



SmartEnzymes™

- 抗体のフラグメント化
- 抗体の脱グリコシル化
- 抗体の修飾/プロテオミクス
- 糖鎖解析
- アフィニティ精製
- 抗体研究

For Better Biologics



重松貿易株式会社 化学品部
Shigematsu & Co., Ltd.

本社：〒541-0047 大阪市中央区淡路町2丁目2番5号
TEL: (06) 6231-6146 (代) FAX: (06) 6231-6149
www.shigematsu-bio.com/ info@shigematsu-bio.com



Nature offers a vast source of enzymes, perfected through evolution to perform defined reactions.

At Genovis, we believe that enzymes with unique properties can be used as biological tools to support the research and development of complex biopharmaceuticals to help bring safe and effective medicines to patients in need.

Our task is to identify new enzymes and give them names.

We call them *SmartEnzymes*.

抗体のフラグメント化

IgG特異的なプロテアーゼは、バイオ医薬品の分析とその試料調製ワークフローに最適なサブユニットを生成します。これは、バイオ医薬品の特性評価、開発および製造に有用です。

| | |
|---|----|
| FabRICATOR® (IdeS) IgGヒンジ領域直下を切断 | 4 |
| FabALACTICA® (IgdE) ヒトIgG1ヒンジ領域上部を切断 | 12 |
| FabRICATOR® Z (IdeZ) マウスIgGヒンジ領域直下を切断 | 16 |
| FabULOUS™ (SpeB) IgG1ヒンジ領域上部を切断 | 18 |
| GingisKHAN® (Kgp) ヒトIgG1ヒンジ領域上部を切断 | 20 |

抗体の脱グリコシル化

IgG特異的なエンドリコシダーゼは、高マンノース型、ハイブリッド型、複合型、バイセクト型などのネイティブ抗体上のFc領域の糖鎖構造をトリミングすることが可能です。

| | |
|---|----|
| GlycINATOR® (EndoS2) IgG Fc領域の糖鎖を加水分解 | 22 |
| IgGZERO® (EndoS2) Fc領域の複合型糖鎖を加水分解 | 24 |

抗体の修飾

抗体の部位特異的な修飾と任意の糖鎖構造を使用した糖鎖エンジニアリングに関するテクノロジー。

| | |
|--|----|
| GlyCLICK® ネイティブなIgGを部位特異的に修飾 | 26 |
| TransGLYCIT™ IgGをトランスグリコシル化 | 30 |

プロテオミクス

ユニークな特異性を持つプロテアーゼにより、プロテオミクスやMS解析に適したペプチドを生成します。

| | |
|--|----|
| GingisREX® (RgpB) アルギニン特異的にタンパクを切断 | 32 |
|--|----|

糖鎖解析

N-およびO-結合型糖鎖タンパクの解析は、糖鎖に特異的なプロテアーゼ、エンドおよびエキソグリコシダーゼを用いることにより簡便に行うことが可能となります。

| | |
|--|----|
| Immobilized PNGase F N-結合型糖鎖を加水分解 | 34 |
| OpeRATOR® O-結合型糖鎖を有するタンパクを特異的に切断 | 36 |
| OglyZOR® コア-1 O-結合型糖鎖を加水分解 | 38 |
| SialEXO® シアル酸を加水分解 | 40 |
| FucosEXO™ α 1-2,3,4結合型フコースを加水分解 | 42 |
| GalactEXO™ β 1-3,4結合型ガラクトースを加水分解 | 44 |
| GalNAcEXO™ α -結合型GalNAcを加水分解 | 46 |

アフィニティ精製

複雑な試料からO-結合型糖鎖を持つタンパクやペプチドをアフィニティ精製するツール。

| | |
|-----------------------------------|----|
| GlycOCATCH® O-糖化タンパクを濃縮 | 48 |
|-----------------------------------|----|

