AXCELEAD
Drug Discovery Partners

分子スクリーニングサービスのご紹介

高品質（多様性、Lead-likeness)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

ヒット探索を成功させるための重要因子

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

- Diversity
- Drug-likeness
- 設計、合成、購入
- In silico 技術

- 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

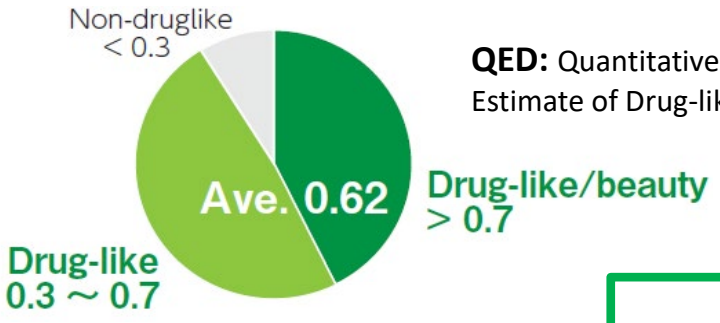
- ロボティクス
- 倉庫
- 測定装置
- 分注装置
- システム
- メンテナンス

- 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

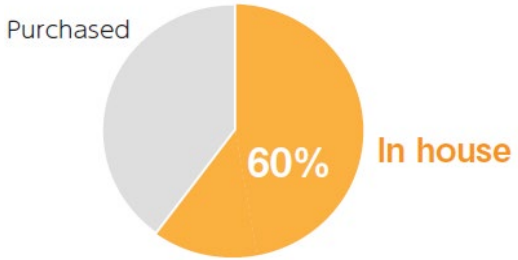
➢ 製薬会社オリジンのHTSプラットフォームで皆様のヒット化合物探索をサポート

製薬企業由来のオリジナルな高品質ライブラリーを利用し、優位性の高いヒット化合物を創出します

1.5M
化合物ライブラリーサイズ



QED: Quantitative Estimate of Drug-likeness



60%
社内合成化合物の割合

HTS 用ライブラリーセット

- **Diversity libraries**
  - シングルライブラリー 31.7万化合物
  - プールライブラリー 50万化合物（基本セット32万化合物）
- **Focused libraries** （合計約4.8万化合物）
  - ターゲットごと（Kinase, GPCR, PPI, RNA, molecular glue etc.）
  - CNS フォーカス
  - Extended rule of 5
  - PPI, Macrocycle
  - 天然物
  - 共有結合性化合物
  - アノテーション化合物

500K
プールライブラリーサイズ

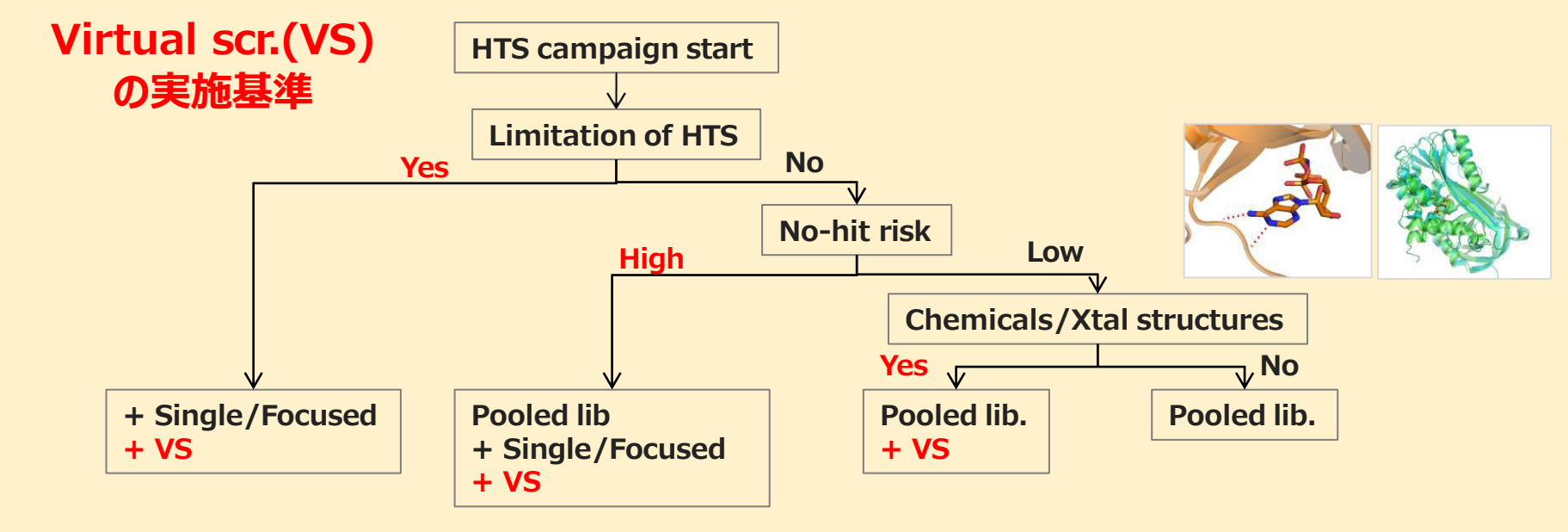
317K
シングルライブラリーサイズ

✓ 150万化合物に対するバーチャルスクリーニングでプロジェクト用のカスタムライブラリーを作成する事も可能です

Virtual screeningによる化合物選抜

適応例

1. アッセイ可能化合物数に制限がある場合の効率的なライブラリー選択
   - ✓ 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

