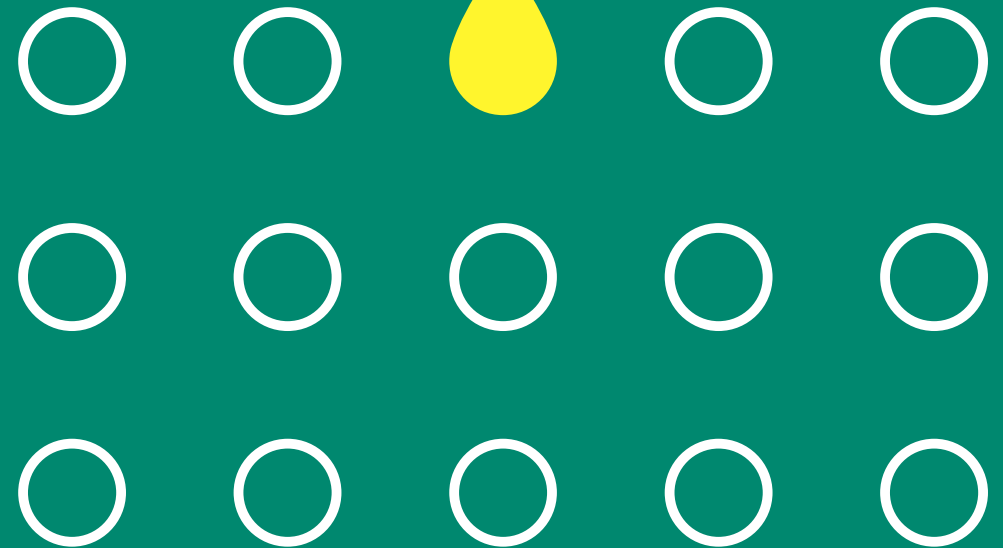


Cytiva Webinar

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。

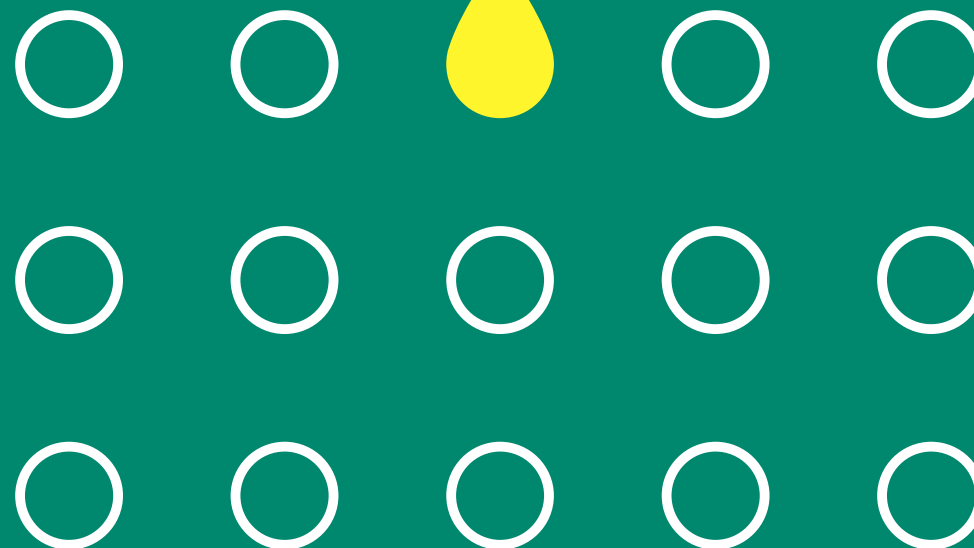


音声につきまして

- 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。





イチから始める Biacoreでの低分子 測定の戦略

Prepared for Masami Koinuma

November 12, 2020

Agenda

1. Biacoreを用いて低分子を測定することのメリット
2. Biacoreでの低分子測定における基本的な考え方
3. 測定・解析の方法
 - 3-1. Screening
 - 3-2. Characterization
 - 3-3. Competition screen
4. まとめ

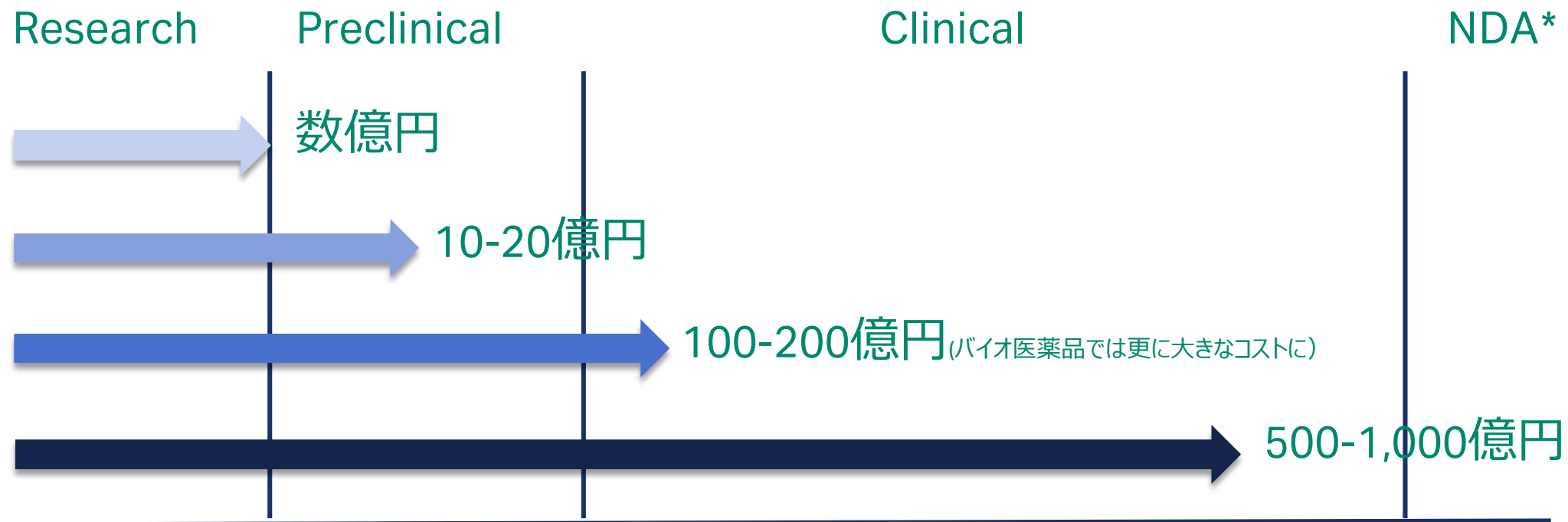
- 標的タンパク質と低分子の相互作用検討をしたい方



1

Biacore を用いて低分子を 測定することのメリット

創薬の課題 — 創薬はコストがかかる！

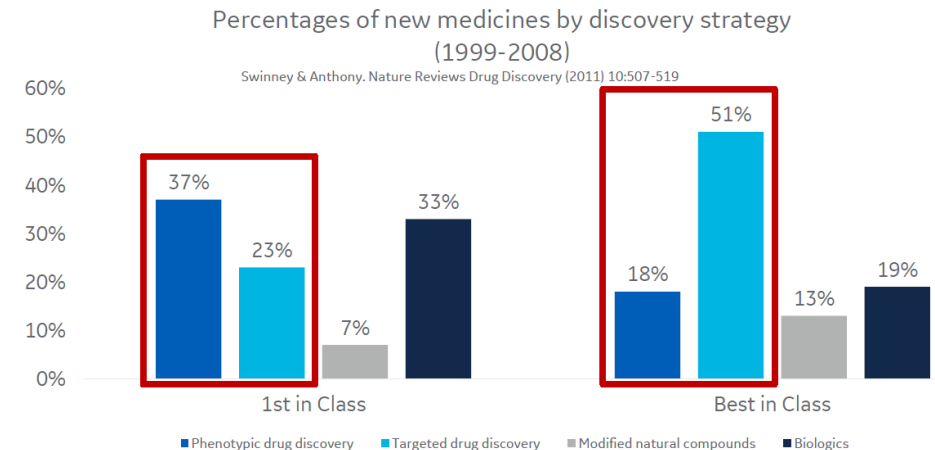
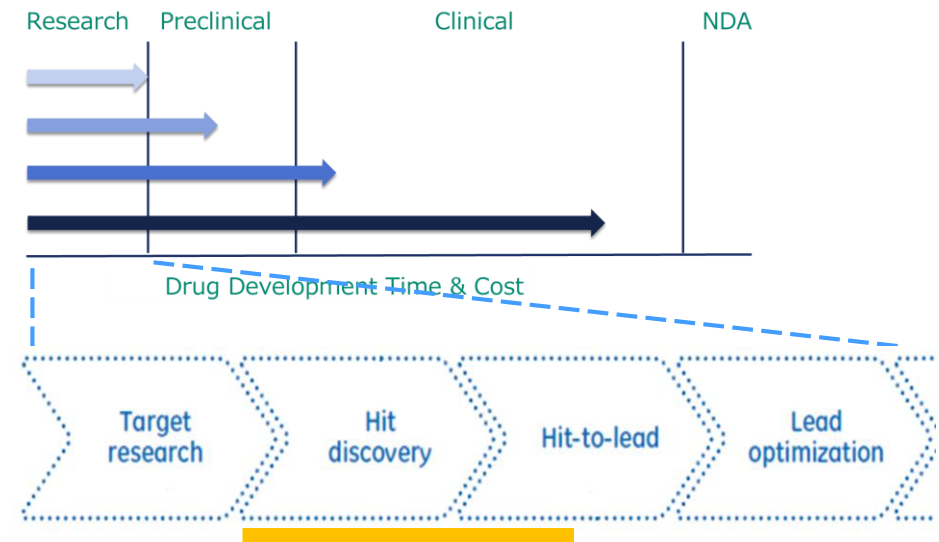


