



# 正しいBiacoreデータ、 取れていますか？ ～失敗例を見てみましょう！～

Prepared for Masami Koinuma

June 24, 2020

# Agenda

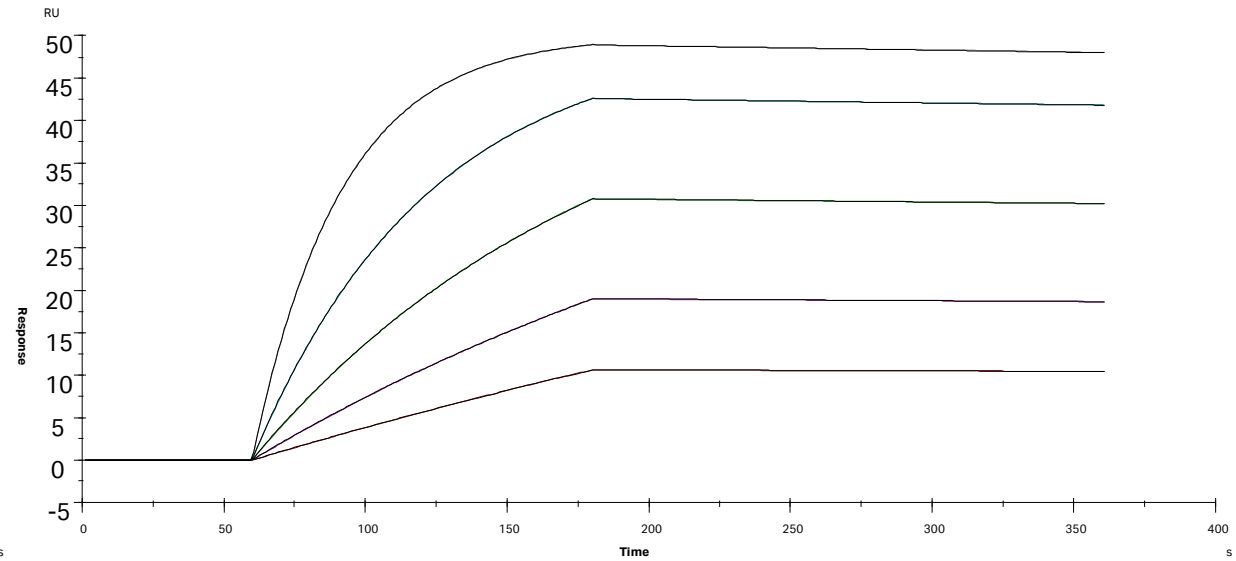
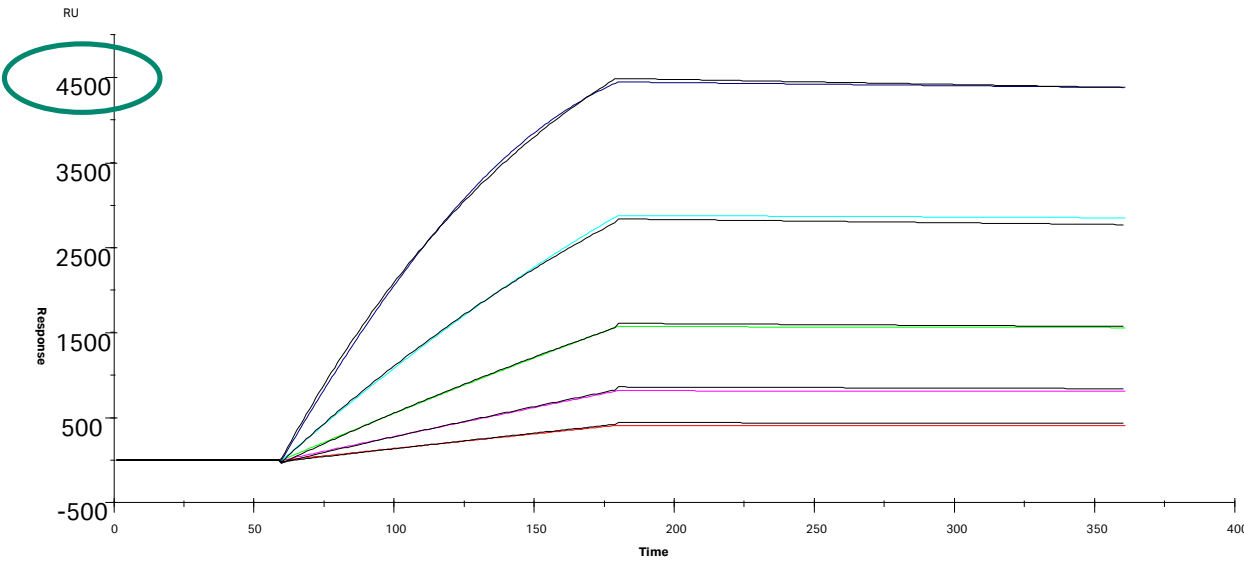
1. このセンサーグラム、変ですか？
2. (まとめ) 正しい Sensorgram を得るために考えること
3. 質疑応答

# 1

このセンサーグラム、変ですか？

# Q1. 見た目としては良いフィッティング？

結合相が直線的になっていることにも注目



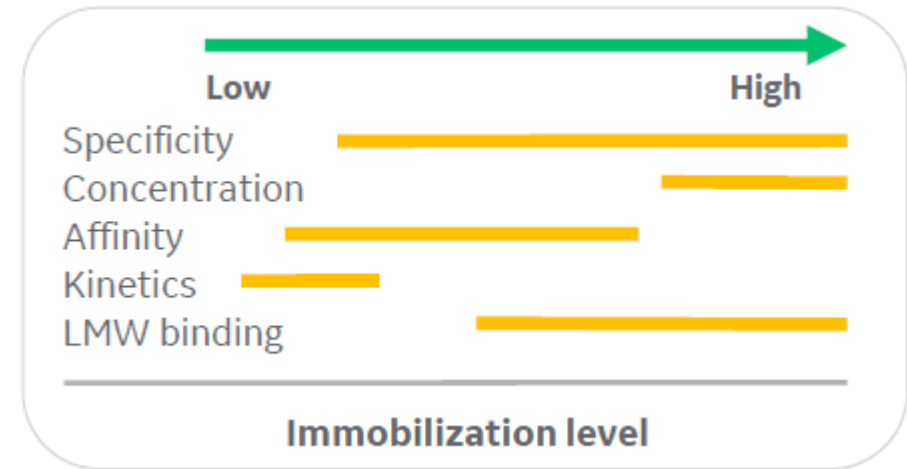
ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> )
2.84E+4	1.33E-4	6800	958

ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> )
9.93E+4	1.04E-4	50	3.39E-4

