

UNITE

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TERAMO

C.I. DRUG DESIGN

MECCANISMI MOLECOLARI E CELLULARI NEL DRUG DESIGN

Enrico Dainese

Facoltà di Bioscienze e Tecnologie Agroalimentari e Ambientali

University of Teramo

MECCANISMI MOLECOLARI E CELLULARI NEL DRUG DESIGN

Lo studente apprenderà le principali metodiche di produzione purificazione di proteine e complessi di macromolecole biologiche necessarie allo studio di composti bioattivi da usare per lo sviluppo di farmaci. Verranno trasferite le basi teoriche e pratiche per le analisi necessarie nelle fasi preclinica di safety and efficacy. Al termine del corso lo studente avrà appreso gli aspetti teorici e pratici relativi alle simulazioni molecolari e ai modelli sperimentali cellulari nella fase preclinica di sviluppo di farmaci. In particolare, lo studente conoscerà le basi di diversi metodi computazionali (incluso il docking molecolare e la Dinamica Molecolare), e la loro integrazione per la progettazione o selezione di composti bioattivi. Infine, lo studente apprenderà come pianificare ed allestire esperimenti virtuali ed eseguire calcoli con software open-source per le simulazioni biomolecolari.

MECCANISMI MOLECOLARI E CELLULARI NEL DRUG DESIGN

Nel drug design siamo interessati all'efficacia e alla sicurezza di nuovi farmaci e nuovi mezzi per decifrare questi aspetti. Pertanto, utilizziamo tecniche avanzate di imaging e screening ad alto rendimento accanto ad approcci computazionali come la bioinformatica.

«Terza Missione» delle università e degli enti di ricerca

Il decreto legislativo 19/2012, che definisce i principi del sistema di Autovalutazione, Valutazione Periodica e Accredimento, e successivamente il DM 47/2013, che identifica gli indicatori e i parametri di valutazione periodica della ricerca e della terza missione (allegato E), hanno riconosciuto a tutti gli effetti la terza missione come una missione istituzionale delle università, accanto alle missioni tradizionali di insegnamento e ricerca.

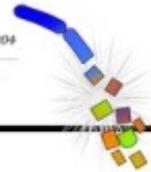
La finalità è di avere un data-base standardizzato e comparabile su tutti i 95 atenei italiani con informazioni sia in riferimento all'attività di valorizzazione della ricerca (brevetti, spin-off, contratti conto-terzi e convenzioni, intermediari) che all'attività di produzione di beni pubblici sociali e culturali (public engagement, patrimonio culturale, formazione continua, sperimentazione clinica).

La terza missione dei docenti

INSIGHTS

Shakedown on fracking p. 1204

How cancer chromosomes shatter p. 1205



PERSPECTIVES

ENTREPRENEURSHIP

Studying the start-up system

There is seemingly limitless, often breathless, rhetoric championing “innovation” and “entrepreneurship” as keys to harnessing science and technology for economic advancement. More elusive, and illuminating, is solid evidence on features that allow a dynamic technology commercialization ecosystem to thrive. *Science* invited social scientists to highlight insights from their research on what makes entrepreneur-driven systems flourish and how those lessons might inform policies and practices to help make rhetoric reality.

Financing experiments

By Ramana Nanda^{1,2} and Matthew Rhodes-Kropf^{3,4}

Venture capital (VC) investors have recently been criticized for no longer financing innovations related to society’s “biggest problems.” We have shown that two defining features of VC investments are an extremely skewed distribution of outcomes and an inability to tell—up front—which will be successful. VCs therefore learn about the viability of potential investments through a multistage financing process, where each round of funding is tied to results of “experiments” that create information about future prospects (1). The value of staging stems from being able to abandon investments partway if information from early experiments is negative. Startups for which experiments are cheaper to run and are more discriminating are more attractive investments. The advent of cloud-

POLICY computing significantly lowered costs of early experiments for firms in software, Internet, and digital media and shifted funding away from sectors where early experiments cost more and are less discriminating, such as biotechnology and energy production. Advances in simulation technologies, rapid prototyping, and gene sequencing have begun lowering costs of experiments in these sectors, as have platforms, such as Science Exchange, that allow startups to conduct early tests without investing in infrastructure upfront. Nevertheless, entrepreneurs in science-based ventures that are expensive to commercialize can also benefit from setting up experiments that help investors learn about viability early on. Although entrepreneurs are never happy when investors stop funding, structuring early experiments that facilitate such abandonment, by being highly specific (correctly identifying all failures), even if at the expense of sensitivity (correctly identifying every success), can actually help obtain investment in the first place. To increase the chances

that innovations focused on society’s biggest problems attract sufficient funding, government policy should focus on sectors or stages where the cost and the time to learn is high, thereby making it more difficult for private investors to finance experimentation.

REFERENCES

1. W. E. Kerr, R. Nanda, M. Rhodes-Kropf, *J. Econ. Perspect.* **28**, 23 (2014).

10.1126/science.1241135

Founders and joiners

By Michael Roach¹ and Henry Sausermann^{2,3}

Most efforts to promote technology entrepreneurship, such as courses and incubators, focus on potential founders of startup companies. Yet the vast majority of scientists and engineers contribute to entrepreneurship as “joiners”—employees who join founders’ entrepreneurial interests through a survey of nearly 4200 science and engineering Ph.D. candidates at tier 1 U.S. research universities (1), focusing on three questions: How prevalent are interests in joining a startup as an employee versus being a founder? How are joiners different from founders? How do contextual factors shape different entrepreneurial interests? Among the Ph.D.s surveyed, 46% were interested in joining a startup as an employee, whereas 11% expected to one day start their own company. Compared with Ph.D.s interested in careers in established firms, founders and joiners share similar preferences for an entrepreneurial work setting, such as a desire for greater autonomy, tolerance for risk, and a desire to commercialize technologies. However, founders are significantly more risk tolerant and have a stronger interest in management, whereas joiners are more interested in functional work activities

¹Harvard Business School, Boston, MA 02163, USA; ²National Bureau of Economic Research, Cambridge, MA 02138, USA; ³Cornell University, Ithaca, NY 14850, USA; ⁴Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA 30332, USA; ⁵School of Management, Politecnico University of Milan, 20156 Milan, Italy; ⁶Rice University, Houston, TX 77251, USA; ⁷Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139, USA; ⁸Universidad Pompeu Fabra, 08002 Barcelona, Spain; ⁹Barcelona GSE, 08002 Barcelona, Spain; ¹⁰Banco de España, 08002 Barcelona, Spain; ¹¹Boston University, Boston, MA 02215, USA; ¹²Hoover Institution, Stanford University, Stanford, CA 94305, USA. *The opinions in this article are the sole responsibility of the authors and do not necessarily coincide with those of the Banco de España. Corresponding author. E-mail: {ramana@hbs.edu; mroach@cornell.edu; {henry.sausermann@upf.edu; {hroach@rice.edu; {hroach@mit.edu; {hroach@bu.edu; {hroach@stanford.edu; {hroach@hoover.stanford.edu}}

Risvolti occupazionali nell'industria

Oggi è necessario ammettere che ci troviamo in una situazione di saturazione del mercato occupazionale, in particolar modo per i profili della ricerca

Occorre quindi differenziare i propri CV acquisendo nuove competenze e capacità in aree che possono essere approfondite in base a percorsi di crescita individuale secondo le proprie inclinazioni e passioni

da SCIENZIATI a...

esperti di



business

technology transfer

marketing

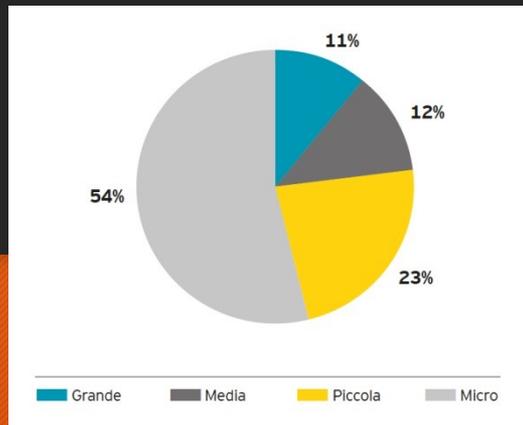
proprietà
intellettuale

comunicazione
scientifica

Le imprese di piccole dimensioni rappresentano la maggioranza nel biotech

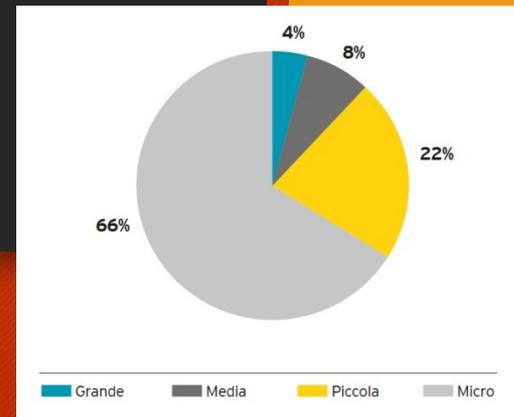
ANALISI PER DIMENSIONE

Imprese biotech totali



- 77% piccole & micro
- 12% medie
- 11% grandi

Imprese pure biotech

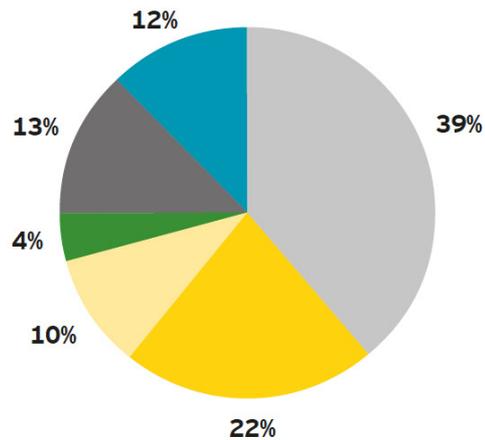


- 88% piccole & micro
- 8% medie
- 4% grandi

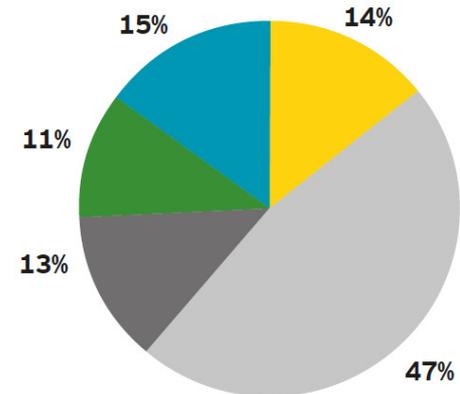
Analisi per origine e per settore di applicazione

Imprese biotech totali

ANALISI PER ORIGINE



ANALISI PER SETTORE DI APPLICAZIONE



Glossario

Imprese Red Biotech

Imprese che operano nel settore della salute dell'uomo e degli animali, utilizzando moderni metodi biotecnologici per lo sviluppo di prodotti per la cura e la prevenzione delle malattie (farmaci, nuove terapie, vaccini, sistemi diagnostici).

Imprese Green Biotech

Imprese che operano nel settore agroalimentare, utilizzando moderni metodi biotecnologici per la produzione di piante e colture vegetali per applicazioni in campo alimentare, chimico, produttivo, così come nel *pharming* molecolare e nello sviluppo di test per la rilevazione di ingredienti e contaminanti nei prodotti alimentari.

Imprese White Biotech

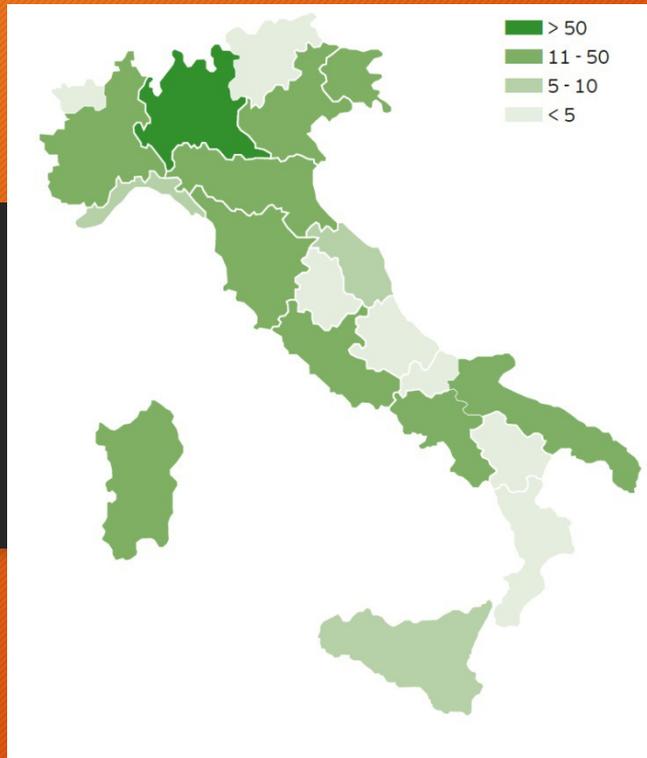
Imprese che operano nel settore delle biotecnologie industriali, utilizzando moderni metodi biotecnologici per la produzione e trasformazione di prodotti chimici, biomasse, materiali e carburanti, incluse le tecnologie di *bioremediation* ambientale.

