de trabajo para estudios de difracción de Rayos X (Figura 19). También se utiliza en la investigación para descubrir la función de proteínas al identificar ligandos y efectores, entre otros usos.

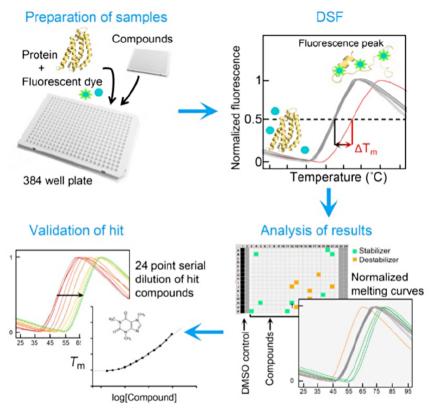


Figura 19. Fluorimetría diferencial de barrido en el cribado y validación de chaperonas farmacológicas para proteínas solubles y de membrana. Extraída del libro *Protein Homeostasis Diseases Mechanisms and Novel Therapies 2020, Pages 329-341.*

El ensayo de DSF ofrece varias ventajas destacadas: (1) es altamente susceptible a la miniaturización, lo que lo hace eficiente en términos de recursos; (2) es una técnica rápida; (3) permite un bajo consumo de muestra; (4) no necesita etiquetar la proteína de interés; (5) es aplicable a una amplia gama de proteínas, ya sean citoplasmáticas o de membrana; (6) no requiere equipos costosos; (7) el análisis de datos es sencillo; y (8) es capaz de abarcar un amplio intervalo de afinidades, desde constantes de disociación milimolar hasta femtomolar.

Sin embargo, es importante considerar algunas características: (1) las sondas fluorescentes pueden no proporcionar información útil para algunas proteínas, en el caso de que no muestren cambios en la intensidad de fluorescencia durante el desplegamiento; (2) en ciertas proteínas, las sondas fluorescentes pueden mostrar una mayor afinidad por el estado nativo, lo que resulta en una curva de desplegamiento descendente; (3) si no hay unión preferencial del compuesto, no se observará un cambio en la temperatura de mitad de transición (T_m) ; (4) existen desafíos comunes relacionados con mediciones de fluorescencia, como efectos de

filtro interno dependientes del compuesto y extinción dinámica/estática; (5) bibliotecas químicas sesgadas pueden llevar a falsos positivos debido a la formación de agregados y micelas; (6) algunos fluoróforos extrínsecos pueden afectar negativamente la estabilidad de la proteína de interés; (7) las proteínas intrínsecamente desestructuradas (IDPs) pueden ser difíciles de analizar debido a su falta de estructura definida (como veremos más adelante); y (8) es complicado establecer una clasificación precisa de la afinidad según los cambios en la T_m.

El cambio en la T_m inducido por un ligando está influenciado por múltiples factores, incluyendo la afinidad de unión del ligando, la entalpía de desplegamiento de la proteína, la entalpía y capacidad calorífica de unión del ligando, y la concentración del ligando. Esto hace que sea difícil predecir con precisión la afinidad de unión a baja temperatura basándose únicamente en el cambio en la T_m inducido por el ligando. En resumen, el uso de DSF en HTS está pensado principalmente para distinguir entre ligandos y no ligandos en lugar de clasificar ligandos en función de su afinidad.

4. PROTEÍNAS INTRÍNSECAMENTE DESORDENADAS (IDPS)

4.1. IDPs: ¿Qué son y qué función tienen?

Un estado funcional de una proteína generalmente se define por una conformación plegada que tiene una estructura tridimensional bien definida. Sin embargo, hay evidencias que sugieren que, incluso bajo condiciones fisiológicas, hay muchas proteínas que carecen de estructuras tridimensionales estables y ordenadas en su totalidad, o presentan regiones que carecen de una estructura tridimensional definida (Figura 20). Estas proteínas se conocen como proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs) y los segmentos desordenados se conocen como regiones intrínsecamente desordenadas (IDPRs) [Uversky, V.N. et al. 2013; Uversky, V.N. et al. 2019]. A diferencia de las proteínas completamente plegadas, las IDPs tienen conformaciones altamente flexibles que carecen de estructuras secundarias y terciarias estables.

Estas proteínas generalmente contienen una alta proporción de residuos de aminoácidos polares y cargados como Lys, Arg, His, Gln, Ser, Glu, y una escasez de cadenas laterales hidrofóbicas y aromáticas que proporcionan suficiente hidrofobicidad a las proteínas y estabilizan el núcleo interno [Uversky, V.N. et al. 2000]. También contienen residuos con baja propensión a estar estructurados, como Pro y Gly [Campen, A. et al. 2008].

Un análisis computacional detallado muestra que a medida que aumenta la complejidad en un organismo, también aumenta el grado de desorden intrínseco [Jorda, J. et al. 2010]. Las proteínas eucariotas poseen alrededor del 52-67% de IDPRs largas, mientras que los organismos procariotas como archaea y bacterias contienen solo entre el 16% y el 45% de proteínas con tales IDPRs largas.

La abundancia natural de IDPs e IDPRs en organismos superiores se atribuye a la necesidad de diversas funciones de una proteína particular en un sistema complejo. Las IDPs/IDPRs son abundantes en cantidad y tienen funciones biológicas cruciales, como el reconocimiento molecular, el ensamblaje molecular y las interacciones reguladoras y de señalización [Dyson, H.J. et al. 2005].

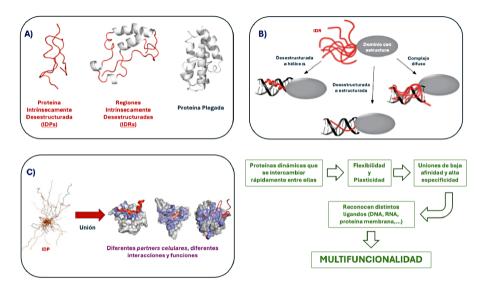


Figura 20. Representación de IDPs y sus características: (A) Las proteínas pueden adoptar diversas conformaciones, desde totalmente desordenadas a totalmente estructuradas o mixtas estructuradas/desordenadas. Las proteínas intrínsecamente desordenadas (IDP, izquierda) no adoptan ninguna estructura globular. Las proteínas mixtas contienen regiones intrínsecamente desordenadas (IDR, centro) en los extremos N o C o entre regiones estructuradas. Las proteínas totalmente estructuradas (derecha) adoptan un pliegue globular único, sin IDR. Las regiones estructuradas aparecen en gris y las intrínsecamente desordenadas en rojo. (B) Se muestra un dominio globular (gris) flanqueado por un IDR (rojo). Los IDR muestran un amplio conjunto conformacional en el estado no unido, con un rápido intercambio entre estados (representado por una imagen borrosa). Tras la unión, se ha observado que los IDR adoptan una estructura secundaria, como una hélice alfa (izquierda), adoptan una conformación estable sin plegarse en una estructura secundaria (centro) o mantienen una dinámica conformacional sustancial incluso en el estado unido, lo que se conoce como complejo difuso (derecha). (C) Las IDPs son capaces de realizar más de una función, gracias a su flexibilidad. Una IDPs puede unir un ligando con una conformación dada y realizar una función específica (1); sin embargo, la misma IDPs puede interaccionar con el mismo ligando (o con otro distinto) a través de una conformación diferente y, por tanto, realizar una función completamente distinta (2). Las IDPs, por lo tanto, son capaces de realizar más de una función, por lo que se constituyen como un grupo de proteínas multifuncionales. Figuras adaptadas de https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102070 y https:// doi.org/10.1016/j.bpc.2022.106769.

Las IDPs frecuentemente interactúan con diversas proteínas asociadas, y se pliegan y forman diferentes tipos de estructuras monoméricas, oligoméricas y multiméricas, y realizan diversas funciones [Galea, C.A. et al. 2008]. La unión de IDPs/IDPRs con sus dianas generalmente tiene una especificidad bastante alta y una afinidad baja, lo que les permite asociarse rápidamente e iniciar un proceso de señalización y, al mismo tiempo, disociarse fácilmente una vez completada la tarea [Wright, P.E. et al. 2009]. Es por eso que las proteínas involucradas en vías de señali-

zación y funciones regulatorias, como la transcripción, son ricas en IDPRs [*Uversky*, V.V. et al. 2005].

Como las IDPs/IDPRs funcionan como reguladores generales de muchos procesos celulares, también están fuertemente influenciadas por diversos factores ambientales, como la temperatura, el pH, el potencial redox, las interacciones con ligandos específicos, proteínas, membranas, ácidos nucleicos y diferentes modificaciones post-traduccionales [*Jain, M.K. et al. 2018*].

Sin embargo, cuando se producen algunas alteraciones en los factores ambientales de control, las IDPs/IDPRs pueden tener una expresión incorrecta, modificarse de manera inadecuada o desregularse. En esta situación, las IDPs/IDPRs son susceptibles de un mal plegamiento, agregación, transporte, modificación, y también de que se involucren en interacciones no deseadas, lo que conduce al desarrollo de diversas condiciones patológicas. De hecho, la mayoría de las IDPs y proteínas que contienen IDPRs largas están asociadas con el cáncer [Iakoucheva, L.M. et al. 2002], enfermedades cardiovasculares [Cheng, Y. et al. 2006], neurodegeneración [Uversky, V.V. et al. 2005], diabetes [Du, Z. et al. 2017], amiloidosis [Uversky, V.V. et al. 2008], trastornos metabólicos [Midic, V.V. et al. 2009] y enfermedades genéticas [Uversky, V.V. et al. 2008] (Figura 21). Uversky y colaboradores investigaron a fondo la asociación integral del mal funcionamiento de las IDPs/IDPRs en enfermedades humanas e introdujeron el concepto de «desorden en desórdenes» (o concepto D2) [Uversky, V.V. et al. 2008]. Se encontró que las proteínas involucradas en las enfermedades mencionadas anteriormente contienen al menos 30 residuos consecutivos en un estado desordenado, y alteraciones en esas regiones han dado lugar a estos diferentes tipos de enfermedades [Uversky, V.V. et al. 2008].

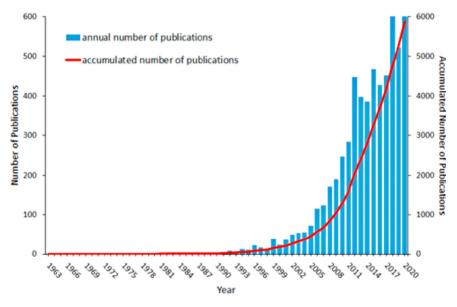


Figura 21. Número de publicaciones relacionadas con IDPs desde 1963 hasta 2020. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00031

4.2. Importancia de las IDPs como potenciales dianas terapéuticas

Debido a las amplias implicaciones de las IDPs/IDPRs en enfermedades humanas, son dianas muy prometedoras para el tratamiento y la terapia. Dada su función central en numerosos procesos celulares, la disponibilidad de IDPs en las células está controlada en múltiples niveles, como la regulación de la transcripción y eliminación del ARN mensajero, la traducción de proteínas y la degradación de proteínas [Babu, M.M. et al. 2011]. Alterar la disponibilidad de IDPs puede producir resultados no deseados, como una menor fidelidad de señalización y la adquisición de funciones aberrantes potencialmente dañinas [Babu, M.M. et al. 2011].

Aunque el genoma humano contiene un gran número de posibles dianas terapéuticos, solo alrededor del 2% de las proteínas humanas se sabe que interactúan con fármacos aprobados [*Lazo, J.S. et al. 2016*]. Muchos de las dianas restantes, especialmente las IDPs como c-Myc, p53 y Ras, se han clasificado como «difíciles de abordar» o incluso se consideraron "inabordables" [*Dang, C.V. et al. 2017*].

Dado que las IDPs/IDPRs son bastante diferentes de las proteínas globulares bien estructuradas, el mecanismo de identificación de compuestos frente a ellas también es diferente al de las proteínas plegadas. Las proteínas y segmentos proteicos desordenados carecen de una cavidad de unión bien definida y tienen múltiples proteínas asociadas, por lo que apuntar directamente con uno o dos fármacos/inhibidores o en uno o dos sitios potencialmente activos puede que no sea efectivo.

La mayoría de las estrategias exitosas que han facilitado la recuperación de la función de proteínas desordenadas asociadas con enfermedades han evitado dirigirse directamente a las IDPs. Por ejemplo, se han desarrollado estrategias dirigidas a las enzimas que modifican las proteínas desordenadas para recuperar su disponibilidad normal, a los dominios ordenados de las proteínas desordenadas y a las proteínas ordenadas que interaccionan con la IDP en cuestión, como en el caso de los inhibidores de la interacción p53-MDM2 que se unen a MDM2 [Vassilev, L.T. et al. 2004; Shangary, S. et al. 2008; Chang, Y.S. et al. 2013].