検出用抗体

多様なアッセイ系に使用可能なSmartEnzymesの検出抗体

| | |
|---|----|
| Anti-FabRICATOR® FabRICATOR® (酵素) を検出 | 50 |
|---|----|

FabRICATOR®

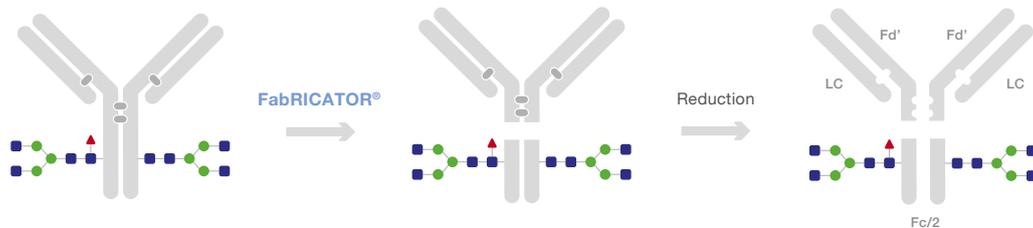
IgGヒンジ領域直下を切断



FabRICATOR (Ides) は、ヒンジ領域直下の単一アミノ酸部位で抗体を消化するIgG特異的システインプロテアーゼであり、均質なF(ab')₂およびFcフラグメントを生成することができます。この酵素は、mAb、ADC（抗体薬物複合体）、バイオシマラー、Fc融合タンパクなどの抗体ベースの治療薬の特性評価、品質管理、安定性試験、生産モニタリング、クローン選択に幅広く利用されています。

-  Human IgG1-4, IgG of some classes from monkey, rat, rabbit, sheep
-  CPAPELLG / GPSVF
-  30 min reaction
-  No reducing agents or co-factors needed

抗体のサブユニット化ワークフロー



酵素であるFabRICATORは37°C・30分の条件において抗体を消化し、インтактなF(ab')₂およびFc部位を生じます。これには、他の最適条件は要求されず、かつ、

過剰な消化のリスクはありません。中間レベルでのLC-MS分析ワークフローの前処理では、サブユニットを減らして23~25 kDaのフラグメントを生成し、質量分解能を

高めて重要な品質属性を正確に決定できます。

製品フォーマット



FabRICATOR®
酵素の凍結乾燥品



FragIT™
スピニングカラムに酵素を固定した製品



FragIT™ kit
FragITとCaptureSelect® (Fcフラグメント精製カラム)のセット



FabRICATOR®-HPLC
HPLCに接続できるカラムに酵素を固定した製品



FabRICATOR® MagIC
磁気ビーズに酵素を固定した製品
オートメーション向け



FabRICATOR® Validation kit
異なる3パッチの凍結乾燥品のセット
分析バリデーション向け



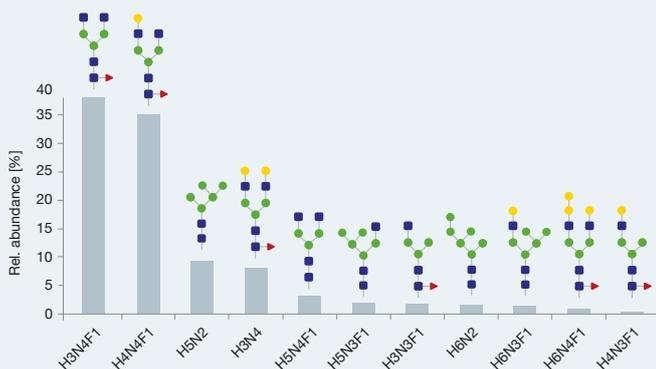
FabRICATOR®を利用した重要品質特性の決定について

FabRICATORで生成された均質なフラグメントは、完全な状態の抗体では解決できない特性の詳細なマッピングに対して、モノアイソピックな側面から解決が可能です。この中間レベルでの分析ワークフローは、脱アミノ化・ピログルタミル化・グリカンプロファイリングなどを含む品質特性やアミノ酸配列の検証、酸化分析に有用です。治療薬として使用される抗体において、11個の

Fcグリカンの相対的な存在量は、質量分解能を高めるためにFabRICATOR消化後に定量化されました。なお、類似性の評価に追加の消化やラベリングは必要ありませんでした。