Imprese Multi-business

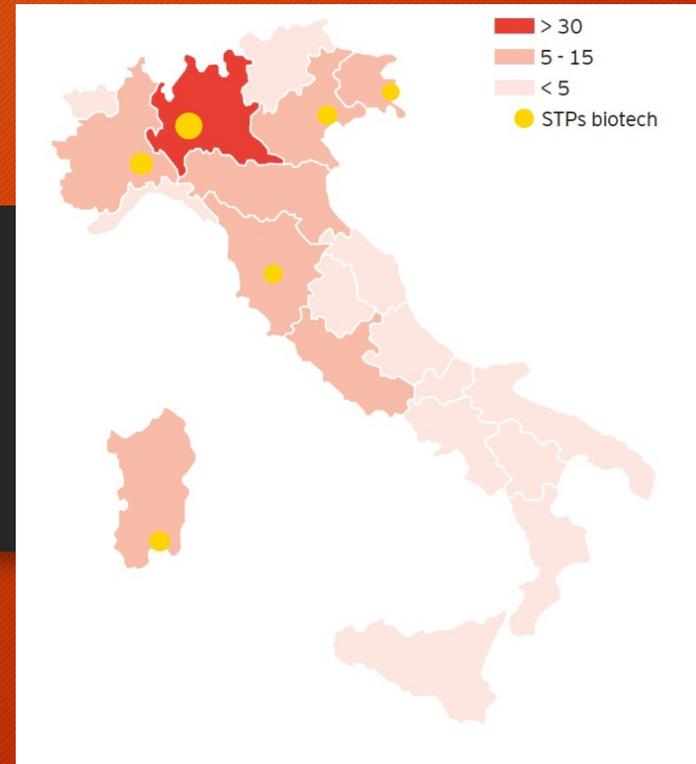
Imprese che operano in almeno due dei settori di applicazione sopra citati.

Distribuzione geografica

Distribuzione geografica imprese biotech



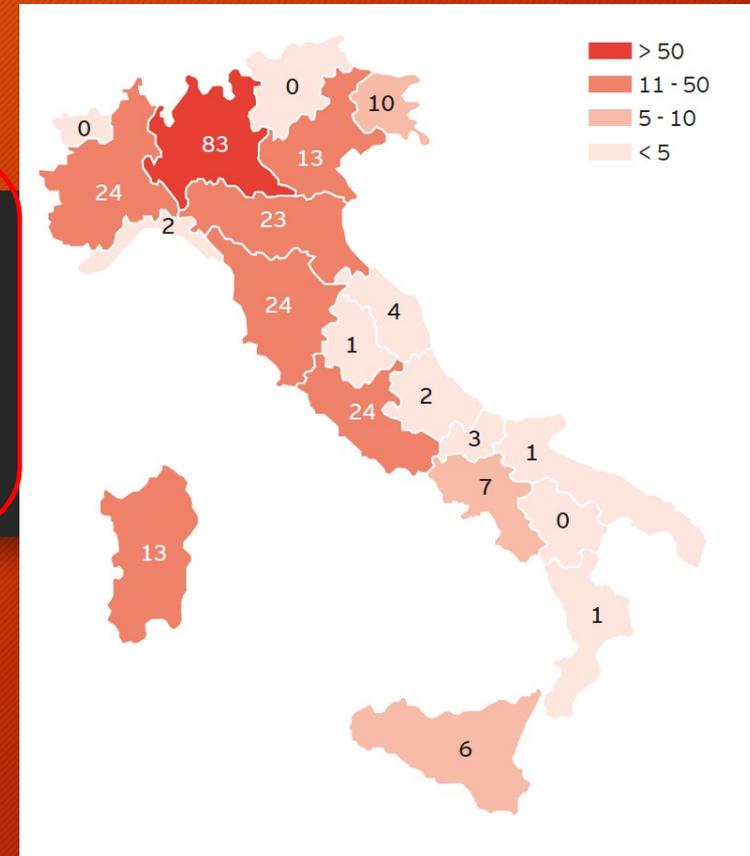
Localizzazione geografica PST e imprese pure biotech di micro e piccola dimensione - settore red biotech



Le imprese biotech sono concentrate nel Nord e nel Centro Italia

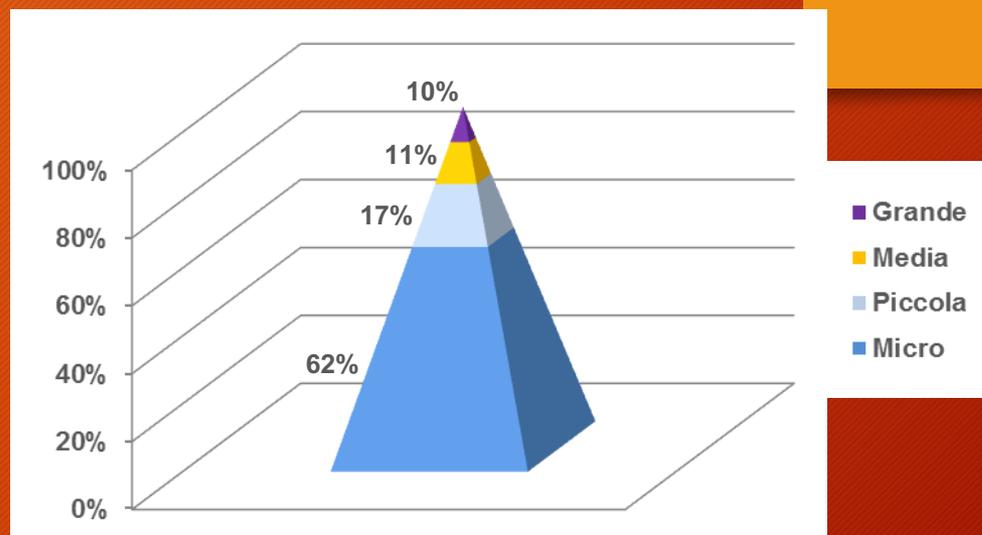
Il red biotech traina l'intero comparto

	<i><u>Imprese totali</u></i>	<i><u>Pure Biotech</u></i>
• Imprese	241	145
• Addetti R&S	5.217	1.416
• Fatturato biotech	6.662 mln €	1.174 mln €
• Investimenti in R&S	1.382 mln €	366 mln €



Imprese biotech: analisi per dimensione

- Quasi l'80% delle *biotech* italiane sono micro o piccole imprese
- Questa percentuale è ancora più elevata nei settori *Green* e *White*



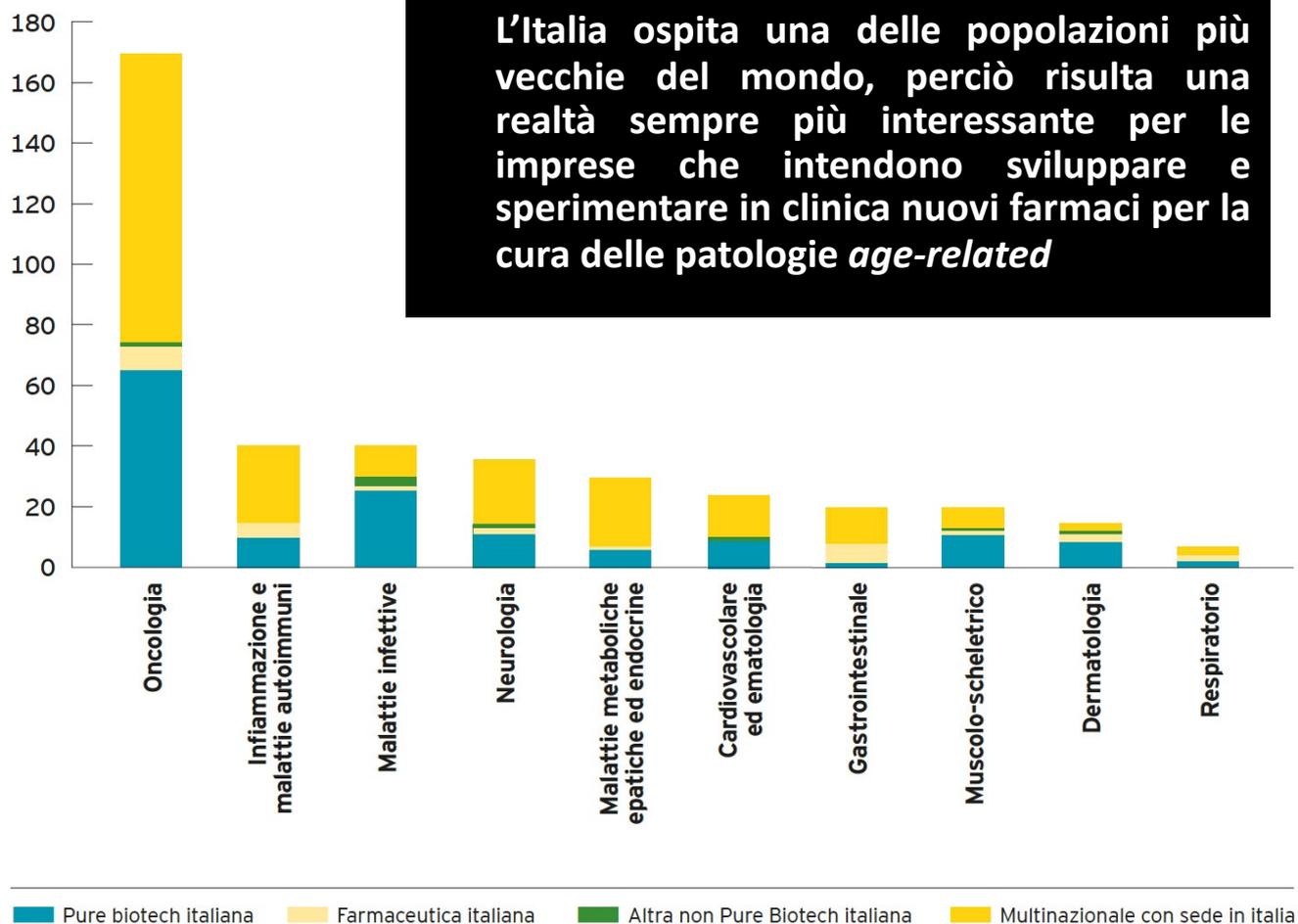
Imprese	Totali	Red	Green	White
Grande	10 %	12 %	5 %	3 %
Media	11 %	13 %	3 %	11 %
Piccola	17 %	18 %	15 %	16 %
Micro	62 %	57 %	77 %	70 %

Biotecnologie per la salute

- Tra le imprese che operano nel settore delle biotecnologie applicate alla salute, che sono 344, rappresentando circa la metà delle imprese biotech italiane (49%).
- Il comparto salute genera una quota preponderante del fatturato, corrispondente a oltre 9 miliardi (75% del totale) determina la maggior parte degli investimenti complessivi in R&S (91%) ed occupa oltre il 75% degli addetti alla R&S biotech in Italia.
- Le imprese dedicate alla R&S biotech ovvero che impegnano il 75% o più dei propri costi di ricerca intra-muros in attività biotech, sono 208, di cui il 92% è a capitale italiano: un dato che evidenzia come le biotecnologie abbiano aperto importanti opportunità nella fase della ricerca early-stage all'interno della filiera farmaceutica.

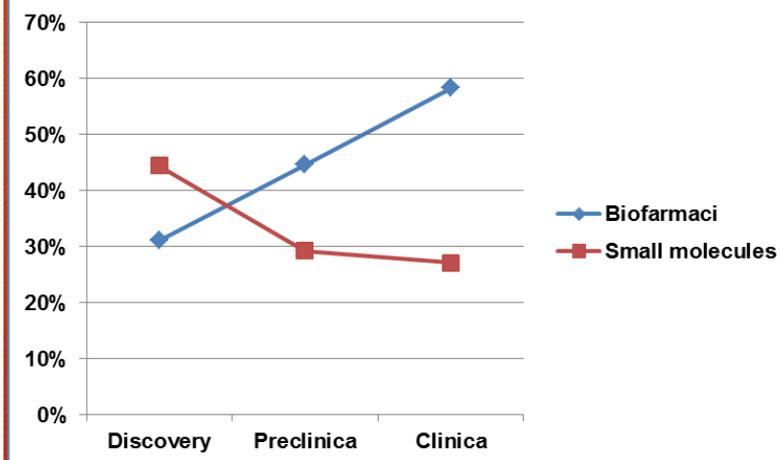
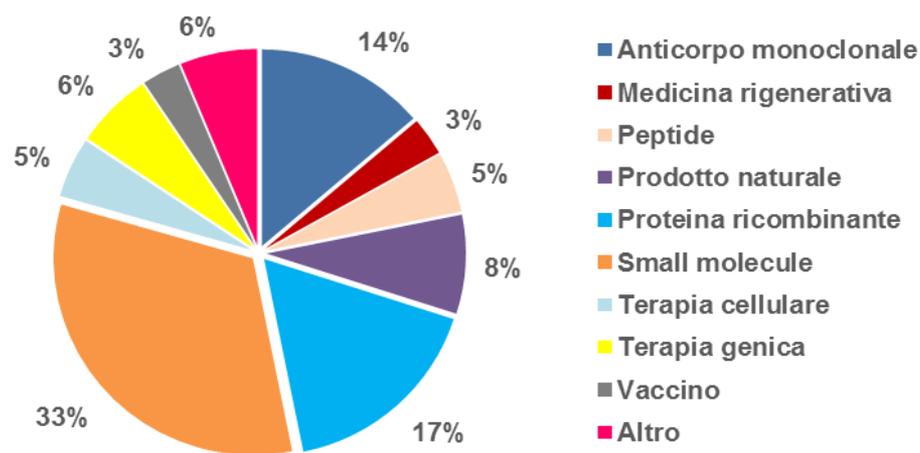
Di rilievo anche l'attenzione per i prodotti diagnostici: nel complesso delle imprese biotech italiane, ben 199 sviluppano prodotti e servizi diagnostici per la salute umana.