# どのような解析をしたいかによってリガンド密度は異なる

## Kinetics解析を行いたいならばリガンド密度を下げる

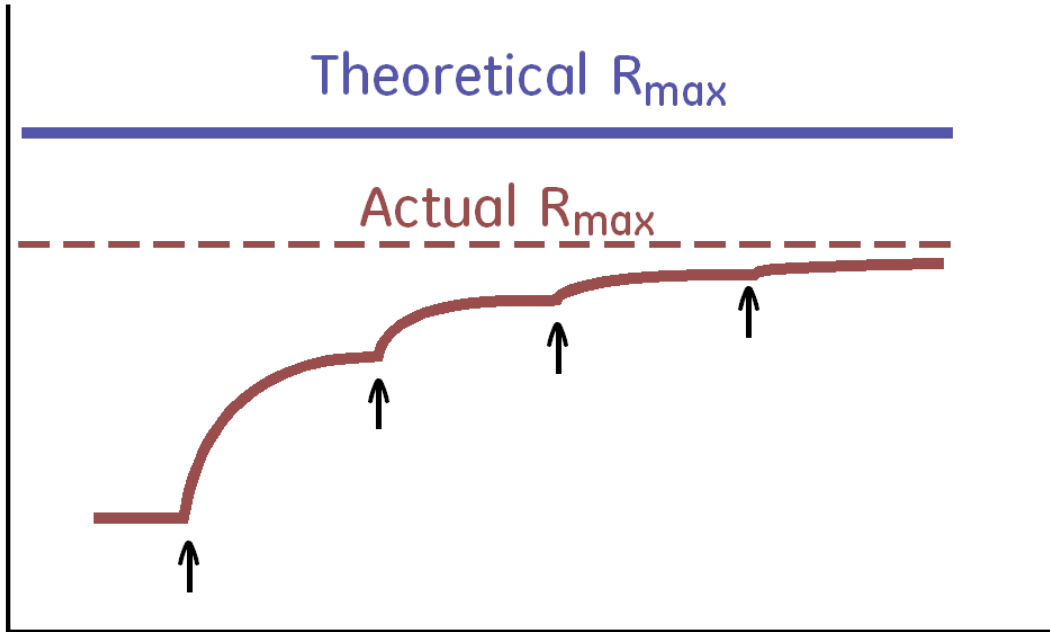
- Kinetics解析以外のパラメータを得たいのであればリガンド密度を低くする必要は必ずしもありません
- リガンド密度を下げて測定を行うことでマストランスポートリミテーション（MTL）の影響を小さくすることができます
- アナライトの結合が見えるのであればリガンド密度は小さいほど良いですが、アナライトのActual Rmax（実測Rmax）が以下に示す程度になるようなりガンド密度であればMTLの影響が小さいと言えます
- アナライトがタンパク質の場合：Actual Rmax  $\leq$  50RU
- アナライトが低分子の場合：Actual Rmax  $\leq$  30RU



# (とはいえ) 初めて取り扱うサンプルの場合は...

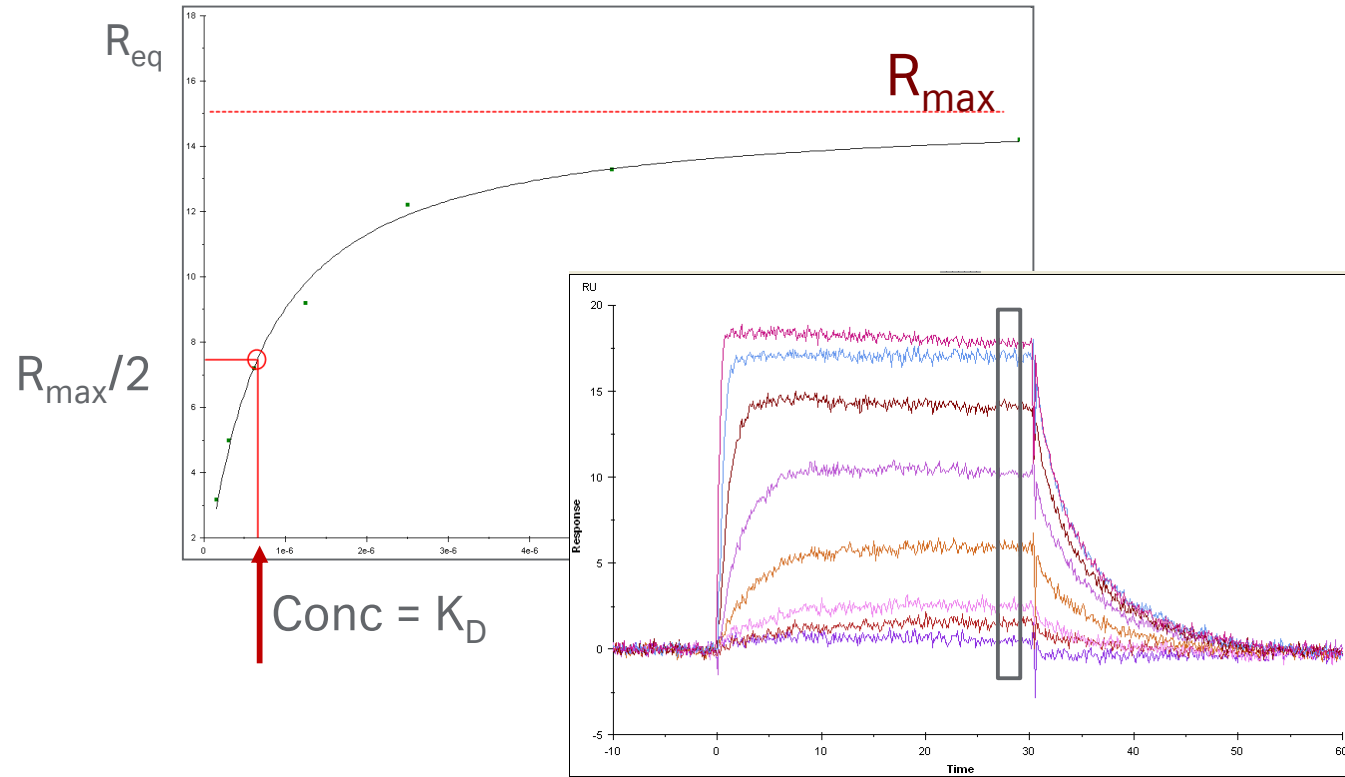
まずはリガンド密度を高くして活性、特異/非特異、再生条件を検証する  
いきなり低リガンド密度での測定はしないこと

## 解離が遅いサンプル (再生が必要)



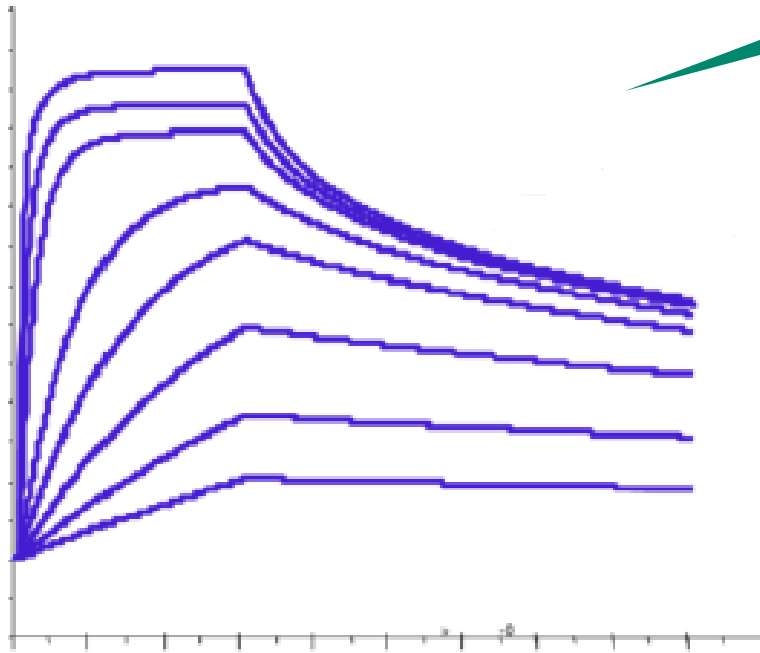
Actual  $R_{max}$  を得るためにはSensorgramが飽和  
するまで 10 倍ずつ濃いサンプルを添加する

