

Gestión de la colección de compuestos químicos y su contribución al descubrimiento temprano de fármacos.

Ana García González^{1,2*}, Lola Jimenez-Alfaro²

1 Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. **2** R&D GSK Tres Cantos.

Resumen

Una de las tareas fundamentales de la Investigación en una empresa farmacéutica es el descubrimiento de nuevos fármacos en enfermedades no cubiertas. GSK ha adoptado un proceso secuencial en el descubrimiento temprano de fármacos conocido como Cribado Molecular de alto rendimiento; esto supone enfrentar la colección de compuestos químicos de la compañía a una diana previamente identificada y validada, y realizar cientos de miles de ensayos bioquímicos y farmacológicos, para identificar moléculas activas frente a esa diana. Los compuestos químicos de la colección de GSK son, por tanto, una parte crítica en este proceso; sin una gestión adecuada de los mismos, que garantice su inventario, estabilidad y manipulación, no obtendríamos resultados de calidad en el proceso. La colección de GSK está compuesta por más de 3 millones de compuestos químicos, los cuales están almacenados en un sistema automatizado y refrigerado que permite conservar su estabilidad y posterior manipulación mediante tecnología automatizada y robótica. Entre ellas, un sistema de pipeteo con tecnología acústica que permite dispensar volúmenes muy pequeños de muestra prolongado la vida útil de los mismos. Así mismo, GSK ha adoptado por la implantación de un nuevo software que gestione el almacenamiento, manejo y distribución de la colección de compuestos de GSK y garantice un proceso robusto, reproducible y de alta calidad en la generación de placas de ensayo en todas y cada una de las etapas del descubrimiento temprano de fármacos

Palabras clave: colección de compuestos químicos; DMSO; optimización de leads; placa de ensayo; tecnología automatizada y robótica.

Cita: Ana García González, Lola Jiménez-Alfaro (2015) Gestión de la colección de compuestos químicos y su contribución al descubrimiento temprano de fármacos. *Dianas* 4(1): e20150905. ISSN 1886-8746 journal.dianas.e20150905. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Editores: María José Carmena y Alberto Domingo, Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

Recibido: 4 de junio de 2015

Copyright: © 2015 Ana García González et al. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

***E-mail:** ana.garcia.gonzalez.89@gmail.com



Introducción

El Centro de Investigación Básica, *CIB*, de GlaxoSmithKline (GSK) en Tres Cantos está especializado en el proceso de descubrimiento temprano de fármacos mediante la utilización de modernas tecnologías y procesos automatizados y robotizados de alto rendimiento conocido en el mundo científico como *ultra-High-Throughput Screening, uHTS*. El HTS o cribado molecular permite realizar cientos de miles de ensayos bioquímicos, farmacológicos, celulares y fenotípicos diarios con el objetivo de identificar compuestos activos en diferentes dianas moleculares. Para ello, el Centro mantiene en sus instalaciones la colección de compuestos de GSK, 2,2 millones de compuestos químicos puros. El departamento encargado de la gestión de esta colección se conoce como *Compound management, CM*, y su misión fundamental, utilizando tecnología puntera de automatización y robótica, es el inventario, almacenamiento, distribución y monitorización de los 2,2 millones de compuestos para dar apoyo a las distintas actividades que se realizan en los centros de investigación de Tres Cantos: el centro de HTS y los grupos que trabajan en el centro especializado en las enfermedades del tercer mundo, conocido como *DDW (diseases of developing world)*.

El DDW es un centro que trabaja en la validación de dianas, identificación de hit, síntesis química y ensayos preclínicos y clínicos, enfocados al descubrimiento de fármacos de patógenos de nivel de bioseguridad 2 y 3 (BSL2/3) causantes de las enfermedades más conocidas y devastadoras del tercer mundo: malaria, tuberculosis, leishmaniosis, enfermedad del sueño y enfermedad de Chagas.

Colección de compuestos químicos

La colección de compuestos de GSK ofrece un espacio químico diverso y biológicamente relevante, siendo la fuente fundamental de las entidades químicas activas, *starting points*, para todo el proceso de descubrimiento temprano de fármacos.