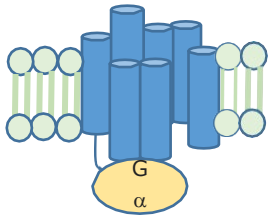


- ➢ ターゲットやニーズに応じてVirtual screeningによる化合物選択を実施
- ➢ ランダムスクリーニングとVirtual スクリーニングを組み合わせたヒット探索が可能

Assay Platforms

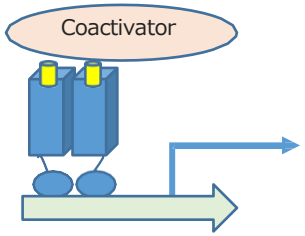
GPCR

cAMP assay
Ca^{2+} flux assay
Reporter gene assay
Arrestin/Internalization assays
Binding assay
Impedance assay



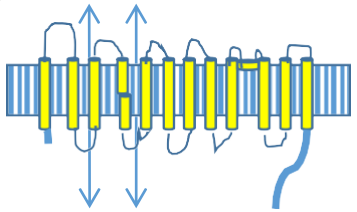
Nuclear receptor

Binding assay
Cofactor recruitment assay
Reporter gene assay
Nuclear translocation assay



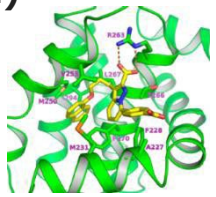
Ion channel / Transporter

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



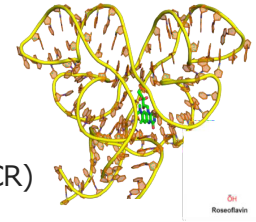
J Med Chem **56** 9635–45 (2013)

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)



➢ 広範な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

対応可能なアッセイの例

Enzyme

- Luminescence, Absorbance, Coupling, Fluorescence, TR-FRET, AlphaScreen
- Label-free assay (Rapidfire-MS)
- ELISA
- Radiometric assay

GPCR

- cAMP assay
- Ca^{2+} flux assay (FLIPR, FDSS)
- Reporter gene assay
- Arrestin/Internalization assays
- Binding assay

Phenotype

- High content imaging assay
- Reporter gene assay, qRT-PCR
- Cell growth etc.

Protein/Protein Interaction

- TR-FRET, AlphaScreen
- ELISA
- NanoBit, NanoBRET
- Two-hybrid assay
- Biophysical assay

Ion channel / Transporter

- Ion influx assay
- Membrane potential
- Electrophysiology
- Substrate uptake
- Binding

Biophysics

- SPR
- ASMS
- ITC
- Thermal Shift
- Crystal structure

Nucleic Acids

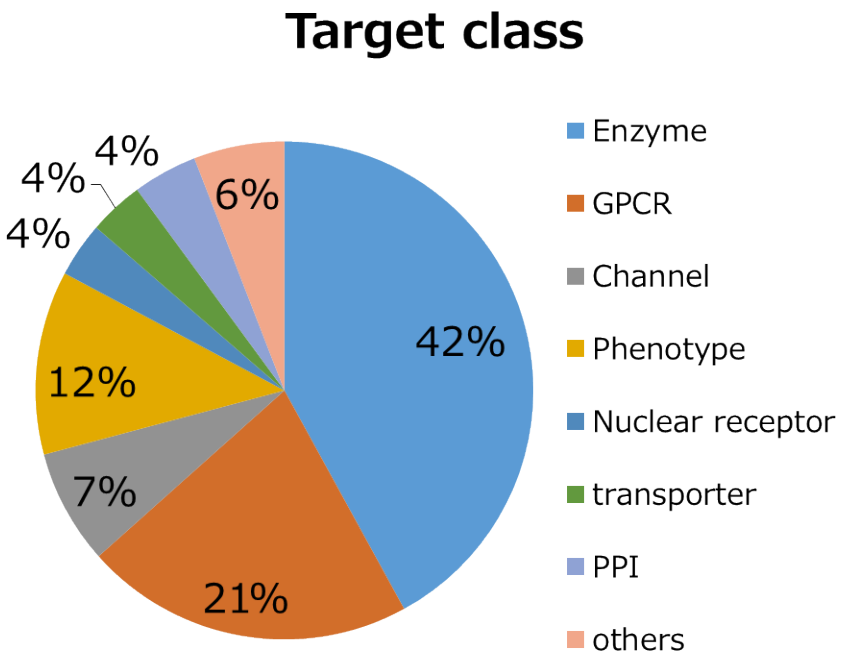
- Biophysical assay (e.g. ASMS)
- Fluorescence probe binding
- FRET
- Cell-based assay (Reporter gene, RT-qPCR)

