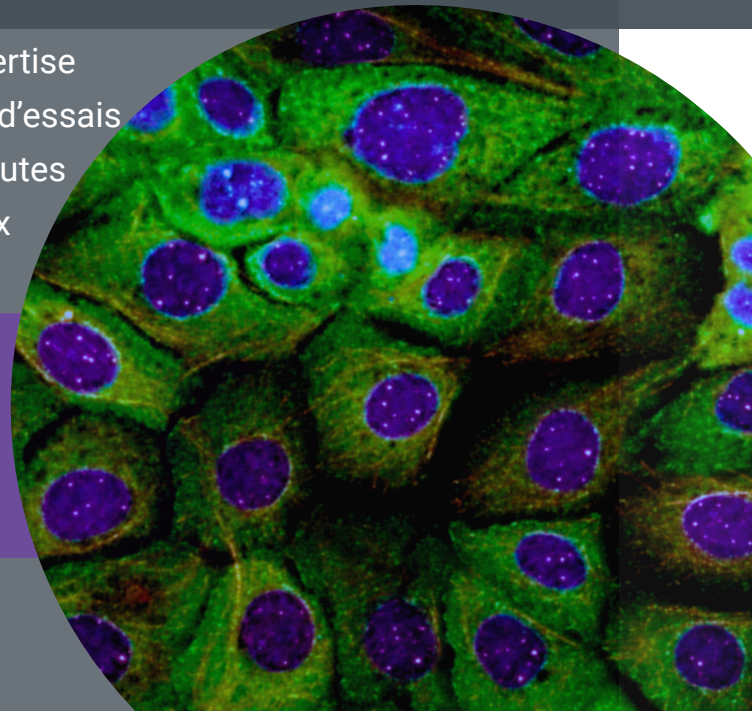


Développement de médicaments ciblant les RCPGs

Environ 35% des médicaments approuvés par la FDA ciblent des Récepteurs Couplés au Protéines G (RCPGs) [1]. Les RCPGs constituent le groupe le plus abondant et diversifié de récepteurs de surface des cellules eucaryotes. Possédant sept domaines transmembranaires, leur activation entraîne le recrutement des protéines G, menant à diverses réponses cellulaires: génération d'AMPc, libération de calcium intracellulaire, activation de voies de signalisation cellulaire, et internalisation du récepteur médiée par β -arrestine, pour ne nommer que celles-là. Les RCPGs sont impliqués dans des processus tels que de la vision, le goût et l'odorat, jusqu'à la contraction des muscles lisses, la régulation du tube digestif, et la réponse immunitaire. Puisqu'ils sont centraux dans la communication cellulaire, les RCPGs sont une cible de choix pour la recherche de nouveaux médicaments.

À Paraza Pharma, nos scientifiques ont une vaste expertise dans le développement et la réalisation une panoplies d'essais cellulaires de liaisons et fonctionnels, nécessaires à toutes les étapes des projets portant sur les RCPG, les canaux ioniques et les récepteurs tyrosine kinases (RTK).

- Essais de liaison de radioligands
- Détection d'AMPc
- Essais calciques
- Lignées cellulaires universelles



Test de liaison de radioligands sur membrane

Les essais de liaison sont essentiels pour l'étude de la relation structure-activité et pour le développement et la caractérisation de composés pharmaceutiques ciblant les RCPGs. À travers différents protocoles tels que la saturation, la compétition et la cinétique de liaison, il est possible d'obtenir des informations quantitatives précieuses sur la densité du récepteur, sur les constantes et vitesses d'équilibre de dissociation et d'association des ligands, ainsi que de distinguer les interactions allostériques et orthostériques. Chez Paraza, nous avons toutes les autorisations nécessaires pour utiliser des sondes radiomarquées pour effectuer des études de liaison.

Préparation de membranes

L'un des principaux défis dans le développement d'un essai biochimique pour les RCPGs réside dans l'obtention d'une population enrichie en récepteurs fonctionnels. Cela nécessite un repliement adéquat des sept domaines transmembranaires au sein de la bicouche lipidique afin de préserver leur conformation et leur activité biologiques. La préparation rigoureuse de micelles issues de membranes provenant de tissus animaux ou de lignées cellulaires surexprimant le récepteur d'intérêt constitue une étape essentielle au développement d'essais précis, robustes et reproductibles. Chez Paraza, nous possédons une expertise reconnue dans la sélection, l'optimisation et la mise en œuvre de protocoles d'expression à grande échelle. Nous utilisons notamment les systèmes d'expression Expi293™ et ExpiCHO™ pour produire des préparations membranaires en grand volume avec expression exogène du RCPG cible. Cette approche permet d'obtenir des réactifs de haute qualité compatibles avec les plateformes de criblage à haut débit.

