



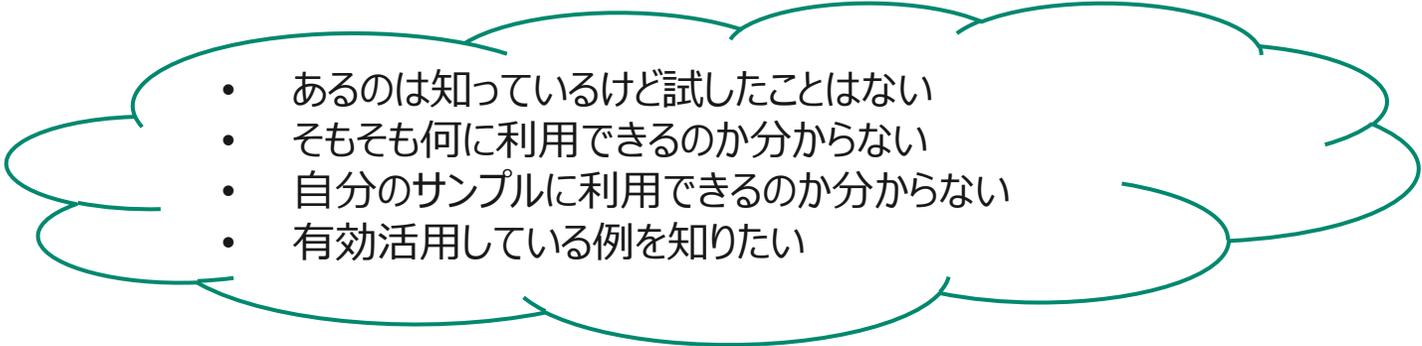
# 試してみたいくなる CFCA



August 31, 2021  
Koinuma Masami

# Agenda

1. CFCA の考え方やメリット
2. D 値の算出方法
3. CFCA 解析と信頼性の向上
4. よくあるギモン
5. 利用例
6. (Appendix)

- 
- あるのは知っているけど試したことはない
  - そもそも何に利用できるのか分からない
  - 自分のサンプルに利用できるのか分からない
  - 有効活用している例を知りたい



# 1

## CFCA の考え方やメリット

# Calibration Free Concentration Analysis (CFCA) の概要

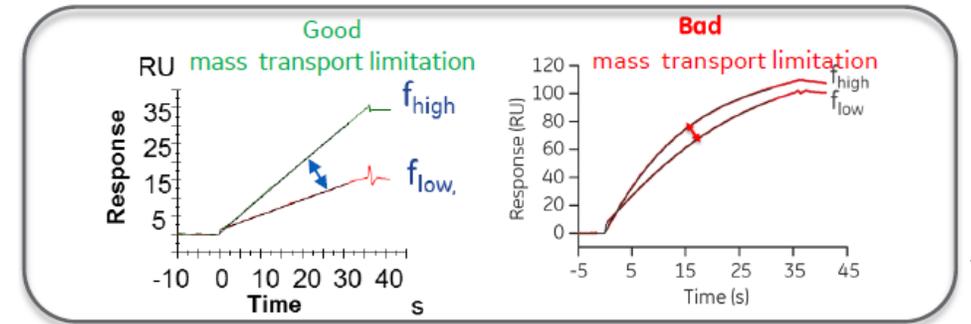
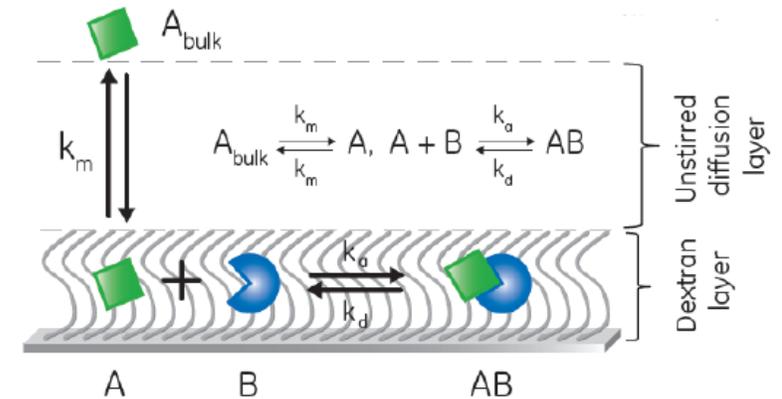
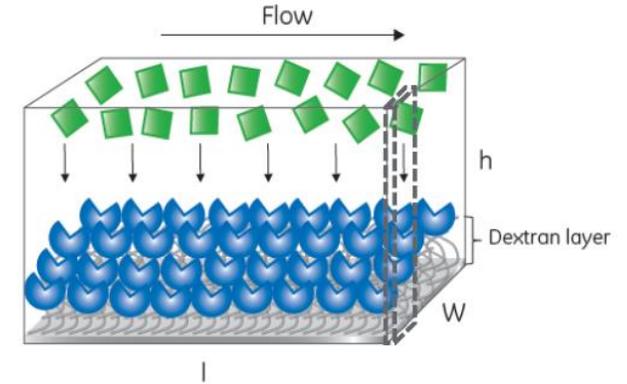
## 標品不要の濃度定量法

- マストランスポートリミテーション (MTL) を利用：
  - アナライトの需要に対して供給が間に合っていない状態 (≒リガンド固定化量が多い状態)
  - 非攪拌層 (バルク層) からデキストラン層にやってきたアナライト  $A_{bulk}$  は即時 AB 複合体に
- MTL 条件下 Biacore で得られる結合相のセンサーグラムの傾きは以下の3要素で決定される：
  - 分子量  $M_w$  マストランスポート係数  $k_m$  濃度 Conc

$$\frac{dR}{dt} = f(M_w, k_m, Conc)$$

$$k_m = 0.98 \cdot \sqrt[3]{\frac{D^2 \cdot F}{h^2 \cdot w \cdot 0.3 \cdot l}}$$

- $M_w, k_m$  は分子固有の値なので標品なしで Conc を逆算可能



# 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

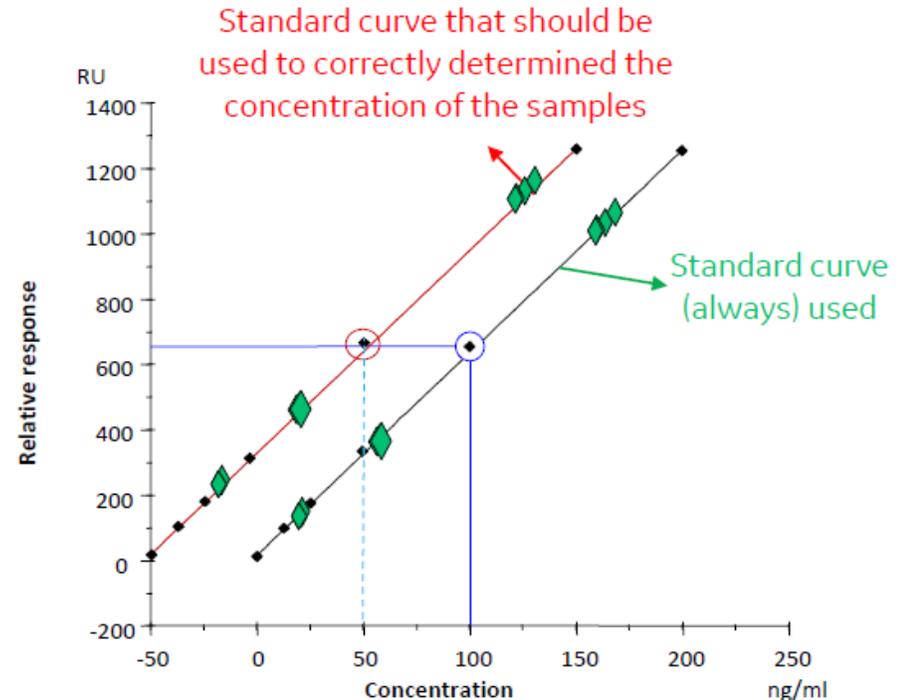
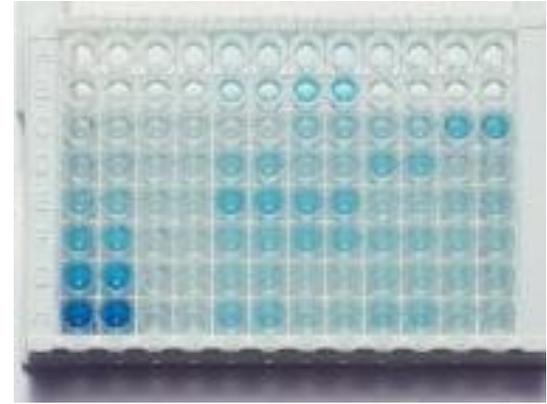
- 色素を持つサンプルは光の吸収や散乱の影響あり

## 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

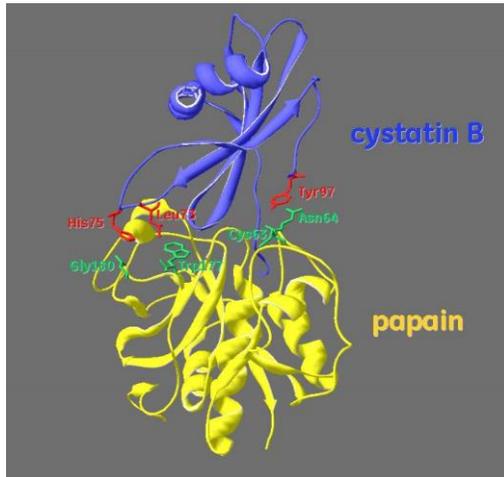


# どんなときに CFCA を利用する？特徴から利用方法を考える

CFCA の特徴	メリットと有効な利用方法
結合活性を持つ分子のみレスポンスに反映される	真の活性濃度を知ることが可能 → <b>正確な Kinetics 解析を実施したいとき</b>
ある程度クールドなサンプルでも測定できる	血清中や培養上清に含まれるサンプルを測定可能 → <b>ワクチン開発における中和抗体の確認をしたいとき</b> → <b>細胞などを使った医薬品製造プロセスにおける精製ステップごとの活性確認をしたいとき</b>
標品が不要	標品が入手できない場合や標品自体のクオリティが問題の場合にも対応可能 → <b>加速試験、過酷試験時のような標品を用意しづらい系の活性濃度を知りたいとき</b> → <b>ウイルス粒子のような標品を用意しづらい系の濃度定量をしたいとき</b>
1サイクル当たり数分、かつ最低 2 流速での測定で濃度を算出可能	結果を得るまでが迅速 → <b>細胞などを使った医薬品製造プロセスにおける精製ステップごとの活性確認をしたいとき</b> → <b>Dose Response Curve の補足/代替法</b>

