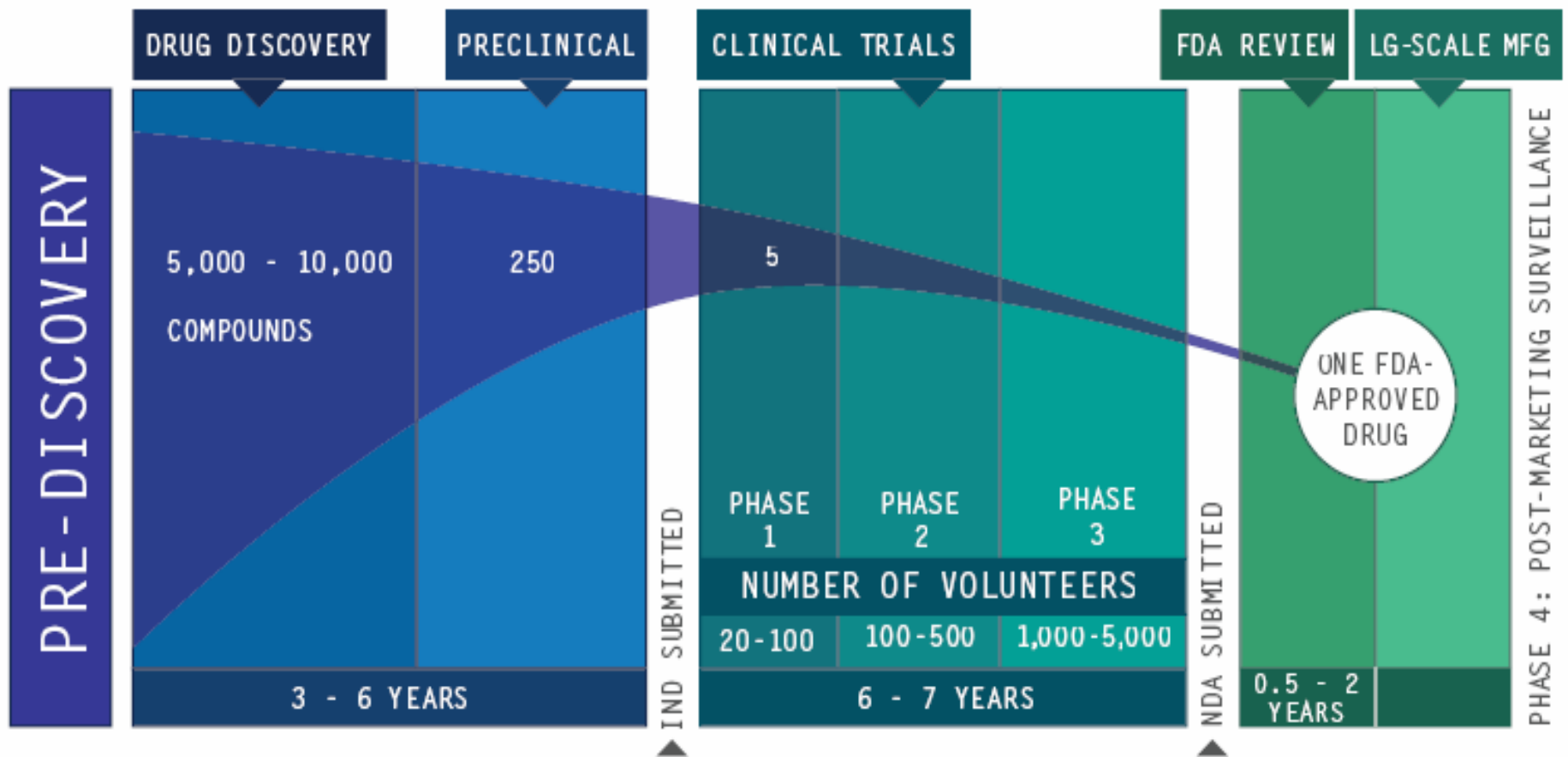


HTS

High-Throughput Screening



HTS

=

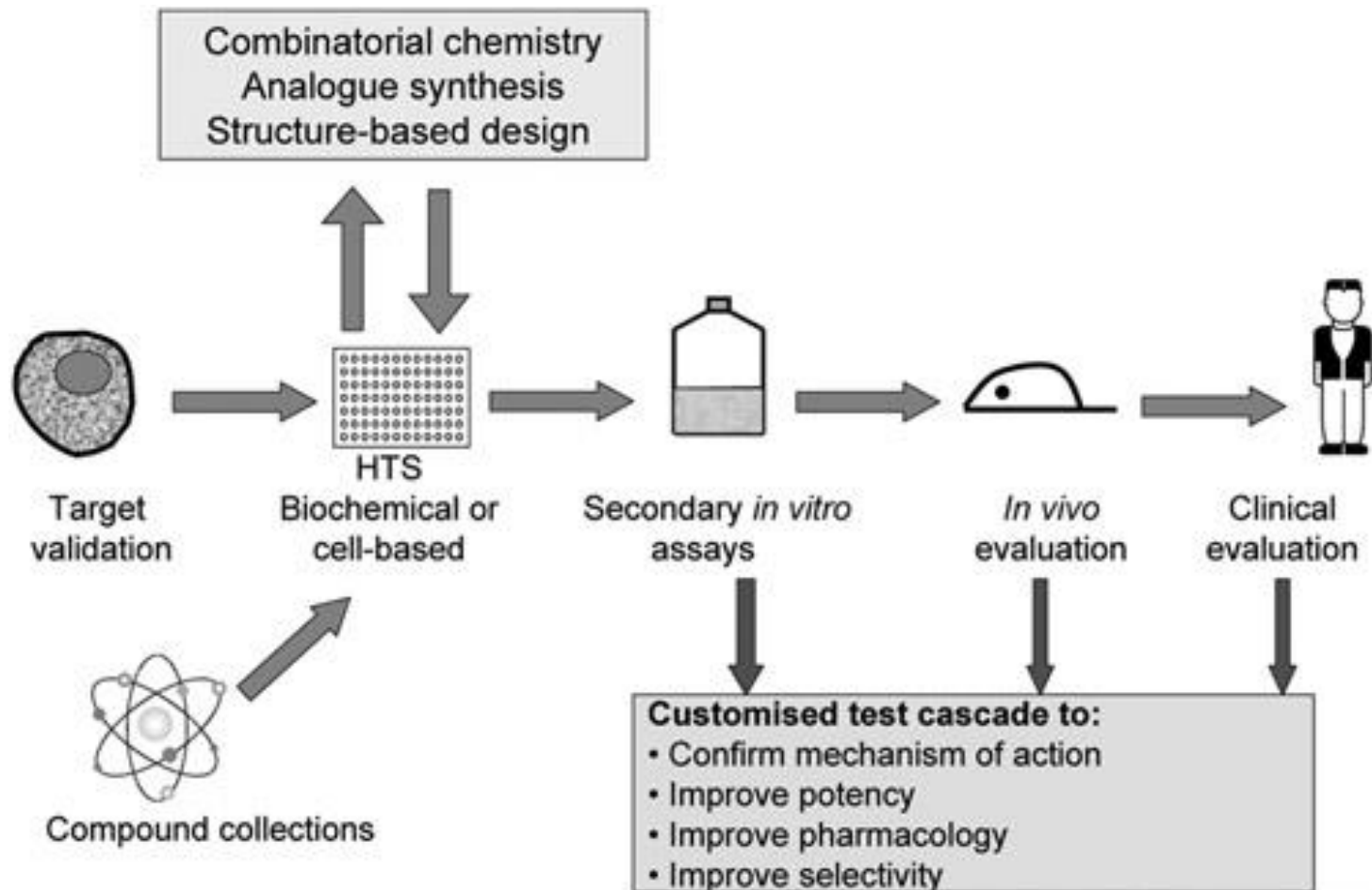
Screening ad alta
capacità'

IMPORTANTE TECNICA PER
VELOCIZZARE LA FASE DI
RICERCA DI UN FARMACO

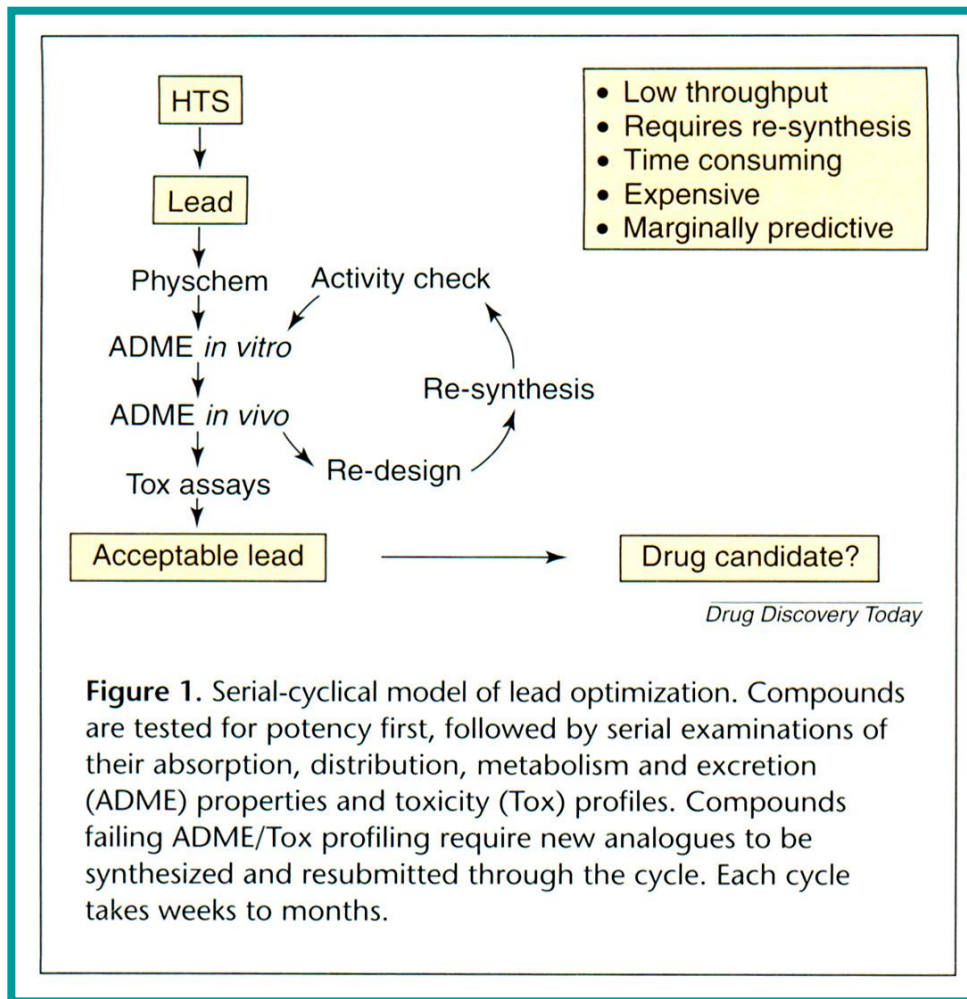
Per HTS si intende un processo tramite il quale un numero elevato di molecole può essere esaminato, in modo automatizzato, per l'identificazione di un'attività farmacologica

