

免疫の働きを光で精密測定

# 抗体医薬開発ツールガイド

免疫学研究からバイオ医薬の開発・品質管理まで



## プロメガのソリューション:

- 品質管理された細胞の利用で、安定した結果を実現 (事前の細胞管理・準備の手間を省力化)
- 高感度な発光アッセイ系による明瞭な結果

# 抗体 / 細胞医薬の開発・品質管理 に最適! バイオアッセイ製品マップ

近年、バイオリジックス (生物学的製剤) には多様なモダ  
 ガは、抗体医薬、細胞治療薬など多様なバイオリジックス  
 新規な発光免疫検出システムを利用することにより安定か



細胞内マーカーの漏出

LDH

DNA

DNA

LDH

Casp 3/7

1 細胞死マーカーの測定  
..... 11 ページ

検出試薬 (LgBiT 他)

Glo

発光 (NanoBiT® 再構成)

A C1q 結合アッセイ  
..... 9 ページ

HaloTag®  
または LDH\*

HiBiT

HiBiT 融合  
タンパク質マーカー

2 HiBiT ターゲット  
セルキリング (TCK)  
..... 4 ページ

プロモーター HaloTag® または LDH HiBiT

## HiBiT 発現 ターゲット細胞

11 アミノ酸の発光性ペプチドとの融合タンパク質 (HaloTag® または LDH) を恒常的に発現する細胞。細胞死により、HiBiT 融合タンパク質は漏出し、ターゲット細胞特異的なセルキリングを高感度に測定可能

CD20

Target  
Antigen

CD19

エンドサイトーシス

発光あり

3 内在化アッセイ  
..... 10 ページ

NanoLuc® 発光基質  
(細胞透過性)

4 バイスタンダー  
キリングアッセイ  
..... 11 ページ

NanoLuc®

発光なし

細胞外  
NanoLuc® 阻害剤

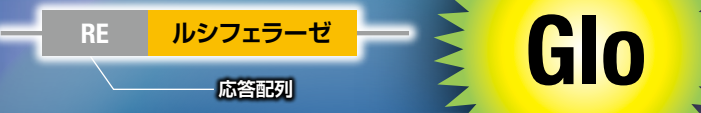
テクノロジーが採用され、開発や品質管理は低分子創薬よりも薬剤の作用機序 (MOA) に基づく定量的で正確かつ再現性の高い測定法が求められています。プロモーションの特性評価・開発に対応する高精度のバイオアッセイを提供しています。これらのアッセイでは、分子設計され、厳密に品質管理されたレポーター細胞や、一つ一つの精密な細胞実験を可能にします。さらに、創薬支援サービスとして既存のバイオアッセイのカスタマイズや新規アッセイ系構築なども承っています。

細胞ベースアッセイ  
Lumit® イムノアッセイ

**5 免疫チェックポイントアッセイ**  
..... 7 ページ

**6 初代培養 エフェクター細胞**  
..... 5 ページ

**7 T 細胞活性化アッセイ**  
..... 7 ページ



**レポーター導入  
エフェクター細胞**

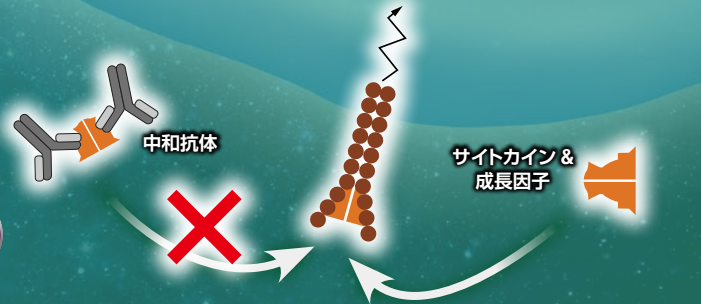
T細胞をはじめとする免疫細胞の活性化に重要な転写因子に関連する応答配列が導入されており、各種免疫系のシグナルをルシフェラーゼの発現に変換することにより定量します。

**8 ADCC & ADCP レポーター  
バイオアッセイ**  
..... 6 ページ

**9 サイトカイン & 成長因子  
バイオアッセイ**  
..... 7 ページ

**B Fc 受容体 結合アッセイ**  
..... 9 ページ

**C サイトカインアッセイ**  
..... 8 ページ



# 共培養系のペインポイントを解決！ ターゲットセルキリング (TCK)

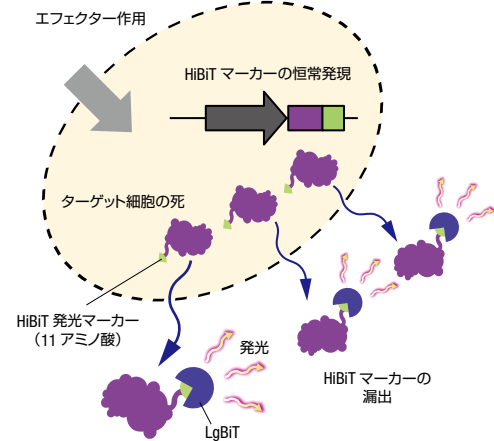
初代培養細胞に依存する従来の ADCC 法および ADCP 法は、細胞の入手が煩雑で、結果のばらつきも大きいため、バイオ医薬品開発において課題のひとつになっています。さらに、免疫療法薬の重要なメカニズムである標的細胞殺傷において、ターゲット細胞死とエフェクター細胞死を区別でき、高感度で再現性よく測定することは非常に重要です。

プロメガが提供するターゲットセルキリング (TCK) バイオアッセイは、様々なバイオ医薬品によって誘発される TCK を測定するためのシンプル、高感度、特異性の高い方法です。従来の共培養アッセイ系では見過ごされていた差をより明瞭に提示する可能性があります。これらのアッセイではターゲット細胞からのみ生じる細胞死シグナル (発光) を標準的なルミノメーターを使用して測定します。

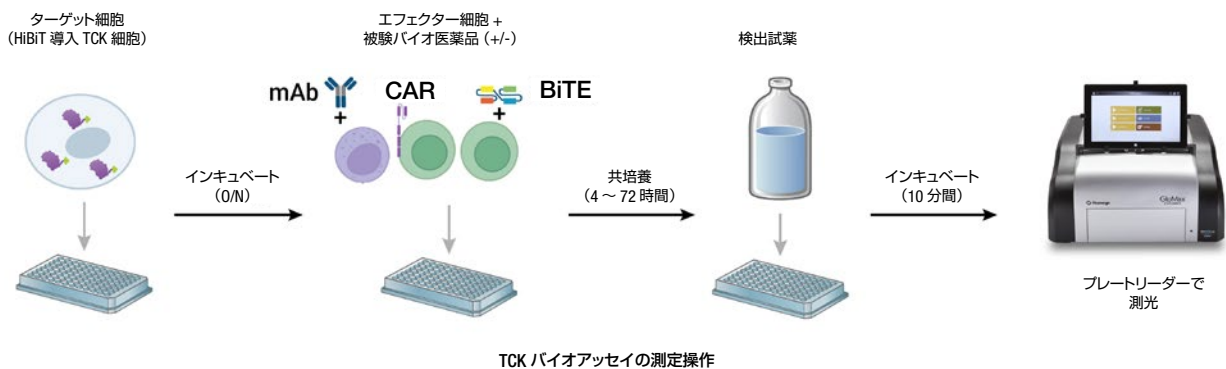
**製品形態:** 基本的なキットは、HiBiT 導入ターゲット細胞、発光検出試薬および培地で構成されています (キットによってコントロール抗体など添付)。キットに含まれる細胞は融解後すぐに使用できる使い切りの Thaw and Use 細胞ですが、増殖やバンクングが可能な Cell Propagation Model (CPM) も別途ご利用いただけます。

## HiBiT ターゲットセルキリングの特性

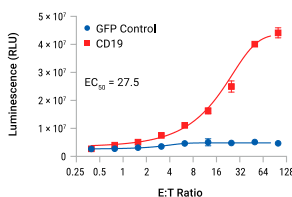
- 高感度に標的細胞特異的な細胞傷害を測定
- 培地交換のない、シンプルなホモジニアスアッセイ
- 標的細胞は発光性タグ HiBiT 発現細胞として、あるいは自作用キットとして入手可能



