

ENSAIO DE BINDING: ASPECTOS TEÓRICOS E PRÁTICOS

NOËL F.

<http://francoisnoelfarmac.wixsite.com/fnoel>

Lab. Farmacologia Bioquímica e Molecular



ICB – UFRJ



François Noël, PhD

Farmacologista

[Início](#)

[Perfil](#)

[Laboratório](#)

[Graduação](#)

[Pós-graduação](#)

[Publicações](#)

[Cantinho da Estatística](#)

[Contato](#)

[Blog](#)

Atuação

1 - Responsável pela disciplina de Farmacocinética e Farmacodinâmica fundamental (BMF-310) do curso diurno da Faculdade de Farmácia da UFRJ.

2 - Participa de outras disciplinas do programa de graduação do ICB-UFRJ:

- BMF-310 (noturno): seminários
- BMF320 (Farmacologia neuroendócrina-diurno): seminários
- BMF-354 (farmacologia básica e aplicada-diurno): aulas e seminários
- BMF-001 (Farmacologia clínica-diurno): aulas e seminários

[Site ICB: graduação](#)

BMF-310: Informações



Informação para alunos



Programa

BMF-310: Seminários/Práticas



Seminário 1



Seminário 2



Seminário 3



interacoes

BMF-310: Aulas



Introdução



Const/Diarréia

Farmacogenia



Modelos-PK

Absorção



Doses Repetidas

Vias



BDBE genericos

Distribuição



Farmacodinâmica

Excreção



Estudos Clínicos

Metabolização



PK/PD

Farmacogenética

Glossário-Farmacologia



medicamento-Fármaco



Efeitos adversos - colaterais



Sinergismo



Biodisponibilidade



Eficácia Efetividade Eficiência



Doenças negligenciadas-raras



Tempo Residência



Alosterismo



Seletividade Funcional



Instituto de Ciências Biomédicas
UFRJ



Da Administração Oral Ao Efeito Terapêutico

Medicamento



Administração

Desintegração
Desagregação
Dissolução

ETAPA BIOFARMACÊUTICA



Fármaco em solução

Absorção
Distribuição
Eliminação

FARMACOCINÉTICA



Fármaco na biofase

Interação Fármaco-Receptor

FARMACODINÂMICA

EFEITO TERAPÊUTICO

CONCEITO DE RECEPTOR FARMACOLÓGICO

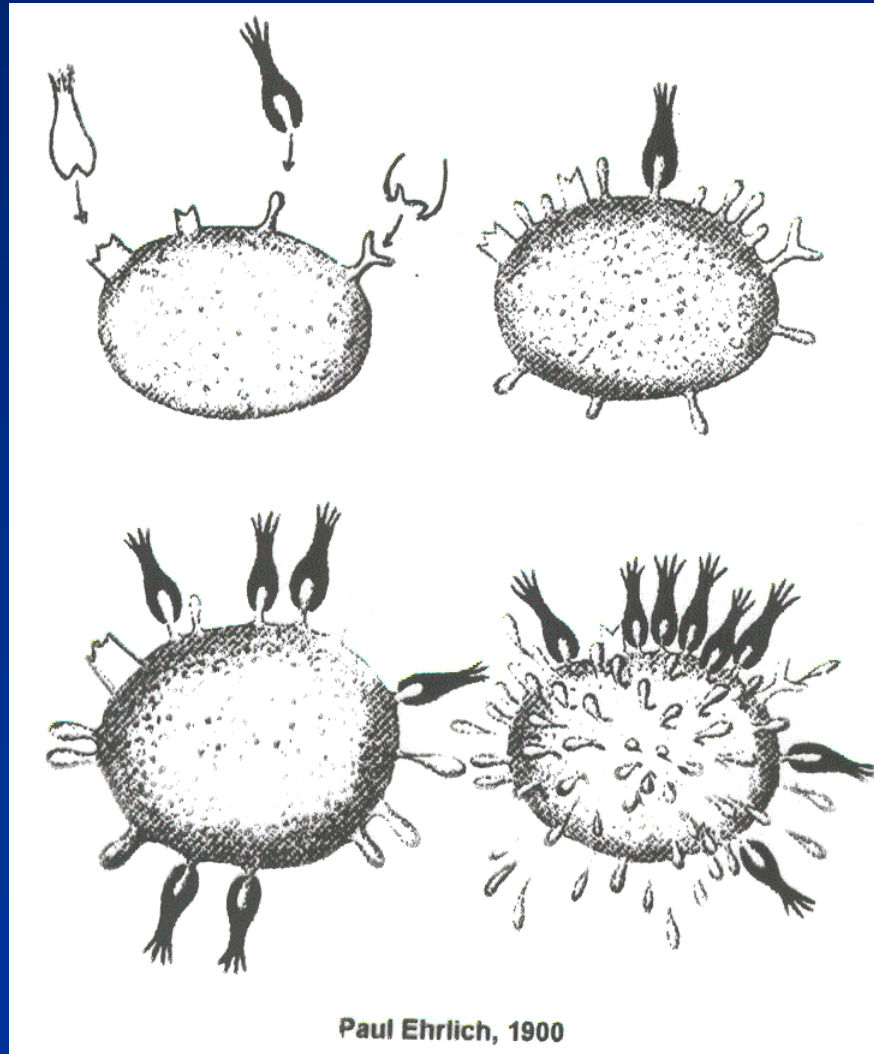
Langley (1905): introdução do termo
“**Receptive substance**”

Ehrlich (1907): Base teórica da Quimioterapia
“*Corpora non agunt nisi fixata*”



Definição: Componente biológico **macromolecular**
com que interage **especificamente** um fármaco
para desencadear seu **efeito** farmacológico

Corpora non agunt nisi fixata: Binding



PROPRIEDADES GERAIS DOS RECEPTORES

Sensibilidade: afinidade !

Especificidade: REA (*Estereoseletividade*)

Saturação → competição

Especificidade da resposta celular

INTERAÇÃO FÁRMACO-RECEPTOR: FORÇAS QUÍMICAS E RELAÇÃO ESTRUTURA-AATIVIDADE

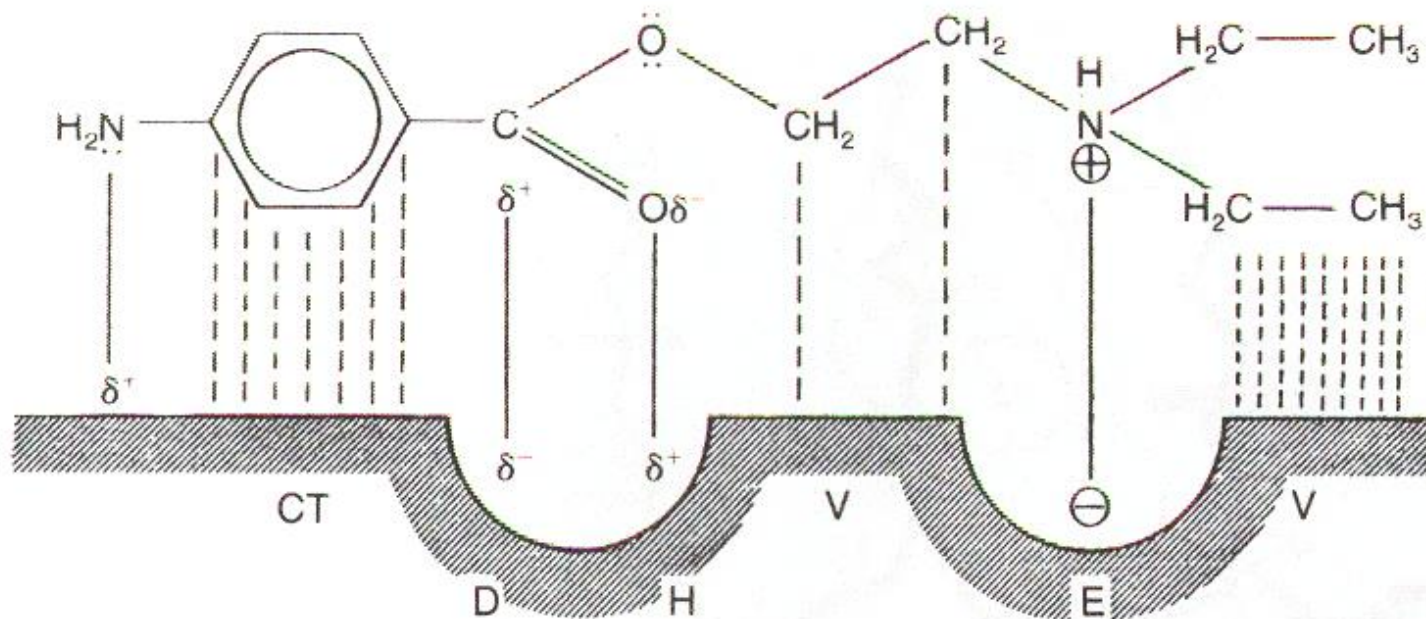
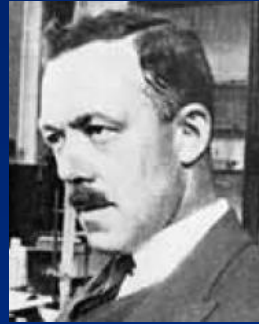


Fig. 17.3 Ligação da molécula de procaína por meio de: E, forças eletrostáticas; D, interação dipolo-dipolo; V, forças de van der Waals; H, ligação de hidrogênio; CT, transferência de carga (Büchi, J. *et al. Arzneim.-Forsch.*, 16:1657, 1966).

1. LEI DE AÇÃO DAS MASSAS: LANGLEY (1878)

2. TEORIA DA OCUPAÇÃO: CLARK - 1930



modelo: “O efeito do fármaco é diretamente proporcional à fração de receptores ocupados”



Afinidade
Binding

Efeito
Farmacologia clássica

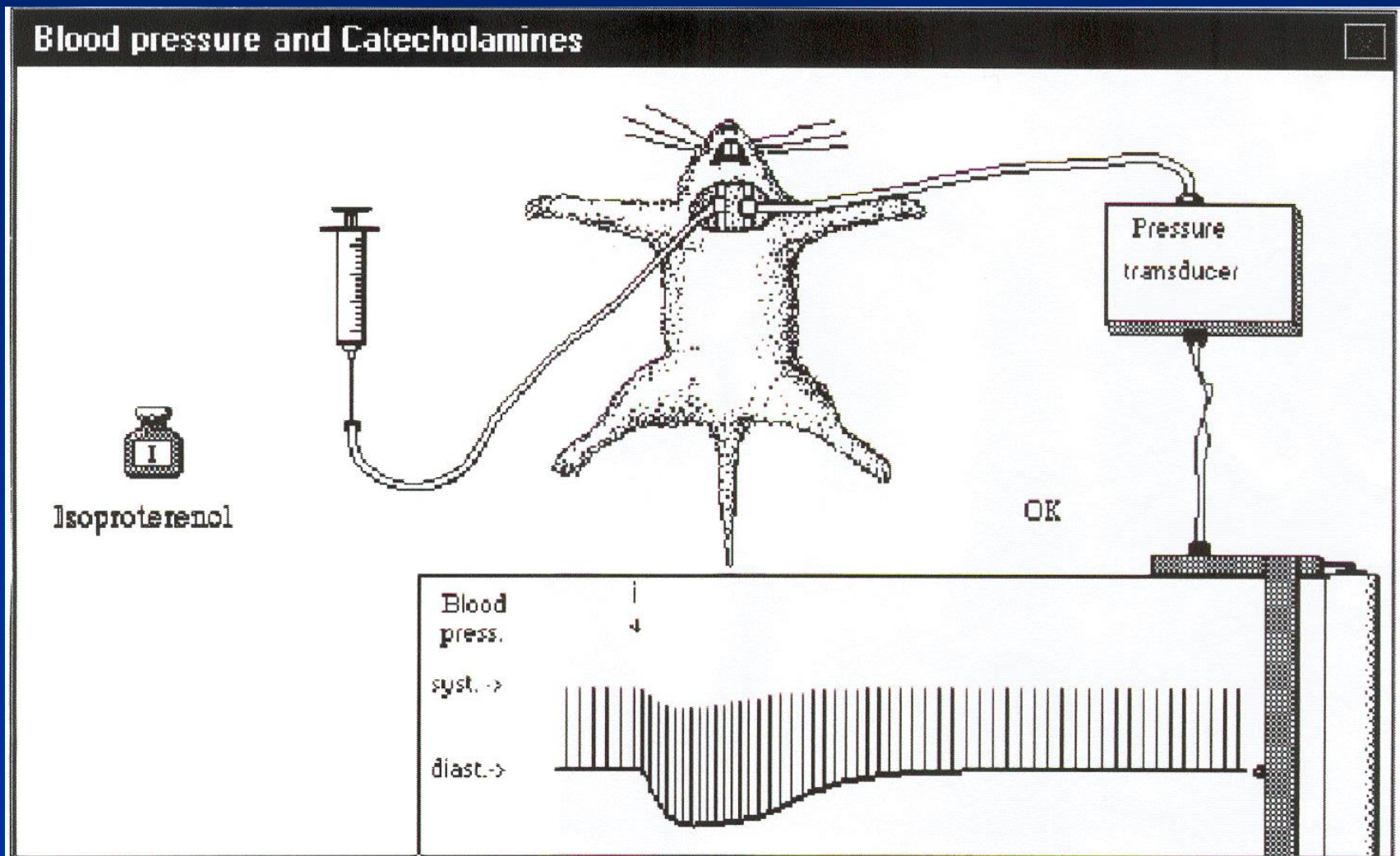
FARMACOLOGIA CLÁSSICA:

Estudos comportamentais



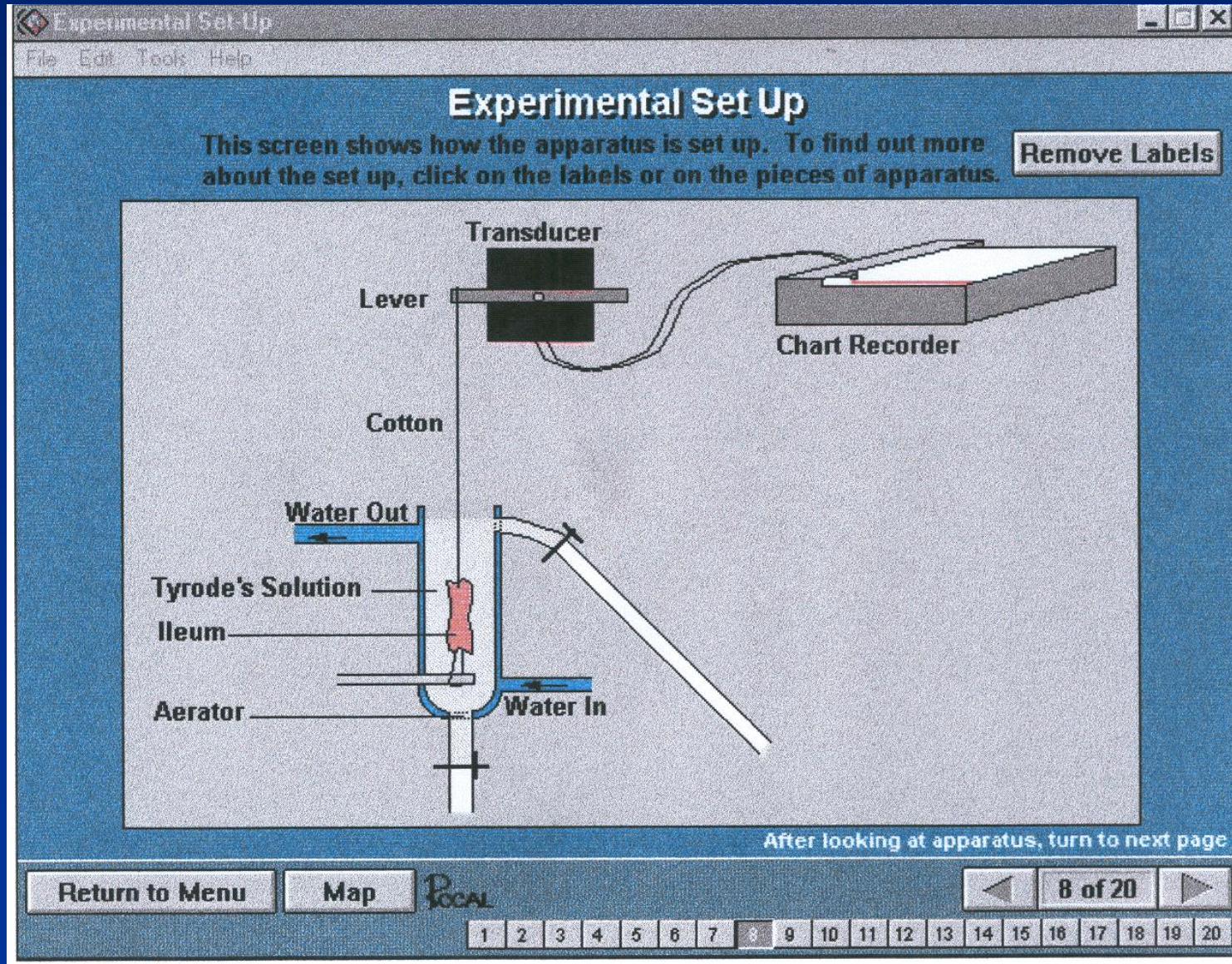
FARMACOLOGIA CLÁSSICA:

medida *in vivo*: pressão arterial



FARMACOLOGIA CLÁSSICA:

Medida *in vitro*: órgão isolado

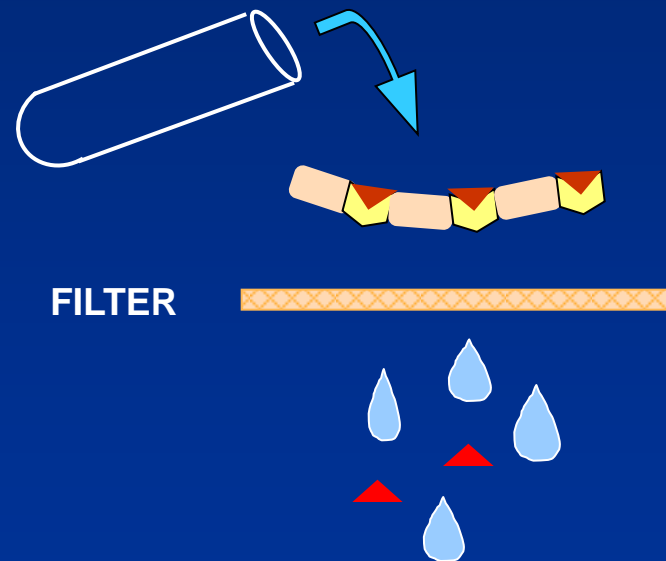
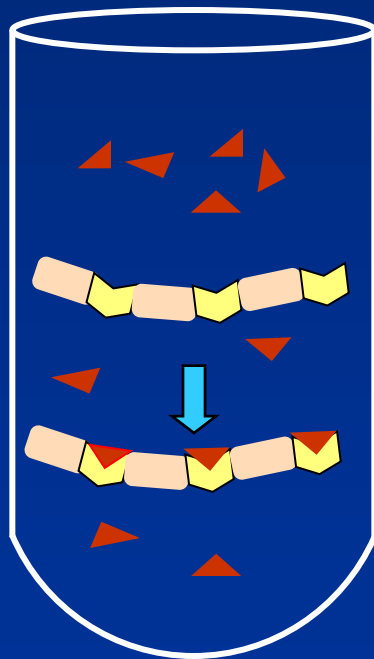


FARMACOLOGIA CLÁSSICA “moderna”:

Medida *in vitro*: célula / *Patch Clamp*



BINDING ASSAY: PRACTICAL ASPECT





LANÇAMENTO

E-BOOK:
Baixe o pdf no site
da SBFTE

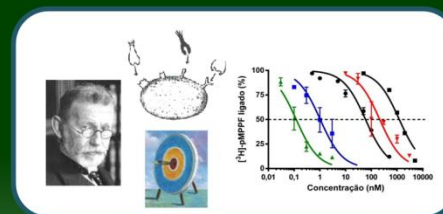
<http://www.sbfte.org.br/material-didatico/>



François Noël

ENSAIOS DE *BINDING*:

Fundamentos teóricos, aspectos práticos e
aplicações no desenvolvimento de fármacos



1^a edição

Rio de Janeiro
François Germain Noël
2017

Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular
ICB – UFRJ -Brasil

Vídeo

DETERMINAÇÃO DA LIGAÇÃO NÃO ESPECÍFICA

I. CONCEITO

$$S = T - NS$$

NS: medido na presença de um excesso de ligante não radioativo ($[L] \geq 100 \times K_d$)

II. ORIGEM

Verdadeiro NS ao tecido

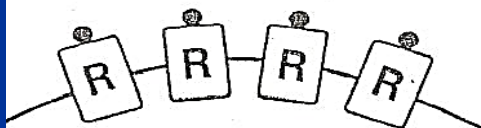
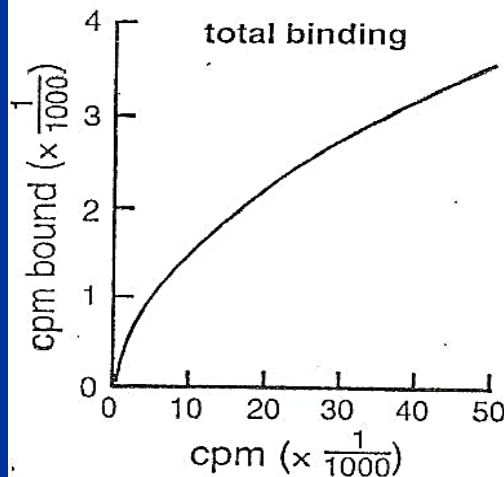
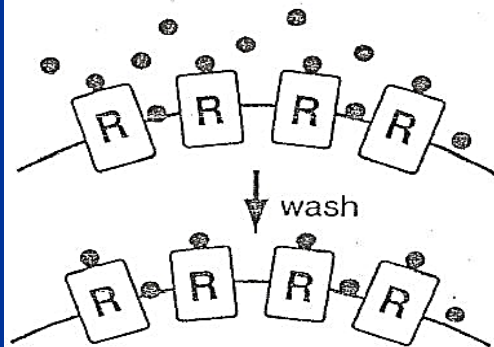
Radioligante livre que não foi lavado eficientemente

NS ao filtro

III. LAVAGEM E USO DE ANTI-ADSORVANTES

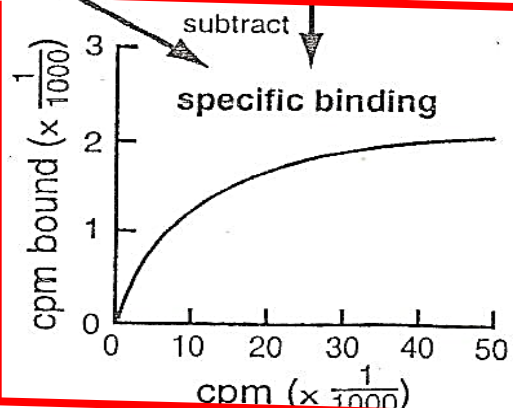
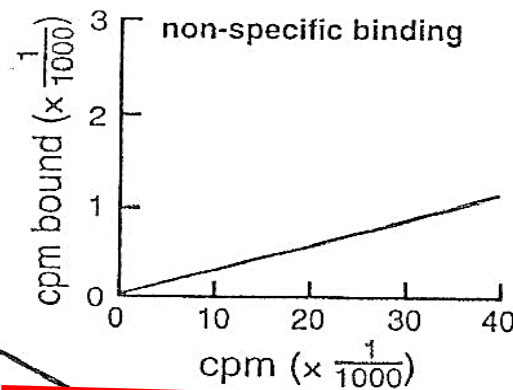
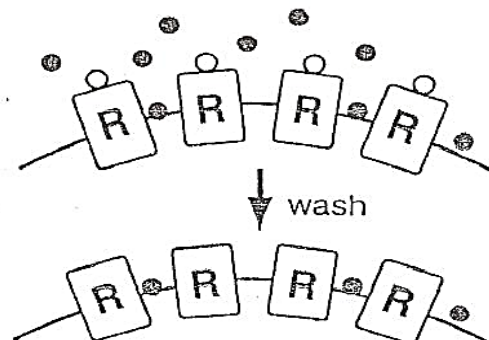
Ligação Total

● = Radioligand



Ligação Não - Específica

O = Protecting Ligand



O não-específico é definido usando-se um excesso de uma substância não-radioativa, que é específica para o subtipo de receptor em estudo.

USO DE ANTI-ADSORVANTES

Tratamento dos filtros para evitar cargas negativas
(fibras de vidro)

LAVAGENS:

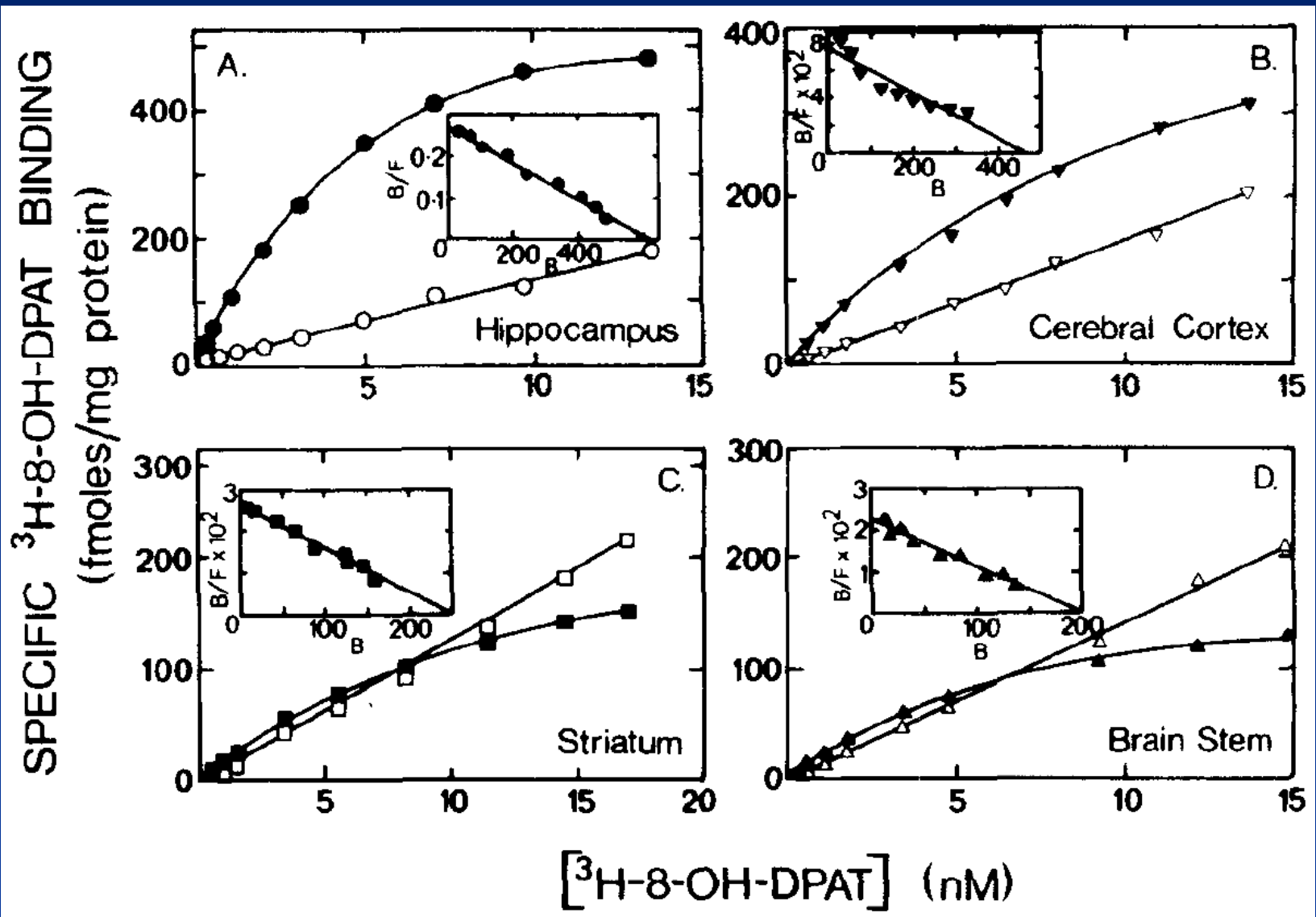
Número, volume, temperatura ?....

