

Dégradation Ciblée de Protéines

Les PROTAC® et les colles moléculaires utilisent le Système Ubiquitine Protéasome (SUP) pour dégrader leurs protéines cibles. Notre département de biologie offre une éventail d'essais pour développer et caractériser cette nouvelle classe d'agents thérapeutiques. Nous avons déjà supporté plus de 16 projets de développement de médicaments axés sur la dégradation des protéines en fournissant une expertise flexible et un grand savoir-faire. En plus, l'équipe de chimistes à Paraza Pharma peut concevoir et synthétiser des molécules PROTAC® et colles moléculaires, tandis que notre équipe de DMPK peut profiler leurs propriétés physicochimiques/ADME/PK.

Liaison binaire à PI ou E3 ligase

- SPR
- Polarisation de Fluorescence
- TR-FRET
- NanoBRET
- MST
- DSF

Comprendre le MOA

- Cinétique de Dégradation
- Dépendance au Protéasome
- Essais de Compétition
- Essais d'Ubiquitination

Formation de complexe tertiaire

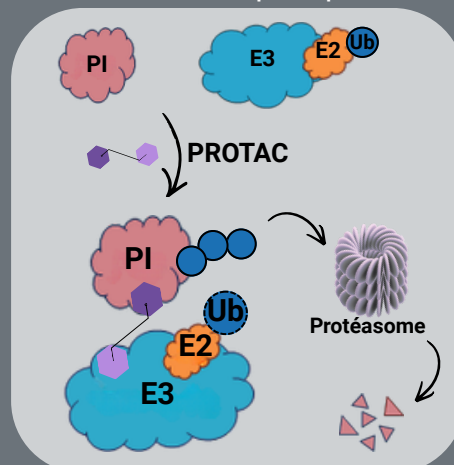
- Polarisation de Fluorescence
- TR-FRET
- NanoBRET®/NanoBiT
- Études de Coopérativité
- Co-immunoprécipitation

Dégradation protéique

- Western Blot
- Protein Simple JESS™
- Système HiBiT
- AlphaLISA™
- MSD

Essais cellulaires fonctionnels

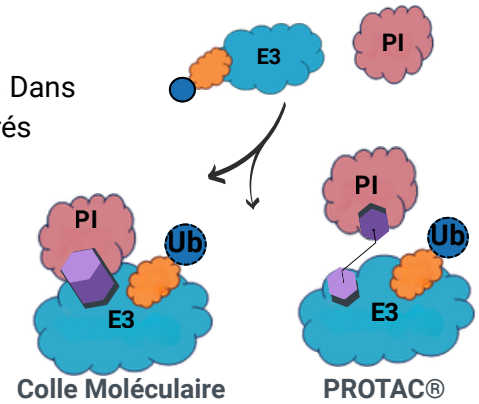
- Marqueurs en aval
- Cytotoxicité/Apoptose
- Voies de Signalisation
- Cycle Cellulaire
- Expression Génique
- Migration/Invasion



Essais de formation de complexes tertiaires

La formation de complexes tertiaires médiée par PROTAC® / colle moléculaire peut être étudiée par des essais basés sur la proximité. Dans des essais tels que TR-FRET et NanoBRET®, les composés sont titrés contre l'E3 ubiquitine ligase et la protéine d'intérêt (PI). Un signal fluorescent est généré suivant l'interaction entre les deux protéines marquées.

Il est connu qu'en absence de liaison coopérative, un PROTAC® peut indépendamment saturer la PI et la E3 ligase à forte concentrations, menant au classique « effet crochet », ce qui n'est pas le cas avec les colles moléculaires.



Essais biochimiques TR-FRET pour cribler des composés

Nous avons utilisé le TR-FRET pour découvrir des colles moléculaires capables d'augmenter l'interaction entre une protéine mutée causant une maladie et sa E3 ligase naturelle, afin de déclencher sa dégradation. Plus de 10 000 composés ont été criblés. Les composés qui induisirent une liaison supérieure ont été choisis pour des étapes de validation subséquentes.