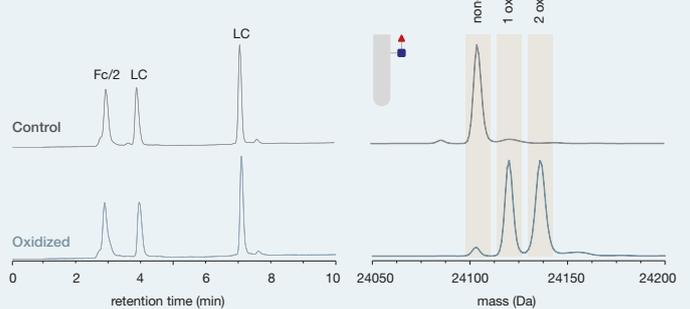
抗体を均質なサブユニットに消化することで、メチオニンの酸化など保管や製剤化中に発生する可能性のある変化を迅速に監視するための中間レベルの分析が可能に

なります。治療薬として使用される抗体を、強制的に酸化し、FabRICATORで領域特異的に消化し、GlycINATORによって脱グリコシル化した後、サブユニットレベルで分析を行いました。Fc/2フラグメントのデコンボリューションされた質量スペクトルに示されているように、酸化に関する分析において、領域固有のデータが取得できました。なお、分析はハイスループット形式で実行されました。



Determining antibody quality attributes. Relative abundance of glycans on cetuximab Fc/2 fragments, generated with FabRICATOR and analyzed with LC-MS at the subunit level by Ayoub and colleagues (Ayoub, 2013).

Adalimumab (IgG1)

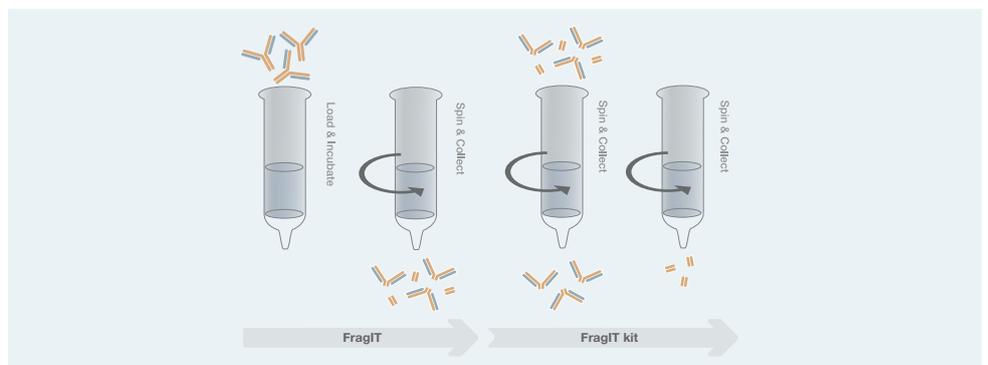


Quality control of antibody oxidation. Oxidation analysis of adalimumab showing UV (280 nm) chromatograms before (control) and after (oxidized) incubation with 0.25% H₂O₂. A deconvoluted mass spectrum of the deglycosylated Fc/2 fragments demonstrates the degree of oxidation.

FragIT™ Kitを利用したF(ab')₂およびFc/2サブユニット分析用調製



調製サンプル中に、残留酵素を含まない抗体またはFc融合タンパクの迅速かつ効率的な消化が必要なアプリケーションでは、FragIT スピニングカラムが有用です。これには、アガロースビーズにFabRICATORが固定化されています。また、FragIT kitでは、CaptureSelect™ アフィニティー精製カラムを使用して、均質なF(ab')₂およびFcフラグメントを分離することも可能です。



References

Ayoub, D. et al., 2013. *Correct primary structure assessment and extensive glyco-profiling of cetuximab by a combination of intact, middle-up, middle-down and bottom-up ESI and MALDI mass spectrometry techniques.* mAbs, 5(5), pp.699–710.