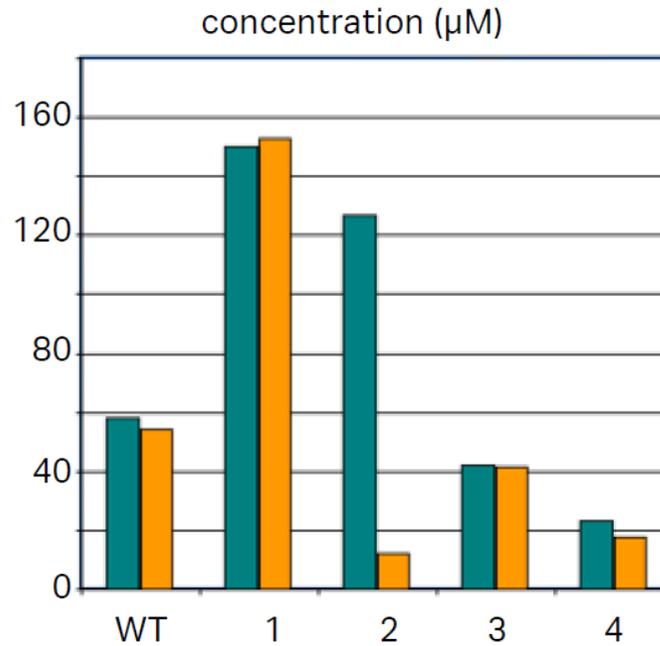
# Kinetics 解析には正しい濃度情報が重要

固定化されたPapainに対し  
WTと4種のCyclatin B変異体を添加



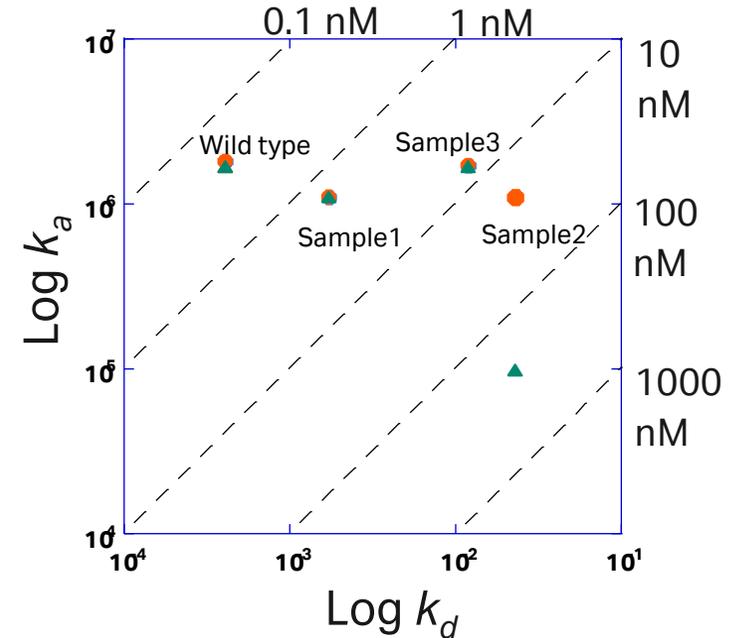
Pol, E. and Björk I. *Biochemistry*, **38**, 10519-10526 (1999)

緑 :  $A_{280}$  で測定した濃度  
橙 : CFCA で測定した濃度



- Cyclatin B の変異体サンプル 2 を CFCA 分析すると  $A_{280}$  での濃度より大幅に低い

▲ :  $A_{280}$  の濃度を用いた kinetics 解析  
● : CFCA の濃度を用いた kinetics 解析



- $A_{280}$  の濃度を用いると Sample2 の親和力の低下は  $k_a$  の減少と捉えられてしまう
- 実際のセンサーグラムからは  $k_d$  依存

# 対応機種と version の違い

	機種、version	特別な機能
	Biacore X100 plus package version 2	-
	Biacore T100 / T200 version 2	-
	Biacore T200 version 3	<ul style="list-style-type: none"><li>• Sensitivity check 可能</li><li>• Dual/Multiで測定時に Reference の差し引きなしに対応</li></ul>
その他の機種		CFCA 実施不可

# 2

## D 値の算出方法

# サンプル固有の値、拡散係数 D 値はどう算出するか？

## Diffusion Coefficient Calculator を利用

- (参照) "Handbook of Biochemistry: Selected data for Molecular Biology" ed. Herbert A. Sober, CRC Press Cleveland OH, 1973.
- (3D構造から計算) HYDROPRO program (J. Garcia de la Torre, M.L. Huertas and B. Carrasco, "Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic-level structure. Biophys. J. 78, 719-730 (2000))
- (実験的に算出) 分析超遠心または DLS
- ストークスの法則と分子拡散のインシュタイン-サザーランド方程式に基づく半経験則的な関係から導出  
[Diffusion Coefficient Calculator](#) (クリック)
- 物理的に類似した分子の値を使用するのも良い

$$D = 342.3 \times \frac{1}{M^{1/3} \times f \times \eta_{rel}} \times 10^{-11}$$

D is the diffusion coefficient in m<sup>2</sup>/s  
M is the molecular weight in Daltons  
f is the frictional ratio  
 $\eta_{rel}$  is viscosity of the solvent relative to water at 20°C  
( $\eta_{rel}$  for water or buffer at 25° = 0.89)

$$D = D_{ref} \times \frac{T}{T_{ref}} \times \frac{\eta_{ref}}{\eta}$$

D is the diffusion coefficient of the analyte  
T is the absolute temperature in Kelvin (20°C = 293.15K)  
 $\eta$  is the viscosity of the solvent  
subscript ref indicates reference conditions

# (参考) Diffusion Coefficient Calculator

## Diffusion Coefficient Calculator

Calculate diffusion coefficients for calibration-free concentration analysis assays.

### Calculate diffusion coefficient at 20°C

Molecular weight: ( $M_r$ )

(Da)  
150000

Frictional ratio ( $f/f_0$ )

Choose predefined value or enter a value of your choice.

Choose molecular shape

Enter value

Globular 1.2

0

Viscosity relative to water at 20°C ( $\eta/\eta_0$ ):

Use standard value (1.00)

Enter value

0

CALCULATE

Diffusion coefficient at 20°C ( $m^2/s$ ):

$m^2/s$   
5.08629973610196e-11

COPY RESULT

分子量入力

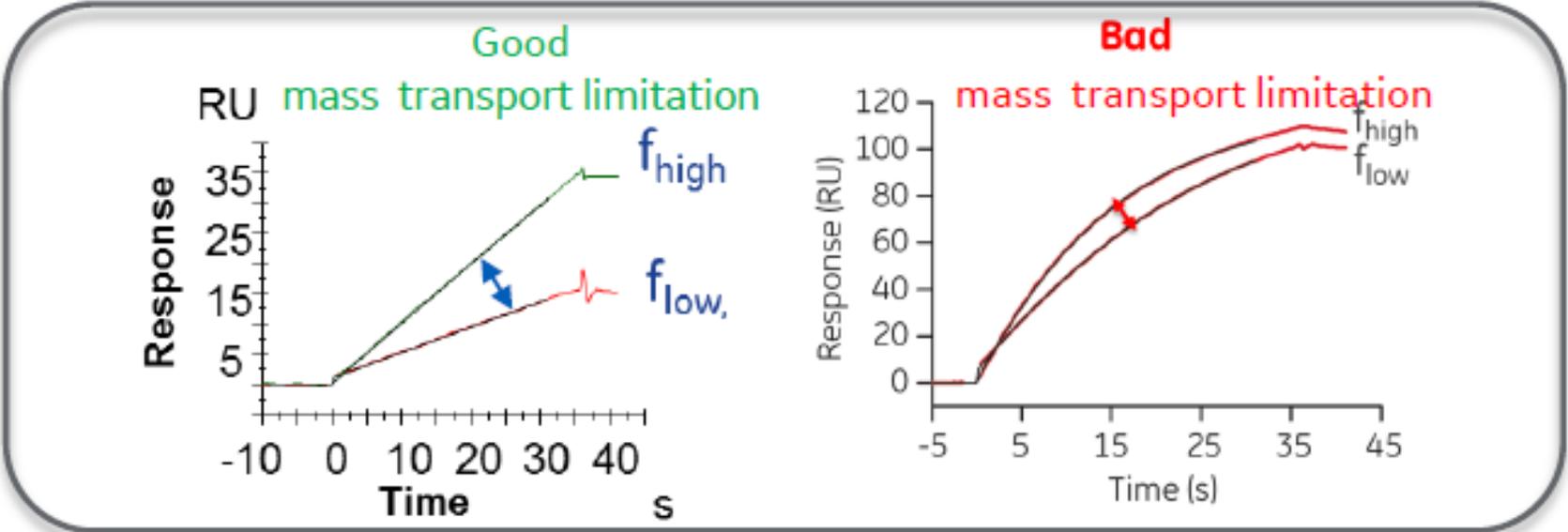
摩擦率  
分子形状の選択あるいは数値入力

20°Cにおける水と比較した溶液粘性  
水系のバッファーなら1.0で良い

# 3

## CFCA 解析と信頼性の向上

# CFCA 解析は 1:1 binding model でフィッティングするだけ ... kinetics 解析とは違う？



# フィッティングは何を行っているか

- 1:1 binding model でフィッティングしているだけ
- 普段は濃度情報を input し tc を global fitting している
- CFCA では逆に tc を input (実際には D 値入力すると自動で計算) して濃度を global fitting している

$$t_c = \frac{k_t}{\sqrt[3]{f}}$$

$$k_t = k_m \cdot 10^9 \cdot Mw \left[ \frac{\text{RU}}{\text{M} \cdot \text{s}} \right]$$

$$k_m = 0.98 \cdot \sqrt[3]{\frac{D^2 \cdot F}{h^2 \cdot w \cdot 0.3 \cdot l}}$$

Curve	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Conc (M)	tc	Flow (ul/min)	kt (RU/Ms)	RI (RU)	Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> )
	1.518E+6	0.002601	1.713E-9	105.5		7.323E+7				0.0827
Cycle: 5 1.1 nM					1.100E-9		30.00	2.275E+8	-0.04034	
Cycle: 6 2.2 nM					2.200E-9		30.00	2.275E+8	-0.2053	
Cycle: 7 4.3 nM					4.300E-9		30.00	2.275E+8	0.1734	
Cycle: 8 8.5 nM					8.500E-9		30.00	2.275E+8	0.08274	
Cycle: 9 17 nM					1.700E-8		30.00	2.275E+8	-0.1291	
Cycle: 10 1.1 nM					1.100E-9		30.00	2.275E+8	0.06663	