**TCK アッセイの原理**  
漏出した HiBiT マーカーのみを発光させて、ターゲット細胞死に応じた発光シグナルを測定。

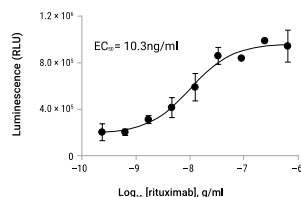


### CAR-T 細胞による細胞傷害活性

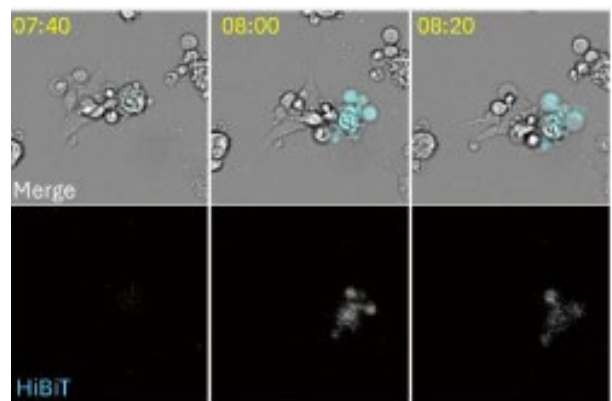


**HiBiT ターゲット細胞を用いて実証された CAR-T 活性**  
CAR-19 または GFP コントロールをレンチウイルスで形質導入した T 細胞を、HiBiT ターゲット細胞 (Ramos) と異なるエフェクター:ターゲット (E:T) 比で共培養し、24 時間インキュベートした。

### 抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC)



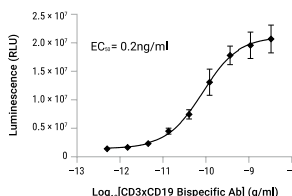
**PBMC ADCC Bioassay を用いて測定された TCK 活性**  
抗がん抗体医薬リツキシマブによる、PBMC を介した Raji (HiBiT) ターゲット細胞への傷害活性



### ターゲットセルキリングの細胞発光イメージング

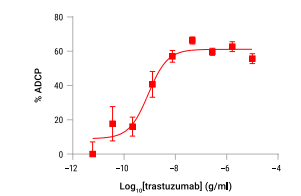
SKOV3 (HiBiT) 細胞に対し、50 ng/ml の runimotamab、および TDCC 試験適合のヒト T 細胞 (CD8<sup>+</sup>) (Cat. # CS3055B03) を、エフェクター細胞対ターゲット細胞の比率 2:1 で処置した。発光の検出は、Bio-Glo-NBT™ TCK LgBiT タンパク質 (Cat.# JB1001)、Nano-Glo® Vivazine® 基質 (Cat.# N2580) を使用し、GloMax® Galaxy 細胞発光イメージャー (Cat.# GM4000) で測定した。小さな円形の細胞が T 細胞であり、より大きな接着細胞が SKOV3 (HiBiT) 細胞。

### T 細胞依存性細胞傷害活性 (TDCC)



**ターゲット細胞に特異的な細胞傷害活性を測定する TDCC Assay**  
TDCC 試験適合のヒト T 細胞 (CD8<sup>+</sup>) を、HiBiT 発現ターゲット細胞および適切な二重特異性 T 細胞エンゲージャー (BiTE) と組み合わせて測定。

### 抗体依存性細胞貪食活性 (ADCP)

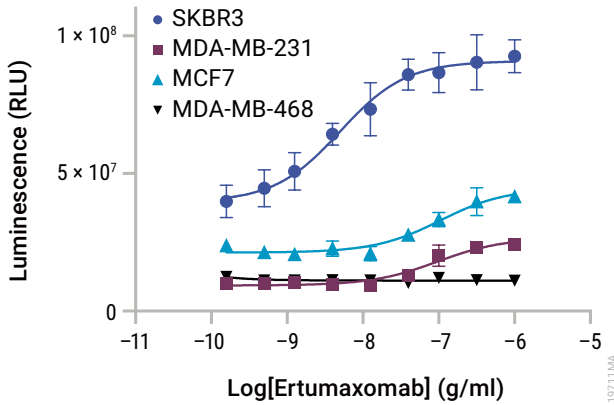


**ターゲット細胞の貪食による細胞傷害活性を定量する Macrophage ADCP Bioassay**  
ADCP 適格ヒトマクロファージを、HiBiT ターゲット細胞およびトラスツズマブと組み合わせ、ADCP 活性を測定。



## HiBiT- TCK 細胞は自作可能！

HiBiT マーカーを発現する TCK 細胞は、ご自身の実験目的に最適な細胞に HaloTag-HiBiT mRNA または短鎖 HiBiT 配列のノックイン (ゲノム編集) で導入することで作製でき、ターゲット細胞と共培養することによりターゲットセルキリングアッセイを実施することができます。



### ViaScript® (HiBiT) TCK バイオアッセイ法を用いた乳癌パネル解析

1 日目: ViaScript® 試薬による HaloTag-HiBiT mRNA のトランスフェクション。2 日目: Ertumaxomab (HER2 X CD3) の濃度を変えながら CD8<sup>+</sup> T 細胞とターゲット細胞 (E:T 比 10:1) を混合。3 日目、Bio-Glo-NB™ TCK 試薬を添加後、発光測定を実施。HER2 発現量 (高→低) は以下の通り: SKBR3、MCF7、MDA-MB-231、MDA-MB-468 (HER2 陰性)。ViaScript® (HiBiT) TCK バイオアッセイは、複数のターゲット細胞タイプを同時にスクリーニング可能であり、作業負荷を大幅に軽減します。

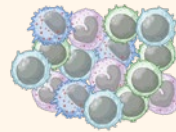
## CAR-T 細胞の効力評価アプリケーションに関するウェビナー！

CAR-T 細胞の生体内作用機序は多面的であり、ターゲット細胞殺傷とサイトカイン誘導は、CAR-T 細胞治療の指標として特に注目されている測定法です。本ウェビナーでは、既存の測定手法の限界について解説し、新しい HiBiT による標的細胞殺傷を基盤としたアプローチをご紹介しますとともに品質管理 (QC) 環境での使用に向けたアッセイの性能評価についても解説します (英語、要登録)。



### 初代培養 エフェクター細胞

プロメガの一次エフェクター細胞は、抗体やバイオ医薬品の力価・安定性を高精度に評価できる発光バイオアッセイ用の細胞です。ADCC、ADCP、TDCC などの作用機序に基づいて設計され、生物学的に高い関連性を有します。HiBiT ターゲットセルキリングアッセイで機能確認されており、ターゲット TCK 細胞の溶解後に検出試薬を加えることで、特異的な細胞傷害性を明るい発光シグナルとして定量的に測定することができます。



PBMC



CD8<sup>+</sup> T cells



Mφ

### 製品情報

#### HiBiT 導入 ターゲット細胞

	固形がん	血液がん
卵巣がん	<b>OVCAR3 および SKOV3</b> ・ 発現: HER2, MSLN, 5T4, MUC16 ・ MSLN ノックアウト株あり	<b>B 細胞リンパ腫・白血病</b> <b>Raji および Ramos</b> ・ 発現: CD19, CD20, CD22, CD38 ・ 一部標的に対してノックアウト株あり
乳腺腺がん	<b>SK-BR-3</b> ・ 発現: HER2, EpCAM	<b>骨髄性白血病</b> <b>U937 および K562</b> ・ 発現: CD33, CLL-1
肺がん	<b>A549</b> ・ 発現: EGFR	<b>多発性骨髄腫</b> <b>H929</b> ・ 発現: BCMA, CD38
メラノーマ	<b>A375</b> ・ 発現: HER2, CD70, B7-H3	<b>T 細胞性白血病</b> <b>T2</b> ・ 発現: CD5, CD7, CD30, CD52

#### HiBiT 導入ターゲット細胞作製ツール

RNA 導入法	<b>ViaScript® (HiBiT) TCK Bioassay</b> ・ RNA トランスフェクションによる一過性 HiBiT 発現 ・ 最適な TCK 細胞株の選定 ・ 血液がんまたは固形がん細胞株の HiBiT 化に
ゲノム編集法	※ CRISPR ノックインによる導入については弊社までお問い合わせください。