Drug Development Time & Cost

*New Drug Application

Phenotypic drug discovery と Target-based drug discovery

- Phenotypic drug discovery (PDD)
 - 潜在的あるいは革新的な情報が得られる可能性
 - 標的分子やMOAが不明で標的の同定が必要
 - 動物や細胞などで臨床的に意味のある表現型を測定
 - デザインしたコンセプトとは異なるMOAのものが選出されるリスク
- Target-based drug discovery (TDD)
 - 標的分子やMOAの知見を得られる
 - 実際のBiologicalな効果は確認が必要
 - 標的に対してライブラリをテスト
 - 目的の表現型が得られないリスク
 - 安全性の観点でドロップアウトするリスク



AstraZeneca社のHTSでの戦略的Biophysics活用例

Integrating biophysics with HTS-driven drug discovery projects

Drug Discovery Today Volume 21, Number 3 March 2016

- アストラゼネカ社では2000年前後からHTSにBiophysicsの情報を活用
- 20プロジェクトを振り返り検証してBiophysicsがもたらしたものを評価
- 早期でのMOAの理解
- HTSアッセイとそれに続くカスケードが目的に沿うか
- Pre-HTSでのMOA評価、バリデーション
- Post-HTSでのカウンターアッセイ、クラスタリング後のバリデーション

BiophysicsをHTSに活用することで後期でのドロップアウトを最小限にした結果、1.8MUSD/10 HTS projectのコストを削減できた

なぜBiacore ?

推奨と選択基準

- 細胞を利用する系と比べて DMSO濃度を高くできる
- 化合物側が低濃度で測定できる
- タンパク質側の消費量も少なく測定できる
- 標的タンパク質自体の品質バリデーションを行えること
 - ポジティブコントロールサンプルを使用したレスポンスの確認
- ラベルフリーの直接結合データによる、候補分子の確実な選別
 - 選択性、ストイキオメトリー（1:1かそれ以外か）、Affinity、Kinetics、熱力学的解析
- MOAと薬物動態/薬力学への理解を深めることを通じて、薬効と安全性を向上させるための薬物候補分子の最適化が図れる
 - 最適化の指標として Kinetics や熱力学的なデータを利用できる

2

Biacoreでの低分子測定における 基本的な考え方

測定する前におさえておくべき最も基礎的なポイント

プレートと素材

- プレートは PP製、対応する型番のもの
- プレートフォイル、セプタはCytiva製
- マジックペンの記入位置！



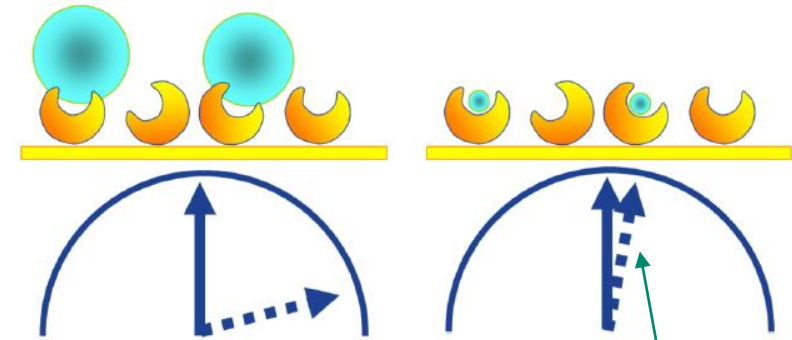
センサーチップとリファレンスセルの選択

- CM5チップなら
 - ①未処理のセル
 - ②EDC/NHS活性化後すぐにEthanolamineでブロッキングしたセル
 - (③ネガティブコントロールタンパク質を固定化したセル)
- SA/NAチップなら
 - ①未処理
 - ②PEG-Biotinなどを固定化

測定する前におさえておくべき最も基礎的なポイント

高い結合活性率を維持しつつ十分なタンパク質密度を確保

- 針が振れるよう十分な密度を確保
- ただし固定化量を多くすること以上に高い結合活性率を維持することを意識する
 - ビオチン化してのSA/NAチップなど
 - 後半のBiotin CAPture Kitにもそのまま利用可能
- ポジティブコントロールサンプルでレスポンスを確認する
- ネガティブコントロールサンプルを用意する
(0濃度のデータとは明確に異なる)



理論的Rmax=20RUあると安心 (目安)

ランニング緩衝液の設定

推奨と選択基準

- (推奨) PBS-P+ Buffer (28995084)
- PBS-P+に終濃度5%以下のDMSOを混ぜて利用
- リガンドがキナーゼのときはTrisが有効なこともある
- 毎日用事調製
- ボトルはPP製かガラス製
- ボトルは使用前に50mM NaOH→超純水でリンスも推奨

