

Parte 2: Aplicação na descoberta de fármacos.

Biossensores Ópticos e suas Aplicações na Descoberta de Fármacos contra câncer

14.1 Introdução

A pesquisa de medicamentos é um campo multidisciplinar enriquecido pela química, farmacologia, ciências clínicas e bioinformática. A maioria dos avanços surgiu nas últimas décadas, devido aos grandes esforços e novos desenvolvimentos ocorridos na biologia molecular, genômica e proteômica [1-7]. O crescente conhecimento sobre materiais hereditários, bem como vias de sinalização de muitas proteínas e genes centrais, também tem um impacto imenso na descoberta de medicamentos. Quando a influência fascinante da nanotecnologia ocupa seu lugar nesse papel complexo, os últimos anos testemunharam um esforço interdisciplinar encorajador que reúne a academia e a indústria de biotecnologia para preencher as lacunas e estabelecer uma plataforma de pesquisa e desenvolvimento (P&D) muito mais bem-sucedida e rápida em descoberta de drogas. Levando em consideração este objetivo, a fabricação de novas ferramentas e o aprimoramento das já existentes têm sido alcançadas para a triagem e caracterização bioterapêutica [5, 7, 8]. Recursos naturais, como ambientes marinhos e florestas tropicais úmidas, recebem uma atenção enorme como fontes de novos medicamentos em potencial, uma vez que milhares de animais e plantas dessas habitações têm sido utilizados na medicina convencional da comunidade nativa. A obtenção de conhecimento sobre a medicina tradicional resultou em várias dicas importantes relacionadas à bioatividade que podem levar a novos medicamentos de origem natural [9-11]. Portanto, há uma necessidade especial de sistemas de triagem e seu desenvolvimento, uma vez que eles têm um papel central na descoberta de medicamentos. No escopo deste capítulo, serão discutidos os biossensores ópticos e seu potencial uso no desenvolvimento de drogas anticancerígenas. Os biossensores servem como uma tecnologia de ponta com uma ampla gama de aplicações e grande sucesso [12, 13]. Eles têm sido

intensamente empregado em diagnóstico médico [14-21], análise ambiental [22-25] e segurança alimentar [26-32] usando várias estratégias de ensaio. Os biossensores são classificados em várias categorias principais com base nos sistemas transdutores como biossensores ópticos, piezoelétricos, eletroquímicos e magnéticos [14, 16]. Uma discussão detalhada sobre as aplicações de cada tipo de biossensor, além deste capítulo, pode ser encontrada na Seção 2 deste livro. Devido ao intenso P&D em sensores ópticos, eles servem como as plataformas mais confiáveis, robustas e amplamente utilizadas com natureza rápida e em tempo real. Esses recursos também os tornam amplamente aplicáveis na pesquisa de drogas, fornecendo informações sobre a cinética de ligação de drogas, interação droga-ligante, taxas de associação-dissociação, reatividade cruzada de uma droga-alvo com outros ligantes e vice-versa [33-39]. Considerando o fato de que o desenvolvimento de um medicamento leva cerca de 15 a 20 anos e custa mais de US\$ 1 milhão para ser produzido [40] (Figura 14.1), a indústria farmacêutica está constantemente em busca de tecnologias que possam reduzir o custo de desenvolvimento, bem como o prazo de entrega ao mercado; portanto, a área do sensor desempenhou um papel fundamental neste momento.

Plataformas baseadas em ressonância plasmon de superfície (SPR) são os sensores ópticos dominados nesta área como sendo sistemas rápidos sensíveis e livres de rótulos [42, 43]. Eles utilizam a detecção indireta de plasmons de superfície - ondas eletromagnéticas que oscilam na interface de dois meios, como metal e dielétrico - a partir de recursos de absorção (por exemplo, ligação do analito) que correspondem ao acoplamento da luz ao plasmon de superfície. O SPR é sensível a mudanças no índice de refração do dielétrico após a ligação do analito à interface substrato-metal à medida que passa por um canal fluídico [35, 42].

Existem três métodos de excitação de plasmon de superfície: configuração baseada em prisma, abordagem baseada em guia de

onda e arquitetura baseada em fibra óptica. Usando uma configuração baseada em prisma, a ressonância é monitorada coletando a luz refletida em função do ângulo de incidência em um comprimento de onda fixo ou em função do comprimento de onda incidente em um ângulo fixo. Nos métodos baseados em guia de onda ou fibra óptica, os plasmons de superfície são excitados por uma fonte de luz de banda larga e a luz transmitida é coletada e analisada, onde uma queda no espectro representa uma mudança na ressonância. Esses sensores são muito convenientes para fins de triagem, a fim de descobrir novos medicamentos e fornecer informações sobre a bioatividade de medicamentos com composição química conhecida ou desconhecida. Sua integração bem-sucedida na pesquisa de drogas depende principalmente da química de superfície apropriada que precisa ser selecionada considerando a natureza da droga, grupos funcionais do receptor da droga e tipo de ensaio. Portanto, técnicas de imobilização em biossensores, sistemas SPR de alto rendimento lançados no mercado, informações detalhadas e estratégias importantes na descoberta de drogas usando biossensores ópticos e novas abordagens, como simulação computacional acoplada a sensores SPR para monitoramento de receptores de drogas, são discutidas a seguir Seções.

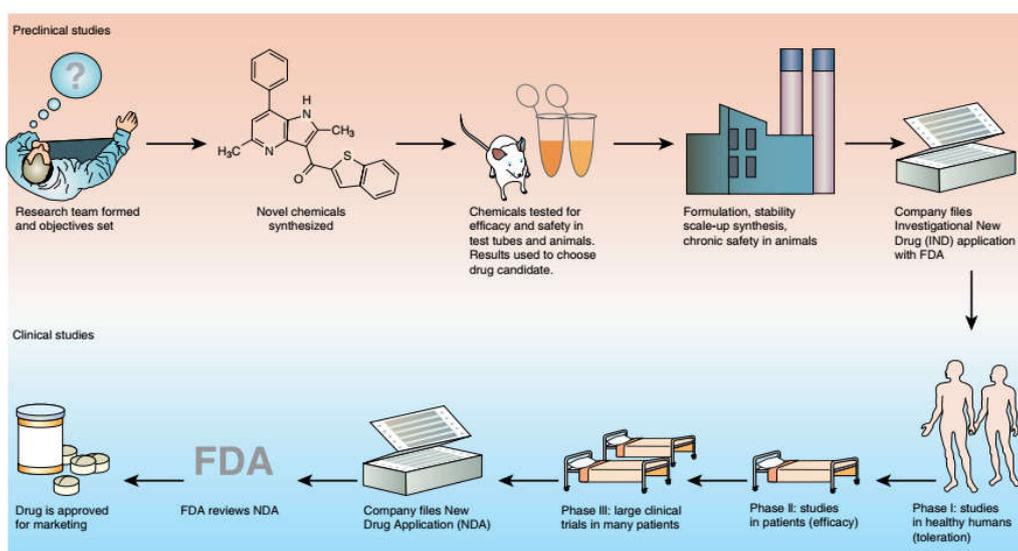


Figure 14.1 Stages of drug discovery process. *Source:* Lombardino and Lowe [41]. Reproduced with permission of Nature Publishing Group. (See insert for color representation of the figure.)

