



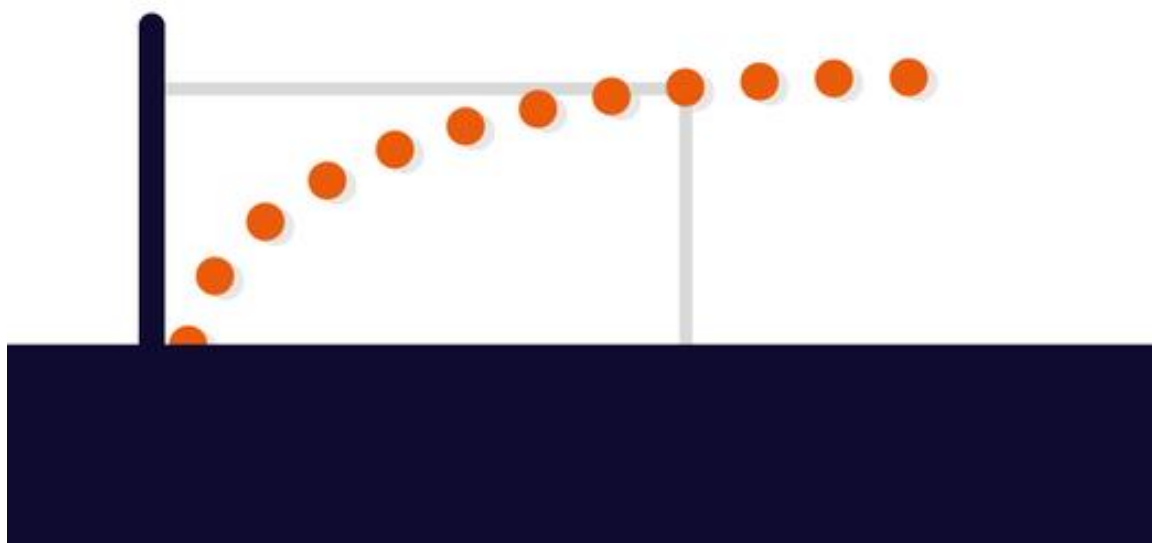
Biacore Insight Evaluation Software

Concentration and Potency マニュアル

Version 1 2023/07

Insight version 5.0.18 対応版

Biacore™ Insight
Concentration and Potency Extension



目次

1. 本資料の目的	4
2. Concentration measurement について	5
2-1. Concentration measurement の概要	5
2-2. Insight でフォローする Assay format の解説	6
Direct binding assays (DBA)	6
Indirect assays の 1 つ : Inhibition in solution assays (ISA)	8
Indirect assays の 1 つ : Surface competition assays	9
2-3. 測定フォーマット	10
2-4. Biacore Insight Control Software の実行	11
2-5. Serial concentration の Method Builder の解説	13
1. Method definition	13
2. Variables and positioning	16
3. Cycle overview	17
4. Plate layout	17
2-6. Biacore Insight Evaluation Software の実行	18
2-7. Insight Evaluation Software の workspace の解説	19
Calibration settings	21
Thumbnails panel	23
Plots panel	24
Table panel	25

3. Curve analysis (PLA と EC₅₀)について	26
3-1. Potency measurements と Curve analysis の概要	26
3-2. Insight でフォローする assay format	27
3-3. Biacore Insight Control Software の実行.....	28
3-4. PLA/EC50 analysis using capture の Method Builder の解説	29
1. Method definition	29
2. Variables and positioning	31
3. Cycle overview	32
4. Plate layout.....	32
3-5. Biacore Insight Evaluation Software の実行.....	33
3-6. Evaluation item -PLA や EC50 の workspace の解説.....	34
Table パネル.....	36
PLA results.....	36
EC50 results.....	37
PLA settings.....	38
EC50 settings and parameters	38

1. 本資料の目的

本資料は Biacore Insight Software にオプションとして追加可能な Concentration and Potency Extension について、その利用方法や解析方法について解説したものです。Concentration and Potency Extension は Biacore Insight Evaluation Software (以下 Insight ES) だけでなく Biacore Insight Control Software (以下 Insight CS) にもテンプレートが付加されます。Biacore T200/S200 Control Software に関してはそのサポート機能は付加されませんのでご注意ください。

本資料は Biacore Insight Evaluation Software User Manual を元にご案内しております。より詳細な解説は以下の web ページより正式な英語版マニュアルをダウンロードしてご確認ください。

<https://www.cytivalifesciences.com/ja/jp/support/software/biacore-downloads/Biacore-Insight-Evaluation-Software>

Concentration and Potency Extension は Permanent、1 year のライセンスのいずれかをお求めいただけます。価格に関する詳細は以下の web ページをご参照ください。

<https://www.cytivalifesciences.co.jp/catalog/44011.html>

2. Concentration measurement について

2-1. Concentration measurement の概要

結合活性を持つサンプルの濃度を決定することは、学術研究だけでなく企業研究の両方においても基本的な要素です。また製薬開発や製造における品質管理のツールとしても重要です。Biacore を利用した濃度定量は迅速性、精密性、自動化、簡便性などでその他の手法と比較して優位性があります。

Bradford 法や Lowry 法など分光光度計を用いた測定系ではサンプルに含まれる全タンパク質の濃度を定量してしまうため失活している（結合活性を失った）タンパク質も含まれてしまいますし、吸光度を指標にする測定系では分析対象が色素を持つサンプルの場合は光の吸収や散乱の影響が避けられません。ELISA 法による測定系では B/F 分離のための wash out の作業で測定前に検体が剥離してしまう可能性や、標識・基質反応など手技によるバラつきもあります。またこれらの手法で得られるデータはエンドポイントなので異常値が出た時にその理由付けが困難です。

Biacore での濃度定量は、リガンド分子と結合できるアナライト分子のみがレスポンスとして得られる点、すなわち活性濃度定量ができる点が特徴です。また解析自体は report point を利用するものの、測定データ自体はノンラベル・リアルタイムで得られるため、余計なアーチファクトが介在しにくく、予想外の結果が得られた際もセンサーグラム形状からその理由を追跡しやすいというメリットがあります。

本マニュアルでは濃度既知のサンプルを標準品として用いた場合の測定方法や解析手法について解説します。標準品から得られる検量線は測定中に一定の間隔で繰り返し行うことでアッセイ系のドリフトを調整することができます。繰り返し行われる検量線は *calibration trends* の作成に用いられ、アッセイのパフォーマンスの変動を補正するために、測定サイクル間の検量線データを補完することでドリフトを調整します。一定の間隔で繰り返される Control samples はアッセイのパフォーマンスがアッセイ全体で一貫性があるかを確認するために用いられます。

プリセットされているテンプレートは direct binding assays (DBA)、inhibition in solution assays (ISA) です。この資料で紹介している surface competition assays はテンプレートがございません。

Note : *Calibration-free concentration analysis (CFCA)* は Insight ではサポート外です。

こちらの資料もご参考ください。

<https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-33160-pdf>

2-2. Insight でフォローする Assay format の解説

Direct binding assays (DBA)

最も直接的なアプローチです。リガンド分子はセンサーチップ表面に直接固定化あるいはキャプチャーして保持します。添加されたアナライト分子の濃度はセンサーグラムの slope が特定のタイミングでの結合レスポンス (report point) で決定されます。また 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) を添加可能ですが、システム自体の感度が向上したため最近はあまり利用されません。

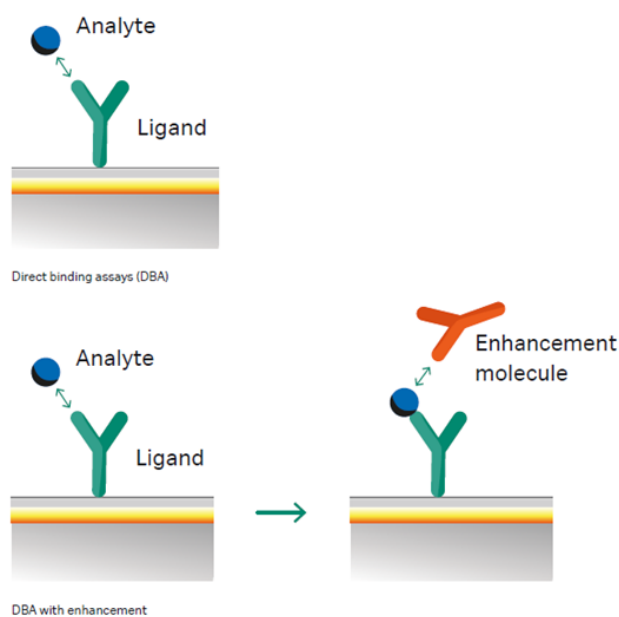


Figure 1 Direct binding assays (DBA) のフォーマット (下はエンハンスメント分子あり)

Slope を利用する場合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く、report point を利用する場合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です。デフォルトで stability の report point が自動取得されますのでこちらを利用しても良いですが、ご自身で追加しても構いません。

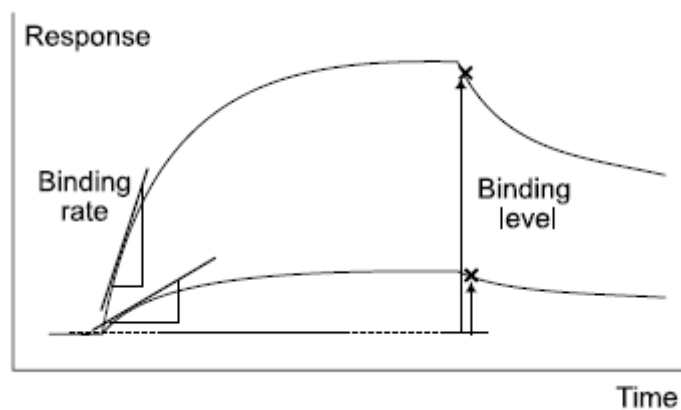


Figure 2 DBA のレスポンスの取得方法

Indirect assays の 1 つ : Inhibition in solution assays (ISA)

