技術論文

表面プラズモン共鳴センサーを用いる薬物スクリーニングと 初期薬物動態の同時解析

稲川 淳一^{®*}, 森本 香織^{*}

Simultaneous analysis of drug efficacy and early absorption, distribution,
metabolism and excretion characterization using
surface plasmon resonance sensor

Junichi INAGAWA and Kaori MORIMOTO^{*}

^{*}Biacore KK, Koyo Bldg. 5F, 2-9-5, Shibakouen, Minato-ku, Tokyo 105-0011

(Received 28 January 2002, Accepted 24 April 2002)

A high resolution optical biosensor assay for screening of low molecular weight compounds using Biacore[®] S51 has been examined. Carbonic anhydrase(CA) and human serum albumin(HSA) were immobilized on the sensor surfaces respectively and 34 chemical compounds involved 10 of inhibitors and 24 of non-interacting reference compounds were injected directly to each sensor surface simultaneously. Sulfanilamide, CBSA (carboxybenzenesulfonamide), furosemide, azosulfamide, acetazolamide, dichlorphenamide, chlorothiazide, hydrochlorothiazide, methazolamide and indapamide were bound to immobilized CA but reference compounds were not bound at all. All compounds were bound to immobilized HSA at variable binding levels. This analysis was based on single concentration association: dissociation analysis, and provided a higher level of data than standard YES/NO analysis, enabling compounds to be prioritized based on their binding profile and stability as well as activity. Kinetics analysis of azosulfamide, furosemide and indapamide were estimated as k_a (association rate constant) and k_d (dissociation rate constant) from a series of sensorgram at different concentrations of inhibitors. The method is expected to be generally applicable to secondary screening and optimization of lead compounds of low molecular weight compound libraries with protein as targets.

Keywords : simultaneous analysis; early drug efficiency; drug screening; SPR sensor.

1 緒 論

ゲノミクス (genomics) やプロテオミクス (proteomics) の急速な発展により, 創薬開発の手法は近年急速に変化を遂げている. ターゲット分子を選択後, ランダムスクリーニングによるリード化合物の検索 (hit selection, 一次スクリーニング) 技術が発達してきている. ランダムスクリーニングにおいては, SPA (scintillation proximity assay) 法, FRET (fluorescence resonance energy

transfer) 法などがあるが, リード化合物の最適化 (optimization, 二次スクリーニング) による候補化合物の選出については, 理想的なアプローチの方法が必ずしも確立されていない. また, 単なる *in vitro* での活性の測定にとどまらず, 生体内動態プロファイル (血清タンパク質への吸着性や消化管からの吸収性等) のよい化合物を選択する手法は, リード化合物の最適化に極めて有効な方法となる. 薬物の血清タンパク質結合性は, 体内分布に影響を与え, 代謝排斥にも影響を及ぼすことが知られている. リード化合物最適化の検討の際, 化合物の体内動態を同時に検討できる手法があれば, 医薬品開発は確実に高速化することが予

^{*} ビアコア(株)アプリケーション開発部: 105-0011 東京都港区芝公園 2-9-5 向陽ビル5階

想される。また、この段階において、ターゲットタンパク質への結合性を、単なる結合の強さだけでなく、反応を速度論的に評価できれば、リード化合物の絞り込みにより重要な情報をもたらすものと考えられる。リード化合物とターゲットタンパク質との複合体の安定性（解離速度）を知ることにより、薬効の持続性や理想的な血中薬物濃度を推察することも可能である。

生体分子の相互作用をリアルタイムで解析することを目的に、Biacore 社（スウェーデン）で開発された Biacore は、高感度である表面プラズモン共鳴（SPR）技術を採用し、広く医学、薬学、農学、生化学分野に利用され、論文数も 3000 報以上を数える¹⁾。Biacore S51 は、リード化合物の最適化を高効率で行うことを目的に開発された新しい装置である。ターゲットタンパク質に対するリード化合物（低分子化合物）の結合をリアルタイムに測定でき、他の Biacore 装置と同様に、反応速度論的解析も可能である²⁾³⁾。また、サンプルの処理能も向上し、1 日の分析で約 384 サンプルの解析が可能である。また、同一セルに 2 種類のターゲットタンパク質を固定化することができ、同時に 2 種類のターゲットタンパク質と低分子化合物との相互作用を検討することが可能である。