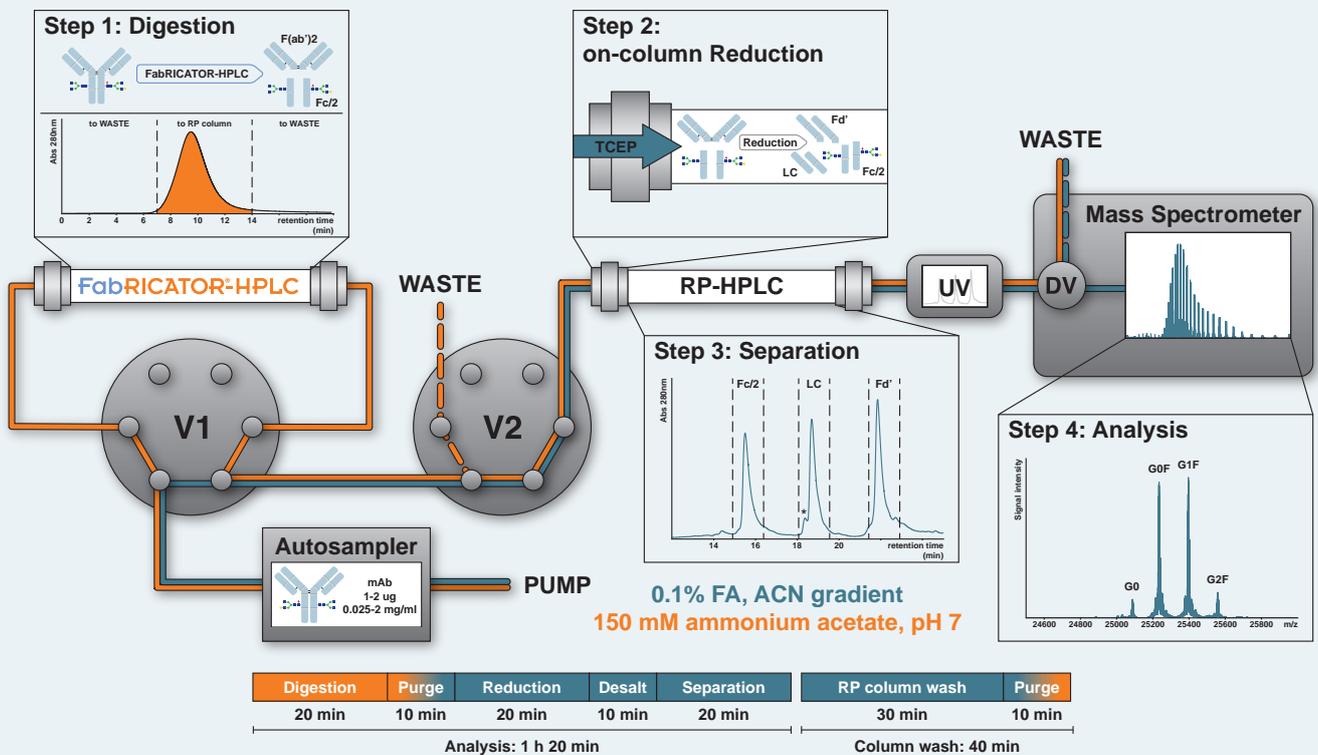
FabRICATOR®-HPLCを使用した中間レベル分析でのオンカラム消化



高い一貫性と再現性のあるオンカラムでの抗体消化のために、FabRICATOR-HPLCにはHPLCレジンに固定化されたFabRICATOR酵素が含まれています。FabRICATOR-HPLCカラムは、標準のLC

MSルーチン分析で使用できますが、2D-LCセットアップなど、より高度な構成も可能です。最終的には、バイオリアクターは自動化されたオンラインな中間レベル分析のワークフローでMSに直接接続できます。

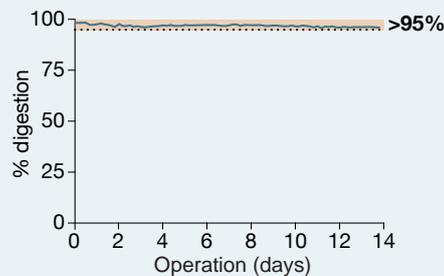
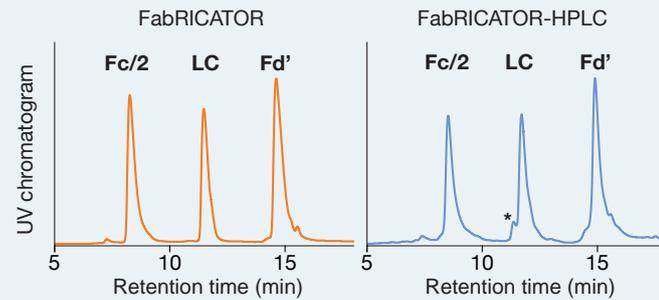
これにより、オペレーターの時間、サンプル処理エラーが大幅に削減され、スループットが向上します。



FabRICATOR-HPLC in a middle-level workflow. Potential set-up for an automated middle-level workflow using FabRICATOR-HPLC that digests IgG to F(ab')₂ and Fc, which is well suited for high resolution MS analysis.