DBA では検体を直接測定しそのレスポンスを解析に用いますが、検体が低分子の場合の濃度測定ではレスポンスが小さく解析しにくいです。このようなケースでは検体そのものではなく Indirect assays（間接法）により測定・解析を実施します。ISA では detecting molecule の表面への結合を阻害するアナライト分子を利用します。Detecting molecule はアナライト分子の含有量を超えた一定濃度でサンプルと混合されます。理想的には detecting molecule は一価であるはずですが、実際には二価の抗体なども機能します。Immobilized analyte に対する detecting molecule の結合に由来するレスポンスは、サンプル中のアナライト分子の量に反比例します。

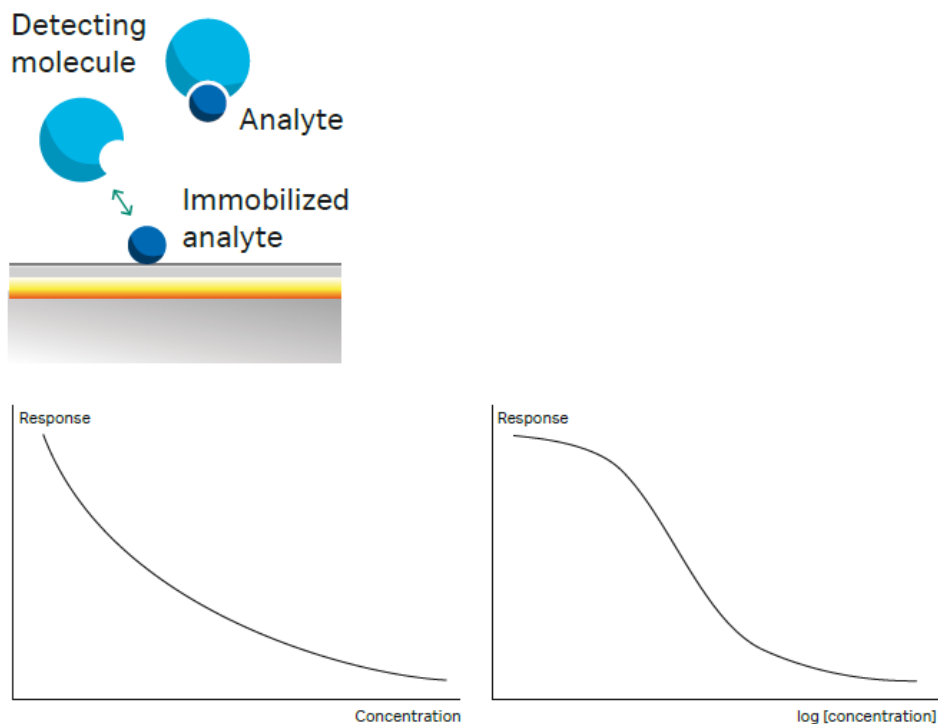


Figure 3 ISA のフォーマット

Indirect assays の 1 つ : Surface competition assays

アナライト分子の高分子量類似体（Competing analyte、通常はキャリアタンパク質に結合したアナライト分子のこと。キャリアタンパク質 1 分子当たりアナライト 1 分子となるように結合レベルは低く抑える）が測定される検体に一定量添加される測定方法です。キャリアタンパク質としては Transferrin や Haptoglobin などが用いられます。Serum albumin は多くの低分子に結合するため用いられません。アナライト分子はリガンド分子への結合について competing analyte と競合し、レスポンスはアナライト分子と competing analyte の合計となります。アナライト分子が competing analyte と比べて分子量が十分小さい場合、レスポンスは competing analyte 支配的になります。Competing analyte がアナライト分子によって追い出されるため、レスポンスはサンプル中のアナライト分子の量に反比例します。

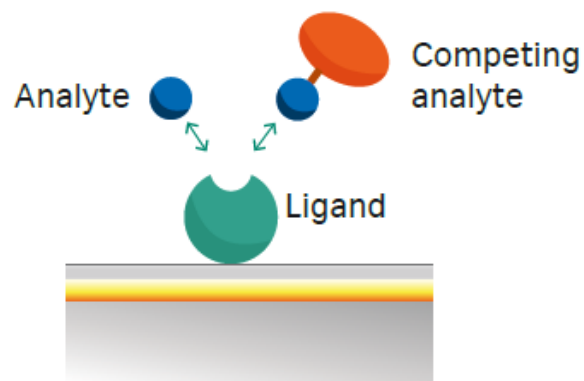

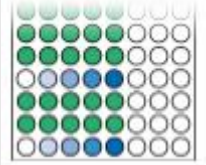


Figure 4 Surface competition assays のフォーマット

2-3. 測定フォーマット

濃度定量方法は serial モードか parallel モードで測定可能です。serial モードは Biacore 1 series と Biacore 8 series で実施可能であり、parallel モードは Biacore 8 series のみ可能なフォーマットです。5 つの calibration solution を青色、検体を緑色で表示した場合のサンプルの配置の仕方は以下のようになります。

モード	備考	サンプル配置
Serial	<ul style="list-style-type: none"> • Biacore 8 series でも Biacore 1 series でも実施可能 • Biacore 8 series: Calibration solution もサンプルも 1 つのチャンネル上で複数回のサイクルで測定される • Biacore 1 series: Calibration solution もサンプルも 1 つのフローセル上で複数回のサイクルで測定される 	
Parallel	<ul style="list-style-type: none"> • Biacore 8 series のみで実施可能 • 複数のチャンネルで同一のリガンドを固定化し、1 回のサイクルで Calibration solution のデータを取得する • 測定中にチャンネル間の normalization が必要になる 	

2-4. Biacore Insight Control Software の実行

Insight CS にて method のテンプレートを実行します。なお、これらのテンプレートでは既にチップ表面でリガンドの固定化が完了しているところから開始となっております（キャプチャー法のもの以外）。したがって別の method にて事前にリガンドの固定化は完了させてください。

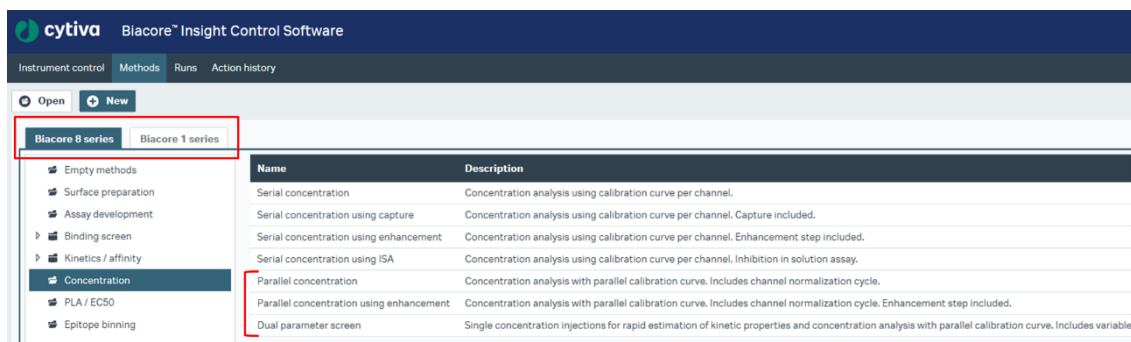


Figure 5 Concentration の method の始め方

Figure 5 にて、Biacore 8 series の場合は赤色カッコで示した **Parallel concentration**、**Parallel concentration using enhancement**、**Dual parameter screen** が選択可能です。

Method name	機能説明
Serial concentration	<ul style="list-style-type: none"> Biacore 8 series: それぞれのニードルに対して検量線用の標品やサンプルを測定する method Biacore 1 series: 1 つのフローセルに対して検量線用の標品やサンプルを測定する method
Serial concentration using capture	<ul style="list-style-type: none"> Serial concentration のキャプチャー法版
Serial concentration using enhancement	<ul style="list-style-type: none"> Serial concentration のエンハンスメント分子添加版
Serial concentration using ISA	<ul style="list-style-type: none"> Serial concentration の ISA 版 mix の command を利用すると装置内で Detecting molecule と Analyte を混合してから添加する

<p>Parallel concentration</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Biacore 8 series のみ搭載 • 全チャンネルの Fc2 にのみリガンド分子を保持し、1 サイクルで検量線用の標品やサンプルを測定する method • チャンネル間のレスポンスを補正するために channel normalization という step が追加される
<p>Parallel concentration using enhancement</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Parallel concentration のエンハンスメント分子添加版
<p>Dual parameter screen</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Parallel concentration の後にそのままりガンド分子と結合したアナライトに対する別のアナライトを 1 濃度で添加することで簡易的な kinetics screen まで実施する method