## 解離が速いサンプル (再生不要)



## Q2. 抗原抗体反応の解析

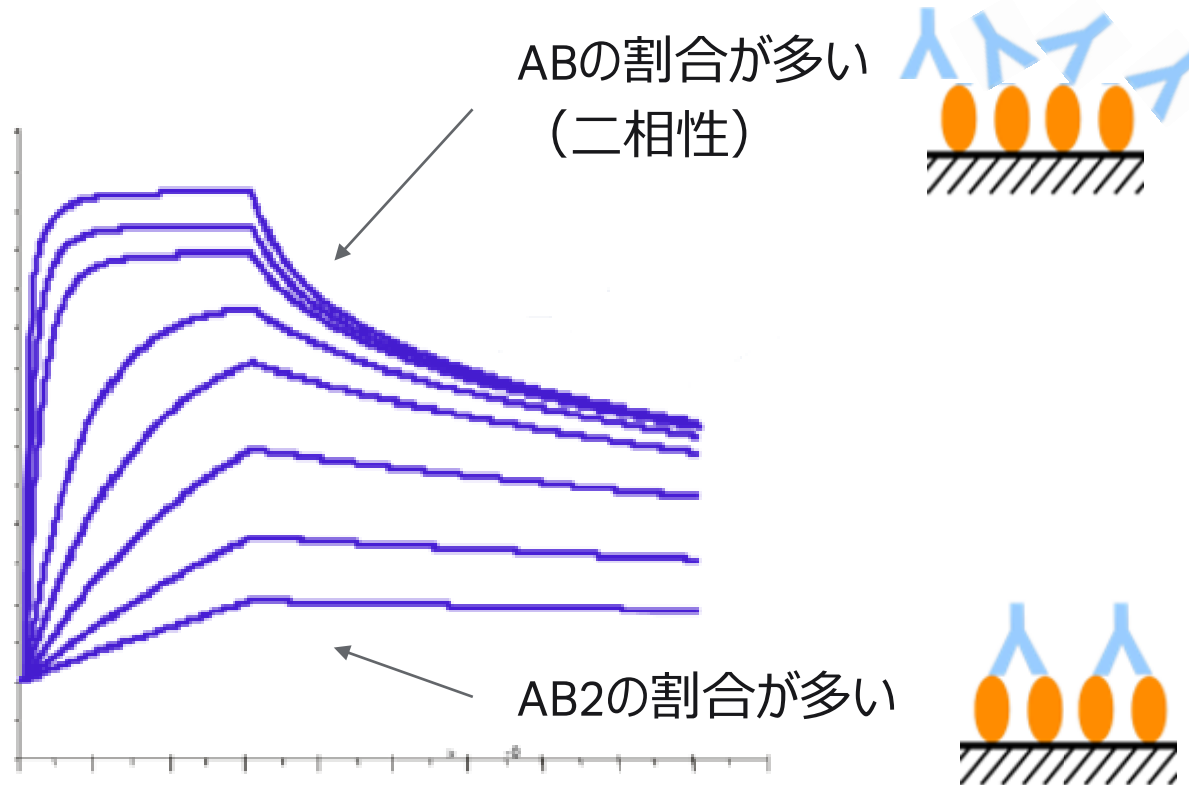
- 1:1 binding modelで解析



# センサーグラムが2相性なので抗体がアナライトになっている？

アナライトの濃度を振るとセンサーグラムの形状が変化する

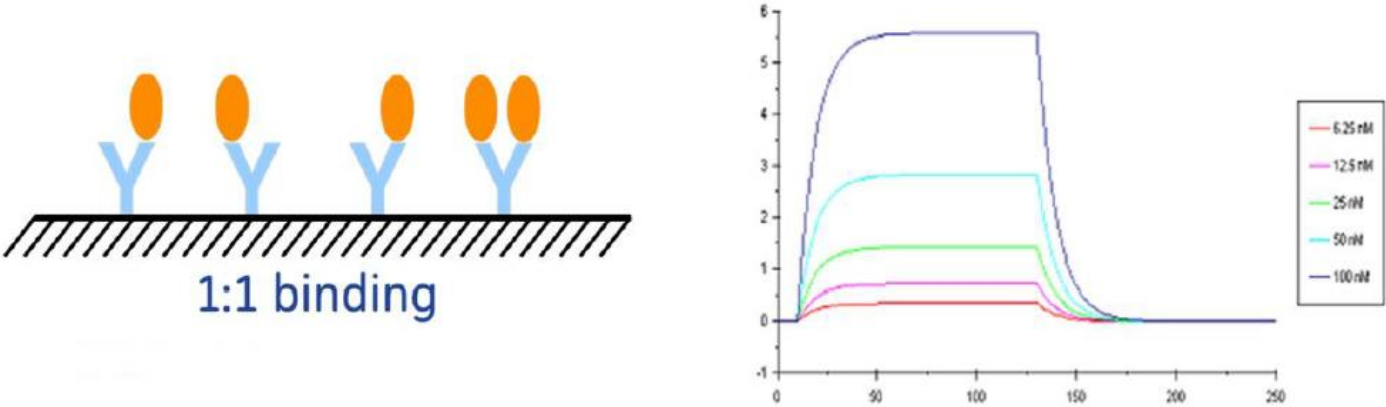
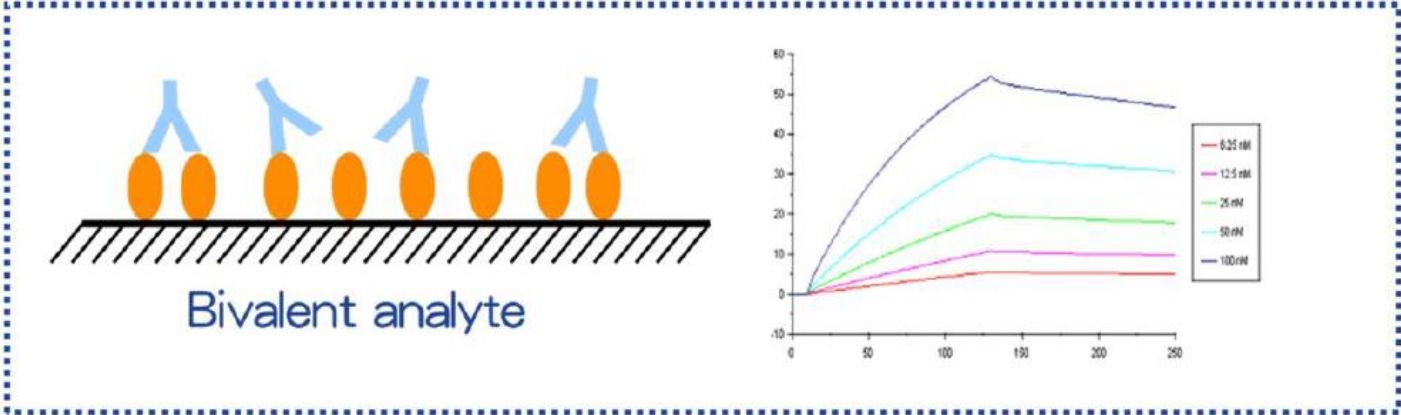
低濃度から高濃度まで多くのデータを得ないと信頼性が落ちやすい、複雑なモデル