DRUG RESEARCH

DRUG DEVELOPMENT



Breast Cancer Research



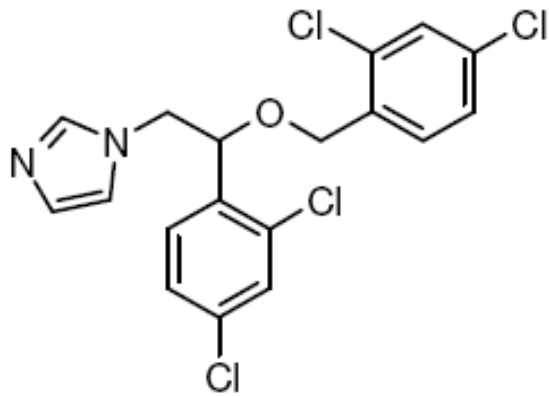
HTS → Leads → ADMET

ADMET = Adsorption-Distribution-Metabolism-Excretion-Toxicity

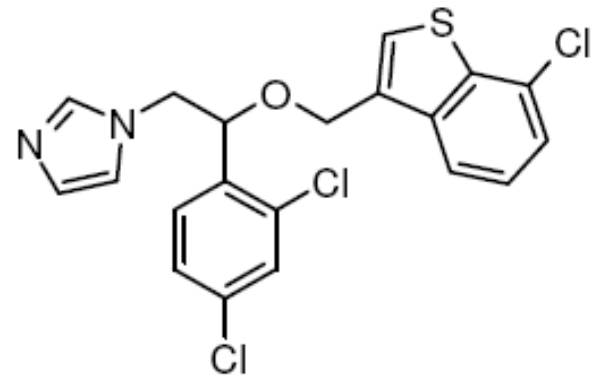
Strategie generali per la scoperta di una molecola hit

1. Modificazione di uno hit esistente:
farmaci *mee-too*
2. Attività biologica di una data molecola:
Etnofarmacologia, effetti collaterali di farmaci, effetti su animali, piante, microorganismi
3. Ricerca pianificata e approccio razionale
("Rational Drug Design")
4. Screening sistematico (HTS)

1. Modificazione di uno hit esistente: farmaci *mee-too*



miconazole
(Janssen; 1968/1971)

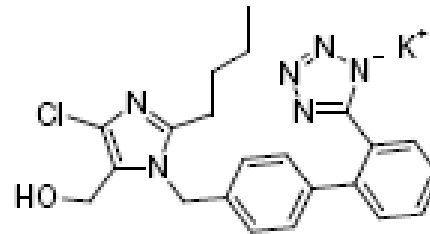


setraconazole
(Ferrer; 1984/1992)

Strategia del *me-too*: copia a fini commerciali o molecola migliorata (maggiore solubilità, migliore farmacocinetica, ecc.)

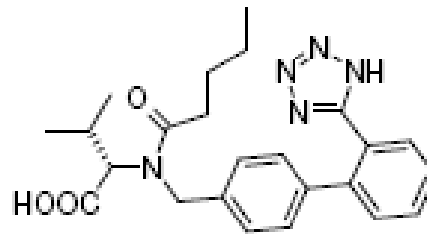
Early-phase analogues

Quando due ricerche contemporanee e indipendenti conducono a due molecole con struttura simile



losartan
(DuPont; 1986/1994)

Antagonisti del recettore
dell'angiotensina (AT1)



valsartan(Novartis; 1990/1996)

Vantaggi e svantaggi della strategia mee-too

PRO

- Probabilità di ottenere una molecola attiva in clinica
- Possibilità di capitalizzare informazioni (es: cliniche) esistenti
- Alta profittabilità apparente
- Possibilità di migliorare un farmaco esistente
- Attività inaspettata in un altro contesto terapeutico

CONTRO

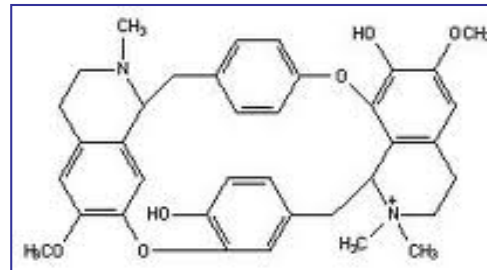
- Bassa livello innovativo
- Competizione con farmaci esistenti già stabilitisi sul mercato

2. Attività biologica di una data molecola

2.1 Etnofarmacologia: sfruttare l'effetto farmacologico di sostanze naturali utilizzate nella tradizione indigena



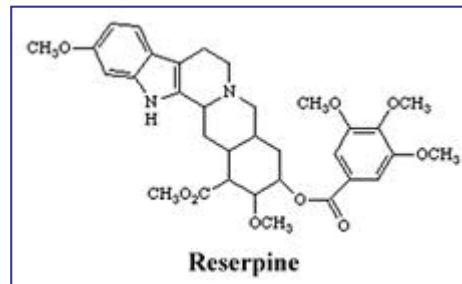
curari



Miorilassante nella pratica chirurgica



reserpina



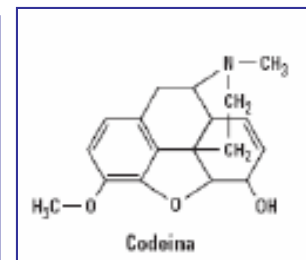
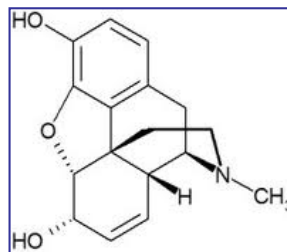
Tranquillante

Rauwolfia serpentina

morfina

codeina

OPPIO

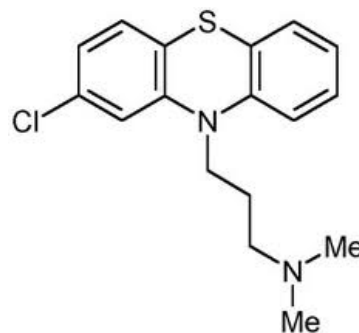
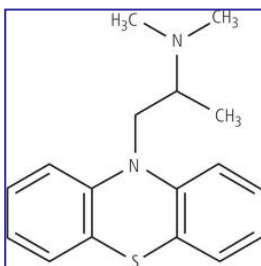


Analgesici



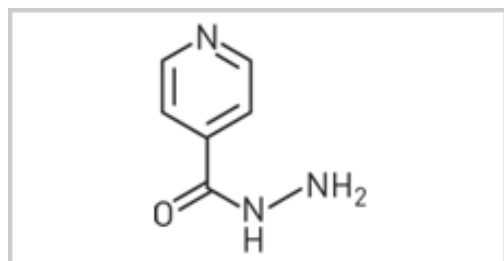
2. Attività biologica di una data molecola

2.2 sfruttare l'effetto collaterale di una molecola per una nuova applicazione terapeutica

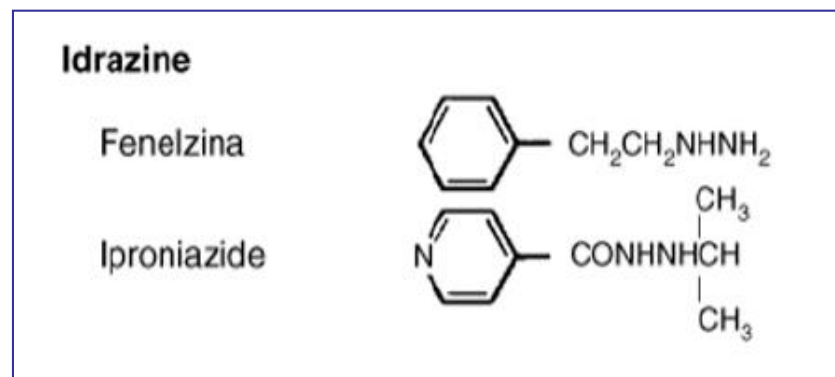


Effetto sedativo dell'antistaminico
PROMETAZINA

Clorpromazina: antipsicotico



Isoniazide:
antitubercolare

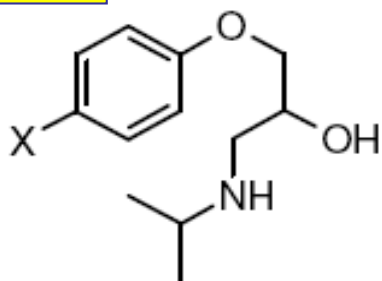


Effetto antidepressivo 11

2. Attività biologica di una data molecola

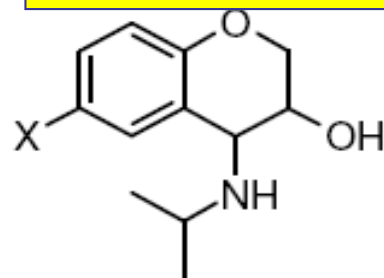
2.2 effetto ipotensivo dei β -bloccanti sfruttato per la progettazione di un attivatore dei canali del potassio

