



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO
BIOSENSORES Y SU APLICACIÓN EN EL
DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS

Autor: Esther Alemán Sierra

Tutor: Prof. Dra. María José Hernaiz Gómez-Degano

Convocatoria: Junio 2018

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	4
3. OBJETIVOS	5
4. METODOLOGÍA	5
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	6
5.1 Descripción de la técnica.	6
5.2 Estudios de unión fármaco-receptor (<i>Binding</i>).	8
5.3 Métodos de inmovilización de biomoléculas a la superficie de oro.	11
5.4 Ventajas de los biosensores en el descubrimiento de fármacos	14
5.5 Aplicaciones de los biosensores ópticos en el descubrimiento de fármacos. ...	15
6. CONCLUSIONES	18
7. BIBLIOGRAFÍA	18

1. RESUMEN

En este trabajo se trata la importancia de los biosensores basados en la Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR) y sus aplicaciones. El funcionamiento de este tipo de dispositivos está basado en un fenómeno óptico denominado SPR. A partir de ellos y aplicando los principios físicos que rigen el SPR, los biosensores pueden aportarnos gran cantidad de información. La mayor utilidad de este tipo de instrumentos es el estudio de las interacciones biomoleculares fármaco-receptor, que en la actualidad presentan una enorme aplicación en el descubrimiento de fármacos, pudiendo emplearse en las diferentes etapas de estudio de este proceso:

- Búsqueda de fármacos cabeza de serie entre un gran número de moléculas
- Identificación de posibles dianas farmacológicas
- Caracterización farmacocinética y termodinámica de la interacción biomolecular (serie ADME)
- Estudio de afinidad entre el fármaco y su receptor
- Ensayos que permiten la optimización del fármaco para una mejor interacción con la diana
- Caracterización de la unión de biomoléculas a sus receptores de membrana (1,2)

El manejo de este tipo de instrumentos es bastante sencillo, pero precisa de la inmovilización de una de las biomoléculas (fármaco o receptor) a la superficie del dispositivo. Posteriormente, se deja fluir la molécula no inmovilizada (fármaco o receptor) sobre la misma. De esta manera, podemos llevar a cabo el análisis cualitativo y cuantitativo de la interacción estudiada en tiempo real. En el equipo obtendremos una representación llamada Sensograma, cuyo estudio detallado nos aportará toda la información necesaria para caracterizar la unión. Por todo esto, actualmente este tipo de dispositivos es ampliamente solicitado por la industria farmacéutica en sus distintas secciones.

Palabras clave: biosensor, SPR, fármaco, receptor, interacción, descubrimiento.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Los biosensores son instrumentos para la medición de parámetros biológicos o químicos, que normalmente cuentan con un componente de naturaleza biológica y otro fisicoquímico. Están basados en principios de detección óptica y permiten obtener información sobre la unión fármaco-receptor a la vez que realizamos el ensayo. Este tipo de sistemas permite medir la cantidad de complejo formado entre una molécula (receptor), inmovilizada sobre la superficie del sensor, y otra molécula en solución (fármaco). La función del biosensor óptico es determinar los cambios que se producen en el índice de refracción en la interfaz de la unión de las biomoléculas. El principio en el que se basan los biosensores es la **Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR)**, sobre todo en el descubrimiento de fármacos de bajo peso molecular. Gracias a los avances en el desarrollo de hardware y software con un elevado nivel de sensibilidad en la detección de datos, se pudieron obtener este tipo de sistemas.

La importancia de esta técnica radica en la correcta caracterización de las dianas farmacológicas y los fármacos cabeza de serie, esencial en el proceso de descubrimiento de un nuevo fármaco, así como la interacción que se produce entre ellos, es por ello que todas las tecnologías que permiten este hecho están siendo muy demandadas en la industria farmacéutica. (3)

Los biosensores ópticos permiten el seguimiento en tiempo real de la interacción entre biomoléculas, sin necesidad de marcarlas. Además, aporta resultados con elevada selectividad aun trabajando a pequeña escala. Por último, otra gran ventaja de esta técnica es que a penas genera pérdidas de producto y éste se obtiene ya fijo sobre el chip. (4) Gracias al empleo de estas técnicas, podemos estudiar un gran número de fármacos en un mismo ensayo, tanto de las primeras etapas de diseño de fármacos, *screening* de una gran cantidad de moléculas, optimización del cabeza de serie y posteriores estudios farmacocinéticos y de la serie ADME. (4)

En 1980 se desarrolló y comercializó el primer biosensor óptico. Anteriormente las tecnologías sin flujo eran la única posibilidad para conseguir información sobre los aspectos cinéticos de una interacción entre biomoléculas pero su principal problema es que suponen un gran consumo de materia y tiempo.(3)

El primer biosensor SPR que se comercializó fue el denominado *Biacore AB*. Actualmente contamos con un gran número de dispositivos en el mercado, algunos de ellos son:

- *Flexchip*: empleado en ensayos de interacción proteína-proteína.
- *Biacore T100*: utilizado para caracterización biofarmacéutica y control de calidad.
- *S51*: especializado en el análisis de la interacción de moléculas de pequeño tamaño.

3. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es conocer la utilidad de los biosensores en el descubrimiento de nuevos fármacos. Para ello se realiza una revisión bibliográfica de algunos artículos relacionados con el tema, con el fin de obtener un trabajo resumen del funcionamiento y aplicaciones de estos dispositivos, dando mayor importancia a todo lo relacionado con el hallazgo de nuevos fármacos.

