

# 分子スクリーニングサービスのご紹介

業界最大級の化合物ライブラリーと  
広範なハイスループットスクリーニング技術

# 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

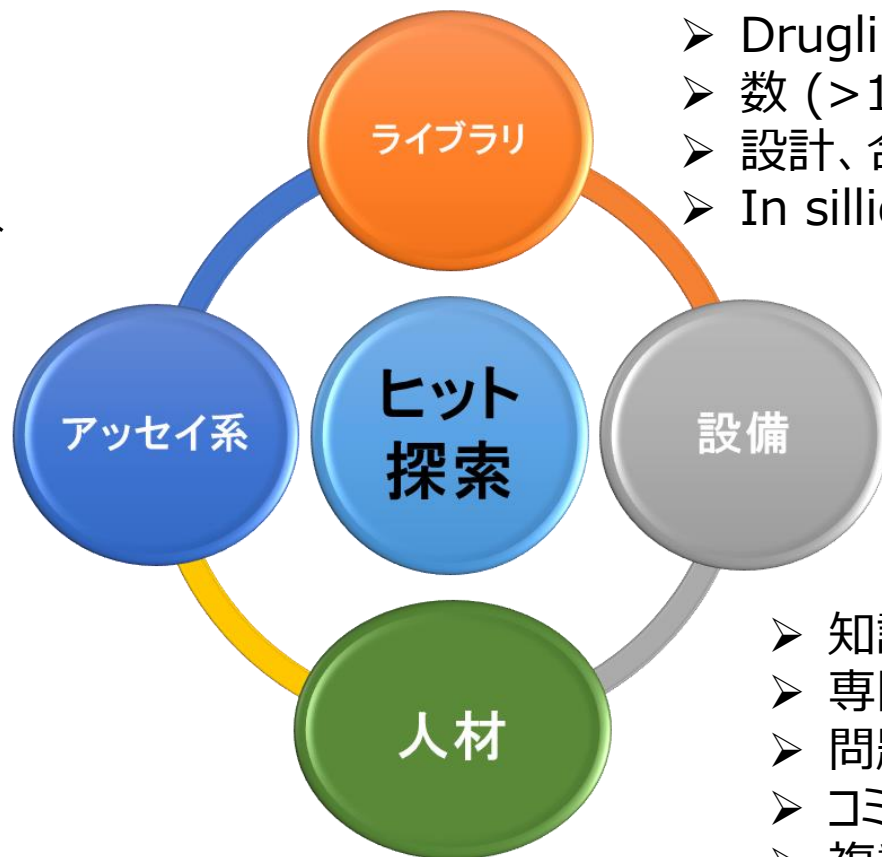
リード化合物の  
創製

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
- In silico 技術

- 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

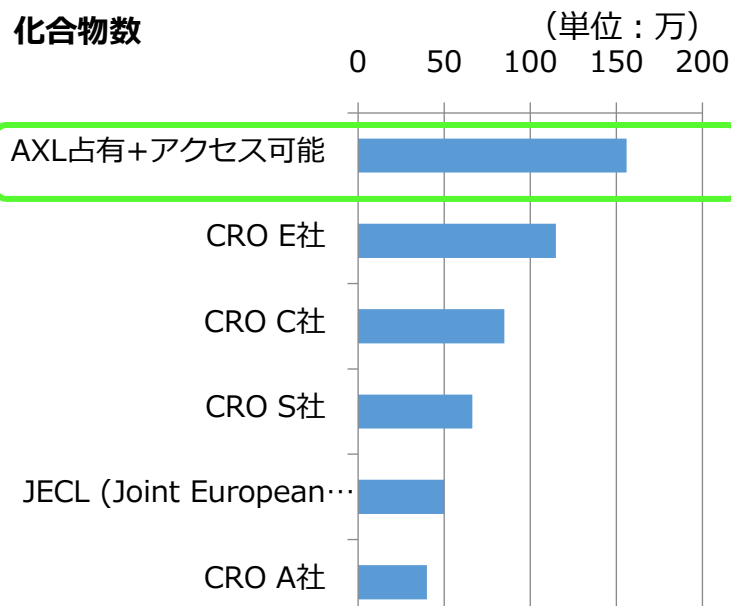
- 製薬会社オリジンのHTSプラットフォームで皆様のヒット化合物探索をサポート

# 質の高い大規模化合物ライブラリ

>150万

質の高い大規模化合物ライブラリ

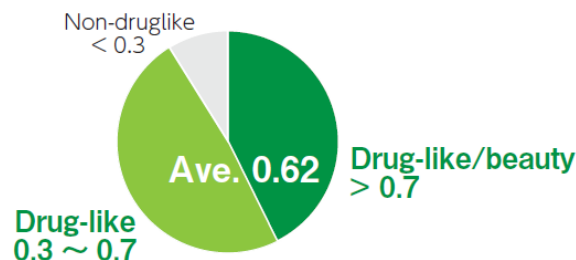
## 業界最大希望の化合物数



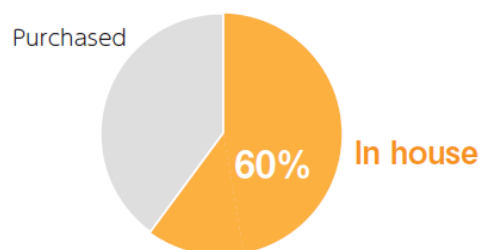
Source: 各種公表資料よりAXL作成

## 質にこだわったライブラリ

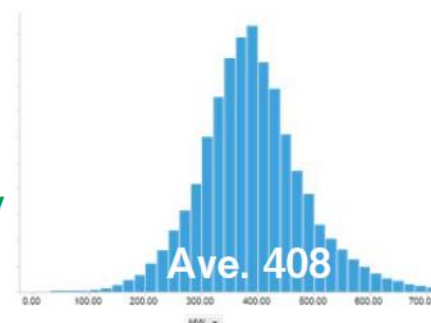
高いドラッグライクネス  
QED: (Chemical beauty)