2-5. Serial concentration の Method Builder の解説

1. Method definition

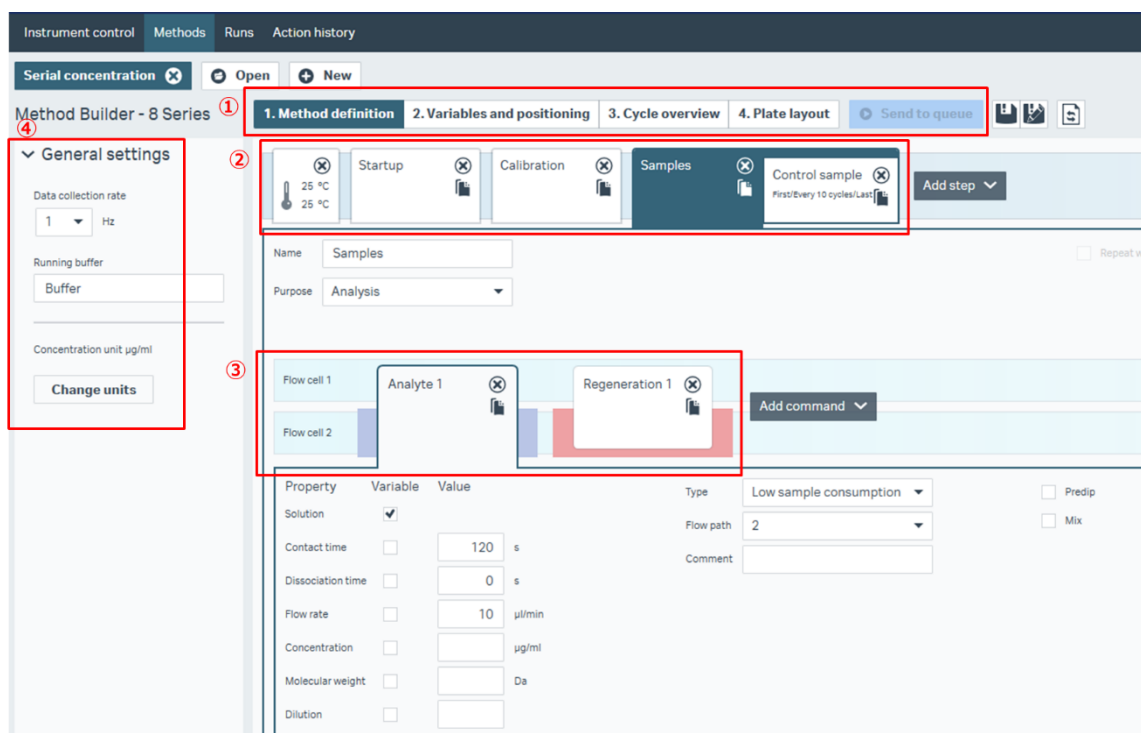


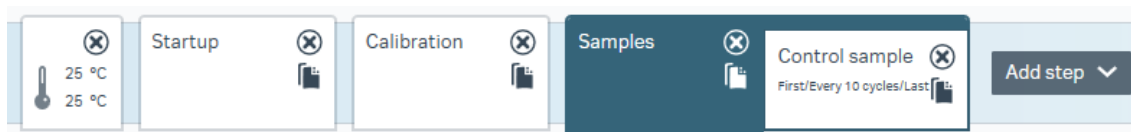
Figure 6 Method definition の設定

ここでは代表例として Biacore 8 series における **Serial concentration** の method を解説します。

番号	名称	機能説明
①	Method management steps	左から順に各項目の設定を行う。 Send to queue を押下すると Method Builder の画面に戻れなくなるので注意する。
②	Steps	Method の全体構成を定義する。それぞれの step の繰り返し回数などは次の 2. Variables and positioning で設定する（例えば Startup の繰り返し回数など）。
③	Commands	個々の操作を定義する。Concentration の method においては Reference cell を作成せず、Active cell のみで測定・解析を行う点に注目する。この図では Fc2 のみが利用されている（Biacore 1 series でも同様に 1 つのフローセルのみで測定・解析が実行される）。Reference cell を設定する場合は Flow path の項目を変更す

		る。 Variables のチェックボックスにチェックが入っている場合は各サイクルで異なる値を入力することが可能であり、次の 2. Variables and positioning で詳細を設定する。
④	General settings	Data collection rate は 1 秒間に何点のデータを取得するかを定義するが、kinetics 解析のようにセンサーグラムの形状を利用した解析ではないため、デフォルトの最低の 1 Hz で良い。 Running buffer は使用するランニング緩衝液の名称を記入しておく。 Concentration unit は適宜変更するが、キャプチャー分子やエンハンスメント分子の濃度単位を個別に設定可能である。

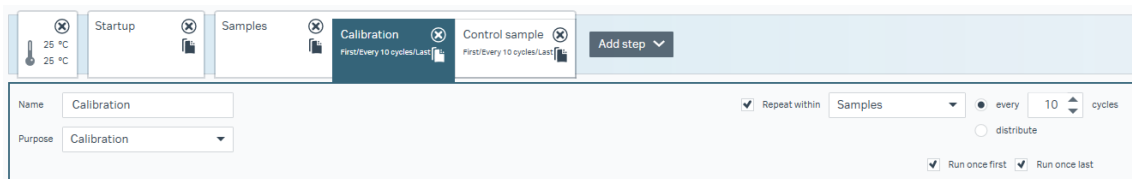
②Steps 補足



Purpose	機能説明
Set temperatures	測定温度およびサンプルコンパートメント温度の設定。
Startup	最初のサンプルを測定する前にフローシステムならびにセンサー表面を平衡化する操作。リガンドを固定化した直後やチップをドックした直後はセンサーグラムのドリフトが発生しやすい。ドリフトが analysis cycle に与える影響を避けるために最初の数サイクルをダミーランする。Startup cycles は Samples steps と同じ条件にするのが望ましいが、各種サンプルが貴重な場合などには添加溶液をランニング緩衝液に置き換えることがある。デフォルトでは Startup with analyte という名称で規定されている。
Calibration	検量線を作成するための step。複数回の Calibration step を実施する場合、Samples の step に紐づける（後述）。
Samples	濃度未知のサンプルを測定する step。

Control sample	ここでは Samples の step に紐づいており、濃度未知のサンプルを測定する最初と最後、ならびに 10 サイクルおきに測定される step。Control sample のレスポンスが経時的に変化してしまう場合、解析時に全体のレスポンスを補正することができる（後述）。次の 2. Variables and positioning において Positive control のフラッグが立つ（後述）。
-----------------------	--

Calibration を繰り返し測定する場合



テンプレートでは **Startup** の直後に 1 回の **Calibration** step が組み込まれていますが、**Samples** の step に複数回組み込む場合は図のように **Repeat within** を **Samples** に設定し、**every** にて何サイクルおきに実施するかを設定し、更に **Run once first/Run once last** のチェックボックスにチェックを入れることで **Samples** のサイクルが始まる前と終わった後に **Calibration** の step を組み込むことができます。設定後、**Calibration** の step を **Control sample** の step の前にドラッグすることで優先順位を上げることができます。なお、**distribute** は等間隔で指定された回数分だけその step を実行します。

2. Variables and positioning

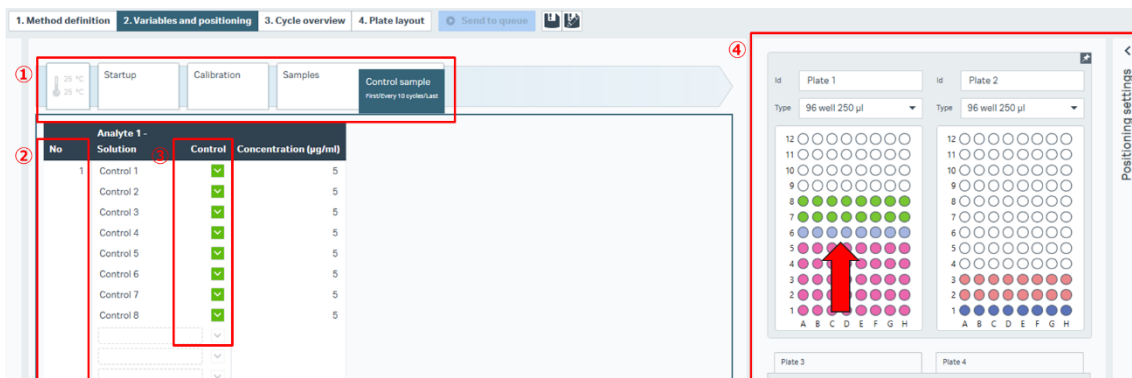


Figure 7 Variables and positioning の設定

番号	名称	機能説明
①	Steps	前の 1. Method definition で Variables のチェックボックスにチェックを入れた commands について詳細な設定を行う。なお、 1 つの step の 1 サイクル中に添加される溶液は 1 つの tray 上に用意されていなければならない。プレートやラックにまたがるのは問題ない。
②	No.	その step におけるサイクル数を表す。通常はあまり気にしなくて良いが、Startup のサイクル数を増やしたい場合は左の Add cycle を押下する（表示外）。
③	Control	解析時に利用できるフラッグを設定する。図中では Control sample に対して緑色の Positive control のフラッグが設定されている。Control sample のレスポンスが経時的に変化してしまう場合、解析時に全体のレスポンスを補正することができる（後述）。
④	Positioning settings	<p>どのウェルバイアルに各種溶液を用意するか設定する。Biacore 8 series における Serial concentration では矢印方向に標品や検体を配位する。Biacore 1 series では右側のプレート部分がラックの表示になっている。また配位方向も Vertical ではなく Horizontal を選択可能である。</p> <p>図中のピンク色は標品を示しているが、測定濃度条件は 5 点となっている。必要があれば増やす。</p> <p>デフォルトで 1 枚のプレートではなく 2 枚のプレートを使用する設定になっている点にも留意する。これは、Regeneration の溶液などは同じウェルバイアルから取得する pooling の設定がデフォルトで入っているためである。プレート利用時はプレートに各種溶液を準備後に foil か septa で蓋をする必要がある。Pooling の</p>

		設定がかかるウェルはコンタミ防止のためゴム製の septa で蓋をすることを推奨している。したがって、左のプレートは foil を、右のプレートは septa を利用するために分離している。Biacore 1 series の場合はバイアルに利用するキャップはゴム製しかなく、コンタミ防止になっている。
--	--	---

3. Cycle overview

トータルにかかる時間や Calibration、Control sample の step がどこに挿入されているか確認する。

4. Plate layout

各種溶液を指示通りに準備する。

Method Builder - 8 Series

1. Method definition 2. Variables and positioning 3. Cycle overview 4. Plate layout Send to queue

Bottles

- Buffer bottle 200 ml Buffer
- Water bottle 200 ml Water
- Reagent bottle empty

View Trays **Volume summary**

Sort by Solution Number of wells Volume

Solution	Concentration	Number of wells	Total volume μl
Regeneration solution	-	16	3496
Startup with analyte	-	8	1080
Control 1	5 μg/ml	2	110
Control 2	5 μg/ml	2	110
Control 3	5 μg/ml	2	110
Control 4	5 μg/ml	2	110
Control 5	5 μg/ml	2	110
Control 6	5 μg/ml	2	110
Control 7	5 μg/ml	2	110
Control 8	5 μg/ml	2	110

