



MEDICAMENTOS DISRUPTIVOS: APRENDIENDO DE LA EVOLUCIÓN

Carmen Alvarez Lorenzo

Discurso de ingreso en la Real Academia Gallega de Ciencias
Santiago de Compostela, 27 de septiembre de 2022

PREFACIO

Sr. Presidente da Real Academia Galega de Ciencias

Sras. y Sres. Académicos

Autoridades

Señoras y Señores

Ingresar en la Real Academia Gallega de Ciencias me produce una gran satisfacción, al tiempo que despierta en mi un sentimiento de responsabilidad. Satisfacción, por lo que la incorporación a esta institución tan prestigiosa supone de reconocimiento al trabajo que vengo desarrollando desde que comencé mi doctorado en la Facultad de Farmacia de la USC, y que no habría sido posible sin la contribución de numerosos colaboradores del entorno próximo y de muy diversos países del mundo, y en particular de todos los miembros del grupo I+D Farma. Responsabilidad, porque soy consciente de que esta distinción, que representa un importante impulso para seguir avanzando en mi desarrollo profesional, implica también el compromiso - que asumo gustosa- de participar en las actividades y contribuir a los objetivos de la Academia. Agradezco sinceramente a todos los académicos la benevolencia con que han valorado mis méritos para proponerme como miembro de número, y a la Profesora M^a José Alonso su disponibilidad para contestar al discurso. Pondré todo mi empeño en corresponder a la confianza depositada en mí.

En el discurso que voy a pronunciar a continuación intentaré mostrar algunos ejemplos de cómo la Naturaleza puede servir de fuente de conocimiento para el desarrollo de nuevos materiales, y en particular de medicamentos disruptivos, y de cómo este planteamiento ha sido el motor que ha impulsado mi investigación. He tenido la suerte de contar como mentores con dos grandes defensores de la observación de la naturaleza y de la interconexión de las ramas científicas como fuente de conocimiento, el Prof. Angel Concheiro en la Universidad de Santiago de Compostela y el Prof. Toyochi Tanaka en el Massachusetts Institute of Technology. También me siento afortunada por contar con el apoyo de investigadores con perfiles complementarios pertenecientes a la USC, algunos de ellos integrados en el recientemente creado iMATUS, y de otras universidades e instituciones, a los que no puedo dejar de reconocer su aportación a la hora de abordar nuevos retos y plantear proyectos pluridisciplinarios. Quiero dejar también constancia de la importante contribución de los numerosos estudiantes que han formado parte de nuestro grupo durante su etapa de doctorado o que se han incorporado temporalmente a él para llevar a cabo estancias pre- o posdoctorales, y que han hecho posible que, para mí, enseñar y aprender sean dos actividades difíciles de distinguir.

Finalmente quiero manifestar mi más profundo agradecimiento a mis padres, por iniciarme en el camino de las ciencias, por animarme a seguir mi vocación a la hora de elegir la orientación profesional y apoyarme incondicionalmente en todo momento, eso sí con el compromiso por mi parte de poner todo el esfuerzo necesario para hacer el trabajo lo mejor

posible, y a mi hermana y al resto de mi familia, por el apoyo y el estímulo que siempre han representado para mí.

Imagination is more important than knowledge.
The knowledge is limited, whereas imagination embraces the
entire world, stimulating progress, giving birth to evolution.
It is, strictly speaking, a real factor in scientific research.

Albert Einstein

"Cosmic Religion and Other Opinions and Aphorisms"

MEDICAMENTOS DISRUPTIVOS: APRENDIENDO DE LA EVOLUCIÓN

Introducción

Cuando se aplica un tratamiento farmacológico, el objetivo que se persigue es alcanzar y mantener en el lugar de acción la concentración de fármaco necesaria para que se produzca el efecto terapéutico buscado. Para optimizar la respuesta y minimizar los efectos colaterales, la exposición se debe restringir a los tejidos en los que se ubica la diana farmacológica. Sin embargo, esta aspiración se ha mantenido como una meta inalcanzable a lo largo de los años. De hecho, y a pesar de las importantes innovaciones en tecnología farmacéutica, con los medicamentos desarrollados hasta finales del siglo XX lo que se consigue es que el fármaco se incorpore al torrente sanguíneo, para que desde allí pueda acceder a su diana en la medida en que el grado de irrigación, la permeabilidad y la afinidad del tejido por el fármaco lo permitan. De acuerdo con este planteamiento, para la mayor parte de los medicamentos, la biodisponibilidad del fármaco, tanto en cantidad como en velocidad, se cuantifica a partir de los niveles en sangre, no en el tejido o en las células objetivo, y el rendimiento en cuanto a fracción de fármaco que se acumula en el entorno de la diana es bajo. Esto obliga a administrar dosis relativamente elevadas para que el fármaco pueda llegar en cantidad suficiente a los tejidos o a las células "correctas". Además, esta aproximación, que sirvió de base para desarrollar la inmensa mayoría de los medicamentos que se utilizan en la actualidad, plantea el problema de que no todos los pacientes responden igual en lo que se refiere a los efectos terapéuticos ni en la aparición de efectos secundarios.

El creciente interés por la medicina personalizada y el lanzamiento en 2015 de la *Precision Medicine Initiative* llevó a intensificar los esfuerzos dirigidos a poner a punto estrategias más avanzadas para el diseño de medicamentos. La medicina personalizada pone el foco en el ajuste de las actuaciones sanitarias tomando como base el perfil genético del paciente, pero prestando atención también al contexto social y a los conocimientos y los condicionamientos culturales y religiosos de cada persona. Se trata, por lo tanto, de una personalización que no se restringe a la terapia farmacológica (es decir, no se limita a los medicamentos), sino que abarca todas las etapas del cuidado de los pacientes. La medicina de precisión persigue el objetivo de poner a punto y aplicar las estrategias de prevención y los

tratamientos más efectivos para grupos de pacientes con características propias. Es decir, busca formar grupos de personas con características comunes para simplificar el proceso de implantación de tratamientos personalizados.

Una práctica médica que se remonta muchos años atrás como es la transfusión de sangre, se puede ver como precursora de la medicina de precisión. En 1901 se describió el sistema de ABO y en 1940 el sistema Rh; y tomando como base este conocimiento se pudo hacer una estratificación en grupos sanguíneos. Un paciente que necesita una transfusión recibe sangre de un donante de un grupo sanguíneo compatible con el suyo, no de cualquier donante elegido al azar. Pero sólo fue posible abordar una verdadera personalización de la medicina cuando en el año 2003 se consiguió secuenciar un genoma humano completo, es decir, se logró una información completa sobre el material genético del ADN de los cromosomas y de las mitocondrias.

Hoy en día se cuenta con el conocimiento científico y las herramientas tecnológicas que permiten llegar a las bases moleculares (es decir, al origen) de muchas enfermedades e identificar las variantes genéticas propias de cada persona (polimorfismos genéticos) que determinan la respuesta a los tratamientos. El ciclo de la medicina de precisión se inicia con la toma de muestras de tejido del paciente, la secuenciación del ADN y el análisis de los datos con ayuda de superordenadores y procedimientos de inteligencia artificial. De esta manera se consigue hacer un diagnóstico más preciso, establecer un posible tratamiento con dosis óptimas, minimizando los efectos secundarios, e implementar controles y estudios de seguimiento personalizados para curar la enfermedad y prevenir recaídas. Lo que aporta realmente la medicina de precisión es una guía de decisión mejorada para identificar el tratamiento más efectivo en cada momento para cada paciente y, por lo tanto, para mejorar la calidad de la atención sanitaria, evitando pruebas diagnósticas y terapias innecesarias. Se busca potenciar la medicina curativa, actuando sobre el origen de la enfermedad, y la medicina preventiva para mejorar la calidad de vida de los pacientes, atendiendo a las tendencias demográficas actuales de envejecimiento poblacional. Para facilitar los avances en esta dirección, las agencias reguladoras están haciendo un gran esfuerzo para agilizar el proceso de incorporación a la terapéutica de nuevos fármacos con mecanismos de acción innovadores para un amplio abanico de patologías.¹

Los fármacos carecen de capacidad para auto-enviarse a través del organismo hacia su lugar de acción, lo que plantea un problema adicional. Un medicamento personalizado no sólo debe incorporar el fármaco más adecuado y en la dosis requerida para cada paciente, sino que también tiene que ser capaz de cederlo en el lugar preciso y a la velocidad adecuada en función de cómo progresa el estado de salud de ese paciente. Esto obliga a que, a diferencia de los medicamentos de cesión sostenida que se pre-programan en el momento de la fabricación para

¹ <https://elglobal.es/industria/la-innovacion-disruptiva-sobresale-entre-los-datos-de-aprobaciones-de-ema-y-fda/>; acceso Agosto 2022.

que en todos los pacientes el fármaco se ceda a la misma velocidad, idealmente los medicamentos personalizados deberán tener capacidad para activar o interrumpir la cesión en función de determinados condicionantes fisiopatológicos. Para responder a este reto, indudablemente complejo, no son suficientes los avances incrementales, sino que se requieren innovaciones disruptivas, es decir planteamientos y diseños que provoquen una transformación profunda de las funcionalidades de los medicamentos.

Los tratamientos farmacológicos podrán verse notablemente beneficiados con el diseño de medicamentos disruptivos cuando los fármacos:

- a) presentan características fisicoquímicas muy desfavorables (baja solubilidad o gran tamaño molecular), como ocurre con muchas moléculas innovadoras de síntesis química y también con la gran mayoría de los nuevos fármacos biotecnológicos;
- b) son muy inestables, como los que se usan en terapia génica, que requieren protección frente a los numerosos riesgos a los que se ven expuestos antes y después de su incorporación al torrente circulatorio, y que además deben acceder al interior del núcleo celular;
- c) presentan una toxicidad elevada (por ejemplo, los fármacos antineoplásicos) y, por lo tanto, deben ser dirigidos selectivamente a su diana minimizando la exposición de los tejidos sanos;
- d) su perfil de cesión debe ajustarse a los niveles de ciertos biomarcadores, que son indicadores de la evolución de la enfermedad o dependen de los ritmos circadianos.

