

235 種類の化合物ライブラリの ハイスループットスクリーニングアッセイによる 可溶性エポキシド加水分解酵素阻害剤候補の 探索

著者

David Hoffman, PhD
Scientific Director,
Contract Services Division
Cayman Chemical

Melissa Parsey, PhD
Scientific Content Developer
Cayman Chemical

Agilent contact: Donna Levy
donna.levy@agilent.com

主な特長

- 可溶性エポキシド加水分解酵素 (sEH) 阻害剤は、炎症および心血管疾患に対する有望な治療手段です。
- 低分子阻害剤を同定するために、自動化されたハイスループットスクリーニング (HTS) プラットフォームを開発しました。最小限のサンプル量で、数週間ではなく数日で多数の化合物を試験することが可能です。
- Cayman の抗炎症スクリーニングライブラリ中の 235 種類の化合物すべてをスクリーニングしました。このアプローチを用いて 36 種類の化合物が sEH 阻害剤候補として同定されました。
- このハイスループットスクリーニングプラットフォームにより、創薬が加速されます。他の酵素活性アッセイにも幅広く適用可能で、Cayman や他の化合物ライブラリを使用して実行できます。

はじめに

エポキシエイコサトリエン酸 (EET) は、CYP450 エポキシゲナーゼによって形成されるアラキドン酸のシトクローム P450 (CYP450) 代謝産物であり、4 つの位置異性体 (5(6)-、8(9)-、11(12)-、14(15)-EET) があります。¹ EET には、幅広い抗炎症効果と心臓保護効果があることが示されています。² しかし EET は可溶性エポキシド加水分解酵素 (sEH) によって急速に、それぞれ対応するジヒドロキシエイコサトリエン酸 (DiHETrE) に加水分解され、この変換により生物学的活性が著しく失われます。したがって EET の蓄積を増加させるために sEH 阻害剤を使用することは、炎症性疾患および心血管疾患の治療における有望な戦略です。

このアプリケーションノートでは、自動化とスループット向上に適応した、Cayman の可溶性エポキシド加水分解酵素阻害剤スクリーニングアッセイキットの改良版を使用したハイスループットスクリーニング (HTS) について説明します。このアッセイを自動化することにより、生成と解析に通常 1 ~ 2 週間かかるデータを 3 日間で取得できます。さらに、自動化により再現性が大幅に向上し、アッセイ間およびアッセイ内の両方でばらつきが減少します。このスクリーニングでは、生物学的活性のある構造的に多様な抗炎症化合物 235 種類からなる Cayman の抗炎症スクリーニングライブラリを評価しました。このスクリーニングライブラリを選択したのは、炎症治療のターゲットとしての sEH に関連性が高いためです。

メソッド

化合物ライブラリと対照

sEH 阻害剤のハイスループットスクリーニングは、Cayman Chemical のハイスループットスクリーニング施設で実施しました。Cayman の抗炎症スクリーニングライブラリには、3 つの 96 ウェルチューブブラックに DMSO 中の 10 mM 原液として供給される 235 種類の化合物が含まれています。化合物はハイスループットスクリーニング用に、単一のマッピングされた 384 ウェルソースプレートに再フォーマットしました。ソースプレートから 7 枚のバーコードラベル付き希釈プレートを作成しました。各プレートには溶媒、陽性対照、および 32 種類の化合物に対する 10 pt ½ 対数濃度応答カーブが含まれます。追加の希釈プレートを、16 種類の化合物に対して上記のように調製しました。DMSO を溶媒 (陰性) 対照として使用し、sEH 阻害剤 AUDA を陽性対照として使用しました。