有機溶媒に対する化学耐性は？

- DMSOを推奨

	ランニング緩衝液として使用可能	10分間まで添加可能
DMSO	10%	50%
DMF	3%	50%
EtOH	10%	70%
MtOH	10%	70%

バルクレスポンスと有機溶媒（特にDMSO）

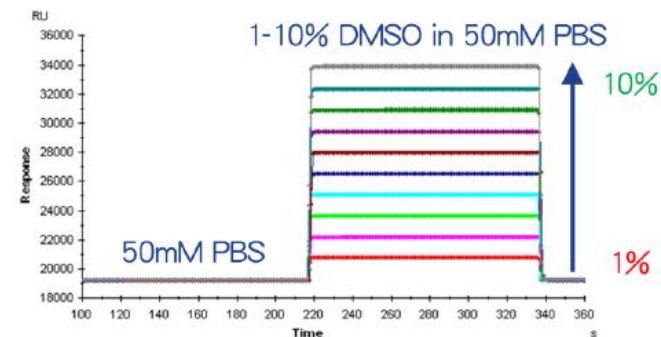
バルクレスポンス

- ランニング緩衝液と添加する溶液との間の組成差で生じるレスポンス

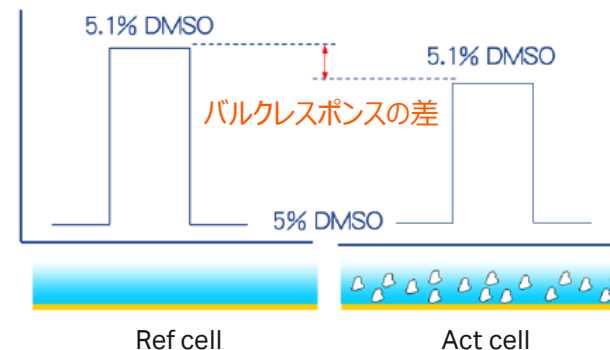


なぜDMSOは特別なのか？

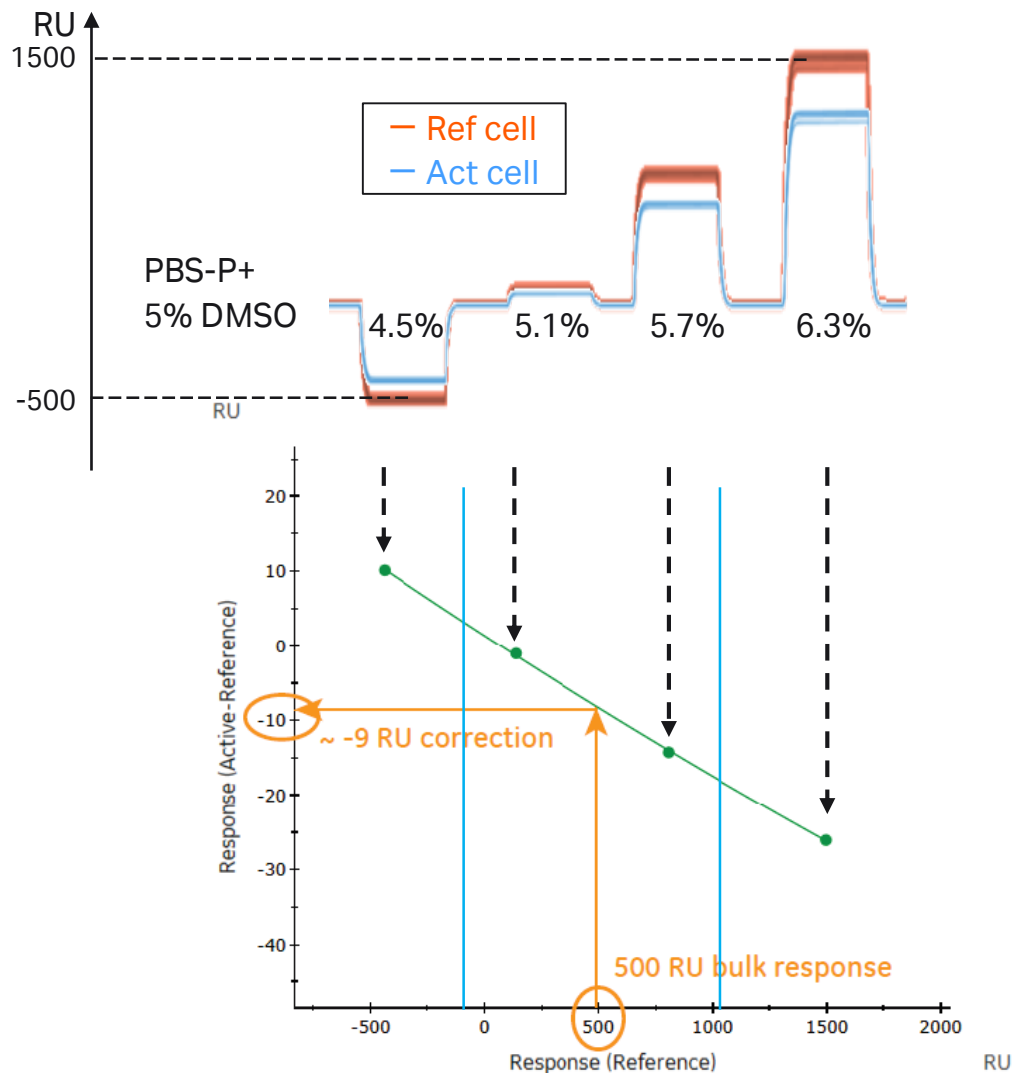
- 0.1%の差で約120RUのバルクレスポンス



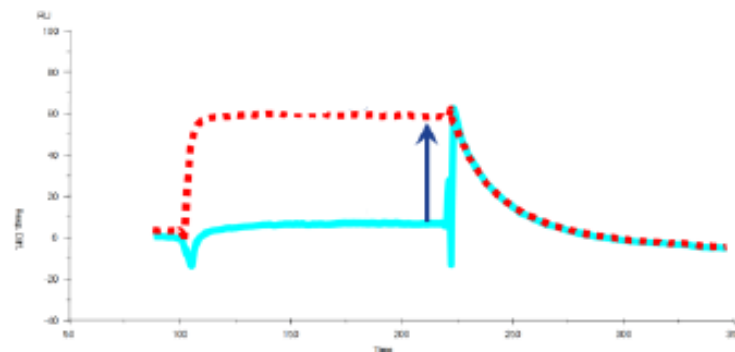
- Ref cellとAct cellのバルクレスポンスは異なる



溶媒補正 (Solvent correction)



- ランニング緩衝液のDMSO濃度に対し、±1%程度の濃度のDMSO溶液を4-8点添加する
- 真の結合レスポンス = (Act - Ref) - 補正值
- DMSOを用いるときは基本的にいつも溶媒補正を実施した方が良い (Clean screenは例外)



Extra wash (キャリーオーバーの抑制)

Extra washとは何か、いつ用いられるか

- タンパク質の上は流れず流路のみを洗浄するコマンド

測定時は

- 各化合物サンプルを添加した直後に50% DMSOでExtra wash
- 時間は伸びるが実施を推奨

固定化時は

- NA/SAチップにビオチン化サンプルを固定化する際、50% Isopropanol / 50mM NaOH / 1M NaClの溶液でExtra wash

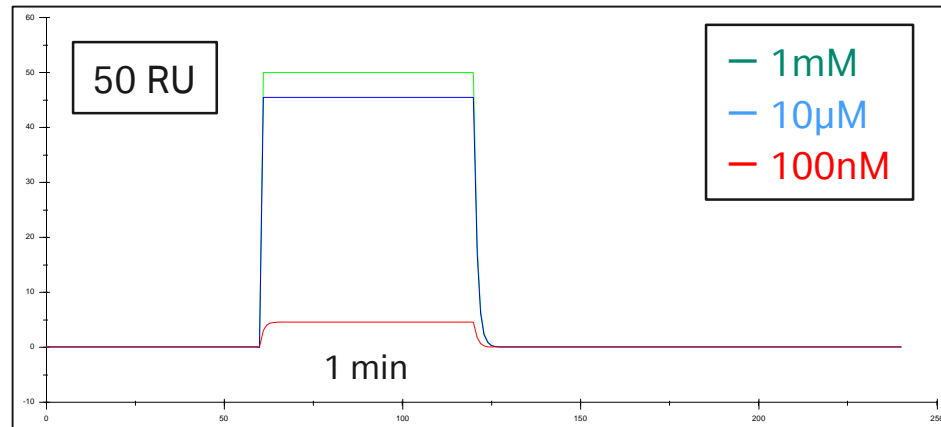
The image displays three screenshots from the Xpoo software interface:

- Open/New Wizard Template:** A tree view showing various assay templates. The 'Custom Assay Wizard' option is circled in red.
- Analysis Command Configuration:** A dialog box for configuring the 'Wash 1' command. The 'Solution' is set to '50% DMSO'. A red circle highlights the 'Wash 1' command box.
- Sample 1 Configuration:** A dialog box for configuring 'Sample 1'. The 'Extra wash after injection with:' option is checked and set to '50% DMSO', which is circled in red.

フラグメントと低分子は違うのか？ シミュレーションを元に考える (Rmax = 50RU)

フラグメント : 150-300 Da程度、 K_D は μM ~ mM

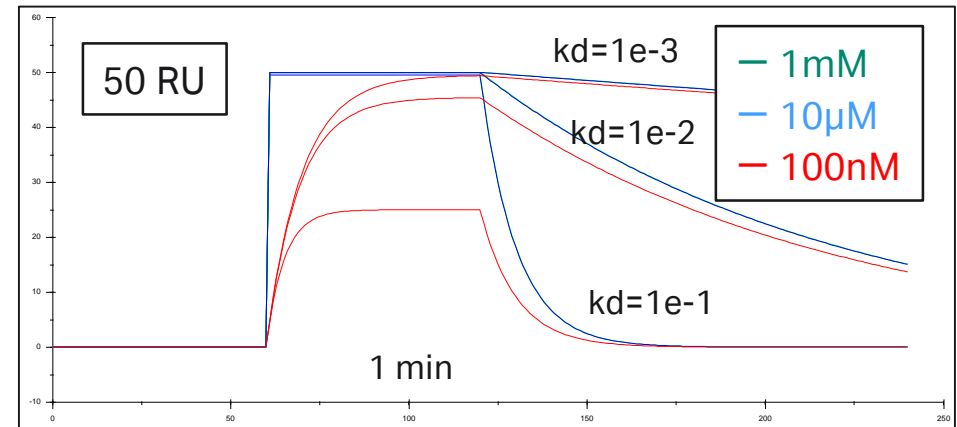
- フラグメントの添加濃度 = 1mM、10 μM 、100nM



- 1mMを添加なら、普通は箱型になる
- 1mMを添加なら、Rmaxに近いデータが得られる

低分子 : 数百 Da程度、 K_D はnM~ μM

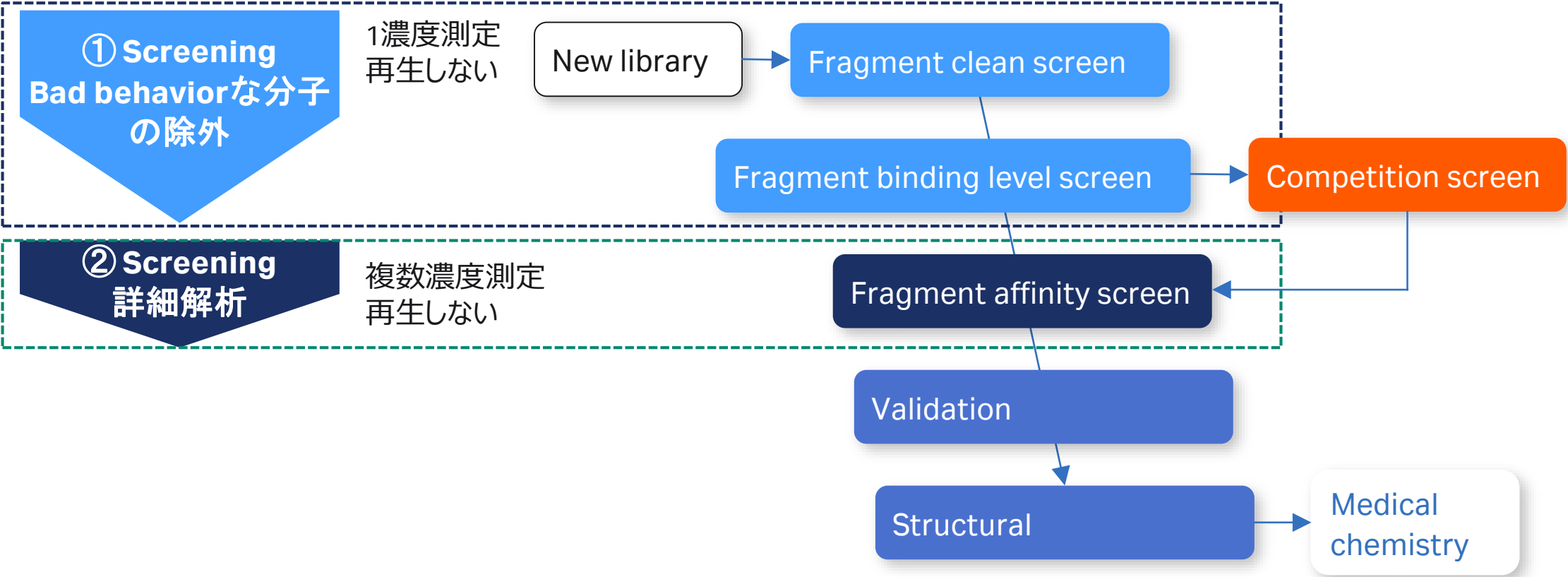
- 化合物の添加濃度 = 1mM、10 μM 、100nM
- $k_a=1e6$, $k_d=1e-3, 1e-2, 1e-1$ ($K_D=1\text{nM} \sim 0.1\mu\text{M}$)



