



## Inhibition test inter proteins using iMSPR-ProX & COOH-Au chip (2D)

Protein-Protein interaction은 신호전달의 의미로서 생체 내 매우 중요한 메커니즘입니다. 이를 통해 면역체계가 작동하고, 이러한 이유로 질병치료의 핵심이 됩니다. 인위적으로 신호전달을 막기 위해 주로 small compound를 의약품으로 사용하는 경우가 많습니다. 특정 단백질과 결합하는 small compound를 우선 발굴한 후 그 후보물질에 대한 inhibition을 평가하는 것은 제약 개발 초기 단계의 기본적인 작업입니다. iMSPR-ProX와 COOH-Au chip을 통해 아래와 같은 방식으로 발굴한 small compound의 inhibition 효과를 증명할 수 있습니다.

### Materials

- Instrument: iMSPR-ProX
- Sensor chip: COOH-Au chip
- Immobilization Reagent: Amine coupling kit (ACK50)
- Immobilization buffer: Acetate buffer pH5.0 (AB50)
- Regeneration buffer: 10 mM HCl
- Ligand: Protein 1
- Analyte: Protein 2
- Inhibitor: small compounds

### Procedure

#### Ligand Immobilization

- ① Baseline: Inlet tubing으로 양 채널 (Ligand channel, Reference channel)에 유속 30 ul/min 조건으로 5분이상 1xHBST를 흘려

주어 안정적인 baseline을 잡는다.

- ② 양 채널에 Activation buffer (175 ul)와 EDC 용액 (175 ul)을 1:1로 혼합하여 30 ul/min의 유속으로 5분동안 주입한 후 1xHBST로 5분동안 washing 한다.
- ③ Protein 1 50 ug/ml (in Acetate buffer pH5.0) 300 ul를 준비하여 Ligand channel에만 10 ul/min으로 20분 주입한 후 1xHBST로 5분 동안 washing 한다.
- ④ Quenching buffer를 200 ul 준비하여 양 채널에 30ul/min으로 2분동안 흘려준 후 1xHBST로 5분동안 washing 한다.
- ⑤ 양 채널에 10 mM HCl을 200 ul 준비하여 30 ul/min으로 2분동안 흘려준 후 1xHBST로 30분이상 washing하여 안정화시킨다.

#### Analyte binding

- ① 1xHBST에 Protein 2를 희석하여 3.91nM, 7.81nM, 15.6nM, 31.3nM, 62.5nM, 125nM, 250nM, 0nM 농도로 각 200 ul씩 준비한다.
- ② 3.91nM Protein 2를 30 ul/min으로 3분 주입한 후 1xHBST로 5분동안 washing 한다.
- ③ 10mM HCl 용액을 30 ul/min으로 2분 주입하여 regeneration한 후, 1xHBST로 6분 동안 안정화시킨다.
- ④ 농도별로 ②-③을 반복수행

#### Inhibition

- ① 1xHBST(1% DMSO)에 희석한 Protein 2 (150 nM) 75 ul와 small compound 200, 100, 50, 0 uM 75 ul를 각각 섞는다. 이 때 DMSO 농도는 1%가 유지되도록 한다. 각 샘플을 섞은 후 30분 이상 incubation한다.
- ② Protein 2 (75 nM)+ small compound 100 uM를 30 ul/min으로 3분 주입한 후 1xHBST로 5분동안 washing 한다.

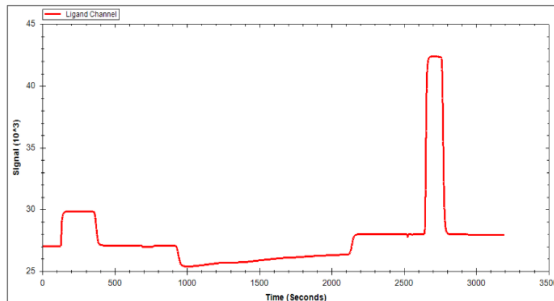
- ③ Injection valve에 10 mM HCl 용액을 10 ul/min으로 3분 주입하여 regeneration 후, 1xHBST로 6분동안 안정화시킨다.
- ④ 농도 별로 ②-③을 반복수행



## Results

## Results summary

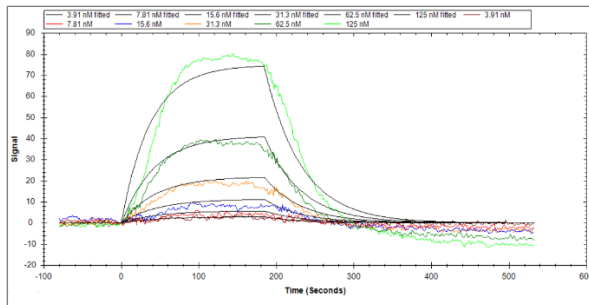
### R1. Ligand 고정화



Protein 1과 Protein 2 결합의 확인 및 kinetic evaluation을 통해 inhibition 분석에 필요한 Protein 2의 적절한 농도를 결정하였습니다.

Small compound의 농도가 높을수록 Protein1에 결합하는 Protein 2의 신호가 낮아짐을 확인할 수 있었습니다. 특히 100 uM의 Small compounds에서는 거의 대부분의 Protein-Protein 결합이 억제된 것을 관찰할 수 있습니다.

### R2. Protein 1 and 2 binding Curve fitting: one to one binding model



### T1. Kinetic Evaluation

Contents	Value
Immobilization Level	1456.9 RU
B <sub>max</sub>	356 RU
K <sub>a</sub> (Association rate, 1/M*s)	4.42 x 10 <sup>4</sup>
K <sub>d</sub> (Dissociation rate, 1/s)	2.11 x 10 <sup>-2</sup>
K <sub>D</sub> (Affinity)	4.77 x10 <sup>-7</sup> M
Chi <sup>2</sup>	16.84

### R3. Inhibition