En los últimos años GSK ha adoptado un modelo de innovación abierta, GSK comparte con la comunidad científica internacional sus conocimientos y recursos a través de colaboraciones externas públicas (academias y universidades) y de la fundación *open lab*, siendo esto una estrategia innovadora para avanzar en el proceso del descubrimiento de nuevas terapias. Un ejemplo de innovación es el *set de antimicrobianos*, compuesto por moléculas activas contra determinados microorganismos abierto a toda la comunidad científica. El primer set disponible fue el *TCAM* (TC antimalarial set), compuesto por 13.500 moléculas activas en el ensayo de célula entera. Tres años después, y a raíz del éxito del *TCAM*, enviado a más de 40 colaboradores repartidos por todo el mundo, se crearon el *TB SET* (tuberculosis set) y *TCAKS* (kinetoplastidos set).

Como hemos mencionado anteriormente, GSK establece numerosas colaboraciones con diferentes grupos externos y academias, los compuestos que son fruto de esta colaboración se denominan Alianzas y aunque el tipo de restricciones que se aplican depende de la naturaleza del acuerdo, generalmente su uso es restringido.

Compuestos químicos que están resultando exitosos en el descubrimiento temprano de fármacos son protegidos de su uso con el fin de destinarlos a un único proyecto y así invertir en su progreso.

Compound management, debe asegurar y verificar que las restricciones que se han impuesto a estos compuestos siguen vigentes y actuar en consecuencia, no permitiendo su uso y gestionando las aprobaciones pertinentes.

Así mismo mantiene los almacenes de compuestos, libres de sustancias prohibidas o reguladas, a través de una monitorización continua.

La biblioteca de productos químicos de GSK está ubicada en tres almacenes automatizados de sólidos o líquidos en cada uno de los centros dedicados al descubrimiento temprano de fármacos: un centro en Inglaterra, uno en Estados Unidos y el centro de Tres cantos.

Se trata de una colección dinámica que cubre un amplio espectro químico que tiene su origen en:

- La colección histórica de compuestos de las dos compañías que forman GSK enriquecida por la revolución de la química combinatoria en los años 80 como tecnología clave y fuente de diversidad química.
- Productos de síntesis interna a lo largo de los años dentro del proceso de identificación de leads, incorporando la experiencia del colectivo de químicos médicos y computacionales de toda la compañía.
- Adquisiciones externas, como parte del proceso de mejora de la diversidad química provenientes de la compra a través de un sistema llamado *eMolecules* para cubrir el espacio químico no cubierto en la diversidad de la colección de compuestos.

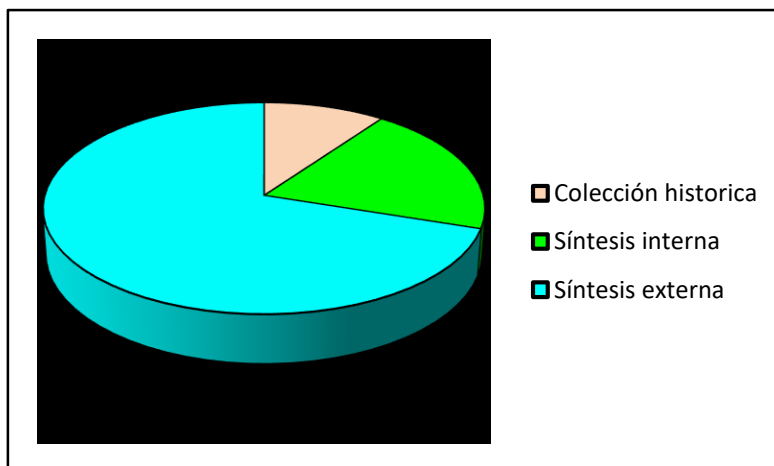


Figura 1. Fuentes de la colección de más de 3 millones de compuestos químicos de GSK.