#### 初代培養エフェクター細胞

ADCC 適格	<b>PBMC</b> ・ 機能試験済み ・ 単一ドナー由来 ・ FcγR 遺伝子型判定済み
TDCC 適格	<b>CD8<sup>+</sup> T 細胞</b> ・ 機能試験済み
ADCP 適格	<b>マクロファージ</b> ・ 機能試験済み ・ FcγR 遺伝子型判定済み

#### 定量試薬

ADCC、TDCC、CAR-T 用	Bio-Glo-NB™ TCK Luciferase Assay System
ADCP 用	Bio-Glo-NB™ Lytic Luciferase Assay Systems

※以下については弊社までお問い合わせください。

- ・ ターゲット、エフェクター細胞、定量試薬など必要な試薬を含むキット
- ・ CD19、CD20 ノックアウトターゲット細胞
- ・ ご自身のターゲット細胞の HiBiT TCK 化、ノックアウト細胞作製など

製品の詳細・価格等については最終ページの QR コードの資料をご覧ください。弊社テクニカルサービスまでお問い合わせください。

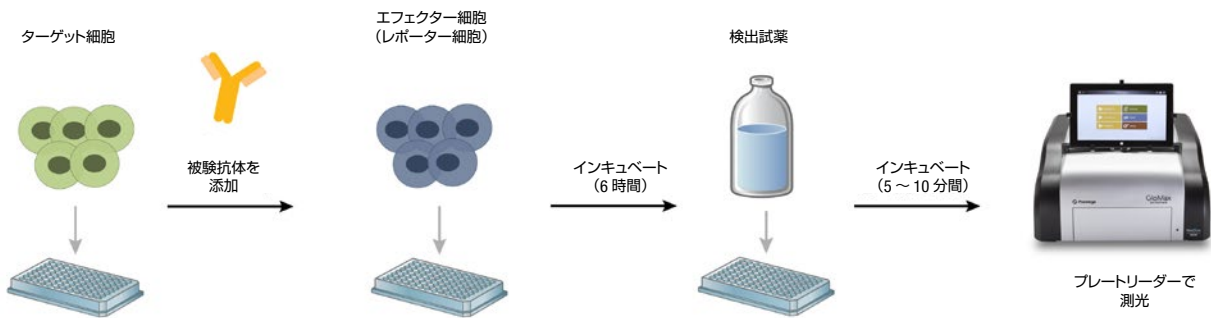
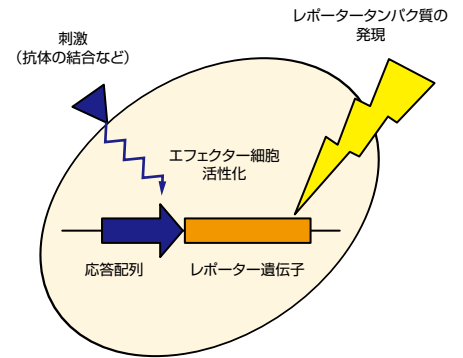
※オリジナルのバイオアッセイの構築については弊社 TRS (カスタムアッセイ開発サービス) がご利用いただけます。

# 精度、安定性に優れたレポーター細胞 レポーターバイオアッセイ

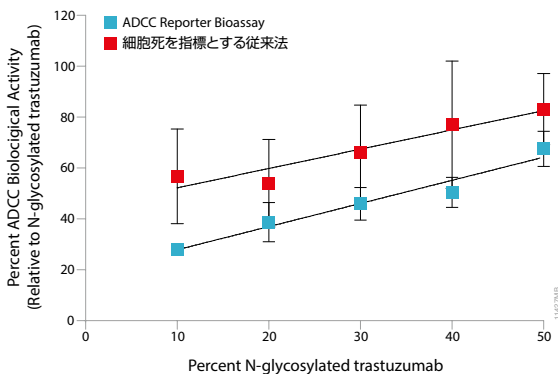
本アッセイは免疫細胞の活性化をそれぞれ特異的なシグナル経路を利用してルシフェラーゼ遺伝子の発現としてアウトプットさせることで安定・高感度に検出します。

初代細胞のバラつきを排除し、数週間にわたる工程を最短6時間に短縮します。プロメガのMOAベースアッセイは、ICHガイドライン準拠の信頼性と糖鎖修飾等の微差を見抜く高感度を両立します。R&DからCMCまで一貫したデータを提供する「試薬としての細胞」が、抗体創薬を劇的に効率化します。

**製品形態:**キットには改変エフェクター細胞、発光検出試薬および培地を基本とし、キットによってコントロール抗体などが含まれます。キットに含まれる細胞は使い切りの Thaw and Use 細胞ですが、増殖やバンキングが可能な Cell Propagation Model (CPM) も別途ご利用いただけます。



代表的なレポーターバイオアッセイの操作フロー



## 抗体のグリコシル化による生物活性の変化に関する ADCC レポーターアッセイと従来法の比較

未処理（完全にグリコシル化）と PNGase F 処理したトラスツズマブを適切な割合で混合したサンプルを HER2 陽性 SK-BR-3 細胞で評価した。ADCC レポーターアッセイの場合はキットに添付の Jurkat エフェクター細胞を使用した。従来法である PBMC ベースの ADCC アッセイではドナー由来の PBMC をエフェクターとし、溶解した SK-BR-3 細胞から漏出した LDH を CytoTox 96® 非放射性細胞傷害性アッセイを用いて測定した。

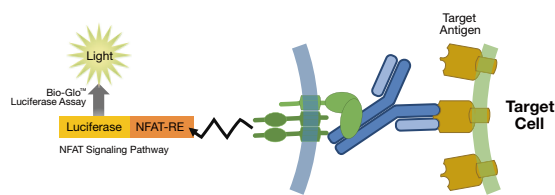
## レポーターバイオアッセイの精度 (ADCC レポーターバイオアッセイの場合)

パラメーター	結果	
	WIL2-S ターゲット細胞    Raji ターゲット細胞	
精度	% 予測相対力価	% 回収率    % 回収率
	50	97.7    101.0
	75	88.5    101.2
	125	98.4    93.8
	150	98.4    96.7
反復精度 (%CV)	5.0    9.1	
中間精度 (%CV)	7.3    3.0	
直線性 (r2)	0.995    0.997	
直線性 (y=mx+b)	y=1.016x-0.052    y=0.922x+5	

## レポーターバイオアッセイの抗体医薬パイプラインでの利用

ステージ	利点
開発	受容体結合の迅速なスクリーニングやランク付け
最適化	特定の機能プロファイルをもとにしたドメイン設計など
前臨床	精度、直線性、再現性が認められたレポーターバイオアッセイ
薬事	各機能の直交的確認のためのブリッジング研究
製造	効力試験のためのロットリリースアッセイとして

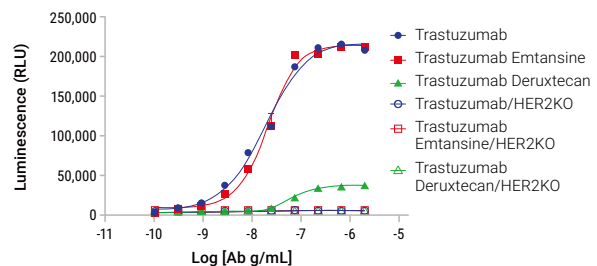
## ① Fc エフェクターバイオアッセイ (ADCC / ADCP)



### 製品ラインナップ:

- Human ADCC FcγRIIIa (V158 and F158 variants)
- Human ADCC FcγRIIIa (H131 and R131 variants), FcγRI, FcγRIIb
- Mouse ADCC FcγRIV, FcγRIII
- Mouse ADCC FcγRI, FcγRIIb
- Cynomolgus ADCC FcγRIII
- Cynomolgus ADCC FcγRI, FcγRIIIa, FcγRIIb
- Canine ADCC FcγRIII