EXEMPLO DETALHADO DE PROTOCOLO:

ENSAIO DE RADIOLIGAÇÃO (*BINDING*) A RECEPTORES 5-HT

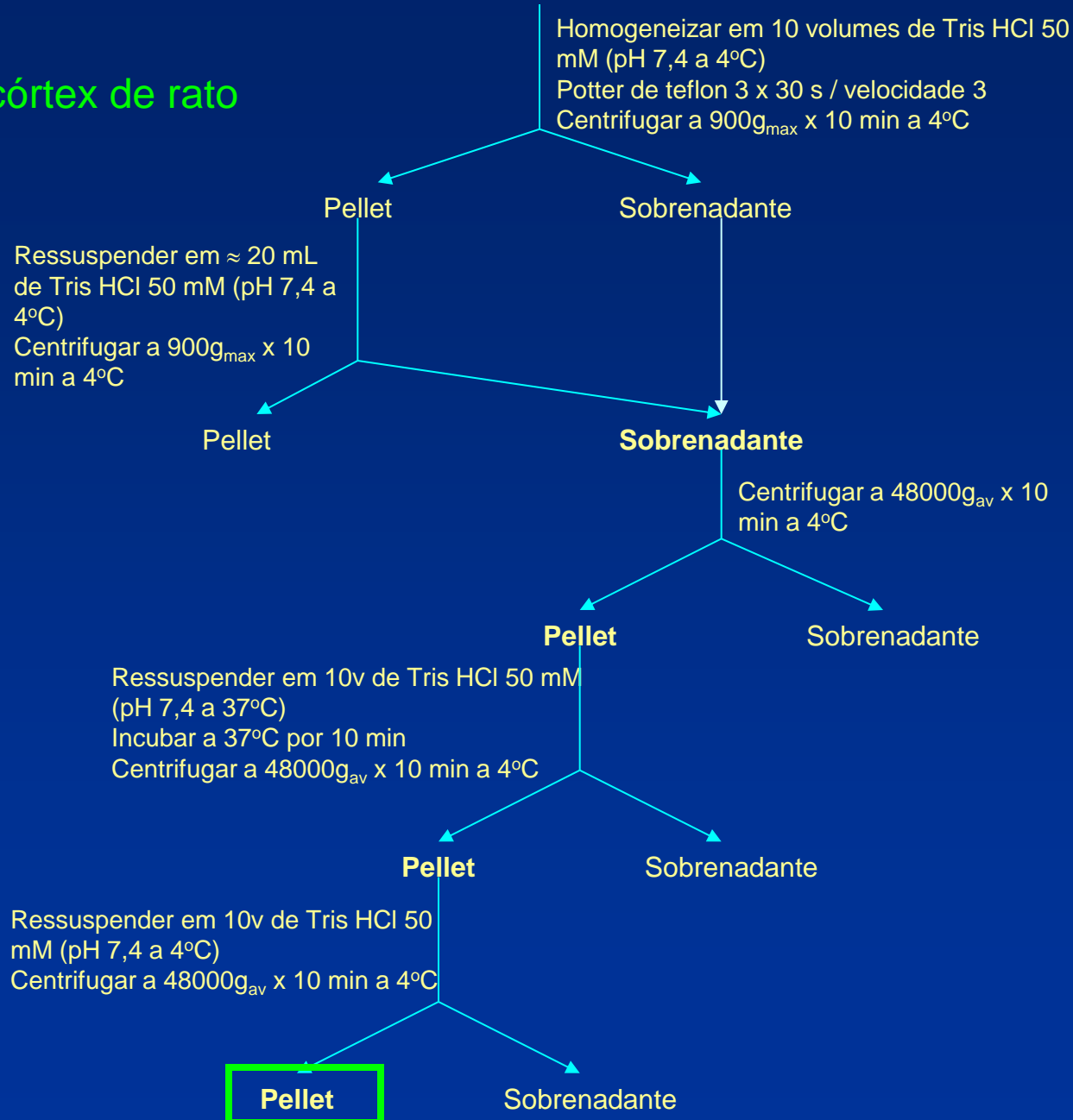
1. Escolha do tecido
2. Preparação membranas
3. Meio e condições de incubação

1. Escolha do tecido: ex. *Rec. 5-HT1A*



2. Preparação membranar: ex. *Rec. 5-HT_{2A}*

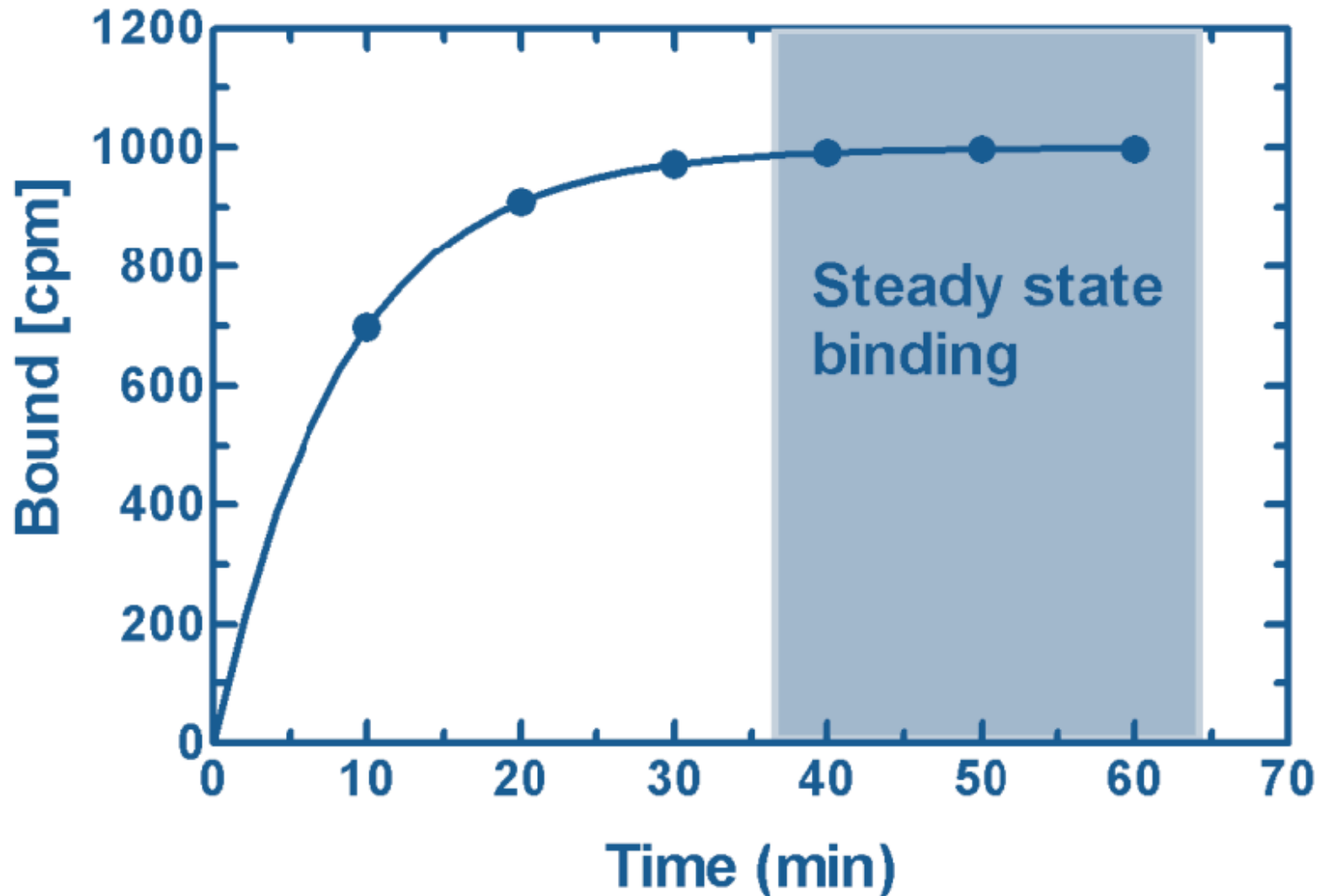
Preparação: córtex de rato



ULTRACENTRIFUGAÇÃO



MEDIDA NO EQUILÍBRIO.....importância da cinética de ligação



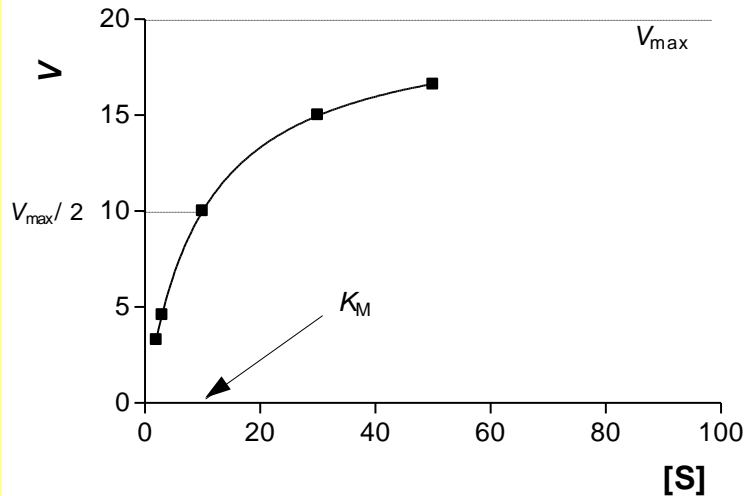
$$[FR] = \frac{[R]_{\text{tot}} \cdot [F]}{K_d + [F]}$$

$$E = \frac{E_{\text{max}} \cdot [F]}{CE_{50} + [F]}$$

- REPRESENTAÇÃO GRÁFICA:
 - curva Concentração-Efeito
 - curva Log Concentração-Efeito
 - gráfico dos inversos
 - gráfico de Scatchard

CINÉTICA ENZIMÁTICA: MICHAELIS-MENTEN

Velocidade vs Concentração



Velocidade vs Log Concentração

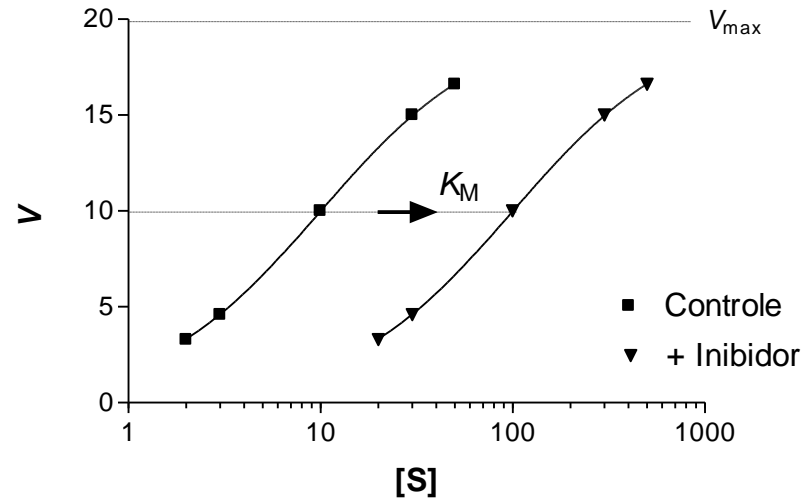


Gráfico de Lineweaver-Burk (dos inversos)

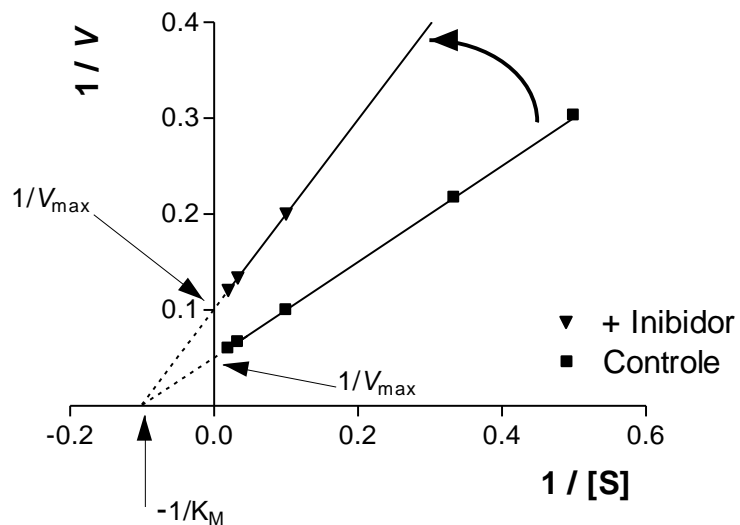
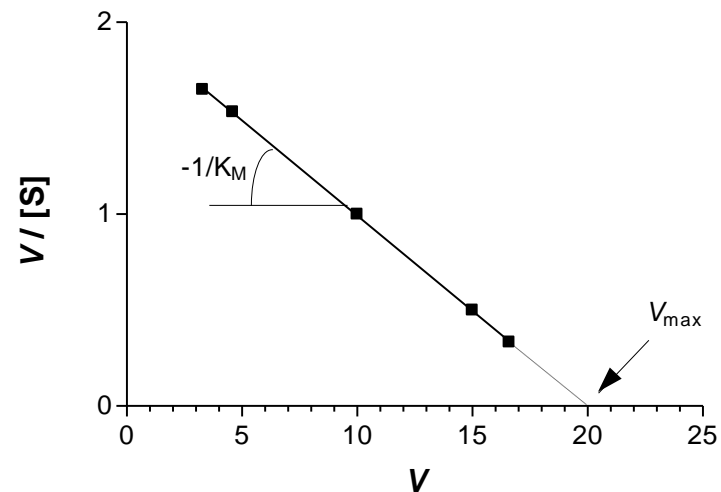
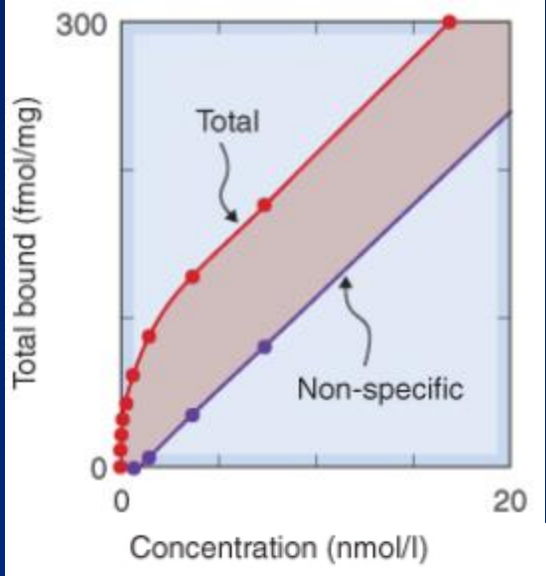
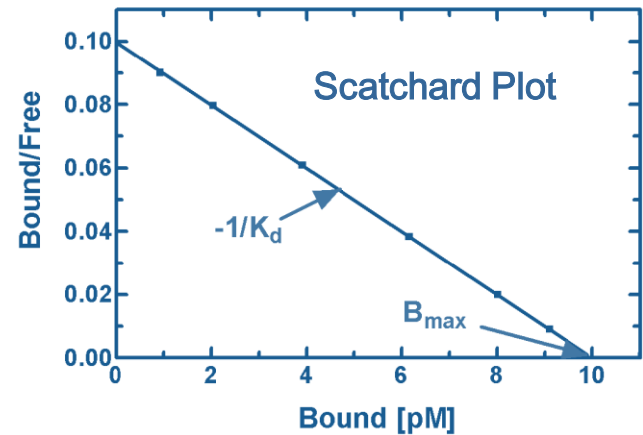
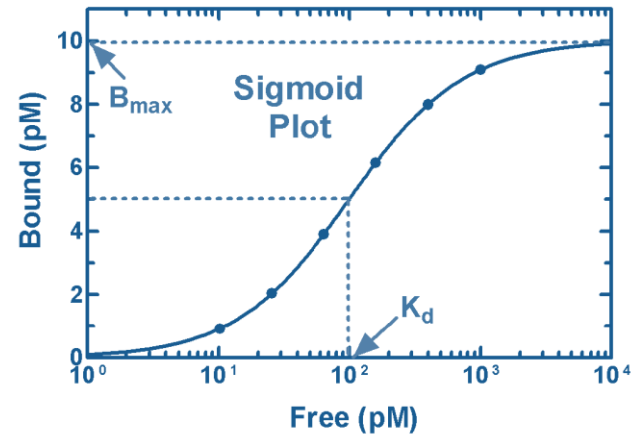
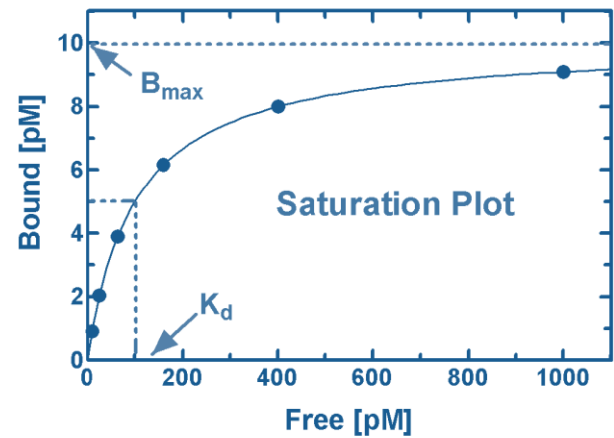