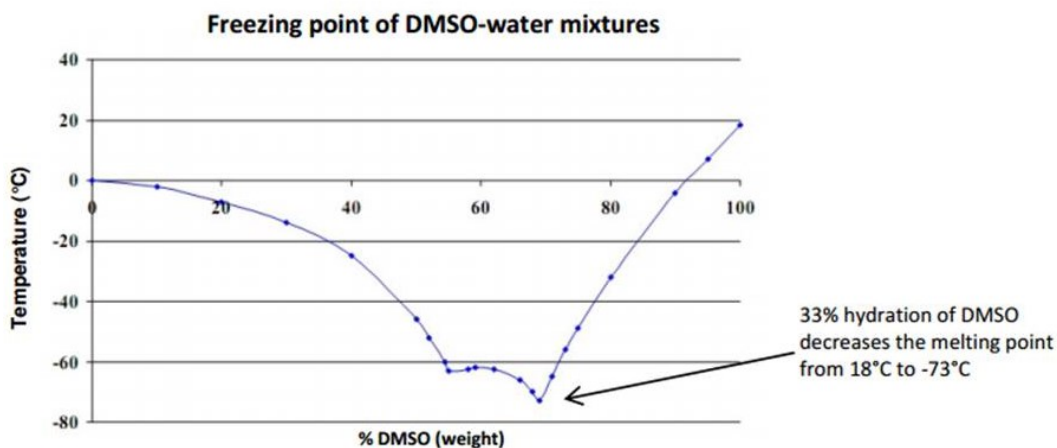
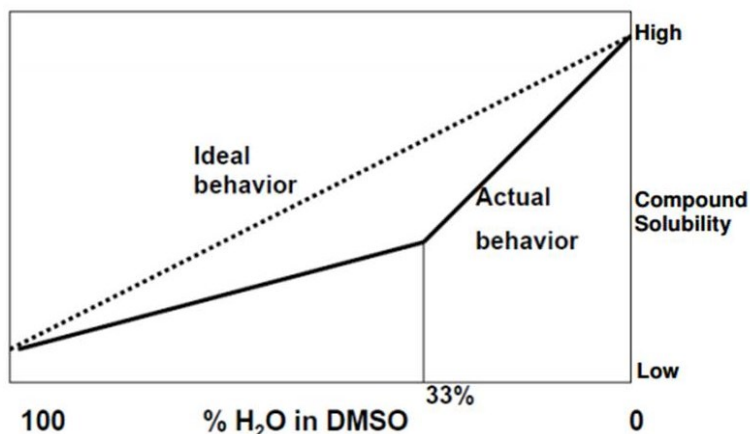
Usando estas tres fuentes, GSK ha reunido una colección de 2,2 millones de compuestos siendo 1,7 millones la colección de compuestos químicos a los que se enfrentan las campañas de HTS. Las características fisicoquímicas de estas moléculas son: pesos moleculares pequeños, buena lipofilia, alta solubilidad acuosa, formas con mayor tridimensionalidad y quiralidad.

El CIB tiene 2,2 millones, de los más de 3 millones que formaba la colección de GSK, de compuestos ubicados dentro de un almacén automatizado y robotizado o ALS (automated liquid store).

El ALS tiene capacidad para almacenar 2,6 millones de compuestos en formatos de micro-placas y tubos, ambos necesarios para una operación efectiva del HTS. Todo este sistema de alta tecnología, de las más modernas en la industria farmacéutica, se ha instalado para la gestión de los compuestos y para la realización de cribado de alto rendimiento. Cabe destacar el esfuerzo continuo en la gestión de calidad de la colección, los compuestos han sido categorizados en función de sus propiedades físico-químicas y solo aquellos que cumplen los parámetros adecuados y tiene un porcentaje de pureza mayor de 80% forman parte de la biblioteca. Están almacenados en tubos y placas de polipropileno, con código de barras que les identifica, y cerrados para evitar la evaporación y absorción de agua.

Las condiciones de almacenamiento de los compuestos químicos de la colección se han establecido para garantizar la estabilidad de los mismos; por lo tanto, tenemos que tener en cuenta todos aquellos factores que puedan alterarlos. Los compuestos químicos se encuentran disueltos en dimetil-sulfoxido, DMSO, disolvente orgánico polar y miscible en agua y solventes orgánicos. Sin embargo, el DMSO es altamente higroscópico, rápidamente absorbe agua, lo que afectará a la calidad de los compuestos.

La absorción de moléculas de agua afecta de dos maneras al DMSO [1]:

Figura 2: Punto de congelación de mezclas DMSO-H₂O.Figura 3. Solubilidad del DMSO, dependiente del H₂O.

La presencia de agua disminuye drásticamente el punto de congelación del DMSO y la absorción de agua afecta a la solubilidad del DMSO, alterando las propiedades de solvente orgánico. Es importante

considerar que ambas gráficas no representan pendientes rectas, si no que existe un punto crítico, 33% de hidratación o ratio de 1molécula de DMSO: 2moléculas de H₂O, situación donde el punto de fusión disminuye 18°C a -73°C.

