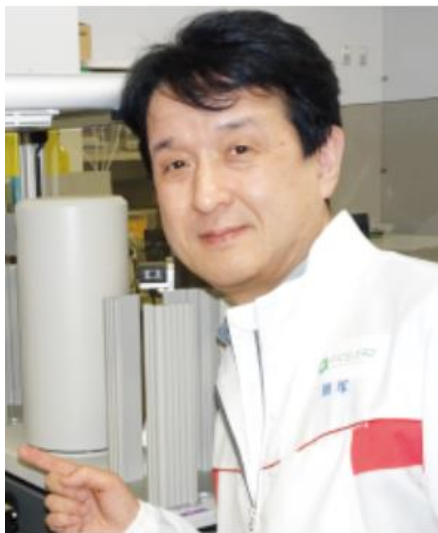


「質量分析計を用いた ハイスループットスクリーニング」



演者: Axcelead Drug Discovery Partners株式会社
医薬探索研究
HTSリード・主席研究員 猶塚昭彦

質量分析計を用いた ハイスループットスクリーニング

Axcelead Drug Discovery Partners株式会社

医薬探索研究

HTSリード・主席研究員 猶塚昭彦

日時：1月27日（水）12：00 - 12：30

創薬戦略

ターゲット
選抜

アッセイ系
構築

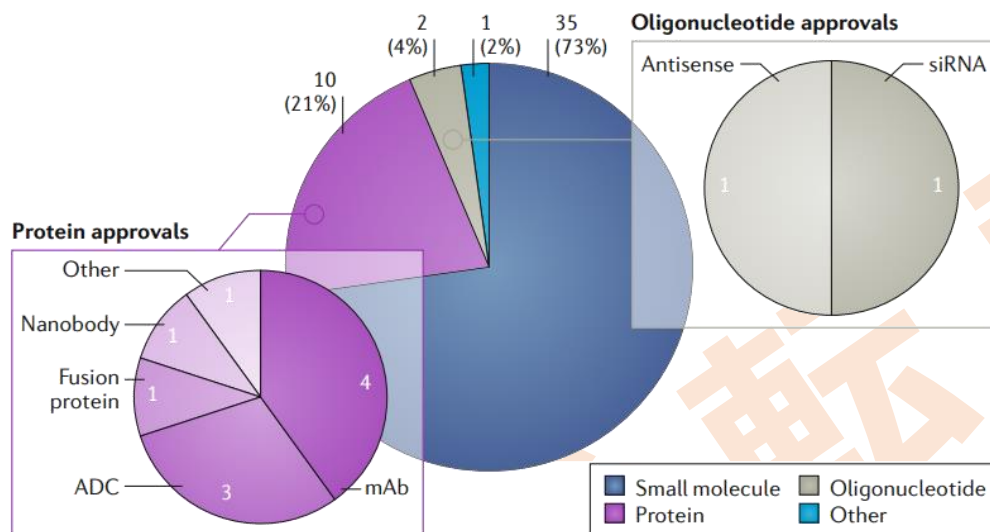
ヒット探索

リード
創出

リード
最適化

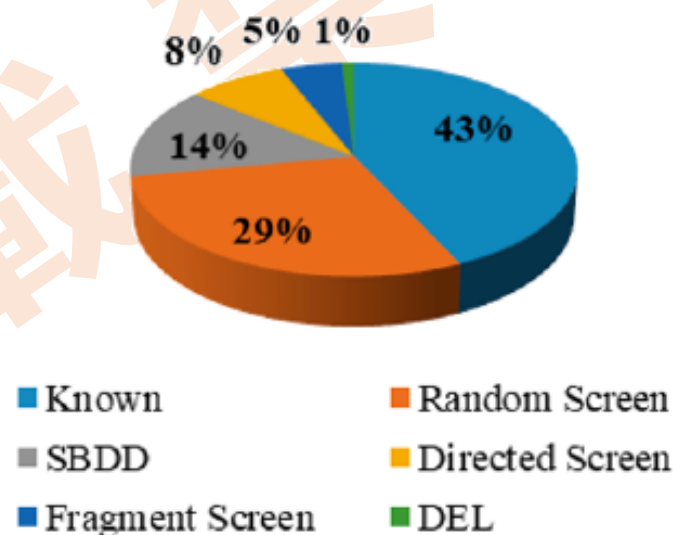
IND

2019年 FDA 承認薬 (48個)



Nature Reviews Drug Discovery, 2020, 19, 79-84

リード創出戦略 (Clinical candidates)



J.Med.Chem, 2018, 61, 9442-9468

- FDA承認薬の73%が低分子薬
- 新規低分子創薬における最適化研究のリード化合物の多くはスクリーニングから見出されており、その探索手法は多様化している
- ヒット探索は創薬においてゼロからイチを生み出すプロセスとして重要な位置づけ