堅牢性の高いパフォーマンス

2 μ gのトラスツズマブを4時間毎に注入し、LC-MSで分析したテストによると、37°Cで最大14日間の連続操作という条件下にて、FabRICATOR-HPLCによるオンカラムでの消化効率は良好に維持されました。生成された抗体フラグメントはオンカラムで還元され、自動ワークフローを使用して分析され、14日間で95%を超える抗体消化率が得られました。

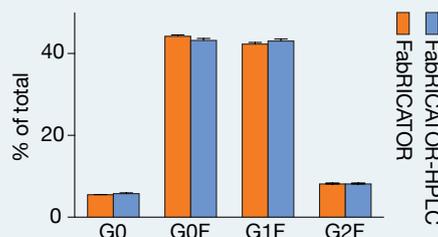
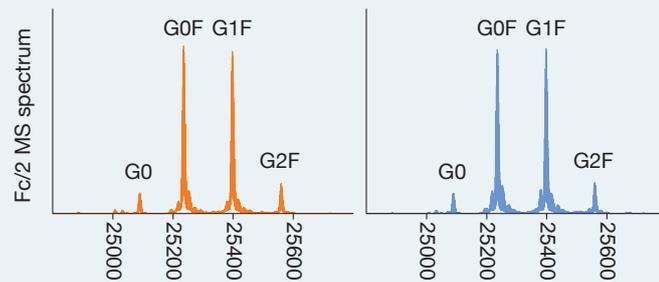


Performance testing of FabRICATOR-HPLC.

Comparison between digestion with standard in-solution FabRICATOR protocol (orange) and digestion using the automated FabRICATOR-HPLC workflow (blue), and quantification of the column's performance over a period of 14 days (bottom). The asterisk marks LC fragments that are not completely reduced with one intramolecular disulfide bridge intact.

抗体Fcグリカン分析の自動化

ここでは、トラスツズマブのFcグリコシル化の分析を利用して、FabRICATOR-HPLCのカラムの性能と操作安定性を示します。FabRICATOR-HPLCを使用した自動化された中間レベル分析では、標準的な溶液内分解による分析ワークフローで得られたものと実質的に区別できない質量スペクトルが得られました。Fcグリコシル化プロファイルの分析結果は、すべてのグリコフォームの標準偏差が0.5%未満で、14日間の連続操作中に安定して再現性がありました。



Glycan analysis using FabRICATOR-HPLC.

Deconvoluted mass spectra of trastuzumab Fc/2 from in-solution FabRICATOR digestion (top, orange), FabRICATOR-HPLC (top, blue), and glycosylation profiles of trastuzumab (bottom, orange, n=10) or (bottom, blue, n=28).

FabRICATOR®-HPLC

Column hardware: PEEK/biocompatible

Column dimensions: 2.1 mmD × 50 mL

Support resin: POROS®*

Typical flow rate: 0.025-0.05 mL/min

Maximum Pressure: 100 bar

Operating pH: 6.5 - 8.0

Operating temperature: 37°C

Storage conditions: +4-8°C
(Do not freeze!)