ヒト炭酸脱水素酵素（carbonic anhydrase, CA）は、生体内に広く分布する分子量約 30000 の酵素で、じん（腎）臓では近位尿細管に多く、尿細管での電解質輸送に重要な役割を有している。CA 阻害剤は、水素イオン供給を抑制することで、近位尿細管の Na-H 交換系を抑制して利尿作用を発揮する。現在までに、CA 阻害剤は、利尿剤や緑内障治療薬などに広く利用されている。しかし、水素イオンが尿中に移行しないために、尿はアルカリ性、体液は酸性となり、代謝性アシドーシスになりやすく、また腎障害、低カリウム血症や尿中カルシウム排泄増加のため、尿路結石や骨軟化症への誘発などが知られており、副腎皮質ホルモン、抗てんかん薬などとの併用は注意を要することが指摘されている。

通常薬物は血清タンパク質と結合（相互作用）し、この結合が薬物の薬効に大きく影響することが知られている。また、この結合は可逆的で、容易にはかの薬物と置換されるために、ほかの薬物との併用による血清タンパク質への結合性が、薬効や副作用に大きく影響を与える。著者らは、Biacore S51 を用いる CA 阻害薬物のスクリーニングをモデル実験として、各薬物の CA に対する結合性と同時に、薬物動態上重要な血清タンパク質である、血清アルブミン（human serum albumin, HSA）への結合性についても分析した。

Table 1 Using drugs

Drugs	Molecular weight	Maker (code)
Digitoxin	765	Sigma (D5878)
Warfarin	308	Simga (A2250)
Phenytoin	252	Sigma (P0931)
Naproxen	230	Sigma (N1275)
Sufanilamide	172	Sigma (S9251)
Carboxybenzenesulfonamide (CBSA)	201	Sigma (C1180-4)
Furosemide	331	Sigma (F4381)
Indoprofen	281	Sigma (I3132)
Naringin	581	Sigma (N1376)
Azosulfamide	543	Sigma (A2759)
Ibuprofen	206	Sigma (I4883)
Lidocain	234	Sigma (L7757)
Nicotinic acid	123	Sigma (N4126)
Sufadimethoxins	310	Sigma (S7007)
Acetazolamide	222	Sigma (A6011)
Dichlorphenamide	305	Sigma (D3268)
Chlorothiazide	296	Sigma (C4911)
5-Chloro-2-fluorotoluene	145	Fluka (440094)
Hydrochlorothiazide	298	Sigma (H4759)
Methazolamide	236	Sigma (M4156)
Diazepam	285	Sigma (D0899)
Quinine	324	Sigma (Q1878)
2-Aminobenzenesulfonamide	172	Ald (245887)
Hydralazine	197	Sigma (H1753)
Kanamycin	583	Sigma (K4000)
Angiotensin I-converting enzyme inactivate	379	Sigma (A5457)
Salicylic acid	138	Sigma (S5922)
Salbutamol	239	Sigma (S8260)
Foroxymithine	576	Wako (337-41901)
Pyrimethamine	249	Sigma (P7771)
Nepsilon-Trifluoroacetyl-Lys-Pro	339	Sigma (T7025)
Rifampicine	823	Sigma (R3501)
Enalapril maleate	493	Sigma (E6888)
Indapamide	366	Sigma (I1887)

2 実 験

2・1 Biacore システム

Biacore S51 は Biacore AB（スウェーデン）製を用いた。

2・2 試 薬

CA (C3640) 及び HSA (A3782) はシグマ製を購入した。CA は 2 mg/ml の濃度で 0.15 M NaCl, 0.5 mM ZnCl₂ 溶液に溶解し、HSA は 1 mg/ml の濃度で 0.15 M NaCl 溶液に溶解し、冷蔵保存した。

各薬物はシグマ-アルドリッチ製、フルカ製、和光純薬製を使用した (Table 1)。各薬物は、10 mM の濃度でジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、4℃ で保存後使用した。その他の一般試薬はナカライテスク製を使用した。アミンカップリングキット (BR-1000-50) は Biacore AB 製を使用した。

Fig. 1 Flowcell

Fig. 2 Sensorgram

2・3 ターゲットタンパク質のセンサーチップへの固定化

センサーチップ CM5 (シリーズ S, BR-1004-35) は, Biacore AB 製を用いた. 固定化用緩衝液としてリン酸緩衝溶液 (PBS) (10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 150 mM NaCl, pH 7.4) を使用した. 1 枚のセンサーチップには, 2 個のフローセルが存在し, 一つのフローセルには 3 個のスポットがある (Fig. 1). スポット 1 及び 2 にターゲットタンパク質を固定化し, スポット R はレファレンス (コントロール) セルとして使用した. センサーチップ表面は直鎖のカルボキシルメチル (CM) デキストランが結合しており, このカルボキシル基を介してターゲットタンパク質を固定化する.