Fitted

Fitted

Calculated

Fitted

Input

Fitted

Input

Fitted

Fitted

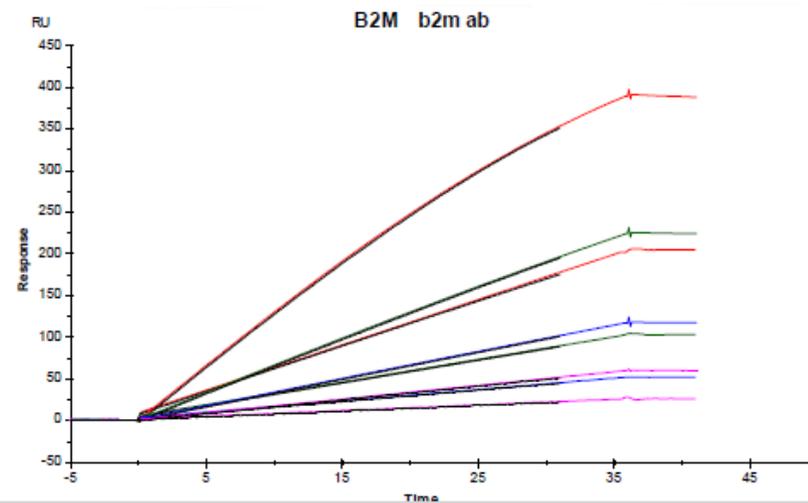
1:1 Binding			
Name	Fit	Initial value	
ka	Fit global	1e5	Default
kd	Fit global	1e-3	Default
Rmax	Fit global	YMax	Default
tc	Fit global	1e8	Default
RI	Fit local	YMax/5	Default

Name	Fit	Initial value	
Conc	Fit global	1e-5	Default
ka	Fit global	1e5	Default
kd	Fit global	1e-3	Default
Rmax	Fit global	100*YMax	Default
RI	Fit local	YMax/5	Default
Form Factor	Constant	0.81	Default

# 解析結果の妥当性評価

## 評価すべきポイント

- センサーグラムがよくフィッティングしているか（見た目）
- 5 uL/min のデータでもセンサーグラムが直線的か
- $\text{Chi}^2$  が十分に小さいか
- SE が十分に小さいか
- Initial rate > 0.2 (RU/s) か
- QC ratio > 0.2 か
- Sensitivity check の評価



Cycle#	Flow (μl/min)	Dilution factor	Conc (M)	Diluted Conc (M)	SE(Conc)	QC ratio Fit	Initial rate Fit	Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> )
			8,70E-08		2,60E-11			0,028
6	5	1		8,70E-08		0,75	5,47	
7	100	1		8,70E-08		0,75	12,5	
8	5	2		4,40E-08		0,796	2,75	
9	100	2		4,40E-08		0,796	6,51	
10	5	4		2,20E-08		0,815	1,38	
11	100	4		2,20E-08		0,815	3,3	
14	5	8		1,10E-08		0,823	0,69	
15	100	8		1,10E-08		0,823	1,66	

# Q, QC<sub>ratio</sub> による評価... MTL が十分かかっているか？

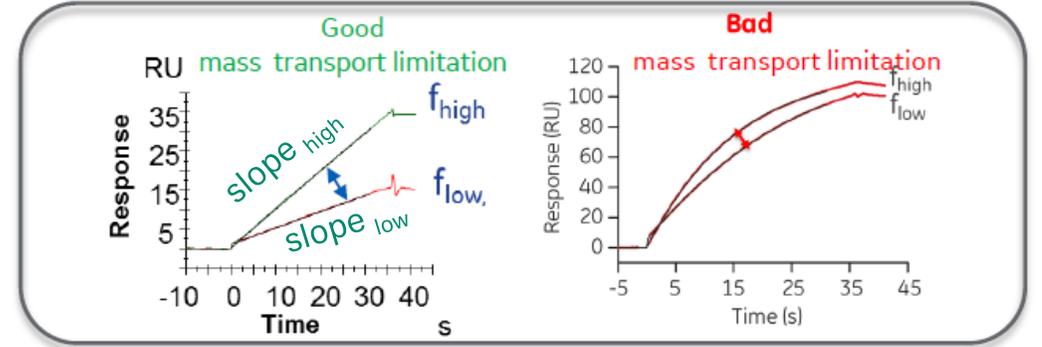
## Degrees of MTL

- Qを以下のように定義：

$$Q = \frac{\text{slope}_{\text{high}}}{\text{slope}_{\text{low}}} \cdot \frac{\sqrt[3]{f_{\text{high}}}}{\sqrt[3]{f_{\text{low}}}}$$

- MTLが全くかかっていないなら  $\text{slope}_{\text{high}} = \text{slope}_{\text{low}}$   
よって  $Q_{\text{min}} = \sqrt[3]{f_{\text{low}}} / \sqrt[3]{f_{\text{high}}}$
- MTLが完全にかかっているなら同じ濃度のサンプルを添加した時の slope は完全に  $k_m$  に依存 (=  $\sqrt[3]{F}$  に依存)  
よって  $Q_{\text{max}} = 1$
- 扱いやすいよう正規化：

$$QC_{\text{ratio}} = \frac{Q - Q_{\text{min}}}{Q_{\text{max}} - Q_{\text{min}}} > 0.2$$



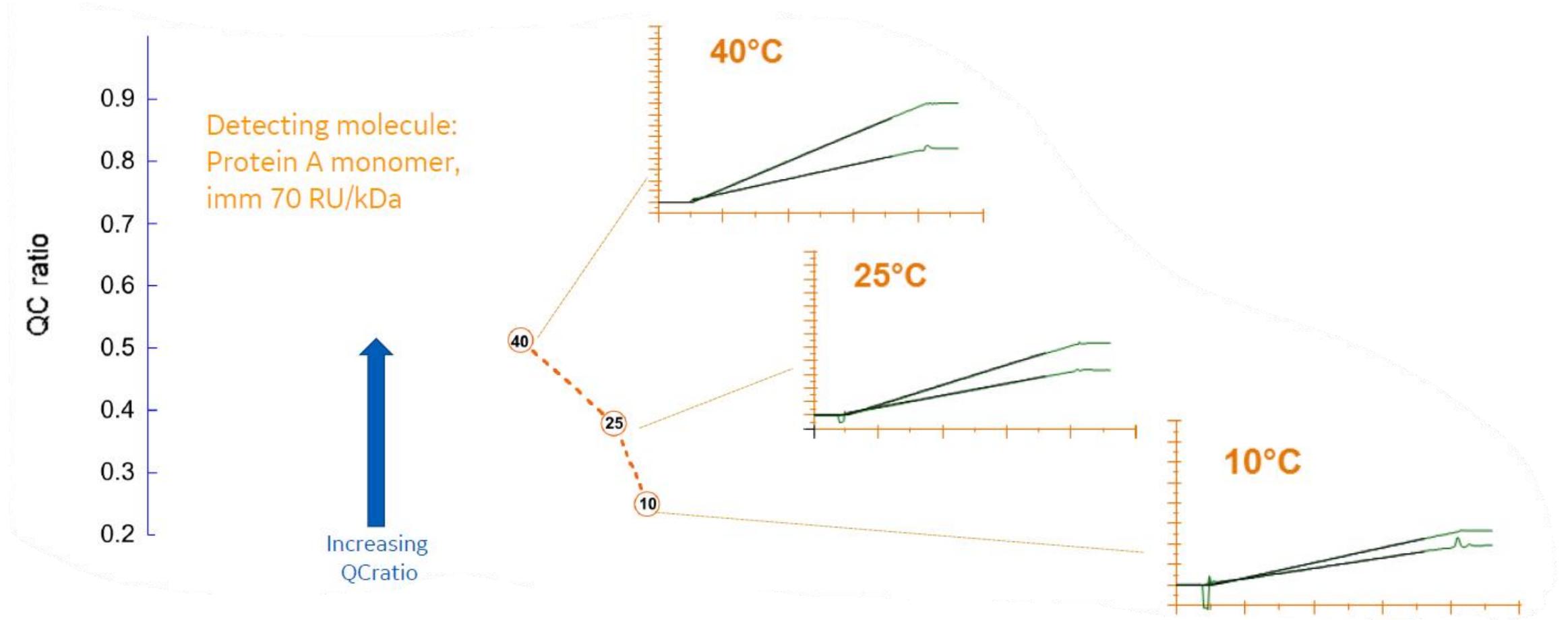
なお  $f_{\text{high}} = 100 \text{ uL/min}$ ,  $f_{\text{low}} = 5 \text{ uL/min}$  とし

$QC_{\text{ratio}} > 0.2$  ならば

$\text{Slope}_{\text{high}} > 1.34 * \text{Slope}_{\text{low}}$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dR}{dt} = f(M_w, k_m, \text{Conc}) \\ k_m = 0.98 \cdot \sqrt[3]{\frac{D^2 \cdot F}{h^2 \cdot w \cdot 0.3 \cdot l}} \end{array} \right.$$

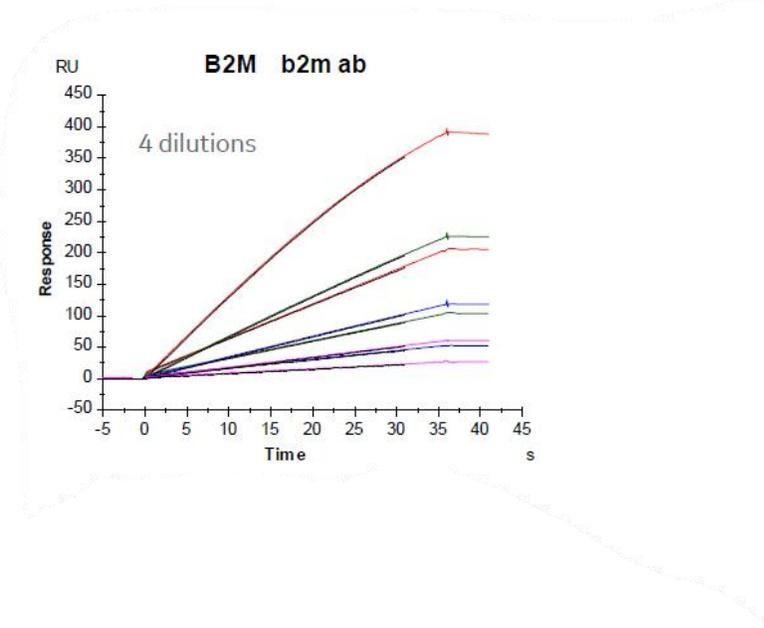
# (補足) QC<sub>ratio</sub>を向上：温度を高くして測定する (Avastin®)