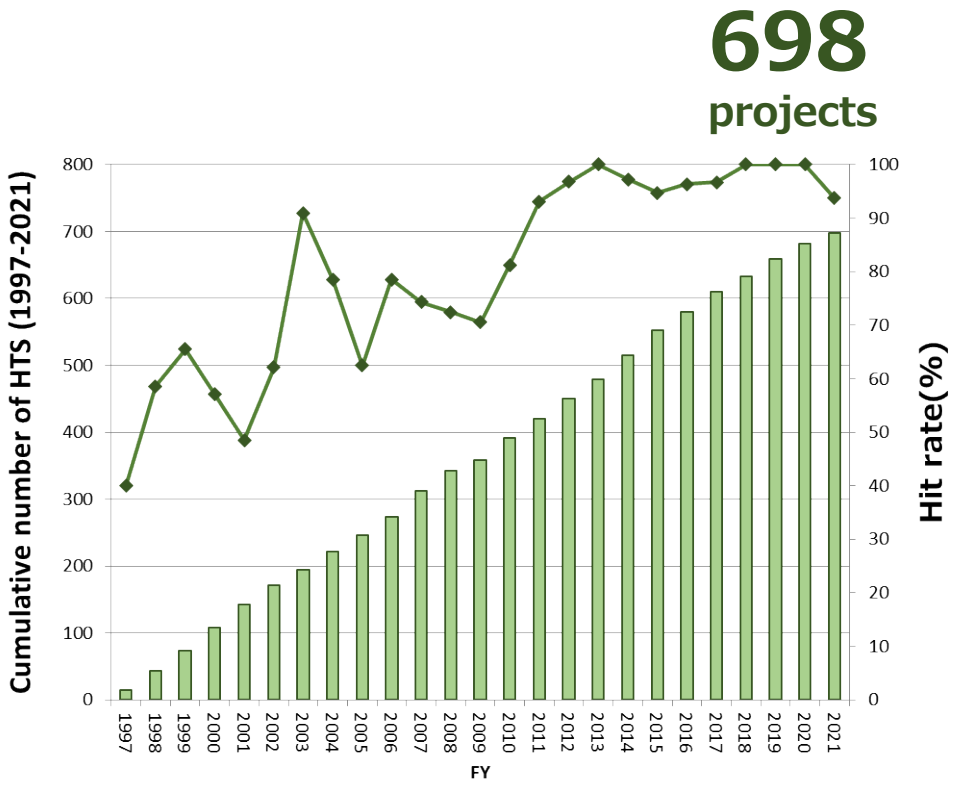
Nuclear Receptor

- Binding assay
- Cofactor recruitment assay
- Reporter gene assay
- Nuclear translocation assay

一般的なアッセイのほとんどに経験があります。
リストに無いアッセイについてもお問い合わせください。

HTS実績





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

- 700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

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）
  - ハイコンテントスクリーニング
  - 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

➢ Full automation system

HORNET HTS10CB

(FUJIFILM　WAKO)

➢ Acoustic liquid handling

Echo555

(Labcyte)

FDSS7000

(Hamamatsu Photonics)

➢ RapidFire400

(Agilent)

➢ 6550 Q-TOF MS

(Agilent)

➢ Autopatch

Syncropatch 384 (Nanion)

➢ RT-PCR

QuantiStudio 12K Flex Realtime PCR (ThermoFisher)

➢ High-content screening

IN Cell Analyzer 6000

(Molecular Devices)

➢ Cell Imaging

Cytation 5

(Agilent)

➢ 広範かつ高性能のHTS設備を完備

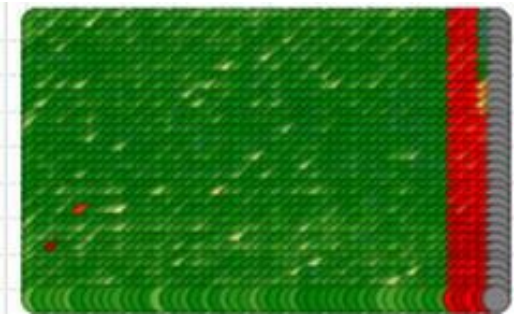
スクリーニング戦略立案～HTS系構築

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
-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）

