

<お客様向け情報>

ファイル名：1366-B\_SLAS2020 Promega KRiching Degraders poster

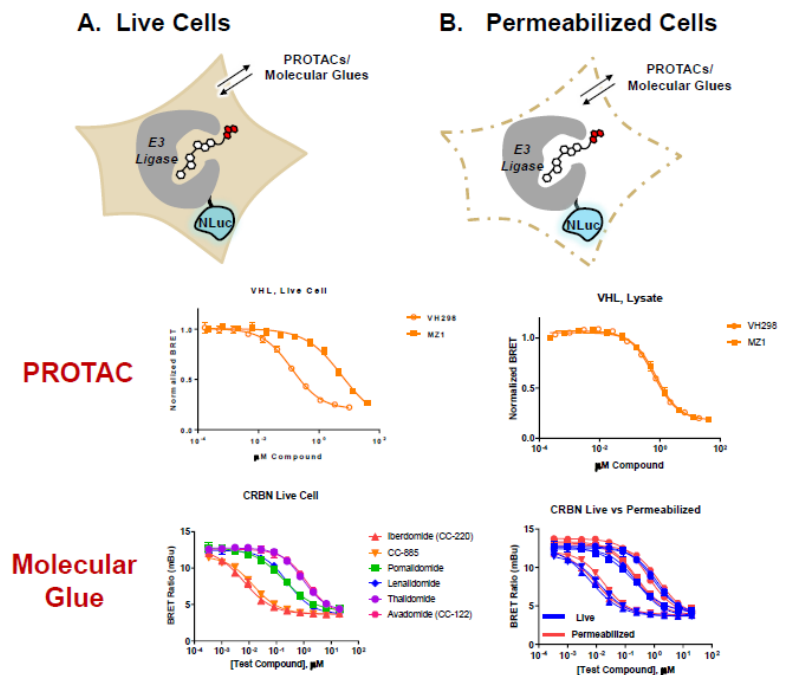
タイトル：Real-time Monitoring of PROTAC and Molecular Glue Targeted Degradation in Living Cells

概要：HiBiT-CRISPR 細胞株を用いた Molecular Glue のライブセルタンパク質分解評価法

現在ホットなタンパク質分解誘導剤は PROTACs を含めて多数報告、開発されていますが、そのうちのひとつである Molecular Glue は分子サイズが小さく比較的細胞透過性がよいことが特徴の一つです。本ポスターでは PROTACs と同様に Molecular Glue をプロメガの標的タンパク質分解プラットフォームで評価した事例をご紹介します。

本ポスターでは下記のアプリケーション事例が示されています。

- Molecular Glue による標的タンパク質分解のライブセル解析および細胞生存性・毒性アッセイとのマルチプレックス事例
- Molecular Glue による E3 Ligase と標的タンパク質の相互作用解析および標的タンパク質のユビキチン化評価
- PROTACs と Molecular Glue の細胞透過性比較



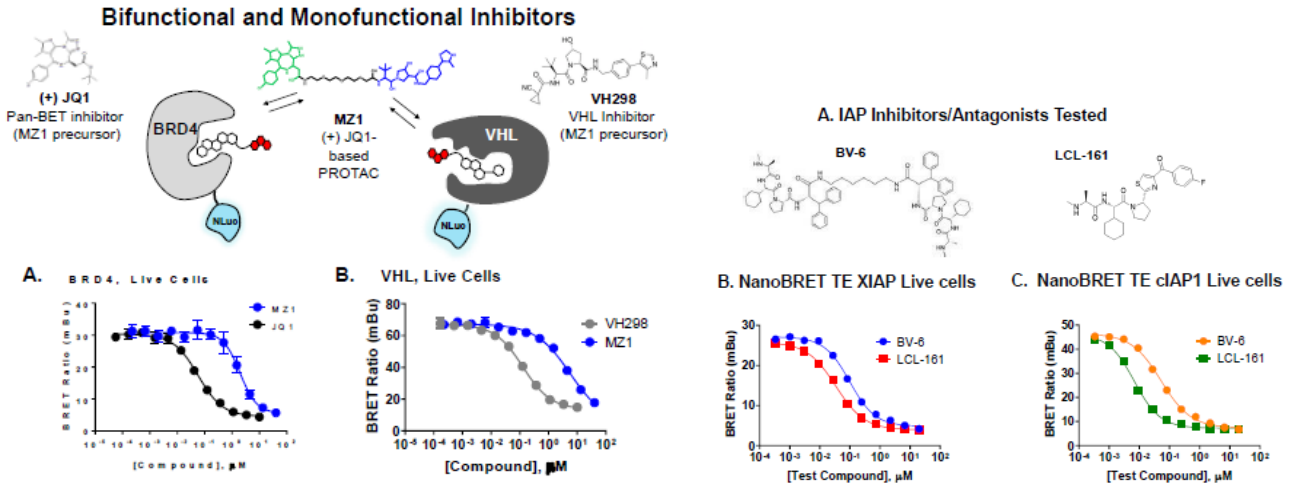
ファイル名：1352-C\_SLAS2020 Promega FFan NanoBRET TE E3 Ligase poster