# Sensitivity check とは？

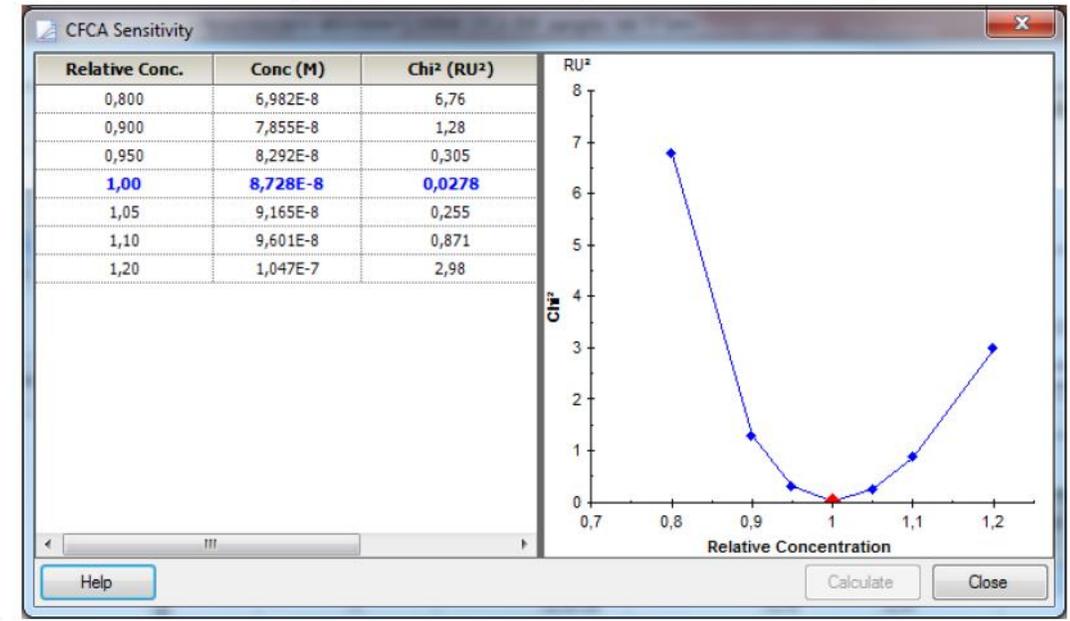
## Biacore T200 v3 から追加された機能

- CFCA で得られた濃度の  $\pm 5\%$ ,  $10\%$ ,  $20\%$  の濃度で再計算
- 横軸を Relative concentration に取りグラフに表示
- Relative conc. = 1 が鋭い谷底になれば OK



$$\frac{dR}{dt} = f(M_w, k_m, \text{Conc})$$

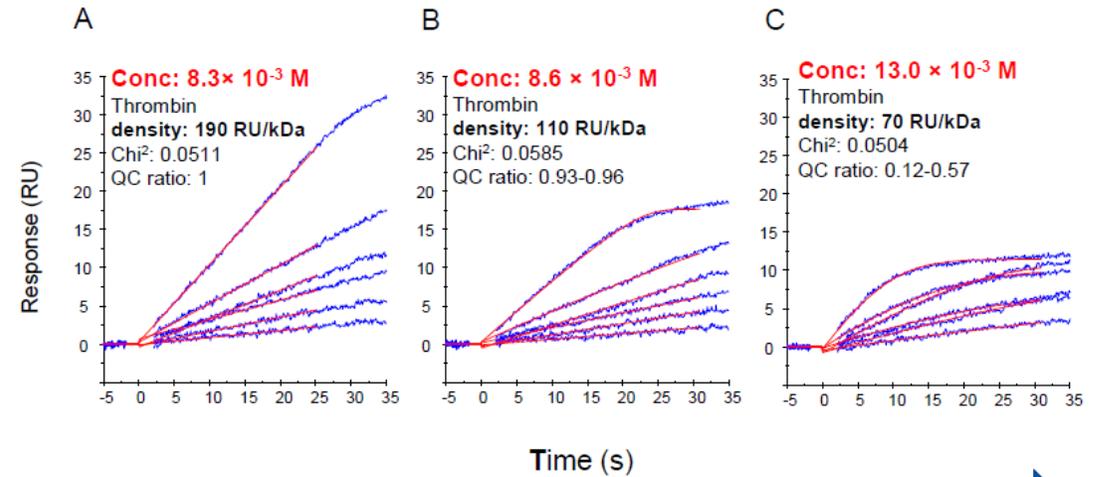
- 1)  $\pm 5, 10, 20\%$  する
- 2) (当然) フィッティングが悪くなる  
→  $\text{Chi}^2$  は大きくなる  
→ 大きくならなければ濃度と無関係にフィットしている  
= CFCAで得られた濃度は意味がない



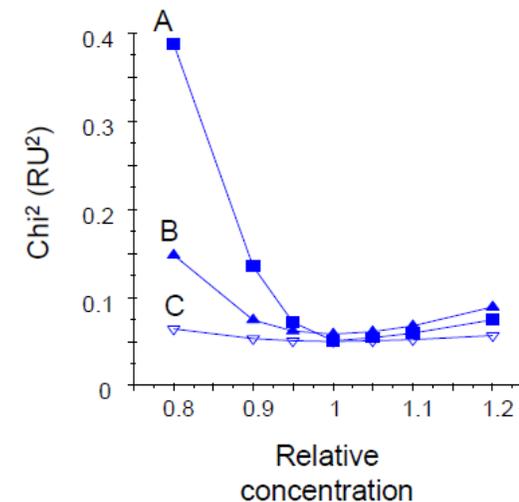
# 固定化量と Sensitivity check、および非対称な結果について

## Thrombin 固定化表面に対する Melagatran の測定

- Thrombin の固定化量が低くなる→  $QC_{ratio}$  が小さくなる
- CFCA で得られる濃度値も増加方向にずれる
- 経験則的には 30-100 RU/kDa 程度のリガンド量を確保すると良い
- またアナライト濃度は 0.5-50 nM 程度  
不明な場合は複数の希釈溶液で測定しGlobal fit
- Sensitivity check の結果では  $Chi^2$  のプロットが非対称
- 真の濃度は算出された濃度値以上の可能性がある



Decreasing density of thrombin



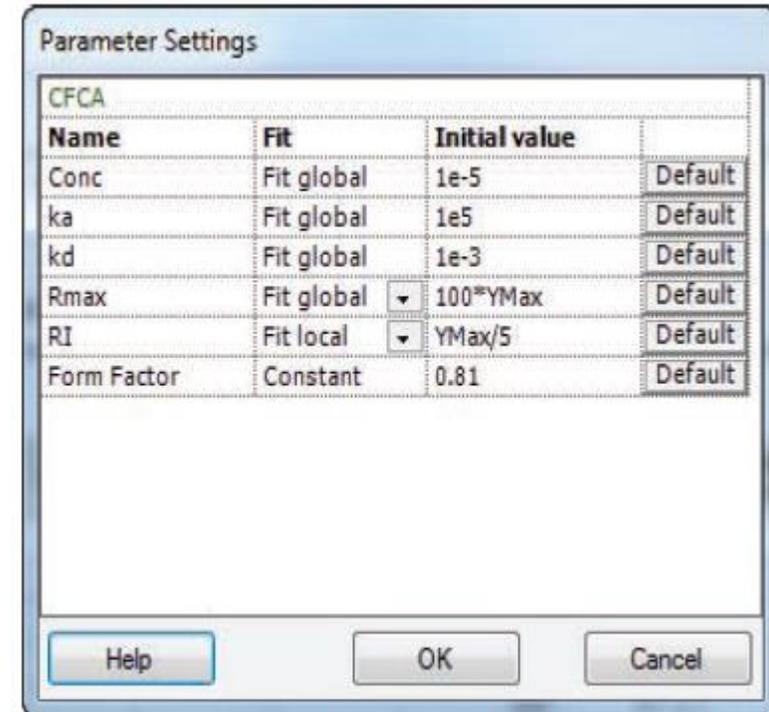
# 4

よくあるギモン

# 1:1 binding 以外の結合様式にも適用して良い？

## 抗体なら問題なし

- CFCA の解析では 1:1 binding model で固定されており変更不可能
- しかし例えば抗原を固定化されたセンサー表面に抗体を添加すると avidity 効果をもたらすが、シミュレーションでは低濃度（1-4 nM = 0.15-0.6 µg/mL）を使用すれば avidity は濃度データに影響を与えないことが分かっている
- フィットがうまくかからない場合は Parameter を変更
  - Conc, ka, kd: 適宜変更可能
  - Rmax: キャプチャー法で CFCA を行う場合は Fit local に
  - RI: 見た目ではバルクが存在しないなら 0 に
- Heterogeneity については影響あり
  - アナライトがポリクローナル抗体の場合や、翻訳後修飾や凝集して複数の形態で存在する場合
  - 非特異的結合がある場合



# CM5 以外にも適用可能？キャプチャー法には？

## CM3 なら良い

---

- CM3 なら実際の CFCA 分析で得られる結果としてはほとんど変化がないため適用可能
- 絶対濃度定量という意味合いでは真値からのズレが大きくなりがちなので相対濃度定量で用いるのが良い
- 一方で CM7 chip を使用した場合は正しい濃度測定ができなかったと報告がある（隣のキャプチャー法のpaper）

## キャプチャー法にも適用可能

---

- Talanta 148(2016)478–485, Visentin
- 比較的  $QC_{ratio}$  が悪くとも測定可能だった
- いくつかの仮定条件がリガンドを直接固定化した時と同等であると考えられる