La référence absolue pour évaluer l'affinité de liaison d'un médicament à son récepteur

Flux de travail d'un essai de liaison d'un radioligand

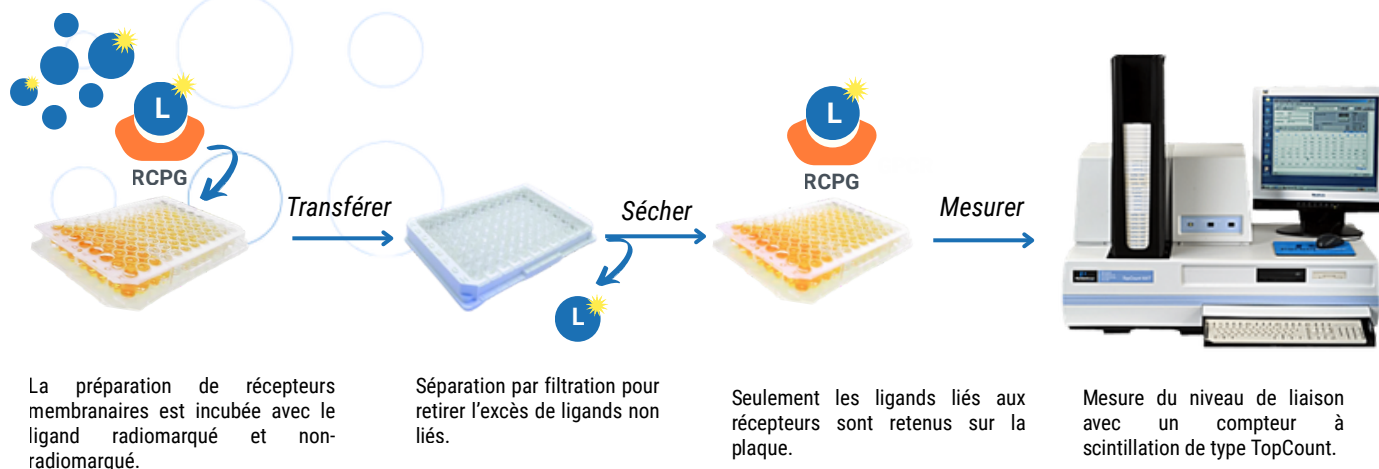


Fig 1. Protocole du test de liaison de radioligand.

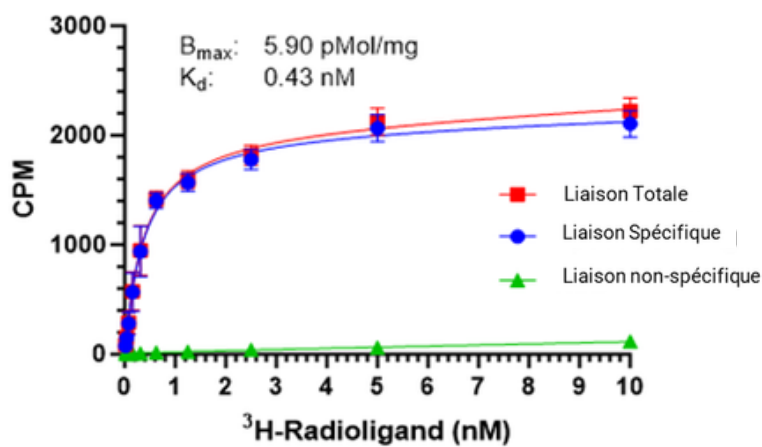
Des préparations membranaires isolées à partir de cellules exprimant le récepteur d'intérêt sont incubées avec un ligand radiomarqué et un composé compétiteur dans un tampon de liaison, au sein de plaques de test à 96 puits. Les mélanges sont ensuite transférés sur des plaques de filtration à 96 puits et filtrés sous vide afin de retenir le ligand radiomarqué lié. Les plaques de filtration sont ensuite lavées à plusieurs reprises pour éliminer l'excès de ligand radiomarqué non lié, puis incubées à 50°C jusqu'à séchage complet. Un cocktail de scintillation est alors ajouté aux puits et la radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation TopCount.

