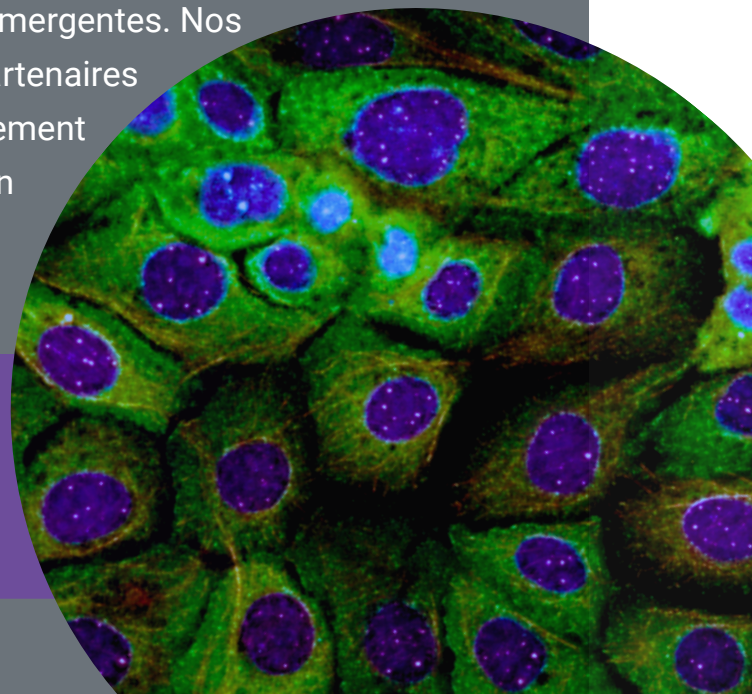


Engagement de Cibles Cellulaires

Suivant une caractérisation biochimique initiale, les essais cellulaires sont essentiels pour démontrer la liaison de composés à leur cible dans un environnement cellulaire complexe où la perméabilité, le métabolisme et la localisation intracellulaire modulent leur efficacité. Comprendre les propriétés pharmacodynamiques de composés en contextes cellulaires et *in-vivo* sont des étapes critiques pour supporter la prise de décision lors de l'optimisation de candidats et lors du développement pré-clinique.

Chez Paraza, nous avons une expertise approfondie pour résoudre les défis que posent les essais cellulaires sur des cibles émergentes. Nos scientifiques travaillent étroitement avec les clients-partenaires afin de concevoir et personnaliser des essais d'engagement de cible et de biomarqueurs pharmacodynamiques afin de guider avec assurance la prise de décision et permettre d'accélérer la découverte de médicaments.

- Essais d'engagement de cible
- Essais fonctionnels
- Exploration génétique d'activité ciblée
- Pharmacodynamique *in vivo*



Essais cellulaires d'engagement direct de cibles

Les essais cellulaires d'engagement de cible permettent de quantifier l'interaction entre un composé et sa cible dans des conditions physiologiques pertinentes. Les essais de déplacement de sonde peuvent être implémentés en utilisant plusieurs types de technologies, incluant la compétition d'un radioligand, le NanoBRET, le TR-FRET et l'AlphaLISA.

Essais de déplacement de sonde

Une lecture robuste qui représente réellement l'engagement de la cible est nécessaire afin de grader les composés lors d'un criblage à haut débit. Cependant, développer des essais cellulaires pour des cibles moins bien caractérisées peut représenter un défi. Dans cet exemple, notre équipe de chimie médicinale a conçu une sonde conjuguée à BODIPY590 à partir d'une petite molécule identifiée tôt pendant la campagne de SAR pour viser une nouvelle cible. Cette sonde a permis le développement d'un essai de déplacement par BRET en format 384-puits avec une excellente performance, pour déterminer l'activité cellulaire des composés et guider la relation structure-activité.