Gráfico de Scatchard

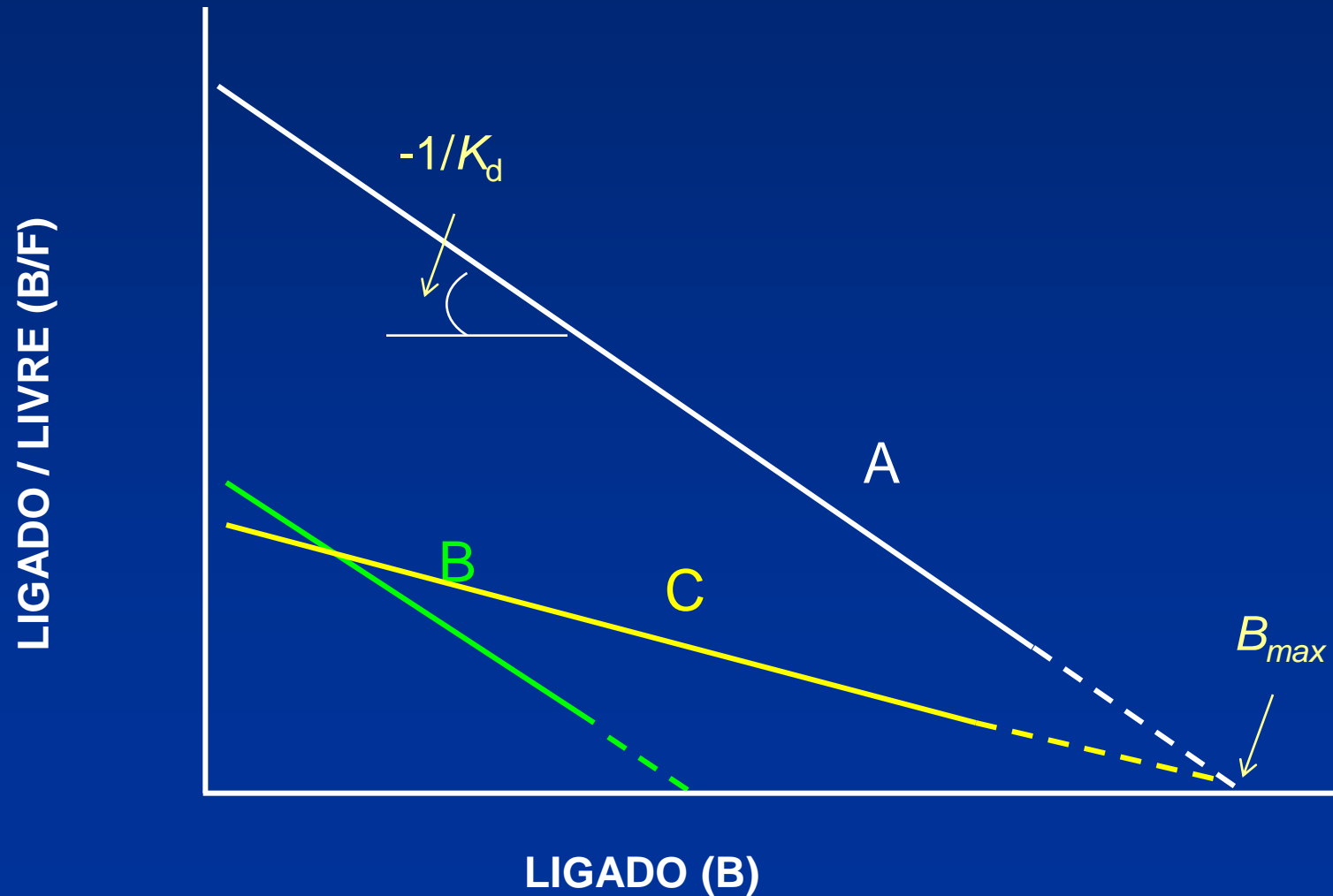




$$T - NS = SP$$



SCATCHARD



BINDING: aplicações

- 1. Medida da alteração do B_{max}
(idade, doença....)
- 2. Detalhe do mecanismo de ação molecular

BINDING E MECANISMO DE AÇÃO MOLECULAR: LIGANTE COMPETITIVO IRREVERSÍVEL

Silva et al., Biochem. Pharmacol., 51: 193-196, 1996

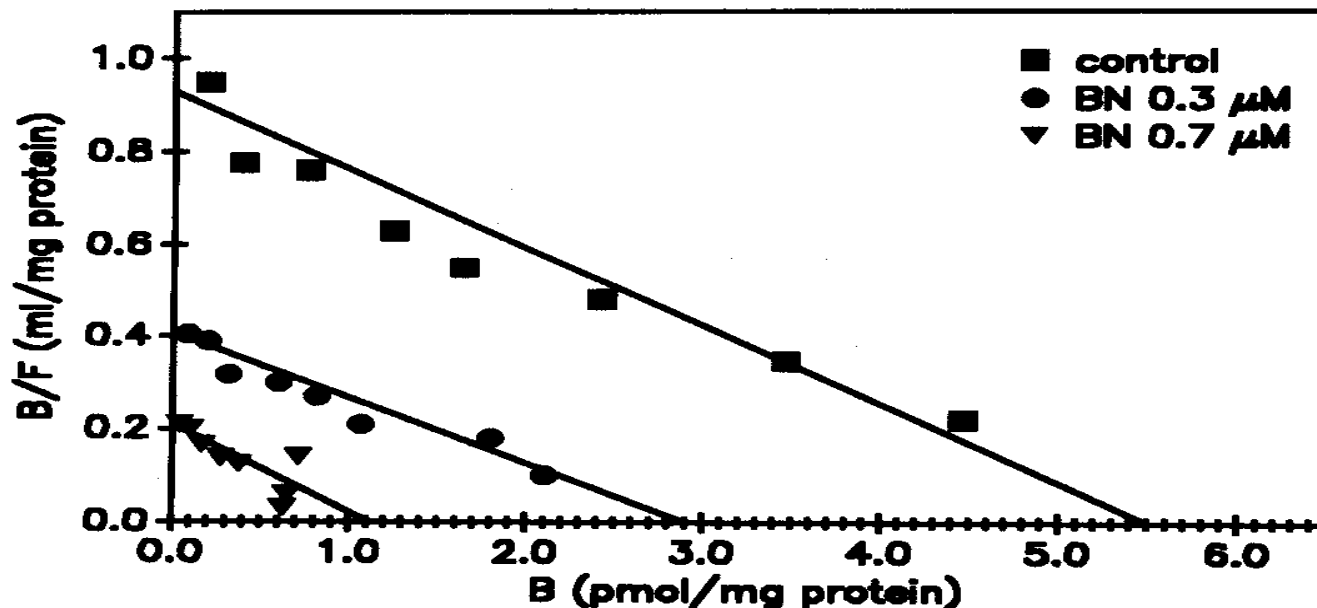


FIG. 1. Scatchard plots for the specific binding of [^3H]PAF to rabbit platelet membranes in the presence of BN 50730. About 60–100 μg protein was incubated at 0° for 2 hr in the absence (■) and presence of 0.3 μM (●) or 0.7 μM (▼) BN 50730. The assay medium contained 10 mM MgCl_2 , 10 mM Tris, 0.025% BSA, 0.2 nM [^3H]PAF, and various concentrations of unlabeled PAF, at pH 7.0. Each point is the mean of triplicate determinations in a typical experiment. The fitted curves were obtained by non-linear regression, using the model of a single class of binding sites (see Materials and Methods).

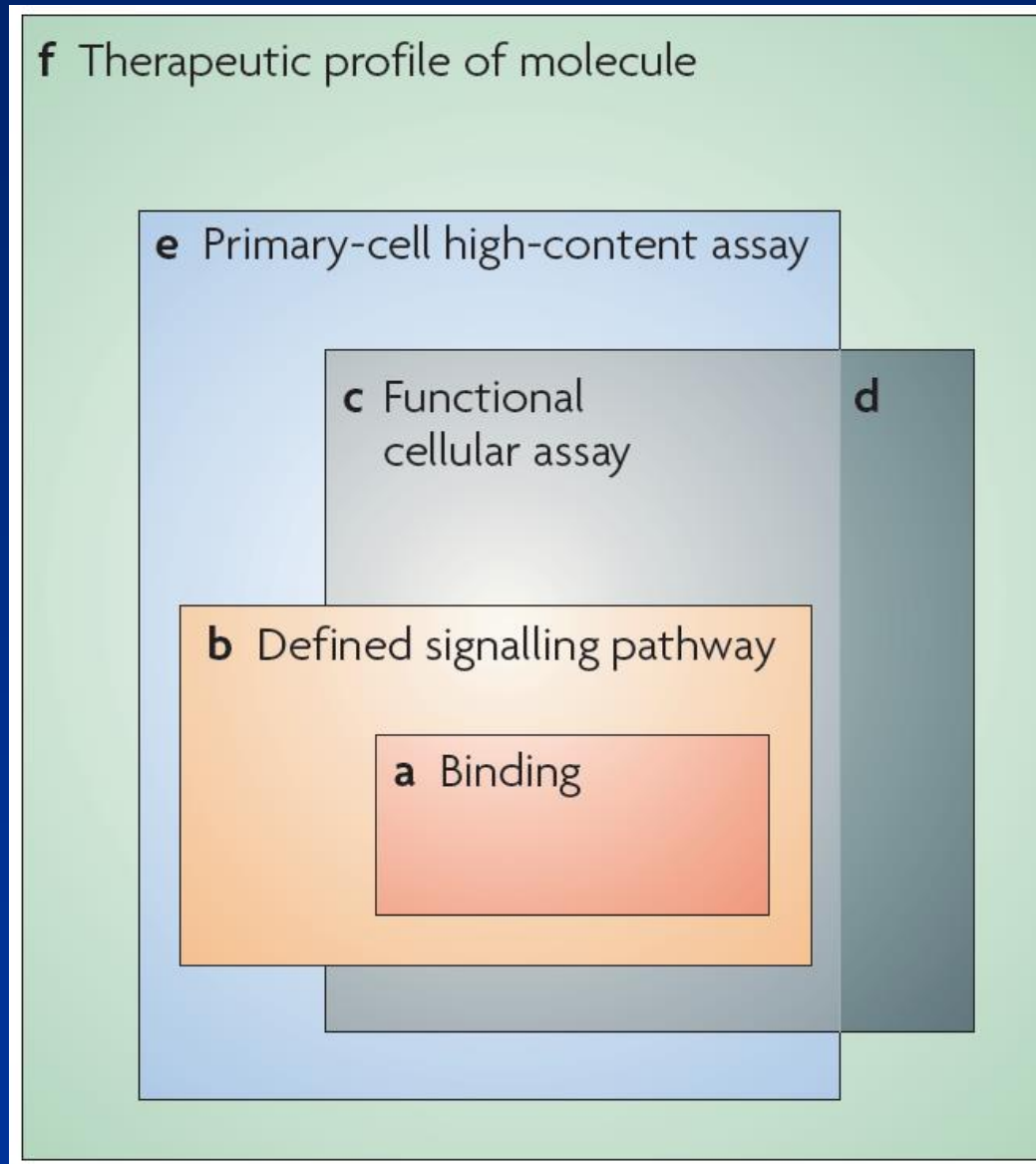
BINDING: aplicações

- 3. Desenvolvimento de novos fármacos

3.1. *Screening (Target-based approach)*

3.2. Lead optimization (REA)

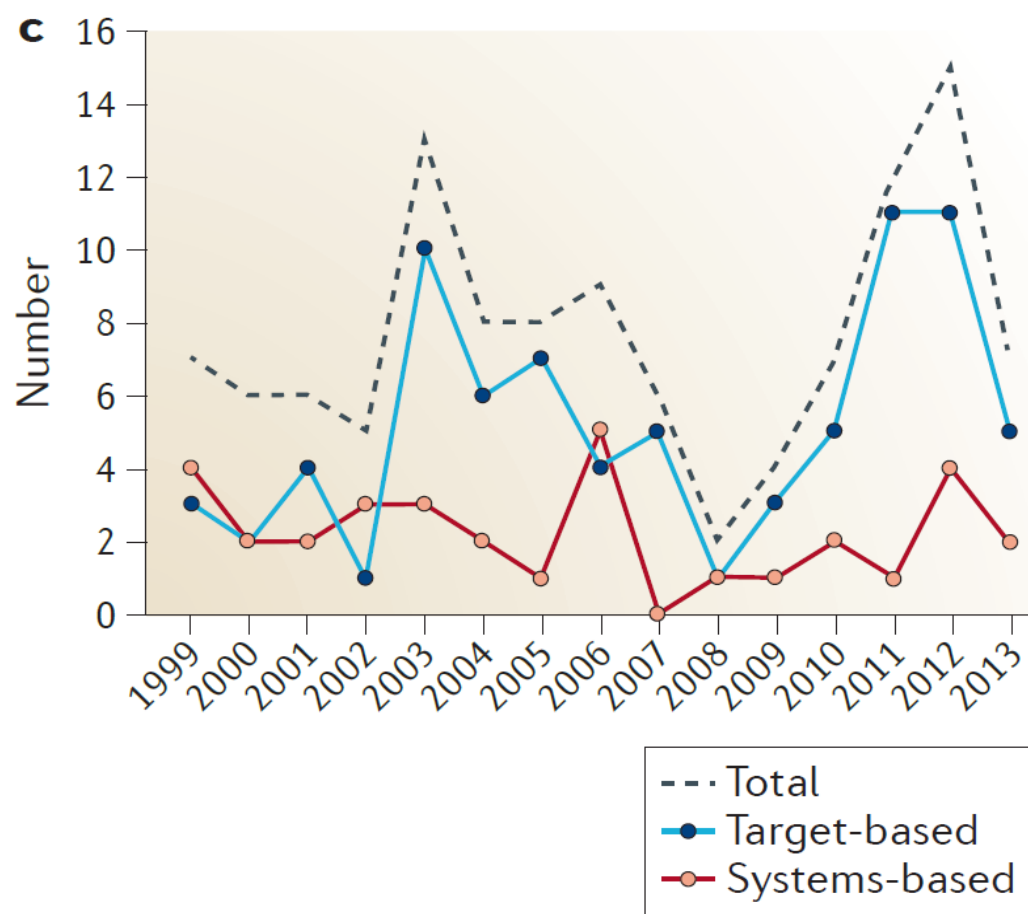
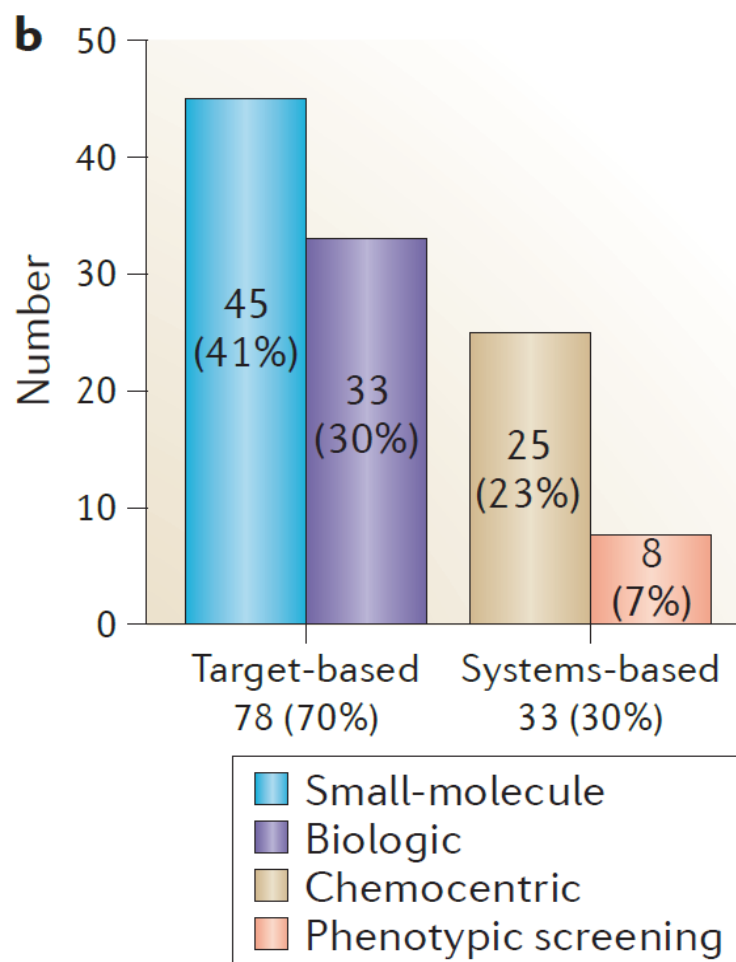
ENSAIOS FARMACOLÓGICOS: CLASSIFICAÇÃO BASEADA NOS NÍVEIS DE RESPOSTA

