



抗体スクリーニングにおける Epitope binningの活用と Biacoreでの測定

Prepared for Masami Koinuma

May 20, 2020



お知らせ：GE Healthcare Life Sciences（Biopharma事業）はCytivaに変わりました

2020年3月31日をもってDanaher CorporationによるGE Healthcare Life SciencesのBioPharma事業の買収が完了しました。

4月からは **Cytiva（サイティバ）** というブランド名のもと、新たにスタートいたしました。

Cytivaは、これまでと変わらず、お客様の“頼れるパートナー”を目指しています。

Agenda

1. そもそも Epitope binning とは？
2. どんな分野の方が、どんな時に利用する？
3. BiacoreでEpitope binningを行うと
4. 製品情報
5. トピック
6. 質疑応答

1

そもそもEpitope binningとは？

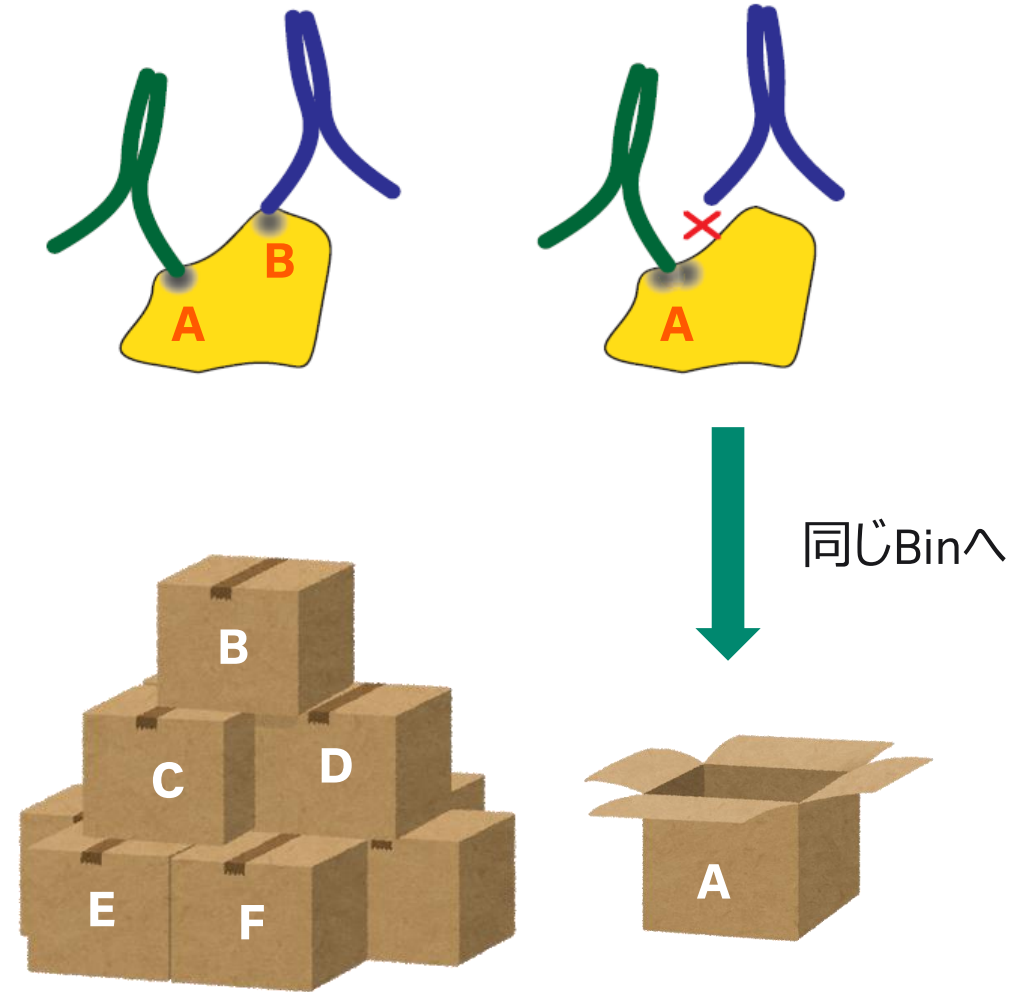
抗原に対して別々の抗体が結合できるかどうか

抗体のグルーピング = Bin

- Epitope = 抗体が結合できる抗原の一部分のこと
 - 3~8アミノ酸、数百~千数百Daとされています
 - 同じエピトープを持つなら同じBin（箱）へ

(参考)

- Paratope = 抗体上の抗原と結合する部分



2

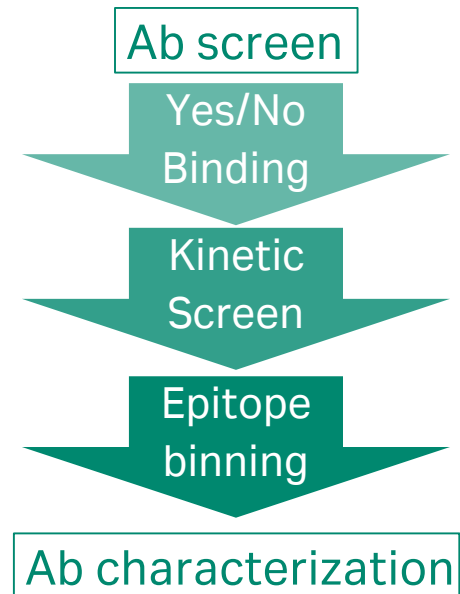
どんな分野の方が、どんな時に 利用する？

- 代表的な4つの用法について
- うち2つの実際の使用例のご案内

代表的な4つの用法について

① Biotherapeutics development

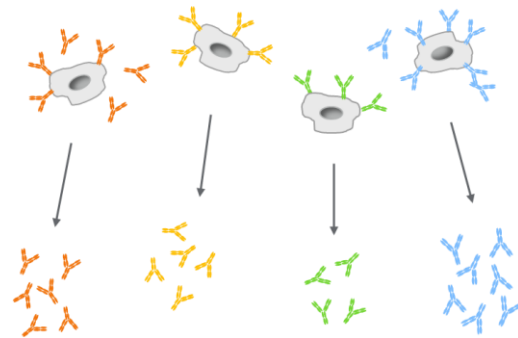
抗体スクリーニングにおいて異なるBinから選別するのに利用



Cytiva

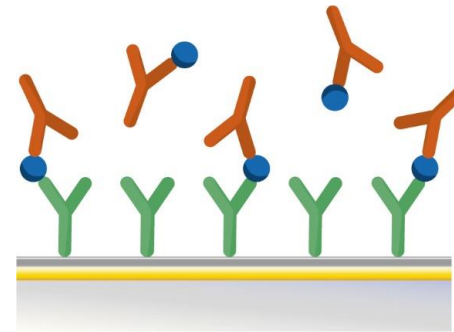
② Vaccine development

ユニバーサルワクチン開発のためB細胞やT細胞のエピトープを決定する



③ Diagnostic reagent

生体バイオマーカー分子の免疫学的検出のため



④ Intellectual property (IP) protection

知的財産を保護することや他社の特許を侵害していないかどうかの検証

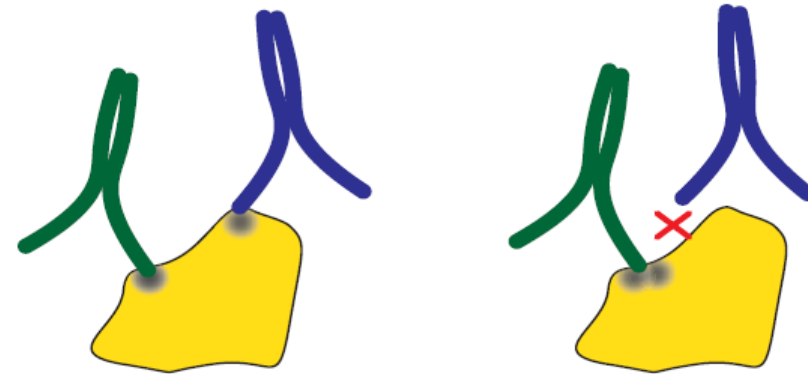


① Biotherapeutics developmentでの使用例

開発時に発生しうる「抗体の取り直し」を防ぎ開発スピードを上げる

- 抗体スクリーニングの評価指標を増やし、異なる特性を持つ抗体を候補に残せるようにする
- 抗体の評価指標
 - 親和力
 - 熱力学的安定性
 - 抗原特異性
 - Epitope bin