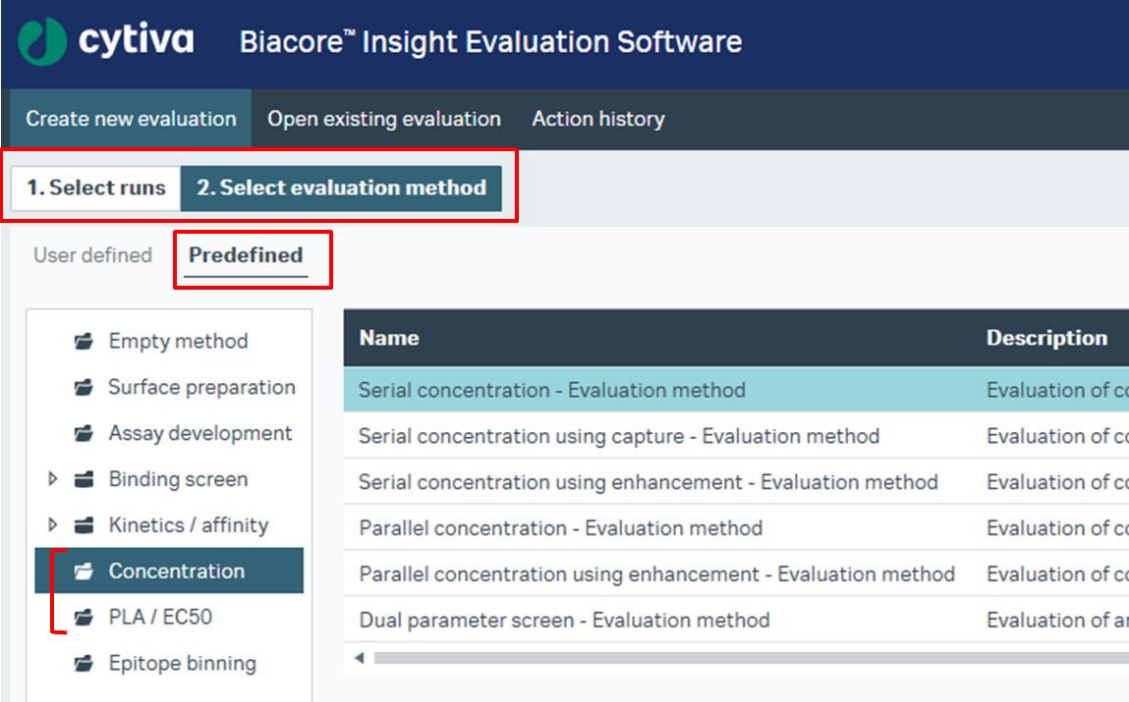
Figure 8 Plate layout の Volume summary の設定

図のように **View** において **Volume summary** を選択すると各種溶液の必要量が表示されるので準備に役立てる。

準備完了したら Send to queue で測定を実施する。

2-6. Biacore Insight Evaluation Software の実行

Insight ES にて測定後ファイルの解析を実施します。**1. Select runs** にて解析したいファイルを選択した後、**2. Select evaluation method** にて **Predefined** を選択し、**Concentration** の中から測定時に利用したテンプレートに対応した解析メソッドを選択し **Open** を押下してください。



The screenshot displays the Biacore Insight Evaluation Software interface. At the top, the Cytiva logo and the software name are visible. Below the header, there are navigation tabs: 'Create new evaluation', 'Open existing evaluation', and 'Action history'. A red box highlights the '1. Select runs' and '2. Select evaluation method' tabs. Under '2. Select evaluation method', the 'Predefined' tab is selected and highlighted with a red box. On the left, a sidebar lists various method categories, with 'Concentration' highlighted in a dark blue box and also marked with a red box. The main area shows a table of predefined evaluation methods.

Name	Description
Serial concentration - Evaluation method	Evaluation of co
Serial concentration using capture - Evaluation method	Evaluation of co
Serial concentration using enhancement - Evaluation method	Evaluation of co
Parallel concentration - Evaluation method	Evaluation of co
Parallel concentration using enhancement - Evaluation method	Evaluation of co
Dual parameter screen - Evaluation method	Evaluation of an

Figure 9 Insight ES での解析の始め方

2-7. Insight Evaluation Software の workspace の解説

解析 method を適用すると、以下のような workspace が出現します。



Figure 10 Insight ES の workspace

番号	名称	機能説明
①	Evaluation items	Insight ES における 5 つの基本的な item types は、それぞれ Sensorgram , Plot , Concentration , Epitope binning , Kinetics and affinity である。 Sensorgram は全体のセンサーグラムを確認するため、 Plot は screening や ranking、PLA や EC ₅₀ の決定などのレポートポイントベース解析のため、 Concentration は標品を用いた濃度定量解析のため、 Epitope binning は epitope binning の解析のため、 Kinetics and affinity は kinetics や affinity 解析のために用いられる。解析 method を適用するといくつかは自動で出現するが、必要があれば item の右矢印から Clone を取得したり、 Home から該当の item アイコンをクリックして追加することができる。
②	Settings	表示したいセンサーグラムや解析したいレポートポイントの設定を行う（後述）。
③	Panel	Thumbnails: ②の Settings で設定したパラメータを表示する（後述）。Figure 10 では④に示される領域。 Plots: ④の Thumbnails で選択された channel にフォーカスしている（後述）。左から標品による検量線、control、検体。Figure 10 では⑤に示される

	<p>領域。</p> <p>Sensorgrams: ⑤の Plots で示されるデータを押し下し明るい水色のアクティブ状態にすることで、そのデータの元となるセンサーグラムを表示する。Evaluation items 内の Sensorgram でも全体を確認可能であるため、デフォルトでは非表示となっている。</p> <p>Parameters: ⑤の Plots で示される標品による検量線はデフォルトでは 4-parameter fitting model でフィッティングを行っているが、それぞれの上側漸近線 Rhi、下側漸近線 Rlo、中点 A1、ヒル係数 A2、カイ二乗値 Chi²を表している。</p> <p>Table: 全サイクルの詳細が記載されている（後述）。画面下方にスクロールして確認できる（Figure 10 のマウスのイラストの辺りをドラッグ）。</p>
--	--

Calibration settings

▼ Calibration settings

Report point: Analyte stability early_1 ▼

Response type: Relative
 Slope

Calibration curve: Preceding
 Average
 Calibration trends

Fitting function: 4 parameter
 Linear

Figure 11 Calibration settings

Figure 10 の②の **Settings** 内の **Data grouping** で設定します。どのように検量線を作成するかを決定します。Figure 6 の②の **steps** において **Calibration** に設定されたサイクルのみが検量線を構成します。

Setting	機能説明
Report point	解析に利用するレポートポイントを設定する。全てのサイクルに適用される。
Response type	Relative response か slope を選択することが可能（2-2 参照）。
Calibration curve	<p>検量線を複数回取得している場合は検体が適用する検量線をどれにするか設定する。</p> <p>Preceding: 直前の検量線を用いる。直前の検量線が存在しない場合は最も近い検量線を用いる。</p> <p>Average: それぞれの濃度のプロットを平均した値での検量線を用いる。</p> <p>Calibration trends: それぞれの検体は検量線の傾向に従って補間によって得られた個別の検量線から計算される。複数回の検量線でドリフトが発生している際に補正して解析することができる（後述）。</p>
Fitting function	検量線をフィッティングで作成する際に 4 parameter か Linear のモデルを選択できる。

Calibration trends の補足

Calibration trends は、実行中の各サイクルに対して個別の検量線を構築することにより、検量線全体の体系的なドリフトを補正することができる機能です。Trend line は各標品濃度の同じ標品濃度のレスポンスでフィットされ、各サイクルの個別の検量線は trend line の値を使用した補間によって構築されます。Trend line は 2 点の trend の場合は Linear でフィッティングされ、3 点以上の場合は 4 parameter でフィッティングされます。Trend line の端にあるプロットを **exclude** で除外した場合、trend line は延長されません。したがって最初の検量線よりも前に測定した検体あるいは最後の検量線よりも後に測定した検体があった場合は、それらの検体の濃度は計算されません。

Calibration trends を選択すると、Calibration curve の **Thumbnails** と **Plots** が **Calibration trends** に置き換えられます。