自動化されたハイスループットスクリーニングアッセイ

このハイスループットスクリーニングアッセイには、3 つのロボット機器で構成される完全自動化プラットフォームを使用しました (図 1)。すべての分注手順に、384 ST ピペッティングヘッドを取り付けた Agilent Bravo Automated Liquid Handling Platform を用いました。アッセイプレートと希釈プレートは別々のスタッカーに保管し、必要に応じて Agilent BenchCel マイクロプレートハンドラーを使用して Bravo のピペッティングデッキに配置しました。データ取り込みのために、アッセイプレートを Bravo のデッキから Agilent BioTek Synergy Neo2 ハイスループット・プレートリーダーのステージに移しました。

黒色のバーコードラベル付き 384 ウェル非結合プレートで試験化合物を 2 回分析しました。まず、ヒト組換え sEH を sEH アッセイバッファで希釈し、この溶液 39.5 µL をアッセイプレートの各ウェルに移しました。次に、試験化合物 0.5 µL を希釈プレートからアッセイプレートに移しました。反応成分を室温で 5 分間プレインキュベートしました。

酵素反応は、10 µL の sEH 基質 PHOME の添加によって開始させました。Agilent BenchCel 4R マイクロプレートリーダーを用いて、25 °C に設定した Synergy Neo2 マルチモードマイクロプレートリーダー上にアッセイプレートを直ちに配置しました。カインेटイクス測定は、360 nm 励起フィルタと 460 nm 発光フィルタ (360 励起/460 発光) を使用して、3 分ごとに合計 20 分間実施しました。終了後、アッセイプレートと希釈プレートは別々のスタッカーに保管しました。酵素および基質原液、ならびに阻害剤および基質ピペットチップはプレートごとに新しいものを使用しました。

