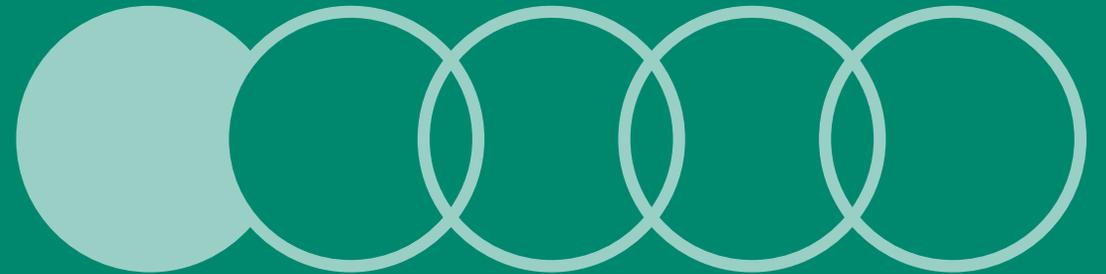
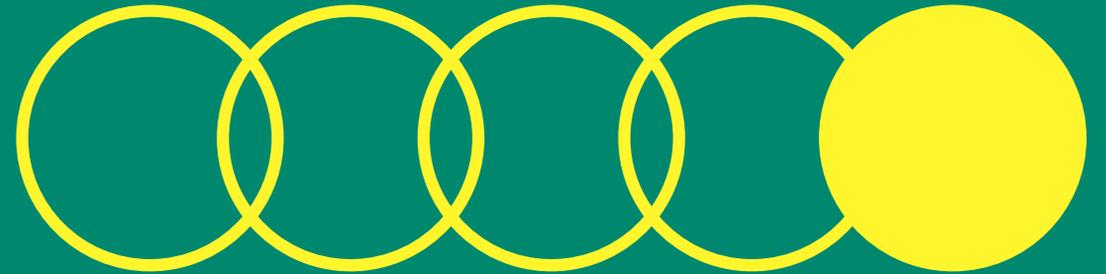
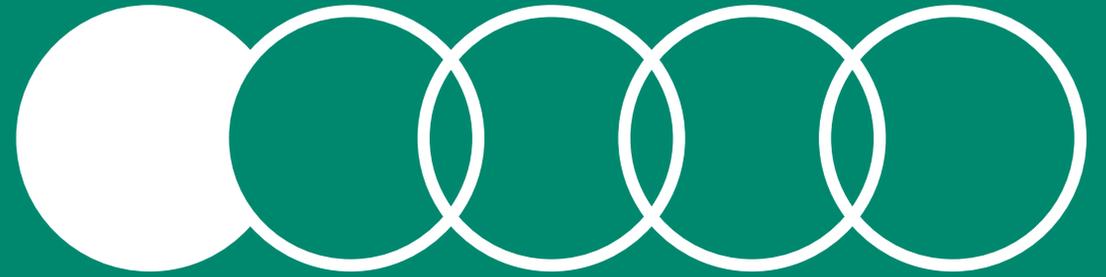


Cytiva Webinar

まもなく開始します。
もうしばらくお待ちください。

※開始時刻から30秒ほど遅れての配信となります。

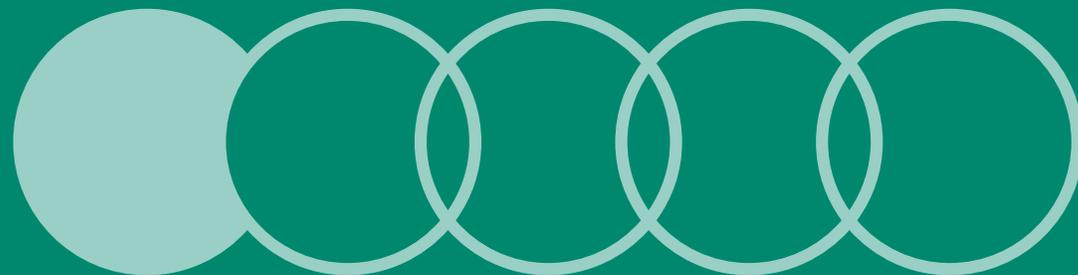
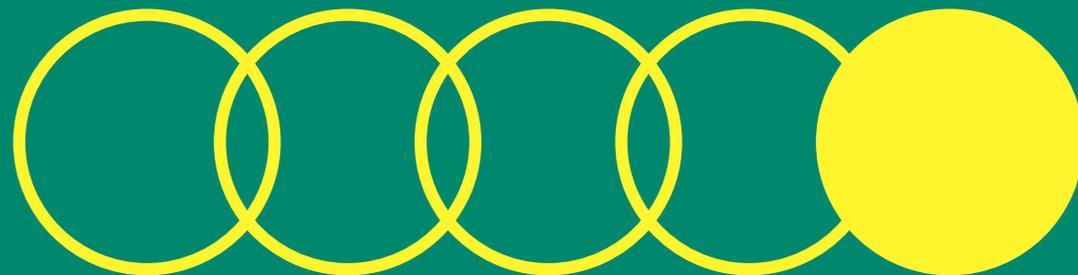
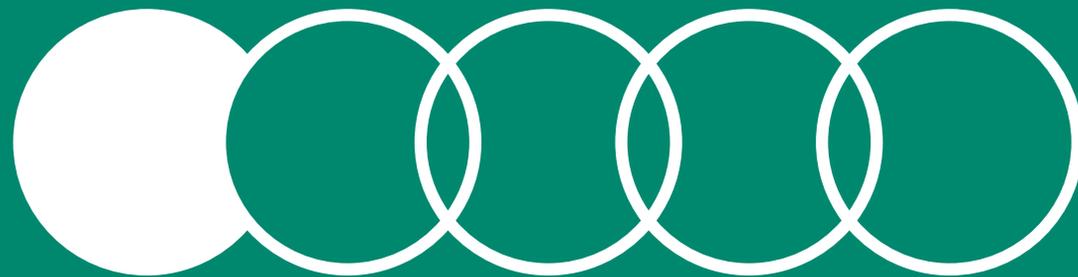


音声につきまして

- 視聴者の皆様の音声は講師、他の参加者には届きません。

ご質問につきまして

- 画面右上のはてなマークをクリックして現れる画面に質問内容を入力してください。
- 講演後まとめて講師より回答いたします。
- 入力いただいたご質問内容、質問者のお名前は、主催者にのみ公開されます。





戦略と測定条件の ワークフロー version 2.0

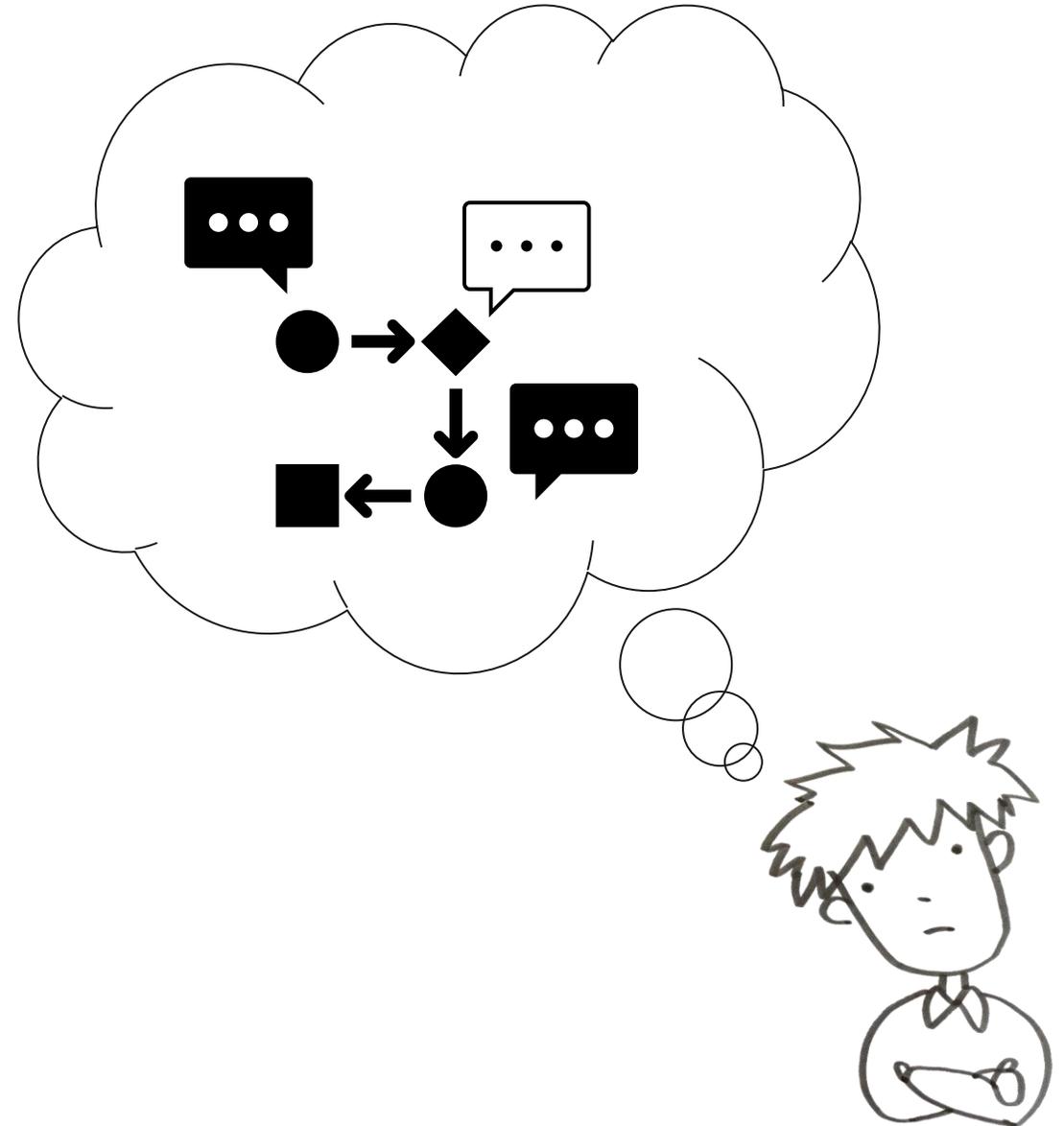


November 16, 2021

はじめに

- 今回は Webinar というよりは日々のご測定に役立つ有用なツールのご紹介
- このPower pointのPDF版自体がツール
- **本ツールはこの Webinar 後公開、ダウンロード可能**
- **各ページには詳細な解説を加えたコメント欄**
- お手元で戦略を確認して計画を練ってから測定へ
- Biacoreを初めて使う方から中級者レベルまで幅広く

- Version1.0では**フラグメント、低分子、抗体**にフォーカス
- 各ページではリンク先へジャンプ可能
- 適宜アップデート予定
- 追加して欲しいご要望がございましたらご連絡ください。



今回の測定の目的は？



1つ前に戻る



ホームへ戻る

Screening

- 多くのサンプル (> 100) の中から候補となるサンプルを荒く絞る
- アナライトは1濃度で測定することが多い
- 再生操作も行わないことが多い

<代表例>

- フラグメントスクリーニング
- 低分子スクリーニング
- 抗体スクリーニング

Characterization

- 絞られたサンプル数 (< 数十) を詳細に解析してベストなサンプルを選別する
- 数百サンプルのCharacterizationもBiacore 8K/8K+ なら現実的
- アナライトは複数濃度で測定する

<代表例>

- Affinity解析
- Kinetics解析



Concentration & Potency

- 品質管理目的の濃度測定やCharacterizationに移る前にサンプルの活性を確認したい場合
- サンプルの相対力価を求める場合

<代表例>

- Concentration assay
- CFCA
- PLA, EC₅₀

何を Screening / Characterization する？

フラグメント

- 300 Da以下の小さい分子
- K_D 値は μM ~ mM オーダー
- 解離が速いためセンサーグラムは箱型

低分子

- 数百~1000 Da程度の分子
- K_D 値は nM ~ μM オーダー
- 少し解離が遅いため解離相では若干カーブが見えることも
- HTSからの二次スクリーン完了後の hit 化合物ライブラリーを想定

抗体

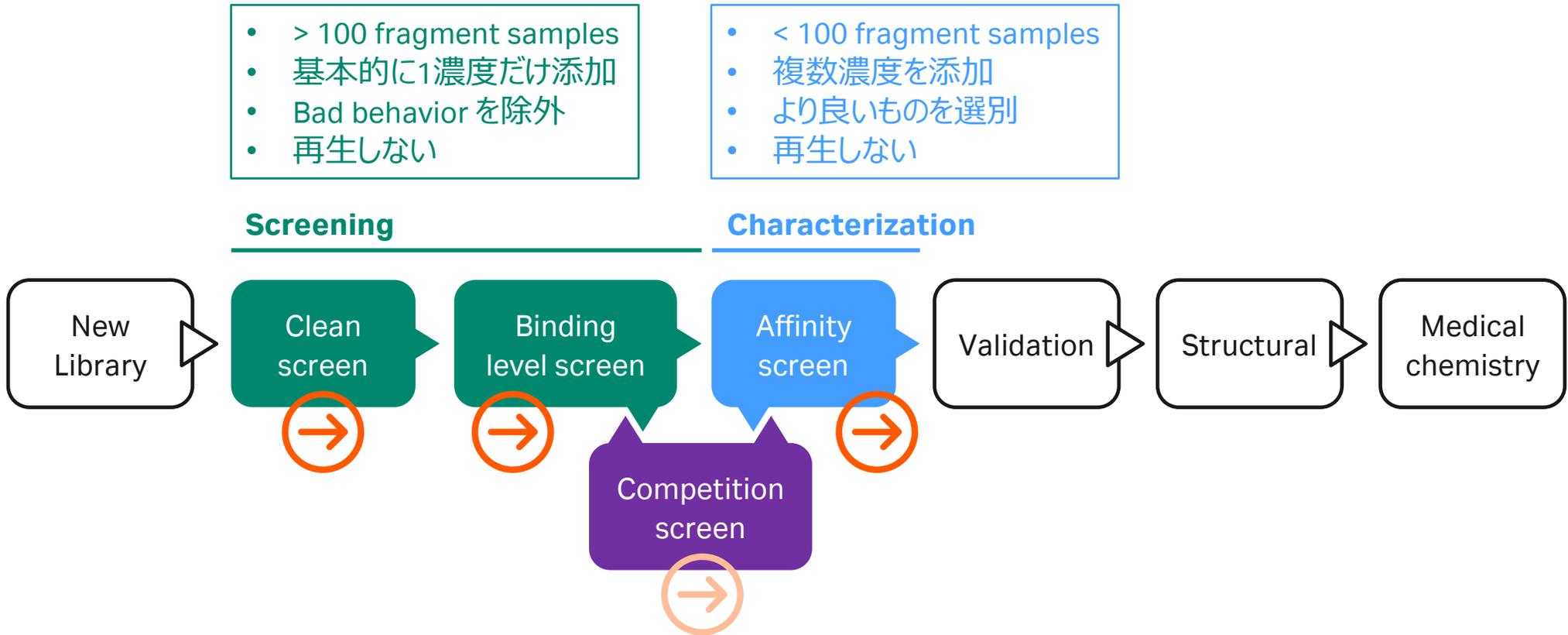
- 大腸菌培養上清や細胞培養上清といったクールドサンプルに含まれる2価の抗体
- 1価の改変抗体は別のアプローチ

その他

- 核酸、その他

フラグメント

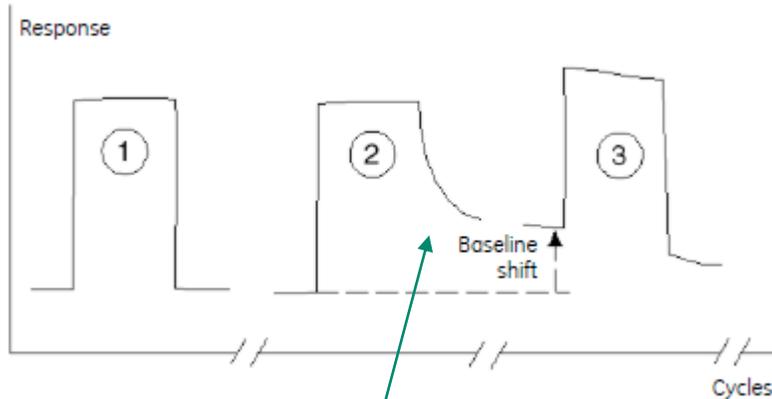
フラグメントにおける典型的なワークフロー全体概要



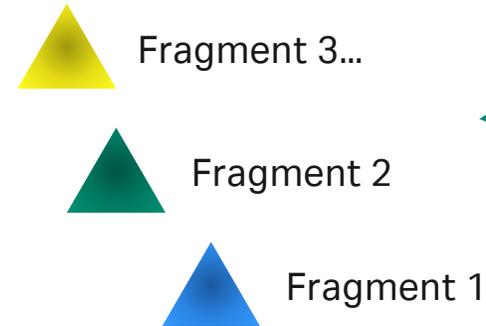
Fragment clean screenの概要

Stickyな（ベタベタな）フラグメントを排除すること

- Solvent correction 不要かつ再生不要
- 解離せず残ってしまうフラグメントが出て問題ない
（特異性の確認ではなく非特異的結合の排除）

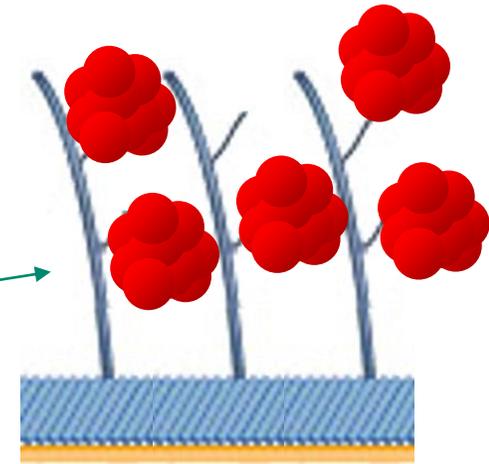


Sticky なので②を排除する
判定基準はベースラインが上昇したかどうか



- 1mM程度で1濃度だけ
- 添加時間は30sec程度

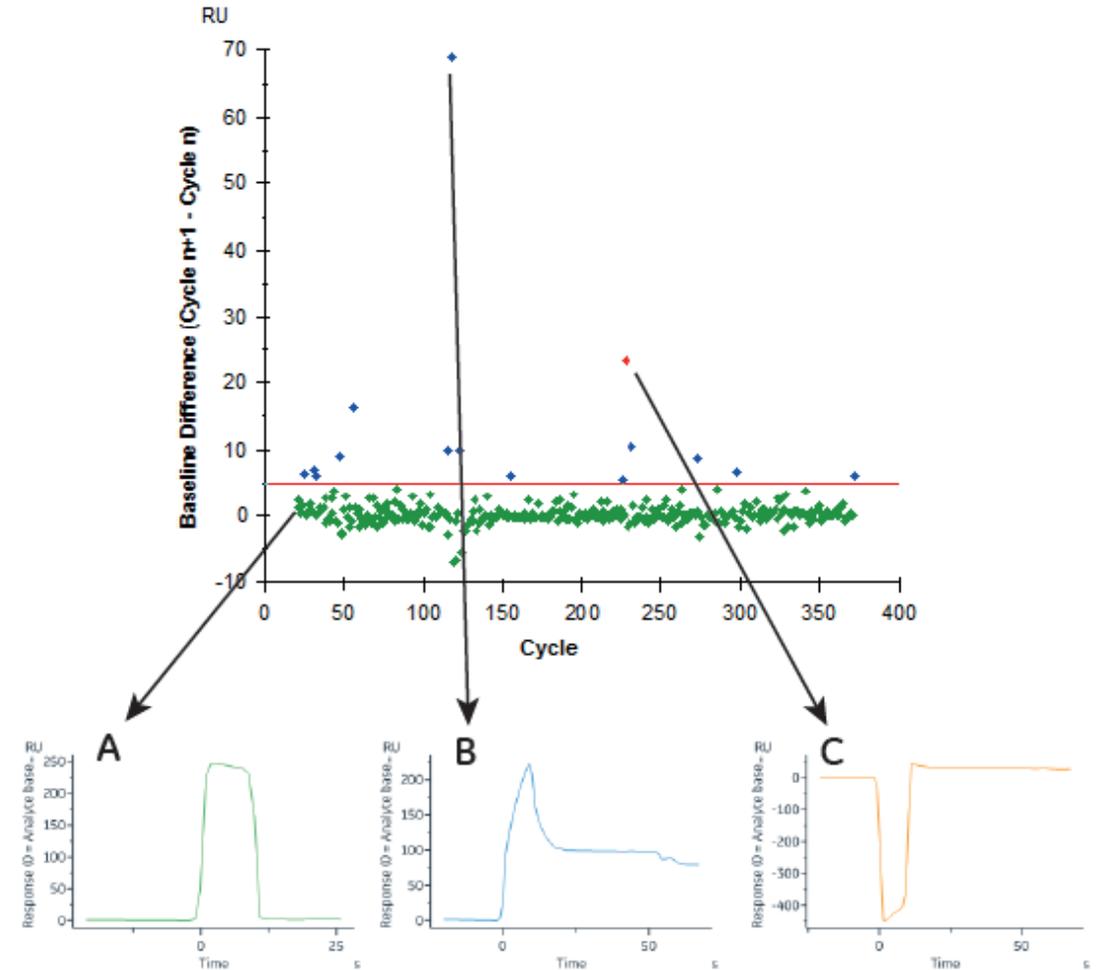
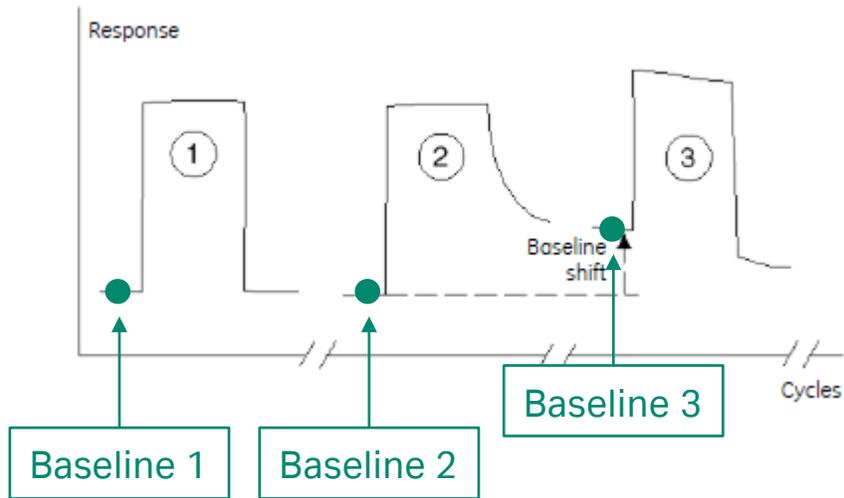
- NA/SA chipへの固定化
- NTA chipへのクロスリンク
- CM5 chipへの固定化



Fragment clean screenの解析

ベースラインのレスポンスだけを評価

- Baseline (n+1) – Baseline n をプロット
- この解析に関してのみ Positive control や Negative control は不要



Fragment clean screen の装置別処理速度

Biacore 8K/8K+

- 8K+:
4608 samples / 8.5 h

※4608 samples は
384 well plate 12枚運用時

- 8K:
1536 samples / 3 h



Biacore S200

- 384 samples / 7.5 h



Biacore T200

- 384 samples / 17.5 h



Biacore X100PP

- 不向き
- 左3つのシステムを利用



その他のシステム (Biacore 4000を除く)

- 不向き
- 左3つのシステムを利用

Fragment Clean screen ワークフロー



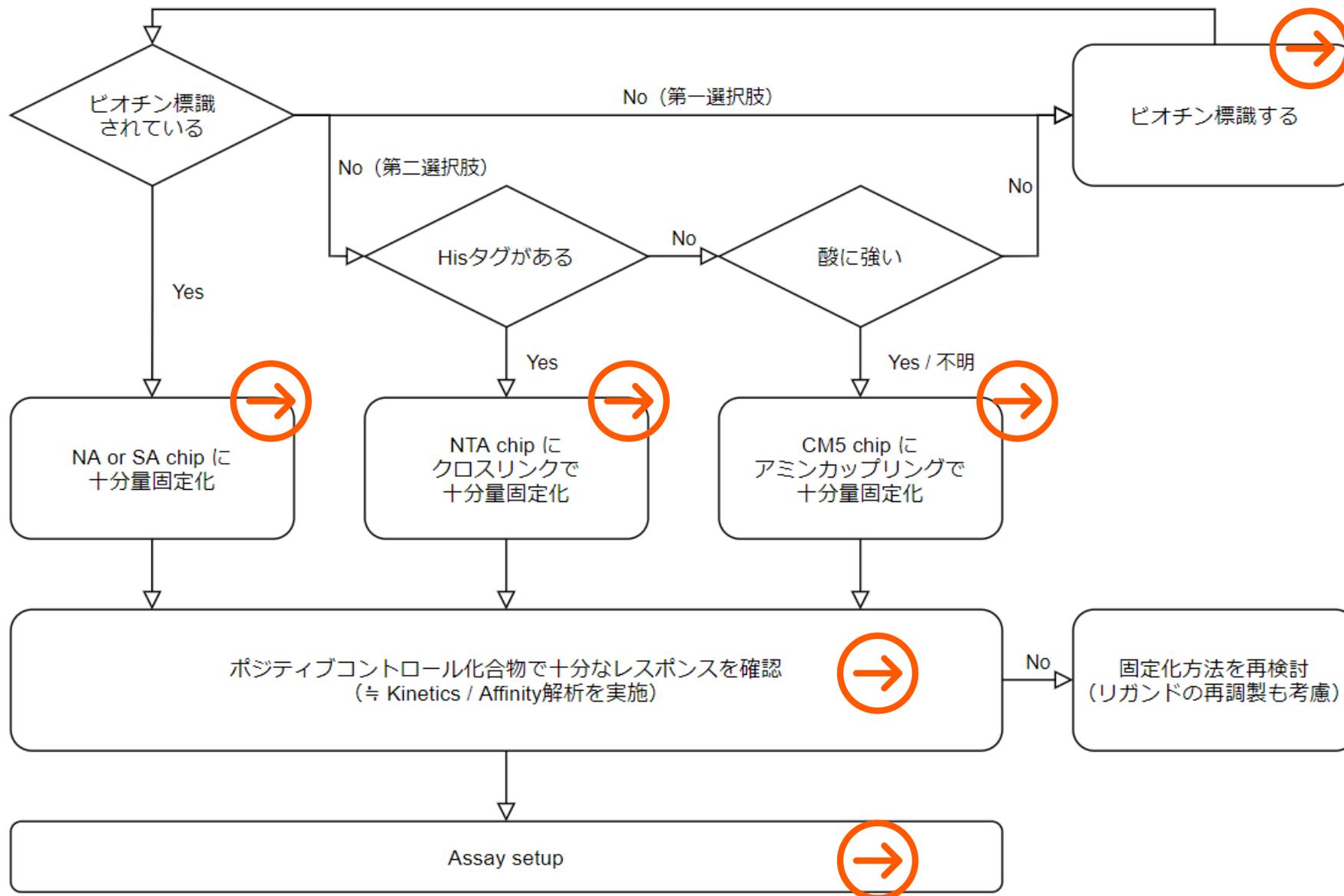
1 ページ戻る



分岐前に戻る



ホームへ戻る

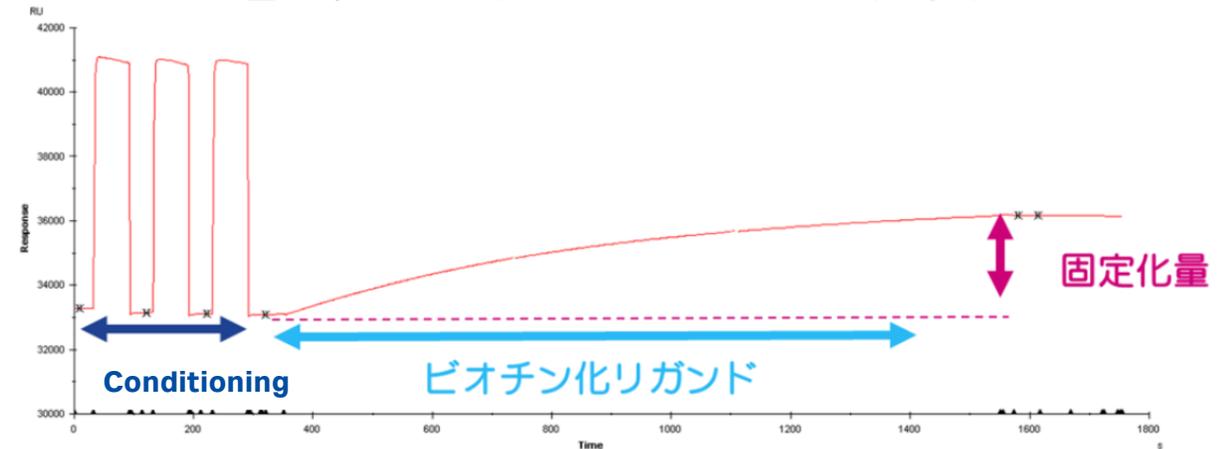




NA or SA chip に十分量固定化

注意点や特徴 ※取扱説明書 (IFU) 必読!

- Sanitizeした後はNA chip, SA chipを**Dockする前に**ランニング緩衝液を流す (コメントに詳細記載)
- 固定化はWizardやMethodでの実施を推奨
- ビオチン標識リガンドを添加する前に **Conditioning (洗浄操作)** を行う
- ビオチン標識リガンドの濃度は数 nM (≒数百 ng/mL～数 μg/mL) 程度の濃度で飽和するまで添加
- 固定化量は Conditioning の後から見積もる
- Extra wash にて50% Isopropanol, 1M NaCl, 50mM NaOHを添加する



Sensor chip NA
Instruction



Sensor chip SA
Instruction

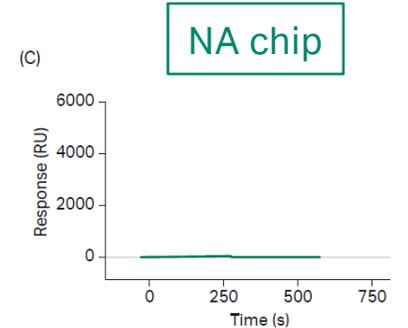
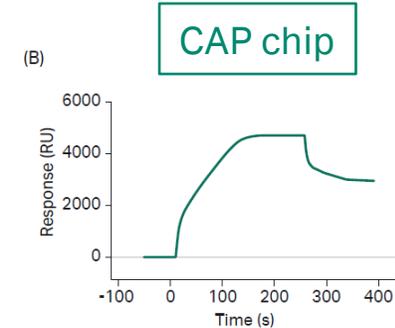
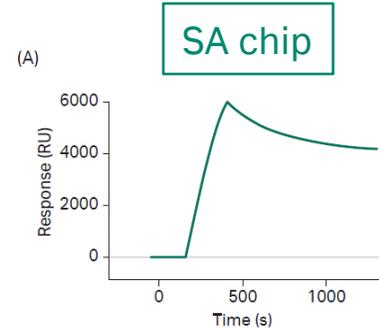
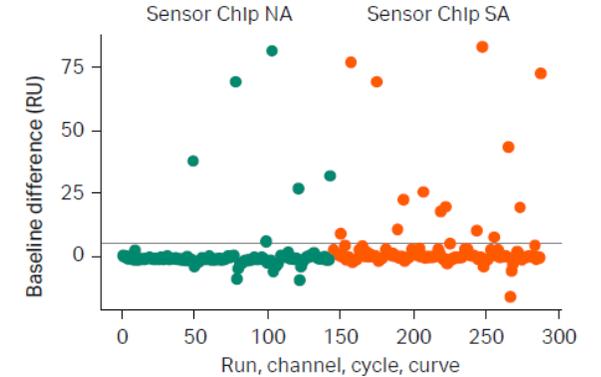
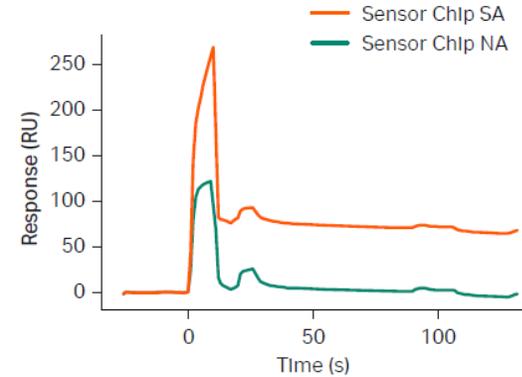
NA / SA chip ...どちらを選ぶべき？

フラグメントの測定なら NA chip がおすすめ

- NAはRYDモチーフを持たないため、より非特異的結合を抑えられる
- ビオチン標識されていない高 pI (~9.9) のタンパク質は SA や一本鎖DNA (CAP chip) と非特異的に結合するが NA とはしない



- NA chip は2020年初頭に発売開始
- NA chip と SA chip はビオチンとの親和力も価格もほぼ同等
- NA chip は Series S (Biacore 8K/8K+, S200, T200, 4000) だけの提供



NTA chip にクロスリンク



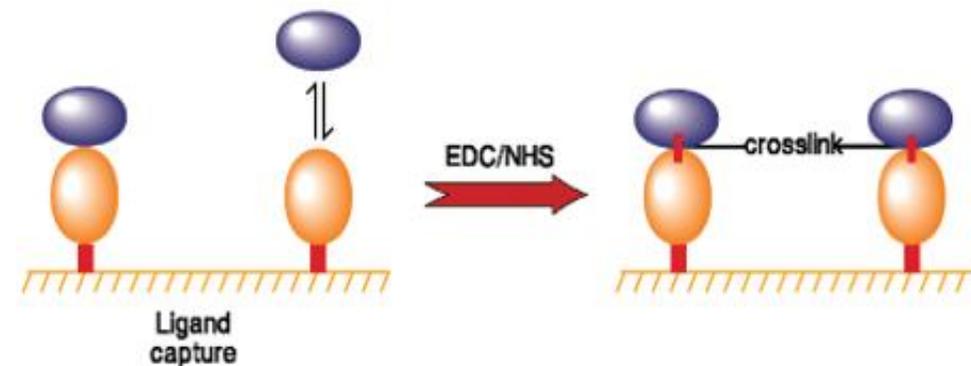
分岐前に戻る



ホームへ戻る

注意点や特徴 ※取扱説明書 (IFU) 必読!