La naturaleza dinámica y heterogénea de las IDPs/IDPRs no unidas a otras proteínas es el principal desafío para la caracterización completa de las IDPs/IDPRs. Por lo tanto, esto ha demostrado ser un gran obstáculo para establecer una relación fiable entre secuencia, estructura, función y enfermedad de las IDPs [Yan, E.Y. et al. 2016]. La falta de una comprensión clara de las bases moleculares de la función de las IDPs y de su desregulación en enfermedades ha creado una ambigüedad significativa en la capacidad de medicación para la mayoría de las IDPs/IDPRs [Hu, G. et al. 2016]. En tales casos, un profundo entendimiento de las IDPs puede permitir un diseño de medicamentos basado en la estructura y en sus características clave. Algunas de estas estrategias consisten en dirigirse a proteínas centrales que son principalmente IDPs/IDPRs en las redes de interacción proteína-proteína, o dirigirse a factores de transcripción que controlan muchas proteínas simultáneamente, o dirigirse a procesos de autoasociación de proteínas [Uversky, V.N. et al 2008].

Un enfoque menos explorado implica el diseño de ligandos que se unan directamente a las IDPs, cambien su conjunto conformacional y compitan con las moléculas interaccionantes endógenas. Esta estrategia también puede dirigirse a IDPs mal plegadas, que interactúan con socios indeseados o se agregan. Aunque se sugiere que las IDPs tienen una "drogabilidad" similar a las proteínas ordenadas, a

menudo contienen más cavidades de unión debido a la naturaleza de los procesos de plegamiento y unión acoplados, y las IDPs suelen tener una afinidad de unión más débil en comparación con las proteínas estructuradas [Zhang, Y. et al. 2015]. Estas observaciones sugieren que los ligandos de moléculas pequeñas podrían diseñarse para unirse específicamente a las IDPs y alterar las interacciones endógenas. El avance de estas estrategias podría permitir convertir el gran número de IDPs en dianas farmacéuticas y allanar el camino a interesantes descubrimientos terapéuticos.

Anteriormente se ha mencionado el HTS como método de identificación de potenciales ligandos de dianas terapéuticas. Las IDPs no presentan características especiales con respecto a los ensayos HTS basados en la unión de proteínas o la actividad de proteínas. Sin embargo, en lo que respecta a un ensayo HTS basado en la estabilidad, debido a su falta de estructura estable, en principio, las IDPs parecen estar en desventaja en comparación con las proteínas bien plegadas. Sin embargo, si el ligando se une a la proteína y establece una interfaz de unión proteína-ligando que, de alguna manera, además de las moléculas de agua, excluye preferentemente las moléculas de la sonda fluorescente (similar a un proceso de replegamiento al unirse), el TSA reflejará el desplegamiento inducido por la temperatura del complejo, que se observará experimentalmente como una Tm aparente o un perfil de desplegamiento distorsionado (en comparación con la proteína diana libre de compuesto).

5. IDENTIFICACIÓN DE POTENCIALES FÁRMACOS EN UN LABORATO-RIO DE INVESTIGACIÓN ACADÉMICO

Utilizaré un ejemplo concreto de nuestro grupo de investigación para mostrar una estrategia que puede ser utilizada en el mundo académico para identificar moléculas bioactivas de interés como potenciales fármacos.

5.1. ETAPA 1: Identificar un problema de salud no resuelto

El primer paso en el desarrollo de un nuevo medicamento es identificar problemas de salud no resueltos como nuevas enfermedades, enfermedades desatendidas, tratamientos que pierden eficacia o tratamientos ineficaces para un grupo de población. Esto significa que hay pacientes que no pueden recibir tratamientos efectivos o no tienen acceso a terapias adecuadas. Abordar estas necesidades es esencial para mejorar su atención médica y calidad de vida. A menudo, encontrar soluciones para estos problemas requiere enfoques innovadores y creativos. Esto impulsa la investigación científica y puede llevar a importantes avances en la comprensión de las enfermedades y el desarrollo de nuevos tratamientos.

Este es el caso del adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC: Pancreatic Ductal Adenocarcinoma). El PDAC, aunque sólo representa el 2,7% de todos los cánceres en España (5,5 casos por 100000 habitantes según la SEOM (Sociedad Española de Oncología Médica), constituye la cuarta causa de muerte por cáncer en los países occidentales con una supervivencia media de 3-6 meses tras el diagnóstico y una tasa de supervivencia a los 5 años del 1-4%, lo que da una idea clara de su agresividad

(Figura 22). En los Estados Unidos, según el Instituto Nacional del Cáncer, cada año son diagnosticados 46.420 nuevos casos y 39.590 personas morirán a causa de la enfermedad (www.cancer.net). La supervivencia de este tipo de cáncer no supera el 10% a los cinco años en ninguno de los países europeos en los que hay registro de casos dentro el proyecto SURVMARK2 2018 (Cancer Survival in High-Income Countries). Así pues, el cáncer de páncreas es un problema de salud no resuelto a pesar de los avances en la comprensión de sus causas y factores de riesgo, así como en el diagnóstico y tratamiento de otras formas de cáncer y sigue siendo un desafío en el ámbito de la salud por varias razones: ausencia de síntomas iniciales y detección tardía de la enfermedad (estadios avanzados), falta de biomarcadores efectivos que puedan implementarse de forma rutinaria en clínica, agresividad tumoral con alta capacidad de metastatizar a órganos cercanos, abordajes quirúrgicos complejos y ausencia de tratamientos específicos, así como factores de riesgo desconocidos que impiden la implantación de programas de cribado poblacional (que resultan altamente efectivos en otras patologías como cáncer de mama o colon).

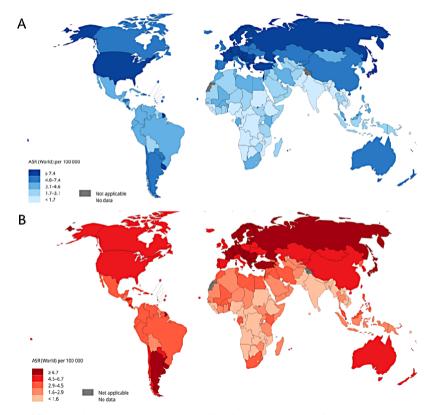


Figura 22. Tasas de incidencia (A) y mortalidad (B) por cáncer de páncreas ajustadas por edad para países en cinco continentes según las últimas cifras de la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer de la OMS. Fuente de datos: Globocan 2020. Producción del gráfico: Observatorio Global del Cáncer. Agencia Institucional de Investigación sobre el Cáncer (Organización Mundial de la Salud).

La tasa de supervivencia a cinco años ha aumentado del 5,26% en 2000 al 10% en 2021 gracias a terapias con múltiples agentes, a pesar de que actualmente no existen pruebas de diagnóstico efectivas y la mayoría de los pacientes con cáncer de páncreas presentan síntomas no específicos en etapas avanzadas de la enfermedad, donde la cirugía curativa ya no es posible [Conroy, T. et al. 2018]. Cuando se detecta, el 50% de los pacientes tienen enfermedad metastásica, el 10-15% tienen enfermedad localizada susceptible de cirugía y el 30-35% de las personas afectadas tienen enfermedad localmente avanzada que en su mayoría no se puede extirpar quirúrgicamente debido al alto grado de afectación tumor-vascular [Siegel, R.L. et al. 2021]. El problema con el diagnóstico tardío radica en la alta tasa de metástasis en el PDAC: el hígado (90%), los ganglios linfáticos (25%), los pulmones (25%), el peritoneo (20%) y los huesos (10-15%) son sitios comunes de metástasis en este tipo de cáncer [Conroy, T. et al. 2011].

En cuanto a los factores de riesgo, el tabaco es el factor de estilo de vida con una asociación más fuerte con el PDAC, seguido de un consumo excesivo de alcohol [Bosetti, C. et al. 2012]. Además, se ha observado que la pancreatitis crónica se asocia con un aumento en el riesgo (13 veces mayor) de desarrollar PDAC, y la obesidad también se ha relacionado con un mayor riesgo de enfermedad. Dado el aumento en el consumo de dietas procesadas, que contienen alimentos proinflamatorios, la incidencia de PDAC en personas menores de 30 años también está aumentando [Sung, H. et al. 2019]. Por otro lado, del 3,8% al 9,7% de los pacientes portan variantes genéticas en su línea germinal que los hacen más susceptibles a la enfermedad. En la mayoría de los casos, estas variantes ocurren en genes de reparación del daño del ADN. Entre las variantes más comunes se encuentran los genes Breast Cancer Type 2 (BRCA2), Breast Cancer Type 1 (BRCA1) y Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) [Hu, C. et al. 2018].

Un conjunto complejo de alteraciones genéticas en varias etapas está involucrado en la fisiopatología del PDAC. Existe un estado precanceroso, en el cual existen neoplasias intraepiteliales pancreáticas (PanIN), que son lesiones precancerosas, de las cuales una pequeña fracción puede progresar a un alto grado de displasia y PDAC (Figura 23). En este estado precanceroso mencionado anteriormente, PanIN adquiere una serie de defectos genéticos acumulativos, lo que resulta en la iniciación y el mantenimiento del PDAC [Terhune, P.G. et al. 1998].

En cuanto a los síntomas del PDAC, a menudo son inespecíficos, lo que hace que el diagnóstico en la mayoría de los casos sea tardío. Entre ellos se encuentran una disminución del apetito, indigestión y cambios en los hábitos intestinales. En la mayoría de los casos, los tumores de PDAC (70%) comienzan en la cabeza del páncreas con obstrucción biliar, lo que produce orina oscura, ictericia, pérdida de peso, fatiga, pérdida de apetito e insuficiencia pancreática exocrina [Walter, F.M. et al. 2016].

En cuanto al tratamiento, el cáncer de páncreas generalmente se trata con cirugía, quimioterapia y radioterapia, pero rara vez se cura. Como se mencionó anteriormente, menos del 20% de los pacientes con PDAC pueden optar por la extirpación quirúrgica de los tumores porque generalmente la detección se produce en una etapa avanzada o metastásica [Wang, S. et al. 2021]. Esto hace que la quimioterapia sea el principal tratamiento para el PDAC. Los principales agentes quimioterapéuticos son aquellos basados en agentes que dañan el ADN, que afectan directamente a la síntesis y reparación del ADN, y también se emplean antimetabolitos como gemcitabina y fluorouracilo. Si hay metástasis, por ejemplo, el PDAC está en una etapa avanzada y los tratamientos citotóxicos con múltiples agentes pueden mejorar las tasas de supervivencia [REF]. Las opciones de quimioterapia de primera línea actuales incluyen gemcitabina sola o combinada con paclitaxel unido a albúmina (nab-Paclitaxel), o FOLFIRINOX modificado (que es una combinación de 5-fluorouracilo, oxaliplatino, irinotecan, leucovorina) [*Conroy, T. et al. 2018*].

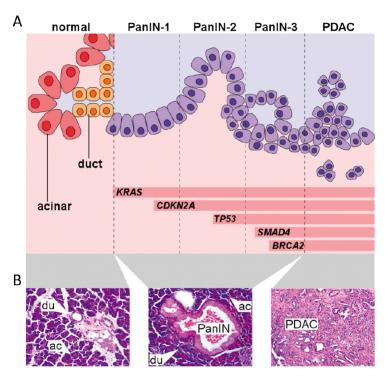


Figure 23. Representación de la progresión del cáncer de páncreas en humanos y ratones. (A) Representación esquemática de células normales del páncreas exocrino, indicando de izquierda a derecha la formación de PanIN cada vez más displásicos y el desarrollo del PDAC. La progresión de PanIN-PDAC está relacionada con una acumulación creciente de lesiones genéticas, que involucran la activación de KRAS y la pérdida de genes supresores de tumores, incluyendo CDKN2A, TP53, SMAD4 y BRCA2. (B) Secciones teñidas con H&E (hematoxilina y eosina) del páncreas de ratón de los siguientes genotipos: izquierda (WT), medio (KrasLSL; Pdx1-Cre), derecha (KrasLSL; Pdx1-Cre; p53+/-), ilustrando células acinares (ac) y ductales (du) normales, así como una lesión PanIN en etapa temprana y un PDAC avanzado. https://doi.org/10.1177/0192623313508250.

Dado que actualmente no existe un tratamiento completamente eficaz para el PDAC, la búsqueda de nuevos y más efectivos dianas terapéuticas y medicamentos continúa activamente.