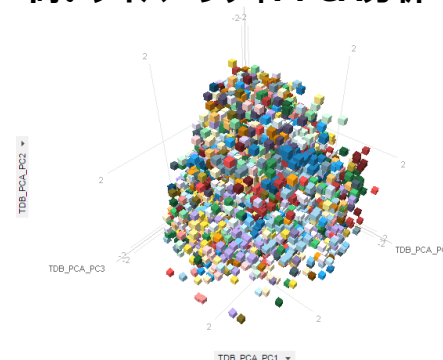
in house デザイン化合物



分子量(MW)のダイバーシティ



高いダイバーシティ: PCA分析



- 創薬の成功確率を高めるヒット化合物の同定には、化合物ライブラリの量と質（ドラッグライクネスとダイバーシティ）がともに重要。
- Axceleadでは、高品質かつ多彩な構造を持つ大規模化合物ライブラリにアクセス可能。

QED: Quantitative Estimate of Drug-likeness  
PCA: Principal Component Analysis (主成分分析)  
プロットの分布範囲が大きいほど、多くのケミカルスペースに対応

# Library Sets for HTS

**Axcelead libraries >1,500,000 cpds**

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

**Diversity Library**



**Single  
200K**

- Pilot screening : 2,560
- Diversity Core : 94,960
- CNS : 18,900
- sp<sup>3</sup>rich and chirality rich: 7,500
- Phenotypic Sc. : 22,000
- Fragment (Ro3.5): 11,000
- Extended rule of 5 : 6,400
- Additional core library (FY21) : 30,000



**Pooled  
720K**

Pool:10 different cpds  
per one sample

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

**Focused Library  
41K**

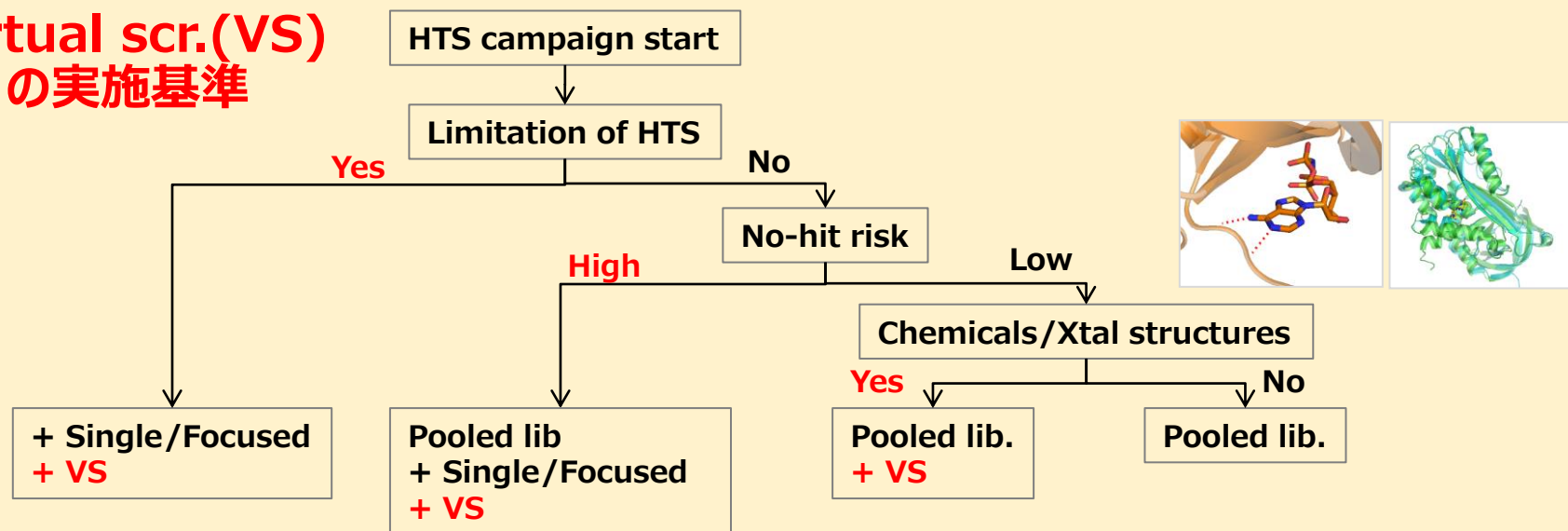
- Target class
  - Kinase : 8,500
  - GPCR : 9,300
  - Protease : 401
  - PPI : 4,100
  - RNA : 6,400
  - RNA splicing (FY21) : 1,280
- Macrocyclic: 4,600
- Natural product: 3,700
- Covalent: 3,800
- Phenotypic Sc.
  - Annotation: 7,000
  - Covalent fragment (FY21):50

# Virtual screeningによる化合物選抜

## 適応例

1. アッセイ数の制限（化合物数）
  - ✓ スループット、コストなど
2. No-hit riskの低減
  - ✓ PPIなどのLigandabilityの低いターゲット
  - ✓ Pilot-screening時にヒット率が低いことが懸念された場合、など
3. 特定のMOA/部分構造などを有する化合物の探索
4. 標的蛋白質または化合物の結晶構造情報がある場合