14.2 Tecnologia e Acoplamento químico de Biossensores

Um dos principais componentes de um sensor é a imobilização de um ligante na superfície do transdutor para alcançar a estabilização ao longo de um ensaio de ligação, bem como para evitar a degradação da biomolécula, devido à ligação direta dos ligantes a uma superfície de sensor de metal [19, 44]. Uma variedade de técnicas pode ser usada para conseguir a imobilização do ligante; alguns dos quais são baseados em ligação covalente, enquanto outros dependem de ligação não covalente na superfície. Químicas de acoplamento covalente comumente aplicadas para anexar um ligante a uma superfície incluem (i) química EDC-NHS, que é usada em superfícies de monocamada auto-montadas envolvendo um grupo carboxila exposto a ser ativado por EDC-NHS e ligado ao receptor por meio de seu amino grupo [15, 19, 45]; (ii) uso de superfícies apresentadoras de amino, que são adequadas para serem tratadas com ligantes bifuncionais para influenciar o acoplamento com sulfidril livre ou grupos amino no ligante [46]; e (iii) superfície do sensor derivatizada com ácido salicilhidroxâmico, que é usado para criar complexos reversíveis com ligantes ativados com piridinilditioetanamina [47] (Figura 14.2).

Os métodos de imobilização não covalente também incluem três diferentes e estratégias comumente usadas:

- 1) Superfícies apresentadoras de estreptavidina ou biotina que oferecem não apenas alta eficiência, mas também complexos estáveis e são amplamente utilizadas para imobilização de oligonucleotídeos 5'-biotinilados [18, 44, 48-50]
- 2) Anticorpos monoclonais que podem ser ligados covalentemente a uma superfície do sensor por meio da química EDC-NHS e, em seguida, proteínas marcadas por fusão ou epítipo, como glutationa S-transferase, epítipo FLAG, 6 × His e epítipo D da glicoproteína do vírus herpes simplex são direta e reversivelmente acoplados à superfície via interação antígeno-anticorpo [51, 52]

3) Grupos de coordenação de metal, como ácido nitrilotriacético e ácido iminodiacético, que são comumente aplicados para imobilizar ligantes marcados com 6×His e 6×His diretamente [53, 54] (Figura 14.3). Apesar do uso bem-sucedido dessas técnicas para imobilização de receptores em biossensores ópticos, a detecção de um composto pequeno, como drogas, geralmente é difícil no caso de aplicação de um ensaio de ligação direta. Os ensaios de biossensores podem ser agrupados em três métodos, incluindo ensaios diretos, sanduíche e sanduíche amplificado por nanomaterial. O limite de detecção (LOD) de um analito de interesse é principalmente diminuído usando o ensaio sanduíche em relação ao método direto, e o sinal mais alto com o menor LOD é obtido com nanopartículas funcionalizadas ensaios que envolvem um anticorpo secundário ou sonda. Embora as aplicações de ensaios sanduíche sejam muito desejáveis e amplamente empregadas com biossensores em muitas aplicações, desde bactérias, vírus e detecção de biomarcadores até compostos e células ambientalmente perigosos, o tipo de ensaio preferido para drogas

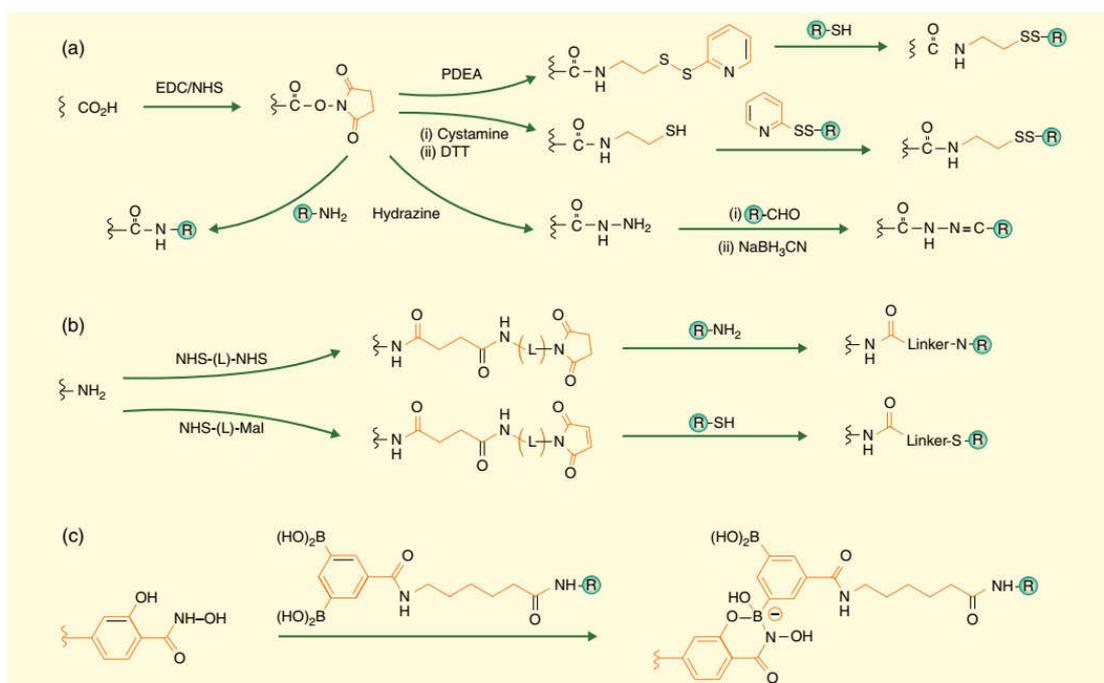


Figure 14.2 Covalent coupling methods to immobilize receptors onto the sensor surface. (a) Water-soluble EDC-mediated coupling. (b) Amino-presenting surfaces. (c) Salicylhydroxamic acid-derivatized surfaces. Source: Cooper [35]. Reproduced with permission from Nature Publishing Group.