抗体自体の親和力が強い場合は  
高濃度領域の二相性も見えづら  
くなるため更に信頼性は落ちやすい



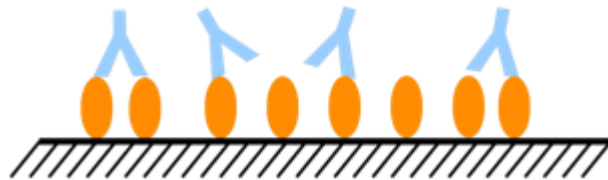
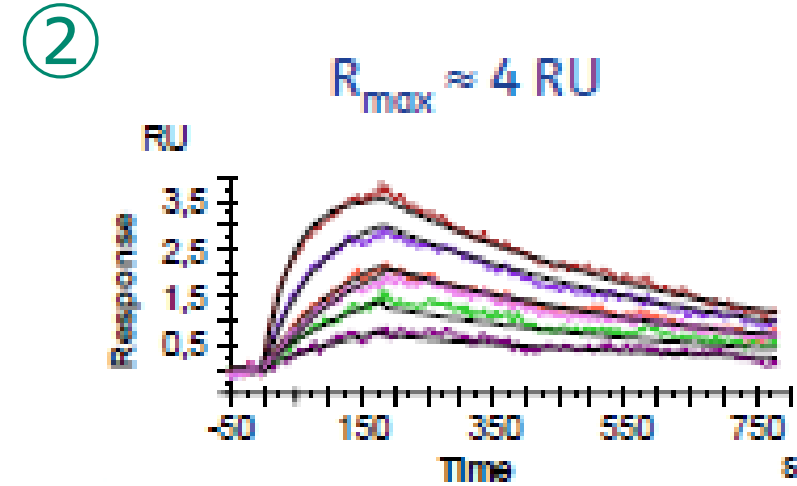
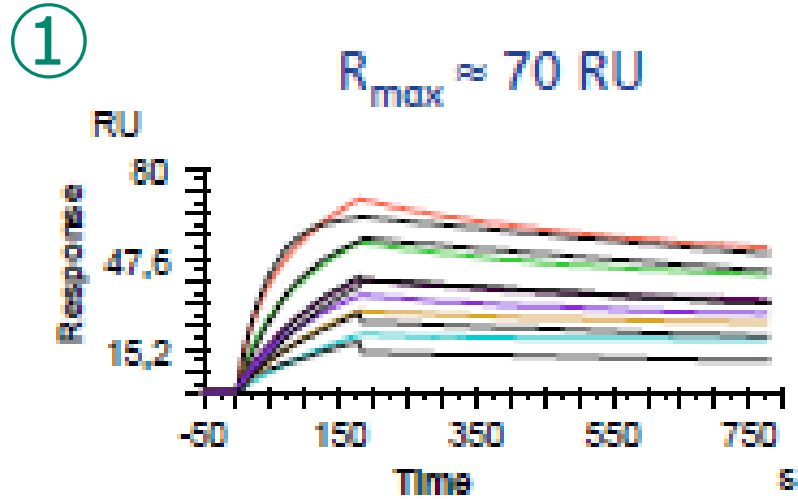
# 数値化したいなら極力1:1 binding modelに



# Q3. 抗原抗体反応のフィッティング

③

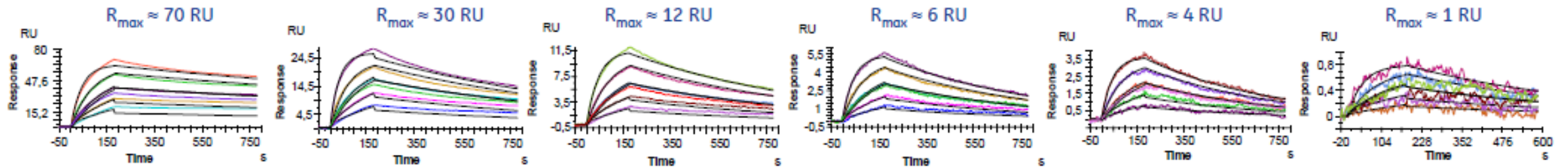
より信頼性の高いパラメータが得られそうなのはどちら？あるいは回答なし？



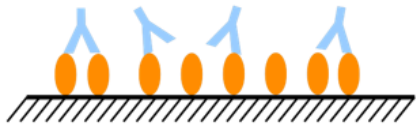
リガンド  
アナライト  
モデル式

抗原  
抗体  
1:1 Binding model

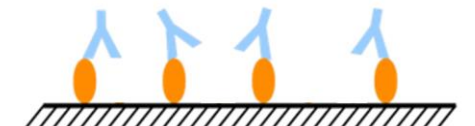
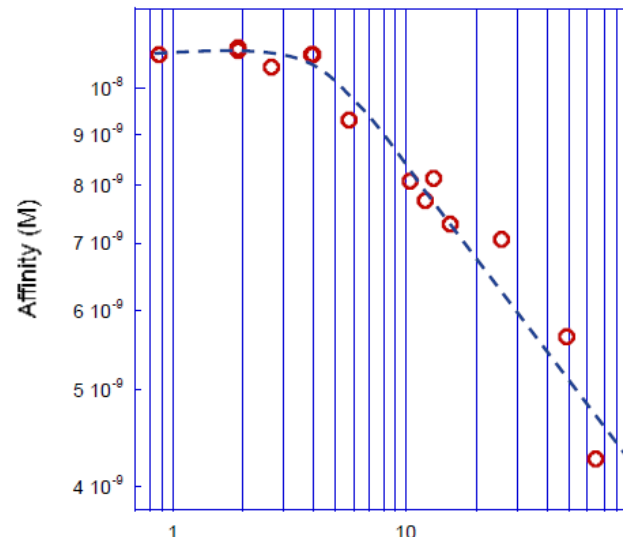
# 固定化量を極限まで減らせば1:1 binding modelで解析できる