## Virtual scr.(VS) の実施基準

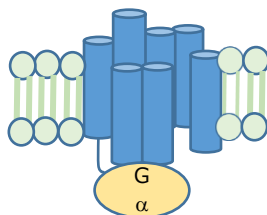


- ターゲットやニーズに応じてVirtual screeningによる化合物選択を実施
- ランダムスクリーニングとVirtual スクリーニングを組み合わせたヒット探索が可能

# Assay Platforms

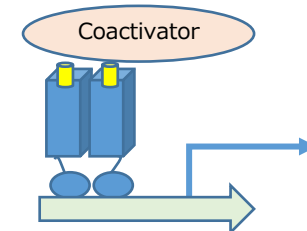
## GPCR

cAMP assay  
Ca<sup>2+</sup> flux assay  
Reporter gene assay  
Arrestin/Internalization assays  
Binding assay  
Impedance assay



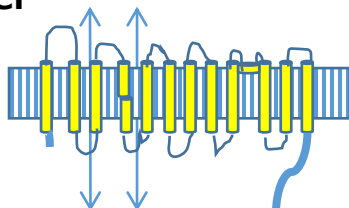
## Nuclear receptor

Binding assay  
Cofactor recruitment assay  
Reporter gene assay  
Nuclear translocation assay



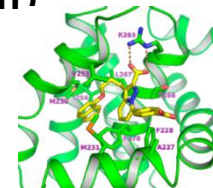
## Ion channel / Transporter

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



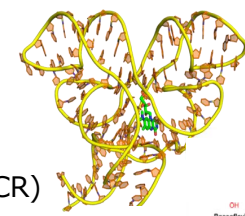
J Med Chem **56** 9635–45 (2013)

## Enzyme

Luminescence, Absorbance, Fluorescence, TR-FRET  
Alphascreen, ELISA  
Radiometric assay  
Label-free assay (e.g. Rapidfire-MS)  
Coupling assay  
Global kinase panel

## Nucleic acid

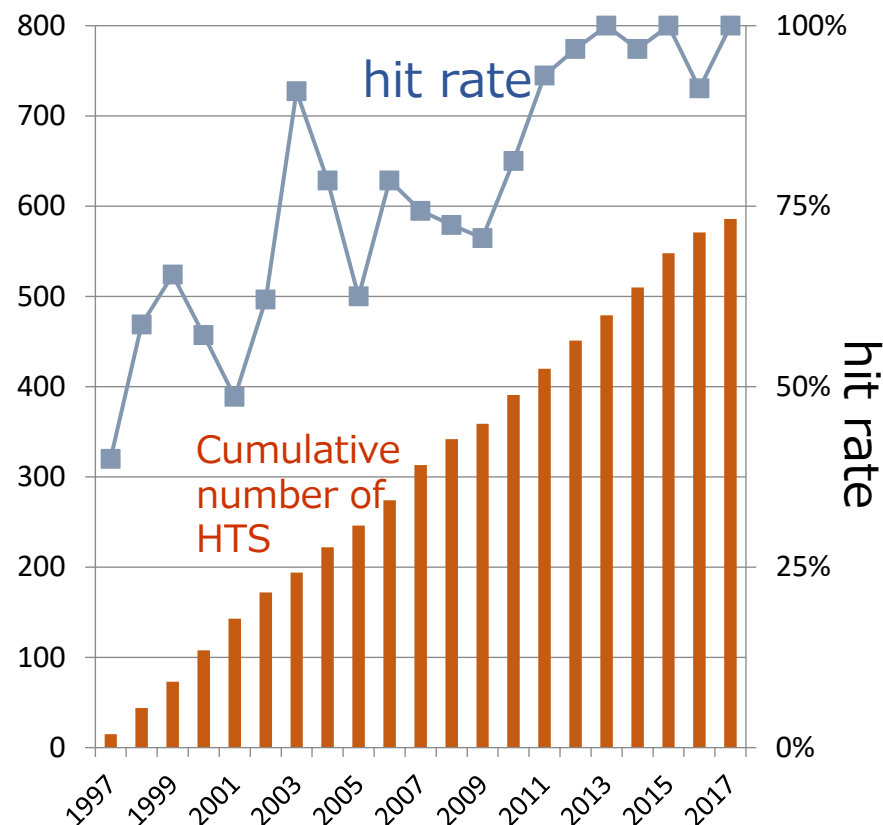
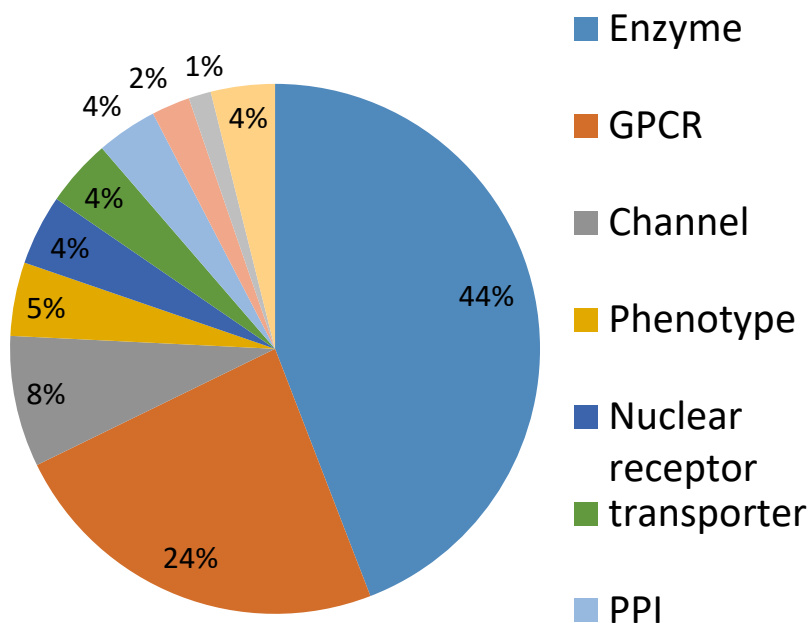
Biophysical assay (e.g. ASMS)  
Fluorescence probe binding  
FRET  
Cell-based assay (Reporter gene, RT-qPCR)