Teniendo en cuenta estos parámetros se ha definido dos condiciones de almacenamiento: a largo plazo a -20°C para garantizar congelación, y almacén de trabajo donde las muestras deben mantenerse descongeladas, a 15-16°C y 12% de humedad relativa.

Gestión de compuestos en el descubrimiento temprano de fármacos

El manejo y almacenamiento de más de 2 millones de compuestos químicos es una tarea de complejidad técnica y logística, para lo que es necesario un grupo especializado capaz de mantener y dispensar estas moléculas en modo y manera adecuada para las diferentes etapas del proceso de descubrimientos de fármacos, garantizando la excelencia en todos los pasos. [2-3]

El proceso de descubrimiento de fármacos mediante “Cribado Molecular de alto rendimiento” o HTS, se compone de varias etapas fundamentales, en las que veremos el papel que desarrolla el departamento de gestión de compuestos.

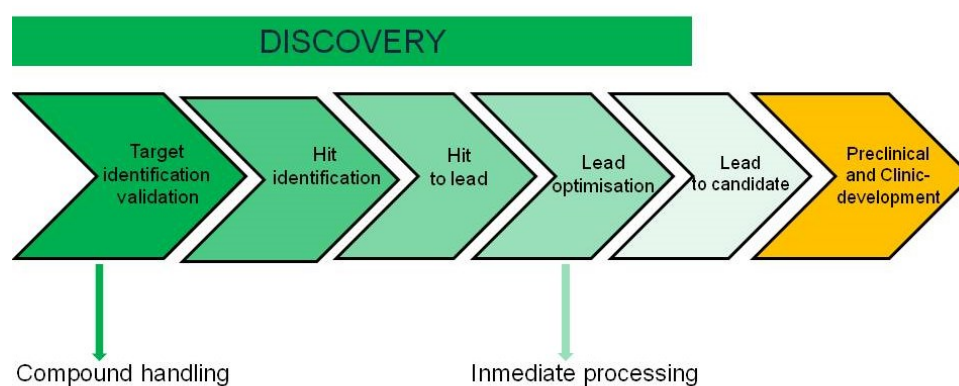


Figura 4. Etapas del proceso de descubrimiento temprano de fármacos.

Identificación y Validación de la diana molecular:

El primer paso del descubrimiento de nuevos fármacos consiste en identificar una necesidad médica no cubierta; se estudia detalladamente la biología que explica la enfermedad y si hay alternativas terapéuticas.

Una vez identificada la enfermedad, el propósito siguiente es desarrollar un medicamento que actúe sobre una diana de un modo tal que interfiera en el proceso patológico. Hoy en día existen unas 8.000 dianas terapéuticas conocidas, divididas en su mayoría entre receptores de membrana GPCRs, enzimas y canales iónicos. El proyecto del genoma humano permitió la secuenciación de 28000 genes de los cuales solo una parte del genoma es *drugable* (susceptible de ser modulado por fármacos) y solo una parte de estos corresponde a fármacos en el mercado.

Cuando la diana ha sido identificada hay que proceder a su validación. Esto consiste en definir la relación entre la enfermedad de interés y la diana seleccionada, es decir, el impacto cuantitativo que tiene la activación o desactivación de la diana en concreto.

Además hay que demostrar que es eficaz y segura para el desarrollo de un fármaco contra la misma, es decir, hay que cerciorarse de que la diana elegida no altere otros mecanismos fisiológicos que no interese y esto lleve a efectos secundarios.

Una vez identificada la diana, el departamento de *screening* del centro pondrá a desarrollar un ensayo para determinar la actividad farmacológica de cientos de miles de moléculas. Se define un protocolo de ensayo cuyo fin será medir el potencial estimado de una molécula para inhibir o estimular la diana.

Antes de empezar con el cribado, es necesaria la puesta a punto del ensayo con el objetivo de reproducir lo descrito en el protocolo asegurando que las condiciones que hemos determinado son las correctas. Para este proceso se emplean compuestos herramientas o compuestos de referencia que sabemos cómo responden ante nuestra diana y nos permite asegurar que el ensayo es de buena calidad, robusto y

reproducibile. CM a través de su actividad de *Compound Handling* dispensa estos compuestos herramientas en placas multipocillo, de 384 o 1536, en un rango variable de volumen.

