

Chromatographie Faible Affinité (WAC) couplée à la spectrométrie de masse (TOF-MS) pour le Drug Discovery

Mots Clés : Santé – Chromatographie, spectrométrie de masse - Interactions moléculaires – approche analytique pluridisciplinaire

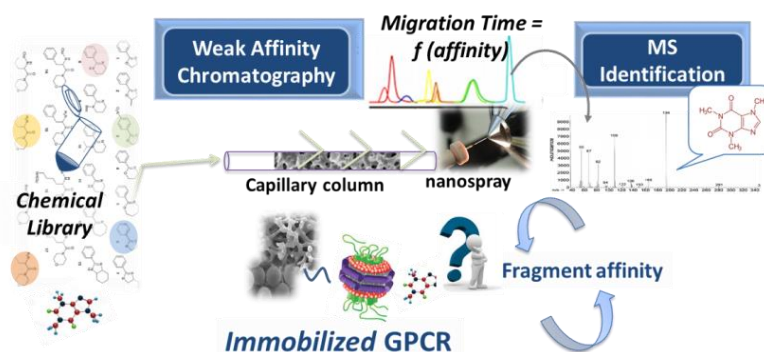
Contexte :

La conception de candidat-médicaments à partir de molécules dites fragments (*Fragment-Based Drug Discovery*¹) est une approche qui a totalement révolutionné le développement de molécules à visée thérapeutique. Cette approche consiste à identifier des molécules organiques (fragments) qui ciblent des protéines impliquées dans des pathologies humaines. Ces molécules fragments sont ensuite liées entre elles ou modifiées pour aboutir à des molécules plus complexes de meilleure activité et spécificité. Dans le contexte de ces approches *FBDD*, la recherche pharmaceutique du monde industriel et académique requiert des méthodes de criblage adaptées à l'identification de fragments d'affinité μM - mM et à l'étude des protéines membranaires. En effet, ces protéines qui représentent des cibles thérapeutiques à fort potentiel sont encore très peu étudiées en raison des difficultés de production et de leur faible stabilité en dehors de leur membrane d'origine. Le développement de techniques biophysiques adaptées aux protéines membranaires et permettant de diminuer la consommation de protéine et de réduire la durée de criblage s'avère nécessaire.

L'équipe Techsep a développé une nouvelle technologie ultra-miniaturisée de chromatographie de faible affinité (nano weak affinity chromatography).

Cette approche repose sur l'élaboration de colonnes chromatographiques d'affinité au format capillaire, sur lesquelles la protéine cible est immobilisée soit directement, soit par le biais d'une membrane biomimétique (type nanodisc). La

rétention des fragments est directement liée à leur affinité pour la protéine cible. La miniaturisation et la réutilisation des protéines immobilisées permet de réduire drastiquement la consommation de protéine (de l'ordre du μg). La preuve de concept de cette nouvelle approche a été réalisée sur des protéines soluble² et très récemment sur une protéine membranaire.



Projet de thèse :

Les développements seront, dans un premier temps, poursuivis avec le récepteur d'adénosine A2A (AA2AR) et un objectif clé sera le couplage avec la spectrométrie de masse (nano-ESI-MS) pour réduire la durée de criblage de la bibliothèque (injection de pool de fragments) et pour ouvrir le criblage aux mélanges complexes (produits naturels) ou à des mélanges synthétiques non purifiés. On explorera ensuite le potentiel de la nano-WAC-MS pour étudier le récepteur de la ghréline GHSR qui est une cible importante en biomédecine. En effet, l'industrie pharmaceutique poursuit activement le développement de composés susceptibles de moduler la signalisation de la ghréline pour le traitement de l'obésité, du diabète ou des troubles liés à l'usage de drogues / alcool, mais aucun composé efficace n'a été identifié jusqu'à présent.

Ce travail sera réalisé en collaboration avec d'autres équipes spécialisées dans le Drug Discovery (Fragmentech Lyon 1), et l'expression de protéines membranaires (Impress Strasbourg) et de pharmacologie cellulaire (IBMM Montpellier).

¹ D.A. Erlanson, et al. Twenty years on: the impact of fragments on drug discovery, *Nat Rev Drug Discov.* 15 (2016) 605–619 / J.-P. Renaud et al., Biophysics in drug discovery: impact, challenges and opportunities, *Nat Rev Drug Discov.* 15 (2016) 679–698.

² L. Lecas, J. Randon, A. Berthod, V. Dugas, C. Demesmay, Monolith weak affinity chromatography for μg -protein-ligand interaction, *J. Pharm. Biomed. Analysis.* 166 (2019), 164-173.

Key words: health – affinity chromatography- mass spectrometry- molecular interactions – analytical multidisciplinary approach

Weak Affinity Chromatography (WAC) coupled to Mass Spectrometry (TOF-MS) for drug discovery.

Context: The design of candidate drugs starting from the so-called fragment-like molecules (Fragment-Based Drug Discovery) has strongly modified the generation of therapeutic compounds¹. The method consists in identifying small organic compounds (fragments) that bind proteins associated with human diseases. Based on structural information, the fragments are then linked together or modified to generate complex molecules with high activity and specificity. For the FBDD process, pharmaceutical research in both academia and industry requires biophysical techniques suitable for the identification of fragments of weak affinities (nM-mM) targeting membrane proteins available in scarce amounts. Indeed, many of these proteins that represent key targets for therapeutic compounds have not been successfully targeted by the pharmaceutical industry because of the difficulties in obtaining sufficient amounts of stable and functionally folded proteins. Development of new assays that would be adapted for screening fragment libraries is thus urgently required for lead discovery and optimization as this should revitalize drug discovery programs. In this context, the Techsep team has developed a breakthrough approach that relies on the extreme miniaturization of Weak Affinity Chromatography (nanoWAC)².

This approach relies on the preparation of ultra-miniaturized affinity columns (capillary format) on which the target proteins are immobilized either directly or by means of biomimetic membranes (nanodisc type). The retention of fragments on these affinity columns is directly related to their affinity for the target protein. The miniaturization makes it possible to drastically reduce protein consumption (at the µg scale). The proof of concept of this new approach was performed on soluble proteins and very recently on a membrane protein.



Thesis project:

After further optimization with the adenosine A2A Receptor (AA2AR), one key objective will be the coupling with mass spectrometry (nano-ESI-MS) to reduce the duration of library screening (injection of pool of fragments) and to open the screening to complex mixtures (natural products) or to unpurified synthetic mixtures. The nano-WAC-MS methodology will be extended to fragment screening against the ghrelin receptor GHSR which is a prominent target in biomedicine. Indeed, development of compounds that would modulate ghrelin signaling is actively pursued by the pharmaceutical industry for treatment of obesity, diabetes or drug/alcohol use disorders, but no efficient compound has been identified so far. This work will be carried out in collaboration with other teams specialized in Drug Discovery (Lyon 1), membrane protein expression (Impress Strasbourg) and cellular pharmacology (IBMM Montpellier).

¹ D.A. Erlanson, et al., Twenty years on: the impact of fragments on drug discovery, *Nat Rev Drug Discov.* 15 (2016) 605–619 / J.-P. Renaud, et al., Biophysics in drug discovery: impact, challenges and opportunities, *Nat Rev Drug Discov.* 15 (2016) 679–698.

² L. Lecas, J. Randon, A. Berthod, V. Dugas, C. Demesmay, Monolith weak affinity chromatography for µg-protein-ligand interaction, *J. Pharm. Biomed. Analysis.* 166 (2019), 164-173.