Screening



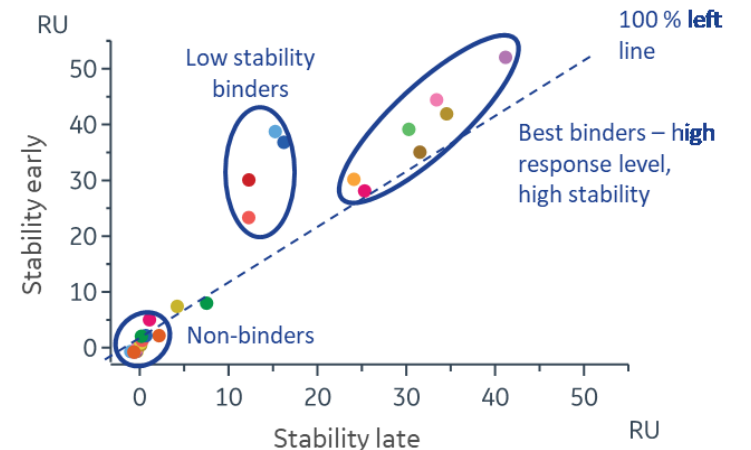
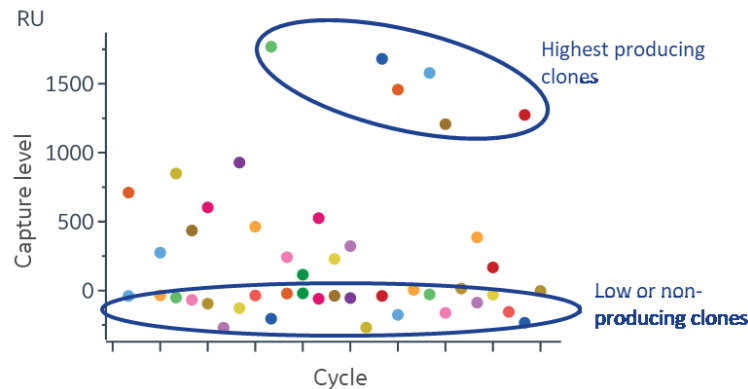
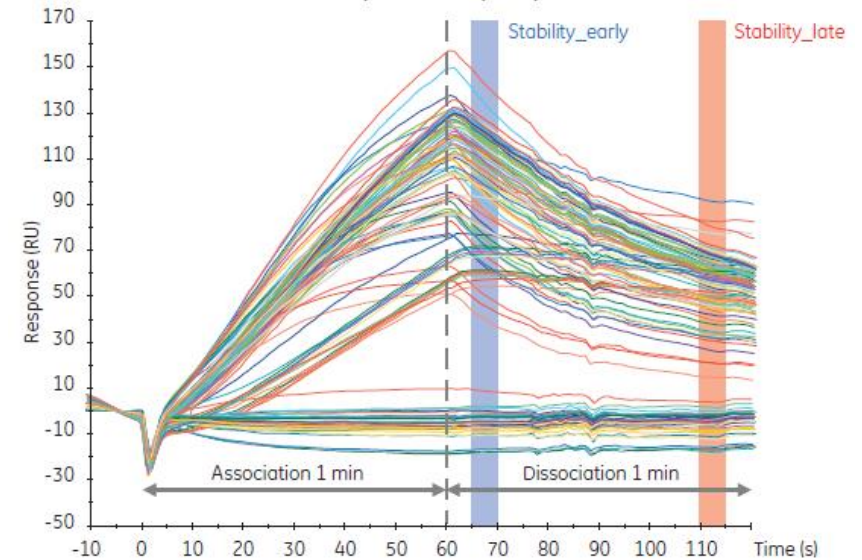
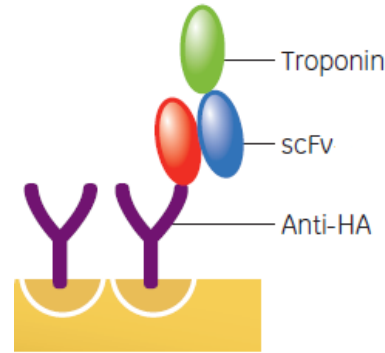
(参考) Yes/No binding 初期はReport point based screeningが用いられる

望ましい特性のものを選別する

- サンプルとしてはハイブリドーマ培養上清や大腸菌培養上清、ファージディスプレイなどを直接利用できることができる
- 抗原は1濃度添加すれば良い
- 発現量が十分なクローンの選別
- 複合体安定性の良いクローンの選別

https://www.cytivalifesciences.co.jp/technologies/biacore/pdf/B02_28-9214-33AA.pdf

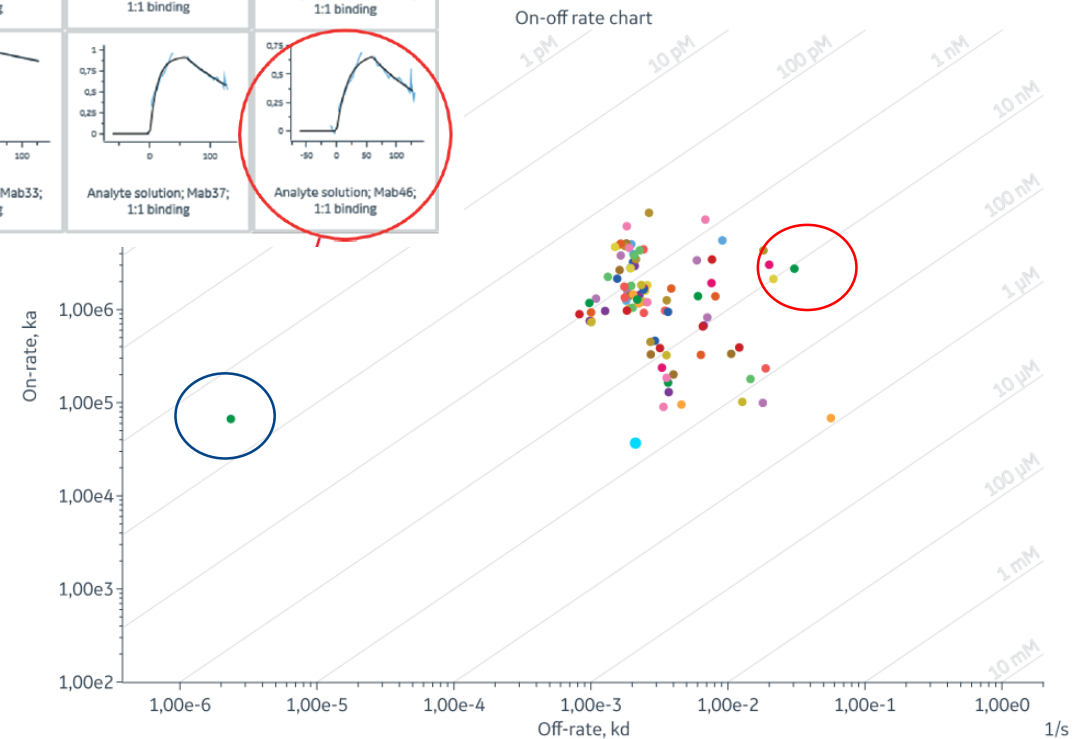
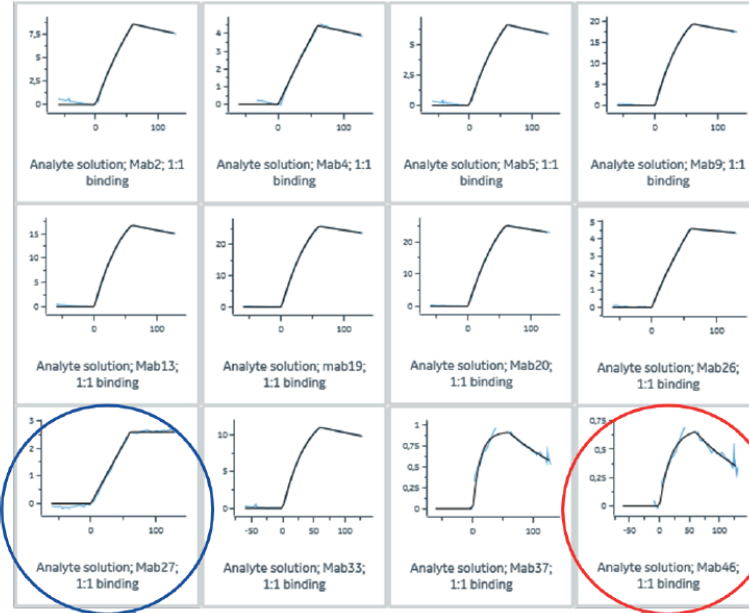
https://www.cytivalifesciences.co.jp/technologies/biacore/pdf/B03_28-9777-72AA.pdf