- ビオチン標識リガンドを用意できないが His タグ付きリガンドは用意できる場合
- Ni-His タグの K_D 値は数十 μM 程度でありあまり強くないため大量に固定化しようとしても解離してしまう
- そこで Ni と His タグが近付いたらそのままアミンカップリングしてしまう方法がクロスリンク
- CM5 chip のアミンカップリングの場合はチップ表面に標的タンパク質を濃縮する (プレコンセントレーション) ために標的タンパク質を酸性条件に曝す必要があり、変性、失活するリスクがあるが、これならマイルドに固定化可能
- Biacore 8K/8K+ ならテンプレートが標準搭載



NTA Reagent Kit
Instruction



Sensor chip NTA
Instruction



T200 NTA amine

CM5 chip に十分量固定化



分岐前に戻る

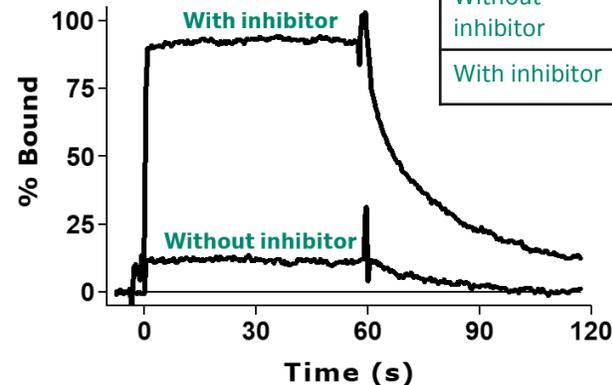
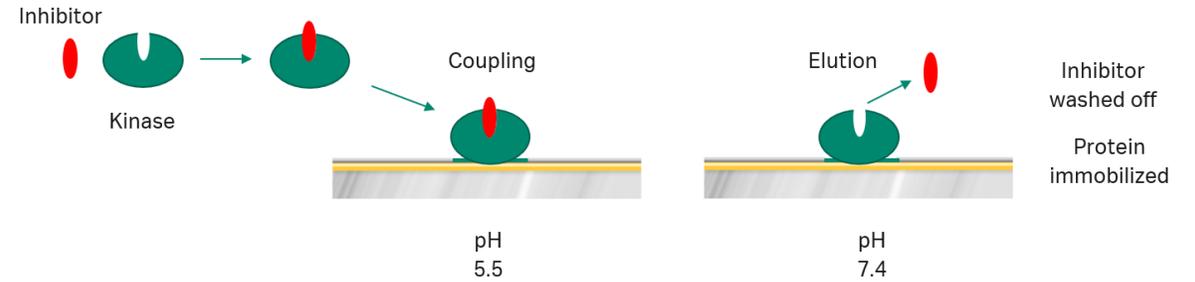


ホームへ戻る

注意点や特徴

- 十分にプレコンセントレーションが起こる条件にて Specify contact time で 7-10 分程度で固定化 (終濃度数十 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
- 酸性条件に曝すことでタンパク質が変性 / 結合活性を失うリスクを考慮
- 特殊な方法としてポジティブコントロール化合物とプレミックスした状態でアミンカップリングすることで結合サイトを保護しながら固定化することが可能 (右図)
- CM5 chip では十分な固定化量が稼げない場合は CM7 chip が次の選択肢

Casper et al., Analytical Biochemistry 325 (2004) 126-136



Procedure	Immobilized ligand (RU)	Theoretical R_{\max} (RU)	Actual R_{\max} (RU)	Surface activity
Without inhibitor	3000 - 4000	33	5	15 %
With inhibitor	3000 - 4000	34	32	94 %



分岐前に戻る



ホームへ戻る

タンパク質のビオチン標識方法

この後も画一的なアプローチを組みやすくなるのでおすすめ

1. 元からビオチン標識されているタンパク質を購入
 2. AviTag™ をコードするDNA配列を組み込んで発現
(右下外部リンクを参照)
 3. 後からタンパク質にビオチンタグを導入
(右下タンパク質のビオチン標識についてを参照)
- Webinar「ノウハウや経験がなくてもBiacoreの測定系を最速で立ち上げられる方法」に関しては主に Biotin CAPture Kit を使用した測定系の説明だが途中のクリップビデオで後からタンパク質にビオチンタグを導入する方法を紹介しているので参考に



外部リンク
表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を用いた蛋白質に結合する低分子リガンドスクリーニング



タンパク質のビオチン
 標識について



Webinar
ノウハウや経験がなくてもBiacoreの測定系を最速で立ち上げられる方法



分岐前に戻る



ホームへ戻る

ポジティブコントロール化合物の添加で十分なレスポンスを確認

Kinetics / Affinity 解析を実施し K_D を得る

- フラグメントと同じポケットに結合する化合物をポジティブコントロールとする
- 十分量固定化された標的タンパク質の活性率を確認
- **Solvent correction** も実施して正確に K_D を算出する (右下参照)
- 正確な K_D 算出は LMW Characterization 参照 (後述)
- $100 * \text{Actual Rmax} / \text{Theoretical Rmax} = \text{活性率}(\%)$
- 得られた活性率 (Actual Rmax) からフラグメントのレスポンスを見積もり、以降の測定系がワークするか考察
- あまりにもレスポンスが小さいなら固定化方法を再検討
- 標的タンパク質の再調製も視野に入れる

フラグメントではレスポンスが見えづらい

Immobilized ligand (RU)	Theoretical R_{max} (RU)	Actual R_{max} (RU)	Surface activity
3000 - 4000	33	5	15 %
3000 - 4000	34	32	94 %

フラグメントでも測定容易



原理解説
Solvent correction



ランニング緩衝液が
2% DMSOの時の
sol corr調製方法



ランニング緩衝液が
5% DMSOの時の
sol corr調製方法

Fragment clean screen - Assay setup

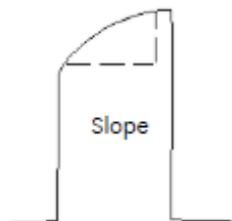
典型的なセットアップと注意点

- Clean screen は標的タンパク質やチップ表面にフラグメントが残留しているかどうかを確認する
- Solvent correction は不要
- 再生操作を含まないので残存する結合が後続のサンプルに影響を与える（→定期的にポジティブコントロール化合物を添加しレスポンスを確認する）

Parameter	Value
Flow rate	30 μ L/min
Contact time	10 to 30 s
Dissociation time	0 s
Fragment concentration	Typically 1 mM for all fragments
Regeneration	Not used
Molecular weights	Not used
Startup cycles	Include 1 to 3 startup cycles to equilibrate the system before injecting the first sample
Reference subtraction	Not used
Extra wash	Optional (50% DMSO recommended) Extra wash does not pass over the sensor surface
Solvent correction	Not used
Control samples	Not used

Fragment binding level screenの概要

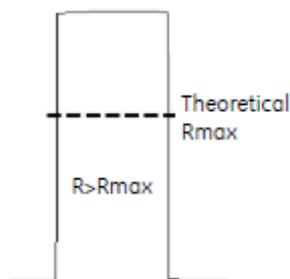
センサーグラム形状が典型的でないフラグメントを排除すること



- 結合相でレスポンスが上昇し続ける
- 副次的な結合サイトがあるかもしれない
- ピペティング不十分のケースもあり

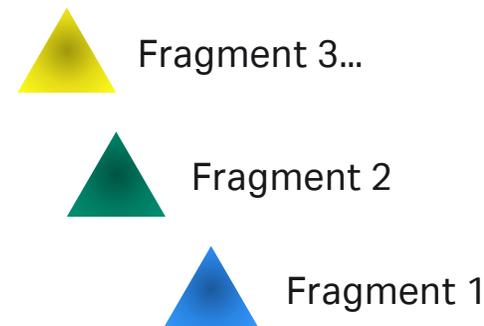


- 解離相でカーブが出現する
- $k_d < 1e-1$
- フラグメントではまず見られない

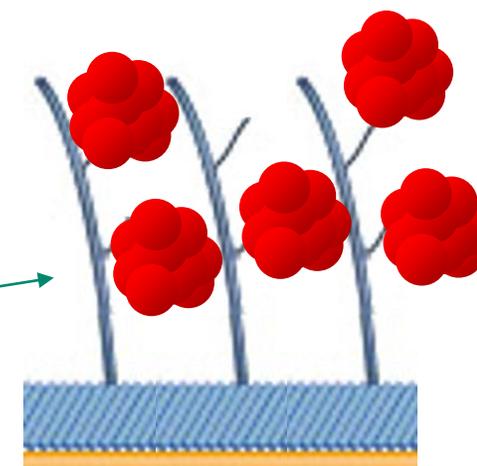
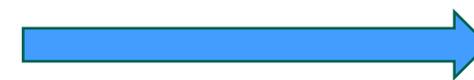


- 理論的Rmaxを超過する
- 凝集、副次的な結合サイト

Cytiva



- 1mM程度で1濃度だけ
- 添加時間は30sec程度
- 溶媒補正する

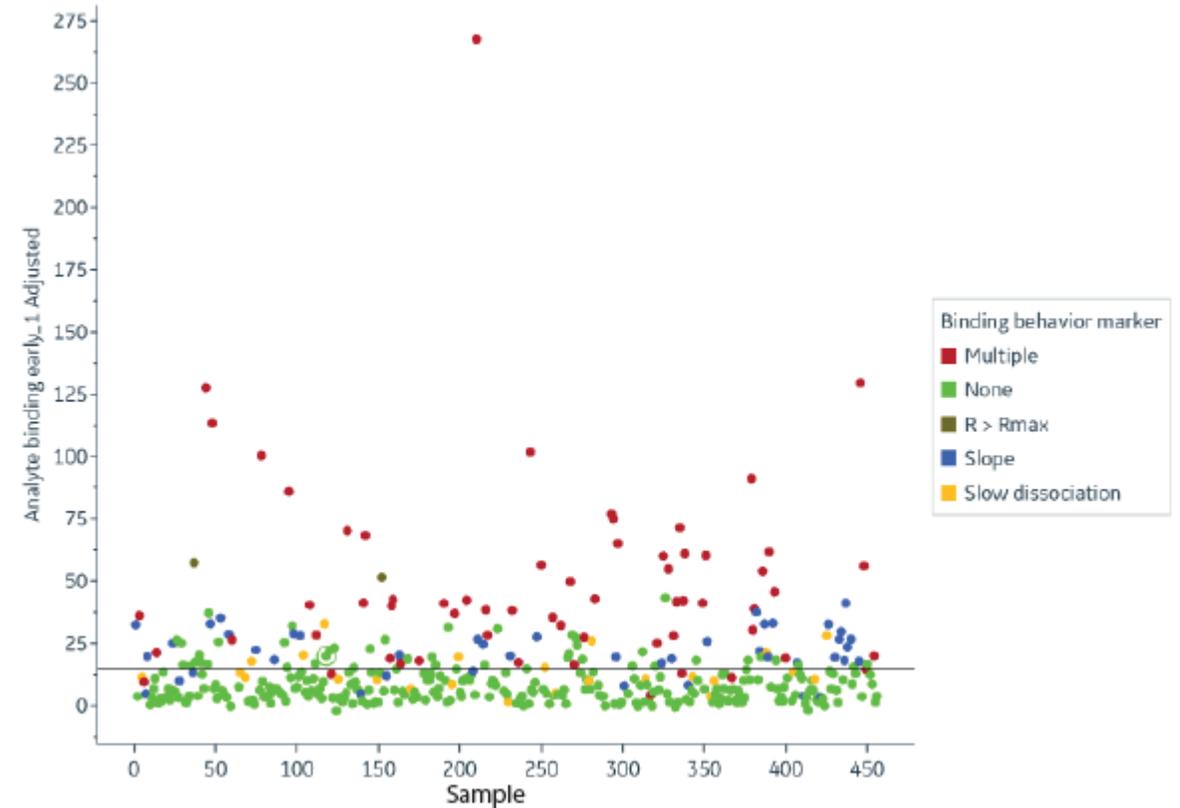
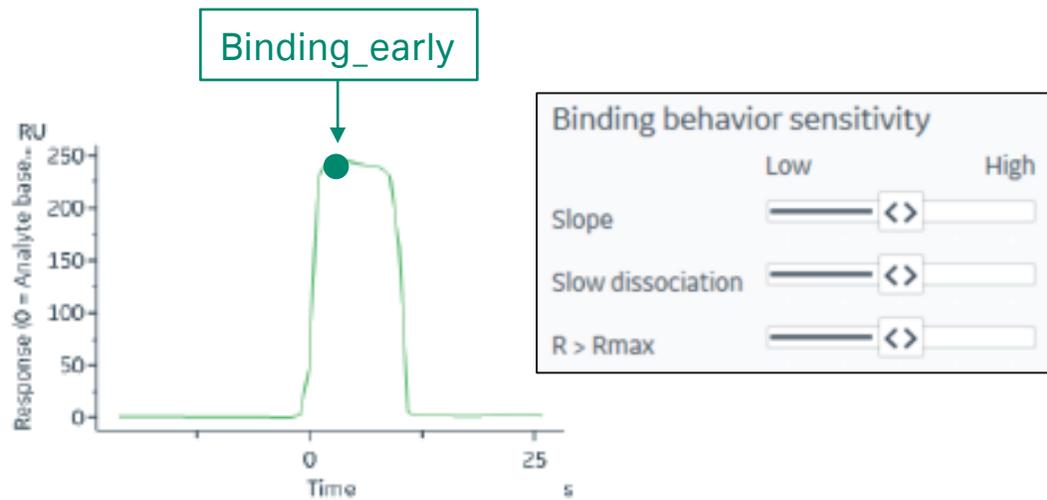


- NA/SA chipへの固定化
- NTA chipへのクロスリンク
- CM5 chipへの固定化

Fragment binding level screenの解析

解析ソフト側が自動的に形状を判別

- Binding_earlyのデータをプロット
- ソフトがセンサーグラム形状を自動判別
- 0濃度、Positive control、Negative control での判別も行う



Fragment binding level screen の装置別処理速度

Biacore 8K/8K+

- 8K+:
3456 samples / 33.5 h
- 8K:
384 samples / 4 h



Biacore S200

- 350 samples / 16 h



Biacore T200

- 350 samples / 24 h



Biacore X100PP

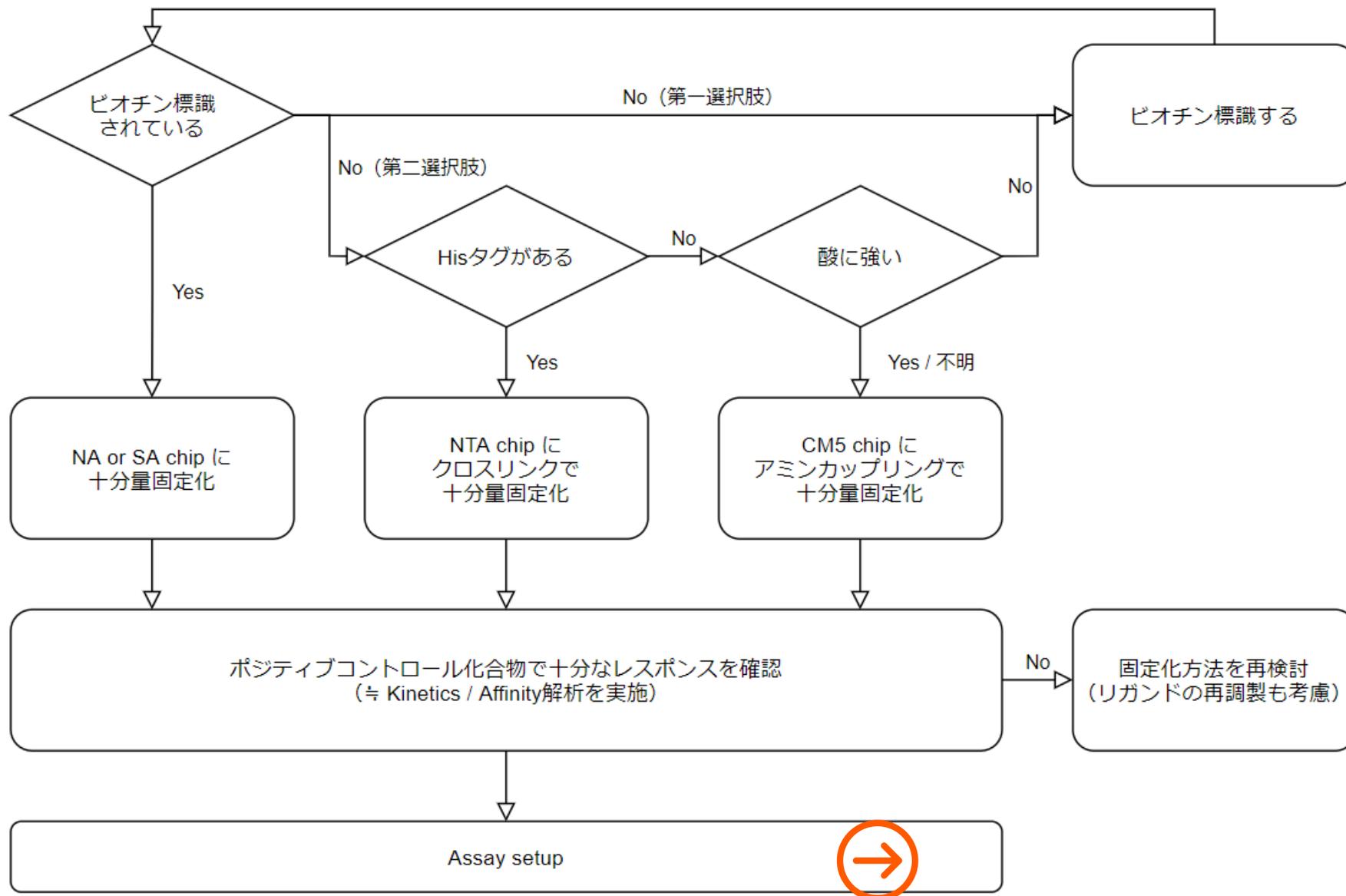
- 不向き
- 左3つのシステムを利用



その他のシステム (Biacore 4000を除く)

- 不向き
- 左3つのシステムを利用

フラグメントBinding level screening ワークフロー



Fragment binding level screen -Assay setup

典型的なセットアップと注意点

- Binding level screen では非典型的な挙動をするフラグメントを除外
- 形状が重要なので Solvent correction が必要
- 典型的なフラグメントでは結合/解離は非常に速いため、センサーグラムは箱型
- 再生操作を含まないので残存する結合が後続のサンプルに影響を与える（→定期的にポジティブコントロール化合物を添加しレスポンスを確認）
- ネガティブコントロールサンプルも必ず用意する（ランニング緩衝液はネガティブコントロールにならない）

Parameter	Value
Flow rate	30 μ L/min
Contact time	20 to 30 s
Dissociation time	0 to 15 s
Fragment concentration	Typically 1 mM for all fragments
Regeneration	Not used
Extra wash	Optional (50% DMSO recommended) Extra wash does not pass over the sensor surface
Molecular weights	In Biacore systems with dedicated support for Binding level screen , molecular weight of both immobilized target and fragments are required for full evaluation functionality
Startup cycles	Include 1 to 3 startup cycles to equilibrate the system before injecting the first sample
Solvent correction	Repeated at regular intervals. The recommended interval differs in different systems. See the system-specific documentation for details.
Positive controls	Known binder (not necessarily a fragment) that dissociates rapidly Repeated at regular intervals. The recommended interval differs in different systems. See the system-specific documentation for details.
Negative controls	Prepare negative controls in the same way as samples, using buffer instead of fragment. Do not use running buffer. Repeated at regular intervals. The recommended interval differs in different systems. See the system-specific documentation for details.
Blank cycles	Repeated at regular intervals. The recommended interval differs in different systems. See the system-specific documentation for details. Distinguish between blank cycles and negative controls. The cycles have different purposes even if they can use the same sample.



分岐前に戻る



ホームへ戻る

Fragment affinity screenの概要

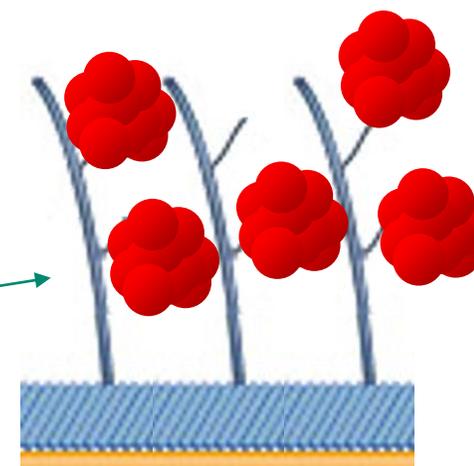
タンパク質との結合を確認し K_D 値を算出しランキングする

- タンパク質は十分量固定化
- 濃度条件を振った affinity 測定を行う
- フラグメントの affinity は数百 μ M～数mMくらいの値になるが、溶解性が悪いため高濃度側のデータが取れないことがある
- いくつかの Biacore システムでは Constant Rmax というモデル式が提供されており、これは Rmax の値を一定にすることでフィッティングカーブに漸近線を描かせる
- Rmax の値は Rmax control というポジコン化合物を飽和濃度で添加するか、ポジコン化合物を kinetics/affinity 解析することで得られる

- Max 1 mM ~ 50 μ M
- 0濃度含め8点の1.5倍希釈系列をたてる
- MC法
- 添加時間は30sec程度
- 溶媒補正する



Fragment 1

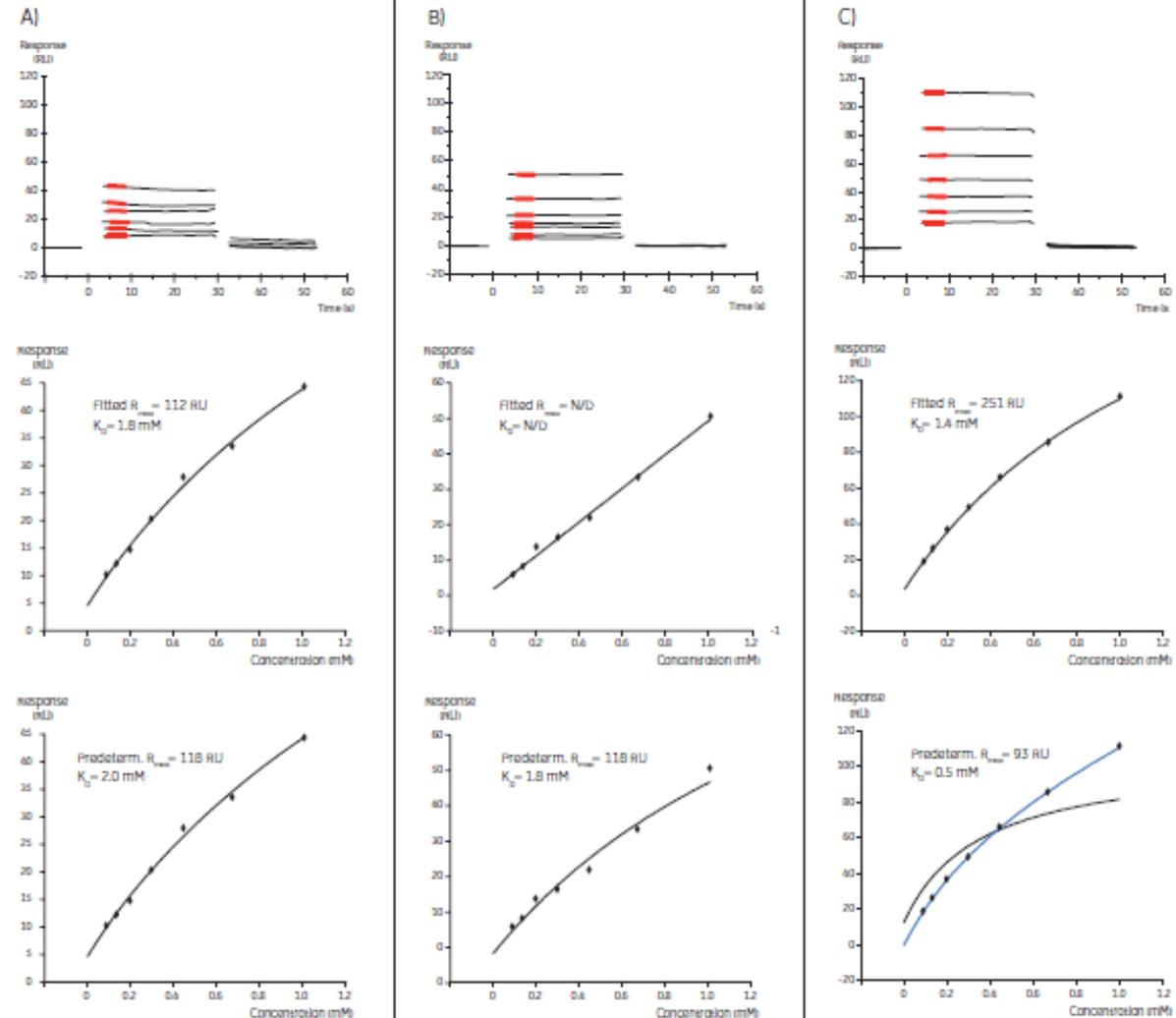


- NA/SA chipへの固定化
- NTA chipへのクロスリンク
- CM5 chipへの固定化

Fragment affinity screenの解析

データが収束するかどうか

- A) Steady stateで収束する (理想的)
- B) Steady stateで収束しない
→ Rmax controlを用いて低濃度側だけで解析
(高濃度側はRmax controlで補完)
- C) Steady stateで収束するが理論的Rmaxを超過
→ Constant Rmax (multi site)で解析
→ 副次的な結合サイトが存在



Fragment affinity screen の装置別処理速度

Biacore 8K/8K+

- 8K+:
64 samples / 5 h
- 8K:
64 samples / 5 h



Biacore S200

- 8 samples / 5 h



Biacore T200

- 8 samples / 5.5 h



Biacore X100PP

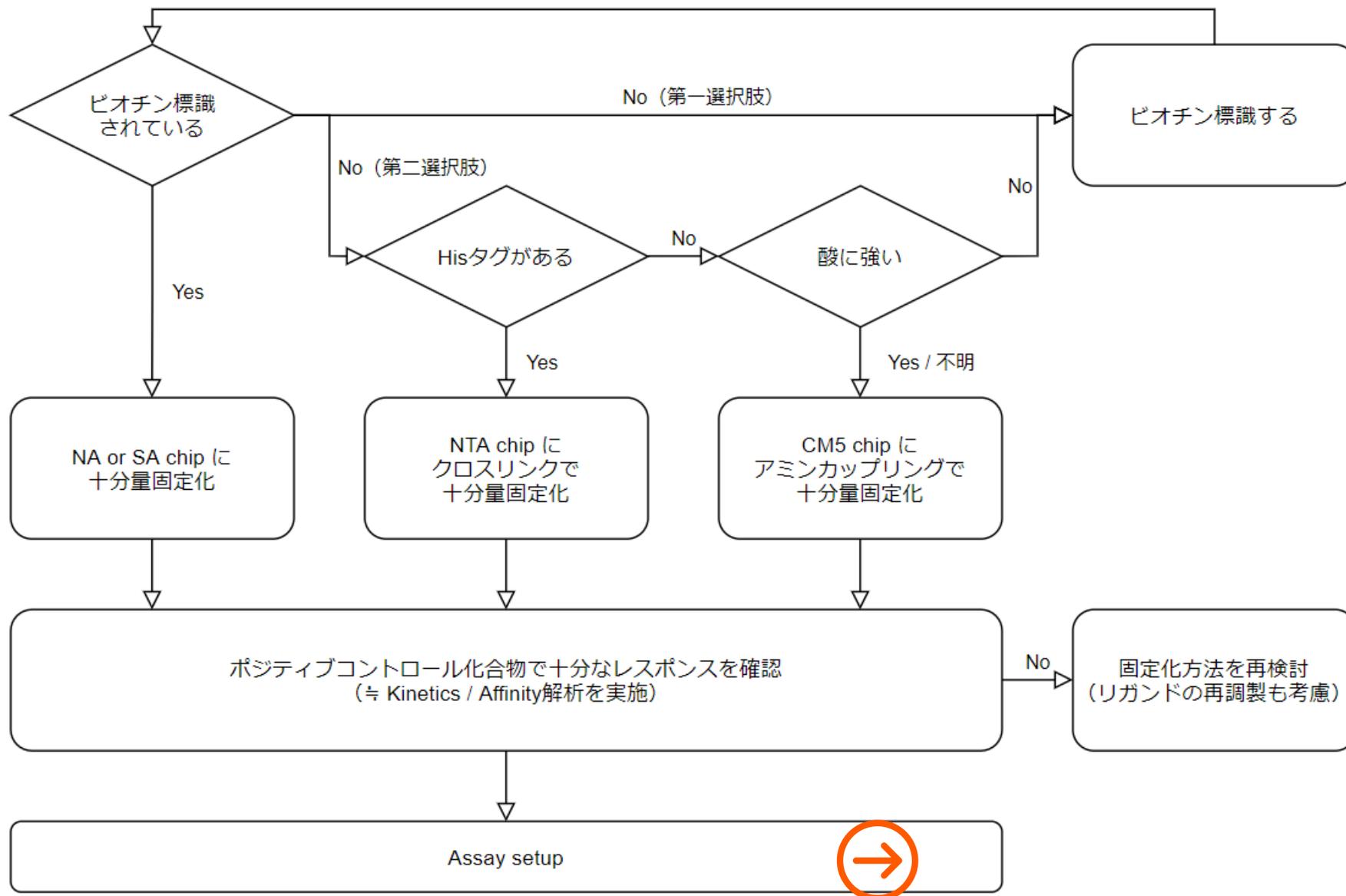
- 1 sample / 1 h



その他のシステム (Biacore 4000を除く)

- 不向き
- 別のシステムを利用

Fragment Affinity screen ワークフロー





分岐前に戻る



ホームへ戻る

Fragment affinity screen - Assay setup

典型的なセットアップと注意点

- Affinity screen では標的タンパク質との結合を確認し affinity (大体数百 μM ~数 mM) を算出
- 溶解性が悪いフラグメントのためにRmax control用のデータを取得することもある
- 通常の affinity 測定の通り、Solvent correction 実施、フラグメントは1つのブランクを含む 7-8 点の濃度のデータを取得
- ポジコン化合物、ネガコン化合物も取得

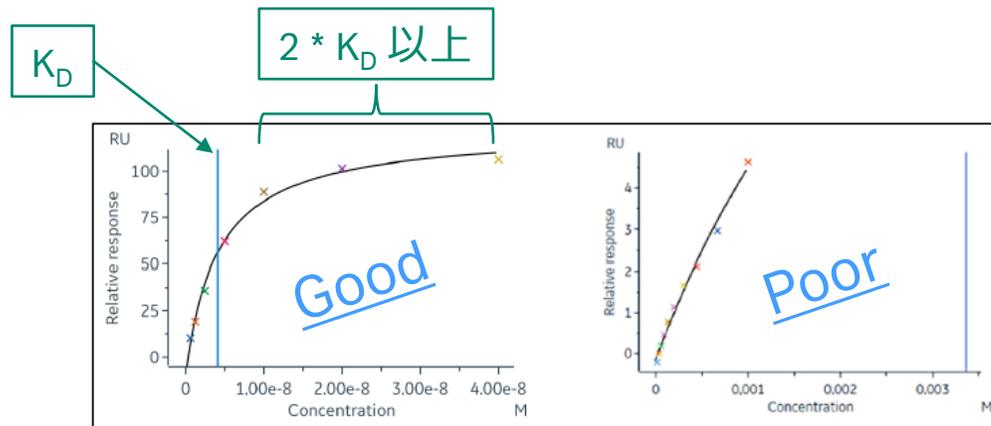
Parameter	Value
Flow rate	30 $\mu\text{L}/\text{min}$
Contact time	30 s
Dissociation time	30 s
Fragment concentration	Typically 1.5-fold dilution series from 1000 to 50 μM
Regeneration	Not used
Extra wash	Optional (50% DMSO recommended) Extra wash does not pass over the sensor surface
Molecular weights	In Biacore systems with dedicated support for Affinity screen , molecular weight of both immobilized target and fragments are required for full evaluation functionality
Startup cycles	Include 1 to 3 startup cycles to equilibrate the system before injecting the first sample
Solvent correction	Repeated at regular intervals. The recommended interval differs in different systems. See the system-specific documentation for details.
Positive controls	Known binder (not necessarily a fragment) that dissociates rapidly Repeated at regular intervals. The recommended interval differs in different systems. See the system-specific documentation for details.
Negative controls	Prepare negative controls in the same way as samples, using buffer instead of fragment. Do not use running buffer. Repeated at regular intervals. The recommended interval differs in different systems. See the system-specific documentation for details.
Rmax control	Included or determined in a separate experiment
Blank cycles	Repeated at regular intervals. The recommended interval differs in different systems. See the system-specific documentation for details. Distinguish between blank cycles and negative controls. The cycles have different purposes even if they can use the same sample.