Los medicamentos avanzados se conciben para comportarse no solo como un "hardware" que facilite el manejo y la administración del fármaco y regule la cesión local o sistémica, sino también como un "software" que detecte el microambiente en el que se administra o a través del cual el fármaco se tiene que desplazar en su camino hacia el lugar de acción, con el fin de ayudarlo a superar barreras y adecuar el proceso de liberación a las demandas terapéuticas. La nanociencia y la nanotecnología han abierto un amplio abanico de posibilidades a la hora de dotar de nuevas funcionalidades a los medicamentos, pero estas herramientas facilitadoras necesitan tanto de criterios de diseño disruptivos como de materiales avanzados que hagan posible que el fármaco llegue inalterado a su lugar de acción, en la cantidad y a la velocidad adecuadas según la progresión de la enfermedad. La Naturaleza ha evolucionado durante miles de millones de años y ha desarrollado una miríada de estrategias efectivas para ayudar a los organismos a adaptarse a su entorno utilizando mecanismos y biomateriales muy versátiles. Los mecanismos fisiológicos de transporte de sustancias y de reconocimiento de moléculas específicas que actúan en el ser humano pueden servir de modelo para afrontar un cambio de paradigma en el diseño de medicamentos.

Los cambios evolutivos que se han producido en las especies animales, y en particular en el ser humano, han dado lugar a sistemas de transporte y reconocimiento molecular que se basan en unos pocos aminoácidos, sacáridos y lípidos. No obstante, las moléculas biológicas pueden desempeñar funciones increíblemente complejas, adoptando arquitecturas que son el resultado del correcto ensamblaje de componentes que interactúan con alta especificidad en escalas de longitud extremadamente pequeñas.²

Tomando como modelo los materiales y los procesos biológicos, la Biomimética se ha conformado ya como un campo científico emergente que aborda el estudio de cómo la Naturaleza diseña, procesa y ensambla/desensambla bloques de construcción moleculares para fabricar híbridos polímero-mineral y materiales blandos de alto rendimiento, y aplica este conocimiento para desarrollar nuevas moléculas y materiales con propiedades únicas.³ La Biomimética requiere un planteamiento investigador altamente inter y multidisciplinar y su impacto en ingeniería, biología y ciencia de materiales es cada vez más importante (Figura 1).⁴ En la actualidad se publican trabajos científicos sobre aplicaciones de la Biomimética, que incluye los términos bioinspirado y bioingeniería, en más de 160 revistas internacionales de los ámbitos de la ingeniería, informática, robótica, biónica, biomedicina, física, arte y ciencias sociales. En el año 2010 se publicaron más de 4000 artículos, una cifra que se duplicó en 2019. Desde la antigüedad el ser humano ha mirado hacia la Naturaleza para intentar resolver problemas complejos -el célebre mito de Dédalo e Ícaro es un buen ejemplo de ello-, y la Biomimética es la forma en la que esta atracción innata se manifiesta con el nivel de conocimiento del siglo XXI.

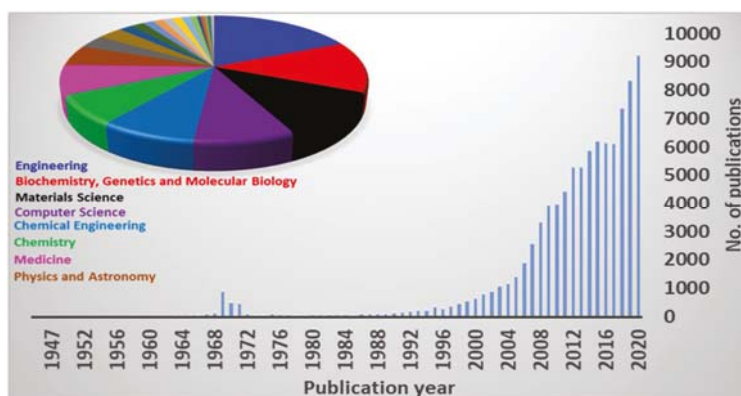


Figura 1. Publicaciones científicas que contienen en el título, resumen o palabras clave los términos “biomimicry, biomimetics, biomimicking, bioengineering, bioengineered, bioinspired, bioinspiring, o bioinspiration”. El gráfico de sectores muestra los campos en los que la Biomimética tiene más impacto. Datos tomados de Scopus en Diciembre de 2020. Reproducido de Rahamim y Azagury (2021).⁴

² R.S. Tu, M. Tirrell. *Bottom-up design of biomimetic assemblies*. Adv. Drug Del. Rev. 56:1537–1563 (2004).

³ B. Bhushan. *Biomimetics: lessons from nature – an overview*. Phil. Trans. R. Soc. A 367:1445–1486 (2009).

⁴ V. Rahamim, A. Azagury. *Bioengineered biomimetic and bioinspired noninvasive drug delivery systems*. Adv. Funct. Mater. 31:2102033 (2021).

Las posibilidades de que se dispone hoy en día para imitar estructuras de revestimientos y capas de camuflaje, reconocimiento molecular selectivo, componentes sensibles a estímulos e incluso determinados movimientos están teniendo un gran impacto en el diseño de medicamentos avanzados.^{5,6} La aplicación de los principios biomiméticos no sólo es útil para desarrollar medicamentos con estructuras y/o funcionalidades bioinspiradas, sino que también sirve de base para el diseño de procedimientos novedosos de preparación de medicamentos. Hoy en día la química ofrece millones de monómeros potencialmente útiles como componentes de macromoléculas sintéticas; la clave para generar sistemas biomiméticos está en encontrar las secuencias adecuadas.

Para comprender como se puede aplicar la Biomimética al diseño de medicamentos disruptivos, resulta muy útil hacer una reflexión sobre el origen de la vida y la evolución de los materiales que constituyen los seres vivos.

El origen de la vida como referencia en el diseño de medicamentos disruptivos

La Tierra se formó hace unos 4500 millones de años y la vida comenzó probablemente hace 3500-3900 millones de años.⁷ El origen de la vida y de la diversidad de especies que poblaron y pueblan la Tierra ha sido objeto de intensos debates, que contribuyeron decisivamente al avance del conocimiento. Por ejemplo, Louis Pasteur, investigando acerca de las causas de la contaminación por microorganismos, demostró en 1861 que los microorganismos no se forman espontáneamente en un caldo de cultivo, refutando así la teoría de la generación espontánea y demostrando que todo ser vivo procede de otro ser vivo anterior (*omne vivum ex vivo*).⁸ Es verdad que los hallazgos de Pasteur no sirvieron para identificar el origen de la vida en la Tierra, pero tuvieron importantes consecuencias para el aprovechamiento de los procesos de fermentación y el control de las enfermedades infecciosas.

Coincidiendo en el tiempo con los trabajos de Pasteur, los estudios de Charles Darwin y Alfred Russel Wallace sobre la evolución de las especies, presentados en la Sociedad Linneana de Londres en 1858, abrieron un nuevo camino para la ciencia. Darwin definió evolución como "descendencia con modificación", es decir, propuso la idea de que las especies proceden de un ancestro común, cambian en el transcurso del tiempo y dan origen a nuevas especies. La evolución biológica tiene lugar en tres etapas: reproducción, variación y selección. Lo que impulsa la evolución es la "selección natural", es decir, los organismos con rasgos que favorecen la supervivencia en unas determinadas condiciones ambientales tienen mayor probabilidad de

⁵ C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro. *Bioinspired drug delivery systems*. Curr. Opin. Biotech. 24: 1167-1173 (2013).

⁶ C. Sabu, C. Rejo, S. Kotta, K. Pramod. *Bioinspired and biomimetic systems for advanced drug and gene delivery*. J. Control. Release 287:142-155 (2018).

⁷ S. Weinberg. *The first three minutes: A modern view of the origin of the Universe*. Basic Books, New York, 1988.

⁸ L. Pasteur. *Fermentations et générations dites spontanées*. Masson et Cie., Paris, 1922.

reproducirse y de transmitir sus características a la descendencia. De acuerdo con las observaciones de Darwin, las poblaciones o bien se adaptan y se vuelven más adecuadas a su entorno con el paso del tiempo, o bien tienen que migrar a entornos más favorables para evitar el riesgo de desaparecer. Esta teoría implica la existencia de un ancestro común, que tras eventos de ramificación repetidos, dio lugar a todas las nuevas especies, formando un árbol filogenético (Figura 2).⁹ En la actualidad, se considera que este ancestro común es un organismo unicelular que recibe el nombre de LUCA, acrónimo de *Last Universal Common Ancestor*, y cuya fisiología y hábitat se conocen sólo parcialmente.^{10,11} No obstante, y aunque LUCA sea nuestro antepasado más antiguo, no tuvo por qué ser, necesariamente, ni el primero ni, en su momento, el único ser vivo de la Tierra, sino que al ser el mejor adaptado de todos para sobrevivir y perpetuarse, se convirtió en el precursor de todos los seres vivientes que hoy poblamos el planeta.

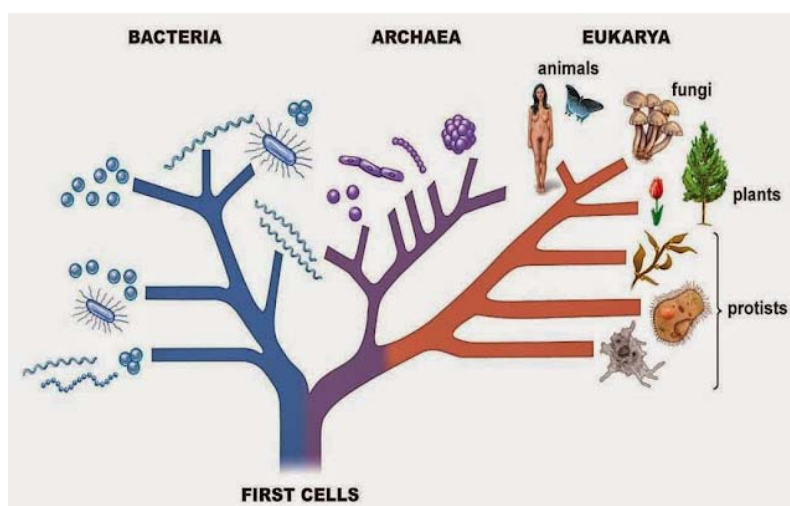


Figura 2. Árbol filogenético de la vida en la Tierra. Aparecen representados los 3 dominios reconocidos por la ciencia en la actualidad: bacteria, archaea y eukarya con sus 6 "reinos" correspondientes: bacteria, archea, animalia, fungi, plantae y protistas. Tomado de Picón (2017)¹².