Struttura di un β -bloccante

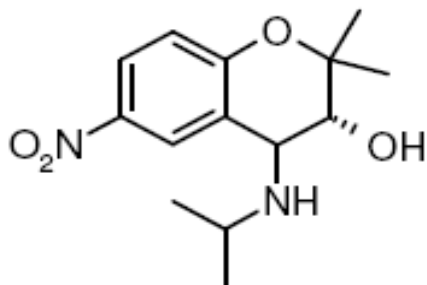


Struttura aperta

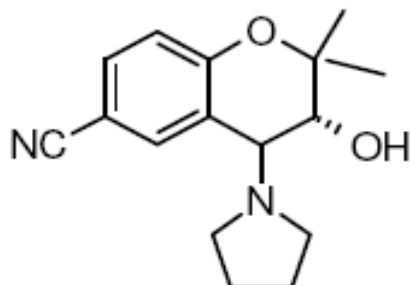
Ciclizzazione:
perdita di attività β -bloccante
ritenzione dell'effetto ipotensivo



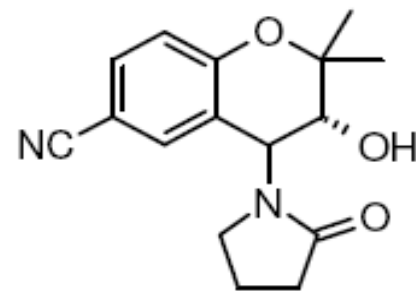
Analogo ciclizzato



lead



lead ottimizzato

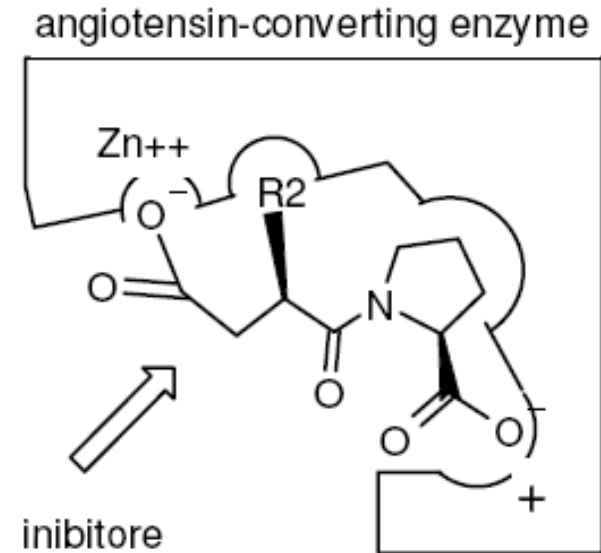
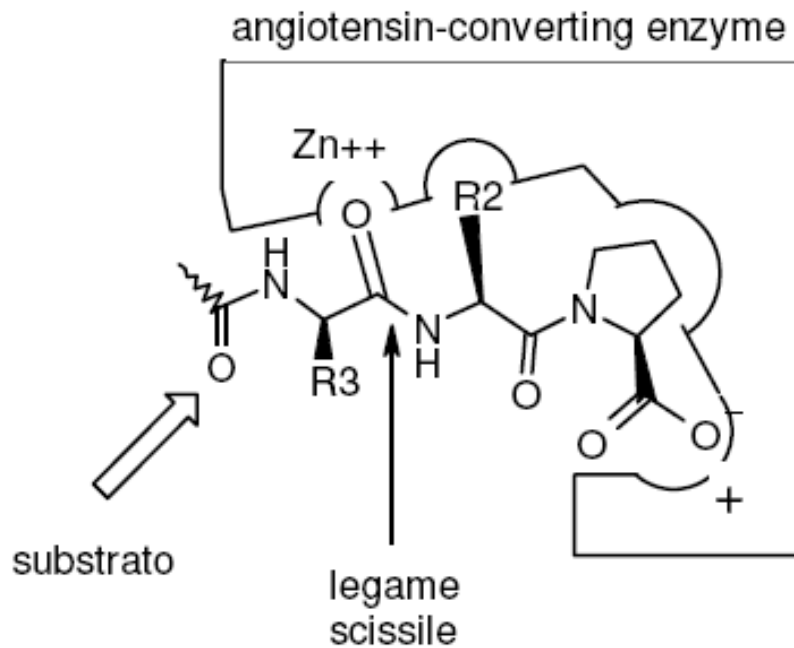


cromakalim

Attivatore dei canali per il K^+

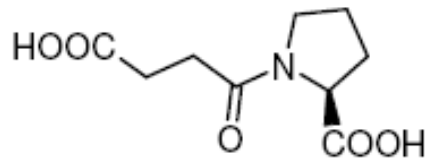
3. Ricerca pianificata e approccio razionale ("Rational Drug Design")

Es: inibitori dell'enzima ACE

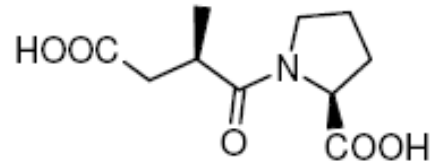


- Ondetti, M. A.; Rubin, B.; Cushman, D. W. *Science* 1977, 196, 441-444.
- Klebe, G. *J. Mol. Med.* 2000, 78, 269.

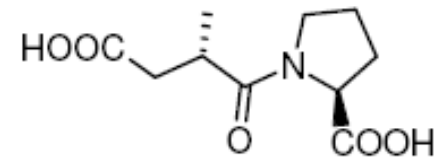
SAR DEGLI ACE-INIBITORI



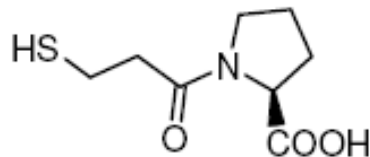
N-succinilprolina
 IC_{50} : 330 μ M



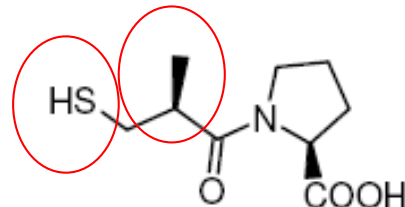
IC_{50} : 22 μ M



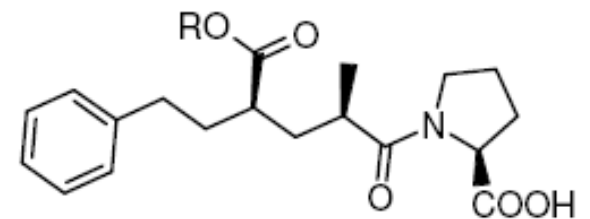
IC_{50} : 1480 μ M



IC_{50} : 0.20 μ M



IC_{50} : 0.023 μ M
captopril



R = H; enalaprilat
R = Et; enalapril

4. Screening sistematico

Random screening

Migliaia di molecole sono saggiate su un singolo target

Metodo adottato dalle grandi industrie su estese collezioni di composti

Screening esaustivo

Basso numero di molecole originali e chimicamente sofisticate sono saggiate in una batteria di test biologici

Es: prodotti naturali complessi come il taxolo, per i quali è richiesto un elevato investimento per la sintesi o purificazione

HTS



Combinazione di un random screening con un extensive screening



Saggio di milioni di molecole contro molti targets (nell'ordine di decine) in tempi limitati (nell'ordine delle settimane)

HTS: I NUMERI

- High throughput = $10^4 - 10^5$ cmpds/giorno
- Medium throughput = $10^2 - 10^3$ cmpds/giorno

Questa tecnologia presuppone un elevato livello di AUTOMAZIONE in molte sue componenti:

- pesata, diluizione e prelievo delle molecole da saggiare
- preparazione del saggio biologico (reazione enzimatica o saggio di binding)
- cattura dei risultati di binding o di inibizione del target

Elementi necessari per condurre un HTS:

1. Una collezione di molecole da studiare:
LIBRERIA MOLECOLARE
2. Un saggio biologico adattato
all'esecuzione automatizzata (**BIOWARE**)
3. Una piattaforma robotizzata
(**HARDWARE**)
4. Un sistema computerizzato per la valutazione
dei risultati (**SOFTWARE**)

Elementi necessari per condurre un HTS:

1. LIBRERIA MOLECOLARE

Combinatorial Diversity in Nature

20 natural amino acids yield

400 dipeptides

8,000 tripeptides ...

64,000,000 hexapeptides and, in principle,
 10^{400} proteins with MW \approx 30 kD

100 chemically modified amino acids yield

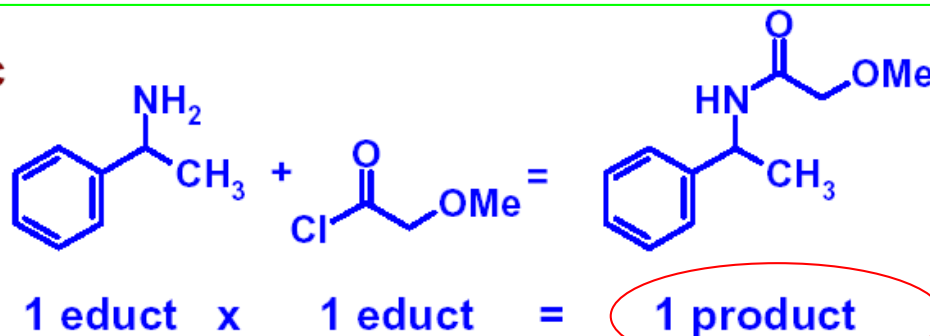
e.g. 1,000,000,000,000 hexapeptides,

and ... **4 nucleic bases encode all organisms !**

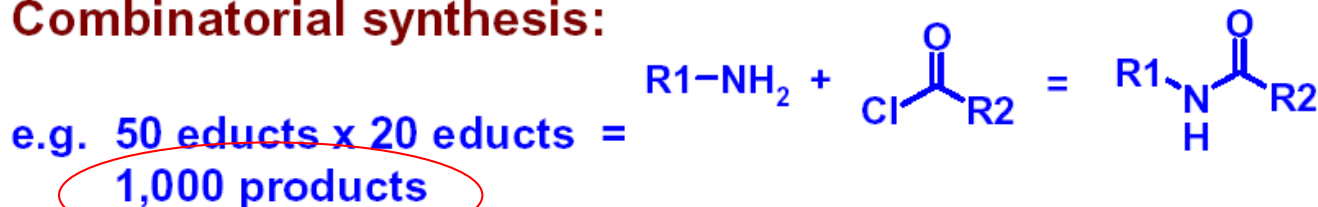
Chimica combinatoriale

Chimica combinatoriale vs. Sintesi Classica

Classical organic synthesis:



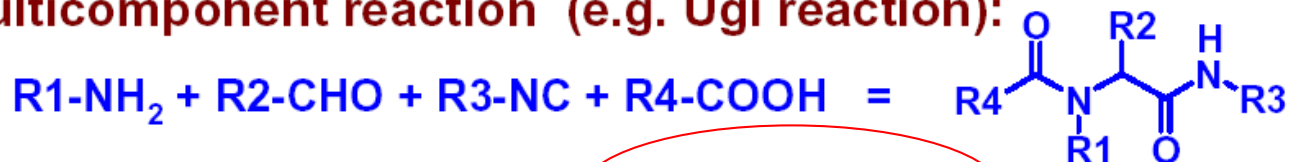
Combinatorial synthesis:



Multistep combinatorial synthesis:

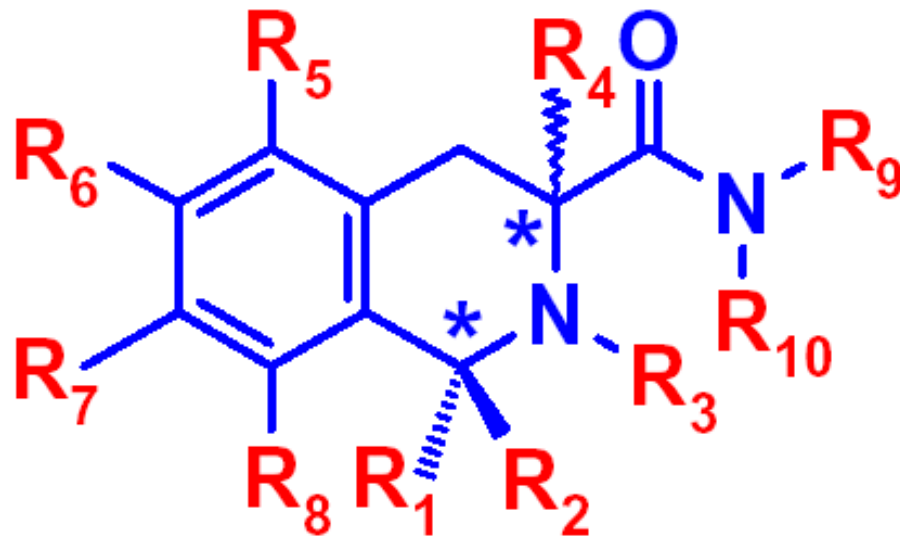
e.g. 50 x 20 x 20 educts = 20,000 products

Multicomponent reaction (e.g. Ugi reaction):



e.g. 50 x 20 x 5 x 200 educts = 1 million products

Combinatorial Library



Building blocks con 68 residui differenti in 10 posizioni (R_1 - R_{10} sono 5, 10, 10, 4, 2, 5, 5, 2, 5 e 20 residui differenti) generano una libreria di 20 milioni di composti differenti.

Considerando entrambi i centri chirali (*) il numero cresce di 4 volte, cioè arriva 80 milioni di composti.

Types and Features of Combinatorial Libraries

Random libraries → **druglike**
→ **diverse scaffolds**

Chemogenomics
Targeted libraries → **target-directed**
(target families) → **diverse substitution**

Focused libraries → **similar to lead**
→ **complete**

Criteria per il design di librerie

Obiettivo



Ottenerne il maggior numero possibile di informazioni

Drug discovery screening

Massima diversità possibile

Ricerca dell'hit

Drug discovery optimization

Scaffold comune

Diversità meno ampia, ma più mirata
Ricerca del lead

Tecniche di Sintesi Combinatoria:

Fase solida

Reagenti usati in eccesso per portare a completamento le reazioni

Purificazione semplice (lavaggio del supporto)

Facile automazione

Poche reazioni organiche applicabili

Scale-up relativamente costoso

In soluzione

I reagenti non possono essere usati in eccesso, a meno di purificazioni aggiuntive

Purificazione difficoltosa

Automazione difficoltosa

In teoria tutte le reazioni organiche sono utilizzabili

Scale-up semplice e non costoso

Anni '90:

library di composti, acquisite anche da ditte specializzate, in cui prevaleva un criterio di quantità su uno di qualità



Campagne HTS fallimentari a causa di

- bassa purezza dei prodotti
- identità sconosciuta di molti prodotti
- elevato numero di falsi positivi e negativi

Miglioramento delle library di composti in termini di:

1. Conservazione (storage) dei prodotti (es: campioni solidi invece che in soluzione di DMSO, frigoriferi, ecc.)
2. Rimpiazzo (replenishment) dei prodotti consumati o deteriorati
3. Controllo analitico (Quality Assurance; QA) effettuato a campione o sull'intera collezione
4. Filtri (smart filters): eliminazione dalle library di molecole con proprietà chimico-fisiche svantaggiose (es. Elevata complessità molecolare, alta lipofilia, gruppi funzionali tossici, ecc.)

RISULTATO:

collezioni di alta qualità contenenti 500.000-1.000.000 di composti per companies di taglia media

La collezione di composti di Nerviano Medical Sciences



37,500 Flaconi



17,600 Vials

Elementi necessari per condurre un HTS:

2. Un saggio biologico adattato all'esecuzione automatizzata (*BIOWARE*)

Sistema artificiale per determinare e quantificare l'attività biologica di un composto

SAGGIO IDEALE PER L'HTS  **"MIX&MEASURE"**

- La manipolazione deve essere ridotta al minimo.
- Non si possono effettuare operazioni convenzionali di laboratorio: centrifugazione, lavaggio dei pozzetti (es. ELISA), ecc.
- Metodo in fase omogenea che non necessita di fase solida

SAGGIO BIOLOGICO PER HTS

SAGGIO CELLULARE

Sistema cellulare intatto

es: gli enzimi sono presenti in forma nativa

Molti target contemporaneamente
Promiscuità
SAR influenzata da altre proprietà del composto
Compatibilità delle cellule con il saggio

SAGGIO BIOCHIMICO

Target isolato

es: attività catalitica di un enzima purificato o di una parte di esso

VANTAGGI: specificità, SAR precisa

SVANTAGGI: Espressione e purificazione del target

ESEMPI DI SAGGI BIOLOGICI PER HTS

- inibizione/attivazione enzimatica
- agonismo/antagonismo recettoriale
- proliferazione cellulare/inibizione della crescita
- blocco/attivazione di un canale ionico

Come si misura l'attività?

I seguenti sistemi permettono di rivelare e quantificare la funzione biologica.

- tracers radioattivi
- sistemi fluorescenti, luminescenti e colorimetrici
- sistemi cellulari che possono includere metabolismo, potenziali di membrana e misure di sistemi reporter accoppiati alla trascrizione.

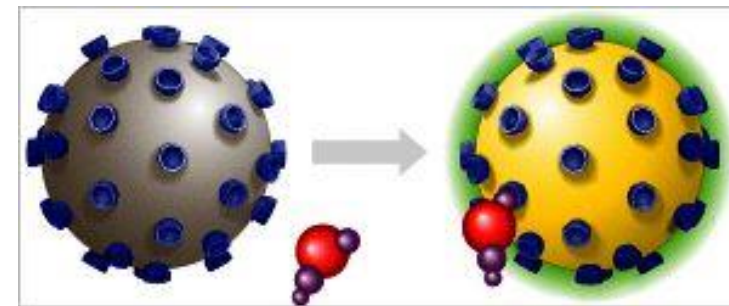
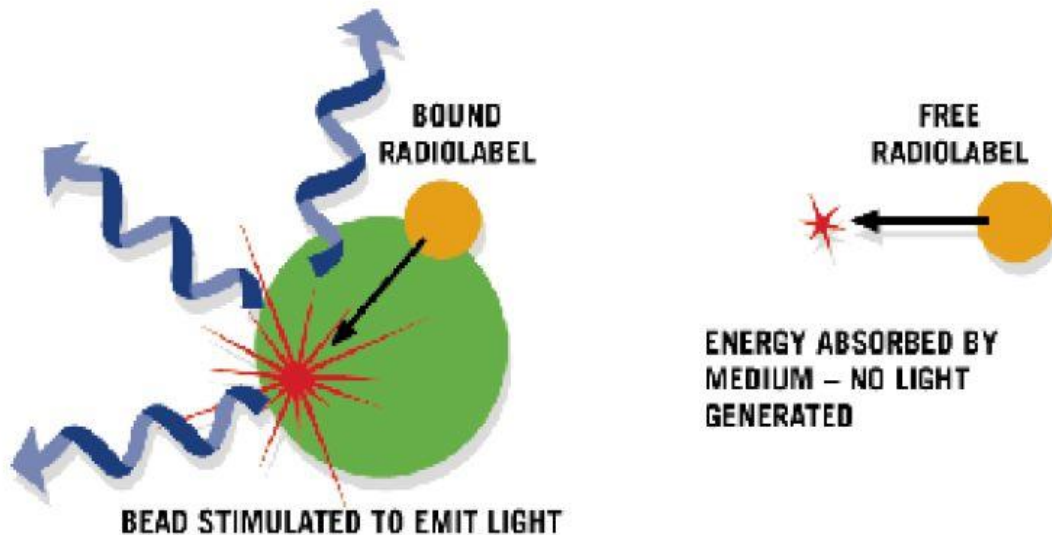
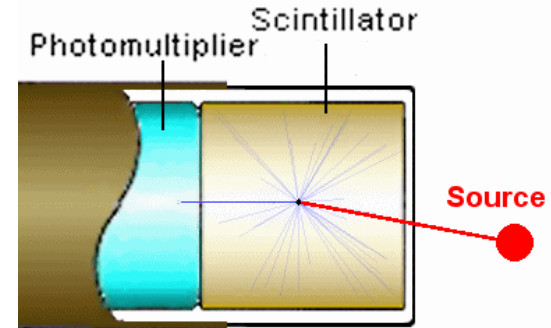
TECNOLOGIA DEL SAGGIO: SCINTILLATION PROXIMITY TECHNIQUE (SPA)