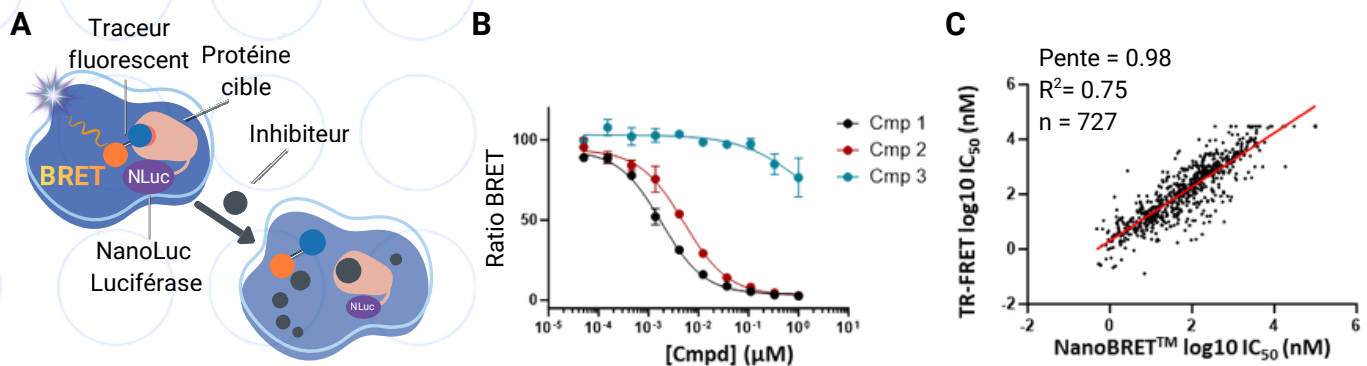


Fig 1. Essai de déplacement de sonde ciblant une classe d'enzymes peu caractérisées. A) Représentation d'un essai de déplacement de sonde par NanoBRET. B) Exemple de dose-réponse en format 384-puits. Des composés de différentes efficacités sont montrés. C) La corrélation entre le NanoBRET et un essai biochimique de déplacement de sonde en TR-FRET est présentée.

Autophosphorylation de kinases par AlphaLISA

Le suivi de l'autophosphorylation est une approche courante pour évaluer l'interaction d'un composé avec sa cible quand celle-ci est une kinase. Les essais kinase AlphaLISA™ utilisent des anticorps afin de détecter une protéine dans sa forme phosphorylée, en émettant un signal fluorescent/luminescent. Tout comme le TR-FRET, la technologie AlphaLISA™ est très sensible, robuste et permet un criblage de composés à haut débit. Ces deux types d'essais sont disponibles en trousse pré-validées. Advenant le cas où il n'existe pas d'essais pré-validés, nous sommes experts dans le développement d'essais personnalisés.

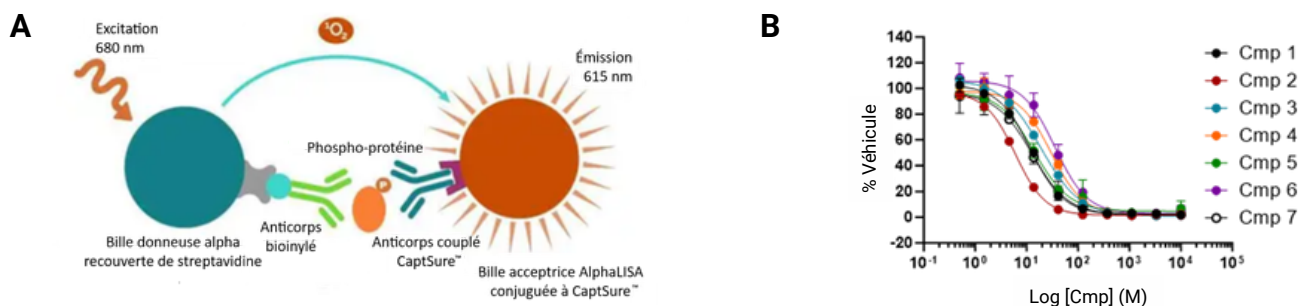


Fig 2. Évaluation d'inhibition d'activité kinase par AlphaLISA™. A) Représentation d'un essai AlphaLISA™ (adapté de www.revity.com). B) Une dose-réponse automatisée en AlphaLISA™ a été optimisée pour cribler des composés ciblant une kinase d'intérêt dans un essai cellulaire. Des exemples de composés testés sont présentés.

Essais fonctionnels d'engagement de cible

Une mesure directe de la liaison d'un composé à sa cible n'est pas toujours réalisable, selon le type de cible ou de stratégie thérapeutique. Pour pallier cette situation, l'engagement fonctionnel peut être utilisé pour détecter des changements moléculaires qui sont dépendants de la cible.

Évaluation de modulateurs d'épissage par RT-qPCR

Parmi les classes émergentes de petites molécules, les modulateurs de l'épissage du pré-ARN messager agissent en favorisant l'inclusion/exclusion d'exon(s) pour restaurer un motif d'expression, ou pour générer un transcrit non-fonctionnel permettant l'extinction d'un gène. À ce jour, il n'existe pas de criblage à haut débit permettant de mesurer directement une interaction composé-ribonucléoprotéine (ou composé-ARN). Ainsi, les modulations d'épissage sont quantifiées par RT-qPCR, ce qui fournit une lecture sensible et précise, permettant de confirmer l'effet sur la cible et le classement des composés selon leur puissance dans un contexte cellulaire.