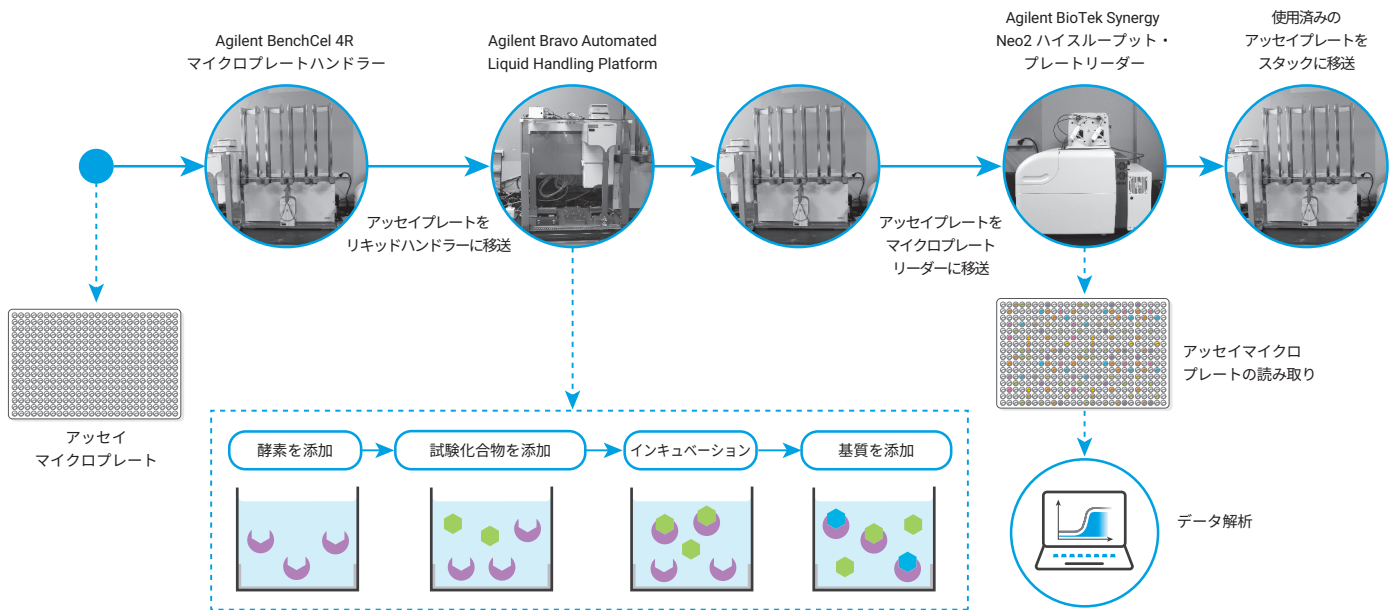


図 1. ハイスループットスクリーニングアッセイのワークフローと反応条件。Agilent Bravo Automated Liquid Handling Platform は、ハイスループットスクリーニングアッセイのすべての液体移送ステップを実行します。このプラットフォームは Agilent BenchCel 4R マイクロプレートハンドラーと統合されており、Agilent BioTek Synergy Neo2 ハイスループット・プレートリーダーへの自動マイクロプレートハンドリングが可能です。

品質管理

Z' ファクターは、ハイスループットスクリーニングアプリケーションにおけるアッセイの適合性を評価するために広く使用されている指標です。³ 陽性対照と陰性対照間の分離を明らかにすることによってアッセイの堅牢性を測定します。Z' ファクターは次式を用いて計算しました。

式 1.

$$Z' = 1 - \frac{3(\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|}$$

ここで、 σ_p は陽性対照 (AUDA) の標準偏差、 σ_n は陰性対照 (DMSO) の標準偏差、 μ_p は陽性対照の平均、 μ_n は陰性対照の平均です。Z' ファクターが 0.5 ~ 1 のアッセイは、優れたアッセイとみなされます。

データ解析

酵素反応速度は、反応の直線部分の傾きから時間に対する蛍光の増加を計算することによって決定しました。最大蛍光は 20 分で得られました。試験化合物の活性パーセント値は、溶媒対照 (100 % 活性) を含むウェルおよび陽性対照 (sEH 阻害剤 AUDA) を含むウェルに基づいて計算しました。IC₅₀ 値は、GraphPad Prism を使用し、4 パラメータの非線形回帰曲線を当てはめて計算しました。

一部の化合物は、高濃度でバックグラウンド蛍光特性を示しました。これは、アッセイ開始時の化合物の蛍光に対して化合物濃度をプロットすることによって決定しました。化合物の蛍光がアッセイまたはデータ解析と顕著に干渉する場合、データは除外しました。化合物のバックグラウンド蛍光が sEH 阻害率に大きな影響を与えなかった場合、データは保持しました。

アッセイ性能

代表的な溶媒および陽性対照の応答を図 2 に示します。すべてのアッセイの平均 Z' ファクターは 0.60 で、アッセイ性能が堅牢であることを示しています。メソッドセクションで説明したとおり、自動化されたハイスループットスクリーニングメソッドを用いて、1 時間当たり 20 種類の化合物というスループットを達成しました（データは示していません）。

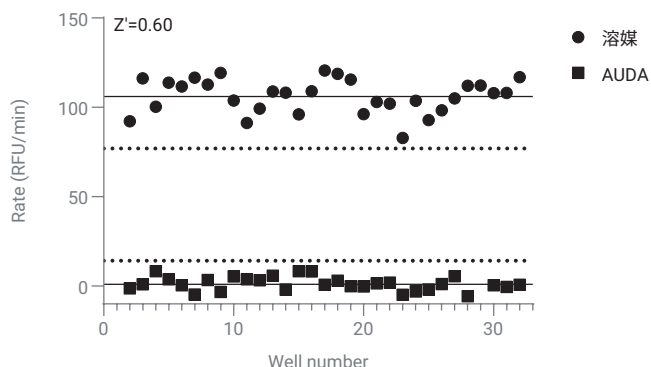


図 2. sEH 阻害剤のハイスループットスクリーニングアッセイにおける代表的な 384 ウェルプレートの Z' ファクター計算用の溶媒対照（黒丸、DMSO）および陽性対照（黒四角、AUDA）サンプルを示す散布図。各点は、単一プレート上の個々のウェルを表します（各対照について n = 32）。実線は、陽性対照と陰性対照の平均蛍光率を表します。破線は、平均値の上下 3 標準偏差のラインを示します。このデータに対して計算された Z' ファクターは 0.60 であり、優れたアッセイ性能を示しています。

