

SLAS2019 プロメガポスター概要

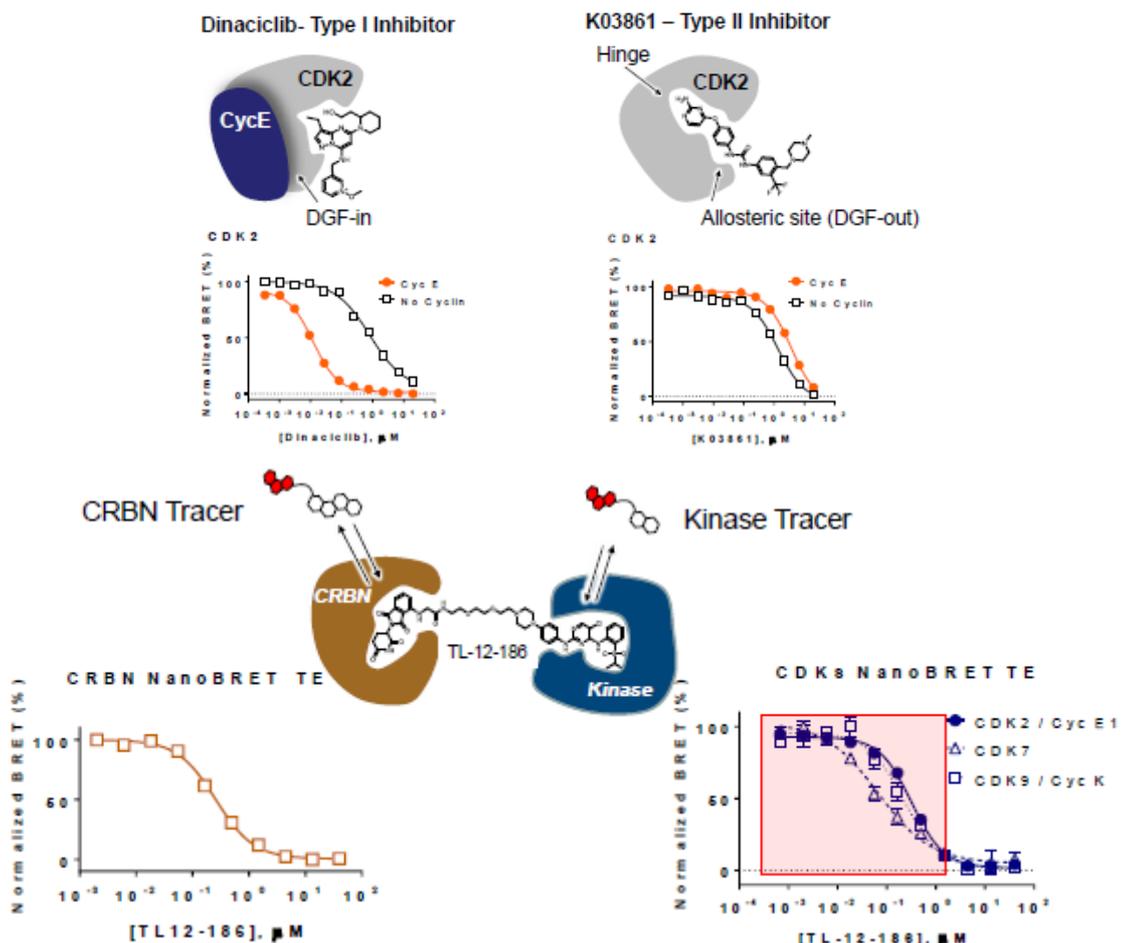
<お客様向け情報>

SLAS2019_1179-E Intracellular Engagement for Clinically Relevant Inhibitors and PROTACs Across the CDK Family Using NanoBRET™