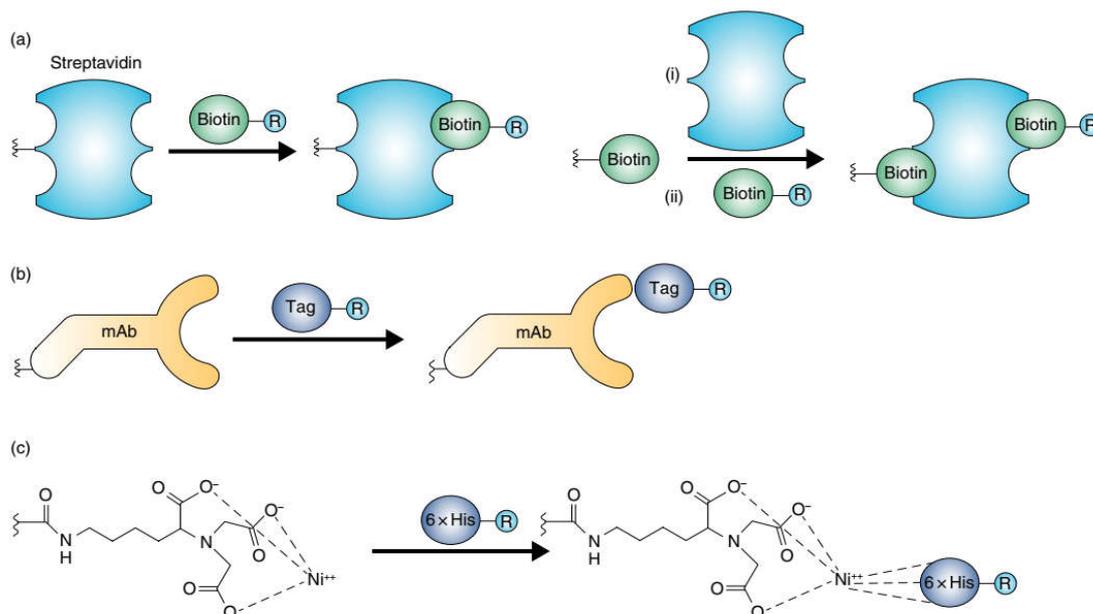


Figure 14.3 Non-covalent coupling methods to immobilize receptors onto the sensor surface. *Source:* Cooper [35]. Reproduced with permission from Nature Publishing Group.

estudos de descoberta é um ensaio direto devido ao fato de que o ensaio de ligação complexa pode causar alterações conformacionais no receptor ou na droga; portanto, pode não refletir a interação original entre o fármaco e o par de receptores na célula ou na membrana celular. Além disso, também pode obter cinética de ligação mais baixa ou mais alta do que o esperado, resultando em uma triagem malsucedida da interação droga-receptor para posterior descoberta de drogas. Duas abordagens alternativas sem marcação podem ser consideradas para evitar esse problema: (i) ensaio direto padrão que requer a imobilização do receptor da droga na superfície do sensor e, em seguida, o monitoramento da ligação da droga em uma determinada faixa de concentração e (ii) ensaio indireto que inclui a ligação da droga na superfície e, em seguida, injeção de concentração variável de receptor. Em ambos os casos, é possível determinar a cinética de ligação, padrões de dissociação-associação e afinidade matemática, bem como especificidade no caso de triagem de uma droga em amostra de soro humano. Ao empregar os primeiros modelos de sensores Biacore (como o Biacore 3000), é possível detectar a resposta de ligação de pequenas moléculas com uma massa molecular superior a 200 Da. A triagem direta de drogas foi aplicada na seleção de inibidores de DNA-girase [55],

inibidores de trombina [56], inibidores de protease do HIV [57, 58] e muitos outros. Hoje, a eficácia dos sensores ópticos em termos de determinação de pequenas moléculas melhorou muito nos últimos anos, e o limite de massa foi substancialmente reduzido para menos de 100 Da. Portanto, as aplicações de sensores ópticos na descoberta de drogas aumentaram intensamente. Novos sensores ópticos baseados em SPR foram introduzidos no mercado nos últimos anos, levando em consideração a pesquisa de drogas de alto rendimento que será discutida na próxima seção; exemplos de aplicações de descoberta de drogas baseadas em óptica também serão fornecidos.

14.3 Biossensores ópticos para descoberta de medicamentos

A última década testemunhou avanços importantes de sensores SPR com o lançamento de novos sistemas de rendimento para o mercado. Sendo proprietária do primeiro instrumento SPR comercial em 1990, a GE Healthcare (Uppsala, Suécia) lançou muitos outros sensores SPR mais avançados, incluindo Biacore C, Biacore X100, Biacore T200, Biacore S200, sistema Biacore 8K SPR e Biacore 4000. Eles foram projetados e fabricados como ferramentas apropriadas para análise de interação de proteínas, descoberta e desenvolvimento de drogas e fabricação e controle de qualidade. Todos eles servem como sistemas automatizados com ensaios em tempo real e permitem realizar estudos cinéticos. As versões mais recentes, como o sistema Biacore 8K SPR e o Biacore 4000, demonstraram grandes oportunidades para serem usadas na descoberta de medicamentos, devido à capacidade de rastrear moléculas muito pequenas (<50 Da) com um alto número de análises paralelas (2300 moléculas pequenas por dia). Esses sistemas foram desenvolvidos especialmente levando em consideração a necessidade de pesquisa de descoberta de medicamentos. Portanto, alguns importantes as características desses dois biossensores SPR estão listadas na Tabela 14.1, e todos os outros sensores SPR com seus nomes de empresas e sites são fornecidos na Tabela 14.2 para mais detalhes de cada sistema. Outra empresa estabelecida em 2006 com o nome Sierra Sensors GmbH (Hamburgo,

Alemanha) lançou sensores QCM [18, 26] e SPR [25, 36, 37, 59]. Como resultado de seu foco principal em sistemas SPR, dois biossensores SPR diferentes (SPR-2 e SPR-2/4) [36, 59, 60], que são semelhantes ao Biacore 3000, foram inicialmente lançados no mercado. Esses sistemas têm sido empregados com sucesso em várias áreas diferentes [25, 36, 37, 45, 59, 60], e seu potencial em interações droga-receptor foi demonstrado em trabalhos recentes [36, 37].

Table 14.1 Key features of Biacore 8K SPR system and Biacore 4000 as potential high-throughput drug discovery tools.