結果と考察

図 3 に、ハイスループットスクリーニングアッセイで得られた sEH 阻害の IC₅₀ 値を、235 種類の抗炎症化合物すべてについて示します。10 μM の IC₅₀ 値を、すべての化合物を比較するためのベースライン値として使用しました。10 μM 未満の IC₅₀ 値は sEH 阻害剤である可能性があると考え、一方で 10 μM を超える IC₅₀ 値を有する化合物は、sEH 阻害剤である可能性は低いと見なしました。既知の一次標的を持つ化合物で予想されるように、より弱い二次標的の活性を捕捉するために 10 μM を選択しました。このハイスループットスクリーニングでは、合計 36 種類の抗炎症化合物が 10 μM 未満の sEH IC₅₀ 値を持つものとして発見されました。

強い IC₅₀ 値および/または明確な濃度応答カーブを示した 6 つのヒット化合物を図 4 に示します。これら 6 つのヒット化合物の主要な抗炎症標的、主要な標的効力、および sEH IC₅₀ 値を表 1 にまとめます。NF-κB 阻害剤である SC-75741、および既知の sEH 阻害剤である *trans*-AUCB は、このハイスループットスクリーニングアッセイで明確な sEH 阻害剤として同定されました。⁴⁵ 両方の化合物とも、試験した濃度範囲（10 nM から 10 μM まで）を超える効力で sEH を阻害しました。したがって、これらの化合物の IC₅₀ 値は <10 nM として示されています。これらの効力を考慮すると、これらの化合物は二次スクリーニングの主な候補となります。

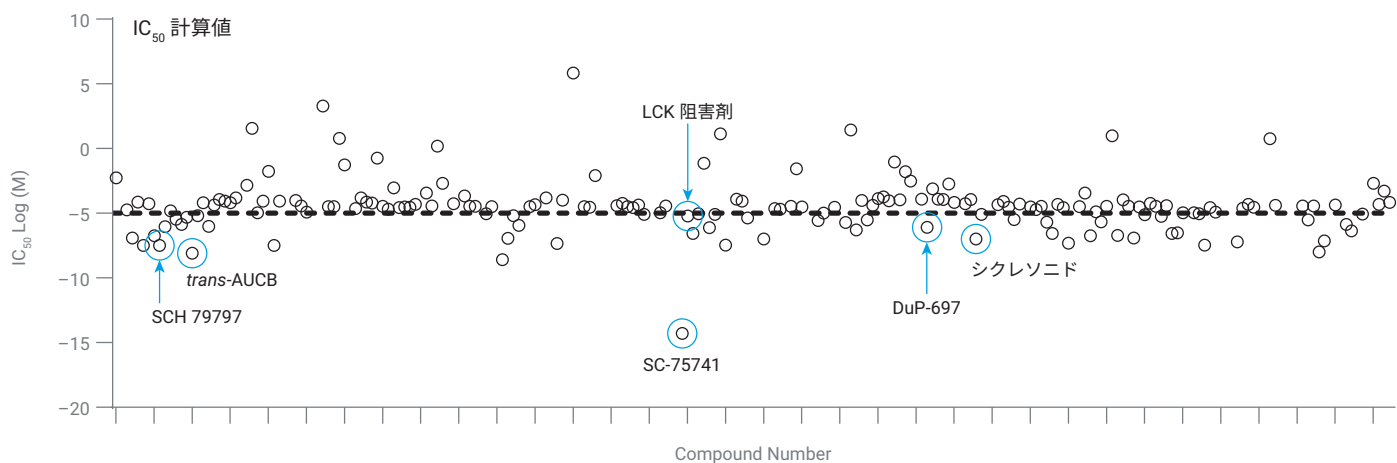


図 3. 試験化合物の IC₅₀ 値の散布図。すべての化合物の比較のために使用したベースライン値は 10 μM (-5 Log (M)) でした。IC₅₀ 値が 10 μM 未満の化合物は sEH 阻害剤の候補であると考え、一方で IC₅₀ 値が 10 μM を超える化合物は阻害剤である可能性は低いと考えました。赤丸で囲まれた化合物は、強力な IC₅₀ 値および/または明確な濃度応答曲線を示しました。