(参考) Kinetic screen

サンプル1濃度だけでkinetics解析を行い On-off rate chart を描く

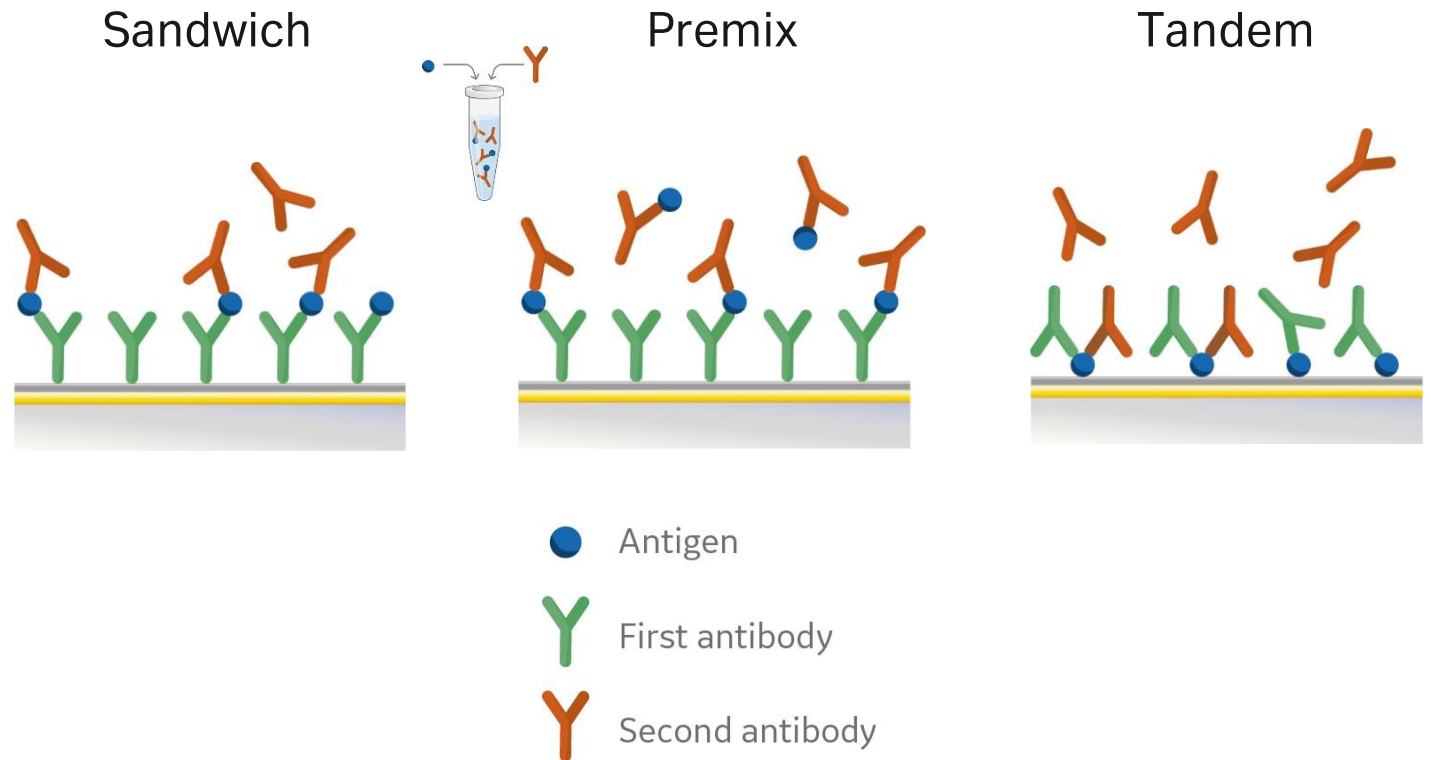
- On-off rate chart は各抗体の k_a と k_d をプロットし目的の特性を持つ抗体を選別する
- $KD = k_d/k_a$ より灰色のラインで示した範囲が同じKDを持つ
- 簡易的な k_d のランキングとしても利用される



Epitope binning

様々なアッセイフォーマットで解析

- 抗体の親和力や必要量、抗原の特性などで最適なフォーマットで測定・解析を行う
- ELISAと比較すると以下の点で優れる
 - 未精製のサンプルでも測定可能
 - ラベル化する必要がない
 - ラベルに伴うアーチファクトを除外できる
- 詳細な測定・解析法は後述



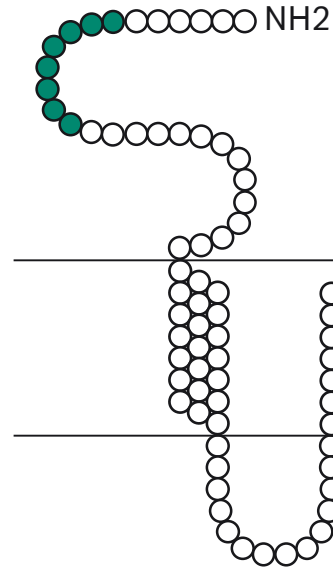
④Intellectual property (IP) protection での使用例