4. METODOLOGÍA

La metodología empleada en la elaboración de este trabajo ha consistido en una búsqueda y revisión bibliográfica de publicaciones científicas relacionadas con los biosensores, la tecnología de Resonancia de Plasmón de Superficie y sus aplicaciones, especialmente aquellas relacionadas con las distintas fases del descubrimiento de fármacos.

Los medios que se han empleado para conseguir el material a partir del cual se ha llevado a cabo este trabajo han sido PubMed, Google Scholar y otros buscadores de literatura científica online.

En primer lugar, se ha llevado a cabo una descripción de los biosensores y la tecnología que emplean en su funcionamiento y posteriormente se comentan las principales aplicaciones de estos dispositivos, haciendo especial hincapié en la interacción fármaco-receptor, ya que esta es una parte fundamental en el descubrimiento de un nuevo fármaco.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Descripción de la técnica.

El **biosensor** es un dispositivo (Fig. 1) conectado a un ordenador y el principio fundamental por el cual permite la obtención de resultados es la Resonancia de Plasmón de Superficie. El procedimiento que se lleva a cabo consiste en:

- I. Introducción de los componentes necesarios (solución o buffer con el fármaco, receptor, componentes necesarios para la inmovilización del mismo...) en el dispositivo.
- II. Colocación del chip que contiene la lámina metálica y el cristal de cuarzo en la ranura correspondiente.
- III. Puesta en marcha del ensayo: Resonancia de Plasmón de Superficie.
- IV. Obtención de los resultados en forma de gráficas.



Figura 1: Biosensor Biacore 3000. Disponible en: <https://photos.labx.com/labx/4132000/4132423-0m.jpg>

El fenómeno de **Resonancia de Plasmón de Superficie** se basa en lo siguiente: en los metales existe una gran concentración de electrones libres, lo que permite que estos sean capaces de conducir la electricidad. En condiciones normales, los electrones disponen de espacio suficiente para desplazarse sin colisionar entre ellos. Sin embargo, la aplicación de un campo eléctrico sobre una lámina metálica provoca que los electrones se confinen. El desplazamiento perpendicular de los electrones hacia la superficie del metal genera un campo eléctrico debido a las cargas positivas que presenta dicho elemento. Por tanto, un campo eléctrico externo y perpendicular puede actuar sobre los electrones produciendo un aumento de cargas en la superficie metálica. La energía cuántica que se genera en la oscilación de las cargas que se encuentran en la superficie es lo que se denomina **Plasmón de superficie**. (5,6)

Los **componentes** (Fig. 2) que intervienen en el fenómeno de SPR son: emisor del haz de luz (láser de diodo con una longitud de onda entre 700 y 900 nm), lámina de oro (chip), cartucho de microfluídica, prisma de cuarzo y detector del haz de luz reflejado (matriz de diodos).(1)

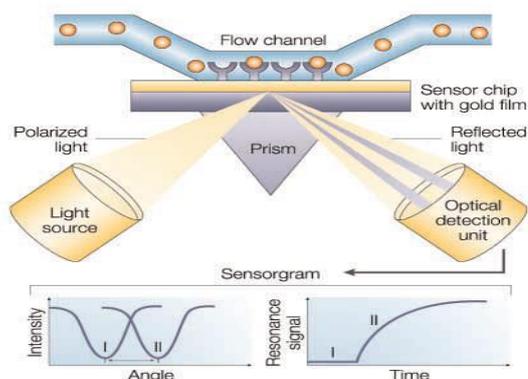


Figura 2: Componentes del SPR. Disponible en: Cooper, MA. *Optical biosensors in drug discovery*. Nat Rev Drug Discov 2002; 1(7):515–28.

El **proceso** por el cual tiene lugar el SPR se puede describir de la siguiente manera (Fig. 4). Un rayo de luz, como puede ser un campo electromagnético, se hace incidir sobre una delgada película de oro depositada sobre la superficie de un prisma de cuarzo. El vector señala la dirección de propagación del campo electromagnético en el medio a una determinada velocidad. A esto se le denomina fenómeno de dispersión. (7,8)

Para llevar a cabo la excitación de los electrones de la placa de oro es necesario que la velocidad del haz de luz se reduzca e iguale a la velocidad del plasmón de superficie. Esto puede conseguirse empleando un prisma o la mitad de una esfera de cuarzo, de esta forma el índice de refracción del primer medio, cuarzo (n_1) será mayor al del segundo medio (n_2). (3,9) Durante el ensayo para estudiar la interacción entre biomoléculas, se puede observar que al hacer pasar el flujo de fármaco, se forma el complejo entre dicho fármaco y su diana correspondiente y con ello la intensidad del haz de luz disminuye, el ángulo de incidencia también se ve reducido y en el detector se registra una notable disminución del haz de luz reflejado. Cuando la luz polarizada incide sobre la lámina de oro, en función de la masa que se haya fijado a su receptor, varía el índice de refracción del medio líquido, provocando la variación en el ángulo de reflexión del haz de luz. Se puede correlacionar la cantidad de masa en la superficie con la intensidad de la señal. La técnica SPR detecta cambios en la masa de la fase líquida que se encuentra próxima al chip mediante la medida de la variación del índice de refracción. (4) La intensidad de la luz reflejada decrece hasta llegar a un mínimo en el ángulo de resonancia (Fig. 3).