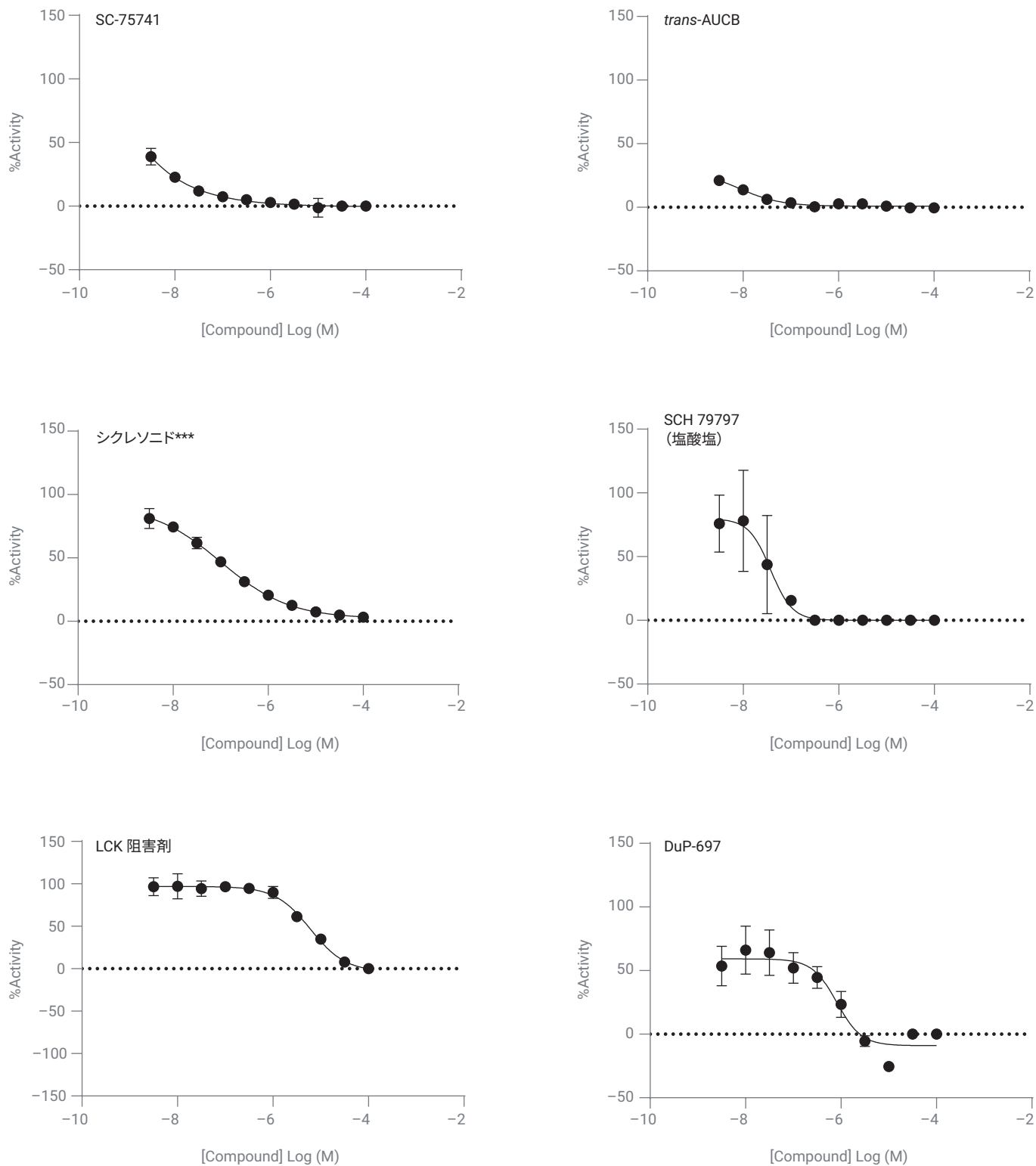


図 4. 選択されたヒット化合物の濃度応答曲線。すべてのデータは、2 回のテクニカルレプリケートの平均 ± 標準偏差としてプロットされています。これらの化合物を含むアッセイプレートの Z' ファクターは >0.5 でした。三重アスタリスク (***) でマークされた化合物は、高濃度でバックグラウンド蛍光特性を示しました。

シクレソニドは、グルココルチコイド受容体アゴニストであるデスイソプチリル シクレソニドのプロドラッグです。⁶ グルココルチコイドは、最もよく知られた抗炎症化合物の 1 つです。シクレソニドは高濃度でバックグラウンド蛍光を示すにもかかわらず、sEH 阻害に関して 100 nM の IC₅₀ 値を有する結果となりました。シクレソニドは水溶液中での溶解度が限定的です。このハイスループットスクリーニングアッセイで用いた化合物濃度が高かったため、その水溶解度の限界に近かった可能性があり、これが高いバックグラウンド蛍光の原因と考えられます。

プロテイナーゼ活性化受容体 1 (PAR1) のアンタゴニストである SCH 79797 は、このスクリーニングで sEH 阻害活性を有することがわかりました (IC₅₀ = 372 nM)。⁷ SCH 79797 は、血管平滑筋細胞および内皮細胞における PAR1 の活性化、ならびにα-トロンピン誘導性の血小板凝集を阻害します。SCH 79797 の sEH 阻害活性がこれらの心臓保護効果に一部寄与しているかどうかについて、追跡研究での調査が考えられます。

選択的 COX-2 阻害剤である DuP-697 が sEH 阻害剤の可能性があると判明しました (IC₅₀ = 813 nM)。⁸ 炎症における COX-2 の広範な役割を考慮すると、この発見は特に興味深いものです。