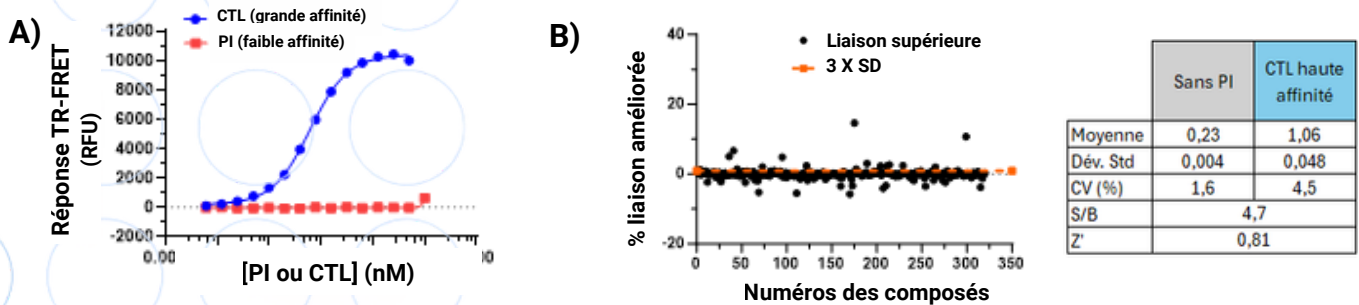


Fig 1. Essai TR-FRET pour cribler des colles moléculaires. A) Essai TR-FRET pour mesurer la formation de complexes avec une protéine contrôle (CTL, en bleu) ou avec la protéine mutante (cible, en rouge). B) Criblage de composés en plaque 384 puits à 10 μ M, dans 10 μ L, avec 10 nM de E3 ligase et 20 nM de la protéine d'intérêt (PI). Les statistiques de la plaque indiquent une excellente performance de l'essai.

Formats de dose-réponses pour étudier la relation structure-activité (SAR)

Les « Hits » identifiés durant le criblage sont optimisés pour améliorer leur efficacité. Deux formats d'essais ont été utilisés pour étudier la SAR : dans un premier temps, les composés ont été titrés contre une concentration fixe de protéine cible et de E3 ligase pour déterminer l'EC₅₀. Ensuite, la PI, ou le contrôle positif, ont été titrés contre des concentrations fixes de composés pour estimer leur affinité.

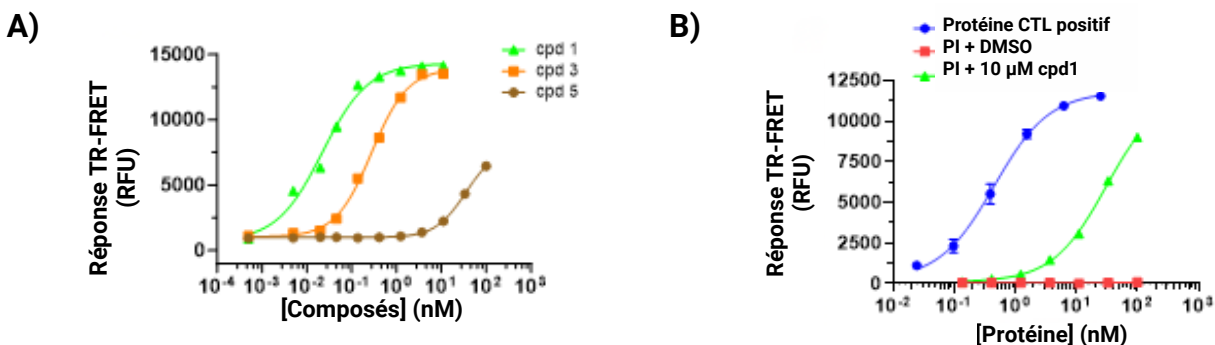


Fig 2. Essais de profilage de colles moléculaires. A) Les composés actifs ont été testés par TR-FRET avec 0,3 μ M de E3 ligase et 20 nM de la PI. B) La liaison supérieure avec le Composé 1 a été confirmée par titration de la PI de faible affinité par TR-FRET.

Quantification de la dégradation d'une protéine cible

La dégradation de protéines induite par PROTAC®, ou par colle moléculaire, peut être évaluée par de multiples méthodes, incluant le traditionnel Western Blot, le JESS™ (Protein Simple), et le MSD. Les essais en plaques tels que l'AlphaLISA™ et HiBiT offrent un meilleur débit, parfait pour supporter le SAR et des études de mécanismes complexes. Chez Paraza, nous avons l'expérience pour optimiser tous ces essais pour suivre la dégradation protéique dans divers types cellulaires.