Number of days of continuous operation: >10**

Injections per column: >200**

Start material: Human IgG1-4,
Fc-fusion proteins

* See legal and disclaimers. ** Depending on specific application



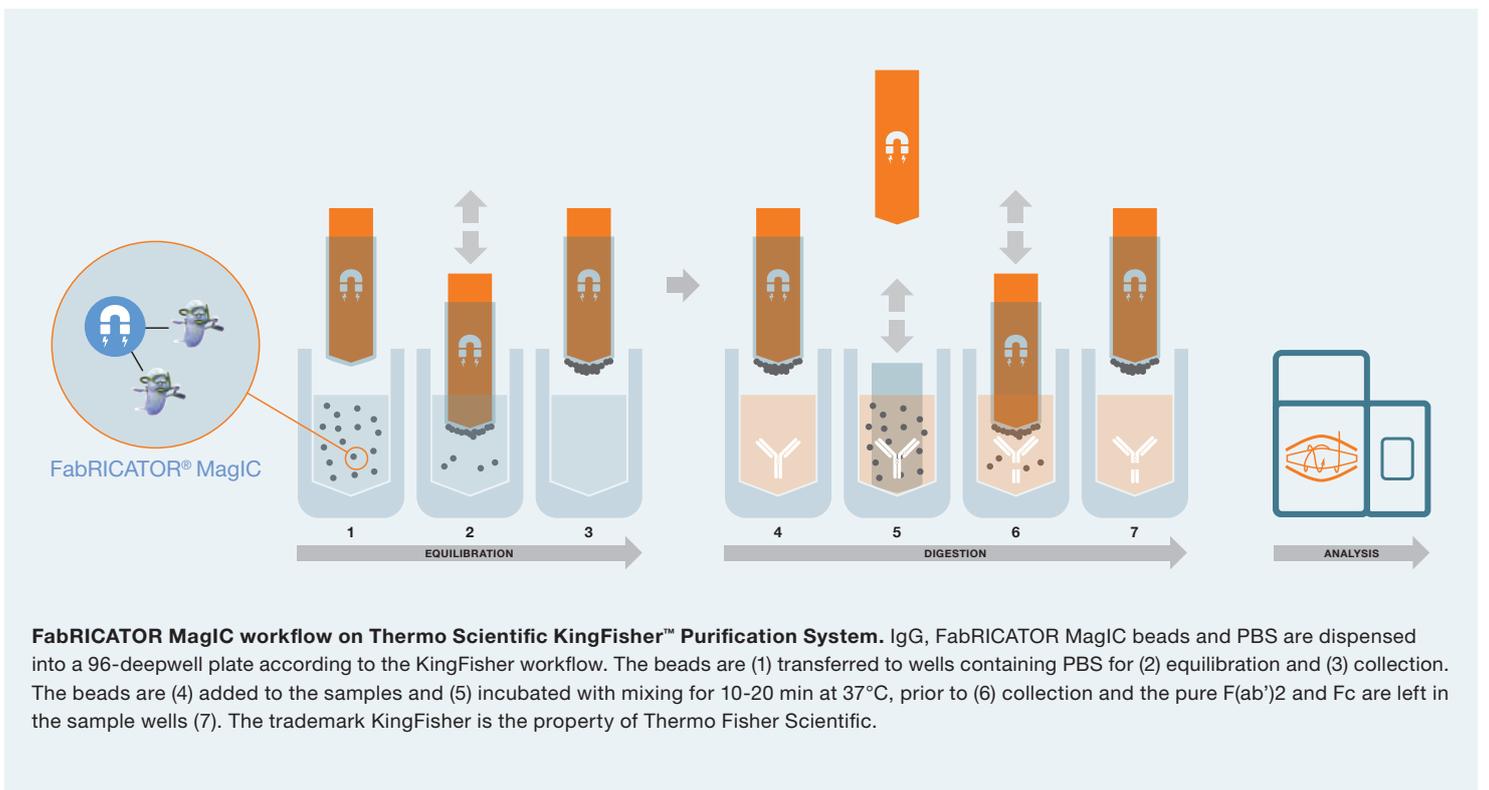
中間レベルでの自動分析向けのFabRICATOR® MagIC による抗体サブユニットの平行生成