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。

このポスターでは、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。



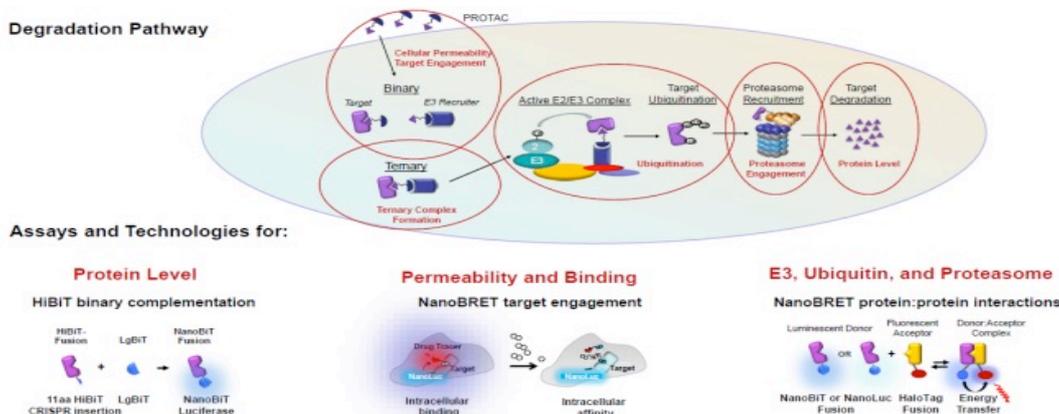
SLAS2019_1327-C Monitoring Functional Mechanisms of Protein Degradation in Living Cells

生細胞でのタンパク質分解モニタリングアプリケーション
 PROTAC (PROteolysis TArgeting Chimera)

- 標的タンパク質のリガンドと E3 ユビキチンリガーゼ結合ドメインが結合した低分子化合物

SLAS2019 プロメガポスター概要

- ・ 特異的に標的タンパク質に結合して、ユビキチンプロテアソームを介して分解を行います。
- ・ 合成した PROTAC の膜透過性、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 (下記図参照)。



候補
る

とな

PROTAC の迅速なプロファイル解析には、異なった細胞内解析テクノロジーが必要とされます。本ポスターでは、HiBiT と NanoLuc®テクノロジー、NanoBRET™テクノロジーがツールして利用できることを紹介しています。

HiBiT , NanoLuc®テクノロジーの利用

- ・ ゲノム編集技術で HiBiT タグを利用することで、生細胞におけるタンパク質分解プロファイルモデリングしたデータや分解パラメーターの定量などが掲載されています。

NanoBRET™テクノロジーの利用

- ・ ターゲットとの結合、プロテアソーム複合体形成、ユビキチン化などダイナミックなタンパク質分解メカニズムを生細胞でモニタリングした例、PROTAC の細胞内透過性の評価例が掲載されています。

SLAS2019_1272-C Application of BRET Technology to Quantitatively Determine Kinase Inhibitor Potency in Live Cells - Reaction Biology Corporation

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

海外 CRO、Reaction Biology 社とのコラボレーションポスターです。従来の RI キナーゼ阻害アッセイ (HotSpot™ Kinase assay) と NanoBRET™ TE を比較・評価し、受託可能であることをアピールしています。

NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay が SelectScience の Reviewers' Choice Award を受賞しました！下記にて Reviewer のレビューを閲覧できます。

<https://www.selectscience.net/products/nanobret--te-intracellular-kinase-assay?prodID=209449>