Decreasing response gives more reliable kinetic and affinity data



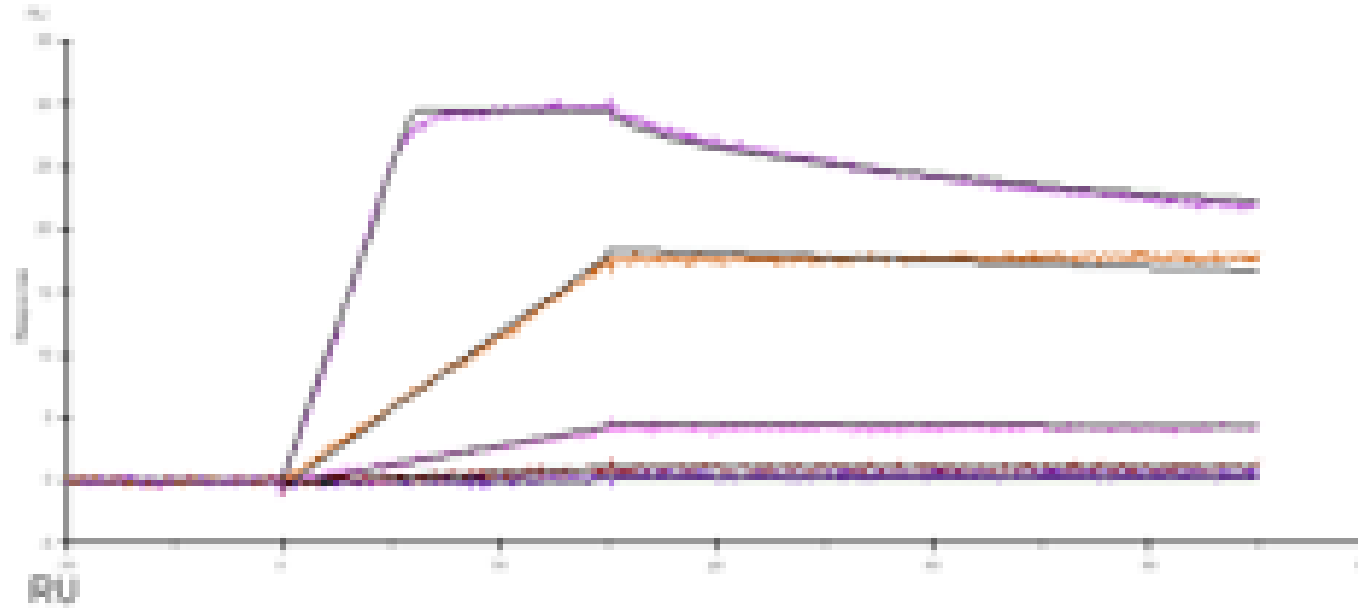
$K_D$



$R_{max}$  (≒ 固定化量)

# Q4. 良好なフィッティング？

SE値が大きい = 取り得る解の幅が広い

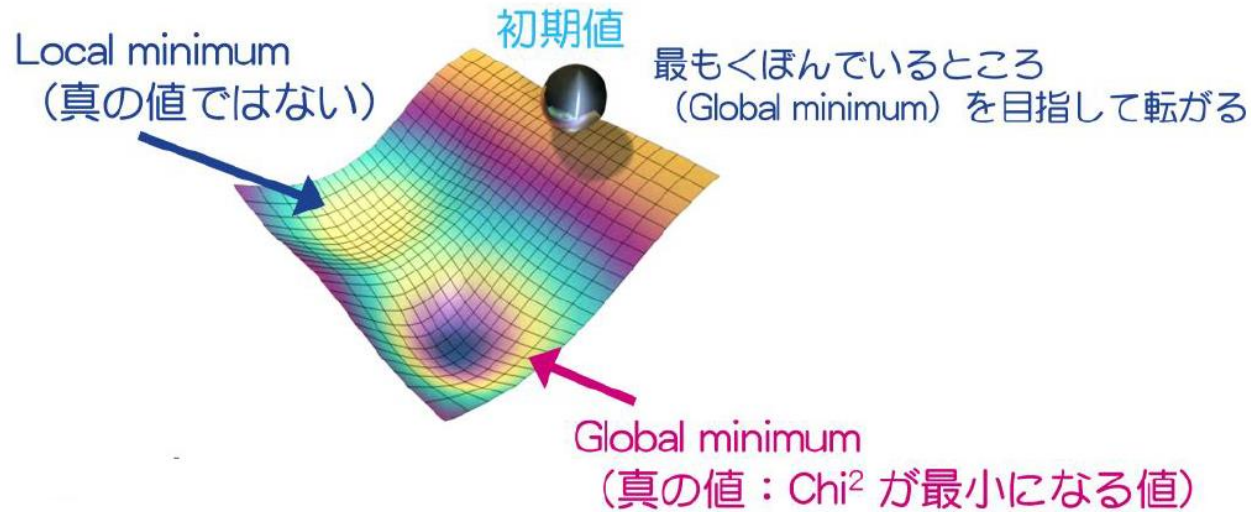


ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> )
2.8E+9	2.2E-3	29.8	0.08

SE (ka)	SE (kd)	SE (Rmax)
3.5E+9	2.8	0.03

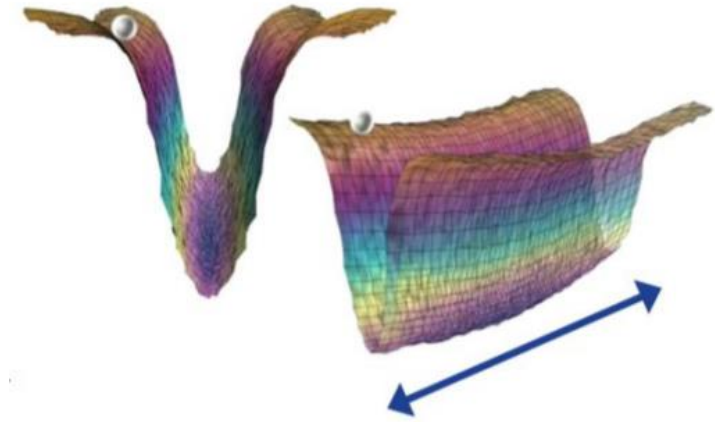
# SE値

Chi<sup>2</sup>が最も小さくなるようにfittingされた際に取りうる各値（ka, kdなど）の誤差範囲



垂直軸 → Chi<sup>2</sup>

水平軸 → パラメータ値 (Rmax, ka, kd, ...)