タイトル：NanoBRET™ in Live Cells as a Method to Assess E3 Ligase and Target Protein Occupancy for PROTACs

概要：NanoBRET™ Target Engagement による PROTACs 細胞透過性および標的タンパク質との結合解析

今、PROTAC (PROteolysis TArgeting Chimera) をはじめとする標的タンパク質分解が新しい創薬モダリティとして非常に注目されています。PROTACs は標的タンパク質結合部位・ E3 Ligase 結合部位・ リンカーを合成して作られますが、合成した PROTAC の評価には、膜透過性、細胞内での安定性、標的タンパク質への結合、ユビキチン-プロテアソーム複合体の形成、分解のモニタリングなど多岐にわたるプロセスを評価するシステムが必要です。プロメガは生細胞でこれら 5 つのプロセスを評価できるアッセイ系を提供しています。

本ポスターでは、生細胞における PROTACs と標的タンパク質の結合解析、およびこれを応用した PROTACs の細胞透過性評価事例を紹介しています。



本ポスターでは下記のアプリケーション事例が示されています。

- 標的タンパク質または E3 Ligase と PROTACs の結合解析
- PROTACs の細胞透過性評価
- 新たな E3 Ligase の事例として XIAP、cIAP1 および MDM2 と化合物の結合解析データ

ファイル名 : 1364-E\_SLAS2020 Promega-Carna MRobers poster

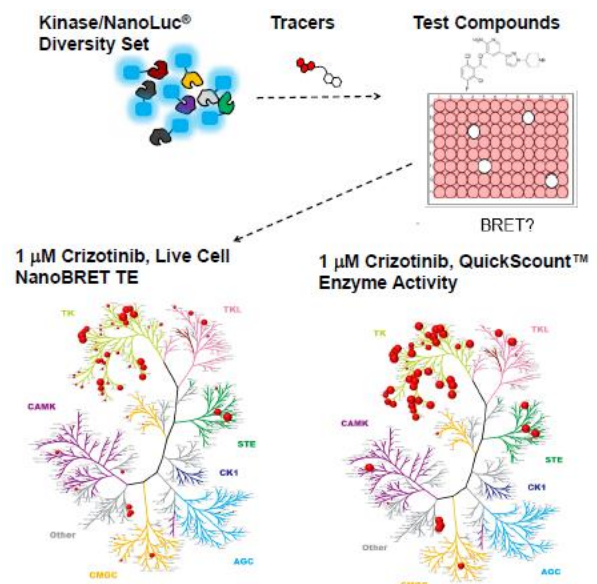
タイトル : Broad Kinome Selectivity and Residence Time Analysis in Live Cells with NanoBRET

概要 : キナーゼ阻害剤の NanoBRET™ Target Engagement と QuickScout™ 法による評価比較

国内 CRO、カルナバイオサイエンス社とのコラボレーションポスターです。カルナバイオサイエンスが提供するキナーゼ酵素活性アッセイ QuickScout™ 法とプロメガの NanoBRET™ TE 法を用いてキノーームワイドにキナーゼ阻害剤選択性の比較を行い、アッセイ間で高い相関性がみられること、また NanoBRET™ TE 法のライブセルアッセイではより阻害剤の選択性が高い結果が得られることを示しています。

本ポスターでは下記のアプリケーション事例が示されています。

- Type I, II およびアロステリック阻害剤評価
- 膜受容体型キナーゼの評価
- 野生型と変異体キナーゼの阻害剤結合比較
- キナーゼ-化合物親和性と Residence Time 比較
- 可逆的および不可逆的阻害剤の Residence Time 測定



NanoBRET™ の受託は日本ではカルナバイオサイエンスにてお受けしています。受託サービス詳細はカルナバイオサイエンスまでお問合せください。

[カルナバイオサイエンス受託ページ](#)