NanoBRET™ TE Assay は日本ではカルナバイオサイエンス(株)にてお受けしています。詳細はカルナバイオサイエンスにお問合せください。

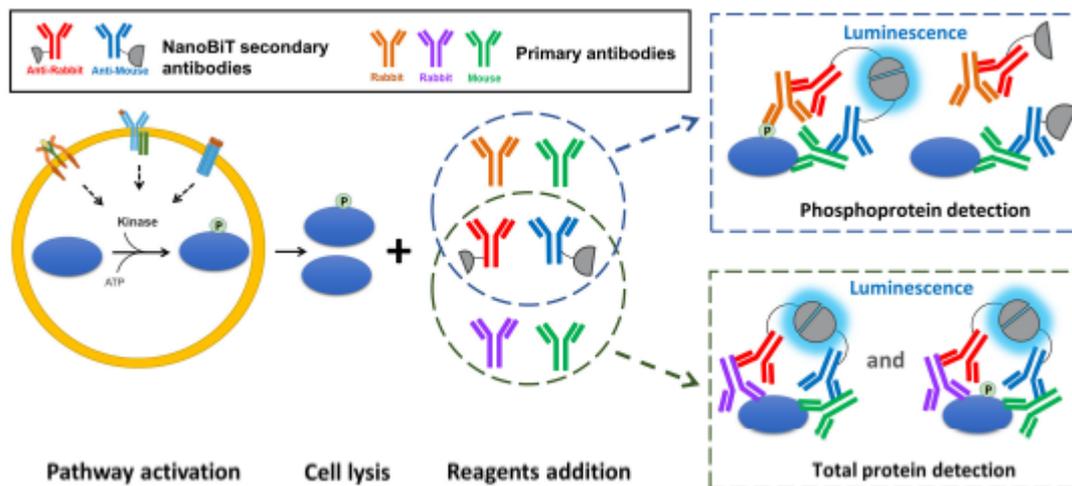
カルナバイオ受託ページ : <https://www.carnabio.com/japanese/product/nanobret-sevices.html>



SLAS2019_1343-E A Homogeneous Bioluminescent Immunoassay Approach to Interrogate Cellular Signaling Pathways Activation and Deactivation NanoBiT™ Cell based immunoassays (旧 ImmunoBiT)

SLAS2019 プロメガポスター概要

NanoBiT™ Cell based immunoassays は NanoBiT™ で標識した 2 次抗体と 2 種類の 1 次抗体を使用し、細胞のリン酸化タンパク質や総タンパク質を簡便に定量するアッセイです。



このポスターではがんおよび炎症のキーとなる pathway について NanoBiT™ Cell based immunoassays を使用したセルベースでのキナーゼアッセイの実施例をご紹介します。下記 pathway のキーとなるタンパクについて定量および阻害を見ています。

- NF- κ B pathway: I κ B α と p65 のトータルおよびリン酸化のモニタリング
- JAK/STAT pathway: STAT3 のトータルおよびリン酸化のモニタリング
- mTOR/PI3K/AKT pathway: AKT トータルおよびリン酸化の検出

結論：NanoBiT™ Cell based immunoassays のメリットとして以下が挙げられます。

- NanoLuc® の発光を利用：化合物の阻害が少ない
- ホモジニアスアッセイで簡便、また細胞を改変（トランスフェクション等）する必要がない
- WB, ELISA, 蛍光アッセイに比べ少ない手順で検出可能
- HTS に最適
- 抗体を変えてご自身の目的タンパクにも適用可能

各キットはカスタム販売中です。詳細はお問合せください。

SLAS2019 プロメガポスター概要

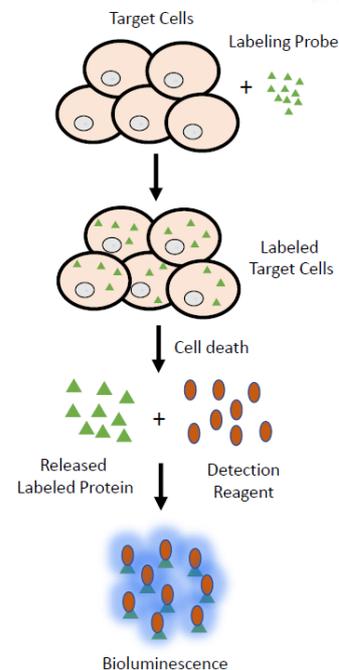
SLAS2019_1349-E A Homogeneous Bioluminescence Cell-Specific Cytotoxicity Assay for Surveying Cellular Sub-Populations in Mixed Cultures 細胞改変不要、Non-RI の新規 Target Cell Killing アッセイ法

近年、免疫細胞や間葉系細胞などとの共培養系を用いた、細胞間相互作用存在下でのアッセイの重要性が増しています。共培養系はヒトの生体内をよく模倣した優れた評価系です。その一方で、複数の細胞集団を含むため、HTS に最適なホモジニアス系である発光法には、不利な評価系であると考えられてきました。

