



Screen More With Less

新世代の分注技術を用いたウルトラハイスルーブットな化合物プロファイリング

By Brad Larson, B.A. and Tracy Worzella, M.S., Promega Corporation

イントロダクション

創薬プロセスにおいては、個々の化合物の性質に関する情報をより多く得ることがきわめて重要です。化合物ライブラリーには、しばしば数100万個の化合物が登録されています。このため、スクリーニング施設は、大規模な化合物ライブラリーに対応する能率的かつ費用対効果の高いアプローチとして、微細化フォーマット高密度1536ウェルプレートを採用し始めています。このアプローチを実行するためには、低容量フォーマットにおいても高感度を示す、簡便なアッセイが必要とされます。また、所定容量のアッセイ成分を正確に分注できる方法も必要となります。

プロセスを高密度1536ウェルプレートにまで微細化すれば、化合物の作用を幅広い濃度で解析できるため、より意味のあるデータを得ることができます。

時間およびコストの節約を目的として、化合物のプロファイリングが開始されています。化合物の標的以外の活性および毒性をより正確に予測するため、創薬プロセスのより早期に、標的作用およびADME/Toxアッセイが実施されています。類似構造をもつ多くの化合物を同じプロファイリング手順によってスクリーニングすれば、各化合物クラスが有する作用の予測がより簡単になります。また、高密度プレートを用いてアッセイを実施すれば、スクリーニングに各被験化合物の系列希釈を導入することもできます。このような方法を採用することにより、化合物の幅広い濃度範囲にわたる標的作用を、より正確に知ることができます。本試験では、微細化ウルトラハイスルーブット法による被験化合物プロファイリングへの、プロメガの発光および蛍光HTSアッセイの応用例を示します。

発光および蛍光ハイスルーブットアッセイ

我々は、2種類の化合物クラスから4化合物を選定し、多様な標的作用およびADME/Toxアッセイを用いて、各化合物の作用を評価しました。2化合物はカルシウムチャンネル遮断薬であるニカルジピンおよびニフェジピン、残る2化合物はステロイドであるデキサメタゾンおよびプロゲステロンとしました。各化合物は濃度範囲 0.1μM~100μMで試験し、単独添加条件および併用条件におけるIC₅₀あるいはEC₅₀を算出しました。全アッセイとも1536ウェルフォーマットで実施しました（表1）。

Dual-Glo™ GPCRアッセイ用には、遺伝子を安定的に導入したHEK 293細胞株を、1536ウェルプレート1枚に密度2,500個/ウェルで播種後、アゴニストおよびアンタゴニストアッセイ用の全ウェルに化合物を添加しました。15分後、アンタゴニストアッセイ用のウェルにSKF38393を添加し、プレートを37℃で4時間インキュベートしました。Dual-Glo™ Luciferase Reagentを添加し、プレートを10分間インキュベーション後、ホタルルシフェラーゼの相対発光強度（relative light unit：RLU）を記録しました。最後に、Dual-Glo™ Stop & Glo® Reagentを添加し、同様のインキュベーション後、ウミシイタケルシフェラーゼのRLUを記録しました。

セルベースアッセイ用には、Jurkat細胞を1536ウェルプレート1枚に密度2,500個/ウェルで播種しました。濃度範囲 0~100μMの化合物を添加し、4または18時間インキュベートしました。アッセイ試薬を添加後、プレートを60分間インキュベートし、RFUあるいはRLUを記録しました。

生化学的アッセイ用には、濃度範囲 0~100μMの化合物を1536ウェルプレート1枚に添加後、酵素/基質混合液を添加しました。続いて、NADPH（P450-Glo™ Assay）またはATP（Kinase-Glo® Plus Assay）を添加し、室温で所定時間インキュベートしました。最後に、所定の検出試薬を添加し、各アッセイ用のプロトコルに従って各プレートをインキュベーション後、RLUを記録しました。

表1. BioRAPTR FRD® Workstationによる分注容量

CytoTox-ONE™ アッセイでは、検出試薬4μlを添加し、その10分後に停止試薬2μlを添加することにより、蛍光シグナルを安定化させます。Dual-Glo™ アッセイでは、Dual-Glo™ Luciferase Reagentを添加後、ホタルルシフェラーゼの発光値を測定します。続いて、Stop & Glo® Reagentを添加後、ウミシイタケルシフェラーゼの発光値を測定します。