ヒット探索の重要因子

ターゲット
探索・評価

ヒット化合物の
同定

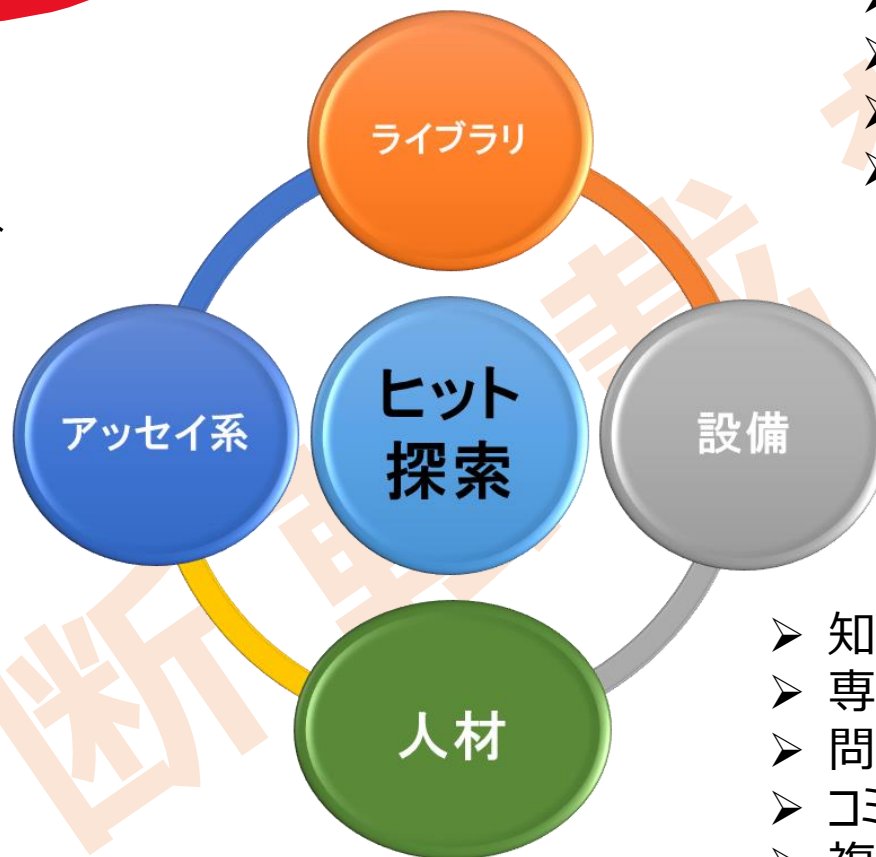
リード化合物の
創製

リード化合物の
最適化

最適化化合物
の精査

IND用
試験

- 質、スピード、コスト
 - 堅牢性、スループット
 - 疾患関連性
- Phenotypic rule of three(細胞、刺激剤、リードアウト)
- 高次評価、解析



- Diversity
- Druglikeness
- 数 (>1.0 million)
- 設計、合成、購入

- ロボティクス
- 測定装置
- 分注装置
- システム
- メンテナンス

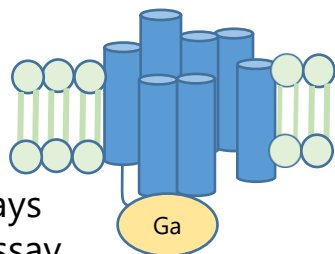
- 知識、スキル、経験
- 専門性、信頼性
- 問題解決力
- コミュニケーション
- 複数部門のコラボレーション

- 製薬会社オリジンのHTSプラットフォームで皆様のヒット化合物探索をサポート

ヒット探索の重要因子：アッセイプラットフォーム

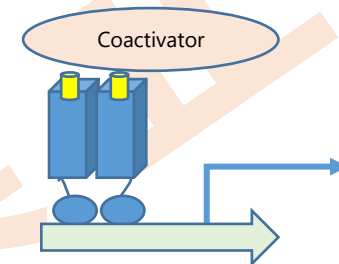
GPCR

cAMP assay
Ca²⁺ flux assay
Reporter gene assay
Arrestin/Internalization assays
Binding assay, Impedance assay



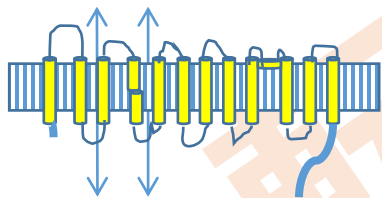
Nuclear receptor

Binding assay
Cofactor recruit assay
Reporter gene assay
Nuclear translocation assay



Ion channel / Transporter

Ion influx assay
Membrane potential
Electrophysiology
Substrate uptake
Binding



PPI (protein-protein interaction)

TR-FRET/Alpha screen assay
ELISA
NanoBit/BRET
Two-hybrid assay
Biophysical assay (e.g. Surface Plasmon Resonance)

Enzyme

Direct assay

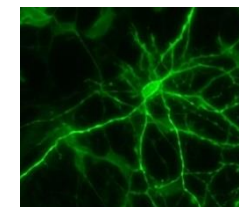
- Absorbance, fluorescence, FRET
- ELISA
- Label-free assay (e.g. HT-MS)

Indirect assay

- Coupling assay (e.g. ATP by luciferase)

Phenotypic screening

High-content assay
Reporter gene assay
Cell growth
qPCR
CRISPR Cas KO screen etc.



ヒット探索の重要因子：ライブラリ

- ▶ 製薬会社オリジンのライブラリで化合物探索をサポート

Axcelead libraries > 1,500,000 cpds

Diversity,
Chemical Structure
Solubility data,
Cell toxicity data
Activities data

Diversity Library

Focused Library
41K

Single
200K

Pooled
720K

Pool: 10 different cpds
per one sample

- ▶ Target class
 - Kinase : 8,500
 - GPCR : 9,300
 - Protease : 401
 - PPI : 4,100
 - RNA : 6,400
 - RNA splicing (FY21) : 1,280
- ▶ Macrocyclic: 4,600
- ▶ Natural product: 3,700
- ▶ Covalent: 3,800
- ▶ Phenotypic Sc. Annotation: 7,000
- Covalent fragment (FY21): 50