SE値（標準誤差）のイメージ

SE値が小さい：窪みが非常に鋭く深い

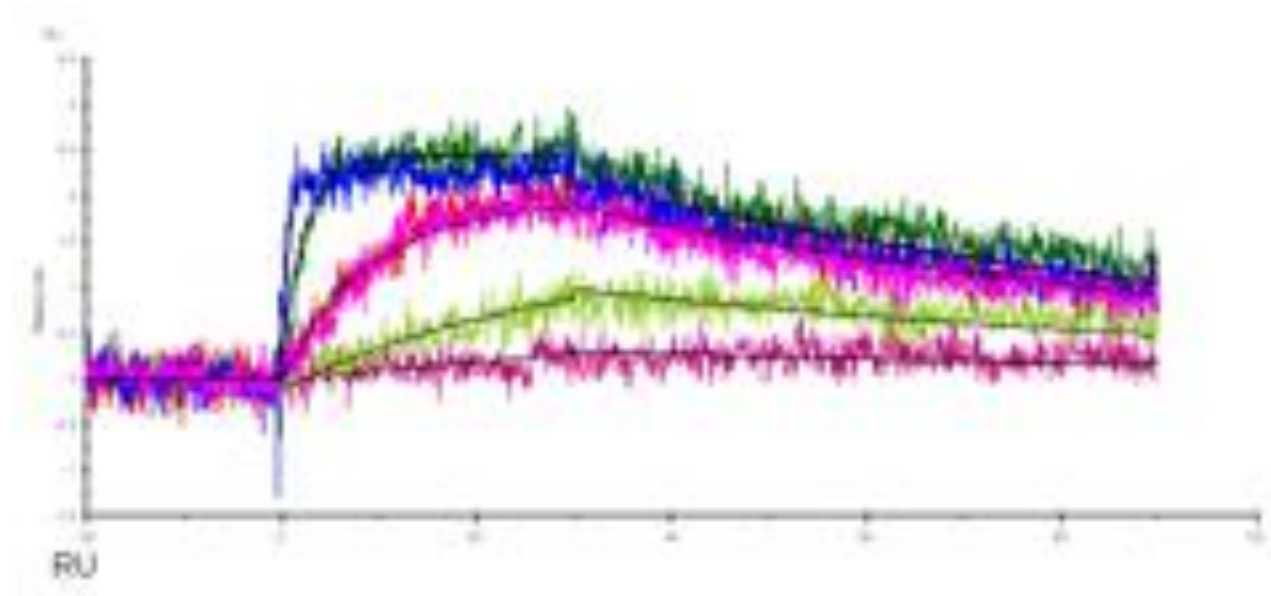
SE値が大きい：窪みの幅が広い

窪みの幅が広い = 取り得る解の幅が広い

⇒ 算出された解にほとんど意味がない

## Q5. ノイジーなフィッティング？

ノイズレベルよりも特異性、再現性、濃度依存性やドリフトに注意する

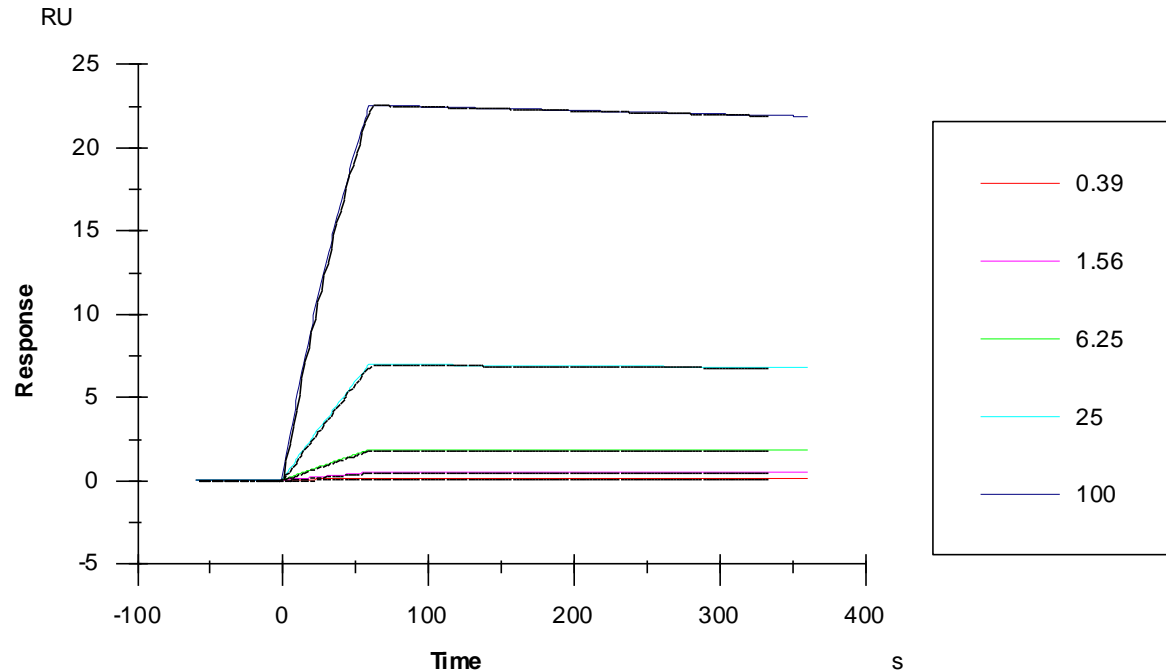


ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> )
1.6E+7	1.2E-2	2.2	0.03

SE (ka)	SE (kd)	SE (Rmax)
1.8E+5	1.4E-4	0.03

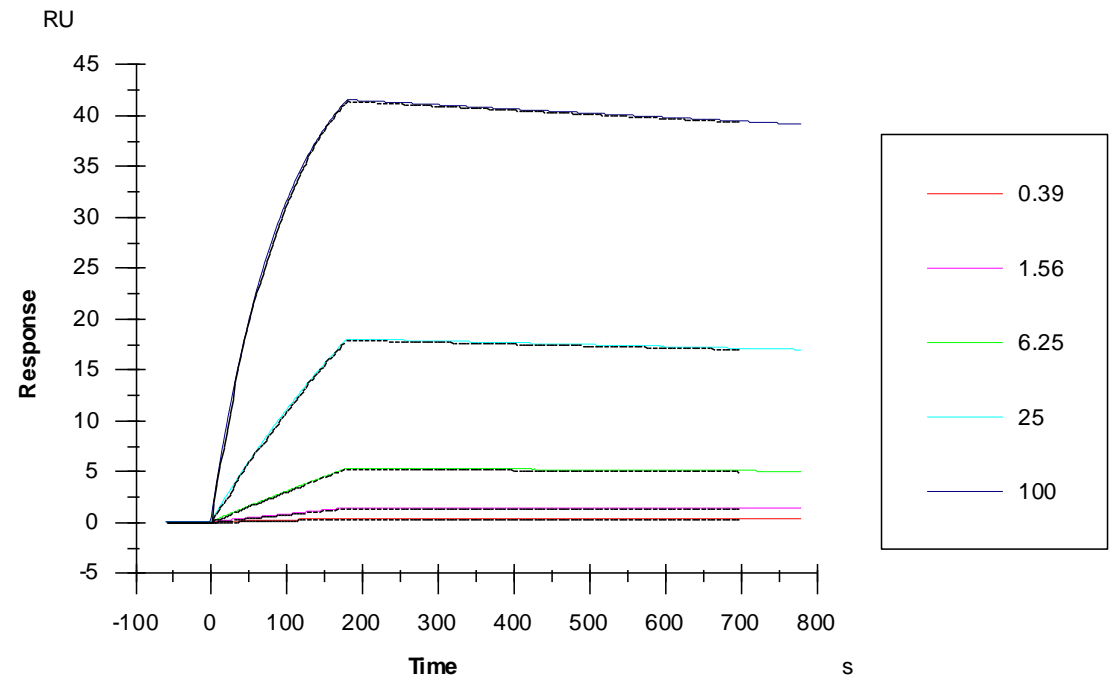
# Q6. 良好なフィッティング？

添加時間、解離時間の調整



$k_a = 1.52e5$        $T=10$   
 $k_d = 1.2e-4$        $T=12$   
 $KD = 0.78 \text{ nM}$   
 $R_{max} = 42 \text{ RU}$        $T=8$

$T \text{値} = \text{パラメータ}/SE$   
 $T \text{値が} 10 \text{以上} = SE \text{が} 10\% \text{以内}$

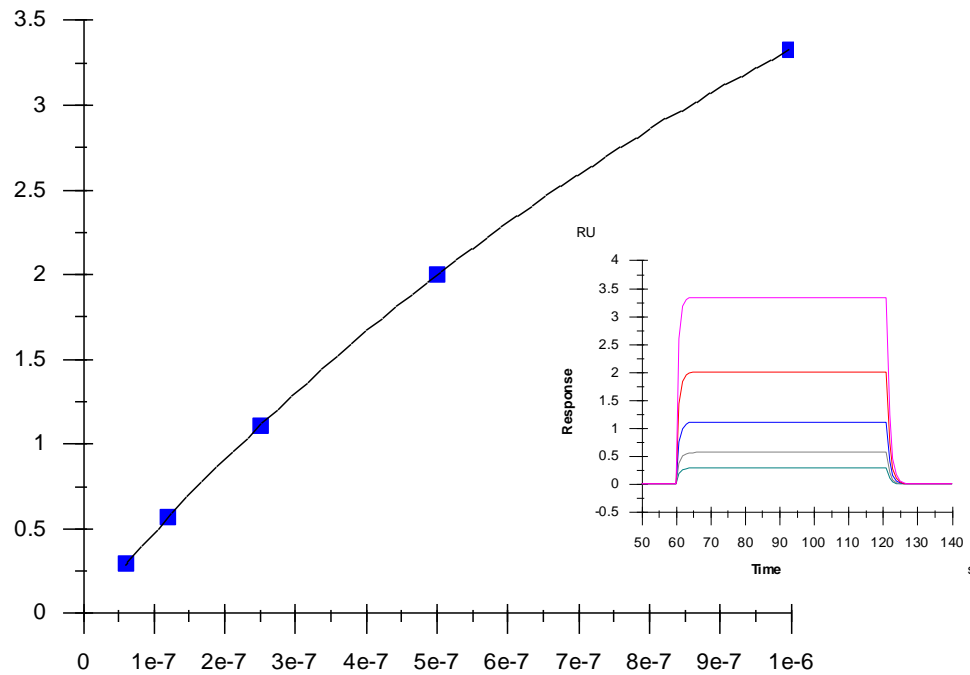


$k_a = 1.0e5$        $T=400$   
 $k_d = 1.0e-4$        $T=500$   
 $KD = 1 \text{ nM}$   
 $R_{max} = 50 \text{ RU}$        $T=300$