Todas las formas de vida conocidas se basan en la misma organización bioquímica fundamental: información genética codificada en el ADN, transcrita en ARN y traducida en proteínas por ribosomas (muy similares), con ATP, NADPH y otros como fuentes de energía. En todos los organismos hay 23 proteínas que actúan como enzimas llevando a cabo funciones básicas como la replicación del ADN. El hecho de que exista un solo conjunto de enzimas es una prueba convincente de una sola ascendencia. Se han identificado 6.331 genes comunes a todos los animales vivos; estos pueden haber surgido de un solo ancestro común que vivió hace unos

⁹ D.J. Futuyma. *Evolutionary Biology* (3ª edición). Sinauer Associates Inc., 1998, pp. 108–110.

¹⁰ P. Forterre. *Displacement of cellular proteins by functional analogues from plasmids or viruses could explain puzzling phylogenies of many DNA informational proteins*. *Molecular Microbiol.* 33: 457–465 (1999).

¹¹ M. Weiss, F. Sousa, N. Mrnjavac, S. Neukirchen, M. Roettger, S. Nelson-Sathi, W.F. Martin. *The physiology and habitat of the last universal common ancestor*. *Nat. Microbiol.* 1:16116 (2016).

¹² C. Picón. <https://murciascienceeducation.blogspot.com/2017/12/la-evolucion-de-las-especies-parte-ii-3.html> (2017); acceso Agosto 2022.

mil millones de años durante el Precámbrico, pero ¿cómo surgió ese pre-organismo de forma abiótica, es decir, antes de que hubiera vida?.

En las décadas de 1920 y 1930, Alexander Oparin¹³ y Jack Haldane¹⁴ propusieron de forma independiente un escenario en el que la vida habría surgido poco a poco a partir de moléculas inorgánicas, es decir como resultado de una evolución química que con el paso del tiempo llevó a que se produjesen cambios en moléculas o en sistemas químicos (grupos de moléculas que interactúan entre sí). Primero, se formarían “unidades estructurales” como aminoácidos, nucleótidos y azúcares simples, a partir de agua, sustancias inorgánicas y gases presentes en la atmósfera primitiva de la Tierra.¹⁵ En ese caldo rico en nutrientes o “sopa de monómeros”, las unidades estructurales se combinarían formando cadenas más o menos largas, es decir polímeros de diferente complejidad como proteínas y cadenas de ARN y ADN, que ya podrían desempeñar funciones sencillas tales como actuar como enzimas capaces de participar en distintas reacciones, codificar información hereditaria y posiblemente replicarse. El proceso de polimerización sería la etapa clave en la evolución biológica, pero al igual que en el símil del huevo y la gallina, lo que sigue siendo una incógnita es qué fue primero: la molécula de ADN con información para generar una determinada proteína, o la proteína que dio lugar a una molécula de ADN, o quizá un ARN con información capaz de codificar la formación de ADN (Figura 3).¹⁶

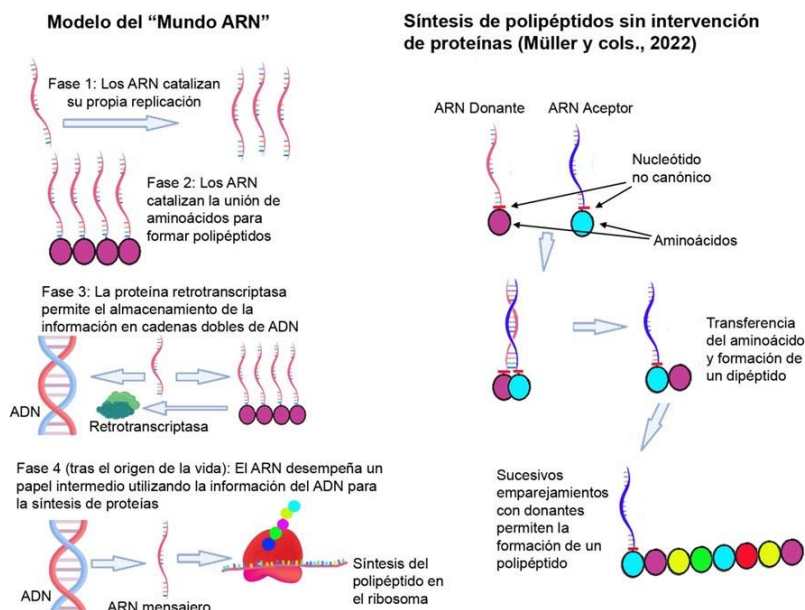


Figura 3. Esquema de las fases hipotéticas por las que atravesó el mundo ARN para dar lugar a ADN y proteínas. A la derecha, esquema del proceso de síntesis de péptidos¹⁶ que desarrolla de forma experimental la fase 2 del mundo ARN. Tomado de Muñoz-Chapulí (2022).¹⁷

¹³ A.I. Oparin. *The Origin of Life* (ed. J.D. Bernal). Weidenfeld and Nicholson, 1967, pp. 199–234.

¹⁴ J.B.S. Haldane. *Origin of life*. *Rationalist Annu.* 148:3–10 (1929).

¹⁵ <https://bioprinciples.biosci.gatech.edu/module-1-evolution/origin-of-life/>; acceso Agosto 2022.

¹⁶ F. Müller, L. Escobar, F. Xu, E. Węgrzyn, M. Nainytė, T. Amatov, C.Y. Chan, A. Pichler, T. Carell. *A prebiotically plausible scenario of an RNA–peptide world*. *Nature* 605:279–284 (2022).

¹⁷ R. Muñoz-Chapulí. https://naukas.com/2022/07/07/arn-peptidos-y-el-origen-de-la-vida/?utm_source=dlvr.it&utm_medium=twitter&s=03 (2022); acceso Agosto 2022.

Finalmente, se formarían protocélulas, es decir células primitivas, como resultado del autoensamblaje de componentes anfífilos para formar una membrana semipermeable, similar a la bicapa lipídica de las actuales membranas biológicas, y en cuyo interior se podrían concentrar las moléculas sencillas junto con los polímeros haciendo las reacciones más eficientes y regulables. Estas vesículas primitivas se comportarían como gotas coacervadas autocatalíticas.¹⁸ La membrana permitiría crear gradientes de concentración de iones y otras sustancias entre el exterior y el interior de la vesícula, la membrana podría crecer por adición de más lípidos, y la vesícula se podría dividir por rotura de la membrana. En el ámbito de la evolución química, se postula que la reproducción típica de un organismo vivo fue, en los inicios, un proceso muy simple que se denomina “producción repetitiva”, que tuvo su origen en los cambios cíclicos de energía que ocurren en la Tierra (ciclos de luz natural, cambios de temperatura, subida y bajada de mareas). Estos cambios cíclicos pueden producir nuevas moléculas, polímeros y vesículas capaces de desarrollar funcionalidades nuevas a medida que interactúan con su entorno. La creación de vesículas distintas proporcionaría nuevos ambientes que facilitarían la evolución química. Aunque las vesículas no se pueden considerar como seres vivos porque carecen de capacidad para reproducirse por sí mismas como lo hacen las células, se asume que bajo determinadas circunstancias la evolución química habría conducido a sistemas capaces de reproducirse abriendo el camino hacia la evolución biológica. La hipótesis del mundo del ARN sugiere que el primer paso hacia la vida fue un ARN que se autoduplicaba.^{15,19}

Del análisis de los fenómenos que dieron lugar a las células y a los materiales que hacen posible su funcionamiento se puede extraer información clave para plantear el diseño de medicamentos disruptivos.²⁰

-En la formación de biomacromoléculas sólo interviene una variedad muy limitada de moléculas pequeñas, principalmente 22 aminoácidos y 5 bases nitrogenadas.

-La amplísima diversidad de proteínas, ADN y ARN se debe a la unión covalente de esas pequeñas unidades siguiendo distintos patrones para dar lugar a cadenas poliméricas más complejas.

-Las biomacromoléculas necesitan plegarse o ensamblarse entre ellas para desempeñar sus funciones; por ejemplo, las proteínas adoptan una conformación espacial que hace posible el reconocimiento de sustratos específicos y el desarrollo de una reacción determinada, mientras que los fosfolípidos se ensamblan en bicapas, con participación de otros lípidos y glucoproteínas, para formar la membrana externa de la célula y las membranas de los compartimentos interiores.

¹⁸ M. Matsuo, K. Kurihara. *Proliferating coacervate droplets as the missing link between chemistry and biology in the origins of life*. Nature Comm. 12:5487 (2021).

¹⁹ <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/natural-selection/origins-of-life-on-earth/a/hypotheses-about-the-origins-of-life>; Agosto 2022.

²⁰ A.Yu. Grosberg, A.R. Khokhlov. *Giant Molecules: here, there and everywhere*. Academic Press, San Diego, 1997.

-La organización espacial de las biomacromoléculas depende en gran medida del balance de las interacciones intra- e inter-moleculares reversibles que se establecen entre distintos grupos funcionales y de la afinidad por el medio acuoso en el que se encuentran. Un pequeño cambio en la secuencia de aminoácidos, el reemplazo de uno por otro de hidrofilia distinta o una alteración en una variable física (pH, luz, temperatura) o química (presencia de otras moléculas en el medio) puede dar lugar a cambios conformacionales que activen o desactiven esa funcionalidad de manera reversible o que provoquen alteraciones irreversibles.