ファイル名 : 1183-D\_SLAS2020 Promega MCurtin Intracellular TE poster

タイトル : Examination of Intracellular Target Engagement for Clinically Relevant Inhibitors Across the CDK Family Using NanoBRET™ Assays

概要 : キナーゼの阻害剤および PROTAC の NanoBRET™ Target Engagement による評価

キナーゼはこれまで最も有望かつ成功を収めた創薬ターゲットの一つであり、また依然として有望な創薬ターゲットとして日々研究開発が進められている標的分子です。キナーゼ阻害剤の解析は in vitro の biochemical な酵素アッセイから生細胞内での結合アッセイに移行しつつあり、このニーズに応じてプロメガは NanoBRET™ テクノロジーを用いた Target Engagement Assay を開発しています。

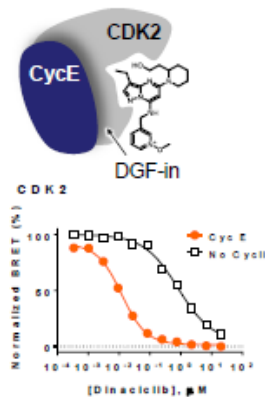
また最近ホットなタンパク質分解誘導キメラ分子 ( PROTACs ) にキナーゼ阻害剤を組み込み、キナーゼ PROTACs を開発する動きも進んでいます。

本ポスターでは、キナーゼの中でも最近注目されている CDK に着目し、NanoBRET™ TE による細胞での CDK 阻害剤と PROTACs の解析事例をご紹介します。

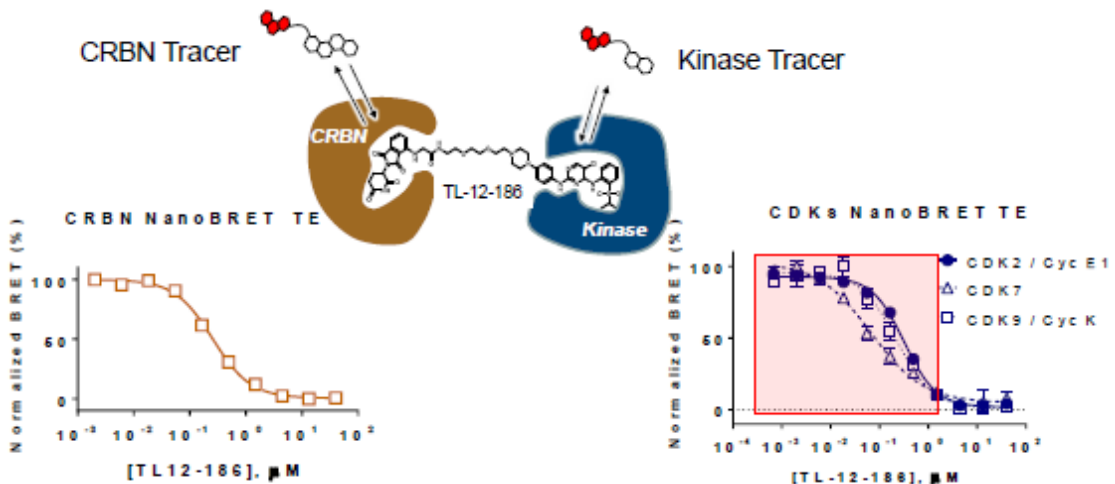
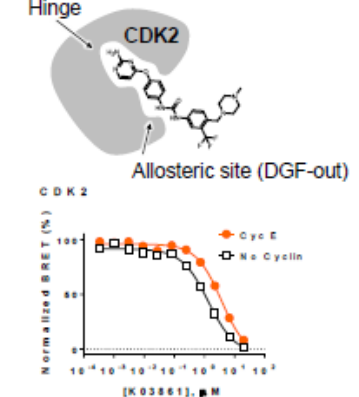
CDK 阻害剤の細胞内における CDK 選択性とサイクリンバイアスの検証が可能です。タイプ I、タイプ II 阻害剤を細胞内で解析可能です。細胞内でのキナーゼと化合物の結合親和性および解離速度 ( Residence Time ) を解析可能です。キナーゼ PROTACs とキナーゼ、E3 リガーゼとの結合を細胞内で評価可能です。

- CDK 阻害剤の細胞内における CDK 選択性とサイクリンバイアスの検証が可能です。
- タイプ I、タイプ II 阻害剤を細胞内で解析可能です。
- 細胞内でのキナーゼと化合物の結合親和性および解離速度 ( Residence Time ) を解析可能です。
- キナーゼ PROTACs とキナーゼ、E3 リガーゼとの結合を細胞内で評価可能です。