RADIOISOTOPI

^3H

^{125}I

SCINTILLATORE

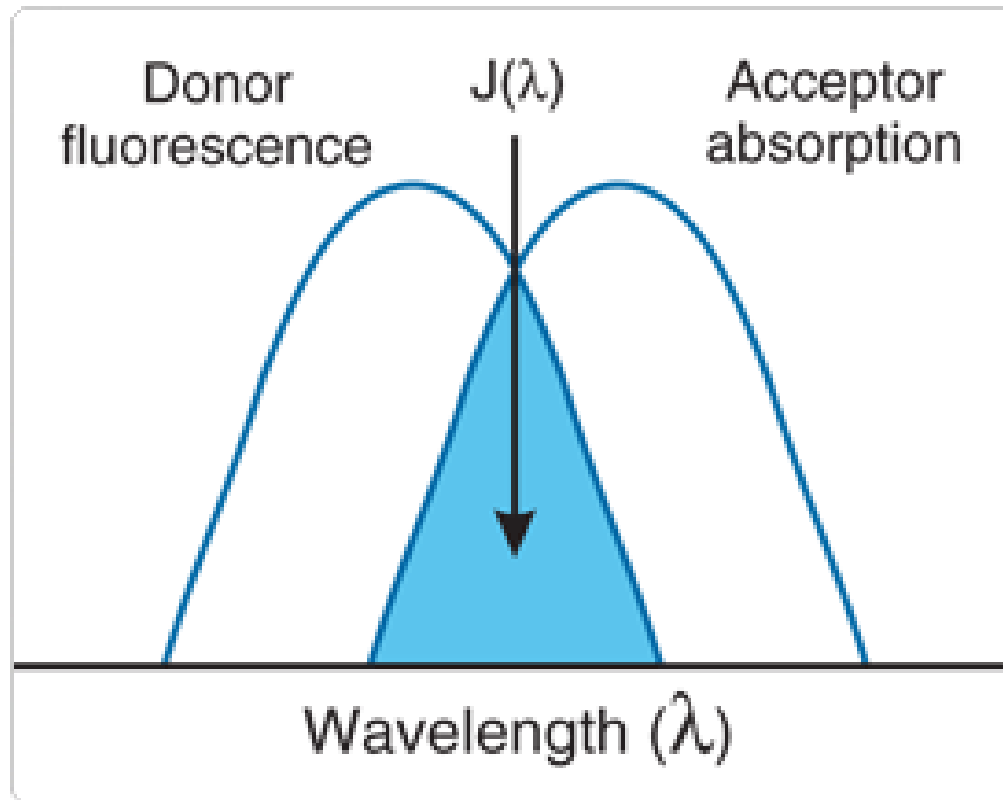


SCINTILLATION PROXIMITY TECHNIQUE (SPA)

- ✓ Low energy radioisotopes (^3H and ^{125}I) as labels due to their short range electron emission
- ✓ When bound close to a solid scintillator surface during the binding reaction, electron energy is transferred to the scintillator and the resulting photons can be captured by scintillation counting
- ✓ Electrons emitted from labeled molecules not close to the surface dissipate their energy and are not detected.
- ✓ Binding assays can take advantage of this technology and avoid the usual filtration or washing procedures.

TECNOLOGIA DEL SAGGIO: Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

Distance-dependent interaction between the electronic excited states of two dye molecules in which excitation is transferred from a donor molecule to an acceptor molecule



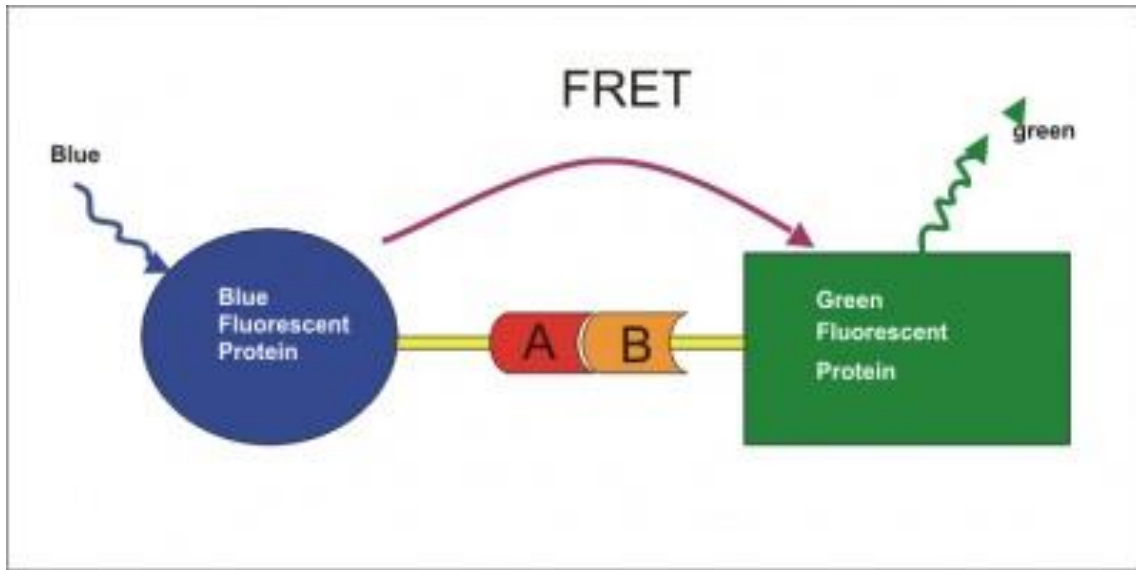
FRET is an important technique for investigating a variety of biological phenomena that produce changes in molecular proximity



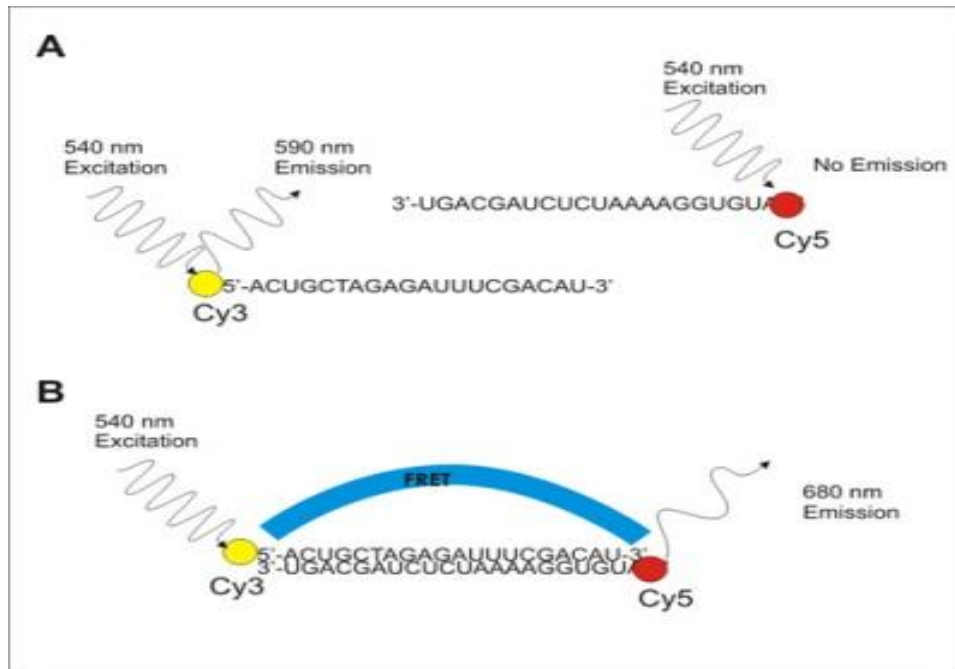
FRET: applications

- ✓ Suitable for protein interaction assay
- ✓ This assay is homogeneous and uses a small quantity of proteins
- ✓ Direct or indirect labelling of the protein interaction partners allows a quantitative detection of your favorite interaction
- ✓ Examples of protein interaction assays with FRET:
 - intracellular interactions (proteases and cofactors)
 - viral protein-host protein,
 - transcription factor-coactivator
 - apoptosis-related interactions