	Biacore 8K	Biacore 4000
Key features	<p>A single solution for interaction analysis in both screening and characterization</p> <p>Screening of 2300 small-molecule fragments in a day</p> <p>High-quality kinetic characterization of 64 interactions in 5 h</p> <p>60h unattended runtime with queuing abilities and rapid multi-run evaluations</p> <p>Confident interaction analysis of small molecules binding to complex targets such as GPCRs</p>	<p>High-sensitivity and high-quality interaction data for better informed decision making</p> <p>60h unattended operation with parallel analysis of up to 16 targets</p> <p>Large-scale molecular analysis generating up to 4800 interactions in 24 h</p> <p>Seamless LIMS integration with convenient data import and export functionality</p> <p>Innovative software solutions for increased productivity and performance</p>
Main applications	<p>Selection of biotherapeutic or small-molecule hits based on affinity and kinetic ranking</p> <p>Characterization and optimization of selected binders based on detailed kinetic and affinity information</p>	<p>Fragment and LMW compound screening</p> <p>Compound hit validation, hit-to-lead characterization, and lead optimization of compounds</p> <p>Antibody and antibody fragment screening and characterization</p>
Detection technology	Surface plasmon resonance (SPR) biosensor	Surface plasmon resonance (SPR) biosensor
Information provided	Kinetic and affinity data (k_a , k_d , K_D), specificity, selectivity, and screening data	Binding kinetic, affinity, selectivity, and specificity data. Concentration measurements
Data presentation	Result tables, result plots, and real-time monitoring of sensorgrams	
Analysis time per cycle	Typically 2–15 min	4 targets per flow cell, cycle time 5 min
Sample type	Small-molecule drug candidates to high molecular weight proteins (also DNA, RNA, polysaccharides, lipids, cells, and viruses) in various sample environments (e.g., in DMSO-containing buffers, plasma, and serum)	LMW drug candidates to high molecular weight proteins in various sample environments, for example, in DMSO-containing buffers, cell culture supernatants, or serum

	Biacore 8K	Biacore 4000
Required sample volume	Injection volume plus 20–50 μL (application dependent)	N/A
Injection volume	1–200 μL	Typically 60 μL per flow cell (range 30–425 μL)
Sample/reagent capacity	4 \times 96- or 384-well microplates, normal and deep-well	Antibody screening: 10 \times 96-well microplates LMW compound screening: 6 \times 384-well microplates Kinetic characterization: 4 \times 384-well microplates
Number of flow cells	16 in 8 channels	Parallel processing of four independent flow cells, each containing five detection spots
Analysis temperature range	4–40°C	4–40°C
Molecular weight detection	No lower limit for organic molecules	Analytes with relative molecular mass (M_r) > 50 (Da)

A empresa fabricou e lançou novos sensores baseados em SPR (MASS-1 e MASS-2) com grandes melhorias, incluindo análises de amostras paralelas de até 16 amostras, triagem de mais de 7.000 interações por dia, análise detalhada de mais de 2.000 amostras por dia, ampla faixa de temperatura entre 4 e 40° C para análise e detecção de compostos muito menores. Portanto, MASS-1 e MASS-2 podem servir como ferramentas muito adequadas e confiáveis na descoberta de medicamentos aplicações para casos de câncer. Os recursos notáveis do sensor MASS-1 estão listados na Tabela 14.3, e as informações detalhadas podem ser encontradas no site da empresa para outros tipos de sensores (Tabela 14.2). A capacidade de monitoramento em tempo real, a alta sensibilidade e a natureza do rendimento dos sensores ópticos recém-desenvolvidos aumentarão seu uso na pesquisa de medicamentos e acelerarão o processo de descoberta de medicamentos. Altermann et al. usou o sensor SPR para rastrear inibidores de protease do HIV e demonstrou que a protease do HIV-1 é um alvo valioso para o tratamento da AIDS, devido ao seu papel central na replicação do vírus HIV.

Table 14.2 Developers of label-free optical sensor platforms.

Provider	Sensor type	Product	Website
Axela	Diffraction optic sensors	dot*—Avidin sensor, dot*—Covalent sensor, panelPlus™, and Axela custom sensors	http://www.axelabiosensors.com
Affinité Instruments	SPR	P4SPR	http://affiniteinstruments.com
Biacore	SPR	Q, 3000, C, X100, T200, S200, SK SPR system, and 4000	https://www.biacore.com/lifesciences
Bio-Rad	SPR	ProteOn™	http://www.bio-rad.com
BioNavis	SPR	MP-SPR	http://www.bionavis.com
Biopix	Enhanced SPR	404pi	http://www.biopix.com
Biosensing Instrument	SPR	BI-2500 and BI-4500	http://biosensingusa.com
IBIS Technologies BV	SPR imager	MX96	http://www.ibis-spr.nl
Plexera	SPR imaging	PlexArray® HT System	http://www.plexera.com
Nicoya Lifesciences	SPR	OpenSPR sensors	https://nicoyalife.com
Reichert	SPR	SR7500DC and Reichert4SPR	http://www.reichertspr.com
Sensia	SPR	Indicator-G	http://www.sensia.es
Sierra Sensors	SPR	SPR-2/4, MASS-1, and MASS-2	http://www.sierrasensors.com

Table 14.3 Characteristics of MASS-1 (Sierra Sensors, Hamburg, Germany) surface plasmon resonance biosensor.

Detection technology	SPR imaging
Working principle	Parallel processing of up to eight simultaneous injections over eight dual-sensor flow cells Fully individual addressing of all 16 sensor spots in the 8 × 2 array
Type of information obtained	Binding specificity and selectivity, binding kinetics, affinity, concentration, and thermodynamics
Sample types	Large and small molecules in a variety of sample buffers, solvents (e.g., DMSO, MeOH) and matrices (e.g., cell culture supernatants, serum, plasma)
Molecular weight detection limit	>100 Da
Sample concentration	≥50 pM
Kinetic analysis	Association rate, k_a : 10^3 – 10^7 M ⁻¹ s ⁻¹ Dissociation rate, k_d : 10^{-6} to 10^{-1} s ⁻¹
Affinity	0.1 mM to 1 pM
Number of flow cells	8 dual-sensor flow cells
Number of sensors	16, individually addressable
Flow rate	5–50 μL min ⁻¹
Injection volume	1–300 μL
Sample consumption	Injected volume + 10–25 μL (injection type dependant)
Analysis temperature	4–40 °C (or 15 °C below ambient)
Sample Temperature	Ambient
Sample capacity	Two 96-well plates + one 96-vial reagent rack + one 96 well
Automated buffer exchange	Yes, up to five different buffer solutions
Sample throughput	2300 samples per 24 h (5 min cycle ⁻¹) with dedicated controls
Cycle throughput	Simultaneous processing of up to eight samples per cycle