CA 及び HSA はアミンカップリング法にて固定化を行った. 設定温度は 25°C で行った. センサー表面を, アミンカップリングキットの 0.4 M エチル-*N*'-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド (EDC) と 0.1 M *N*-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) の混合液を, 流量 $25\ \mu\text{l}/\text{min}$ で 10 分間添加し, NHS 活性化した. 更に, 流量 $10\ \mu\text{l}/\text{min}$ で CA 溶液 ($100\ \mu\text{g}/\text{ml}$) を 12 分間あるいは HSA 溶液 ($25\ \mu\text{g}/\text{ml}$) を 7 分間添加し, タンパク質を CM デキストランに固定化した. 各タンパク質は 10 mM 酢酸緩衝液, pH 5 に希釈した. 更に, アミンカップリングキットの 1 M エタノールアミン-塩酸 (pH 8.5) を流量 $40\ \mu\text{l}/\text{min}$ で 7 分間添加し, 残存活性型 NHS 基の不活化を行った. この方法による固定化量はそれぞれ CA では 3,498 RU, HSA では 9,895 RU, であった. RU は Biacore のレスポンス単位で, $1\ \text{RU} = 1\ \text{pg}/\text{mm}^2$ の質量変化を表す.

2・4 CA 及び HSA と薬物との相互作用の特異的結合検討

固定化したセンサーチップを用いて, これに各薬物を添加し, はじめのベースラインと一定時間後のレスポンスの差を結合量 (binding level) として算出した. また, 薬物添加が終了すると, 緩衝液がセンサー表面を流れ, そこか

ら解離が観測されるが, 一定時間後のレスポンス (binding stability) をとり, 結合安定性を観察した (Fig. 2).

フローセルのスポット 1 に CA を固定化し, スポット 2 に HSA を固定化したセンサーチップを用いて, 各薬物 (Table 1) を添加し相互作用を観察した. ランニング緩衝液は, 5% DMSO を含む PBS を用いた. 各薬物は, 10 mM 濃度の保存液をランニング緩衝液で $30\ \mu\text{M}$ に希釈して用いた. すべてのサンプルについて, 2 連で実験を行った. DMSO による溶液効果補正は, 4.5% から 5.8% 濃度の DMSO 緩衝液標準を用いて行った⁴⁾. Biacore S51 では, 溶液効果補正は全自動で行った. 流量 $30\ \mu\text{l}/\text{min}$ で $30\ \mu\text{M}$ の薬物を 60 秒間添加し, 解離を 120 秒間とって, 結合量及びレスポンス量を測定した. 解離終了後, 90 秒間ベースラインの安定性を調べ, 更にランニング緩衝液を添加し, システム内への薬物のキャリーオーバーを調べた. また, 注入終了後, フローセルを除くニードル, チューブ及び流路系を 50% DMSO 溶液で洗浄した. 今回使用した薬物は, 解離測定中に速やかにベースラインまで戻るため, 再生操作は必要でなかった. Biacore S51 ではこれらの操作を自動で行い, Biacore S51 制御ソフトウェア ver.1.0 のウィザード機能を使用し行った.

分析終了後, Biacore S51 評価ソフトウェア ver.1.0 を用いて結合量を表示した.

2・5 CA 結合性に関する反応速度論的解析

2・4 において, CA に対する結合性が確認されたアズスルファミド, フロセミド及びインダパミドについて, 濃度を変えて測定し, 得られたセンサーグラムから速度論的分析を行い, 各反応速度定数 (k_a 及び k_d 値) を計算した.