Le principali aree terapeutiche



Analisi dei progetti per tipologia e fase di sviluppo

Il 45% circa dei progetti della pipeline (fase di *discovery* inclusa) è costituito da biofarmaci, che comprendono, per definizione, gli anticorpi monoclonali, le proteine ricombinanti e i prodotti per terapie avanzate (terapia cellulare, terapia genica e medicina rigenerativa).



% di biofarmaci nelle diverse fasi di sviluppo

Dal 2014 a oggi, i biofarmaci sono passati dal 36% al 60%

Parchi Scientifici e Tecnologici e incubatori



Pure biotech italiane: localizzazione

Le *pure biotech* italiane sono localizzate:

- presso PST o incubatori (47%)
- presso università o centri di ricerca (25%)
- sede autonoma (28%)

I PST sono quindi autentici poli di aggregazione tra ricerca, imprese e capitale, consentendo alle micro e piccole imprese di accedere a un *network* di eccellenza e a un'ampia gamma di servizi particolarmente utili nelle fasi iniziali del loro sviluppo



Il sostegno all'innovazione

E' stata avviata una politica economica volta a fare dell'innovazione la chiave della competitività nostro sistema industriale. Tra le misure adottate:

- il riconoscimento dello status di *Start up* innovativa
- l'introduzione di un Credito d'imposta sulla ricerca
- l'adozione di un regime di tassazione agevolata sui redditi da proprietà intellettuale (*Patent Box*)
- il riconoscimento dello status di PMI innovativa

Innovazione: per una crescita più sostenibile

- ✓ Sono sempre più numerose le aziende che, pur operando in settori “tradizionali”, integrano prodotti e tecnologie biotech nei propri processi produttivi, al fine di migliorarne la qualità e la resa, e di diminuirne l’impatto ambientale
- ✓ **Nessun processo produttivo risulta, infatti, meno invasivo sull’ambiente di quello dei processi naturali dai quali, non a caso, le biotecnologie originano**
- ✓ La bioeconomia è la sfida che l’Europa sta raccogliendo per l’affermazione di un nuovo modello di sviluppo sostenibile, in grado di generare valore e occupazione
- ✓ **Le biotecnologie rientrano a pieno titolo nelle cosiddette KET (Key Enabling Technologies), come dichiarato dalla Commissione Europea**



Il processo di Ricerca & Sviluppo dei farmaci



2-5 MEUR

2 - 10 MEUR

400-700 MEUR

1-3 MEUR



Tempo
(media in anni)

Fallimento e successo: 5 su 1.000 !

Per ogni 1.000 molecole identificate, solo 5 arrivano alla valutazione clinica.

Di queste cinque, solo una viene approvata per l'utilizzo da parte dei pazienti.

In media occorrono 8-9 anni dalla sintesi di una molecola in laboratorio alla sua approvazione regolatoria.

Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA), aprile 2002



Percentuali di successo nello sviluppo di un farmaco

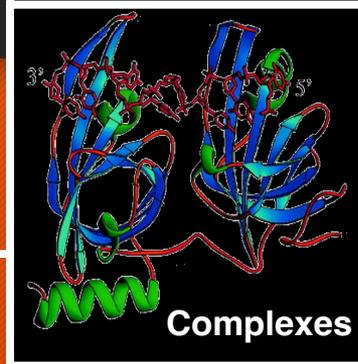
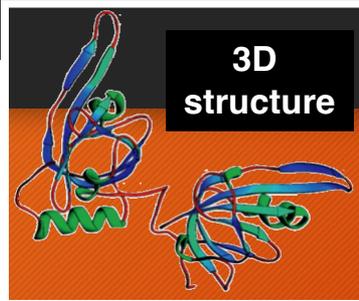


DRUG DESIGN

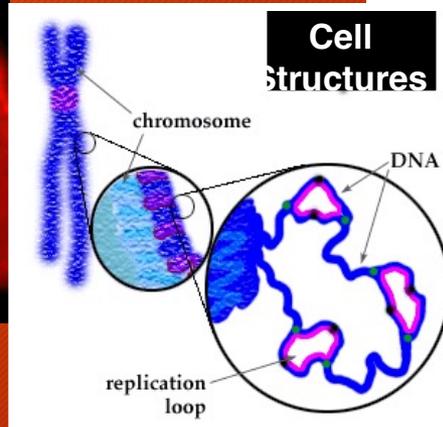
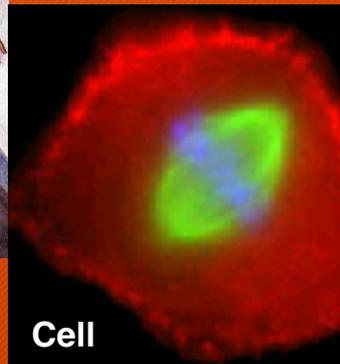
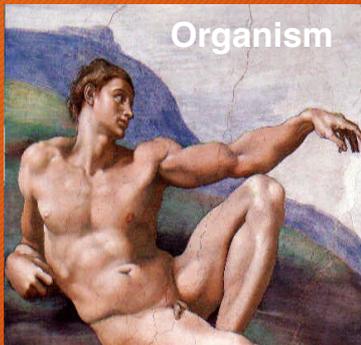
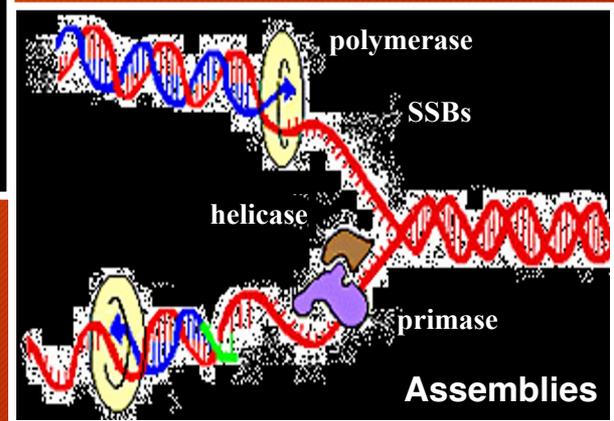
Biological Structure

Sequence

MESDAMESETMESSRSMYN
AMEISWALTERYALLKINCAL
LMEWALLYIPREFERDREVIL
MYSELFIMACENTERDIRATV
ANDYINTENNESSEEILIKENM
RANDDYNAMICSRPADNAPRI
MASERADCALCYCLINNDRKI
NASEMRPCALTRACTINKAR
KICPCDPKIQDENVSDETAVS
WILLWINITALL

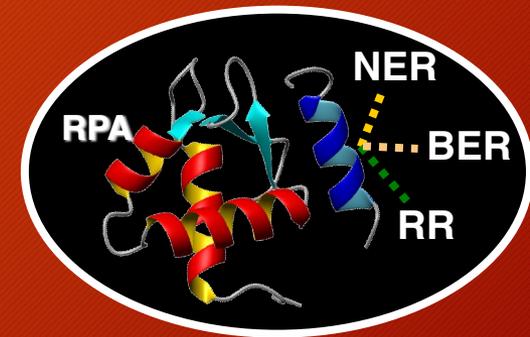
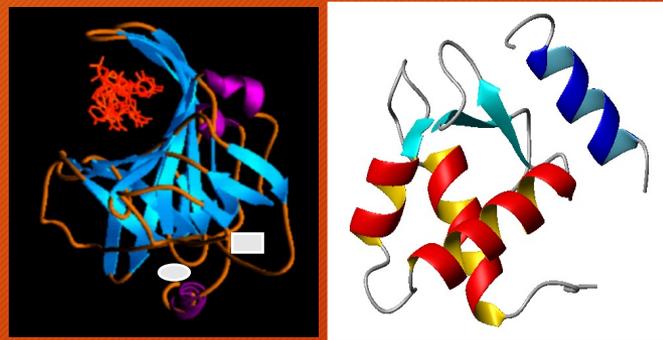
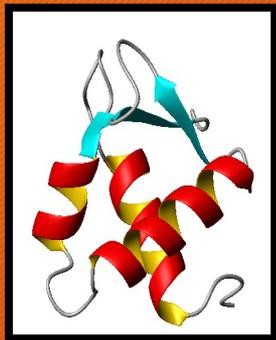
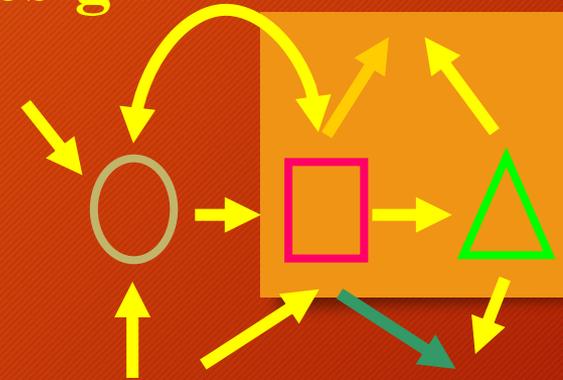