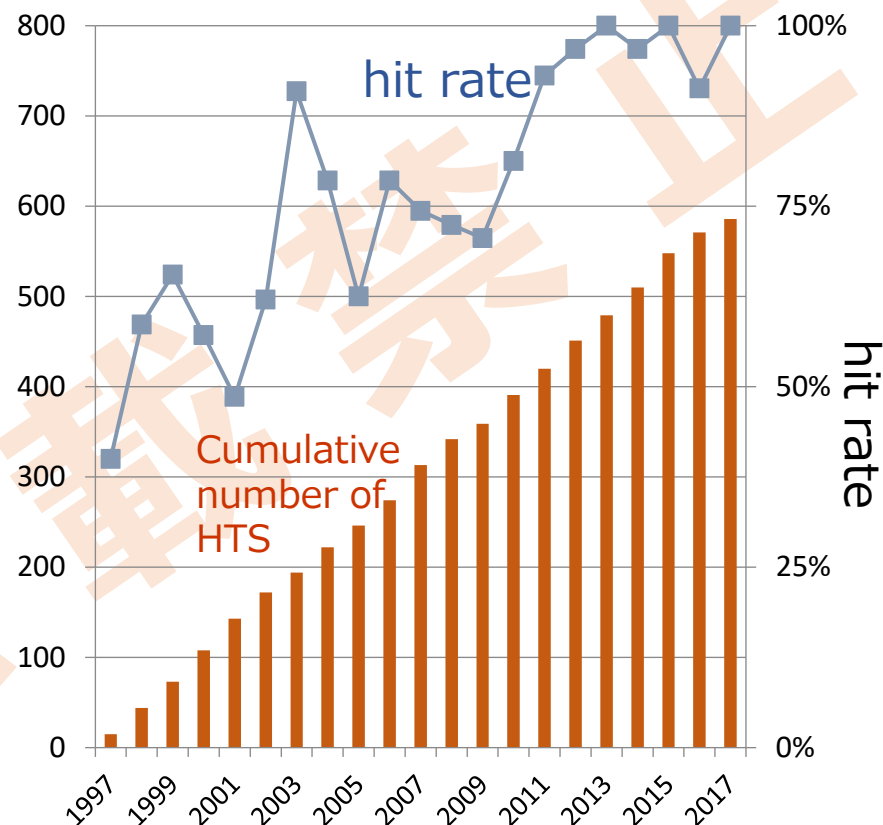
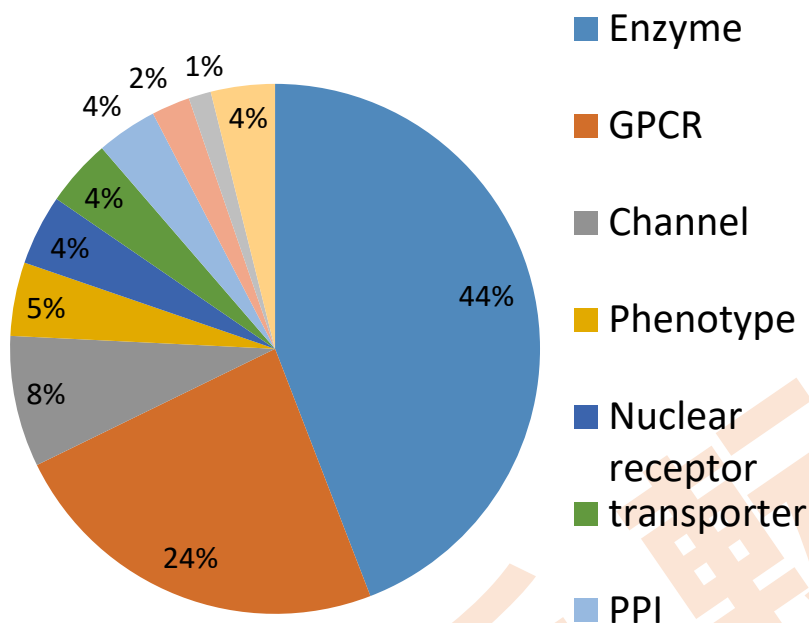
- ▶ ニーズに合わせた
継続的なライブラリー作成

- Pilot screening : 2,560
- Clean-A : 10,240
- Clean-B : 44,180
- CNS : 18,900
- sp³rich and chirality rich: 7,500
- Phenotypic Sc. : 22,000
- Fragment (Ro3.5): 11,000
- Extended rule of 5 : 6,400
- Diversity set A : 22,000
- Diversity set B : 18,540
- Core Library (FY21) : 30,000

- Pilot screening: 32,000
- # 1 : 292,000 (High Priority)
- # 2 : 396,000

ハイスルーputスクリーニング実績

Target class



製薬企業で蓄積した膨大な創薬データを基に、最適なヒット探索プランをご提案

- 600以上： 複数のターゲットクラスに対して行ったHTSの実績
- 90%以上： HTS のヒット率

Post-HTSサービス

Hit Identification

Lead Generation



Advanced
Hit
Generation
service

典型的な
HTS service
(Ready-Made)

HTS

Hit
Profiling

Hit
Expansion

Quality Hit

高品質・多様なライブラリから
プロファイリングされたヒット化
化合物の選出

Advanced Hit

短期間での初期SAR取得およびメド
ケム視点での LG/LOに進めるに適し
たDrug-likeなヒット化合物選出

Active Hit

(一般的なReady-Madeサービスではここまで)

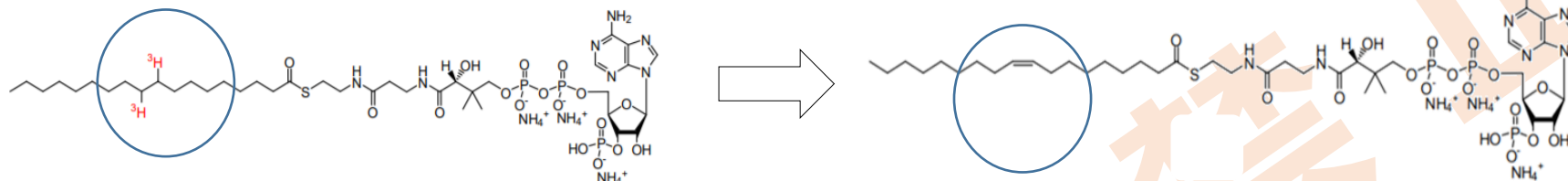
質量分析計のHTS適用

質量分析計 (MS)を用いたサービス

- ターゲットベースHTSへのMSの活用
- Affinity Selection-Mass Spectrometry(AS-MS)を用いたHTSサービス

質量分析計 (MS) のスクリーニングへの応用

(反応例) Stearoyl-Coenzyme A Desaturase
Agilent ホームページより引用



Non-labelで測定できる

- 天然基質・生成物の直接測定 (ラベルフリー検出)
- 質量分析装置による僅かな分子量変化を検出可能
 - ・放射線ラベル・カップリングアッセイの設定が不要
 - ・アッセイキットなど的高額な試薬代が不要
- アッセイ系構築が難しいターゲット*のスクリーニングが可能
(*特異的抗体がない/蛍光・発光分析技術を使用できない)
- 化合物による偽陽性、偽陰性を最少限に抑えることができる



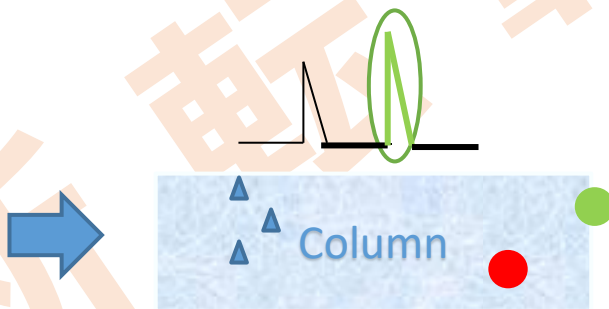
RapidFire-MS(RF-MS)の特徴 (LC-MSとの比較)

超高速オンライン固相抽出システム

RapidFire™ /Agilent Technologies,Inc.