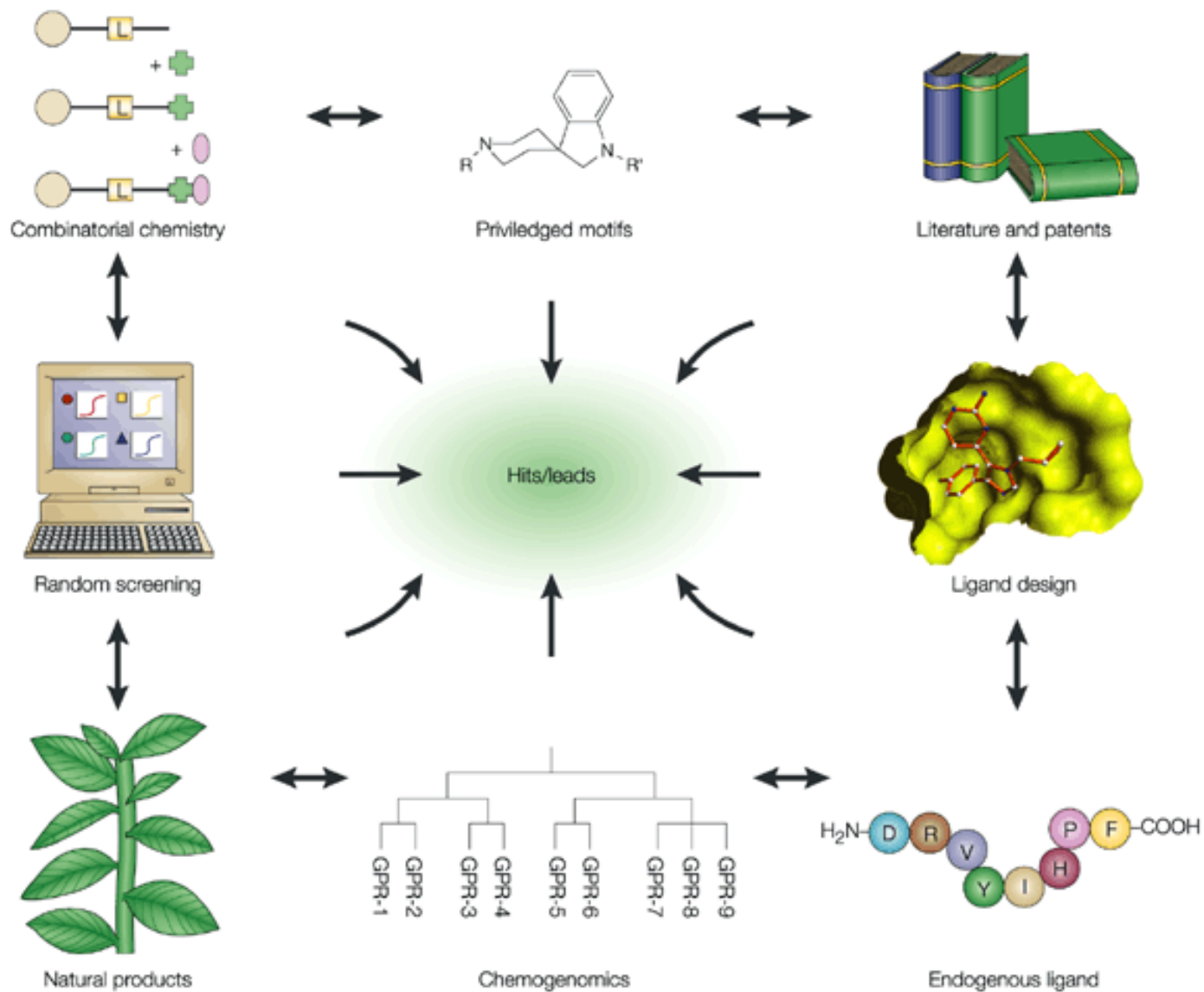


The discovery of first-in-class drugs: origins and evolution

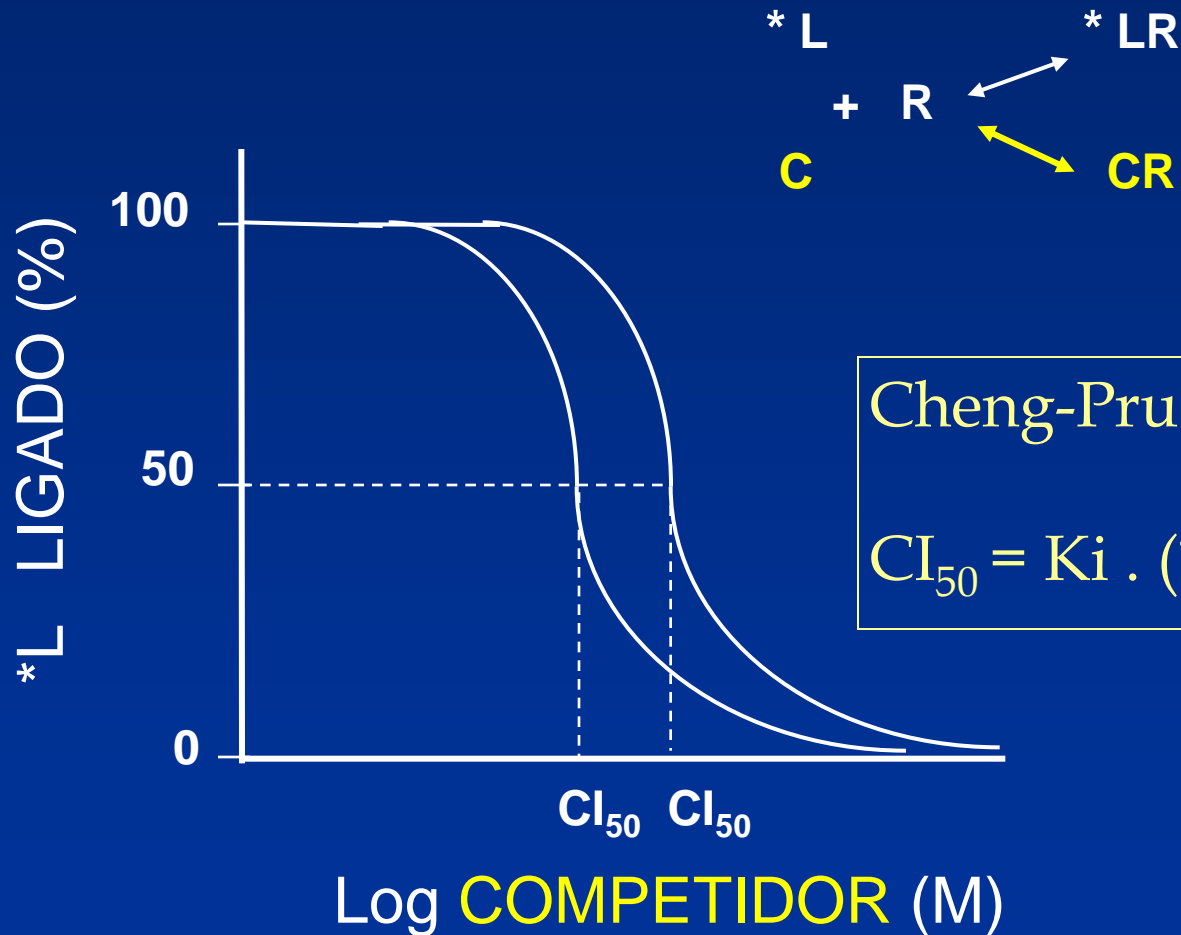
Jörg Eder, Richard Sedrani and Christian Wiesmann

NATURE REVIEWS | DRUG DISCOVERY | VOLUME 13 | AUGUST 2014 | 577



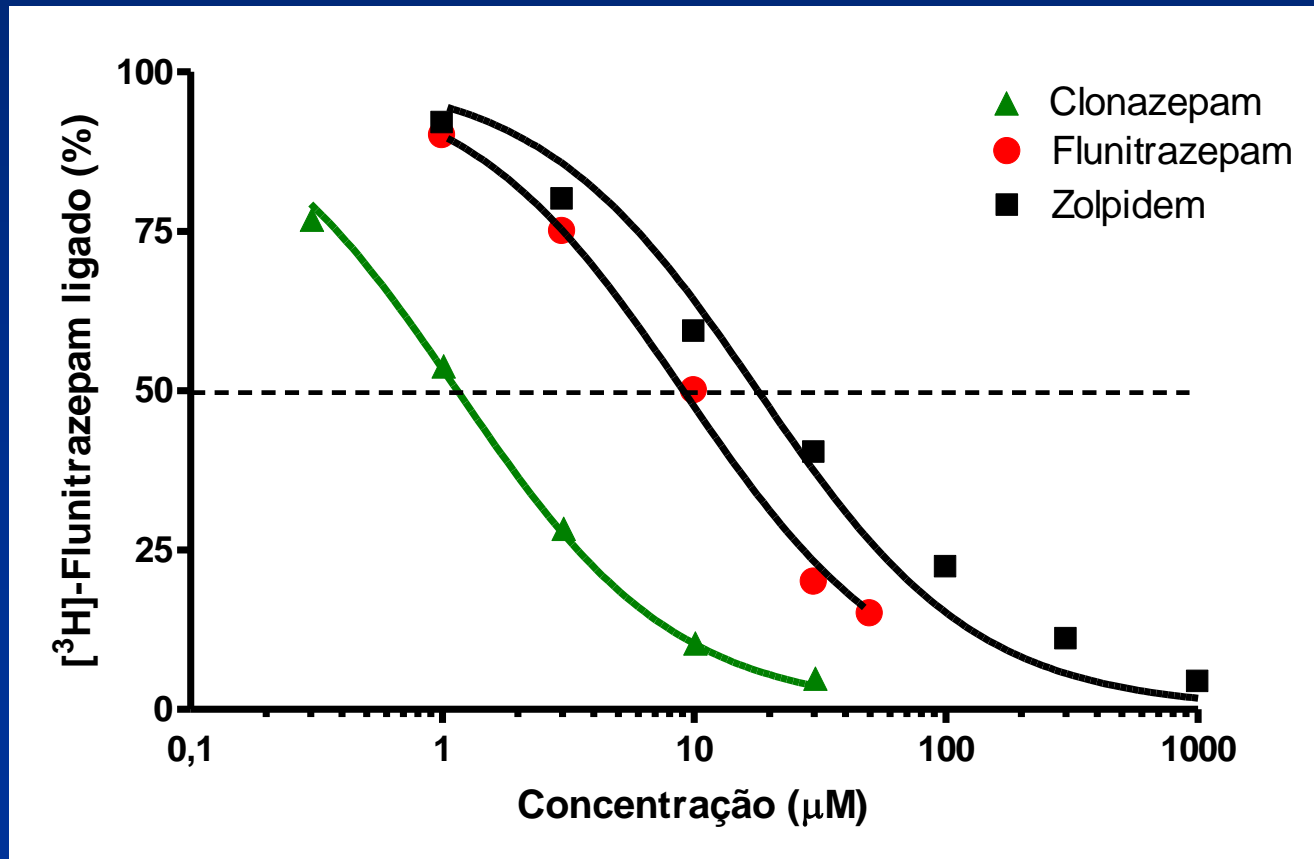


BINDING: ENSAIO DE COMPETIÇÃO



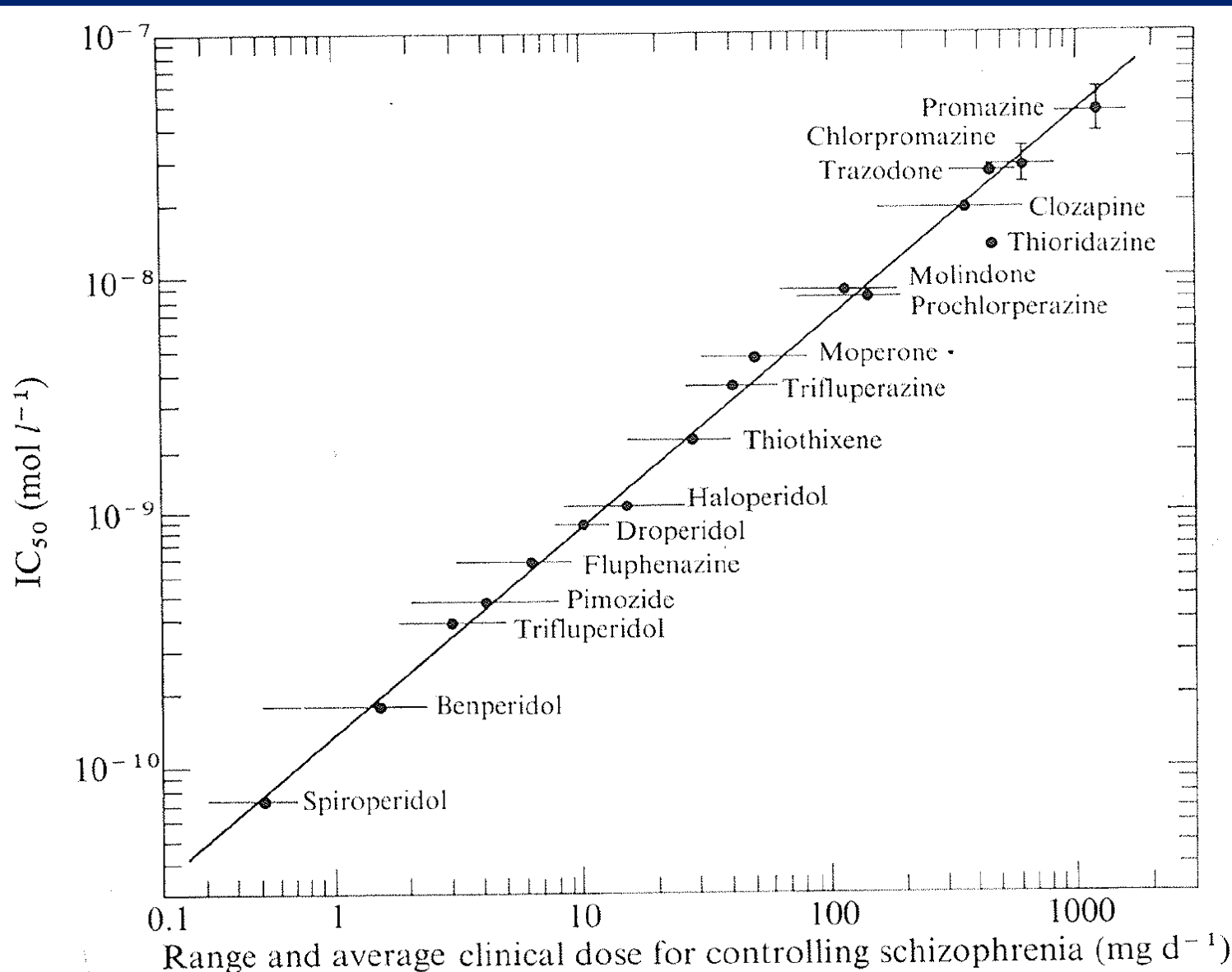
BINDING E CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA

Binding de ^3H -flunitrazepam: curva de competição



BINDING IN VITRO

Antipsicóticos: excelente correlação entre valores de IC_{50} no receptor D2, mas não D1, e doses usadas clinicamente.....