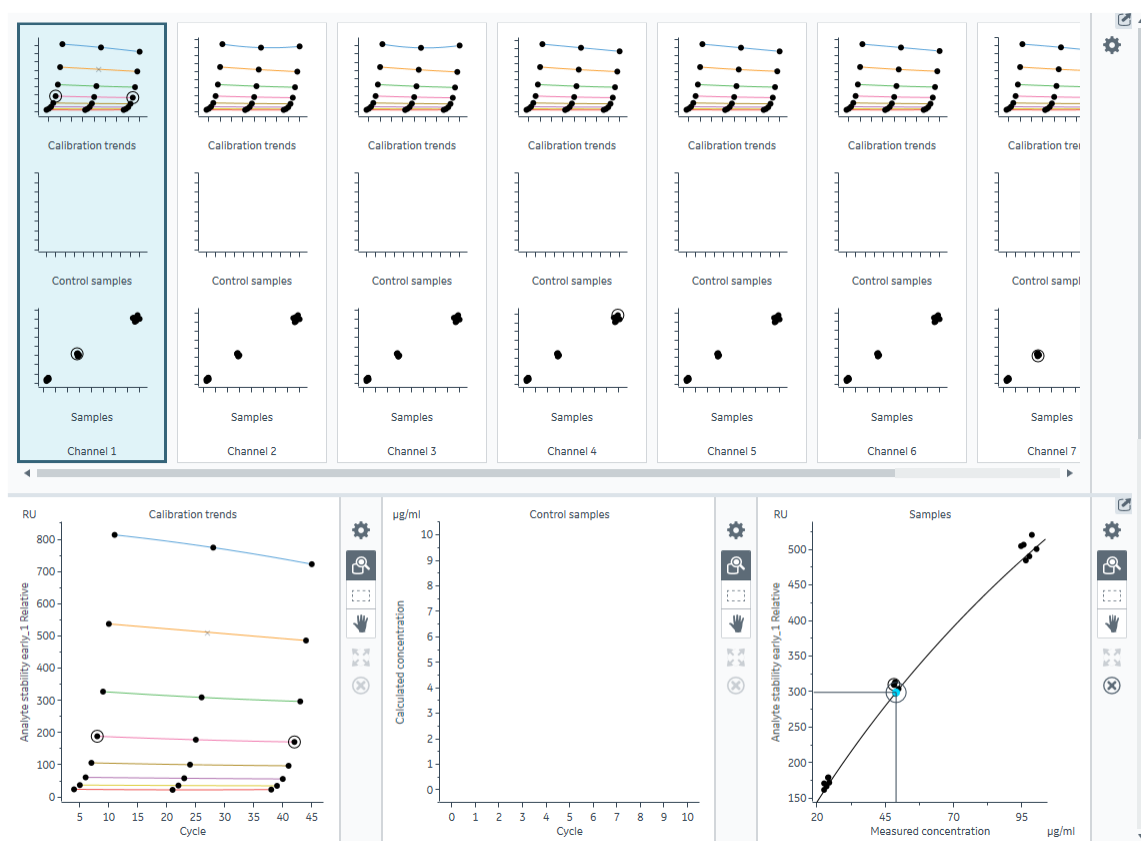


Figure 12 Calibration trends を適用した場合

Thumbnails panel

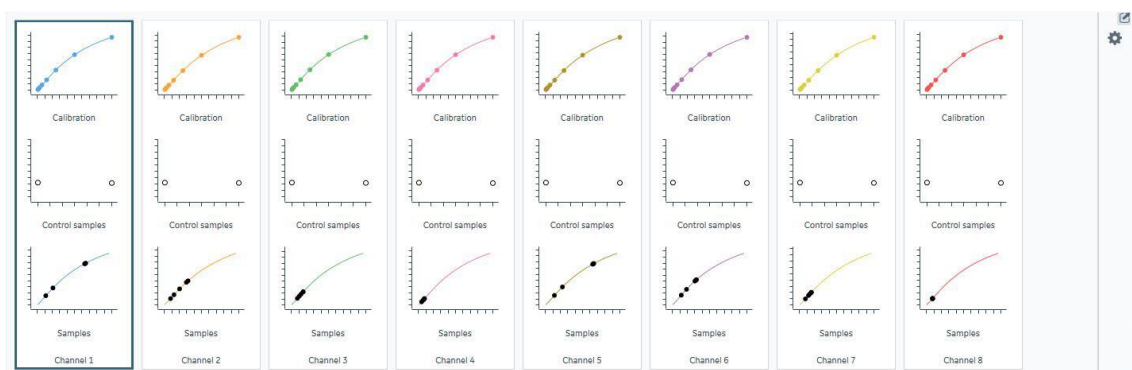


Figure 13 Biacore 8 series での Serial concentration の Thumbnails

Figure 10 の②の **Settings** の **Data grouping** で設定した方式で表示されます。選択した Thumbnail はアクティブ状態となり、**Plots panel** に詳細が表示されます。複数の Thumbnails をアクティブ状態にすることも可能であり、その場合は **Ctrl + click** で選択してください。

Serial concentration を実施している場合は channel 間をまたいで標品による検量線や control、検体のデータを適用することはできません。

Plots panel

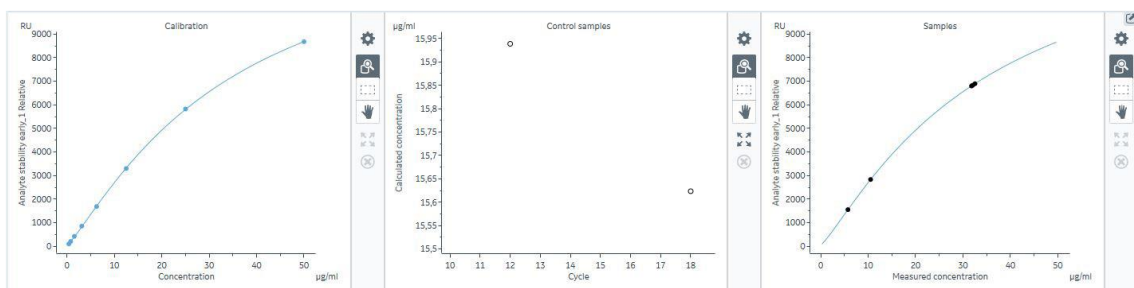


Figure 14 Plots の一例

3つのパネルを表示します。左から標品による検量線、control、検体のデータです。

Exclude (除外) 設定

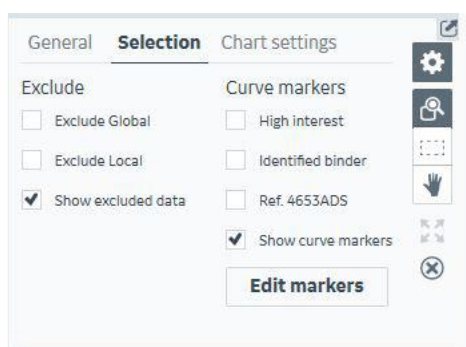


Figure 15 Selection tab

ノイズやスパイクの問題で、含まれると解析結果に影響を与える特定のプロットを除外したい場合は、それぞれの Plots panel の右上にある歯車マークから Selection tab を開き、除外設定を行います。

Setting	機能説明
Exclude global	選択されたプロットを全ての Evaluation items から除外する。変更のあった Evaluation items にはオレンジ色の「！」マークが出現する。
Exclude local	選択されたプロットを現在の Evaluation item 内でのみ除外する。
Show excluded data	この設定にチェックが入っている場合は、除外設定されたプロットは灰色の×マークで Plots panel 内に表示される。

Table panel

Cycle	Channel	Sensorgram type	Analysis step purpose	Analysis step name	Excluded	Curve markers	Calib. curve	Analyte 1 Solution	Response (RU)	Analyte 1 Concentration (µg/ml)	Calculated conc. (µg/ml)	Avg. calc. conc. (µg/ml)	CV (%)	Calc. conc. vs expected (%)
4	1	Active	Calibration	Calibration			1	Calib 1	102,1	0,39	0,275	0,275		70,5
5	1	Active	Calibration	Calibration			1	Calib 1	208,7	0,78	0,765	0,765		98,1
6	1	Active	Calibration	Calibration			1	Calib 1	425,5	1,56	1,64	1,64		105
7	1	Active	Calibration	Calibration			1	Calib 1	857,2	3,12	3,23	3,23		103
8	1	Active	Calibration	Calibration			1	Calib 1	1687	6,25	6,19	6,19		99,1
9	1	Active	Calibration	Calibration			1	Calib 1	3304	12,5	12,4	12,4		99,4
10	1	Active	Calibration	Calibration			1	Calib 1	5826	25	25,1	25,1		100
11	1	Active	Calibration	Calibration			1	Calib 1	8680	50	49,9	49,9		99,9
12	1	Active	Analysis	Control sample			1	Control 1	4105		15,9	15,8	1,41	
13	1	Active	Analysis	Samples			1	Sample 1	6899		32,5	22,5	58,9	
14	1	Active	Analysis	Samples			1	Sample 1	6803		31,8	22,5	58,9	
15	1	Active	Analysis	Samples			1	Sample 1	2835		10,5	22,5	58,9	

Figure 16 Table の例

解析結果はこの Table にまとまっています。Columns に現れるパラメータを追加したい場合は右上の歯車マークから追加してください。順番なども自由に変更が可能です。

Column	機能説明
Calib. curve	検量線を複数回測定している場合は何回目の検量線かを示す。
<Command name> concentration	測定 method で入力した濃度が記載されている。通常は標品の濃度のみ記載されているが、（もし入力しているなら）検体の予測濃度が記載されていることもある。
<Command name> dilution	測定 method で入力している場合は希釈倍率が記載されている。未記入の場合は 1 となっている。検体と control にのみ適用される。
Response/Normalized response	レポートポイントにおけるレスポンスが表示されている。Parallel concentration を実施しており channel 間の normalize を実施している場合は Normalized response が記載されている。
Measured conc.	検量線から算出された濃度が記載されている。
Calculated conc.	Measured conc. * Dilution factor が表示される。ストック溶液濃度。
Avg. calc. conc.	検体を複数回測定している場合の Calculated conc. の平均値。
Calc. conc. vs expected (%)	（測定 method で入力している場合は）検体の予測濃度に対する Calculated conc. の割合を示す。
Avg. vs expected (%)	（測定 method で入力している場合は）検体の予測濃度に対する Calculated conc. の均値の割合を示す。

3. Curve analysis (PLA と EC₅₀)について

3-1. Potency measurements と Curve analysis の概要

Potency measurements はバイオ医薬品の開発および製造で利用されるいくつかの試験のうちの 1 つを指し、関連する薬効や意図した生物学的効果を定量化するものです。動物実験や細胞実験などのバイオアッセイでは、実際の生物学的活性を測定することによって potency を直接決定できます。これとは対照的に、ELISA や SPR ベースなどの結合アッセイでは、標的分子への薬物の結合を測定することとなり、surrogate potency assays などと呼ばれることがあります。結合が生物学的効果とどの程度相関するかによって真の potency measurements に対する surrogate assays の関係性が決まります。

Biacore では用量反応曲線 **dose-response curve** (参照物質 **reference substance** と被試験物質 **test substance** の対数濃度に対するレスポンスのプロット) の比較によって potency が評価されます。Insight ES における Potency measurements では 2 つの計算方法を用いることが可能で、それぞれ **Parallel line analysis (PLA)** と **半数効果濃度 (EC₅₀)** です。対数濃度スケールでの **dose-response curve** は一般的にシグモイド型であり、上側および下側漸近線とほぼ直線的な中央領域を持ちます。PLA による評価は線形領域の傾きに基づいて行われ、EC₅₀ による評価は 4 parameter 関数を測定データに当てはめることによる上側および下側漸近線の決定に依存します。