Essais de luminescence HiBiT pour mesurer les niveaux de PI

Le HiBiT est une petite étiquette peptidique qui produit un signal bioluminescent lorsque liée à son partenaire de complément, LgBiT, pour recréer NanoLuc®. Le système HiBiT peut être utilisé pour suivre les niveaux d'expression endogène et mesurer les effets du PROTAC®/colle moléculaire sur la dégradation de la PI dans les modèles cellulaires. Avec une optimisation minutieuse des conditions, les courbes de dose-réponses peuvent éviter la région de l'effet crochet.

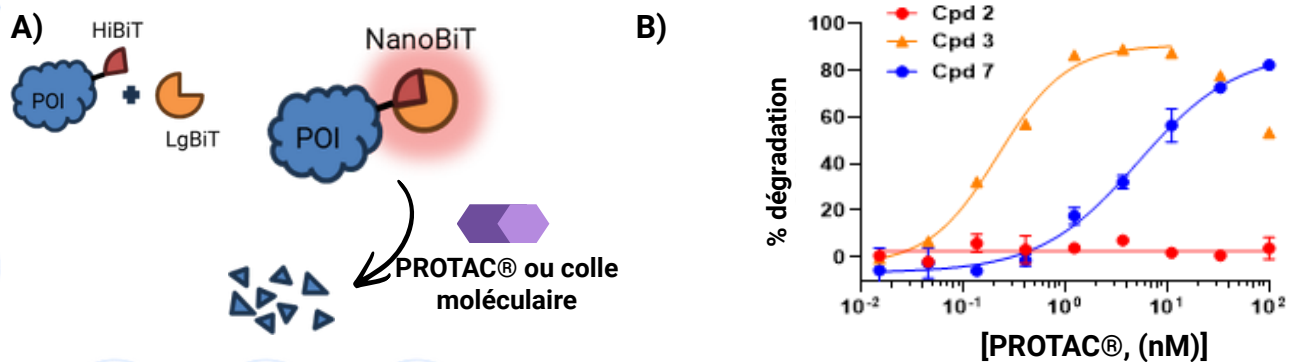


Fig 3. Essai HiBiT pour tester un PROTAC®. A) Principe du système HiBiT. B) Un essai en plaque 384-puits a été implémenté dans une lignée cellulaire exprimant une PI étiquetée avec HiBiT. Des traitements avec les composés 3 et 7 mènent à la dégradation de la PI. Pour le PROTAC® le plus efficace (Cpd 3), l'effet crochet est observé à haute concentration.

Lignées cellulaires HiBiT ciblant des effecteurs en aval

Deux systèmes HiBiT ont été utilisés pour investiguer l'efficacité d'un PROTAC® sur les formes active et inactive d'un facteur de transcription, d'abord en suivant sa dégradation, et ensuite en évaluant les niveaux d'expression d'une de ses cibles. Le PROTAC® a dégradé la forme active du facteur de transcription, menant à une diminution dose-dépendante de l'expression d'un gène inducible en aval.