Structural Scales



System Dynamics

Red biotechnologies and drug design



Molecule

Pathway

Activity

Structural Genomics

**Functional
Proteomics**

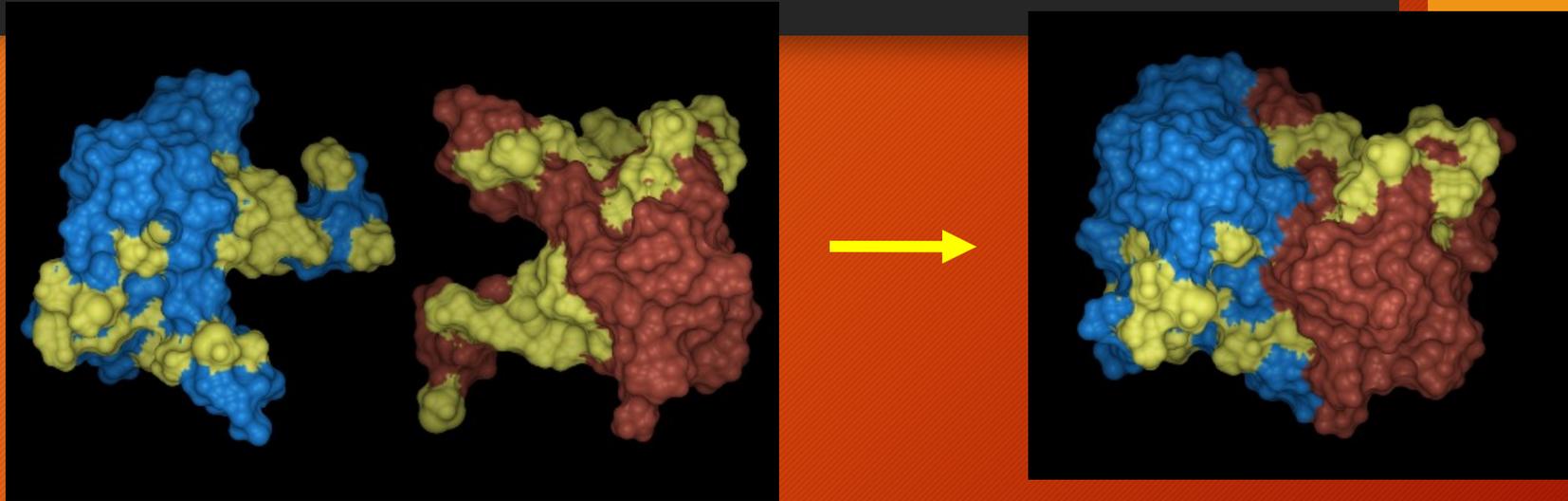
Drug design

High Resolution Structural Biology

Organ → Tissue → Cell → Molecule → Atoms

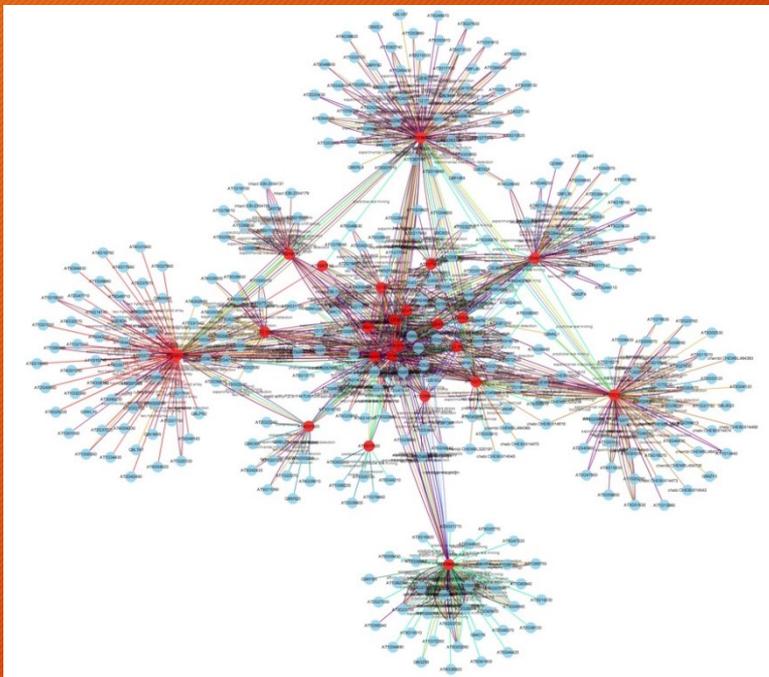
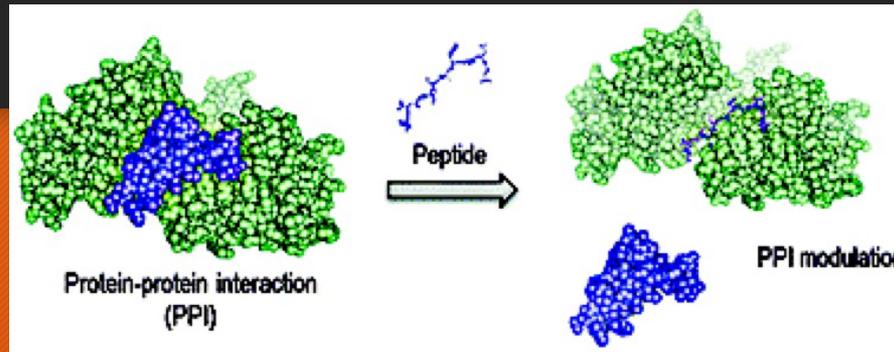
- A cell is an organization of millions of molecules
- Proper communication between these molecules is essential to the normal functioning of the cell
- To understand communication:
 - *Determine the Arrangement of Atoms**

High Resolution Structural Biology



Determine atomic structure
Analyze why molecules interact

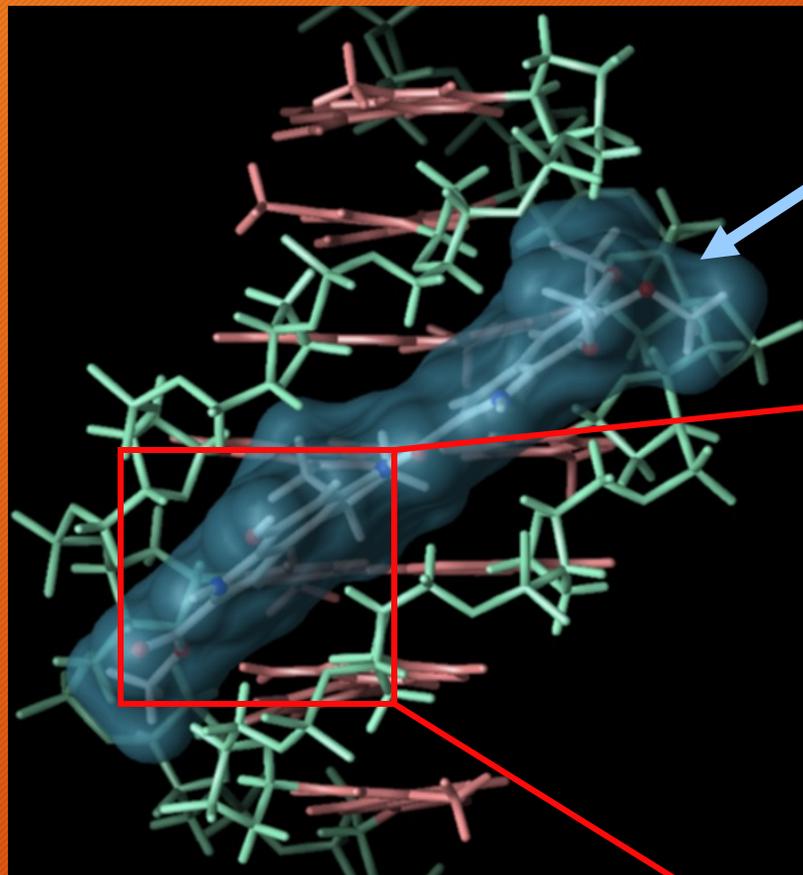
Protein-Protein Interaction (PPI)



Information stored in specific PPIs databases that can be used for:

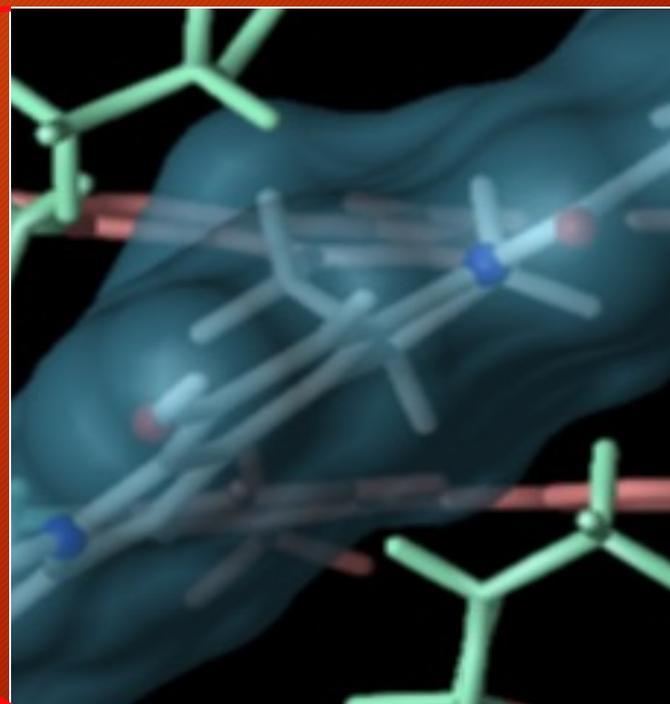
- 1) Prediction of interacting sites of proteins and design of specific interacting molecules;
- 2) Reliability Assessment of Protein-Protein Interactions;
- 3) Establishment of interaction networks for specific collections of proteins, and involved with pathological/physiological processing.

The Reward: Understanding → Control



Anti-tumor activity

Atomic interactions

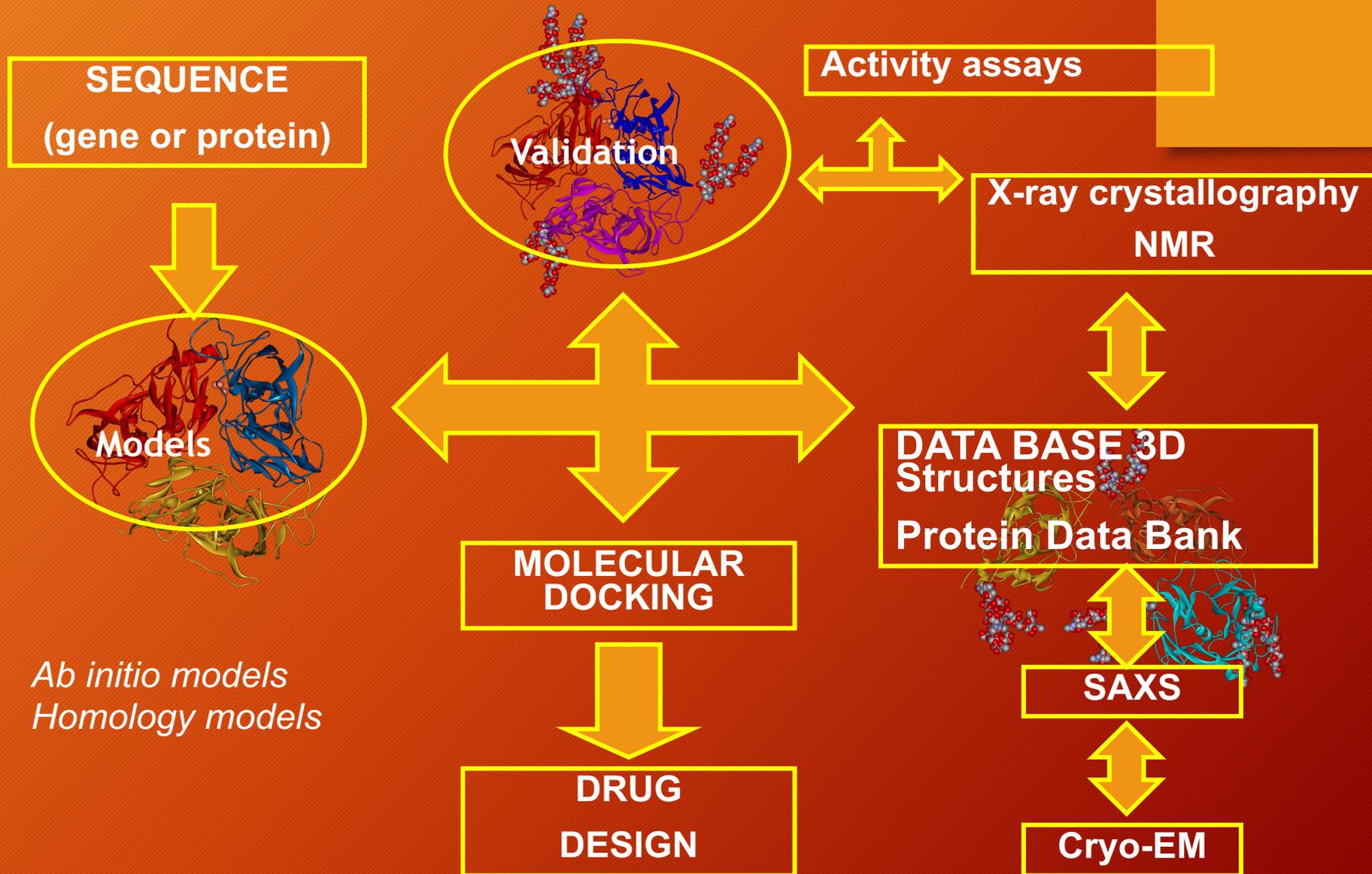


Shape

Structural Biology

In silico approaches

Experimental approaches



“Ligand Based” Approach

- **Disegno razionale di farmaci**
- **Chimica computazionale QSAR (Quantitative Structure Activity Relationships). Studio della correlazione statistica tra una proprietà fisica o molecolare calcolabile con alcune specifiche attività biologiche (programmi HyperChem, Sybyl).**
- **Una volta definiti dei parametri QSAR validi, è possibile predire l'attività biologica di un numero elevato di composti correlati prima di passare alla fase sperimentale che spesso richiede tempi lunghi ed è costosa.**

«TARGET BASED DRUG DESIGN»

Esempio → Valutare una libreria di pentapeptidi.