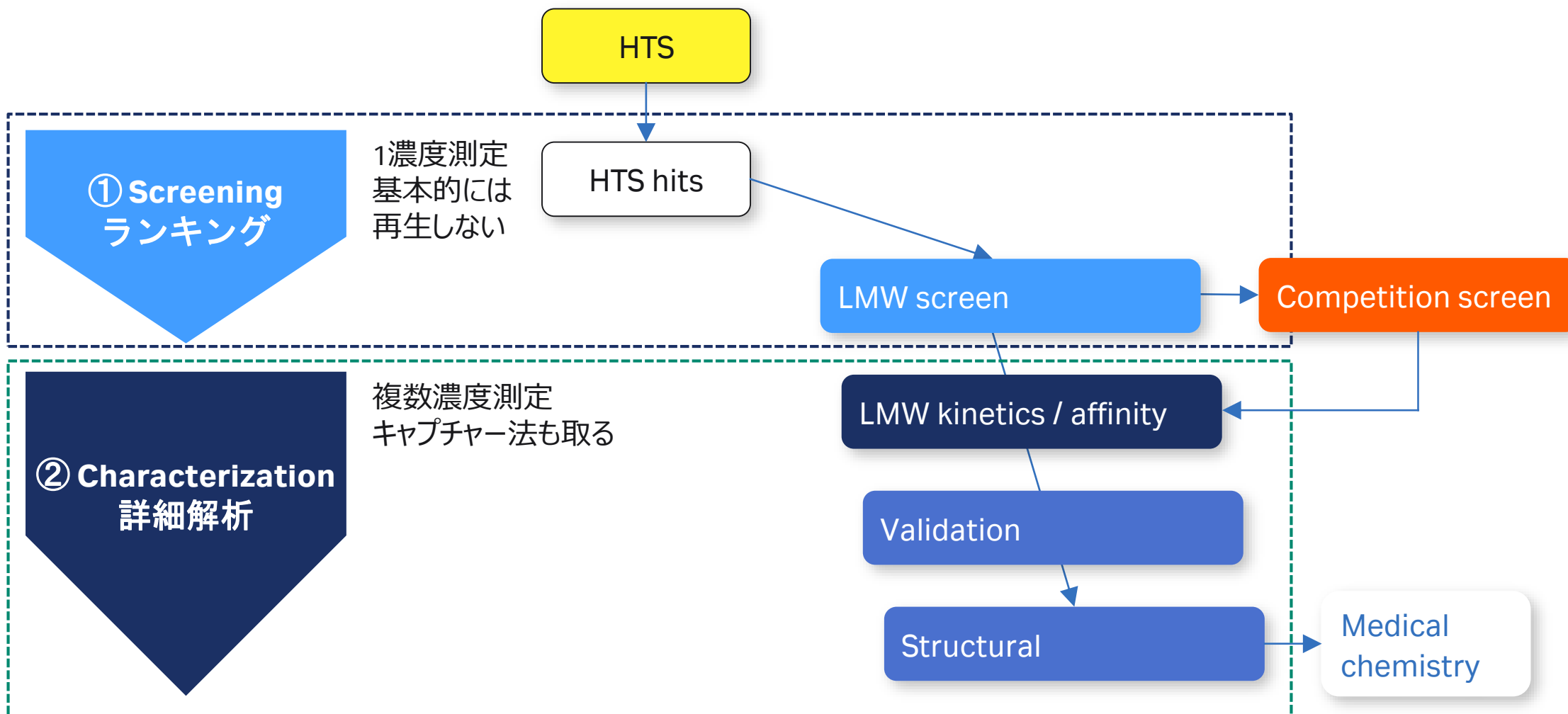
- 10 μM を添加なら、 k_d に依らず結合相は速やかに平衡値になる

(緑の1mMのデータは青の10 μM のデータと重なっている)

フラグメントにおける基本的なワークフロー



低分子における基本的なワークフロー



3

測定・解析の方法

3-1

Screening (1濃度での測定)

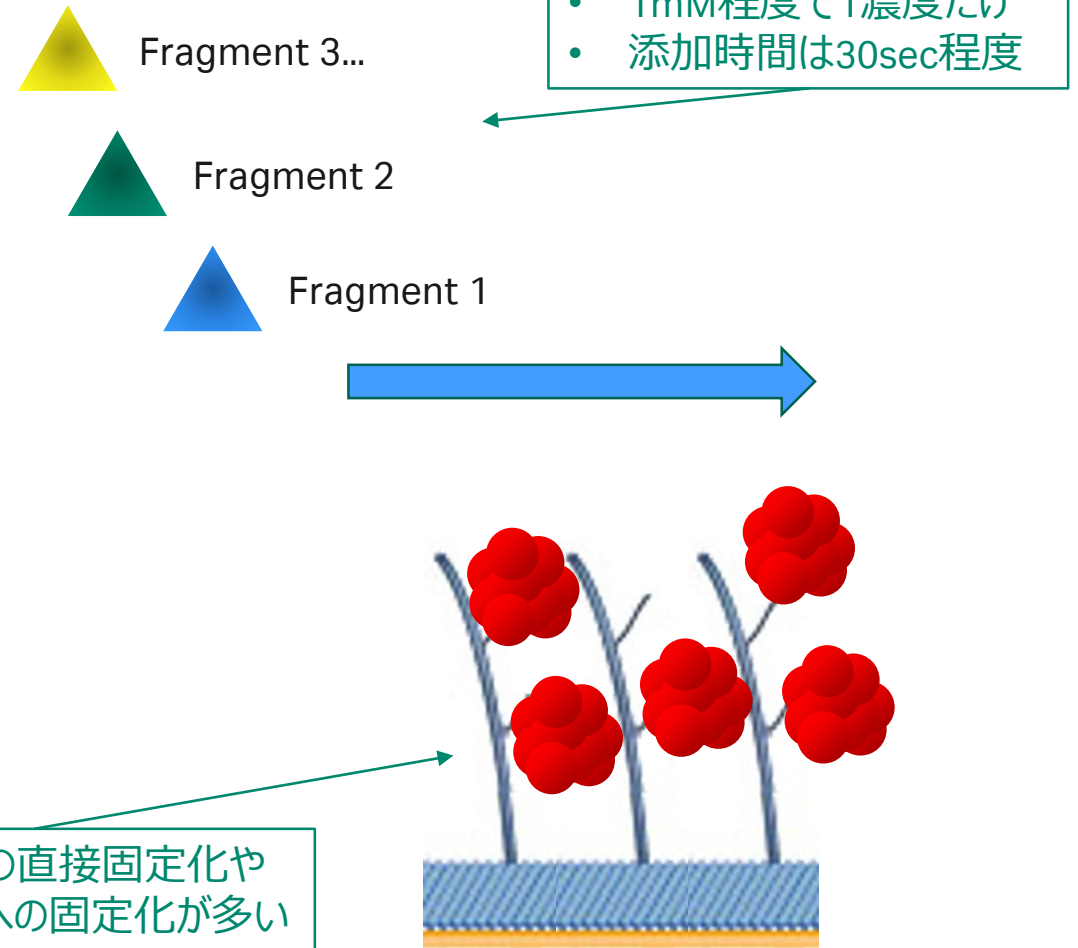
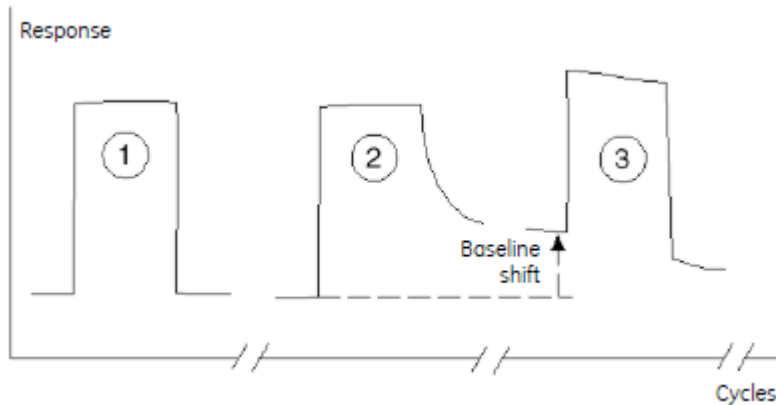
フラグメントの場合	Clean screen	Binding level screen
8K+	4608 / 8.5h	3456 / 33.5h
8K	1536 / 3h	384 / 4h
S200	384 / 7.5h	350 / 16h
T200	384 / 17.5h	350 / 24h
X100PP	非推奨	非推奨

低分子の場合	LMW screen
8K+	320 / 5.5h
8K	320 / 5.5h
S200	192 / 20h
T200	192 / 22h
X100PP	非推奨