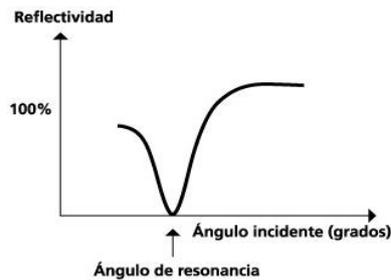


Figura 3: Curva de SPR. Disponible en: http://www.guialab.com.ar/images/notas_tecnicas/09101302_xl.jpg

Los beneficios que presenta el oro frente a otros metales como puede ser la plata son:

- Prevalece en el sistema de SPR sin interactuar con ningún otro componente gracias a sus características físicas y químicas.
- Presenta una elevada sensibilidad a las longitudes de ondas que emplea este sistema (700-900 nm).

El detector puede registrar la luz reflejada en función del ángulo de incidencia o de la longitud de onda. Los cambios en el índice de refracción de cualquiera de los dos medios suponen el desplazamiento del ángulo de resonancia para una determinada longitud de onda, o bien, desplaza la longitud de onda para un ángulo de incidencia determinado. (3)

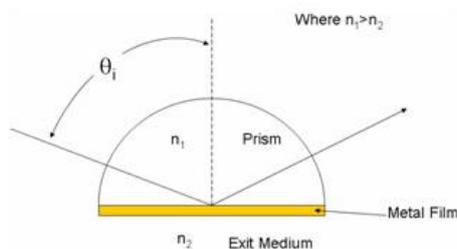


Figura 4: Esquema del campo eléctrico y los vectores en el plano de incidencia de la lámina metálica. Disponible en: <http://www.alfatest.it/public/images/spr4.jpg>

5.2 Estudios de unión fármaco-receptor (*Binding*).

La mayor ventaja de realizar este tipo de estudios empleando biosensores y la técnica de Resonancia de Plasmón de Superficie es que podemos obtener resultados en tiempo real, a la vez que realizamos el experimento.

El primer paso para llevar a cabo un ensayo de unión entre biomoléculas es la inmovilización del ligando o receptor en la superficie del sensor o chip. Se debe monitorizar la cantidad inmovilizada porque se trata de un dato determinante a la hora de analizar los resultados obtenidos.

Al comenzar el estudio, el receptor inmovilizado se encuentra en contacto con una solución *buffer* (tampón), que se hace pasar a través de la celda de flujo. La señal que

capta el detector en este momento se emplea como punto de referencia o patrón y permite comparar y analizar el resto de resultados. En segundo lugar, durante la **fase de contacto o formación del complejo**, la solución *buffer* es sustituida por el analito o fármaco en solución, denominado solución problema. Con el fin de evitar posibles señales que supongan errores en la lectura, las soluciones *buffer* y problema deben presentar la misma composición, a excepción del fármaco. Finalmente, se intercambian de nuevo las soluciones dando lugar a la **fase de disociación**, siempre que estemos trabajando con un fármaco cuya unión al receptor sea reversible. Dicho analito se separa de su ligando obteniéndose de nuevo la señal del punto de referencia.

Se conoce como **Sensograma** (10) la curva obtenida como resultado de un ensayo de unión fármaco-receptor, en la cual aparece representada la respuesta registrada en el sensor (señal de resonancia) frente al tiempo (Fig. 5). En él se pueden observar las siguientes fases:

- Fase 1) Unión del analito al receptor (fase de contacto o asociación): se observa un aumento en la respuesta.
- Fase 2) Todos los receptores están ocupados (saturación o equilibrio): se registra una fase de meseta. El máximo nivel de respuesta es proporcional a la masa de fármaco que actúa en la interacción con el receptor.
- Fase 3) Los analitos se van soltando del receptor y estos quedan libres (fase de disociación): se detecta una disminución en la curva de respuesta.
- Fase 4) Regeneración de los ligandos inmovilizados en la superficie del sensor.

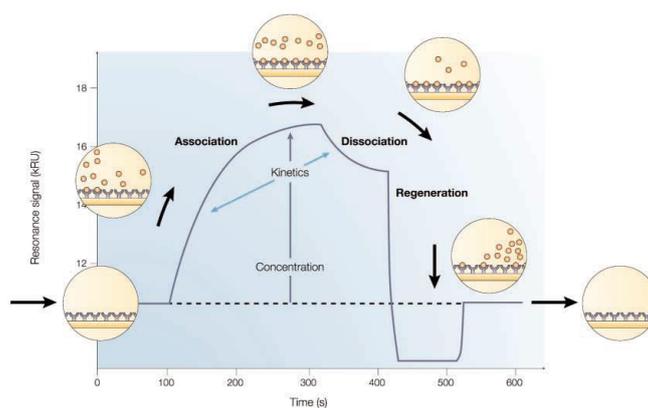


Figura 5: Sensograma. Disponible en: Cooper, MA. *Optical biosensors in drug discovery*. Nat Rev Drug Discov. 2002; 1(7):515–28

La fase de regeneración es esencial para evitar la contaminación cruzada al realizar ensayos consecutivos en los que se emplea el mismo receptor inmovilizado, pero difieren en el fármaco que se hace pasar por la celda de flujo. El proceso de limpieza que tiene

lugar afecta únicamente al sistema de inyección de solución problema, dejando en el mismo estado al ligando.