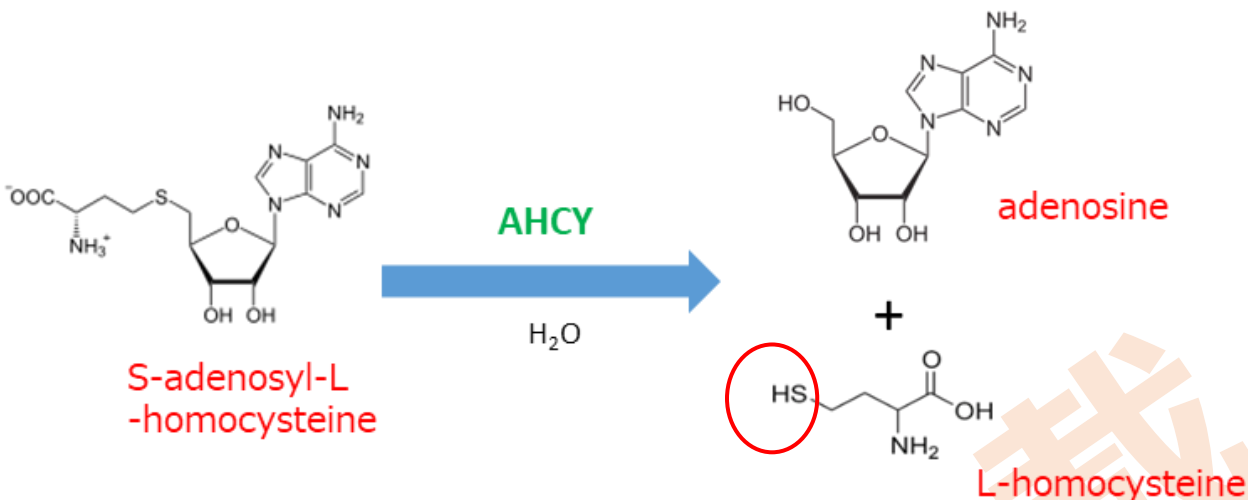
8~10sec / インジェクション



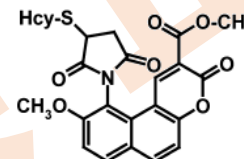
1~2分 / インジェクション

➤ 従来のLC-MS法と比較して10倍以上の処理能力

(実例) AHCY inhibitor – HTS



Thiol reagent



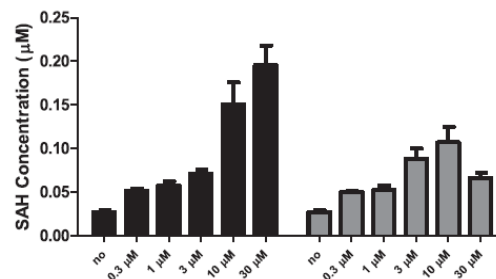
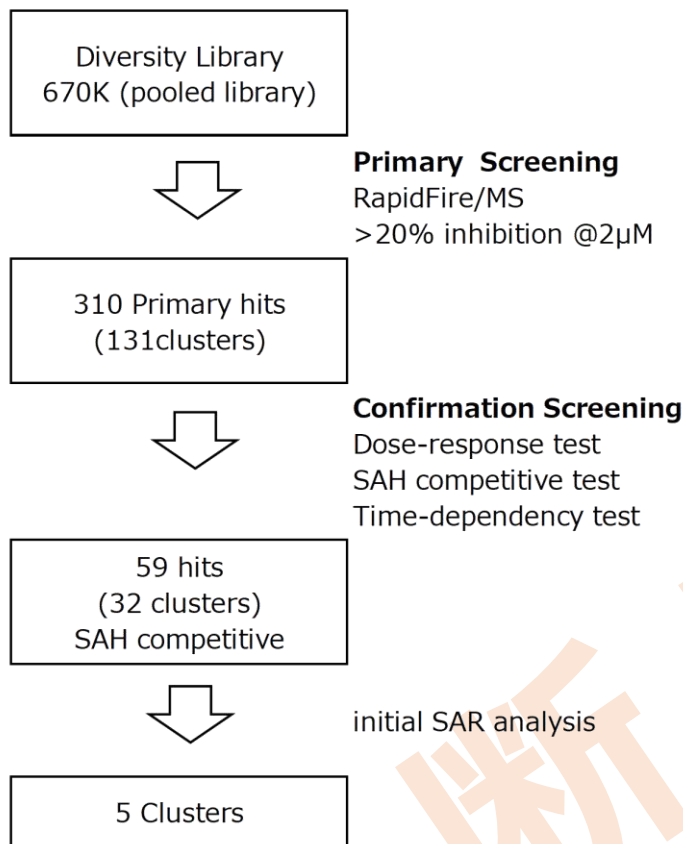
$Ex_{max} = 384 \text{ nm}$

$Em_{max} = 513 \text{ nm}$

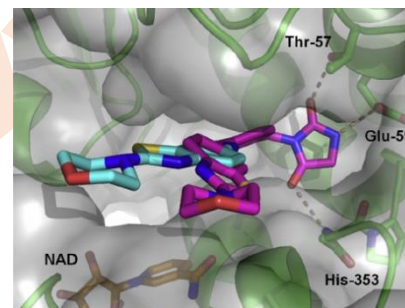
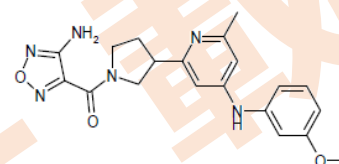
| | Method | coments | Pros. | Cons. |
|---|---------------|--|---|--|
| | Thiol reagent | Homocysteine detected using SH reagent | High-throughput High sensitivity | Autofluorescence |
| ⊙ | RapidFire/MS | Direct measurement adenosine homocysteine | Direct measurement (few false positives) | Assay development are complex and time consuming |