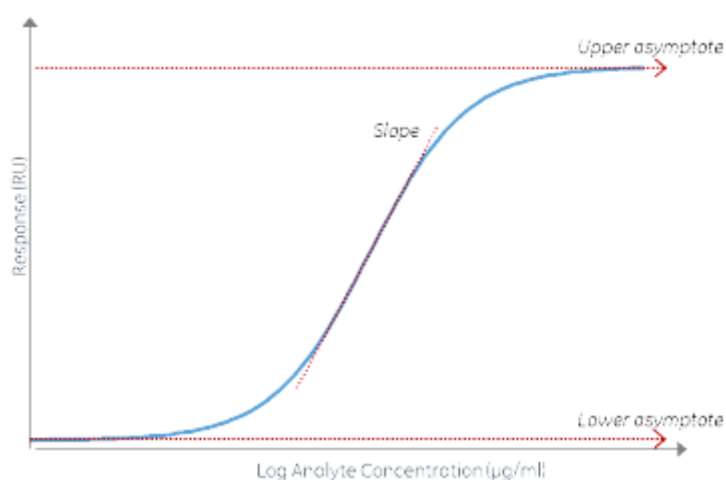


Figure 17 対数濃度を取った時の dose-response curve の代表例

こちらの資料もご参考ください。

<https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-33043-pdf>

3-2. Insight でフォローする assay format

Potency measurements は DBA のフォーマットを取ります。エンハンスメント分子は用いられません。キャプチャー法も取ることが可能ですが、キャプチャー量は測定全体を通して一定値である必要があります。

一般的にはアナライトは 9 点の濃度で測定することが推奨され、下側漸近線、中央領域、上側漸近線にそれぞれ 3 点が用いられるような濃度範囲で運用されます。PLA での解析は中央領域の直線に、EC₅₀ での解析は上側および下側漸近線に厳密性が求められます。

リガンド量は高密度にすることで低濃度のアナライトでも dose-response curve の下側漸近線を信頼性高く決定することができます。ただし極端に高密度なリガンド量はアナライトの消費量をいわずに増やし、dose-response curve の上側漸近線に到達することを妨げます。適切なリガンド量は assay development で決定していただくほかありませんが、検討のスターティングポイントとして 50 kDa 程度の分子をリガンドとするなら 2500-4000 RU 程度を確保できれば良いでしょう。

また Concentration measurements とは異なり Potency measurements では Reference cell を設定するのが通常です。ただしこれはデキストランマトリクスに非特異的結合が起きていないことを確認するために用意されるものであり、assay development の過程でそうした非特異的結合は取り除かれたり最小化されなければなりません。解析時には Reference subtraction は通常は実施されません。

測定順も Concentration measurements の感覚とは異なり、Reference substance も test substance も低濃度から順に測定します (Figure 18 参照)。Potency assay はたくさんの分析サイクル数と長時間の測定が必要なが多く、アッセイのドリフトの影響を最小限にするため、どのサンプルでも低濃度から順に測定していきます。ブランク (0 濃度) も一般的には取得しません。

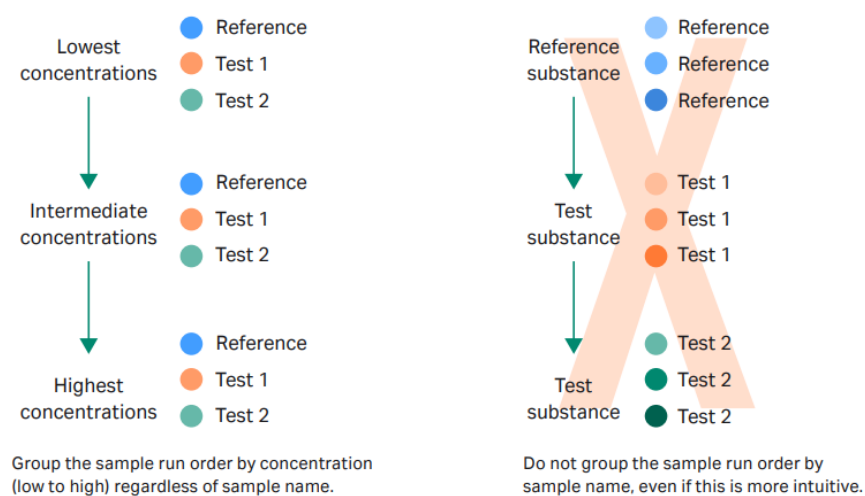


Figure 18 測定順

3-3. Biacore Insight Control Software の実行

Insight CS にて method のテンプレートを実行します。なお、これらのテンプレートでは既にチップ表面でリガンドの固定化が完了しているところから開始となっております（キャプチャー法のもの以外）。したがって別の method にて事前にリガンドの固定化は完了させてください。

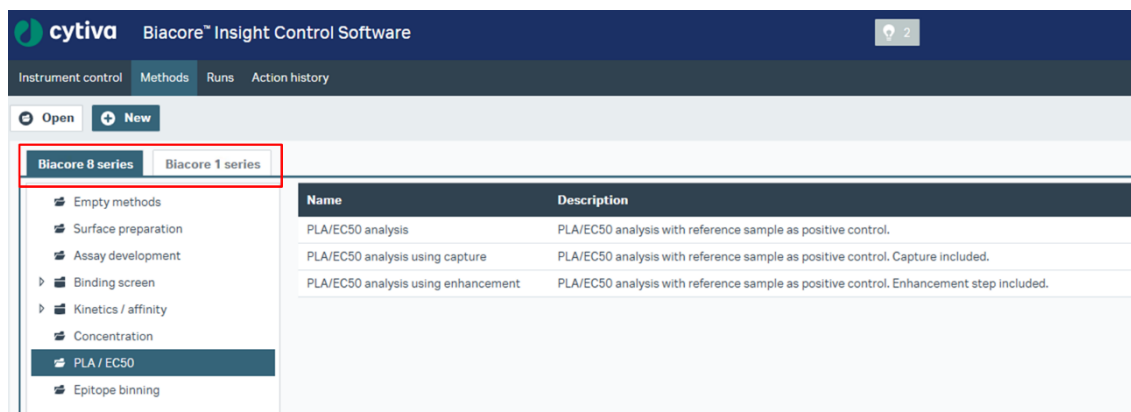


Figure 19 Potency assay の method の始め方

PLA/EC50 のテンプレートは以下のものが用意されています。

Method name	機能説明
PLA/EC50 analysis	最も基本的な分析手法。
PLA/EC50 analysis using capture	PLA/EC50 analysis のキャプチャー法版。
PLA/EC50 analysis using enhancement	PLA/EC50 analysis のエンハンスメント分子添加版。

3-4. PLA/EC50 analysis using capture の Method Builder の解説

1. Method definition

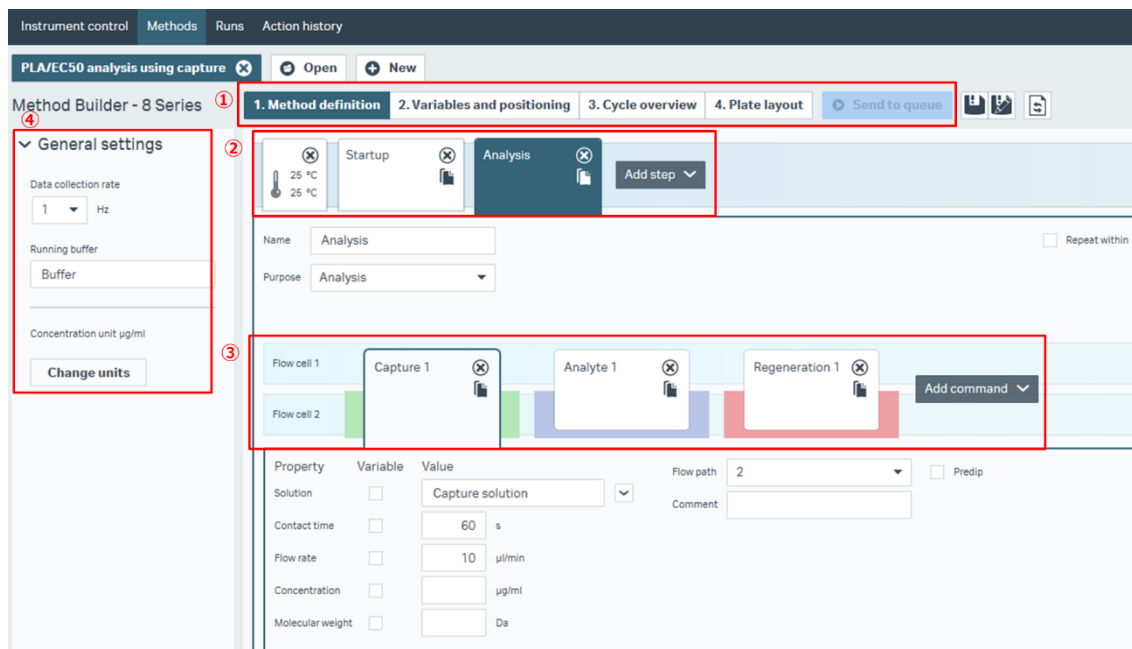


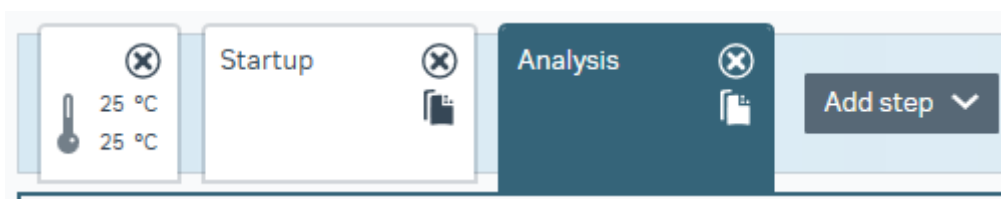
Figure 20 Method definition の設定

ここでは代表例として Biacore 8 series における **PLA/EC50 analysis using capture** の method を解説します。

番号	名称	機能説明
①	Method management steps	左から順に各項目の設定を行う。 Send to queue を押下すると Method Builder の画面に戻れなくなるので注意する。
②	Steps	Method の全体構成を定義する。それぞれの step の繰り返し回数などは次の 2. Variables and positioning で設定する（例えば Startup の繰り返し回数など）。
③	Commands	個々の操作を定義する。Potency の method においては Reference cell を作成せず、Active cell のみで測定・解析を行う点に注目する。この図では Fc2 のみが利用されている（Biacore 1 series でも同様に 1 つのフローセルのみで測定・解析が実行される）。Reference cell を設定する場合は Flow path の項目を変更する。 Variables のチェックボックスにチェックが入っている場合は各サイクルで