Por tanto, en cuanto a los **resultados** que podemos obtener utilizando esta tecnología se puede decir que son muy amplios. Podemos conocer si se produce la formación de un complejo entre las biomoléculas en estudio, también podemos deducir si se alcanza o no el equilibrio o la saturación del sistema y, por último, nos aporta información sobre si la unión fármaco-receptor es reversible o irreversible. Además, nos informa de la estabilidad cinética del complejo formado, en el caso de que esto ocurra, ya que podemos observar cómo de rápido se lleva a cabo el proceso de disociación. Si la curva presenta una pendiente muy pronunciada desde el punto máximo hasta el punto de referencia, se deduce que el complejo formado no es muy estable y se disocia con rapidez. Sin embargo, en el caso contrario, cuando la pendiente no es muy pronunciada indica que el complejo es estable y tarda más tiempo en disociarse. Aplicando métodos matemáticos más sofisticados se puede realizar un análisis cuantitativo dependiente del tiempo y la concentración, a partir del cual podemos obtener información sobre la estequiometría de la unión de las biomoléculas, las constantes de equilibrio, las constantes de velocidad y el mecanismo de formación del complejo. Por último, si realizamos un análisis dependiente de la temperatura conseguiremos información sobre los aspectos termodinámicos.

Aspectos a tener en cuenta en el estudio de la interacción:

– Especificidad de unión: la tecnología SPR no tiene la posibilidad de distinguir entre la unión del fármaco al sitio activo de la proteína (receptor), a un sitio alostérico o a cualquier otro lugar de la superficie del chip. Todas estas opciones suponen la anotación de respuesta por parte del detector. Existen distintos métodos para diseñar un experimento que permita conocer la especificidad de la interacción:

- I. Preparación de líneas de referencia o patrón en el chip que contengan proteínas inmovilizadas con estructura muy similar a la del sitio activo de la diana.
- II. Elaboración de ensayos competitivos con moléculas que se unan al sitio activo. En estos se procede a la elaboración de un mutante de la enzima, en el cual se modifican los aminoácidos del sitio activo que participan en la unión fármaco-receptor. Por ejemplo, el cambio del Glu74 por Arg en la enzima Aldolasa (ruta del ácido fólico), supone la reducción del espacio en el sitio activo de la enzima y además introduce cargas negativas en el lugar de las positivas. Debido a los

cambios que supone la mutación de la enzima, cuando dejamos fluir una solución de inhibidores de dicha enzima sobre la superficie del chip en el que ésta se encuentra inmovilizada, observamos que la unión del inhibidor a la enzima disminuye, la enzima no es inhibida. Por ello, concluimos que los aminoácidos modificados eran esenciales en la interacción. (11)

- III. Creación de ensayos de *binding* competitivos utilizando una molécula patrón que se una específicamente al sitio activo del receptor. Estos ensayos se desarrollarán con una solución purificada del analito a estudio, con la solución que contiene el patrón de referencia y con una solución que resulta de la mezcla de ambas. En el caso de una unión no competitiva la respuesta que obtenemos al dejar fluir la solución mezcla se debe a la suma del patrón y el fármaco estudiado. Sin embargo, en la unión competitiva la respuesta que genera la solución mezcla es intermedia respecto al resultado que aportan las soluciones estudiadas individualmente.
- Constantes de afinidad: son obtenidas a partir de la fase de equilibrio.
 - Parámetros cinéticos: se deducen a partir de las gráficas k_{on}/k_{off} . En ellas se observa la velocidad con la que los fármacos se asocian con el receptor y, posteriormente, se disocian. A partir de su estudio podemos obtener las constantes de asociación y disociación del proceso, cuyas fórmulas son:

$$K_D = k_{off}/k_{on}$$

$$K_A = k_{on}/k_{off}$$

5.3 Métodos de inmovilización de biomoléculas a la superficie de oro.

En el desarrollo de cualquier ensayo llevado a cabo en un biosensor con tecnología SPR, es necesario llevar a cabo un paso previo que consiste en la inmovilización del ligando o receptor (12), que en el caso de nuestros estudios con fármacos, normalmente se trata de proteínas, sobre la superficie de oro que se encuentra en el chip. Este procedimiento se lleva a cabo para conseguir:

- Una mayor densidad de receptores sobre la superficie del sensor.
- Que estas biomoléculas permanezcan activas durante el tiempo que dura el ensayo.
- Evitar las uniones inespecíficas.

Existen una gran variedad de estrategias que permiten la adecuada inmovilización de las moléculas y todas ellas se basan en la formación de una monocapa orgánica sobre la

superficie de oro. La elección entre una u otra de estas opciones depende de la aplicación y de la naturaleza del receptor.

I. Inmovilización covalente.

Esta técnica permite que los receptores anclados resistan a la fase de regeneración y lavado que tiene lugar al final de cada ensayo. Sin embargo, no todas las biomoléculas resisten las duras condiciones de esta inmovilización. Disponemos de tres tipos de inmovilización covalente (Fig. 6):