Détermination de la valeur Kd

Des préparations membranaires, issues de cellules Expi293™ surexprimant le RCPG d'intérêt, peuvent être utilisées pour réaliser des essais de liaison à saturation avec un ligand marqué par un radio-isotope. La liaison non spécifique (NSB) est déterminée en présence d'une concentration saturante de ligand froid et soustraite de la liaison totale afin d'obtenir les courbes de saturation de la liaison spécifique. Les données sont traitées avec le logiciel GraphPad Prism en utilisant le modèle de liaison spécifique à un seul site de liaison pour déterminer les valeurs de Kd et de Bmax. Les valeurs de CPM peuvent être converties en pmol/mg de protéines en tenant compte de l'activité spécifique du ligand, de la concentration en protéines et de l'efficacité de comptage.

Fig 2. Détermination de la valeur de Kd et de l'occupation des récepteurs par un test de liaison de radioligand utilisant une sonde marquée au ^3H .

Les points de données représentent les concentrations de ligand correspondantes (axe des abscisses) et les mesures de CPM obtenues (axe des ordonnées).



Criblage de composés par test de liaison de radioligands

Une fois les conditions du test établies, les essais de liaison se prêtent bien au criblage à débit moyen ou à l'évaluation quantitative de la relation dose-réponse des composés testés. Dans cet exemple, huit composés actifs («Hits») ont été identifiés, puis validés par des essais de liaison compétitive en fonction de la dose afin de déterminer leur puissance relative.

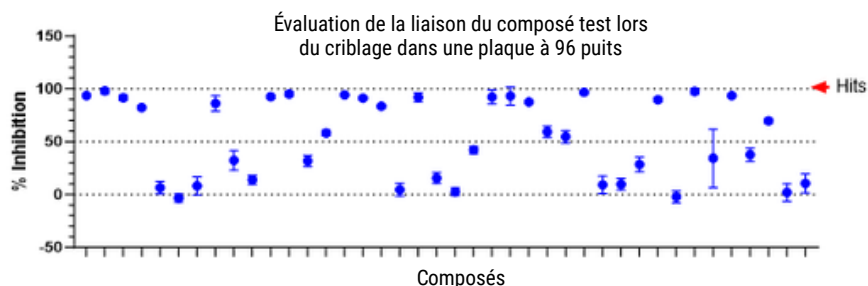
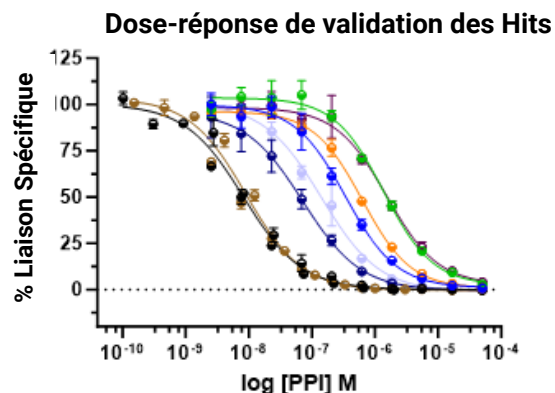


Fig 3. Criblage en point unique et validation des « Hits » par un test de liaison par compétition sur filtre.

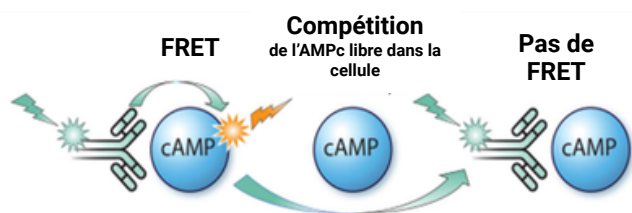
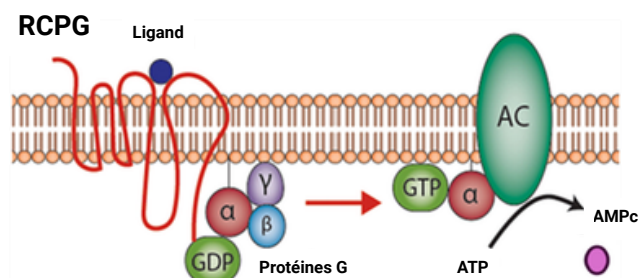
Un test de liaison par compétition a été réalisé pour évaluer la capacité de composés (à une concentration de 10 μM) à inhiber totalement la liaison d'un ligand marqué au tritium (^3H) au RCPG cible. Jusqu'à 40 composés ont été testés par plaque de 96 puits, en duplicatas techniques.