低分子

(前提1) Affinity 解析と Kinetics 解析について

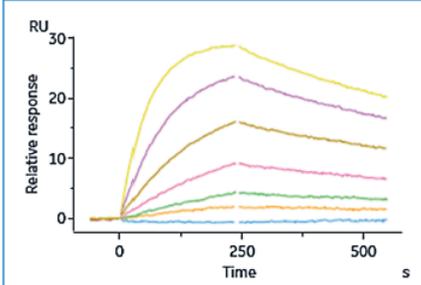
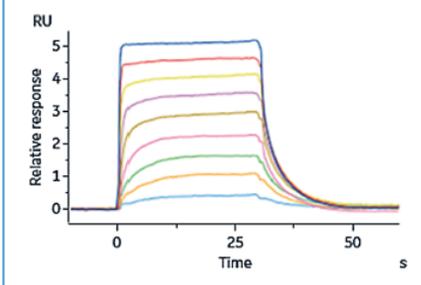
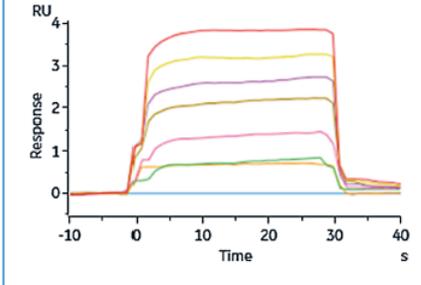
Affinity : 平衡値をプロットしてフィッティング

- 低親和力でセンサーグラムがカーブしていないとき (および結合様式が不明なとき)



Kinetics : センサーグラムをモデル式でフィッティング

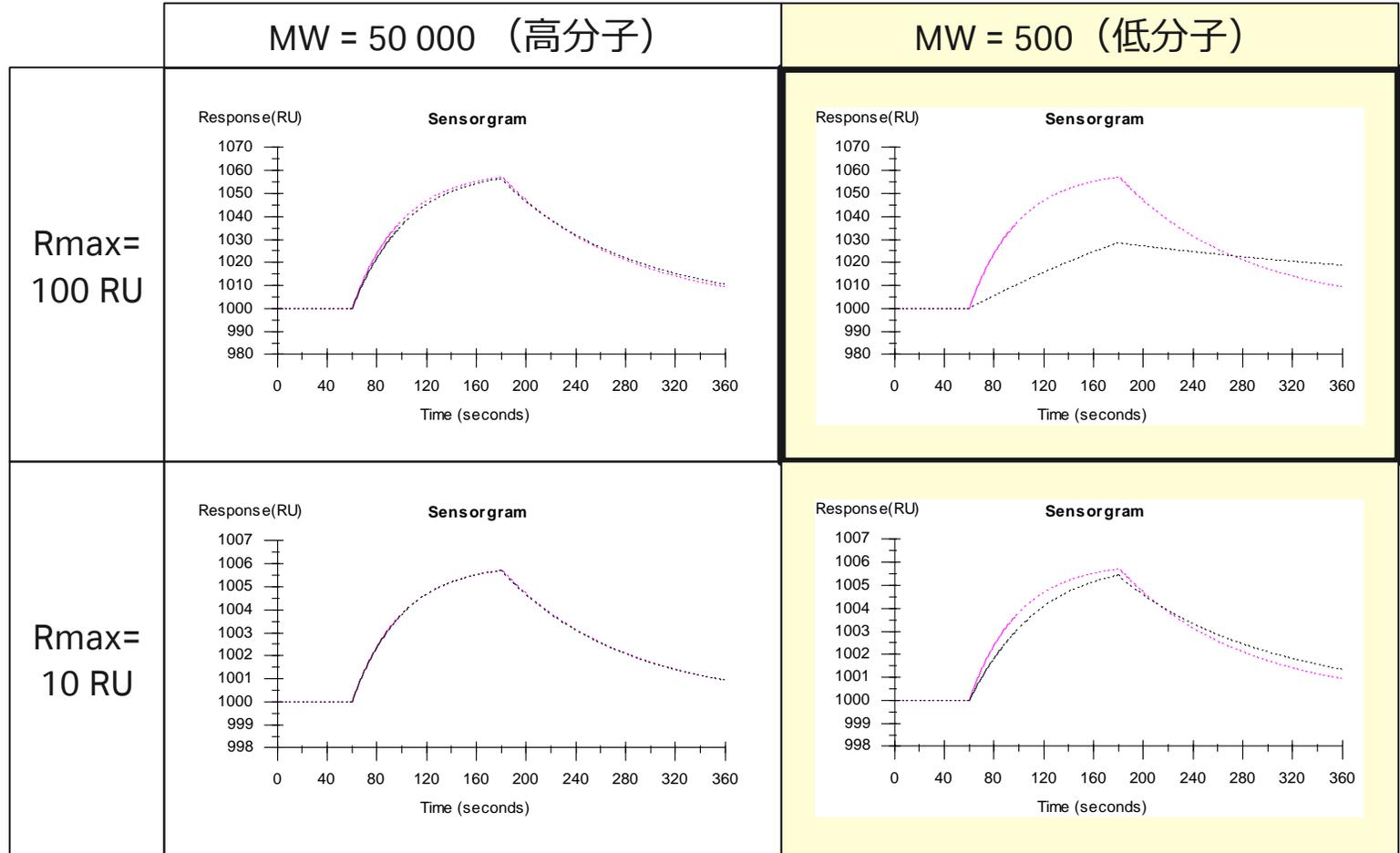
- 結合様式に沿うモデル式があり、センサーグラムがカーブしているとき

Sensorgrams	Kinetics	Affinity
	✓	✗
	✓	✓
	✗	✓

(前提2) 低分子の Kinetics 解析を行う際のリガンド量について

低分子の Kinetics 解析は特に MTL に注意

- 低分子は k_a が大きくなりがちで MTL (マス トランスポートリミテーション) の影響を受け やすい
- Kinetics 解析では MTL を避けないと信頼 性の高いデータを得ることができない
- 高分子の時より一層リガンド量を少なく保つ ようにしないと信頼性が大幅に低下する



条件：全て $k_a = 10^6$, $k_d = 10^{-2}$, 15nM でアナライト添加
 ピンク：MTL が一切ない理想環境 黒：実際のセンサーグラム
 低分子は Rmax を低く保ち MTL を避けないと黒のデータがピンクのデータに近づかない

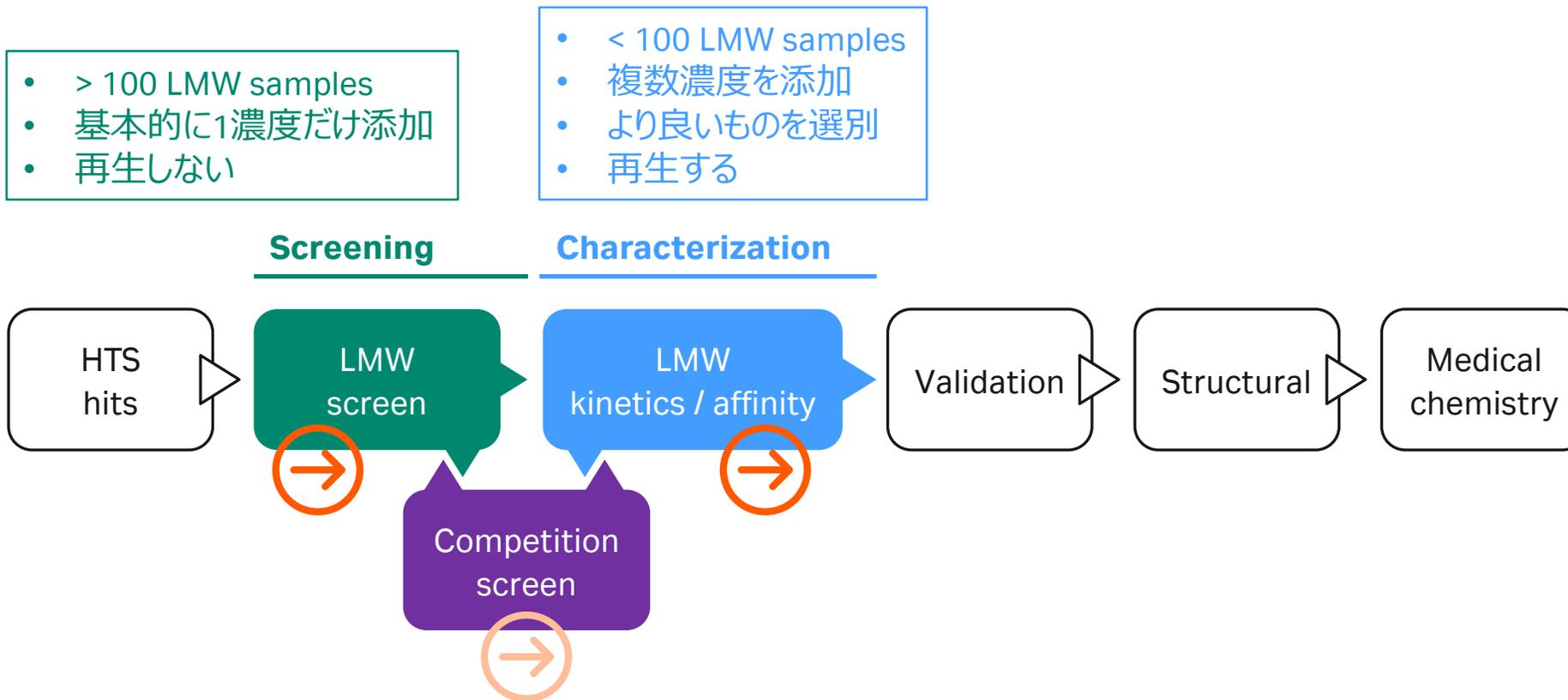


分岐前に戻る



ホームへ戻る

低分子における典型的なワークフロー全体概要



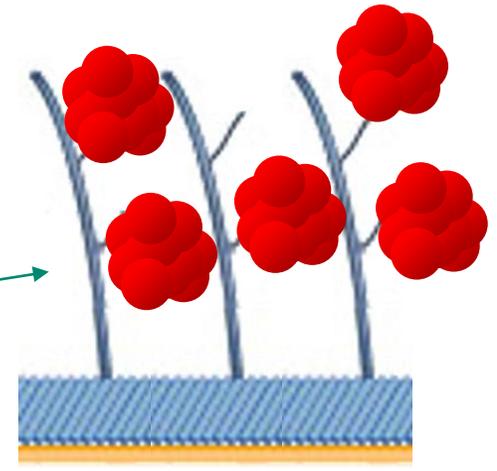
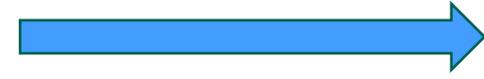
LMW screenの概要

ランキングや閾値を設けて有望な低分子を選別

- 標的タンパク質を十分量固定化
- 再生せずに化合物を測定しきる
- キャプチャー法も取れなくはないが普通はしない



- 30 μ M程度で1濃度だけ
- 添加時間は60sec程度
- 溶媒補正する



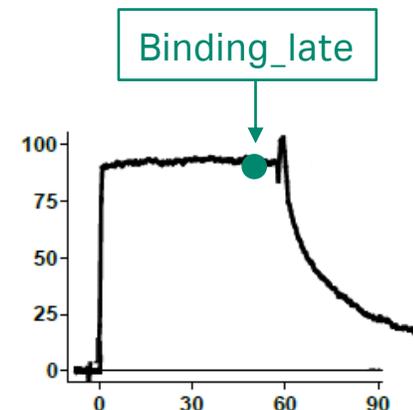
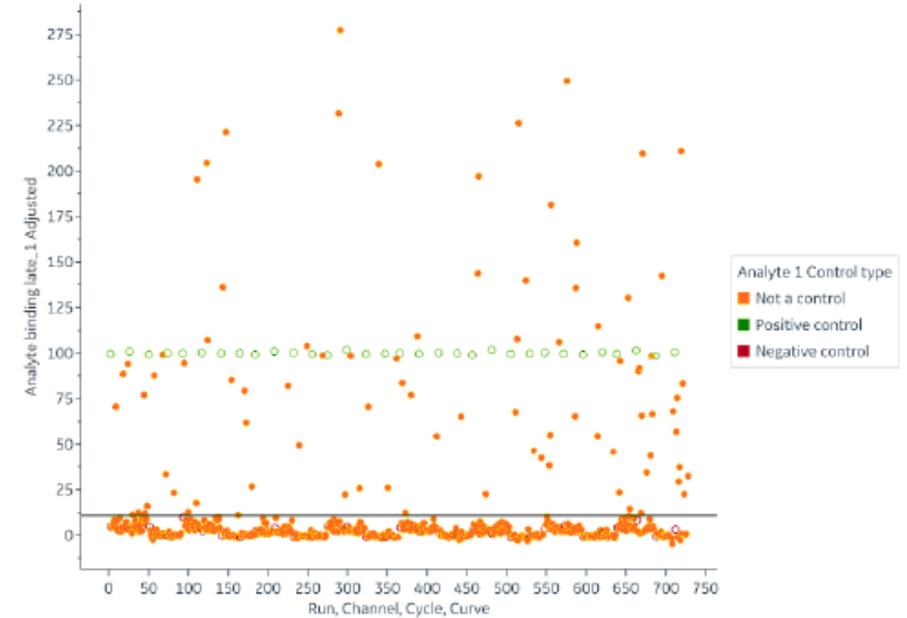
- NA/SA chipへの固定化
- NTA chipへのクロスリンク
- CM5 chipへの固定化

LMW screenの解析

補正機能を正しく使う

- Binding_lateのデータをプロット
- 0濃度、Positive control、Negative control で補正
- ネガコンと比較してレスポンスがあるかどうか
- Stickyな化合物があれば除外

Report Point Adjustment	Ranking/Cut-off	Curve fitting
Blank Subtraction...	✓	• 0濃度データでの差し引き
Molecular Weight Adjustment	✓	• 分子量補正
Capture Adjustment		• (キャプチャー量補正)
Adjustment For Controls...	✓	• コントロールサンプル補正
Median Filtering...	✓	• 中央値補正



月刊Biacoreコンシェルジュ
5月号 (2021年)
低分子スクリーニングの
補正機能について

LMW screen の装置別処理速度

Biacore 8K/8K+

- 8K+:
320 samples / 5.5 h
- 8K:
320 samples / 5.5 h



Biacore S200

- 192 samples / 20 h



Biacore T200

- 192 samples / 22 h



Biacore X100PP

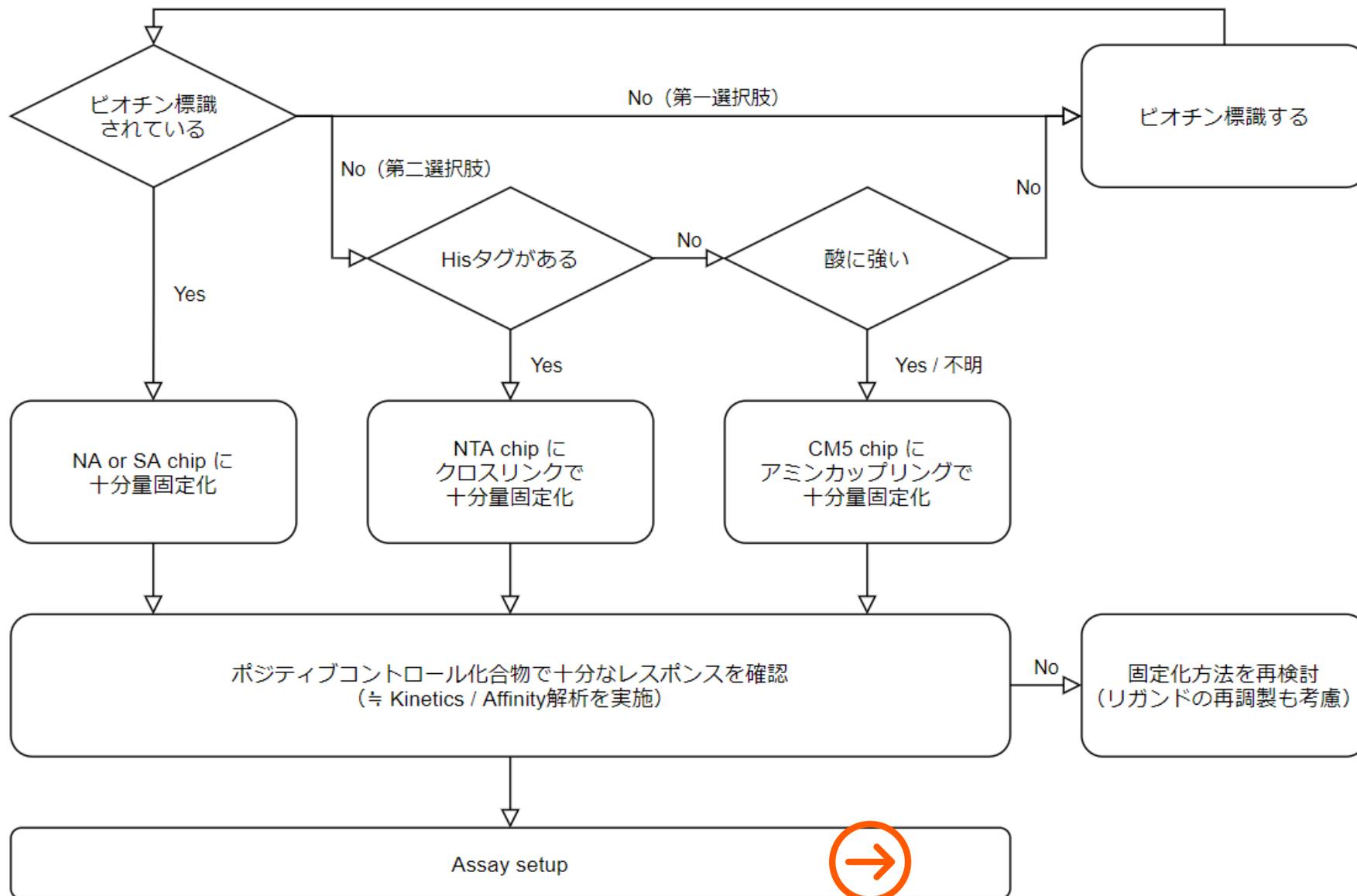
- 不向き
- 左3つのシステムを利用



その他のシステム (Biacore 4000を除く)

- 不向き
- 左3つのシステムを利用

低分子における典型的な LMW screen ワークフロー



LMW screen -assay setup

典型的なセットアップと注意点

- LMW screen では標的タンパク質に対して特異的な結合をする化合物を選別
- 同時にプロミスカスバインダーな化合物を除外
- 通常1濃度 30 μ Mで添加

Parameter	Value
Flow rate	30 μ L/min
Contact time	30 s to 60 s
Dissociation time	60 s
Sample concentration	Recommended starting value 30 μ M May need to be adjusted according to the expected binding affinity. Use the same order of magnitude as the expected affinity (for example, if μ M affinities are expected, use μ M concentrations).
Regeneration	Not used
Carry-over injection	Included to detect "sticky" compounds
Extra wash	Optional (50% DMSO recommended) Extra wash does not pass over the sensor surface
Molecular weights	Required for adjusting response levels for molecular size
Startup cycles	Include 1 to 3 startup cycles to equilibrate the system before injecting the first sample
Solvent correction	Repeated at regular intervals. The recommended interval differs in different systems. See the system-specific documentation for details.
Positive controls	Known binder that dissociates rapidly Repeated at regular intervals. The recommended interval differs in different systems. See the system-specific documentation for details.
Negative controls	Prepare negative controls in the same way as samples, using buffer instead of compound. Do not use running buffer. Repeated at regular intervals. The recommended interval differs in different systems. See the system-specific documentation for details.
Blank cycles	Repeated at regular intervals. The recommended interval differs in different systems. See the system-specific documentation for details. Distinguish between blank cycles and negative controls. The cycles have different purposes even if they can use the same sample.



分岐前に戻る



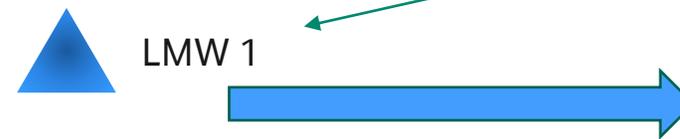
ホームへ戻る

LMW kinetics / affinity の概要

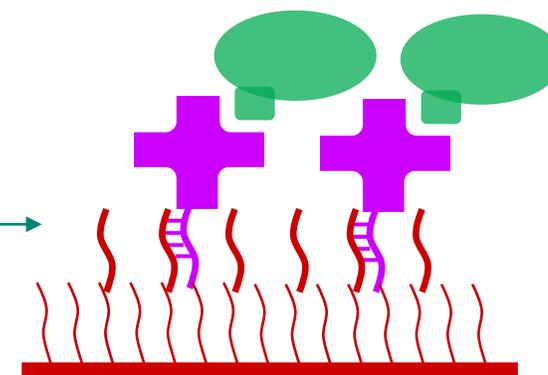
タンパク質との結合を確認し K_D あるいは k_a 、 k_d を算出しランキング

- それなりに親和力が強い化合物もあるため再生条件が決まっているキャプチャー法も多く用いられる
- 再生条件検討不要ならこれまでのようにNA/SA chipやNTA chipへのクロスリンク、CM5へのアミンカップリングも用いることが可能
- 0濃度のデータも別途取得
- Positive control, Negative control のデータも取得する

- Max 30~1 μ M
- 3-7点の2-5倍希釈系列をたてる
- SC法
- 0濃度も取得する
- 添加時間は60sec程度
- 溶媒補正する



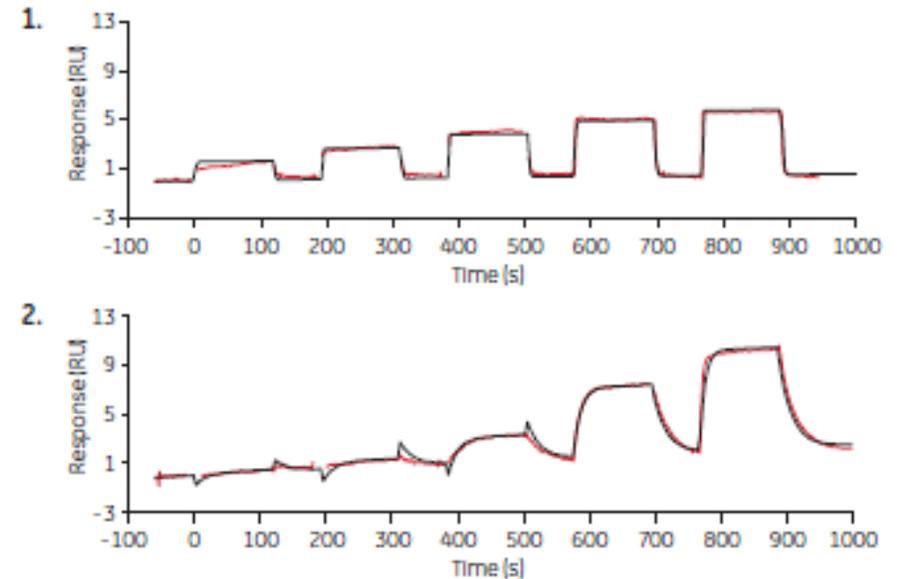
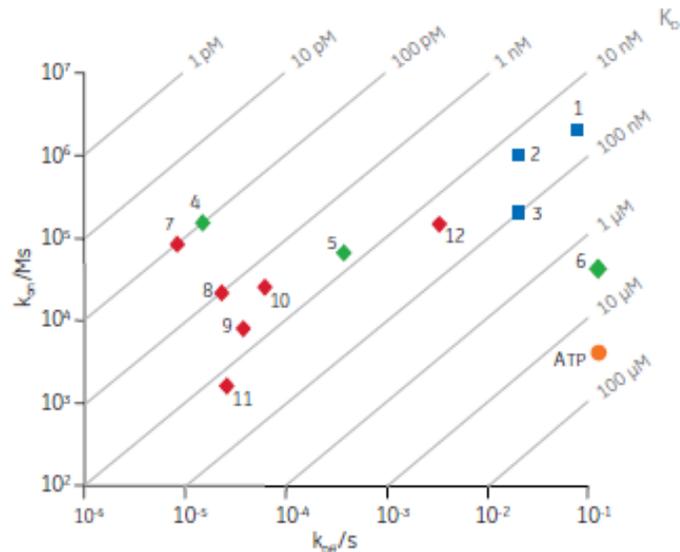
Biotin CAPture Kitや
NTA Reagent Kit, His Capture Kit
などのキャプチャー法が取られることもある
...ただしBiotin CAPture Kitが推奨



LMW kinetics / affinity の解析

On-off rate mapを活用して選別

- センサーグラムが平衡値に達していればAffinity解析
- 解離相でカーブが見られ、Kineticsでフィッティングできそうな場合はka、kd算出
- On-Off rate mapを描き望む特性の化合物を選別する



LMW kinetics / affinity の装置別処理速度

Biacore 8K/8K+

- 8K+:
16 samples / 2.5 h
- 8K:
16 samples / 2.5 h



Biacore S200

- 16 samples / 8.5 h



Biacore T200

- 16 samples / 9 h



Biacore X100PP

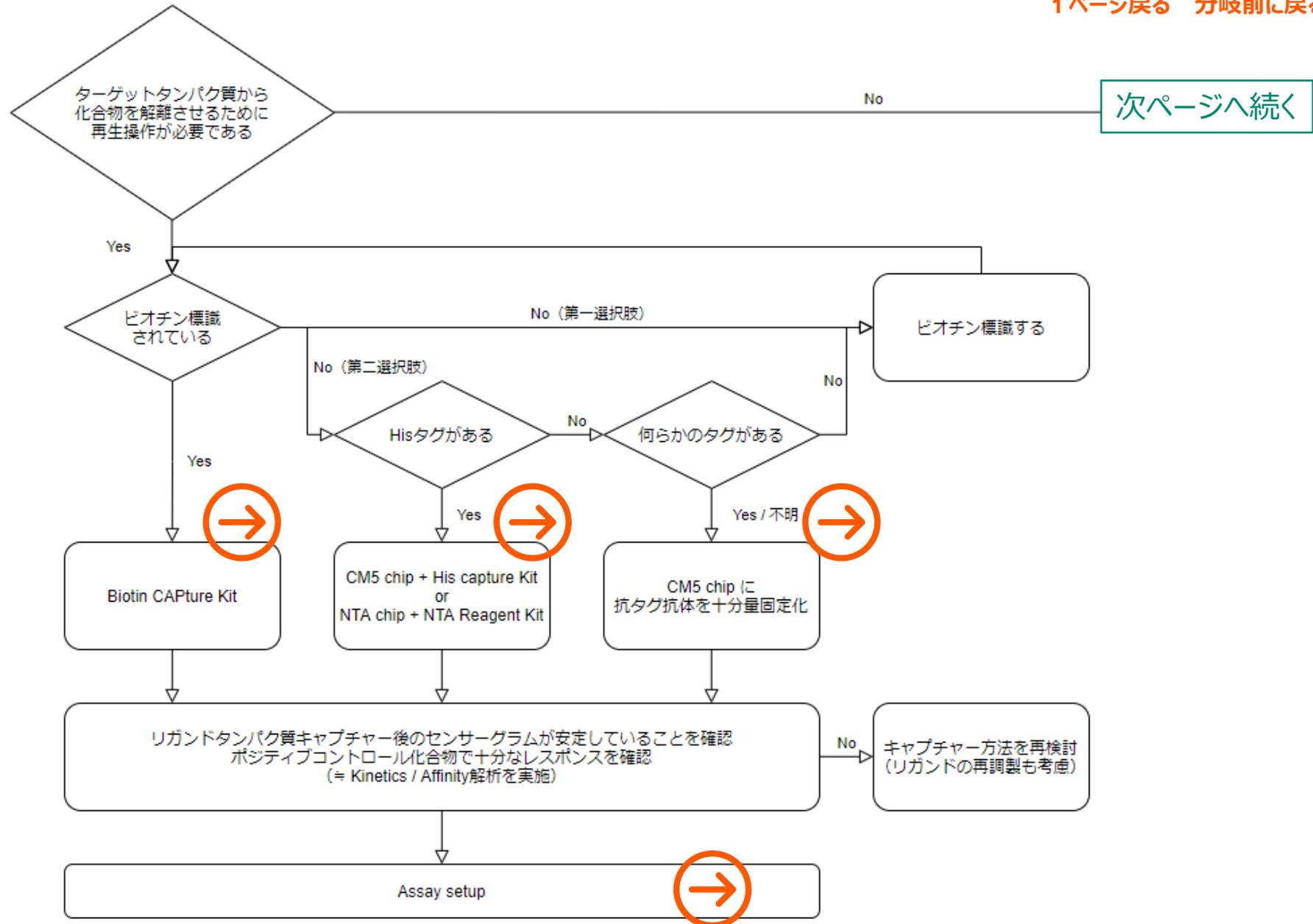
- 1 sample / 2 h



その他のシステム (Biacore 4000を除く)

- 不向き
- 別のシステムを利用

低分子における典型的な LMW kinetics/affinity ワークフロー①



低分子における典型的な LMW kinetics/affinity ワークフロー②



1 ページ戻る

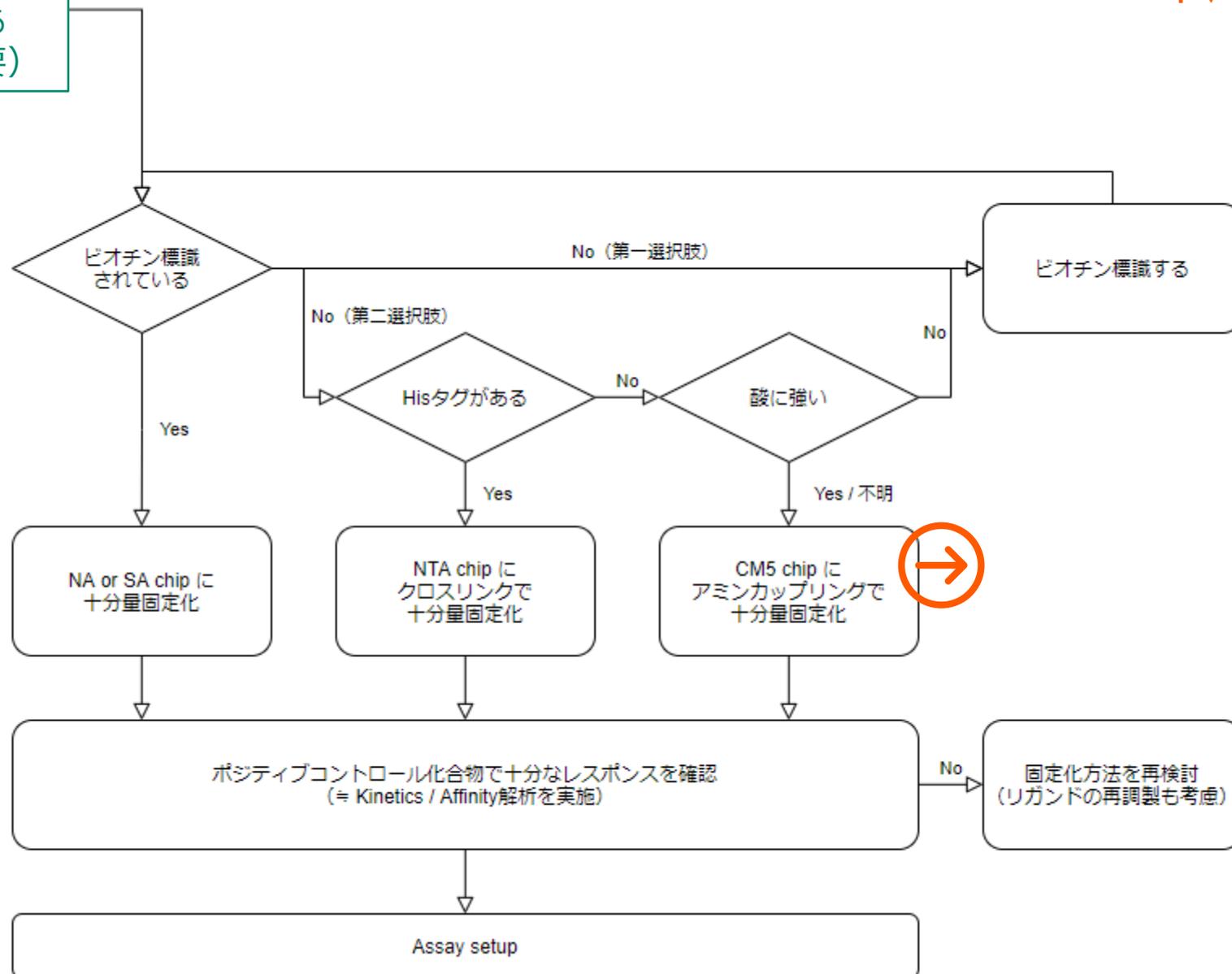


分岐前に戻る



ホームへ戻る

前ページのNoから
(再生操作不要)