このデメリットを解消し、共培養アッセイ系でも発光の良さを活かした評価ができるようプロメガでは、膜透過性の細胞内タンパク質 Labeling Probe を開発、これを活用した新規 Target Cell Killing アッセイ法の構築に成功しました。

Labeling Probe で標識したターゲット細胞が傷害を受けると、培地中に Labeling Probe 標識タンパクが放出されます。この標識タンパクを NanoBiT™ をベースとした検出試薬で検出・測定し、発光シグナルにより特定の細胞のみの傷害を評価する技術になります（右図）。

発光法を用いる事で Non-RI で高感度に Target Cell Killing を評価することが可能となっています。また、Labeling Probe は細胞膜を透過するため、細胞改変することなく、標的細胞の特性を損なうことなく、アッセイを実施することが可能です。



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。

- 種々のがん細胞での検出事例
- 少数の細胞数からの検出事例 (**100 個の細胞から検出可能**)
- 複数のがん種を用いての PBMC による ADCC 活性の評価
- 本技術を用いた、384well プレートフォーマットでの ADCC アッセイ
- 長時間発光基質を用いた、経時的な ADCC 活性の評価

SLAS2019 プロメガポスター概要

SLAS2019_1196-B Evaluating a No-Wash Rapid FcRn Immunoassay to Guide Development of Antibody Therapeutics

簡便な発光 FcRn イムノアッセイ

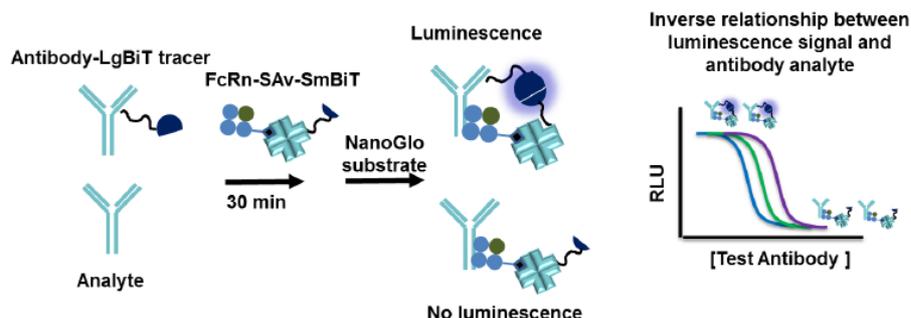
胎児性 Fc 受容体 (FcRn) は、抗体の体内動態制御にかかわる受容体であり、バイオ医薬品開発におけるキー分子のひとつです。現在、抗体と FcRn の結合は表面プラズモン共鳴分析法による測定が一般的ですが、固定化や複雑なステップに伴い **artifact** が生じる可能性が懸念されます。この度プロメガでは、固定化不要かつアッセイ試薬を添加するだけで FcRn と抗体の結合を評価することができる NanoBiT™ FcRn Immunoassay を開発しました。NanoBiT™ FcRn Immunoassay は、下図のように NanoBiT™ テクノロジーをベースとした **Competitive** アッセイであり、測定対象の抗体と FcRn の結合に応じた FcRn-トレーサー複合体の解離を、

NanoBiT™ 発光値でモニターすることで、抗体と FcRn の結合を評価するアッセイです。また試薬を添加するだけの溶液ベースのアッセイであるため、**artifact** が生じる可能性も最小になります。ポスターでは、**human IgG** 特異的に FcRn 結合能

をアッセイできることや、アッセイのミニチュア化にも対応できること、また Fc 領域のメチオニン残基の酸化による FcRn との結合能低下を、NanoBiT™ FcRn Immunoassay で評価したデータを紹介しています。NanoBiT™ FcRn Immunoassay キットはカスタム品として提供可能ですので、ご興味ある方はご連絡ください。

(ポイント)

- 迅速で簡便なホモジニアスアッセイ
- スクリーニングにも最適
- アッセイに伴う **artifact** が最小であるため、抗体の FcRn 結合能を適切に評価可能