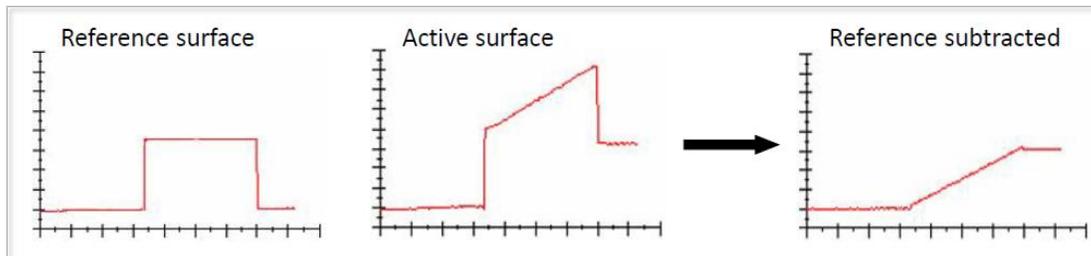
# Subtraction は実施した方が良い？ 特にクルードなサンプルを測定するときの大きなバルクについて

## (1) Reference subtraction

- 基本的に必須
- ProteinA, G, L chip を使用して抗体の濃度定量を行う場合は Reference cell を設定できないため、できる限りランニング緩衝液組成と近づける
  - 100倍希釈以上か溶液交換を推奨

## (2) Blank subtraction

- 可能であれば実施する
- 例えば血清ならサンプルと同じ希釈倍率の negative serum をブランクとして差し引く
- なお血清をサンプルに用いる場合は10倍以上の希釈倍率を推奨
- また血清測定時はデキストランに対する非特異が発生しやすいため NSB Reducer (BR100691) を終濃度 1mg/mL で添加するのも効果的



# 5

## 利用例

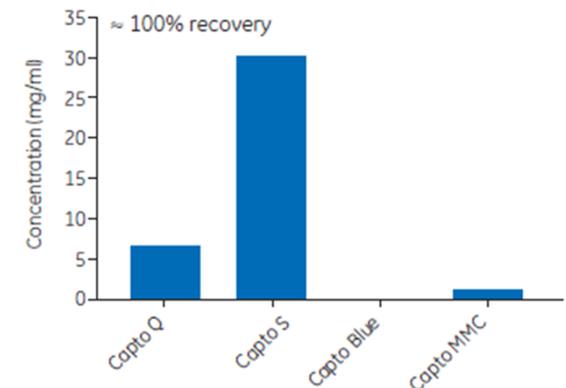
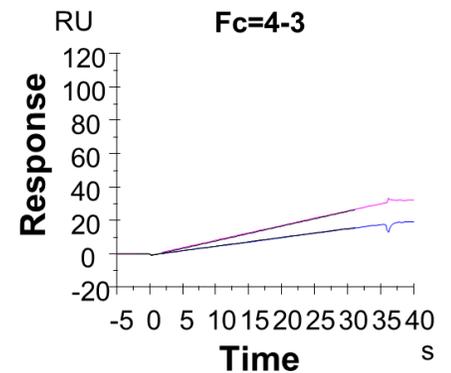
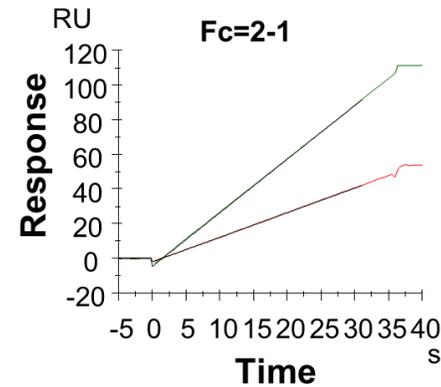
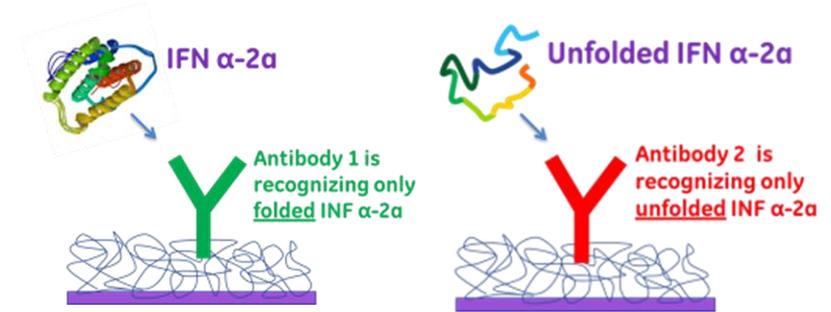
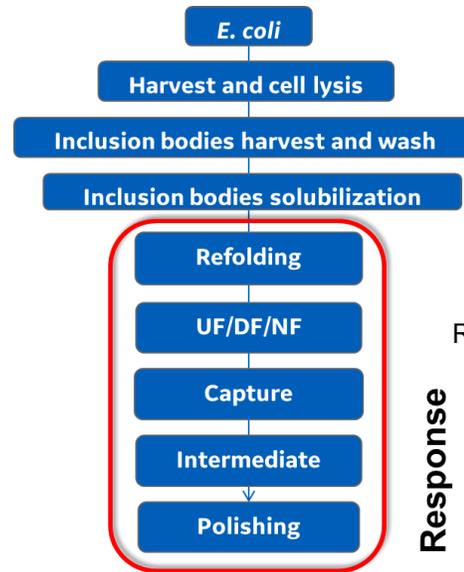
# (プロセス開発) Interferon $\alpha$ -2a

## 精製工程での活性率の検証

- 開発中のバイオシミラー製品に対する先発品との正確な比較検討
- 大腸菌から封入体として発現、8M Urea で可溶化以降から Biacore T200 を用いた検討開始
- 不純物が混入したプロセス開発工程中のサンプルを分析

### <CFCAの利用方法>

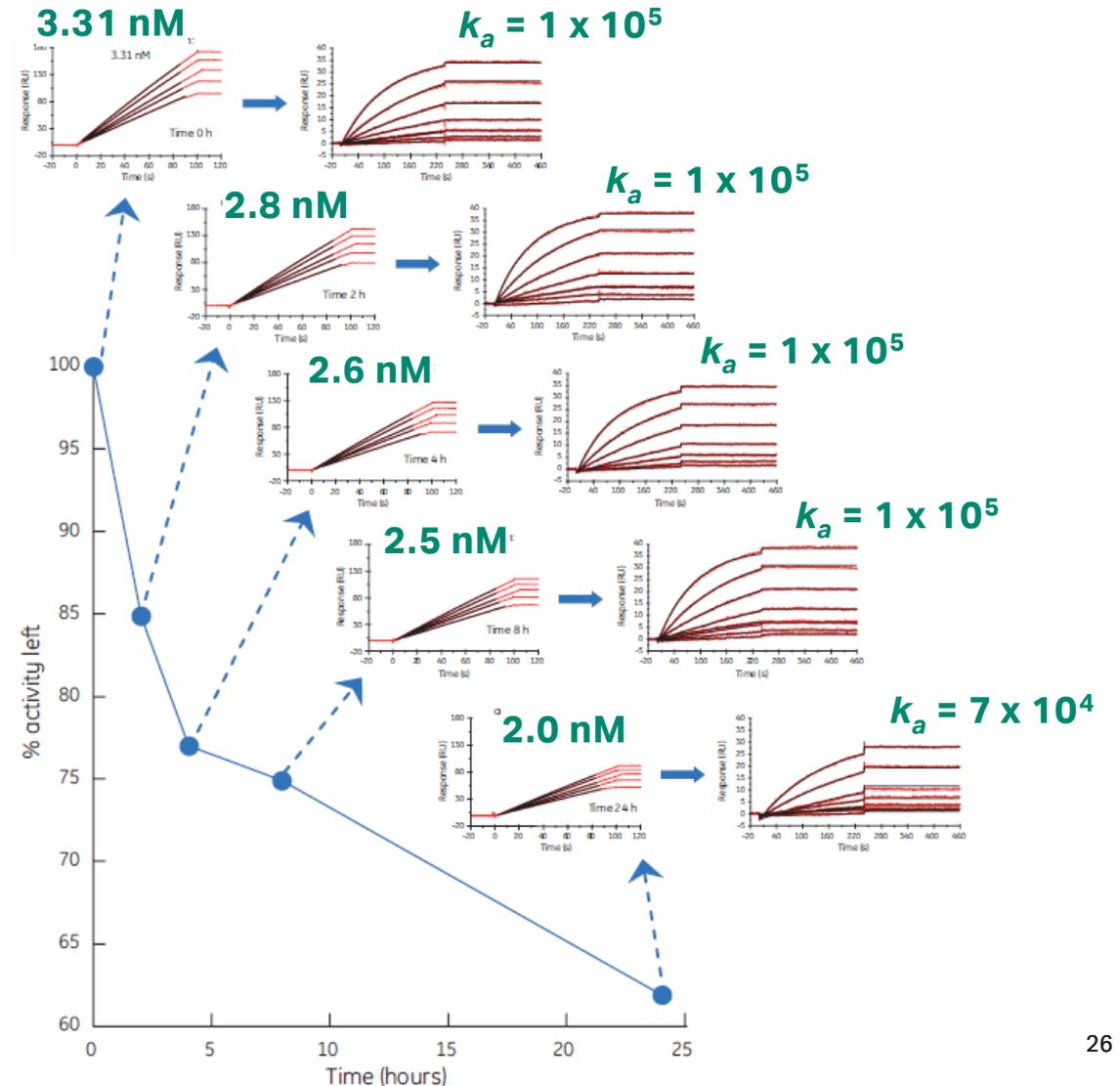
- Folded/unfolded INF  $\alpha$ -2a 認識抗体を用いて最適なリフォールディング条件検討
  - pH、アルギニン濃度、希釈率、GssG/GsH
- Capture、Intermediate、Polishing 工程における最適なメディアの条件検討
  - 陰イオン交換体Capto QやCapto adhere、陽イオン交換体のCapto SやCapto MMC、アフィニティメディアのCapto Blue、HICのCapto ButylやCapto Octylなど



# (品質管理) Stability study ストレス後の加速試験過酷試験

## IgE受容体α鎖を固定化した表面に組換えIgE様タンパク質を添加

- 組換えIgE様タンパク質は熱ストレスに曝された (~24h) のちに CFCA 分析
- 8時間までは活性の低下は濃度の低下のみに依存し  $k_a$  は変化しない
- 24時間後には  $k_a$  も変化し始めた
- こういった測定系はストレスチェックのみならず通常のバッチテストなどにも応用可能