Os cientistas realizaram dois ensaios diferentes para triagem: (i) a protease do HIV foi imobilizada em um chip e a amostra foi então injetada na superfície. Um substrato biotinilado foi usado para bloquear as regiões livres de ligação da enzima. (ii) Um inibidor modelo foi imobilizado na superfície do sensor e a amostra com inibidor de HIV foi incubada com amostra de enzima. O inibidor modelo imobilizado foi então ligado à enzima livre. Os ensaios foram investigados nas faixas de concentração de 0,1 nM a 10 μ M e 1-100 nM, respectivamente. A pesquisa indicou a compatibilidade desses dois ensaios competitivos para triagem de inibidores do HIV [61]. Portanto, os inibidores da protease do HIV servem como um dos melhores candidatos a drogas a serem usadas contra a AIDS. Abordagem semelhante com sensor SPR também foi utilizada para inibidores de trombina para evitar a coagulação do sangue. O uso de sensores SPR também é bem-sucedido para a caracterização de drogas de ligação ao DNA. Em um estudo, as sondas de DNA foram imobilizadas na superfície do sensor por meio de suas marcas de biotina e demonstraram regiões de ligação para muitas proteínas de sinalização humana. As interações de ligação entre os oligonucleotídeos de DNA e os compostos alvo, incluindo distamicina, cromomicina e mitramicina, podem ser analisadas usando a abordagem de ensaio direto [62]. As abordagens desenvolvidas podem ser amplamente aplicadas em uma triagem rápida de interações moleculares entre drogas de ligação ao DNA e o DNA alvo sequências em casos de câncer. Os novos sensores SPR são extremamente capazes de aumentar a eficácia desta abordagem devido à possibilidade de triagem simultânea de muitos alvos. Kampranis et al. avaliaram a cinética de ligação de drogas ciclotialidina e cumarina a girases de DNA mutantes e de tipo selvagem. A pesquisa demonstrou interações droga-proteína de alta afinidade com constante de dissociação de 1-150 nM e o papel crítico dos resíduos na girase para a ligação da droga [63]. Os receptores acoplados à proteína G (GPCRs) constituem a principal classe de fármacos. Em contraste com a

abordagem tradicional para a descoberta de ligantes de GPCR, a triagem de fragmentos está recebendo grande atenção como uma nova abordagem. O princípio da descoberta de drogas baseada em fragmentos depende de um número relativamente pequeno de fragmentos de baixo peso molecular que exibem grandes áreas de espaço químico [39, 64-66].

No entanto, esta abordagem não tem sido utilizada rotineiramente para proteínas de membrana e é limitada a alguns alvos de GPCR atualmente aprovados. A triagem de uma pequena biblioteca é a etapa inicial da descoberta de drogas baseadas em fragmentos que geralmente inclui apenas algumas centenas a alguns milhares de compostos de baixo peso molecular chamados de fragmentos. O peso molecular desses fragmentos geralmente está na faixa de 100 a 300 Da. A tecnologia SPR tem atualmente oferecido os métodos de triagem dominantes para a descoberta de drogas baseadas em fragmentos. Aristóteles et al. relataram a utilidade da triagem de fragmentos baseados em SPR de GPCRs de tipo selvagem pela invenção de novos antagonistas de alta afinidade do adrenoceptor β_2 . É demonstrado que a triagem de fragmentos usando SPR pode ser alcançada em GPCRs nativos marcados sem a necessidade de engenharia de proteínas abrangente. O método ofereceu uma grande vantagem ao rastrear receptores nativos marcados, sem introduzir mutações estabilizadoras; assim, a farmacologia do ligando do tipo selvagem pode ser protegida. A triagem de fragmentos baseada em SPR não apenas fornece uma nova abordagem eficaz para a descoberta de novos receptores GPCR, mas também demonstra oportunidades excepcionais para a triagem de ligantes contra complexos de sinalização de receptores e conformações de sinalização tendenciosas dos receptores [67]. Algumas técnicas de SPR localizadas (L-SPR) também foram desenvolvidas para a triagem rápida de candidatos a medicamentos contra o citocromo P450s, que desempenha um papel crítico nas interações medicamentosas [68]. Além disso, o método também é empregado na triagem de drogas bloqueadoras de oligomerização contra a doença de Alzheimer ou outras doenças que mostram um

grande potencial para ser usado em uma ampla gama de aplicações [69]. O rápido reconhecimento de resíduos de drogas em amostras clínicas também é possível empregando imunossensores SPR que visam baixos níveis de anfetaminas ou esteróides [70, 71]. Mais exemplos de descoberta de medicamentos baseados em SPR estão resumidos na Tabela 14.4.

Table 14.4 Examples of SPR-based drug discovery works from the literature.

SPR biosensors in drug analysis	Investigated drug compounds	Objective	References
High-throughput screening (HTS)	Candidate drugs and drug fragments Primary screening of large libraries comprising small (drug) molecules	Target and assay validation	[72]
Pharmacokinetic drug profiling	Alprenolol, desipramine, dibucaine, homochlorcyclizine, hydrochlorothiazide, imipramine, ketoprofen, oxprenolol, metoprolol, naproxen, propranolol, pindolol, verapamil, salmeterol, suprofen, tetracaine, and tolmetin. Atenolol, creatinine, D-glucose, mannitol, sulfasalazine, and urea. Diverse drugs with a wide range of molecular weight (138.1–664.8 Da) and chemical functionalities Drugs with high transcellular absorption	Predictive <i>in vitro</i> drug permeability Passive transport of drugs through membrane Characterization of membrane binding affinity	[73–75]
Early ADME/T studies	Small molecules (130–800 Da) Drugs binding to alpha(1)-acid glycoprotein (AGP)	Rapid <i>in vitro</i> assays for defined ADME/ $T_{parameters}$ as protein-binding studies, for potential drug candidates Prediction/measuring of drug/human serum albumin binding.	[76]
Fragment-based drug design	Small molecules (100–300 Da) Active compounds with Mw < 500 Da, LogD < 5, and solubility > 10 μ M Thrombin inhibitors HIV protease inhibitors DNA-binding drugs and novel inhibitors of the bacterial enzyme DNA gyrase	Identification of lead structures Affinity ranking and kinetics for small molecules binding to target protein	[55, 62, 70, 77–79]

Source: Adapted from Olaru et al. [43].