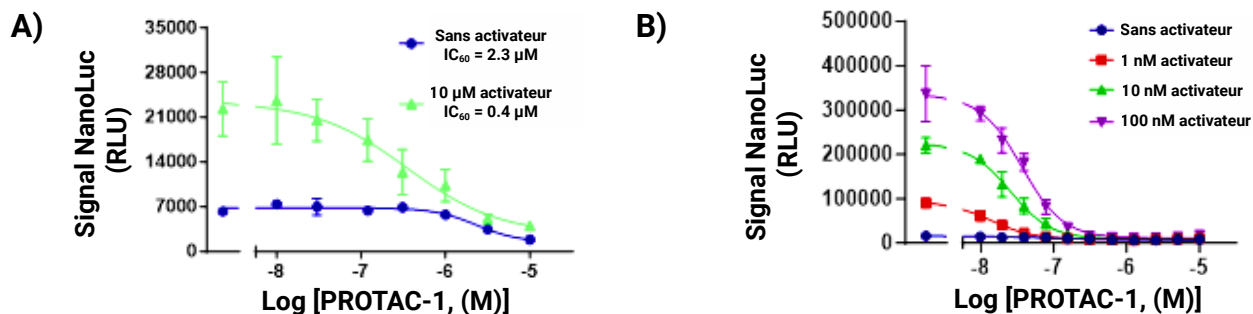


Fig 4. Essai HiBiT pour suivre la dégradation d'un facteur de transcription induite par PROTAC®, et la modulation de gènes en aval. A) Essai HiBiT pour suivre la dégradation d'un facteur de transcription sous des conditions basales ou d'activation. B) Suivi par essai HiBiT d'expression de gènes cibles en aval de la cible dont l'expression dépend de la PI.

Confirmation de la dégradation protéasomale

L'objectif d'induire la proximité entre la PI et une E3 ligase est de promouvoir son ubiquitination et ainsi l'identifier pour être dégradée par le protéasome 26S. Cependant, la formation d'un complexe tertiaire ne mène pas toujours à une conformation active. Il faut alors fournir une preuve directe de l'ubiquitination induite par PROTAC® pour confirmer le mécanisme de dégradation de la cible. Il est possible de démontrer l'implication du SUP par l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome (MG132, bortezomib), d'inhibiteurs de NEDDylation (MLN4924) et d'inhibiteurs spécifiques de l'E3 ligase.

Essais d'ubiquitination

Traditionnellement, l'ubiquitination des protéines est suivi par immunoprécipitation de la PI sous des conditions stringentes, suivant un immunobuvardage contre l'ubiquitine, ce qui génère la trainée caractéristique de poly-ubiquitination. Plus récemment, des méthodes telles que le NanoBRET® Ubiquitination Live-Cell System de Promega, qui combine une protéine de fusion HaloTag-Ub et un système HiBiT pour la PI, permettent de surveiller l'ubiquitination en essai de format 96- ou 384-puits.

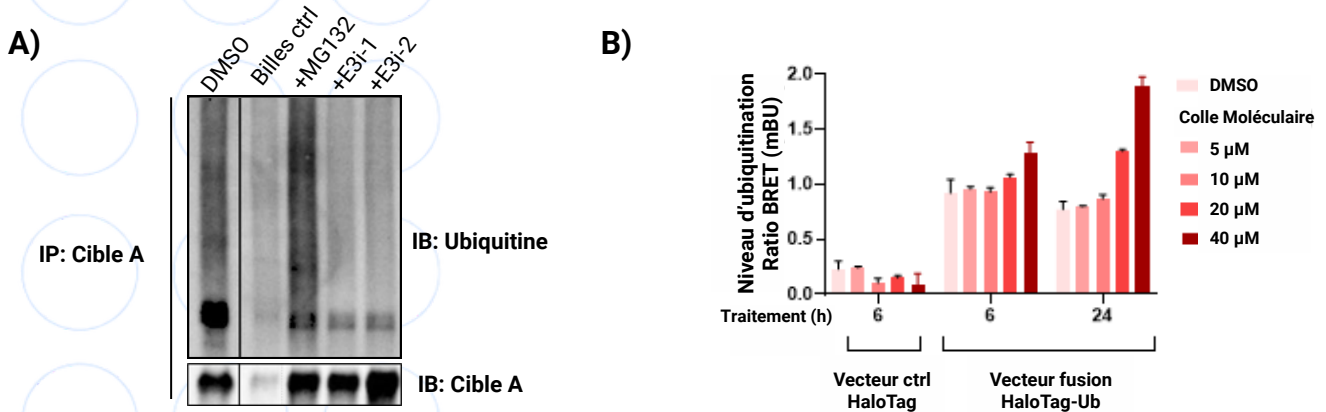


Fig 5. Essais pour détecter l'ubiquitination. A) Détection de l'ubiquitination par immunoprécipitation. Traitements des cellules : véhicule (DMSO, puits1), inhibiteur du protéasome MG132 (puits3), inhibiteurs spécifiques de E3 ligases (puits 4,5). Un contrôle avec les billes seules (pas d'anticorps) est montré dans le puits 2. B) 6h et 24h de traitement avec un PROTAC® montrent une dépendance au temps et à la dose de l'ubiquitination de la PI dans des cellules transfectées avec une protéine de fusion HaloTag-Ub.