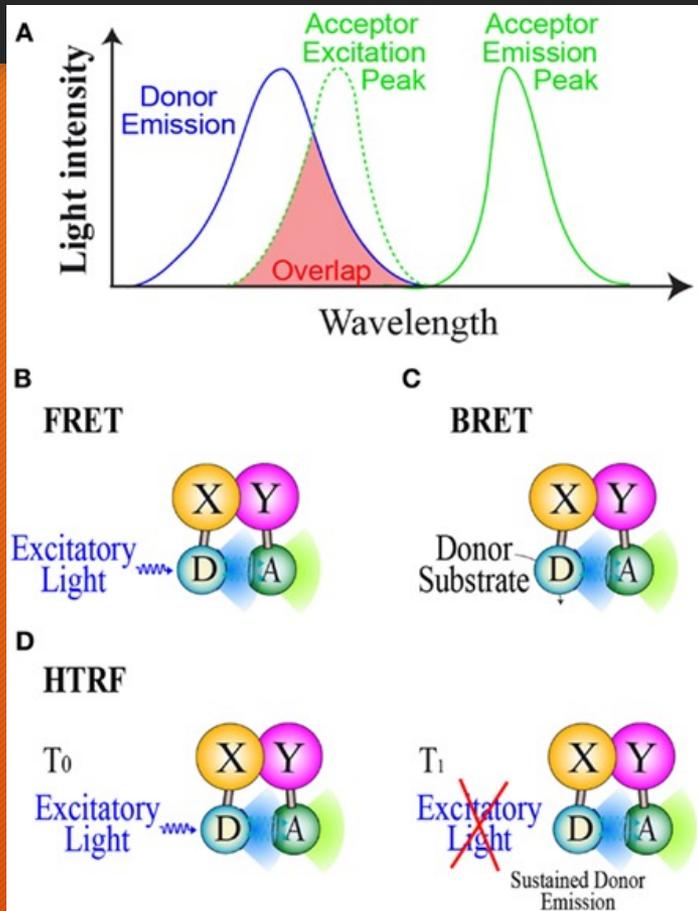
20 aminocidi abbiamo:

$20^5 = 3,200,000$ peptidi

✓ PROBLEMI

- Non possono essere tenuti in considerazione tutti i fenomeni che avvengono in soluzione. I calcoli possono richiedere molto tempo. Bisogna introdurre approssimazioni.
- Il più grande errore che si può commettere nell'analisi computazionale è quello di assumere che ogni numero calcolato sia esatto!!

Additional experimental approaches



- Label Transfer Protein Interaction Analysis (FRET-HTRF-BRET-FCS)
- Co-immunoprecipitation (co-IP)
- Pull-Down Assay
- Crosslinking Protein Interaction Analysis
- Far-Western Blot Analysis
- Label free SPR technology

Relationships between affinity and efficacy

A drug's potency is dependent on the drug's affinity and efficacy.

Affinity

Affinity describes how well a drug can bind to a protein (i.e. receptor, enzyme, ecc.). Faster or stronger binding is represented by a higher affinity, or equivalently a lower dissociation constant.

The EC_{50} should not be confused with the affinity constant, K_d . While the former reflects the drug concentration needed for a level of tissue response, the latter reflects the drug concentration needed for an amount of receptor binding.

Efficacy

Efficacy is the relationship between receptor occupancy and the ability to initiate a response at the molecular, cellular, tissue or system level.

Relationship of affinity and efficacy

The affinity of a drug for a molecular target is considered to be, along with its pharmacokinetic and metabolic profile, a primary determinant of therapeutic effectiveness.

For this reason, the affinity-related properties of new molecules - such as dissociation constants for receptor ligands or inhibition constants for enzyme inhibitors - play a key role in the selection of candidates for further development in the early stages of drug discovery.

It has recently emerged that drug binding kinetics (i.e. k_{on} and k_{off} of interaction), which is directly related to the length of time a drug spends in contact with its target, may be at least as important as the binding affinity.



Europe's partnership for health

[Home](#)

[About IMI](#)

[Get
involved](#)

[Apply
for funding](#)

[Projects
& results](#)

[News
& events](#)

[Reference
documents](#)



We are an EU public-private partnership
funding health research and innovation

€5.3bn
BUDGET

90
PROJECTS

868
PARTICIPANTS

6 995
PROJECT OUTPUTS

2 686
PUBLICATIONS

Kinetics and assay technology in drug design

To develop in vitro binding kinetic assays for studying the interaction between protein targets (soluble and membrane-bound) and drug candidates, with the throughput and timescales required for drug discovery projects.

Use different SPR platforms (e.g. Biacore and SensiQ-Pioneer) for validation. Kinetic profiles and affinity analysis by “faststep” injections will be developed and optimized specifically for membrane-associated proteins.

Cell-based SPR technologies for investigating the role of diffusion kinetics in drug-protein interactions. This technology could greatly accelerate the throughput of SPR based screening using membrane proteins (ALPHA screen).

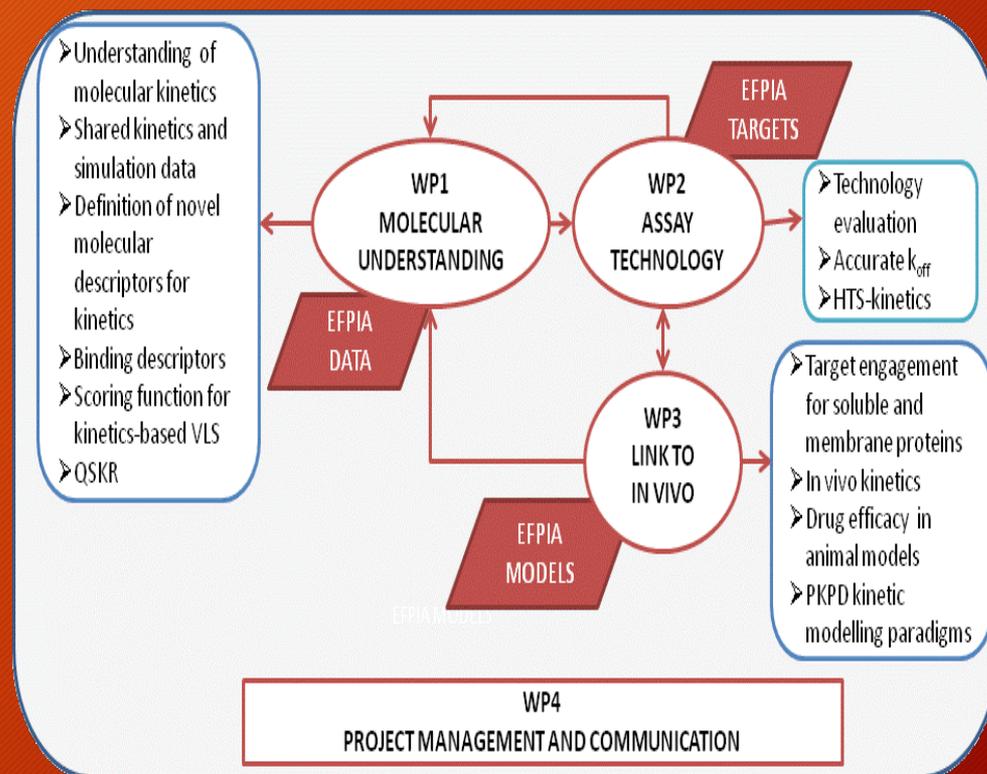
Use of Multimode Plate Readers. By optimizing these novel HTS assays, we are able to analyze many biological interactions in solution, including those with low affinity. We are also able to study membrane enzymes and/or receptor-ligand interactions.

Experiments across multiple cellular backgrounds to optimize and develop HTS methods based on the availability of fluorescence biosensors.

The study and integration of kinetics in the drug discovery process could thus be moved to the next level.

List of participants

No	Organisation	Representative	Country
1	FONDAZIONE ISTITUTO ITALIANO DI TECNOLOGIA (IIT)	Dr. Daniele Piomelli Dr. Andrea Cavalli Dr. Angelo Reggiani	Italy
2	FUNDACIÓN DE LA COMUNIDAD VALENCIANA CENTRO DE INVESTIGACION PRINCIPE FELIPE (CIPF)	Dr. Antonio Pineda-Lucena	Spain
3	UNIVERSITAT POMPEU FABRA (UPF)	Dr. Gianni de Fabritiis	Spain
4	SYNAPSE RESEARCH MANAGEMENT PARTNERS (SYNAPSE)	Mr. Carlos Diaz	Spain
5	ACELLERA LTD. (ACELLERA)	Mr. Matt J. Harvey Dr. David Soriano	United Kingdom
6	NOMADICS INC. (SENS)	Dr. John Quinn Dr. Michel Perrière	United States of America
7	UNIVERSITE DE GENEVE (UNIGE)	Dr. Leonardo Scapozza Dr. Yann Seimbille	Switzerland
8	FUNDACIÓN CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES ONCOLOGICAS CARLOS III (CNIO)	Dr. Guillermo Montoya Dr. Francesco Luigi Gervasio	Spain
9	UNIVERSITA DEGLI STUDI DI TERAMO (UNITE)	Dr. Mauro Maccarrone Dr. Enrico Dainese Dr. Sergio Oddi	Italy
10	SIENA BIOTECH S.p.A. (SIBI)	Dr. Ugo Zanelli Dr. Antonio Chiumiento	Italy
11	BRUKER BIOSPIN GmbH (BRUKER)	Dr. Manfred Spraul	Germany
12	PERKINELMER CELLULAR TECHNOLOGIES GERMANY GmbH (PKI)	Dr. Volker Eckelt	Germany
13	FORSCHUNGSZENTRUM FUER MOLEKULARE MEDIZIN GMBH (CeMM)	Dr. Giulio Superti-Furga	Austria



Risonanza plasmonica di superficie e tecniche *label-free*

di Enrico Dainese

La **risonanza plasmonica di superficie** (*Surface Plasmon Resonance, SPR*) è un metodo di elezione per la caratterizzazione delle interazioni macromolecolari. L'SPR è una tecnica ottica che utilizza il fenomeno dell'**onda evanescente** per misurare cambiamenti dell'**indice di rifrazione** in prossimità della superficie di un sensore metallico. A partire dallo sviluppo, negli anni '90 del secolo scorso, del primo sensore basato sull'SPR, l'uso di questa tecnica è cresciuto in modo costante negli anni. Il legame tra un analita in soluzione e il suo substrato immobilizzato sulla superficie del sensore determina una variazione dell'indice di rifrazione. Tale interazione viene monitorata in tempo reale e la quantità di analita legato, nonché le velocità di associazione e di dissociazione, possono essere misurate con alta precisione. I metodi sperimentali che prevedono l'impiego della metodica SPR stanno evolvendo insieme a un crescente numero di applicazioni, che vanno dal **ligand-fishing** ("pesca" del ligando), ad applicazioni in microbiologia, in virologia, allo studio delle interazioni patogeno-ospite, alla mappatura degli epitopi e allo studio delle interazioni tra macromolecole biologiche (proteina-proteina, DNA-proteina, proteina-membrane, proteina-cellule ecc.).

Metodologie biochimiche e biomolecolari. Strumenti e tecniche per il laboratorio del nuovo millennio, Zanichelli Editore 2019 .

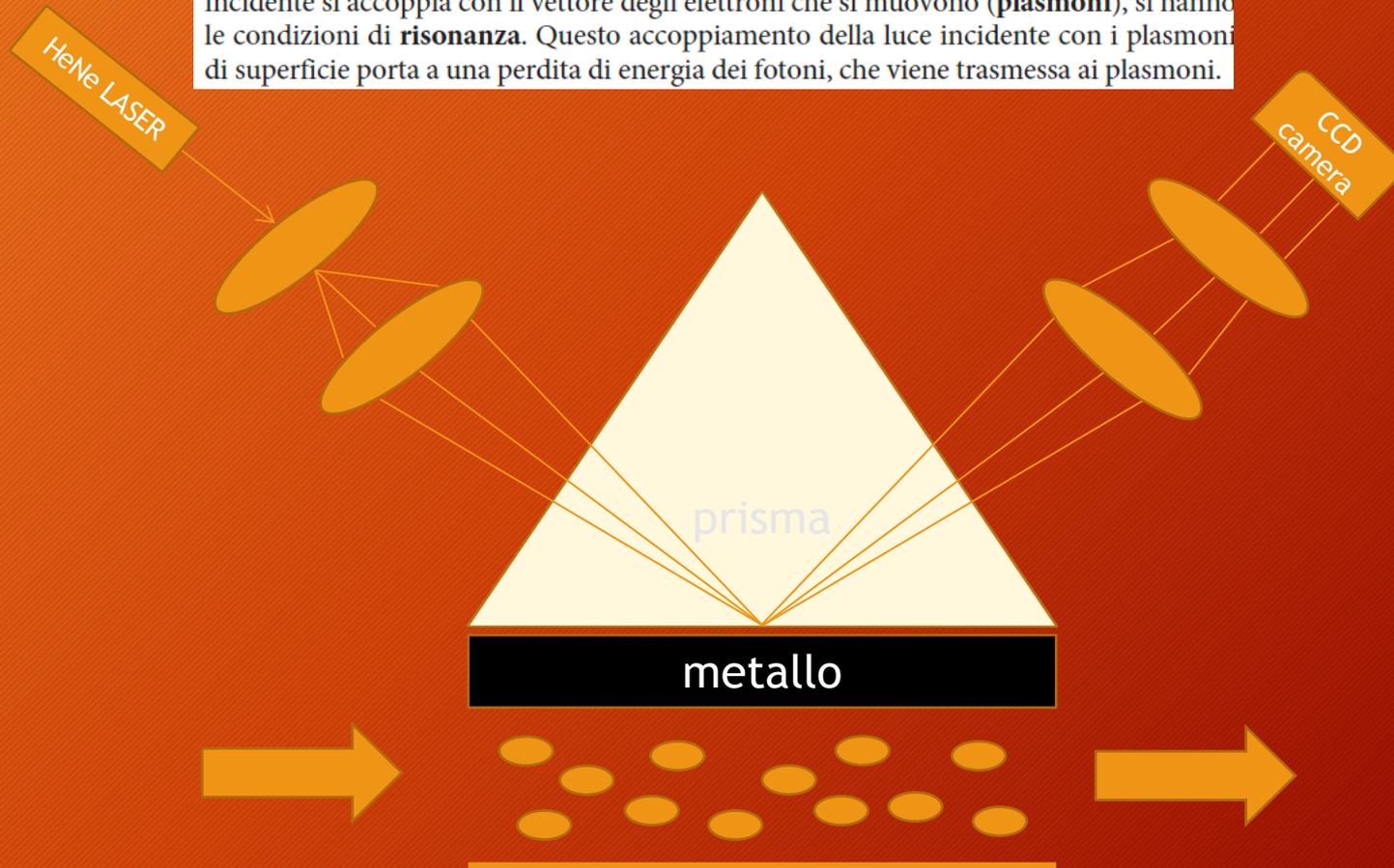
Risonanza plasmonica di superficie e tecniche *label-free*

di Enrico Dainese

Come detto precedentemente, a partire dal suo sviluppo iniziale, la metodica SPR è stata ampiamente utilizzata in biochimica e biologia molecolare grazie ai suoi numerosi vantaggi:

- rilevazione in tempo reale e senza etichette molecolari (metodica *real-time e label free*);
- alta **sensibilità**;
- mancanza di dipendenza dalle proprietà spettroscopiche delle molecole analizzate;
 - **analisi quantitativa**;
 - determinazione delle **costanti cinetiche di velocità**;
 - necessità di piccoli volumi di campione;
 - possibilità di analisi di un elevato numero di campioni (*High-Throughput Screening*, HTS).