分岐前に戻る

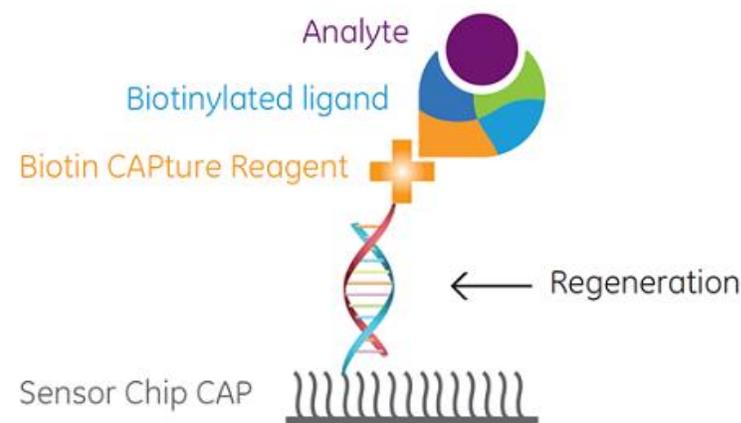
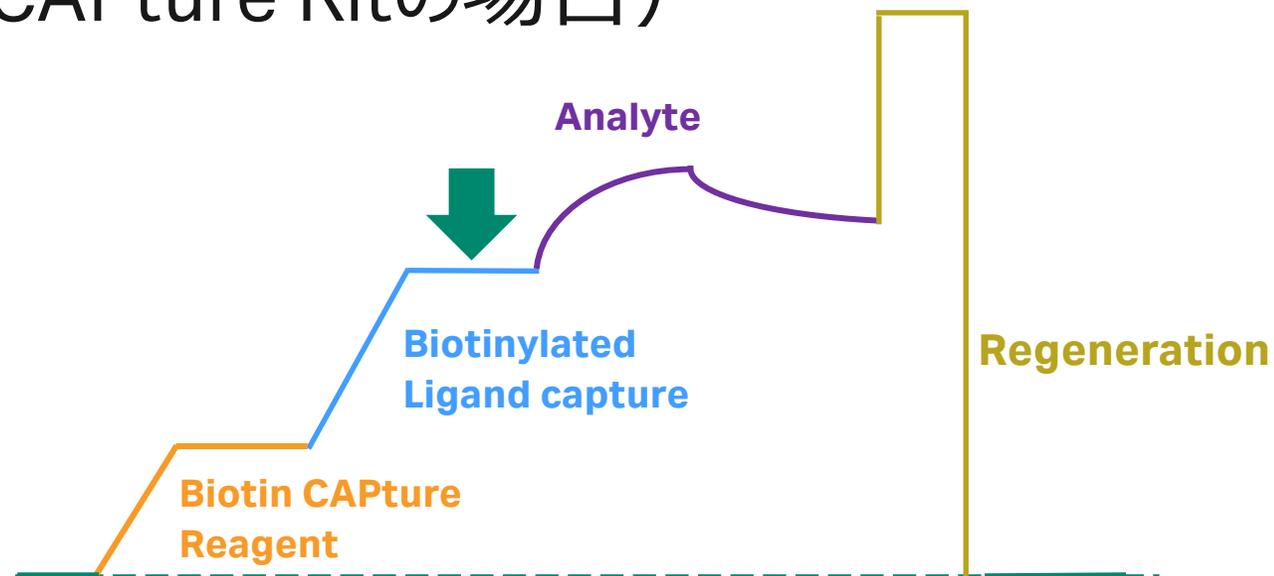


ホームへ戻る

リガンドタンパク質キャプチャー後のセンサーグラムが安定していることを確認 (Biotin CAPture Kitの場合)

最もお勧めできる

- リガンドタンパク質キャプチャー後のベースラインが非常に安定する (緑矢印部分)
- ここが安定していないとアナライト (化合物) の相互作用が正確に見積もることができない
- 図ではマルチサイクル法を示しているがシングルサイクル法をお勧め
- リガンドのキャプチャー量から理論的Rmaxを算出し、アナライトが低分子の場合は < 20 RU (目安) を目指す





分岐前に戻る

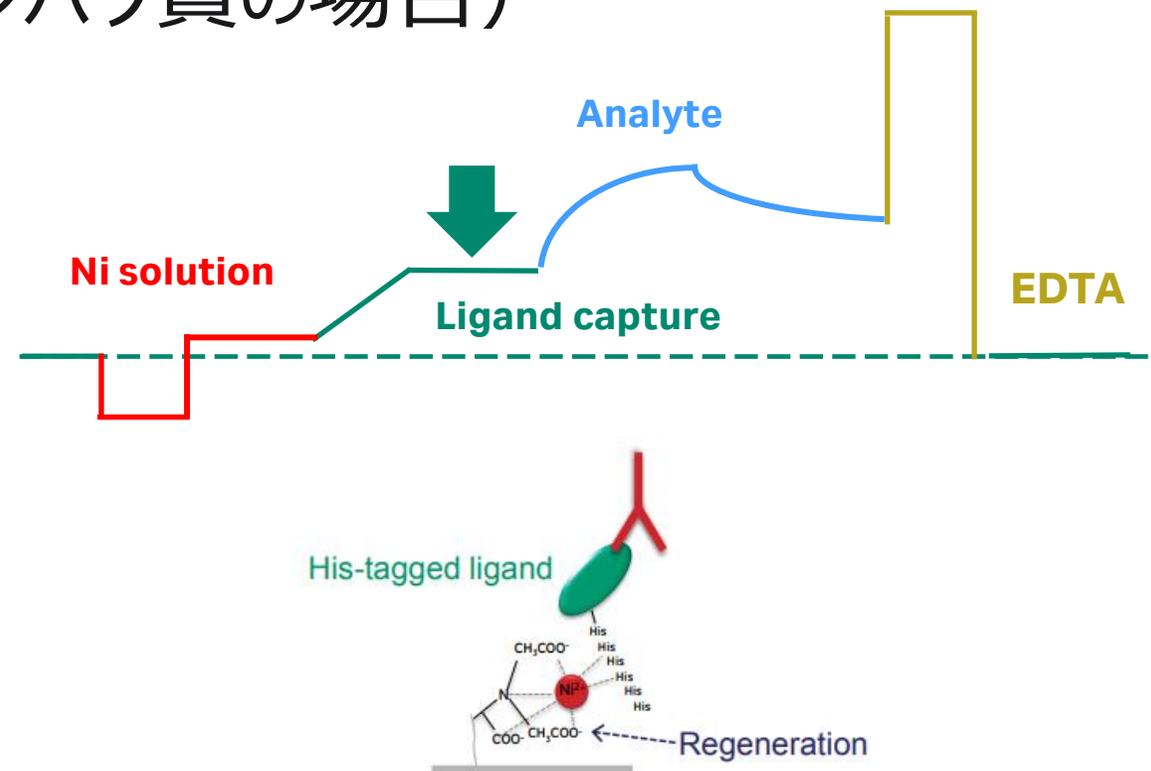


ホームへ戻る

リガンドタンパク質キャプチャー後のセンサーグラムが安定していることを確認 (Hisタグタンパク質の場合)

NTA chip + NTA Reagent Kit か CM5 chip + His capture kit

- NTA chip + NTA Reagent Kit も CM5 chip + His capture kit もあまり親和力が強くないためキャプチャー後ベースラインが不安定なのが課題
- ある程度キャプチャー量が減ると、一旦解離したHisタグタンパク質が、近くの空いたNiやHis抗体と再結合するため見かけ上安定したベースラインが得られる (右下参考)
- ここが安定していないとアナライト (化合物) の相互作用が正確に見積もることができない
- 図ではマルチサイクル法を示しているがシングルサイクル法をお勧め
- リガンドのキャプチャー量から理論的Rmaxを算出し、アナライトが低分子の場合は < 20 RU (目安) を目指す



Approaches for capture of histidine-tagged proteins



月刊Biacoreコンシエルジュ
5月号 (2021年)
Hisタグタンパク質固定化のトリセツ



分岐前に戻る

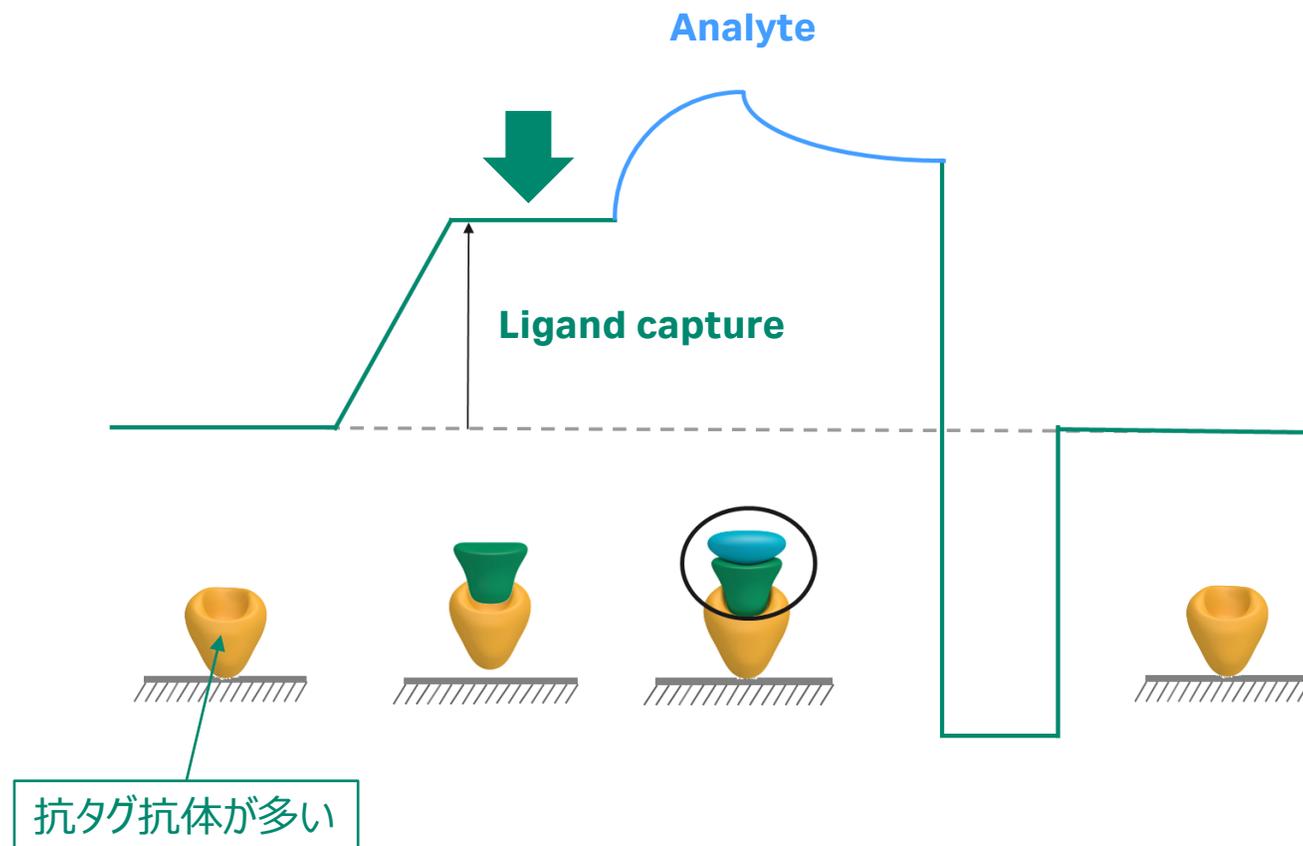


ホームへ戻る

リガンドタンパク質キャプチャー後のセンサーグラムが安定していることを確認（何らかのタグがある場合）

抗タグ抗体を使用することが多い

- 基本的に His capture kit と同じ
- リガンドタンパク質キャプチャー後のベースラインの安定性が課題（緑矢印部分）
- ここが安定していないとアナライト（化合物）の相互作用が正確に見積もることができない
- 図ではマルチサイクル法を示しているがシングルサイクル法をお勧め
- リガンドのキャプチャー量から理論的Rmaxを算出し、アナライトが低分子の場合は < 20 RU（目安）を目指す





分岐前に戻る

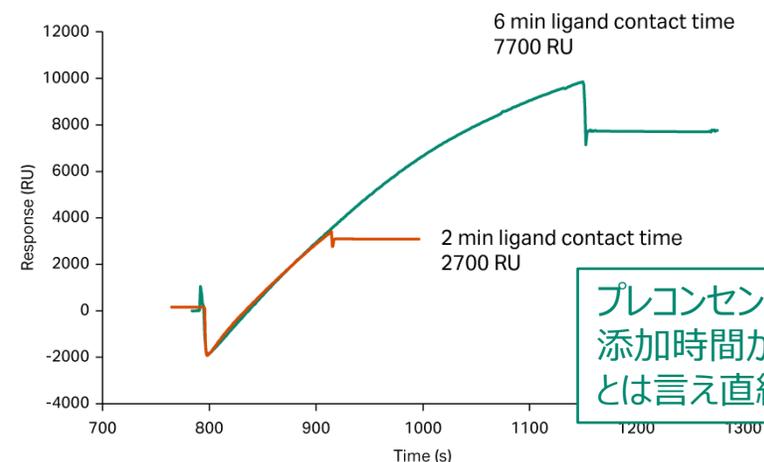
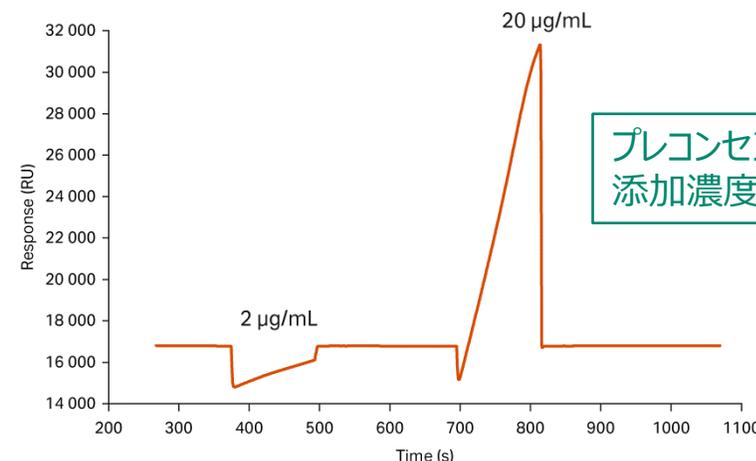


ホームへ戻る

アミンカップリング法で固定化量を調節する

リガンドタンパク質失活のリスクを常に考える

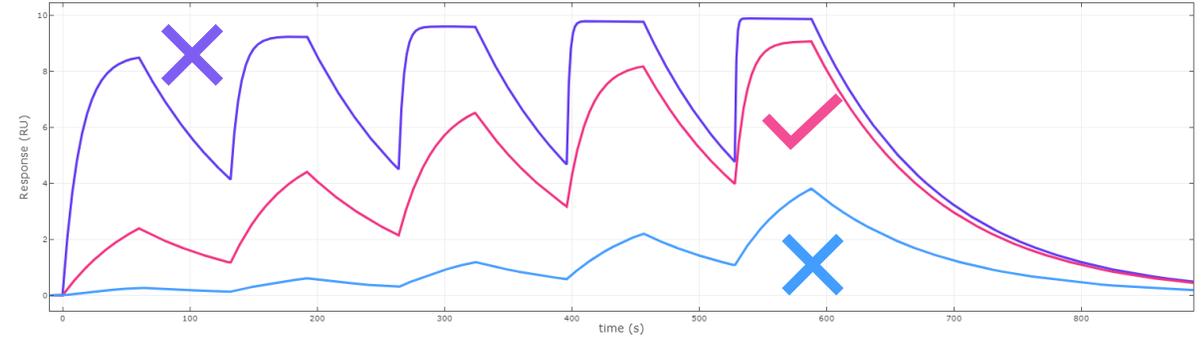
- CM5 chipへの共有結合なのでベースラインは非常に安定
- **固定化量の調節（右図：プレコンセントレーションの傾きを制御）**とリガンドタンパク質の失活が課題
- リガンドタンパク質の失活は経時的にも、再生操作によっても起こりうる



LMW kinetics/affinity -assay setup

典型的なセットアップと注意点

- テンプレートの使用を推奨
- LMW kinetics/affinity では標的タンパク質に対して kinetics 解析あるいは affinity 解析を実施
- アナライト濃度は $0.1-10 \times K_D$ 程度
 - 最高濃度で R_{max} に近いぐらいのデータ (右図赤)
 - 高濃度すぎても低濃度すぎても良くない
 - Affinity解析の場合は少なくとも $2 \times K_D$ の濃度を取得
- 理論的 $R_{max} < 20$ RU (目安)



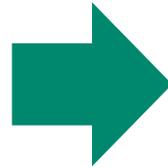
LMW kinetics/affinity	
(Analyte) Flow rate	> 30 uL/min
(Analyte) Injection type	Single cycle kinetics
(Analyte) Contact time	60 sec
(Analyte) Dissociation time	180-600 sec
(Analyte) Pooling	Optional
(Analyte) Concentration	$0.1 - 10 \times K_D$
(Ligand) Flow rate	10 uL/min
(Ligand) Contact time	60-180 sec (Theoretical $R_{max} < 20$ RU)

抗体

(前提1) 取り扱えるサンプルについて

流路が詰まるからクールドなサンプルは無理？

- ハイブリドーマの培養上清
- 大腸菌培養上清
- 血清



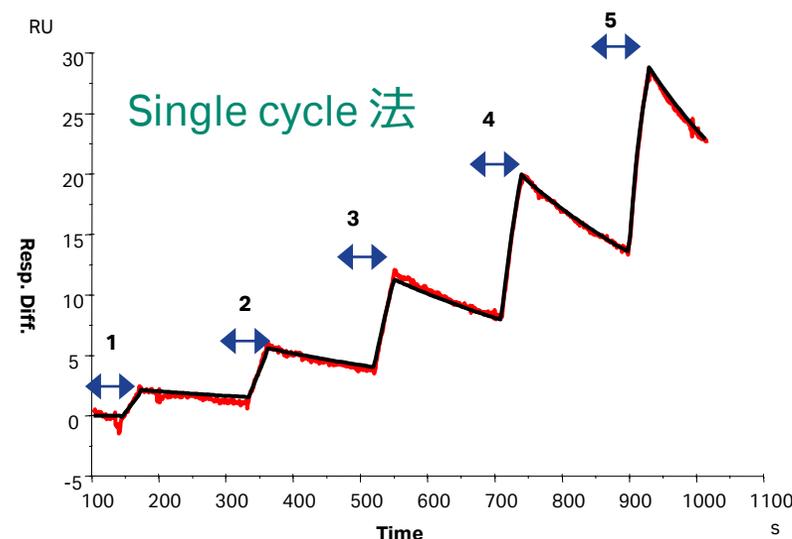
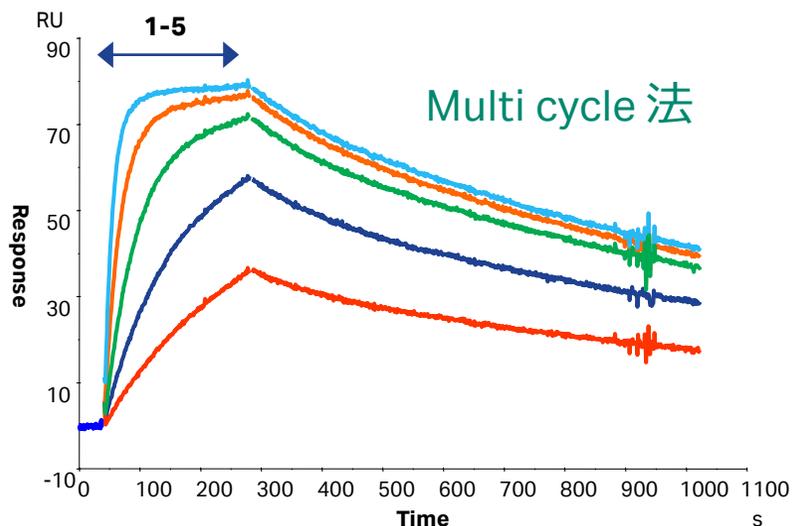
フルサイズの抗体以外でも可能

- Fab
- scFv
- その他何かしらのタグがあれば

- 不溶物がなければそのまま希釈して使用して問題ない
- 通常、ランニング緩衝液（HBS-EP+推奨）にて 2~20倍程度希釈して利用
- 一方で、論文では遠心（14000rpm, 5min程度）あるいはフィルトレーション操作により大きな粒子を除去しているものも見かけられる
- 非特異的結合が起きる場合は NSB Reducer (BR100691) を終濃度 1mg/mLになるよう添加すれば抑制できる可能性がある（やや使い方特殊なのでバイオダイレクトラインへ）



(前提2) Multi cycle 法とSingle cycle 法の違い



Multi cycle 法 各濃度は個別サイクルで測定する		Single cycle 法 各濃度は同一サイクルで測定する	
Pros	<ul style="list-style-type: none"> 古典的方法。 アフィニティー解析にはよく使われる 	<ul style="list-style-type: none"> 再生操作が不要（再生困難なリガンドにも適用可能） 解離が遅いサンプルでより正確な測定ができ有利 キャプチャー法におけるリガンド消費量が少ない 1 RUNの時間短縮で、リガンド失活の影響を受けにくい 	
Cons	<ul style="list-style-type: none"> 再生条件の検討が必要 再生困難なサンプルに適用不可 解離の非常に遅いサンプルで不利 	<ul style="list-style-type: none"> キャプチャー後のベースラインドリフトが安定でないと困難（Biotin CAPture kitおすすめ） 	

2価の抗体における典型的なワークフロー全体概要

- クルードな溶液中の抗体
- 抗体をリガンドとしたキャプチャー法
- 抗原1濃度で添加

- 精製済み抗体
- 抗体をリガンドとしたキャプチャー法
- 抗原複数濃度で添加

Screening

Yes/No
binding

Kinetic
screen

Epitope
binning

Kinetic
analysis

Fcγ
binding

FcRn
binding

Active
conc.





分岐前に戻る



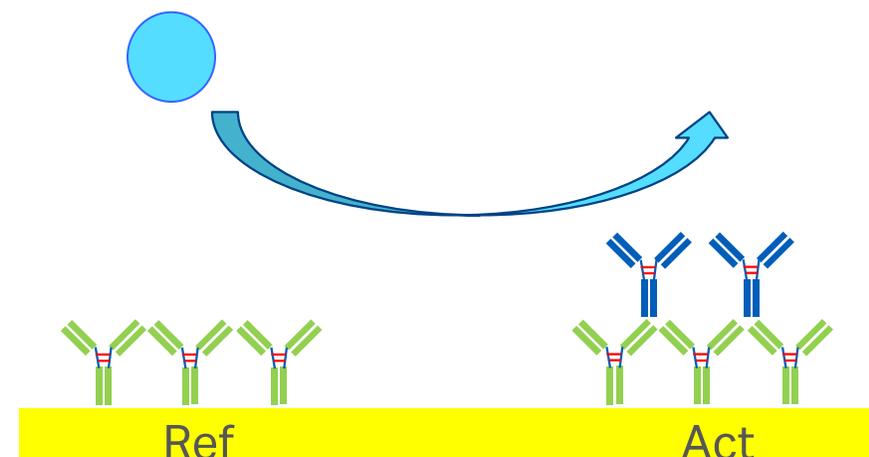
ホームへ戻る

Kinetic screen の概要 (2価なら) 抗体をリガンド、抗原をリガンドに

注意点と特徴

- 目的の抗体を含むクールドな溶液を抗抗体やSensor Chip Protein Gなどでキャプチャー
- 抗体の濃度は不明であることが多いためアナライトとしてしまうと kinetics 解析ができない
- 抗原をリガンドとする系でも (困難だが) 評価は可能 (サンプル数と量を考慮して測定者が選択)
- ただしその場合は抗原のリガンド量を少なく保つことを推奨

抗体の数や得たい解析結果の精度にもよるが、抗原は大体 1 濃度のみ



AffinityとAvidityについて
より深く理解する



1価の抗体の場合

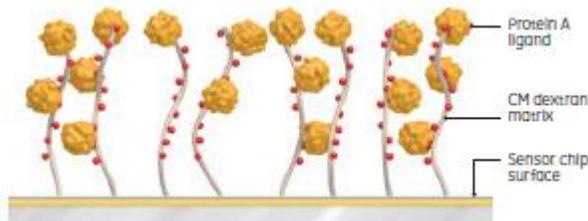
抗体のキャプチャー方法

Sensor chip Protein A, G, (L)

大体これで問題ないが、FCSとは非特異的結合する

- Protein AやGやLが pre-immobilize されたチップ
- 遠心あるいはフィルトレーション済みの培養上清などをそのまま添加することで抗体はキャプチャーされる

Sensor chip	抗体種
Protein A	Human IgG1, IgG2 and IgG4 mammalian IgG Stability of mouse IgG1 is quite low, so kinetic studies challenging
Protein G	Human, rat, mouse, rabbit, sheep, goat, pig, cow, horse IgG Not bind chicken IgG, human IgA, IgD, IgE and IgM
Protein L (for yes/no screening)	Kappa light chain subtypes 1,3 and 4 Not bind bovine immunoglobulins (so useful for antibodies from serum based culture)

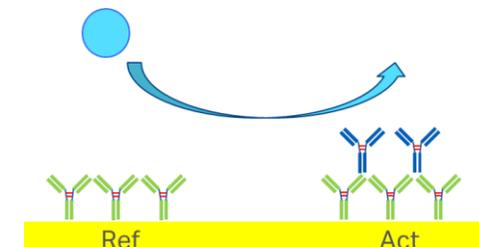


Cytiva

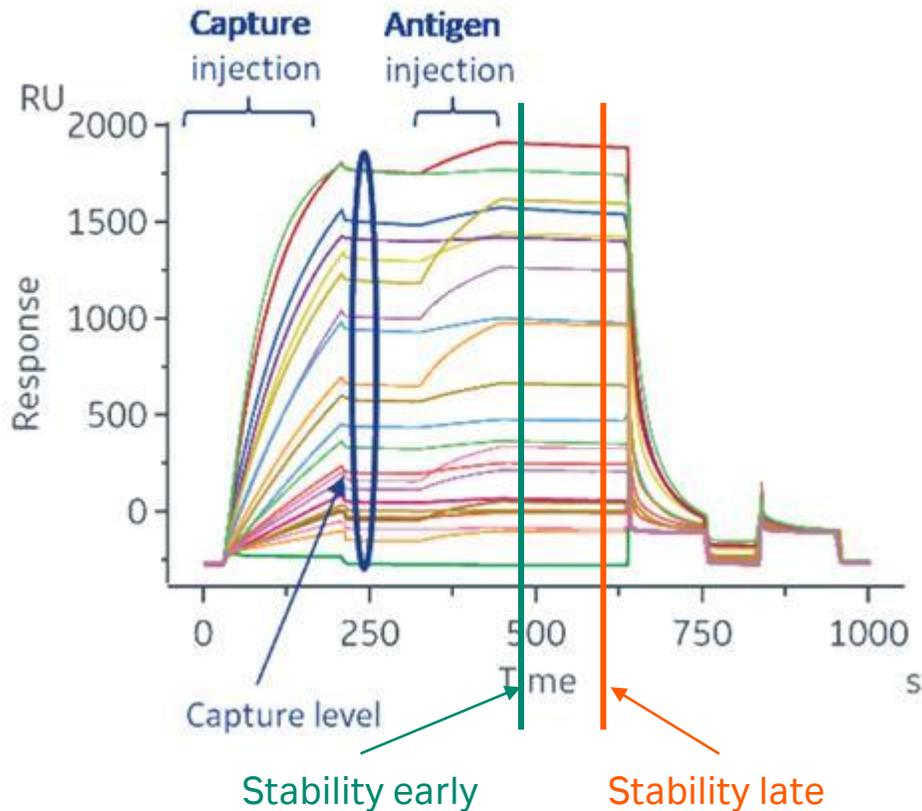
CM5 + 各種キャプチャーキット + Amine coupling kit

準備がやや面倒だがCM5チップでワークする

- 弊社からは Mouse antibody capture kit, Human antibody capture kit, Human Fab capture kit を用意
- その他の動物種については他社製品で対応
- Amine coupling Kit が必要
- 固定化の作業が必要
- 通常 Reference cell にも抗抗体を固定化するがタンパク質フリーにしたいのであればあえて固定化しない選択肢もある
- Protein Gは Fatal Calf Serum と結合するためこちらが選ばれることもある
- mIgG1が含まれる場合もキャプチャーキットが無難



代表的な解析フォーマット



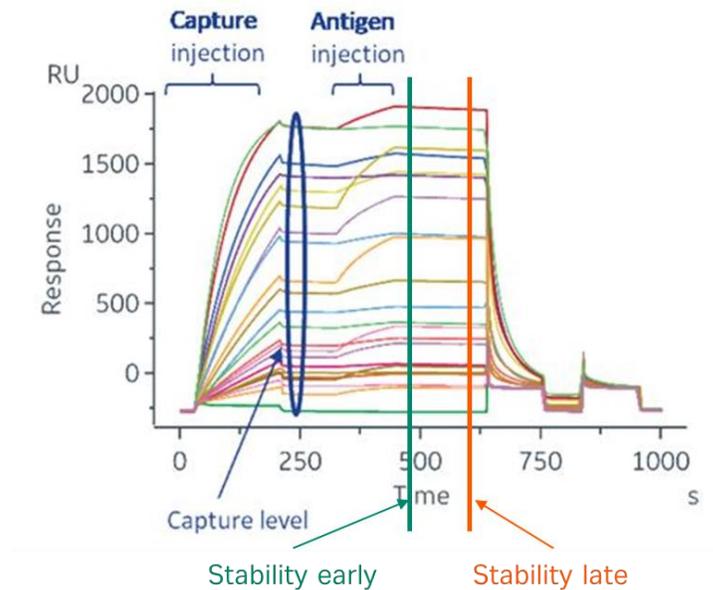
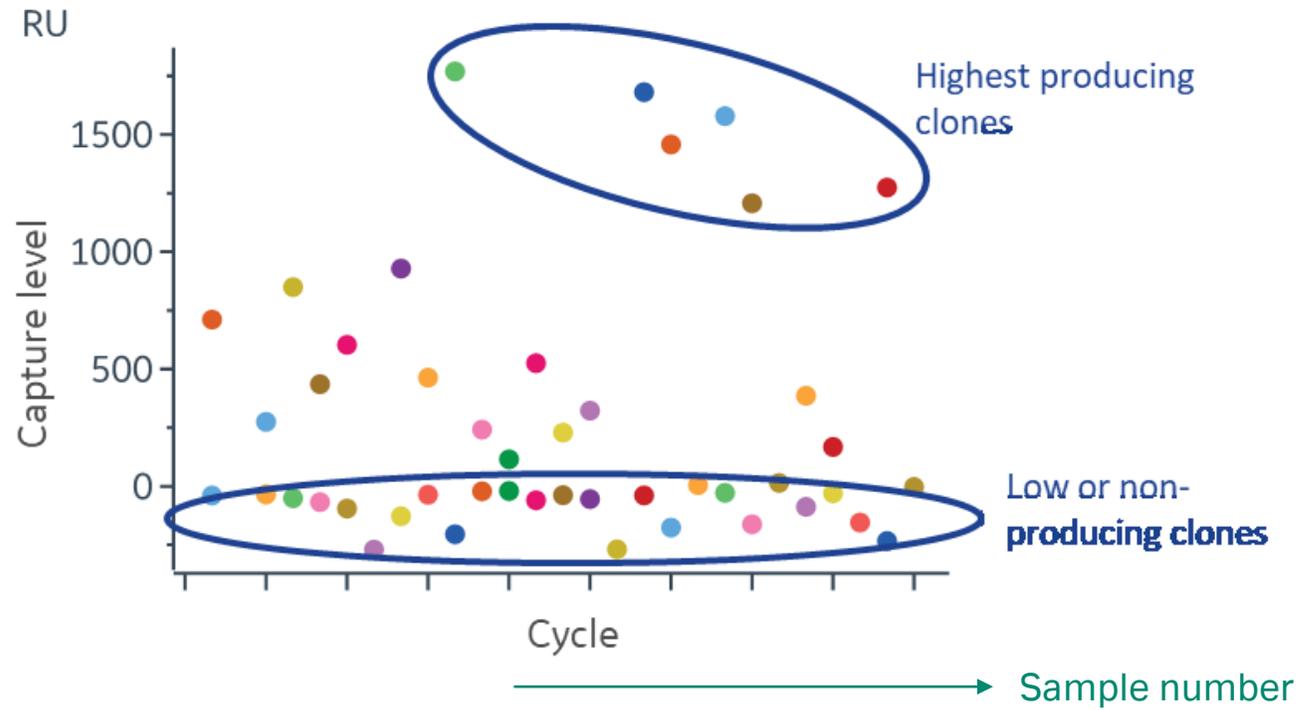
Blankサイクルを必要としない、Report point-based screening