➤ ほぼ全てのターゲットクラスやフェノタイプのアッセイ系構築およびHTSを実施可能なプラットフォームを整備

# HTS実績

## Target class

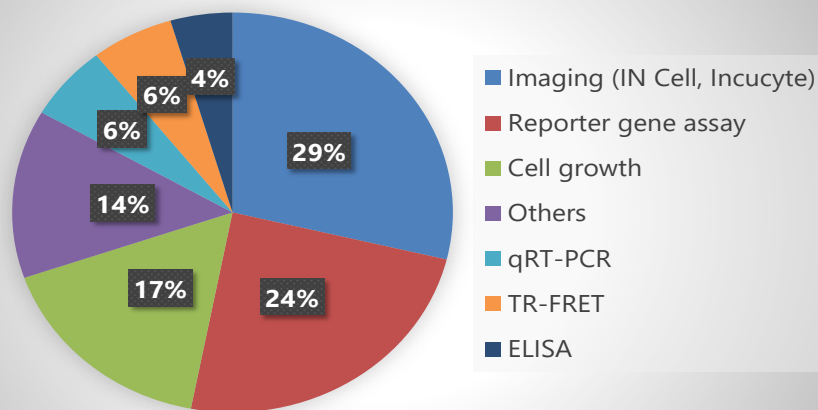


製薬企業で蓄積した膨大な創薬データを基に、最適なヒット探索プランをご提案

- 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

# Phenotypic Drug Discovery実績

## Assay systems



- **Successful >70 HTS campaigns with phenotypic screening**

Assay systems	Library size (Average)
Imaging	100,000 cpds
Reporter gene assay	400,000 cpds
Cell growth	400,000 cpds
qRT-PCR	30,000 cpds
TR-FRET	100,000 cpds
ELISA	100,000 cpds

## Cells

- Cell lines
- Primary cells
- iPS differentiated cells

## Libraries

- Small molecules
- CRISPR / Cas KD libraries



# スクリーニング戦略立案～HTS系構築

## スクリーニング戦略立案

- ・ターゲットアセスメント
- 薬理情報
- Druggability予測
- アッセイ系情報
- ・スクリーニングカスケードの作成及び化合物選択基準
- ・使用化合物ライブラリー
- ・Virtual screen適応可能性
- ・スケジュール



## 材料調製

- ・cDNA クローニング
- ・安定発現細胞構築
- ・タンパク質調製（発現・精製）  
（E.coli/Baculovirus/動物細胞）

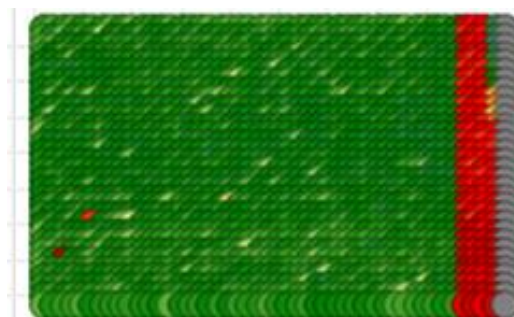
## アッセイ系構築

- ・Km測定(酵素)
- ・Ligand濃度依存性(受容体等)
- ・タイムコース測定
- ・コントロール化合物評価
- ・安定性(Z')
- ・DMSO耐性
- ・カウンターアッセイ系設定



## HTS化検討

- ・ミニチュア化  
（384/1536well plates）
- ・ロボティクス適応
- ・安定性（Z', 日間差）
- ・Pilot スクリーニング
  - 評価系の妥当性
  - ライブラリー濃度設定
  - ヒット率測定



- ご要望、ターゲットに基づいて最も成功確率の高いHTS系をデザイン
- お客様が構築したアッセイ系を用いたスクリーニング実施も可能

# HTS設備およびCapability

- ・ハイスループットスクリーニング  
(全自動化、多検体対応；1536ウェル)
- ・多様なアッセイに対応した最先端の装置  
生化学スクリーニング（蛍光・吸光・発光）  
ハイコンテンツスクリーニング  
生物物理学スクリーニング  
質量分析計を用いたスクリーニング  
定量的PCR法によるスクリーニング
- ・多様な評価系に対応したデータ解析プラットフォーム
- ・BSL2に対応したスクリーニング
- ・放射性同位体を用いたスクリーニング

## ➤ RT-PCR システム



QuantiStudio 12K Flex Realtime PCR  
(ThermoFisher)

## ➤ Autopatch システム



Syncropatch 384 (Nanion)

## ➤ フルオートメーションシステム



HORNET HTS10CB  
(FUJIFILM WAKO)

## ➤ RapidFire-MS/MS システム



(Agilent)

## ➤ 極微量化合物分注システム



Echo555  
(Labcyte)

