

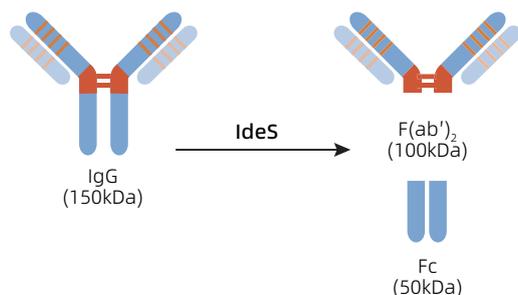
用于 LC/MS 分析的高性能 IgG 消化工具：IdeS 蛋白酶

抗体片段化及特性鉴定的简化方法

IdeS 蛋白酶是免疫球蛋白 G (IgG) 降解酶，是用于分析治疗性抗体、Fc 融合蛋白和抗体药物偶联物 (ADC) 的重要工具。IdeS (源自酿脓链球菌) 是经过工程改造的重组蛋白酶，在大肠杆菌中过表达，能够特异性地在铰链区以下位置切割 IgG 分子，从而生成 F(ab')₂ 和 Fc 片段。

IdeS 的特点及优势：

- **快速简便：**30 分钟内完成消化，产率 >95%，无需优化
- **高度特异性和可重复性：**在铰链区下特定单一位点切割，确保生成 F(ab')₂ 和 Fc 片段
- **高性能：**几乎达到 100% 完全消化
- **通用性强：**有效地消化所有人类 IgG 亚型 (IgG1 至 IgG4)、猴、羊、兔来源的 IgGs 以及人源化和嵌合 IgGs，此外还包括 Fc 融合蛋白。



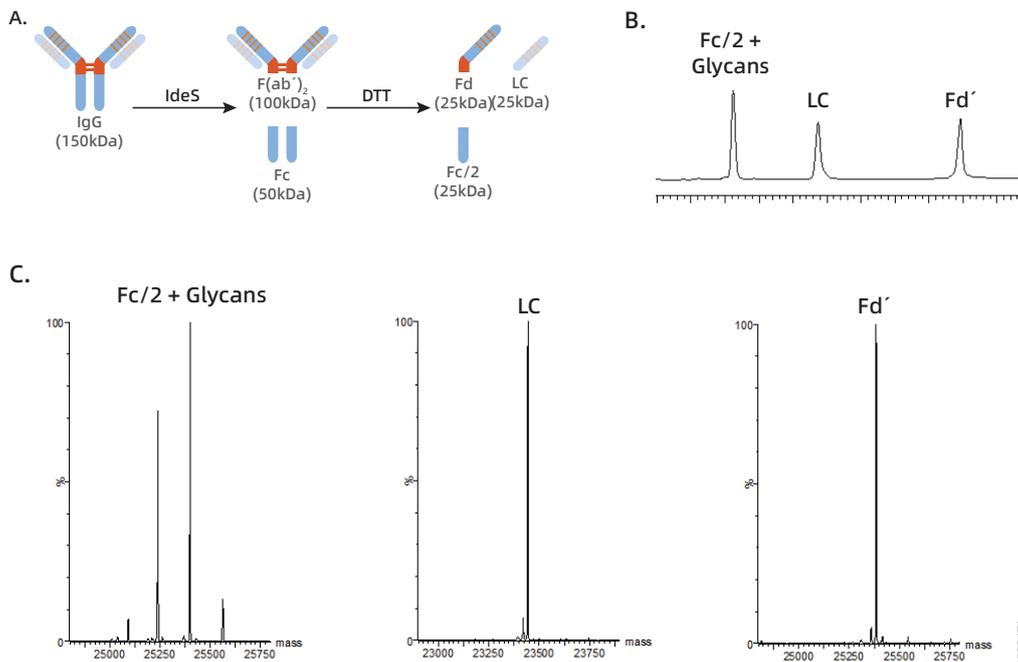
示意图展示了 IdeS 蛋白酶的切割特异性。橙色的半胱氨酸 (C) 表示与相对的重链形成二硫键的位置，而橙色的甘氨酸 (G) 则指示了 IdeS 的切割位点。

IgG1 Hinge sequence: S-C-D-K-T-H-T-C-P-P-C-P-A-P-E-L-L-G-G-P-S-V

↑
IdeS
cleavage site

使用 LC/MS 表征治疗性抗体候选药物

对 IgG 进行 IdeS 酶切处理后再进行还原反应，会生成大约 25kDa 的三个片段 (Fd'、Fc/2 和 LC)，这些片段非常适合通过 LC/MS 进行表征分析。这些较小的片段有利于精确的质谱测定，从而能够检测到翻译后修饰 (PTMs)，包括糖基化形式、C 端赖氨酸变异体、N 端焦谷氨酰胺以及氧化等变化。