5.2. ETAPA 2: Identificar una diana terapéutica de interés para abordar la patología que se pretende resolver

NUPR1 como diana terapéutica

La proteína NUPR1 (Nuclear Protein 1), también conocida como p8 (por su masa molecular de 8 kDa) o COM1 (Candidato a Metástasis 1), fue identificada en 1997 por Mallo y colaboradores con un estudio transcriptómico [Mallo, G. et al., 1997] cuando aislaron por primera vez su gen, mientras estudiaban la respuesta al estrés en el páncreas al inducir pancreatitis aguda en ratas, la enfermedad más frecuente del páncreas exocrino (Figura 24). Cuando las células de un organismo se enfrentan al estrés debido a una agresión o daño, activan un programa de emergencia que altera la expresión de genes y proteínas. Este programa ayuda a las células a sobrevivir en condiciones de estrés o ambientes hostiles. En el caso de la pancreatitis aguda, esta respuesta es rápida y eficaz, llevando a la autolimitación de la enfermedad. El programa de emergencia sobreexpresa proteínas que previenen la progresión de la pancreatitis y también promueven la regeneración y supervivencia de la glándula pancreática, por lo que resultó de interés estudiar este "programa de defensa" a nivel molecular en las células pancreáticas.

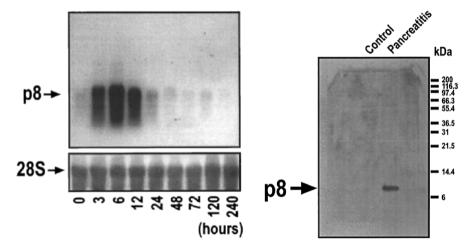


Figura 24: Imagen extraída de la publicación *Mallo GV et al (https://doi.org/10.1074/jbc.272.51.32360).* Izquierda: Expresión de RNA mensajero de p8 en páncreas en función de las horas posteriores a la inducción de un proceso de pancreatitis en rata (utilizando ceruleina inyectada intraperitonealmente). Derecha: Confirmación mediante *WesternBlot* de la presencia de la proteína (utilizando un anticuerpo policional que reconocía la secuencia de aminoácidos 61-80 de p8 en rata).

Una vez identificado este ARNm se utilizó este cADN del gen p8 de rata para hacer un cribado de una librería de cADN de páncreas humano, proporcionando un único clon positivo, que correspondía al equivalente gen p8 en humano, con una homología del 74% con el gen de rata [*Vasseur, S. et al., 1999*] (Figura 25).

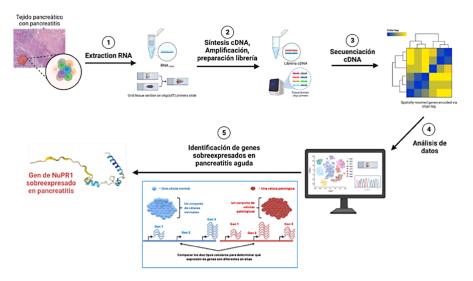


Figura 25: Esquema del proceso en el que se identificó del gen p8 que codifica para la proteína de estrés celular NUPR1 en tejido pancreático con pancreatitis aguda (*Creado con BioRender.com*)

Estudios posteriores confirmaron que el gen p8 humano es un gen de estrés celular, cuya expresión se incrementa rápidamente durante la pancreatitis aguda. Codifica la proteína NUPR1, que ayuda al páncreas a protegerse y regenerarse. Además del páncreas, la proteína NUPR1 se expresa en varios tejidos, mostrando diferentes niveles de expresión en diferentes órganos. Sin embargo, no se ha detectado mRNA de NUPR1 en sangre periférica ni leucocitos.

Otro gen, denominado COM1 (Candidato a Metastasis-1) se encontró muy sobreexpresado en el cáncer de mama y su secuencia resultó idéntica a la secuencia del gen p8 humano [Ree, A.H. et al., 2000]. En otros tipos de tumores también se comprobó su expresión alterada (aumentada o disminuida) respecto a sus niveles en tejido sano, como los localizados en la glándula pituitaria, páncreas, próstata, tiroides o glioblastomas [Goruppi, S. et al. 2010], el caso concreto de adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC), se ha observado una sobreexpresión de la proteína NUPR1 tanto en el tejido canceroso del páncreas como en las líneas celulares de cáncer de páncreas, mientras que sus niveles son normales en el páncreas sano. Las células tumorales, incluyendo las pancreáticas, deben enfrentarse a condiciones extremadamente difíciles, como la hipoxia, falta de nutrientes y la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) debido al metabolismo alterado. Nuestro grupo de investigación participó en un estudio donde se observó que la proteína NUPR1 desempeña un papel clave en el mecanismo de defensa celular ante el estrés, lo que la convierte en una candidata prometedora para el desarrollo de nuevas drogas en el tratamiento de este tipo de tumores [Santofimia-Castaño, P. et al. 2019].

Así pues, entre las funciones de la proteína NUPR1, se ha relacionado con apoptosis celular [Malicet, C. et al. 2006], senescencia [Hamidi, T. et al. 2012], adhe-

sión y tumorigénesis [Sandi, M.K. et al. 2011], metástasis [Cano, C.E. et al. 2010] y también con funciones biológicas no tumorales [Path, G. et al. 2004]. La proteína NUPR1 podría considerarse una buena candidata como diana terapéutica frente a PDAC.

5.3. ETAPA 3: Caracterización de la diana terapéutica

Estructura y función de NUPR1

Conocer las características de la diana proteica sobre la que quiere comenzar a trabajar es fundamental.

En cuanto a su estructura, la proteína NUPR1 es un polipéptido de 82 aminoácidos, de carácter básico, y una masa molecular teórica de 8,8 kDa [Mallo et al., 1997] cuya secuencia de aminoácidos es: MATFPPATSAPQQPPGPEDEDSSLDESDLYS-LAHSYLGGGGRKGRTKREAAANTNRPSPGGHERKLVTKLQNSERKKRGARR

La representación de su estructura puede verse en la Figura 26:

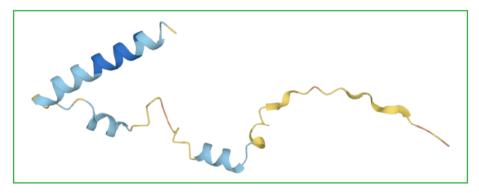


Figura 26: Imagen extraída de la web: https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/O60356. En ella se representa a la proteína NUPR1 de 82 aminoácidos (código UniProt 060356) en la que se aprecia su condición de proteína intrínsecamente desestructurada o IDP

NuPR1 tiene en su extremo COOH-terminal una secuencia de residuos cargados positivamente, típico de las señales de localización nuclear en humanos (NLS: KLVTKLQNSERKKRGA), lo que sugiere que NUPR1 funciona en el núcleo de la célula. Estudios de inmunofluorescencia en células transfectadas con el gen p8 confirmaron que la proteína NUPR1 se distribuye por toda la célula, núcleo o citoplasma, dependiendo su localización subcelular de las condiciones de crecimiento en la célula [Sandi, M.K. et al. 2011].

También se observó en el extremo N-terminal de la proteína la presencia de una región PEST (Regiones ricas en Pro/Glu/Ser/Thr), que se asocian a proteínas de vida media corta, lo que sugiere una regulación de los niveles de la proteína NUPR1 por el sistema ubiquitina/proteasoma [Goruppi, S. et al. 2004].

Los datos obtenidos en la predicción de su estructura secundaria muestran que NUPR1 tiene un motivo hélice-bucle-hélice pero que permanece mayoritariamente

desplegada, perteneciendo por tanto al grupo de las proteínas intrínsecamente desestructuradas o IDPs [Santofimia-Castaño, P. et al. 2017]. Esta estructura es similar a la de otras proteínas que actúan como proteínas de unión al ADN, por lo que la proteína NUPR1 podría actuar como factor de transcripción uniéndose al ADN. Esta hipótesis está apoyada por la capacidad de la proteína de ser fosforilada/desfosforilada, y que podría estar relacionada con la translocación de la proteína al núcleo y su unión al ADN [Mallo et al., 1997] [Vasseur et al., 1999].

Estudios in silico y de ingeniería de proteínas mostraron que hay dos regiones críticas (en la que se involucran estos tres residuos: Tyr 30, Tyr 36 y Thr 68) que resultan ser las más hidrofóbicas de la secuencia de la proteína que interaccionan con muchos ligandos naturales (ADN, protimosina-α...). Cabe destacar que, en todas las interacciones, NUPR1 permanece desordenada tras la formación del complejo [Aguado-Llera, D. et al. 2013].

Otra característica de NuPR1 es que se une a ADN independientemente de la secuencia y que es sustrato para la quinasa A [*Encinar, J.A. et al. 2001*] y que, además de ser fosforilada, NUPR1 puede ser acetilada y ubiquitinada, cualidades que, junto con su localización celular apoyan aún más el papel de NUPR1 en la regulación transcripcional de muchos de los genes implicados en importantes procesos celulares [*Goruppi, S., et al. 2007*].

Los análisis de resonancia magnética nuclear (NMR) y dicroísmo circular (CD) de la proteína NUPR1, indican la ausencia de una estructura secundaria estable de la misma en disolución. La forma del espectro obtenido por estas técnicas corresponde a una conformación *random coil*, es decir, una cadena al azar o una cadena aleatoria sin estructura estable. Se trata por lo tanto de una proteína que se encuentra parcialmente desplegada en disolución.

Todo lo explicado anteriormente, relativo a su estructura y función, nos indica que NUPR1 es una proteína pequeña intrínsecamente desestructurada (IDP) implicada en numerosas rutas celulares relacionados con el cáncer, por lo que puede ser considerada una buena diana terapéutica para la investigación de nuevos fármacos antitumorales.

El descubrimiento de pequeñas moléculas que interaccionen con NUPR1 impidiendo la unión a sus ligandos biológicos, conseguiría bloquear muchas de las funciones protumorales de la proteína en la célula. Por ejemplo, una pequeña molécula que evitara la formación del complejo NUPR1/Protimosina α aumentaría las tasas de apoptosis de las células tumorales pancreáticas; o si esta molécula inhibiera la formación del complejo NUPR1/MSL1, se modularía la reparación del ADN de esas células tumorales.

Aunque la búsqueda de estas moléculas que bloqueen la interacción proteínaproteína de una proteína IDP es un reto considerable, la definición de una estrategia válida para llevarla a cabo abriría un gran campo en el desarrollo de fármacos antineoplásicos, ya que gran parte de las proteínas implicadas en cáncer son proteínas intrínsecamente desestructuradas (IDPs).

5.4. ETAPA 4: Diseño y puesta en marcha de la estrategia de identificación de compuestos bioactivos frente a dicha diana

5.4.1. Hipótesis de trabajo

El punto de partida de nuestro estudio fueron todos los estudios reportados previamente indicaban que NUPR1 era una IDP implicada en numerosas rutas celulares, relacionadas muchas de ellas con desarrollo de cáncer, por lo que podría ser considerada una buena diana terapéutica para la investigación de nuevos fármacos antitumorales y, en concreto, frente a cáncer de páncreas.

Nuestra hipótesis de trabajo se puede resumir en el siguiente esquema, en el que se muestra como el objetivo principal que nos planteamos fue la identificación de pequeñas moléculas con potencial efecto terapéutico para el tratamiento del adenocarcinoma ductal de páncreas, mediado a través de su interacción con la proteína intrínsecamente desordenada NUPR1 (Figura 27).

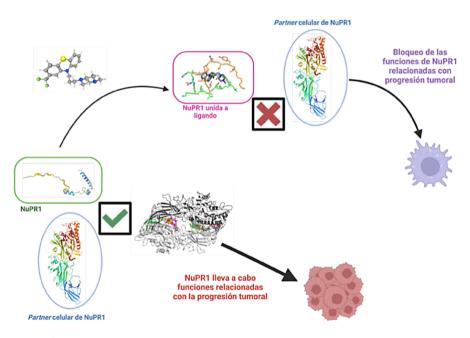


Figura 27: Imagen que describe la hipótesis de partida del trabajo (Creado con BioRender.com)

5.4.2. Esquema general de la estrategia de trabajo

Como se mencionó previamente, el diseño de medicamentos dirigidos específicamente a las IDPs plantea desafíos significativos debido a su naturaleza estructural dinámica, lo que hace que los métodos tradicionales de diseño de medicamentos basados en la estructura no puedan aplicarse en IDPs [Wright, P.E. et al. 2015]. Por lo tanto, el desarrollo de inhibidores para NUPR1 ha resultado ser particularmente desafiante debido a las características únicas de esta proteína.

Durante años (desde 2015), en nuestro grupo de investigación, en colaboración con investigadores de diferentes grupos de investigación nacionales (Dr. Neira en la Universidad de Alicante) e internacionales (Dr. Iovanna del INSERM de Marsella en Francia y Dr. Rizutti del CNR en Calabria, Italia), hemos llevado a cabo numerosos estudios para comprender de manera más integral el papel de NUPR1, así como para desarrollar medicamentos contra esta proteína, desde investigaciones básicas basadas en técnicas biofísicas, bioquímicas, bioinformáticas y biológicas, hasta la posterior evaluación de estos compuestos en sistemas biológicos más complejos, como cultivos celulares y modelos animales de cáncer de páncreas.