## ADCC



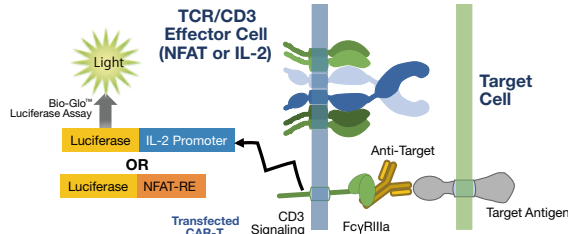
ADCC レポーターバイオアッセイを用いた ADC の Fc エフェクター活性の測定  
trastuzumab (抗 HER2 モノクローナル抗体)、trastuzumab emtansine または trastuzumab deruxtecan の連続希釈液を、ADCC バイオアッセイエフェクター細胞と SKOV3 または SKOV3/HER2 ノックアウトターゲット細胞とともに、37°C で 6 時間インキュベートした。

ADCC および ADCP レポーターバイオアッセイは、Fcγ受容体に特異的に結合して活性化させる抗体ならびにその他のバイオ医薬品の有効性と安定性の測定に利用できる生物学的に関連する作用機序ベースのアッセイです。本アッセイには、関連する Fcγ受容体バリエーションと NFAT 応答配列により駆動するルシフェラーゼ遺伝子を安定して発現するエフェクター細胞が含まれます。

※ 従来の ADCC Assay の改良版については 4 ページをご参照ください。

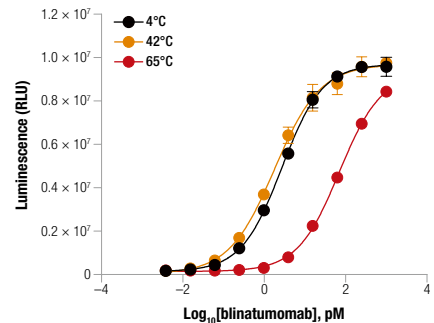
## ② T細胞活性化バイオアッセイ

T細胞応答を誘導、強化、または操作することを目的とした免疫療法戦略は、がんや自己免疫疾患などの疾患の治療における有望なアプローチです。T細胞活性化バイオアッセイ (NFAT および IL-2) は、それぞれ遺伝子改変された細胞株である TCR/CD3 エフェクター細胞 (NFAT) および TCR/CD3 エフェクター細胞 (IL-2) から構成されています。抗 TCR/CD3 刺激単独、または抗 TCR/CD3 と抗 CD28 の両方の刺激と結合すると、受容体を介したシグナル伝達が (それぞれ NFAT または IL-2 経路の活性化を介して) 発光を誘導します。この発光は、Bio-Glo™ 試薬を添加し、ルミノメーターで定量することで検出できます。



製品ラインナップ:

- ・ TCR/CD3 (NFAT), TCR/CD3 (IL2) effector cells
- ・ TCR  $\alpha\beta$ -KO (CD4<sup>+</sup>), TCR  $\alpha\beta$ -KO (CD8<sup>+</sup>), TCR  $\alpha\beta$ -KO (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) cell lines
- ・  $\gamma\delta$  T Cell Activation Bioassay ( $\gamma\delta$  T cell therapy)

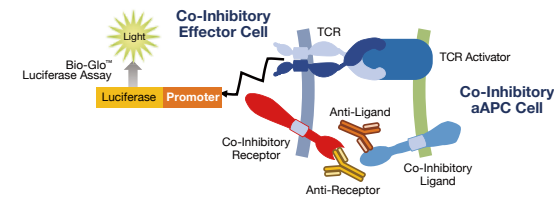


T Cell Activation Bioassay (NFAT) による安定性試験

プリナツモマブのサンプルを4°C (対照) で1時間維持するか、熱処理 (42°Cまたは65°C) した後、T細胞活性化バイオアッセイ (NFAT) とRaji (CD19+) 標的細胞を用いて分析した。

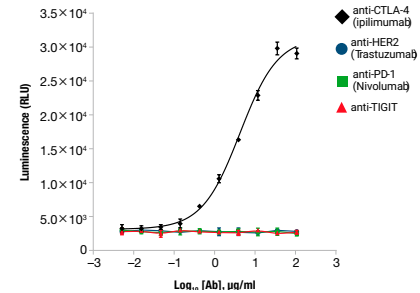
## ③ 免疫チェックポイント調節 (共刺激・共抑制) バイオアッセイ

作用機序 (MOA) に基づくレポーターバイオアッセイは、免疫チェックポイントの共抑制性受容体および共刺激性受容体を、それぞれ単独または組み合わせで解析できるように設計されています。このバイオアッセイは、通常、2つの遺伝子改変細胞株から構成されています。1) 受容体を発現するエフェクター細胞、および 2) リガンドを発現する人工抗原提示細胞 (aAPC) です。共培養中、TCR は TCR 活性化因子または抗原提示によって活性化され、リガンドと共抑制受容体の相互作用が TCR シグナル伝達を阻害します。抗体が存在すると、共抑制受容体とリガンドの相互作用が阻害され、その結果、抑制が解除されます。



製品ラインナップ:

- ・ 共抑制レポーターバイオアッセイ (PD-1, CTLA-4, TIGIT, TIM-3, VISTA, HVEM, CD226, LAG-3/MHC-II)
- ・ 共刺激レポーターバイオアッセイ (GITR, OX40, CD40, 4-1BB, CD27, CD28, ICOS)
- ・ コンビネーションレポーターバイオアッセイ (PD-1+TIGIT, PD-1+CTLA-4, PD-1+LAG-3, PD-1+4-1BB)

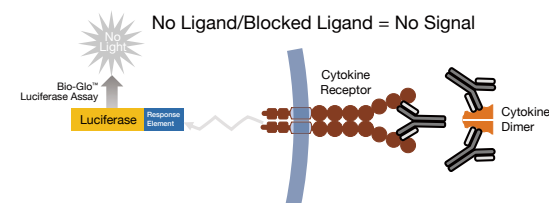


CTLA-4 Blockade Bioassay による各種抗体の力価測定

CTLA-4/CD80 および CD86 の相互作用を阻害するように設計された生物学的製剤の作用機序 (MOA) と特異性を反映した。

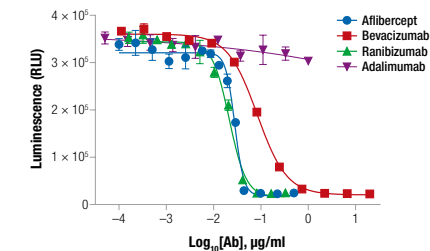
## ④ サイトカイン・成長因子 バイオアッセイ

サイトカインおよび成長因子バイオアッセイは、リガンドの活性を定量およびモニタリングするだけでなく、抗体を介したリガンドと受容体の結合の遮断にも適したルシフェラーゼレポーターベースのアッセイです。これらのバイオアッセイは、サイトカインおよび成長因子のバイオシミラーおよびバイオペターの製造における開発、安定性試験、および力価測定のための貴重なツールとなります。



製品ラインナップ:

- ・ VEGF, RANKL, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$
- ・ IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, IL-17, IL-23



VEGF バイオアッセイの応答性

様々な VEGF 経路阻害剤の効果を、EC<sub>50</sub> 濃度の組換え VEGF 存在下で測定。

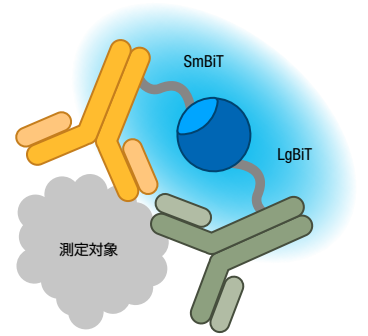
製品の詳細・価格等については最終ページの QR コードの資料をご覧ください。弊社テクニカルサービスまでお問い合わせください。