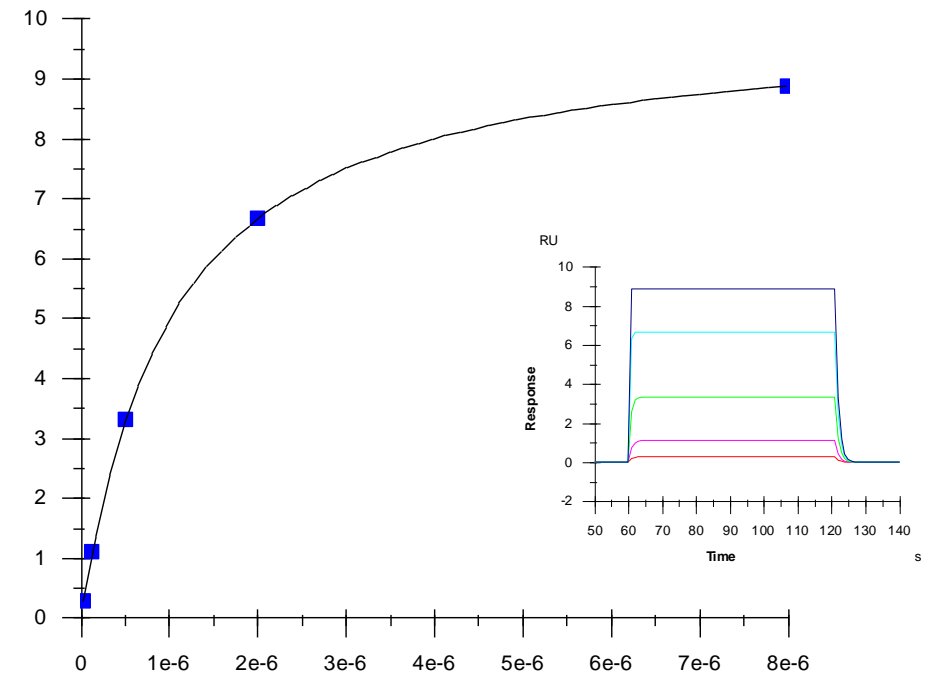
# Q7. Affinity解析...良好なフィッティング？

Affinity 解析では飽和するかどうか重要：適切な濃度範囲で測定する

Conc = 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1  $\mu\text{M}$   
Fitted  $K_D$  = 2  $\mu\text{M}$   
 $R_{\text{max}}$  = 10 RU



Conc 0.03, 0.12, 0.5, 2, 8  $\mu\text{M}$   
Fitted  $K_D$  = 1  $\mu\text{M}$   
 $R_{\text{max}}$  = 10 RU

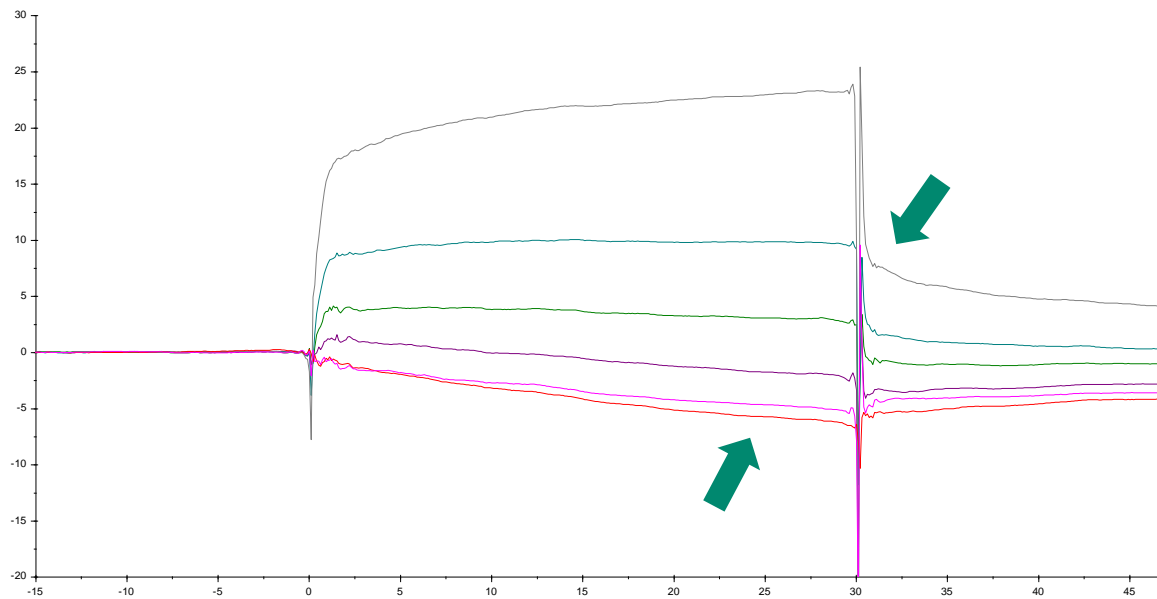




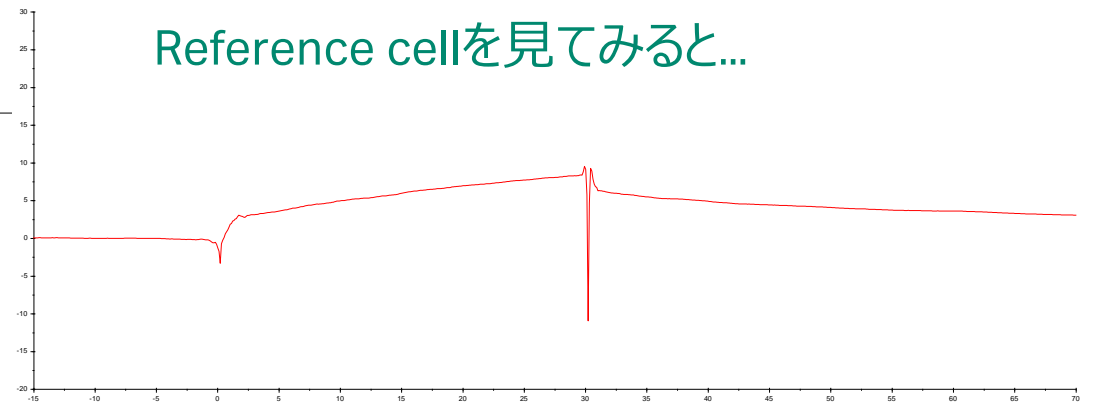
# Q8. フィッティングがうまく行かない？

Fc2-1のデータから見ないこと！

はじめはFc1だけやFc2だけのデータを確認する

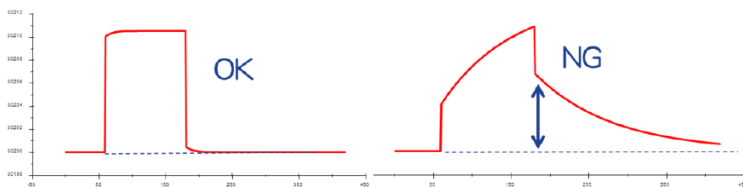


Reference cellを見てみると...