Receptor–ligand binding assays: Technologies and Applications

Lutea A.A. de Jong^{a,*}, Donald R.A. Uges^{a,b}, Jan Piet Franke^c, Rainer Bischoff^a

*“Binding of a ligand to its cognate receptor is the initial and indispensable step in the cascade of reactions that finally cause a pharmacological effect and **many successful and widely used techniques are thus based on measuring ligand binding.**”*

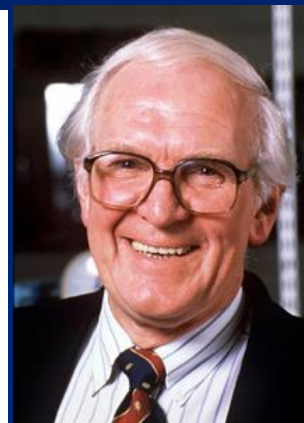
*” which makes the classic radioreceptor assay still the **method of choice in drug screening.** ”*

CONCLUSÃO

SPECIAL LEAD ARTICLE

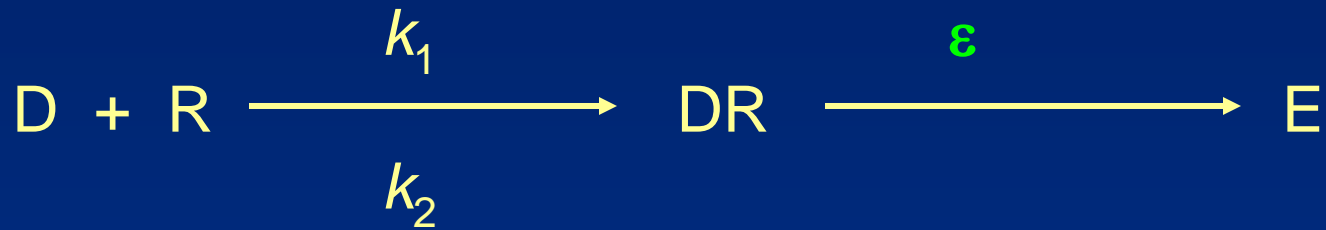
Reflections on drug research

James Black



“Nenhum nível de avaliação é mais informativo do que o outro.

Por isso, acredito fortemente que a farmacologia precisa ser estudado em todos os níveis, sendo que a escolha do nível deve ser ditada pela natureza da questão que é feita”

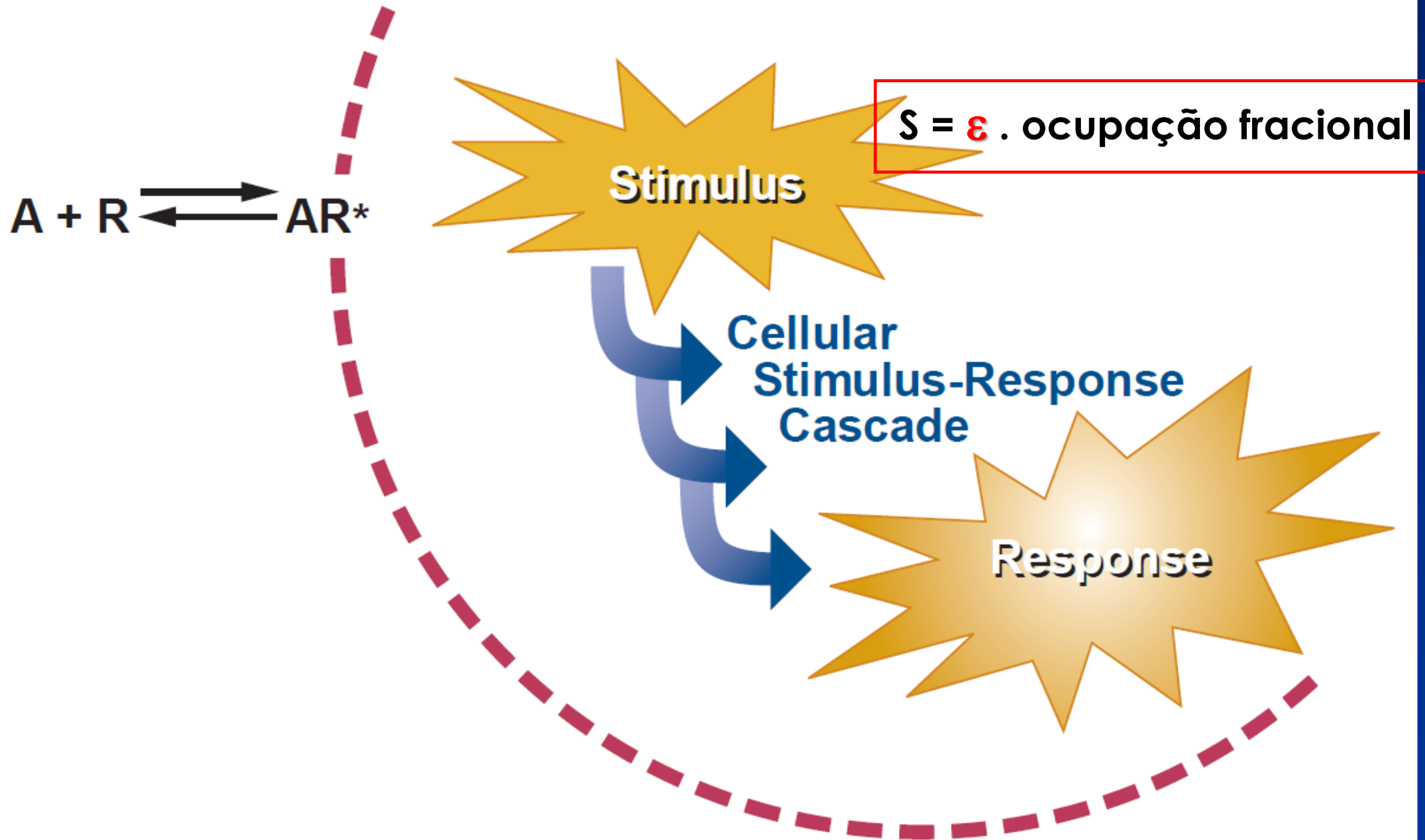


$$E = f \cdot \varepsilon \frac{[R]_{\text{tot}} \cdot [D]}{K_d + [D]}$$

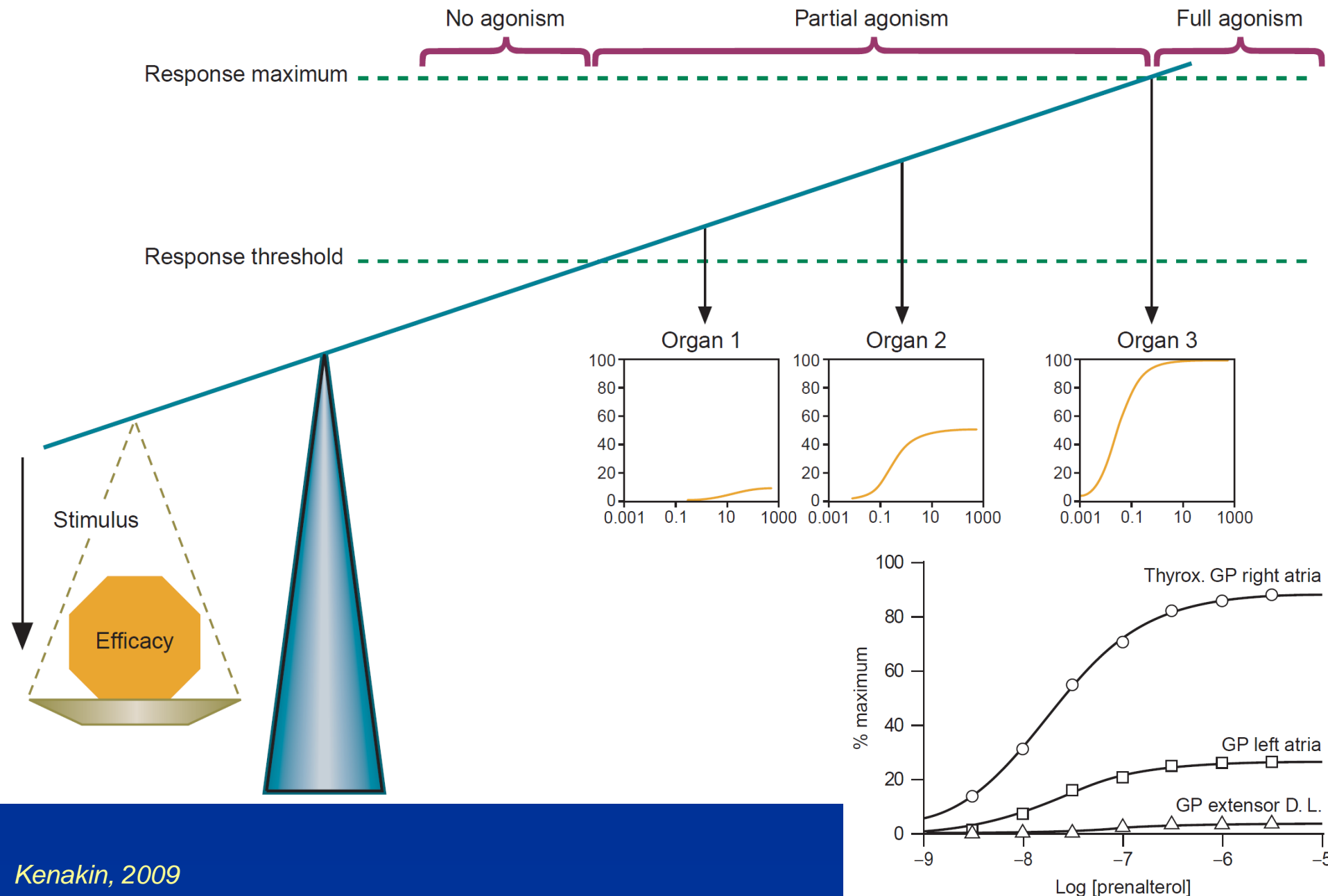
Características do tecido

Características do fármaco

Binding, Estímulo e Efeito



EFICÁCIA INTRÍNSECA – ESTÍMULO - EFEITO



O que é EFICÁCIA ?

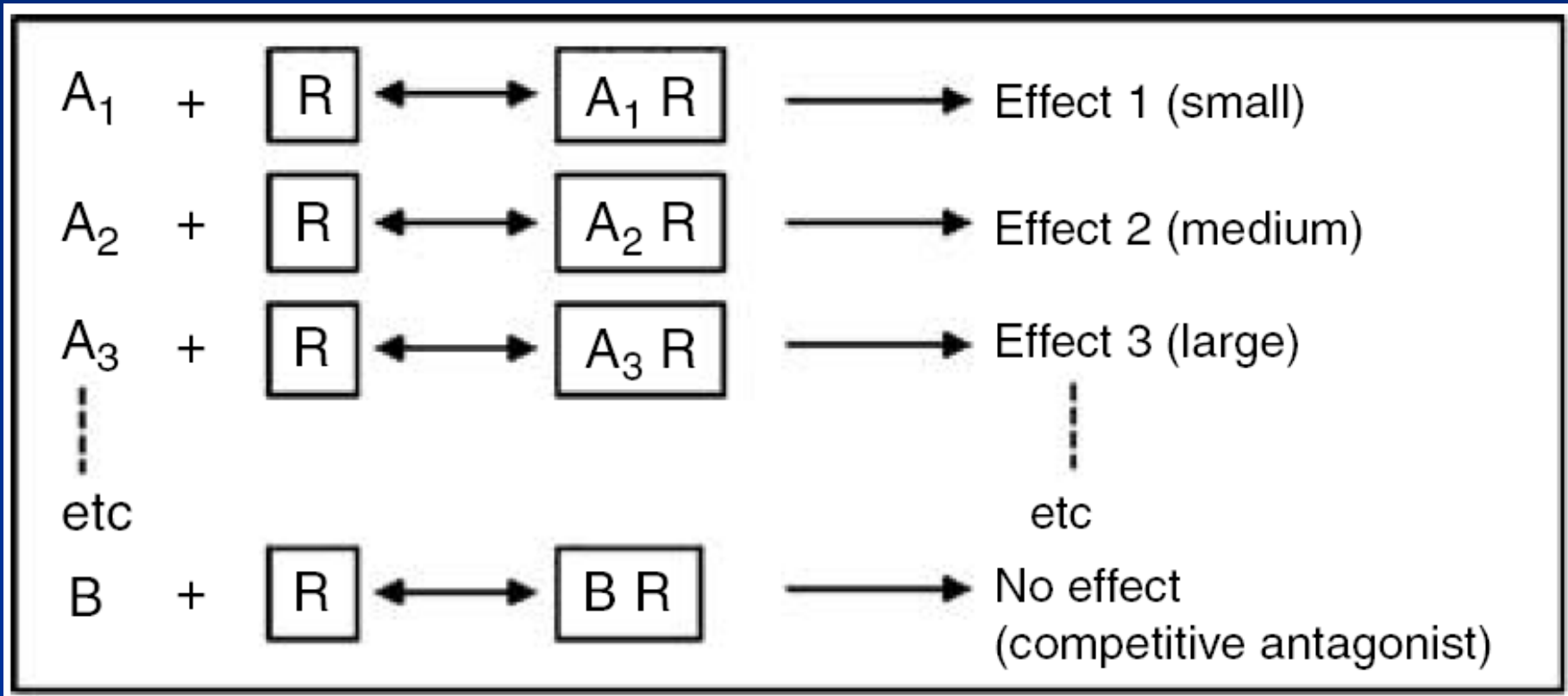
Explicação mecanística ?..... modelos ?