使用 IdeS 酶切后再进行还原和变性处理，可以产生更适合通过高效液相色谱 (HPLC) 分离的片段，并且是质谱分析的理想选择。

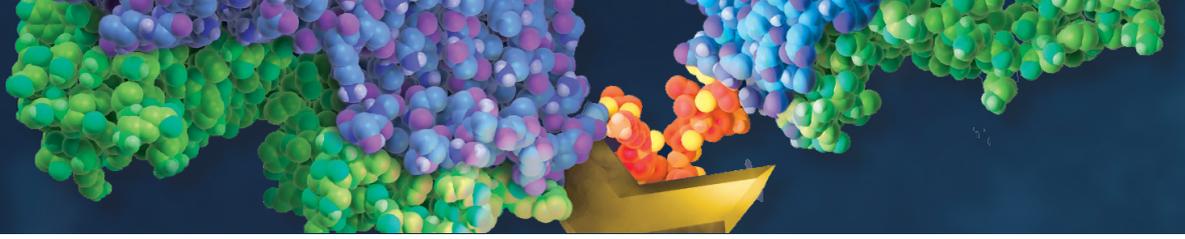
图 A.: 首先用 IdeS 对 IgG 进行酶切处理，随后进行还原步骤，生成三个约 25kDa 的片段。

图 B.: IdeS 酶切产物经 HPLC 分离的示例图。

图 C.: 三个 IdeS 酶切产物的质谱分析结果。

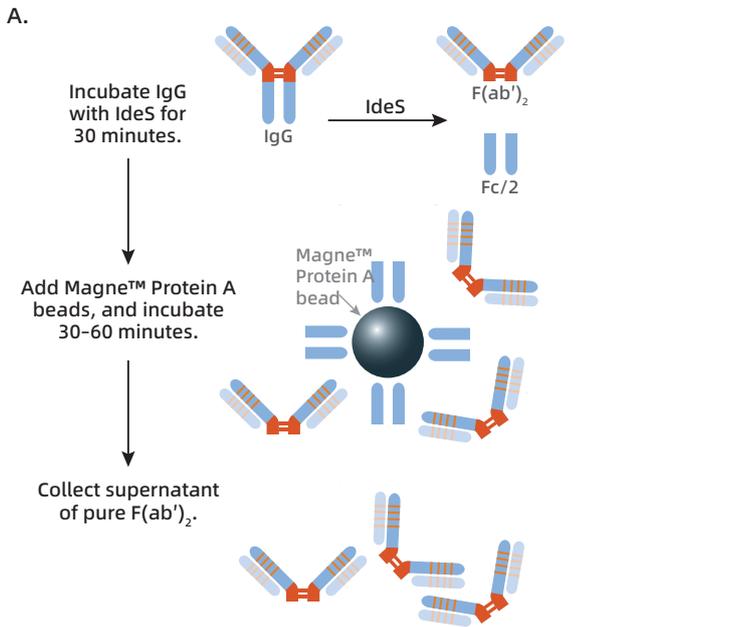
	MWavg (Theoretical) (Da)	MWavg (Observed) (Da)	Error (Da)
Fd'	25383.6	25383.3	-0.3
Fc/2 + G0	25090.2	25091.0	0.8
Fc/2 + G0F	25236.3	25236.9	0.6
Fc/2 + G1F	25398.5	25398.5	0.0
Fc/2 + G2F	25560.6	25561.8	1.2
LC	23443.1	23443.1	0.0

在该过程中，观察到的、经过解卷积处理的片段质量数据表明，抗体片段通过使用 Waters BEH300 C4 色谱柱进行高效液相色谱 (HPLC) 得到了有效分离。进一步地，这些分离出的片段采用 Waters Xevo® G2 QTof 质谱仪进行了精确的质量分析。



生成抗体片段 F(ab')₂ 和 Fc

通过将 IdeS 酶切与 Magne™ Protein A 磁珠相结合，可以实现一种快速方法，用于纯化分离出适用于多种下游应用的 F(ab')₂ 和 / 或 Fc 片段。