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

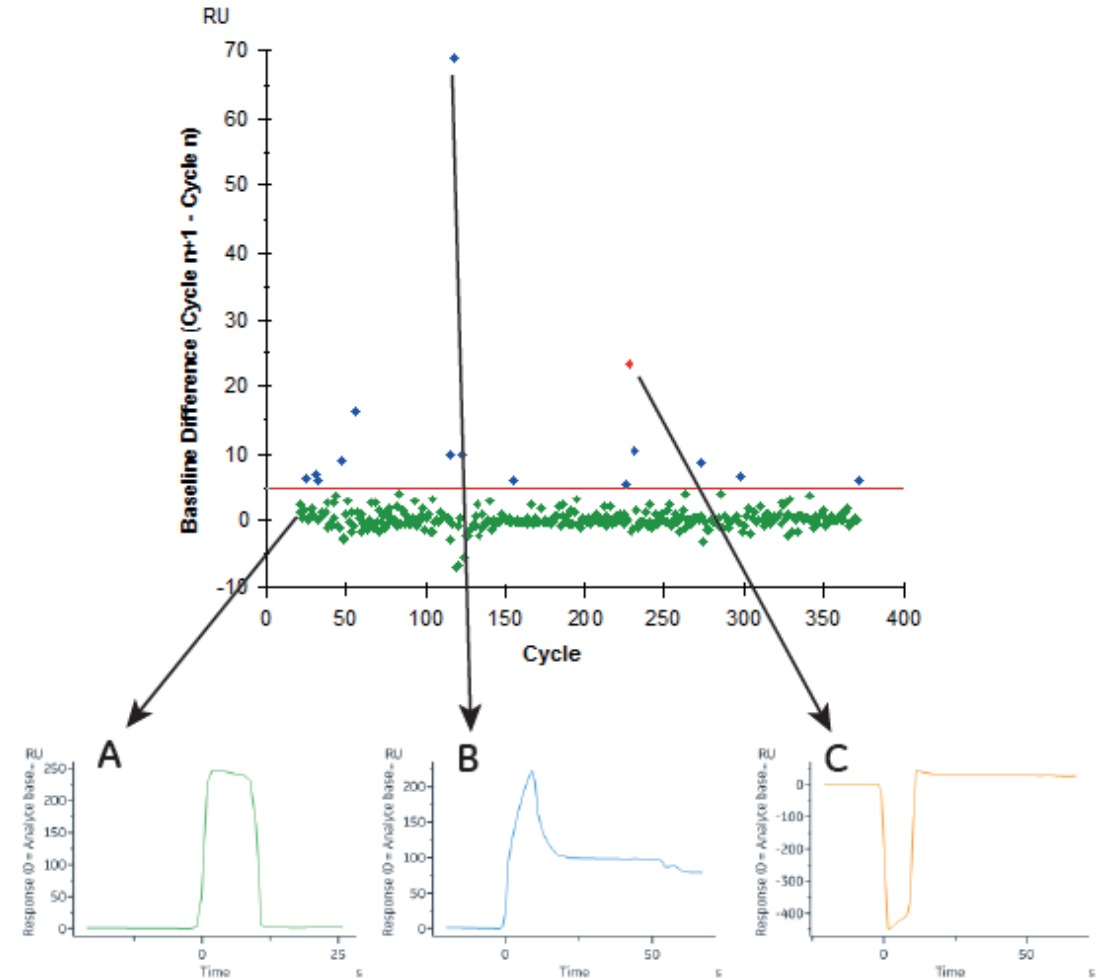
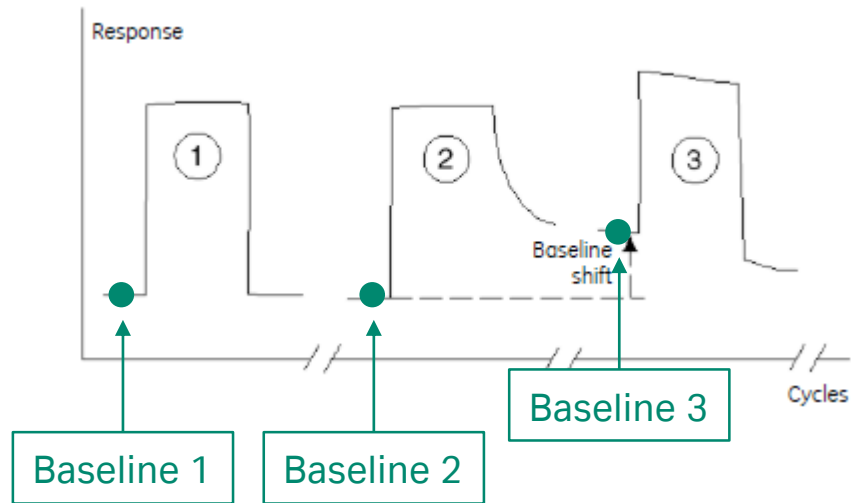
- 解離せず残ってしまうフラグメントが出て**結合できるタンパク質は残っている**から問題ない



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 binding level screenの概要

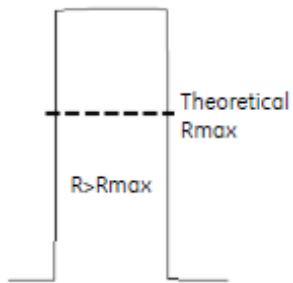
センサーグラム形状が典型的でないフラグメントを排除すること



- 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

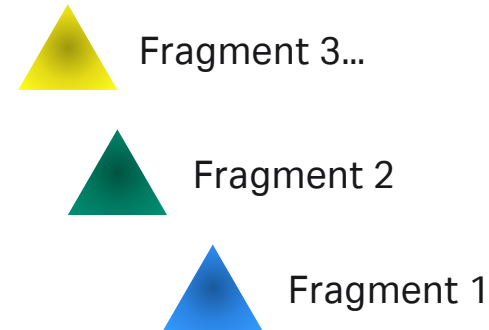


- 解離相でカーブが出現する
- $k_d < 1e-1$
- フラグメントではまず見られない

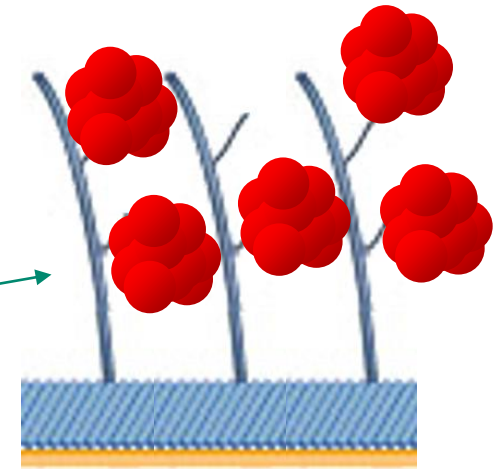
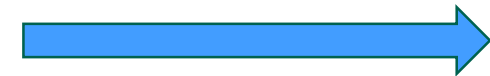


