

Lumit™ FcγR Binding Immunoassays

研究 FcγR-Ab 相互作用的新型生物发光分析方法

FcγR

● 概述

治疗性抗体和 Fc 融合蛋白对多种疾病有效，因为它们在与抗原结合方面具有独特的特异性，并能够通过效应功能激活免疫应答，如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 和抗体依赖性细胞吞噬 (ADCP)。当抗体 Fc 结构域与免疫效应细胞 (如天然杀伤细胞和巨噬细胞) 上的 Fcγ 受体相互作用时，该效应功能被触发。多种因素都会影响 Fc 结构域和 Fcγ 受体的相互作用，对这些相互作用进行仔细的优化和监测对维持抗体药物的有效性和安全性是必要的。一种用来检测和比较 Fcγ 受体对 IgG Fc 结构域的亲和力的易于使用的、可靠的、高通量的筛选方法将在抗体开发、生产和加工过程中发挥重要的作用。

为了满足检测方法的可靠性和易用性，Promega 开发了一套针对以下受体的生物发光的生化检测方法：

- Lumit™ **FcγRI** Binding Immunoassay
- Lumit™ **FcγRIIA(H131)** Binding Immunoassay
- Lumit™ **FcγRIIA(R131)** Binding Immunoassay
- Lumit™ **FcγRIIIA(V158)** Binding Immunoassay
- Lumit™ **FcγRIIIA(F158)** Binding Immunoassay

● 技术优势

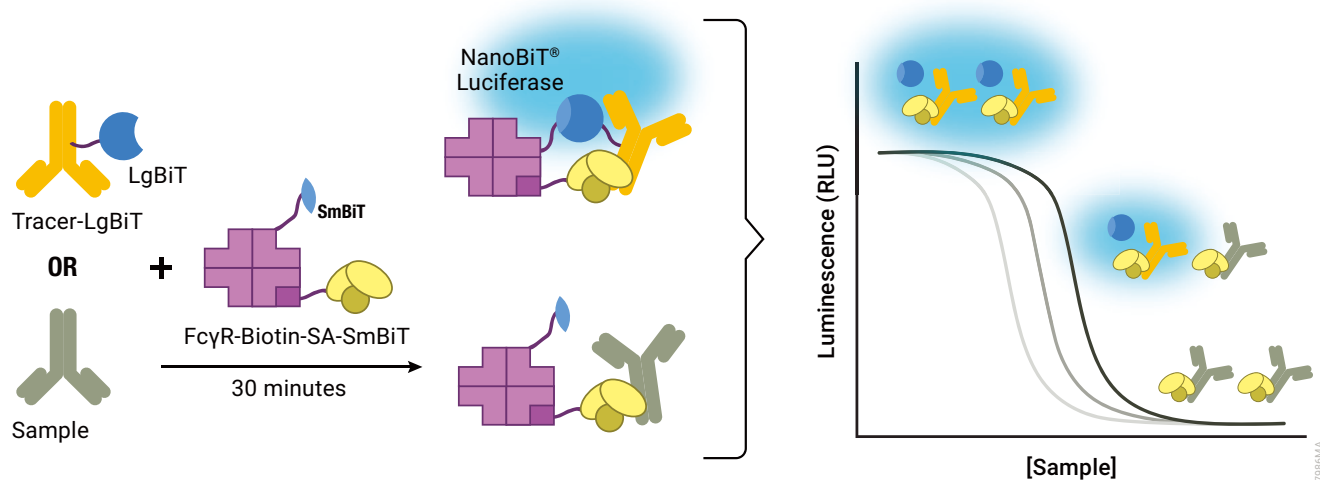
Promega 开发的基于检测生物发光信号的均质型免疫检测平台 (Lumit™) 研究 FcγR-Ab 相互作用，其优势在于：

- 该检测方法无需固定和洗涤流程 (传统的基于生物传感器的平台，如 SPR，BLI 需要固定和洗涤步骤)；
- 均质型检测，简单快速 (30-60min)；
- 检测只需要简单的化学发光检测仪；
- 该检测兼容 384- 孔板模式；
- 生物发光检测提供了广泛的检测窗口；
- Lumit™ FcγR Binding Immunoassays，当与生物发光法的 Fc Effector Reporter Bioassays 联合使用时，将有助于阐明和表征抗体 MOA。

原理及工作流程

● 检测原理

Lumit™ FcγR Binding Immunoassays 是基于 NanoBiT® 蛋白互补技术的竞争性结合免疫检测。该检测方法使用 LgBiT 标记的人 IgG1 作为示踪剂 (Tracer-LgBiT)，以 C 末端生物素化的人 FcγR 结合链霉亲和素 -SmBiT 为靶点 (FcγR-Biotin-SA-SmBiT)。在没有抗体分析物样品的情况下，Tracer-LgBiT 与 FcγR-SmBiT 靶点结合，产生最大的发光信号。而在分析物样品中，未标记的 IgG 将与 Tracer-LgBiT 竞争性的与 FcγR 靶标结合，导致浓度依赖性的发光信号下降。