		異なる値を入力することが可能であり、次の 2. Variables and positioning で詳細を設定する。
④	General settings	<p>Data collection rate は 1 秒間に何点のデータを取得するかを定義するが、kinetics 解析のようにセンサーグラムの形状を利用した解析ではないため、デフォルトの最低の 1 Hz で良い。</p> <p>Running buffer は使用するランニング緩衝液の名称を記入しておく。</p> <p>Concentration unit は適宜変更するが、キャプチャー分子やエンハンスメント分子の濃度単位を個別に設定可能である。</p>

②Steps 補足



Purpose	機能説明
Set temperatures	測定温度およびサンプルコンパートメント温度の設定。
Startup	最初のサンプルを測定する前にフローシステムならびにセンサー表面を平衡化する操作。リガンドを固定化した直後やチップをドックした直後はセンサーグラムのドリフトが発生しやすい。ドリフトが analysis cycle に与える影響を避けるために最初の数サイクルをダミーランする。Startup cycles は analysis steps と同じ条件にするのが望ましいが、各種サンプルが貴重な場合などには添加溶液をランニング緩衝液に置き換えることがある。デフォルトでは Startup with analyte という名称で規定されている。
Analysis	Reference substance や test substance を測定する step。

2. Variables and positioning

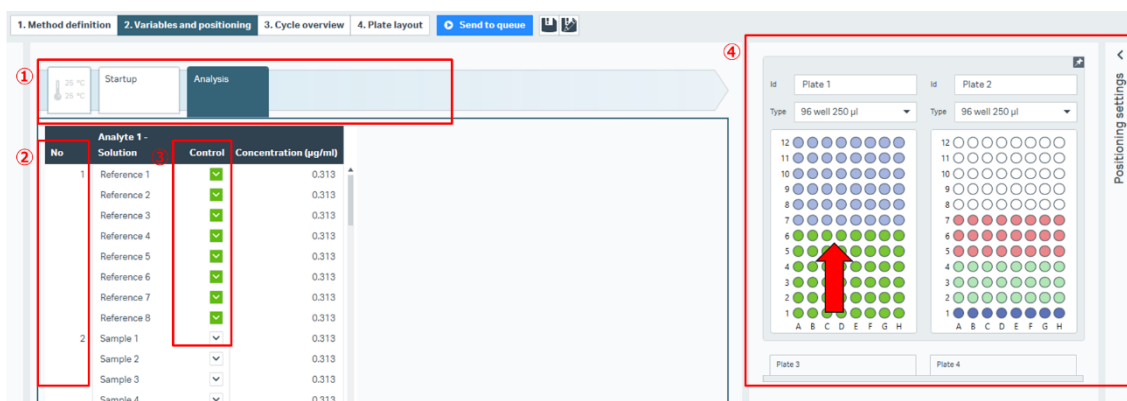


Figure 21 Variables and positioning の設定

番号	名称	機能説明
①	Steps	前の 1. Method definition で Variables のチェックボックスにチェックを入れた commands について詳細な設定を行う。なお、 1 つの step 内の 1 サイクル中に添加される溶液は 1 つの tray 上に用意されていなければならない。プレートやラックにまたがるのは問題ない。
②	No.	その step におけるサイクル数を表す。通常はあまり気にしなくて良いが、Startup のサイクル数を増やしたい場合は左の Add cycle を押下する（表示外）。
③	Control	解析時に利用できるフラッグを設定する。図中では Reference substance に対して緑色の Positive control のフラッグが設定されている。解析時にこの Positive control のフラッグが設定されたサイクルを Reference substance として認識する。
④	Positioning settings	<p>どのウェルバイアルに各種溶液を用意するか設定する。Biacore 8 series における PLA/EC50 using capture では矢印方向に reference substance や test substance を配位する。Biacore 1 series では右側のプレート部分がラックの表示になっている。また配位方向も Vertical ではなく Horizontal を選択可能である。</p> <p>図中の緑色は reference substance を示しているが、測定濃度条件は 6 点となっている。3-2.で解説したように、基本は 9 点を推奨する。また配位は直感的に分かりやすく各 substance がまとまっているが、実際に添加する順番は低濃度から順になっている（②の No.を確認）。</p> <p>デフォルトで 1 枚のプレートではなく 2 枚のプレートを使用する設定になっている</p>

	<p>点にも留意する。これは、Capture や Regeneration の溶液などは同じウェル/バイアルから取得する pooling の設定がデフォルトで入っているためである。プレート利用時はプレートに各種溶液を準備後に foil か septa で蓋をする必要がある。Pooling の設定がかかるウェルはコンタミ防止のためゴム製の septa で蓋することを推奨している。したがって、左のプレートは foil を、右のプレートは septa を利用するために分離している。Biacore 1 series の場合はバイアルに利用するキャップはゴム製ではなく、コンタミ防止になっている。</p>
--	--

3. Cycle overview

トータルにかかる時間や Reference substance がどこに挿入されているか確認する。

4. Plate layout

各種溶液を指示通りに準備する。

Method Builder - 8 Series

1. Method definition 2. Variables and positioning 3. Cycle overview 4. Plate layout Send to queue

Bottles

Buffer bottle 400 ml Buffer
Water bottle 300 ml Water
Reagent bottle empty

Sort by Solution Number of wells Volume

Solution	Concentration	Number of wells	Total volume µl
Capture solution	-	32	6696
Regeneration solution	-	32	6696
Startup with analyte	-	8	1080
Reference 1	0.313 µg/ml	1	55
Reference 1	0.625 µg/ml	1	55
Reference 1	1.25 µg/ml	1	55
Reference 1	2.5 µg/ml	1	55
Reference 1	5 µg/ml	1	55
Reference 1	10 µg/ml	1	55
Reference 1	20 µg/ml	1	55

Figure 22 Plate layout の Volume summary の設定

図のように **View** において **Volume summary** を選択すると各種溶液の必要量が表示されるので準備に役立つ。

準備完了したら Send to queue で測定を実施する。

3-5. Biacore Insight Evaluation Software の実行

Insight ES にて測定後ファイルの解析を実施します。**1. Select runs** にて解析したいファイルを選択した後、**2. Select evaluation method** にて **Predefined** を選択し、**PLA/EC50** の中から測定時に利用したテンプレートに対応した解析メソッドを選択し **Open** を押下してください。

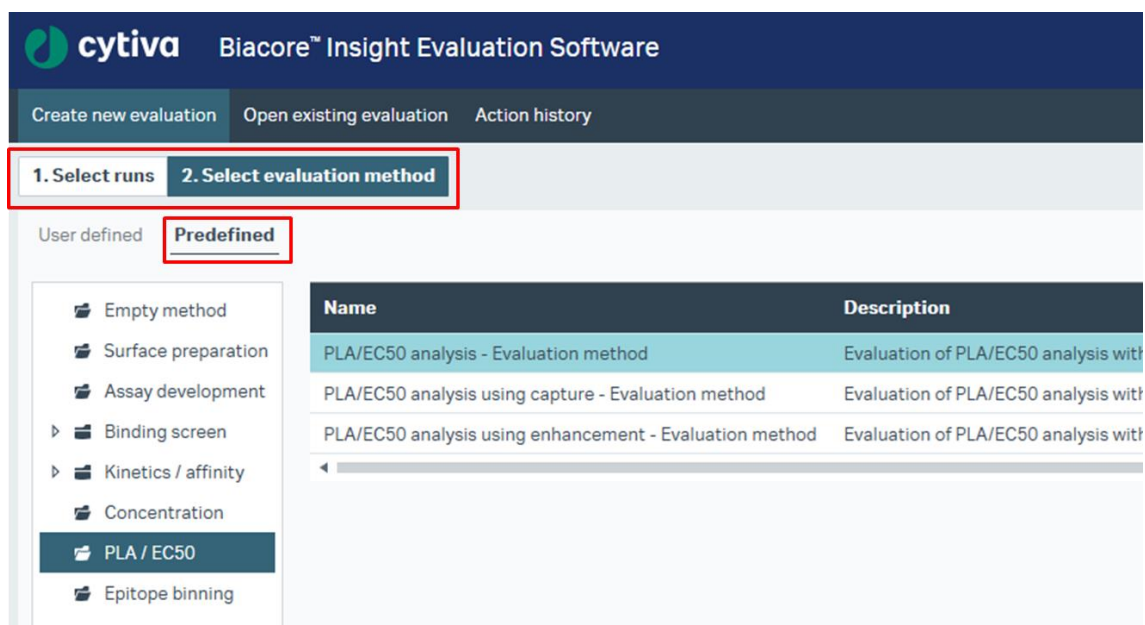


Figure 23 Insight ES での解析の始め方

3-6. Evaluation item -PLA や EC50 の workspace の解説

解析 method を適用すると、以下のような workspace が出現します。



Figure 24 Evaluation -PLA の workspace

番号	名称	機能説明
①	Evaluation items	Insight ES における 5 つの基本的な item types は、それぞれ Sensorgram , Plot , Concentration , Epitope binning , Kinetics and affinity である。 Sensorgram は全体のセンサーグラムを確認するため、 Plot は screening や ranking、PLA や EC ₅₀ の決定などのレポートポイントベース解析のため、 Concentration は標品を用いた濃度定量解析のため、 Epitope binning は epitope binning の解析のため、 Kinetics and affinity は kinetics や affinity 解析のために用いられる。解析 method を適用するといくつかは自動で出現するが、必要があれば item の右矢印から Clone を取得したり、 Home から該当の item アイコンをクリックして追加することができる。
②	Settings	表示したいセンサーグラムや解析したいレポートポイントの設定を行う（後述）。
③	Panel	Thumbnails: ②の Settings で設定したパラメータを表示する。 Plot: ④の Thumbnails で選択された channel を⑤でフォーカスする（後述）。 Sensorgrams: ⑤の Plots で示されるデータを押し下し明るい水色のアクティブ