評価対象	評価内容
Capture level のプロット	そのクローンの抗体発現量
Stability early vs Capture level のプロット	抗体発現量は多くとも抗原との親和力が弱いクローンを見分ける
Stability early vs Stability late のプロット	複合体の安定性

Blankサイクルが必要な、Sensorgram-based screening

評価対象	評価内容
Off-rate ranking	<ul style="list-style-type: none"> Insight に標準搭載の 1:1 dissociation model 使用 抗原の濃度不要 Kinetics screeningよりも簡易
Kinetic screening	<ul style="list-style-type: none"> 1濃度の抗原だけでkaとkdを算出 On-Off rate map の評価可能

Capture levelのプロット



- 抗体発現量の多いクローンを選別することが可能



1 ページ戻る

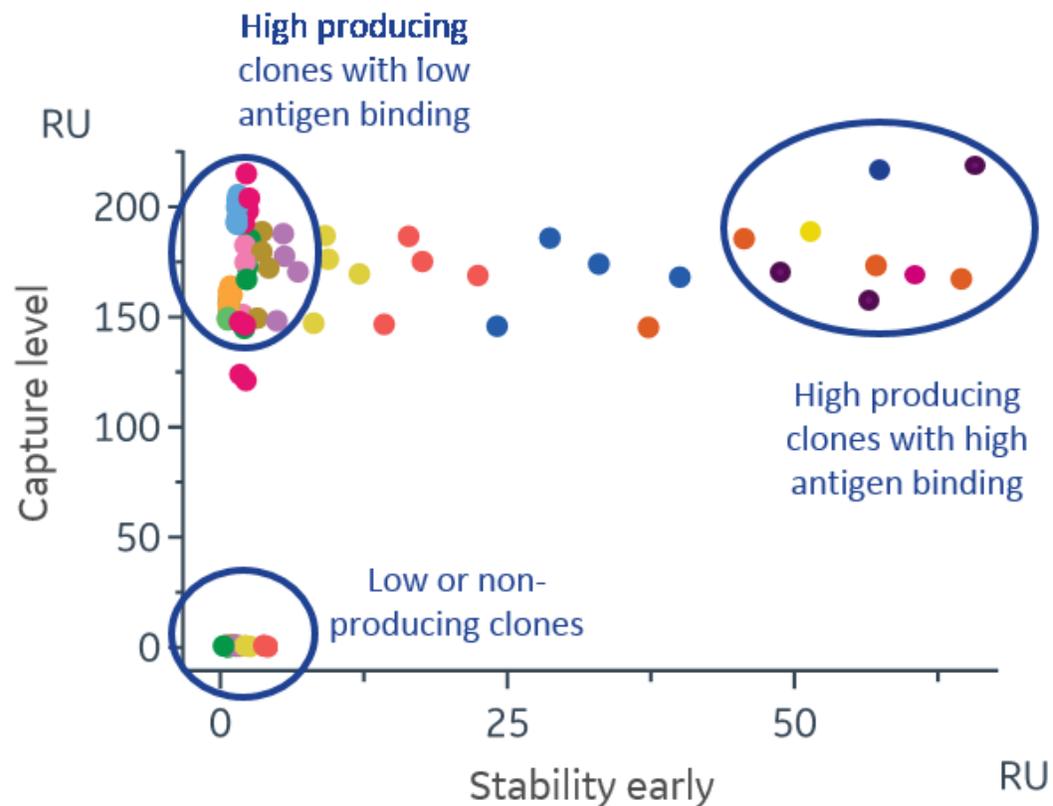


分岐前に戻る

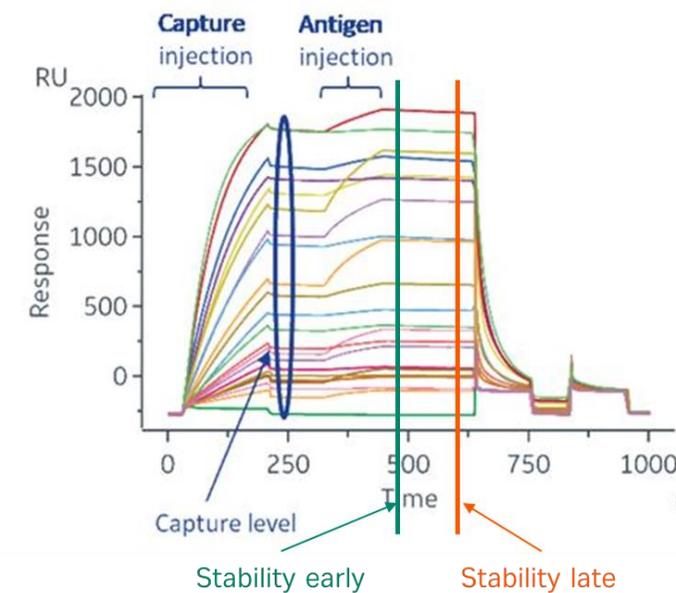


ホームへ戻る

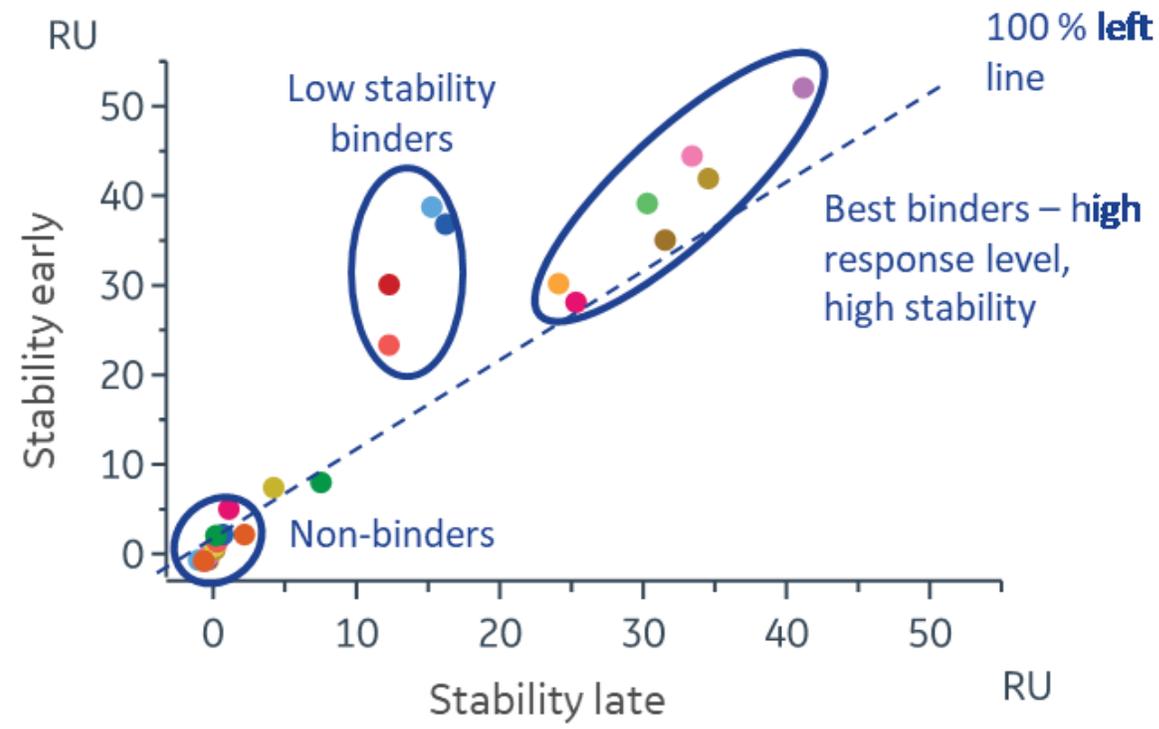
Stability early vs Capture level のプロット



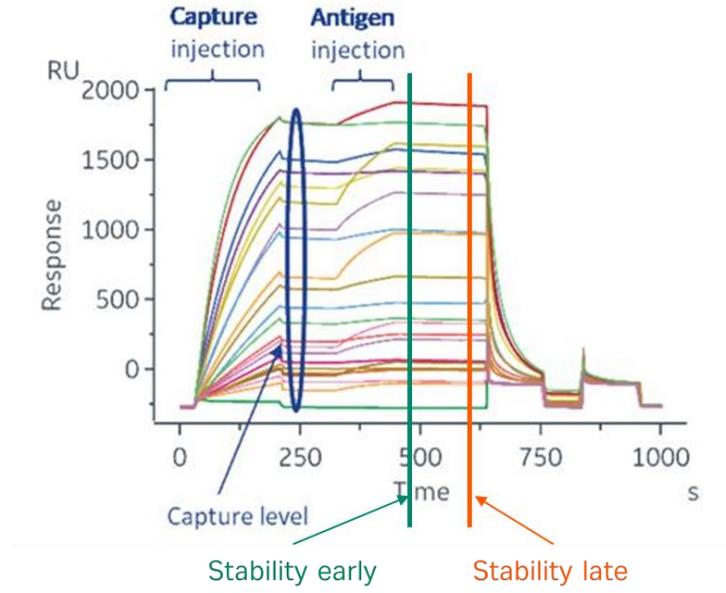
- 抗原との結合量が少ないクローンを除外可能



Stability early vs Stability late のプロット

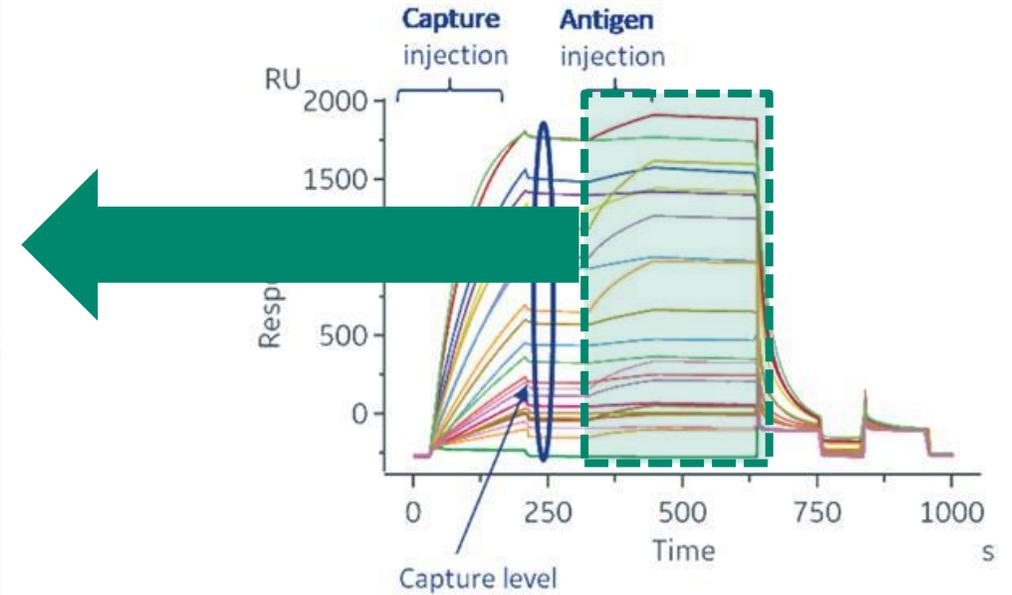
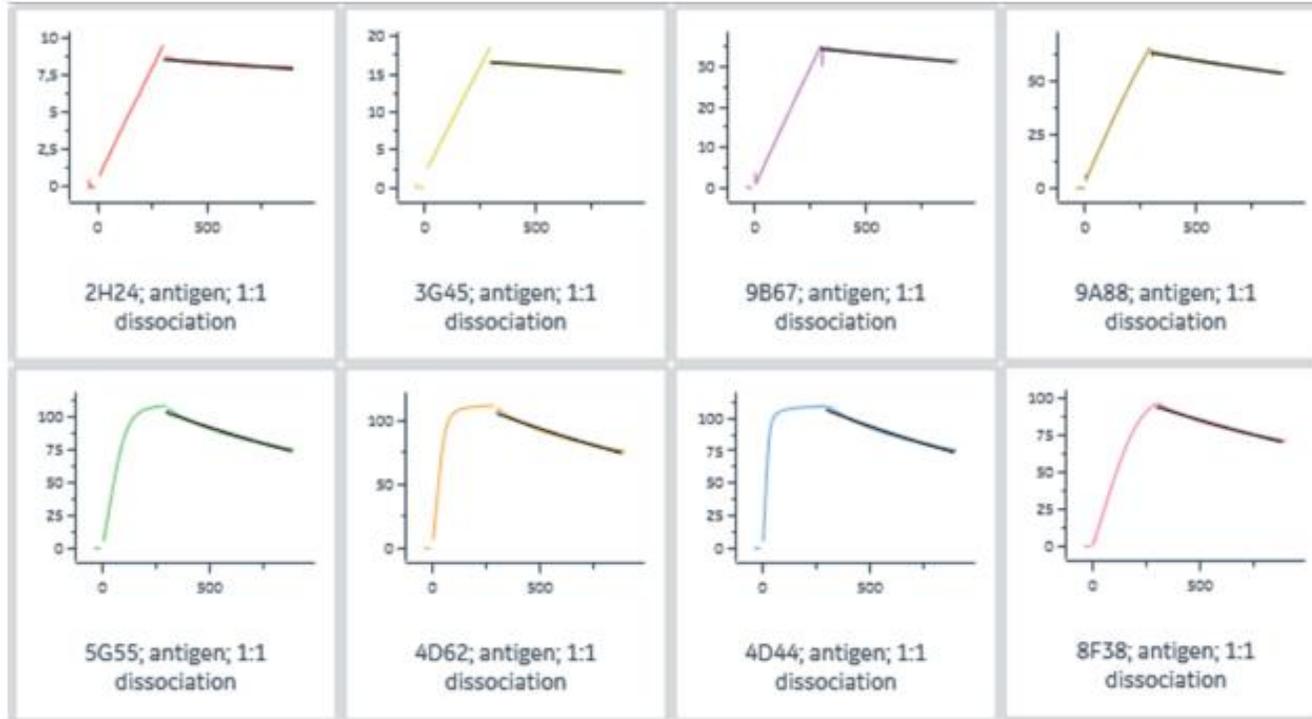


抗原が全く解離しないなら
 100% left lineに乗る



- 複合体の安定性の良い抗体を選別可能

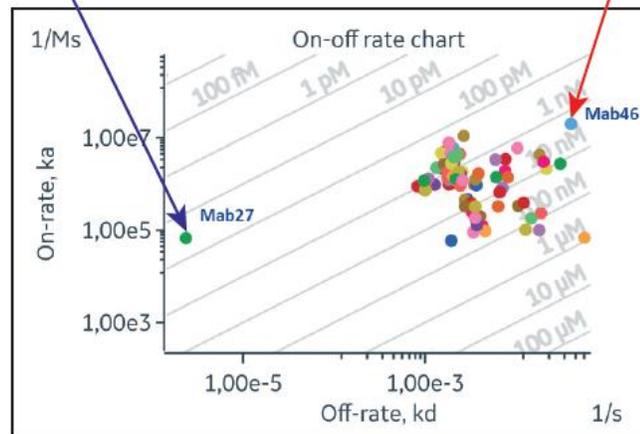
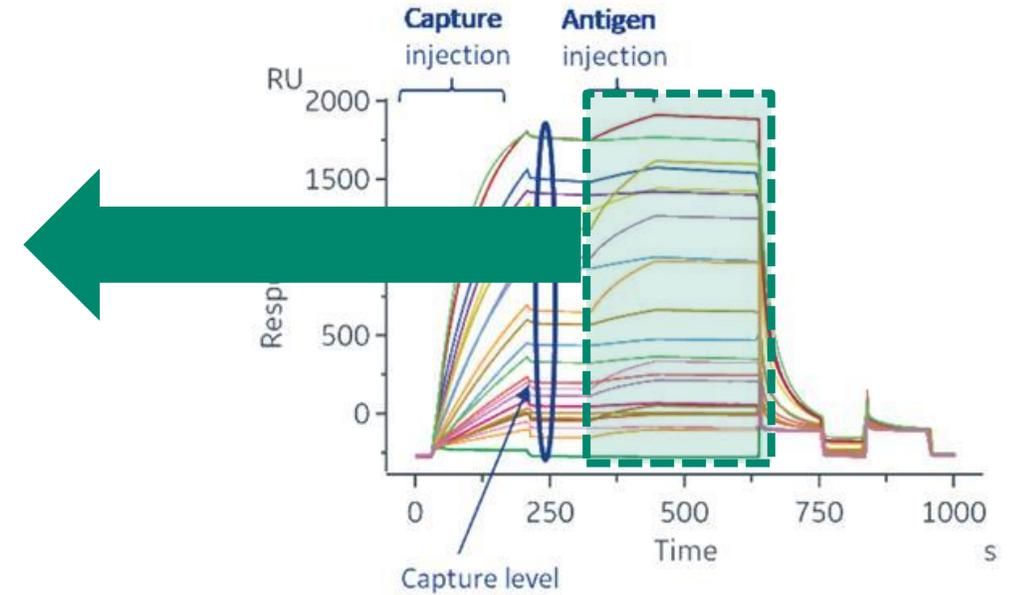
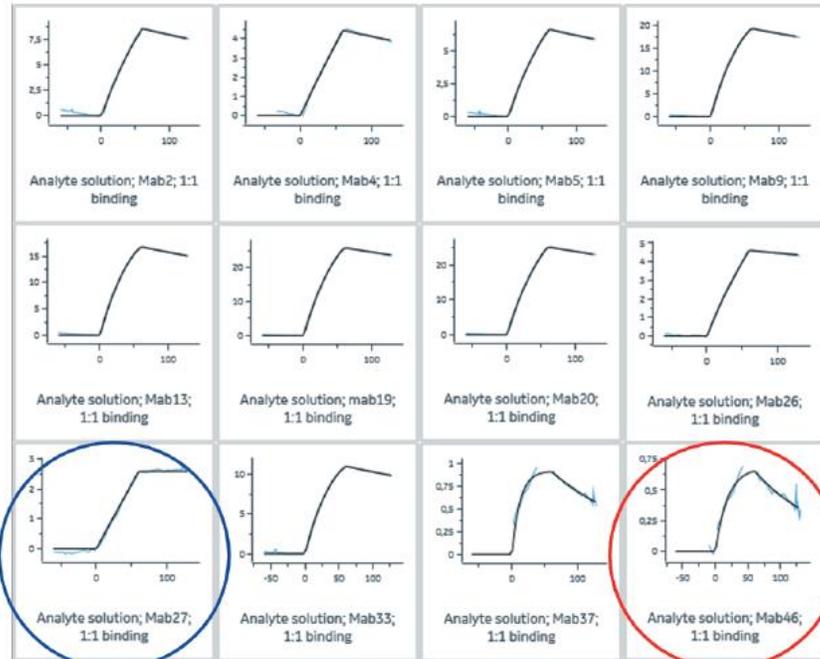
Off-rate ranking



- **Blank (0濃度) のデータを差し引く必要がある**
- 1:1 dissociation model で解析 

• 複合体の安定性の良い抗体を選別可能

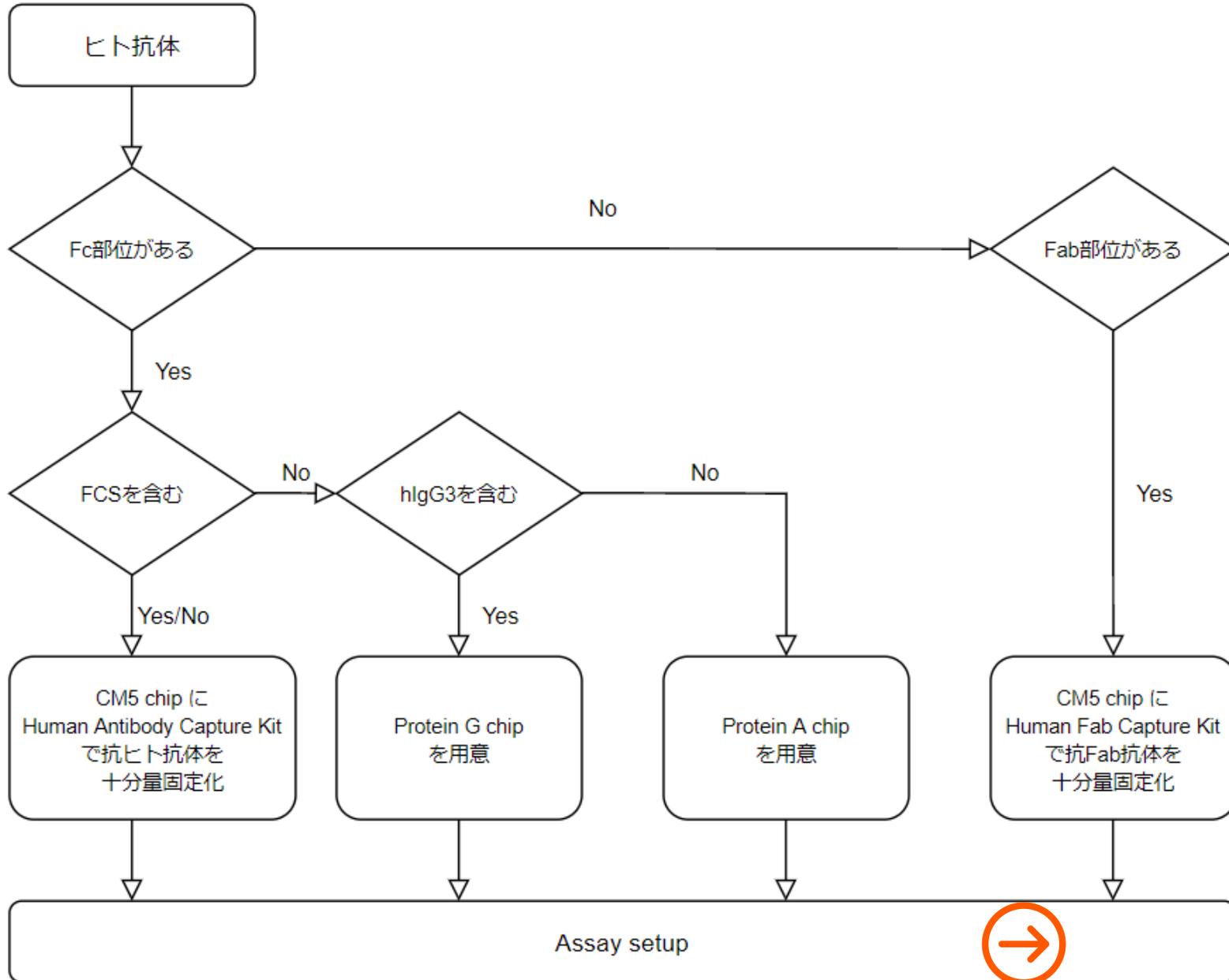
Kinetic screening



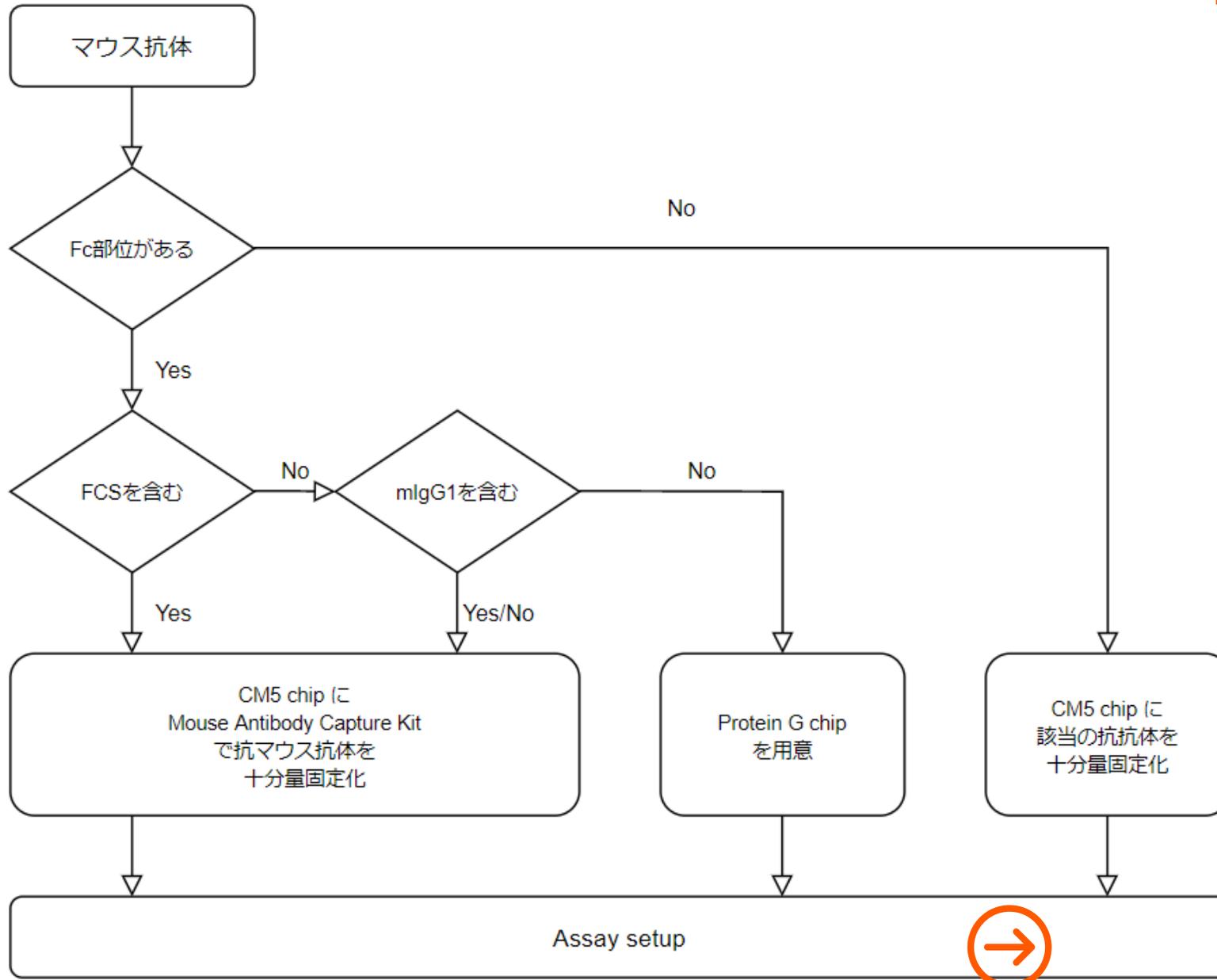
- **Blank (0濃度) のデータを差し引く必要がある**
- 1:1 binding model で解析

• On-Off rate map を描き、より詳細に望む特性の抗体を選別可能

2価のヒト抗体における典型的な Screening ワークフロー



2価のマウス抗体における典型的な Screening ワークフロー



Protein A, G, Lについて

結合できる生物種とサブクラス、および CofA に注意

- Protein A, G, L があらかじめ固定化されているこれらの Sensor chip は Ready-to-use で便利なので積極的に利用可能
- ただし Protein A は hIgG3 および mIgG1 と、Protein G は mIgG1 との親和力がないあるいは弱いため、これらのチップを利用することは非推奨：キャプチャーキットを推奨
- Protein L chip はベースラインドリフトが起きやすいため Characterization には不向き
- 新製品の PrismA chip は V_H3 と結合するため Characterization には不向き
- Protein G, L chip は Certificate of Analysis が発行されないため QC での利用は非推奨

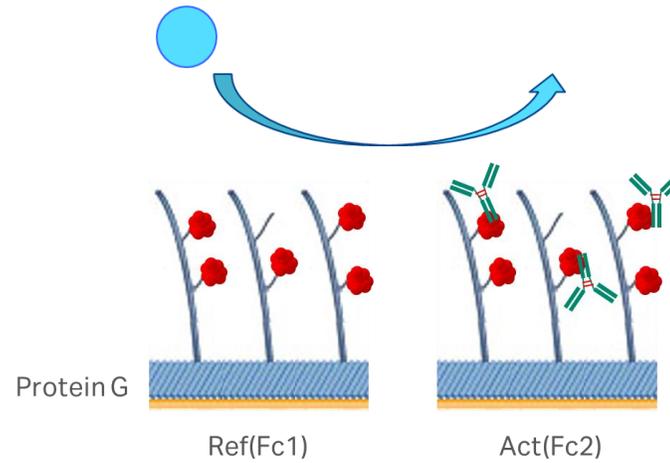
Antibody species	Protein L*	Protein A	Protein G
Human IgG1	++++	++++	++++
Human IgG2	++++	++++	++++
Human IgG3	++++	-	++++
Human IgG4	++++	++++	++++
Human IgGA	++++	++	-
Human IgGD	++++	++	-
Human IgGE	++++	++	-
Human IgGM	++++	++	-
Mouse IgG1	++++	+	++
Mouse IgG2a	++++	++++	++++
Mouse IgG2b	++++	+++	+++
Mouse IgG3	++++	++	+++
Mouse IgGM	++	+/-	-
Rat IgG1	++++	-	+
Rat IgG2a	++++	-	++++
Rat IgG2b	++++	-	++
Rat IgG2c	++++	+	++
Rat IgGM	+	+/-	-
Rabbit Ig	+	++++	+++
Hamster Ig	++++	+	++
Guinea Pig Ig	++	++++	++
Bovine Ig	-	++	++++
Sheep Ig	-	+/-	++
Goat Ig	-	+/-	++
Pig Ig	++++	+++	+++
Chicken Ig	++	-	+

Antibody fragments	Protein L*	Protein A	Protein G
Human Fab	++++	+	+
Human F(ab')2	++++	+	+
Human scFv	++++	+	-
Human Fc	-	++	++
Human κ	++++	-	-
Human λ	-	-	-

* It should be noted that recombinant Protein L binding is restricted to specific subclasses of the κ domain. Thus the affinity indicated in the table is not general for the IgG subclass but accounts only for those antibodies carrying the right kappa light chain (see table below).