COX-2 はおもに、複数の炎症機能を持つ脂質シグナル伝達分子のファミリーであるアラキドン酸からのプロスタグランジン (PG) の生成に関与しています。DuP-697 とおそらく同様に、COX-2 と sEH の二重阻害剤を使用して、組織 EET 蓄積の増加と同時に PG 産生を止めることは、炎症状態を治療するための興味深いアプローチです。

LCK 阻害剤は、Src ファミリーの非受容体タンパク質チロシナーゼ LCK を阻害します。^{9,10} LCK は T 細胞によって発現され、T 細胞受容体シグナル伝達に応答して T 細胞活性化の特徴である IL-2 産生を媒介します。ここで、LCK 阻害剤が sEH 活性も阻害することがわかりました (IC₅₀ = 6,070 nM)。このように、LCK 阻害剤が EET レベルを増加させるかどうか、またこれが異常な T 細胞活性を抑制する実行可能な戦略であるかどうかの判断は、将来の研究にとって有益となる可能性があります。

表 1. この自動化されたハイスループットスクリーニングアッセイで同定された 6 つのヒット化合物の主要ターゲットと sEH の IC₅₀ 値の比較

| 化合物 | 主要ターゲット：ターゲット効力 (IC ₅₀) [*] | sEH (IC ₅₀) |
|------------|--|-------------------------|
| SC-75741 | NF-κB : 200 nM ⁴ | <10 nM |
| trans-AUCB | sEH : 0.5 nM ⁵ | <10 nM |
| シクレソニド | グルココルチコイド受容体 : K _i = 37 nM ⁶ | 100 nM |
| SCH 79797 | PAR1 : 70 nM ⁷ | 372 nM |
| DuP-697 | COX-2 : 80 nM ¹¹ | 813 nM |
| LCK 阻害剤 | LCK : <1-2 nM ^{9,10} | 6,070 nM |