La tecnica della SPR è un metodo ottico per misurare l'indice di rifrazione di strati molto sottili di materiale adsorbito su un metallo. La teoria e le basi della metodica SPR vennero descritte e dimostrate per la prima volta da Andreas Otto alla fine degli anni '60 del secolo scorso. Una frazione dell'energia luminosa di una luce polarizzata incidente con un angolo ben definito può interagire con gli elettroni delocalizzati nel film metallico e, in questo modo, si riduce l'intensità della luce riflessa (**Figura 28.1**). Poiché gli elettroni sulla superficie del metallo (tipicamente oro o argento) sono mobili, essi possono essere definiti come un liquido ad alta densità elettronica (**plasma**) e creano delle oscillazioni che si propagano in direzione parallela all'interfaccia tra il metallo e il materiale dielettrico (il campione biologico). Le onde di plasma che si propagano sono chiamate **plasmoni** superficiali. Quando a un particolare angolo incidente, il vettore dell'onda della luce incidente si accoppia con il vettore degli elettroni che si muovono (**plasmoni**), si hanno le condizioni di **risonanza**. Questo accoppiamento della luce incidente con i plasmoni di superficie porta a una perdita di energia dei fotoni, che viene trasmessa ai plasmoni.



La luce riflessa da un prisma induce un campo evanescente sia nello strato di metallo sia nel materiale dielettrico. La luce viene, quindi, riflessa dal prisma e un rivelatore registra l'angolo a cui è soddisfatta la risonanza, espressa in unità di risonanza o RU (**Figura 28.2**). Il biosensore a SPR si basa pertanto sul principio che qualsiasi cambiamento sulla superficie dielettrica di rilevazione causa uno spostamento dell'angolo di rifrazione al fine di soddisfare la condizione di risonanza che viene registrata dal rivelatore. Quando l'analita inizia a fluire sopra lo strato di rilevazione e si lega al substrato (materiale dielettrico biologico), l'angolo di rifrazione che soddisfa la condizione di risonanza cambia di conseguenza, fino a raggiungere la saturazione (RU_{max}) quando tutti i siti di legame sono stati occupati. La dissociazione dell'analita dal substrato fa sì che l'angolo del rivelatore ritorni alla linea di base, non appena tutto l'analita sia stato completamente rimosso (**Figura 28.3**). Pertanto, nella metodica SPR i cambiamenti ambientali nel mezzo dielettrico (materiale biologico oggetto di analisi) causano un'alterazione di fase, ampiezza, polarizzazione o distribuzione spettrale della luce incidente, che può essere attribuita a variazioni della costante di propagazione; quindi, vengono rilevati cambiamenti nell'indice di rifrazione in tempo reale.

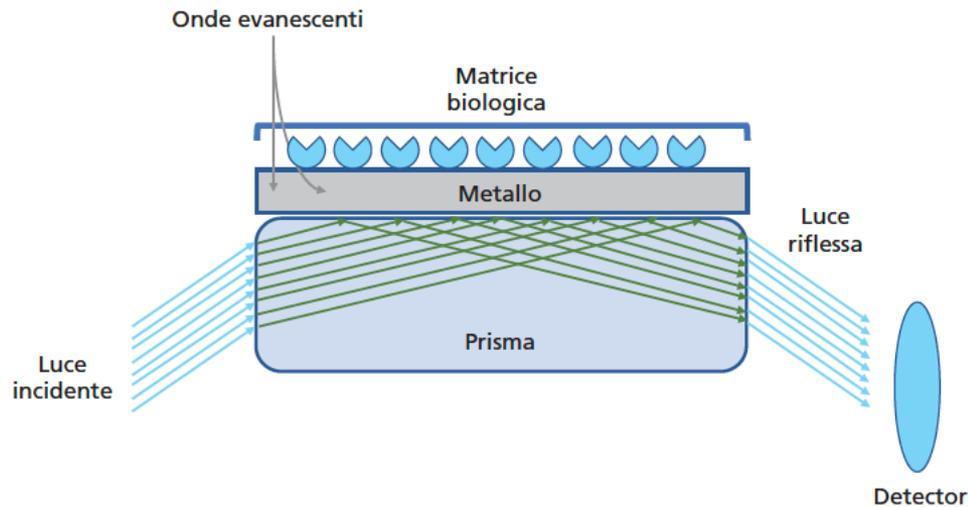


Figura 28.2

La luce riflessa dal prisma induce un'onda evanescente sia nel metallo sia nel materiale dielettrico (materiale biologico). La luce riflessa in uscita dal prisma viene rilevata dal detector, che misura l'angolo al quale è soddisfatta la condizione di risonanza.

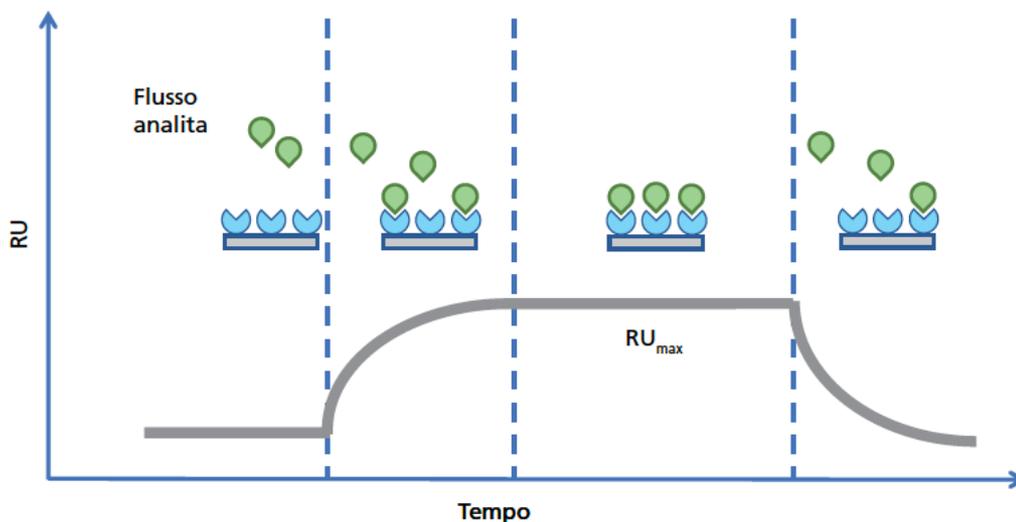


Figura 28.3

Tipico sensogramma SPR. Quando l'analita inizia a legarsi al substrato immobilizzato sul sensore, l'angolo di riflessione che soddisfa le condizioni di risonanza (espresso in unità di risonanza, RU) cambierà fino a raggiungere la saturazione (RU_{max}), situazione in cui tutti i siti di legame del substrato sono occupati. La completa dissociazione dell'analita fa tornare i valori di RU alle condizioni iniziali (linea di base).

In particolare, l'affinità di un farmaco nei confronti di un bersaglio molecolare è considerata, insieme al suo profilo farmacocinetico e metabolico, un fattore determinante per l'**efficacia terapeutica**. Nelle prime fasi della scoperta dei farmaci, le loro proprietà di affinità verso molecole che sono loro bersagli potenziali, come le costanti di dissociazione di ligandi recettoriali (agonisti o antagonisti) o le costanti di inibizione nel caso di inibitori di enzimi, svolgono un ruolo chiave nella selezione di nuove classi di molecole da caratterizzare ulteriormente. In questo contesto va anche considerato che la metodica SPR consente di ottenere parametri cinetici (per esempio le k_{on} e k_{off}) e le affinità di legame con il farmaco che sono direttamente correlate al periodo di tempo in cui un farmaco rimane in contatto con il suo bersaglio. Pertanto, la metodica SPR può essere applicata al miglioramento del profilo e della specificità terapeutica dei farmaci mediante lo studio sistematico delle cinetiche di legame a livello molecolare e cellulare, ottimizzando il processo di sviluppo razionale dei farmaci (*drug design*).

Anche l'integrazione della metodica SPR con altre metodiche complementari come la calorimetria differenziale, la cristallografia a raggi X, il SAXS, l'NMR e la bioinformatica, consente approfondimenti raffinati dei meccanismi d'interazione molecolare, fornendo un contributo fondamentale alla progettazione razionale di farmaci.

Le analisi mediante SPR sono in grado di misurare **costanti cinetiche di associazione** (k_a) e di **dissociazione** (k_d). Prendiamo l'esempio del caso più semplice in cui la molecola A (analita) interagisce con la molecola B (substrato) per dare AB (complesso) con stechiometria 1:1 ($A + B \rightleftharpoons AB$). Tali parametri sono facilmente ottenibili da un **sensogramma SPR** (Figura 28.3), monitorando il cambiamento di risposta del legame in funzione del tempo e della concentrazione, ovvero:

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a \cdot [A] \cdot [B] - k_d \cdot [AB] \quad [28.2]$$

dove

k_a è la costante cinetica di associazione espressa in $M^{-1}s^{-1}$,

k_d è la costante cinetica di dissociazione espressa in s^{-1} ,

[A] e [B] sono, rispettivamente, le concentrazioni di analita e di substrato liberi,

[AB] è la concentrazione del complesso formato.

Ricordiamo che all'equilibrio le velocità di associazione e di dissociazione si equivalgono, quindi $k_a \times [A] \times [B] = k_d \times [AB]$. Pertanto, in condizioni di equilibrio, l'associazione dell'analita A alla superficie può essere descritta da un'equazione di *pseudo-primo ordine*:

$$RU_t = \frac{RU_{\max} k_a [A]}{k_a [A] + k_d} \left(1 - e^{-(k_a [A] + k_d)t} \right) \quad [28.3]$$

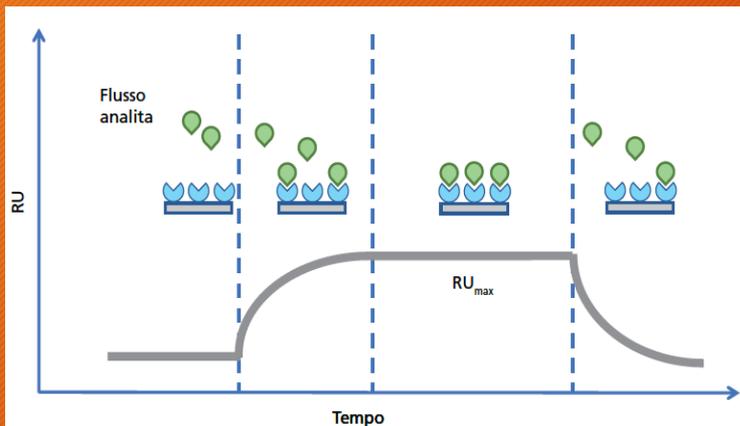
dove

RU_t è il segnale registrato dal detector al tempo t ,

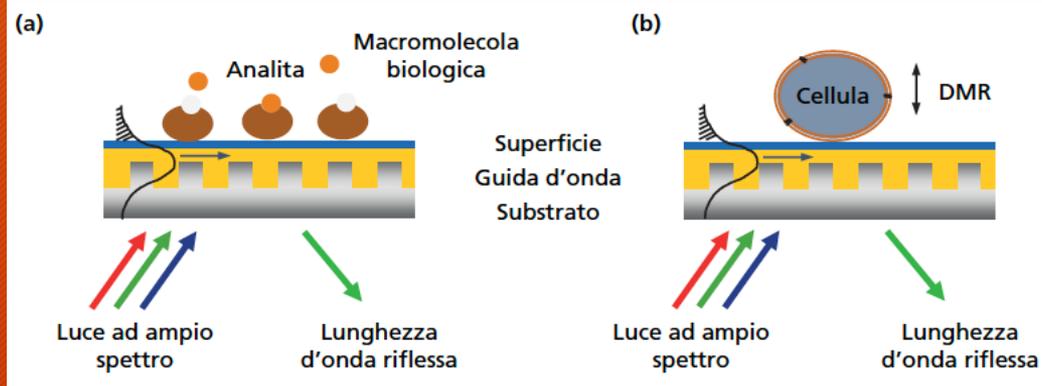
RU_{\max} è il valore massimo del segnale (si veda la Figura 28.3), a saturazione di legame.