◆他社の特許を侵害していないことの検証

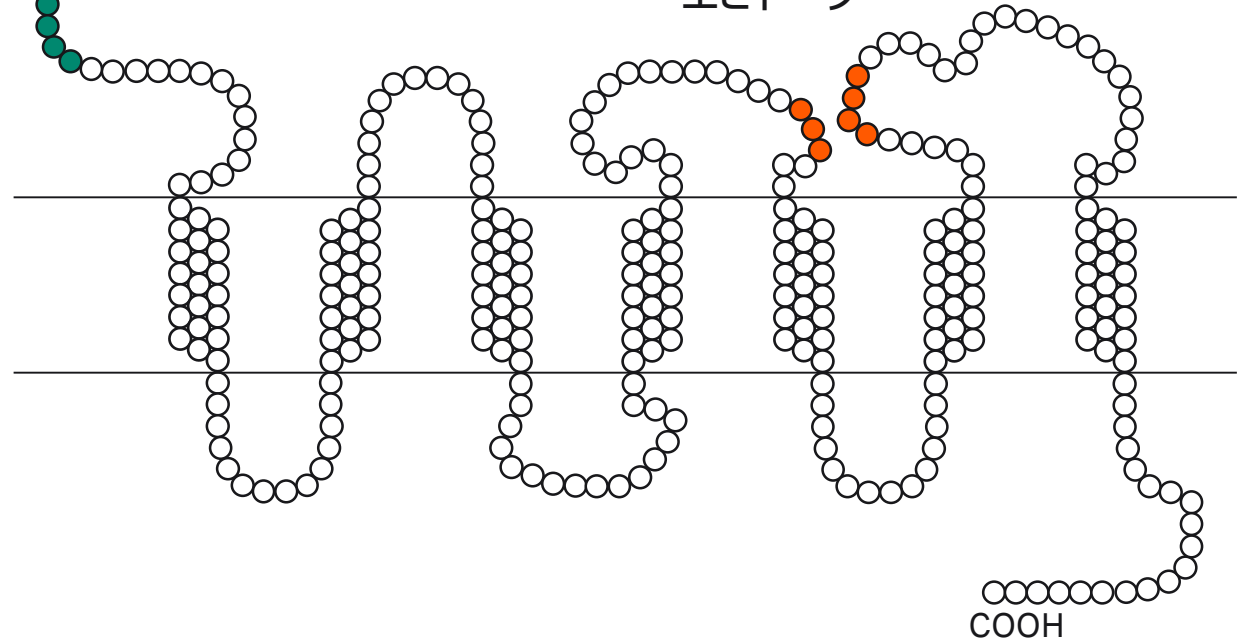
◆自社の製品の特許化

- 標的となりやすい抗原は限られており、多くの企業がその抗原に対する MoAb を作製している
- MoAb の特許出願により同じ機能薬効を示す MoAb を開発する競合を排除できる
- エピトープに関する情報を戦略的に使用して新規性・非自明性を示し特許を取得する

アミノ酸配列に基づく
エピトープ



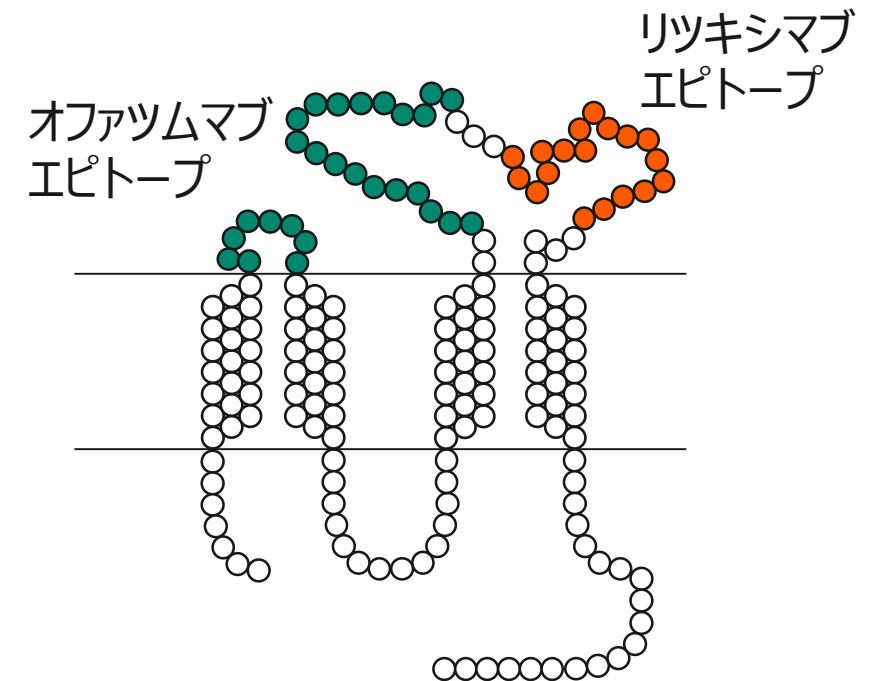
立体構造に基づく
エピトープ



GlaxoSmithKline (Arzerra) vs Biogen Idec (Rituxan), 2012 ～同一抗原に対するエピトープが異なると？～

異なるエピトープを持つことが証明できる限り、同じ標的に対して複数の MoAb が許可される例

- どちらもB細胞に発現するヒトCD20分子上の細胞外ループをエピトープに持つ MoAb
- Biogenはオファツムマブがリツキシマブの特許を侵害したとしてGSKを提訴
- リツキシマブとオファツムマブのエピトープは異なる
- 裁判ではリツキシマブの特許クレーム（請求項）は「リツキシマブが結合する特定のエピトープに対して類似の特異性を持つ抗CD20抗体に限定される」と解釈
- GSKは部位特異的変異誘発とペプチドスキャン技術を組み合わせてアーゼラの正確なエピトープを特定し、リツキシマブのエピトープの外側のサイトにあることを証明



Amgen vs Sanofi/Regeneron, 2017~

~明細書に製造方法やスクリーニング方法が十分に記載されていれば、
機能的な表現で定義された抗体に関する発明は記載要件を満たす~

Amgenの特許戦略

- AmgenはPCSK9に結合してその働きを阻害し、LDL-Cを低減させることができるモノクローナル抗体を開発
- しかしAmgenが3000個のクローンのスクリーニングを実施したところPCSK9に結合するモノクローナル抗体は85種類あることが判明、「エピトープではなく機能で特許クレームを記述する」戦略へ (➡)
- Sanofiも同様にPCSK9を標的とするモノクローナル抗体を開発するも、Amgenの特許を侵害していると判断され製品の差し止めが申し渡された
- 日本では2020年4月24日にAmgenの特許権が国内で有効であることが確定した
- Sanofi/Regeneronとしては少なくとも数十億ドルの損失

特許第5705288号

- 1 A : P C S K 9とL D L Rタンパク質の結合を中和することができ、
- 1 B : 2 1 B 1 2 参照抗体と競合する
- 1 C : 単離されたモノクローナル抗体

特許第5906333号 (特許第5705288号の分割)

- 2 A : P C S K 9とL D L Rタンパク質の結合を中和することができ、
- 2 B : 3 1 H 4 参照抗体と競合する
- 2 C : 単離されたモノクローナル抗体

3

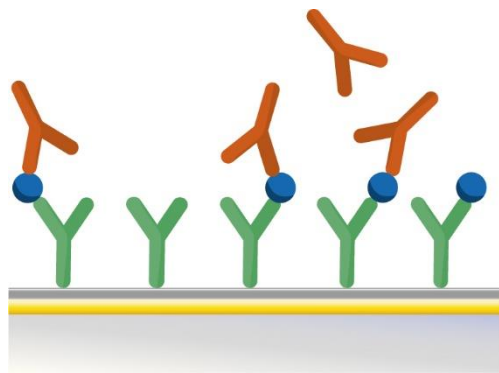
BiacoreでEpitope binningを行うと

- Biacore (8K series) で提供する3種類のフォーマットと測定の流れ
- Biacore Insight Evaluation Software による解析の流れ