L'AMPc comme indicateur de l'activité des RCPG

Les RCPGs qui stimulent la production d'AMPc activent l'adénylate cyclase par l'intermédiaire de la protéine G stimulatrice (G_s); inversement, une action via la protéine G inhibitrice (G_i) peut inhiber la production d'AMPc. Le suivi des taux intracellulaires d'AMPc constitue une approche robuste et bien validée pour évaluer les agonistes et antagonistes des RCPGs, ainsi que les modulateurs allostériques. Les tests de détection de l'AMPc sont des méthodes de criblage très répandues en raison de leur grande sensibilité et de la disponibilité de nombreuses méthodes de détection quantifiables.

La technique TR-FRET est l'une des méthodes les plus polyvalentes pour quantifier l'AMPc. Dans cet essai, le taux d'AMPc est mesuré indirectement par compétition avec de l'AMPc marqué à l'euprotium pour la liaison à l'anticorps anti-AMPc. Plus la concentration intracellulaire en AMPc est élevée, plus le signal TR-FRET est faible. Cet essai peut être utilisé pour caractériser des agonistes et des antagonistes, ainsi que des modulateurs allostériques positifs ou négatifs (PAM et NAM).



Les dosages de l'AMPc cellulaires offrent une personnalisation et une adaptabilité des flux de travail de criblage.

Procédure de criblage à haut débit

Distribution des composés



Distributeur Acoustique Echo



Tecan D300e

Ensemencement de cellules



Multidrop



Apricot S3

Lecture du signal



Lecteur de plaques Envision

Fig 4. Procédures de travail pour le dosage de l'AMPc exploitant des nanodispensers et l'automatisation afin d'augmenter le débit.

Mesure de l'activité des RCPGs dans les cellules CHO-K1

La surexpression des RCPGs dans les cellules CHO-K1 constitue un système bien établi pour l'étude de la signalisation de ces récepteurs. Dans le cas des RCPG couplés aux protéines G_s , cette surexpression entraîne une concentration basale élevée d'AMPC, observée même en l'absence de stimulation, ce qui permet d'utiliser aisément ces cellules pour le criblage de composés.

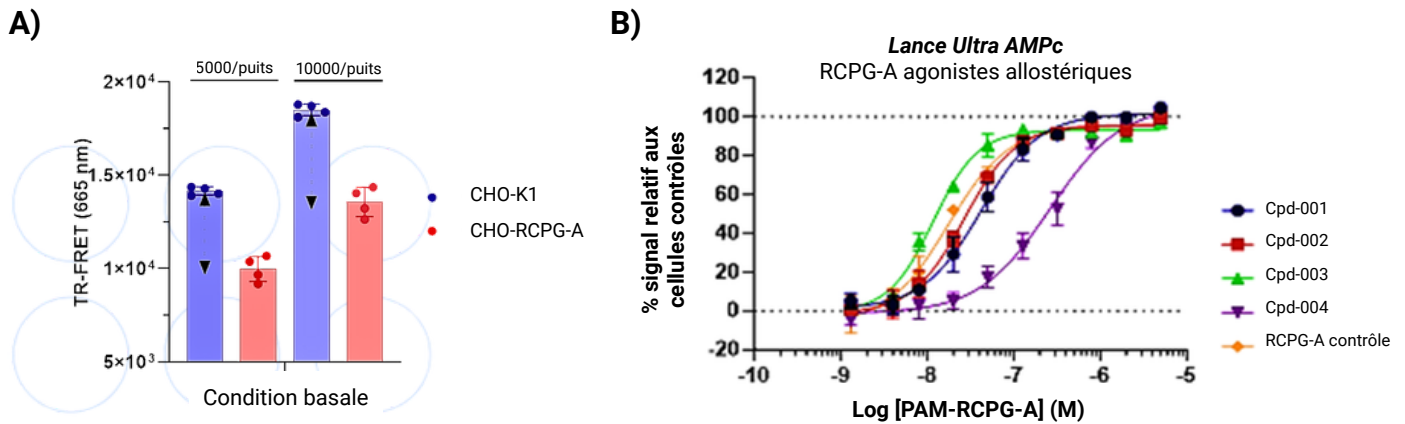


Fig 5. Système de surexpression du GPCR-A dans des cellules CHO-K1 utilisé pour le criblage d'agonistes.