In un tipico esperimento si effettuano misure a diverse concentrazioni di analita, producendo diverse curve con diversi valori di costanti di velocità k_{on} . L'equazione della retta $k_{on} = k_a \times [A] + k_d$ consente di riportare in grafico i dati di k_{on} in funzione della concentrazione di analita [A] e permette, mediante **regressione lineare**, di ottenere il valore di k_a dalla **pendenza della retta** e quello di k_d dall'intercetta con l'asse y. Questi parametri consentono anche di ottenere i valori delle **costanti di associazione** K_a (che in alcuni casi viene definita come **costante di affinità**) e di **dissociazione** K_d **all'equilibrio**, in base alla seguente relazione:

$$K_a = \frac{1}{K_d} = \frac{k_a}{k_d} \quad [28.4]$$



Per le misure di tipo *label free* è importante menzionare i **sensori a reticolo a guida d'onda risonante** (*Resonant Waveguide Grating*, **RWG**). Sebbene il reticolo di diffrazione sia stato descritto oltre un secolo fa, la sua applicazione per lo sviluppo di sensori biochimici non si ebbe prima degli inizi del nuovo millennio. La luce incidente da entrambi i lati del reticolo (**Figura 28.4**) si propaga attraverso e si accoppia nella guida d'onda per mezzo del reticolo. Il segnale risultante in uscita appare in una banda ristretta di lunghezze d'onda riflesse o trasmesse. Quindi, in modo simile alla metodica SPR, qualsiasi cambiamento nello strato di materiale biologico (macromolecole o cellule) causerà un cambiamento nella lunghezza d'onda riflessa o trasmessa. Nelle apparecchiature più recenti è stata introdotta la versione Epic® del sensore RWG, apportando modifiche per aumentare la sensibilità e offrendo la possibilità di effettuare misure su micropiastre da 96, 384 e persino 1536 pozzetti (Figura 28.4). Ogni biosensore fornisce misurazioni molto sensibili dei cambiamenti nel legame a proteine (Figura 28.4a) o cellule (Figura 28.4b), in risposta alle aggiunte di ligandi in prossimità della superficie del biosensore. Le interazioni di legame causano cambiamenti nella distribuzione di massa sul biosensore stesso, che vengono rilevati come uno spostamento della lunghezza d'onda. I sensori vengono colpiti da una radiazione elettromagnetica incidente con luce a banda larga e riflettono solo a una lunghezza d'onda specifica, che è una funzione sensibile alla variazione dell'indice di rifrazione vicino alla superficie del sensore. Nel caso di proteine o altre macromolecole biologiche, il cambiamento dell'indice di rifrazione e, quindi, della lunghezza d'onda della luce riflessa è proporzionale al numero di eventi di legame tra l'analita e il substrato. Invece, nel caso dell'analisi di cellule, esso è proporzionale alla **redistribuzione dinamica di massa (DMR)**. Le analisi delle interazioni biologiche con questi apparecchi sono di notevole interesse, sia per la possibilità di confronto dei dati ottenuti mediante la metodica SPR, sia per la loro versatilità nello sviluppo di farmaci mediante analisi in HTS di un numero elevato di molecole, anche su modelli cellulari *in vitro*.



EnSpire Multimode Plate Reader for binding measurements by FRET and Label Free technology

Can be selected with following options:

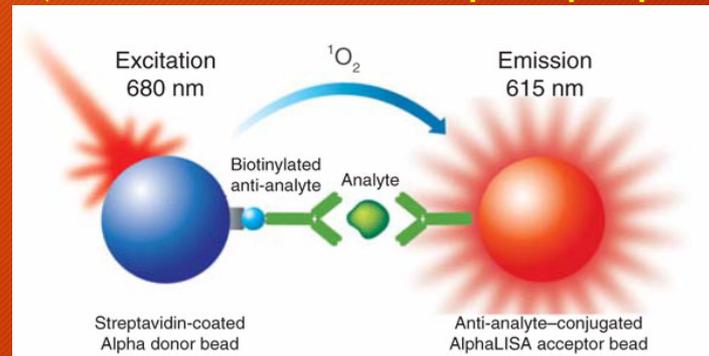
- Absorbance
- Fluorescence
- TRF, TR-FRET
- Ultra sensitive Luminescence
- AlphaScreen
- Temperature control
- Equipped with automatic workstation

Incorporates SPR label-free technology for biochemical and cell-based assays



ENSPIRE ALPHA 2390 MULTILABEL READER:

ENSPIRE ALPHA reader is equipped with modular dispense technology arm, and an EnSpire Multimode Plate Reader. It will be employed for cell signaling assays (detection of cAMP, phospho-protein, etc.)

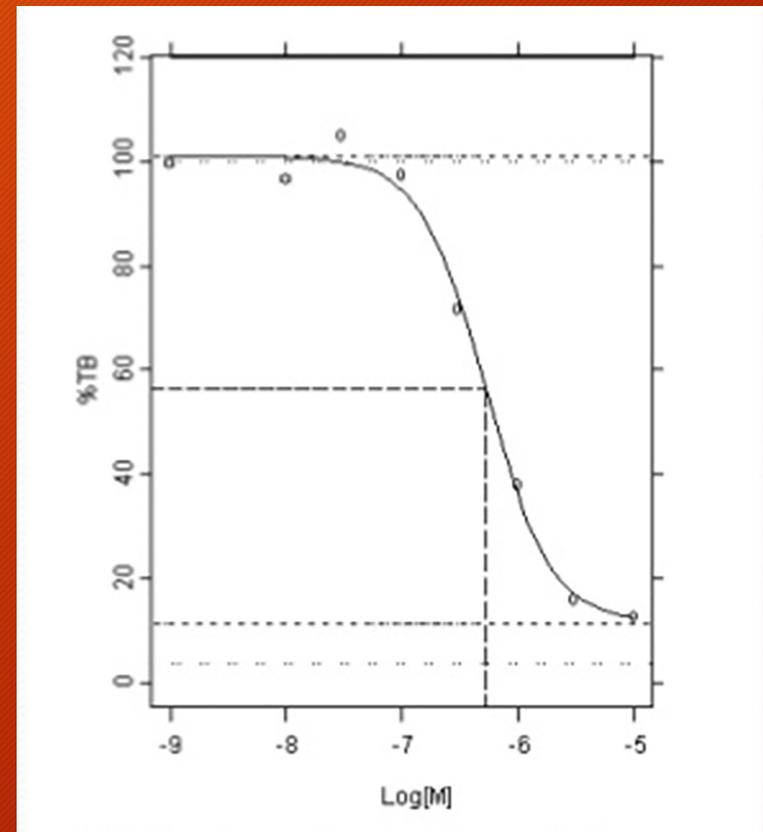


A biotinylated antibody to the analyte binds to the streptavidin-coated donor beads and a second antibody to the analyte is directly conjugated to AlphaLISA acceptor beads. In the presence of the analyte, the two beads come into close proximity. The excitation of the donor beads at 680 nm generates singlet oxygen molecules that trigger a series of chemical reactions in the acceptor beads resulting



Old approaches: Radioligand binding assay

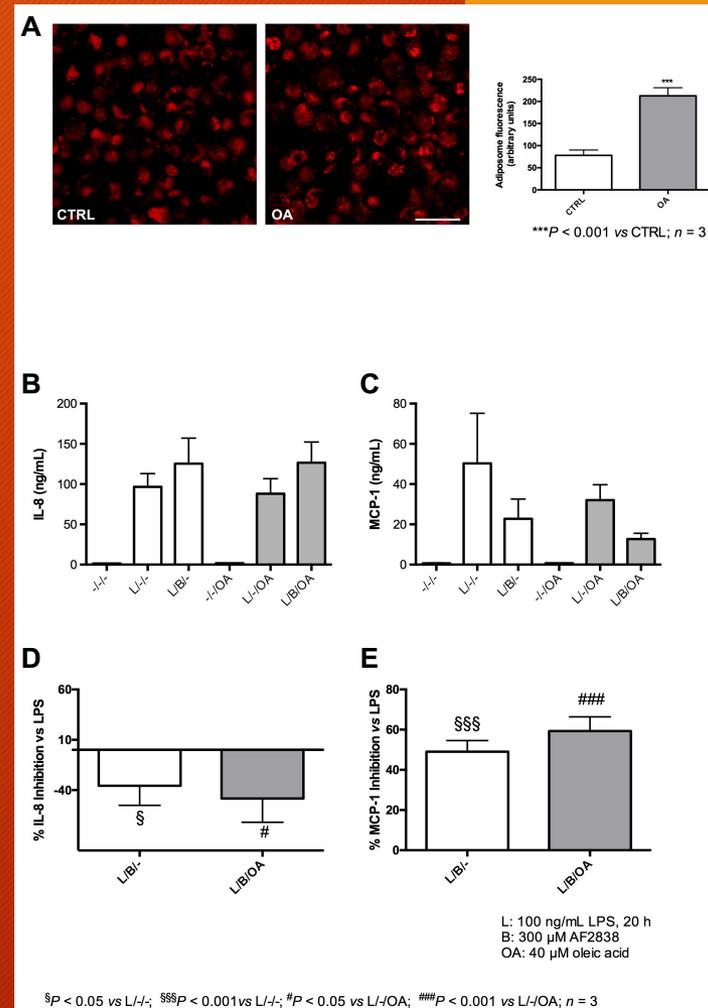
- Fixed concentration of radiolabeled ligand
- Measures of how well a compound competes with the radioligand
- Indicates that the studied molecule is utilizing the same binding pocket within the target protein



The anti-inflammatory agent bindarit acts as a modulator of fatty acid-binding protein 4 in human monocytic cells

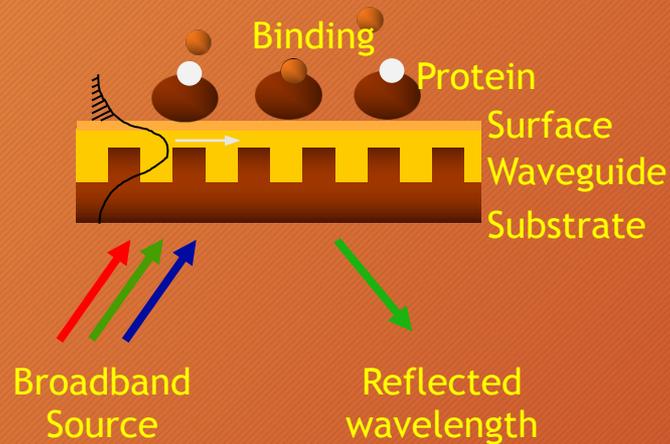
Sergio Oddi^{1,2*}, Lucia Scipioni², Antonio Totaro², Clotilde Angelucci¹, Beatrice Dufrusine¹, Annalaura Sabatucci¹, Daniel Tortolani¹, Isabella Coletta³, Maria Alessandra Alisi³, Lorenzo Polenzani³, Michael Assfalg⁴, Carlo Caltagirone², Enrico Dainese^{1,4,6*} & Mauro Maccarrone^{1,2,5,6*}

We investigated the cellular and molecular mechanisms by which bindarit, a small indazolic derivative with prominent anti-inflammatory effects, exerts its immunoregulatory activity in lipopolysaccharide (LPS) stimulated human monocytic cells. We found that bindarit differentially regulates the release of interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), enhancing the release of IL-8 and reducing that of MCP-1. These effects specifically required a functional interaction between bindarit and fatty acid binding protein 4 (FABP4), a lipid chaperone that couples intracellular lipid mediators to their biological targets and signaling pathways. We further demonstrated that bindarit can directly interact with FABP4 by increasing its expression and nuclear localization, thus impacting on peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and LPS-dependent kinase signaling. Taken together, these findings suggest a potential key-role of FABP4 in the immunomodulatory activity of bindarit, and extend the spectrum of its possible therapeutic applications to FABP4 modulation.