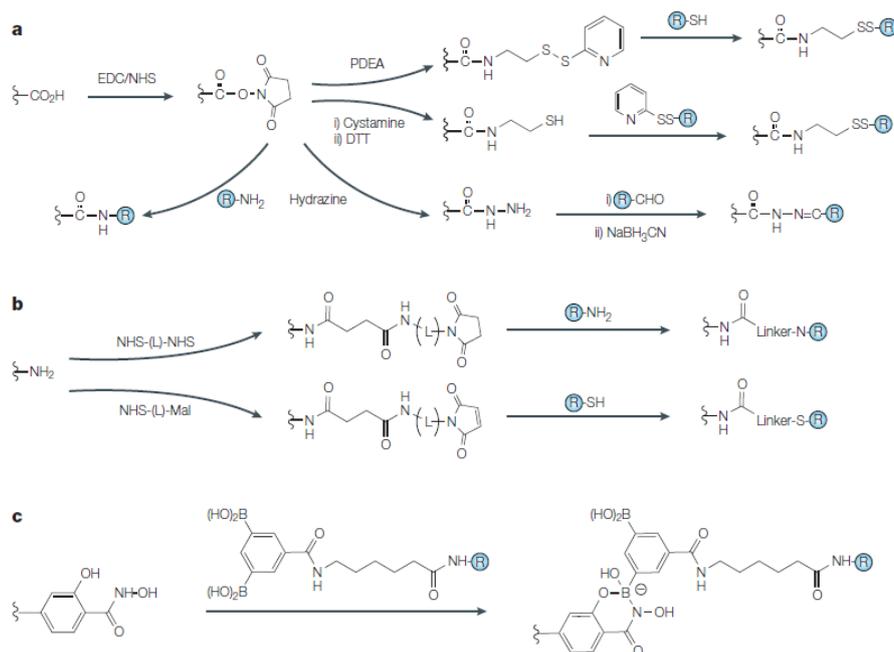


Figura 6: Métodos de inmovilización covalente. DTT, dithiothreitol; EDC, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide; GMBS, N-(γ -maleimidobutyryloxy) sulphosuccinimide ester; L, linker; Mal, maleimide; NHS, N-hydroxysuccinimidyl; PDBA, phenyldiboronic acid; PDEA, pyridinyldithioethanamine; SHA, salicylhydroxamic acid; SPDP, 3-(2-pyridinyldithio)propionic acid N-hydroxysuccinimide ester; sulpho-SMCC, sulphosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexanecarboxylate. Disponible en: Cooper, MA. *Optical biosensors in drug discovery*. Nat Rev Drug Discov. 2002; 1(7):515–28.

- Acoplamiento con aldehído:** permite una correcta orientación de la molécula a la hora de inmovilizarla porque los grupos aldehído normalmente están localizados en el extremo C-terminal del ligando o receptor. El aldehído puede encontrarse en la proteína o puede ser introducido mediante la oxidación de cis-dioles. Este acoplamiento requiere la transformación de grupos ácido en hidrazidas, seguido de aminación reductora.
- Acoplamiento con amina:** es el método más frecuentemente empleado. Requiere la presencia de grupos carboxilo libres en la superficie, los cuales serán transformados en ésteres de N-hidroxisuccinamida reactivos, por tratamiento con carbodiimida y N-hidroxisuccinamida. El acoplamiento se da principalmente con

el grupo amino libre de las lisinas presentes en las proteínas a inmovilizar. Esta técnica solo puede emplearse cuando la proteína puede ser almacenada en una solución hipotónica y un pH entre el punto isoeléctrico de dicha proteína y el pK del ácido de la superficie. (13)

- c) Acoplamiento con tiol: esta técnica genera menos sitios de unión en la superficie que el acoplamiento con amina. Se suele emplear para inmovilizar proteínas ácidas, ya que el procedimiento anterior es complicado en este tipo de biomoléculas. El procedimiento consiste en hacer reaccionar el reactivo PDEA (Pyridinyldithioethanamine) con los tioles libres de las cisteínas y metioninas de la proteína, o bien modificar los grupos tiol libres de la superficie de la proteína con el mismo reactivo.(3,14)

II. Inmovilización por secuencias afines.

Los ligandos con elevada capacidad de unión pueden ser inmovilizados correctamente empleando esta técnica. Sin embargo, la cantidad de proteína inmovilizada es menor y se precisa de un paso posterior para asegurar la correcta fijación de los ligandos. (Fig. 7)

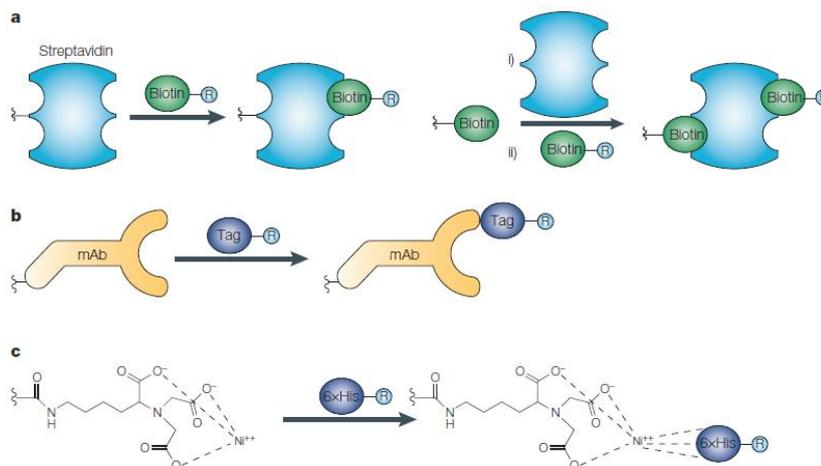


Figura 7: Inmovilización por secuencias afines. Disponible en: Cooper, MA. *Optical biosensors in drug discovery*. Nat Rev Drug Discov. 2002; 1(7):515–28.