Nuestros estudios en esta área han sacado a la luz las complejidades asociadas con el abordaje basado en NUPR1 y el diseño de inhibidores efectivos, con el fin de bloquear la acción de NUPR1 y, por lo tanto, reducir el riesgo de progresión de cáncer de páncreas.

En este punto es importante enfatizar que todos los esfuerzos y avances que se detallarán a continuación valen la pena sin lugar a dudas porque: en primer lugar, el cáncer de páncreas es un cáncer con un alto nivel de estrés de diferentes orígenes; en segundo lugar, NUPR1 es una proteína de estrés y una proteína central involucrada en varias vías de señalización clave; y en tercer lugar, NUPR1 está específicamente sobreexpresada en el PDAC en comparación con su nula expresión en los tejidos normales, lo que convierte a NUPR1 en una diana terapéutica potencial para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer en el PDAC.

Nos hemos centrado en adoptar un «bottom-up approach» (enfoque desde abajo hacia arriba) en el diseño de medicamentos contra las IDPs, utilizando concretamente NUPR1 como prueba de concepto (Figura 28). Este enfoque involucró un esfuerzo multidisciplinario, integrando técnicas in silico, in vitro, in cellulo e in vivo que estaban disponibles en ese momento.

A diferencia de otros enfoques para diseñar medicamentos dirigidos a IDPs, nuestro método no se basó en una determinación experimental completa del conjunto de conformaciones de la IDP. En cambio, nos enfocamos en las características específicas de los compuestos seleccionados. Luego, estos compuestos fueron sometidos a modificaciones químicas y estudiados a través de métodos complementarios, tanto in vitro como in vivo, para obtener una comprensión integral de su modo de acción. A través de ensayos in silico, utilizamos herramientas computacionales para analizar las interacciones entre los compuestos y NUPR1. Estas simulaciones proporcionaron información valiosa sobre los mecanismos de unión y los posibles sitios de unión. En las técnicas in vitro, realizamos experimentos para caracterizar el mecanismo de acción de los compuestos y sus efectos sobre NUPR1. Esto incluyó diferentes ensayos y mediciones para evaluar sus afinidades de unión, propiedades termodinámicas y cambios estructurales inducidos en NUPR1. Además, utilizamos técnicas in cellulo, utilizando modelos basados en células, para examinar el efecto de los compuestos en los procesos celulares que involucran a NUPR1. Esto nos permitió observar sus efectos dentro de un contexto celular, estudiando su comportamiento y posibles efectos secundarios. Además, en los ensayos in vivo, evaluamos la eficacia y seguridad de los compuestos utilizando modelos animales. Al administrar compuestos y monitorizar sus efectos in vivo, obtuvimos información sobre sus propiedades farmacológicas generales, incluyendo

la biodisponibilidad, distribución, metabolismo y toxicidad. Por lo tanto, al combinar los datos obtenidos de todas estas técnicas, pudimos obtener una comprensión integral del mecanismo de acción de los compuestos contra NUPR1. Este enfoque ascendente nos permitió diseñar de manera efectiva medicamentos dirigidos a IDPs, como NUPR1.

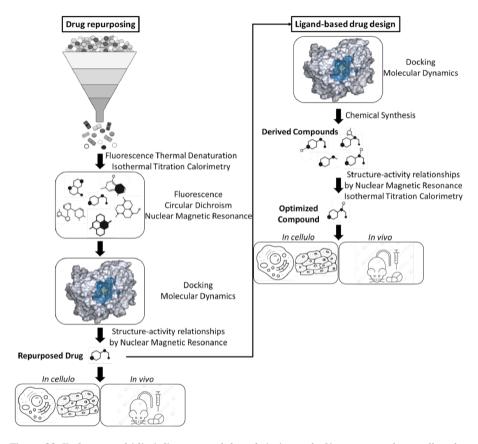


Figure 28. Enfoque multidisciplinar para el descubrimiento de fármacos que hemos llevado a cabo en nuestro grupo.

5.4.3. Resultados en las diferentes fases de investigación realizadas en el laboratorio

Nuestro enfoque se puede resumir en varios pasos:

1. Selección de Compuestos: Iniciamos nuestra investigación seleccionando una biblioteca de 1,120 medicamentos aprobados por la FDA para identificar posibles ligandos para NUPR1. Utilizamos la técnica de TSA mediante DSF mencionada anteriormente, que reveló compuestos que inducían cambios significativos en las curvas térmicas.

- 2. Caracterización de Compuestos: Los compuestos seleccionados del proceso de selección fueron sometidos a una evaluación rigurosa utilizando métodos complementarios. Determinamos sus afinidades de unión mediante calorimetría de titulación isoterma (ITC, por sus siglas en inglés) y utilizamos diversas técnicas espectroscópicas, como fluorescencia, dicroísmo circular (CD, por sus siglas en inglés) y resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés), para obtener una comprensión más profunda de sus interacciones con NUPR1.
- **3. Simulaciones de Dinámica Molecular:** Utilizamos simulaciones de dinámica molecular (MD, por sus siglas en inglés) para capturar la naturaleza dinámica de NUPR1 y predecir modos de unión e interacciones con los compuestos seleccionados. Este análisis computacional proporcionó información valiosa sobre los posibles sitios de unión y mecanismos.
- **4. Ensayos de Relación Estructura-Actividad (SAR):** Para validar aún más nuestros hallazgos, llevamos a cabo ensayos de relación estructura-actividad (SAR) utilizando técnicas de NMR. Examinamos de cerca los complejos formados entre NUPR1 y los compuestos, centrándonos en la detección de residuos dentro de NUPR1 que se vieron afectados por la presencia de los compuestos seleccionados.
- **5. Validación** *In Vitro* e *In Vivo* de los compuestos hits seleccionados: Se determinó la actividad *in cellulo* e *in vivo* de los compuestos identificados por HTS.
- **6.** Diseño Basado en Ligandos *In Silico* para diseño de compuestos leads: Para mejorar la eficacia anticancerígena de la trifluoperazina (TFP) y minimizar sus efectos secundarios neurológicos, utilizamos un enfoque de diseño basado en ligandos *in silico*. Esto involucró simulaciones de MD y técnicas de *dockin*g molecular, lo que condujo a la síntesis de nuevos compuestos derivados de TFP, incluyendo ZZW-115.
- 7. Validación *In Vitro* e *In Vivo* de los compuestos leads sintetizados: Los nuevos compuestos sintetizados, especialmente ZZW-115, fueron sometidos a una validación exhaustiva *in vitro* e *in vivo*. Los experimentos basados en células demostraron una actividad anticancerígena significativa contra células derivadas de PDAC, con ZZW-115 dirigido específicamente a NUPR1. En modelos de ratones, ZZW-115 condujo a una regresión completa de tumores sin efectos secundarios neurológicos observados.

Si bien ZZW-115 fue prometedor inicialmente, también se asoció con posibles efectos cardiotóxicos debido a su interacción con el canal de potasio hERG. Este descubrimiento destacó la necesidad de inhibidores más seguros y selectivos de NUPR1 para mejorar el tratamiento del PDAC.

En resumen, nuestra investigación representa un esfuerzo pionero en el campo del desarrollo de medicamentos dirigidos a IDPs, centrándonos en NUPR1 como prueba de concepto. Nuestro enfoque multidisciplinario proporcionó información valiosa sobre posibles inhibidores de NUPR1 y sus mecanismos de acción. En este momento continuamos trabajando en el desarrollo de tratamientos más seguros y efectivos para el PDAC.

1. Selección de Compuestos:

En la primera fase de nuestra investigación, nos centramos en analizar cómo NUPR1 interactúa con diversos compuestos. Para esto, llevamos a cabo un cribado de compuestos utilizando una biblioteca química de 1,120 medicamentos aprobados por la FDA, conocida como *Prestwick Chemical Library*. Para el proceso de cribado se realizó un ensayo de desplegamiento térmico (TSA) por fluorescencia (del que previamente hemos hablado) y en el que se pudieron identificar compuestos que inducían los cambios más significativos en la señal de fluorescencia de las curvas de desnaturalización térmica (Figura 29). A partir de este cribado, seleccionamos 15 compuestos que avanzaron a las siguientes etapas de nuestro estudio combinaron métodos experimentales y computacionales.

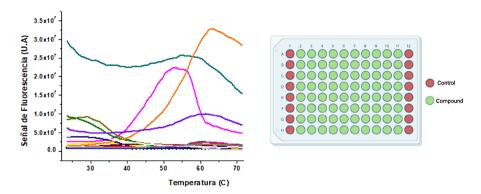


Figure 29. Resultados experimentales del cribado de alto rendimiento HTS con la librería de compuestos químicos Prestwick Chemical Library®. a) Diseño de una placa utilizada para el cribado HTS de los compuestos de la quimioteca: Las columnas 1 y 12 se corresponden con las posiciones de los controles negativos (sin proteína, sólo sonda ANS y DMSO) y las columnas 2 a la 11 con proteína y ANS a la que se añaden los compuestos testados en solvente DMSO. b) Perfil de fluorescencia obtenido por los 15 compuestos finalmente seleccionados del cribado HTS tras la desnaturalización térmica (T^a 25-75°C). Cada curva fluorescencia representa una mezcla formada por la proteína NUPR1 ([NUPR1]= 4μM), la sonda fluorescente ANS ([ANS]= 100μM) y cada compuesto ([Compuesto]= 250μM) que fue monitorizada en el fluorímetro de placas a una longitud de onda de excitación 390nm y a 500nm de emisión, con una velocidad de barrido de 1°C/min y tomando medidas cada 1°C.

2. Caracterización biofísica de interacción con NuPR1:

En primer lugar, utilizamos la calorimetría isotérmica de titulación (ITC) para determinar los aspectos termodinámicos relacionados con la interacción de los

compuestos seleccionados, que habíamos identificado previamente en el cribado, con NUPR1. Este paso nos permitió cuantificar la afinidad de unión de cada uno de los compuestos (Figura 30).

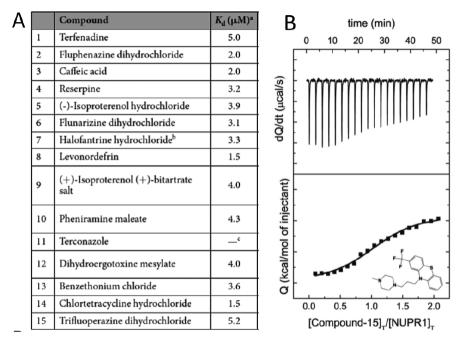


Figura 30. (A) Tabla que contiene las medidas de interacción de afinidad de los 15 complejos NUPR1-Compuesto (Kd) obtenidas por ITC a 25 °C y los residuos afectados de la proteína después de la unión de los compuestos con ampliación de picos cruzados de NMR (aEl error relativo es del 20 %. bEl compuesto precipitó a las concentraciones de NMR utilizadas. No determinado en las condiciones probadas). (B) Ejemplo de titulación calorimétrica para uno de los compuestos Compuesto-15 (TFP, Trifluoperazina) en la interacción con NUPR1 obtenida por ITC a 25 °C. Se muestran el termograma (panel superior) e isoterma de unión (panel inferior). Se muestra un ajuste no lineal de acuerdo con un modelo que considera un solo sitio de unión de ligando (línea continua) y la estructura molecular de la TFP. https://doi.org/10.1038/srep39732

3. Simulaciones de Dinámica Molecular:

Utilizando esta información, realizamos simulaciones de dinámica molecular (MD) para generar un conjunto de conformaciones de NUPR1, capturando su naturaleza dinámica (Figura 31). A continuación, empleamos este conjunto de conformaciones para realizar simulaciones de *docking* molecular con los compuestos seleccionados, prediciendo así sus modos de unión e interacciones con NUPR1.