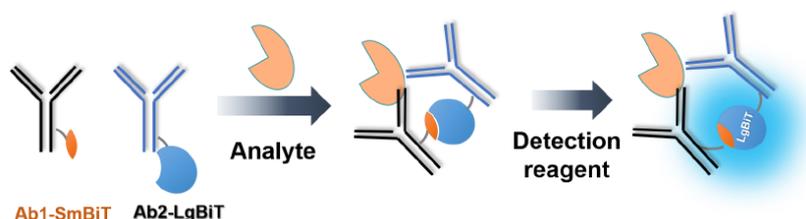


SLAS2019_1323-D NanoBiT™ Homogeneous Immunoassay A Simple, Sensitive, and Rapid Method for Analyte Detection using Luminescent Signal

迅速、高感度なホモジニアスイムノアッセイ

ELISA は高感度で特異性の高いタンパク質検出法として広く一般的に利用されていますが、B/F 分離が必須であるため、作業ステップが多く手間のかかるアッセイです。この度プロメガでは、B/F 分離不要かつアッセイ試薬を添加するだけでタンパク質の検出が可能なる NanoBiT™ Homogeneous Immunoassay を開発しました。NanoBiT™

Homogeneous Immunoassay は NanoBiT™ テクノロジーをベースとしたアッセイであり、右図のように SmBiT および LgBiT をラベルした抗体を用いて、測定対象のタンパク質を発光で検出するホモジニアスアッセイです。ポスターでは、SmBiT



および LgBiT の抗体ラベル化方法の紹介に加え、EGFR やホルモン、サイトカインの測定データや、IgG アイソタイプングの実施データを紹介しています。また IL-1β のアッセイでは、市販の ELISA キットと性能比較しており、NanoBiT™ Homogeneous Immunoassay は市販の ELISA キットと同レベルで IL-1β を検出できるデータを紹介しています。SmBiT/LgBiT の抗体ラベル化キットや Streptavidin-SmBiT はカスタム品として提供可能ですので、ご興味ある方はご連絡ください。

(ポイント)

- B/F 分離不要で迅速な測定が可能 (5~30 min)

SLAS2019 プロメガポスター概要

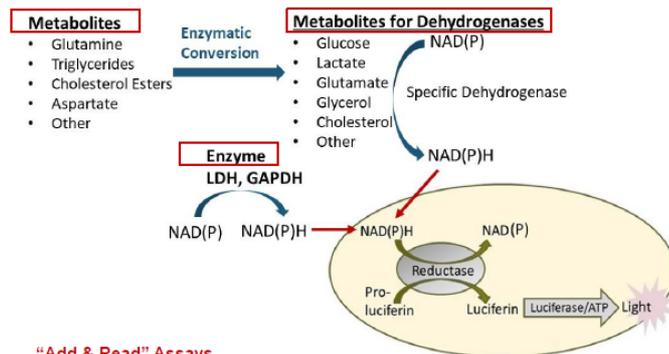
- 試薬を添加して測定するだけの簡便なホモジニアスアッセイ
- スクリーニングにも最適

SLAS2019_1274-E Bioluminescent Platform for Cellular Energy Metabolism Studies HTS 対応の細胞代謝アッセイプラットフォーム

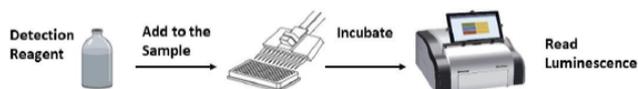
真核生物では様々な栄養因子を細胞内に取り込み、生存に必要なエネルギーや代謝産物を合成し、複雑な代謝ネットワークを形成しています。また、がんなどの疾患においては特異的な代謝機構を有している事が知られており、細胞内代謝を深く理解する事は、効果的な治療方法の開発を進める上で欠かせないポイントです。

細胞内の代謝状況を正確にモニターするには、高感度な測定技術が欠かせません。しかしながら、高感度測定に対応する機器はスループット性や、コストがネックとなります。

プロメガでは NAD(P)H をルシフェリンに変換する酵素リサイクリング法を用いて、代謝にかかわる種々の因子を高感度な発光法にて、簡便に測定する技術を確認立しています (右上図)。