※オリジナルのバイオアッセイの構築については弊社 TRS (カスタムアッセイ開発サービス) がご利用いただけます。

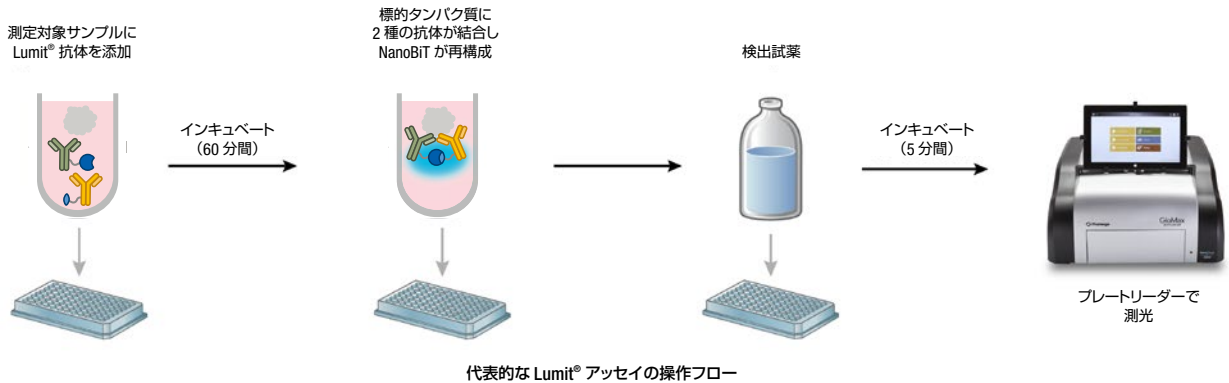
# 洗浄不要のハイスループット対応免疫アッセイ Lumit® 免疫アッセイ

In vitro での 標的タンパク質の検出と定量には、特異性の高い抗体を利用したウェスタンブロットティングや ELISA などの免疫アッセイが利用されますが、洗浄操作やブロッキングなどの煩雑な操作が求められます。Lumit® テクノロジーは、マルチウェルプレートフォーマットで試薬を加えるだけのホモジニアス免疫アッセイを実現できるので、洗浄が不要なために操作がシンプルで自動化やハイスループットスクリーニングにも容易に適応します。蛍光を利用した FRET 様の免疫アッセイに比べてもより簡便、広いダイナミックレンジ、低コストでの実施が可能で、基礎研究から創薬研究を行う研究者にとって強力なツールとなります。

- 真のホモジニアスアッセイ：洗浄工程、ブロッキング、抗体の固定化が不要で、培地の除去も不要な“添加だけ”のステップ
- ハイスピード：ステップ数が最小限で細胞培養プレートでの測定も可能
- 多検体処理：自動化にも容易に適応し、384 ウェルフォーマットにも対応
- 高品質データ：発光法の特性により高感度・広いダイナミックレンジを実現（サンプルの希釈不要）

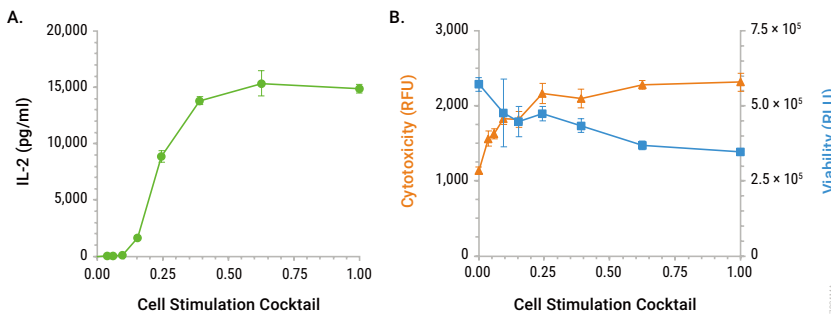


**Lumit® サイトカインアッセイの原理**  
高輝度 NanoLuc® 発光酵素を分割した SmBiT と LgBiT で測定対象に対する 2 種類の抗体をそれぞれ標識。サンプルにこれらの抗体および基質を加えると含まれる標的に比例した発光量が得られる。



## Lumit® サイトカイン免疫アッセイ

Lumit® Cytokine Detection Immunoassay は、洗浄操作を必要としないシンプルな免疫アッセイプロトコルで、培養細胞サンプル中のサイトカイン・成長因子を高感度に定量します。SmBiT または LgBiT で標識済み抗体をサンプルに加え、さらに検出試薬を加えて混合し、標準的なプレートリーダーで発光シグナルを測定するだけで、解析が完了します。全プロトコルは 70 分以内に完了し、培養中の細胞を用いて直接アッセイを実施することも、培養上清を別のプレートに移して測定することも可能です。試薬を加えるだけの単純な操作により 384 ウェルプレートでのホモジニアスアッセイやマルチプレックスアッセイも実現できます。



◀同一ウェルでのヒトPBMCのIL-2放出、細胞毒性、生存性マルチアッセイ  
PBMC (細胞 30,000 個 / ウェル) を 96 ウェルプレートに播種し、Cell Stimulation Cocktail (CSC) の濃度を変えて 24 時間刺激。処理後、CellTox™ Green で蛍光を測定して細胞毒性を評価し (B)、室温平衡後に Lumit® 試薬で IL-2 放出を測定 (A)、最後に CellTiter-Glo® で生存率 (発光) を測定した (B)。

測定項目	関連するイベント
IFN-β	抗ウイルス / 自然免疫センシング経路 (STING, RIG-I, TLR7/9)
IFN-γ	T 細胞 / NK 細胞の機能・活性 (共培養、細胞傷害アッセイ)
IL-1β	インフラマソーム / NLRP3 生物学 (パイロトシス、カスパーゼ-1)
IL-2	T 細胞の増殖・生存 / 拡大 (CAR-T, TCR-T, Treg 機能)
IL-4	免疫スキューニング (Th2 vs Th17 vs 制御性)
IL-6	サイトカイン放出 / CRS (サイトカイン放出症候群) リスク、(細胞治療、エンゲージャー、PBMC アッセイ)
IL-8	腫瘍微小環境のセクレトーム / トラフィックキング

測定項目	関連するイベント
IL-10	抗炎症シグナル / 免疫抑制 (Treg, M2 マクロファージ, TAM)
IL-12p70	樹状細胞活性化 / アジュバント・ワクチンプログラム
IL-17A	免疫スキューニング (Th2 vs Th17 vs 制御性)
IL-18	インフラマソーム / Th1-NK 活性化および IFN-γ 誘導 (カスパーゼ-1, IL-12 との相乗効果)
TNF-α	自然免疫炎症 / 抑制 (マクロファージ, NF-κB, TLR 生物学)
VEGF-A	血管新生 / 低酸素 / 血管生物学
HMGB1	免疫原性細胞死 (ICD) (腫瘍学、化学療法 / 免疫腫瘍学、放射線モデル)

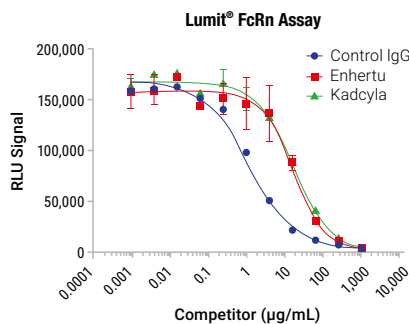
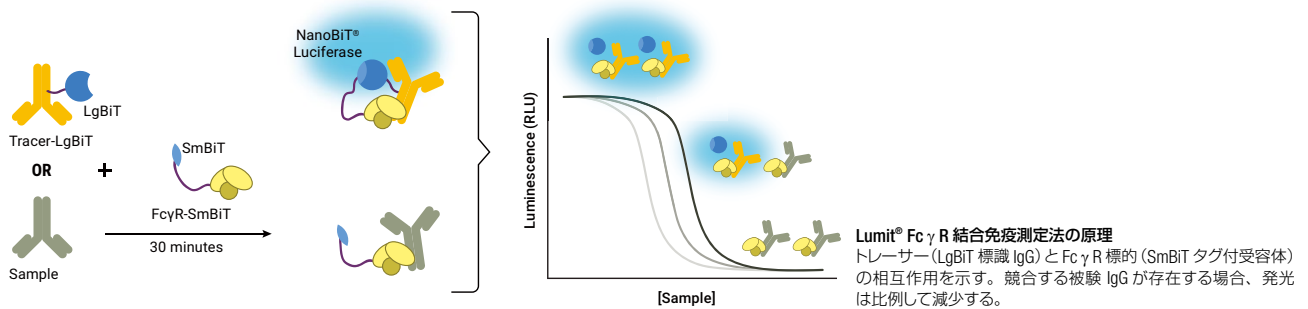
※上記測定項目に対応する Lumit® 免疫アッセイについては弊社までお問い合わせください。