➤ 自家蛍光物質による偽陽性・偽陰性の出現を回避

(実例) AHCY inhibitor – HTS

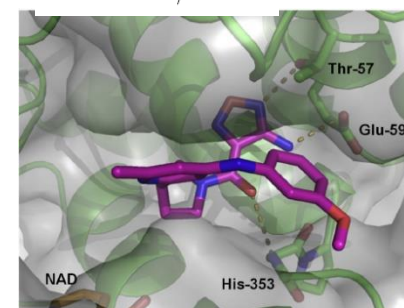
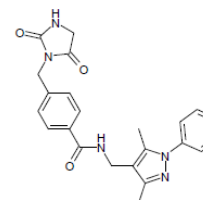
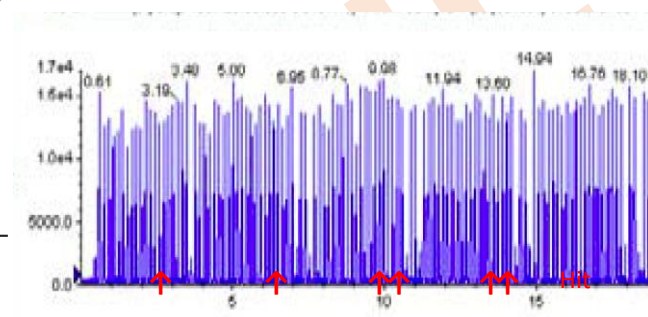


細胞上清中のSAHレベル



ヒット化合物とAHCY複合体の結晶構造

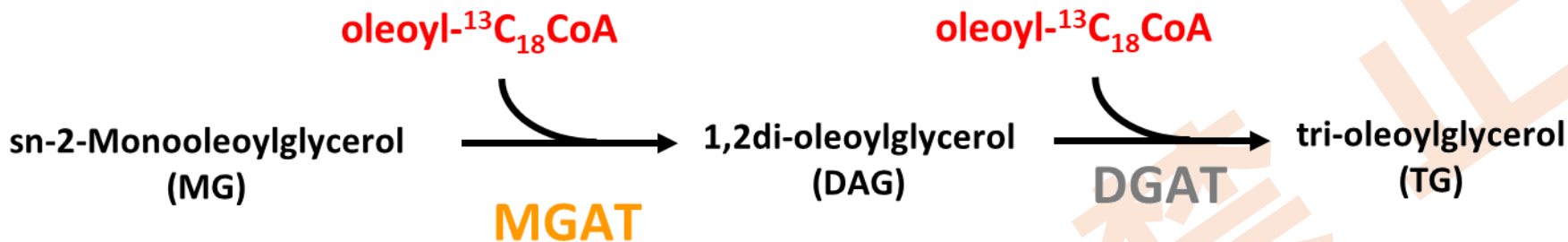
➤ RapidFire-MS system



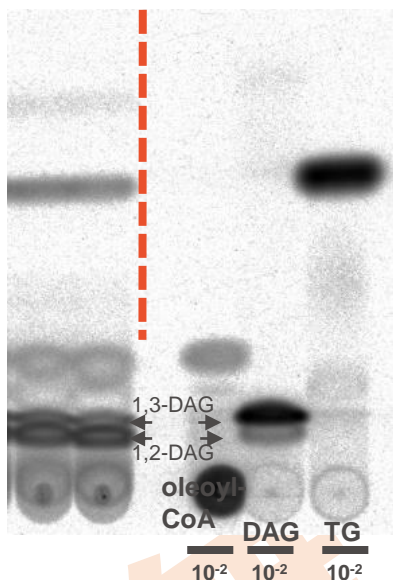
Uchiyama N, Dougan DR, Lawson JD, Kimura H, Matsumoto SI, Tanaka Y, Kawamoto T. Identification of AHCY inhibitors using novel high-throughput mass spectrometry. Biochem Biophys Res Commun. 2017 Sep 9;491(1):1-7.

➤ Pooled library (10化合物混合) を効果的に組み合わせることで短期間にHTSを実施

(実例) MGAT inhibitor – HTS



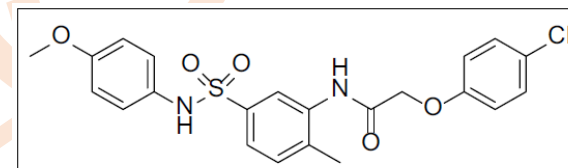
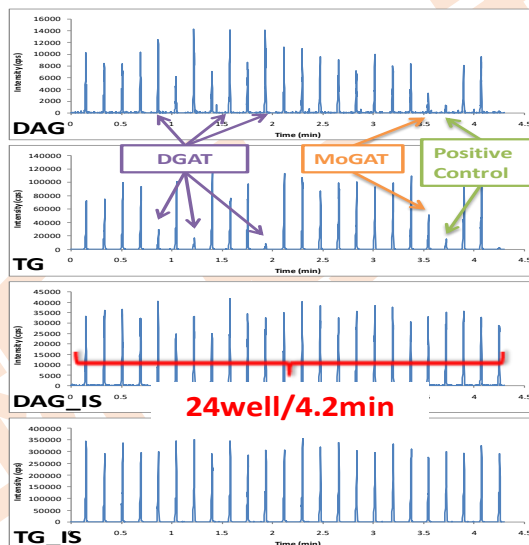
TLC評価系



アッセイ精度

DAG $Z' 0.71 \pm 0.06$

TG $Z' 0.83 \pm 0.06 (N=396\text{plate})$



Human intestinal Microsome
Human MGAT2
Human MGAT3

IC_{50}
21nM
83nM
>30,000nM

Adachi R, Ishii T, Matsumoto S, Satou T, Sakamoto J, Kawamoto T. (2017) Discovery of Human Intestinal MGAT Inhibitors Using High-Throughput Mass Spectrometry. SLAS Discov. 2017 Apr;22(4):360-365.