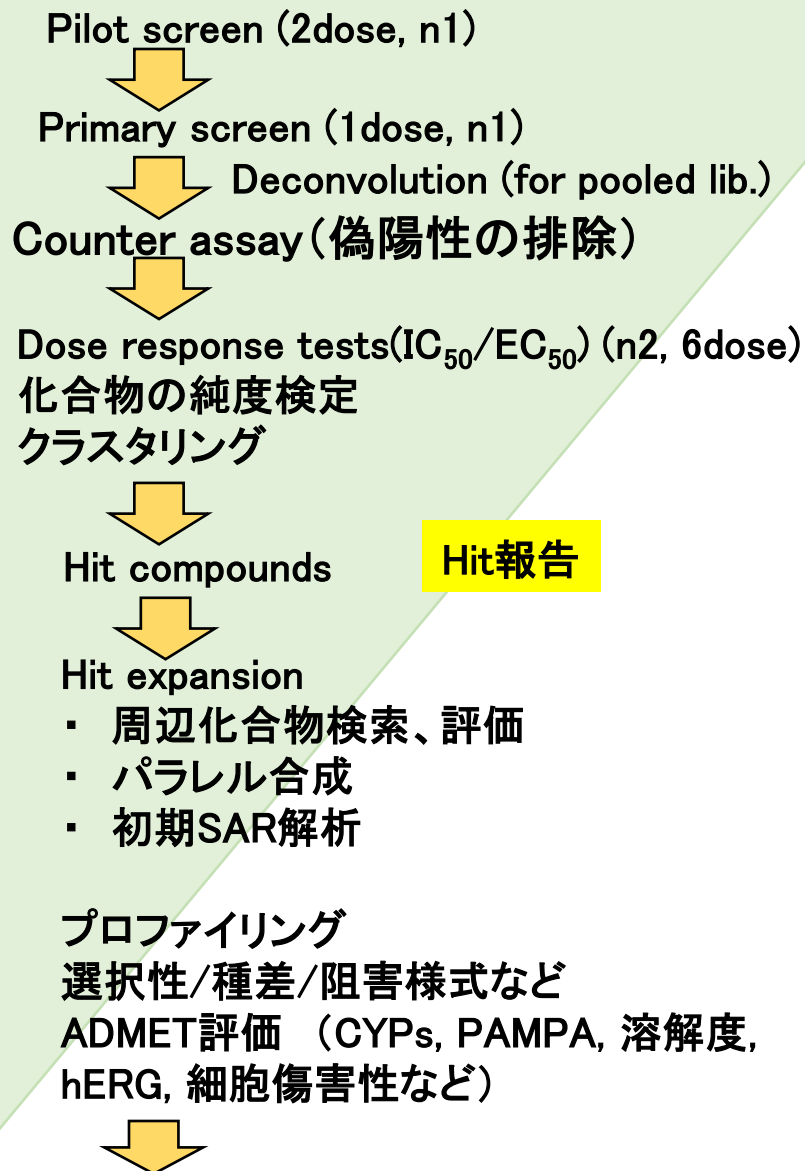
## ➤ High-content screening



IN Cell Analyzer 6000 (GE Healthcare)

## ➤ 広範かつ高性能のHTS設備を完備

# スクリーニングカスケード



Hit報告

Hit探索サービス  
基本パッケージ

Post HTSサービス

Advanced hit

# Hit 報告の一例

Compound No	Cluster ID	Primary assay IC50 (M)	Counter assay IC50 (M)	Primary assay (Graph)	Counter assay (Graph)	Chemical properties				Purity (%)	Notes
						MW	HBD	HBA	AlogP		
AXL1	1	8.0E-08	>1.0E-05			...	...	...	...	95.5	kinase inhibitor
AXL2	1	2.9E-07	>1.0E-05			...	...	...	...	90.5	kinase inhibitor
AXL3	1	4.9E-06	>1.0E-05			...	...	...	...	95.3	kinase inhibitor
AXL4	2	3.2E-08	>1.0E-05			...	...	...	...	85.4	promiscuous
AXL5	3	1.2E-06	>1.0E-05			...	...	...	...	97.2	
AXL6	3	2.5E-06	>1.0E-05			...	...	...	...	98.1	
AXL7	3	4.2E-06	>1.0E-05			...	...	...	...	95.4	

- 過去アッセイ情報（化合物のアノテーション（ターゲットクラス）情報、細胞障害性など）
  - 化学部門によるコメント（クラスタリング、構造的特徴）、
  - 物性値情報（QED, HBA/HBD, AlogP, tPSA, 芳香環数、Fsp3など）
- これらの付加情報を加えてヒット報告いたします

# リード創出～最適化



- 生化学アッセイ (Potency/selectivity/species for SAR study)
- 阻害様式・カインेटクスなど
- 細胞アッセイ (Target engagement, Function etc.)
- 生物物理学の解析  
ASMS, TSA, NMR, ITC, SPR, X-ray crystallography

## SPR



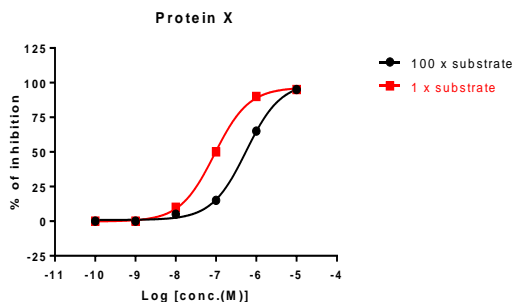
Biacore S200  
(GE Healthcare)

## Thermodynamics



iTC200  
(Malvern  
Panalytical)

## Mode of inhibition



Substrate  
competition  
assay

## Electrophysiology



Q patch  
(Sophion)