CA を固定化したセンサーチップに, 各薬物を 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 及び $0.156\ \mu\text{M}$ に希釈し, 流量 $90\ \mu\text{l}/\text{min}$ で 60 秒間添加した. $2.5\ \mu\text{M}$ のサンプルは 2 連で実験した. 更に解離を 60 秒間測定後, 90 秒間ベースラインの安定性を調べ, 更にランニング緩衝液を添加し,

Fig. 3 Binding level of each drugs to immobilized CA and HSA
(top) binding level to CA ($100 \times \text{RU/MW}$)
(bottom) binding level to HSA ($100 \times \text{RU/MW}$)

システム内への薬物のキャリーオーバーを調べた。また、注入終了後、フローセルを除くニードル、チューブあるいは流路系を50% DMSO 溶液で洗浄した。再生操作は不要なため行っていない。これらは、Biacore S51 制御ソフトウェア ver.1.0 のウィザード機能を使用し行った。

2.6 CA 結合性繰り返し実験による再現性試験

CA に対して結合性が確認されたフロセミド、インダパミド、メタゾールアミド、ヒドロクロロチアジドと結合が見られなかったワーファリン、ナプロキセンを使用し、それぞれの薬物を12回分析し、再現性を調べた。薬物濃度、流量等の実験条件は、2.4に準じた。

3 結果及び考察

3.1 CA 及び HSA と薬物との相互作用の同時解析

センサーチップに固定化した CA と HSA に対する各薬物の結合量 (Fig. 2) を Fig. 3 に示した。レスポンスは得られた結合量を各薬物の分子量で割り100をかけた値として表示した。各薬物は2連で分析し双方を表示した。CA に対して有意に結合を示した薬物は、スルファニルアミド、CBSA、フロセミド、アゾスルファミド、アセタゾールアミド、ジクロルフェンアミド、クロロチアジド、ヒドロクロロチアジド、メタゾールアミド及びインダパミドであった (Fig. 3, 上)。これらの薬物は、CA に対する阻害作用が知られている薬物である。また、阻害効果が知られていないほかの薬物は、結合性が全く確認されなかった。薬物スクリーニングの際、擬陽性は大きな問題となる

が、結合すべきものが結合するだけでなく、結合しないものは結合しない精度の高さは非常に重要である。結合が見られた10種類の薬物の中で、特にアゾスルファミドとインダパミドの結合量が大きかった。また、HSAに対する結合性の同時測定結果をFig. 3, 下に示した。HSAに対しては、各薬物すべてがなんらかの結合性が見られた。結合量の多いものとしての指標に用いられるワーファリンを基準にして、これより結合性の高い薬物は、ナプロキセン、スルファニルアミド、インドプロフェン、イブプロフェン、ニコチン酸、5-クロロ-2-フルオロトルエン及びサリチル酸であった。CAに結合する薬物のHSAに対する結合性をTable 2に示す。アゾスルファミドはCAに極めて高い結合性を示すが、HSAに対する結合性はさほど高くなかった。一方、スルファニルアミドはCAに対して結合性はさほど強くないが、HSAに対しては高い結合性を示

Table 2 Binding level of drugs to immobilized CA and HAS

Drugs	CA (100 × RU/MW)	HSA (100 × RU/MW)
Sulfanilamide	3.9	41.6
CBSA	3.3	35.0
Furosemide	7.0	30.9
Azosulfamide	14.3	17.9
Acetazolamide	4.8	31.0
Dichlorphenamide	5.9	23.8
Chlorothiazide	3.6	24.3
Hydrochlorothiazide	5.3	24.3
Methazolamide	5.1	27.9
Indapamide	8.6	19.4

した。HSA 結合性は、投与後の血清中遊離薬物濃度に影響を与え、更に併用薬物により薬物動態に影響与える重要な要因である。Biacore で測定された血清タンパク質への薬物の結合性は、限外濾過法などのほかの分析系を用いて測定されたタンパク質結合率と極めて相関性が高いことが報告されている⁴⁾。また、固定化するターゲット分子を細胞膜成分（ホスファチジルコリン等から作成したリポソーム等）を使用し、細胞膜成分への薬物の取り込みを測定することで、吸収性を同時に測定する試みも行われている⁵⁾。この場合にも、Biacore による結果と、ほかの *in vitro* の方法により測定された結果との間に、高い相関が得られている。スクリーニングの段階から、薬物動態研究の検討を取り入れて、リード化合物の最適化を行うことは、効率の良い方法であると思われる。