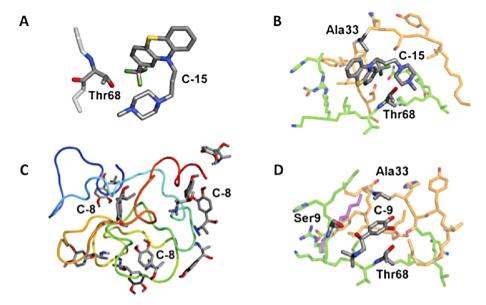
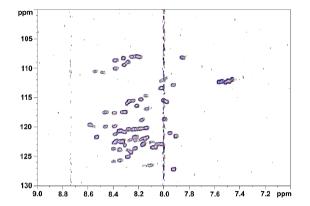


Figura 31. Ejemplo de la caracterización por docking molecular de 3 compuestos identificados: A) Modo de unión del Compuesto-15 con la cadena lateral de la Thr68. La figura muestra también una porción de la cadena principal de la proteína (gris claro); B) Bolsillo transitorio de la proteína modelado por combinación de los modos de unión del Compuesto-15 con las porciones de la cadena principal de NUPR1 incluyendo los residuos 27-40 (naranja) y 62-72 (verde); C) Numerosos modos de unión para el compuesto Compuesto-8 con la cadena principal de la proteína (N- y C- terminales se muestran en azul y rojo respectivamente); D) Bolsillo transitorio de la proteína NUPR1 modelado por la combinación de diferentes modos de unión del compuesto Compuesto-9 con la cadena principal de la proteína NUPR1, que involucra a los residuos 8-11 (morado), 27-40 (naranja) y 60-72 (verde). Para todas las representaciones fue utilizado el programa PyMol [(DeLano WL (2002) The PyMOL molecular graphics system. DeLano Scientific, Palo Alto, CA. http://www.pymol.org/ (accessed May 10, 2014)). Los hidrógenos y los oxígenos de la cadena principal de la proteína no están mostrados y los nitrógenos del esqueleto de la proteína están coloreados solo para los residuos implicados en la unión. https://doi.org/10.1038/srep39732

4. Ensayos de Relación Estructura-Actividad (SAR):

Para validar adicionalmente nuestros hallazgos, realizamos ensayos de relación estructura-actividad (SAR) utilizando técnicas de RMN (Figura 32). Lo que estudiamos fueron los complejos formados entre NUPR1 y los compuestos, y nos centramos en la detección de los aminoácidos concretos de la proteína NUPR1 que se ven modificados en presencia de los compuestos seleccionados en el cribado.



Compuesto	Residuos cuyo espectro RMN se vi modificado por la unión del compuesto	
C-1 Terfenadina		
C-2 Flufenazina dihidrocloruro	Thr68	
C-3 Acido cafeico	Ala33; Thr68	
C-4 Reserpina	Thr68	
C-5 (-)-Isoproterenol dihidroclaruro	Thr68	
C-6 Flunarizina dihidrocloruro	Ala33; Thr68	
C-7 Halofantrina hidroctoruro*	Thr68	
C-8 Levonordefrina	Ala33; Thr68	
C-9 (+)-isoproterenol (+)-bitartrato sal	Ser9; Ala10; Leu29; Ala33; Gly38; Thr	
C-10 Pheniramina maleato	Ser9; His62; Thr68	
C-11 Terconazol	Thr68	
C-12 Dihidroergotoxina hidrocloruro	Leu29; Le32; Gly38; Thr68	
C-13 Bencetonio cloruro	Thr68	
C-14 Clortetraciclina hidrocloruro	Ala33; Thr68	
C-15 Triffuoperazina dihidrocloruro	Ala33; Thr68	

Figura 32. RMN de los compuestos frente a NUPR1. A) Ejemplo de Espectro 2D 1H-15N HSQC de la proteína NUPR1 aislada (rojo) a 100 μ M; NUPR1 y Compuesto-9 (negro) (100:400 μ M); y NUPR1 y Compuesto-15 (azul) (100:400 μ M). B) Tabla en la que se resumen las resonancias afectadas en cada uno de los compuestos caracterizados. https://doi.org/10.1038/srep39732

Nuestra estrategia integral, que incluyó SAR-NMR y simulaciones de MD, produjo resultados consistentes y comparables en todo momento. Los residuos de NUPR1 afectados por la unión coincidieron estrechamente con los identificados en nuestras simulaciones computacionales. De esta forma nuestro enfoque quedó validado. Además, es importante destacar que las constantes de disociación de los compuestos obtenidas en ITC se encontraban en el rango micromolar, similar a las observadas para los ligandos naturales de NUPR1 [Goruppi, S. et al. 2010]. Esto reafirmó aún más la potencial aplicabilidad de nuestros hallazgos en el contexto de encontrar inhibidores interesantes frente a NUPR1. El siguiente paso crucial fue ver si estos hallazgos a nivel in vitro presentaban correlación con la actividad in celullo e in vivo.

5. Ensayos de actividad en cultivo celular de los hits seleccionados:

Los 15 compuestos identificados fueron estudiados en cultivo de células eucariotas, utilizando células tumorales inmortalizadas de cáncer de páncreas (Mia-PaCa-2) y células genéticamente modificadas en las que NuPR1 no se expresaba. Observamos que cuando se trataban las células con ellos, todos los compuestos eran capaces de disminuir la viabilidad inicial de estas células tumorales en mayor o menor medida, siendo los compuestos 1, 13 y 15 los más interesantes, ya que la reducían a un 45, 30 o 15% de su viabilidad inicial (Figura 33).

A continuación, se utilizaron células de cultivo primario que expresaban y no expresaban NuPR1 como modelo para estudiar la especificidad de los tres compuestos (1, 13 y 15) que mostraron una mayor actividad *in celullo* (Figura 33).

Así pues, sólo la Trifluoperazina (TFP), que fue el Compuesto-15 en el estudio y que exhibía en los estudios biofísicos por ITC una alta afinidad por NUPR1 (K_d

= $5.2~\mu M$), era capaz de inhibir la viabilidad celular de manera dependiente de NUPR1 (es decir, en mayor medida en aquellas células en las que se expresaba NuPR1).

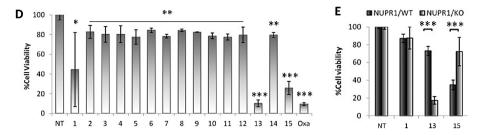


Figura 33. (D) MiaPaCa-2 y (E) líneas celulares murinas primarias genéticamente modificadas (clones NUPR1 KO: sin expresión del gen nupr1) en comparación con los clones NUPR1 WT, tratados con $10~\mu M$ de compuestos durante 6 días. Las barras de error son la desviación estándar de 3 mediciones independientes (valor de p: * ≤ 0.1 ; ** ≤ 0.05 ; *** ≤ 0.0001). https://doi.org/10.1038/srep39732

6. Validación In Vivo de los compuestos hits seleccionados

El compuesto 15, Trifluoperazina (TFP), fue estudiado *in vivo* y para ello se utilizó un modelo de xenoinjertos de células humanas derivadas de PDAC implantadas en ratones inmunodeficientes. Tras el tratamiento, se observó que el crecimiento del tumor se paralizaba en los animales tratados con 10 mg/kg de TFP (Figura 34). Concretamente, después de 2 semanas de tratamiento, los volúmenes tumorales mostraron un crecimiento exponencial en el grupo de control (1530 \pm 184 mm³), mientras que los volúmenes tumorales aumentaron solo un 50 % en los ratones tratados con 5 mg/kg de TFP (767 \pm 196 mm³). Es importante destacar que, en el caso de los ratones tratados con 10 mg/kg de TFP, el crecimiento del tumor se detuvo rápidamente y casi por completo (558 \pm 152 mm³), incluso después de 4 semanas de tratamiento.

Esta estrategia para identificar de forma pionera compuestos bioactivos frente a NuPR1, ha permitido identificar un compuesto como TFP, un conocido antipsicótico, y se enmarcaría en lo que se conoce como reposicionamiento de fármacos [*Neira, J.L. et al, 2017*].

Lamentablemente, las dosis de TFP requeridas también indujeron efectos secundarios neurológicos no deseados, como letargo pronunciado y una postura encorvada en los ratones debido al efecto farmacológico ya conocido de la TFP como agente antipsicótico utilizado principalmente para tratar la esquizofrenia [Marques L de O. et al. 2004]. Por lo tanto, nuestros esfuerzos se centraron en mejorar la eficacia anticancerígena de TFP, al mismo tiempo minimizar sus efectos secundarios neurológicos, requisito para que pueda ser considerado como fármaco antitumoral.

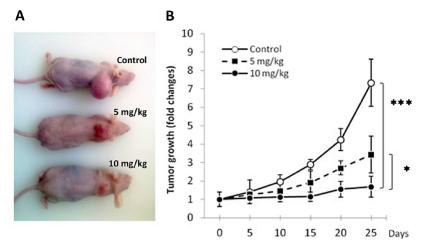


Figura 34. En xenoinjertos de tumores pancreáticos humanos, la TFP fue capaz de detener el crecimiento del tumor. (A) Imágenes representativas de tumores después de 4 semanas de tratamiento intraperitoneal diario (i.p.). con 0, 5 o 10 mg/kg de TFP. El tamaño del tumor del grupo de control mostró un crecimiento exponencial, mientras que los tumores de los ratones tratados con TFP permanecieron constantes. (B) El cambio en el crecimiento del tumor se evaluó para cada grupo de ratones con 0, 5 o 10 mg/kg de TFP durante las 4 semanas de tratamiento diario. El análisis de varianza para mediciones repetidas reveló un efecto de tratamiento estadísticamente significativo (valor de p: ** \le 0,05; *** \le 0,01) en comparación con el grupo de control. https://doi.org/10.1038/srep39732

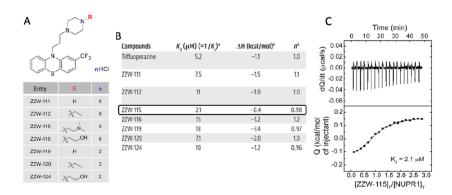


Figura 35. Síntesis de compuestos y caracterización de la unión de NUPR1 a los compuestos. (A) Estructura de los compuestos derivados de TFP sintetizados, llamados compuestos ZZW. (B) Parámetros termodinámicos de las reacciones de unión de NUPR1 con los compuestos. ZZW-115 fue el compuesto derivado de TFP con mayor afinidad por NUPR1 (K_d = 2,1 μ M). (C) Titulación calorimétrica del complejo NUPR1-ZZW-115 obtenida por ITC. En la parte superior: termograma (potencia térmica en función del tiempo); y en la parte inferior: isoterma de unión (efecto de calor normalizado por ligando en función de la relación molar). https://doi.org/10.1172/JCI127223

7. Diseño Basado en Ligandos In Silico para diseño de compuestos leads

La estrategia para lograr este objetivo se basó en un enfoque de diseño de ligandos *in silico*, permitiendo generar variantes de la TFP mediante la utilización de técnicas que combinen las simulaciones de MD y técnicas de acoplamiento. Este análisis computacional dio como resultado una propuesta de nuevos compuestos derivados de TFP (compuestos ZZW) para ser sintetizados químicamente. Estos compuestos fueron analizados de forma exhaustiva mediante ITC y SAR-NMR (tal y como hicimos anteriormente con los compuestos *hits* identificados en el cribado) y finalmente se identificó un compuesto (el denominado como ZZW-115) que mostraba la mayor afinidad (menor K_d) (Figura 35) [*Santofimia-Castaño, P. et al. 2019*].

5.5. ETAPA 5: Ensayos preclínicos de los compuestos identificados

Como paso final, al igual que en la validación previa de TFP, fue preciso realizar una validación *in celullo* e *in vivo* de los nuevos compuestos que fueron sintetizados posteriormente a partir de TFP, para determinar si son capaces de mostrar actividad en estos sistemas.

Los experimentos in celullo demostraron un aumento significativo en la actividad anticancerígena de ZZW-115 en diversas líneas celulares derivadas de PDAC. Es importante destacar que se confirmó que este compuesto exhibía su actividad anticancerígena mediante la focalización específica en NUPR1, ya que los clones nupr1 KO fueron significativamente más resistentes al tratamiento con ZZW-115 que los clones nupr1 WT (estos clones tenían el gen nupr1 inactivado mediante un procedimiento CRISPR/Cas9). Este compuesto derivado de TFP también mostró eficacia contra otras líneas celulares de cáncer [Santofimia-Castaño, P. et al. 2019]. A nivel celular, se determinó la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH), la actividad caspasa-3/7 y el contenido de ATP, observando que ZZW-115 aumentaba la liberación de LDH y la actividad de caspasa-3/7, y reducía el contenido de ATP, de manera dependiente de la dosis. Por lo tanto, estos resultados revelaron que el compuesto ZZW-115 inducía simultáneamente la muerte celular a través de mecanismos de necroptosis (ensayo de LDH) y apoptosis (ensayo de caspasa-3/7), así como alteración de la función mitocondrial (Figura 36) [Santofimia-Castaño, P. et al. 2019].