Identificación de Hits:

Una vez validado el ensayo comienza el cribado a gran escala, se ensaya alrededor de dos millones de compuestos; se seleccionan de estos, aquellos que dan un resultado positivo para volver a testarlos por duplicado y así confirmar su actividad eliminando cualquier falso positivo. Por último, se realizan ensayos de dosis-respuesta para definir la potencia de cada uno los compuestos positivos en el ensayo. Los hits pasan al departamento químico donde se filtran en función de sus características físico-químicas, pocos llegan a leads.

Optimización de leads:

Un lead es un prototipo de estructura química que debe demostrar actividad y selectividad en un ensayo farmacológico, además de tener unas propiedades fisicoquímicas de solubilidad y peso molecular apropiado. Las series de leads compartirán el mismo grupo farmacóforo pero tendrán estructuras y bases diferentes con el objetivo de optimizarlos y progresar de un lead a candidato.

Es en esta etapa del proceso de descubrimiento temprano de fármacos, donde el departamento de gestión de compuestos tiene una mayor implicación, pues permite, a partir de estaciones semiautomáticas, disolver y dispensar a menor escala y con mayor flexibilidad los nuevos compuestos para los distintos ensayos rutinarios de identificación de leads. La actividad se conoce como *Immediate processing*, y se define como el proceso por el cual los compuestos de nueva síntesis como parte de un programa de optimización de leads, son gestionados y manipulados hasta la generación de placas de ensayo.

CM trabaja en estrecha colaboración con otros centros de investigación, como el DDW, donde químicos médicos llevan a cabo el proceso de *Lead optimisation*, modifican las estructuras originales de los hits para obtener moléculas más atractivas químicamente. Estos nuevos compuestos se registran a través de una aplicación online que les permite asociar el compuesto a una ruta y proyecto y CM se encargará del desarrollo del protocolo para finalmente acabar el proceso en una placa de ensayo.

El químico entrega a Compound management el compuesto en forma sólida en diferentes tipos de envase en función de la cantidad y destino del compuesto. A continuación se pesa la cantidad de sólido descrita en la ruta y si el destino del compuesto es ensayo de *screening*, deberá ir siempre en un *T-vial*, el cual permite la inyección de DMSO a partir de una plataforma robótica de dispensación de líquidos llamado Tecan. A través de este sistema de automatización, cada compuesto es disuelto en DMSO hasta alcanzar la concentración necesaria para ser ensayado, 1 mM o 10mM.

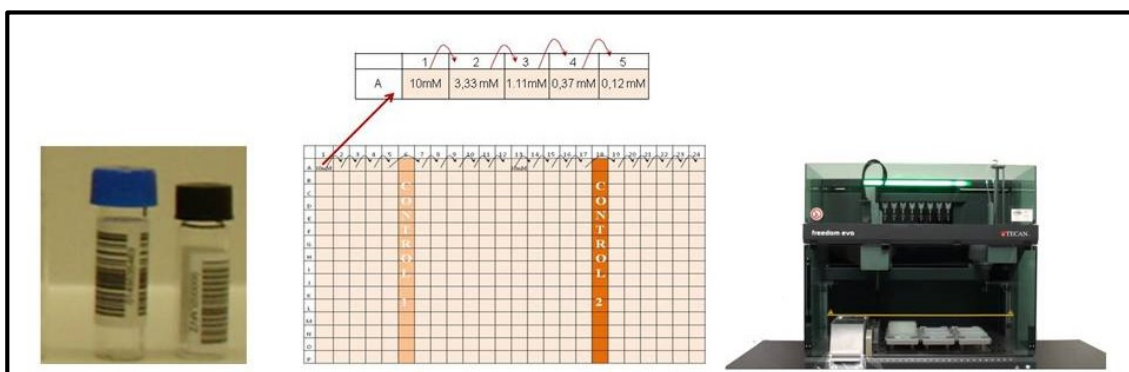


Figura 5. *Immediate processing*. Tecan Freedom Evo dispensa compuestos químicos de nueva síntesis, cabezas de serie, envasados en un vial a una placa de ensayo con formato dosis-respuesta o dilución seriada 1/3 a partir de una concentración de 10 mM.

Una vez que el DMSO ha sido añadido a todos los viales, se sonicen en el Covaris (tecnología acústica) para asegurar su completa disolución. Y a continuación se preparan las placas madres que contienen todos los compuestos en el Tecan.