- a) Streptavidina-biotina: esta técnica aporta elevada afinidad y disociación muy lenta. El proceso comienza con la biotilación de la proteína que queremos inmovilizar. Esto se lleva a cabo mediante la modificación de un residuo de lisina de la proteína con el éster de biotinil-N-hidroxisuccinimida. Si unimos la biotina a una molécula de Streptavidina evitamos los problemas de orientación que suponían los métodos covalentes. (15,16)

- b) Anticuerpos monoclonales: se basa en la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Es recomendable realizar un paso posterior para asegurar la correcta fijación de las moléculas a la superficie. (12)
- c) Quelación de metales: el ácido iminodiacético y el ácido nitrilotriacético fijados a la superficie del sensor mediante la quelación con níquel, han sido ampliamente utilizados para inmovilizar receptores como el 6xHis. La baja estabilidad de estos complejos formados por quelación supone un alto grado de disociación. (3,17)

III. Inmovilización de una membrana.

La mayoría de los fármacos tienen como diana un receptor de membrana, es por ello por lo que conocer el mecanismo de esta interacción es fundamental. Los biosensores ópticos con SPR permiten el estudio a fondo de las interacciones entre el fármaco y su receptor de membrana sin necesidad de llevar a cabo el estudio en una solución.

El primer paso consiste en la inmovilización de una membrana artificial sobre la superficie del chip:

- El método más simple consiste en adsorber fosfolípidos sobre una superficie hidrofóbica. Esto se emplea por ejemplo en el estudio de unión del factor de coagulación VIII o de antibióticos peptídicos.
- Otra técnica que permite la inmovilización de una membrana al chip es utilizar una capa lipídica que se adsorbe a una superficie hidrofóbica, pero introduciendo un compartimento acuoso entre los dos componentes anteriormente citados. De esta forma, se permite la inmovilización de proteínas con dominios transmembrana. Además, la sección acuosa permite que los lípidos se dispongan adecuadamente en la estructura.(3)

5.4 Ventajas de los biosensores en el descubrimiento de fármacos.

El SPR es una herramienta de los biosensores que, permitiendo el seguimiento en tiempo real mediante los sensogramas, y sin necesidad de identificar las moléculas con marcadores, permite la detección y cuantificación de las interacciones biomoleculares con elevada selectividad y trabajando con bajas concentraciones (18). Precisa de muy poca cantidad de muestra y no se producen pérdidas de producto, ya que éste se encuentra inmovilizado cuando se da la interacción. Es una técnica con elevados rendimientos ya que permite realizar entre 100 y 400 ensayos al día (19) y además, se obtiene el producto

directamente inmovilizado en el biosensor, con las consecuentes ventajas de la síntesis en fase sólida. (4)

5.5 Aplicaciones de los biosensores ópticos en el descubrimiento de fármacos.

Las **principales aplicaciones** del SPR en el análisis farmacéutico son:

- En el descubrimiento de fármacos:
 - ✓ Perfil farmacocinético de biomoléculas: estudio de adhesión de fármacos *in vitro*, caracterización de la afinidad por las membranas biológicas.
 - ✓ *Screening* de alto rendimiento: validación de dianas y ensayos.
 - ✓ Diseño de fármacos: identificación estructural, estudios cinéticos y de afinidad de la unión entre proteínas y pequeñas moléculas.
 - ✓ Estudios ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción): ensayos rápido *in vitro* para definir la serie ADME de fármacos candidatos, medida de los niveles de fármaco unidos a albúmina sérica humana.
- En control de calidad:
 - ✓ Detección rápida de fármacos en alimentos y muestras orgánicas.(20)

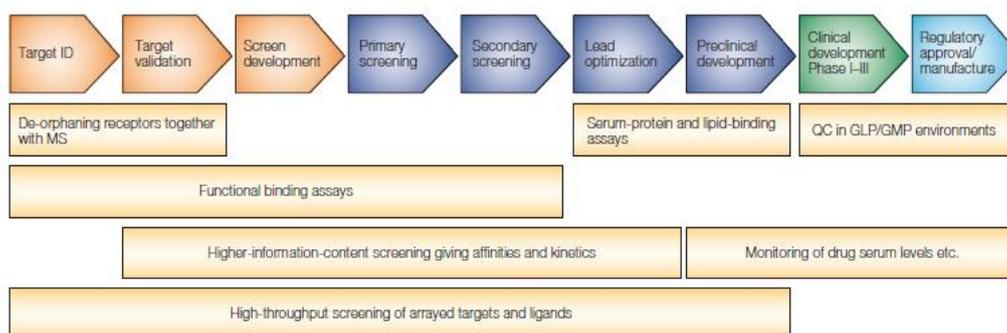


Figura 8: Áreas de aplicación de los biosensores ópticos durante las etapas del desarrollo de un fármaco. Disponible en: Cooper, MA. *Optical biosensors in drug discovery*. *Nat Rev Drug Discov*. 2002; 1(7):515–28.

Los biosensores con SPR permiten caracterizar la interacción fármaco- receptor de forma específica pero además, también juegan un papel importante en el análisis farmacológico de fármacos candidatos en etapas preclínicas de su desarrollo. Permiten obtener información sobre el comportamiento fisiológico de un gran número de moléculas en un corto periodo de tiempo. Por ejemplo, se estudia la unión del fármaco a

proteínas plasmáticas, su paso a través de las membranas o su capacidad para activar Citocromos.

En el siguiente ejemplo veremos la capacidad de esta tecnología para aportar información muy específica sobre la interacción del fármaco **Warfarina** con la albúmina sérica humana, proteína plasmática cuya principal función es transportar fármacos a través de la sangre (HSA) (Fig. 9). La Warfarina (Nombre sistemático (IUPAC): (*R*, *S*)-4-hidroxi-3-(1-fenil-3-oxo-butil)-cumarina) es un fármaco que pertenece al grupo terapéutico de los anticoagulantes orales, impide la formación en el hígado de los factores activos de la coagulación II, VII, IX y X mediante la inhibición de la gamma carboxilación de las proteínas precursoras mediada por la vitamina K. Esta molécula tiene un peso molecular 308 Da y en este estudio se utilizó en distintas concentraciones: 100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.1, 1.1 y 0 μM . Durante el procedimiento, este fármaco fue inyectado en la celda de flujo a una velocidad de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ sobre la superficie del chip, la cual contiene HSA inmovilizada en 20 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, 3% DMSO, pH 7.4 y a 25 $^\circ\text{C}$.