# (品質管理) Dose Response Curve による potency assay 代替法

## Dose Response Curve を 4-parameter fitting するのは大変

- USPおよびEUのガイドラインでは 4 parameter fit を用いて Relative potency を決定することを推奨

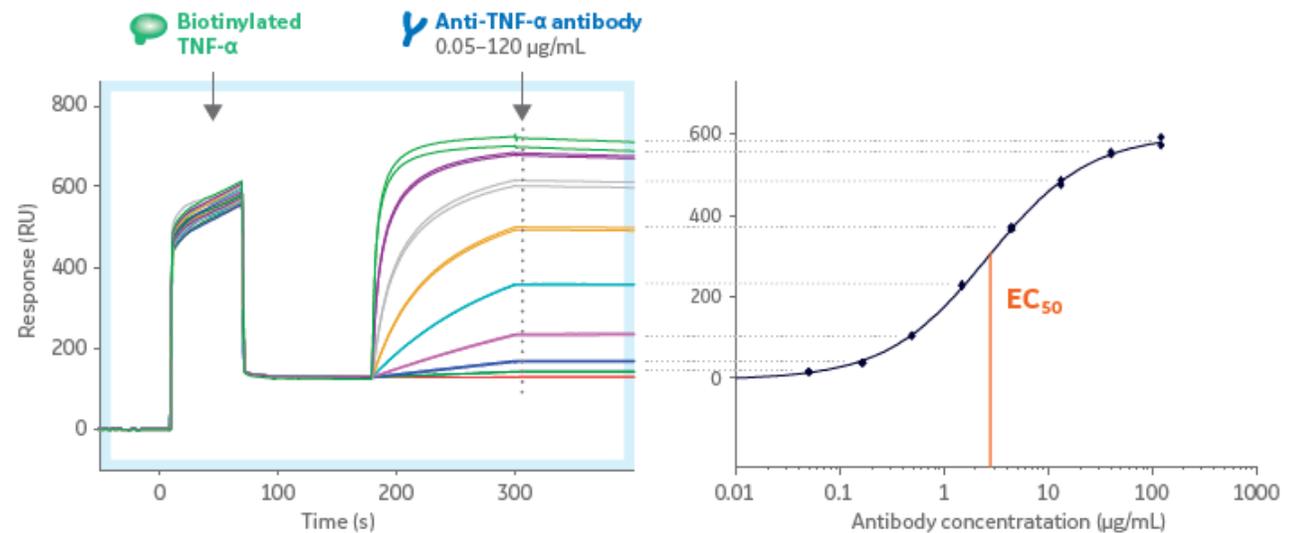
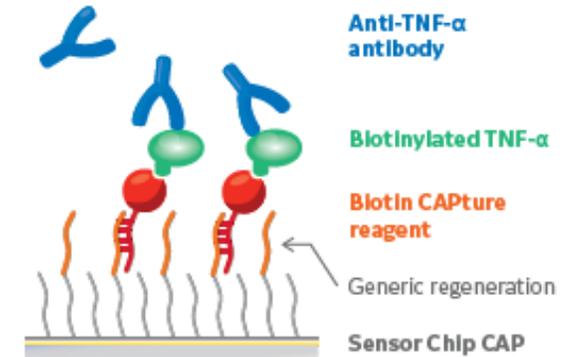
<4-parameter fitting の条件は厳しい>

- 低濃度と高濃度の漸近線が取れていること
- カーブの直線部分に少なくとも3点のデータが取れていること
- 直線性の範囲内で正確であることなど

↓

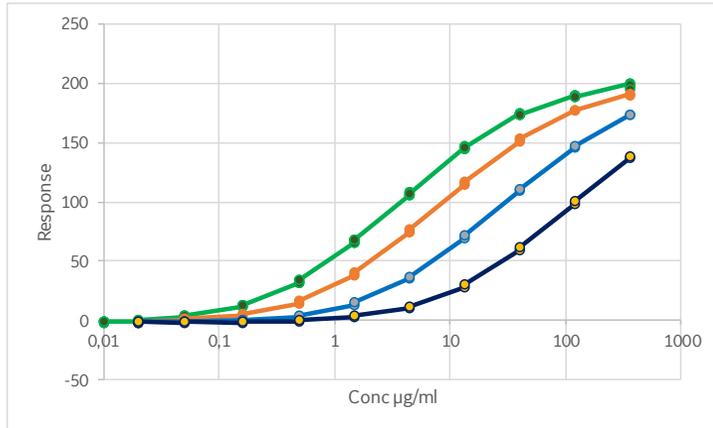
データポイント数も多く手間

添加時間はどうするか？ 見るべきパラメータも増える



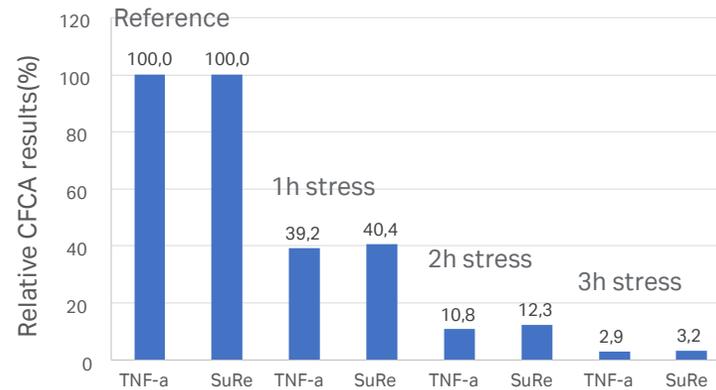
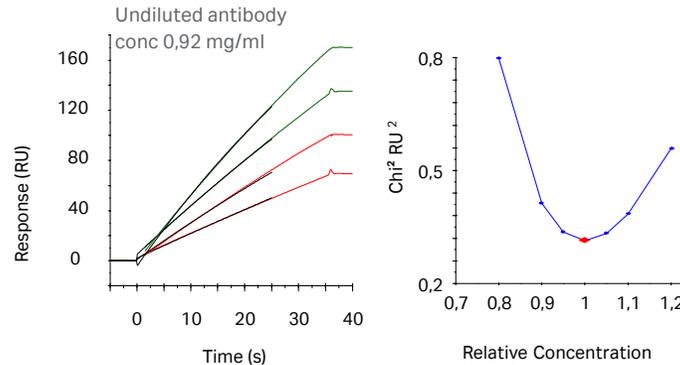
# Dose Response Curve よりも簡単に同等の結果を得る

## EC<sub>50</sub>

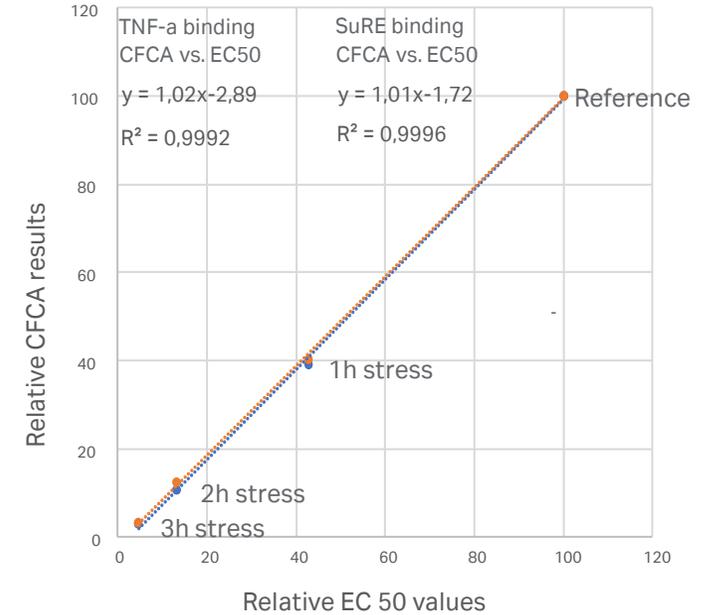


Sample	EC50 µg/ml	Relative potency
Reference	3.6	100.0
1h stress	8.4	42.9
2 h stress	27.3	13.2
3 h stress	77.4	4.7