14.4 Simulações Computacionais e Novas Abordagens para interações droga-receptor

O uso de programas computacionais para simular as interações entre drogas e ligantes está fornecendo informações teóricas e úteis antes das aplicações reais. Recentemente, os receptores de drogas artificiais foram desenvolvidos com o auxílio da química supramolecular, e eles foram testados contra suas drogas-alvo usando vários sensores baseados em SPR (SPR-2 da Sierra Sensors, Biacore 3000 da GE Healthcare) para determinar a interação específica, afinidade de ligação, e ligação não específica [37, 80]. O monitoramento em tempo real das drogas até níveis baixos de ng mL⁻¹ pode ser alcançado com sucesso. Os medicamentos comumente prescritos - diclofenaco como analgésico, metoprolol como β -bloqueador e vancomicina como antibiótico -

foram investigados nesta pesquisa. A droga alvo o diclofenaco foi quantificado em uma ampla faixa linear de 1,24 a 80 ng mL⁻¹, e a superfície do sensor pode ser regenerada até 30 análises de amostra sem perda significativa no sinal. Além disso, uma afinidade de ligação muito alta entre o diclofenaco e seu receptor específico foi calculada usando o analisador de software SPR-2. A constante de dissociação (KD) foi encontrada em $4,27 \times 10^{-10}$ M. Os resultados do sensor foram confirmados por LC-MS que foi combinado com um sistema de extração em fase sólida (SPE). Um ensaio de detecção de diclofenaco foi inicialmente desenvolvido em LC-MS, e uma faixa de investigação de 1-5.000 ng mL⁻¹ com um LOD de 18 ng mL⁻¹ foi alcançada. Por outro lado, diclofenaco na quantidade de 200 ng mL⁻¹ foi filtrado através de colunas SPE que foram previamente imobilizadas com receptores específicos de drogas usando técnicas de ligação covalente envolvendo EDC-NHS ou química de glutaraldeído. Experimentos de controle também foram conduzidos filtrando a droga através de colunas SPE que foram processadas na ausência do receptor. Todos os filtrados foram então avaliados usando o método desenvolvido anteriormente em LC-MS. A captação de diclofenaco pelo receptor na coluna de SPE foi de 100%, o que significa que 200 ng mL⁻¹ de diclofenaco foi captado por seus receptores, não sendo encontrado na solução filtrada. Ambas as químicas de superfície resultaram em resultados idênticos. No caso do experimento controle, quantidade completa do diclofenaco foi observada no filtrado devido à ausência dos receptores nas colunas [37].

A melhoria adicional desta pesquisa foi investigada integrando a abordagem de química computacional nas interações droga-receptor. Receptores artificiais de drogas foram projetados usando simulação computacional para a fabricação de receptores de alta afinidade para reconhecimento e monitoramento de drogas em combinação com biossensores ópticos. A biblioteca de monômeros composta por 21 compostos químicos diferentes foi rastreada para o fármaco alvo metoprolol com base na energia de ligação entre cada monômero e o alvo para a seleção dos melhores

monômeros para desenvolver receptores de sucesso. Os receptores produzidos foram caracterizados em termos de qualidade, uniformidade e tamanho antes da análise de afinidade por meio de biossensores ópticos baseados em SPR (SPR-2 e SPR-2/4 da Sierra Sensors e Biacore 3000 da GE Healthcare). O receptor específico do metoprolol foi imobilizado na superfície do sensor via acoplamento covalente, e este fármaco β -bloqueador foi detectado com sucesso na faixa de concentração linear de 1,9 ng mL⁻¹ a 1 μ g mL⁻¹ com um bom coeficiente de correlação de 0,97. Um método de regeneração desenvolvido usando glicina-HCl 0,1 M permitiu a reutilização do sensor para análise subsequente da amostra, e estudos de reatividade cruzada com drogas de controle revelaram um ensaio de biossensor altamente específico para a interação metoprolol-receptor. Os dados para análise cinética foram coletados e processados através de os analisadores Biacore 3000 e SPR-2/SPR-2/4 para determinar a afinidade entre o receptor e o metoprolol. O KD foi de $1,35 \times 10^{-10}$ M usando o modelo de ligação de Langmuir. Além disso, um ensaio competitivo de ligação de drogas também foi conduzido

que confirma a confiabilidade do sensor óptico, bem como o sucesso do receptor artificial desenvolvido. A afinidade do receptor e capacidade para metoprolol também foram confirmadas pelo método SPE acoplado com LC-MS. Os resultados alcançados destacam o sucesso do receptor modelado computacionalmente com biossensor SPR para detecção e monitoramento farmacêutico [36, 80]. Todas essas conquistas em monitoramento de drogas, interação droga-receptor e a detecção de drogas baseada em sensores ópticos demonstrou a imensa importância de abordagens computacionais e novos métodos para aumentar o desempenho dos processos de triagem, bem como a afinidade de ligação entre receptores naturais e drogas. As ferramentas bioinformáticas e as informações avançadas obtidas da pesquisa genômica e proteômica podem fornecer uma melhor compreensão sobre as interações droga-receptor. Quando esse conhecimento é combinado com ferramentas de caracterização amplamente empregadas e

altamente confiáveis, os pontos precisos de interação entre a droga de interesse e seu receptor podem ser visualizados *in vivo*; portanto, isso leva a uma triagem mais rápida e eficiente de medicamentos durante os processos de descoberta de medicamentos. O potencial dos biossensores ópticos com todas essas melhorias e o desenvolvimento de sensores ópticos mais avançados com sua natureza de alto rendimento têm se mostrado uma grande promessa no desenvolvimento de novos medicamentos para casos de câncer.

14.5 Conclusões

A última década testemunhou enormes avanços em sensores ópticos, e isso permite conduzir pesquisas de descoberta de drogas rápidas, confiáveis e de alto rendimento. A tecnologia do sensor SPR tornou-se uma ferramenta padrão empregada para caracterizar produtos farmacêuticos. Obter informações detalhadas e não depender de rotulagem torna a tecnologia SPR um complemento perfeito para técnicas de monitoramento de alto rendimento. Além disso, novos biossensores baseados em SPR foram particularmente desenvolvidos levando em conta a necessidade neste campo que levou à triagem bem-sucedida de drogas usando metodologias de ensaio direto, mesmo que tenham peso molecular muito baixo. As interações receptor-fármaco, bem como as interações inespecíficas receptor-fármaco, podem ser facilmente investigadas simultaneamente e mais de 7.000 interações por dia podem ser analisadas com sucesso. Devido à conscientização da indústria farmacêutica sobre o grande potencial da tecnologia de sensores SPR, ela servirá como uma ferramenta indispensável no desenvolvimento de novos medicamentos para casos de câncer.

References

- 1 Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, 64, 4-17.
- 2 Gaulton, A.; Bellis, L. J.; Bento, A. P.; Chambers, J.; Davies, M.; Hersey, A.; Light, Y.; McGlinchey, S.; Michalovich, D.; Al-

Lazikani, B.; Overington, J. P. *Nucleic Acids Research* **2012**, *40*, D1100–D1107.

3 Famm, K. *Nature* **2013**, *496*, 300.

4 Csermely, P.; Korcsmaros, T.; Kiss, H. J. M.; London, G.; Nussinov, R. & *Therapeutics* **2013**, *138*, 333–408.

5 Slusher, B. S.; Conn, P. J.; Frye, S.; Glicksman, M.; Arkin, M. *Nature Reviews Drug Discovery* **2013**, *12*, 811–812.