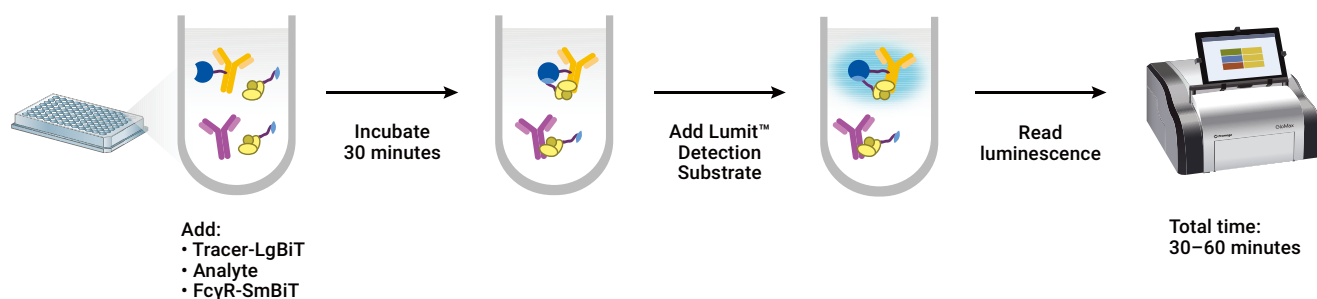


Lumit™ FcγR Binding Immunoassays 的试剂盒组分包括：

- Control Antibody
- Tracer-LgBiT
- FcγR-SmBiT
- Lumit™ Detection Substrate
- FcγR Assay Buffer

● 工作流程

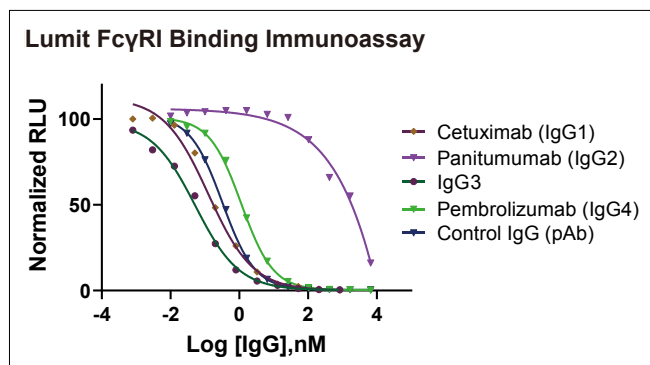
简单的“加样 - 读数”流程



性能数据展示

● Lumit™ FcγRI Binding Immunoassay

FcγRI 是一个高亲和力的受体，有 3 个 Ig 类似的胞外结构域。主要与单体 IgG 结合。

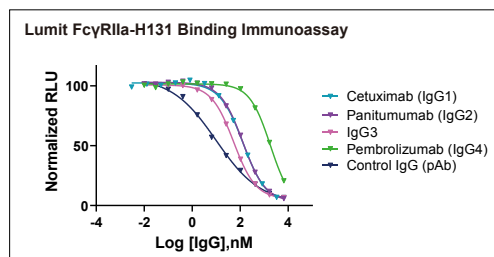


	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	pAb
IC ₅₀ (nM)	0.13	n.d.	0.05	1.14	0.32

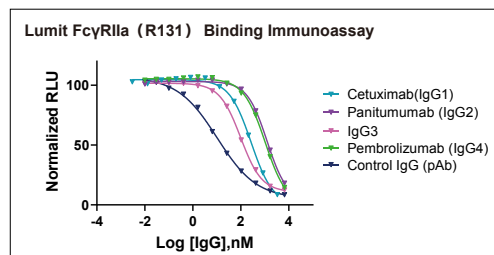
结合亲和力: IgG3 > IgG1 > IgG4 >>> IgG2

● Lumit™ FcγRIIa-H131 和 -R131 Binding Immunoassays

- 编码 FcγRIIa 的两个等位基因产生两种亚型: H131 和 R131;
- 当 IgG 与由巨噬细胞表达的 FcγRIIa 和 FcγRI 结合时, 抗体依赖性细胞介导的吞噬作用 (ADCP) 被触发。



	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	pAb
IC ₅₀ (nM)	133.9	128.5	53.49	n.d.	9.921