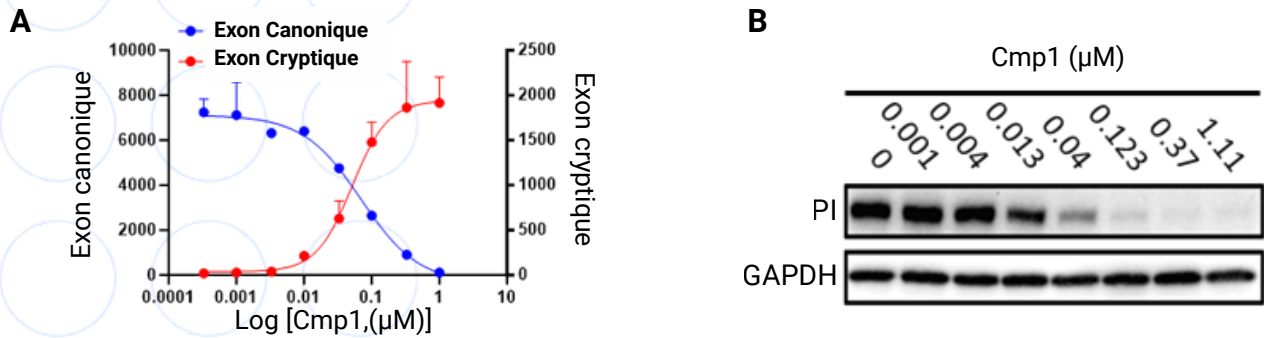


Fig 3. Essai d'engagement d'un modulateur d'épissage. A) RT-qPCR en plaque 384-puits pour quantifier l'expression d'un exon canonique et de son transcrit alternatif (cryptique) suivant le traitement avec Composé 1. B) Analyse par immunobuvardage confirmant la réduction d'expression de la protéine d'intérêt (PI) suivant un traitement avec le Composé 1.

Confirmation de mécanisme d'action par sous-expression génique

Pour certaines cibles, il n'existe pas toujours de bons anticorps. Dans ce cas, des perturbations génétiques peuvent offrir une avenue pour confirmer le mécanisme d'action d'un composé. Dans l'exemple présent, la forte sous-expression du gène cible réduit considérablement l'activité d'inhibiteurs spécifiques, permettant de renforcer l'hypothèse sur le mécanisme d'action proposé. Ce type de résultats, obtenus dans un environnement cellulaire complexe, complète la sélectivité établie en essai biochimique pour fournir des preuves d'activité spécifique à une cible.

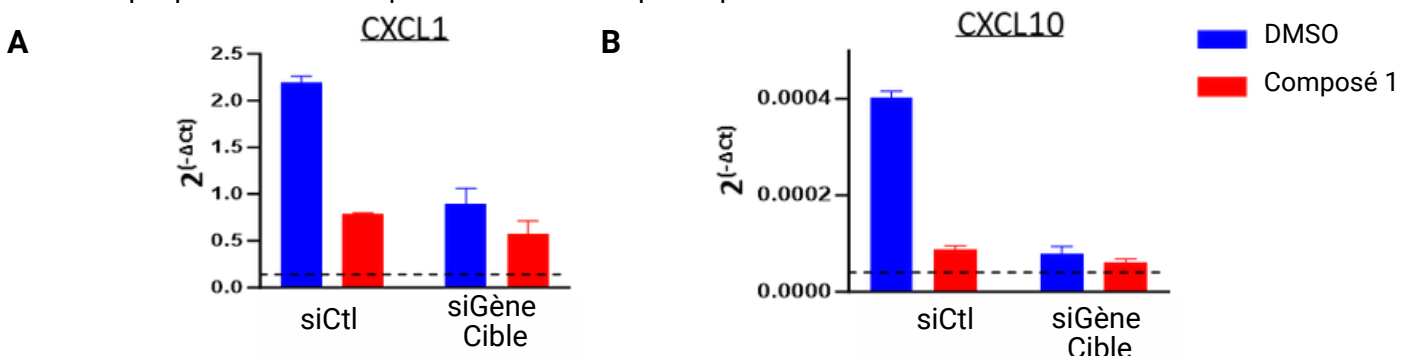


Fig 4. La sous-expression d'une PI supprime l'activité du composé, fournissant une évidence indirecte du mécanisme d'action sur sa cible. La sous-expression d'une PI empêche le Composé 1 d'inhiber l'induction de CXCL1 (A) and CXCL10 (B) par TNF α , tel qu'analysé par RT-qPCR.

Biomarqueurs PD en modèles murins

Évaluer la pharmacodynamique (PD) de composés dans un modèle animal est critique pour la prise de décisions pré-cliniques et renforcer la confiance translationnelle. Plusieurs technologies peuvent être utilisées dans des modèles *in-vivo* pour fournir des preuves supplémentaires sur l'activité de composés. Chez Paraza, nous pouvons administrer des composés *in-vivo* puis procéder à ces analyses sur le plasma et les tissus collectés.