Essai d'Inhibition du SUP

Les inhibiteurs du SUP ou les ligands compétiteurs de E3 ligase peuvent être utilisés pour confirmer le mécanisme de dégradation induits par PROTAC® / colles moléculaires. Dans les exemples ci-dessous, la dégradation de la PI par PROTAC® est réduite par un co-traitement avec un inhibiteur de NEDDylation ou un ligand VHL, ce qui indique que le PROTAC® induit la dégradation de la PI par le SUP.

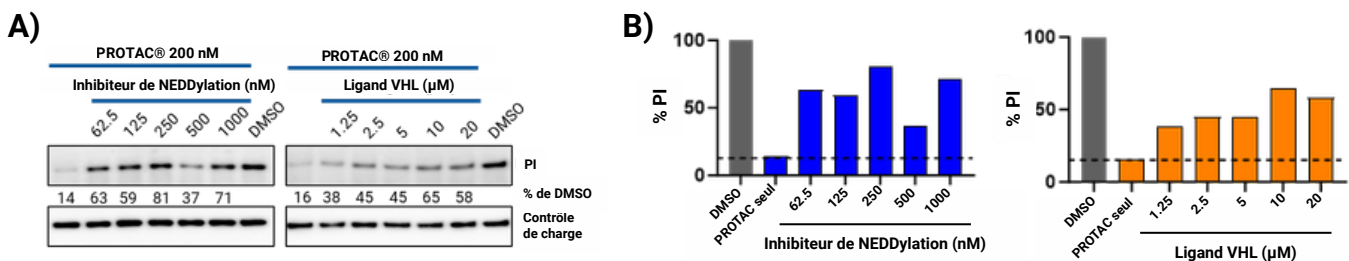


Fig 6. La dégradation d'une PI induite par PROTAC® diminue avec des inhibiteurs de SUP ou ligands de E3 ligase. Des cellules ont été traitées avec un PROTAC® à IC₅₀ et des doses croissantes d'inhibiteur de NEDDylation ou d'un ligand VHL. Immunobuvardage détectant la PI. B) Quantification relative des bandes par densitométrie, normalisée sur le contrôle de charge et exprimée en pourcentage relatif du contrôle DMSO.

Essais fonctionnels en aval

Une dégradation efficace d'une protéine cible engendre des modifications phénotypiques mesurables en modèles cellulaires, incluant, entre autres, l'arrêt du cycle cellulaire, l'altération de la migration / de l'invasion, et la modulation de voies de signalisation. Ces lectures donnent des indications importantes sur la fonction des composés et aident à la sélection de têtes de série avant les essais *in vivo*.

Mort cellulaire et arrêt de croissance

La culture en 2D est un modèle standard *in vitro* pour évaluer les réponses phénotypiques. Dans l'exemple suivant, l'impact d'un PROTAC® a été analysé sur l'apoptose et l'inhibition de croissance. Lorsque la dégradation de la cible atteint 90% (DC90), une diminution de la prolifération et augmentation significative de l'apoptose est notée. Les modèles de culture en 3D, tels que les sphéroïdes dérivés de différentes lignées cellulaires, peuvent mimer des conditions tumorales. Leur croissance peut être suivie à l'aide d'un BioTek Cytation 5 et d'un système d'imagerie en temps réel Incucyte®.