-El análisis bioinformático de miles de enzimas ha revelado que la secuencia de los pocos aminoácidos que conforman su centro activo es crítica para el correcto reconocimiento del sustrato, mientras que pequeños cambios en otros aminoácidos no tienen trascendencia para su funcionalidad. Es decir, en las enzimas que deben realizar las mismas funciones, hay una secuencia común que persiste y se trasmite, pero el resto de los aminoácidos no sigue un patrón definido y su función parece limitarse a hacer posible que se mantenga la estructura terciaria. Esto sugiere que las primeras proteínas tenían secuencias aleatorias, que experimentaron pequeños cambios en el curso de la evolución, persistiendo las más eficaces para desempeñar alguna función. Por lo tanto, a nivel molecular, la evolución se reduce a cambios en la estructura primaria de los biopolímeros.

-La energía conformacional de la doble hélice del ADN no depende de la secuencia de bases, ya que son mutuamente complementarias, lo que facilita que se produzcan cambios en la secuencia para dar lugar a seres vivos mejor adaptados a cada ambiente, sin alterar el mínimo de energía conformacional. Por el contrario, las estructuras secundaria y terciaria de las proteínas están fuertemente condicionadas por su estructura primaria, lo que ha facilitado la evolución hacia proteínas muy diferentes que realizan funciones distintas ya que sus conformaciones secundaria y terciaria en el mínimo de energía son diferentes.

Las posibles combinaciones de sólo 20 aminoácidos distintos para constituir proteínas de tamaño medio, formadas por una secuencia de 200 aminoácidos, sería de 20^{200} , es decir 10^{260} . Este número es extraordinariamente grande y de haber ocurrido hubiera tenido como consecuencia que la superficie de la Tierra se recubriera con una capa de proteínas de más de 10 Km de espesor, lo que ciertamente no sucedió. Se considera que las secuencias de aminoácidos que “sobrevivieron” fueron las de proteínas con una estructura terciaria capaz de catalizar procesos, incluyendo su autocatálisis o “producción repetitiva”, y que utilizaron de manera más rápida los aminoácidos disponibles.

Desde un punto de vista termodinámico, las proteínas y las conformaciones que persisten son las que se encuentran en el mínimo de energía termodinámica. Cualquier otra proteína o conformación es inestable y desaparece en el transcurso de la evolución. Si se establece un símil con otros procesos evolutivos como el del lenguaje, de todas las posibles palabras creadas más o menos al azar las que persisten son las más útiles y fáciles de pronunciar,

y unas palabras caen en desuso en beneficio de otras que son las que se extienden entre distintos grupos poblacionales. Del mismo modo que las palabras que persisten son las que más se memorizan, las conformaciones de los polímeros que permanecen son las que se han memorizado durante el proceso evolutivo. Para ello tienen que cumplir el requisito de encontrarse en el mínimo de energía o de poder volver reversiblemente a él. Por ejemplo, a una proteína que actúe como enzima, el correcto plegamiento en una conformación específica con una distribución de carga dada, le permite reconocer moléculas específicas y establecer interacciones bien definidas. Las proteínas encuentran el plegamiento necesario para el reconocimiento de la sustancia de interés entre un número casi infinito de conformaciones porque tienden a su mínimo de energía.

En los apartados siguientes se muestra como los mecanismos de la evolución química y de la evolución biológica pueden servir de guía para el desarrollo de sistemas disruptivos basados en hidrogeles capaces de realizar funciones propias de seres vivos, como el reconocimiento molecular específico y la sensibilidad a estímulos. El objetivo último es diseñar medicamentos con carga y cesión mediadas por mecanismos de afinidad, y medicamentos inteligentes capaces de regular la cesión del fármaco en respuesta a estímulos concretos.

Reconocimiento molecular y medicamentos regulados por afinidad

En los procedimientos de preparación de medicamentos convencionales y de nanomedicamentos, el fármaco se combina con excipientes evitando el establecimiento de interacciones intensas. A través de un mecanismo preestablecido, como puede ser la disolución o erosión de la matriz de la forma de dosificación o del nanotransportador, el fármaco se cede al medio biológico a una velocidad predefinida y el proceso de cesión es irreversible, es decir, una vez que el fármaco abandona el medicamento no puede volver a él. Diseñar un medicamento avanzado con capacidad de reconocimiento molecular específico podría abrir un enorme abanico de posibilidades ya que permitiría:

- parar la cesión y recaptar el fármaco cuando se acumule en cantidad excesiva en una determinada zona;

- conseguir que la cesión del fármaco ocurra por desplazamiento competitivo cuando está presente en el medio un biomarcador (que puede ser una molécula relacionada con la evolución de la enfermedad) con mayor afinidad que la del fármaco por el entramado polimérico;

- dotar a productos sanitarios basados en entramados poliméricos, como las lentes de contacto y numerosos implantes, de capacidad para actuar como plataformas para cesión localizada de fármacos, de manera que se consiga una sinergia entre los mecanismos físicos y los farmacológicos en la prevención o el tratamiento de patologías o en la regeneración de tejidos.²¹

²¹ C. Alvarez-Lorenzo, S. Anguiano-Igea, A. Varela-Garcia, M. Vivero-Lopez, A. Concheiro. *Bioinspired hydrogels for drug-eluting contact lenses*. Acta Biomater. 84: 49-62 (2019).

Para diseñar entramados poliméricos con capacidad de reconocimiento molecular específico, se pueden crear receptores artificiales que imiten las funcionalidades de los receptores biológicos. Los receptores biológicos, las enzimas y los anticuerpos presentan una conformación espacial que es crítica para el reconocimiento. Tal conformación viene dada por la secuencia de las unidades estructurales; es decir, de aminoácidos. De manera similar, para que un entramado sintético pueda reconocer una molécula de interés hay que regular la unión y la orientación de los componentes del receptor.

La tecnología de impresión molecular surgió hace unos 50 años para preparar materiales sintéticos (abióticos) capaces de imitar la unión selectiva de moléculas diana que es característica de anticuerpos y enzimas.²² La impresión molecular se caracteriza por cuatro etapas principales: i) incorporación de la sustancia que se quiere reconocer a la “sopa de monómeros”, para que las moléculas de esa sustancia actúen como “moldes” o “plantillas” e induzcan el reordenamiento espacial de los monómeros. Este reordenamiento depende de la intensidad de las interacciones monómero-molécula de interés, de manera que los monómeros con alta afinidad (que se denominan monómeros funcionales) se posicionan cerca de las moléculas molde mientras que los de menor afinidad se mantienen alejados; ii) polimerización en presencia de una elevada proporción de monómeros reticulantes, que debe conducir a hacer permanente la disposición espacial; iii) extracción de las moléculas molde para “revelar” huecos complementarios en la red polimérica impresa o *imprinted*; y iv) recaptación selectiva de la sustancia de interés cuando el polímero impreso entre de nuevo en contacto con esa sustancia (Figura 4). Estos cuatro pasos se pueden llevar a cabo por diversos procedimientos.

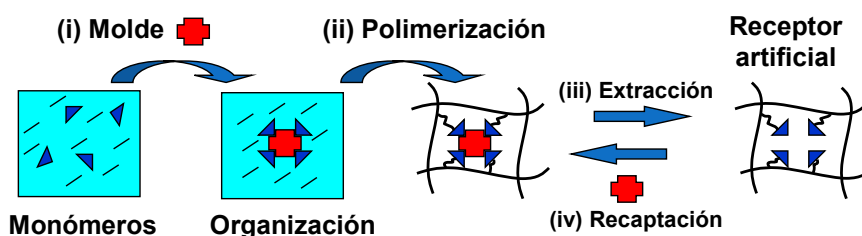


Figura 4. Esquema de un proceso de impresión molecular para obtener un entramado polimérico *imprinted*.

El protocolo clásico de impresión molecular conduce a materiales poliméricos muy rígidos y bastante hidrofóbicos que, una vez eliminadas las moléculas molde, presentan cavidades con el tamaño y los grupos químicos más adecuados para acoplar nuevamente las moléculas de interés. Es como si se hiciera un grabado en madera o en piedra; las moléculas a reconocer encajan o no encajan pero la afinidad apenas se puede regular. Estos polímeros de impresión molecular (MIPs) rígidos son útiles para una amplia variedad de aplicaciones analíticas

²² A.G. Mayes and M.J. Whitcombe. *Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers*. Adv. Drug Deliv. Rev. 57:1742 (2005).

y tecnológicas, pero para las aplicaciones biomédicas *in vivo*, la rigidez es una importante desventaja.

Para solventar esta limitación y crear receptores en dominios no rígidos y, por lo tanto, no físicamente estables, a principios de la década de los 2000, nuestro grupo de investigación aplicó un enfoque inspirado en los procesos de reconocimiento *in vivo*.²³ Como ya se ha señalado, las proteínas son capaces de reconocer moléculas específicas y establecer interacciones bien definidas porque, aunque experimenten cambios en su conformación, tienen tendencia a recuperar su estado nativo, es decir, su plegamiento correcto en la conformación de mínimo de energía. De la misma manera, para obtener un hidrogel flexible con capacidad de reconocimiento molecular específico hay que diseñarlo de manera que la conformación más estable sea aquella en la que reconozca la molécula de interés, y las interacciones entre esa molécula y el hidrogel se produzcan a través de enlaces relativamente débiles con participación de varios grupos funcionales, tal como ocurre en las enzimas. La memorización termodinámica de ese estado nativo de mínima energía impulsará a la red polimérica a plegarse siempre en la misma conformación después de haberse deformado mecánicamente, por hinchamiento o por contracción. Siguiendo esta aproximación biomimética, nuestro grupo de investigación adaptó la metodología de impresión molecular para crear receptores sintéticos para fármacos en hidrogeles sensibles a estímulos y también en entramados poliméricos muy flexibles, como las lentes de contacto.²⁴

Los colirios y, en general, los medicamentos tópicos oculares presentan una efectividad limitada puesto que el fármaco instilado se elimina muy rápidamente a través de los numerosos mecanismos de defensa con que cuenta el ojo. Las lentes de contacto podrían actuar como plataformas de cesión sostenida del fármaco hacia la córnea y la esclera, facilitando la penetración en estos tejidos e incluso haciendo posible que se alcance el segmento posterior del ojo. El principal obstáculo radica en que las lentes de contacto comerciales que se utilizan para corregir problemas de visión carecen de afinidad por los fármacos que se usan en oftalmología, por lo tanto, es necesario crear en su estructura cavidades que actúen como "receptores" capaces de alojar el fármaco de interés.