(A) Une augmentation du taux basal d'AMPC est détectée dans les cellules surexprimant le récepteur, en l'absence de stimulation. (B) Caractérisation d'agonistes allostériques du RCPG-A. Le signal TR-FRET est reproductible et robuste ($Z' > 0,5$) pour les essais d'agonistes.

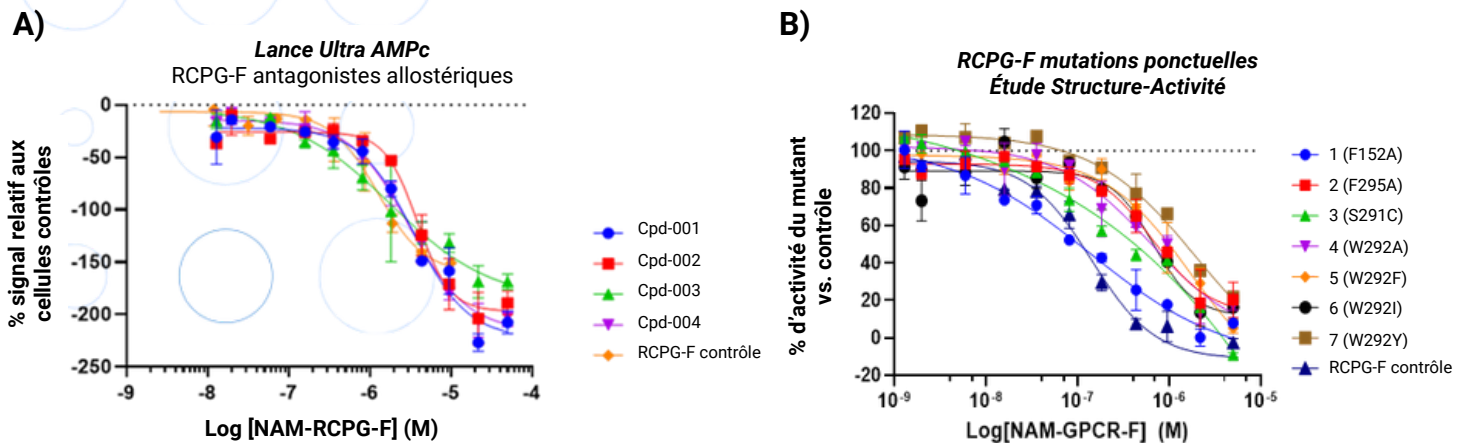


Fig 6. Système de surexpression du GPCR-F dans des cellules CHO-K1 utilisé pour cribler des antagonistes et identifier les résidus clés du site actif prédit.

(A) Des antagonistes allostériques du RCPG-F ont été testés à l'aide du kit de détection de l'AMPC Lance Ultra. Dans des conditions optimisées, le signal TR-FRET est reproductible et robuste ($Z' > 0,5$) pour les essais d'antagonistes. (B) Un modèle d'homologie du RCPG-F humain a été prédit [3]. Afin de valider ce modèle, de rationaliser les relations structure-activité et d'identifier les résidus clés de la cavité de liaison impliqués dans la reconnaissance du ligand, nous avons cloné plusieurs variants du RCPG-F comportant des mutations ponctuelles uniques et les avons exprimés dans des cellules CHO-K1. L'activité de ces mutants a été comparée à celle de la forme parentale (sauvage) en utilisant un composé de référence pour le RCPG-F.

Mesure de la libération de calcium après l'activation de RCPG ou de canaux ioniques

Une variation de la concentration en Ca^{2+} constitue une étape clé de la transduction du signal. Divers types de récepteurs, tels que les canaux ioniques et les RCPGs convertissent les signaux extracellulaires en réponses intracellulaires [3]. Le test de mobilisation du calcium est une méthode de criblage robuste, grâce à sa grande sensibilité et à la disponibilité de sondes fluorescentes calciques perméables aux membranes cellulaires. Les méthodes de détection sont compatibles aussi bien avec le système FlexStation® 3 qu'avec les lecteurs de plaques à fluorescence en temps réel (FLIPR), permettant ainsi la mise au point du test suivie du criblage à haut débit de composés.