		<p>状態にすることで、そのデータの元となるセンサーグラムを表示する。</p> <p>Table: ⑤の Plots を元に PLA や EC₅₀ で解析された結果を⑥に表示する（後述）。</p>
--	--	---

PLA 解析における Plot パネル内の Settings の Curve analysis

PLA の解析においては **Plot** パネルの歯車マークから **Curve analysis** を選択できます。デフォルトでは **Plot** パネルには reference substance と test substance で共通の slope が描かれていますが、**Individual fit** を選択するとそれぞれの slope が出現します。

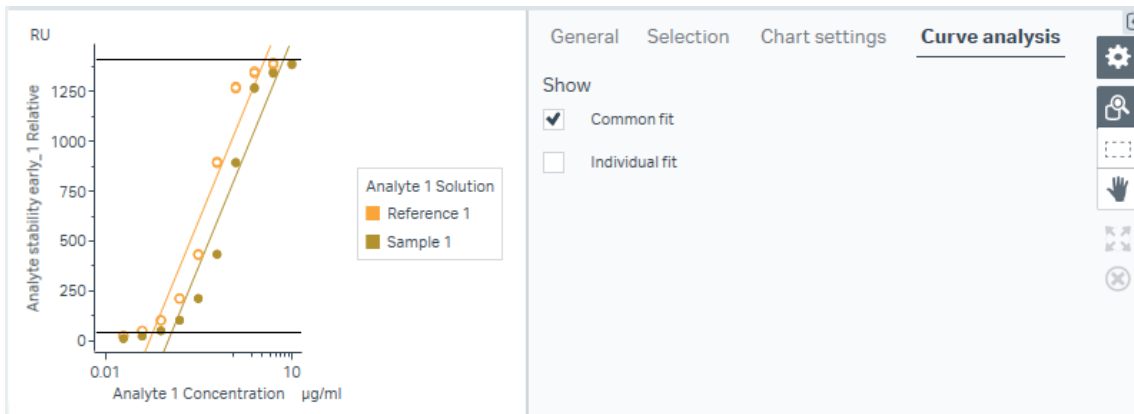


Figure 25 Slope の表示

Table パネル

Group	Control	Sample	Relative potency	Common slope	Common R ²	Control slope	Sample slope	Control R ²	Sample R ²	Slope ratio S/C	Fit mes
Ch 1	Reference 1	Sample 1									Referen
Ch 2	Reference 2	Sample 2	9,73	-8510	0,512	4840	-2,19e4	0,469	0,555		-4,52
Ch 3	Reference 3	Sample 3	49,5	2750	0,700	2940	1520	0,400	1,00	0,516	
Ch 4	Reference 4	Sample 4					-1330		1,00		Referen
Ch 5	Reference 5	Sample 5	1680	-1020	0,540	-850	-2260	0,0806	1,00	2,66	
Ch 6	Reference 6	Sample 6					3970		1,00		Referen

Curve analysis が適用されると、Table パネルには 3 つのタブが出現します。

Tab	機能説明
Plot table	Plot パネルに表示されているパラメータが記載される。
PLA/EC50 results	PLA 解析結果あるいは EC ₅₀ 解析結果が表示される（後述）。
PLA/EC50 settings (and parameters)	Fit mode オプションを適用した場合の数値が表示される（後述）。

PLA results

Group	Control	Sample	Relative potency	Common slope	Common R ²	Control slope	Sample slope	Control R ²	Sample R ²	Slope ratio S/C	Fit mes
Ch 1	Reference 1	Sample 1									Referen
Ch 2	Reference 2	Sample 2	9,73	-8510	0,512	4840	-2,19e4	0,469	0,555		-4,52
Ch 3	Reference 3	Sample 3	49,5	2750	0,700	2940	1520	0,400	1,00	0,516	
Ch 4	Reference 4	Sample 4					-1330		1,00		Referen
Ch 5	Reference 5	Sample 5	1680	-1020	0,540	-850	-2260	0,0806	1,00	2,66	
Ch 6	Reference 6	Sample 6					3970		1,00		Referen

Parameter	機能説明
Relative potency	Reference substance に対する test substance の相対力価が表示される。
95% confidence	相対力価の 95%信頼区間の下限と上限。相対力価が 1 の時、reference substance と test substance は完全に同じ効力を示すということであるから、95%信頼区間が 1 を含まない範囲なら 2 つの substance の効力は有意に異なると結論付けられる。

Slope	直線フィッティングの傾き。Common、Control、Sample について表示される。
R²	直線フィッティングの回帰係数。Common、Control、Sample について表示される。
Slope ratio S/C	Sample と Control の傾きの比。

EC50 results

Plot table **EC50 results** EC50 settings and parameters

Group	Control	Sample	Relative potency %	95% confidence		Fit message
				low	high	
Ch 1	Reference 1	Sample 1	14,2	0,107	1890	
Ch 2	Reference 2	Sample 2	71,6	0,0871	5,88e4	Reference 2 EC50 value outside data range; Sample
Ch 3	Reference 3	Sample 3	2,26	3,35e-12	1,53e12	Sample 3 EC50 value outside data range
Ch 4	Reference 4	Sample 4	181	6,34e-4	5,16e7	
Ch 5	Reference 5	Sample 5	346	0,00		
Ch 6	Reference 6	Sample 6	11,0	4,70e-8	2,70e10	Reference 6 EC50 value outside data range; Sample

Parameter	機能説明
Relative potency	Reference substance に対する test substance の相対力価が表示される。
95% confidence	相対力価の 95%信頼区間の下限と上限。相対力価が 1 の時、reference substance と test substance は完全に同じ効力を示すということであるから、95%信頼区間が 1 を含まない範囲なら 2 つの substance の効力は有意に異なると結論付けられる。

PLA settings

この tab 内では **Fit mode** オプションとフィッティング境界（直線性の範囲）の設定が表示されます。フィッティング境界はレスポンスで表示されるほか、それぞれの上下漸近線からの割合で表示されます。

Group	Low	High	Low (%)	High (%)	Fit message
Ch 1	-2697,1	-1263,5	20,0	80,0	Reference 1 not enough data; Sample 1 not enough data
Ch 2	-27718,3	40039,0	20,0	80,0	
Ch 3	-9806,5	10667,6	20,0	80,0	
Ch 4	-8469,8	-4710,3	20,0	80,0	Reference 4 not enough data
Ch 5	-7612,7	-2801,7	20,0	80,0	
Ch 6	48306,9	192623,3	20,0	80,0	Reference 6 not enough data

Fit mode	機能説明
Original data	元のレスポンスからフィッティングする。
Normalized data	各シグモイドカーブごとに個別に正規化されたデータに下側と上側漸近線をフィットさせる。

EC50 settings and parameters

この tab 内では **Fit mode** オプションと 4-parameter fitting のパラメータが表示されます。

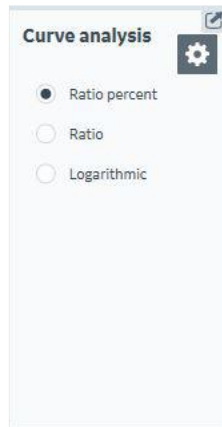
Group	Curve	EC50	Lower asymptote	Upper asymptote	Hill coeff	Chi ²	Function	Fit message
Ch 1	Reference 1	1,30	-1920	-4070	17,8	2,33e7	4 param	
Ch 1	Sample 1	9,10	-2280	352	14,1	1,14e7	4 param	
Ch 2	Reference 2	0,189	-9,75e4	-3180	4,59	9,63e6	4 param	Reference 2 EC50
Ch 2	Sample 2	0,264	1,28e5	-3070	4,91	2,50e7	4 param	Sample 2 EC50
Ch 3	Reference 3	2,75	-1,31e4	-8370	1,64	9,34e7	4 param	
Ch 3	Sample 3	1,22	2,01e4	4,74e4	0,557	5,90e7	4 param	Sample 3 EC50

Fit mode	機能説明
Original data	元のレスポンスからフィッティングする。
Normalized data	各シグモイドカーブごとに個別に正規化されたデータに下側と上側漸近線をフィ

	ットさせる。
Restricted fit	Reference substance も test substance も同じ上下漸近線、同じヒル係数をもつよう制約されたフィッティング。Test substance のデータについてフィッティングを行うにあたり、十分な濃度のデータが取得できない場合の解析に役立つ。

Parameter	機能説明
EC50	EC ₅₀ の値を表示する。
Lower asymptote	下側漸近線
Upper asymptote	上側漸近線
Hill coeff	ヒル係数
Chi²	カイ二乗値
Function	フィッティングモデルを表すが、現在は 4-parameter にしか対応していない。

Table パネル内の Settings の Curve analysis



Setting	機能説明
Ratio percent	Test substance の reference substance に対する相対力価を%で表示する。
Ratio	Test substance の reference substance に対する相対力価を数値で表示する。
Logarithmic	Test substance の reference substance に対する相対力価を基底数 10 の対数で表示する。

■ 総合お問合せ窓口

TEL : 03-5331-9336

● 機器アフターサービス

(営業日の 9:00～17:30、音声案内に従い①を選択)

FAX : 03-5331-9324 (常時受付)

● 製品技術情報に関して

(バイオダイレクトライン、営業日の 9:00～12:00、13:00～17:30)

音声案内に従い②を選択後、対象の製品別の番号を押してください。

① : ÄKTA、クロマトグラフィー関連製品

② : ビアコア関連製品

③ : 電気泳動関連製品、画像解析装置

④ : IN Cell Analyzer、ワットマン製品、その他製品

e-mail : Tech-JP@cytiva.com (常時受付)

● 納期／在庫お問合せ

(営業日の 9:00～12:00、13:00～17:30、音声案内に従い③を選択)

注) 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。

注) アナログ回線等で番号選択ができない場合はそのままお待ちください。オペレーターにつながります。

www.cytivalifesciences.co.jp

論文に掲載いただく際の名称・所在地

Cytiva / Tokyo, Japan

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

〒169-0073

東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルヂング

お問合せ：バイオダイレクトライン

TEL：03-5331-9336

e-mail：Tech-JP@cytiva.com

掲載されている内容は 2021 年 8 月現在のもので
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。