- 豊富な経験と確かな技術でリード創出、最適化プロセスにおけるin vitroアッセイ、プロファイリングをサポートいたします



# X線共結晶構造解析

Purified Protein

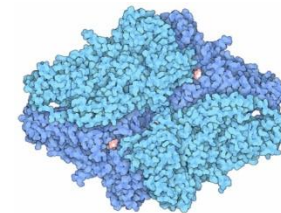
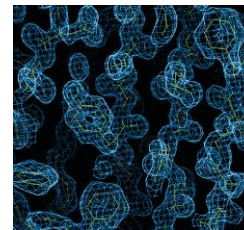
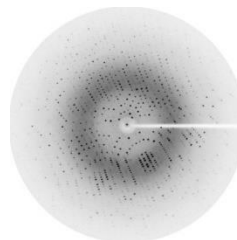
Crystallization

Freezing

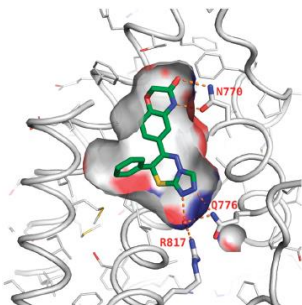
Data collection

Phasing

3D Structure

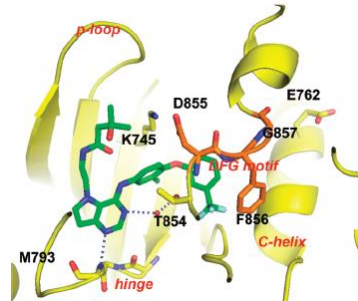


Nuclear receptor (MR)



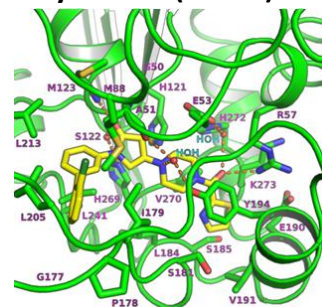
J Med Chem **54** 8616–31 (2011)

Protein kinase (EGFR)



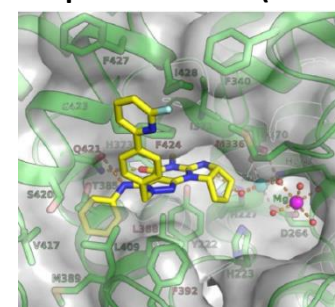
J Med Chem **54** 8030–50 (2011)

Hydrolase (MAGL)



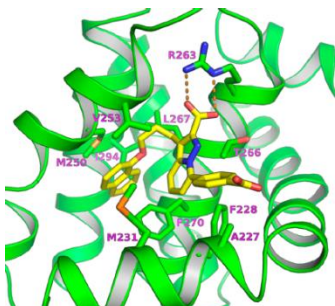
J Med Chem **61** 9205–17 (2018)

Phosphodiesterase (PDE1)



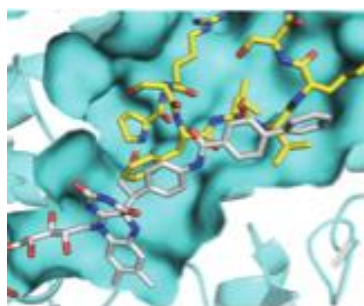
J Med Chem **59** 1149–64 (2016)

PPI target (Mcl-1)



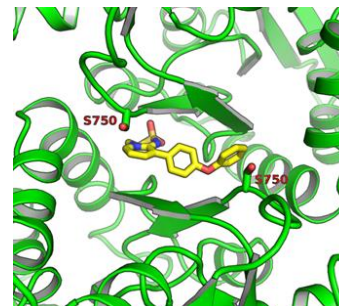
J Med Chem **56** 9635–45 (2013)

Epigenetics target (LSD1)



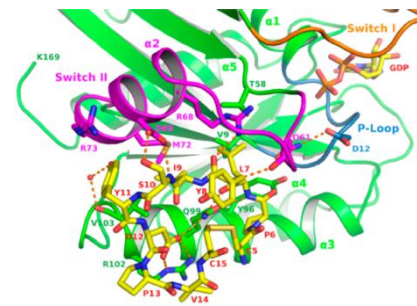
Neuropsychopharm Epub (2018)

Glutamate receptor (GluA2)



Neuropsychopharm **44** 961–70 (2019)

GTPase (KRAS)



ACS Med Chem Lett **8** 732–6 (2017)

化合物の結合モードを明らかにし、ラショナルなドラッグデザインをサポートいたします

# GPCR biased ligands探索の実例

## GPR39 positive allosteric modulators

### Primary screening

Library: >600,000 cpds at 3 $\mu$ M

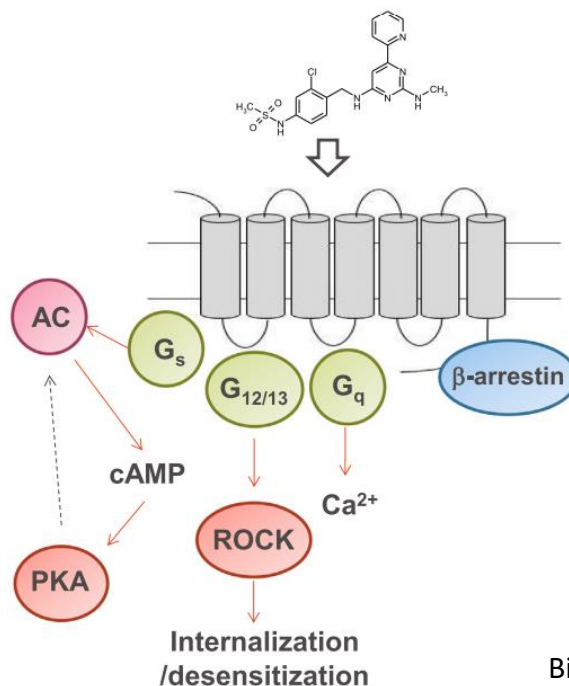
hGPR39 cAMP assay (Gs) with EC<sub>20</sub> Zn<sup>2+</sup>