使用 IdeS 蛋白酶和 Magne™ Protein A 磁珠制备 F(ab')₂ 片段。

图 A. 利用 IdeS 蛋白酶和 Magne™ Protein A 磁珠制备纯化 F(ab')₂ 片段的简要流程。

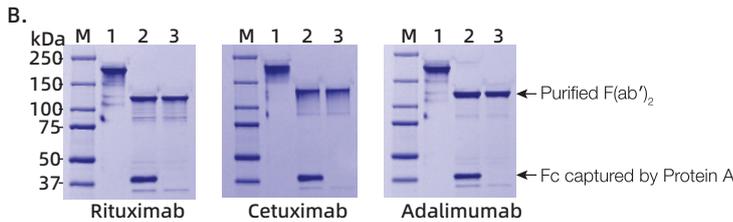
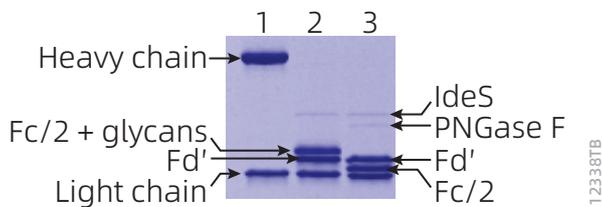


图 B. 泳道 1, 单独的 IgGs; 泳道 2, 使用 IdeS 蛋白酶消化 30 分钟以产生 F(ab')₂ 和 Fc 片段; 泳道 3, 泳道 2 中的消化产物与 Magne™ Protein A 磁珠孵育 30 分钟。Fc 片段被保留在磁性颗粒上, 从而在上清液中留下纯化的 F(ab')₂ 片段。如有需要, Fc 片段可以单独在低 pH 缓冲液中洗脱出来。

在单一步骤中同时实现抗体片段化和脱糖基化

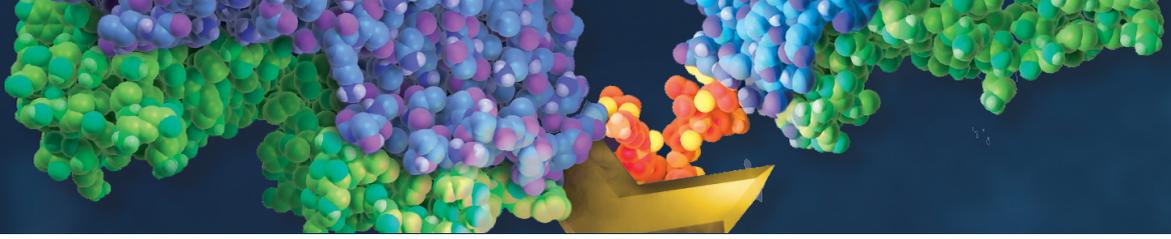
可以将 PNGase F 与 IdeS 蛋白酶结合使用，在一个反应过程中同时对抗体进行片段化和脱糖基化处理。



使用 IdeS 蛋白酶和 PNGase F 在单步操作中同时对抗体进行片段化和脱糖基化处理。

泳道 1, 单独的利妥昔单抗 (Rituximab); 泳道 2, 利妥昔单抗与 IdeS 蛋白酶孵育 2 小时; 泳道 3, 在消化的标准条件下 (50mM 磷酸钠缓冲液, pH 6.6/150mM 氯化钠), 利妥昔单抗与 IdeS 蛋白酶及 PNGase F 共同孵育 2 小时。DTT 还原后通过 SDS-PAGE 电泳可以清楚地观察到 Fc/2 片段完全被消化以及完全脱糖基化。





主要应用领域：

快速而全面的结构分析：

- 序列验证
- 小型和大型翻译后修饰（PTMs）分析
- 抗体药物偶联物（ADCs）分析

快速比较样本类型：

- 克隆间比较
- 原研单克隆抗体与生物类似药对比
- 批次间差异分析
- 监控生产工艺变化

人类和小鼠 IgG 亚类的核心区及下铰链序列

Subclass	Hinge/CH2 Sequence	IdeS Activity
Human		
IgG1	CPPCPAPELLGGPSVF	++++
IgG2	CPPCPAPP_VAGPSVF	++++
IgG3	CPRCPAPELLGGPSV	++++
IgG4	AHHAQAPEFLGGPSVF	++++
Mouse		
IgG1	PCICTVPEV__SSVF	-
IgG2a	CPPCAAPNLLGGPSVF	+
IgG2b	CHKCPAPNLEGGPSVF	-
IgG3	GSSCPAGNILGGPSVF	+

产品订购

Product	Size	Cat. No.
IdeS Protease	5,000 units	V7511
IdeS Protease	25,000 units (5 × 5,000 units)	V7515

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司 Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd

地址：北京市东城区北三环东路 36 号环球贸易中心 B 座 907-909

电话：010-58256268

网址：www.promega.com

技术支持电话：400 810 8133

技术支持邮箱：chinatechserv@promega.com

更新时间：2024.3



欢迎关注 Promega 生命科学