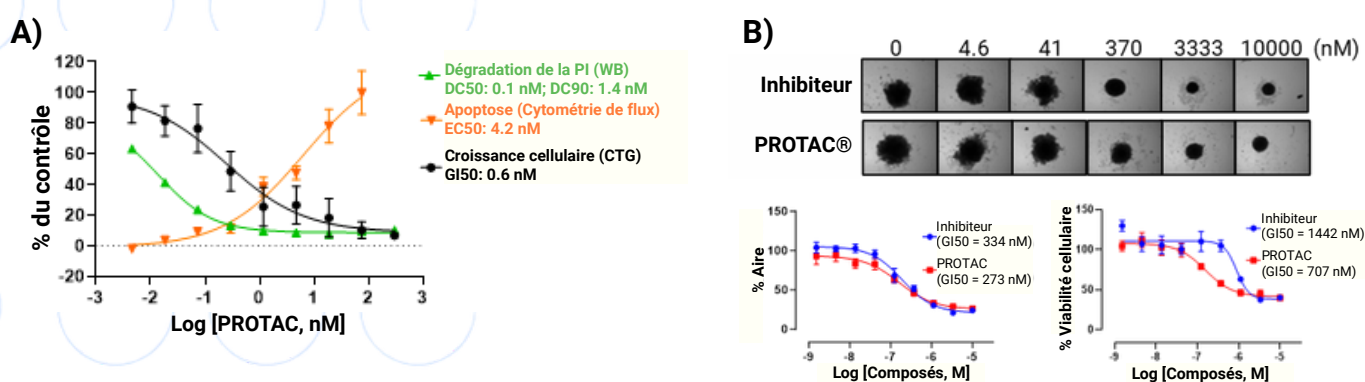


Fig 7. Dégradation d'une cible et son effet sur la réponse cellulaire. A) La dégradation protéique par PROTAC® (par immunobuvardage) mène à une augmentation de l'apoptose (quantifiée par cytométrie de flux) et une diminution de la croissance cellulaire (mesurée par CellTiter Glo®). B) Des sphéroïdes ont été traités avec un PROTAC® ou un inhibiteur pendant 7 jours, et l'IC₅₀ a été déterminée par 3D-CellTiter Glo et par mesure de la taille des sphéroïdes par le système d'imagerie Cytation 5.

Migration cellulaire par test de cicatrisation

Le test de cicatrisation (ou le « scratch assay ») est utilisé pour évaluer l'effet de composés sur la migration cellulaire. Cet essai peut être utilisé dans divers contextes, entre autres pour évaluer l'effet d'un composé sur la capacité d'invasion de cellules cancéreuses. Cette technique consiste à gratter une monocouche de cellules pour créer une zone sans cellules, puis de suivre la vitesse à laquelle les cellules migrent pour refermer cette blessure. Il est montré ici que le PROTAC® est plus efficace qu'un inhibiteur de la même cible pour réduire la migration cellulaire.

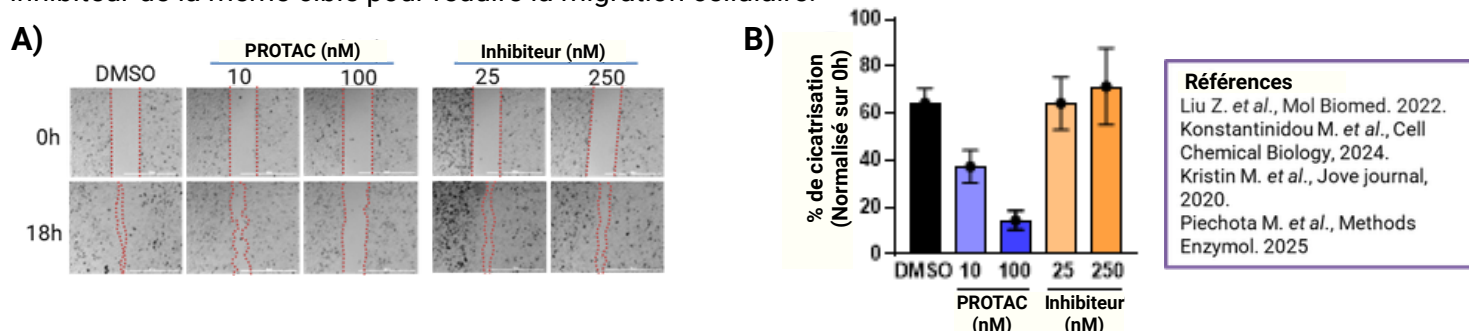


Fig 9. PROTAC® treatment inhibited cell migration. Des cellules ont été traitées avec un PROTAC ou un inhibiteur ciblant la même PI. A) Photos représentatives prise du même endroit à 0h et 18h de traitement par un système d'imagerie Cytation 5. B) Quantification de la largeur de la blessure.

Paraza

Contactez nous

parazapharma.com/
info@parazapharma.com



Canada: +1-514-395-4501
USA: +1-833-606-9077