FabRICATOR MagICは、アガロースビーズに酵素であるFabRICATORを固定した、抗体の自動処理に適した製品です。

磁気ビーズにより、中間レベルでの分析ワークフローにおいて、複数の抗体を並行して調製・分析することが可能になって

います。IgGベースの生物学的製剤のルーチン分析において、手動と自動の両方のステップで利用可能です。

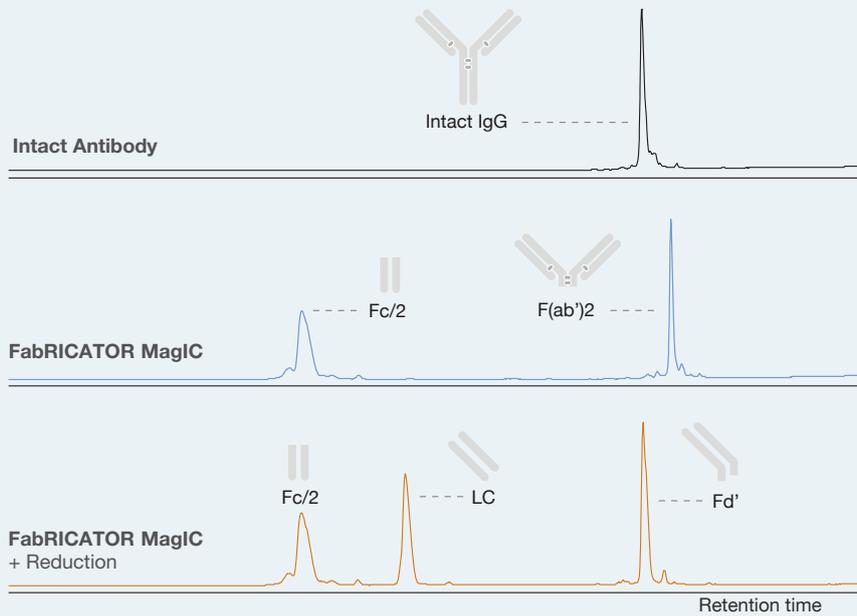


中間レベルでの分析ワークフロー自動化

FabRICATOR MagICはインタクトなF(ab')₂およびFcサブユニットを生成し、ジスルフィド結合は5mM TCEPを用いて容易に還元することができます。5 mM TCEPを用いた

ワンポット反応により、簡単にジスルフィド結合を還元することができます。生成されたFc/2、LC、Fd'フラグメントは、中間レベルでの分析ワークフローで詳細な解析やモニタリングが可能であり、インタクト

レベルのアプローチと比較して優れた分解能を実現します。FabRICATOR MagICで処理したサンプルから得られた抗体フラグメントの逆相LC-MS分析では、完全な消化を実証されています。



Generation of antibody subunits with FabRICATOR MagIC. Analysis of a monoclonal antibody by RPLC-MS at the intact level (top), after FabRICATOR MagIC digestion (middle) and after treatment with FabRICATOR MagIC and 5 mM TCEP (bottom). Data was obtained in collaboration with Symphogen A/S (Ballerup, Denmark).