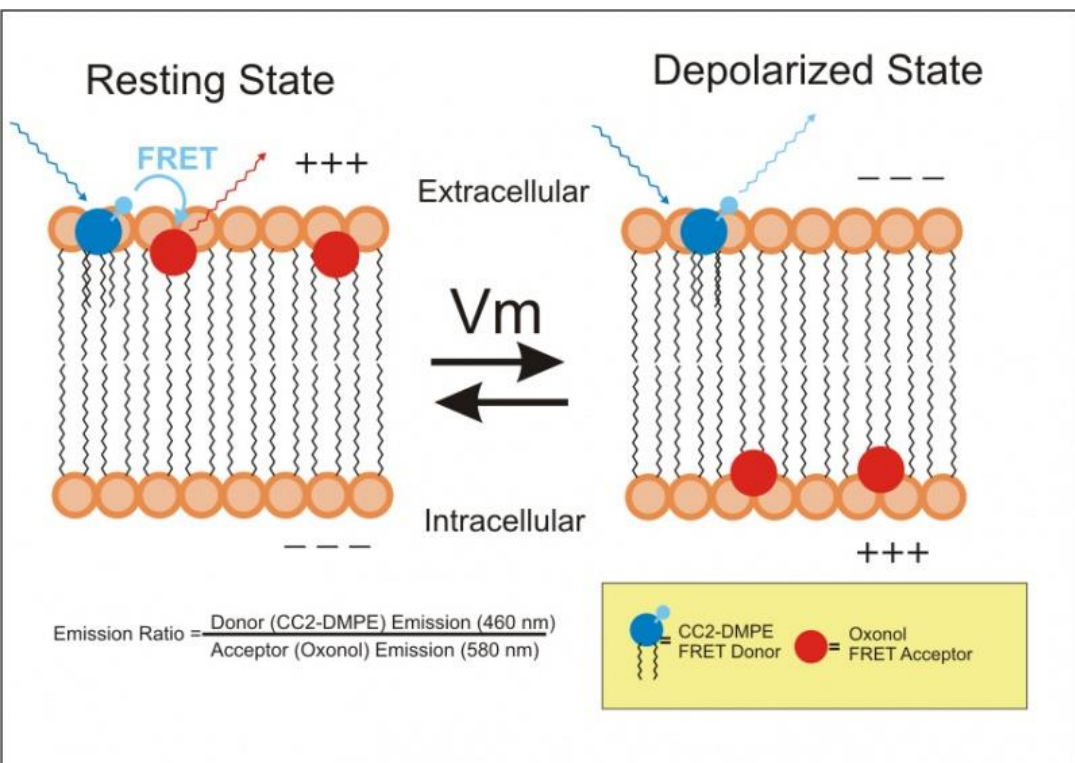
FRET: applications in drug discovery



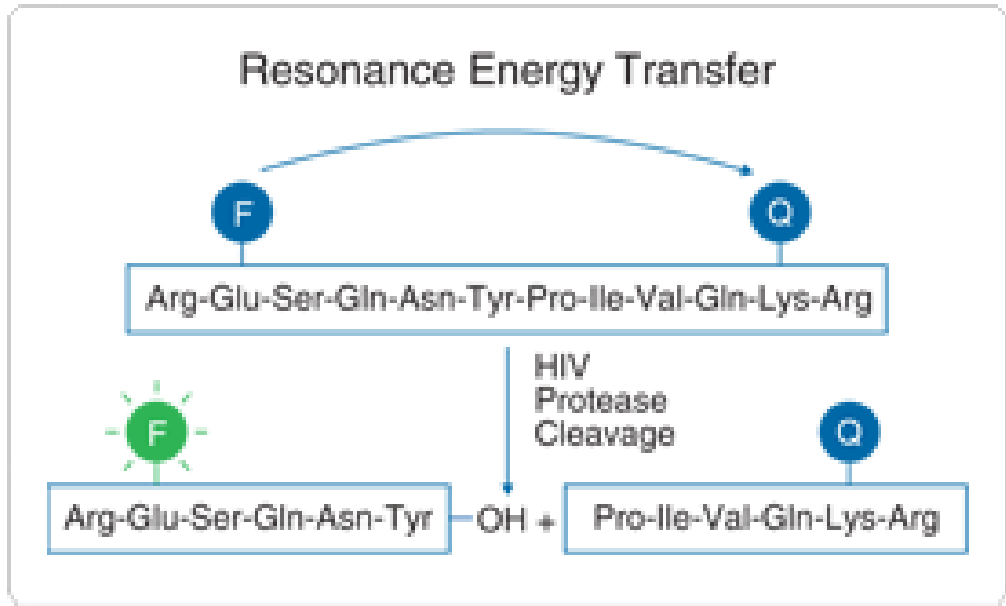
Protein interaction



Nucleic acid hybridization



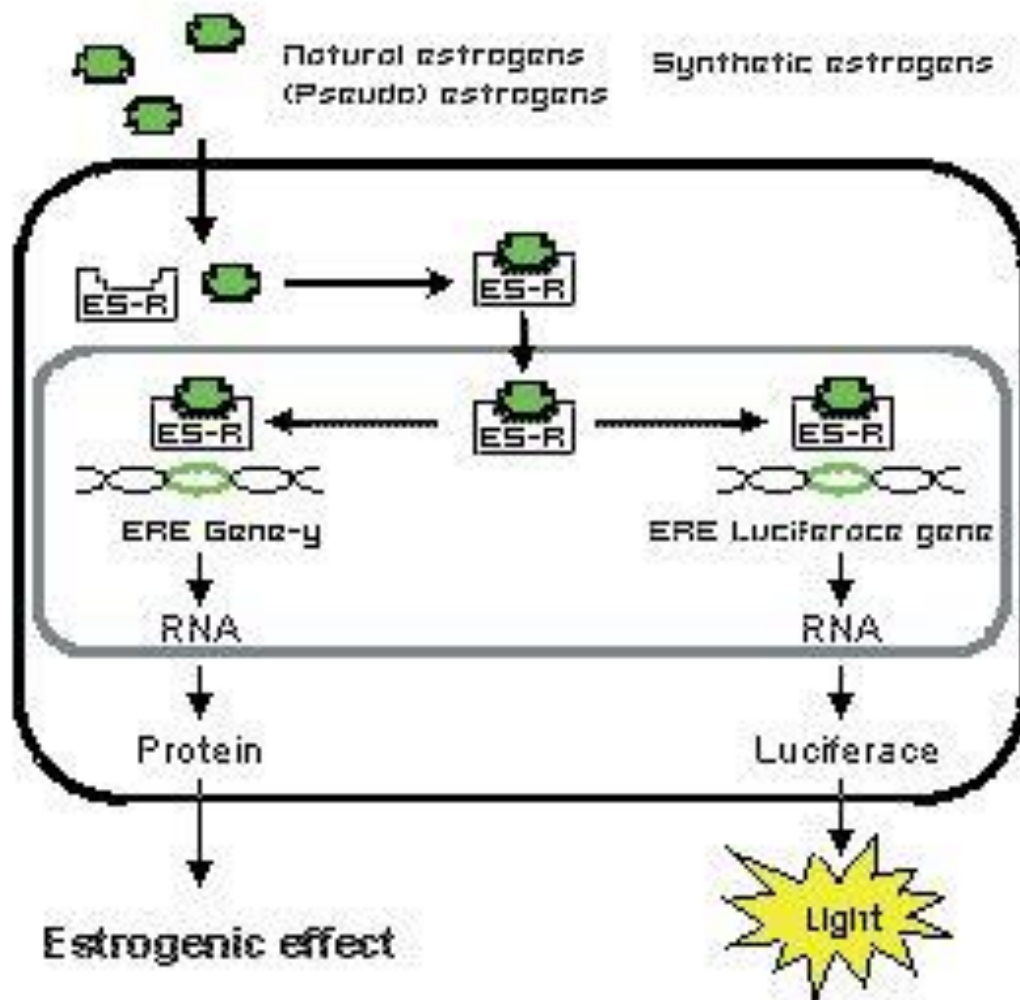
Membrane potential sensing



Protease assay

TECNOLOGIA DEL SAGGIO:

Gene reporter system per lo studio dei fattori di trascrizione



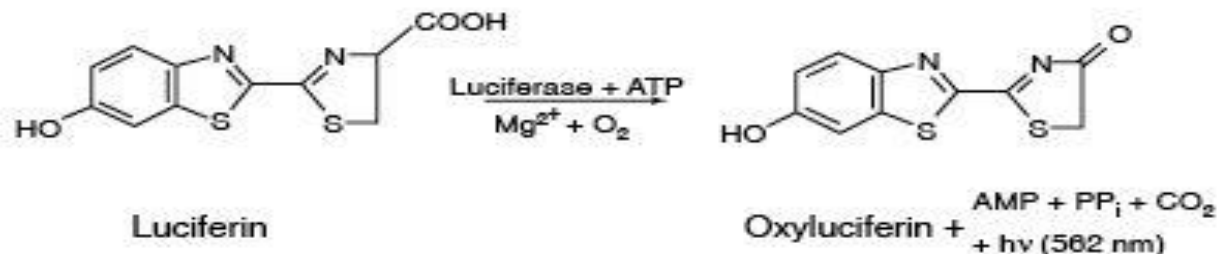
ATTIVAZIONE DI FATTORI DI TRASCRIZIONE (gene reporter)

TABLE 1 Reporter genes useful for cell-based HTS

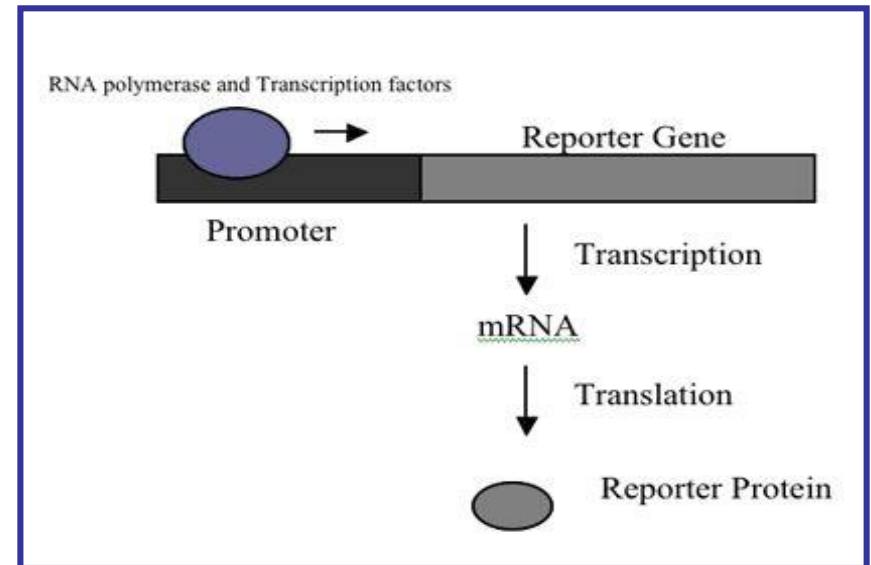
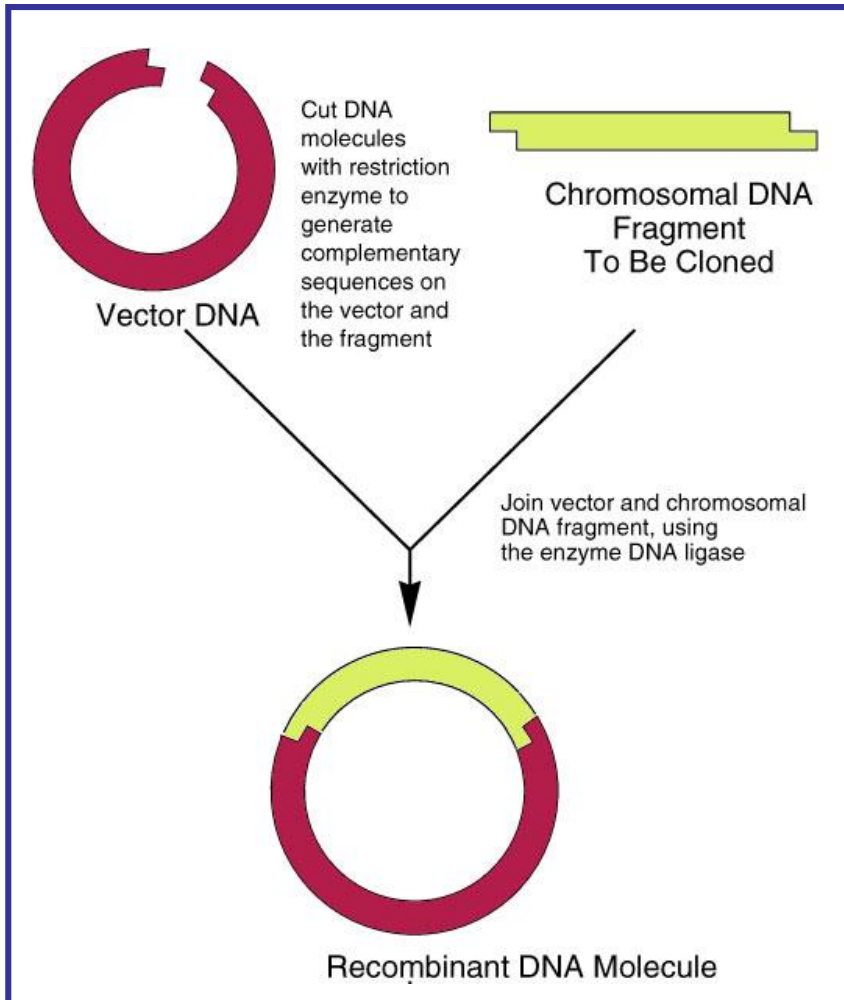
Reporter genes	Advantages	Disadvantages
β -Galactosidase (bacterial)	Well characterized; stable; inexpensive substrates; little interference from test compounds; simple readouts (readily automated)	Endogenous activity (mammalian cells); tetrameric (nonlinear response at low concentration)
Luciferase (firefly)	Dimeric; high specific activity; no endogenous activity (low background)	Requires addition of cofactor (luciferin) and presence of O ₂ and ATP
Alkaline phosphatase (human placental)	Secreted protein (avoids need for membrane-permeable substrates); inexpensive colorimetric and highly sensitive luminescent assays available ¹⁹	Endogenous activity in some cell types; optimal at pH 9.8
β -Lactamase (bacterial)	Monomeric; highly sensitive, membrane-permeant, fluorogenic substrates available*; no endogenous activity	Membrane-permeant fluorescent substrates not yet commercially available
Green fluorescent protein (jellyfish) ^{20,21}	Monomeric; no substrate needed (no manipulations required for assay); no endogenous activity; brighter mutants and colour variants available	Detection is relatively insensitive because of lack of enzymatic amplification