### Counter assay

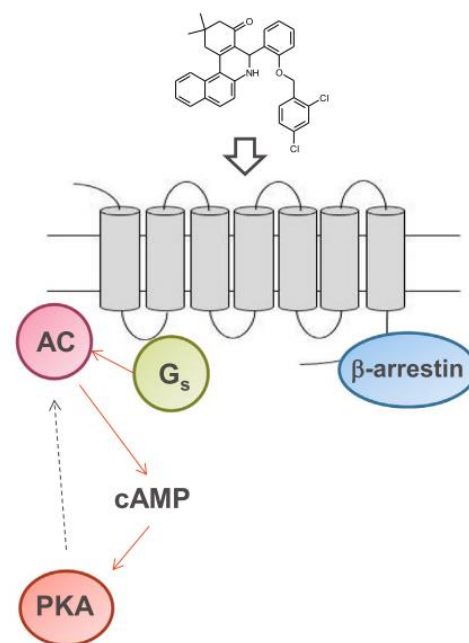
### Profiling assay

hGPR39 cAMP assay (Gs)  
Calcium/IP1 assay (Gq)  
SRE-Luc assay (G12)  
Arrestin assay

Gs Biased ligands



### Gs biased



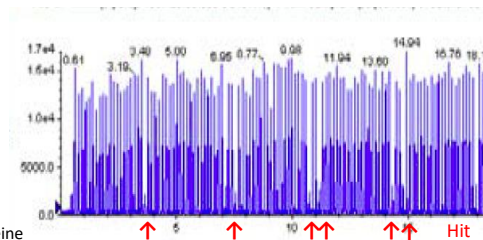
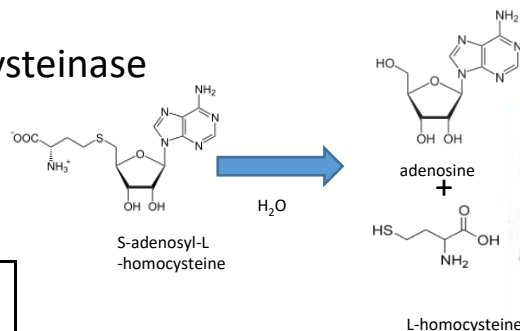
Biochemical Pharmacology 140 (2017) 105–114

- 各種シグナル解析をHTSと組み合わせることで、Biased ligandを創出
- GPCR創薬は受容体選択性だけでなくFunction選択性が問われる時代へ

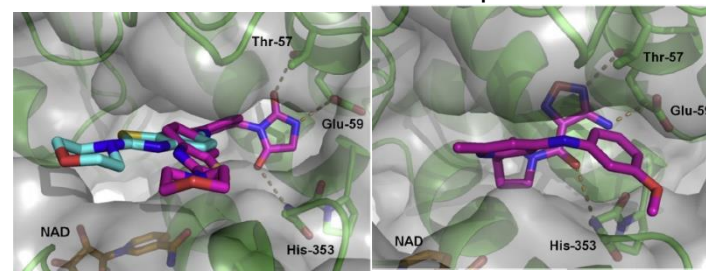
# Rapidfire-MSを用いた酵素阻害剤探索の実例

## AHCY

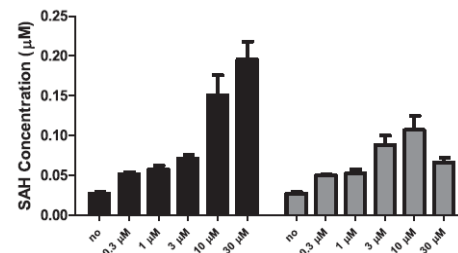
### Adenosylhomocysteinase



➤ Crystal structures of AHCY in complex with hit compounds



➤ Cellular target engagement



Biochem Biophys Res Commun.  
2017;491(1):1-7

Diversity Library  
670K (pooled library)