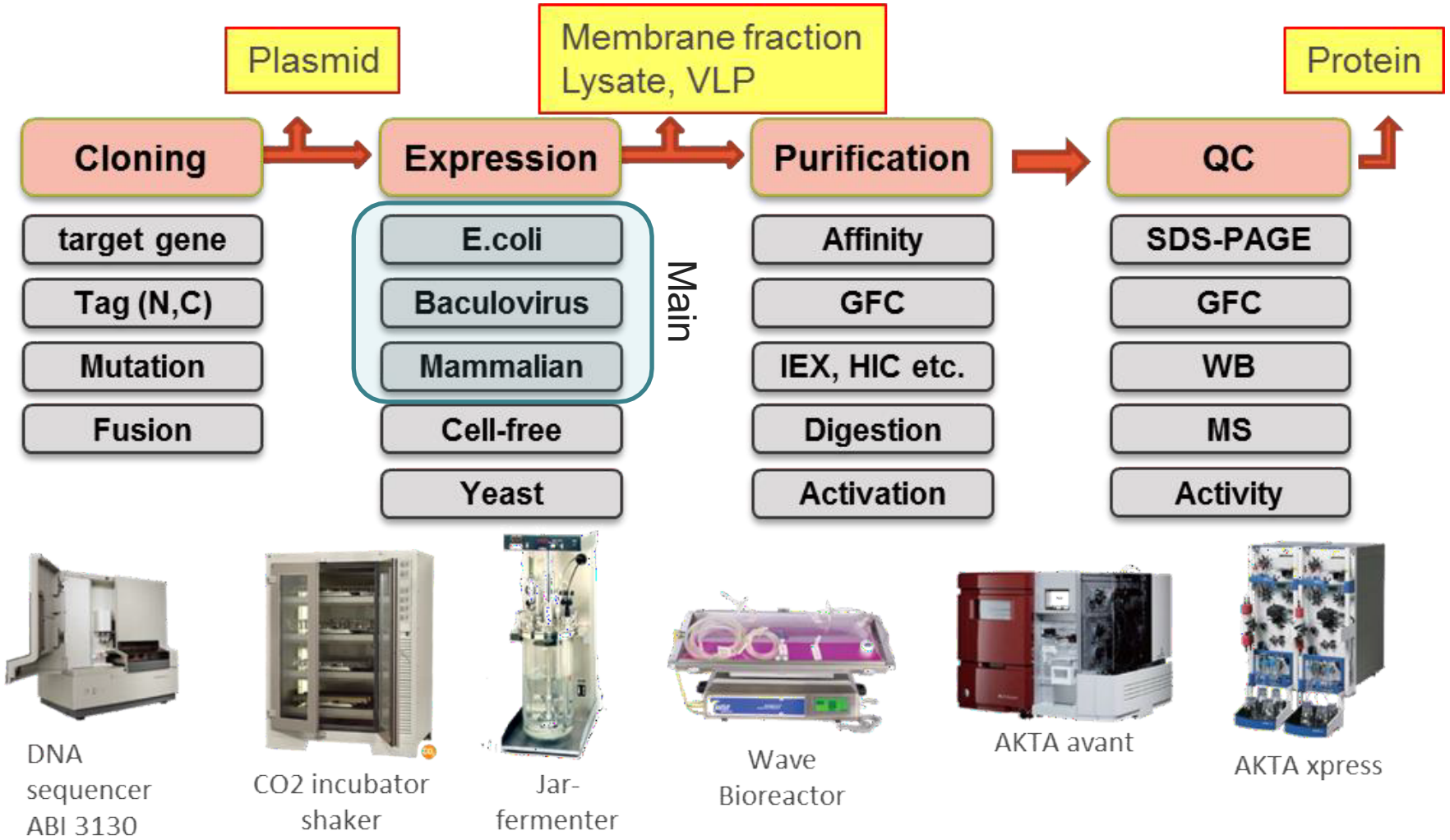
アッセイ系構築
・Km測定(酵素)
・Ligand濃度依存性(受容体等)
・タイムコース測定
・コントロール化合物評価
・安定性(Z')
・DMSO耐性
・カウンターアッセイ系設定

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
-ヒット率予測



- 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

蛋白質調製

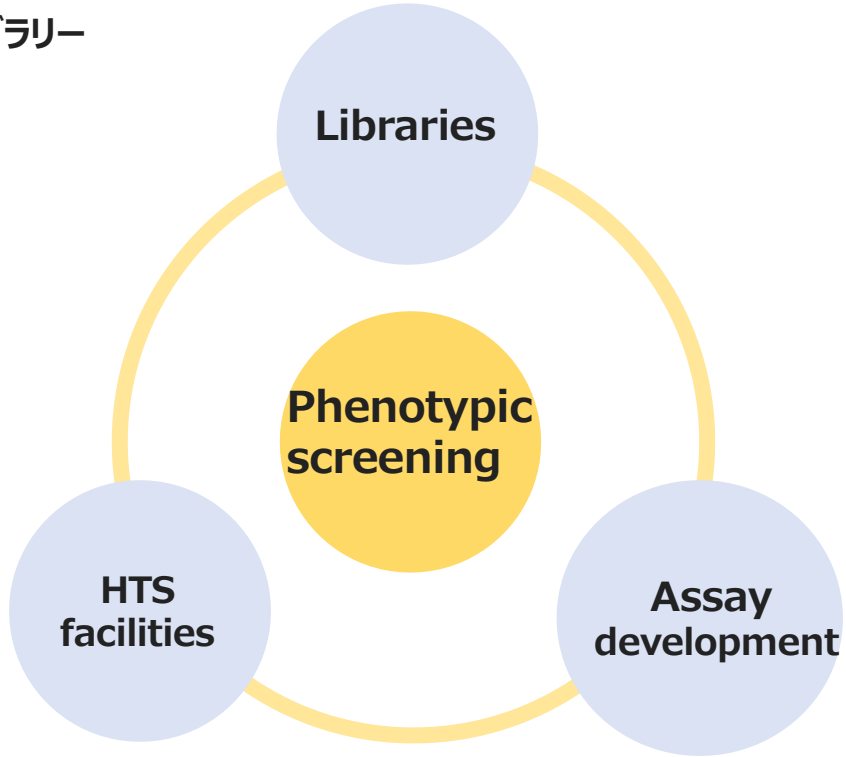


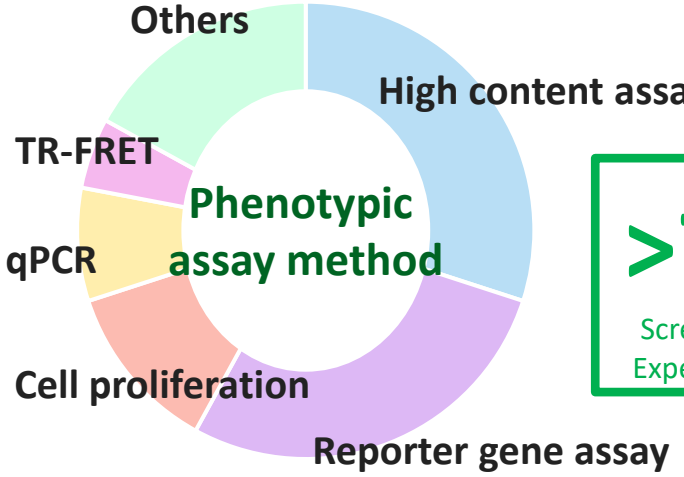
➢ HTS系に最適な材料調製（組換え蛋白質調製、安定発現細胞株）を実施します

Phenotypic screening

ヒット/リード探索、ドラッグリポジショニング、ターゲット/パスウェイ同定の目的に適応可能

◆ 多様性、生物学的情報豊富なライブラリー
・ダイバーシティー
・フォーカス（ターゲットクラス別等）
・アノーテーション
(FDA承認薬を含む化合物ライブラリー)