3・2 Binding stability

CA に対する各薬物の結合量と一定時間解離後のレスポンスのプロットをFig. 4に示す。このグラフは、X 軸の右にいくほど結合力が大きく、Y 軸の上にいくほど結合安定性が高いことを示している。アゾスルファミドは結合力も高いが、その結合は極めて安定であることが分かる。一方、インダパミドは比較的結合量が高いが、その複合体は極めて不安定で速やかに外れてしまうことが分かった。各薬物によってそれぞれに結合力と結合安定性が異なることが明らかである。結合安定性が低い薬物の場合には、有効に薬効を維持するために常に高い血中薬物濃度を維持する必要があり、結合安定性が高い場合には、血中の薬物が代謝され濃度が減少した場合にも、薬効が比較的持続する可

Fig. 4 Plot of binding levels vs binding stabilities of drugs to immobilized CA

Fig. 5 Sensorgrams of various concentrations of azosulfamide, furosemide and indapamide
20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 and 0.156 μM .
Sample of 2.5 μM was duplication.

能性がある。このように、単なる結合性の比較だけでなく、結合の安定性を見ることにより、薬物の選別や評価に有効な情報を得ることが可能であると思われた⁶⁾⁷⁾。

3.3 CA に対する薬物の結合性の速度論的解析

固定化した CA に対して、アゾスルファミド、フロセミド及びインダパミドを各濃度で添加し、得られたデータを Biacore S51 評価ソフトウェアを用いて速度論的解析を行った (Fig. 5 及び Table 3)。薬物添加終了後の解離の仕方から判断して、アゾスルファミドは CA との結合複合体はゆっくりと解離する反応であり (安定性が高い)、フロセミドはより速く解離し、更にインダパミドは極めて速く解離していることが判断された。速度論的解析の結果、結合の強さを表す解離定数 (K_D) は、アゾスルファミドが最も低く (結合が強く)、インダパミドの 1.2 倍、フロセミドの 4.3 倍であった。また、解離速度定数 (k_d) は、アゾスルファミドが最も小さく、解離しにくいことが示され

Table 3 Kinetic analysis of azosulfamide, furosemide and indapamide to immobilized CA

Drugs	結合速度定数 (k_a)	解離速度定数 (k_d)	解離定数 (K_D)
	($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	(s^{-1})	(M)
Azosulfamide	5.3×10^4	9.0×10^{-3}	1.7×10^{-7}
Furosemide	4.9×10^4	3.6×10^{-2}	7.3×10^{-7}
Indapamide	2.5×10^5	1.0×10^{-1}	4.2×10^{-7}

た。また、 K_D の比較的低かった (結合が比較的強かった) インダパミドは、 k_d が極めて高く (解離が速く)、わずかに $1.0 \times 10^{-1} (\text{s}^{-1})$ であった。これは、結合複合体は 1 秒間にその 10% を解離してしまう極めて不安定な複合体であることを示している。一方、結合速度定数は、インダパミドが最も高く、速やかに複合体を形成することを示している。つまり、アゾスルファミドは 3 者の中で比較的速い結合とゆっくりとした解離によって高い結合力を示しているのに対し、インダパミドは非常に速い結合と解離を繰り返す反応で、フロセミドはその中間の性質を持つ反応であることが分かる。このように、反応を速度論的解析を行ったことによって、その反応の性質をより細かく見ることが可能であった。

3.4 CA 結合性繰り返し実験による再現性試験

フロセミド、インダパミド、メタゾールアミド、ヒドロクロロチアジド、ワーファリン、ナプロキセンを使用し、それぞれの薬物を 12 回分析を行った結果を Fig. 6 に示した。CA に対する結合量は、フロセミドは $33.5 \text{ RU} \pm 0.6$ (RSD = 1.8%)、インダパミドは $40.6 \text{ RU} \pm 0.6$ (RSD = 3.7%)、メタゾールアミドは $24.6 \text{ RU} \pm 0.4$ (RSD = 1.5%)、更にヒドロクロロチアジドは $27.6 \text{ RU} \pm 0.4$ (RSD = 1.5%) と非常に高い再現性が得られた。全薬物すべてを分析 (72 回分析) しても、固定化した CA の活性は全く低下しなかった。

4 結 言

医薬品の開発において、新薬のリード化合物をいかに速く、そして効率よく絞り込めるかが開発の速度に大きく影響する。今回、CA に対する阻害剤のスクリーニングをモデル実験として、Biacore S51 を用いて、一連の薬物の結合性と HSA に対する結合性の同時解析を行った。Biacore S51 を用いることで、ターゲットタンパク質に対する化合物の結合の Yes/No 分析だけでなく、結合安定性や速度論的各パラメーターによる結合プロフィールに基づいた化合物の優先順位付けが可能であると考えらる。また、これらを行うことによって、類似するアフィニティーが認められた複数の化合物についても、明確な反応性の差を見いだす