La respuesta obtenida tras el ensayo de unión fármaco(Warfarina)-proteína(HSA) muestra la importancia de la concentración (dosis) de fármaco que se inyecta. Se concluye que la Warfarina se une a la Albúmina con una afinidad de 17 μM , lo que corresponde a una unión del 97.5 %.

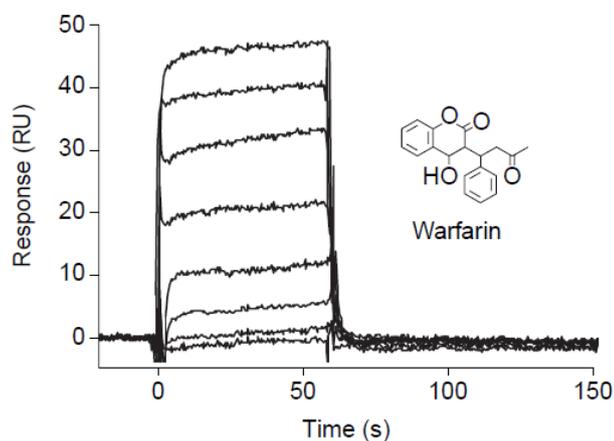


Figura 9: Unión de Warfarina a Albúmina sérica humana. Disponible en: Myszka, Rich. *Implementing surface plasmon resonance biosensors in drug discovery*. Pharm Sci Technolo Today. 2000; 3(9):310–7.

Este estudio empleó la proteína sérica albúmina, pero este tipo de ensayos también puede realizarse con otras proteínas plasmáticas como la glicoproteína α_1 y las gammaglobulinas. (21,22)

La reciente aparición de **chips hidrofílicos y lipofílicos** ha permitido construir membranas estables sobre la superficie del sensor, sin necesidad de emplear una celda de flujo. Gracias a este avance, se pueden llevar a cabo ensayos de permeabilidad de fármacos a través de la membrana. Un ejemplo de esta aplicación es el estudio realizado por Danelian *et al.* (1,23,24) sobre la adsorción de fármacos a la membrana intestinal. Se lleva a cabo mediante la fijación de fosfolípidos sobre un chip lipófilo y la posterior monitorización de la unión de los fármacos a dichos fosfolípidos, que imitan la pared intestinal. Así obtenemos información sobre la permeabilidad de los fármacos en estudio a través de la membrana del intestino.

Por último, comentaremos un ejemplo sobre el estudio de **inhibidores de trombina análogos a la prolina** empleando biosensores ópticos. El ensayo consiste en el análisis de 36 moléculas análogas a prolina (Fig.10), que a una concentración de 200 μM se fluyen sobre la superficie de un chip en el que se encuentra inmovilizada la trombina. Como se referencia se emplea la trombina bloqueada químicamente en su sitio activo. El estudio revela que los análogos de prolina con un grupo amino en posición P_1 presentan el mayor grado de afinidad por la trombina. Además, la incorporación de grupos lipofílicos en las posiciones P_1 y P_3 también contribuye a aumentar la afinidad. De esta forma, se demuestra la capacidad de los biosensores SPR para aportar información sobre la relación estructura-actividad (SAR) de las moléculas a estudio. (2,25)

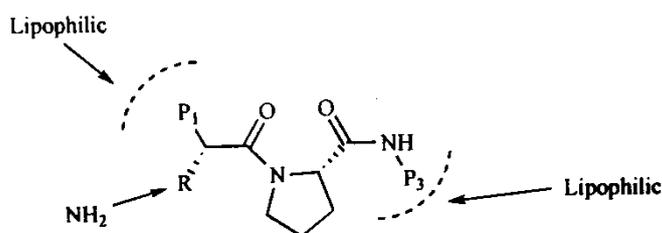


Figura 10: Sustituyentes importantes en los análogos de prolina para mejorar su interacción con la trombina. Disponible en: Danielson, UH. *Fragment library screening and lead characterization using SPR biosensors*. *Curr Top Med Chem.* 2009; 9(18):1725–35.

6. CONCLUSIONES

Los biosensores son tecnologías muy recientes, pero de gran utilidad ya que presentan aplicaciones en una gran variedad de campos. En la industria farmacéutica, en las últimas dos décadas, los ensayos basados en la técnica SPR han llegado a ser reconocidos como método para la caracterización de las interacciones entre biomoléculas, empleado sobre todo en cualquier fase del descubrimiento de fármacos.(3)

Debido a la breve existencia de estos sistemas, aún existen muchas situaciones en la que no han sido aplicados, pero en las cuales, posiblemente, pueden suponer grandes avances como son la unión de fármacos a lipoproteínas o a inmunoglobulinas.