>70
Screening Experience

◆ 広範な高性能設備
・BSL2対応
・Full auto system

◆ 統合型サービスの提供
・細胞構築
・プラットフォーム
Reporter, qPCR, HCA etc.
iPS細胞、Primary細胞使用可 CRISPR CAS KO screen
（Array型、Pooled型可能、
但しライブラリーは依頼者様より提供）
・HTS adaptationからも対応可

スクリーニングカスケード

Pilot screen (2dose, n1)

↓

Primary screen (1dose, n1)

↓ Deconvolution (for pooled lib.)

Counter assay（偽陽性の排除）

↓

Dose response tests(IC_{50}/EC_{50}) (n2, 6dose)
化合物の純度検定クラスタリング

↓

Hit compounds　Hit報告

↓

Hit expansion
- 周辺化合物検索、評価
- パラレル合成
- 初期SAR解析

プロファイリング
選択性/種差/阻害様式など
ADMET評価　（CYPs, PAMPA, 溶解度, hERG, 細胞傷害性など）

↓

Advanced hit

Hit探索サービス
基本パッケージ

Hit フォローアップ
サービス

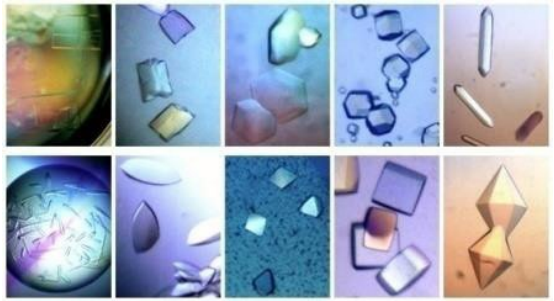
Hit 報告の一例

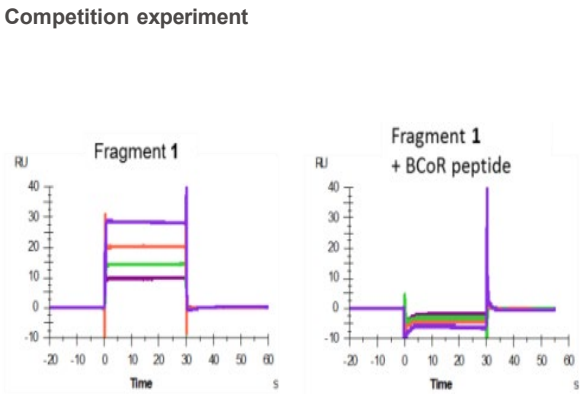
Compound No	Cluster ID	Primary assay IC50 (M)	Counter assay IC50 (M)	Primary assay (Graph)	Counter assay (Graph)	Chemical properties				Purity (%)	Notes
						MW	HBD	HBA	AlogP		
AXL1	1	8.0E-08	>1.0E-05			・・・	・・・	・・・	・・・	95.5	kinase inhibitor
AXL2	1	2.9E-07	>1.0E-05			・・・	・・・	・・・	・・・	90.5	kinase inhibitor
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（化合物のアノーテーション（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）

リード創出～最適化

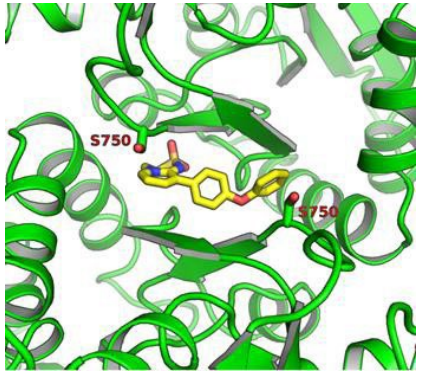
- 生化学アッセイ (Potency/selectivity/species for SAR study)
- 阻害様式・カイネティクスなど
- 細胞アッセイ（Target engagement, Function etc.)
- 生物物理学的解析
  ASMS, TSA, ITC, SPR, X-ray crystallography





Kinetics assay with SPR

Thermodynamics assay with ITC



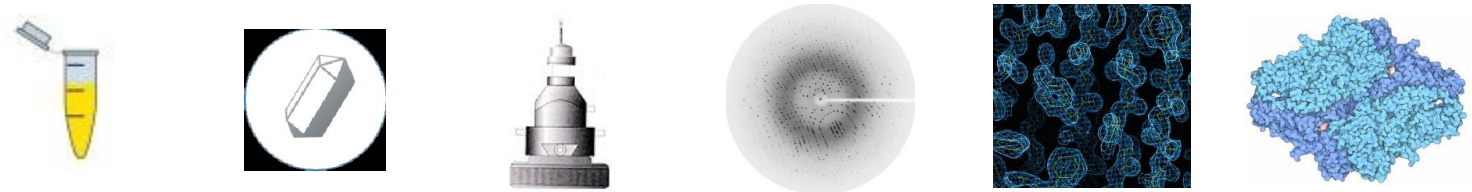
X-ray crystallography

Neuropsychopharm **44** 961–70 (2019)