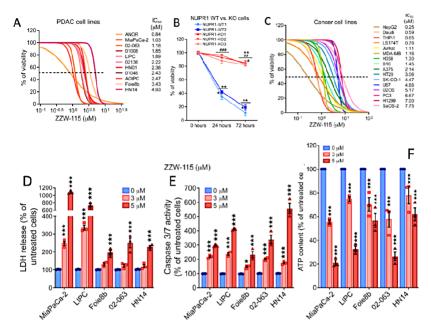


Figura 36. El compuesto ZZW-115 mostró efectos antitumorales e indujo la muerte celular por necrosis y apoptosis in vitro al inhibir NUPR1. (A) Viabilidad de líneas celulares de cáncer de PDAC, (B) clones NUPR1 WT o KO y (C) diferentes líneas celulares de cáncer después del tratamiento con concentraciones crecientes de ZZW-115 durante 72 h. (D) Liberación de LDH, (E) actividad de caspasa-3/7 y (F) medición del contenido de ATP en líneas celulares de PDAC incubadas con 0, 3 o 5 μ M de ZZW-115 durante 24 h. La significancia estadística fue *p < 0,05 y ***p < 0,001 en comparación con el grupo no tratado (análisis de varianza de dos vías (ANOVA), prueba post hoc de Bonferroni). Los datos representan la media \pm SEM, n = 3. https://doi.org/10.1172/JCI127223

En los ensayos *in vivo* que involucraron xenoinjertos de tumores pancreáticos en ratones, ZZW-115 resultó en una reversión completa de los tumores dependiente de la dosis sin efectos secundarios observados (Figura 37) [Santofimia-Castaño, P. et al. 2019]. Es importante destacar que ZZW-115 no solo mostró esta inhibición del crecimiento tumoral, sino que también se observó la desaparición de los tumores en el caso del grupo de 5 mg/kg después de 30 días de tratamiento.

Se estudió el mecanismo de acción de ZZW-115 a nivel celular y se pudo observar que el compuesto obstaculizaba la translocación nuclear de NUPR1 (Figura 38). NUPR1 es una proteína nuclear que tiene una secuencia de localización nuclear (NLS) determinada. Esta parte de la proteína se une a importinas que facilitan su translocación del citoplasma al núcleo, a través del complejo de poro nuclear. La presencia del compuesto impide la interacción de la importina con la secuencia NLS de NUPR1 (se determinó por RMN que la unión se produce en el entorno del residuo Thr68) y se impide así la traslocación al núcleo de la proteína (las imágenes de microscopía mostraron que NUPR1 permanecía en el citoplasma).

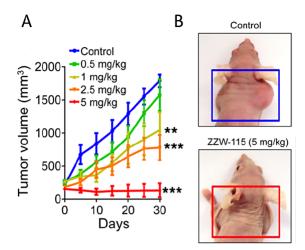


Figure 37. En xenoinjertos de tumores pancreáticos humanos, la ZZW-115 fue capaz de frenar el crecimiento del tumor. (A) El cambio en el crecimiento del tumor se evaluó para cada grupo de ratones con 0, 5 o 5 mg/kg de ZZW-115 durante 30 días de tratamiento diario. El análisis de varianza para mediciones repetidas reveló un efecto de tratamiento estadísticamente significativo (valor de p: ** \leq 0,05; *** \leq 0,01) en comparación con el grupo de control. (B) Imágenes representativas de tumores después de 30 días de tratamiento intraperitoneal diario (i.p). con 0 ó 5 mg/kg de ZZW-115. El tamaño del tumor del grupo de control mostró un crecimiento exponencial, mientras que los tumores de los ratones tratados con ZZW-115 se redujeron e incluso desaparecieron (con 5 mg/kg de ZZW-115). https://doi.org/10.1172/JCI127223

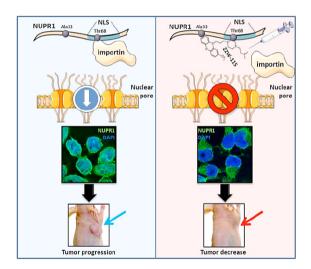


Figure 38. Mecanismo de acción de ZZW-115 a nivel celular y su efecto en la progresión del tumor en ratones con xenoinjertos. https://doi.org/10.3390/cells8111453

Con los resultados mencionados anteriormente, ZZW-115 constituía un prometedor candidato a fármaco para PDAC debido a su mecanismo molecular único, ya que inducía la muerte celular combinando la inducción de necroptosis y apoptosis acompañadas de fallo mitocondrial. Sin embargo, se observó que ZZW-115 podía inhibir el canal de iones de potasio codificado por el Gen Relacionado con Ether-à-go-go en Humanos (hERG), con riesgo de cardiotoxicidad [Gintant, G. et al. 2016]. Concretamente, la unión de ZZW-115 al canal hERG podría retardar la repolarización alargando el intervalo QT en el potencial de acción cardíaco. Como resultado, esta prolongación del intervalo QT podría conducir al desarrollo de un tipo específico de arritmia ventricular, llamada torsades de pointes, que podría resultar en fallecimiento [Garrido, A. et al. 2020].

Por esta razón, identificar y desarrollar nuevos inhibidores de NUPR1 sin comprometer la seguridad cardiovascular, es decir, más seguros y selectivos, fue absolutamente necesario.

De nuevo, al igual que con TFP, un buen compuesto derivado (ZZW-115) mostraba muy buena actividad *in vivo*, pero no podía ser considerado candidato a fármaco debido a los efectos no deseados. Pero esto no invalidaba de ninguna forma la estrategia que diseñamos, sino que la reforzó, ya que, con la experiencia previa, cada vez estábamos más cerca de encontrar un compuesto que pudiera ser considerado como candidato a fármaco frente a PDAC.

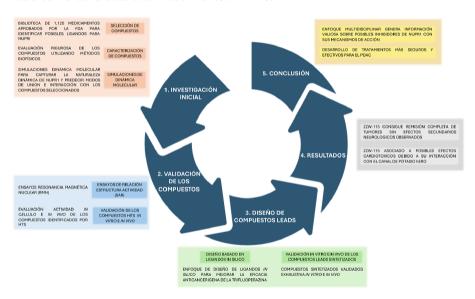


Figure 39. Resumen de los pasos llevados a cabo en la investigación y los resultados obtenidos.

CONCLUSIÓN FINAL

Las proteínas IDPs son un grupo muy interesante de dianas en diferentes patologías para las que son necesarias nuevas terapias y la identificación de compuestos bioactivos frente a ellas representan todo un reto. Los enfoques tradicionales de diseño de medicamentos basados en la estructura suelen ser poco prácticos debido a las propiedades estructurales dinámicas de estas proteínas IDPs.

Como ejemplo de ellas, NuPR1. Su papel en el desarrollo tumoral (como en el caso del adenoma ductal de páncreas) la convierten en una buena diana sobre la que identificar compuestos que sean capaces de alterar la función de NuPR1 en la célula, al interferir en la interacción con sus compañeros (o partners) celulares. La colaboración entre varios grupos de investigación hizo posible abordar este desafío mediante la aplicación de un enfoque sistemático, integrador de diversas disciplinas, como la biofísica, la bioquímica, la bioinformática y la biología celular. La metodología desarrollada no necesita que el conjunto conformacional de la IDP esté determinado previamente y puede centrarse en las características específicas de los compuestos. Esta estrategia de descubrimiento de fármacos fue destacada como una de las «10 Principales Tecnologías Emergentes» el World Economic Forum en 2019. Así lo publicaba la revista Scientific American en su artículo: https://www. scientificamerican.com/article/top-10-emerging-technologies-of-2019/. En él se decía dentro del apartado 4 MEDICAL & BIOTECH: "[...] Los científicos están utilizando combinaciones rigurosas de biofísica, potencia computacional y una mejor comprensión de la forma en que funcionan las IDPs para identificar compuestos que inhiben estas proteínas, y algunos de ellos han surgido como candidatos legítimos para medicamentos. En 2017, investigadores en Francia y España demostraron que es posible apuntar y afectar la interfaz «difusa» cambiable de una IDP. Mostraron que un medicamento aprobado por la FDA llamado trifluoperazina (que se utiliza para tratar trastornos psicóticos y ansiedad) se une e inhibe a NUPR1, una proteína desordenada involucrada en un tipo de cáncer de páncreas. Las pruebas de detección a gran escala para evaluar miles de candidatos a fármacos con potencial terapéutico han revelado varios que inhiben c-Myc, y algunos están avanzando hacia el desarrollo clínico. También se han identificado moléculas adicionales que funcionan en IDPs como la beta-amiloide, implicada en enfermedades como el Alzheimer [...]".

En resumen, este ejemplo del trabajo realizado con la proteína NUPR1, representa uno de los mayores logros de nuestro grupo de investigación, destacando su carácter de colaboración multidisciplinar, y muestra cómo, en el campo de la investigación académica, es posible introducir nuevos enfoques y estrategias para descubrir compuestos bioactivos dirigidos a dianas terapéuticas que inicialmente resultan desafiantes, como las proteínas intrínsecamente desestructuradas (IDPs). Dada su relevancia en diversas enfermedades, incluyendo patologías tumorales y neurodegenerativas, estas proteínas IDPs presentan un potencial significativo como dianas terapéuticas en la búsqueda de moléculas candidatas para futuros fármacos. Nuestra aportación científica a este campo, esperemos que sirva a otros grupos de investigación para avanzar en el mismo.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguado-Llera, D., Hamidi, T., Doménech, R., Pantoja-Uceda, D., Gironella, M., Santoro, J., Velázquez-Campoy, A., Neira, J. L., & Iovanna, J. L. (2013). Deciphering the binding between Nupr1 and MSL1 and their DNA-repairing activity. PLoS One, 8(10), e78101.
- Albani JR. (2007). Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy. Blackwell.
- Anfinsen, C. B., Haber, E., Sela, M., & White Jr., F. H. (1961). The Kinetics of Formation of Native Ribonuclease During Oxidation of the Reduced Polypeptide Chain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 47(9), 1309-1314.
- Astbury, W. T., & Street, A. (1931). X-ray Studies of the Structure of Hair, Wool, and Related Fibers-I. General. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical or Physical Character, 230(681-693), 75-101.
- Babu, M. M., van der Lee, R., de Groot, N. S., & Gsponer, J. (2011). Intrinsically disordered proteins: regulation and disease. Current Opinion in Structural Biology, 21(3), 432-440.
- Baldwin, R. L. (1989). How Does Protein Folding Get Started? Trends in Biochemical Sciences, 14(7), 291-294.
- Bastos, M., Abian, O., Johnson, C. M., Ferreira-da-Silva, F., Vega, S., Jimenez-Alesanco, A., ... & Velazquez-Campoy, A. (2023). Isothermal Titration Calorimetry. Nature Reviews Methods Primers, 3(1), 17.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Gatto, G. J. (2015). Biochemistry. W. H. Freeman and Company.
- Bosetti, C., Lucenteforte, E., Silverman, D. T., Petersen, G., Bracci, P. M., Ji, B. T., ... & Duell, E. J. (2012). Cigarette smoking and pancreatic cancer: An analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PANC4). Annals of Oncology, 23(7), 1880-1888.
- Campen, R. M., Williams, C. J., Brown, J., Meng, J., Uversky, V. N., & Dunker, A. K. (2008). TOP-IDP-scale: a new amino acid scale measuring propensity for intrinsic disorder. Protein and Peptide Letters, 15(10), 956-963.
- Cano, C. E., & Iovanna, J. L. (2010). Stress Proteins and Pancreatic Cancer Metastasis. The Scientific World Journal, 10, 1958-1966.
- Chang, Y. S., Graves, B., Guerlavais, V., Tovar, C., Packman, K. S., To, K. H., ... & Sampath, D. (2013). Stapled α-helical peptide drug development: a potent dual inhibitor of MDM2 and MDMX for p53-dependent cancer therapy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110(36), E3445-E3454.
- Cheng, Y., LeGall, T., Oldfield, C. J., Dunker, A. K., & Uversky, V. N. (2006). Abundance of intrinsic disorder in proteins associated with cardiovascular disease. Biochemistry, 45(33), 10448-10460.
- Ciulli A. (2013). Biophysical Screening for the Discovery of Small-Molecule Ligands. Methods in Molecular Biology, 1008, 357-388.

- Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouché, O., Guimbaud, R., Bécouarn, Y., ... & Adenis, A. (2011). FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. New England Journal of Medicine, 364(19), 1817-1825.
- Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouché, O., Guimbaud, R., Bécouarn, Y., ... & Louvet, C. (2018). FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. New England Journal of Medicine, 379(25), 2395-2406.
- Cordes, M. H., Davidson, A. R., & Sauer, R. T. (1996). Sequence Space, Folding, and Protein Design. Current Opinion in Structural Biology, 6(1), 3-10.
- Cosconati, S., Forli, S., Perryman, A. L., Harris, R., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2010). Virtual Screening with AutoDock: Theory and Practice. Expert Opinion on Drug Discovery, 5(6), 597-607.
- Dang, C. V., Reddy, E. P., Shokat, K. M., & Soucek, L. (2017). Drugging the 'undruggable' cancer targets. Nature Reviews Cancer, 17(8), 502-508.
- De la Torre BG, Albericio F. (2019). The Pharmaceutical Industry in 2018: An Analysis of FDA Drug Approvals from the Perspective of Molecules. Molecules, 24, 809.
- Dill, K. A. (1985). Theory for the Folding and Stability of Globular Proteins. Biochemistry, 24, 1501-1509.
- Dill, K. A., & Chan, H. S. (1997). From Levinthal to Pathways to Funnels. Nature Structural Biology, 4, 10-19.
- DiMasi JA, Hansen RW, Grabowski HG. (2003). The Price of Innovation: New Estimates of Drug Development Costs. Journal of Health Economics, 22(1), 151-185.
- Du, Z., Uversky, V. N. (2017). A comprehensive survey of the roles of highly disordered proteins in type 2 diabetes. International Journal of Molecular Sciences, 18, 10.
- Dyson, H. J., & Wright, P. E. (2005). Intrinsically unstructured proteins and their functions. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 6(3), 197-208.
- Encinar, J. A., Mallo, G. V., Mizyrycki, C., Giono, L., Gonzalez-Ros, J. M., Rico, M., Cánepa, E., Moreno, S., Neira, J. L., & Iovanna, J. L. (2001). Human p8 is a HMG-I/Y-like protein with DNA binding activity enhanced by phosphorylation. The Journal of Biological Chemistry, 276(4), 2742-2751.
- Fersht, A. R. (1995). Optimization of Rates of Protein Folding: The Nucleation-Condensation Mechanism and Its Implications. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92, 10869-10873.
- Fersht, A. R., & Daggett, V. (2002). Protein Folding and Unfolding at Atomic Resolution. Cell, 108, 573-582.
- Galea, C. A., Wang, Y., Sivakolundu, S. G., & Kriwacki, R. W. (2008). Regulation of cell division by intrinsically unstructured proteins: intrinsic flexibility, modularity, and signaling conduits. Biochemistry, 47(27), 7598-7609.
- Garrido, A., Lepailleur, A., Mignani, S. M., Dallemagne, P., & Rochais, C. (2020). hERG toxicity assessment: useful guidelines for drug design. European Journal of Medicinal Chemistry, 195(112290).
- Gintant, G., Sager, P. T., & Stockbridge, N. (2016). Evolution of strategies to improve preclinical cardiac safety testing. Nature Reviews Drug Discovery, 15(7), 457-471.

- Goruppi, S., & Kyriakis, J. M. (2004). The pro-hypertrophic basic helix-loop-helix protein p8 is degraded by the ubiquitin/proteasome system in a protein kinase B/Aktand glycogen synthase kinase-3-dependent manner, whereas endothelin induction of p8 mRNA and renal mesangial cell hypertrophy require NFAT4. The Journal of Biological Chemistry, 279(20), 20950-20958.
- Goruppi, S., Patten, R. D., Force, T., & Kyriakis, J. M. (2007). Helix-Loop-Helix Protein p8, a Transcriptional Regulator Required for Cardiomyocyte Hypertrophy and Cardiac Fibroblast Matrix Metalloprotease Induction. Molecular and Cellular Biology, 27(3), 993-1006.
- Goruppi, S., & Iovanna, J. L. (2010). Stress-inducible protein p8 is involved in several physiological and pathological processes. Journal of Biological Chemistry, 285(3), 1577-1581.
- Grantcharova, V., Alm, E. J., Baker, D., & Horwich, A. L. (2001). Mechanisms of Protein Folding. Current Opinion in Structural Biology, 11(1), 70-82.
- Hamidi T, Algül H, Cano CE, Sandi MJ, Molejon MI, Riemann M, Calvo EL, Lomberk G, Dagorn JC, Weih F, Urrutia R, Schmid RM, Iovanna JL. Nuclear protein 1 promotes pancreatic cancer development and protects cells from stress by inhibiting apoptosis. J Clin Invest. 2012 Jun;122(6):2092-103.
- Harrison, S. C., & Durbin, R. (1985). Is There a Single Pathway for the Folding of a Polypeptide Chain? Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 82, 4028-4030.
- Holdgate G, Geschwindner S, Breeze A, et al. (2013). Biophysical Methods in Drug Discovery from Small Molecule to Pharmaceutical. Methods in Molecular Biology, 1008, 327-355.
- Hu, C., Hart, S. N., Polley, E. C., Gnanaolivu, R., Shimelis, H., Lee, K. Y., ... & Couch, F. J. (2018). Association Between Inherited Germline Mutations in Cancer Predisposition Genes and Risk of Pancreatic Cancer. JAMA Journal of the American Medical Association, 319(23), 2401-2409.
- Hu, G., Yan, E. S., Wang, K., & Uversky, V. N. (2016). Untapped potential of disordered proteins in current druggable human proteome. Current Drug Targets, 17(10), 1198-1205.
- Hutchinson L, Kirk R. (2011). High Drug Attrition Rates Where Are We Going Wrong? Nature Reviews Clinical Oncology, 8(4), 189-190.
- Iakoucheva, L. M., Brown, C. J., Lawson, J. D., Obradovic, Z., & Dunker, A. K. (2002). Intrinsic disorder in cell-signaling and cancer-associated proteins. Journal of Molecular Biology, 323(3), 573-584.
- Jain, M. K., Singh, P., Roy, S., & Bhat, R. (2018). Comparative analysis of the conformation, aggregation, interaction, and fibril morphologies of human α -, β -, and γ -synuclein proteins. Biochemistry, 57(26), 3830-3848.
- Jorda, J., Xue, B., Uversky, V. N., & Kajava, A. V. (2010). Protein tandem repeats the more perfect, the less structured. FEBS Journal, 277(11), 2673-2682.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., et al. (2021). Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold. Nature, 596, 583-589.
- Karplus, M., & Weaver, D. L. (1976). Protein-Folding Dynamics. Nature, 260(5550), 404-406.

- Kay, L. E. (1997). NMR Methods for the Study of Protein Structure and Dynamics. Biochemistry and Cell Biology, 75(1), 1-15.
- Klaeger, S., et al. (2017). The Target Landscape of Clinical Kinase Drugs. Science, 358, eaan 4368.
- Kodoyianni, V. (2011). Label-Free Analysis of Biomolecular Interactions Using SPR Imaging. Biotechniques, 50(1), 32-40.
- Kuo, J. (Ed.). (2008). Electron Microscopy: Methods and Protocols (Vol. 369). Springer Science & Business Media.
- Ladokhin, A. S. (2000). Fluorescence Spectroscopy in Peptide and Protein Analysis. Encyclopedia of Analytical Chemistry, 5762-5779.
- Lakowicz JR. (2006). Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer.
- Lane, P., et al. (2001). High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. Journal of Biomolecular Screening, 6(6), 429-440.
- Lazo, J. S., & Sharlow, E. R. (2016). Drugging undruggable molecular cancer targets. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 56, 23-40.
- Macarron R, Hertzberg RP. (2009). Design and Implementation of High-Throughput Screening Assays. Methods in Molecular Biology, 565, 1-32.
- Malicet, C., Giroux, V., Vasseur, S., Dagorn, J. C., Neira, J. L., & Iovanna, J. L. (2006). Regulation of apoptosis by the p8/prothymosin α complex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(8), 2671-2676.
- Mallo, G. V., Fiedler, F., Calvo, E. L., Ortiz, E. M., Vasseur, S., Keim, V., ... & Iovanna, J. L. (1997). Cloning and expression of the rat p8 cDNA, a new gene activated in pancreas during the acute phase of pancreatitis, pancreatic development, and regeneration, and which promotes cellular growth. The Journal of Biological Chemistry, 272(51), 32360-32369.
- Mannhold, R., Kubinyi, H., & Folkers, G. (2006). Protein-ligand Interactions: From Molecular Recognition to Drug Design. John Wiley & Sons.
- Marques, L. de O., Soares, B., & Silva de Lima, M. (2004). Trifluoperazine for schizophrenia. Cochrane Database of Systematic Reviews.
- McGovern SL, Caselli E, Grigorieff N, Shoichet BK. (2002). A Common Mechanism Underlying Promiscuous Inhibitors from Virtual and High-Throughput Screening. Journal of Medicinal Chemistry, 45(8), 1712-1722.
- Mcmillin, C. R., & Walton, A. G. (1974). A Circular Dichroism Technique for the Study of Adsorbed Protein Structure. Journal of Colloid and Interface Science, 48(2), 345-349.
- Midic, U., Oldfield, C. J., Dunker, A. K., Obradovic, Z., Uversky, V. N. (2009). Protein disorder in the human diseasome: unfoldomics of human genetic diseases. BMC Genomics, 10(Suppl 1), S12.
- Moreno L, Pearson AD. (2013). How Can Attrition Rates Be Reduced in Cancer Drug Discovery? Expert Opinion on Drug Discovery, 8(3), 363-368.
- Mukherjee, D., Scheihing, P. C., Butler, C., Soto, C. (2015). Type 2 diabetes as a protein misfolding disease. Trends in Molecular Medicine, 21, 439-449.

- Murtaugh, L. C. (2014). Pathogenesis of pancreatic cancer: lessons from animal models. Toxicologic Pathology, 42(1), 217-228.
- Neira, J. L., Bintz, J., Arruebo, M., Rizzuti, B., Bonacci, T., Vega, S., ... & Iovanna, J. L. (2017). Identification of a Drug Targeting an Intrinsically Disordered Protein Involved in Pancreatic Adenocarcinoma. Scientific Reports, 7(June 2016), 39732.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). Lehninger Principles of Biochemistry. W. H. Freeman and Company.
- Pantoliano, M. W., Petrella, E. C., Kwasnoski, J. D., Lobanov, V. S., Myslik, J., Graf, E., Carver, T., Asel, E., & Springer, B. A.
- Päth G, Opel A, Knoll A, Seufert J. Nuclear protein p8 is associated with glucose-induced pancreatic beta-cell growth. Diabetes. 2004 Feb;53 Suppl 1:S82-5.
- Pauling, L., & Corey, R. B. (1951). Atomic Coordinates and Structure Factors for Two Helical Configurations of Polypeptide Chains. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 37(5), 235-240.
- Pauling, L., Corey, R. B., & Branson, H. R. (1951). The Structure of Proteins: Two Hydrogen-Bonded Helical Configurations of the Polypeptide Chain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 37(4), 205-211.
- Plaxco, K. W., Simons, K. T., & Baker, D. (1998). Contact Order, Transition State Placement, and the Refolding Rates of Single Domain Proteins. Journal of Molecular Biology, 277(4), 985-994.
- Rautio, J., Kumpulainen, H., Heimbach, T., et al. (2008). Prodrugs: Design and Clinical Applications. Nature Reviews Drug Discovery, 7(3), 255-270.
- Ree, A. H., Pacheco, M. M., Tvermyr, M., Fodstad, O., & Brentani, M. M. (2000). Expression of a novel factor, com1, in early tumor progression of breast cancer. Clinical Cancer Research, 6(5), 1778-1783.
- Renaud JP, Chung C, Danielson UH, et al. (2016). Biophysics in Drug Discovery: Impact, Challenges, and Opportunities. Nature Reviews Drug Discovery, 15(11), 679-698.
- Ringe, D., & Petsko, G. A. (1985). Mapping Protein Dynamics by X-Ray Diffraction. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 45(3), 197-235.
- Rost, B., & Eyrich, V. A. (2001). EVA: Large-Scale Analysis of Secondary Structure Prediction. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 5(S5), 192-199.
- Sandi, M. J., Hamidi, T., Malicet, C., Cano, C., Loncle, C., Pierres, A., Dagorn, J. C., & Iovanna, J. L. (2011). p8 expression controls pancreatic cancer cell migration, invasion, adhesion, and tumorigenesis. Journal of Cellular Physiology, 226(12), 3442-3451.
- Santofimia-Castaño, P., Rizzuti, B., Pey, Á. L., Soubeyran, P., Vidal, M., Urrutia, R., Iovanna, J. L., & Neira, J. L. (2017). Intrinsically disordered chromatin protein NUPR1 binds to the C-terminal region of polycomb RING1B. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 114(31), E6332-E6341.
- Santofimia-Castaño, P., Xia, Y., Lan, W., Zhou, Z., Huang, C., Peng, L., ... & Iovanna, J. (2019). Ligand-based design identifies a potent NUPR1 inhibitor exerting anticancer activity via necroptosis. Journal of Clinical Investigation, 129(6), 2500-2513.