6 Kenakin, T.; Christopoulos, A. *Nature Reviews Drug Discovery* **2013**, *12*, 205–216.

7 Wang, X. J.; Zhang, A. H.; Wang, P.; Sun, H.; Wu, G. L.; Sun, W. J.; Lv, H. T.; Jiao, G. Z.; Xu, H. Y.; Yuan, Y.; Liu, L.; Zou, D. X.; Wu, Z. M.; Han, Y.; Yan, G. L.; Dong, W.; Wu, F. F.; Dong, T. W.; Yu, Y.; Zhang, S. X.; Wu, X. H.; Tong, X.; Meng, X. C. *Molecular & Cellular Proteomics* **2013**, *12*, 1226–1238.

8 Schenone, M.; Dancik, V.; Wagner, B. K.; Clemons, P. A. *Nature Chemical Biology* **2013**, *9*, 232–240.

9 Zofou, D.; Ntie-Kang, F.; Sippl, W.; Efange, S. M. N. *Natural Product Reports* **2013**, *30*, 1098–1120.

10 Skiryecz, A.; Kierszniowska, S.; Méret, M.; Willmitzer, L.; Tzotzos, G. A. *Trends in Biotechnology* **2016**, *34*, 781–790.

11 Gomez-Verjan, J.; Gonzalez-Sanchez, I.; Estrella-Parra, E.; Reyes-Chilpa, R. *Scientometrics* **2015**, *105*, 1019–1030.

12 Turner, A. P. F. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 3184–3196.

13 Cetin, A. E.; Coskun, A. F.; Galarreta, B. C.; Huang, M.; Herman, D.; Ozcan, A.; Altug, H. *Light-Science & Applications* **2014**, *3*, e122.

14 Altintas, Z.; Fakanya, W. M.; Tothill, I. E. *Talanta* **2014**, *128*, 177–186.

15 Altintas, Z.; Kallempudi, S. S.; Gurbuz, Y. *Talanta* **2014**, *118*, 270–276.

- 16 Altintas, Z.; Tothill, I. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2013**, 188, 988–998.
- 17 Altintas, Z.; Kallempudi, S. S.; Sezerman, U.; Gurbuz, Y. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2012**, 174, 187–194.
- 18 Altintas, Z.; Tothill, I. E. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2012**, 169, 188–194.
- 19 Altintas, Z.; Uludag, Y.; Gurbuz, Y.; Tothill, I. E. *Talanta* **2011**, 86, 377–383.
- 20 Ahmed, M. U.; Saaem, I.; Wu, P. C.; Brown, A. S. *Critical Reviews in Biotechnology* **2014**, 34, 180–196.
- 21 Grodzinski, P.; Silver, M.; Molnar, L. K. *Expert Review of Molecular Diagnostics* **2006**, 6, 307–318.
- 22 Jokerst, J. C.; Emory, J. M.; Henry, C. S. *Analyst* **2012**, 137, 24–34.
- 23 Li, M.; Li, Y. T.; Li, D. W.; Long, Y. T. *Analytica Chimica Acta* **2012**, 734, 31–44.
- 24 Long, F.; Zhu, A. N.; Shi, H. C. *Sensors* **2013**, 13, 13928–13948.
- 25 Abdin, M. J.; Altintas, Z.; Tothill, I. E. *Biosensors & Bioelectronics* **2015**, 67, 177–183.
- 26 Masdor, N. A.; Altintas, Z.; Tothill, I. E. *Biosensors & Bioelectronics* **2016**, 78, 328–336.
- 27 Li, S. Q.; Chai, Y. T.; Chin, B. A. In *Conference on Sensing for Agriculture and Food Quality and Safety VII*, Baltimore, MD, **2015**.
- 28 Warriner, K.; Reddy, S. M.; Namvar, A.; Neethirajan, S. *Trends in Food Science & Technology* **2014**, 40, 183–199.
- 29 Narsaiah, K.; Jha, S. N.; Bhardwaj, R.; Sharma, R.; Kumar, R. *Journal of Food Science and Technology-Mysore* **2012**, 49, 383–406.
- 30 Sankaran, S.; Panigrahi, S.; Mallik, S. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2011**, 155, 8–18.

- 31 Lavecchia, T.; Tibuzzi, A.; Giardi, M. T. In *Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors*, Giardi, M. T.; Rea, G.; Berra, B., Eds., Springer Science + Business Media, LLC, New York, **2010**, pp 267–281.
- 32 Alocilja, E. C. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **2009**, 237, 77.
- 33 Siderius, M.; Shanmugham, A.; England, P.; van der Meer, T.; Bebelman, J. P.; Blaazer, A. R.; de Esch, I. J. P.; Leurs, R. *Analytical Biochemistry* **2016**, 503, 41–49.
- 34 Irannejad, R.; Tomshine, J. C.; Tomshine, J. R.; Chevalier, M.; Mahoney, J. P.; Steyaert, J.; Rasmussen, S. G. F.; Sunahara, R. K.; El-Samad, H.; Huang, B.; von Zastrow, M. *Nature* **2013**, 495, 534–538.
- 35 Cooper, M. A. *Nature Reviews Drug Discovery* **2002**, 1, 515–528.
- 36 Altintas, Z.; France, B.; Ortiz, J. O.; Tothill, I. E. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2016**, 224, 726–737.
- 37 Altintas, Z.; Guerreiro, A.; Piletsky, S. A.; Tothill, I. E. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2015**, 213, 305–313.
- 38 Ferrie, A. M.; Wang, C. M.; Deng, H. Y.; Fang, Y. *Integrative Biology* **2013**, 5, 1253–1261.
- 39 Geschwindner, S.; Dekker, N.; Horsefield, R.; Tigerstrom, A.; Johansson, P.; Scott, C. W.; Albert, J. S. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56, 3228–3234.
- 40 Vuignier, K.; Veuthey, J. L.; Carrupt, P. A.; Schappler, J. *Drug Discovery Today* **2013**, 18, 1030–1034.
- 41 Lombardino, J. G.; Lowe, J. A. *Nature Reviews Drug Discovery* **2004**, 3, 853–862.
- 42 Fang, Y. *Assay and Drug Development Technologies* **2006**, 4, 583–595.
- 43 Olaru, A.; Bala, C.; Jaffrezic-Renault, N.; Aboul-Enein, H. Y. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2015**, 45, 97–105.