## Lumit® 結合アッセイ (FcR・C1q)

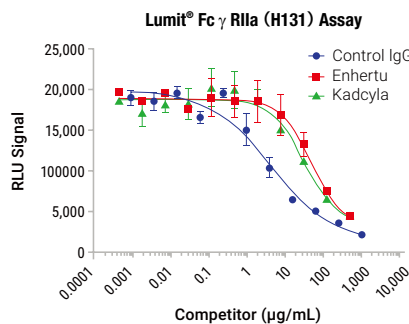
Lumit® Binding Assay は、抗体医薬の機能評価において重要な Fc $\gamma$ R (Fc 受容体) および FcRn (新生児 Fc 受容体) や補体成分 C1q との結合親和性を、迅速かつ高精度に測定できる革新的なプラットフォームです。独自の分割型ルシフェラーゼ技術 NanoBIT® を応用したホモジニアス発光アッセイ法を採用しており、従来の ELISA 法とは異なり、プレートへの固定化や洗浄工程が一切不要です。検体と試薬を混合するだけで、液中中での分子間相互作用を反映した発光シグナルが得られます。エフェクター機能 (ADCC / ADCP 活性) に関わる Fc $\gamma$ R、血中半減期に関与する FcRn、さらに補体依存性細胞傷害 (CDC) の起点となる C1q への結合評価を同一の操作フローで実施可能です。バイオシミラー開発や品質管理における多検体解析を強力に効率化します。

### Lumit Fc Receptor (FcR /FcRn) Binding Immunoassay

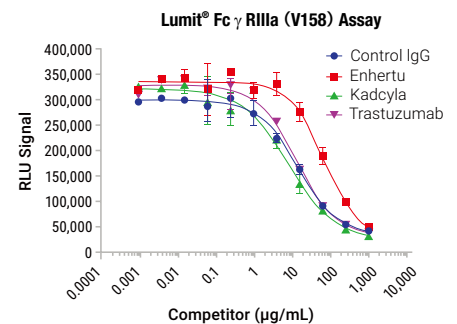
本アッセイは競合法にて、抗体医薬のエフェクター機能 (Fc) や血中滞留性 (FcRn) を左右する受容体との結合能を評価します。LgBIT 標識トレーサー抗体と SmBIT 標識受容体の結合による発光を基準シグナルとし、非標識の検体抗体が存在すると、検体濃度に依存して発光値が低下します。このシグナル変化から、固相への固定化を伴わない溶液中での受容体結合能を定量します。



	Control IgG	Enhertu	Kadcylla
IC <sub>50</sub> (µg/mL)	1.251	17.54	17.41



	Control IgG	Enhertu	Kadcylla
IC <sub>50</sub> (µg/mL)	4.266	51.27	30.84



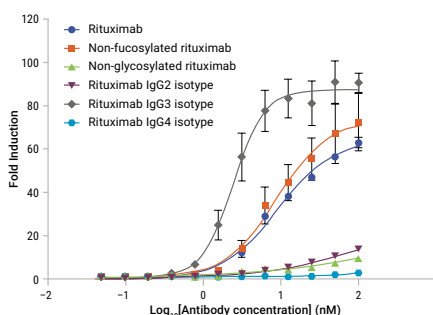
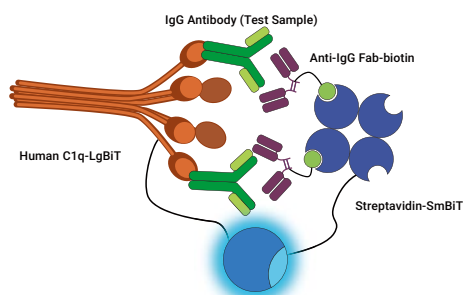
	Control IgG	Enhertu	Kadcylla	Trastuzumab
IC <sub>50</sub> (µg/mL)	13.72	70.28	8.324	12.55

#### Lumit® FcR Binding Assay による ADC の特性比較

各種 ADC は、対照 IgG または非結合 (無修飾) のトラスツマップと並行して Lumit FcR 結合アッセイで試験した。Enhertu (エンハーツ) と Kadcylla (カドサイラ) は、対照 IgG と比べて Fc $\gamma$ RIIa および FcRn への結合性が低く、Enhertu のみが他の抗体よりも Fc $\gamma$ RIIa への結合性が低かった。

### Lumit® C1q Binding Assay

モノクローナル抗体の Fc 領域は C1q との結合を介して補体経路を活性化し、補体依存性細胞傷害 (CDC) などの作用を発揮します。本アッセイは、CDC 活性の起点となる補体成分 C1q と、抗体 Fc 領域との結合を評価します。LgBIT 標識された C1q、ターゲットとなる抗体、および SmBIT 標識された抗 IgG Fab 複合体を混合するホモジニアスな系により、簡便に測定できます。抗ヒト IgG Fab-SmBIT 複合体で抗体を捕捉して Fc クラスタリングを誘導し、C1q-LgBIT を添加することで NanoBIT® ルシフェラーゼを再構成する、洗浄工程不要のホモジニアスアッセイです。固相固定化・洗浄を必要としないため、C1q との結合評価スクリーニングや品質管理に迅速に適用できます。



#### (左) Lumit® C1q 結合アッセイの原理

ビオチン化抗ヒト IgG Fab をストレプトアビジン-SmBIT と複合体化。次に C1q-LgBIT を添加。LgBIT と SmBIT が近接すると NanoBIT® ルシフェラーゼが再構成され、C1q に結合した抗体の量に比例した発光シグナルを生成。

#### (右) Lumit C1q 結合アッセイの優れた特異性

Lumit® C1q 結合アッセイは、抗体の特異性と感度について評価可能。様々な IgG アイソタイプやフコシル化、糖鎖修飾を含むリツキシマブのバリエーションに対して実施。その結合プロファイルは、既存の文献と一致した。

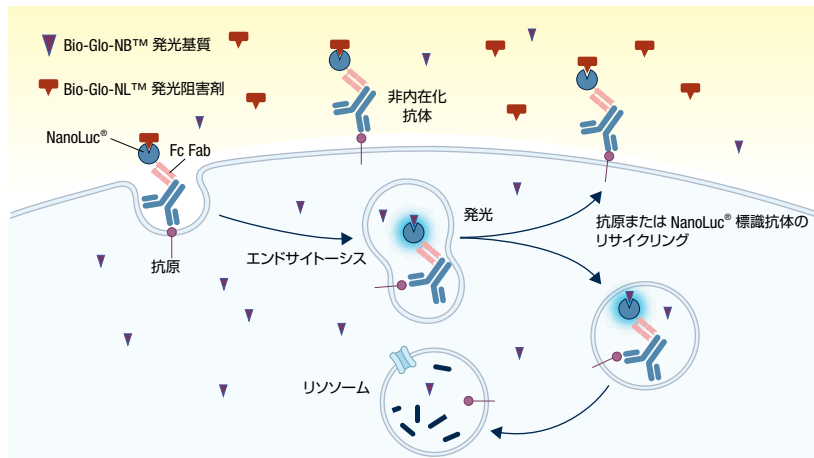
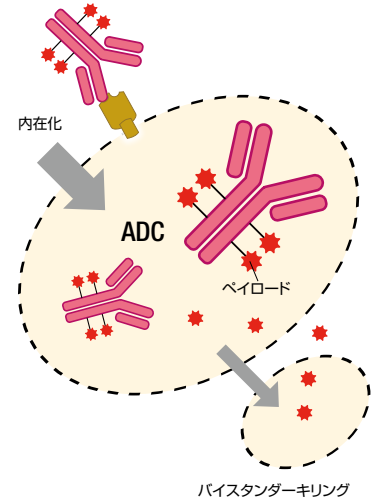
# ADC 薬効メカニズムを深掘り！ 内在化 & バイスタンダー効果の解析

## 内在化の測定

### Antibody Internalization Bioassay

ADC の内在化の動態を開発初期段階で理解することは後期段階でのドロップアウトを回避する上でも非常に重要です。

Antibody Internalization Bioassay は、NanoLuc® ルシフェラーゼ標識抗 Fc Fab フラグメントを用いて、抗体の細胞内取り込みを高感度に測定します。膜透過性のない NanoLuc® 阻害剤を利用することで、細胞外および細胞表面に結合した抗体由来のシグナルを消光させます。このアッセイは、わずか 30 分のインキュベーションで、細胞内に取り込まれた抗体のみを確実に測定することができます。この手法により、プレートベースフォーマットで抗体の結合および細胞内取り込みを定量するための、高感度かつハイスループットな方法が提供されます。