**Primary Screening**  
RapidFire/MS  
>20% inhibition @2μM

310 Primary hits  
(131clusters)



**Confirmation Screening**  
Dose-response test  
SAH competitive test  
Time-dependency test

59 hits  
(32 clusters)  
SAH competitive



initial SAR analysis

5 Clusters

➤ PooledライブラリとRapidfireの組み合わせで、大規模なMSベースのHTSを実現



# HT-ASMS を用いたRNA binderの探索事例

## High-throughput Affinity Selection Mass Spectrometry for FMN riboswitch RNA binders

Diversity Library: 140,633 cpds

RNA focused Library: 6,400 cpds

FMN riboswitch RNA 5  $\mu$ M

Compound conc.: each 0.5  $\mu$ M

Assay format: 400 cpds/pool

Reproducibility test

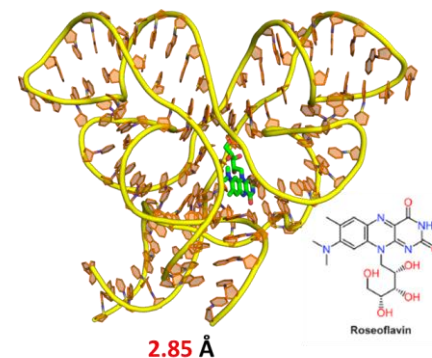
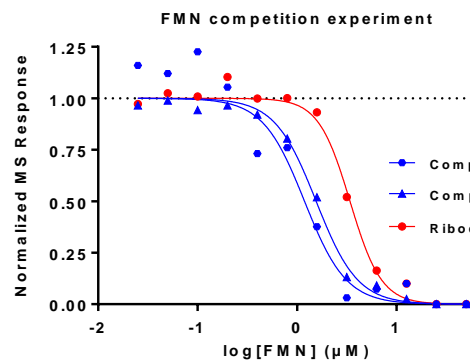
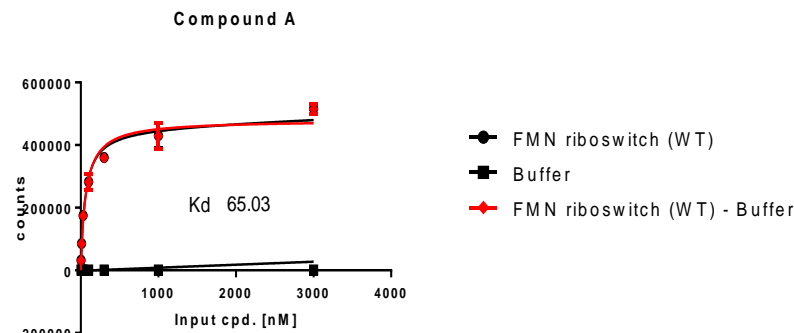
Counter Screen using scramble RNA

Confirmation assay

Diversity Library : 72 hits

RNA focused Library : 7 hits

Kd determination



In house data

➤ ASMS技術で標的分子に直接結合する低分子化合物の探索が可能

# iPS分化心筋細胞を用いたPhenotypic screening

## iPS-分化心筋細胞を用いたエンドセリン誘導性BNP発現抑制薬の探索

### ① 1<sup>st</sup> screening

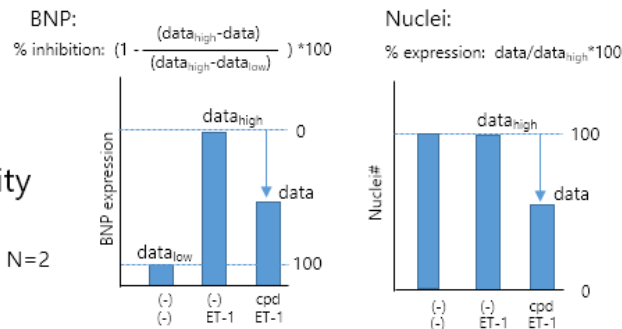
ICC Library:biologically annotated library\_3683 compounds, 3uM, N=1  
Image analyzing of BNP by INCell 6000

### ② Reproducibility

ICC 3uM, N=2  
ELISA

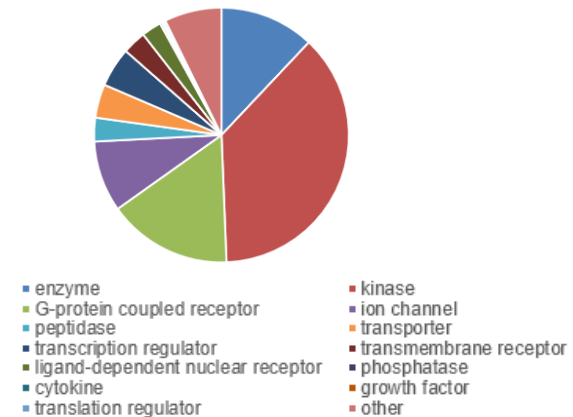
### ③ Dose-dependent activity

ICC 0.03,0.1,0.3,1,3,10uM, N=2  
ELISA  
TaqMan

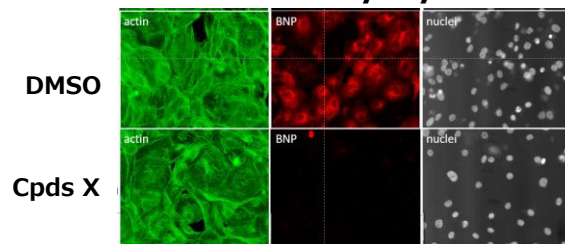


- アノテーションライブラリーからのスクリーニングを実施し、ヒット化合物を同定した。
- ヒット化合物にはFDA承認薬が含まれており、リポジショニングの適応が考えられた。
- 複数ヒットのアノテーション情報を基に作用機序、パスウェイを明らかにした。

### Annotation of selected hit candidates



### iPS-differentiated cardiomyocyte



MOA analysis



- iPS分化細胞を用いた化合物探索
- High Content Assayを用いた画像解析による化合物探索を実現

# 統合型ヒット探索プラットフォーム

## 1. 魅力的な化合物ライブラリ

- 製薬会社オリジンの大規模、高品質、多様な構造を有するライブラリ

## 2. 広範かつ高性能の設備

- オートメーションシステム（HTS、ロジスティクス）
- ほぼすべてのターゲットクラスおよび表現型スクリーニングに対するプラットフォーム

## 3. 包括的なワンストップサービス

- 戦略立案、材料調製、系構築、HTS、プロファイリング、結晶構造解析に至る包括的サービス
- 化学部門によるHit expansion、優先ケモタイプ(Advanced Hit)選抜
- ADMET専門家によるHigh-throughput-ADMETプロファイリングの対応



➤ 蓄積した創薬データと経験を基にして、創薬に繋がる高品質のヒット化合物情報を効率的に取得いたします

# 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](mailto:Contact@axcelead.com)