	Apo-ONE® Assay	CytoTox-ONE™ Assay	CellTiter-Glo® Assay	Caspase-Glo® 3/7 Assay	Dual-Glo™ GPCR Assay	P450-Glo™ Assay	Kinase-Glo® Plus Assay
細胞	2μl	2μl	2μl	2μl	1μl	—	—
被験化合物	2μl	2μl	2μl	2μl	2μl/0.5μl	2μl	2μl
酵素/基質混合液	—	—	—	—	—	2μl	2μl
NADPH/ATP	—	—	—	—	—	1μl	1μl
検出試薬	4μl	4μl/2μl	4μl	4μl	3.5μl/3.5μl	5μl	5μl

非接触型の分注機器

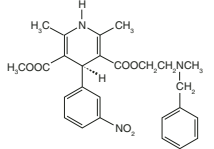
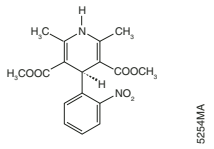
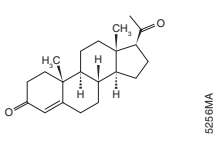
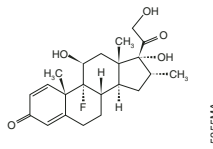
1536ウェルマイクロプレートへの細胞播種、化合物、ATP、酵素/基質および試薬の添加には、Aurora Discovery BioRAPTR FRD™ Workstationを使用しました。BioRAPTR FRD™は、独自の自動化液体分注機器クラスに属する代表的な製品であり、非接触型の迅速なon-the-fly 分注技術により、液体を96、384、1536および3456ウェルプレートに分注できます。この種の技術を用いて分注できる容量は、一般に100nl~60μlの範囲です。

本試験で使用した分注容量は500nl~5μlでした。表1に、各アッセイ時のプレートへの正確な添加容量を示します。

本試験を1536ウェルフォーマットで実施したことによって、1枚のアッセイプレート上で、4化合物すべてを、多様なアッセイによりプロファイリングできました。実施したアッセイは、CYP450アイソフォーム5種類の混合アッセイのほか、Apo-ONE®、CytoTox-ONE™、CellTiter-Glo®、Caspase-Glo® 3/7 Assayなどです。図1に、その実施例を示します。

表2. 個々の微細化プロファイリングアッセイから得られたデータ

特に断りのない限り、結果はμM濃度にて表記

	 5253MA	 5254MA	 5256MA	 5255MA
	Nicardipine	Nifedipine	Progesterone	Dexamethasone
Kinase-Glo® Plus Assay PKA Assay	0.075μM	0.094μM	>100μM	>100μM
Dual-Glo™ GPCR Assay Agonist Assay	No Induction	No Induction	No Induction	No Induction
Antagonist Assay	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition	No Inhibition
Apo-ONE® Assay 4-Hour Incubation	No Effect	No Effect	>100μM	>100μM
18-Hour Incubation	>10μM	>10μM	>10μM	>10μM
CytoTox-ONE™ Assay 4-Hour Incubation	No Effect	No Effect	No Effect	No Effect
18-Hour Incubation	No Effect	No Effect	No Effect	No Effect
CellTiter-Glo® Assay 4-Hour Incubation	Toxic >10μM	Non-Toxic	Non-Toxic	Non-Toxic
18-Hour Incubation	Toxic >10μM	Toxic >50μM	Toxic >50μM	Toxic >50μM
Caspase-Glo® 3/7 Assay 4-Hour incubation	5.728μM	2.388μM	5.133μM	5.653μM
18-Hour Incubation	0.1513μM	0.0939μM	0.3237μM	0.0986μM
P450-Glo™ Assay CYP1A2 Assay	14.14μM	1.2μM	No Inhibition	10.6μM
CYP2C9 Assay	0.06μM	0.3μM	0.32μM	1.0μM
CYP3A4 Assay	1.1μM	2.1μM	No Inhibition	>100μM
CYP2C19 Assay	2.3μM	2.5μM	5.1μM	>100μM
CYP2D6 Assay	6.2μM	8.5μM	>100μM	53.6μM