En el descubrimiento temprano de fármacos, la potencia de un compuesto contra una diana se mide evaluando experimentalmente el efecto del compuesto a múltiples concentraciones con el fin de evaluar su EC_{50} o IC_{50} ; es decir la concentración que produce el 50% del efecto o de inhibición. Es por ello que los compuestos pueden ser dispensados en dos formas: diluciones seriadas, *full curve*, o punto único *single shot*.

Una vez diluidas las placas madres, están preparadas para hacer copias, es decir, placas de ensayo solicitadas por los grupos de investigación a través de tecnología acústica de dispensación de líquidos, Echo Liquid Handler. Y con esto finaliza el proceso de IP.

Immediate processing como su propio nombre indica es un proceso inmediato, es decir, poco tiempo pasa desde que los compuestos de nueva síntesis son enviados a CM y preparados para ser ensayados. Esto exige un análisis de calidad instantáneo; todos los sólidos que han sido disueltos en DMSO son dispensados en una placa madre que será enviada al grupo de *Quality assurance* (QA) para analizar su identidad y pureza.

Con la confirmación de la identidad se pretende que no sea un compuesto inesperado y con la pureza se comprueba que no contenga trazas de otros compuestos. Este análisis se realiza a través de dos técnicas: cromatografía líquida y espectrometría de masas y los datos son procesados por un software y reportados al departamento de gestión de compuestos. Toda sustancia con una pureza de menos del 50% será eliminada del almacén y si alguno falla en identidad será de nuevo analizado por resonancia magnética nuclear (NMR). Los compuestos por encima de 50% de pureza son analizados por el departamento de síntesis química y el grupo de CM para decidir su progreso y futuras etapas de purificación.

Selección de candidatos:

Una vez terminado el proceso de optimización de leads, algunos de ellos pasaran a ser candidatos. Sobre estas moléculas se ensayan, entre otros, un set de experimentos in vitro denominado Panel de *Screening* Cruzado para asegurar la sostenibilidad de los compuestos que progresan y obtener un perfil de seguridad de los mismos temprano con el fin de determinar posibles efectos adversos. CM genera las copias necesarias para este ensayo a partir de placas madre que contiene los posibles compuestos candidatos.

Tecnología automatizada y robótica

Gran parte del éxito del descubrimiento de fármacos mediante Cribado molecular de alto rendimiento se debe a la implantación de modernas tecnologías: sistemas informáticos, software central, modelado molecular, programas de análisis de datos y tecnología automatizada y robótica de calidad, reproducibilidad y velocidad en el proceso. Las instalaciones del CIB se encuentran entre las más modernas de la industria farmacéutica para este tipo de proceso, lo que hace de él un centro de referencia para la investigación. Sus instalaciones han sido modernizadas hacia tecnologías de automatización que permiten mayor productividad con menor tasa de error y coste. El proceso de automatización permite la gestión de un proceso rutinario, de una forma 100% reproducible.

Tecan Freedom EVO:

Se trata de una estación de trabajo de última generación que permite la automatización del proceso de dispensación de líquidos con sencillez, fiabilidad y precisión. Freedom EVO puede automatizar una gran variedad de procesos en genómica, proteómica, diagnóstico de enfermedades y descubrimiento de fármacos. [4]

Sus principales atractivos son:

- alta flexibilidad de actuación debido a brazos robóticos con cabezales de 8 pipetas independientes con puntas fijas.
- modularidad de trabajo, es decir, existen varias configuraciones de trabajo que permiten modular el instrumento según las necesidades y con variedad de instrumentos de laboratorio: placas, tubos y viales.
- La forma más común de pipeteo es *Free pipeting* o pipeteo libre, es decir, se dispensa sin que la punta de la pipeta toque la pared del pocillo, evitando la posible contaminación de la punta con el líquido preexistente en la placa.
- La estación robótica ha sido diseñada para utilizar diferentes líquidos como líquido de sistema, en nuestro caso DMSO, hecho que comporta que todos los tubos, puntas, válvulas y demás elementos estén en contacto con el mismo, por lo que tendrán un revestimiento adecuado para este disolvente. Este líquido será utilizado para diluir los compuestos sólidos en el proceso de IP y para realizar diluciones seriadas en placas de ensayo.