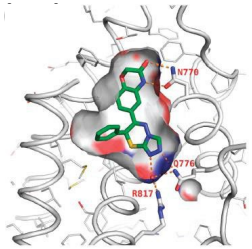
- 豊富な経験と確かな技術でリード創出、最適化プロセスにおけるin vitroアッセイ、プロファイリングをサポートいたします

X線共結晶構造解析

Purified Protein → Crystalli-zation → Freezing → Data collection → Phasing → 3D Structure

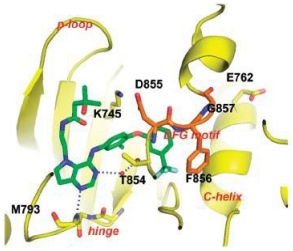


Nuclear receptor



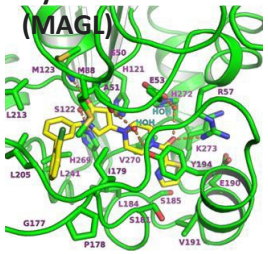
J Med Chem **54** 8616–31 (2011)

Protein kinase



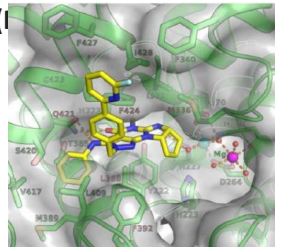
J Med Chem **54** 8030–50 (2011)

Hydrolase (MAGL)



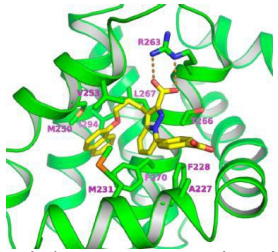
J Med Chem **61** 9205–17 (2018)

Phosphodiesterase (I



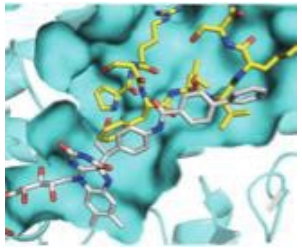
J Med Chem **59** 1149–64 (2016)

PPI target (Mcl-



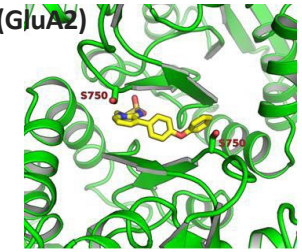
J Med Chem **56** 9635–45 (2013)

Epigenetics target



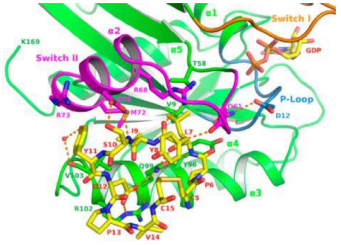
Neuropsychopharm Epub (2018)

Glutamate receptor (GluA2)



Neuropsychopharm **44** 961–70 (2019)

GTPase



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ク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