Inhibitory/Toxic Effects <10μM Non-inhibitory/Non-toxic Effects

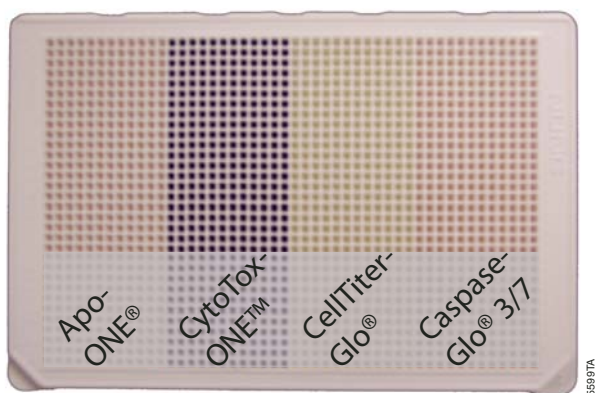


図1. 1536-ウェルプレートのレイアウト

1536-ウェルプレートで複数化合物をプロファイリングする場合のレイアウト例

結果

このようなプロファイリングアッセイにより、各化合物の IC_{50} または EC_{50} 値を算出し、各種アッセイにおける作用を確認しました（表2）。化合物クラス内およびクラス間で認められた傾向を視覚的にとらえやすいよう、結果を2群に分類しました。第1群は、強力な阻害または毒性作用を示す薬物（ IC_{50} または EC_{50} 値が $10\mu M$ 未満と規定）としました。第2群は、阻害作用が弱い、あるいは全く認められない薬物としました。各群を表中で色分け表示しました（強い作用を示したものを赤、弱いまたは全く作用を示さなかったものを緑で表示）（表2）。色分け表示したことにより、同一クラス内の化合物が、本プロファイリングにて実施した全アッセイについて同様の作用傾向を示すことがわかります。また、化合物クラス間では、作用の明確な差が認められます。

考察

データが示すように、スクリーニングプロセスの早期に、標的作用およびADME/Toxアッセイの両方を含むプロファイルスクリーニングを実行すれば、被験化合物に関する豊富な情報を得ることができます。個々のプロファイルはすべて、化合物の開発を進めるか否かの決定に役立てることができるため、時間とコストの両方を節約することができます。類似構造をもつ多くの化合物を同じプロファイリング手順にてスクリーニングすれば、各化合物クラスがもつ作用をより簡単に予測できるようになります。プロセスを高密度1536ウェルプレートにまで微細化すれば、化合物の作用を幅広い濃度で解析できるため、より意味のあるデータを得ることができます。また、複数のアッセイを1枚のプレートで実行できるほか、1種類のスクリーニングから得られる情報量も増大します。プロメテックのホモジニアスなHTSアッセイと次世代型の低容量液体分注機器の組み合わせは、ウルトラハイスループット化合物プロファイルを現実化するための理想的なソリューションです。

プロトコル

- ◆ Kinase-Glo® Plus Luminescent Kinase Assay Technical Bulletin #TB343, Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/tb343/tb343.html
- ◆ Dual-Glo™ Luciferase Assay System Technical Manual #TM058, Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/tm058/tm058.html
- ◆ Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay #TB295, Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/tb295/tb295.html
- ◆ CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay Technical Bulletin #TB306, Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/tb306/tb306.html
- ◆ CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Technical Bulletin #TB288, Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/tb288/tb288.html
- ◆ Caspase-Glo® 3/7 Assay Technical Bulletin #TB323, Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/tb323/tb323.html
- ◆ P450-Glo™ Assays Technical Bulletin #TB325, Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/tb325/tb325.html

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Kinase-Glo® Plus Luminescent Kinase Assay	10ml	V3771	19,800
Dual-Glo™ Luciferase Assay System	10ml	E2920	30,000
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay	1ml	G7792	6,000
CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay	200–800 assays	G7890	16,000
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	10ml	G7570	12,000
Caspase-Glo® 3/7 Assay	2.5ml	G8090	16,000
P450-Glo™ CYP1A2 Assay	10ml	V8771	17,000