Dinaciclib- Type I Inhibitor



K03861 - Type II Inhibitor



ファイル名 : 1064-E\_SLAS2020 Promega HZegzouti Lumit cellular pathway poster

タイトル : A Versatile Bioluminescent Immunoassay Approach to Probe Cellular Signaling Pathway Regulation

概要 : Lumit™ Immunoassay によるシグナル伝達経路の評価

NanoBiT™テクノロジーを応用した Lumit™ Immunoassay では、NanoBiT™標識抗体を用いて Add and Read でのホモジニアスアッセイができるため、従来のウェスタンブロット解析や ELISA に比べ迅速簡便なアッセイが可能になります。このポスターでは、がんや炎症に関連する NF-κB、JAK/STAT、mTOR/PI3K/AKT などのシグナル伝達経路について、NanoBiT™標識二次抗体と 2 種類の一次抗体を用いたリン酸化レベルやタンパク質量の変化について評価した事例を紹介しています。

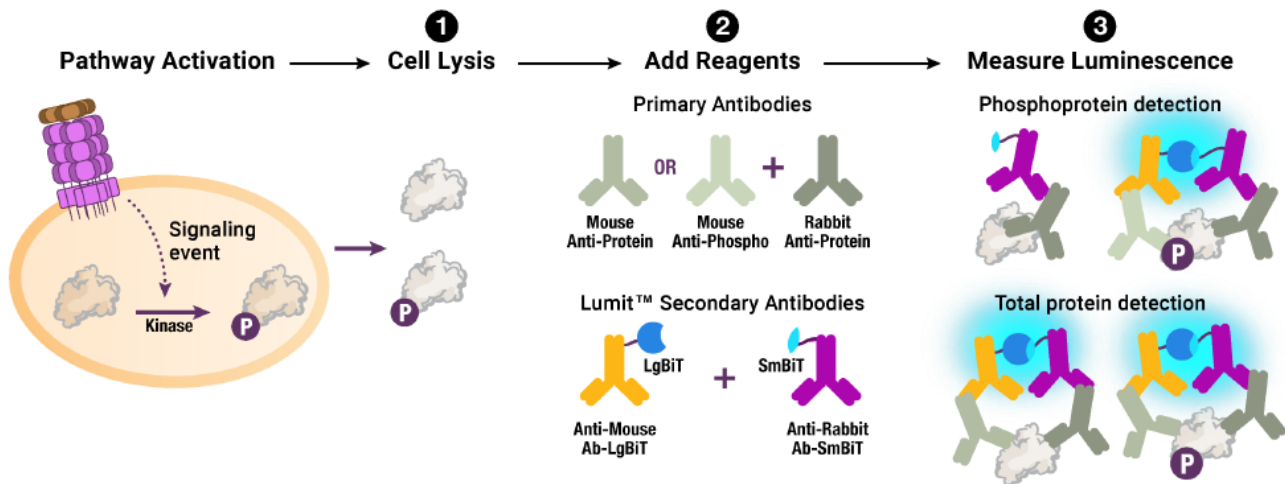
【Lumit™ Immunoassay のメリット】

- 生物発光ベースのアッセイのため化合物干渉が少なく、高感度なアッセイが可能
- Add and Read の簡便なホモジニアスアッセイ
- HTS フォーマットにも対応
- 抗体を変えることで目的タンパク質に対応したアッセイも構築可能

NanoBiT™標識二次抗体はカスタム品として販売中です。またポスター内で使用しているバリデーション済み一次抗体情報をご希望の方はお問合せください。

Lumit™ Immunoassay 特設ページ :

<https://www.promega.jp/products/small-molecule-drug-discovery/immunoassay/>



ファイル名 : 1342-C\_SLAS2020 Promega CHeid Lumit poster

タイトル : Lumit™ Immunoassays: Bioluminescent, Sensitive, and Homogeneous Analyte Detection Using Labeled Antibodies

概要 : 幅広いアプリケーションに応用可能な Lumit™ Immunoassay

NanoBiT™テクノロジーを応用した Lumit™ Immunoassay では、NanoBiT™標識抗体を用いて Add and Read フォーマットの迅速簡便なアッセイを実現します。Lumit™ Immunoassay では以下 3 つのフォーマットでのアッセイ構築が可能です (添付図参照)。