Las lentes de contacto son entramados poliméricos muy poco reticulados y se deforman con facilidad para adaptarse a la curvatura ocular externa de cada usuario, por lo que es muy probable que se distorsione la conformación de los receptores y pierdan su capacidad de reconocimiento. Por ello, esta inestabilidad física se tiene que suplir con una estabilidad termodinámica elevada; es decir, los receptores deben memorizar las características estructurales del fármaco y experimentar un "ajuste inducido" en presencia de éste,

²³ C. Alvarez-Lorenzo, O. Guney, T. Oya, Y. Sakai, M. Kobayashi, T. Enoki, Y. Takeoka, T. Ishibashi, K. Kuroda, K. Tanaka, G. Wang, A.Yu. Grosberg, S. Masamune, T. Tanaka. *Polymer gels that memorize elements of molecular conformation*. *Macromolecules* 33: 8693-8697 (2000).

²⁴ C. Alvarez-Lorenzo, H. Hiratani, J.L. Gómez-Amoza, R. Martínez-Pacheco, C. Souto, A. Concheiro. *Soft contact lenses capable of sustained delivery of timolol*. *J. Pharm. Sci.* 91: 2182-2192 (2002).

recuperando la misma conformación que adquirieron durante la polimerización. Al igual que ocurre en los procesos de reconocimiento *in vivo*, la unión debe ser selectiva y suficientemente estable para que el fármaco se incorpore al entramado polimérico, pero también reversible como ocurre en las enzimas, para que el hidrogel pueda ceder el fármaco a la velocidad adecuada.

La selección de los monómeros funcionales es un paso crítico en la preparación de las lentes de contacto medicadas, ya que son pocos los que dan lugar a entramados biocompatibles. Uno de los monómeros funcionales más ensayados es el ácido metacrílico (MAA), que cuenta en su estructura con un grupo ácido carboxílico; un grupo funcional que también está presente en algunos aminoácidos (como aspártico y glutámico) y muchos polímeros naturales (por ej., ácido hialurónico, heparina, alginato, pectina). Utilizando MAA y tras un estudio exhaustivo del efecto de la relación molar monómero funcional/fármaco, de los restantes monómeros y del grado de entrecruzamiento, se obtuvo por primera vez una lente de contacto capaz de incorporar timolol (utilizado en el tratamiento del glaucoma) y cederlo de manera sostenida en fluido lacrimal.²⁵ En la figura 5 se muestran los niveles de timolol en fluido lacrimal de conejo, cuando se administró el fármaco en un colirio comercial (línea verde), en un colirio preparado con la misma dosis que la lente imprinted (línea negra), en una lente de contacto convencional (línea roja) y en una lente de contacto imprinted (azul). Las dos lentes tenían la misma composición monomérica y la única diferencia fue el ordenamiento espacial de los monómeros para crear los receptores artificiales en la lente de contacto imprinted.

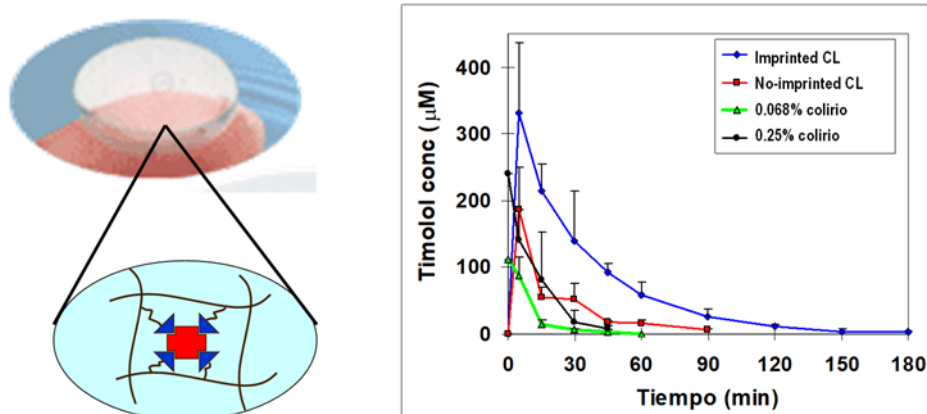


Figura 5. Niveles de timolol en fluido lacrimal tras la instilación de una gota de colirio y durante el uso de lentes de contacto convencionales (no-imprinted) y modificadas por impresión molecular (imprinted). Adaptado de Hiratani y col. (2005).²⁵

Para identificar los monómeros funcionales más adecuados para cada fármaco y establecer la proporción en que deben usarse, se puede acudir a una amplia variedad de técnicas analíticas y de modelado computacional, pero aun así el procedimiento conserva un marcado componente de prueba y error ya que es muy difícil simular tanto las condiciones de

²⁵ H. Hiratani, A. Fujiwara, Y. Tamiya, Y. Mizutani, C. Alvarez-Lorenzo. *Ocular release of timolol from molecularly imprinted soft contact lenses*. Biomaterials 26: 1293-1298 (2005).

polimerización en las que se van a crear los receptores artificiales como el entorno fisiológico en el que debe actuar el hidrogel.

La aplicación de estrategias biomiméticas, basadas en ingeniería inversa, permite abordar la selección de los monómeros funcionales con criterios más racionales. En la actualidad los fármacos se diseñan buscando un ajuste lo más perfecto posible a su receptor farmacológico. La estrategia bioinspirada consiste en identificar los aminoácidos y su disposición espacial en el sitio activo (es decir, el lugar donde el fármaco se une a la biomacromolécula) y, a continuación, imitar ese sitio activo en receptores sintéticos en la estructura de la lente de contacto. De esta forma la estructura del receptor en la biomacromolécula natural sirve como guía para diseñar el receptor artificial utilizando monómeros que contienen grupos químicos similares a los de los aminoácidos del sitio activo del receptor natural. Si el fármaco actúa es porque interacciona con afinidad alta, pero de manera reversible con su diana. De la misma manera las lentes de contacto deben tener una afinidad elevada por el fármaco para incorporarlo, pero la interacción debe ser reversible para que puedan cederlo.

Utilizando esta estrategia se ha conseguido replicar el centro activo de la anhidrasa carbónica II humana en lentes de contacto para cargar su inhibidor acetazolamida, que es un fármaco antiglaucoma.²⁶ De manera análoga, para incorporar el fármaco antihistamínico olopatadina se utilizaron monómeros con los mismos grupos funcionales que los aminoácidos que conforman el receptor H1 de la histamina. Se prepararon hidrogeles con distintas combinaciones de monómeros, se verificó su biocompatibilidad y con algunos de ellos se consiguió incrementar de una manera muy notable la incorporación de olopatadina, lo que permitió atenuar la reacción alérgica.

Profundizando en las posibilidades que ofrecen las estrategias bioinspiradas, hemos desarrollado lentes de contacto medicadas útiles para la prevención y el tratamiento de los efectos de la diabetes a nivel ocular. En condiciones de hiperglucemia, la transformación de glucosa en energía y ácido pirúvico se satura, entra en funcionamiento la ruta de la aldosa reductasa y se produce sorbitol, que causa daño osmótico celular. Imitando la conformación de la aldosa reductasa, se prepararon lentes de contacto con capacidad para reconocer el fármaco inhibidor epalrestat y cederlo a una velocidad adecuada para que se acumule en la córnea y se prevenga la opacificación del cristalino.²⁷

Otro ámbito de aplicación de los mecanismos de reconocimiento molecular es el diseño de superficies con capacidad para inhibir el desarrollo de biofilms de microorganismos. Un problema especialmente grave asociado al uso de productos sanitarios de inserción o de

²⁶ A. Ribeiro, F. Veiga, D. Santos, J.J. Torres-Labandeira, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo. *Bioinspired imprinted pHEMA-hydrogels for ocular delivery of carbonic anhydrase inhibitor drugs*. Biomacromolecules 12:701-709 (2011).

²⁷ F. Alvarez-Rivera, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo. *Epalrestat-loaded silicone hydrogels as contact lenses to address diabetic-eye complications*. Eur. J. Pharm. Biopharm. 122:126-136 (2018).

implantación es que los microorganismos tienen tendencia a adherirse a su superficie para proliferar formando comunidades altamente organizadas y protegidas frente a las defensas del hospedador. De hecho, los productos sanitarios están considerados como el paraíso de los microorganismos oportunistas, y las infecciones asociadas al uso de productos sanitarios -que representan el 45% de las infecciones nosocomiales- incrementan considerablemente el riesgo de mortalidad en pacientes comprometidos. La estrategia a la que se acude cuando se detecta una infección asociada a un producto sanitario es la terapia antimicrobiana sistémica (poco eficaz porque el fármaco accede con dificultad a la zona infectada y los microorganismos son muy resistentes) y alternativamente la retirada del producto sanitario, lo que no siempre es posible sin comprometer la vida del paciente, por ejemplo, en el caso de los injertos vasculares o de las válvulas. Como consecuencia de ello, el desarrollo de materiales antibiofilm para prevenir la colonización por microorganismos encierra un gran interés.