Primary screening

Library: >600,000 cpds at 3μM

hGPR39 cAMP assay (Gs) with EC_{20} Zn^{2+}

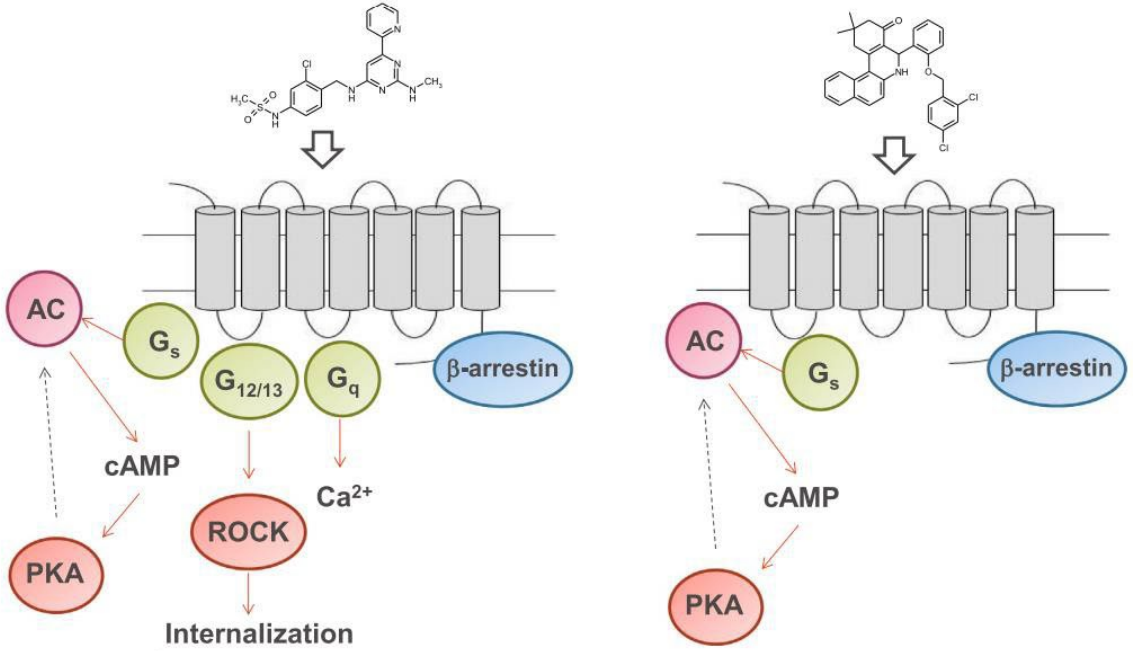
Counter assay

Profiling assay

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

Gs Biased ligands

Gs biased

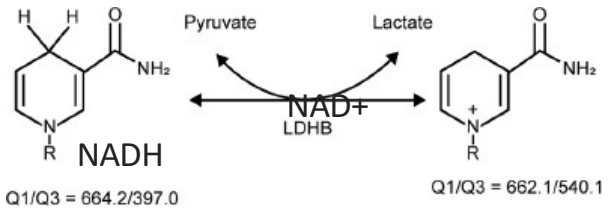


Biochemical Pharmacology 140 (2017) 105–114

- 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を用いた酵素阻害薬探索

LDHB



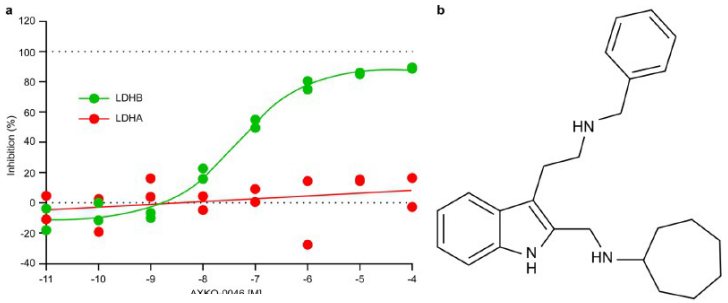
HTS cascade

Primary screening (ca. 370,000 compounds)
- Diversity pooled library 10 μM, N=1
- Enzyme assay with Rapidfire-MS

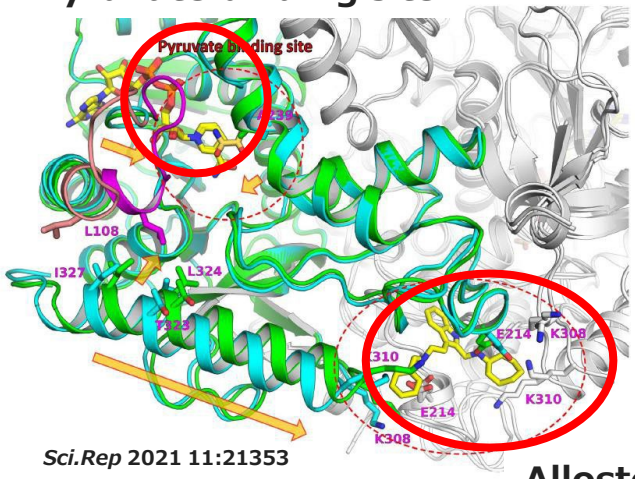
Deconvolution assay (ca. 800 cpds)
- Positive compounds from primary screening 30 μM, N=1

Dose response test
- 4-5 dose, N=2
- Selectivity test (LDHB/LDHA)
- Clustering
- Purity check
- Evaluation of related compounds

Hit compounds



Pyruvate binding site



Sci.Rep 2021 11:21353

Allosteric site

➢ 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探索

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

Diversity Library: 140,633 cpds
RNA focused Library: 6,400 cpds

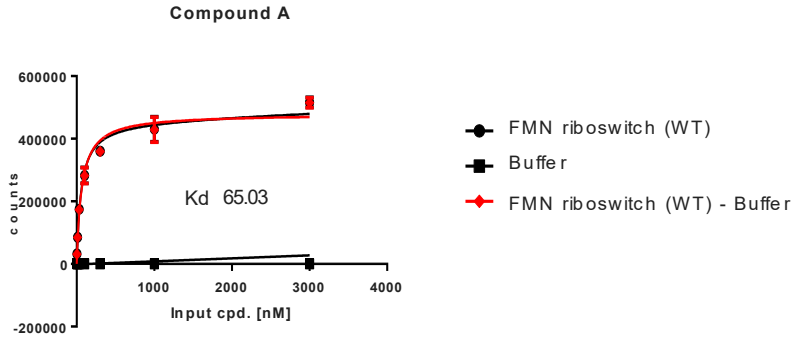
FMN riboswitch RNA 5 μM
Compound conc.: each 0.5 μM
Assay format: 400 cpds/pool

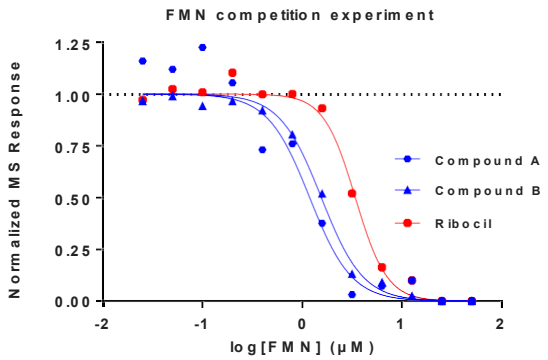
Reproducibility test

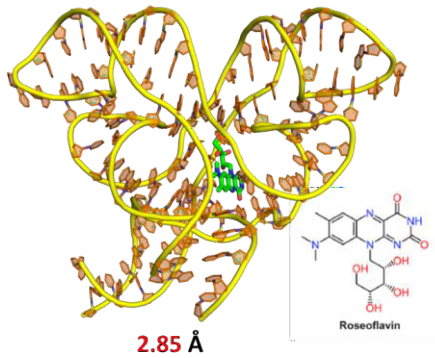
Counter Screen using scramble RNA

Confirmation assay
Diversity Library : 72 hits
RNA focused Library : 7 hits

Kd determination







In house data

iPS分化ミクログリアを用いたPhenotypic screening

Aβ uptake assay in iCell® Microglia AD TREM2

HTS cascade

Primary screening (c.a. 4000 compounds)
- Biologically annotated compounds, > 3,000 cpds
- 3 μM, N=1
- Phagocytosis assay and cytotoxicity (CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay)