Antibody κ light chains	Protein L
Human kappa I	++++
Human kappa II	-
Human kappa III	++++
Human kappa IV	++++
Mouse kappa I	++++
Mouse kappa II	-
Mouse kappa V	+

Kinetic screen - Assay setup

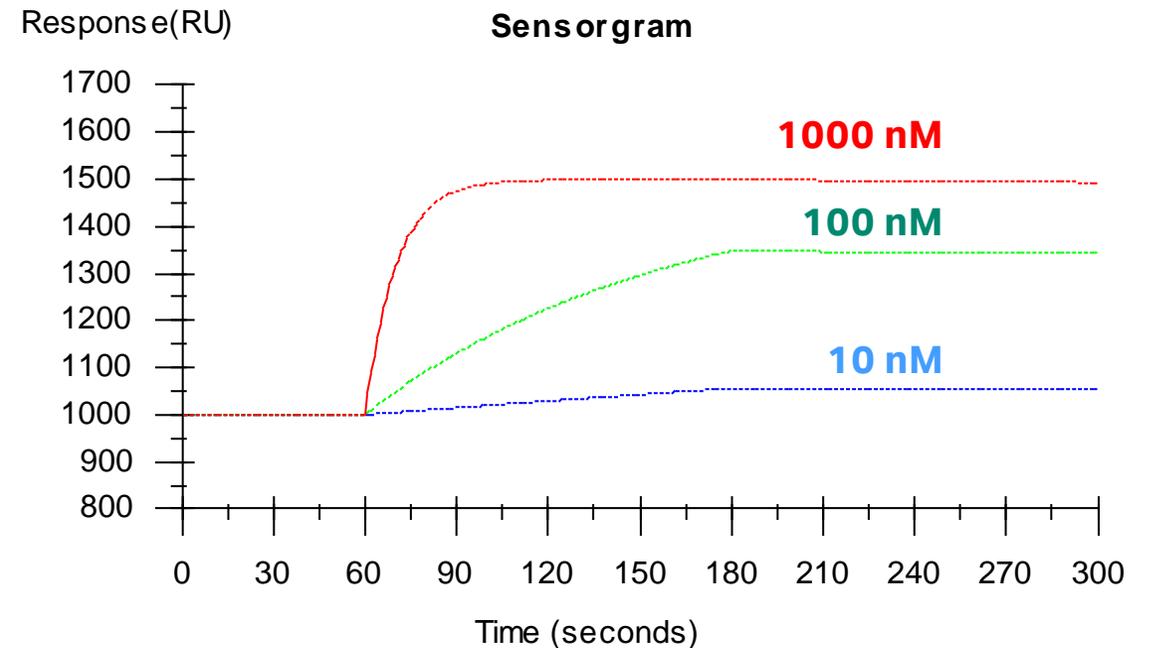


	Report point-based screening	Sensorgram-based screening
特徴	Blank が不要 <ul style="list-style-type: none"> Capture level Stability early, Stability late 	要Blank <ul style="list-style-type: none"> Off-rate ranking Kinetics screening
(Analyte) Flow rate	> 30 uL/min	> 30 uL/min
(Analyte) Injection type	Low sample consumption	High performance
(Analyte) Contact time	60 sec	60-120 sec
(Analyte) Dissociation time	120 sec	180 sec
(Analyte) Pooling	Optional	Optional
(Analyte) Concentration	Use the same conc. In all cycles	Use the same conc. In all cycles
(Ligand) Flow rate	10 uL/min	10 uL/min
(Ligand) Contact time	60-180 sec	60-180 sec

Screening における抗原の濃度は？

100 nM で良い

- 抗原が一般的なタンパク質の場合、抗原抗体反応の kinetics (はおよそ $k_a = 10^4 \sim 10^5$, $k_d = 10^{-5} \sim 10^{-3}$ くらいに収まる)
- 右図は $k_a = 10^5$, $k_d = 10^{-4}$, $R_{max} = 500$ RU としたときにアナライトをそれぞれの濃度で添加した場合のシミュレーションデータ
- 図より1点の濃度だけで**十分なレスポンスを得るためには 100 nM** で添加すれば十分と言える



(Sensorgram-based screeningにおける) Blank の設定について

Blank は各リガンド毎に取得すべきか？

- Sensorgramを解析する際は、アナライタが0濃度のデータ (=Blank) を取得した上でアナライタ分子入りのデータからBlankを差し引くことで、ドリフト、機械的ノイズや非特異的結合の影響を抑える必要がある
- その意味で、全ての抗体について①0濃度のデータと②アナライタ分子入りのデータを取得することが望ましい
- 一方で全抗体についてBlankを取るとスループットが悪くなるので、「5-10サイクルおきに代表的な抗体(Rep)をキャプチャーした上で0濃度を取り、それをBlankとする」という方法を取ることも可能

理想的な Setup

	Ligand	Analyte
Cycle 04	●	○ Blank
Cycle 05	●	●
Cycle 06	●	○
Cycle 07	●	●
Cycle 08	●	○
Cycle 09	●	●
Cycle 10	●	○
Cycle 11	●	●
Cycle 12	●	○
Cycle 13	●	●
Cycle 14	●	○
Cycle 15	●	●

スループット重視

	Ligand	Analyte
Cycle 04	● Rep	○ Blank
Cycle 05	●	●
Cycle 06	●	●
Cycle 07	●	●
Cycle 08	●	●
Cycle 09	●	●
Cycle 10	● Rep	○ Blank
Cycle 11	●	●
Cycle 12	●	●
Cycle 13	●	●
Cycle 14	●	●
Cycle 15	●	●



分岐前に戻る

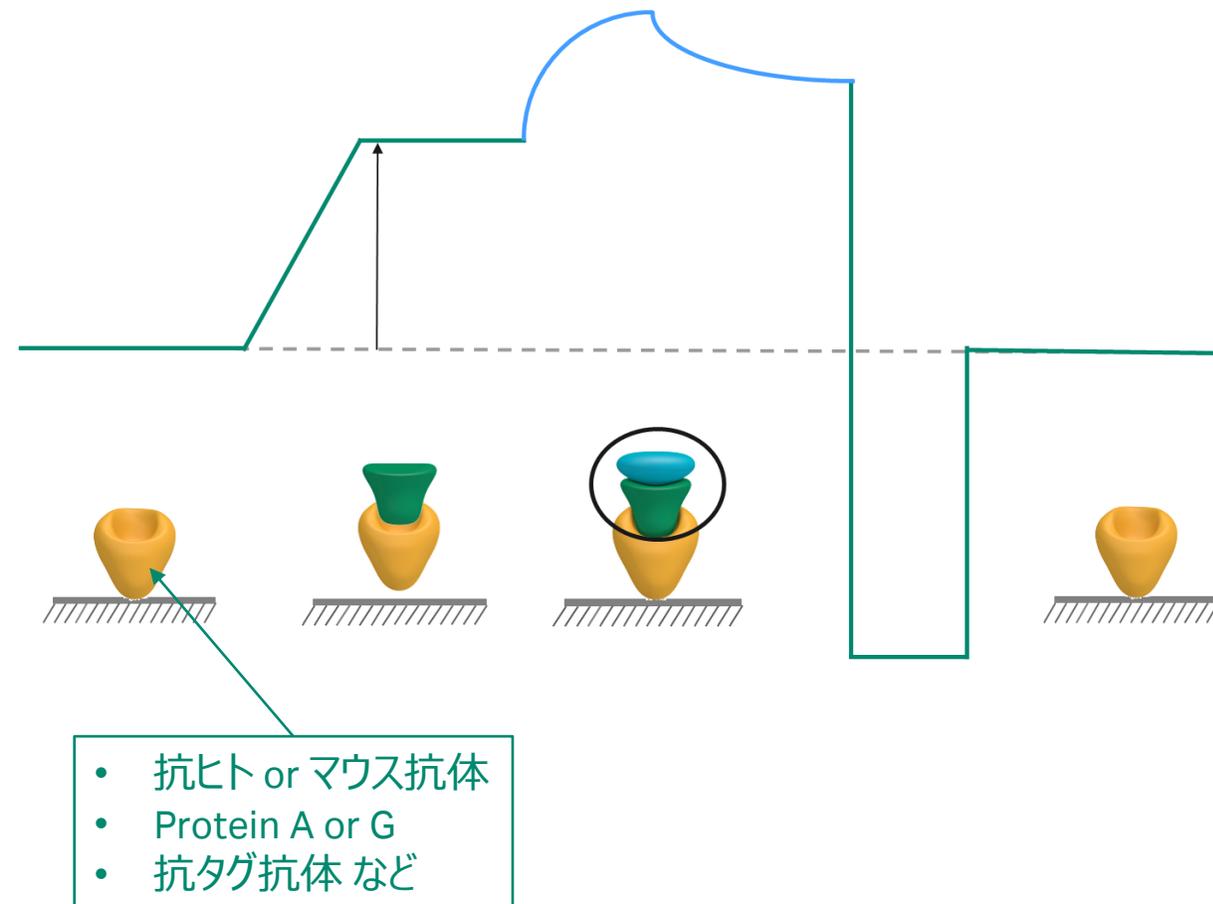


ホームへ戻る

Kinetic analysis の概要

アッセイフォーマットは Screening とほぼ同じ

- 抗体は精製後のものを使用
- 図ではマルチサイクル法を示しているがシングルサイクル法をお勧め（リガンドの消費量、および正確な k_d 算出の観点から）
- リガンドのキャプチャー量から理論的 R_{max} を算出し、アナライต์が高分子の場合は < 50 RU（目安）を目指す



2価のヒト抗体における典型的な Characterization ワークフロー



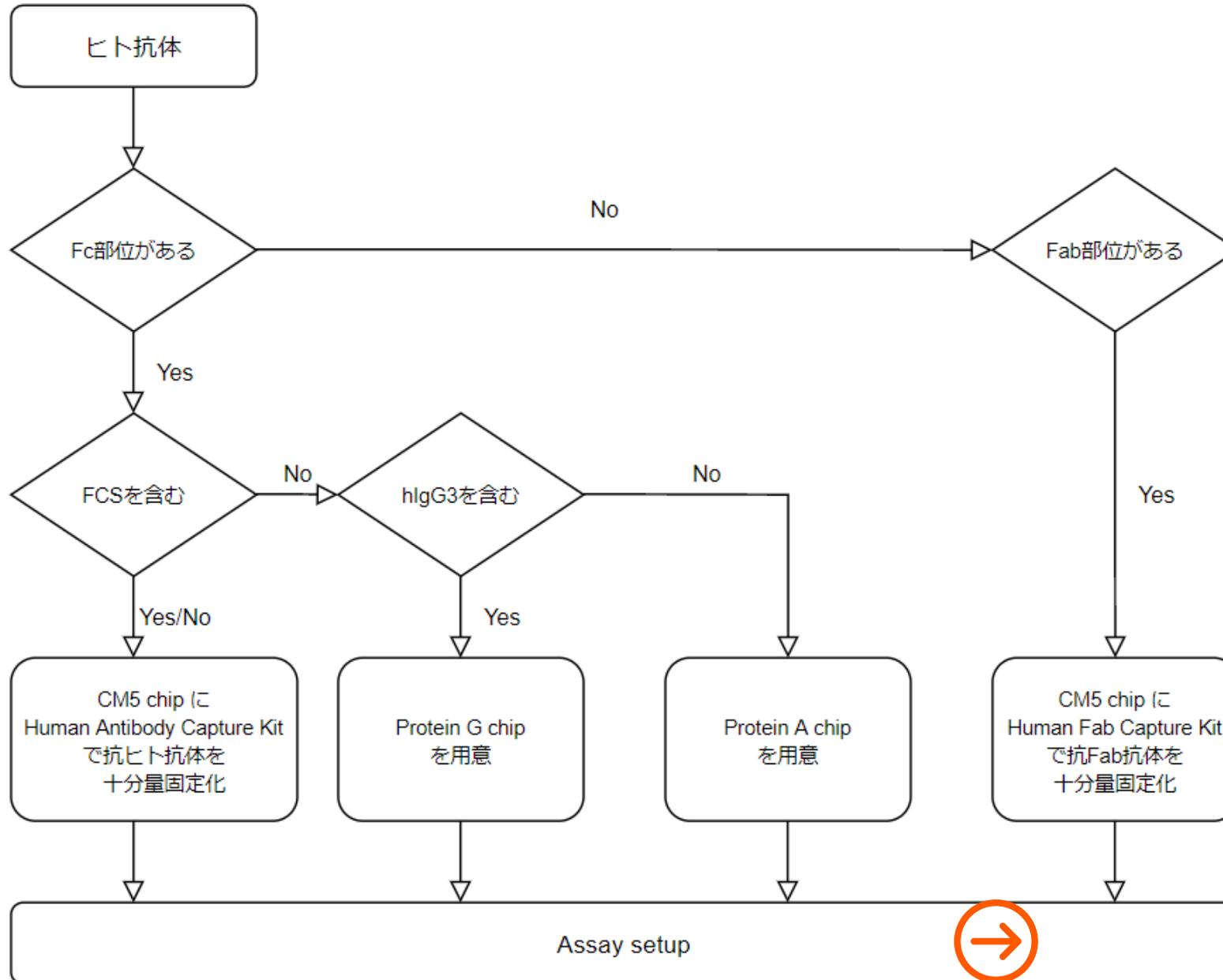
ページ戻る



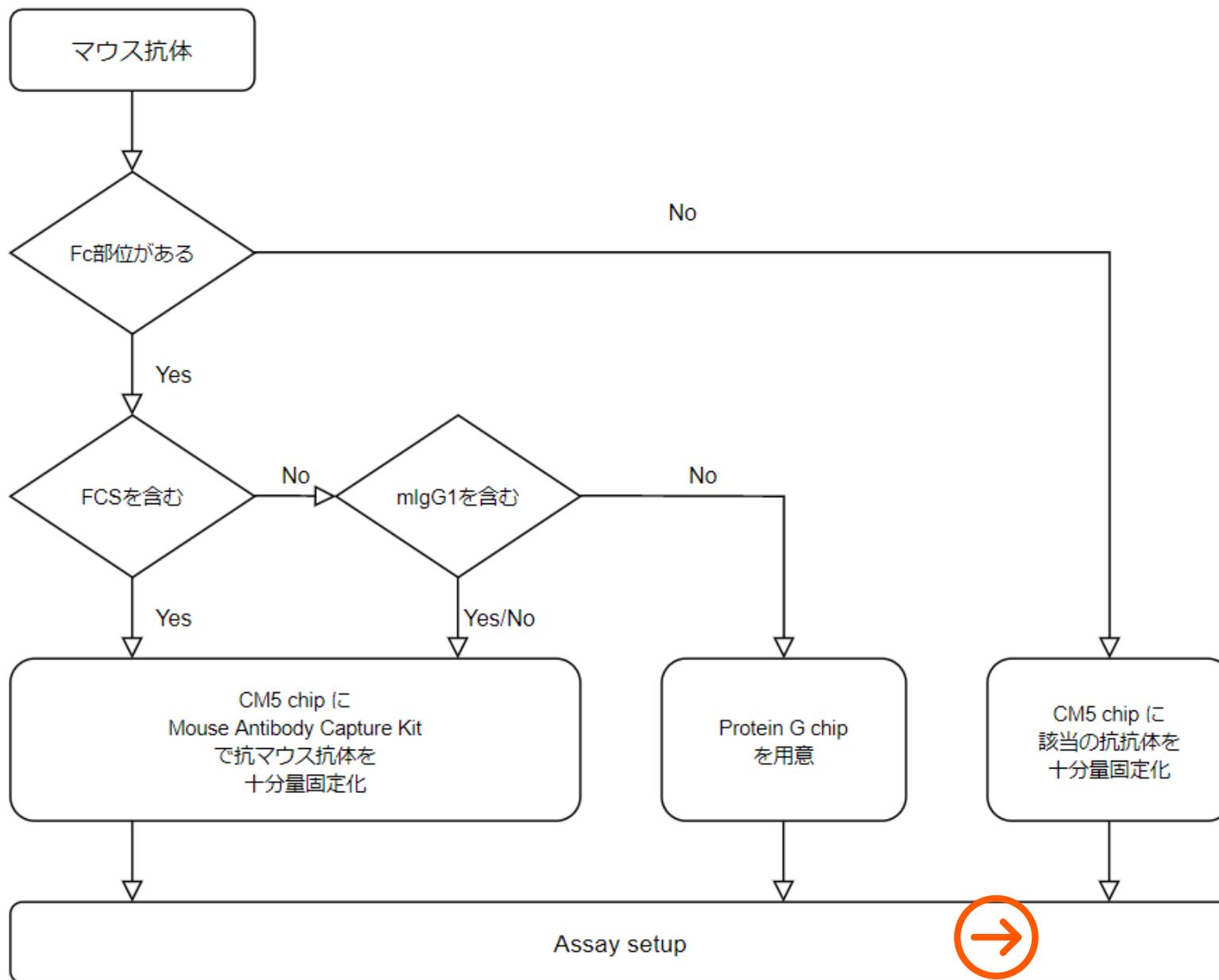
分岐前に戻る



ホームへ戻る



2価のマウス抗体における典型的な Characterization ワークフロー



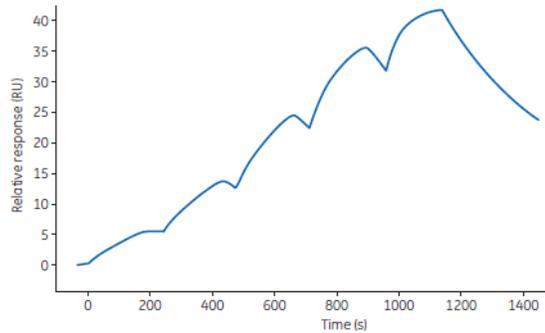
Kinetic analysis -Assay setup



分岐前に戻る



ホームへ戻る



Kinetic analysis	
(Analyte) Flow rate	> 30 uL/min
(Analyte) Injection type	Single cycle kinetics
(Analyte) Contact time	60-120 sec
(Analyte) Dissociation time	180-600 sec
(Analyte) Pooling	Optional
(Analyte) Concentration	0.1 - 10 × K _D
(Ligand) Flow rate	10 uL/min
(Ligand) Contact time	60-180 sec (Theoretical R _{max} <50RU)

Blank Setup

	Ligand	Analyte
Cycle 04	Red	Blank
Cycle 05	Red	Blue
Cycle 06	Yellow	Blank
Cycle 07	Yellow	Blue
Cycle 08	Light Green	Blank
Cycle 09	Light Green	Blue
Cycle 10	Purple	Blank
Cycle 11	Purple	Blue
Cycle 12	Orange	Blank
Cycle 13	Orange	Blue
Cycle 14	Green	Blank
Cycle 15	Green	Blue

Concentration & Potency Biacore での活性濃度測定概要

その他の手法での濃度定量と何が違う？

真の結合活性を持つサンプルの濃度定量は難しい

Bradford 法、Lowry 法など分光光度計を用いた測定系

- 全タンパク質を定量
- 失活しているタンパク質も含まれてしまう

吸光度を指標にする測定系

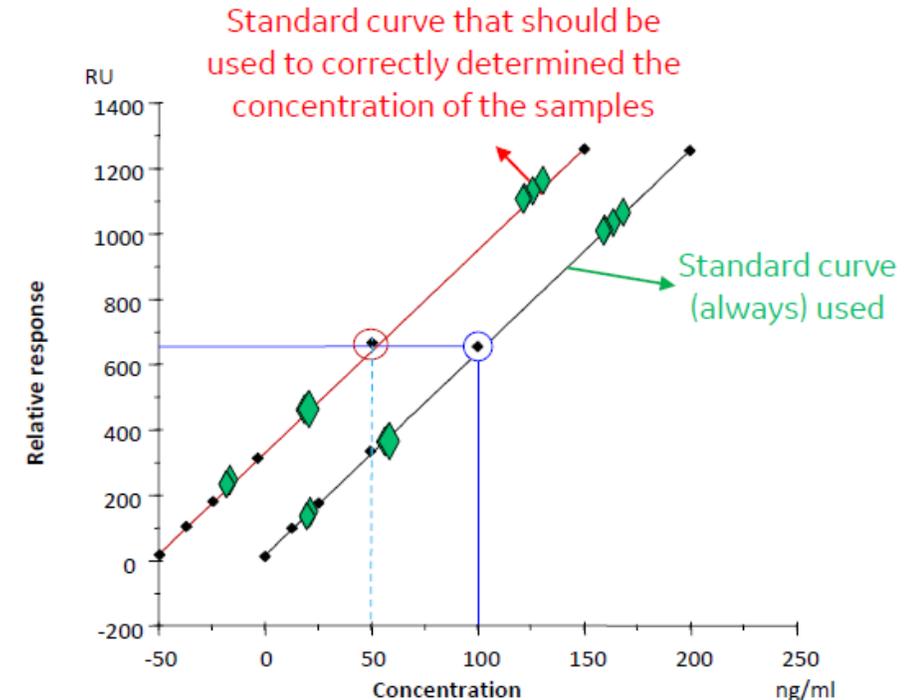
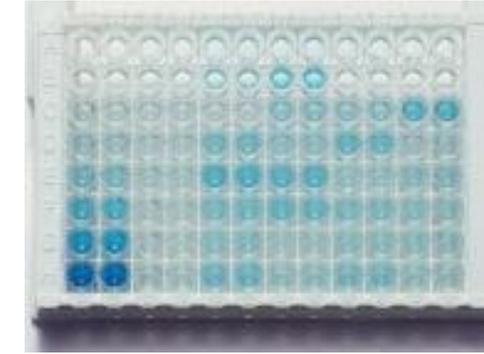
- 色素を持つサンプルは光の吸収や散乱の影響あり

ELISA による濃度定量

- Wash out の作業で測定前に検体が外れてしまう
- 標識、基質反応など手技によるバラつき
- エンドポイントアッセイなので異常値の理由付けが困難

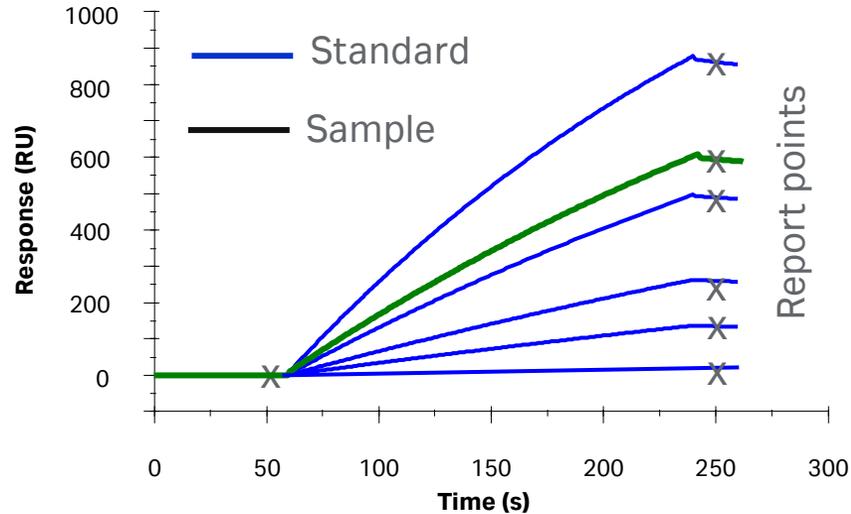
Biacore による（標品を使った）濃度定量

- ELISA のデメリットはない
- ただし標品自体の活性濃度が間違っていると正しい濃度定量ができない

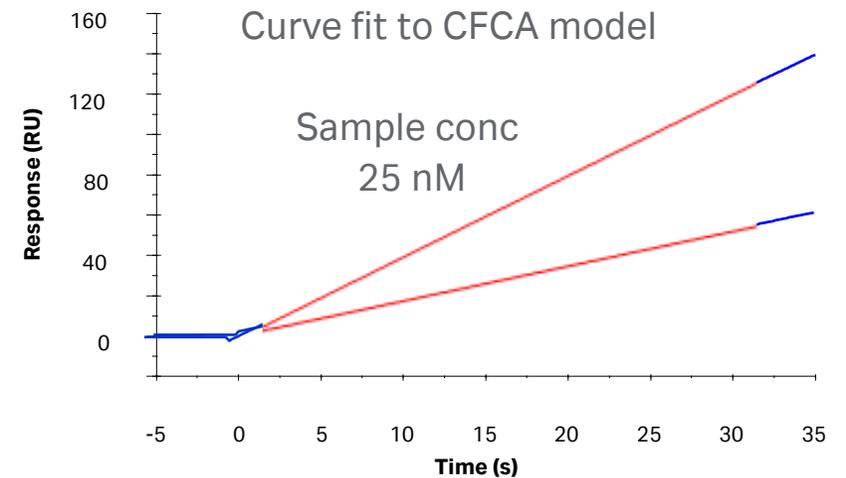
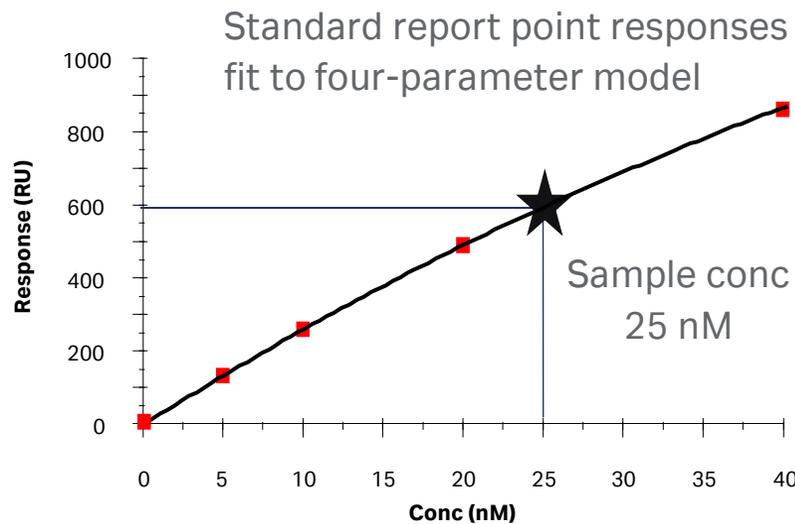
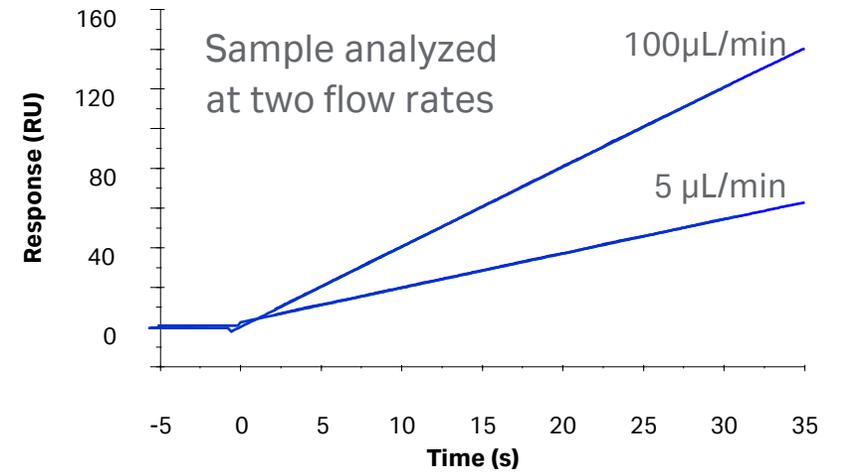


Report point and sensorgram-based assays

Report point-based concentration assay



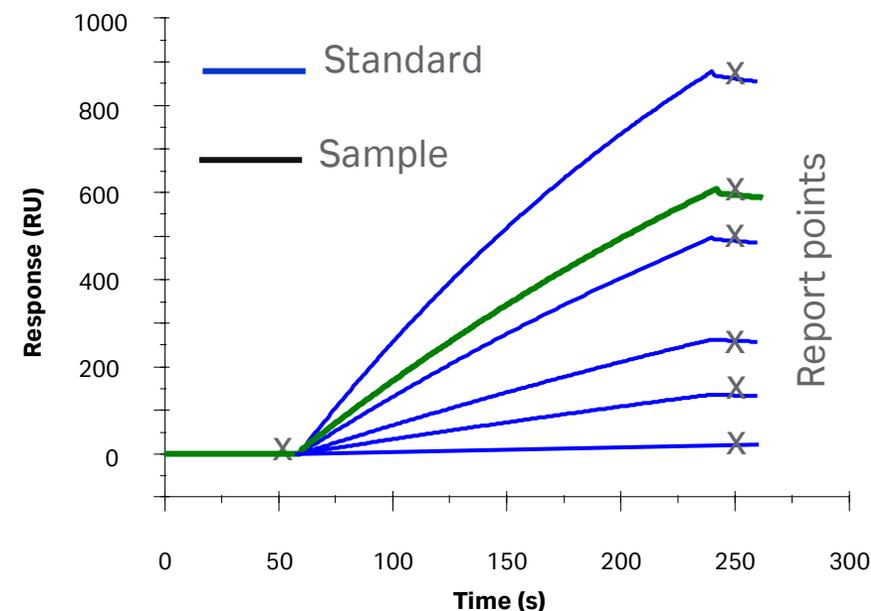
Sensorgram-based concentration assay (CFCA)



検量線を用いた濃度測定

アッセイ上の特徴

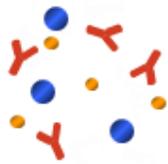
- Active cellのみを利用する（reference cellは不要）
- 添加時間を変更しアッセイの感度とダイナミックレンジを調節
- 短い解離時間（15s）にてアッセイ系全体に掛かる時間を短縮する



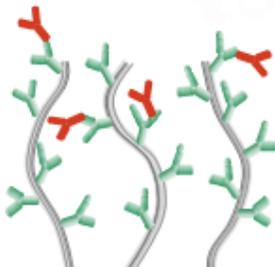
検量線を用いた濃度測定 of 全体像

Assay design

Sample



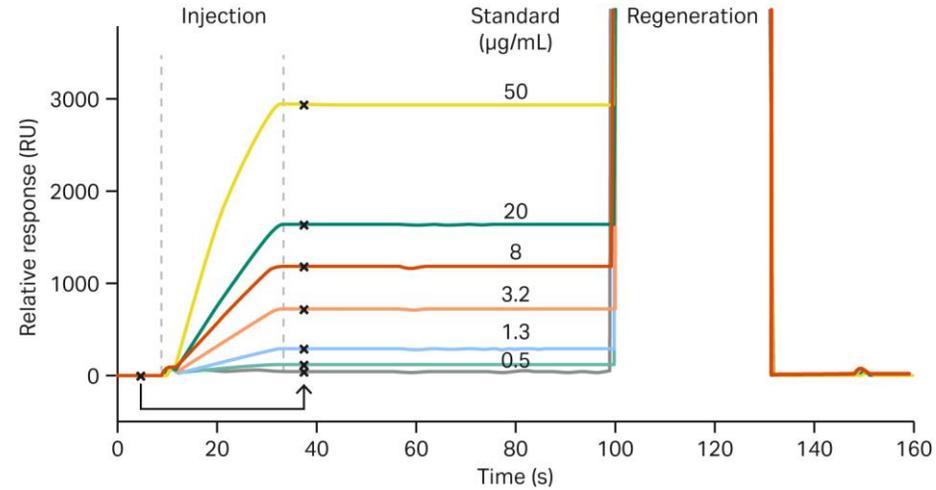
Detector
Antibody



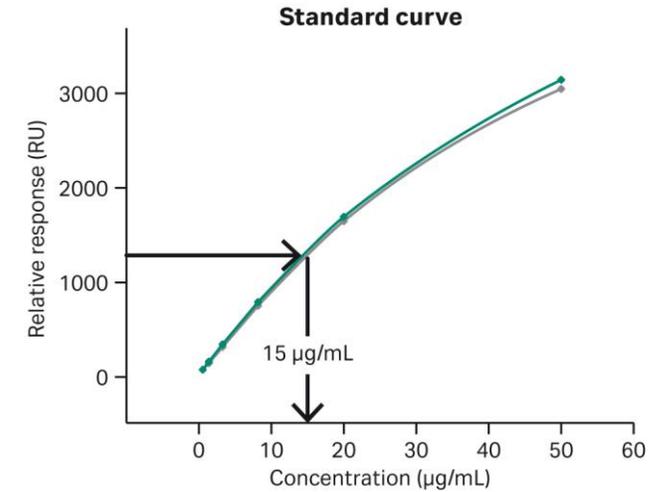
Sensor chip



Sensorgram



Data evaluation



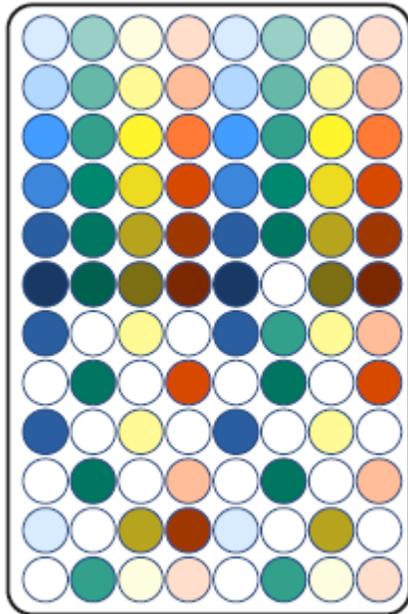
(検量線を用いた)
濃度測定における Tips

検量線を用いた 濃度測定のアッセイフォーマット

複数のニードルを持つシステムにおけるアッセイ系

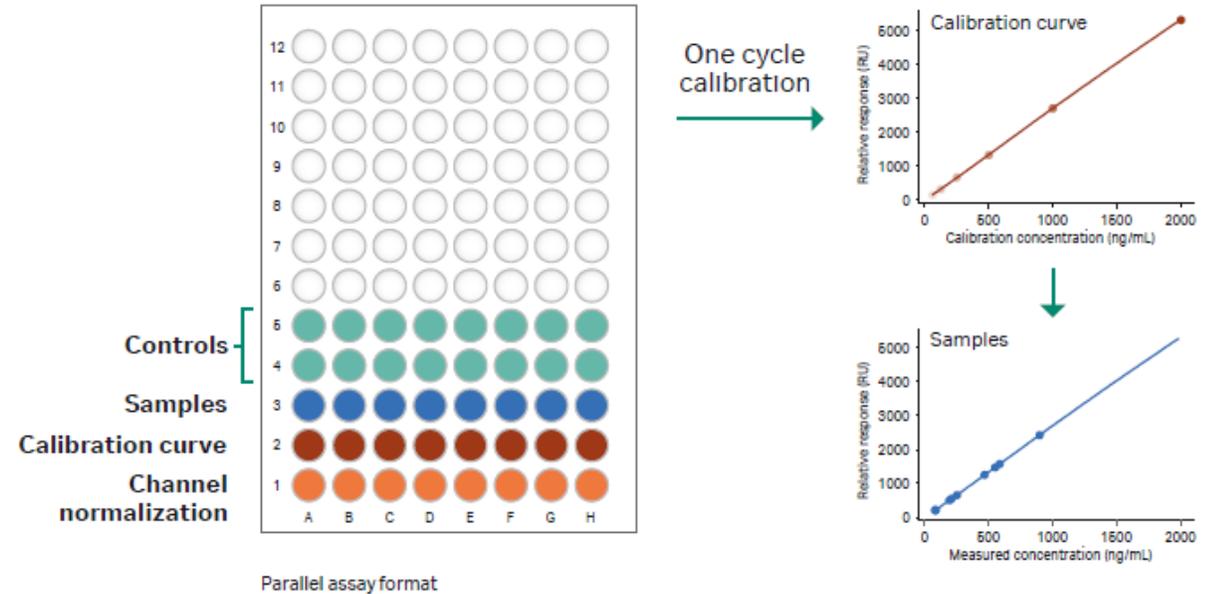
Serial assay format

- 評価はチャンネル内で行われるためそれぞれのチャンネルごとに Calibrant が必要となる



Parallel assay format

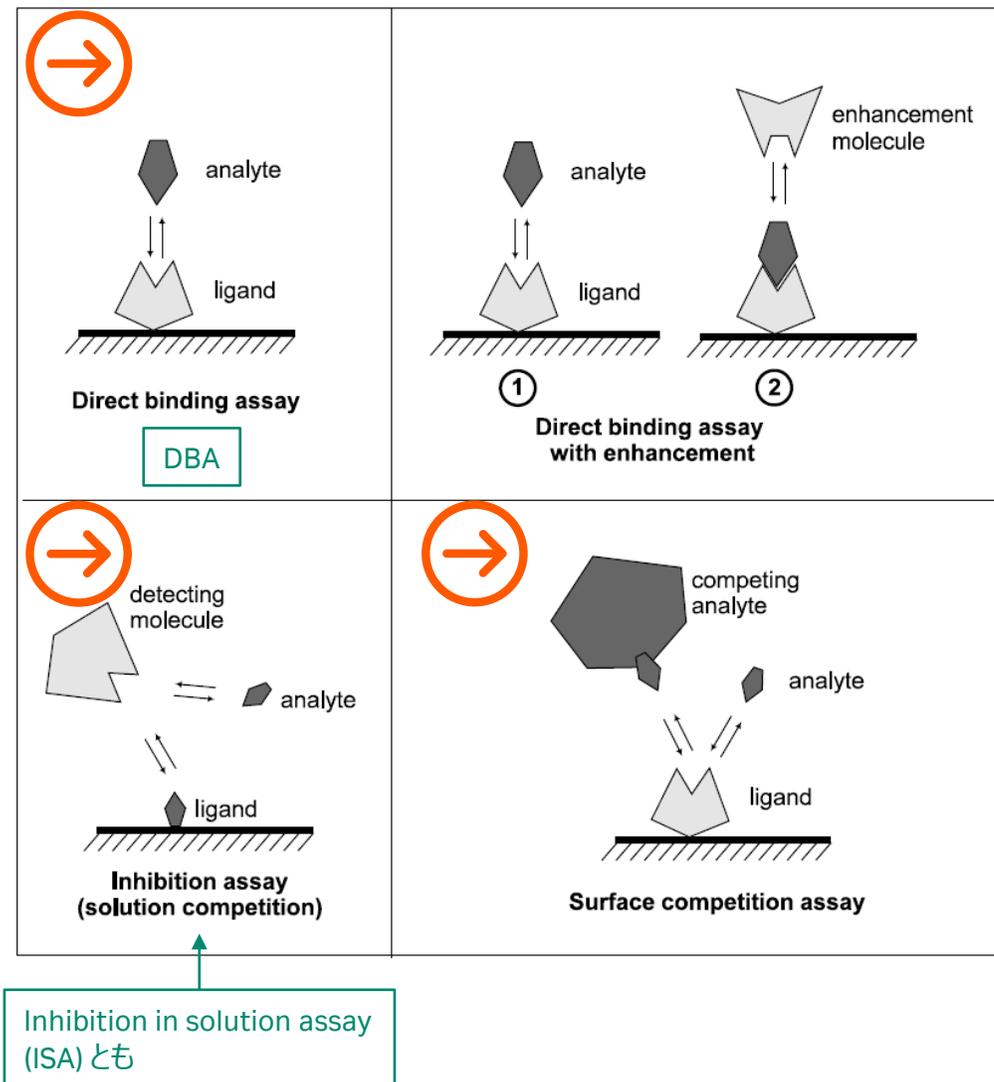
- 異なるチャンネルで異なる濃度の Calibrant を測定
- 各検量線サイクル前に normalization サイクルが必要