En este ámbito también se han aplicado estrategias bioinspiradas. Por ejemplo, para incorporar antifúngicos en un producto sanitario se usó como modelo la pared de los hongos. A diferencia de las membranas celulares de los mamíferos que cuentan con colesterol en su estructura, la pared de los hongos contiene ergosterol. Aunque el colesterol y el ergosterol son estructuralmente muy similares, se ha conseguido sintetizar fármacos antifúngicos selectivos capaces de interactuar con el ergosterol y no con el colesterol. Nuestra hipótesis de trabajo fue que los productos sanitarios decorados con ergosterol podrían incorporar fármacos antifúngicos y cederlos sólo cuando se produjese una infección por hongos, por ejemplo por *Candida albicans*. En presencia del hongo, el fármaco podría cederse por desplazamiento competitivo hacia la pared del hongo en la que el ergosterol está en un microambiente más favorable para interactuar con el fármaco. Se prepararon siliconas con distintos contenidos en ergosterol, se incorporó eficazmente un fármaco polieno (natamicina o nistatina) y se comprobó que en presencia del hongo se activa la cesión, en cantidad y velocidad regulables por la densidad del injerto de ergosterol, lo que tuvo como consecuencia la inhibición del crecimiento de *C. albicans*.²⁸

Transiciones de fase y medicamentos inteligentes

Tanto en el devenir inicial de la evolución química, como en la etapa siguiente y todavía prevalente de la evolución biológica, las biomacromoléculas han estado sometidas a perturbaciones repetidas de su medio ambiente causadas por estímulos externos muy diversos. Las células también generan estímulos y son capaces de responder a ellos mediante cambios conformacionales en los polímeros que las constituyen, que permiten que tengan lugar ciertas reacciones de manera cíclica o cuando se produce un desequilibrio intenso en algún parámetro. En los organismos vivos muchas funciones fisiológicas son desencadenadas por estímulos específicos que impulsan a sus componentes a actuar de una determinada manera. Además, la

²⁸ T. Segura, A.M. Puga, G. Burillo, J. Llovo, G. Brackman, T. Coenye, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo. *Materials with fungi-bioinspired surface for efficient binding and fungi-sensitive release of antifungal agents*. *Biomacromolecules* 15: 1860-1870 (2014).

intensidad del estímulo puede modificar la naturaleza de la respuesta y retroalimentarla. El envío de sustancias endógenas de un compartimento a otro del cuerpo humano está orquestado de una manera muy precisa por una señalización equilibrada.²⁹

Los medicamentos que imitan la capacidad que tienen los seres vivos para responder a estímulos de manera reproducible y proporcional a la señal se denominan inteligentes o, en inglés, SMART. Esta palabra también sirve de acrónimo para diferenciar cuatro categorías de medicamentos avanzados en orden creciente de complejidad:^{29,30,31}

-Tipo 1. Sistemas para Maximizar el Acceso, la Retención y la Terapia (*Systems to Maximise Access, Retention and Therapy*), que están formados por nanopartículas destinadas a la vectorización pasiva o activa del fármaco hacia su diana. Ejemplos de estos sistemas son las nanopartículas decoradas con anticuerpos monoclonales, partículas guiadas magnéticamente y bioconjugados diseñados para mejorar la eficiencia de la vectorización. Están ya comercializados medicamentos para tratamientos antitumorales como el Abraxane® y Doxil®, en los que el fármaco (paclitaxel y doxorubicina, respectivamente) se encuentra encapsulado en estructuras que imitan el auto-ensamblaje espontáneo de las proteínas transportadoras y los lípidos anfifílicos naturales de las membranas biológicas.

-Tipo 2. Sistemas que Monitorizan, Analizan y Responden en el Tiempo (*Systems that Monitor, Analyze and Respond in Time*). Estos sistemas están diseñados para auto-regular la cesión del fármaco mediante sensores electrónicos o utilizando células encapsuladas. En el primer caso, el sistema está integrado por un biosensor que monitoriza la concentración de un determinado biomarcador, un software de gestión de la terapia y un sistema de bombeo que libera el fármaco a la velocidad adecuada. El ejemplo más destacado es el de las bombas de implantación de insulina, que permiten una gestión integrada del tratamiento por medio de un dispositivo más pequeño que una baraja de naipes, que bombea insulina en función de los niveles de glucosa en sangre, imitando la funcionalidad del páncreas para evitar el riesgo de las hiper e hipoglucemias de los tratamientos convencionales. En el segundo caso, se implantan cápsulas con células que producen *in situ* el fármaco; estos medicamentos se denominan vivos o vivientes.³² En función de las células que contengan y del entorno en que se implanten, se podrían utilizar como factorías de fármacos, produciendo desde insulina (como verdaderos sustitutos de páncreas) hasta una amplia variedad de sustancias útiles en el tratamiento de patologías del sistema nervioso central.

²⁹ C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro. *Smart drug delivery systems: from fundamentals to the clinic*. Chem. Comm. 50:7743-7765 (2014).

³⁰ D.J.A. Crommelin, A.T. Florence. *Towards more effective advanced drug delivery systems*. Int. J. Pharm. 454:496 (2013).

³¹ D.W. Grainger. *Connecting drug delivery reality to smart materials design*. Int. J. Pharm. 454:521 (2013).

³² E. Santos-Vizcaino, G. Orive, J.L. Pedraz, R.M. Hernández. *Clinical applications of cell encapsulation technology* (J. Guisan, J. Bolivar, F. López-Gallego, J. Rocha-Martín, eds). Immobilization of Enzymes and Cells. Methods in Molecular Biology, vol 2100. Humana, New York, NY, 2020, pp. 473-491.

-Tipo 3. Sistemas Mudos (silenciados) hasta la Activación por un disparador Remoto (*Systems Mute until Activation by a Remote Trigger*). Se trata de medicamentos capaces de activar o parar la cesión del fármaco en función de estímulos externos específicos (por ejemplo, luz, ultrasonidos o campos eléctricos y magnéticos). Actúan en circuito abierto y pueden proporcionar perfiles pulsátiles de cesión de fármaco cuando se activan externamente.

-Tipo 4. Sistemas que Respetan la Termodinámica (*Some Modest Attempts to Respect Thermodynamics*). En esta categoría se incluyen los medicamentos basados en sistemas poliméricos que reconocen cambios en el medio biológico (por ejemplo, en el pH, la temperatura o la concentración de ciertas sustancias) activando o modulando la velocidad de cesión, a través de cambios conformacionales en su estructura. Se denominan de circuito cerrado o sistemas auto-regulados.

Los medicamentos de los tipos 3 y 4 se comportan como verdaderos medicamentos inteligentes biomiméticos y su diseño representa un desafío difícil ya que requieren la incorporación de componentes sensibles a estímulos en la proporción y la disposición adecuadas. De la misma manera que los materiales naturales modulan su conformación y sus funciones en respuesta a las condiciones (estímulos) de su entorno,³³ con estos medicamentos disruptivos se busca ajustar la cesión al estado fisiopatológico del paciente o a la aplicación de estímulos externos. Por lo tanto, deben interactuar proactivamente con el entorno y responder a los estímulos de manera predecible. El estímulo puede desencadenar una cesión completa en una sola descarga o puede inducir una liberación pulsátil del fármaco si el medicamento es capaz de responder de manera reversible a la aparición/desaparición del estímulo.

En la actualidad, el diseño de polímeros sensibles a estímulos se beneficia del conocimiento sobre la conformación y la funcionalidad de las biomacromoléculas naturales, con la ventaja de que las estructuras sintéticas son más estables y fáciles de obtener, pudiendo incorporar una enorme variedad de grupos funcionales. Para que un polímero sea útil como componente sensible a estímulos en administración de fármacos, tiene que responder a la aparición/desaparición del estímulo pasando por una transición de fase de primer orden; es decir tiene que experimentar en su conformación y en el volumen que ocupa un cambio muy brusco que se transmita al entramado polimérico en su conjunto, de manera que se produzca un “encendido” o un “apagado” eficiente del proceso de cesión. La termodinámica que regula las transiciones de fase constituye la base mecánica de la inteligencia, entendida como capacidad de respuesta a estímulos.³¹ Al igual que en los sistemas biológicos, en los medicamentos disruptivos las interacciones entre cadenas de polímeros que gobiernan las transiciones de fase son las fuerzas de van der Waals, los puentes de hidrógeno, y las interacciones hidrofóbicas y de Coulomb.³⁴ Los estímulos modifican las interacciones de las

³³ K. Y. Zhang, S. Liu, Q. Zhao, W. Huang. *Stimuli-responsive metallopolymers*. *Coord. Chem. Revs.* 319: 180-195 (2016).

³⁴ J.V. Alegre-Requena, C. Saldías, R. Inostroza-Rivera, D. Díaz-Díaz. *Understanding hydrogelation processes through molecular dynamics*. *J. Mater. Chem. B*, 7:1652-1673 (2019).

cadenas de polímero entre sí y con el medio líquido en el que se encuentran, lo que determina que las cadenas de polímero adopten una conformación expandida o que se arrollen y agreguen con otras. Por lo tanto, pequeños cambios en una variable termodinámica (temperatura, presión, composición del medio,...) pueden conducir a cambios drásticos en la estructura del medicamento y, en consecuencia, en el proceso de incorporación y cesión del fármaco.³⁵

En el diseño de medicamentos inteligentes, los cambios conformacionales asociados a transiciones de fase se pueden utilizar para (Figura 6):

i) regular en qué momento un nanotransportador se debe desensamblar. El nanotransportador mantiene encapsulado el fármaco mientras lo transporta y, en cambio, lo cede rápidamente al llegar a su destino porque allí percibe una señal que modifica la solubilidad, la forma o el estado de agregación de los polímeros que lo constituyen.

ii) modificar el grado de hinchamiento de un hidrogel. Por efecto de un estímulo, el hidrogel experimenta una transición de fase volumétrica reversible al cambiar la conformación de las cadenas poliméricas que lo constituyen, dando lugar a un cambio en el tamaño de malla que hace que se modifique la velocidad de difusión del fármaco a su través.

iii) regular el grado de contracción de cadenas o entramados de polímeros inmovilizados en la superficie del medicamento, que actúan como puertas que regulan el paso del fármaco. En ausencia del estímulo, las cadenas arrolladas bloquean los poros e impiden la cesión del fármaco. El estímulo puede hacer que la cadena se estire y desbloquee el poro. Si se injertan polímeros distintos, se puede conseguir una apertura selectiva de los poros en respuesta a estímulos diferentes.

³⁵ M.C. Koetting, J.T. Peters, S.D. Steichen, N.A. Peppas. *Stimulus-responsive hydrogels: Theory, modern advances, and applications*. Mat. Sci. Eng. R-Reports 93:1-49 (2015).