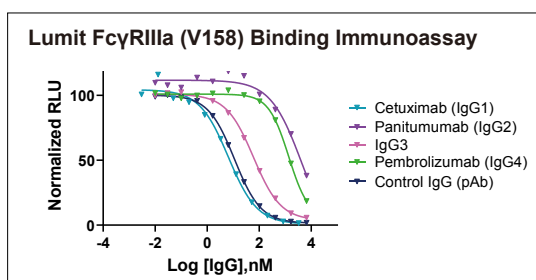


	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	pAb
IC ₅₀ (nM)	269.6	1243	98.68	1036	10.37

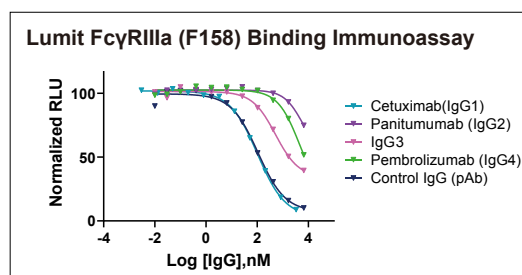
对于 FcγRIIa-H131 和 -R131 来说, 结合亲和力都是:
IgG3 > IgG1 > IgG2 和 IgG4

● Lumit™ FcγRIIIa-V158 和 -F158 Binding Immunoassays

- 编码 FcγRIIIa 的两个等位基因产生两种亚型：V158 和 F158；
- 当抗体与 NK 细胞表达的 FcγRIIIa 受体结合时，抗体依赖性细胞介导的细胞毒性作用（ADCC）被触发。



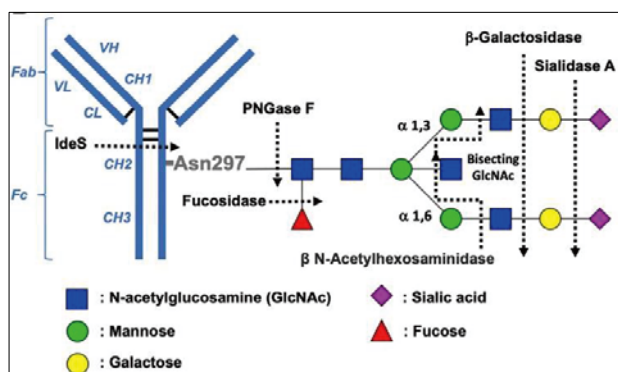
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	pAb
IC ₅₀ (nM)	6.5	n.d.	60.57	1373	11.25



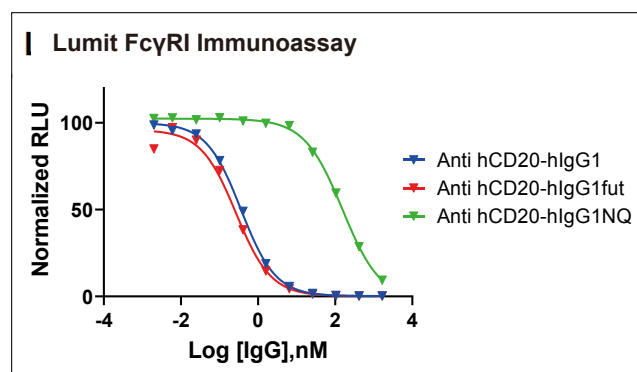
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	pAb
IC ₅₀ (nM)	102.7	n.d.	520.1	n.d.	108.7

对于 FcγRIIIa-V158 和 -F158 来说，结合亲和力都是：IgG1 > IgG3 >>> IgG2 和 IgG4

● Lumit™ FcγR Binding Immunoassays 用于抗体糖基化检测的灵敏度高



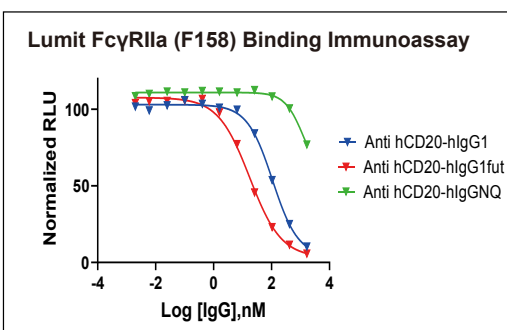
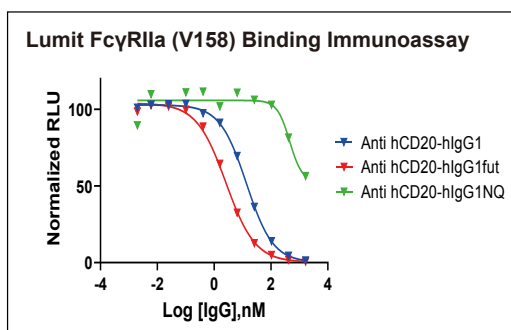
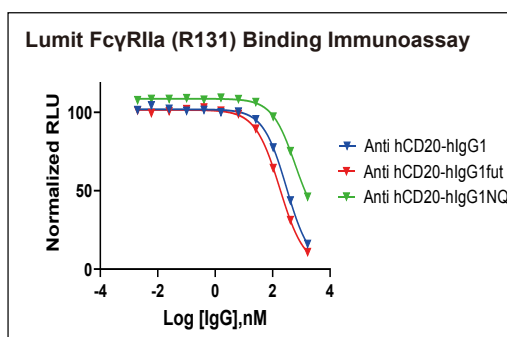
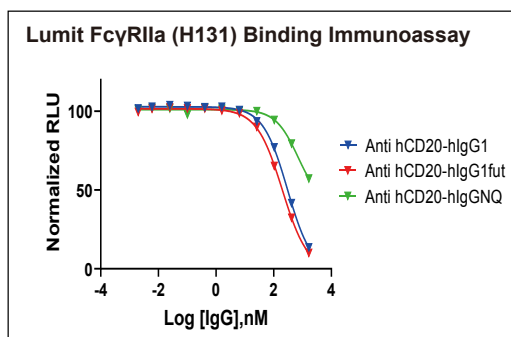
Mathilde Bas et al. J Immunol 2019;202:1582-1594