## CFCA: Ab binding to TNF-α and SuRe



## EC<sub>50</sub> と CFCA は強く相関



ストレスにより Paratope も Fc も同様の  
変化を受けた

# 粒子（ウイルス）の CFCA

## 事例が増えつつある

---

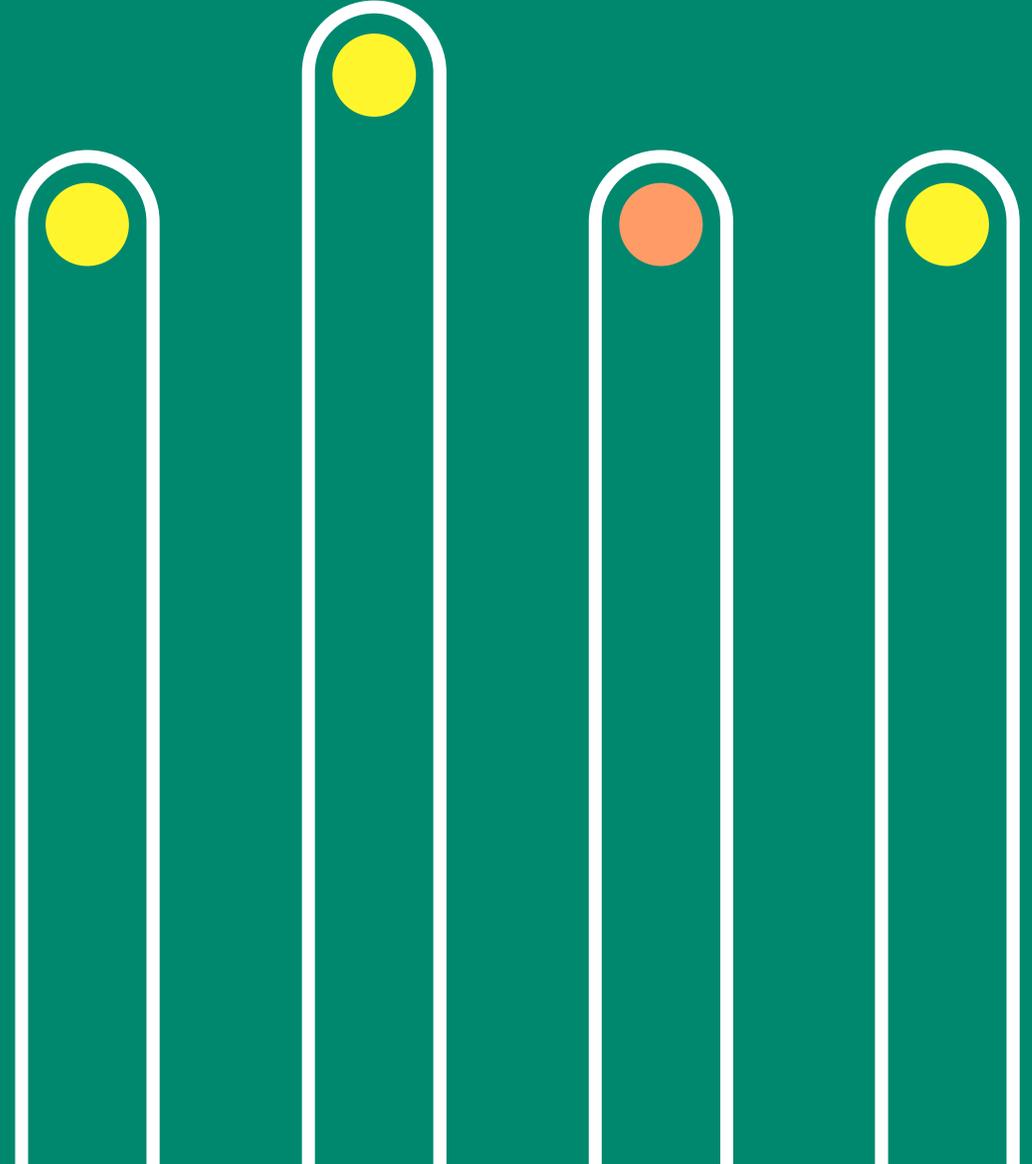
- ポリオワクチンの濃度定量 : Vaccine 29(18),3390-7  
Measuring poliovirus antigenicity by surface plasmon resonance. Application for potency indicating assays.  
Poliovirus: Methods and Protocols -Chapter 16
- 非エンベロープ型 geminivirus の Tomato Curl Sudan Virus の CFCA 濃度測定の結果も上記ポリオワクチンの濃度定量結果と一致

# まとめ

- CFCA は絶対結合活性濃度を測定可能である
  - 従来の濃度測定方法では困難
- MTL 条件下でのレスポンスが  $k_m$  に依存することを利用している
- 真の結合活性濃度を知ることによって正しい kinetics 解析が可能になる
- CFCA はタンパク質の品質管理、タンパク質の活性に対する修飾やストレスの影響の測定、バッチ間管理、精製工程の指針、ワクチン研究における抗体反応の測定などに利用されている
- 絶対濃度はいくつかの仮定を前提にしているため、結果として得られたデータは相対的な濃度として解釈している例も多い



**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](http://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8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。

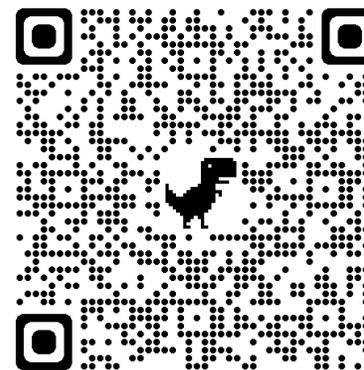
[Learn More](#)

#### 【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](#)



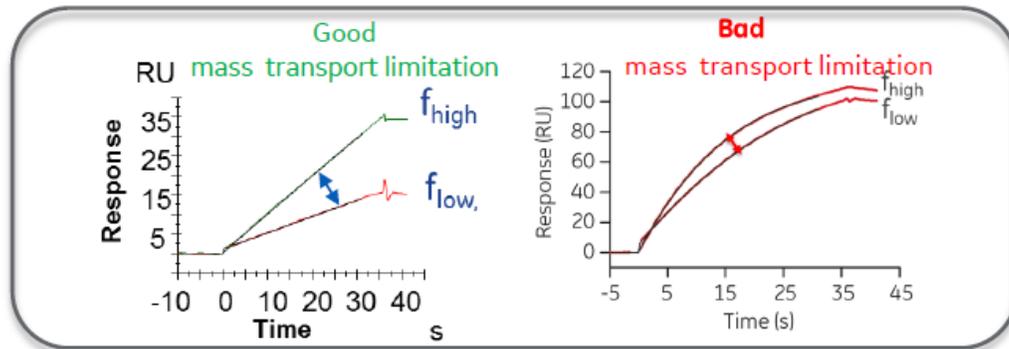
# 6

## Appendix: より詳細な理論的解説

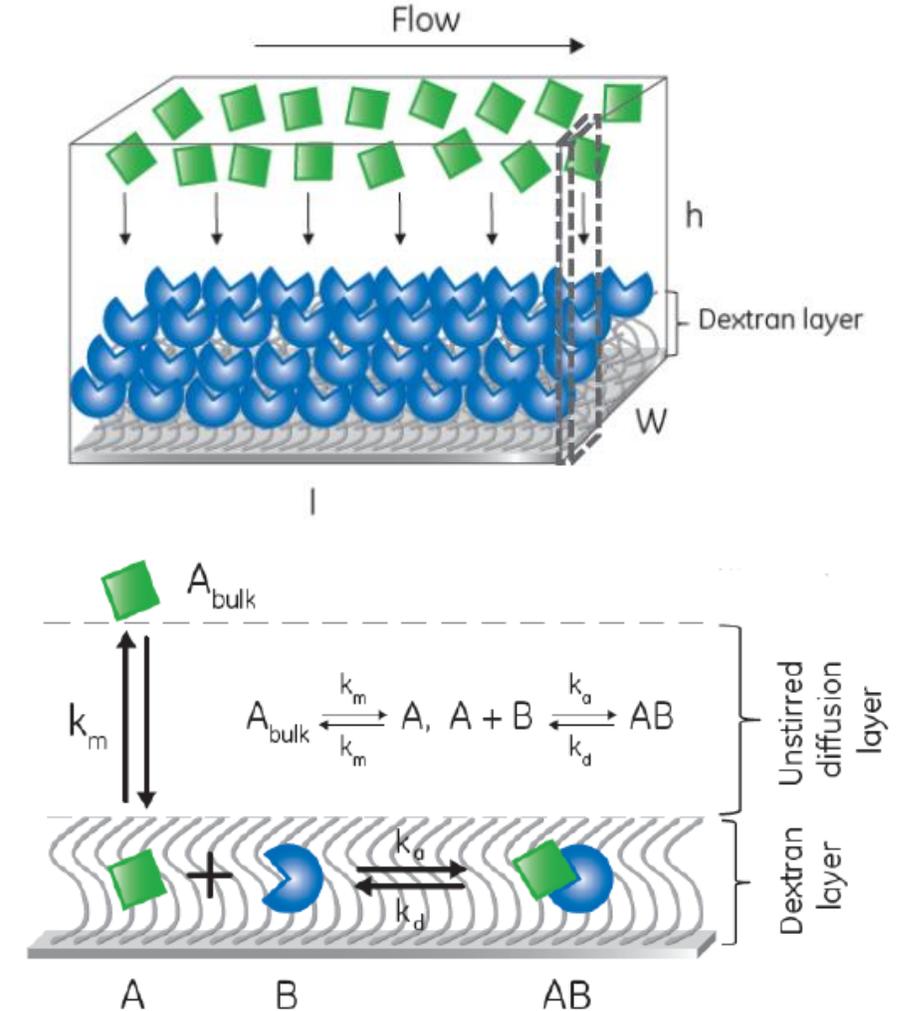
# CFCA 原理

## MTLが強くなる状態のポイント

- MTLが強くなる：リガンドを大量に固定化（右図）
- $k_a \gg k_m$  の状態（※正確な表現ではない）なら AB 複合体の形成（= 結合相のセンサーグラム）は
  - $k_a$  に依存せず  $k_m$  に依存する
  - アナライトが供給されると即時レスポンスに反映
  - 結果センサーグラムは直線的に
- $k_m$  は流速で制御可能：流速依存性的なセンサーグラム



■ = A, protein    ● = B, detecting molecule



## (参考) 最も重要なパラメータ、mass transport constant $k_t$

拡散によるアナライトAの流れ（流束）は単位面積あたりに単位時間に通過するAの量Jで表される。

簡単のためy方向にAの濃度が増加している状況を考えると、流束はAの濃度が高い方から低い方に生じ、かつ流束の大きさは濃度勾配に比例するとみなせ（フィックの法則）、その比例係数Dを拡散係数と呼ぶ。

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial y} \quad \text{この法則を定常状態で記述すると以下ようになる。}$$

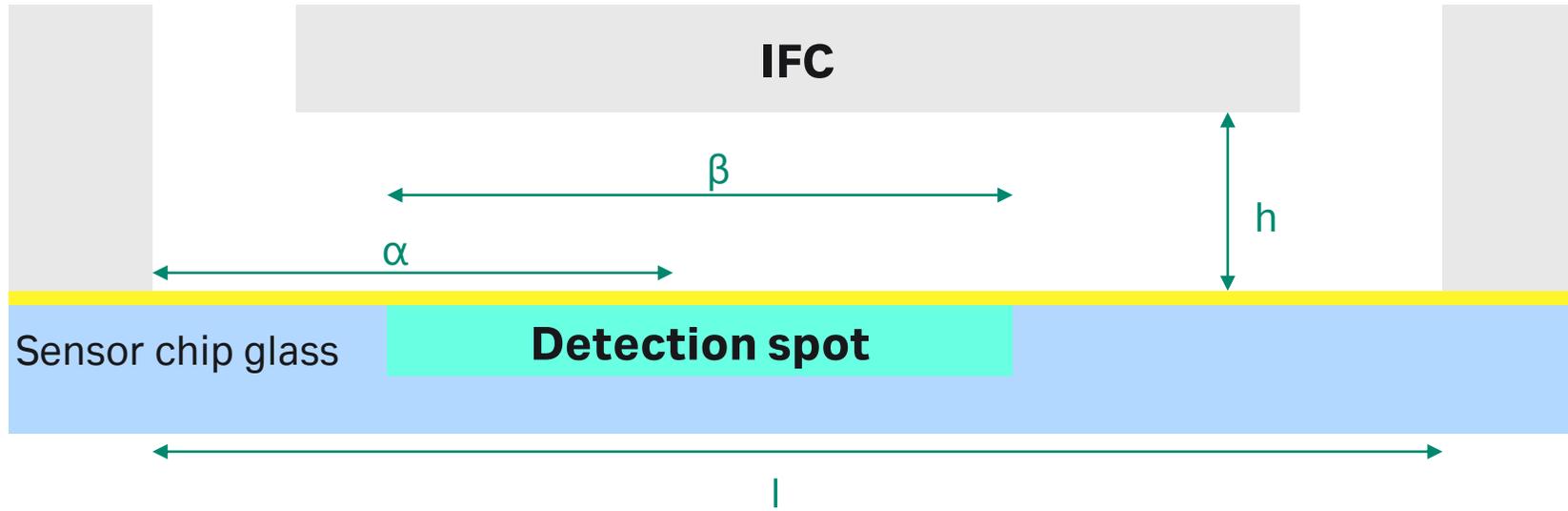
$$J = k_m \cdot (C - C_s) \cdot 10^3 \left[ \frac{10^3 \cdot \text{mol}}{\text{m}^2 \cdot \text{s}} \right] \quad \begin{array}{l} \text{ここで } k_m [\text{m/s}], C [\text{M} = \text{mol/L} = 10^{-3} \text{ mol/m}^3] \\ \text{さらにこれをBiacoreで得られるレスポンスRUを使って記述すると以下ようになる。} \end{array}$$