Es importante reconocer la necesidad de optimización de esta tecnología a lo largo de los años para poder lograr un mejor rendimiento, sensibilidad y reproducibilidad. Además, también se precisa una mejora de las técnicas de inmovilización y purificación de las proteínas para que de esta forma podamos trabajar con datos más próximos a los ensayos *in vivo* y obtener así mejores resultados.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Cooper, MA. *Optical biosensors in drug discovery*. Nat Rev Drug Discov. **2002**;1(7):515–28.
2. Danielson, UH. *Fragment library screening and lead characterization using SPR biosensors*. Curr Top Med Chem [Internet]. **2009**;9(18):1725–35.
3. Huber, W. Mueller, F. *Biomolecular interaction analysis in drug discovery using surface plasmon resonance technology*. Curr Pharm Des. **2006**;12(31):3999–4021.
4. Siles, FJM. *Síntesis quimioenzimática de glicoconjugados y estudio cuantitativo de su implicación en procesos de reconocimiento molecular*. Facultad de Farmacia Universidad Complutense de Madrid; **2008**.
5. Baird, CL. Myszka, DG. *Current and emerging commercial optical biosensors*. J Mol Recognit. **2001**;14(5):261–8.
6. Rich, RL. Myszka, DG. *Survey of the year 2003 commercial optical biosensor literature*. J Mol Recognit. **2005**;18(1):1–39.
7. Ramírez Frómeta, N. *Biosensores: Un Acercamiento a La Resonancia del Plasmon Superficial*. Rev CENIC Ciencias Biológicas. **2005**;36.
8. Sepúlveda, B. Prieto, F. Calle, A. Lechuga, L. *Prototipo de Biosensor Óptico*

- basado en la Resonancia de Plasmón Superficial con Sistema de referencia.*
9. Myszka, DG. *Improving biosensor analysis.* J Mol Recognit. **1999**;12(5):279–84.
 10. Roos, H. Karlsson, R. Nilshans, H. Persson, A. *Thermodynamic analysis of protein interactions with biosensor technology.* J Mol Recognit. **1998**;11(1–6):204–10.
 11. Huber, W. *A new strategy for improved secondary screening and lead optimization using high-resolution SPR characterization of compound-target interactions.* J Mol Recognit. **2005**;18(4):273–81.
 12. Beckmann, C. Haase, B. Timmis, KN. Tesar, M. *Multifunctional g3p-peptide tag for current phage display systems.* J Immunol Methods. **1998**;212(2):131–8.
 13. Nunomura, W. Takakuwa, Y. Parra, M. Conboy, J. Mohandas, N. *Regulation of protein 4.1R, p55, and glycophorin C ternary complex in human erythrocyte membrane.* J Biol Chem. **2000**;275(32):24540–6.
 14. Stolowitz, ML. Ahlem, C. Hughes, KA. Kaiser, RJ. Kesicki, EA. Li, G. et al. *Phenylboronic Acid–Salicylhydroxamic Acid Bioconjugates. 1. A Novel Boronic Acid Complex for Protein Immobilization.* Bioconjug Chem. **2001**;12(2):229–39.
 15. Jensen, KK. Orum, H. Nielsen, PE. Nordén, B. *Kinetics for hybridization of peptide nucleic acids (PNA) with DNA and RNA studied with the BIAcore technique.* Biochemistry. **1997**;36(16):5072–7.
 16. Nilsson, P. Persson, B. Uhlén, M. Nygren, PA. *Real-time monitoring of DNA manipulations using biosensor technology.* Anal Biochem. **1995** J;224(1):400–8.
 17. Nieba, L. Nieba-Axmann, SE. Persson, A. Hämäläinen, M. Edebratt, F. Hansson, A. et al. *BIACORE analysis of histidine-tagged proteins using a chelating NTA sensor chip.* Anal Biochem. **1997**;252(2):217–28.
 18. Zeidan, E. Kepley, CL. Sayes, C. Sandros, MG. *Surface plasmon resonance: a label-free tool for cellular analysis.* Nanomedicine. **2015**;10(11):1833–46.
 19. Myszka, Rich. *Implementing surface plasmon resonance biosensors in drug discovery.* Pharm Sci Technolo Today. **2000**;3(9):310–7.
 20. Olaru, A Bala, C. Jaffrezic-Renault, N. Aboul-Enein, HY. *Surface Plasmon Resonance (SPR) Biosensors in Pharmaceutical Analysis.* Crit Rev Anal Chem. **2015**;45(2):97–105.
 21. Ferrer, JM. Leiton, MJ. Zatón, AM. *The binding of benzopyranes to human serum albumin. A structure-affinity study.* J Protein Chem. **1998**;17(2):115–9.
 22. Frostell-Karlsson, A. Remaeus, A. Roos, H. Andersson, K. Borg, P. Hämäläinen, M. et al. *Biosensor analysis of the interaction between immobilized human serum*

- albumin and drug compounds for prediction of human serum albumin binding levels.* J Med Chem. **2000**;43(10):1986–92.
23. Surdo, PL. Bottomley, MJ. Arcaro, A. Siegal, G. Panayotou, G. Sankar, A. et al. *Structural and biochemical evaluation of the interaction of the phosphatidylinositol 3-kinase p85alpha Src homology 2 domains with phosphoinositides and inositol polyphosphates.* J Biol Chem. **1999**;274(22):15678–85.
24. Danelian, E. Karlén, A. Karlsson, R. Winiwarter, S. Hansson, A. Löfås, S. et al. *SPR biosensor studies of the direct interaction between 27 drugs and a liposome surface: correlation with fraction absorbed in humans.* J Med Chem. **2000**;43(11):2083–6.
25. Nilsson, M. Hämäläinen, M. Ivarsson, M. Gottfries, J. Xue, Y. Hansson, S. et al. *Compounds Binding to the S2–S3 Pockets of Thrombin.* J Med Chem. **2009**;52(9):2708–15.