検量線を立てる濃度測定のアッセイフォーマット

Direct binding assay (DBA) と Inhibition in solution assay (ISA)

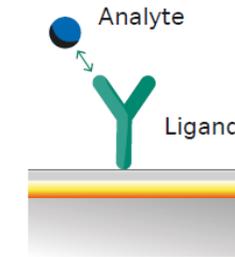
- DBA は最も直接的なアプローチ
- エンハンスメントがあろうとなかろうと、レスポンスはアナライト濃度に比例する
- Inhibition in solution assay および Surface competition assay はともに阻害法として分類される
- 低分子の濃度測定ではレスポンスの問題から阻害法が用いられやすい
- 阻害法ではレスポンスはサンプル中のアナライトの濃度と反比例する



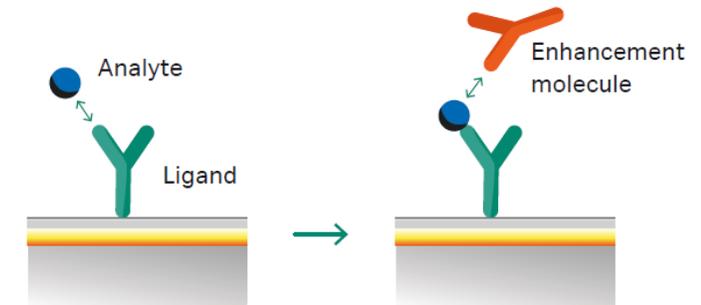
DBA について

特徴

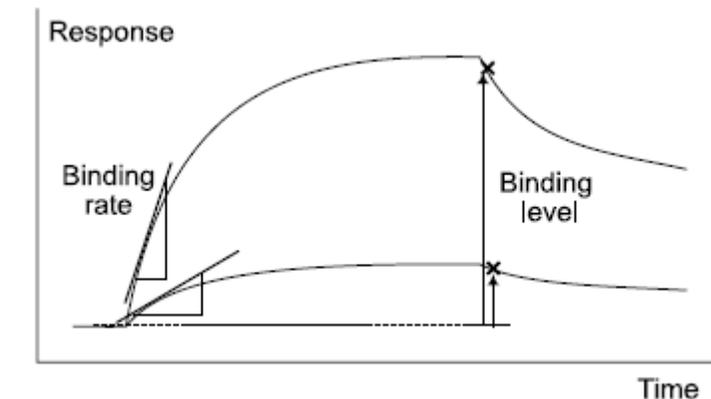
- リガンドはセンサーチップ表面に直接あるいはキャプチャーして保持
- アナライト濃度はセンサーグラムの slope か特定のタイミングでの結合レスポンスで決定される
- Slope はセンサーグラムが直線的な結合初期を用いることが多い
- 結合レスポンスはサンプルマトリックスの影響によるバルクを避けるためアナライト添加後を用いることが多い
- DBA のサンプル添加後には、アッセイの特異性や感度を向上させる目的で二次的な相互作用物質（エンハンスメント分子）を添加可能だが、感度向上したので最近では利用されない



Direct binding assays (DBA)



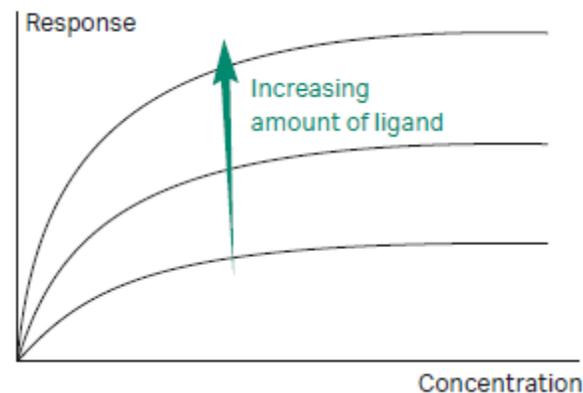
DBA with enhancement



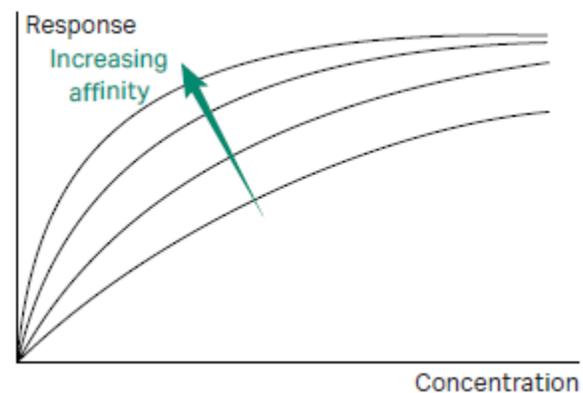
操作範囲（operating range）を調整する -DBA

DBA の場合

- アッセイの操作範囲は、測定可能な下限値と上限値で定義される
- 検量線を決定してアッセイのおおよその範囲を確立する
- 添加時間やリガンド量を調節しても行いたい操作範囲の要求に応えられない場合はリガンドやアッセイフォーマットの選択を見直す
- ベストパフォーマンスを得るには DBA の操作範囲を検量線の**直線領域**に限定する必要がある（実際には高濃度での検量線の多少の湾曲は許容される）
- DBA の操作範囲の上限調節方法としては
 - リガンドの量を増やす
 - 高い親和性を持つリガンドを使用



リガンドの量を増やす
アナライトのレスポンスは高くなるが
検量線の形状は少し変化する



親和性の強いリガンドを使用
操作範囲が低濃度側にシフトする

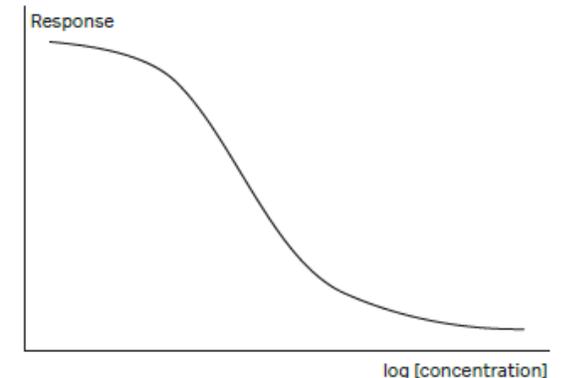
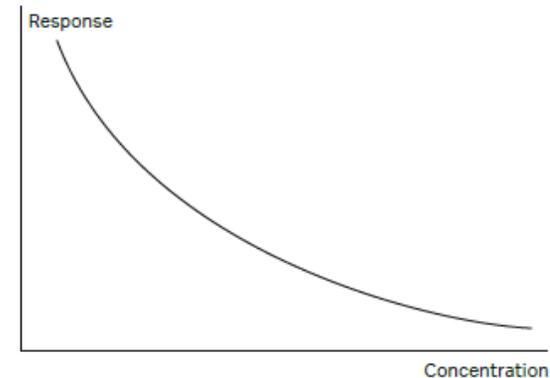
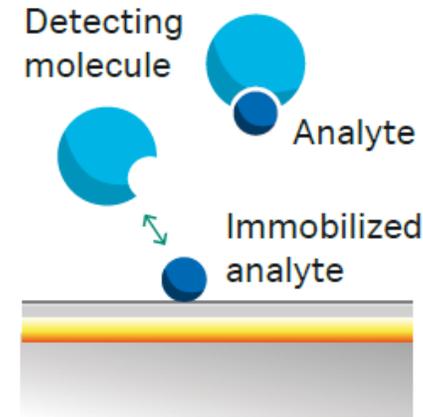
DBA 濃度測定のアッセイ系の標準的な set up

Step	Action
1.	適切な Sensor chip をドックする。
2.	1-10回の再生操作入りの startup サイクルを実行する。高濃度の Calibrant を模したアナライトを添加する。すなわち、DBAならば高濃度のアナライト、ISAならば低濃度（あるいはゼロ濃度）のアナライトを測定する。
3.	Parallel DBA assay を行う場合は2.の startup の直後に normalization cycle を実行する。Calibrant が既知濃度のアナライトを検量線の中心の濃度で全チャンネルに添加する。
4.	2-8点の濃度の Calibrant を用いた検量線を測定する。検量線はアッセイ系に応じて間隔を置いて複数回測定する。Parallel DBA assay を行っている場合は検量線の前に normalization cycle を実行する。
5.	アッセイ系に応じて Control sample を実行する。通常、アッセイの開始時と終了時の他、間隔を置いて定期的に測定する。アッセイの安定性をモニターする。
6.	必要があれば Reference sample を測定する。アッセイの正確性を検証する。
7.	濃度未知のサンプルを測定する。測定された値が検量線の範囲内に入るよう希釈する。何点か希釈したデータを用意して、少なくとも1点のデータが検量線の範囲内であればそれを用いてよい。

ISA (Inhibition in solution assays) について

特徴

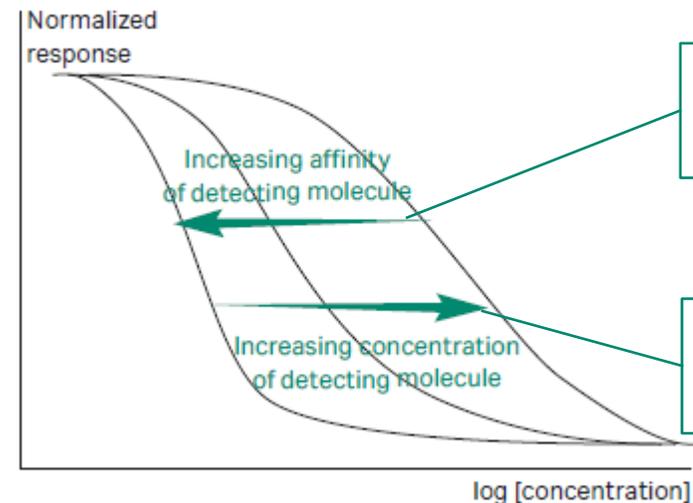
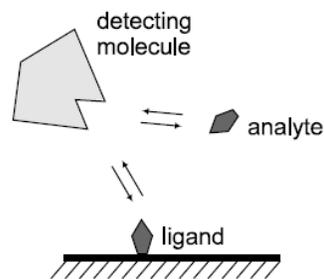
- ISAでの阻害は、Detecting molecule の表面への結合を阻害する Analyte を利用し、通常低分子の分析に利用される
- Detecting molecule は Analyte の含有量を超えた一定濃度でサンプルと混合される
- 理想的には Detecting molecule は1価であるはずだが、実際には2価の抗体も機能する
- Immobilized analyte に対する Detecting molecule の結合に由来するレスポンスは、サンプル中の Analyte の量に反比例する



操作範囲 (operating range) を調整する - 阻害法

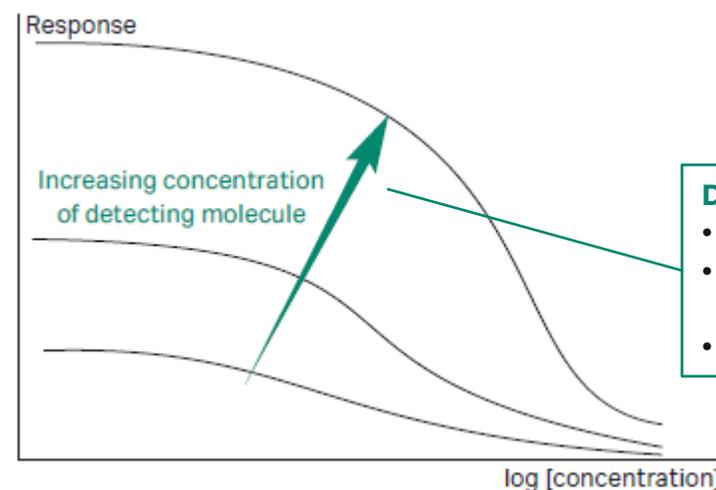
阻害法の場合

- 検量線は DBA と逆になり、低いアナライต์濃度で高いレスポンスが得られる
- 有効範囲は detecting molecule のアナライต์に対する親和性（溶液中の遊離アナライต์と表面に保持されているものの両方）によって決まる
- Detecting molecule の親和力が強いと低濃度アナライットの測定が可能となる一方で操作範囲は狭くなる
- Detecting molecule を高濃度で用意すると全体的にレスポンスは高くなる一方で高濃度側の検量線が圧縮される



Detecting molecule の親和力
強いと操作範囲が低濃度にシフトし
範囲も狭くなる

Detecting molecule の濃度
高濃度にすると操作範囲が高濃度
側にシフトする



Detecting molecule の濃度

- これはノーマライズしていないデータ
- 高濃度にすると操作範囲が高濃度側にシフトする
- 低濃度側の操作範囲も拡張

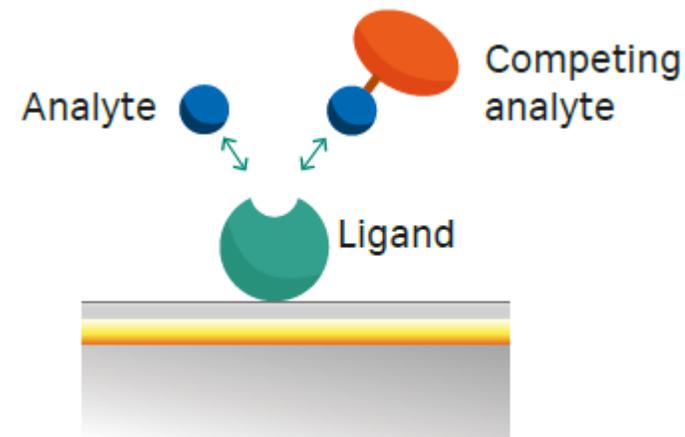
阻害法濃度測定のアッセイ系の標準的な set up

Step	Action
1.	適切な Sensor chip にアナライトあるいはアナログを固定化する。
2.	アナライトとプレミックスせずに detecting molecule を適当な範囲で添加する。短い添加時間で典型的には100-2000 RU 程度の適切なレスポンスを与える濃度を決定する。
3.	2.で決定した濃度の detecting molecule と既知濃度のアナライトをプレミックスし、アッセイの必要な操作範囲をカバーした一連のサンプルを添加する。
4.	もし最高濃度のアナライトが detecting molecule を十分に阻害できない場合は（理想的にはほぼベースラインと同じレスポンスになるべき） detecting molecule の濃度を下げる。それによりアッセイ全体のレスポンスが小さくなる場合は添加時間を長く取ることで補う。また、常に完全な阻害がかけられるとは限らないこともあり得る。
5.	レスポンス対アナライト濃度のプロットを描き、操作範囲の高濃度側と低濃度側において十分な分解能が得られているか確認する。
6.	もし detecting molecule の濃度や添加時間を変更しても必要なアッセイパフォーマンスが得られない場合は、アナライトに対する親和性を考慮した detecting molecule の選択を再検討する。

Surface competition assays について

特徴

- Analyte の高分子量類似体（Competing analyte、通常はキャリアタンパク質に結合した Analyte）が測定されるサンプルに一定量添加される
- Analyte は、Ligand への結合について Competing analyte と競合する
- レスポンスは Analyte と Competing analyte の合計となる
- Analyte が Competing analyte と比べて分子量が小さい場合、レスポンスは Competing analyte に支配的となる
- Competing analyte が Analyte によって追い出されるため、レスポンスはサンプル中の Analyte の量に反比例する
- Competing analyte に関しては、通常、キャリアタンパク質1分子当たり Analyte 1分子となるよう結合レベルは低く抑える



キャリアタンパク質

Transferrin や Haptoglobin などの安価で容易に入手できるタンパク質が用いられることが多い。Serum albumin は多くの低分子に結合するため用いられない。

検量線を用いた 濃度測定の解析

解析について一般的な考察

- Evaluation software であらかじめ定義された関数や評価方法を用いて行われる
- 全て Calibrant、control samples、samples の結果を表にして作成される
- DBA でも ISA でも検量線からのサンプルのレスポンスに対応する濃度を読み取るだけ

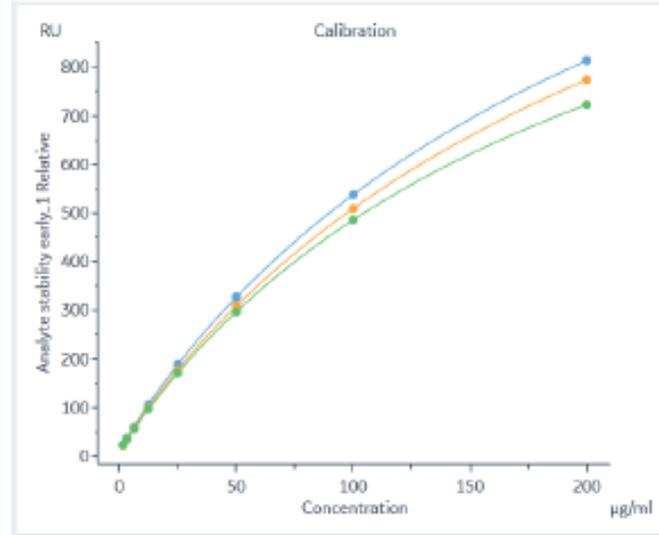
解析に手を加える可能性について

- 特定のセンサーグラムが解析に用いられるベースラインやレポートポイントのいずれかに影響を与える場合、そのサイクルを除外する
- 解析するためのレポートポイントが複数のサイクルで適切でない場合、解析用のレポートポイントを新たに設定する
- ベースラインプロットを確認し、不十分な再生、リガンドのダメージなどないか確認し、外れ値を除外する
- Parallel assays を行っている場合は channel normalization のサイクルを検証する

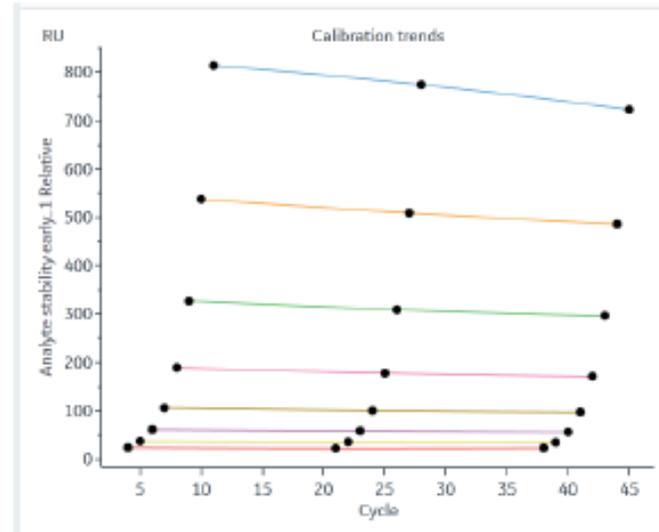
Calibration trends について

検量線が低下するときなどに有効

- 検量線を複数回取得している場合は 直前の検量線を使用するのか、検量線の平均を使用するのか選択可能
- Calibration trends とは、測定された検量線ポイントに傾向線をフィッティングすることで、繰り返しの検量線の傾向を分析することで、control samples や未知の samples は、測定された曲線間の各サイクルを補完した仮想の検量線を用いて評価される
- 表面活性の低下などにより、アッセイの過程で検量線に明らかな変化がみられる場合に使用する



1つのアッセイ中に測定された
3回の検量線データ



それぞれの検量線ポイントの傾向



1 ページ戻る



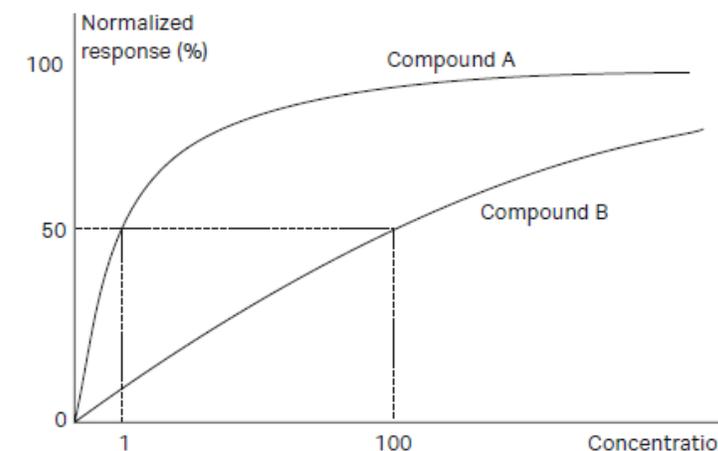
分岐前に戻る



ホームへ戻る

Biacore での分析に固有の性能基準 (1)

- **Specificity (特異性)** とは、共存が予想される不純物、分解物、マトリックス成分などの存在下で、アナライトを正確に測定できる能力を指す
- 活性アナライトを測定するよう設計された Biacore では、不活性な分析対象物も干渉の可能性はある
- **Selectivity (選択性)** とはある分析法によって混合物またはマトリックス中の特定のアナライトを、類似の挙動を示す他の成分に妨げられることなく測定できる程度を指す
- Cross-reactivity (交差反応性) とは、特異性と選択性の定量的な指標であり、Biacore を用いたアッセイの場合は 50% 結合飽和をもたらす (B_{50}) 異なるアナライトの濃度の比で表される
- B_{50} の値に到達するためにアナライトの 100 倍の濃度を必要とする化合物は 1% の交差反応性を示すと言える



- B_{50} の値は Compound A なら 1、Compound B なら 100
- Compound B は Compound A に対し 1% の交差反応性を示す

※ ICH recommendations Q2(R1) Validation of analytical procedures: text and methodology(2006) に基づいた基準



1 ページ戻る



分岐前に戻る



ホームへ戻る

Biacore での分析に固有の性能基準 (2)

- **Accuracy (真度)** とは、測定された濃度が規格値とどの程度一致しているかを指す
- 独立した reference assay の結果または reference sample の見積値 (quoted values) と比較して、reference sample で行われた測定から決定される
- 重要な点としては reference sample の見積濃度 (quoted concentration) を決定するための方法である
- Biacore は結合できる検体のみを測定するため、例えば吸光度 A_{280} で測定したタンパク質含有量の測定値とは異なる場合がある
- **Recovery (回収率)** とは、accuracy の定量化に関連して用いられる用語であり、既知の量をスパイクしたサンプル中のアナライトの測定値と期待値との相関関係を意味する

※ ICH recommendations Q2(R1) Validation of analytical procedures: text and methodology(2006) に基づいた基準

Biacore での分析に固有の性能基準 (3)

- **Precision (精度)** とは、同一サンプルを複数回測定して得られた結果の一致度 (バラツキの程度) を指し、3つのレベルで決定される
- **Repeatability (併行精度)**
 - 短時間に同一条件下で測定する場合の精度で Inter-assay precision ともいう
 - 通常同じ実験で繰り返し測定を行う
- **Intermediate precision (室内再現精度)**
 - 同一施設内において、試験日、試験実施者、器具、機器などを変えて測定する場合の精度
- **Reproducibility (室間再現精度)**
 - 異なった施設間で測定する場合の精度
 - 通常、分析法を標準化する際の共同研究において評価が必要とされる

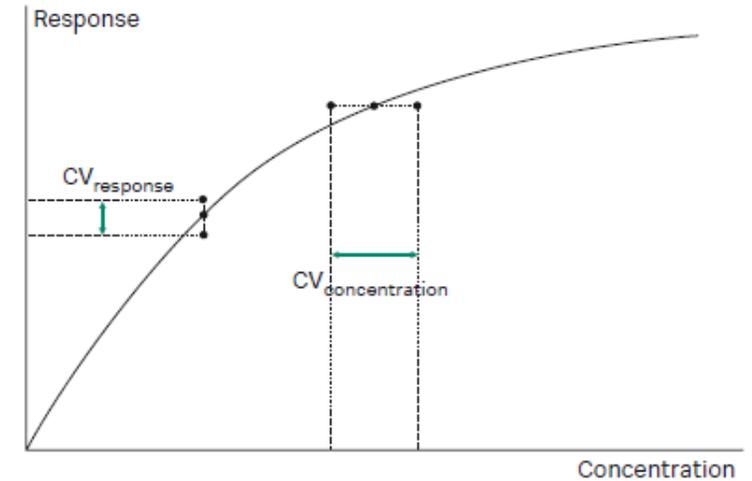
※ ICH recommendations Q2(R1) Validation of analytical procedures: text and methodology(2006) に基づいた基準

Biacore での分析に固有の性能基準 (4)

- Assay precision は通常一連の測定における分散、標準偏差 (SD)、または変動係数 (CV) で表される
- 一連の繰り返し測定では、SD は CV によって以下の式で与えられる

$$CV(\%) = \frac{SD}{\text{mean}} \times 100$$

- CV 値およびその他の変動の尺度は濃度またはレスポンスのいずれかに関連している可能性がある
- CV_{response} は特定の濃度に対するレスポンスの一貫性を示す
- $CV_{\text{concentration}}$ は特定のレスポンスとアナライトの濃度を関連付ける信頼性を示す
- CV の値は検量線が直線でない限り、アッセイのダイナミックレンジに応じて変化する



広い範囲で CV の値が小さくなるため一般的には CV_{response} の方がアッセイパフォーマンスの基準として優れていると考えられる

※ ICH recommendations Q2(R1) Validation of analytical procedures: text and methodology(2006) に基づいた基準

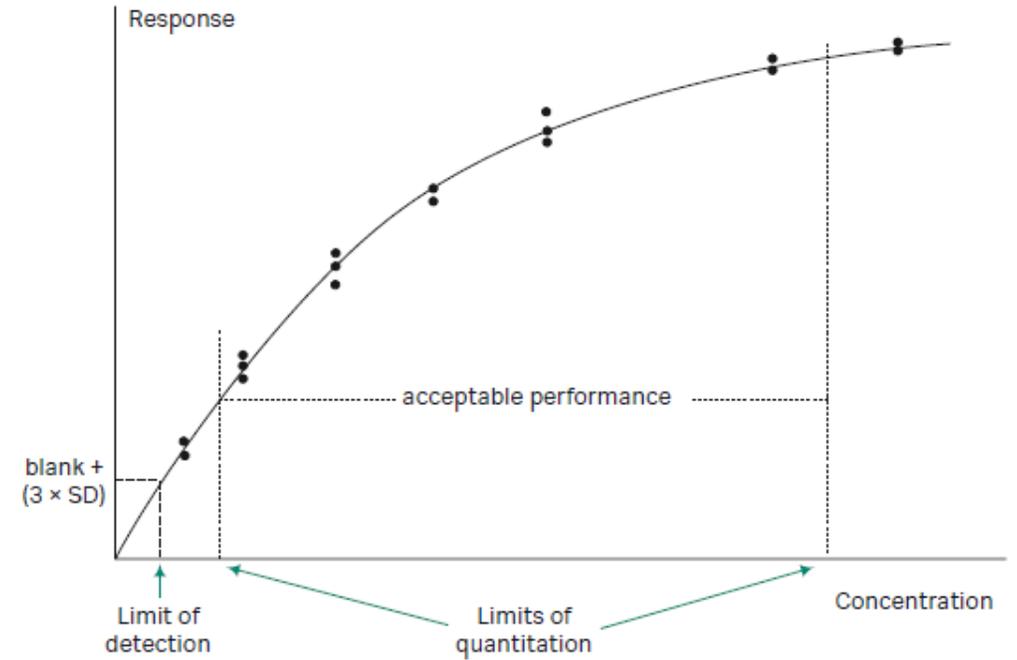
Biacore での分析に固有の性能基準 (5)

- アッセイの **Linearity (直線性)** とは定義された数学的な関数によってアナライトの濃度に関連するレスポンスを得ることができるアッセイの能力を指す
- レスポンスとアナライトの濃度の関係が適切な数学的関数で定義されていれば良く、理想的には線形であるべきであるが多くの相互作用ベースのアッセイでは線形関係を得られない
- Biacore では線形関数または 4-parameter 関数を使用する
- 定量的には直線性はデータポイントを直線にフィットさせるための回帰係数で表される

※ ICH recommendations Q2(R1) Validation of analytical procedures: text and methodology(2006) に基づいた基準