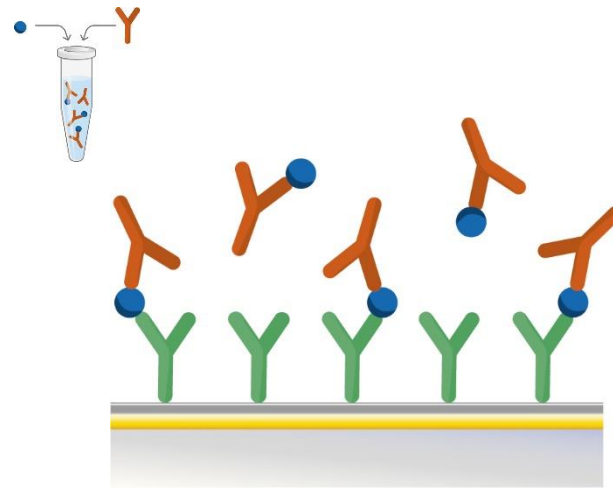


Epitope Binningの代表的な3つのフォーマットを用意

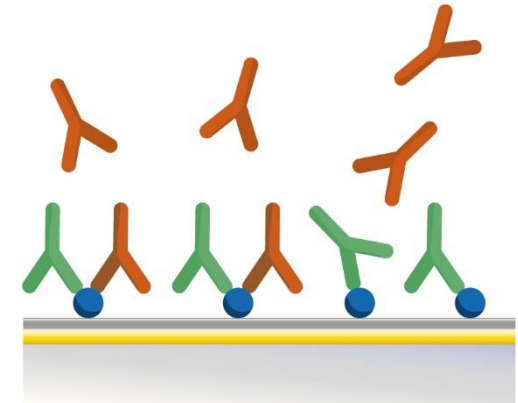
Sandwich assay



Premix assay



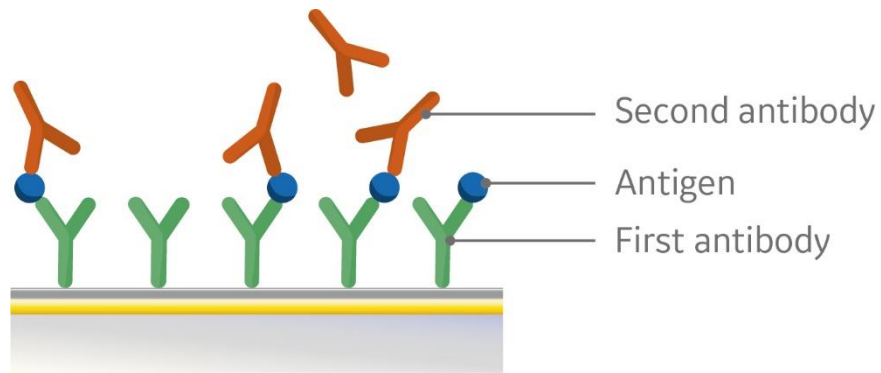
Tandem assay



- Antigen
- Y First antibody
- Y Second antibody

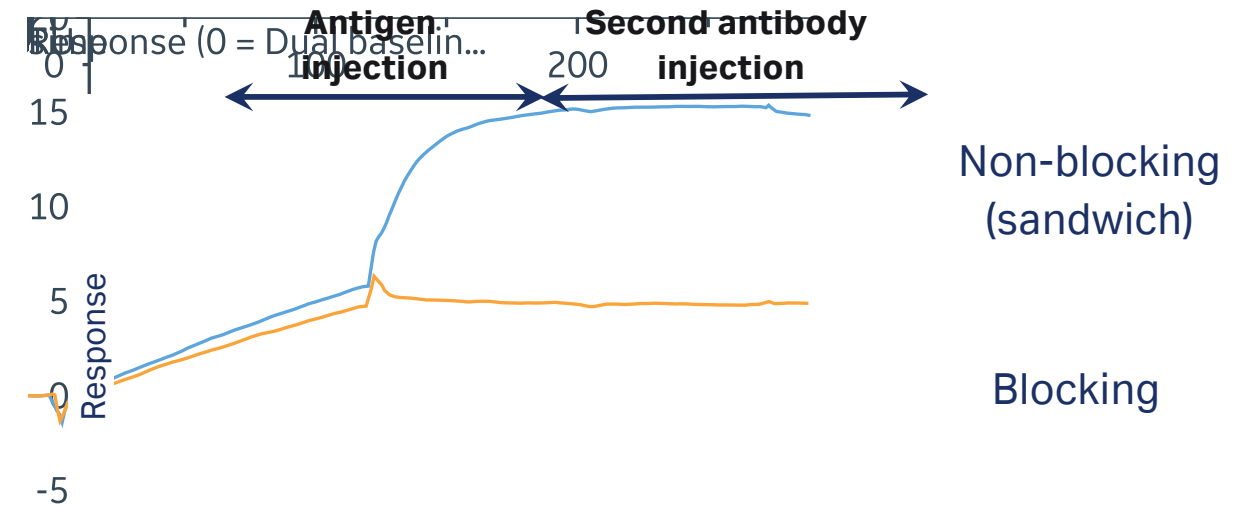
テンプレートを利用して簡単にセットアップ可能 ＜Sandwich assay の場合＞

Sandwich assay の概念図



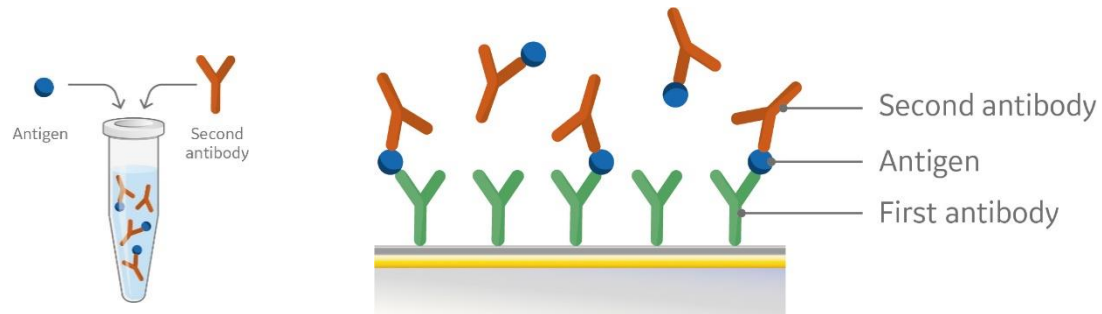
- 一次抗体はセンサーチップ表面に共有結合で固定化
- その上に抗原を添加し、続けて二次抗体を添加する

センサーグラム の例



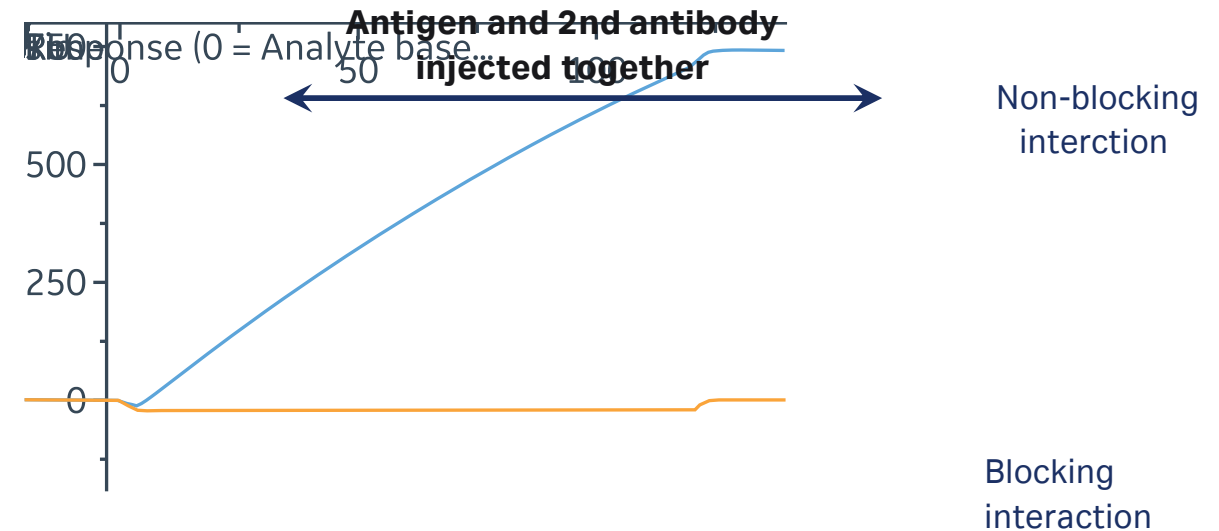
テンプレートを利用して簡単にセットアップ可能 ＜Premix assay の場合＞