- Santofimia-Castaño, P., Xia, Y., Peng, L., Velázquez-Campoy, A., Abian, O., Lan, W., ... & Iovanna, J. (2019). Targeting the Stress-Induced Protein NUPR1 to Treat Pancreatic Adenocarcinoma. Cells, 8(11).
- Santos R, Ursu O, Gaulton A, Bento AP, Donadi RS, Bologa CG, Karlsson A, Al-Lazikani B, Hersey A, Oprea TI, Overington JP. (2017). A Comprehensive Map of Molecular Drug Targets. Nature Reviews Drug Discovery, 16(1), 19-34.
- Schuhmacher A, Gassmann O, Hinder M. (2016). Changing R&D Models in Research-Based Pharmaceutical Companies. Journal of Translational Medicine, 14, 105.
- Scott DE, Bayly AR, Abell C, Skidmore J. (2016). Small Molecules, Big Targets: Drug Discovery Faces the Protein-Protein Interaction Challenge. Nature Reviews Drug Discovery, 15(8), 533-550.
- Shangary, S., Qin, D., McEachern, D., Liu, M., Miller, R. S., Qiu, S., ... & Wang, S. (2008). Temporal activation of p53 by a specific MDM2 inhibitor is selectively toxic to tumors and leads to complete tumor growth inhibition. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(10), 3933-3938.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). Cancer Statistics, 2021. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 71(1), 7-33.
- Śledź, P., & Caflisch, A. (2018). Protein Structure-Based Drug Design: From Docking to Molecular Dynamics. Current Opinion in Structural Biology, 48, 93-102.
- Sung, H., Siegel, R. L., Rosenberg, P. S., & Jemal, A. (2019). Emerging cancer trends among young adults in the USA: analysis of a population-based cancer registry. The Lancet Public Health, 4(3), e137-e147.
- Terhune, P. G., Phifer, D. M., Tosteson, T. D., & Longnecker, D. S. (1998). K-ras mutation in focal proliferative lesions of human pancreas. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 7(6), 515-521.
- Tissue, Brian M. (2012). Ultraviolet and Visible Absorption Spectroscopy. In Characterization of Materials (pp. 1-13).
- Uversky, V. N. (2008). Amyloidogenesis of natively unfolded proteins. Current Alzheimer Research, 5, 260-287.
- Uversky, V. N. (2009). Intrinsic disorder in proteins associated with neurodegenerative diseases. Frontiers in Bioscience (Landmark Edition), 14, 5188-5238.
- Uversky, V. N., et al. (2000). Why are 'natively unfolded' proteins unstructured under physiologic conditions? Proteins, 41(3), 415-427.
- Uversky, V. N., Oldfield, C. J., & Dunker, A. K. (2005). Showing your id: intrinsic disorder as an id for recognition, regulation and cell signaling. Journal of Molecular Recognition, 18(5), 343-384.
- Uversky, V. N., Oldfield, C. J., & Dunker, A. K. (2008). Intrinsically disordered proteins in human diseases: introducing the d2 concept. Annual Review of Biophysics, 37, 215-246.
- Uversky, V. N. (2013). Unusual biophysics of intrinsically disordered proteins. Biochimica et Biophysica Acta, 1834, 932-951.
- Uversky, V. N. (2019). Intrinsically disordered proteins and their "mysterious" (meta) physics. Frontiers in Physics, 7, 10.

- van Gunsteren, W. F., Daura, X., Hansen, N., Mark, A. E., Oostenbrink, C., Riniker, S., & Smith, L. J. (2018). Validation of Molecular Simulation: An Overview of Issues. Angewandte Chemie International Edition, 57(4), 884-902.
- Vasseur, S., Vidal Mallo, G., Fiedler, F., Bödeker, H., Cánepa, E., Moreno, S., & Iovanna, J. L. (1999). Cloning and expression of the human p8, a nuclear protein with mitogenic activity. European Journal of Biochemistry, 259(3), 670-675.
- Vassilev, L. T., Vu, B. T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., ... & Liu, E. A. (2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. Science, 303(5659), 844-848.
- Vedadi, M., Niesen, F. H., Allali-Hassani, A., Fedorov, O. Y., & Finerty Jr, P. J. (2006). Chemical screening methods to identify ligands that promote protein stability, protein crystallization, and structure determination. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(42), 15835-15840.
- Velazquez-Campoy, A., Sancho, J., Abian, O., & Vega, S. (2016). Biophysical screening for identifying pharmacological chaperones and inhibitors against conformational and infectious diseases. Current Drug Targets, 17(13), 1492-1505.
- Walter, F. M., Mills, K., Mendonça, S. C., Abel, G. A., Basu, B., Carroll, N., ... & Rubin, G. P. (2016). Symptoms and patient factors associated with diagnostic intervals for pancreatic cancer (SYMPTOM pancreatic study): a prospective cohort study. The Lancet Gastroenterology & Hepatology, 1(4), 298-306.
- Wang Y. (2012). Extracting Knowledge from Failed Development Programmes. Pharmaceutical Medicine, 26(2), 91-96.
- Wang, S., Yang, F., Zhu, L., Zhu, X. Q., Wang, Z. F., & Wang, C. H. (2021). The molecular biology of pancreatic adenocarcinoma: translational challenges and clinical perspectives. Signal Transduction and Targeted Therapy, 6(1).
- Wetlaufer, D. B. (1973). Nucleation, Rapid Folding, and Globular Intrachain Regions in Proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 70(3), 697-701.
- Wright, P. E., & Dyson, H. J. (2009). Linking folding and binding. Current Opinion in Structural Biology, 19(1), 31-38.
- Wright, P. E., & Dyson, H. J. (2015). Intrinsically disordered proteins in cellular signaling and regulation. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 16(1), 18-29.
- Yan, E. J., Dunker, A. K., Uversky, V. N., & Kurgan, L. (2016). Molecular recognition features (MoRFs) in three domains of life. Molecular BioSystems, 12(2), 697-710.
- Zhang, J. H., Chung, T. D. Y., & Oldenburg, K. R. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. Journal of Biomolecular Screening, 4(2), 67-73.
- Zhang, Y., Tegner, J., & Abeel, T. (2015). Binding cavities and druggability of intrinsically disordered proteins. Protein Science, 24(5), 688-705.

Discurso de Contestación Ilmo. Sr. D. Jesús de la Osada García Académico de número

Me complace enormemente asumir el encargo de nuestro Presidente y la Junta de Gobierno de contestar a la Dra. Abian en su recepción como Académica de Número de esta corporación.

Este hecho tiene para mí unas características singulares, se trata de una persona a la que me une amistad y respeto, viene avalada por un magnífico Currículum, es una entusiasta compañera del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, brillante profesora de las Facultades de Medicina y Ciencias de la Universidad de Zaragoza y, en concreto, compartimos la impartición de la asignatura de Bioquímica Humana en el grado de Medicina.

Sirva esta ocasión para exponerles algunos de los méritos profesionales y científicos de la Doctora Abian, que le han hecho acreedora de la presente distinción. Méritos, que, sin lugar a duda, pondrá al servicio de esta Corporación junto con la vitalidad, iniciativa y talento que le caracterizan.

Mi relación con la profesora Abian se inició hace unos seis años cuando empecé a participar en la mencionada asignatura y en los comentarios de vigilancia de exámenes, surgió la coincidencia de formación farmacéutica. A raíz de este contacto inicial, nuestra trayectoria se ha mantenido gracias a compartir puntos de vista e intereses científicos.

Espero que estos años de amistad y compañerismo no me resten la objetividad necesaria para resaltar con lucidez los hechos más destacados que singularizan la carrera científica de la Dra Abian para que los que me escuchan puedan juzgar la exactitud de mis afirmaciones.

La profesora Abian realizó sus estudios universitarios en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Navarra donde se licenció en 1998. En 2003 con la Tesis Doctoral titulada: "Diferentes estrategias de estabilización de penicilina G acilasa frente a disolventes orgánicos. Aplicaciones en síntesis" obtuvo el título de Doctora en Bioquímica y Biología Molecular por la Universidad de Autónoma de Madrid con la calificación de sobresaliente "cum laude". Su trabajo constituyó un importante avance a lo que durante años ha sido una fructífera línea de investigación dirigida por el Dr. José Manuel Guisán en el Instituto de Catálisis del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Madrid. Fue allí donde inició su andadura científica-profesional. Al poco de terminar su tesis, se trasladó a Zaragoza donde fue profesora ayudante y contratada de investigación del Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos de la Universidad de Zaragoza. En 2008 participó en la convocatoria nacional de investigadores Miguel Servet del Instituto de Salud Carlos III y obtuvo una de las contadas plazas con adscripción al Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud. En este contrato permaneció durante seis años. Después de superar, de nuevo, la evaluación nacional obtuvo el nombramiento como investigadora Miguel Servet tipo II y posteriormente, en el año 2017 se incorporó como Investigadora senior nivel 2 adscrita al Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud. En esos años simultáneo su actividad investigadora con la faceta docente en la Universidad de Zaragoza. Esta actividad docente e investigadora le permitió obtener la acreditación nacional como profesor titular por la Agencia Nacional de Evaluación de la Calidad y Acreditación (ANECA) y el reconocimiento a la madurez científica de investigador (certificado I3) del Ministerio de Ciencia Tecnología y Universidades en 2019. Con ambos avales participó en una convocatoria de la

Universidad para profesores de excelencia y obtuvo su plaza de profesor titular de Universidad en 2021. Actividad que continua con singular éxito hasta la actualidad como Profesora Titular del área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Zaragoza.

Su actividad docente universitaria durante estos 20 años se ha reflejado en clases teóricas y prácticas de diversos cursos relacionados con la Bioquímica en los grados de Medicina y Biotecnología. Igualmente ha participado en diversas asignaturas del Máster de Biotecnología Cuantitativa de la Facultad de Ciencias. Ha supervisado diversos trabajos fin de grado, máster y Tesis Doctorales. Destaca la doctora Abian, entre otras cualidades positivas, por su tesón, dedicación y capacidad para transmitir ideas con extraordinaria eficacia e ilusión.

Su inquietud científica y su laudable deseo de ampliar sus conocimientos le han llevado a realizar estancias en el James Graham Brown Cancer Research Center (USA) y en el Max-Plank-Institut de Alemania. Durante estas estancias obtuvo abundantes resultados que fueron motivo de diversas publicaciones.

La Dra. Abian cuenta con financiación nacional desde 2015 como investigadora principal de proyectos competitivos de investigación como los financiados por el Instituto de Salud Carlos III, colabora con proyectos de la Agencia Estatal de Investigación, del Gobierno de Aragón y fundaciones privadas, donde ha demostrado siempre su responsabilidad y capacidad. A nivel internacional, en la actualidad es colaboradora de un proyecto europeo (MOSBRI) y es líder de uno de los grupos de trabajo de la red europea de Cooperation in Science and Technology "Identification of biological markers for prevention and translational medicine in pancreatic cancer". Cabe destacar su proyecto actual centrado en la biopsia líquida térmica para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con riesgo de patología digestiva tumoral como los cánceres de colon y páncreas.

Su trayectoria como investigadora y docente ha cristalizado en numerosos cursos y conferencias impartidas, además de más de 110 artículos de investigación recogidos en bases de datos internacionales. Cabe destacar entre ellos, sus trabajos publicados en revistas tan prestigiosas como Gastroenterology, J. Clin Investigation, European Journal of Medicinal Chemistry or Science Advances. Sus participaciones en congresos dentro y fuera de España son numerosas y en ellos ha intervenido con diversas ponencias. Todo ello ha sido reconocido con la concesión de varios sexenios de Investigación. Además, ejerce como revisora de diversas revistas, así como evaluadora para diversos organismos encargados de la financiación de proyectos de investigación.

Sería muy prolijo el detallar aquí los muchos y diversos méritos por los que la Doctora Abian ha sido elegida y les ruego acepten ese somero bosquejo como muestra. Otra prueba evidente de la capacidad intelectual de la Doctora Abian es el discurso que acabamos de escuchar, trazado con la firmeza de una mente serena y con la frase oportuna de quien sabe ver con profundidad y perspectiva.

En su discurso, la doctora Abian nos ha introducido a la búsqueda de nuevos fármacos tanto por selección de dianas como por nuevos métodos biofísicos que permitan enfoques de alto rendimiento. Nos ha trasmitido su experiencia con el adenocarcinoma ductal de páncreas. Un problema de salud no resuelto por falta de marcadores tempranos y de tratamientos específicos.

Hoy gracias a este discurso, somos conscientes del potencial farmacológico que proporciona su enfoque dirigido hacia la proteína nuclear 1 o NUPR1. Su hallazgo de un fármaco ya conocido que permite un reposicionamiento nos ha ilustrado este fascinante futuro que indudablemente facilitará el hallazgo de otros para un tipo de tumores que más precisa de nuevos enfoques.

Mi más sincera enhorabuena, por su discurso y por su trayectoria científica. Felicitación que quiero hacer extensiva a su familia.

En este momento de bienvenida, en nombre de todos los académicos de esta Academia, quiero manifestar el deseo de que su permanencia entre nosotros sea muy fructífera. Quienes le recibimos esperamos que su talento, tesón, meticulosidad, y entusiasmo encuentren entre nosotros el clima apropiado para el enriquecimiento de las tareas académicas y para un mayor prestigio de esta Corporación.

Profesora Dra. Abian, Olga ¡¡¡Muchas felicidades!!! Muchas gracias

Edición patrocinada por:

