

分子間相互作用解析

最新のSPR装置Sierra SPR-24を導入しました!!



Bruker/ Sierra SPR-24 Pro

業界トップクラスのSPR性能で
ハイスループットスクリーニング、カインेटックス
解析などの様々な分子間相互作用解析に対応

・ハイスループット

24センサースポット (3 spots/channel x 8 channels)
スポットごとに独立に固定化、サンプルインジェクションが可能
1回のインジェクションで24リガンドのスクリーニングが可能

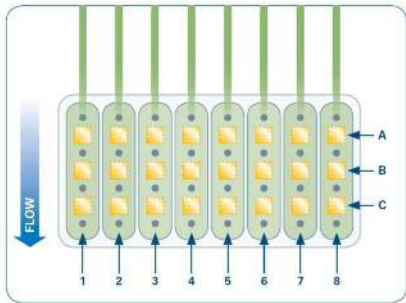
・高感度

フラグメントなどの低分子化合物の相互作用解析が可能
分子量 ≥ 100 Da

多数のセンサースポットを活かした分析事例

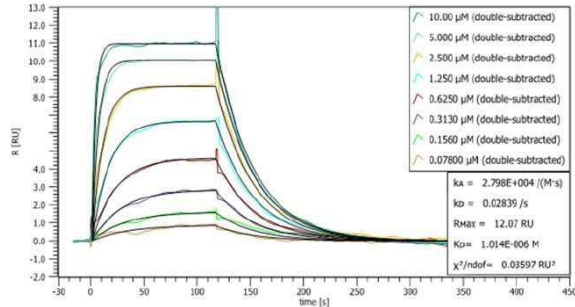
SICK (Single Injection Cycle Kinetics) 法

同じリガンドを固定化した一連のセンサースポットに対して、スポットごとに濃度の異なるアナライト溶液をアプライし、迅速なカインेटックス解析が行える手法



A列の1~8にリガンドを固定化し、
濃度の異なるアナライトを1~8に同時に流す

リガンド：カルボニックアンヒドラーゼII (30 kDa)
アナライト：低分子阻害剤 (201 Da)



- ・1回のインジェクションで8濃度のデータを取得し、カインेटックス解析を実施
- ・チャンネル間の再現性が高く、文献と同等の結果を取得

再生が困難なリガンドや、容易に失活するリガンドの分析に適応可能

アプリケーション

- 📌 標的タンパク質に対する低分子化合物のスクリーニング&カインेटックス
 - 📌 バイオ医薬品のスクリーニングと特性評価
 - 📌 化合物、ペプチド、核酸、タンパク質、糖など種々の分子間相互作用解析
 - 📌 他の手法と合わせた総合的な分子間相互作用解析
- ITC、NMR、質量分析、CD、高速AFM

下記営業部まで、お気軽にお問合せください。

株式会社 東レリサーチセンター

ライフサイエンス営業部 Tel 03-3245-5666
関西営業部 (ライフサイエンス) Tel 077-533-8689
お問い合わせ専用 E-mail bunseki@trc.toray.co.jp



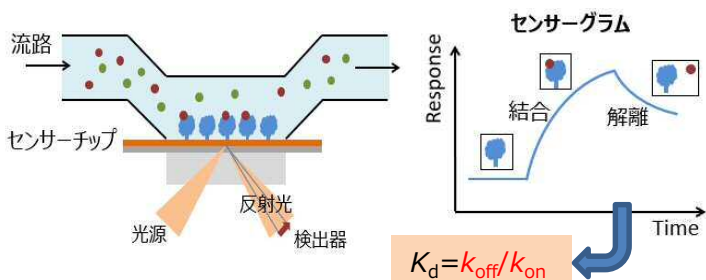
分子間相互作用解析 (SPR, ITC)

医薬品や検査診断薬などの研究開発において、開発分子とターゲットとの相互作用解析は必須です。東レリサーチセンターでは、最新のSPR装置から、ITC, NMR, MSなどの各種分子間相互作用解析装置を保有し、様々な角度から相互作用解析が可能です。今回は、SPRとITCについてご紹介いたします。

分析手法によって得られる情報は異なるため、目的に応じて使い分け・併用が重要

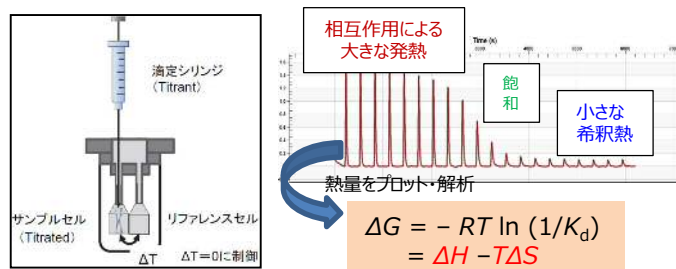
SPR (表面プラズモン共鳴)

センサーチップ上の分子と流路を流れる分子との相互作用で生じるわずかな質量変化をSPRシグナルとして観測



ITC (等温滴定カロリーメトリー)

サンプルセル内の分子と滴定シリンジから滴下される分子との相互作用で生じるわずかな熱変化を観測



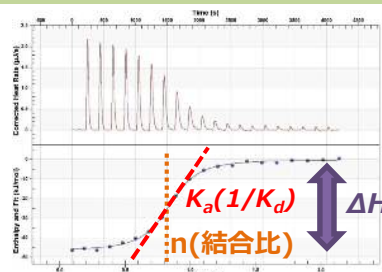
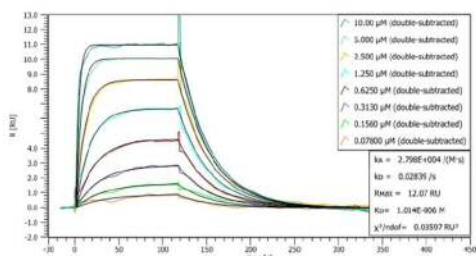
結合速度・解離速度の情報が得られる

Ex. 結合速度が速い・・・診断の早い検査薬
解離速度が遅い・・・薬効が持続する薬

結合様式(エントロピー・エンタルピー)や結合比の情報が得られる

エンタルピー優勢・・・水素結合、静電相互作用
エントロピー優勢・・・疎水性相互作用

分析例：カルボニックアンヒドラーゼ(30 kDa)とスルファモイル安息香酸(201 Da)の相互作用解析



同等の解離定数(K_D)であることを確認

同じ K_d でも、化合物によって結合・解離速度は異なります。

SPRはスループット性が高く、比較・検討が容易です。

K_d (mol/L)	1.014×10^{-6}
k_{on} (L/mol-s)	2.798×10^4
k_{off} (1/s)	0.02839

K_d (mol/L)	1.398×10^{-6}
n	0.807
ΔH (kJ/mol)	-46.76
$-T\Delta S$ (kJ/mol)	13.34

タンパク質がやや失活している可能性を示唆

エンタルピー優勢の結合様式

手法	SPR	ITC
固定化・ラベル化	要 固定化	不要
分子量制限	>100 Da	なし
必要試料量	10 μg程度	1 mg以上

ITCは固定化・ラベル化が不要なため、より自然に近い状態の相互作用分析が可能

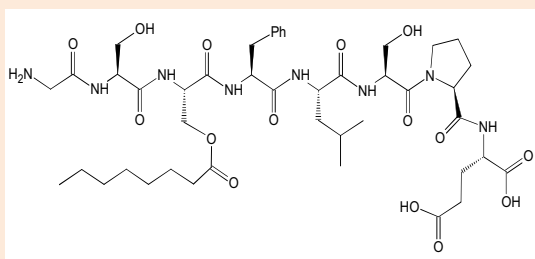
試料消費量の点から、まずはSPRで分析し、結果の妥当性やさらなる情報取得のため、ITC分析をお勧めします

目的に合わせた分析手法で相互作用解析を実施いたします

ペプチド微量分解物の構造解析

中分子であるペプチドは次世代医薬品として注目されており、品質安定性の確保のため、分解物・不純物の構造解析が重要である。東レリサーチセンターは低分子医薬品原薬、製剤などの微量成分の分取・構造解析技術及びペプチド合成技術の両方を保有している。それらの技術を駆使し、質量分析及び核磁気共鳴装置を用いて、Ghrelin(1-8)の微量分解物を構造解析した例を紹介する。

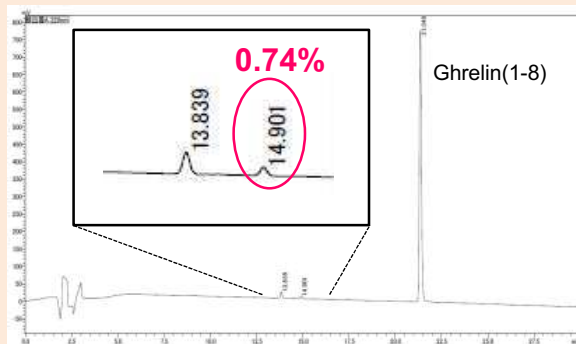
Ghrelin(1-8)分解物のHPLC分析



Ghrelin(1-8)

アミノ酸配列: GSS(octanoyl) FLSPE
(Monoisotopic Mass : 948.4804)

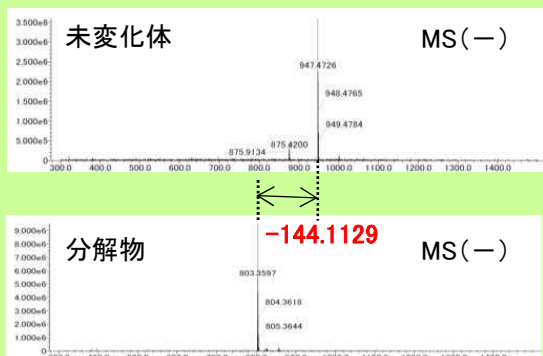
加水分解



Ghrelin(1-8)のHPLCクロマトグラム(検出波長220nm)

14.901分の分解物を自動分取装置(SPE)で分取

LC-MSによる構造解析

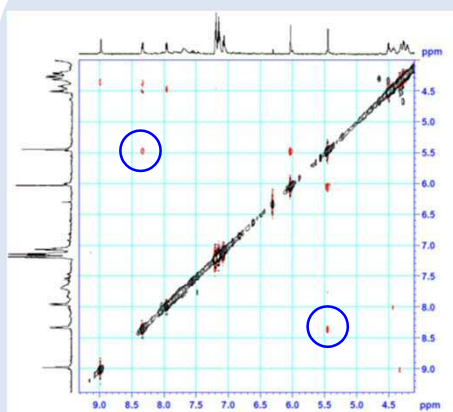


MS/MS測定

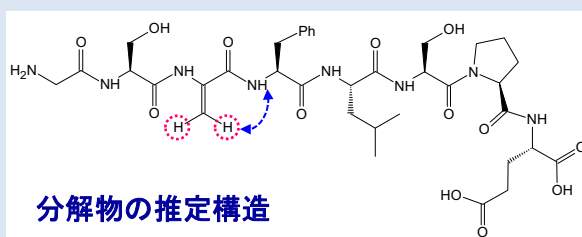


Ser(octanoyl)がβ脱離しデヒドロアラニンに変化したと推測(-C₈H₁₆O₂: 理論質量144.1150)

NMRによる構造解析



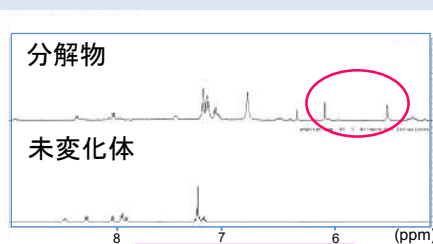
分解物のROESYスペクトル
デヒドロアラニンのプロトンと隣接するフェニルアラニンのアミドプロトンのROE相関を観測



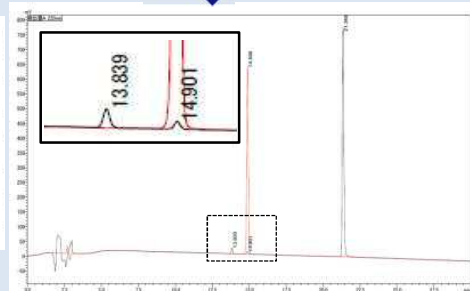
分解物の推定構造

推定構造のペプチドを化学合成し標品を取得

推定構造の標品とLC溶出時間一致



デヒドロアラニンのプロトンシグナルを観測



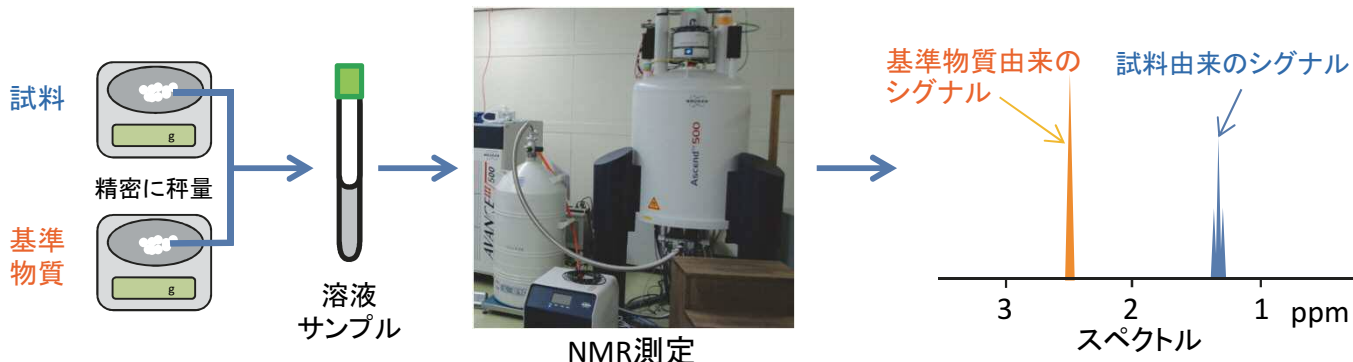
赤: デヒドロアラニン体の合成標品

NMRによる純度、含量の評価（定量NMR）

NMRを用いた定量分析法により、試料の純度や成分の含量を定量することができる。定量NMRでは、目的成分と同一成分の標準物質（濃度既知サンプル）が不要であり、任意の濃度トレーサブルな物質を基準物質として使用することにより、さまざまな試料の絶対定量が可能である。

内標準法

試料と（純度が保証された）基準物質を精密に秤量、溶液にしてNMR測定を行い、スペクトルを取得する。



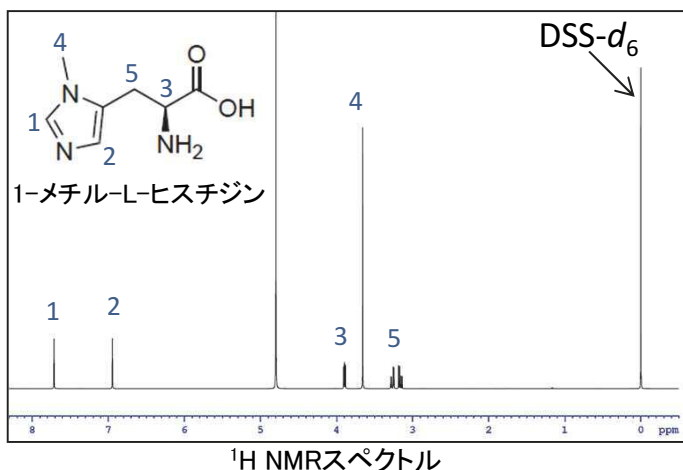
NMRスペクトルのシグナル面積について以下の関係が成り立つので、試料の純度・含量が算出できる。

$$\frac{\text{基準物質のシグナル面積}}{\text{シグナルの水素原子数}} \times \text{試料のモル濃度} = \frac{\text{試料由来のシグナル面積}}{\text{シグナルの水素原子数}} \times \text{基準物質のモル濃度}$$

特徴

定量NMR	GC、HPLC
混合物は苦手	分離分析のため、混合物も可能
感度が低い	感度が高い
有機化合物は、ほぼ全て観測可能	検出器の種類によっては、観測不可
同一成分の標準物質不要	同一成分の標準物質が必要

測定例 基準物質DSS-d₆を用いた1-メチル-L-ヒスチジン（認証純度：90.0%）の定量分析



調製法：1-メチル-L-ヒスチジン約10 mg、DSS-d₆約4 mgを精密に秤量し、重水1 mLで溶解(n=3)
 測定機器：AVANCE III HD 500
¹³Cデカップリング：あり
 積算回数：8回



項目	結果
平均純度(n=3)	89.7%
真度	99.7%
精度(RSD)	0.3%

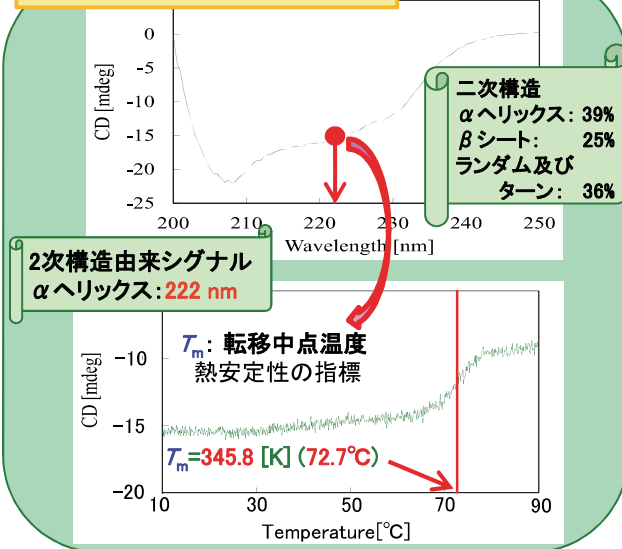
バイオ医薬品の特性解析 — CD分析 —

TRCでは、タンパク質、ペプチドなどのCD(円偏光二色性)分析を実施し、高次構造解析を行っている(信頼性の基準対応試験も実施可能)。さらに、CD分析により、熱安定性の評価、分子間相互作用解析も実施可能である。

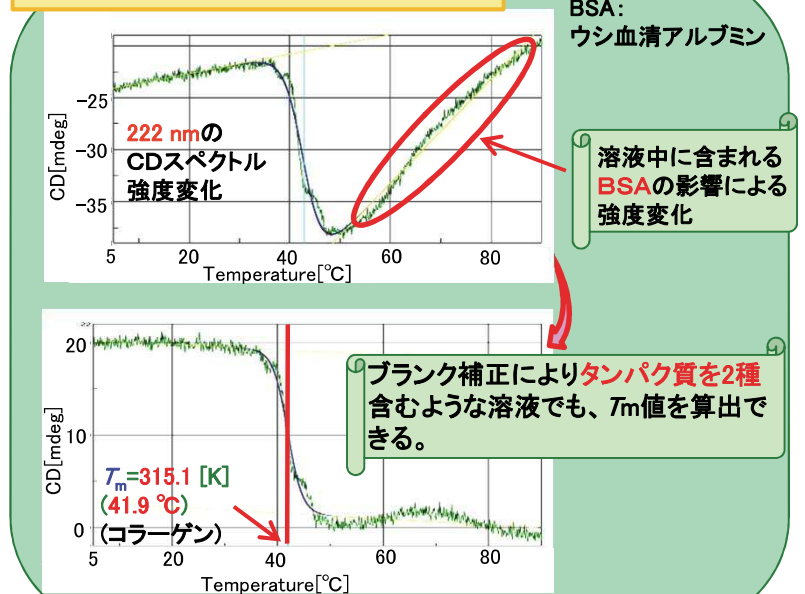
タンパク質の熱変性解析

装置: 円二色性分散計 J-820(日本分光株式会社)

リゾチームの熱変性解析

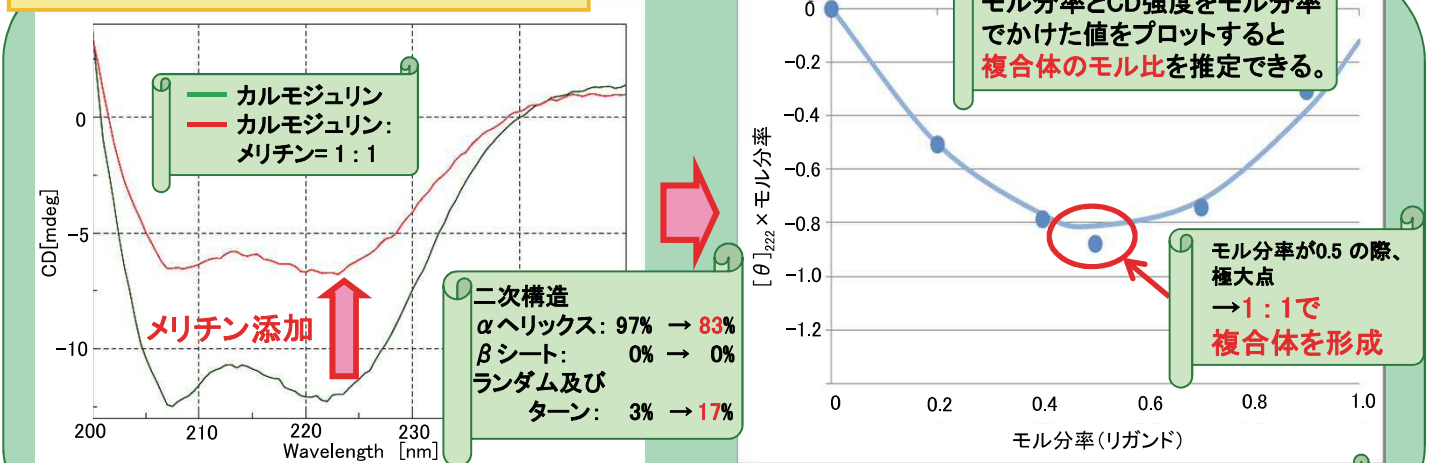


コラーゲンの熱変性解析(BSA溶液中)



リガンド-タンパク質相互作用解析

カルモジュリン-メリチン(リガンド)相互作用解析



リガンドとタンパク質の相互作用による構造変化の評価に加えて、混合比を変えながら、CDスペクトルを実施し、強度の変化をプロットすることで、タンパク質-リガンド複合体のモル比がわかる。

CDの主な測定要件

溶媒について

測定波長に吸収を持たない溶媒が適している。
 防腐剤(アザイド等)は測定の妨害となる。
 PBS、トリス等は問題ない。

必要試料量(タンパク質、ペプチド)

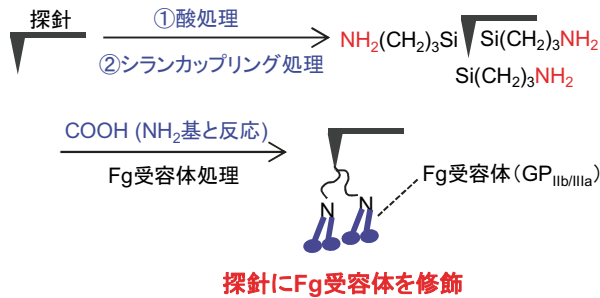
250~200 nm: 0.2 mg/mL, 0.5 mL(1 mmセル)
 320~250 nm: 0.5 mg/mL, 2 mL(10 mmセル)

AFM化学修飾探針を用いた フィブリノーゲンとその受容体との相互作用評価

AFM探針(カンチレバー)にフィブリノーゲン受容体を化学修飾し、その探針を用いたAFMフォースカーブ測定(液中)により、フィブリノーゲンとの吸着力(相互作用)を評価することができた。ブロッキング実験により、検出された吸着力がリガンド-レセプター結合であることを確認した。

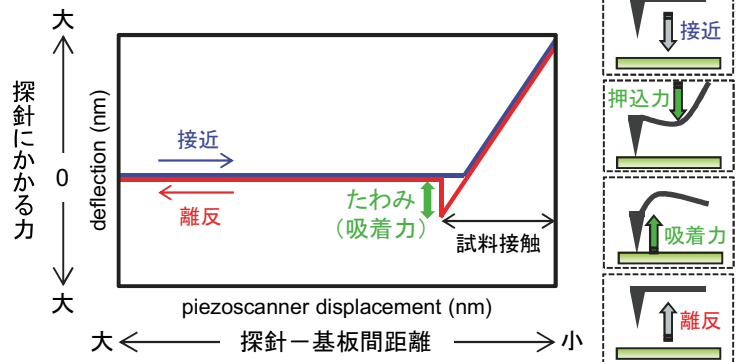
AFM化学修飾探針の作製法

探針を酸処理、シランカップリング処理後にフィブリノーゲン(Fg)受容体(GP_{Ib/IIIa})と反応させ、探針にFg受容体を修飾した。



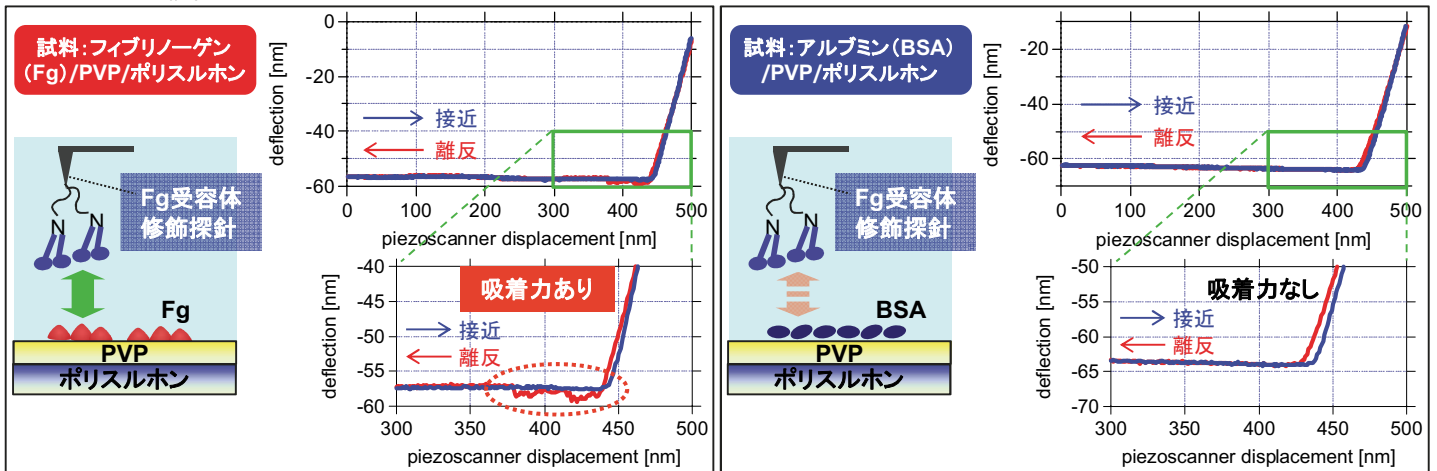
AFMフォースカーブ法

AFMフォースカーブ法では、探針を試料に接近→接触→押し込み→離反という一連の動作により探針位置と探針たわみの関係を表したフォースカーブを取得することができる。フォースカーブ解析により、探針-試料間の吸着力(相互作用)を評価することができる。



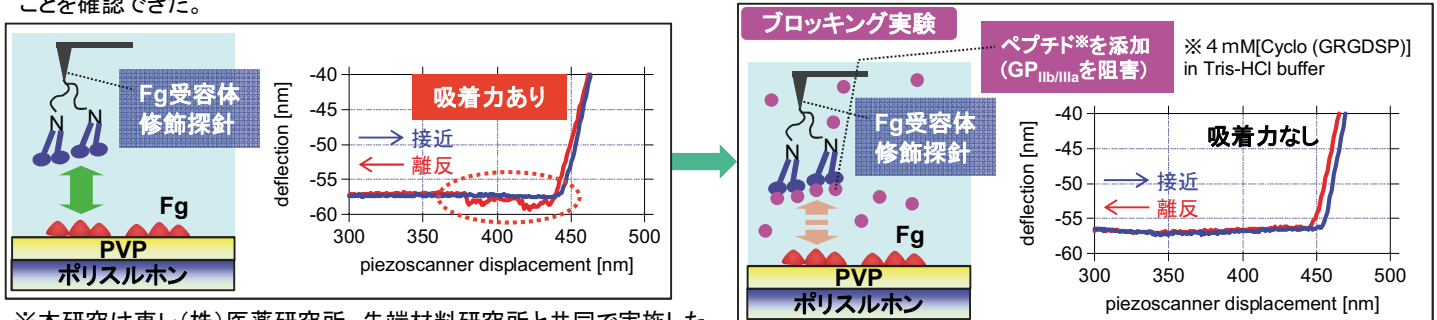
化学修飾探針を用いた吸着力評価

化学修飾探針を用いて、ポリスルホン上PVPポリマーにインキュベーションしたフィブリノーゲン(Fg)およびアルブミン(BSA)との吸着力をTris-HClバッファー中にてAFMフォースカーブ法で評価した。Fgでは吸着力が検出されたのに対し、陰性対照のBSAでは吸着力は検出されなかった。GP_{Ib/IIIa}はFgに高い親和性を示す受容体であることから、**リガンド-レセプター結合**による吸着力を検出できた。



ブロッキング実験によるリガンド-レセプター結合の検証

上記測定後にフィブリノーゲン受容体(GP_{Ib/IIIa})とリガンドの結合をブロックするGRGDSPペプチドを添加してフォースカーブ測定を行ったところ、検出された吸着力が消失した。このことから、検出された吸着力が、フィブリノーゲン受容体(GP_{Ib/IIIa})とリガンドの結合によるものであることを確認できた。

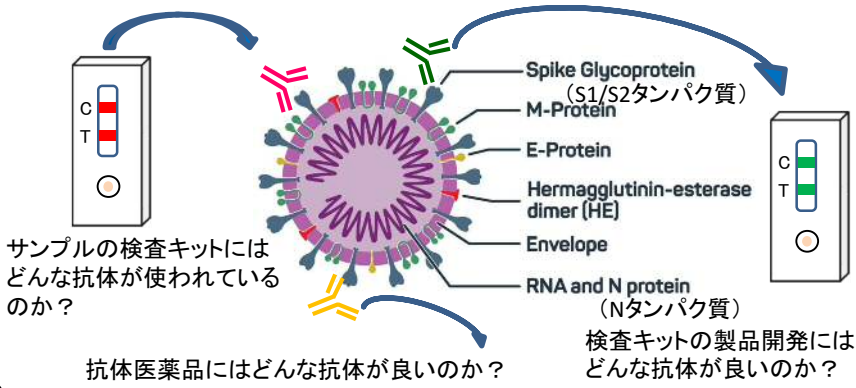


※本研究は東レ(株)医薬研究所、先端材料研究所と共同で実施した。

体外診断用医薬品及び抗体医薬品開発に役立つ エピトープ解析 - 新型コロナウイルスの分析事例 -

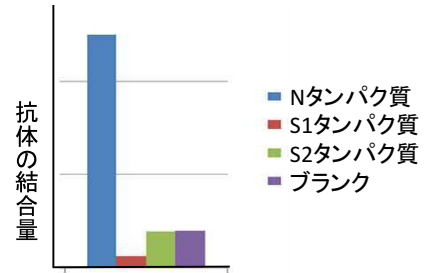
抗体を用いる体外診断用医薬品や抗体医薬品の製品開発にあたっては、そのエピトープ配列（抗体が認識する抗原側の部位）の特定が大変重要となる。新型コロナウイルスを認識する抗体のエピトープ解析を例に、東レリサーチセンターで受託サービスを行っているペプチドライブラリー法及び免疫沈降法の2種類の事例を紹介する。

抗体は、新型コロナウイルスのどのタンパク質（抗原）のどの部分（エピトープ）を認識しているのか？



抗原タンパク質の特定

サンプルの検査キットから抗体を回収し、ELISA法でNタンパク質、S1/S2タンパク質への反応性を確認



Nタンパク質認識抗体と特定

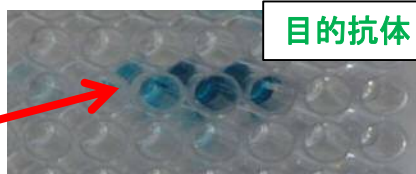
ペプチドライブラリー法

一つ一つのウェルに異なるアミノ酸配列からなるNタンパク質断片（ペプチド）を固定化。抗体を反応させ、抗体が結合するペプチドを検出



可溶性の高いペプチド配列を設計（必要により自社で合成）

反応した断片（ペプチド）



エピトープマッピング結果

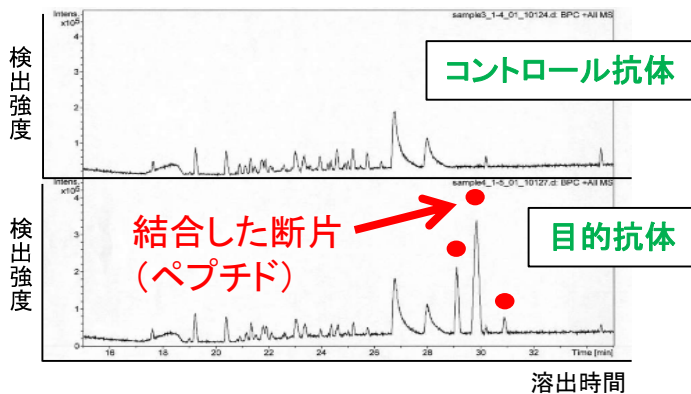
```

MSDNGPQNQRNAPRITFGGSPDSTGNSQNG
ERSGARSKQRRPQGLPNNNTASWFTALTQHG
KEDLKFPRGQVPIINTNSPPDQIGYRRA
TRRIRGGDGKMKDLSRPRWYFYLLGTGPEAG
LPYGANKDGI I WVATEGALNTPKDHIGTRN
PANNAAIVLQLPQGTTLPKGFYAEGRGGS
QASSRSSRSRNSRNSTPGSSRGTSFARM
AGNGGDAALALLLLDRLNQLSEKMSGKGQQ
QQGQTVTKKSAEASKKPRQKRTATKAYNV
TQAFGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTDYKH
WPQIAQFAPSASAFMGMSRIGMEVTPSGTW
LTYTGAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAY
KTFPPTEPKDKKKKKADETQALPQRQKKQQ
TVTLLPADLDDFSKQLQQSMSSADSTQA
    
```

さらにNタンパク質中のどこを認識するか（エピトープ）を特定

免疫沈降（LC-MS/MS）法

Nタンパク質断片と結合した抗体を回収し、高分解能LC-MS/MSで解析して、エピトープを特定（構造型のエピトープを特定できる可能性）



2種類のエピトープ解析法

エピトープ解析手法	特徴
ペプチドライブラリー法	エピトープをアミノ酸残基レベルで決定可能
免疫沈降（LC-MS/MS）法	ペプチドライブラリー法で決まらないエピトープを定められる可能性

高ターゲティング能・高安定性を有する 環状ペプチドダイマーの合成

東レリサーチセンターは環状ペプチドの合成に関する高度な技術と、抱負な合成実績を有しています。環状ペプチドは直鎖のペプチドと比較して標的への結合能、プロテアーゼ耐性、細胞膜透過性が高いため、中分子医薬品として注目を集めています。以下に、環状ペプチドダイマーの合成を紹介します。

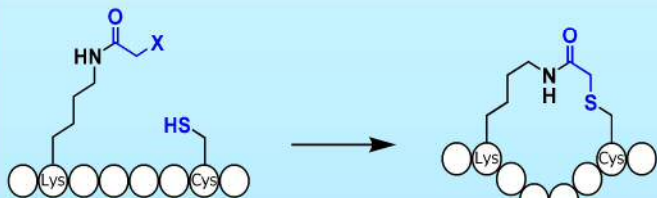
環状ペプチドのラインアップ

STRONG POINT !

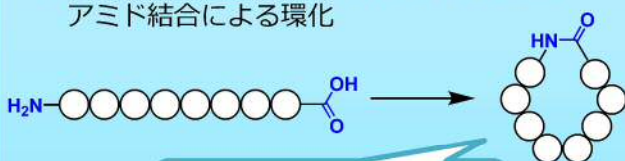
東レリサーチセンターでは、環状ペプチドのカスタマイズが可能です

- 任意の位置で環化することができます！
- 環のサイズを変えることができます！
- 様々な化学修飾が可能です！

◆ スルフヒドリル基とアセチル基とのチオエーテル結合による環化

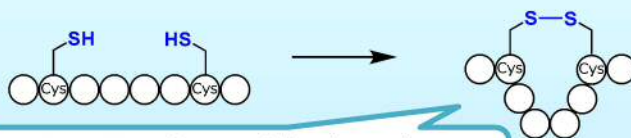


◆ N末端アミノ基とC末端カルボキシル基のアミド結合による環化



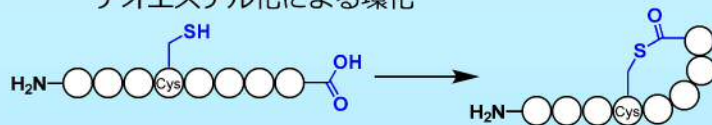
Cilengitideなど、合成実績豊富

◆ スルフヒドリル基のジスルフィド (S-S) 結合による環化

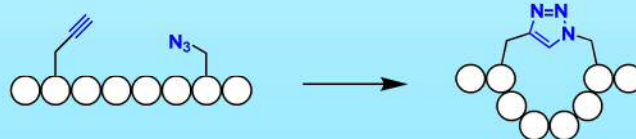


Oxytocin, Adrenomedullin (52mer)、 β -Defensin-3 (S-S結合3組) など、合成実績豊富

◆ スルフヒドリル基とカルボキシル基とのチオエステル化による環化



◆ CuAAC (copper-catalyzed azide alkyne cycloaddition)
* 銅触媒を使用



環状ペプチドダイマーの合成

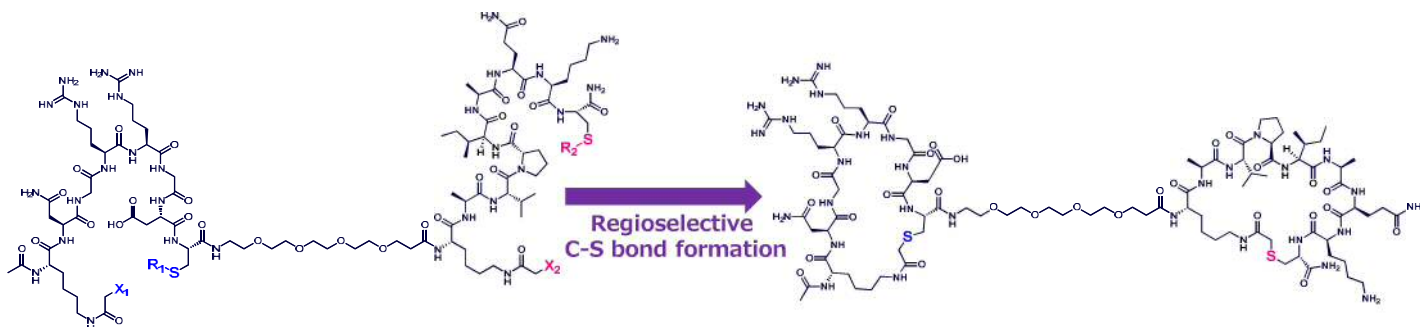
ペプチドダイマーは、モノマーよりもいくつかの利点を有しています。

例えばペプチドをダイマーにすることで、腫瘍細胞に対する選択性を改善できることが報告されています。

STRONG POINT !

- 環状ペプチドホモダイマー、ヘテロダイマー、どちらも合成することができます！
- 様々なリンカー（ペプチド鎖、アルキル鎖、PEGなど）を導入することができます！
- 環状ペプチドダイマーにはビオチンや蛍光色素の導入など、化学修飾が可能です！

例) 位置選択的なチオエーテル結合形成法を用いた環状ペプチドヘテロダイマーの合成



イオンモビリティ搭載質量分析計の抗体・核酸・ペプチドなど新モダリティ医薬品への活用

東レリサーチセンターでは、構造が複雑なバイオ医薬品の分離技術向上を図るため、新たにイオンモビリティ機能を搭載した新規質量分析計timsTOF Pro(ブルカー社)を導入しました。これによりバイオ医薬品の同一分子量の物質を区別できるようになり、同定の確実性を高められます。

timsTOF Proの特徴

- ✓ イオンモビリティによる同一分子量の物質の分離
- ✓ 高 m/z 領域(6,000超)の高分解能測定が可能
- ✓ 高い選択性と高感度
- ✓ 優れた堅牢性

具体的な活用例

下記は分析可能な例です。
他にも、様々な分析に活用できます！

1. 抗体医薬品のペプチドマップ、アミノ酸配列解析
イオンモビリティを活用すると、より複雑成分の少ない、高品質のスペクトルが得られます。通常はノイズ成分に埋もれてしまう微量成分についてもスペクトル抽出により分析可能になります。

2. ADC、特にシステイン型のADCの分析
高 m/z 領域での高分解能測定を活用できます。

3. 糖鎖構造解析
糖鎖には枝分かれ構造の異性体が多く存在します。イオンモビリティを用いて構造ごとに分離することで、これまでに分析できない糖鎖の構造決定を容易に行えます。

イオンモビリティ分離とは

イオン化された化合物を、その物質の嵩高さ(衝突断面積と電荷)の違いにより分離する方法。通常の質量分析では分離不可能な同一分子量の構造異性体の分離が可能。

糖鎖標準品の分析

N-アセチルノイラミン酸が2つのガラクトースのどちらかに結合した同一分子量の2種の糖鎖標準品の混合物

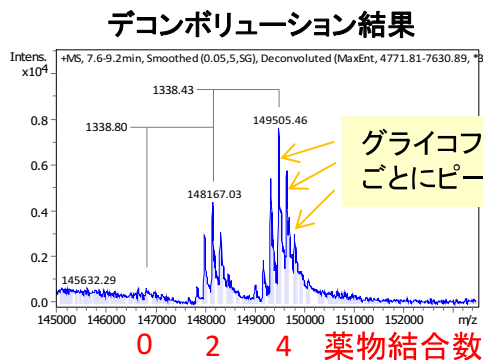


↓

イオンモビリティにより分離して観測が可能！

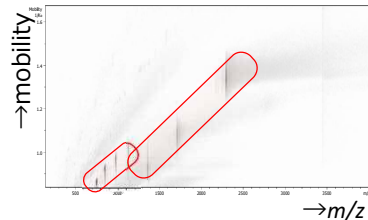
Cys(システイン)型ADCの分析

抗体のCysに薬物を結合させた場合、Native条件で高 m/z (6,000~8,000)でのLC-MS測定が必要。前処理(糖鎖の除去)なしで高分解能測定が可能。



オリゴRNAの分析

ヒートマップ



サンプル：20merオリゴRNA

コンフォーマー
2種の存在を観測

MS/MS測定による配列確認結果

AUGCAUGGAUGGAUGGAACG

	A	U	G	C	A	U	G	G	A	U	G	G	A	A	C	G
Ion	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	1	1	1	1	1	1
d-H2O	A	U	G	C	B	V	H	H	A	U	G	G	A	U	G	G
a-B	A	U	G	C	B	V	H	H	A	U	G	G	A	U	G	G
d	A	U	G	C	B	V	H	H	A	U	G	G	A	U	G	G
y	A	U	G	C	B	V	H	H	A	U	G	G	A	U	G	G
w	A	U	G	C	B	V	H	H	A	U	G	G	A	U	G	G

* チオリン酸

プロダクトイオンから19塩基を確認

Intermolecular Interaction Analysis

We introduced the latest SPR instrument, Sierra SPR-24!!



Bruker/ Sierra SPR-24 Pro

Sierra SPR-24 has industry leading SPR performance and supports various intermolecular interaction analyses including high-throughput screening and kinetics analysis.

- **High-throughput**

24 sensor spots (3 spots/channel x 8 channels)

Immobilization and sample injection can be conducted individually per spot.

Screening of 24 ligands by a single injection.

- **High-sensitivity**

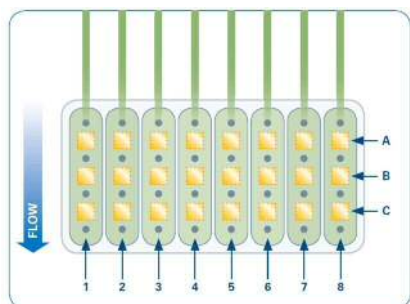
Able to perform interaction analysis of small molecular compounds as fragments

Molecular-weight ≥ 100 Da

Analysis example utilized numerous sensor spots

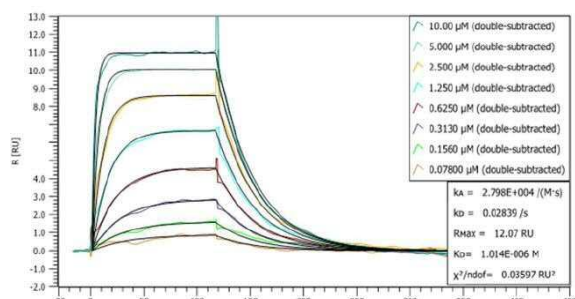
SICK (Single Injection Cycle Kinetics) method

A method realizes a speedy kinetics analysis by injecting analyte solutions of different concentrations to multiple sensor spots where the same ligands are immobilized.



In 1 to 8 of column A, ligands are immobilized, and analytes of different concentrations are injected at the same time.

Ligand : carbonic anhydrase II (30 kDa)
Analyte : small molecule inhibitor (201 Da)



- Data of 8 concentrations are obtained by a single injection for kinetics analysis

- Reproducibility between channels is high, and results equivalent to reference documents can be obtained.

Applicable to ligands that are hard to regenerate or easily inactivated.

Application

- Screening and kinetics analysis of small molecular compounds for target proteins
- Screening and characterization of biopharmaceuticals
- Various intermolecular interaction analyses of compounds, peptides, nucleic acids, proteins, and sugars
- Comprehensive intermolecular interaction analysis combined with other methods. ITC, NMR, MS, CD, and high-speed AMF

Please feel free to contact the following sales departments:

Toray Research Center, Inc.

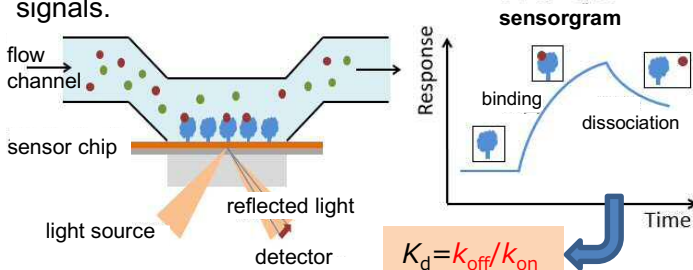
Life Science Sales Dept.: +81-3-3245-5666
Kansai Sales Dept. (Life Science): +81-77-533-8689
E-mail: bunseki@trc.toray.co.jp

Intermolecular Interaction Analysis (SPR, ITC)

In the R&D of drugs, diagnostic medicines, and others, interaction analysis of developing molecules and their targets is essential. Toray Research Center can evaluate the interaction analysis from various perspectives using our intermolecular interaction instruments such as ITC, NMR, MS and the latest SPR. The following are the features of SPR and ITC.

Surface Plasmon Resonance (SPR)

SPR detects a slight mass change caused by the interaction between the molecules on the sensor chip and the molecules flowing in the flow channel as SPR signals.

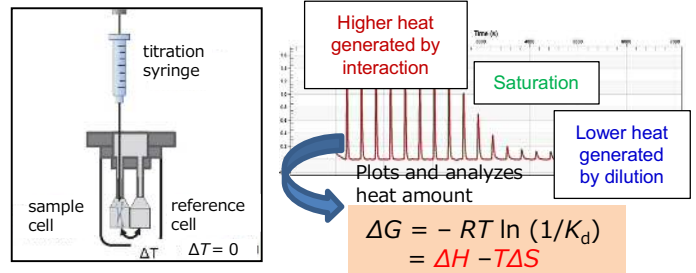


Binding kinetics and dissociation kinetics information is obtained.

Example of research
Faster binding rate: Rapid testing for diagnosis etc.
Slower dissociation rate: Sustained efficacy of drug etc.

Isothermal Titration Calorimetry (ITC)

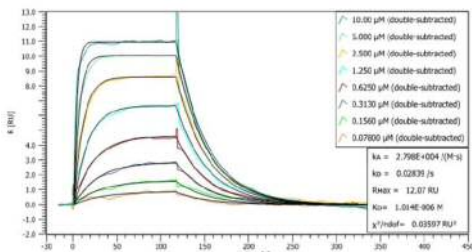
ITC detects a slight thermal change caused by the interaction between the molecules in the sample cell and the molecules titrated from the titration syringe.



Binding modes (entropy/enthalpy) and binding ratio information is obtained.

Enthalpy predominance: hydrogen bond and/or electrostatic interaction
Entropy predominance: hydrophobic interaction

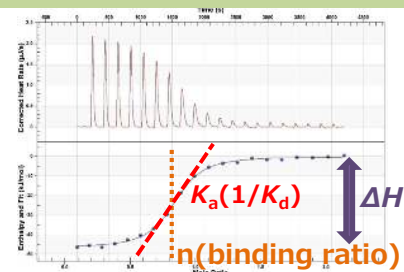
Analysis example: Interaction analysis of carbonic anhydrase (30 kDa) and sulfamoylbenzoic acid (201 Da)



The dissociation constants were confirmed to be equivalent.

Even when K_d is the same, binding and dissociation kinetics differs by compound. SPR has high throughput performance, making comparison and examination easier.

K_d (mol/L)	1.014×10^{-6}
k_{on} (L/mol-s)	2.798×10^4
k_{off} (1/s)	0.02839



K_d (mol/L)	1.398×10^{-6}
n	0.807
ΔH (kJ/mol)	-46.76
$-T\Delta S$ (kJ/mol)	13.34

Slight deactivation of protein is indicated.
The binding mode that enthalpy is predominant.

Method	SPR	ITC
Immobilization/Labeling	Immobilization is required	unnecessary
Molecular weight restriction	>100 Da	none
Required volume	Approx. 10 μ g	1 mg or more

ITC does not require immobilization or labeling, and interaction analysis can be conducted under more natural conditions.

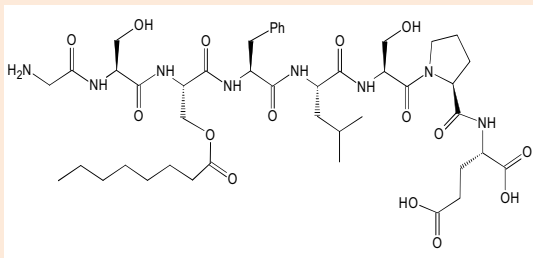
To save samples, it is recommended to first analyze by SPR, and then by ITC to obtain the validity of the results and further information.

We propose to perform interaction analysis using an optimum method for your purpose.

Structural analysis of peptide trace decompositions

Peptides, middle-size molecules, are big hope as one of next-generation drugs. The structural analysis of the decomposition and impurities is critical to ensuring stable quality. Toray Research Center possesses technologies for small molecule drugs, ranging from fractionation and structural analysis of trace components of APIs and drug products, and peptide synthesis technologies. Here is an example of our structural analysis of Ghrelin(1-8) trace decomposition using MS and NMR.

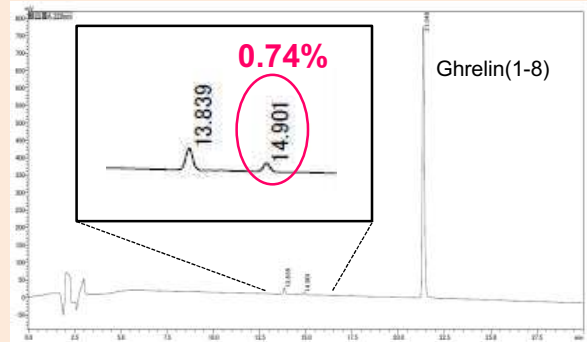
HPLC analysis of Ghrelin(1-8) decomposition



Ghrelin(1-8)

Amino acid sequence: GSS(octanoyl) FLSPE
(Monoisotopic Mass : 948.4804)

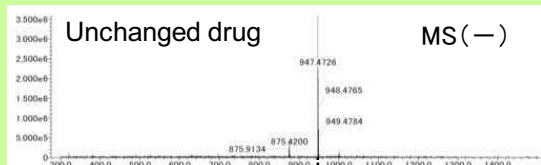
Hydrolysis



HPLC chromatogram of Ghrelin(1-8) (detection wavelength: 220 nm)

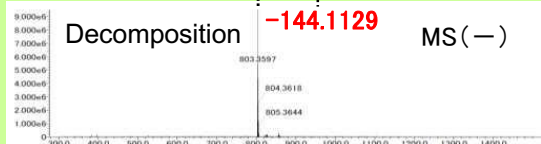
The decomposition (14.901) was isolated by automated solid phase extraction (SPE).

LC-MS structural analysis



Unchanged drug

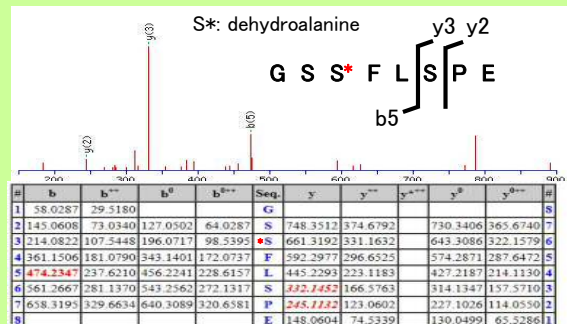
MS(-)



Decomposition

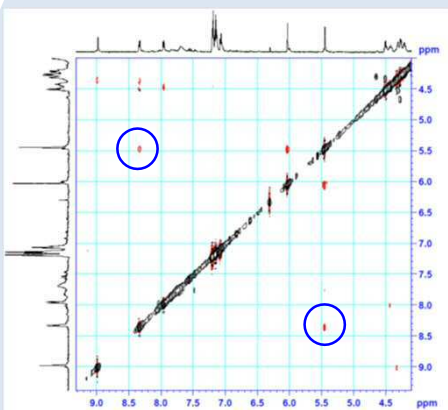
MS(-)

MS/MS analysis



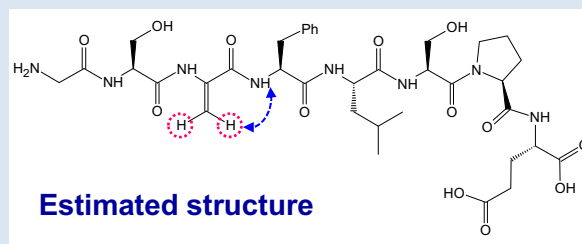
Ser(octanoyl) was possibly converted to dehydroalanine via β -elimination. ($-C_8H_{16}O_2$: theoretical mass, 144.1150)

NMR structural analysis



ROESY spectrum of decomposition

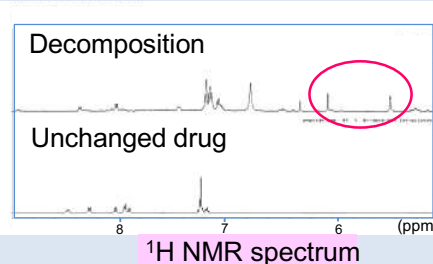
ROE correlations between dehydroalanine's proton and the adjacent phenylalanine's amide proton



Estimated structure

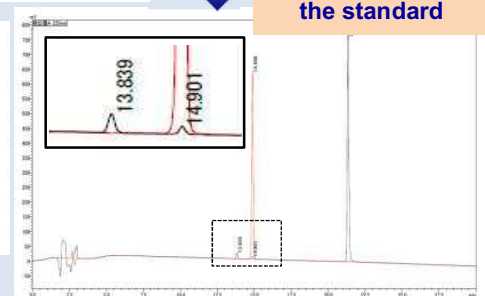
The peptide with the estimated structure was chemically synthesized into a standard

The same LC retention time as the standard



¹H NMR spectrum

Proton signal of dehydroalanine



Red: synthetic standard of dehydroalanine