Premix assay の概念図



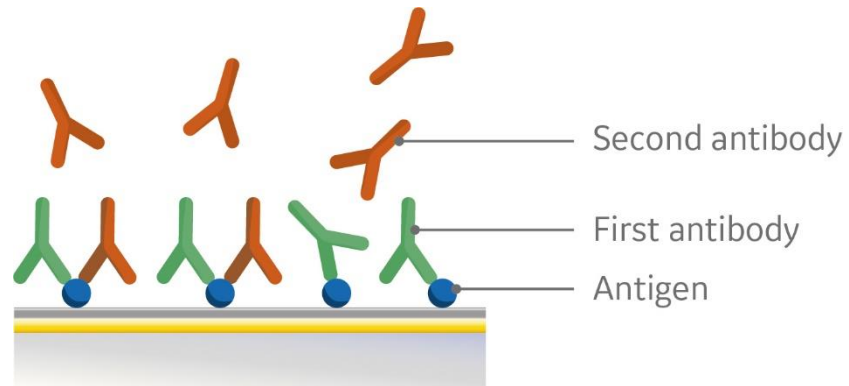
- Sandwich assayと同様に、一次抗体はセンサーチップ表面に共有結合で固定化
- 抗原と二次抗体はプレミックスしたものを添加する

センサーグラムの例



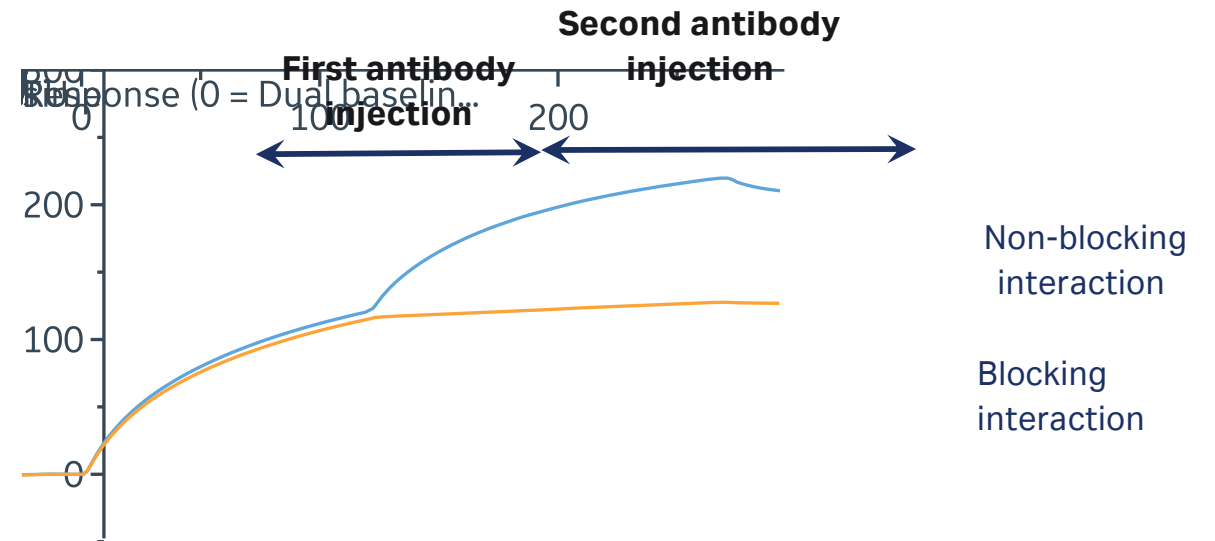
テンプレートを利用して簡単にセットアップ可能 ＜Tandem assay の場合＞

Tandem assay の概念図



- センサーチップ上に抗原を共有結合またはキャプチャー
- 一次抗体を添加後二次抗体を添加する

センサーグラム の例

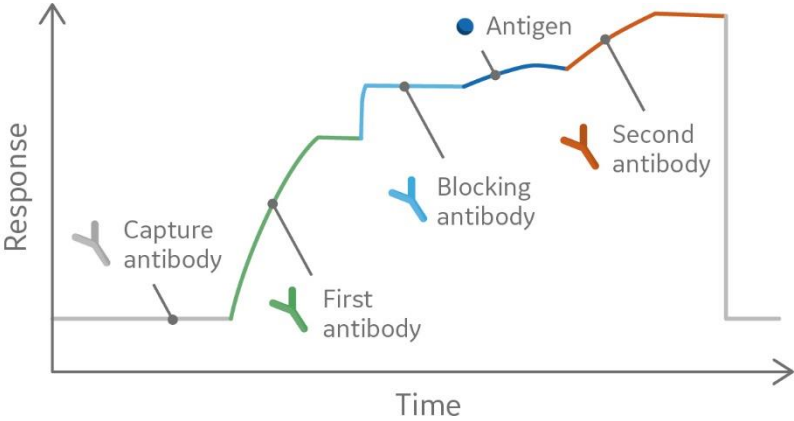
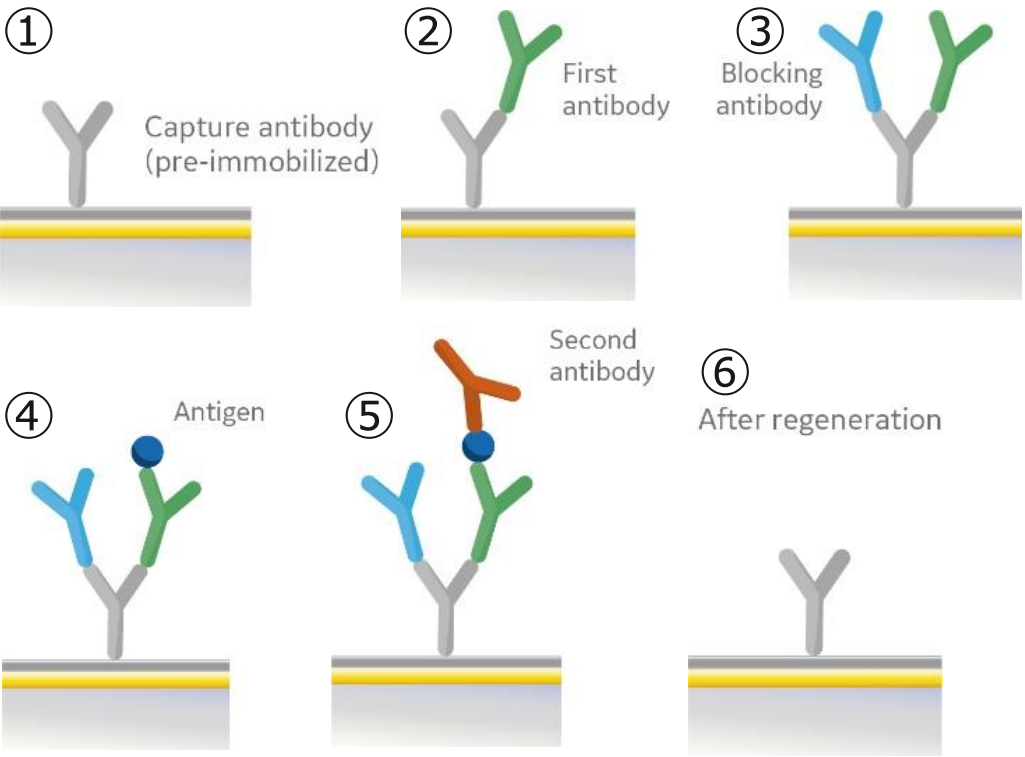