- 理論的Rmaxを超過する
- 凝集、副次的な結合サイト

Cytiva



- 1mM程度で1濃度だけ
- 添加時間は30sec程度
- 溶媒補正する

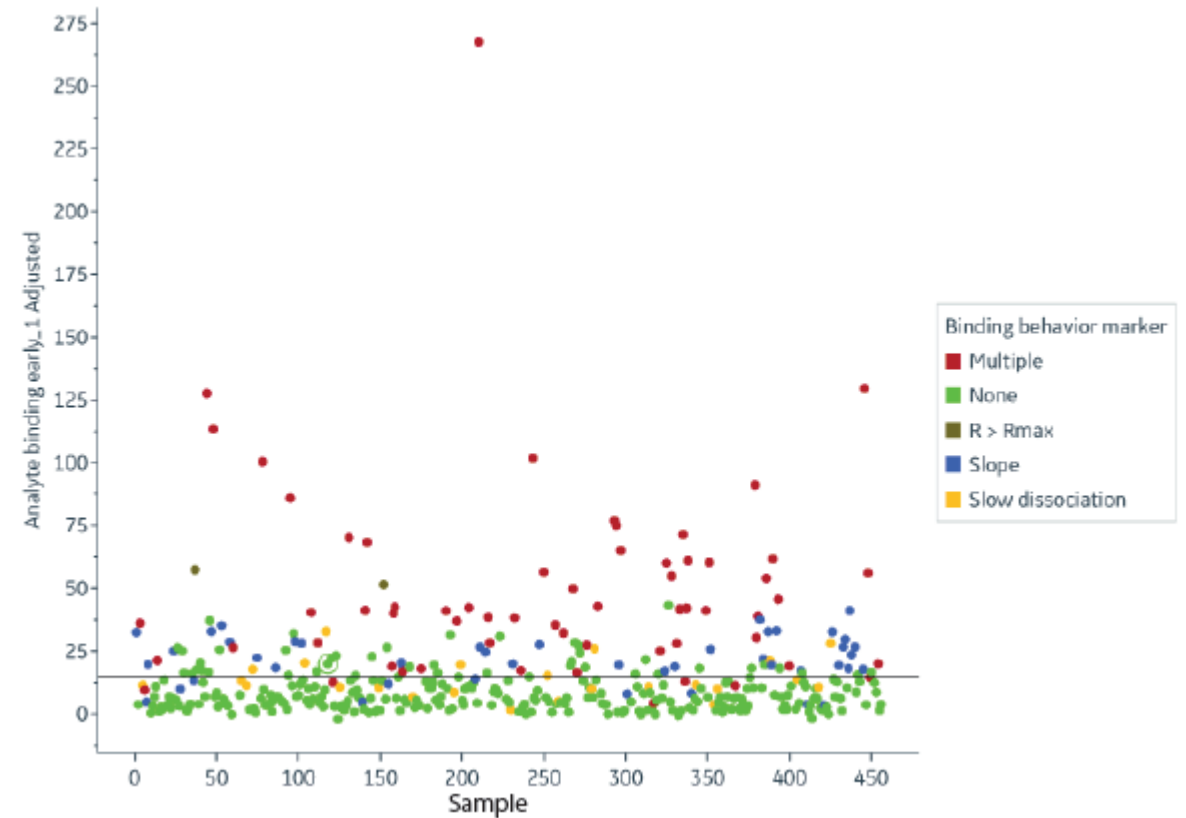
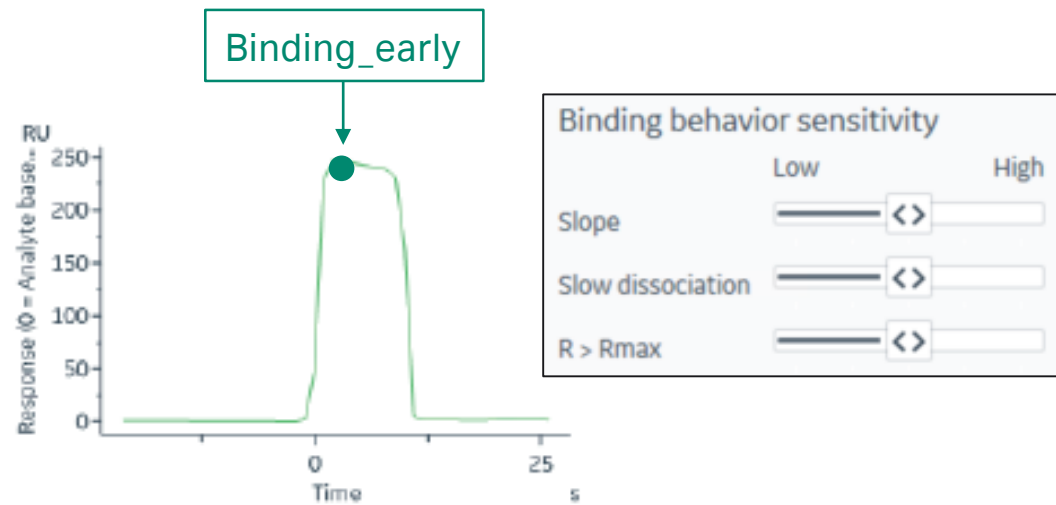


CM5チップへの直接固定化や
NA/SAチップへの固定化が多い

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



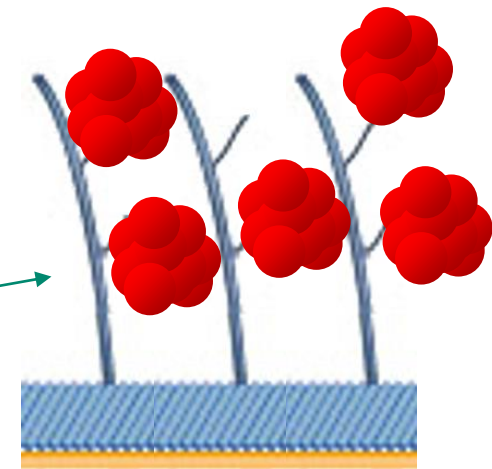
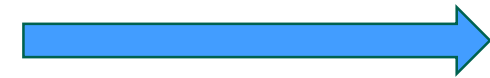
(低分子用) LMW screenの概要

ランキングや閾値を設けて有望な低分子を選別すること

- CM5チップへの直接固定化やNA/SAチップへの固定化を行うことが多い（この場合は再生なし）
- 化合物の解離が遅い場合や測定すべき化合物の数がそれほど大きくない場合などはスループットやタンパク質の消費量増大を犠牲にしてキャプチャー法を取ることもある



- 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



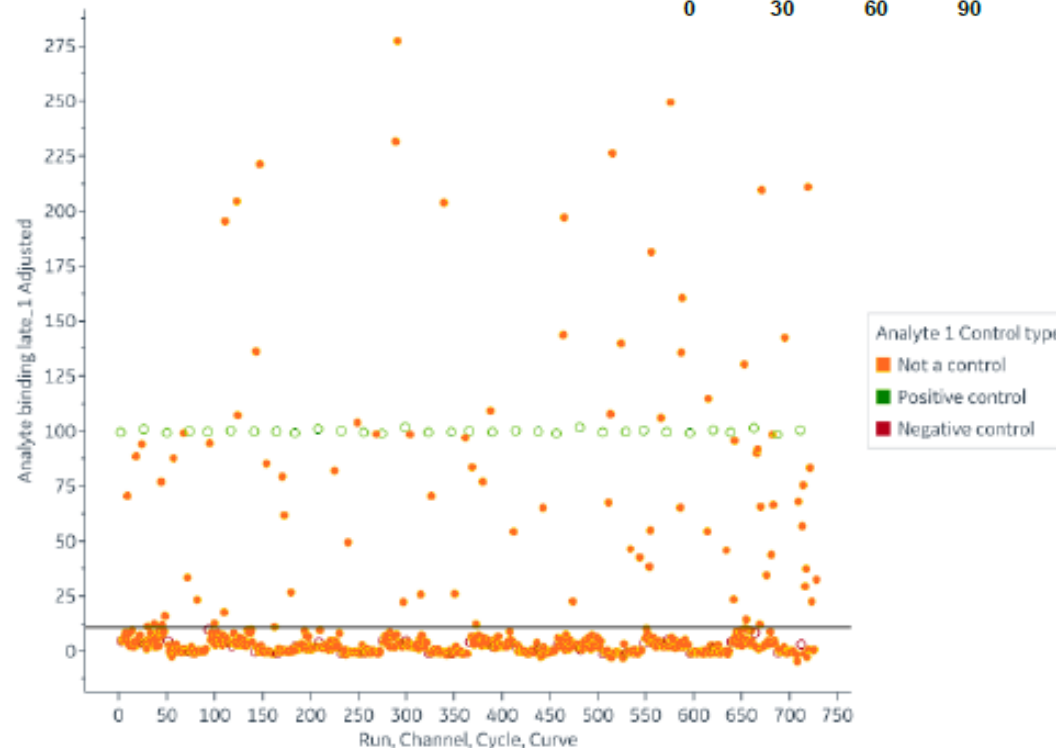
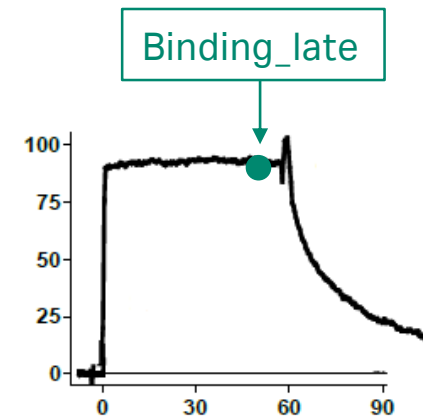
- CM5チップへの直接固定化
- NA/SAチップへの固定化
- キャプチャー法

(低分子用) 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

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



3-2

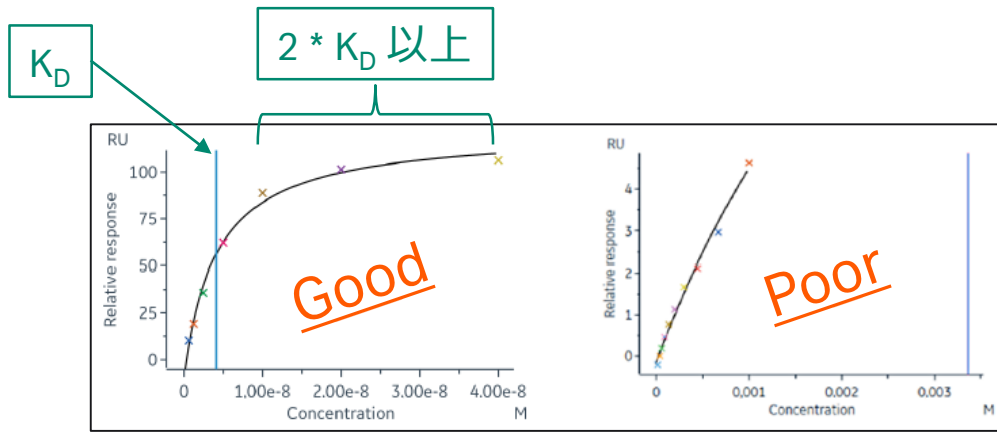
Characterization (複数濃度での測定)

	(フラグメント) Affinity screen	(低分子) Affinity/Kinetic screen 5濃度のSC法, capture法
8K+	64 / 5h	16 / 2.5h
8K	64 / 5h	16 / 2.5h
S200	8 / 5h	16 / 8.5h
T200	8 / 5.5h	16 / 9h
X100PP	1 / 1h	1 / 2h

(前提) Affinity と Kinetics 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
	✓	✗
	✓	✓
	✗	✓