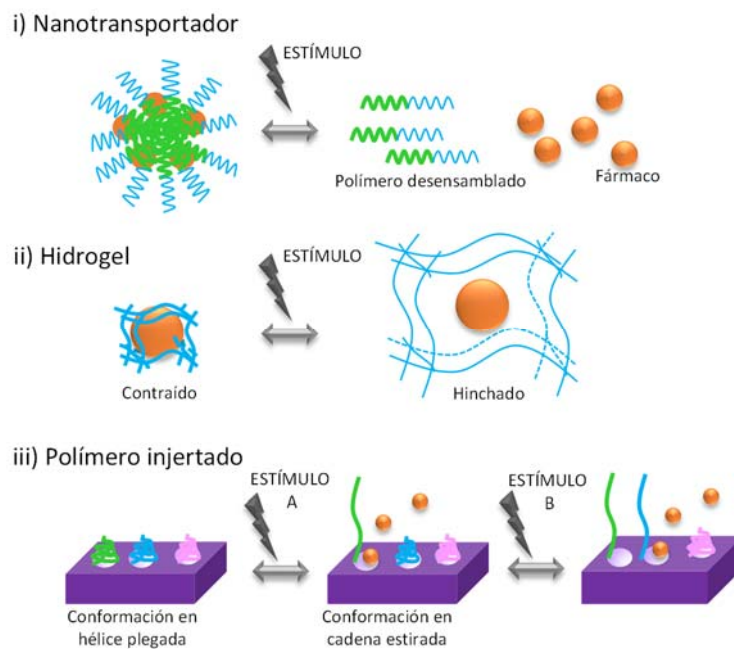


Figura 6. Transiciones asociadas a la respuesta a estímulos con interés potencial en el diseño de medicamentos inteligentes: i) desagregación de polímeros anfifílicos en un nanotransportador, que desencadena la cesión de un fármaco encapsulado; ii) cambio volumétrico en un hidrogel que, al pasar de estado contraído a hinchado, permite la difusión del fármaco; y iii) transición de hélice plegada a cadena estirada en polímeros injertados sobre un material con poros que facilita la cesión del fármaco.

La traslación a la clínica de los prototipos de medicamentos sensibles a estímulos requiere conocer en qué medida el medio biológico, que es un entorno complejo con una gran variedad de sales y proteínas, puede alterar la respuesta a los estímulos con respecto a la que se observa en medios de composición más simple. Además, la velocidad a la que se produce la transición de fase en uno y otro sentido cuando aparece/desaparece el estímulo se tiene que ajustar a las demandas terapéuticas para que ocurra un correcto encendido y apagado del proceso de cesión del fármaco. Las estructuras de tamaño nanométrico y las redes altamente porosas resultan muy adecuadas porque sus transiciones son más rápidas y con menos histéresis que las de las redes macroscópicas densas.

Se han desarrollado numerosos hidrogeles que responden a la temperatura, el pH, las condiciones redox, las enzimas, la luz, los campos magnéticos y eléctricos, los ultrasonidos, las fuerzas mecánicas y los microorganismos.³⁶ En general, los hidrogeles que responden a estímulos incorporan el fármaco cuando se encuentran en estado hinchado, lo retienen mientras están contraídos y lo ceden rápidamente cuando se expanden, o cuando se contraen fuertemente y “exprimen” el fármaco.

³⁶ C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro. *Smart drug release from medical devices*. J. Pharmacol. Exper. Therap. 370:544-554 (2019).

En la Naturaleza se pueden encontrar numerosos sistemas sensibles a estímulos, por ejemplo ciertas proteínas y enzimas, que no sólo ceden sustancias sino que también pueden recaptarlas. Esto nos animó a orientar una parte de nuestra investigación hacia el diseño de hidrogeles sintéticos sensibles a estímulos con capacidad de reconocimiento molecular reversible. Para ello, se combinaron monómeros con sensibilidad a variables del entorno (por ejemplo, a cambios de temperatura) y monómeros funcionales con grupos químicos con afinidad por la molécula de interés. Cuando el hidrogel está contraído los grupos funcionales se pueden aproximar para formar el receptor y atrapar el fármaco, y en presencia de un estímulo que provoque el hinchamiento del hidrogel, los grupos se separan y el fármaco se cede. Pero si cesa el estímulo, los receptores se forman de nuevo. Así, se pueden crear geles capaces de absorber sustancias o de cederlas en función de un pequeño cambio en el entorno. Para que esto ocurra es necesario que la conformación asociada a la formación de los receptores sea la de mínima energía.³⁷

Tomando como punto de partida estas ideas, se demostró por primera vez que era posible conseguir memoria conformacional, es decir, receptores para una amplia variedad de iones y moléculas que se podían formar y destruir reversiblemente en hidrogeles con bajo grado de reticulación y sensibles a estímulos. En el ámbito del medicamento, estos hidrogeles además de ofrecer una incorporación selectiva y eficaz del fármaco y una cesión dependiente del estímulo, pueden detener la cesión cuando los niveles de fármaco en el entorno del medicamento alcanzan un valor determinado (debido a un equilibrio de reparto entre el fármaco unido y el fármaco libre) y son los únicos que pueden recuperar el fármaco ya cedido si el estímulo cesa o revierte.³⁸

Los resultados de estas investigaciones abren un amplio abanico de posibilidades al tiempo que suscitan nuevos interrogantes. Por ejemplo, se cuenta aún con poca información acerca de en qué medida el fármaco puede interferir en la capacidad de respuesta a estímulos. En el caso de los hidrogeles que responden a cambios de temperatura y pH, los efectos de los fármacos en las transiciones de fase pueden ser muy relevantes.

El interés de la temperatura como estímulo se debe a que muchas condiciones patológicas (por ej., inflamación, tumor o infarto) cursan con hipertermia local. Además, resulta relativamente sencillo inducir un calentamiento focalizado de manera muy precisa utilizando una fuente externa de energía. La sensibilidad a la temperatura se consigue con monómeros que cambian bruscamente su afinidad por el agua a una temperatura determinada, que se denomina temperatura crítica de solubilidad. A diferencia de las biomacromoléculas, los

³⁷ K. Ito, J. Chuang, C. Alvarez-Lorenzo, T. Watanabe, N. Ando, A.Yu. Grosberg. *Multiple point adsorption in a heteropolymer gel and the Tanaka approach to imprinting: Experiment and Theory*. Prog. Polym. Sci. 28:1489-1515 (2003).

³⁸ M.A. Lago, V.Ya. Grinberg, T.V. Burova, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo. *Ionic and polyampholyte N-isopropylacrylamide-based hydrogels prepared in the presence of imprinting ligands: stimuli-responsiveness and adsorption/release properties*. J. Funct. Biomater. 2:373-390 (2011).

polímeros sintéticos pueden experimentar transiciones reversibles en intervalos más amplios de temperatura sin el riesgo de que se desnaturalicen. En el ámbito biomédico, los hidrogeles de poli(N-isopropilacrilamida), PNIPAAm, son los hidrogeles sensibles a la temperatura a los que se ha prestado más atención ya que su temperatura crítica de solubilidad se sitúa en torno a 33 °C. A temperatura más baja el entramado está expandido por lo que resulta fácil incorporar el fármaco, mientras que a 37 °C se encuentra contraído lo que evita que el fármaco se ceda o que lo haga a una velocidad muy baja. Un cambio a estado hinchado o una contracción muy intensa del entramado provoca que la cesión se acelere. Los fármacos iónicos pueden afectar a la transición de hidrogeles termosensibles por los siguientes mecanismos:³⁹

a) el fármaco iónico que permanece en la fase acuosa del hidrogel produce un efecto salino que promueve la deshidratación del polímero y hace que la transición de estado hinchado a contraído tenga lugar a temperatura más baja que la esperada. Cuando el hidrogel está contraído la incorporación del fármaco en la dosis requerida resulta difícil.

b) si el fármaco se adsorbe en las cadenas poliméricas, puede aportar cargas al polímero y aumentar su hidrofilia, desplazando la temperatura crítica de solubilidad hacia valores más altos, de manera que puede suceder que la transición de estado hinchado a contraído no se produzca dentro del intervalo fisiológico de temperaturas. En esta situación, a 37 °C el hidrogel permanecerá expandido sin capacidad de control de la cesión del fármaco.

Los entramados que responden a dos estímulos, como temperatura y pH, permiten regular la cesión de fármacos con mayor precisión. En el cuerpo humano existen compartimentos con medios de pH notablemente diferente y los procesos patológicos pueden alterar significativamente los valores normales. Por lo tanto, la combinación de la capacidad de respuesta a temperatura y pH ofrece un control más preciso de la cesión de fármacos desde dispositivos implantables y nanotransportadores. Además, el comportamiento de los polímeros que combinan sensibilidad a la temperatura y al pH se asemeja más al de las proteínas naturales cuando se exponen a cambios fisiopatológicos de estas variables.

Cuando se combina NIPAAm con monómeros iónicos, como el ácido acrílico (AAc) (aniónico) y la N-aminopropilmetacrilamida (APMA) (catiónico), los grupos ionizados que se intercalan entre los segmentos de NIPAAm aumentan la hidrofilia de las cadenas poliméricas y generan restricciones topológicas que se oponen a la transición de estado hinchado a estado contraído. Esto determina que la contracción se produzca a una temperatura más elevada y sea de menor intensidad (Figura 7A). En esta situación, el efecto de la incorporación de un fármaco de carga opuesta adquiere una especial relevancia. Si se incorpora propranolol·HCl (catiónico) o ibuprofeno sal sódica (aniónico), a medida que se van neutralizando los grupos ionizados en el hidrogel, la sensibilidad original de PNIPAAm a la temperatura se recupera (Figura 7 B), lo que permite que el hidrogel se contraiga y se formen receptores de alta afinidad para el fármaco. Sin embargo, un exceso de fármaco (concentración mayor que 10 mM) vuelve a inhibir la

³⁹ C. Alvarez-Lorenzo, V.Y. Grinberg, T.V. Burova, A. Concheiro. *Stimuli-sensitive crosslinked hydrogels as drug delivery systems: Impact of the drug on the responsiveness*. Int. J. Pharm. 579:119157 (2020).

sensibilidad a la temperatura ya que las moléculas en exceso se autoensamblan con las previamente unidas al hidrogel a través de interacciones hidrofóbicas. En consecuencia, una sobrecarga de fármaco invierte el signo de la carga original de los hidrogeles e inhibe su capacidad de respuesta a los estímulos (Figura 7 B y C).⁴⁰ Estos resultados confirman la importancia de incorporar el fármaco en las proporciones correctas para que el medicamento mantenga sus prestaciones como sistema inteligente.