FlexStation 3 pour la signalisation calcique (Ca^{2+}) médiée par les RCPGs (faible débit)

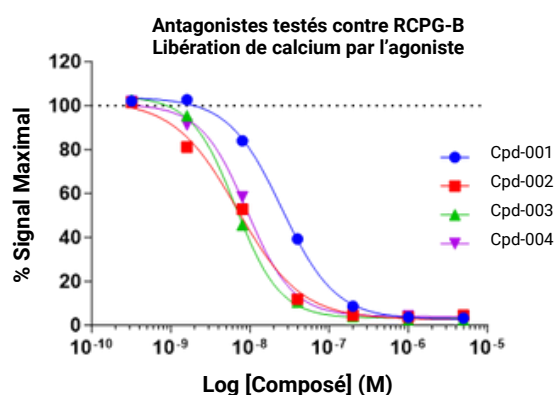


Fig 8. Inhibition, par des antagonistes, de la mobilisation du calcium induite par un RCPG couplé à la protéine G_q exprimé de manière endogène dans une lignée cellulaire rénale. Courbes dose-réponse obtenues après une préincubation de 2 min avec les antagonistes, suivie de l'ajout de l'agoniste du récepteur cible à une concentration correspondant à la CE_{80} .

La détection des signaux calciques constitue une méthode rapide et adaptable pour caractériser les ligands des RCPGs

FLIPR pour les tests Ca^{2+} à haut débit

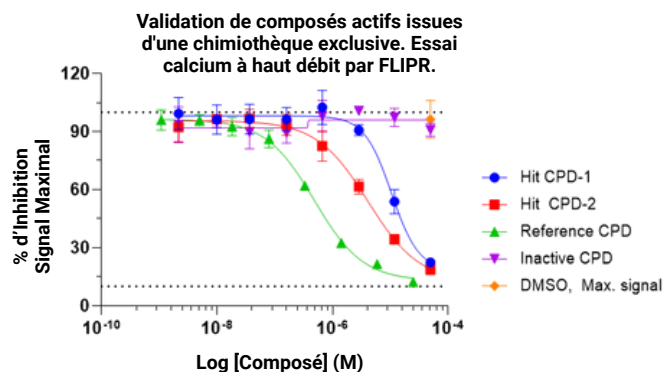
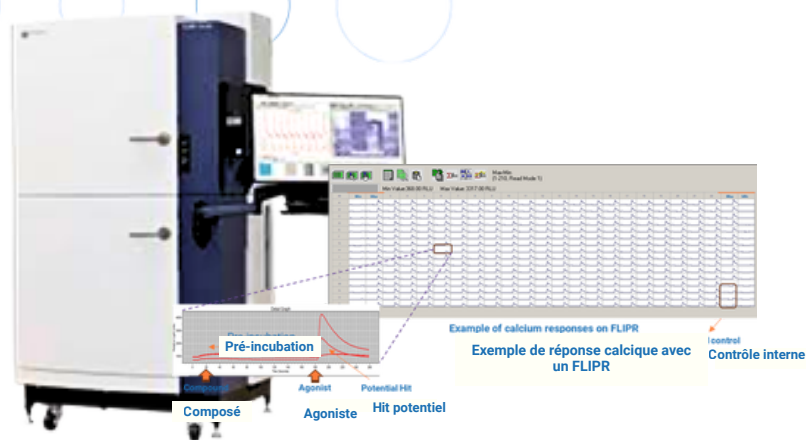
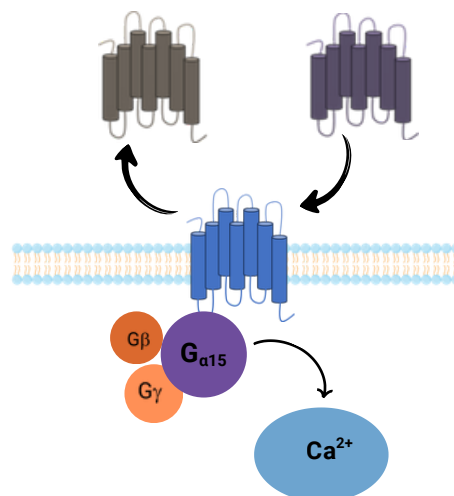


Fig 9. Identification de composés actifs («Hits») à partir de notre chimiothèque exclusive sur un canal ionique ligand-dépendant et sensible au calcium, surexprimé dans des cellules HEK293. Courbes dose-réponse d'antagonistes pré-incubés pendant 2 min, suivis de l'ajout de l'agoniste du récepteur cible à une concentration correspondant à la CE_{80} .