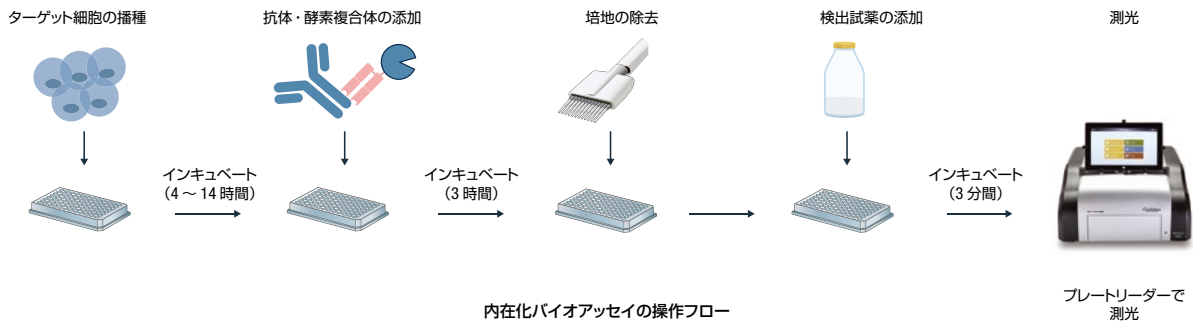


#### Antibody Internalization Bioassay 測定原理 (左)

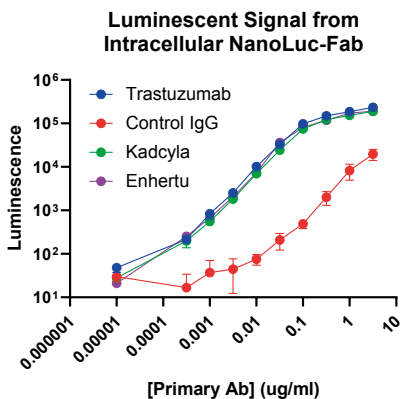
NanoLuc® ルシフェラーゼ標識抗 Fc Fab が一次抗体または ADC 治療薬に結合することに基づいている。一次抗体が標的抗原に結合すると、複合体が内在化 (internalization) し、結合していない抗体は洗浄除去される。膜透過性のない NanoLuc® 阻害剤 (Bio-Glo-NL™ Glo-Guard) および NanoLuc® 阻害剤緩衝液 (Bio-Glo-NL™ Glo-Guard 緩衝液、図中の黄色の網掛け部分)、および膜透過性ルシフェラーゼ基質を含む検出試薬を細胞に添加。結果として得られる発光シグナルは、主に内在化した Fab と一次抗体の複合体から生成される。

#### 測定プロトコル (下)

1) ターゲット細胞をプレートに播種。2) 事前に複合体化させた抗体と細胞をインキュベートし、細胞表面の抗原に結合、内在化。3) インキュベート後、培地を除いて未結合の抗体を除去することで、細胞表面に結合あるいは内在化した抗体のみが残存。4) Bio-Glo-NL™ Glo-Guard を含む検出試薬を各ウェルに添加。5) 細胞外の NanoLuc® は阻害され、発光基質は細胞質やエンドソーム膜に浸透するため、内在化した抗体量に比例した発光シグナルが得られる。

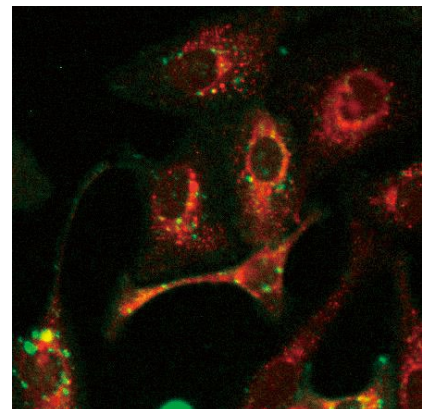


内在化バイオアッセイの操作フロー



#### 内在化抗体由来の発光シグナルの測定

NanoLuc® Fab と複合体化した ADC (Kadcyla®, Enhertu®, トラスツズマブ®, または対照 IgG) の滴定試験を実施した。ADC を NanoLuc®-Fab と 2:1 の比率で 15 分間インキュベート後、培地中で連続希釈し、SKOV3 細胞に添加した。3 時間インキュベート後、細胞を 1 回洗浄し、アッセイ試薬を添加した。初回発光測定後、ジキトニンで細胞を透過化させ、細胞外 NanoLuc® 阻害剤が内在化した NanoLuc®-Fab を阻害できるようにした。2 回の発光測定値の差を細胞内 NanoLuc® シグナルとしてプロットした。



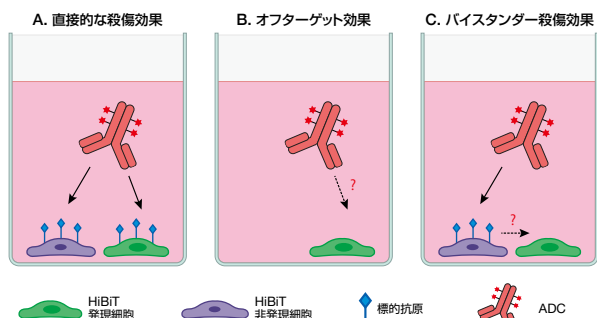
#### GloMax® Galaxy による抗体内在化イメージング

SKOV3 細胞を NanoLuc® 標識 Fab が結合した trastuzumab とともにインキュベーションした。緑: NanoLuc® 発光、赤: リンソームなどの酸性オルガネラ (LysoTracker® Deep Red 染色)

## バイスタンダー効果の測定

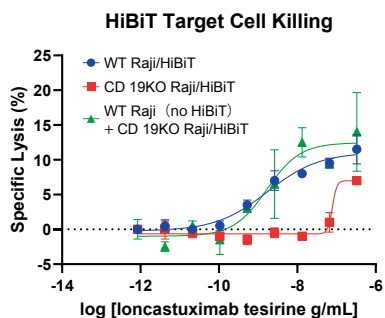
### HiBiT Bystander Killing Assay

ADC は、抗原陽性細胞への直接的な殺傷に加え、細胞内で放出された薬物が周囲の抗原陰性細胞を死滅させる“バイスタンダー効果”という重要な作用機序を持ちます。これは、全ての細胞が標的抗原を発現しているわけではない不均一な腫瘍微小環境において、撃ち漏らしによる治療抵抗性や再発を防ぐ上で極めて重要です。プロメガの HiBiT Bystander Killing Assay は、細胞死に伴い放出される発光性のタグ (HiBiT) を利用した非溶解型のアッセイです。混合培養という微小環境を模した系においても、特定の細胞集団の死のみを正確に捉え定量化できます。本手法により直接的殺傷、バイスタンダー殺傷、オフターゲット毒性を明確に区別でき、ADC 設計の最適化を強力に支援します。



#### HiBiT 発現細胞を利用したバイスタンダーキリングの測定原理

- ADC が、標的抗原 (+) および HiBiT (+) 細胞に結合し、ペイロードを放出 (本来の殺傷効果)
- 標的抗原 (-) HiBiT (+) 細胞の場合は細胞を殺さない (オフターゲット効果のみ)
- 標的抗原 (+) および HiBiT (-) 細胞と標的抗原 (-) および HiBiT (+) 細胞でターゲットセルキリング (バイスタンダー効果)



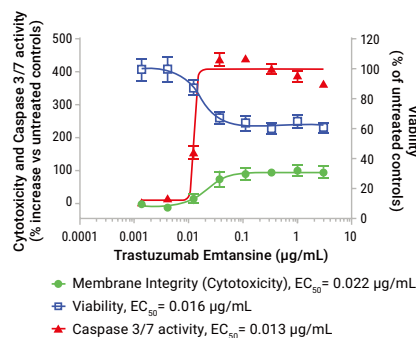
#### ロンカスタキシマブ・テシリンによるバイスタンダーキリングの検出

Raji 細胞に抗 CD19 ADC である loncastuximab tesirine を段階希釈して加え、96 時間インキュベートした後、Bio-Glo-NB TCK 検出試薬で細胞外 HiBiT を検出した。青色: Raji/HiBiT 細胞の直接溶解を示し (EC50 = 1.7 ng/mL)。赤色: 高濃度における CD19 ノックアウト (CD19KO) Raji/HiBiT 細胞のオフターゲット溶解を示した (EC50 = 78 ng/mL)。緑色: HiBiT を発現しない Raji 細胞と、CD19KO Raji/HiBiT 細胞を 8:1 の割合で混合した条件で、バイスタンダー効果による溶解が観察された (EC50 = 1.7 ng/mL)。