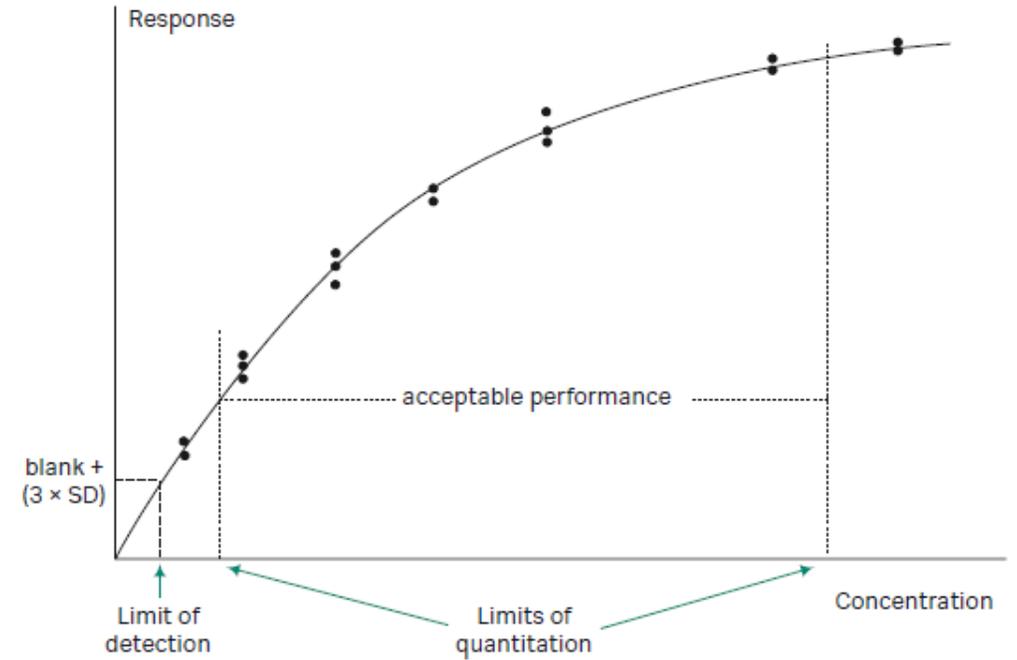
Biacore での分析に固有の性能基準 (6)

- **Limit of detection, LOD (検出限界)** とは許容できる性能で検出できるが必ずしも定量できるとは限らない最低のアナライต์濃度のことを指す
- 主に測定自体の S/N 比の関数であり、ブランクサンプルのレスポンスの統計的変動との関連で設定される
- 一般的にはブランク値の平均値 + 3 × SD
- SD はブランクサンプルを用いた時の繰り返し測定の標準偏差



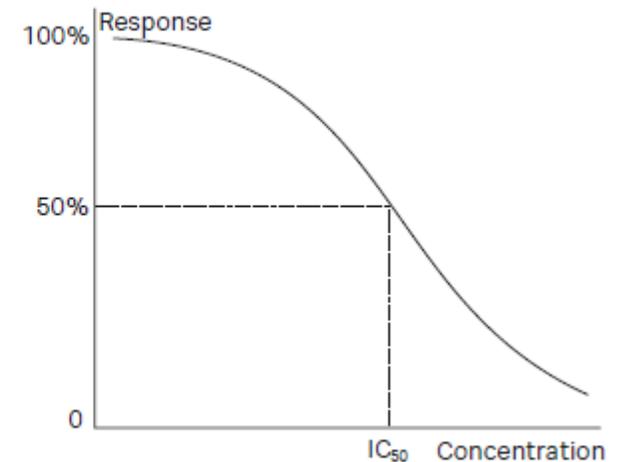
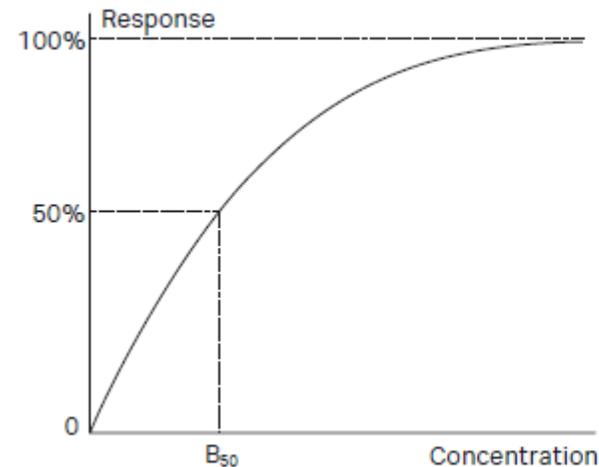
Biacore での分析に固有の性能基準 (7)

- **Upper および Lower limit of quantitation, ULOQ および LLOQ (定量上限および定量下限)** は許容できる直線性、精度および真度で測定できる最高および最低のアナライツ濃度を指す
- 希釈されたサンプルでの測定を可能にするアッセイ手順では明確な ULOQ がない場合もあるがアッセイ自体の限界値は希釈の範囲を定義するのに関連している
- LOQ を厳密に決定するためには一定期間異なる作業による広範な測定が必要
- ピペット、天秤、フラスコなどの他の機器の変動の可能性や試薬のバッチ変動も考慮に入れる必要がある
- 要求がそれほど厳しくない場合の LLOQ の初期推定値は、ブランク値の平均値 + $10 \times SD$



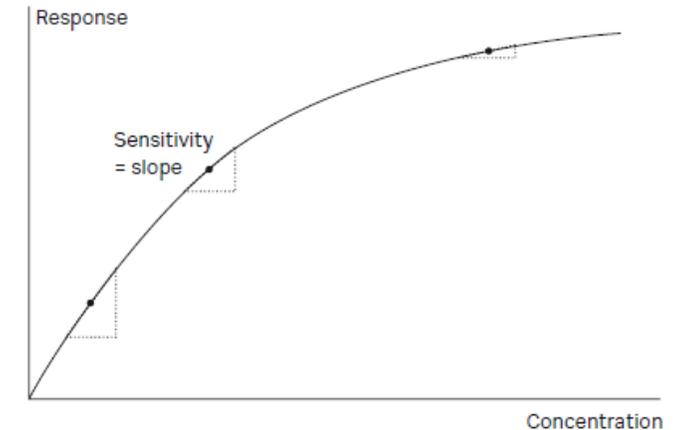
Biacore での分析に固有の性能基準 (8)

- アッセイの **Range (範囲)** とは ULOQ と LLOQ を含むその間のことを指す
- すなわち精度、真度、直線性が許容される範囲のことを指す
- アッセイのパラメータとして最大レスポンスの半分を与えるアナライト濃度がよく挙げられる (DBA では B_{50} 、ISA では IC_{50})
- この値は厳密には性能基準ではないが、アッセイが扱うことのできるアナライト濃度のオーダーを示している



Biacore での分析に固有の性能基準 (9)

- アッセイの **Robustness (頑健性)** とは分析法のパラメータが変化しても影響を受けない能力を指す
- Robustness は intermediate precision と関連しており、intermediate precision がアッセイのタイミングや作業者間の意図しない変動の影響を指すのに対し、選択したアッセイパラメータの意図的な変動によって決定される
- 全ての必須パラメータに対して頑健な分析法は、高レベルの intermediate precision を有する
- アッセイの **Sensitivity (感度)** はアッセイバリデーションの推奨性能基準には含まれていないが、この用語自体が曖昧さを含むためここで定義している
- 正式には Sensitivity は検量線の傾きと定義され、Biacore では濃度単位当たりのレスポンスで表される
- 標準曲線が直線的ではないアッセイでは、Sensitivity はアナライトの濃度によって変化する
- LOD や LLOQ や分解能として用いられることもあるが混乱のため正式な意味を推奨





Thank you



現段階ではこの資料に反映されておられません
(お手数ですがジャンプ元には戻れませんのでサムネイルから戻ってください)

【お問合せ先】

グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社

バイオダイレクトライン 内線 # 2をご選択ください

TEL: 03-5331-9336 / FAX: 03-5331-9370

e-mail: Tech-JP@cytiva.com

www.cytivalifesciences.co.jp

Appendix



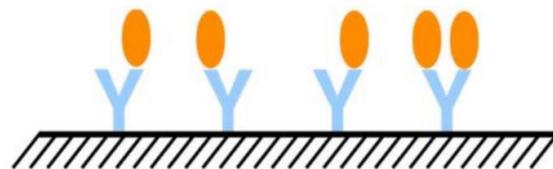
分岐前に戻る



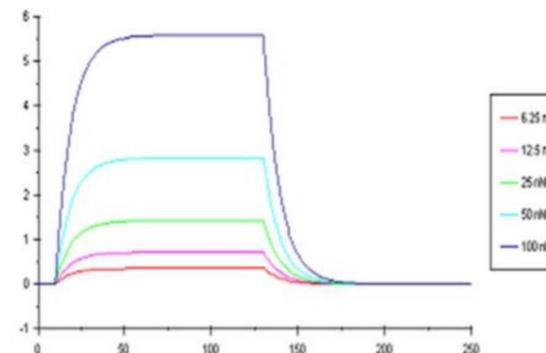
ホームへ戻る

二価の結合サイトを持つ分子の測定方法 AffinityとAvidityの違い

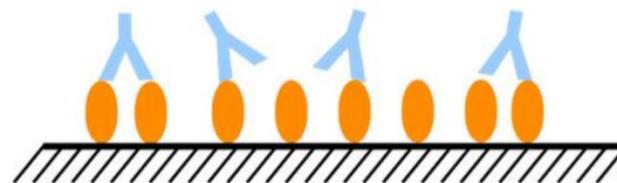
Affinity



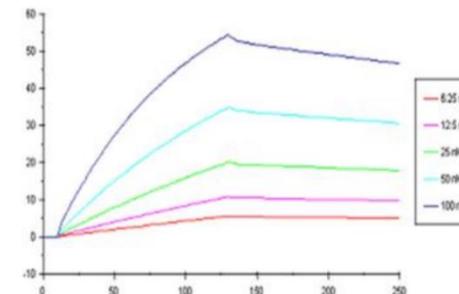
二価分子を固定化



Avidity



二価分子を流す



K_D 値

片手、両手についているものが混在しているため、見かけ上解離速度が遅くなります。

K_D 値は 1:1 binding の親和性を定義 ($K_D = [A][B]/[AB]$)。⇒なるべく1:1のセットアップ。

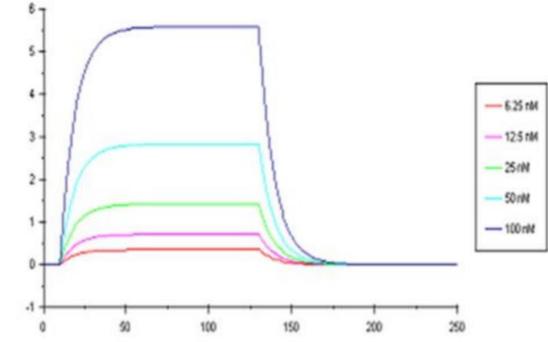
二価の結合サイトを持つ分子の測定方法

Bivalent Analyte のリスク

1:1 binding

$$dR/dt = f(k_a, k_d, R_{max}, \text{conc}, \dots)$$

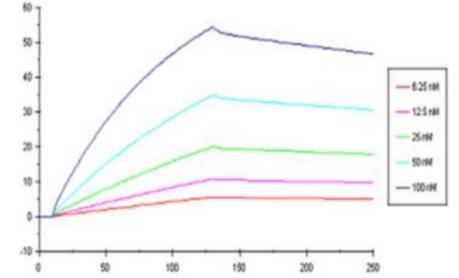
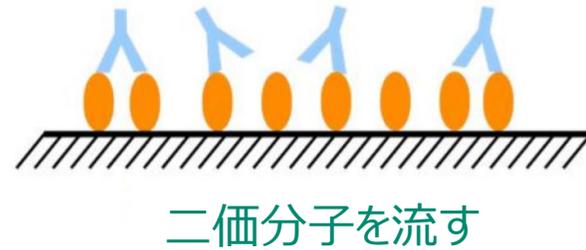
→ KD, k_a, k_d の信頼性が高い。



Bivalent Analyte

$$dR/dt = f(k_{a1}, k_{d1}, k_{a2}, k_{d2}, R_{max}, \text{conc}, \dots)$$

→ KD, k_{a1}, k_{d1} の信頼性が低い。

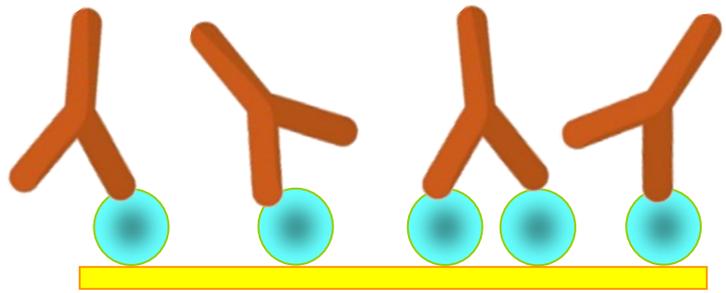


二価の結合サイトを持つ分子の測定方法

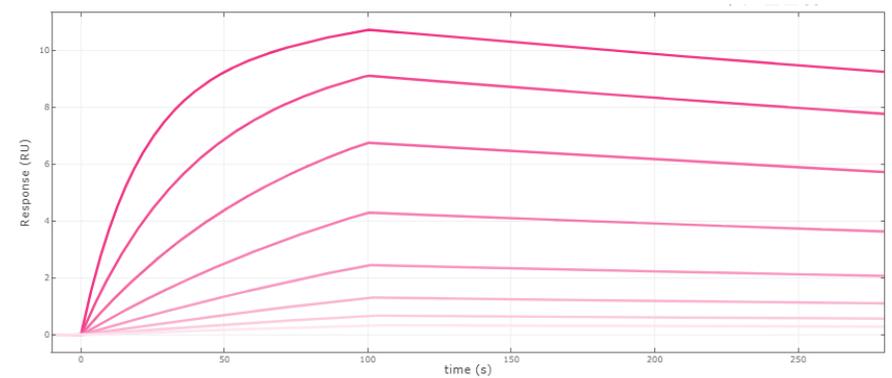
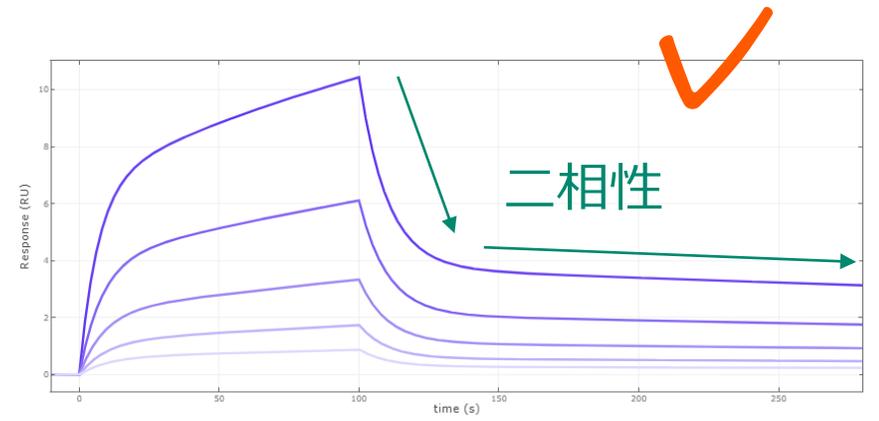
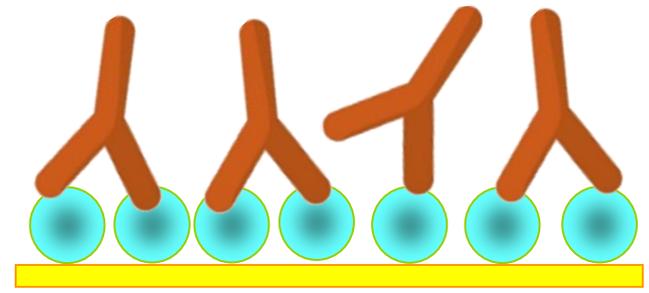
Avidity環境で測定する注意点

固定化量によって変化するAvidity環境

固定化量
少



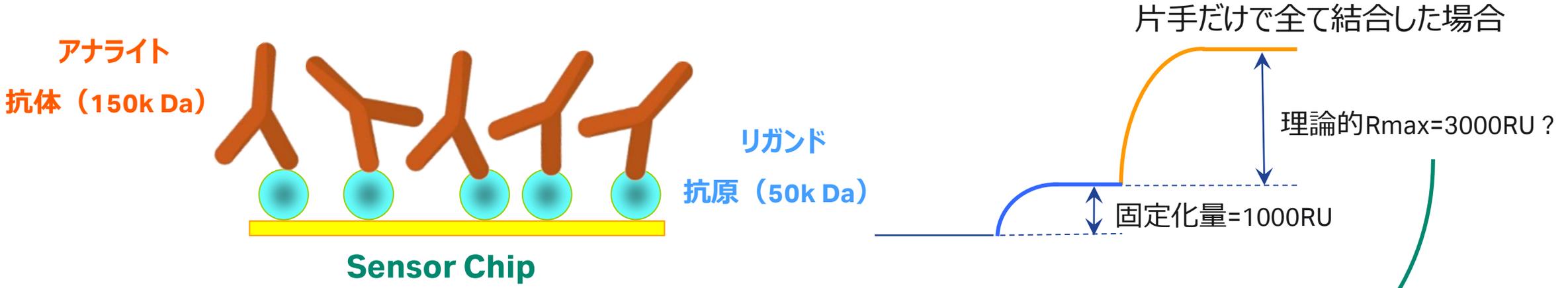
固定化量
多



Bivalent Analyteでは、Avidity環境の相互作用データから、片手で結合したと考えられる k_{a1} 、 k_{d1} を算出するモデル式
 → k_{a1} 、 k_{d1} が支配的な測定環境（固定化量が低い条件）で測定

二価の結合サイトを持つ分子の測定方法

Avidity環境下における理論的Rmax算出方法

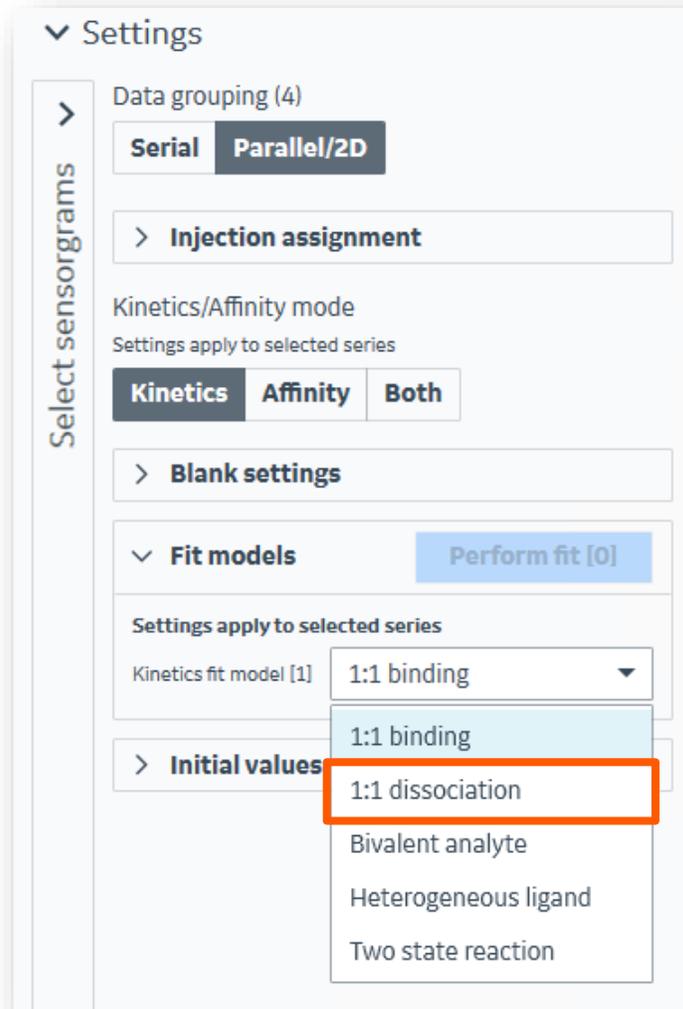


実際は、片手、両手をつく分子が混在
 実測Rmax = 2400RUの場合 ⇒ リガンドの活性率 (Activity) は80% ??

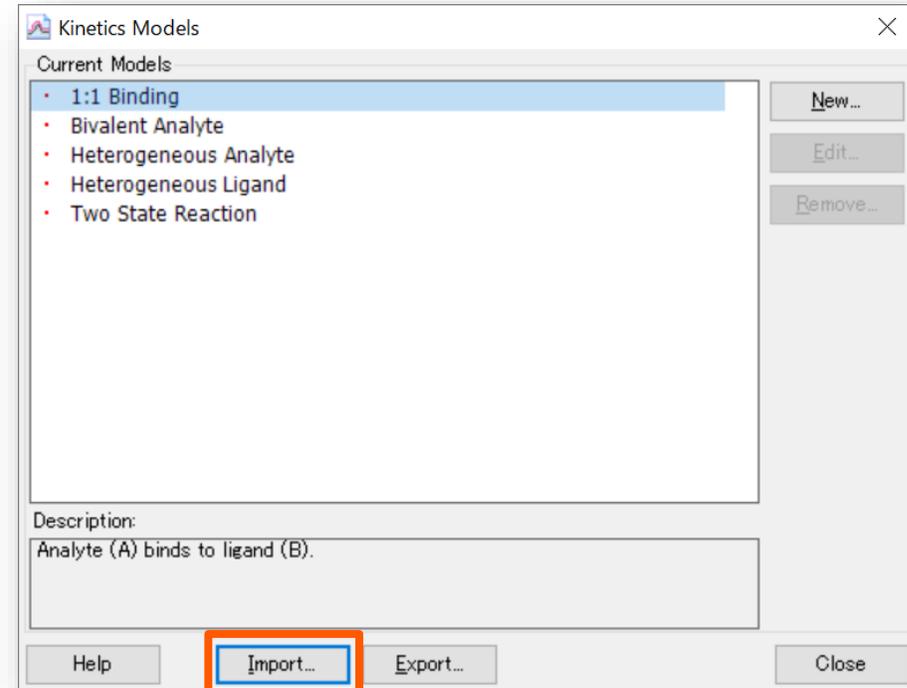
リガンドの活性率 (Activity%) $\stackrel{?}{=} \frac{\text{実測のRmax}}{\text{理論的Rmax}} \times 100$

【補足】 1:1 dissociation model

Biacore Insight Evaluation Software



Biacore T200/S200/X100 Evaluation Software



T200 1 to 1 diss

- メインメニューの Tools > Models > Kinetics... よりインポート
- Multi cycle 法のみ対応
- 結合相のデータはフィッティングしないので、Removeして解析すること



分岐前に戻る



ホームへ戻る

濃度測定における Tips(1)

- リガンドとアナライトの親和力にデータが左右されないよう（≒MTL の影響を強くするため）、固定化量は多くする（抗体なら7000-12000RU程度）
- 同様に MTL の影響を強くするためサンプル添加は低流速を推奨（10 uL/min）
- リガンドをキャプチャー法で保持も可能だがキャプチャー量は揃える
- 解析で Reference cell の差し引きは行わないため設定は不要だが、センサーグラムをきれいに打ち出したいなど別の目的で利用したい場合は設定してもよい
- **Calibrant** は 2-8 点の濃度で用意する
- 全てのサンプル、**calibrant**、**control sample** は可能な限り同じサンプルマトリックスで調製し、不可能な場合は assay development の段階でマトリックスの違いが測定に支障をきたさないことを確認する
- アッセイの精度を確認するために **reference sample** を使用する場合は、複数の希釈倍率を使用して濃度範囲内の正確性を確立する
- 未知のサンプルを複数の希釈倍率で測定し、測定濃度範囲にあることを確認する

MTL

マストランスポートリミテーション。

キャプチャー法の時の固定化量の特例

Capturing molecule はセンサー表面でのクラウディング効果や立体障害を回避するために固定化量を抑えることがある。リガンド量は多くてよい。

Calibrant

濃度が既知の溶液から得られる応答を測定して検量線を作成するために使用される物質。

Control sample

アッセイの安定性をモニターするために、アッセイ中に一定の間隔で繰り返し測定される既知の分析物濃度のサンプルのこと。**Calibrant** 溶液は **Control sample** として用いられることが多いが、必ずしもそうではない。

Reference sample

濃度測定の精度を確立するために使用される、濃度が既知で検証されたサンプル（通常は外部のサプライヤーから提供される公式の標準試料）。**Reference sample** は、アッセイを外部標準に対して検証する必要がある場合にのみ必要。アッセイの正確性の検証になる。



1 ページ戻る



分岐前に戻る



ホームへ戻る

濃度測定における Tips(2)

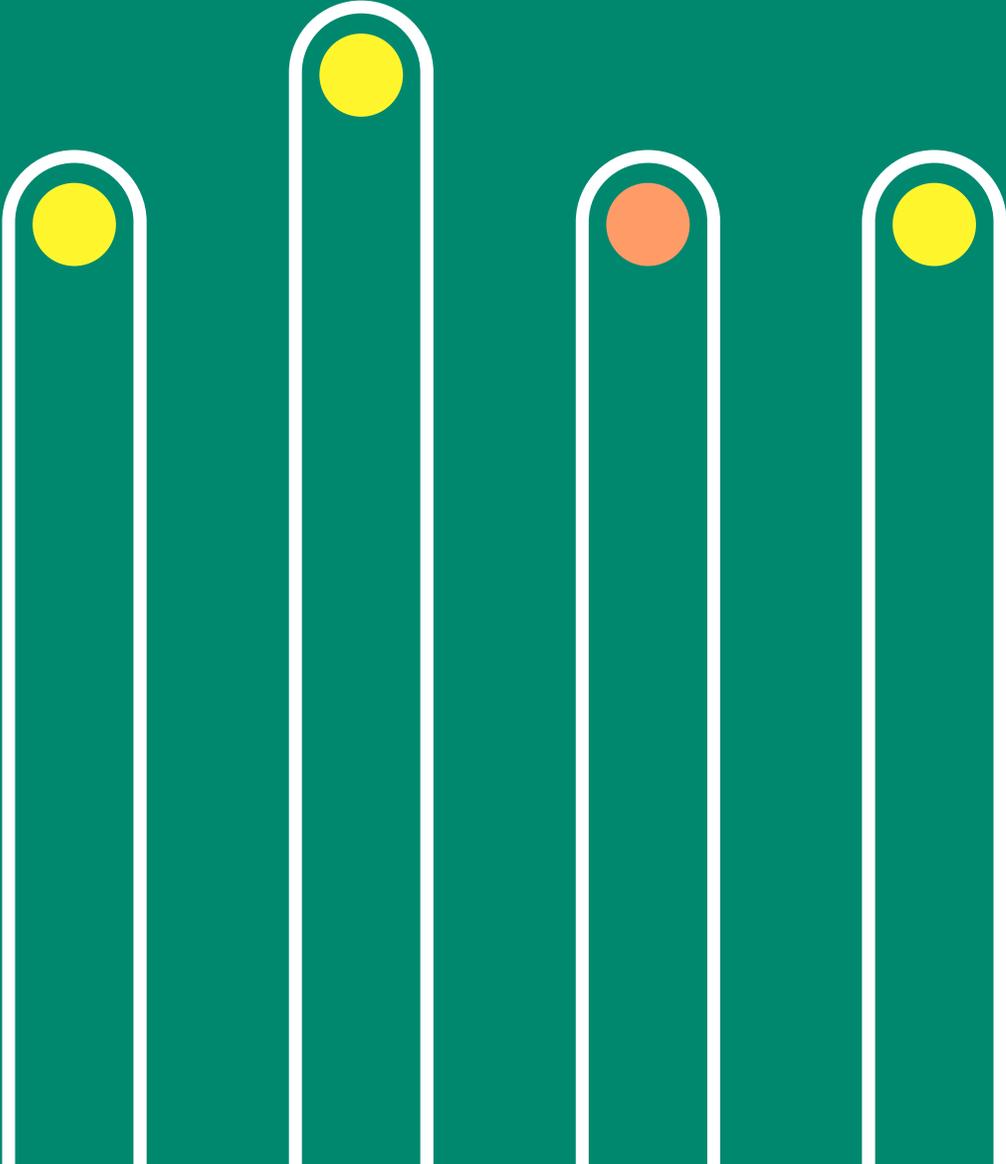
- サンプルとして色のついたもの、濁ったもの、不透明なものでも測定可能
- 粒子や凝集体も直径が 20um 以下で沈殿しないものであれば測定可能
- サンプル、Control sample、Calibrant は全てランニング緩衝液で希釈するが、サンプルに体液や細胞培養液などの複雑なマトリックスが含まれる場合は同じマトリックスで Control sample、calibrant も調製する
- 複雑なマトリックス中のサンプルに対するアッセイの有効性の確立のためには、以下のよう
な検証を行う：
 - マトリックス成分のセンサー表面への非特異的な結合検証
 - 分析物を含まないマトリックスでアッセイを実施してテスト
 - 既知の分析物濃度でスパイクしたマトリックスサンプルからの分析物の回収率検証
 - マトリックス濃度を変化させた場合のアッセイの直線性の検証

濃度測定における Tips(3)

- 検量線はアッセイの開始時に作成し、検量線自体のドリフトを調整するために間隔を置いて繰り返し作成するが、その頻度はアッセイ性能の安定性と測定するサンプル数に依存する
- Calibrant は濃度の高い順、低い順、またはランダムな順序で実行することができる
- Calibrant の濃度範囲はアッセイ開発時に決定され、アッセイの要件に応じて予想されるサンプル濃度の範囲をカバーする必要がある
- 一般的に検量線は外挿することができない
- 検量線の範囲外にあるサンプルは最高および最低の検量線濃度を超えた、とのみ報告する



Thank you



【お問合せ先】

グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社

バイオダイレクトライン 内線 # 2をご選択ください

TEL: 03-5331-9336 / FAX: 03-5331-9370

e-mail: Tech-JP@cytiva.com

www.cytivalifesciences.co.jp

本資料の使用については、お客様施設内での使用に限ります。他社への転送、譲渡等は禁じます。本資料の著作権その他の知的財産権は、グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社に帰属します。無断転載、無断コピー、改ざん、二次利用を禁じます。

掲載されている価格は2021年4月現在の希望小売価格です（消費税は含まれておりません）。希望小売価格は単なる参考価格であり、弊社販売代理店が自主的に設定する販売価格を何ら拘束するものではありません。掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。お問合せに際してお客さまよりいただいた情報は、お客さまへの回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただく場合があります。

弊社は、資料の掲載内容の正確性を記すべく、情報を随時更新しておりますが全ての情報が最新であることを保証するものではありません。

したがって、当資料上の掲載内容に誤りがあった場合でも弊社は責任を負いかねます。



Biacoreのメールマガジン“月刊Biacoreコンシェルジュ”のご案内

Biacore コンシェルジュ

Biacoreをとことん使いこなす！

ための月刊メルマガ



- Biacoreの製品・ソフトウェアのアップデート情報
- 機器を使いこなしていただくためのTips、裏技
- ウェビナー、イベント等のご案内
- 頻出のお問合せとその回答
- Biacore関連の論文紹介

是非皆様お誘いあわせの上ご登録ください！

ご登録（無料）はこちらで検索か右のQRコードより

Biacoreコンシェルジュ



3月号サンプル

3月 & 4月 Biacoreウェビナー

Biacoreで粒子を測定する

3月はウイルスなどの粒子を測定する際の、レスポンスの解析方法についてご紹介します。

Date: 3/18 Thu

Time: 15:00~

Title: Biacoreで粒子を測定する

講師: Cytiva アプリケーションスペシャリスト 鯉沼 正美

[Learn More](#)

やっと分かった！

Biacore メンテナンスの方法と意味、トラブルシューティングまで

4月は安心して使っていただくためのBiacoreのメンテナンス方法をご紹介します。

Date: 4/22 Thu

Time: 15:00~

Title: やっと分かった！ Biacore メンテナンスの方法と意味、トラブルシューティングまで

講師: Cytiva アプリケーションスペシャリスト 鯉沼 正美

[Learn More](#)

Biacore™ Insight Evaluation Software



Biacore共通解析ソフトウェアご存じですか？

Biacore 8K/8K+, T200(v2以降)、S200共通で使用、様々なお悩みを解決します。

- センサーグラムを含めたレポート作成が手間。
- 複数のPCIにデータが散在していて見つけるのが大変。
- 機種ごとに異なるソフトウェアを覚えるのが面倒。

論文紹介でとりあげたエピソードも、効率よく実施可能。

[LEARN MORE](#)

Tips・FAQs

5濃度+0濃度、 $n=2$?

多くのBiacoreユーザーの皆様は、ka、kd測定の方法作成時にアナライト濃度条件設定の上記ルールを外れると出るアラートを見たことがあると思います。何故こんなルールがあるのでしょうか。無視しても大丈夫でしょうか？

[Learn More](#)

論文紹介

Biacore論文第一号は？

1990年Biacoreを使用した論文第一号はエピソードマッピングでした。ノンヘルド分子間相互作用測定できる強みを生かし、多段階インジェクションで複数サイトに結合する分子を、連続モニターできることは画期的でした。

[Learn More](#)

【先着2,000名】

卓上カレンダープレゼント

記入しやすい紙質、大きな記入欄、年度にあわせて使える、毎年恒例、リピーター多数の「弊社特製卓上カレンダー」の2021年度版を、今年も先着2,000名様に無料プレゼント中です。

[Learn More](#)