Quantification de biomarqueurs par MesoScale Discovery (MSD)

Les essais MSD utilisent l'électrochemiluminescence pour détecter des protéines cibles dans des échantillons biologiques complexes. La technologie MSD permet de mesurer simultanément des biomarqueurs multiples, de façon précise et sensible, avec une vaste gamme dynamique et peu de bruit de fond. Que ce soit en utilisant une trousse déjà pré-validée ou par le développement d'essais personnalisés, nous avons établis avec succès des méthodes de quantification pré-cliniques de marqueurs PD pour de nombreuses cibles, tant en cellules que dans des tissus.

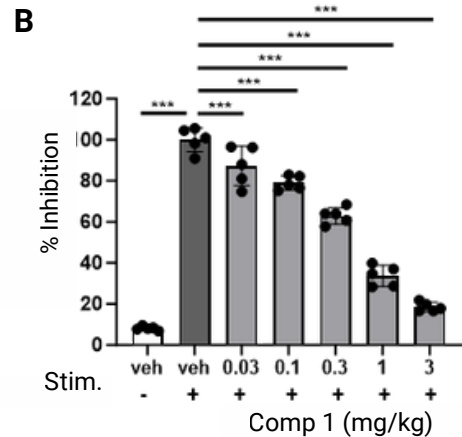
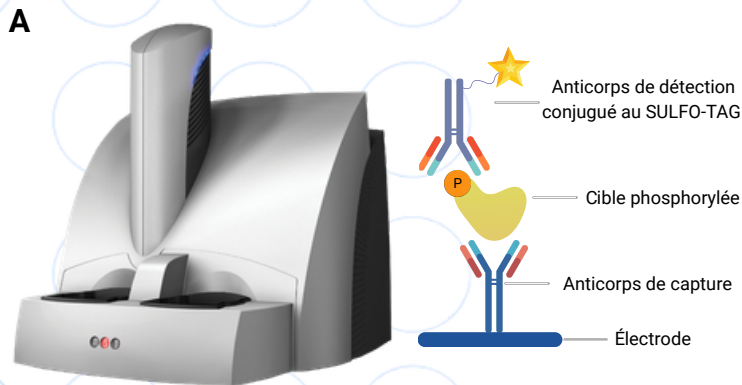


Fig 5. Évaluation d'inhibition de l'activité kinase *in vivo* par MSD. La phosphorylation de la protéine d'intérêt (PI) a été évaluée par MSD dans des tissus de poumons de souris. A) L'instrument et la représentation de la technologie MSD. B) Après quinze minutes de stimulation *in vivo* en souris, une forte phosphorylation de la PI est observée. Cette phosphorylation a été inhibée de façon dose-dépendante suivant une administration orale du Composé 1.

Quantification de métabolites par LC-MS/MS

La spectrométrie de masse quantitative permet l'identification directe de molécules basée sur le ratio masse-sur-charge et les motifs des fragments, ce qui donne une grande flexibilité pour déterminer les chimiques, peptides et lipides, endogènes ou exogènes, dans une multitude de types d'échantillons. Par exemple, en mesurant les niveaux d'un inhibiteur d'enzyme et de son marqueur PD, il est possible d'obtenir une évaluation translationnelle de pharmacocinétique (PK) et pharmacodynamique dans le même échantillon. Les lectures en spectrométrie de masse fournissent une haute sensibilité et spécificité, ce qui rend cette technique idéale pour les études pré-cliniques et translationnelles.

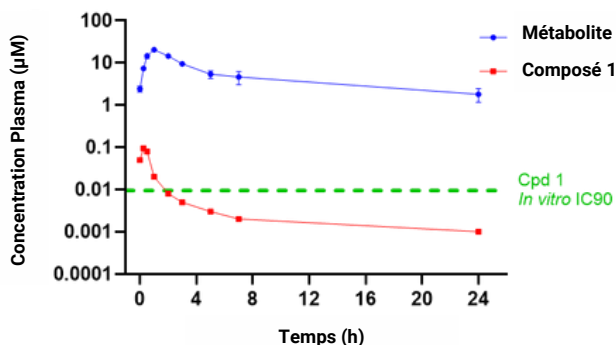


Fig 6. Évaluation de l'activité enzymatique dans le plasma. Visualisation des profils PK d'un inhibiteur et d'une protéine d'intérêt, tous deux mesurés dans le plasma de rat en utilisant un Vanquish Flex UPLC couplé avec spectromètre de masse TAQ Quantis à triple quadrupôle (Thermo). Les deux analytes montrent des profils similaires, incluant le délai attendu de l'accumulation relative du substrat relatif à la quantité de Composé 1 injecté.

Paraza

Contactez-nous

parazapharma.com/
info@parazapharma.com



Canada: +1-514-395-4501
USA: +1-617-216-9459