$$J \cdot G = \frac{dR}{dt} = k_m \cdot (C - C_s) \cdot 10^3 \cdot G \left[ \frac{\text{RU}}{\text{s}} \right] \quad \text{さらに } 1 \text{ RU} = 10^{-6} [\text{g/m}^2] \text{ を利用すると}$$

$$\frac{dR}{dt} = k_m \cdot (C - C_s) \cdot 10^9 \cdot M_w \left[ \frac{\text{RU}}{\text{s}} \right] \quad \text{なお以下のように } k_t \text{ を定義する：}$$

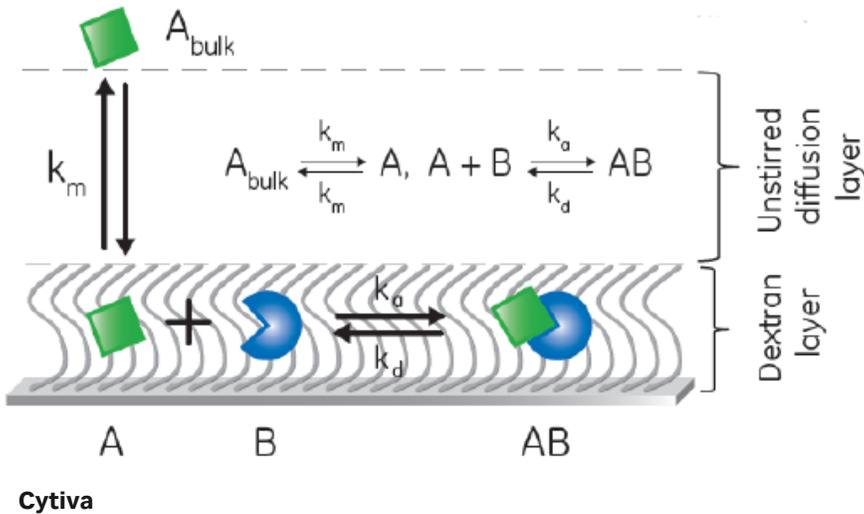
$$k_t = k_m \cdot 10^9 \cdot M_w \left[ \frac{\text{RU}}{\text{M} \cdot \text{s}} \right] \quad \therefore \frac{dR}{dt} = k_t \cdot (C - C_s) \left[ \frac{\text{RU}}{\text{s}} \right]$$

(参考) mass transport coefficient  $k_m$



T200

$\alpha = 1.28 \times 10^{-3}$  [m]  
 $\beta = 1.80 \times 10^{-3}$  [m]  
 $l = 2.9 \times 10^{-3}$  [m]



$$k_m = 0.98 \cdot \sqrt[3]{\frac{D^2 \cdot F}{h^2 \cdot w \cdot l}} \quad \text{Heterogeneous mass transport coefficient}$$

$$k_m = 0.98 \cdot \sqrt[3]{\frac{D^2 \cdot F}{h^2 \cdot w \cdot 1.5^{-3} \cdot l}} \quad \text{Average mass transport coefficient}$$

$$k_m = 0.98 \cdot \sqrt[3]{\frac{D^2 \cdot F}{h^2 \cdot w \cdot (\alpha - \beta/2 + 1.5^{-3} \cdot \beta)}} \quad \text{In practical SPR detection system}$$

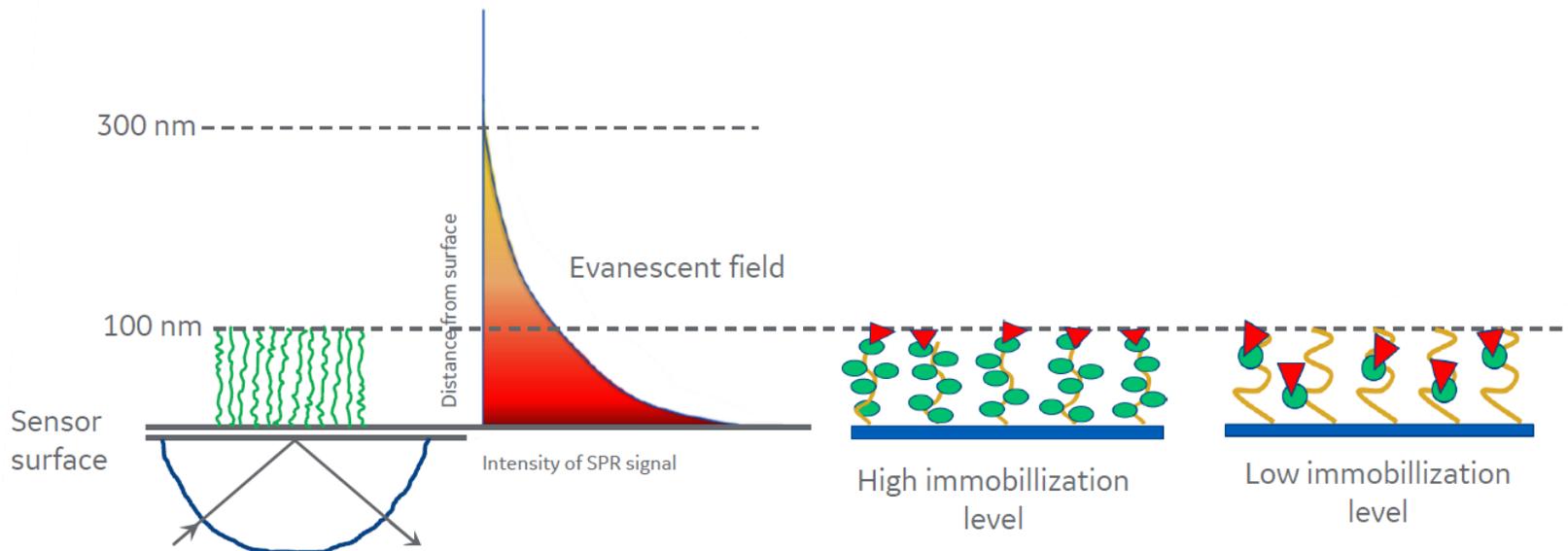
# (参考) Form Factor

1 RU =  $10^{-6}$  [g/m<sup>2</sup>] は、100 nm のデキストラン層（今でいう CM5 chip）にアナライトが均一に分布しているときに成立する。

しかしデキストラン層は固定化レベルやチップの種類によっても伸縮する他、アナライトがマトリクス中に一様に分布しているとは限らない。

SPRシグナルはセンサー表面から指数関数的に減衰するため、センサー表面から離れた分子は表面に近い分子よりも単位質量当たりのレスポンスが小さくなる。

これらの理由から、実際の CFCA データとアミノ酸分析データを比較し 0.81 という Form Factor を採用している（High immobilization level 想定）。



# CFCA の計算の要点

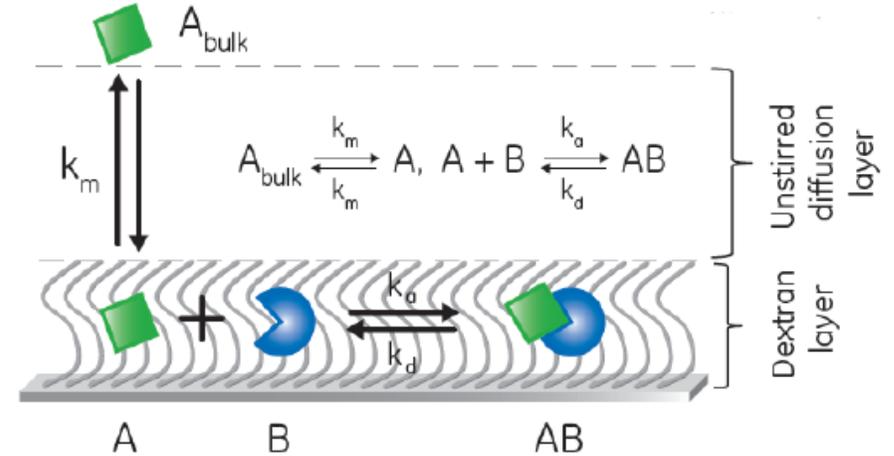
## 標品不要の濃度定量法

- 1) CFCA は MTL 条件下を想定した分析法
  - アナライトが供給されると即時レスポンスに反映
- 2) レスポンスは Unstirred diffusion layer (非攪拌層、バルク層) から Dextran layer (デキストラン層、表面層) への拡散律速

$$\frac{dR}{dt} = f(M_w, k_m, k_t, Conc)$$

$$k_m = 0.98 \cdot \sqrt[3]{\frac{D^2 \cdot F}{h^2 \cdot w \cdot 1.5^{-3} \cdot l}} \left[ \frac{m}{s} \right]$$

- 3) D 値を理論計算した場合は摩擦率が推定値
- 4) kt 値は 1 RU = 10<sup>-6</sup> [g/m<sup>2</sup>] を仮定
- 5) CM5 chip に大量にリガンドを固定化した時のアナライトの結合を想定し Form Factor (0.81) を採用
- 6) 1:1 binding model で解析



- 絶対濃度定量は理想的な環境下でないと難しい
  - 最大で15-30% 程度ずれることがある (経験的)
- 相対濃度定量なら仮定値を考慮する必要がない