- ラジオアイソトープを使わない中性脂肪合成酵素阻害剤のHTS
- スクリーニング期間とスクリーニングコストの大幅な削減に貢献

RapidFire-MSを使ったHTS

RF-MS/HTS実績

RapidFire-MS/MS(API-4000)
酵素アッセイ系を中心に

- 40以上のアッセイ系の構築
- 30以上のHTSを実施



| Target class | Numbers |
|----------------|---------|
| Hydrolase | 8 |
| Transferase | 8 |
| Ligase | 3 |
| Protease | 3 |
| Deacetylase | 2 |
| Oxidoreductase | 2 |
| Decarboxylase | 1 |
| Esterase | 1 |
| Isomerase | 1 |
| Lipase | 1 |
| | 30 |

➤ RapidFire-MSにより、系構築が難しいターゲットのHTSが可能になった

(まとめ) MSを用いたスクリーニングの有用性

➤ RapidFire-MSを用いたHT-MSの特徴

- アッセイ系構築が困難なターゲットのスクリーニングに有用
- 偽陽性、偽陰性を最少限に抑え、質の高いHTSを実現
- Pooled libraryを組み合わせて短期間にHTSを実施

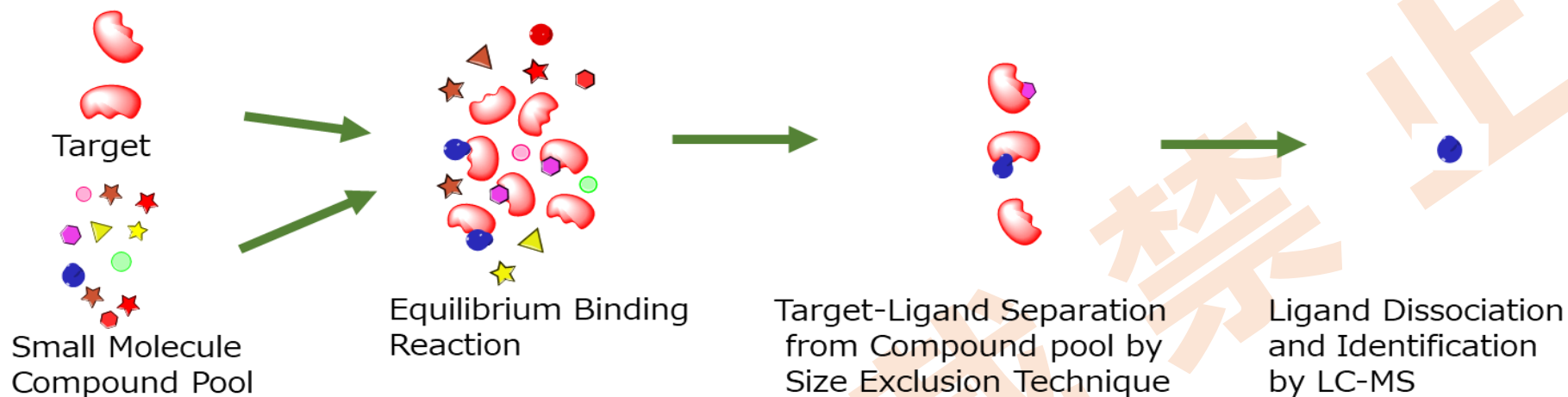
➤ ASMS-HTS

- 活性測定系が構築できないターゲットに有用な技術 (RNA、DNA、PROTAC-ligand探索など)
- ターゲットに合わせたフォーカスライブラリーを利用可能
- Phenotypic assayやBiophysical assay(SPR、ITC、X-ray)の活用によりHTSからシームレスに化合物最適化へ展開

質量分析計 (MS)を用いたサービス

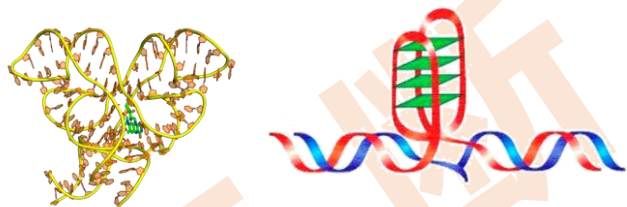
- ターゲットベースHTSへのMSの活用
- Affinity Selection-Mass Spectrometry(AS-MS)を用いたHTSサービス

Affinity Selection-Mass Spectrometry (AS-MS)

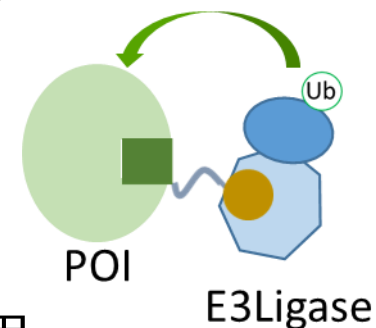


◆ 活性測定系が構築できないドラッグターゲットに応用できるスクリーニング技術

- 生化学的アッセイ系構築が或いはHTS困難なターゲットへの適応
RNA・DNA・転写因子・不活性型酵素・Pseudokinaseなど



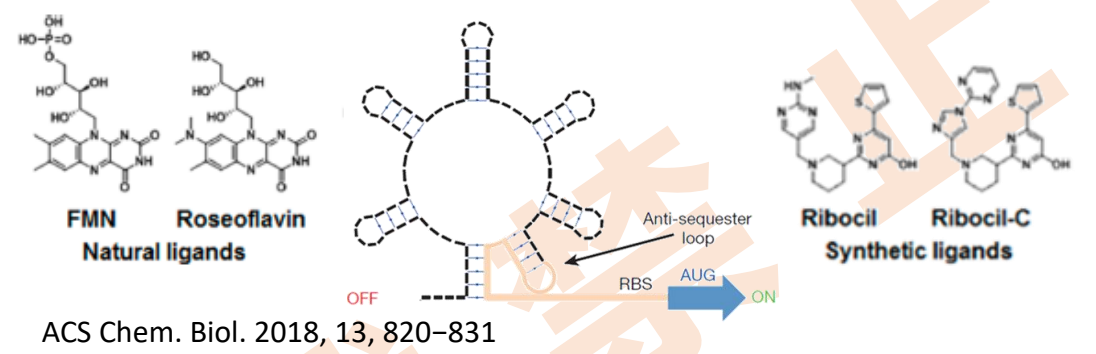
- Protein knock down (PROTAC)手法のLigand探索への応用