キャプチャーフォーマットを利用してアッセイ系開発の時間を短縮

全 assay format に対してキャプチャー法が実施可能

センサーグラムの例

キャプチャー用抗体はブロッキングする必要があります



アッセイ方法の選択

| | Sandwich | Premix | Tandem |
|------|--|---|--|
| Pros | <ul style="list-style-type: none">• 一般的には第一選択肢• 抗体の必要量も少なく済む | <ul style="list-style-type: none">• データが解釈しやすい• Sandwich assay の検証可能 | <ul style="list-style-type: none">• 抗原を直接固定化した場合は必要量が少なく済む• 多価抗原にも互換性がある |
| Cons | <ul style="list-style-type: none">• 多価抗原の場合はブロッキングステップが必要• 一次抗体の親和力が弱い場合抗原がすぐに解離してしまう | <ul style="list-style-type: none">• 親和力に関するある程度の情報が必要• 二次抗体が高濃度が必要 ($>10 \cdot K_D$) | <ul style="list-style-type: none">• 固定化に伴いエピトープがマスクされる可能性• 固定化された抗原から抗体を解離させる再生条件の検討が面倒 |

Biacore 8K series ならアッセイテンプレートが測定をサポート (自分で編集も可能)

(8 x 8) や (4 x 12) などのフォーマットに対応

サンプルをセットする場所も自動的に作成

Set up epitope binning matrix

First antibody

Capture 1

| No | Solution |
|----|----------|
| 1 | Ab1 |
| 2 | Ab2 |
| 3 | Ab3 |
| 4 | Ab4 |
| 5 | Ab5 |
| 6 | Ab6 |
| 7 | Ab7 |
| 8 | Ab8 |

Second antibody

Analyte 2 - Secondary ab

| No | Solution |
|----|----------|
| 1 | Ab1 |
| 2 | Ab2 |
| 3 | Ab3 |
| 4 | Ab4 |
| 5 | Ab5 |
| 6 | Ab6 |
| 7 | Ab7 |
| 8 | Ab8 |

Epitope

| No | Capture 1 | | Analyte 2 - Secondary ab | |
|----|-----------|---------|--------------------------|---------|
| | Solution | Control | Solution | Control |
| 1 | Ab1 | ▼ | Ab1 | ▼ |
| | Ab2 | ▼ | Ab1 | ▼ |
| | Ab3 | ▼ | Ab1 | ▼ |
| | Ab4 | ▼ | Ab1 | ▼ |
| | Ab5 | ▼ | Ab1 | ▼ |
| | Ab6 | ▼ | Ab1 | ▼ |
| | Ab7 | ▼ | Ab1 | ▼ |
| | Ab8 | ▼ | Ab1 | ▼ |
| 2 | Ab1 | ▼ | Ab2 | ▼ |
| | Ab2 | ▼ | Ab2 | ▼ |
| | Ab3 | ▼ | Ab2 | ▼ |
| | Ab4 | ▼ | Ab2 | ▼ |
| | Ab5 | ▼ | Ab2 | ▼ |

Id Plate 1

Type 96 well 250 µl

| | | | | | | | | | |
|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 12 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 11 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 10 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 9 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 8 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 7 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 6 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 5 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 4 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 3 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 2 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 1 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| | A | B | C | D | E | F | G | H | |

Id Plate 2

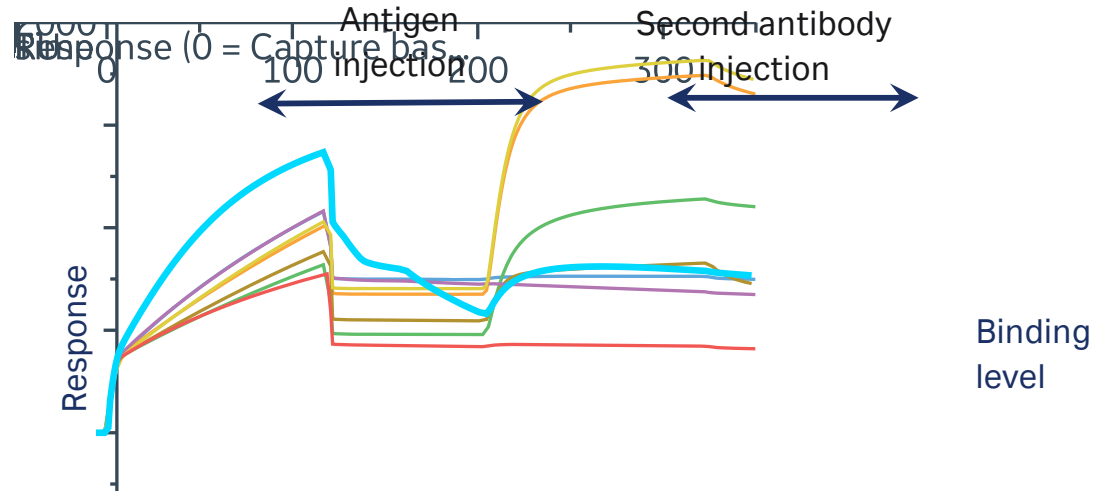
Type 96 well 250 µl

| | | | | | | | | | |
|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 12 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 11 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 10 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 9 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 8 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 7 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 6 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 5 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 4 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 3 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 2 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 1 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| | A | B | C | D | E | F | G | H | |

すぐに解離してしまう抗原について **Dual** injection を利用した例

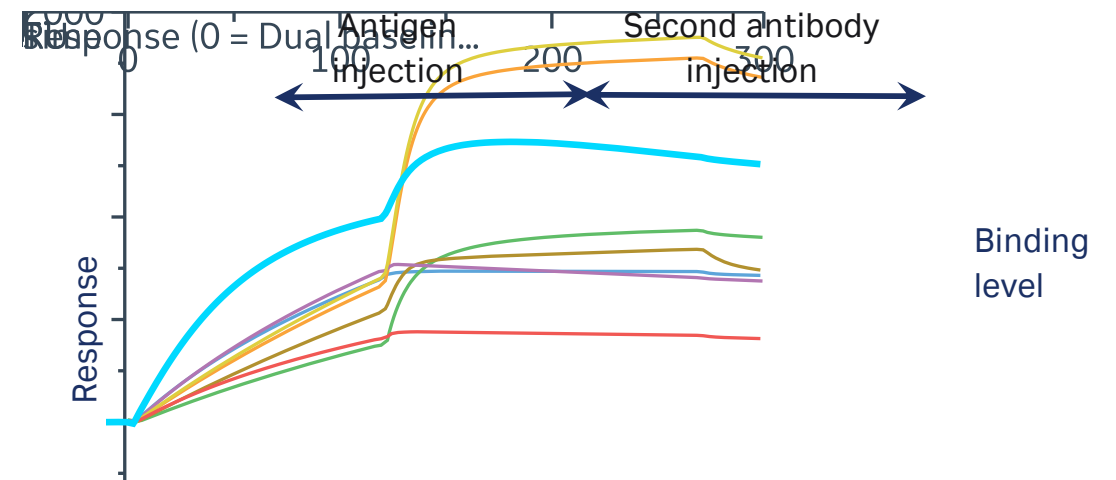
Sandwich 8x1 run without **Dual** injection