*G. Zlokarnik & R. Y. Tsien, personal communication.

NATURE · VOL 384 · SUPP · 7 NOVEMBER 1996

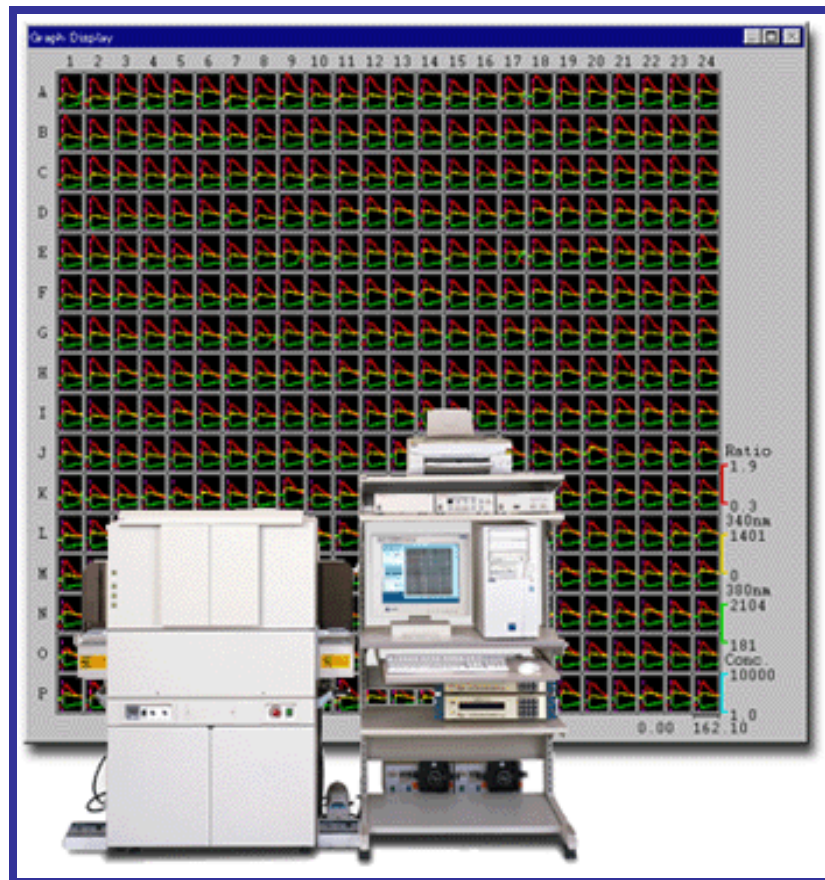


ATTIVAZIONE DI FATTORI DI TRASCRIZIONE (gene reporter)



Elementi necessari per condurre un HTS:

3. Una piattaforma robotizzata (*HARDWARE*)



TIPI DI PIATTAFORME HTS

AUTOMAZIONE COMPLETA INTEGRATA

Un software controlla l'intero
saggio (flusso delle piastre,
prelievo e diluizione del
campione, rivelazione)
Efficienza del processo
100.000
campioni/giorno/persona

Maggior capacità (throughput),
minore richiesta di
personale, maggior costo

AUTOMAZIONE A 'WORKSTATIONS'

Sistema a stazioni di lavoro che
operano in maniera
indipendente e altamente
specializzata. Efficienza del
processo 25.000-40.000
campioni/giorno/persona

Maggior flessibilità, semplicità
d'installazione, minor costo

AUTOMAZIONE A 'WORKSTATIONS'



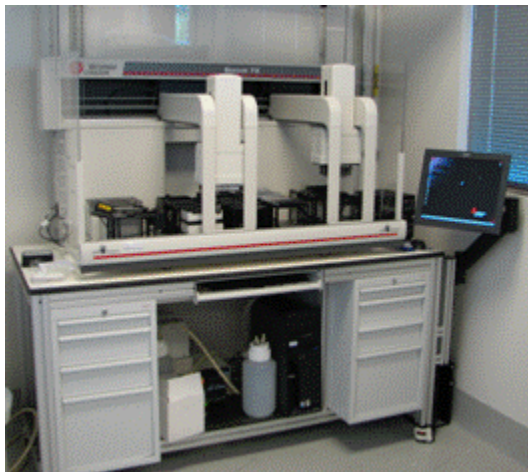
Reagent & Cell Dispensing



Tissue Culture Suite



Reagent & Cell Dispensing



Pipetting



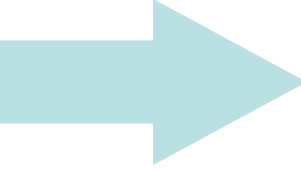
Product Detection

AUTOMAZIONE COMPLETA INTEGRATA



- Batch sizes in excess of 400 plates with lids (96, 384 or 1536 well)
- Reagent addition using temperature controlled reservoirs with optional gassing and agitation
- Tip washing and drying, in parallel with pipetting
- Tissue culture quality incubation with CO² and humidity control
- Finely controlled plate washing for cell-based, coated-well and ELISA procedures
- Signal detection using multiple readers of user's choice
- Complete sample tracking giving full audit trail
- Unlimited multi-stream transfers between compound, cell and assay plates within an assay

Elevati costi di implementazione e di mantenimento

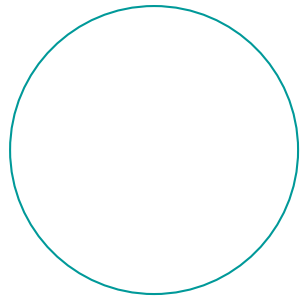


HTS
un servizio company-wide

I differenti progetti di un'industria devono conformarsi alle ben definite specifiche della tecnica HTS

Tipo di saggio biologico,
volume e miniaturizzazione del saggio

Miniaturizzazione del saggio: contenere il volume del saggio in pochi microlitri (3-15 μl)



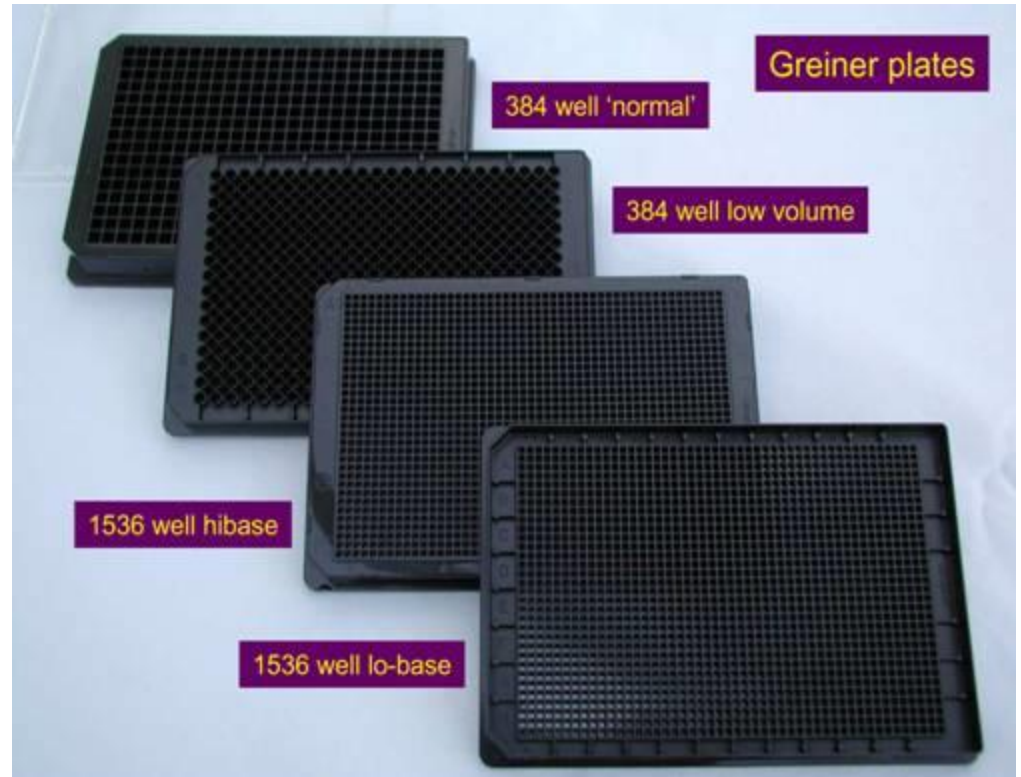
96 Well format
(300 μL)



384 Well format
(100 μL)



1536 Well format
(10 μL)



Miniaturized ≥ 1536 wells/plate
uHTS $\geq 100,000$ samples/24 hours

Elementi necessari per condurre un HTS:

4. Un sistema computerizzato per la valutazione dei risultati (*SOFTWARE*)

- Lo screening di centinaia di migliaia di composti necessita di sofisticati programmi di immagazzinamento e di analisi dei dati (es. data mining e data visualization)
- Importanza dei controlli positivi e negativi
- Valutazione di parametri statistici (*threshold-soglia*)

ESEMPIO DI VISUALIZZAZIONE GRAFICA DEI DATI DERIVANTI DA UNO SCREENING HTS

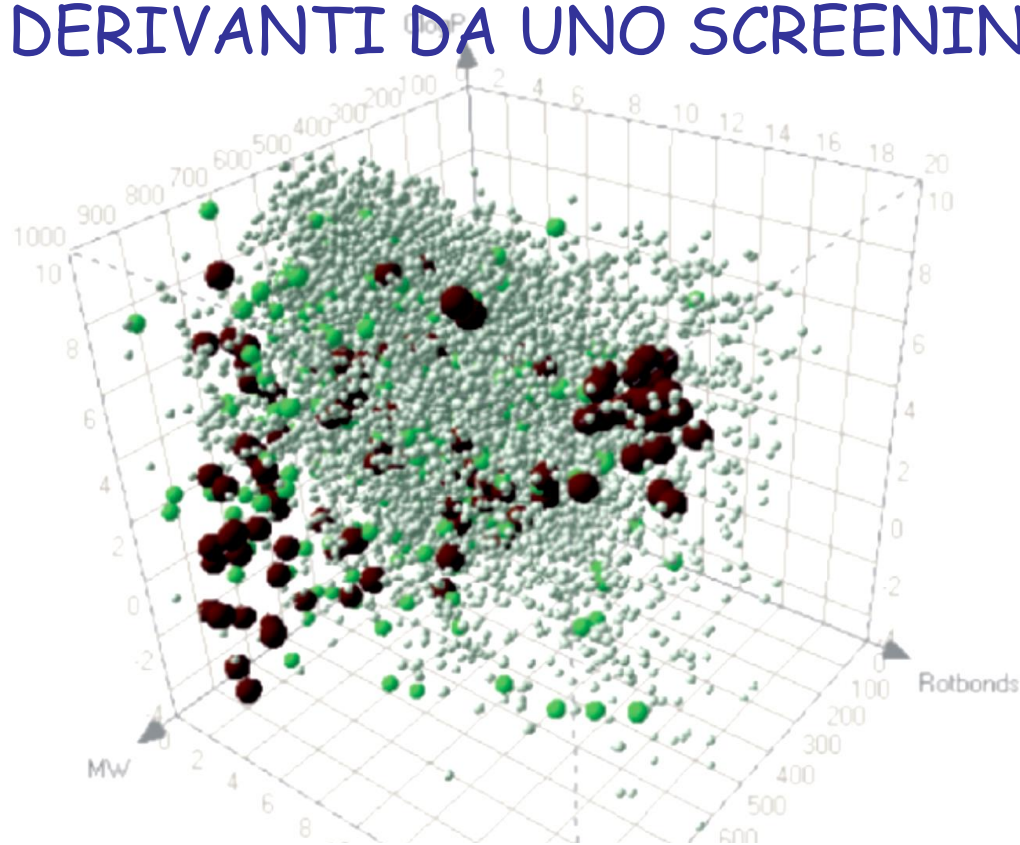
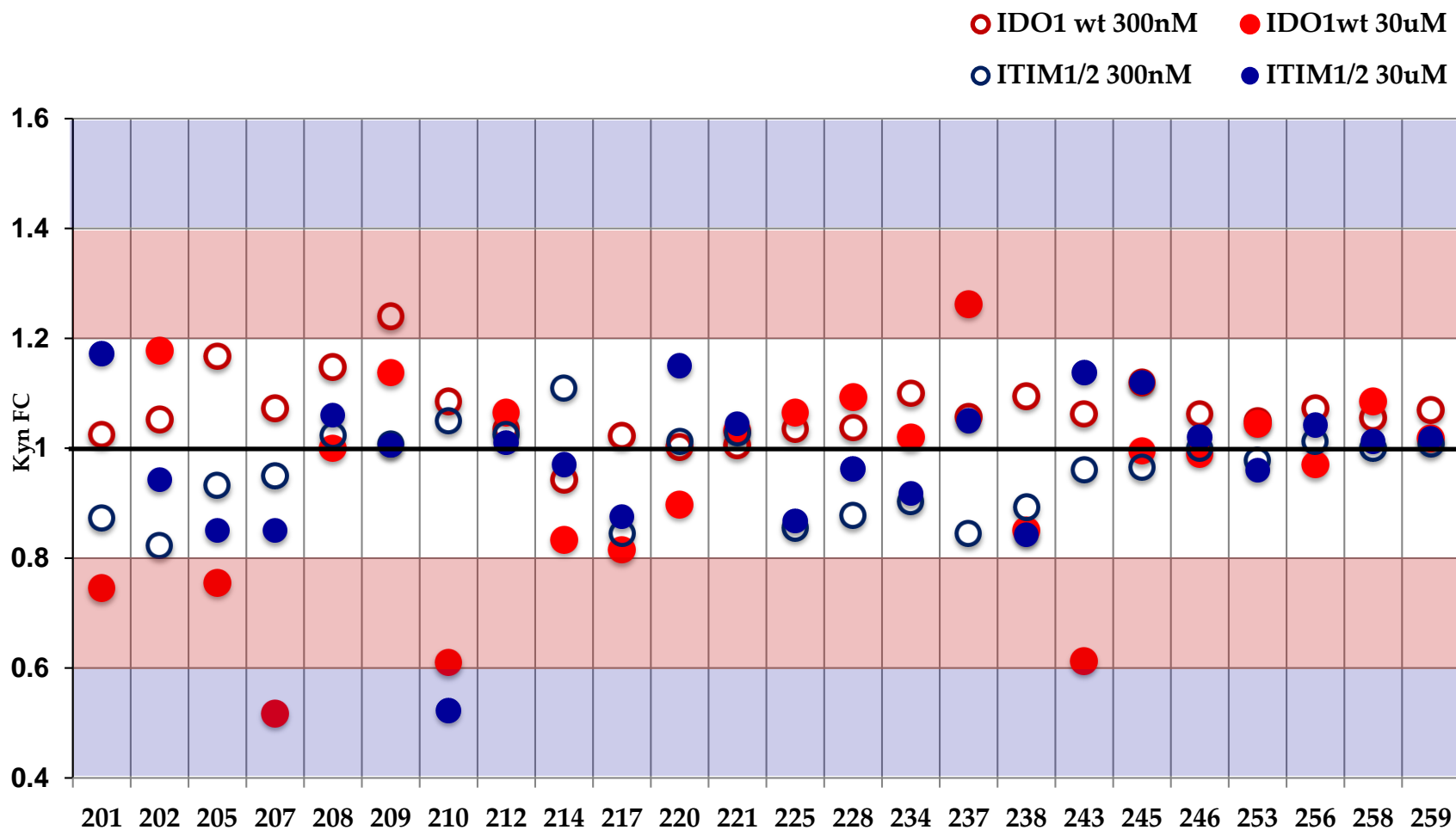
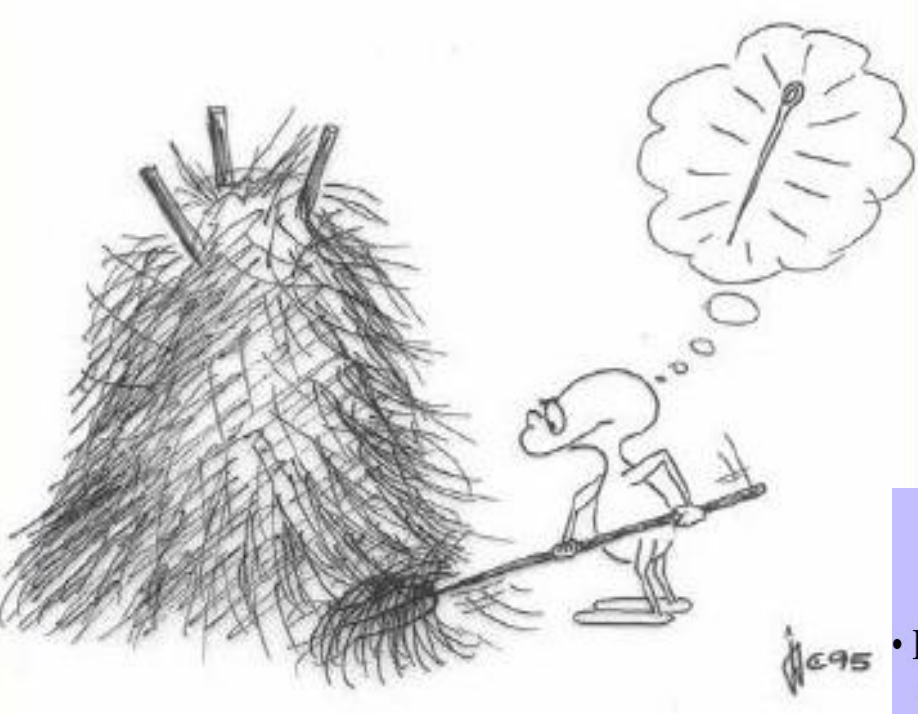


Figure 7-3. Graphical representation of the property distributions of active (large spheres), moderately active (medium spheres) and inactive (small spheres) compounds from the NCI AIDS data set [NCI] using Spotfire [Spotfire; Ahlberg 1999].

HTS - IDO1 inhibitors





Trends and current observations in HTS

- **Focussed screening**

(see also Valler & Green, DDT 5, 2000)

Since chemical space is huge and estimates of possible drug molecules average at about 10^{40} , sampling of this massive space for HTS or even uHTS seems impossible.

- ➔ In **focussed screening** compounds are pre-selected (pre-filtered) by computational methods, based on prior knowledge of the target and/or ligands (3-D structure, 3-D pharmacophore). Thus, the number of cpds. to be tested is largely reduced and the probability of success is increased. Usually, several 100s or 1,000s of cpds. have then to be screened. (in contrast to *de novo* structure-based design). Recent examples show a 10-100-fold improvement over diversity (random) screening (see Valler & Green).