“Add & Read” Assays

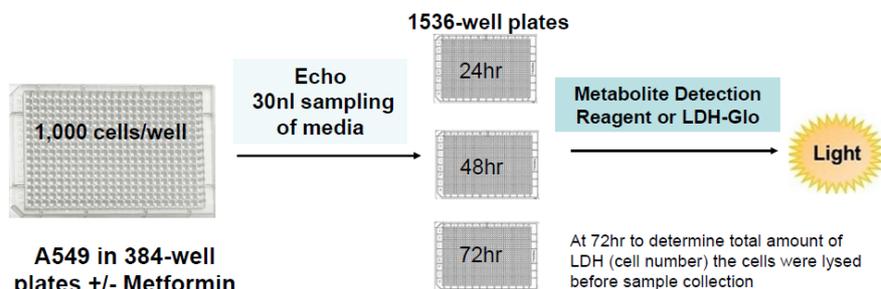


本ポスターでは、多検体のフォーマット (384well もしくは 1536well プレート) での評価を中心に下記の 5 つのアプリケーションを実施し、HTS に対応可能なフォーマットでの種々のアッセイの事例を紹介しています。

【アプリケーション概要】

- ・ 1536well プレートでの NADH, Glucose, Lactate, Glutamate の測定
- ・ 96well プレートで培養した細胞の ATP, NAD, NADP, Glucose, Lactate, Glutamine, Glutamate の測定と定量
- ・ 脂肪様細胞に分化誘導した細胞の Triglyceride の測定
- ・ 384well-LV プレートおよび LOPAC1280 を用いての、スフェロイド培養細胞に対する Glycolysis と Glutaminolysis 阻害剤の探索例
- ・ アコースティック 分注システムを活用した、1536well フォーマットでの 72 時間までの経時的な代謝因子量の変化の測定と、LDH を指標とした生細胞数測定のマルチアッセイ (下図)

Using Small Volume Acoustic Dispensing with Metabolite and LDH-Glo Assays



アコースティック 分注システムの事例にあるように、発光法ではわずか 30nL の培地サンプルからでもアッセイ可能であり、非常に高感度であると共に、ロバストな系です。加えて、viability/toxicity を組み合わせたマルチアッセイを組む事も可能となっています。

SLAS2019 プロメガポスター概要

SLAS2019_1361-B High-Throughput, Transfection-Grade Plasmid Purification without Centrifugation using Paramagnetic Particles

HTS 対応トランスフェクショングレードプラスミド精製

近年、改変抗体のハイスループットスクリーニングが注目されています。

ハイスループットで、トランスフェクショングレードのプラスミド抽出する手法を紹介しています。

使用試薬：Wizard MagneSil Tfx™ System

機器：Tecan Freedom Evo® 150 (Miniprep)

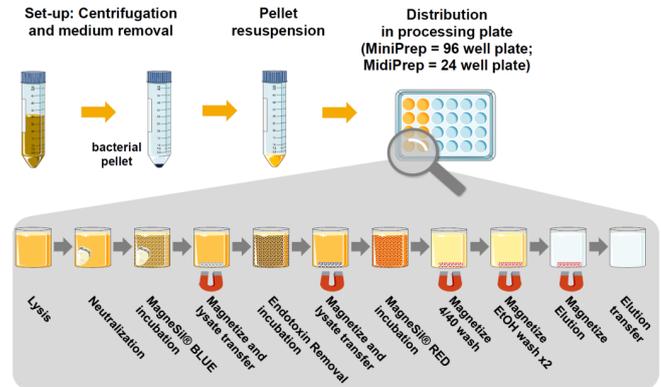
Tecan Freedom Evo® 200 (Midiprep)

ランタイム：3 時間

プロトコール：右の図を参照

収量：1.5ml 培養液：約 20ug

30ml 培養液：80~120ug



Automation Specialist (FSS)が、お持ちの機器のセットアップ、プロトコール設定を全面的にサポートします。



2019.02.26

SLAS2019 プロメガポスター概要