Fragment affinity screenの概要

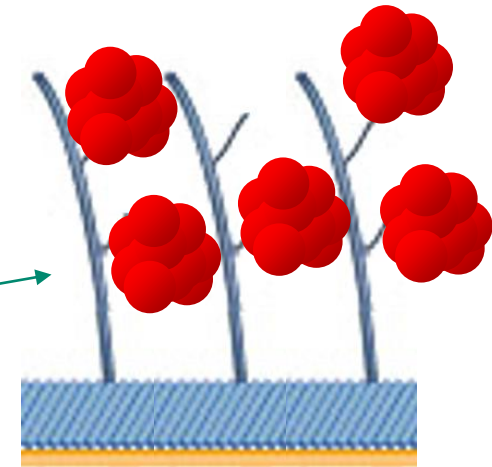
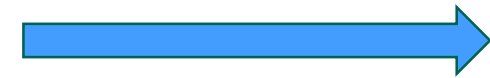
タンパク質との結合を確認し K_D 値を算出しランキングする

- タンパク質は十分量固定化
- 通常のように濃度条件を振ったAffinity測定を行う
- 高濃度で非特異的な結合が起きてしまうフラグメントには Rmax control を使って解析する

- Max 1mM~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

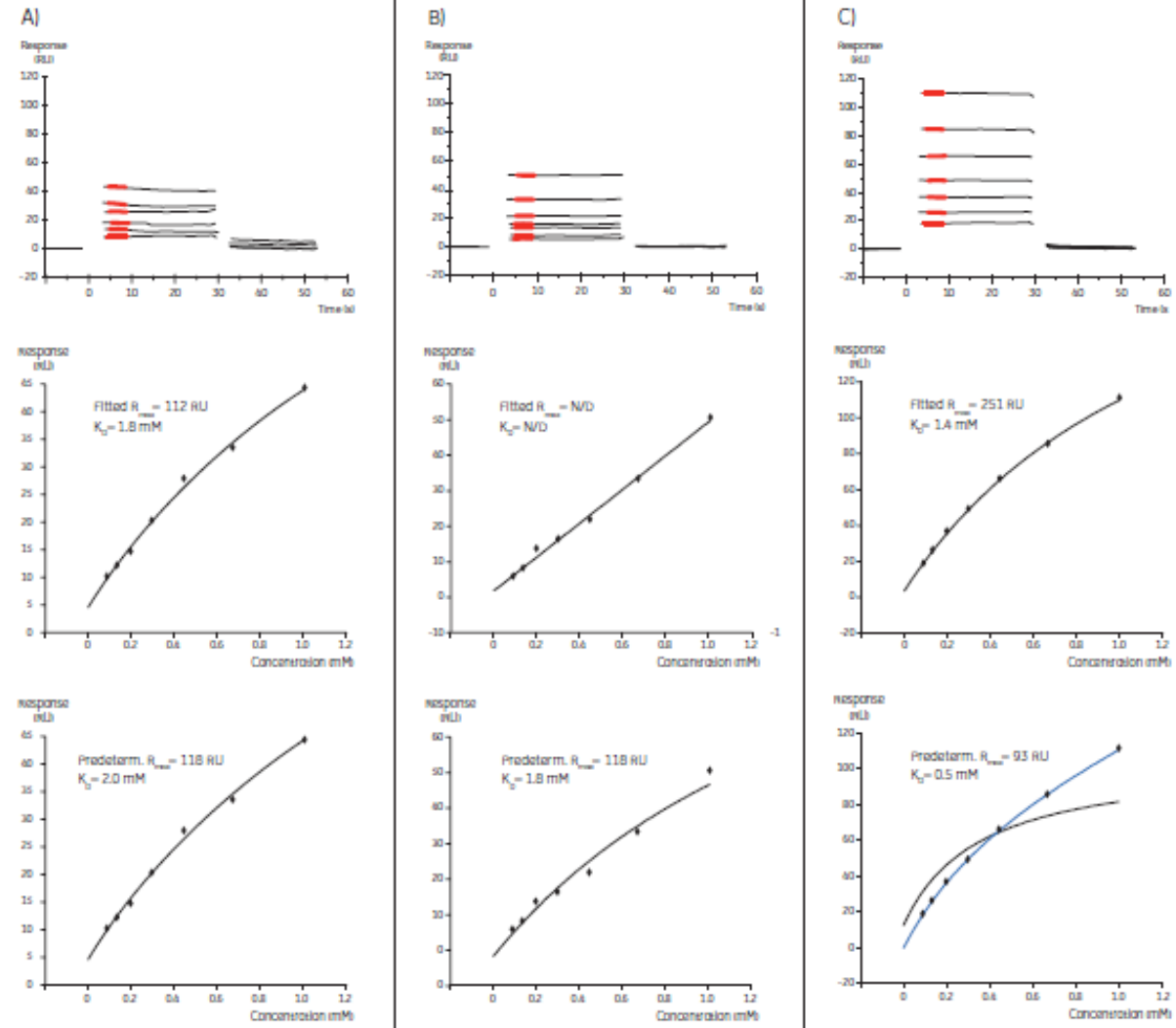


CM5チップへの直接固定化や
NA/SAチップへの固定化が多い

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)
 - Rmax controlを用いて低濃度側だけで解析
- B) Steady stateで収束しない
 - Constant Rmax (multi site)で解析
 - 副次的な結合サイトが存在
- 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

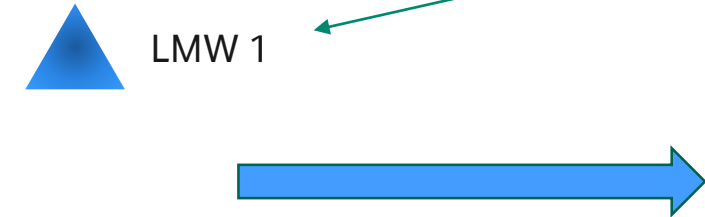


(低分子用) LMW kinetics / affinity の概要

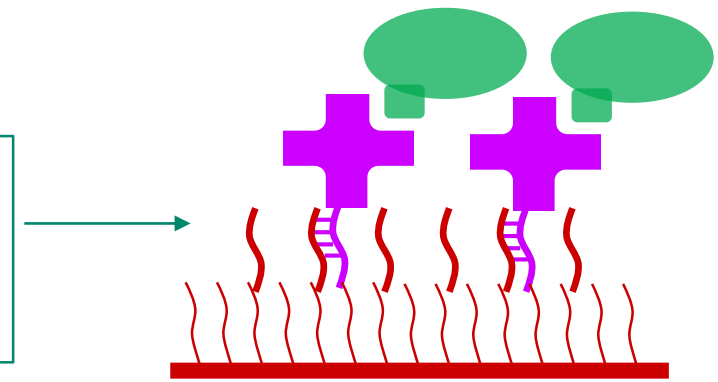
タンパク質との結合を確認し K_D あるいは k_a 、 k_d を算出しランキングする

- 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
- 0濃度のデータも別途取得する
- 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



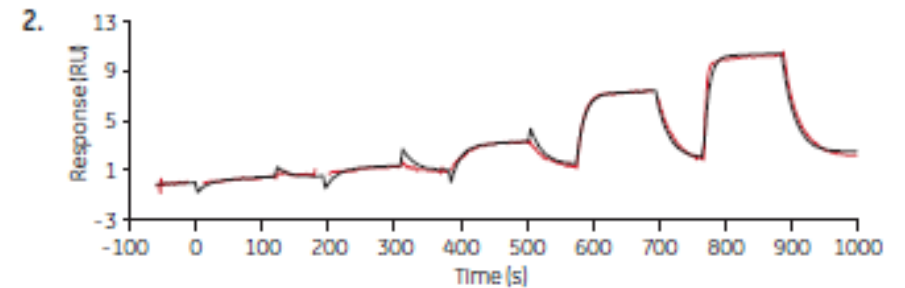
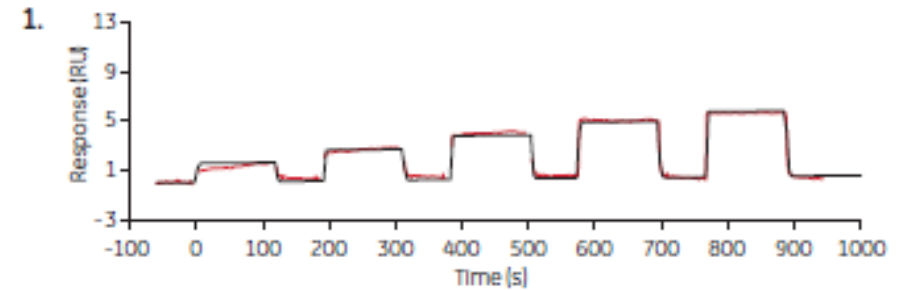
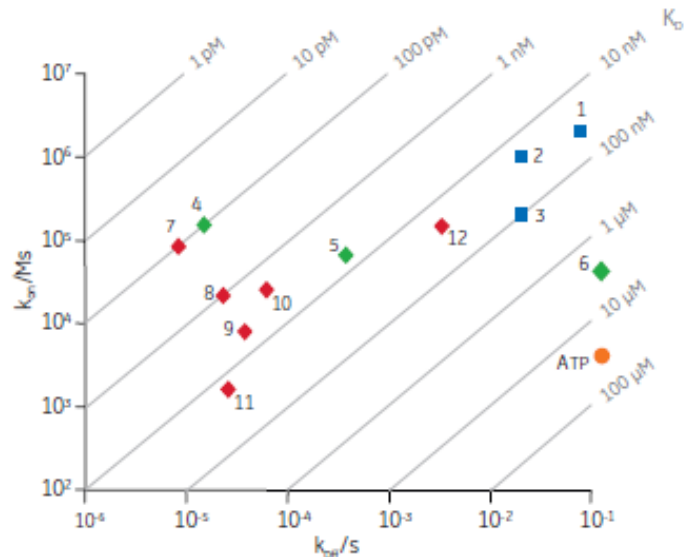
Biotin CAPture Kitや
NTA Reagent Kit, His Capture Kit
などのキャプチャー法が取られることもある
...ただしBiotin CAPture Kitが推奨