Lignées cellulaires universelles pour le criblage de RCPG

Les tests fonctionnels cellulaires destinés au criblage des RCPGs se limitent souvent à un sous-ensemble de sous-unités G_{α} et ne sont applicables qu'aux RCPG dont les voies de signalisation sont bien établies. Une approche universelle de criblage à haut débit (HTS) pour les cibles RCPGs offre un cadre permettant d'étudier une gamme plus large de ces récepteurs, y compris les récepteurs orphelins. Des études antérieures ont identifié la sous-unité $G_{\alpha15}$ comme une sous-unité de protéine G à promiscuité enzymatique, capable d'orienter la signalisation des RCPG vers la voie de mobilisation du calcium (Ca^{2+}), et amenable à être utilisée pour le criblage à haut débit de RCPG [4].

Afin de mettre en place un test cellulaire universel pour l'identification de composés ciblant certains RCPGs, une lignée cellulaire HEK293 exprimant de manière stable la protéine $G_{\alpha15}$ a été établie chez Paraza. La stimulation par un agoniste d'un récepteur couplé aux protéines $G_{\alpha i}$ surexprimé dans ces cellules induit une réponse de mobilisation calcique non canonique. D'autres lignées cellulaires stables exprimant d'autres sous-unités de protéines G à large spectre, telles que $G_{\alpha i5}$ et $G_{\alpha s5}$, sont en cours d'établissement afin d'élargir les possibilités de criblage.



Lignée cellulaire HEK293- $G_{\alpha15}$ pour un test universel de mobilisation du calcium induite par les RCPGs

Relation dose-réponse d'un antagoniste des RCPGs

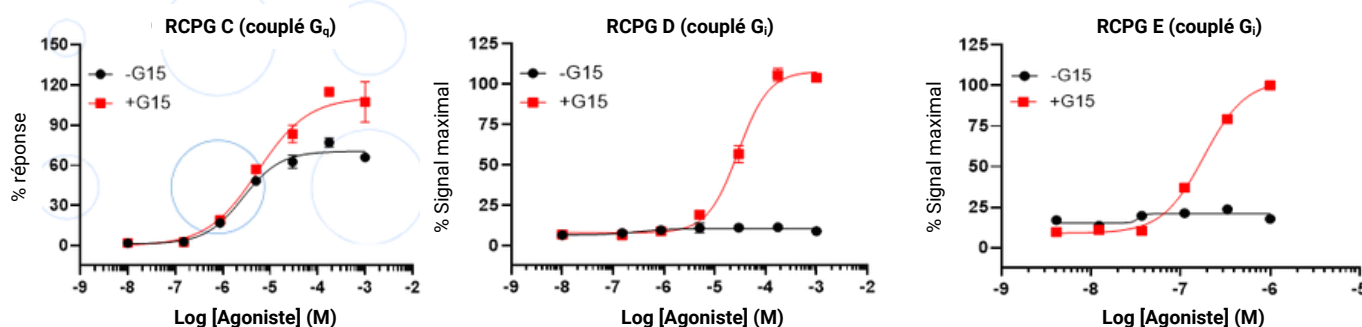


Fig 10. Mobilisation du calcium induite par un agoniste via des RCPGs couplés aux protéines G_q ou G_i , exprimés de manière transitoire dans des cellules HEK293 surexprimant un plasmide témoin ou la sous-unité $G_{\alpha15}$. À l'aide de la plateforme FlexStation, la réponse calcique a été enregistrée après stimulation par un agoniste des récepteurs couplés aux protéines G_i ou G_q dans des cellules HEK293 exprimant ces RCPG. Cette réponse était amplifiée dans les cellules HEK293 coexprimant la sous-unité $G_{\alpha15}$.

REFERENCES

- [1] Sriram et al, 2018. Mol. Pharmacol. 2018 Apr. 93(4):251–258
- [2] Rall, T. W., & Sutherland, E. W. 1958. Journal of Biological Chemistry, 232(2), 1065–1076
- [3] Isawi et al., 2020. Molecules. 2020 Feb. 7;25(3):725
- [4] Zhu et al., 2008. ACTA PHARMACOLOGICA SINICA, (29):507–516



Contactez-nous

parazapharma.com/
info@parazapharma.com



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