- ① NanoBiT 標識一次抗体を用いる Direct アッセイ
- ② NanoBiT 標識二次抗体を用いる Indirect アッセイ
- ③ NanoBiT 標識抗体と NanoBiT 標識トレーサータンパク質を用いる Competitive アッセイ

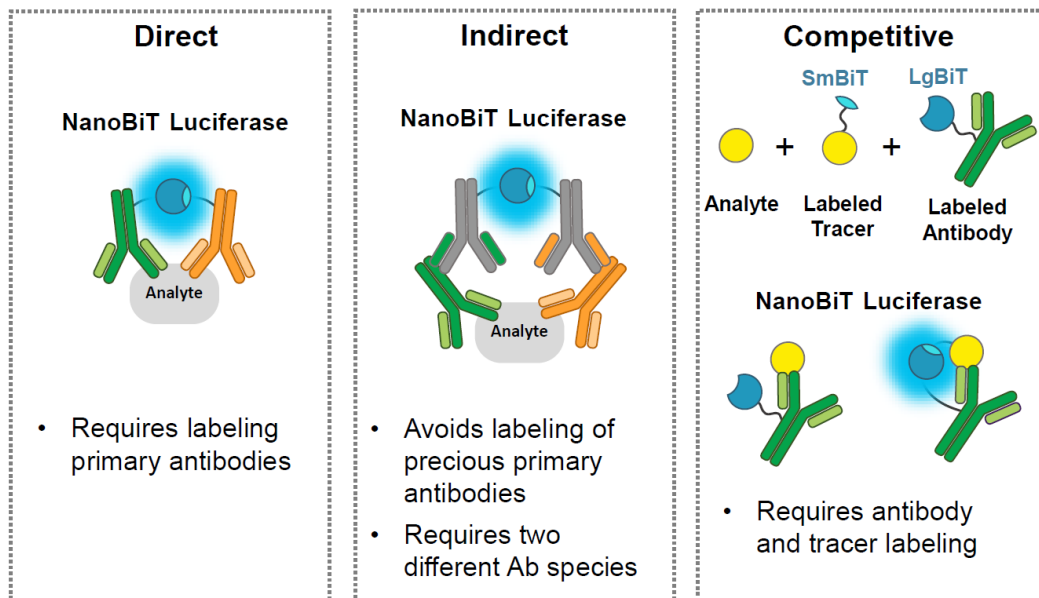
このポスターではそれぞれのアッセイフォーマットについて、以下のようなアプリケーション例を紹介しています。

- Direct : サイトカインの検出
- Indirect : NF-kB シグナル伝達経路の解析 (リン酸化レベルやタンパク質量の変動)
- Competitive : 胎児性 Fc 受容体 (FcRn) と抗体の結合評価

また NanoBiT™標識キットを用いてお持ちの抗体やタンパク質に NanoBiT を標識することで、オリジナルのアッセイ系を構築することも可能です。NanoBiT™標識キット、NanoBiT™標識 2 次抗体、FcRn アッセイキットはカスタム品として販売中です。またパネル 4 で紹介しているサイトカイン検出キットも販売中もしくは開発中です。詳細ご希望の方はお問い合わせください。

Lumit™ Immunoassay 特設ページ :

<https://www.promega.jp/products/small-molecule-drug-discovery/immunoassay/>



ファイル名 : 1318-D\_SLAS2020 Promega SEdenson GPCR Biology poster

タイトル : Novel Bioluminescent Tools to Study GPCR Pharmacology in Living Cells

概要 :

G-protein coupled receptors (GPCRs) は創薬標的として極めて重要な膜タンパク質ファミリーであり、市販医薬品の標的分子の約 30%以上を占めるとも言われています。GPCR は細胞膜上に発現し、細胞外からのリガンド刺激に応答して、細胞内のシグナル伝達分子を活性化させることにより細胞応答を誘起します。プロメガでは GPCR および GPCR 経路の活性化や特性を、様々な高感度な発光測定系で評価するアプリケーションを確立しています。

本ポスターでは最新の技術を活用し、下記のアプリケーションを実施しています。

- 1) HiBiT 融合 GPCR 発現細胞を用いた、NanoBRET での Ligand binding アッセイ
- 2) 一過性発現の条件と、ゲノム編集を実施した細胞株での Ligand binding アッセイの比較
- 3) HiBiT 融合 GPCR 発現細胞を用いた、Ligand Selectivity のプロファイリング
- 4) HiBiT 融合 GPCR 発現細胞を用いた、受容体の細胞内局在化とリサイクリングの評価
- 5) NanoBiT システムを用いた、GPCR と  $\beta$ -arrestin の会合の評価
- 6) Glosensor cAMP テクノロジーおよび cAMP-Glo システムを用いた、細胞内 cAMP の測定・評価