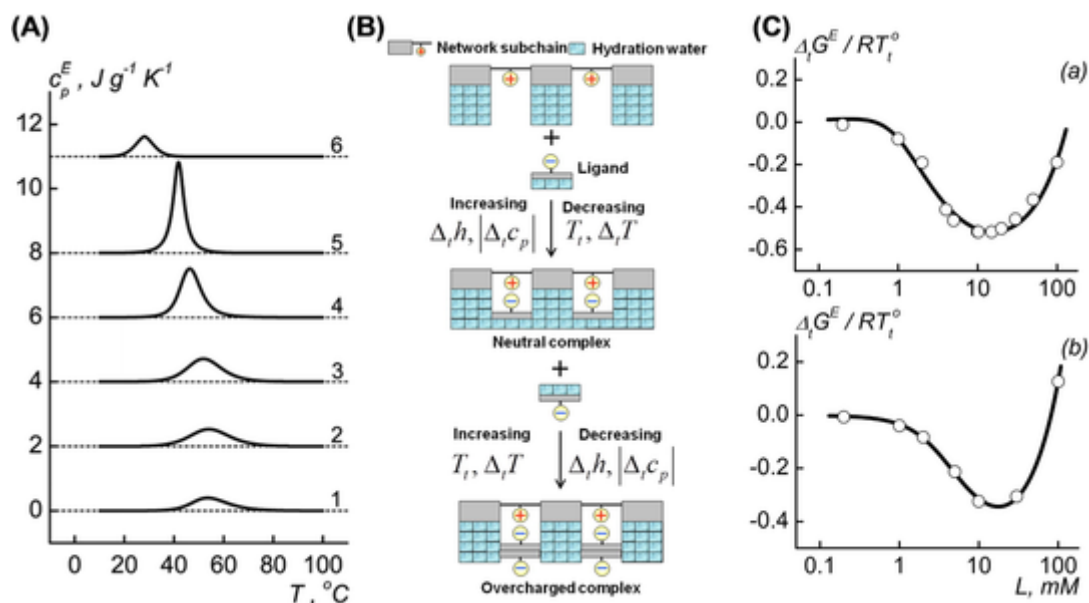


Figura 7. (A) Influencia de la concentración de ibuprofeno sódico (0 (1), 0.2 (2), 1.0 (3), 5.0 (4), 10 (5) y 100 (6) mM) sobre la temperatura y la intensidad de la transición de fases de hidrogeles de NIPAAm-APMA. (B) Efecto de la unión de este fármaco aniónico sobre la temperatura de contracción (T_i), la entalpía ($\Delta_i h$), la capacidad calorífica ($\Delta_i c_p$) y el ancho de la transición ($\Delta_i T$) del hidrogel catiónico. (C) Influencia de la concentración de (a) propranolol-HCl y (b) ibuprofeno sódico sobre la energía de la transición de fases de hidrogeles de (a) NIPAAm-AAc y (b) NIPAAm-APMA. La situación termodinámica más favorable se alcanza para una concentración de fármaco de 10 mM, que da lugar a una neutralización completa de los grupos ionizados del hidrogel. Adaptado de Grinberg y col. (2014).⁴⁰

Algunos fármacos, en particular los de naturaleza peptídica, son inestables a las temperaturas moderadamente altas que se alcanzan durante los procesos convencionales de polimerización. Para evitar riesgos de degradación, se implementó un procedimiento de polimerización a $-10^{\circ}C$ en presencia de moléculas molde que permitió obtener criogeles con memoria molecular o, dicho en otros términos, con memoria para un ligando. Para la síntesis de criogeles sensibles a estímulos se partió de NIPAAm y N-[3-(N,N'-dimetilamino)propil]acrilamida

⁴⁰ Va.Y. Grinberg, T.V. Burova, N.V. Grinberg, A.S. Dubovik, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo. *Binding affinity of thermoresponsive polyelectrolyte hydrogels for charged amphiphilic ligands. A DSC approach.* Langmuir 30:4165–4171 (2014).

(DMPA) (monómero catiónico) y se incorporó ibuprofeno sódico como molécula molde.⁴¹ En estas condiciones de baja temperatura, el sistema se separa en dos fases: hielo cristalino, formado a partir de agua libre, y disolución concentrada de monómeros en agua líquida. Una concentración alta de monómeros favorece las interacciones multi-contacto de las moléculas molde con NIPAAm a través de su anillo aromático (enlaces hidrofóbicos) y con DMPA mediante el grupo ácido carboxílico (enlaces iónicos). Como resultado de la polimerización en frío, también denominada gelificación criotrópica, se obtienen entramados poliméricos muy porosos en los que las transiciones de fase son muy rápidas. En ausencia de fármaco, la temperatura de transición de estado hinchado a contraído de los criogeles de PNIPAAm fue de 31.8 °C, mientras que la de PNIPAAm-DMPA se situó en 82.5 °C por su elevado contenido en grupos ionizados. En medio con ibuprofeno sódico y a temperatura baja, los criogeles de PNIPAAm-DMPA captaron rápidamente el fármaco y su temperatura de transición de fases se redujo hasta el valor característico de PNIPAAm. La formación de receptores capaces de reconocer selectivamente ibuprofeno se confirmó exponiendo los criogeles a otros ligandos aniónicos estructuralmente parecidos al ibuprofeno sódico, como las sales de sodio del ácido benzoico, fenilacético y toлилacético (Figura 8). Ninguna de estas moléculas causó cambios significativos ni en la temperatura ni la energía de la transición de fases de los criogeles de PNIPAAm-DMPA, lo que sugiere que la interacción es muy débil. En su conjunto, estos resultados demuestran que los criogeles obtenidos por impresión molecular en frío contienen receptores moleculares específicos para ibuprofeno que se ajustan perfectamente a la estructura de este fármaco cuando el hidrogel está contraído, lo que da lugar a una neutralización de las cargas muy efectiva.

⁴¹ T.V. Burova, Natalia V. Grinberg, E.V. Kalinina, R.V. Ivanov, V. I. Lozinsky, C. Alvarez-Lorenzo, V. Y. Grinberg. *Thermoresponsive copolymer cryogel possessing molecular memory: synthesis, energetics of collapse and interaction with ligands*. Macromol. Chem. Phys. 212:72–80 (2011).

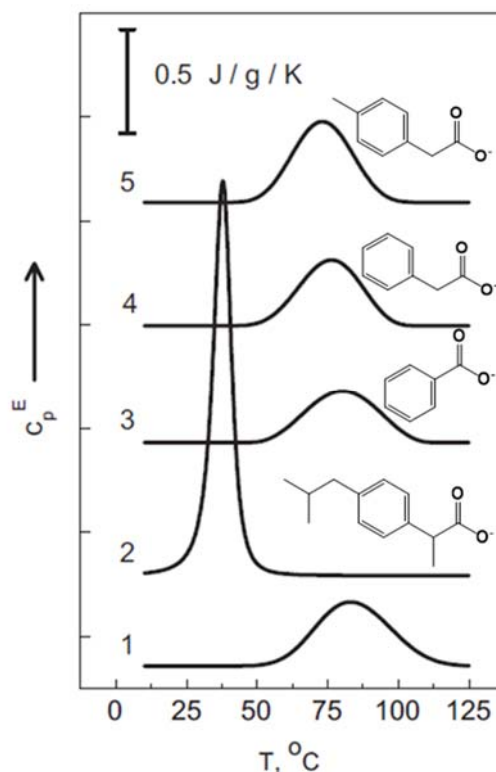


Figura 8. Termogramas de la transición de estado hinchado a contraído de criogeles de NIPAAm-DMAPA en ausencia de ligados (1) y después de incubación en disoluciones 20 mM de las sales sódicas de ibuprofeno (2), ácido benzoico (3), ácido fenilacético (4), y ácido tolilacético. Adaptado de Burova y col. (2011).⁴¹

Conclusiones

La Naturaleza constituye una fuente de inspiración muy valiosa a la hora de plantear el desarrollo de medicamentos con prestaciones que hasta hace poco eran impensables y que deben permitir hacer frente a los nuevos retos de salud de una sociedad en la que cada vez se reconoce más la trascendencia de la singularidad de cada uno de sus miembros. El desarrollo de medicamentos que regulen de manera muy precisa cuando y donde deben ceder el fármaco tiene mucho que aprender de cómo en los seres vivos se produce de manera natural el intercambio de sustancias entre unas células y otras y de cómo las proteínas, las enzimas y los anticuerpos llevan a cabo tareas muy complejas, adoptando conformaciones que les permiten interactuar a nivel nanoscópico con una especificidad muy elevada.

La observación cuidadosa de los procesos naturales, incluso desde las etapas más tempranas de la evolución de la vida en la Tierra, puede ofrecer claves para desarrollar materiales con prestaciones complejas pero a la vez sostenibles, seguros y eficaces. El desarrollo de nuevas arquitecturas y asociaciones de materiales poliméricos, inspiradas en vesículas naturales y en compartimentos celulares o que imitan la conformación de la diana o el receptor del fármaco, puede proporcionar matrices con afinidad y capacidad de incorporación de fármaco incrementadas, y que eviten la degradación o la pérdida prematura de las sustancias activas antes de que alcancen su diana. Además, dotando a los medicamentos de capacidad de respuesta a estímulos externos, variables fisiológicas o factores dependientes de la evolución de

los procesos patológicos se abre la posibilidad de regular de manera precisa el perfil espacio-temporal de cesión de los fármacos.

El avance de los medicamentos corre paralelo a la evolución de los biomateriales, y por lo tanto al desarrollo de la ciencia y tecnología de los materiales. La integración de diferentes disciplinas científicas que permita seguir avanzando en la imitación de la Naturaleza es esencial para diseñar prototipos con estructuras y prestaciones cada vez más sofisticadas, que deben dar paso en el futuro a verdaderos medicamentos bioinspirados útiles en la implementación de la medicina de precisión.

Muchas gracias.