(低分子用) 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









3-3

Competition screen

Competition screenの概要... Competitorは過剰量

Sampleだけ or Competitorだけ or SampleとCompetitorの同時添加で排他的・加算的か

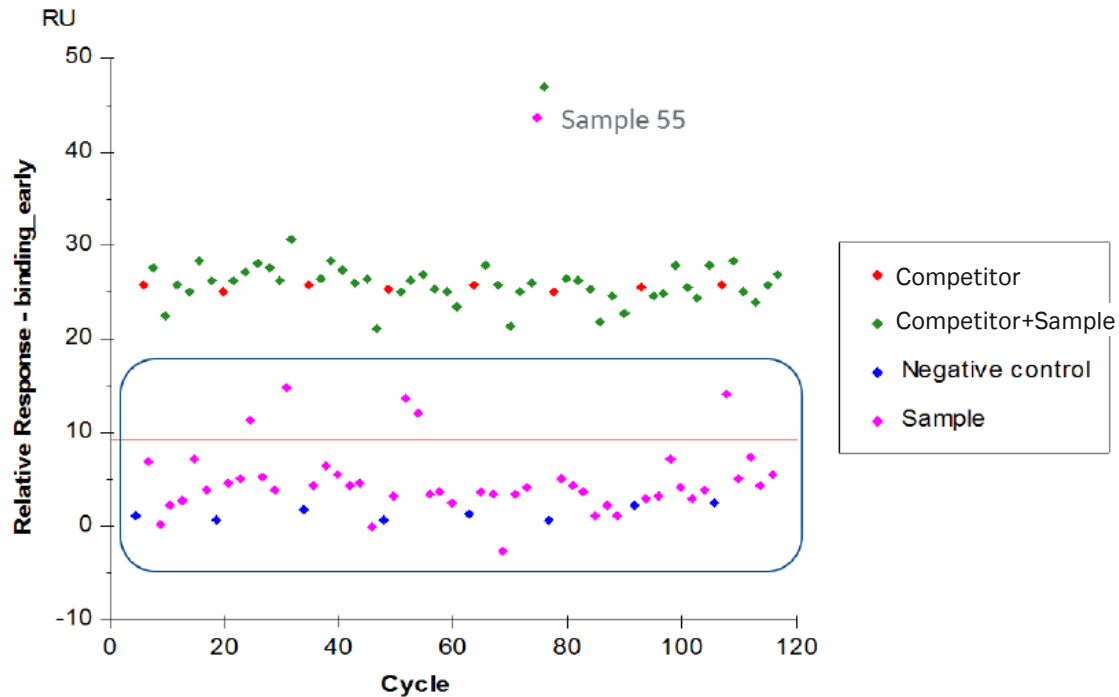
	測定方法	Pros	Cons
(1) Sample mix	<p>Sample だけ or Competitor だけ or プレミックスして添加</p> <p>Cycle 1 </p> <p>Cycle 2 </p>	<ul style="list-style-type: none"> Competitorの消費量が少ない 	<ul style="list-style-type: none"> Competitorがタンパク質から解離しない場合は利用できない
(2) Buffer mix	<p>ランニング緩衝液自体がCompetitorなしもしくはあり</p> <p>Run 1 </p> <p>Run 2 </p>	<ul style="list-style-type: none"> Competitorがタンパク質から解離しない場合でも利用できる 	<ul style="list-style-type: none"> Competitorの消費量が非常に多く現実的でない可能性 2回のRunが必須（連続測定は可能）
(3) A-B-A injection	<p>Sampleの添加直前にCompetitorなしもしくはありに切り替える</p> <p>Cycle 1 </p> <p>Cycle 2 </p>	<ul style="list-style-type: none"> Competitorの消費量は(1)と(2)の中間程度 	<ul style="list-style-type: none"> Competitorがタンパク質から解離しない場合は利用できない Biacore S200、8K/8K+のみ

Competition screenの解析

Step1 Competitorなしのデータを判断

- Negative control の平均値 + 3*SD 以上を閾値とする
- 閾値以上 = 結合物質と判断

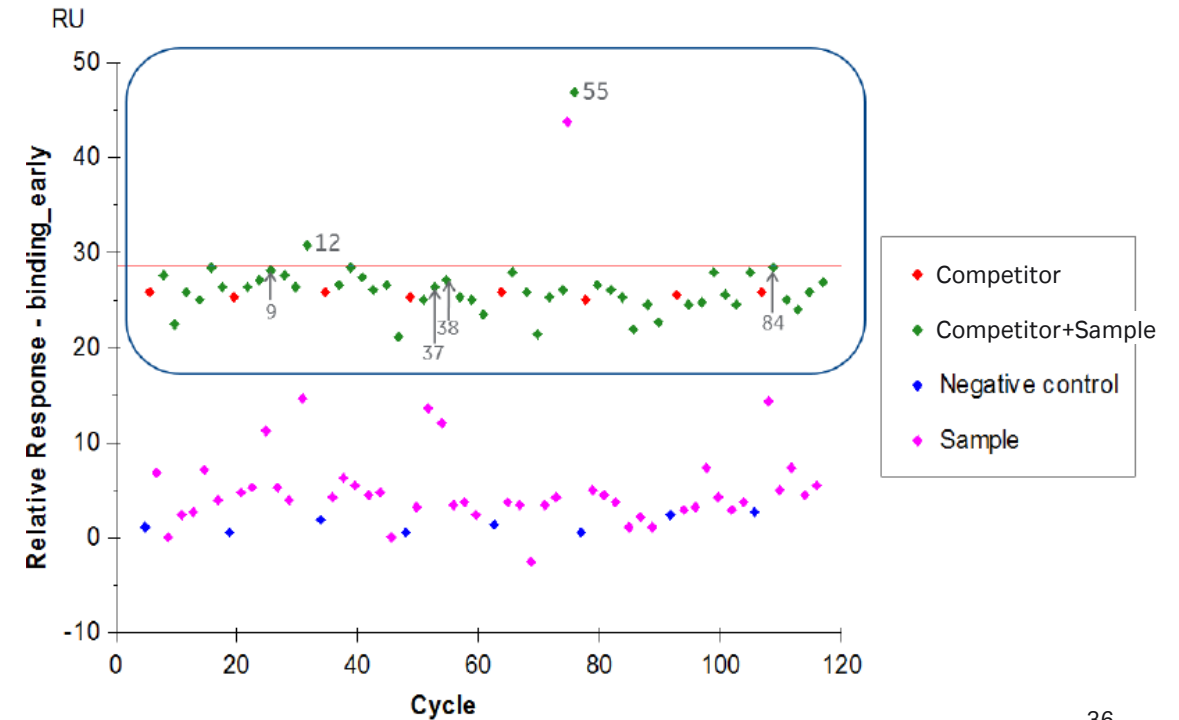
Competitor



Cytiva

Step2 Competitorありのデータを判断

- Competitor の平均値 + 3*SD 以上を閾値とする
- 閾値以下 = 排他的 (選択性高い)
- 閾値以上 = 付加的 (選択性低い)



4

まとめ

イチから始めるBiacoreでの低分子測定の戦略

- + Biacoreで直接結合を確認することのメリットを理解する
- + タンパク質は結合活性を維持しつつ十分な固定化量を取る（ビオチンタグおすすめ）
- + 大きく ①Screening（1濃度）と ②Characterization（複数濃度）の2ステップを理解する
- + Competition screen は選択性に関する情報を得られる
- + Positive control、Negative control、0濃度（Buffer）は分けて考える
- + 解離が遅い低分子はキャプチャー法も取られることがある（ビオチンタグおすすめ）
- + 各解析の目的を正しく理解し、SPR以外の手法とオルソゴナルに評価する

二 Biacoreでの低分子測定・解析



Thank you

Masami Koinuma

【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

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2020年5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。

活性濃度を測ってみよう。～Biacoreによる濃度定量～

Cytiva アプリケーションスペシャリスト 高田 元

 [Register](#)  2020年12月18日  15:00～15:30  30min

CONTENTS

タンパク質の濃度測定といえば、分光光度計で吸光度をもとにした測定が思い浮かぶかもしれませんがそれに対してBiacoreでは、“活性を維持した分子”の定量ができるという大きな特長があります。

この活性濃度定量は、“本当に作用する”医薬品の濃度として品質管理に使用されたり、あるいはKD値を算出するためにも本来であれば“活性”濃度情報が必要になりますので、実は隠れたBiacoreの利用価値なんです。

当Webinarでは何故活性濃度が重要かという点と、直接法、阻害法、また、標品要らずの濃度定量など、各手法の特長や使い分けなどをあわせてお話しします。