#### 細胞マーカー測定 (細胞生存・細胞死アッセイ)

高感度で簡便なプロメガの細胞生存率およびアポトーシスアッセイなら ADC ペイロードがターゲット細胞の生存および細胞死メカニズムに与える影響をエンドポイントまたはリアルタイムで把握することができます。

また、免疫原性細胞死 (ICD) は、免疫系が腫瘍細胞を認識・攻撃する能力を高めることで、ADC の治療効果を補完します。ADC は ICD を誘導し、がん抗原の放出や免疫細胞の腫瘍部位への動員を引き起こします。このプロセスは、ADC による直接的な細胞殺傷効果を強化するだけでなく、腫瘍に対する持続的な免疫応答の促進にもつながるため、ADC 療法の有効性向上における重要なメカニズムとされています。当社の専用アッセイを用いれば、ADC 研究における ICD の重要な役割を詳細に解析できます。



trastuzumab emtansine による SKBR3 細胞への細胞毒性効果のマルチプレックスアッセイ CellTox Green™ dye を用いて細胞膜の完全性 (緑) を測定し、CellTiter-Fluor™ により生細胞プロテアーゼ活性を介した細胞生存率 (青) を評価しました。さらに Caspase-Glo® 3/7 試薬により、高用量でカスパーゼ活性の増加 (赤) が観測され、膜の損傷および細胞生存率の低下が認められた。

細胞状態	形式	検出系	3D 対応	測定対象	製品名
細胞生存性	EP	発光	○	細胞内 ATP	CellTiter-Glo® Assay
	EP	蛍光	—	生プロテアーゼ	CellTiter-Fluor™ Assay
ネクローシス	RT	発光	○	還元能	RealTime-Glo™ MT
	RT	蛍光	○	DNA 漏出	CellTox Green™ Assay
アポトーシス	EP	発光	○	カスパーゼ	Caspase-Glo® 3/7 Assay
	RT	発光	○	ホスファチジルセリン	RealTime-Glo™ Annexin V
免疫原性細胞死	RT	発光	—	細胞外 ATP	RealTime-Glo™ Extracellular ATP Assay
	EP	発光	○	HMGB1	Lumit® HMGB1 Immunoassay

RT: リアルタイムアッセイ (経時測定が可能)。EP: エンドポイントアッセイ。

製品の詳細・価格等については最終ページの QR コードの資料をご覧ください。弊社テクニカルサービスまでお問い合わせください。

※オリジナルのバイオアッセイの構築については弊社 TRS (カスタムアッセイ開発サービス) がご利用いただけます。

# 本ガイド掲載製品に関する詳細

製品ラインナップならびに詳細情報については以下を参照ください。

製品リスト

Product List (GE921)



製品詳細資料

Biologics FlipBook  
(FB005)



製品使用文献

Applications for Immunotherapy Drug  
Development (FL652)



## 関連製品

### 抗体医薬の構造解析 (分離および 質量分析)

プロメガは最高品質の質量分析用プロテアーゼをはじめ 抗体医薬開発に最適な抗体捕捉ビーズや抗体定量システムを提供しています。

目的	製品名	特長
抗体捕捉ビーズ	Magne® Protein A and Magne® Protein G Beads	高い特異性と結合容量を持つ磁気ビーズで、多様なサンプルから抗体を高純度・高収率で精製でき、自動化にも対応。迅速な作業と抗体ロスの最小化を実現し、研究開発を効率化。
	Trypsin Platinum, Mass Spectrometry Grade	自己分解を抑制した高純度トリプシン。高い特異性で、信頼性の高いデータを提供。バイオ医薬品の正確な特性解析に最適。
	Trypsin/Lys-C Mix, Mass Spec Grade	質量分析用のタンパク質消化酵素。トリプシンと Lys-C の併用により切断効率が増え、見逃しを低減。ペプチド同定数と定量性、再現性の向上により、高品質なデータを取得。
	Rapid Digestion-Trypsin and Rapid Digestion-Trypsin/Lys C	本製品はタンパク質消化時間を最短 60 分に短縮するキット。数時間かかっていた作業を大幅に短縮し、解析のスループットを向上。簡便な操作で再現性の高いデータが得られ、研究開発を効率化。
	AccuMap® Low pH Protein Digestion Kit	低 pH でのタンパク質分解により、分析サンプル調製時の脱アミド化やジスルフィド結合のスクランブルなどの人為的修飾を抑制。バイオ医薬品の品質評価におけるデータの信頼性を向上。
質量分析用酵素ほか	ProteaseMAX™ Surfactant, Trypsin Enhancer	タンパク質分解を促進する界面活性剤。酵素のアクセスを向上させ、1 時間で消化完了。自己分解性なので除去不要。質量分析の感度と網羅性を高め、時間と手間を大幅に削減。
	<b>NEW</b> Arg-C Ultra	アルギニン C 末端を超特異的に切断する酵素。非特異的分解を抑制し、信頼性の高いデータを提供。2 時間で迅速に消化、幅広い pH や尿素に対応し、解析の網羅性と効率を向上。
	ProAlalanase	プロリン/アラニンを超特異的に切断する新規プロテアーゼで、トリプシンを補充して配列網羅性を高め、翻訳後修飾の解析にも有用。酸性 pH で活性があり、ジスルフィド結合解析にも有用。
	IdeS Protease and IdeZ Protease	IgG を特異的に切断する酵素で、30 分で迅速に高純度の抗体フラグメントを生成 (Fc フラグメント単離)。抗体医薬品の簡便・正確な特性解析が可能。
	PNase F (組換えグリコシダーゼ)	N 型糖鎖を特異的に切断する組換え型酵素。多様な糖鎖に対応し、タンパク質の糖鎖修飾解析に有用で、IdeS プロテアーゼとの併用で抗体品質評価の精度が向上。

IgG 抗体の高感度定量が可能な Lumit® システムについては別途お問合わせください。

## 抗体医薬開発サポートプログラム ※ プロメガクラブへの入会 (無償) が必要です。

### IAP (イノベーションアクセスプログラム) :

治療用抗体の発見、免疫腫瘍学、CAR-T 細胞療法などの分野において先駆的なご研究に取り組まれている研究者の方々とのコラボレーションを求めています。アカデミックおよび非営利団体の研究者は、このプログラムを通じて製薬企業が使用しているものと同じ「ゴールドスタンダード」のツールに、アカデミック専用価格でアクセスできます。バイオベンチャーの方も本 IAP プログラムの対象です。弊社 製薬 & バイオテクノロジーセールス担当までお問合わせください (E-mail : PKKPharm@promega.com)

詳しくは  
こちら▶



### RentaMAX : バイオアッセイに最適な 発光プレートリーダーを無償でレンタル!

RentaMAX は、弊社製品をご購入いただければ、プロメガのルミノメーターを無償で一定期間お貸出しするプログラムです。初めてバイオアッセイを行う方にも試薬/機器の両面からのサポート・コンサルティングも行います。



日本語 Web site : [www.promega.co.jp](http://www.promega.co.jp)

テクニカルサービス • Tel. 03-3669-7980 • E-mail : [prometec@jp.promega.com](mailto:prometec@jp.promega.com)

# プロメガ株式会社

本社 〒103-0001  
東京都中央区日本橋小伝馬町1-5 PMO日本橋江戸通ビル 7F  
Tel. 03-3669-7981

大阪事務所 〒541-0051  
大阪市中央区備後町4-1-3 御堂筋三井ビルディング  
Tel. 06-6202-4581

※製品の仕様、価格については 2026 年 5 月現在のものであり予告なしに変更することがあります。

販売店