* 特に明記しない限り、データは IC₅₀ 値として示されています。

結論

このアプリケーションノートでは、低分子阻害剤を同定する自動化されたハイスループットスクリーニングプラットフォームを確立しました。この自動化されたハイスループットスクリーニングアッセイは、特定の標的に対して化合物ライブラリをスクリーニングする効率的な方法です。スループットを考慮すると、このアッセイはより大規模な化合物ライブラリに簡単に適用し、ヒットの可能性を高めることが期待できます。この自動化フォーマットを使用すると、広範囲の標的酵素と化合物ライブラリの組み合わせを網羅するように、複数のアッセイを簡単に変更できます。この自動化されたハイスループットスクリーニングアッセイは、創薬だけでなく基礎研究にも適用可能です。

著者について

David Hoffman は、2009年にロチェスター大学で博士号を取得しました。博士研究員を経て、2011年に学術界を離れ小規模な創薬会社に入社しました。2013年にR&D科学者としてCayman Chemicalに入社し、ミトコンドリア機能を対象とした多数のキットの開発を支援しました。2018年にCaymanの細胞代謝/ハイスループットスクリーニングサービスグループの立ち上げを開始し、現在は同部門のサイエンスディレクターを務めています。

Melissa Parsey は、2017年にミシガン州立大学で博士号を取得しました。博士研究員を経て、2019年にテクニカルライターとしてCayman Chemicalに入社し、2022年に科学コンテンツ開発者としてマーケティング部門に異動しました。

www.caymanchem.com

詳しくはこちら

www.agilent.com/en/product/automated-liquid-handling

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

RA45071.7372106481

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, June 5, 2023

5994-6078JAJP

参考文献

1. Lai, J.; Chen, C. The Role of Epoxyeicosatrienoic Acids in Cardiac Remodeling. *Front. Physiol.* **2021**, *12*, 642470.
2. Spector, A. A.; Kim, H.-Y. Cytochrome P450 Epoxygenase Pathway of Polyunsaturated Fatty Acid Metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1851*(4), 356–365.
3. Zhang, J. -H.; Chung, T. D. Y.; Oldenburg, K. R. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J. Biomol. Screen.* **1999**, *4*(2), 67–73.
4. Leban, J. *et al.* A Novel Class of Potent NF- κ B Signaling Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*(21), 5858–5862.
5. Hwang, S. H. *et al.* Synthesis and Structure-Activity Relationship Studies of Urea-Containing Pyrazoles as Dual Inhibitors of Cyclooxygenase-2 and Soluble Epoxide Hydrolase. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*(8), 3037–3050.
6. Belvisi, M. G. *et al.* Preclinical Profile of Ciclesonide, a Novel Corticosteroid for the Treatment of Asthma. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *314*(2), 568–574.
7. Ahn, H. S. *et al.* Inhibition of Cellular Action of Thrombin by N3-Cyclopropyl-7-[[4-(1-methylethyl)phenyl]methyl]-7H-pyrrolo[3,2-f]quinazoline-1,3-diamine (SCH 79797), a Nonpeptide Thrombin Receptor Antagonist. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*(10), 1425–1434.
8. Kargman, S. *et al.* Mechanism of Selective Inhibition of Human Prostaglandin G/H synthase-1 and -2 in Intact Cells. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, *52*(7), 1113–1125.
9. Burchat, A. F. *et al.* Pyrrolo[2,3-d]Pyrimidines Containing an Extended 5-Substituent as Potent and Selective Inhibitors of Ick II. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*(19), 2171–2174.
10. Arnold, L. D. *et al.* Pyrrolo[2,3-d]Pyrimidines Containing an Extended 5-Substituent as Potent and Selective Inhibitors of Ick I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*(19), 2167–2170.
11. Cayman Chemical Company. Unpublished internal company data. **2000**.