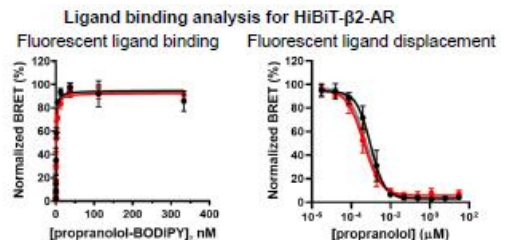
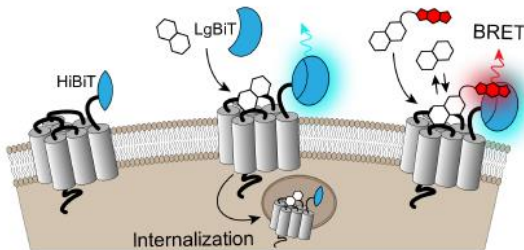
新規発光タグ HiBiT は 11 アミノ酸と小さく、タンパク構造への影響が小さくなっています。

また、ノックインも容易に行いやすくなり、生理的な発現条件下での評価を可能にします。

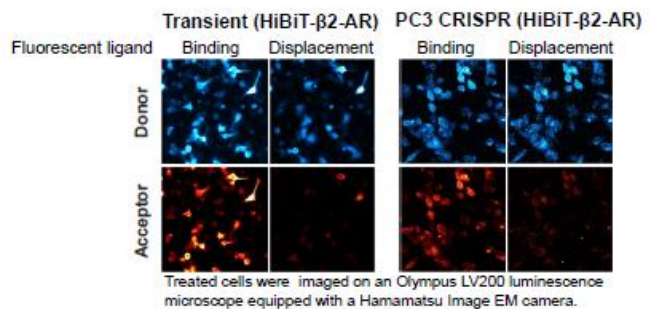
HiBiT と相補的な LgBiT タンパクを添加することで発光活性が亢進することを指標に、HiBiT 付加 GPCR の膜状の発現や、細胞内局在化、膜所へのリサイクリングの評価も可能です。

GPCR に結合する Ligand を蛍光標識し、GPCR と蛍光標識リガンドが結合した際に生じる BRET より non-RI での Ligand binding アッセイも可能です。

GPCR だけではなく、GPCR と  $\beta$ -arrestin との会合や、2nd messenger である細胞内 cAMP の変動も発光アッセイにより評価が可能です。



HiBiT $\beta$ 2-AR	$K_D$ (nM)	IC50 (nM)
→ Transient (HEK293)	$0.75 \pm 0.10$	$0.95 \pm 0.09$
→ Transient (PC3)	$1.09 \pm 0.16$	$0.56 \pm 0.05$
→ PC3-CRISPR knock-in	$0.95 \pm 0.13$	$0.43 \pm 0.05$



高感度な発光法を活用して、プロメガではこの他にも様々なアプリケーションを確立しています。

GPCR 関連の情報に関してご興味ございましたら、お気軽に担当営業または代理店にお問い合わせください。

ファイル名 : 1272-C\_SLAS2020 Promega TRiss Poster

タイトル : Detection of Insulin Action and Steatosis Using New Bioluminescent Metabolite Assays

概要 :

高血圧、高血糖、中心性肥満などを特徴とするメタボリックシンドロームは、より重篤な代謝疾患である糖尿病や、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)/非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) のリスク増加に深く寄与します。

プロメガではこれまでの代謝産物測定技術を応用し、肥満症・メタボリックシンドロームに関する因子を発光法にて高感度に測定する技術を開発しました。

NAD(P)H を介した酵素リサイクリング法を用いて、最終的に発光シグナルにて脂質代謝産物を検出します。

本ポスターでは細胞ベースのアッセイを中心に、下記のアプリケーション例を示しています。

- 1) トリグリセリドの検出・測定
- 2) グルコース・グリセロールの検出・測定
- 3) インスリン刺激によるグルコース取り込み能の評価
- 4) HiBiT テクノロジーを活用した GLUT4 の膜輸送活性の評価
- 5) Lumit テクノロジーを活用した、インスリンの測定

(Lumit に関しては、1342-C\_SLAS2020 Promega CHeid Lumit poster

および 1064-E\_SLAS2020 Promega HZegzouti Lumit cellular pathway poster もご覧ください)