⇩

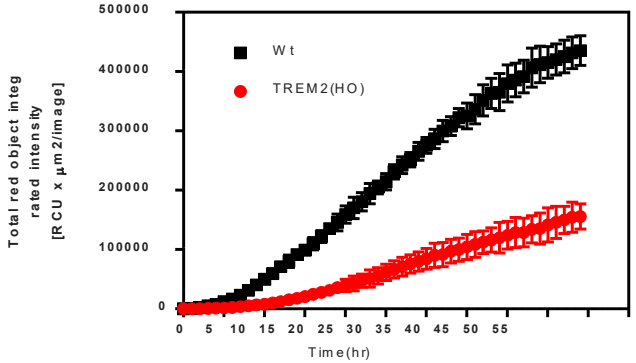
Reproducibility test （350 compounds)
- Positive compounds from primary screening
- 3 μM, N=1
- Phagocytosis assay and cytotoxicity (CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay)

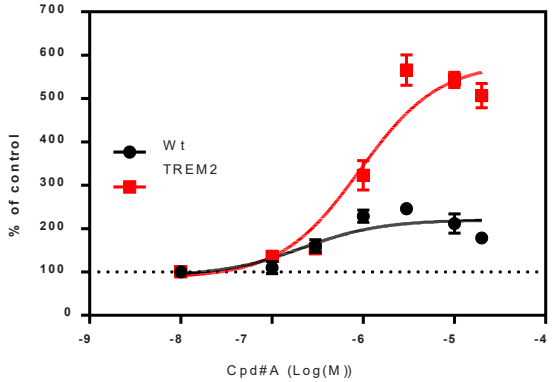
⇩

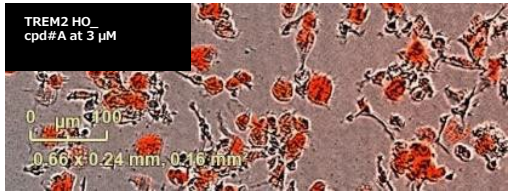
Dose response test (24 compounds)
- Selected compounds from reproducibility test
- 6 dose, N=2
- TREM2 mutant and WT
- Phagocytosis assay and cytotoxicity (CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay)

⇩

Hit compounds







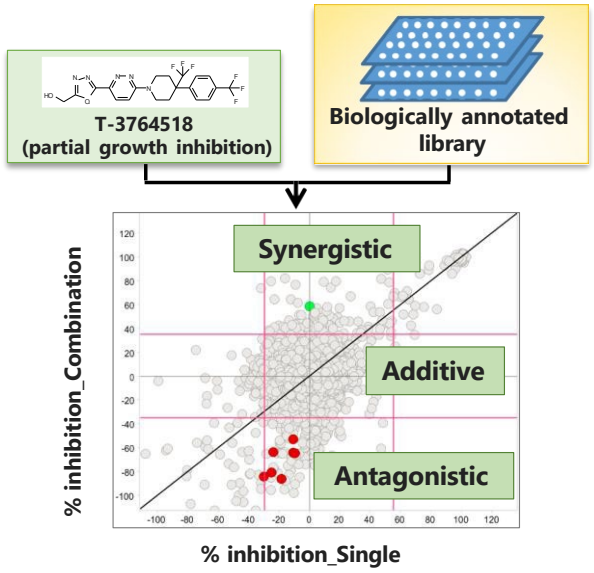
アノテーションライブラリーの作用メカニズム解析への活用

➢ **作用メカニズム解析を実施したい化合物とアノテーションライブラリの併用スクリーニング**

● 作用メカニズム解析を実施したい化合物の作用を増強・抑制する化合物を探索する

癌細胞のSCD1阻害剤に対する耐性メカニズムを解明

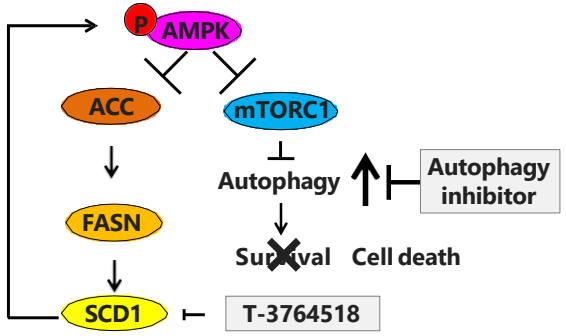
＜Strategy＞



＜New finding＞

Feedback activation of autophagy is a key resistance mechanism against SCD1 inhibitor-induced cell growth inhibition.

SCD1 inhibitor and autophagy inhibitor co-treatment



PLoS One. 2017 Jul 13;12(7):e0181243.

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）
- 広範な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**

THANK YOU!

AXCELEAD
Drug Discovery Partners

https://www.axcelead.com
https://axcelead-us.com