Covaris:

Disolver compuestos orgánicos en DMSO en tubo o placa rápidamente y eficazmente es una de las tareas fundamentales que realiza CM; la dificultad que surge en ocasiones a la hora de disolver o descongelar

compuestos ha llevado a la sustitución de tecnología rudimentaria como vortex, centrifugas o calor por tecnología acústica de sonicación como el Covaris.[5]

Gracias a este instrumento se ha conseguido reducir el tiempo de disolución, mejores mezclas y reducir los tiempos de descongelación. La tecnología consiste en la emisión de ondas acústicas desde un transductor a través de un baño de agua y atraviesan el vial donde se encuentra el compuesto. Las ondas convergen en un mismo punto dentro de la muestra creando una intensidad de mezcla máxima.

Labcyte Echo Liquid Handler:

El departamento de gestión de compuestos da soporte a multitud de proyectos que se encuentran en diferentes etapas del proceso de Cribado molecular; lo que supone entregar cientos de miles de compuestos con diferentes propiedades químicas en placas de ensayo de distinto formato en el menor tiempo posible, con una calidad excelente

Esto ha llevado a la necesidad de desarrollar un método de trabajo híbrido, entre tecnología más tradicional de dispensación de compuestos, para preparar una placa intermedia o madre, y tecnología moderna que dispense rangos de volumen muy pequeños, con el fin de generar tantas copias de una placa madre como volumen contenga y así poder dar servicio a varios experimentos a partir de una sola placa. Esta optimización de trabajo se ha conseguido gracias a la implantación del Echo Liquid Handler, aparato con grandes ventajas, como: la dispensación de volúmenes de nanolitros, lo que conlleva minimizar el consumo de los compuestos y con ello el coste; exactitud y precisión en el proceso; dispensación sin contacto físico con la muestra, evitando cualquier contaminación y favoreciendo la estabilidad de los mismos.

El Echo usa energía acústica, *acoustic drop injection*, para transferir volúmenes pequeños en forma de gotas de 2.5nl desde una placa madre a una placa destino. Presenta dos plataformas como compartimentos de entrada, uno para la placa madre y otro para la placa de destino. Este dispositivo de entrada, invierte la placa destino para enfrentarla a la placa madre y dispensa en esta posición. Una vez transferido el compuesto, la tensión superficial del DMSO sobre el plástico de la placa destino, evita el desprendimiento del líquido.

Una vez ambas placas en el interior, el transductor audita a la largo de toda la placa emitiendo ondas acústicas pocillo a pocillo. En función de la amplitud de la onda y del tiempo, el software del aparato calcula la energía ultrasónica que ha de emitir en cada pocillo para dispensar el volumen requerido. [6-8]

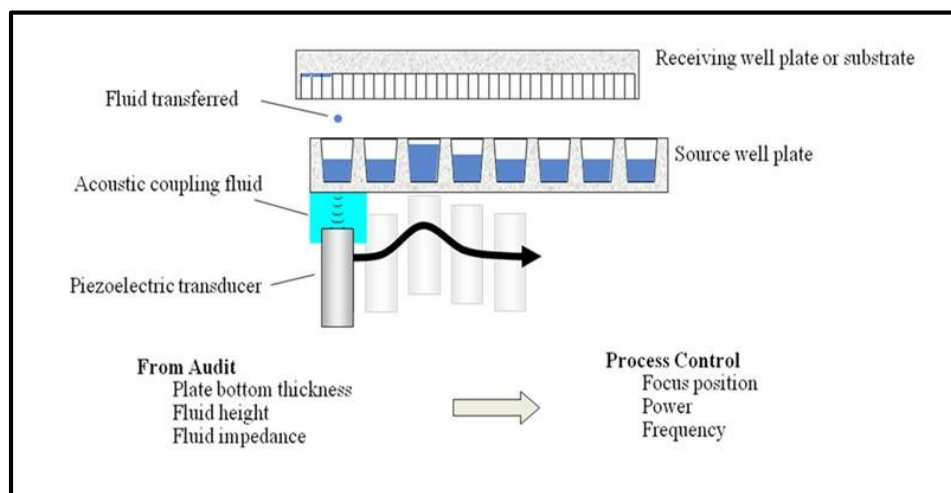


Figura 6. *Acoustic drop injection by Labcyte Echo Liquid Handler.*

En definitiva, el Echo Liquid Handler, ha facilitado trabajar con simplicidad y flexibilidad permitiendo transferir cualquier volumen a cualquier pocillo a partir de una placa de compuestos y así generar todas las copias necesarias para los diferentes ensayos.