Fig. 6 Reproductively test

●: indapamide; —: furosemide; △: hydrochlorothiazide; ■: methazolamide; ○: warfarin; ◆: naproxen

ことができる。更に、血清タンパク質との結合性を同時に解析することにより、化合物についての包括的なキャラクター化が可能となり、高品質なリード化合物の選択に大きく貢献することが考えられる。

文 献

- 1) U. Jonsson, L. Fagestram, B. Ivarsson, B. Johnsson, R. Karlsson, K. Lundh, S. Lofas, B. Persson, H. Roos, I. Ronnberg, S. Sjolander, E. Stenberg, R. Stahlberg, S. Urbaniczky, H. Ostlin, M. Malmqvist: *Biotechniques*, **11**, 620 (1991).
- 2) U. Jonsson, M. Malmqvist: *Adv. Biosens.*, **2**, 291

(1992).

- 3) A. Szabo, L. Stolz: *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **5**, 699 (1995).
- 4) A. F. Karlsson, A. Remaeus, H. Roos, K. Andersson, P. Borg, M. Hamalainen, R. Karlsson: *J. Med. Chem.*, **43**, 1986 (2000).
- 5) E. Danelian, A. Karlen, R. Karlsson, S. Winiwarter, A. Hansson, S. Lofas, H. Lennernas, M. D. Hamalainen: *J. Med. Chem.*, **43**, 2083 (2000).
- 6) P. O. Markgren, M. Hamalainen, H. Danielson: *Anal. Biochem.*, **265**, 340 (1998).
- 7) P. O. Markgren, M. Hamalainen, H. Danielson: *Anal. Biochem.*, **279**, 71 (2000).

要 旨

Biacore S51 を用いて、カルボニックアンヒドラーゼ (CA) に対する 34 種類の低分子化合物の結合性を実験したところ、スルファニルアミド、カルボキシベンゼンスルホンアミド (CBSA)、フロセミド、アゾスルファミド、アセタゾールアミド、ジクロロフェンアミド、クロロチアジド、ヒドロクロロチアジド、メタゾールアミド及びインダパミドの 10 種類の阻害剤のみが結合することが確認され、擬陽性や擬陰性は全く見られなかった。また、血清タンパク質であるヒト血清アルブミン (HSA) を固定化したセルを同時に用いることで、HSA への結合性を同時に解析することができた。CA に対する結合安定性は、結合量と一定時間解離後のレスポンスのプロットから評価した。アゾスルファミドは高い結合性と安定的な複合体形成を示し、一方、インダパミドは比較的結合量が高いが、その複合体は極めて不安定で、速やかに外れてしまうことが分かった。センサーチップ上の CA は、72 回の分析でも活性が全く失われなかった。また、アゾスルファミド、フロセミド及びインダパミドの CA に対する速度論的解析では、結合速度定数 (k_a)、解離速度定数 (k_d) 及び解離定数 (K_D) は、アゾスルファミドで 5.3×10^4 ($M^{-1} s^{-1}$)、 9.0×10^{-3} (s^{-1})、 1.7×10^{-7} (M)、フロセミドで 4.9×10^4 ($M^{-1} s^{-1}$)、 3.6×10^{-2} (s^{-1})、 7.3×10^{-7} (M)、インダパミドで 2.5×10^5 ($M^{-1} s^{-1}$)、 1.0×10^{-1} (s^{-1})、 4.2×10^{-7} (M) であった。また、6 種類の薬物を 12 回繰り返し分析した再現

性試験の結果, CA に対する結合性は, フロセミドで $33.5 \text{ RU} \pm 0.6$ ($\text{RSD} = 1.8\%$), インダパミドで $40.6 \text{ RU} \pm 0.6$ ($\text{RSD} = 3.7\%$), メタゾールアミドで $24.6 \text{ RU} \pm 0.4$ ($\text{RSD} = 1.5\%$), 更にヒドロクロロチアジドで, $27.6 \text{ RU} \pm 0.4$ ($\text{RSD} = 1.5\%$) と非常に高い再現性が得られた. 全薬物を分析 (72 回分析) しても, 固定化した CA の活性は全く低下しなかった.