➤ 活性測定系が構築できないドラッグターゲットに応用できるスクリーニング技術

(実例) ASMS-HTS for FMN-riboswitch

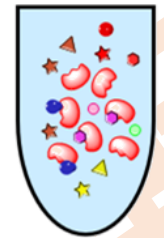
- Riboswitch は mRNA の非翻訳領域に存在する配列
- リボスイッチに低分子代謝産物 (FMN) が直接結合することによって RNA の三次構造が変化し遺伝子発現を制御



評価ライブラリー

- Diversity library
- RNA focused library

1. Incubation between target molecule and pooled compounds

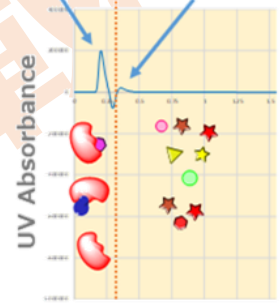


2. Separation of compound-target complex



Size Exclusion Column

Complex Free compound

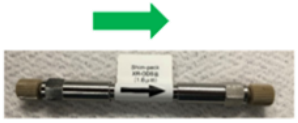


Elution time (min)

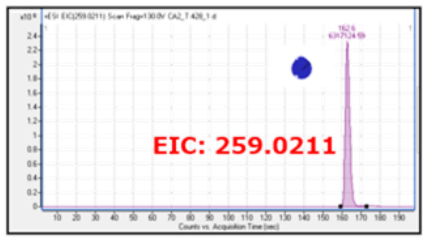
3. Separation of compound from complex by heat and acidic mobile phase



4. Separation of compound by Reversed-phase column



Reversed-Phase Column



Elution time (min)

5. Identification of compound by Q-TOF MS (Agilent G6550)



ASMS-HTS for FMN-riboswitch

ハイスルプットスクリーニング

Diversity Library: 140,633 cpds

RNA focus Library: 6,400 cpds

FMN riboswitch RNA 5 μ M

Compound conc.: each 0.5 μ M

Assay format: 400 cpds/pool

再現性試験

Counter Screen by FMN scramble

Diversity Library hits: 480 (Hit rate: 0.34%)

RNA focused hits: 34 (Hit rate: 0.53%)

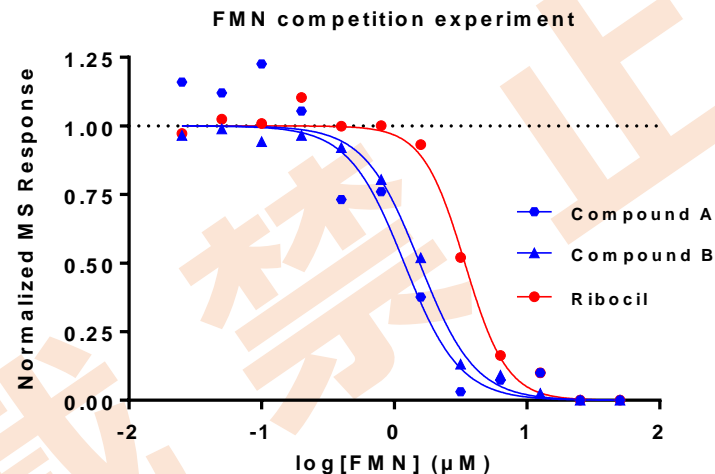
確認試験/用量依存性試験

Diversity Library : 72 hits

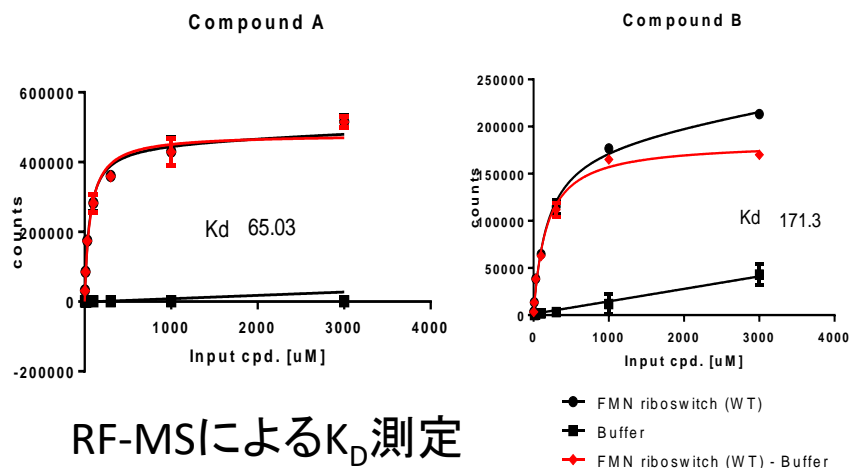
RNA focus Library : 7 hits

結合定数 (K_D) 決定

(Speedscreen by RF-MS)



FMNに対する競合試験



RF-MSによる K_D 測定

➤ ASMSシステムは、RNA binder 探索にも有用

ASMS-HTSをサポートする統合型プラットフォーム

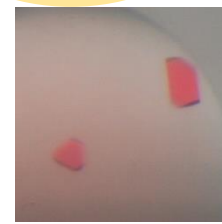
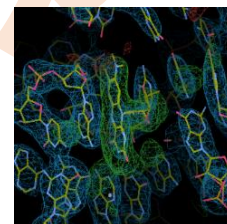
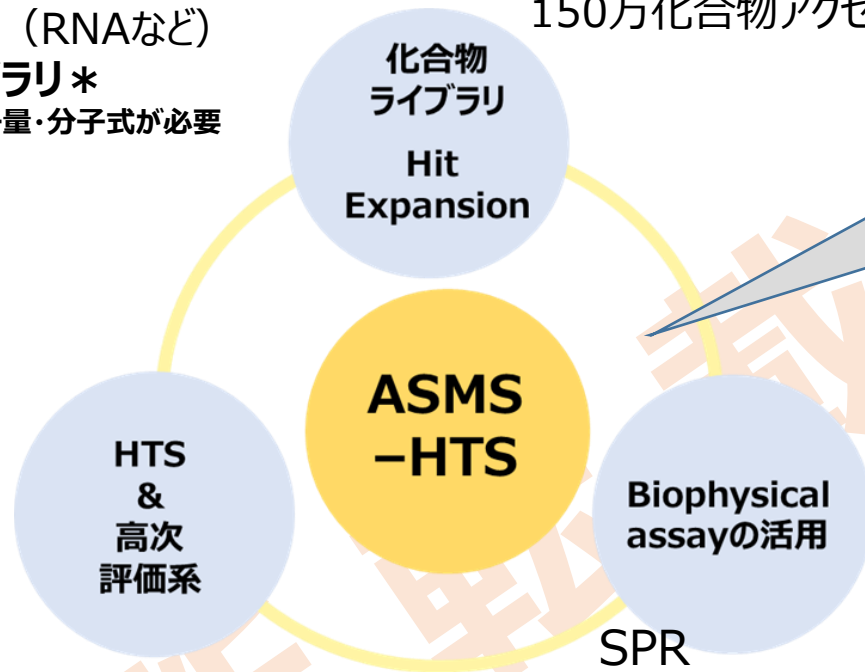
◆ 様々なライブラリーにアクセス