Control de calidad

La introducción de tecnologías automatizadas y robóticas de dispensación de líquidos ha transformado el proceso de descubrimiento temprano de fármacos permitiendo precisión, exactitud, y reproducibilidad en el proceso, pero también ha dado lugar a la introducción de un nuevo desafío: realizar un control de calidad exhaustivo de todos los aparatos para garantizar un resultado de calidad.

Los criterios que se buscan son: precisión, capacidad de un instrumento de dar el mismo resultado en mediciones diferentes realizadas en las mismas condiciones, y exactitud, capacidad de un instrumento de acercarse al valor de la magnitud real.

El proceso de chequeo de las máquinas, Tecan Freedom EVO y Labcyte Echo Liquid Handler, se realiza semanalmente y consiste en simular un proceso rutinario midiendo parámetros por gravimetría y fluorimetría. Mediante gravimetría, calculamos la precisión del instrumento a través de pesadas previamente y posteriormente a la dispensación de compuestos en vial, tubo, y placa. Con un ensayo fluorimétrico medimos la exactitud del aparato tras una dispensación de dosis-respuesta o dilución seriada. Ambas medidas, pesos y fluorescencia, son procesadas por un software informático, que a través de parámetros estadísticos, nos da la aprobación del manejo de las máquinas.

Mosaic

Toda esta tecnología automatizada y robotizada, no sería tan efectiva y fiable de no ser por la existencia de un software con conexión a los aparatos y a la base de datos de los más de 2 millones de compuestos. MOSAIC, sample management software, líder mundial para la gestión de compuestos químicos, es una plataforma creada para el manejo y manipulación funcional de la colección de compuestos; permite racionalizar el flujo de trabajo de los compuestos, conectado de forma online con las máquinas automatizadas y robotizadas, obteniendo la máxima eficiencia, productividad y rendimiento del trabajo. Está diseñado para el seguimiento del ciclo de vida del compuesto: recepción e inventario seguro, almacenamiento, operación y destino.

Mosaic supuso una revolución para Compound management, pues ha permitido realizar operaciones rutinarias de laboratorio liberando al personal experto en estas tareas, disminuyendo la tasa de error tanto en el manejo de los compuestos como de los datos y permitiendo enfocar su trabajo a tareas de mejora y perfeccionamiento.[9]

Agradecimientos.

Agradecer al equipo de gestión de compuestos su empeño en enseñarme conocimientos nuevos; en especial a mis compañeros de laboratorio por su paciencia en estos tres meses; y a Lola Jiménez-Alfaro e Isabel Saiz, por sus consejos y orientaciones.

Referencias

1. The effects of Water on DMSO and Effective Hydration Measurement. 2015 (11 June). In Ziath. http://www.edcbiosystems.com/bio/download/dmso_and_effective_hydration_measurement.pdf
2. Bleicher, K.H., Böhm, H., Müller, K. And Alanine, A.I. 2003. Hit and lead generation: beyond high-throughput screening .Nature Reviews, 2: 369-377.
3. Peláez, F. 2011. Paradigmas actuales en las etapas tempranas del proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármaco. An. Quím., 107(1): 36-45.
4. Tecan Freedom Evo.2015 (3 June) In Tecan. <http://www.tecan.com/platform/apps/product/index.asp?MenuID=2694&ID=5270&Menu=1&Item=21.1.8>
5. Nixon, E., Holland-Crimmin, S., Lupotsky, B., Chan, J., Curtis, J., Dobbs, K. and Blaxill, Z. 2009. Applications of Adaptive Focused Acoustics to Compound Management. Journal of Biomolecular Screening, 14(5):460-466.
6. Ellson, R., Mutz, M., Browning, B., Lee, L., Jr., Miller, M.F. and Papen, R. 2003. Transfer of Low Nanoliter Volumes between Microplates Using Focused Acoustics-Automation Considerations. JALA, 8:29-34.
7. Turmel, M., Itkin, Z., Liu, D. And Nie, D. 2010. An Innovative Way to Create Assay Ready Plates for Concentration Response Testing Using Acoustic Technology. JALA, 15:297-305.
8. Echo Brochure liquid handler. 2015 (4 June) In Labcyte. <https://labcyte.app.box.com/s/ghp0s6cycykbz595fa99>
9. Mosaic Brochure. 2015(18 June) In Mosaic. <http://www.titian.co.uk/wp-content/uploads/2014/07/Mosaic-Brochure.pdf>