- 44 Altintas, Z.; Uludag, Y.; Gurbuz, Y.; Tothill, I. *Analytica Chimica Acta* **2012**, 712, 138–144.
- 45 Pawula, M.; Altintas, Z.; Tothill, I. E. *Talanta* **2015**, 146, 823–830.
- 46 Nunomura, W.; Takakuwa, Y.; Parra, M.; Conboy, J.; Mohandas, N. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, 275, 24540–24546.
- 47 Stolowitz, M. L.; Ahlem, C.; Hughes, K. A.; Kaiser, R. J.; Kesicki, E. A.; Li, G. S.; Lund, K. P.; Torkelson, S. M.; Wiley, J. P. *Bioconjugate Chemistry* **2001**, 12, 229–239.
- 48 Jensen, K. K.; Orum, H.; Nielsen, P. E.; Norden, B. *Biochemistry* **1997**, 36, 5072–5077.
- 49 Hart, D. J.; Speight, R. E.; Cooper, M. A.; Sutherland, J. D.; Blackburn, J. M. *Nucleic Acids Research* **1999**, 27, 1063–1069.
- 50 Nilsson, P.; Persson, B.; Uhlen, M.; Nygren, P. A. *Analytical Biochemistry* **1995**, 224, 400–408.
- 51 Kazemier, B.; deHaard, H.; Boender, P.; vanGemen, B.; Hoogenboom, H. *Journal of Immunological Methods* **1996**, 194, 201–209.
- 52 Nice, E.; Layton, J.; Fabri, L.; Hellman, U.; Engstrom, A.; Persson, B.; Burgess, A. W. *Journal of Chromatography* **1993**, 646, 159–168.
- 53 Radler, U.; Mack, J.; Persike, N.; Jung, G.; Tampe, R. *Biophysical Journal* **2000**, 79, 3144–3152.
- 54 Sigal, G. B.; Bamdad, C.; Barberis, A.; Strominger, J.; Whitesides, G. M. *Analytical Chemistry* **1996**, 68, 490–497.
- 55 Boehm, H. J.; Boehringer, M.; Bur, D.; Gmuender, H.; Huber, W.; Klaus, W.; Kostrewa, D.; Kuehne, H.; Luebbers, T.; Meunier-Keller, N. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, 43, 2664–2674.
- 56 Karlsson, R.; Kullman-Magnusson, M.; Hamalainen, M. D.; Remaeus, A.; Andersson, K.; Borg, P.; Gyzander, E.; Deinum, J. *Analytical Biochemistry* **2001**, 291, 306–306.

- 57 Markgren, P. O.; Hamalainen, M.; Danielson, U. H. *Analytical Biochemistry* **2000**, 279, 71–78.
- 58 Hamalainen, M. D.; Markgren, P. O.; Schaal, W.; Karlen, A.; Classon, B.; Vrang, L.; Samuelsson, B.; Hallberg, A.; Danielson, U. H. *Journal of Biomolecular Screening* **2000**, 5, 353–359.
- 59 Altintas, Z.; Gittens, M.; Guerreiro, A.; Thompson, K.-A.; Walker, J.; Piletsky, S.; Tothill, I. E. *Analytical Chemistry* **2015**, 87, 6801–6807.
- 60 Altintas, Z.; Abdin, M. J.; Tothill, A. M.; Karim, K.; Tothill, I. E. *Analytica Chimica Acta* **2016**, 935, 239–248.
- 61 Alterman, M.; Sjobom, H.; Safsten, P.; Markgren, P. O.; Danielson, U. H.; Hamalainen, M.; Lofas, S.; Hulten, J.; Classon, B.; Samuelsson, B.; Hallberg, A. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2001**, 13, 203–212.
- 62 Gambari, R.; Feriotto, G.; Rutigliano, C.; Bianchi, N.; Mischianti, C. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2000**, 294, 370–377.
- 63 Kampranis, S. C.; Gormley, N. A.; Tranter, R.; Orphanides, G.; Maxwell, A. *Biochemistry* **1999**, 38, 1967–1976.
- 64 Murray, C. W.; Rees, D. C. *Nature Chemistry* **2009**, 1, 187–192.
- 65 Hopkins, A. L.; Groom, C. R.; Alex, A. *Drug Discovery Today* **2004**, 9, 430–431.
- 66 Navratilova, I.; Hopkins, A. L. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2010**, 1, 44–48.
- 67 Aristotelous, T.; Ahn, S.; Shukla, A. K.; Gawron, S.; Sassano, M. F.; Kahsai, A. W.; Wingler, L. M.; Zhu, X.; Tripathi-Shukla, P.; Huang, X. P.; Riley, J.; Besnard, J.; Read, K. D.; Roth, B. L.; Gilbert, I. H.; Hopkins, A. L.; Lefkowitz, R. J.; Navratilova, I. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2013**, 4, 1005–1010.
- 68 Das, A.; Zhao, J.; Schatz, G. C.; Sligar, S. G.; Van Duyne, R. P. *Analytical Chemistry* **2009**, 81, 3754–3759.

- 69 Hong, Y.; Ku, M.; Lee, E.; Suh, J. S.; Huh, Y. M.; Yoon, D. S.; Yang, J. *Journal of Biomedical Optics* **2014**, 19, 051202.
- 70 Lee, J. H.; Kim, B. C.; Oh, B. K.; Choi, J. W. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* **2013**, 9, 1018–1026.
- 71 Mitchell, J. *Sensors* **2010**, 10, 7323–7346.
- 72 Giannetti, A. M. *Methods in Enzymology* **2011**, 493, 170–217.
- 73 Abdiche, Y. N.; Myszka, D. G. *Analytical Biochemistry* **2004**, 328, 233–243.
- 74 Frostell-Karlsson, A.; Widegren, H.; Green, C. E.; Hamalainen, M. D.; Westerlund, L.; Karlsson, R.; Fenner, K.; Van De Waterbeemd, H. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2005**, 94, 25–37.
- 75 Baird, C. L.; Courtenay, E. S.; Myszka, D. G. *Analytical Biochemistry* **2002**, 310, 93–99.
- 76 Frostell-Karlsson, A.; Remaeus, A.; Roos, H.; Andersson, K.; Borg, P.; Hamalainen, M.; Karlsson, R. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, 43, 1986–1992.
- 77 Anraku, K.; Fukuda, R.; Takamune, N.; Misumi, S.; Okamoto, Y.; Otsuka, M.; Fujita, M. *Biochemistry* **2010**, 49, 5109–5116.
- 78 Geschwindner, S.; Carlsson, J. F.; Knecht, W. *Sensors* **2012**, 12, 4311–4323.
- 79 Mani, R. J.; Dye, R. G.; Snider, T. A.; Wang, S. P.; Clinkenbeard, K. D. *Biosensors & Bioelectronics* **2011**, 26, 4832–4836.
- 80 Altintas, Z.; Tothill, I. E. Molecularly Imprinted Polymer-based Affinity Nanomaterials for Pharmaceuticals Capture, Filtration and Detection, GB Patent **2014**, GB1413210.4