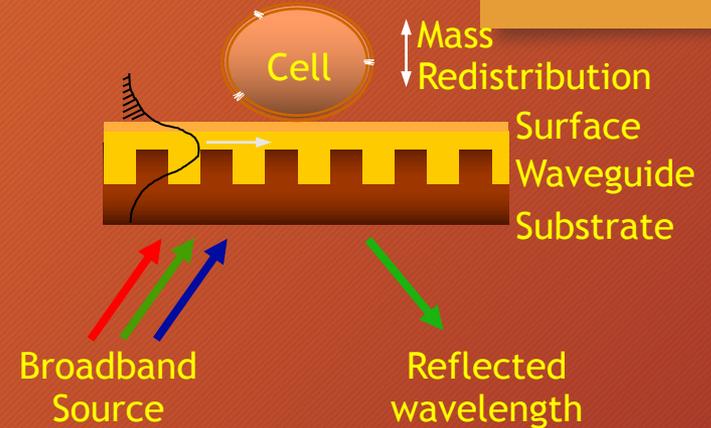
Label-free captures information in a single assay

Biochemical Assays



Biochemical binding events cause index of refraction changes, resulting in a wavelength shift

Cell-Based Assays



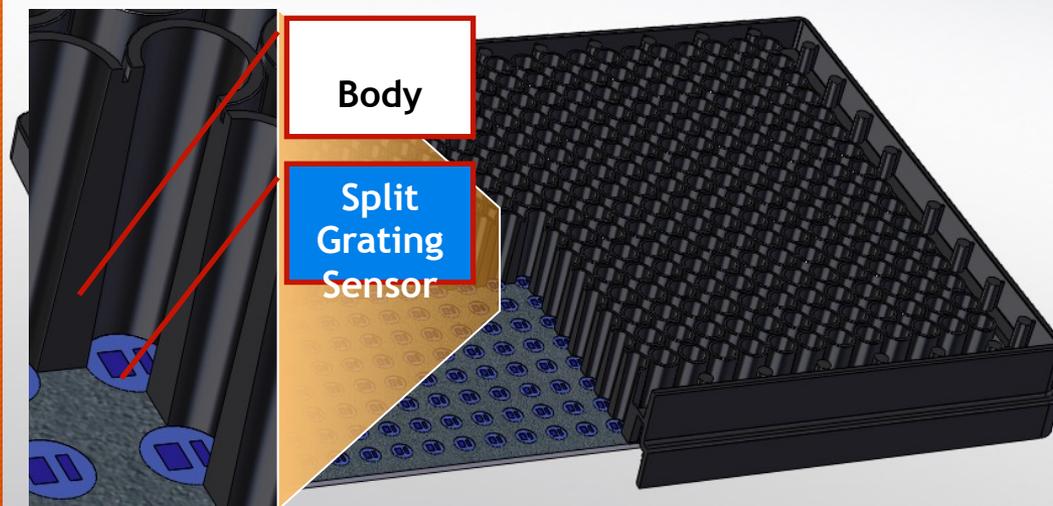
Dynamic mass redistribution (DMR) within a cell causes index of refraction changes, resulting in a wavelength shift

Biochemical Label-free Microplates For Binding Measurements

384-well format

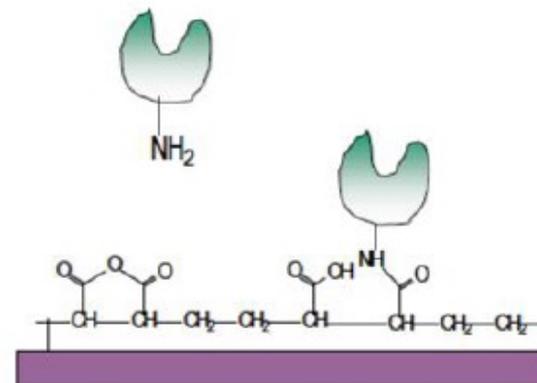
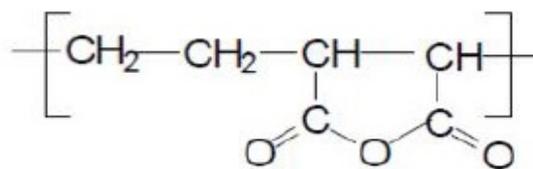
Have a self reference pad within the sensor

Pre-activated amine coupling chemistry for covalent immobilization of targets



Immobilization concept

- Polyethylene-Maleic anhydride (EMA) copolymer is the current Epic® immobilization chemistry
- This chemistry allows direct amine coupling for immobilization of the target protein through creation of a covalent bond between the protein of the surface



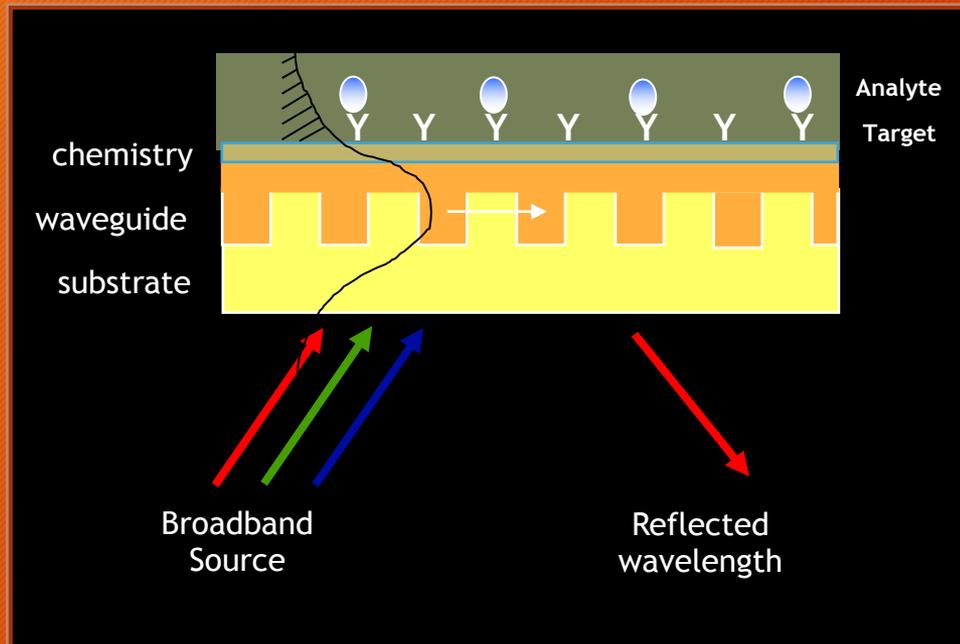
Target immobilization on
EMA standard chemistry

Biochemical Label-free Microplates For Binding Measurements

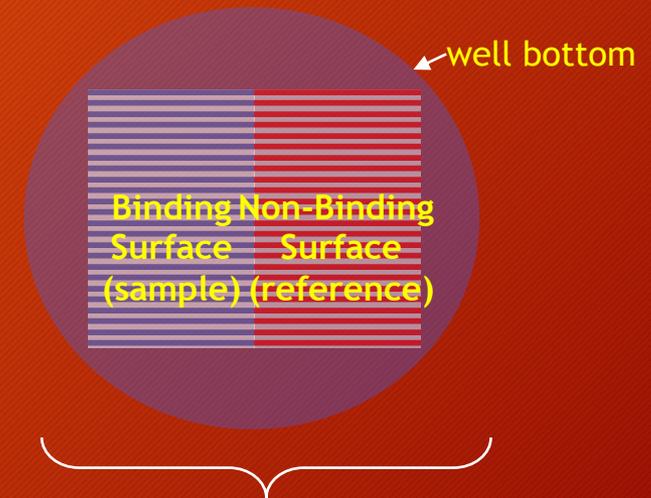
Measures changes in index of refraction upon a binding event

Change in index manifested by a shift in resonant wavelength (SPR)

Sensitive to the first ~150 nm from the sensor surface



Patented Dual-Sensor Self-Referencing Technology



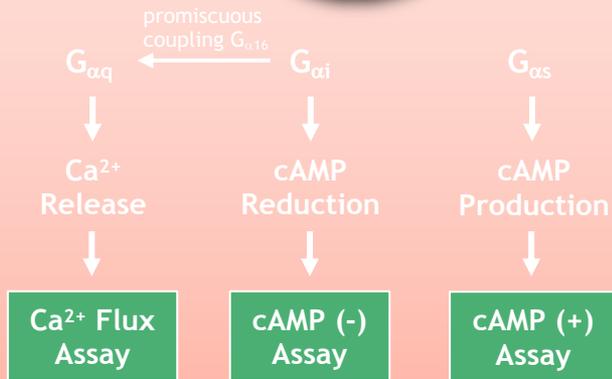
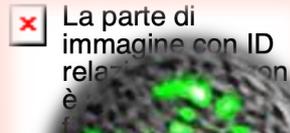
Single split sensor within well

Binding Signal = Sample - Reference

Label-free captures information in a single cellular assay

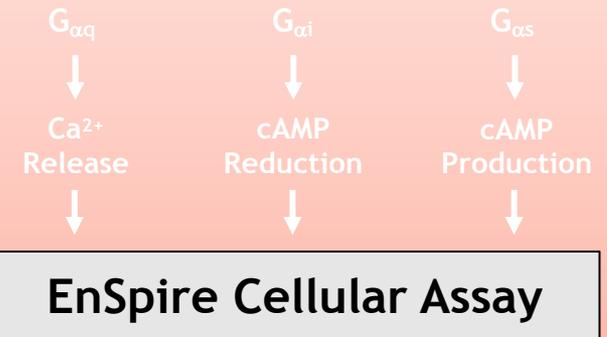
Conventional Secondary Pathway Assay

Genetically Modified (Engineered) Cell

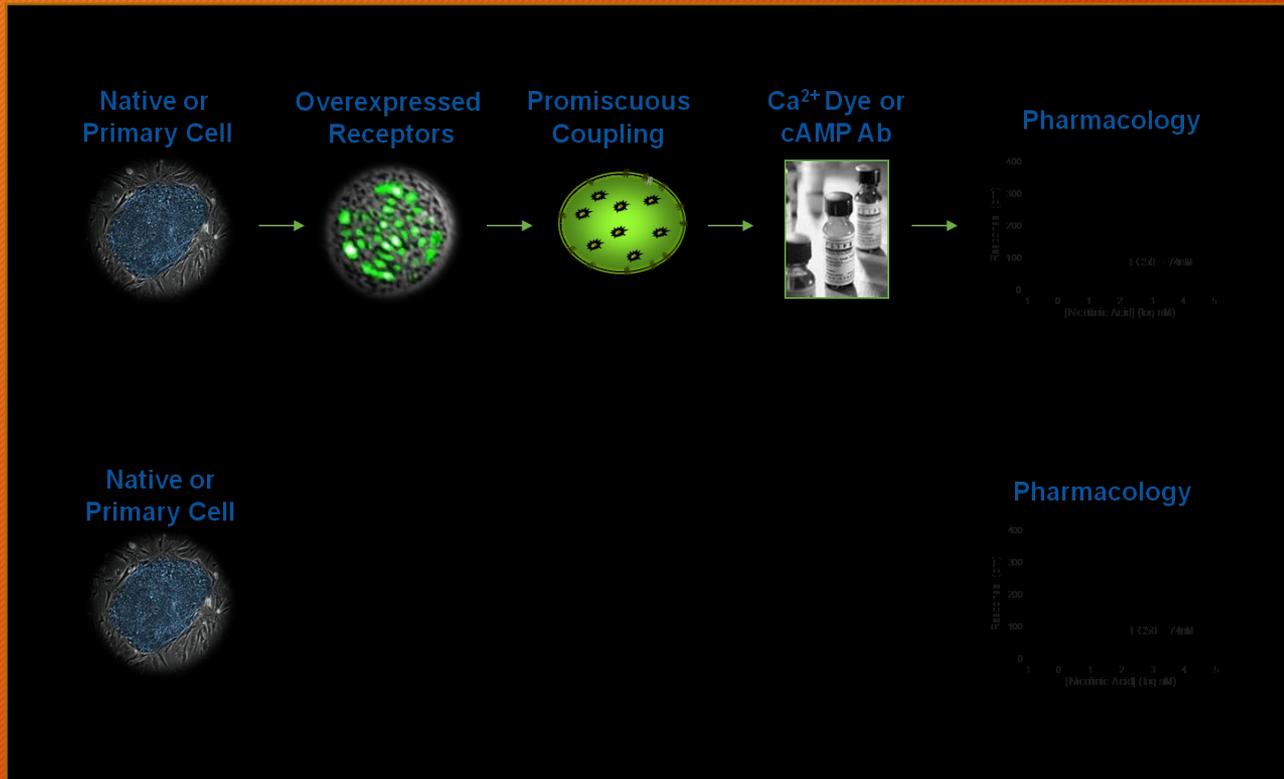


Label-free Assay

Primary or Stem Cell



Label-free captures information in a single cellular assay



- non-invasive / live cell assay format
- produce better physiologically and biologically relevant data
- Conventional techniques will help to further investigate and deconvolute label-free responses