一次抗体と抗原の低親和力のため二次抗体の結合量を見積もれない

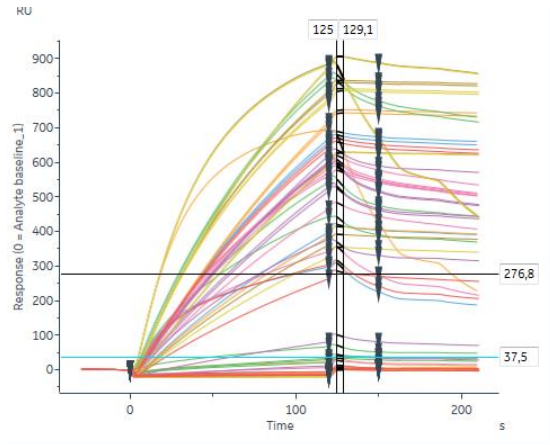


Sandwich 8x1 run with **Dual** injection

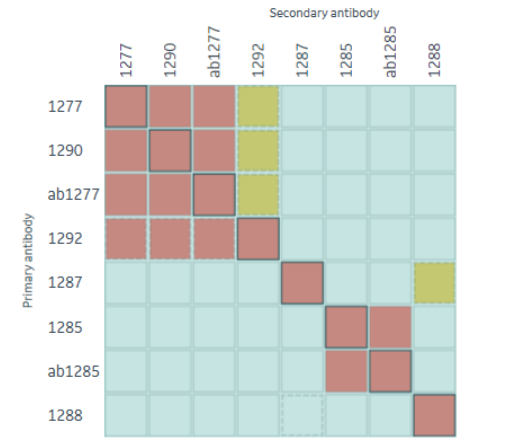
Dual injection では2つの溶液を washing step を挟まずに連続して添加可能



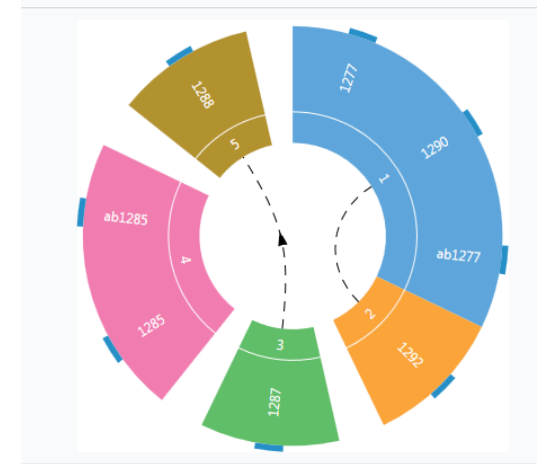
自動的に得られる解析画像



Sensorgram



Heat map



Bin wheel

測定時間 (for Biacore 8K series)

Comparison of 8x8 arrays (no capture)

| Assay format | Array | Unattended Run time |
|--------------|-------|---------------------|
| Sandwich | 8 × 8 | 2 h |
| Premix | 8 × 8 | <2 h |
| Tandem | 8 × 8 | 2 h |

Run times for sandwich assay with capture

| Assay format | Array | Unattended Run time |
|-----------------------|---------|---------------------|
| | 8 × 8 | < 4 h |
| Sandwich with capture | 10 × 10 | < 5.5 h |
| | 20 × 20 | < 17 h |

抗原消費量 (for Biacore 8K series)

Comparison of 8x8 arrays (no capture)

| Assay format | Array | Antigen 50 nM |
|--------------|-------|---------------|
| Sandwich | 8 × 8 | 10 µg |
| Premix | 8 × 8 | 10 µg |
| Tandem | 8 × 8 | 6 µg |

Run times for sandwich assay with capture

| Assay format | Array | Antigen 50 nM |
|-----------------------|---------|---------------|
| Sandwich with capture | 8 × 8 | 10 µg |
| | 10 × 10 | 15 µg |
| | 20 × 20 | 56 µg |

4

製品情報

Epitope binning を運用するにあたっては

① Insight Evaluation Software について



- 各解析モジュールのインストールは無料ですが、動かすためにはライセンスが必要です。
- ライセンスの数 = 同時に解析できるPCの数 と考えてください。(フローティングライセンス)
- ライセンスは期限付き (1年) と永続の2種類があります。

- Insightを動かす上で必須のモジュール
- 下5つのモジュールは単独では動きません
- 8K/8K+購入者は最初から2ライセンス納品

- スクリーニングする方向け
- 8K/8K+購入者は最初から2ライセンス納品

- 欲しい方だけ購入
- 一番上のBasicライセンスが必須
- T200で購入する方は特に注意!

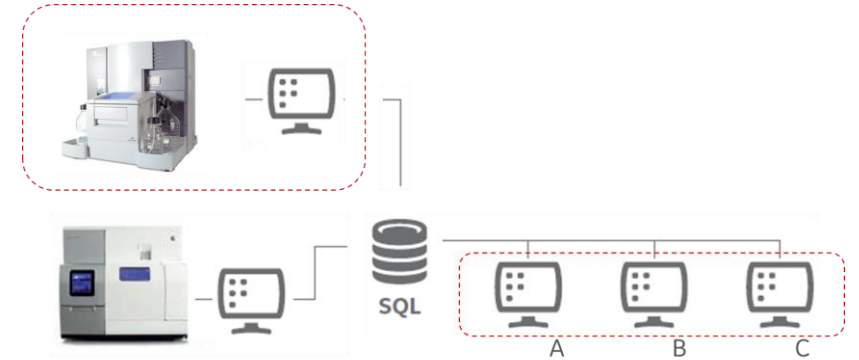
| Software and Extensions | Biacore 8K Biacore 8K+ | Biacore T200 | Biacore S200 |
|---|---------------------------|--------------|--------------|
| Biacore Insight Evaluation Software | ✓ | ✓ | ✓ |
| Extended Screening and Characterization | ✓ | ✓ | ✓ |
| Epitope Binning | ✓ | * | * |
| Concentration and Potency | ✓ | ✓ | * |
| GxP | ✓ | | |
| Data Integration | ✓ | ✓ | ✓ |

↓
モジュール (現在6個)

Epitope binning を運用するにあたっては

② SQLサーバについて

- Insight を運用するためには SQL サーバが必須です。
- SQLサーバは無償版と有償版があります。
- 有償版でないと右図の運用はできません。



| | 無償版 | Cytivaが提供する有償版 |
|--------------|----------------------|--|
| データサイズ | 10GB 週3日運転で半年分くらい | 4TB |
| 価格 (おおよそ) | 無料 | <ul style="list-style-type: none"> • 1年保守 480万 • 3年保守 530万 • 5年、7年もあります |
| ネットワーク | ローカル設定のみ | 構築可能 |
| 保守内容 | | <ul style="list-style-type: none"> • 納品後保守期間中はパーツ提供 • Biacoreとサーバを接続するサービス |

希望小売価格 (2020年5月現在のもの)

| 製品名 | コード番号 | ライセンス数 | 希望小売価格 |
|--|----------|--------|-----------|
| Biacore Insight Evaluation Software, Permanent | 29310602 | 1 | 127,700 |
| | 29310603 | 5 | 446,800 |
| Biacore Insight Evaluation Software, 1 year | 29310604 | 1 | 32,000 |
| | 29310605 | 5 | 111,700 |
| Epitope binning Extension, Permanent | 29478580 | 1 | 319,100 |
| | 29478581 | 5 | 1,117,000 |
| Epitope binning Extension, 1 year | 29478584 | 1 | 79,800 |
| | 29478585 | 5 | 279,300 |

Thank you

Q&A

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。お問い合わ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。

【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。