I. ATIVAÇÃO GRADUAL

- Modelo de Luva-mão
- **Ajuste induzido** - *Koshland*



Diferentes agonistas podem induzir diferentes graus de modificação conformacional

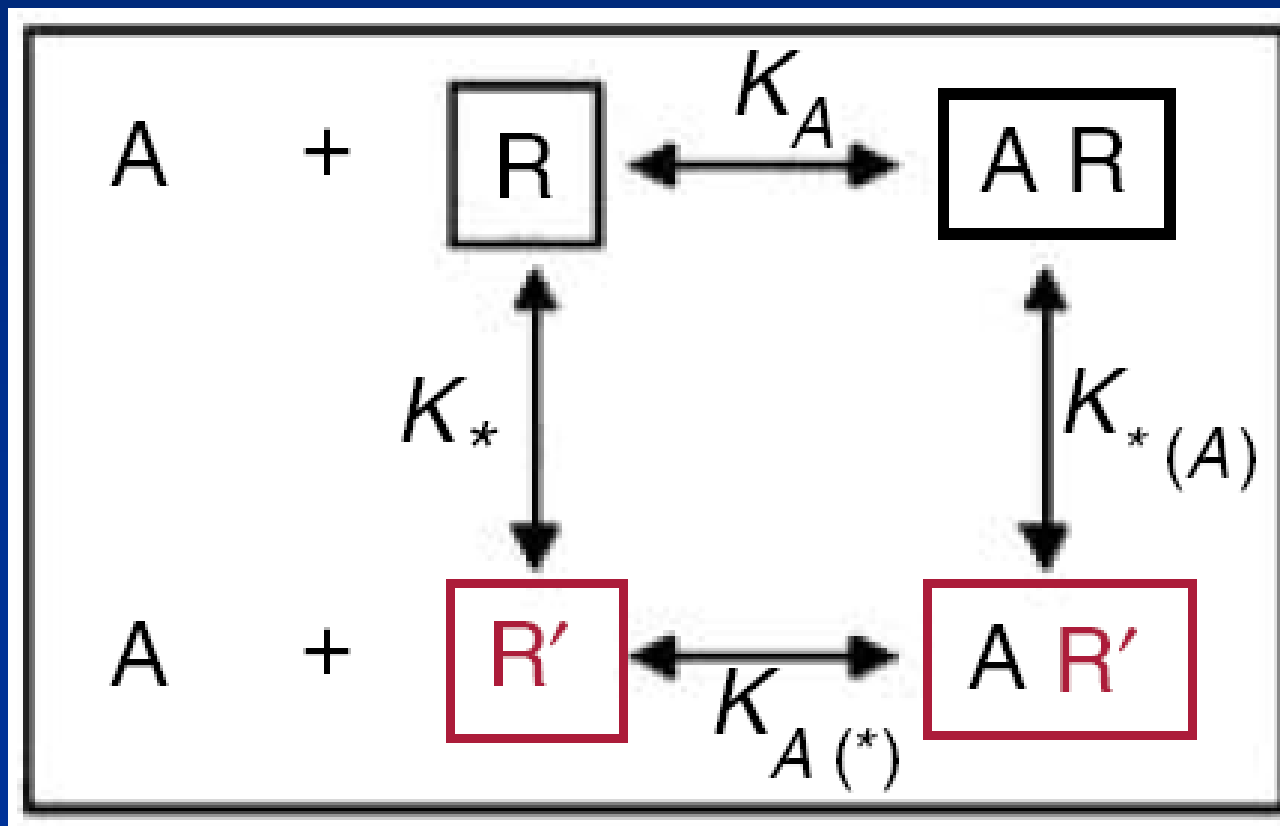


II. MODELO DE DOIS ESTADOS, REVERSÍVEL (Atual)

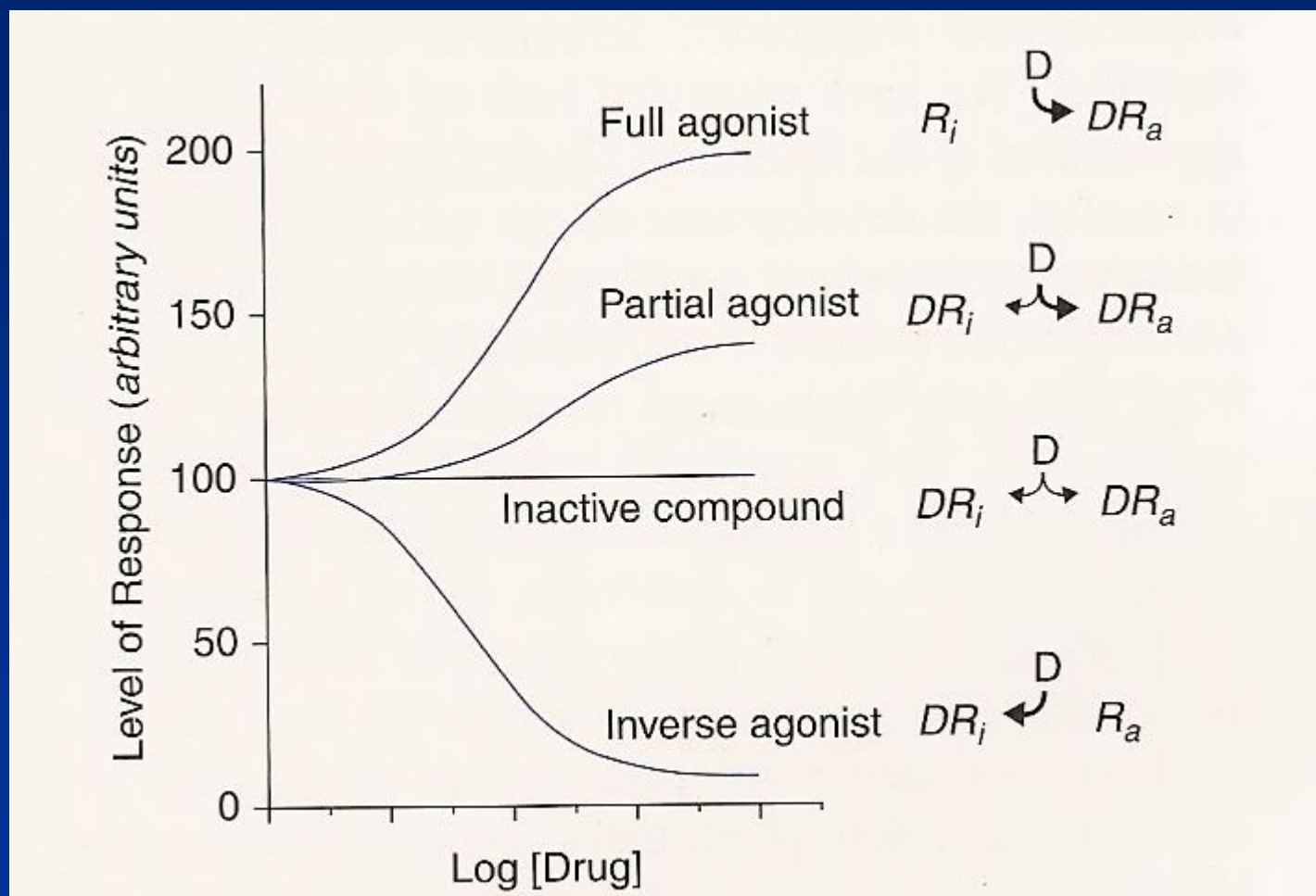
Consequências:

Atividade constitutiva (Costa & Herz, 1989)

Agonistas inversos (Braestrup et al., 1982: DMCM)



SISTEMA ONDE EXISTE ATIVAÇÃO DE RECEPTOR NA AUSÊNCIA DE LIGANTE (= ATIVIDADE CONSTITUTIVA)



BINDING: aplicações

- 4. Binding e Eficácia intrínseca ?.....

exemplo de *binding* “funcional”

II. MODIFICAÇÃO CONFORMACIONAL E EFICÁCIA INTRÍNSECA

2.1. Receptor 5-HT^{1A} (GPCR)

Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 70 (2014) 12–18



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Journal of Pharmacological and Toxicological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpharmtox

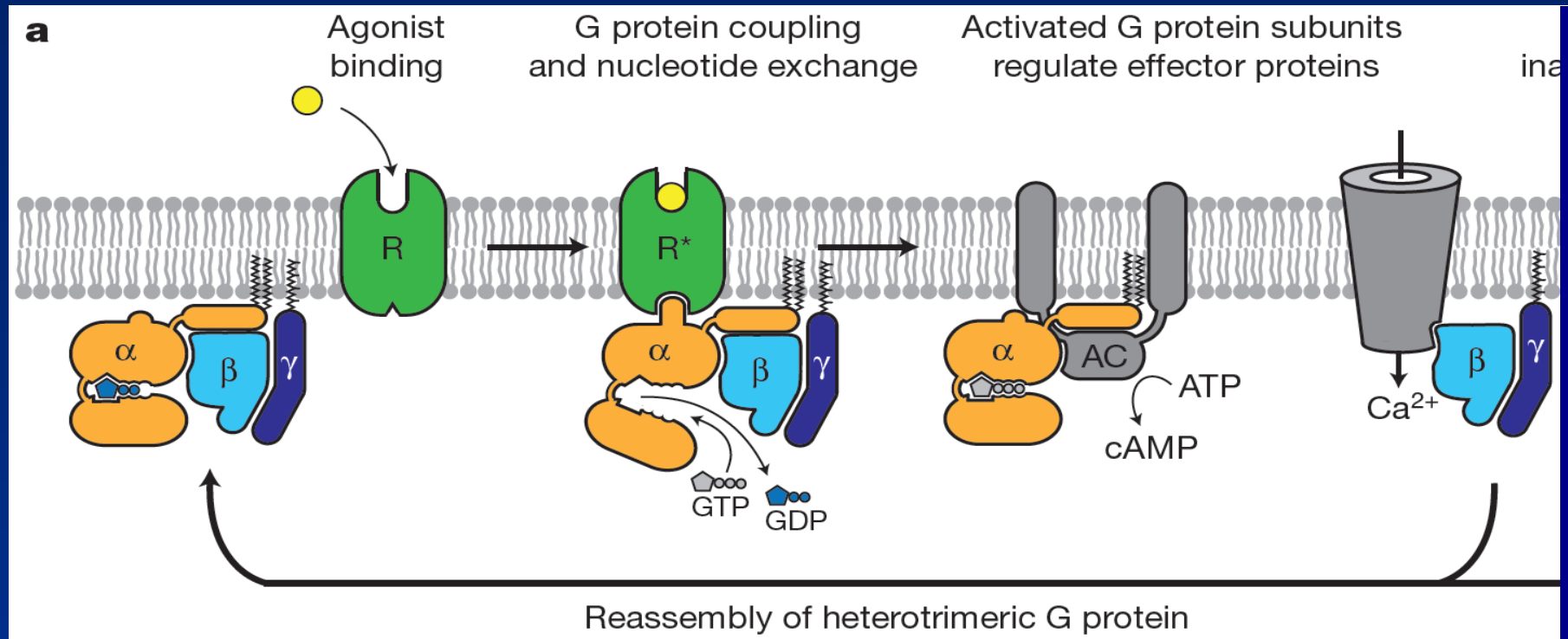
Original article

Functional binding assays for estimation of the intrinsic efficacy of ligands at the 5-HT_{1A} receptor: Application for screening drug candidates

François Noël *, Thais E.T. Pompeu, Bruna C. Moura

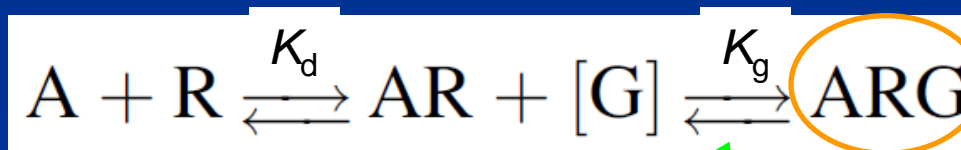
Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil

MODELO TERNÁRIO e papel do GTP



Rasmussen e cols., Nature 2011

O receptor no seu **estado ativado** é o complexo ternário **AR*G**



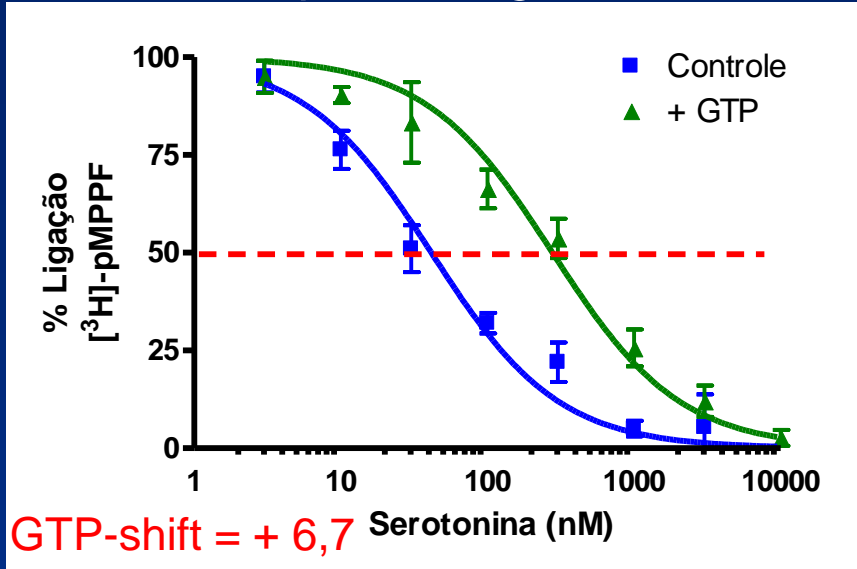
Baixa
afinidade

Alta afinidade

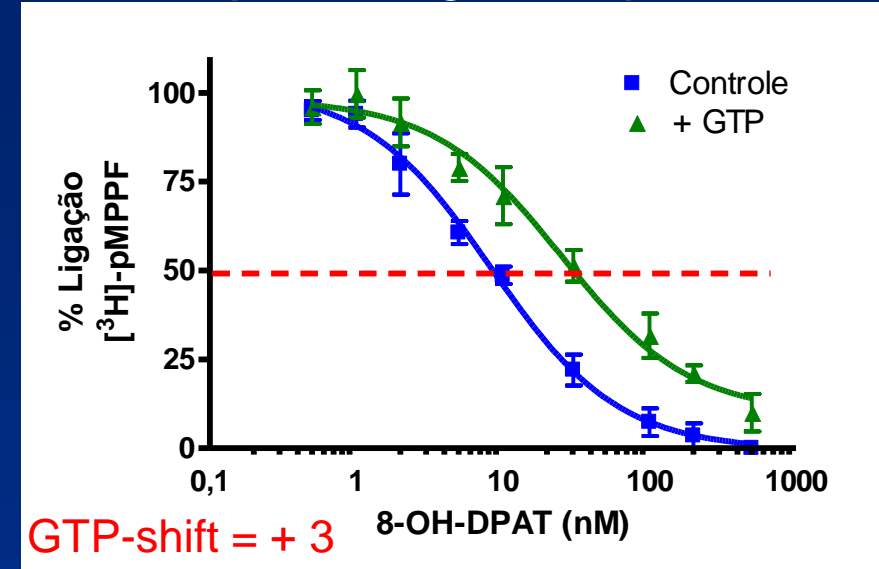
GTP

I. GTP-shift (*radioligante antagonista*)

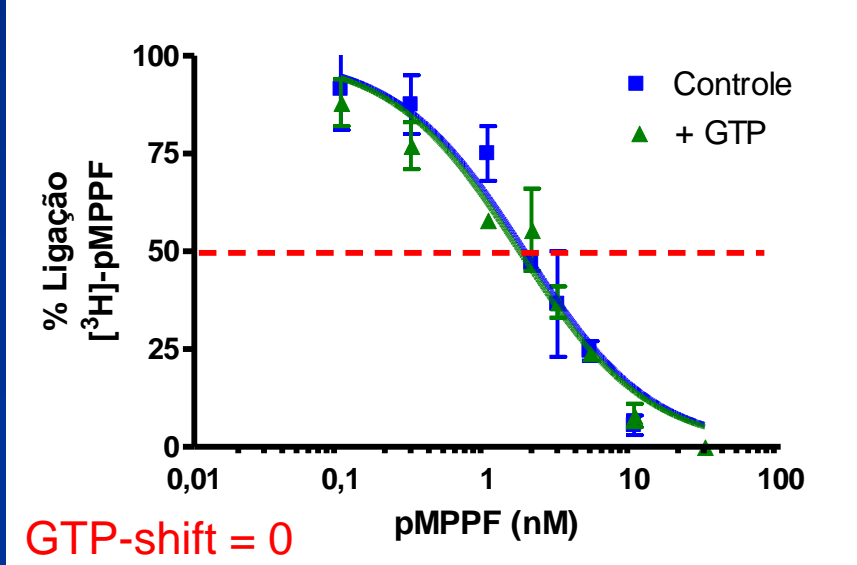
Competidor agonista



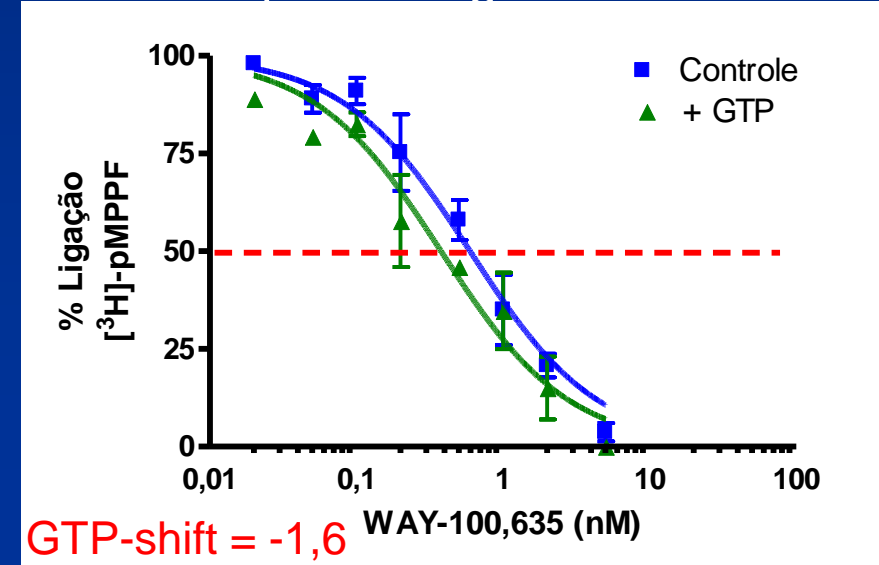
Competidor agonista parcial



Competidor antagonista



Competidor agonista inverso

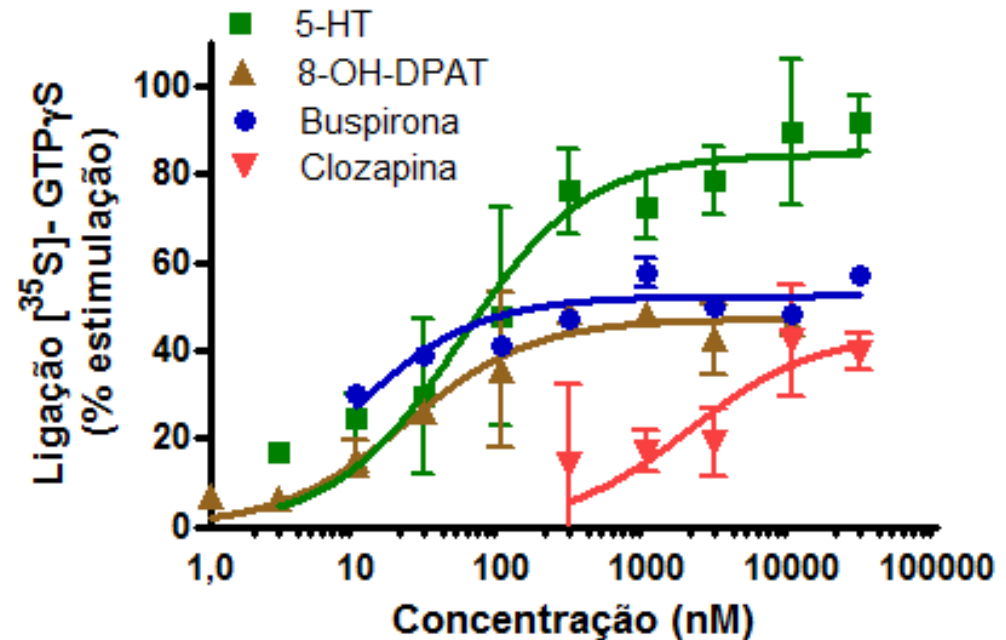
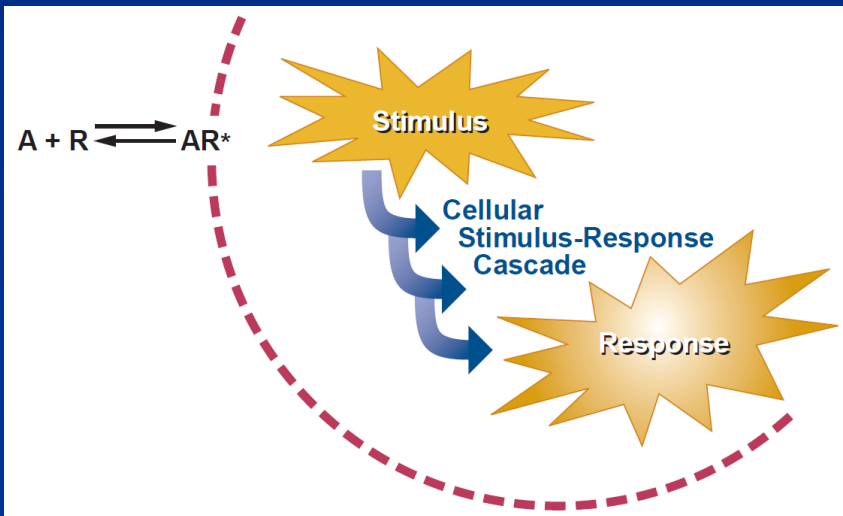
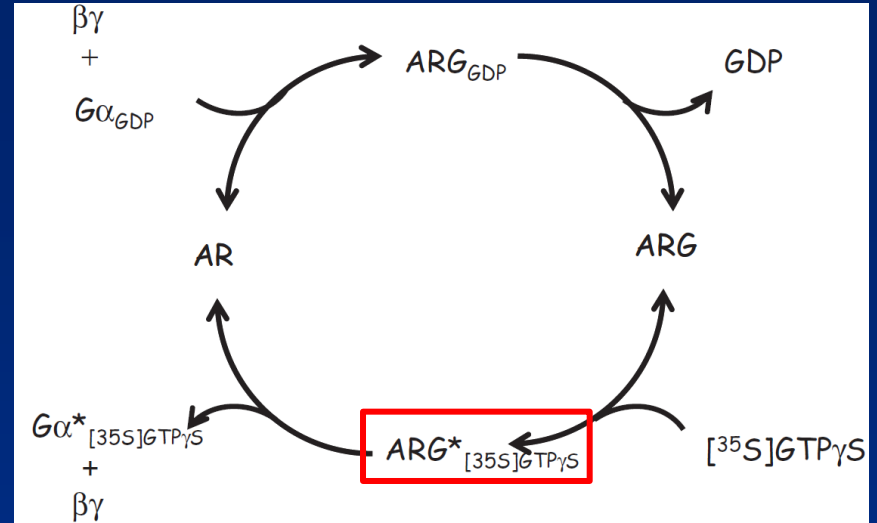


II. Binding de $[^{35}\text{S}]\text{-GTP}\gamma\text{S}$

Use of the $\text{GTP}\gamma\text{S}$
($[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ and Eu- $\text{GTP}\gamma\text{S}$)
binding assay for analysis of
ligand potency and efficacy
at G protein-coupled
receptors

Strange PG

Brit. J. Pharmacol. 161:1238–1249, 2010



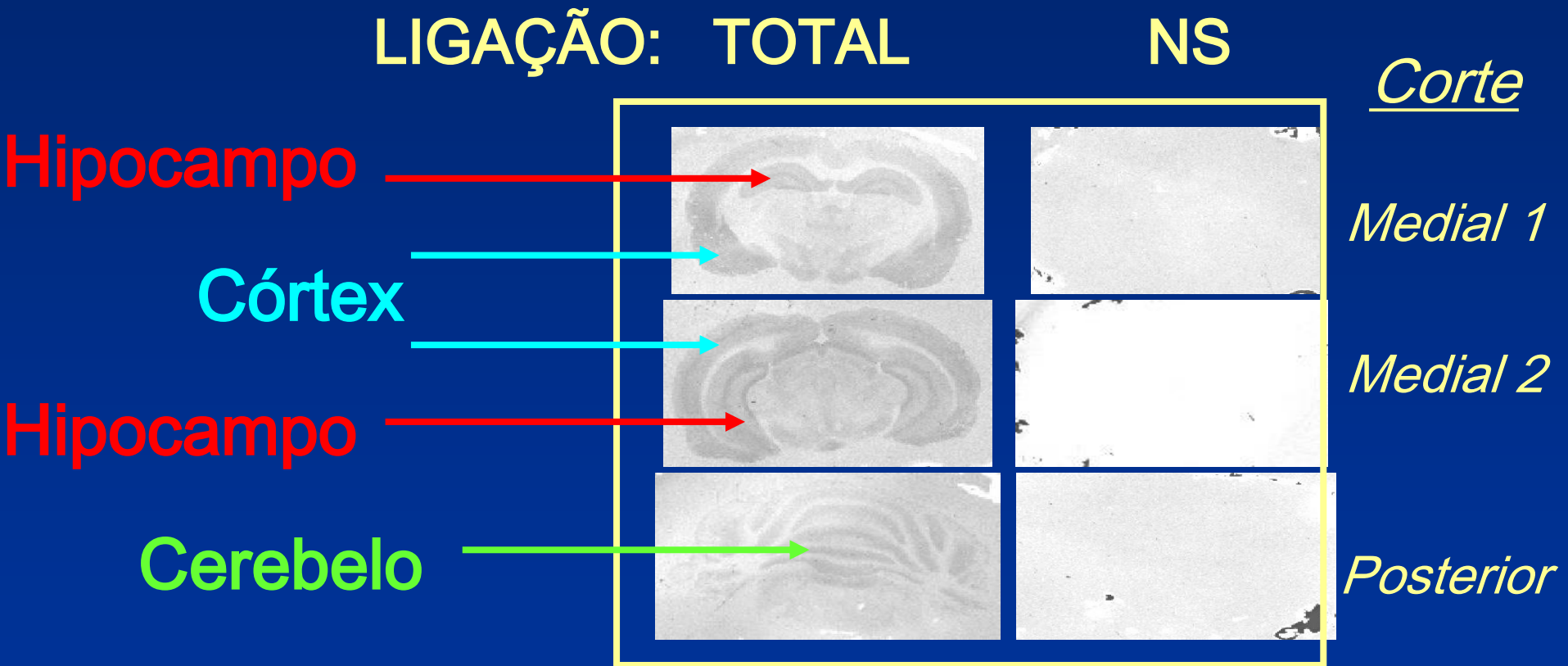
Adaptado de: *Eur. J. Med. Chem.* 66: 122-134, 2013

BINDING: aplicações

- **5. Binding e localização tecidual**

AUTORADIOGRAFIA EM CORTES DE CÉREBRO DE RATO

Ligante: ^3H -Flunitrazepam



BINDING: aplicações

- 6. Identificação de novos sítios de ligação

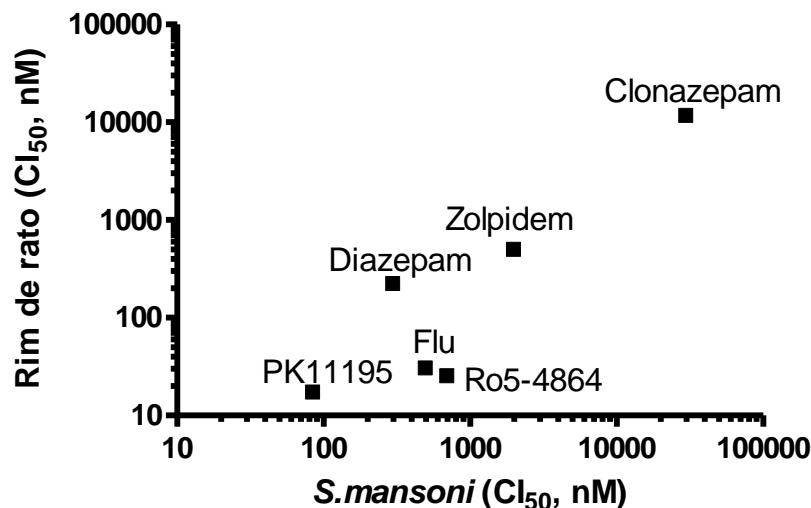
CARACTERIZAÇÃO DOS RECEPTORES BENZODIAZEPÍNICOS NO *S. MANSONI*

Duas populações de receptores benzodiazepínicos no *S. mansoni*:

- Uma pequena população de receptores marcados com alta afinidade pelo [³H]-PK111-95 e farmacologia semelhante aos receptores BZP periféricos de rato.

Sítios de ligação do [³H]PK11195 no *S. mansoni*:
comparação com sítios de ligação no rim de rato
(rec. BZPp)

(Correlação - Teste de Pearson: $r = 0.99$; $p < 0.0001$)



Sítios de ligação do [³H]PK11195 no *S. mansoni*:
comparação com sítios de ligação do [³H]Flunitrazepam no
cérebro de rato - (rec. BZPcentral)

(Correlação - Teste de Pearson: $r = -0.32$; $p = 0.54$)