- Diversityライブラリ
- Focusライブラリ (RNAなど)
- お客様のライブラリ*
*化合物の分子量・分子式が必要

◆ Hit Expansionサービス

Hit chemotypeの周辺拡大
150万化合物アクセス可能

ASMS-HTSから
化合物最適化へ
シームレスな移行



FMN-RS: 結晶構造
(in house data)

◆ 生化学アッセイとの組み合わせによる合理的なHTSと高次評価系の提案

- Phenotypic assay (細胞系)
- Biochemical assay

SPR

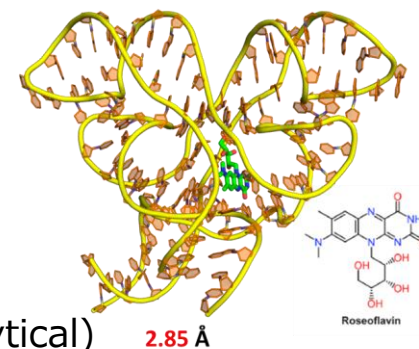


Biacore S200
(Cytiva)

ITC



iTC200
(Malven Panalytical)



➤ ヒット化合物の最適化を強力にサポートいたします

(まとめ) MSを用いたスクリーニングの有用性

➤ RapidFire-MSを用いたHT-HTS

- アッセイ系構築が困難なターゲットのスクリーニングに有用
- 偽陽性、偽陰性を最少限に抑え、質の高いHTSを実現
- Pooled libraryを組み合わせて短期間にHTSを実施

➤ ASMS-HTS

- 活性測定系が構築できないターゲットに有用な技術
(RNA、DNA、PROTAC-ligand探索など)
- ターゲットに合わせたフォーカスライブラリーを利用可能
- Phenotypic assayやBiophysical assay(SPR、ITC、X-ray)
の活用によりHTSからシームレスに化合物最適化へ展開

統合型HTSプラットフォーム

ターゲット
探索・評価

ヒット化合物の
同定

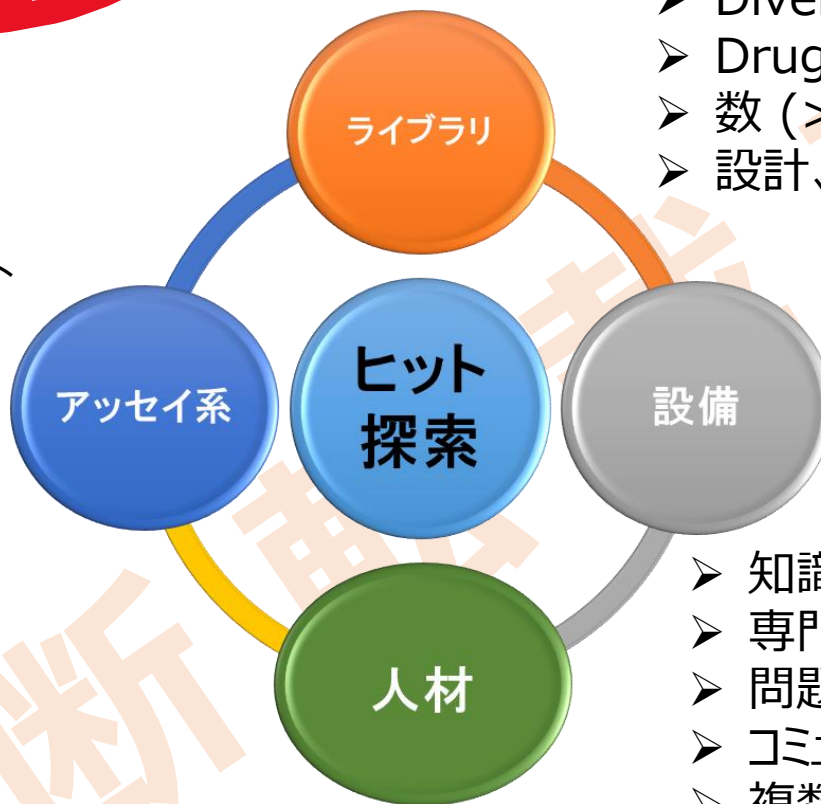
リード化合物の
創製

リード化合物の
最適化

最適化化合物
の精査

IND用
試験

- 質、スピード、コスト
 - 堅牢性、スループット
 - 疾患関連性
- Phenotypic rule of three(細胞、刺激剤、リードアウト)
- 高次評価、解析



- Diversity
- Druglikeness
- 数 (>1.0 million)
- 設計、合成、購入

- ロボティクス
- 測定装置
- 分注装置
- システム
- メンテナンス

- 知識、スキル、経験
- 専門性、信頼性
- 問題解決力
- コミュニケーション
- 複数部門のコラボレーション

- 持続的なアッセイプラットフォームの改良とこれまでに蓄積した経験を基に、高品質なヒット化合物情報をご提供いたします！ぜひお声がけください

We are Your Best Partner

**共に手を取り
創薬を通して
希望ある未来を創りたい**

Axcelead Drug Discovery Partners

<https://www.axcelead.com>

Contact@axcelead.com