- Anti-hCD20-hIgG1: Human IgG1
- Anti-hCD20-hIgG1fut: Non-fucosylated Human IgG1
- Anti-hCD20-hIgG1NQ: Non-glycosylated human IgG1

- N297 位点发生 N-糖基化的 IgG1 分子示意图。糖基可以通过葡萄糖苷酶和抗体工程化方法进行修饰。
- 这些修饰能够调节抗体和多种 FcγR 之间的相互作用，随后影响效应功能。
- 去糖基化能显著降低人 IgG 与 FcγRI 的结合，如文献报道。
- 去除海藻糖可以提高与 FcγR 的结合。

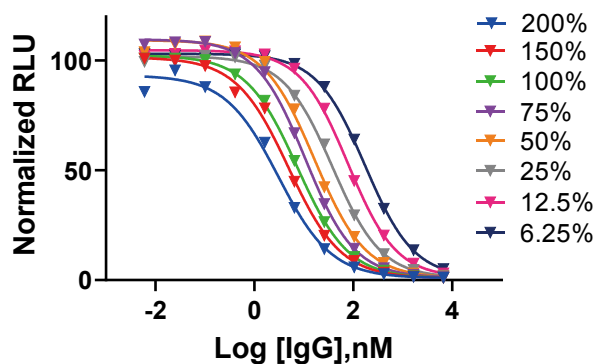
● 糖修饰对 FcγRIIa 和 FcγRIIIa 结合的影响



- Anti-hCD20-hIgG1: Human IgG1
- Anti-hCD20-hIgG1fut: Non-fucosylated Human IgG1
- Anti-hCD20-hIgG1NQ: Non-glycosylated human IgG1

- 去糖基化抗体 (绿色) 显示结合能力显著降低, 正如预期的那样;
- 与 FcγRIIa 相比, 去除海藻糖提高了抗体与 FcγRIIIa 的结合。

● Lumit™ FcγR Binding Immunoassays 检测抗体效能



- 使用 Lumit™ FcγR (V158) Binding Immunoassay 检测曲妥珠单抗的相对效能, 获得了预期的 IC_{50} 值变化;
- 使用所有的 Lumit™ FcγR Binding immunoassays 对抗体效能进行类似的检测 (数据未显示);
- 针对 FcγR 的一组易于使用的效价试验可用于阐明抗体药物的生物活性。

FcγR

Lumit™ FcγR Binding Immunoassays

● 产品综合列表

Lumit™ FcγR Binding Immunoassays			
产品	受体	规格	目录号
Lumit™ FcRn Binding Immunoassay	FcRn	100 assays	W1151
Lumit™ FcRn Binding Immunoassay 10X		1000 assays	W1152
Lumit™ FcγRI Binding Immunoassay	FcγRI	100 assays	咨询 Promega
Lumit™ FcγRIIA(H131) Binding Immunoassay	FcγRIIA(H131)	100 assays	咨询 Promega
Lumit™ FcγRIIA(R131) Binding Immunoassay	FcγRIIA(R131)	100 assays	咨询 Promega
Lumit™ FcγRIIIA(V158) Binding Immunoassay	FcγRIIIA(V158)	100 assays	咨询 Promega
Lumit™ FcγRIIIA(F158) Binding Immunoassay	FcγRIIIA(F158)	100 assays	咨询 Promega

了解 Lumit™ FcγR Binding Immunoassays 更多信息，请访问

www.promega.com/products/immunoassay-elisa/lumit-immunoassays/lumit-fcgr-binding-immunoassays/

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

微网站：wechat.promega.com.cn

技术支持电话：400 810 8133

技术支持邮箱：chinatechserv@promega.com

更新时间：2022.8



Promega 生命科学



Glo 学院