# (高分子の) 非特異的結合

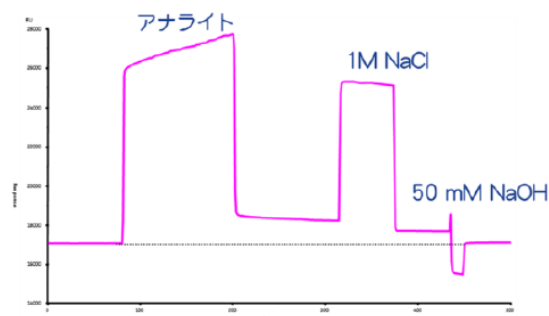
## 確認方法



Ref cell でアナライト添加後にベースラインが上昇していないこと

- Act cell で同様の非特異的結合が発生していることの証明は困難なので差し引きできない
- Ref cell には非特異的結合せず、Act cell のリガンド (およびキャプチャー分子) そのものに対して非特異的結合するサンプルもあるが、飽和するかどうか判断のポイントになる
- 一般的に非特異的結合はアナライト濃度が上がっても飽和しない

## 原因と対策

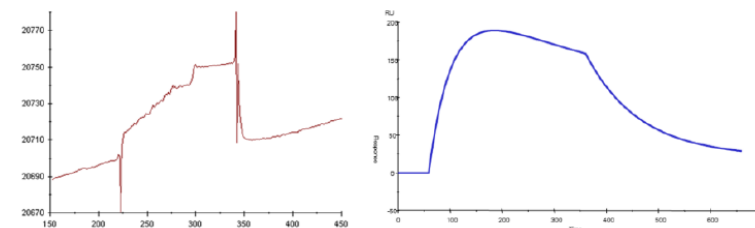


(Ref cell に) 各種試薬を添加して確認する

- 塩(~2M NaCl)で戻るならば静電的な結合の可能性高い→Blank blocking, CM4
- 酸、アルカリ溶液、界面活性剤で戻るならば疎水的結合やデキストランに対して結合している可能性が高い→界面活性剤変更, CM3 (C1, PEG)
- ランニング緩衝液の組成を見直す
- 夾雑物は除去か NSB Reducer

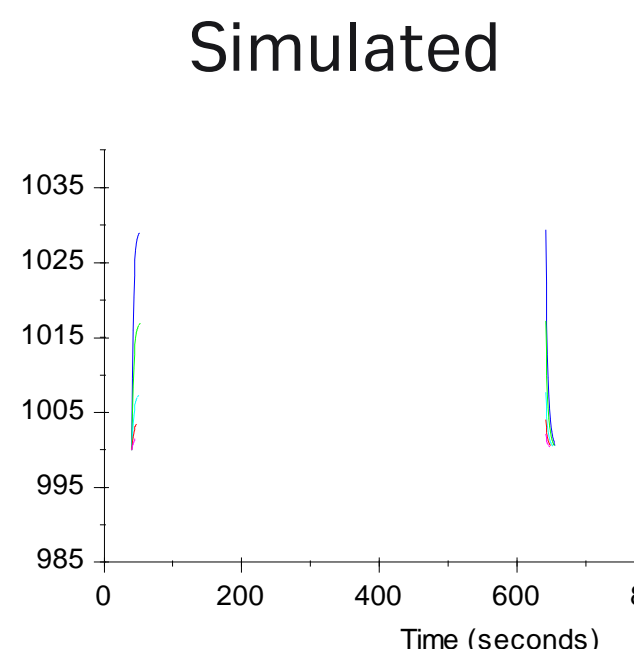
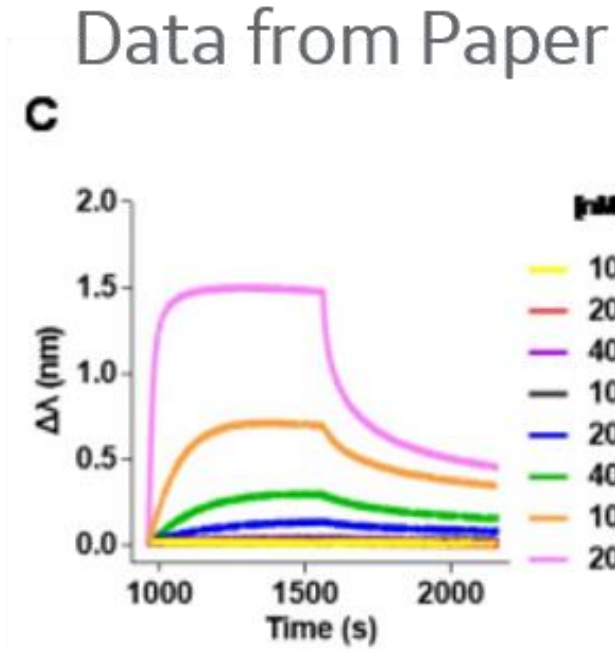
## 溶液効果と異形

- グリセロールが入っている場合など大きな溶液効果が見られることがある
- 結合相と解離相で分子の拡散速度が変わるため  $k_a$ ,  $k_d$  算出の信頼性が低下する
- Ref cell と Act cell で同じ溶液効果が出ているとも限らない  
→溶液置換する



- ガタつき→不溶性、単分散していない、大粒子
- レスポンス低下→単分散していない

# (Tips) BIA simulation を利用する



Reported  $k_a = 5.82 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$   $k_d = 0.28 \text{ s}^{-1}$

[https://www.biacore.com/lifesciences/Application\\_Support/laboratory-guidelines/index.html?backurl=%2Flifesciences%2FApplication\\_Support%2Findex.html](https://www.biacore.com/lifesciences/Application_Support/laboratory-guidelines/index.html?backurl=%2Flifesciences%2FApplication_Support%2Findex.html)

※ダウンロード自体は無料ですがProduct keyが必要です

# 2

正しい Sensorgram を  
得るために考えること

# Biacoreで特にKinetics解析するにあたっての Assay Development

- + できるだけ 1:1 binding model に落とし込めるようなアッセイ系にする
- + 溶液効果を減らすためアナライト溶液組成をランニング緩衝液組成と一致させる（+シンプルに！）
- + 高密度リガンドでActual Rmax、Ref cell での非特異的結合、再生条件の確認
- + Actual Rmax  $\leq$  30-50 RU となる低密度リガンドを計算
- + 最高濃度添加時に Actual Rmax が得られるくらいのアナライト濃度・添加時間の設定
- + ゼロ濃度も取得するプログラムの準備

**二** Assay Development 完了



# Biacoreでデータを取って解析するにあたっての 6 Steps

- + 非特異的・特異的な結合の有無（Ref cell、Act cellそれぞれ！）
- + 濃度依存性（およびゼロ濃度の再現性）
- + 測定系とモデル式の妥当性
- + 残差プロット（見た目）
- + 実験的に得られたパラメータの生物学的な妥当性
- + 統計的パラメータの有意性 ( $\chi^2$ , T-value (or SE))

## 二 データの信頼性

シミュレーションを上手に使いましょう



# 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](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。