重要品質特性(CQA)の

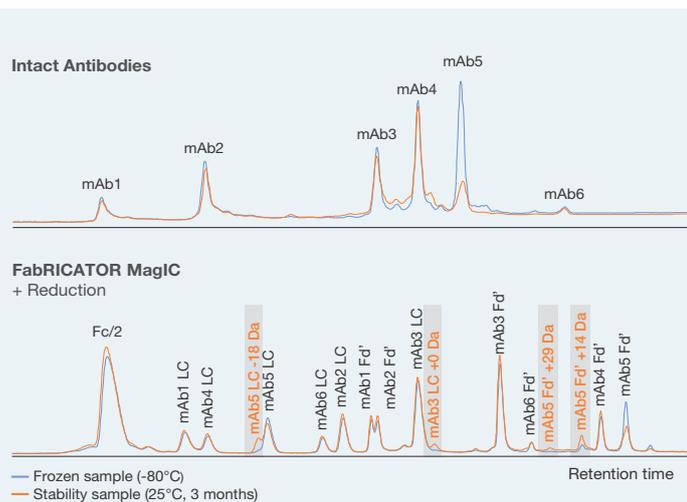
高速自動モニタリング

FabRICATOR MagICを用いた複数のモノクローナル抗体の自動化された分解により、酸化などの複数のCQAを解析することができます。強制的な分解を受けた

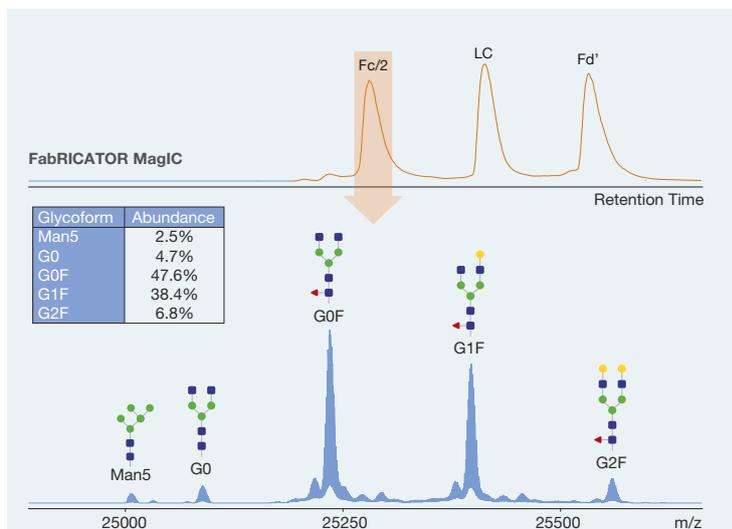
6種類のモノクローナル抗体の混合物をLC-MSでインタクトまたはサブユニットレベルで分析しました。この結果は、FabRICATOR MagICを用いることで、モノクローナル抗体の複雑な混合物における修飾を迅速に検出し、モニタリング

できることを示しています。

また、FabRICATOR MagICによる消化と5 mM TCEPによる還元後の中間レベルの分析により、FabRICATOR MagICに対して詳細なFc-糖鎖プロファイリングが行われました。



Oxidation studies using FabRICATOR MagIC. Six mAbs were analyzed for tryptophan oxidation during forced degradation studies by RPLC-MS at the intact level (top panel) and after FabRICATOR MagIC with 5 mM TCEP (bottom panel). New peaks detectable by the subunit analysis are highlighted. Data was obtained in collaboration with Symphogen A/S (Ballerup, Denmark).



Glycan analysis using FabRICATOR MagIC. Analysis of Fc glycosylation by middle-level LC-MS using FabRICATOR MagIC (top) and quantification of glycoforms from a deconvoluted mass spectrum of the Fc/2 fragment (bottom).

FabRICATOR®

酵素の凍結乾燥品



| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|---|-------------------------|------------|
| FabRICATOR, 2000 units | Digests 2 mg IgG | A0-FR1-020 |
| FabRICATOR, 5000 units | Digests 5 mg IgG | A0-FR1-050 |
| FabRICATOR, 5 x 5000 units | Digests 5 x 5 mg IgG | A0-FR1-250 |
| FabRICATOR, 96 x 100 units | Digests 96 x 100 µg IgG | A0-FR1-096 |
| FabRICATOR, 8 x 100 units | Digests 8 x 100 µg IgG | A0-FR1-008 |
| FabRICATOR LE (low endotoxin), 2000 units | Digests 2 mg IgG | A0-FR8-020 |
| FabRICATOR LE (low endotoxin), 5000 units | Digests 5 mg IgG | A0-FR8-050 |

FabRICATOR® Validation kit

異なる3バッチの凍結乾燥品のセット, 分析バリデーション向け



| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|----------------------------|----------------------|------------|
| FabRICATOR, 3 x 2000 units | Digests 3 x 2 mg IgG | A0-FR4-060 |

FragIT™

スピナラムに酵素を固定した製品



| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|-------------------------------|-------------------------|-------------|
| FragIT, Microspin 2 x 0.5 mg | Digests 2 x 0.5 mg IgG | A0-FR6-010 |
| FragIT, Microspin 5 x 0.5 mg | Digests 5 x 0.5 mg IgG | A0-FR6-025 |
| FragIT, Microspin 10 x 0.5 mg | Digests 10 x 0.5 mg IgG | A0-FR6-050 |
| FragIT, Midispin 1-10 mg | Digests 1-10 mg IgG | A0-FR6-100 |
| FragIT, Maxispin 10-100 mg | Digests 10-100 mg IgG | A0-FR6-1000 |





FragIT™ kit

FragITとCaptureSelect™ (Fcフラグメント精製カラム)のセット

| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|-----------------------------------|--------------------------------------|-------------|
| FragIT kit, Microspin 0.5 mg | Digests and purifies 0.5 mg IgG | A2-FR2-005 |
| FragIT kit, Microspin 5 × 0.5 mg | Digests and purifies 5 × 0.5 mg IgG | A2-FR2-025 |
| FragIT kit, Microspin 10 × 0.5 mg | Digests and purifies 10 × 0.5 mg IgG | A2-FR2-050 |
| FragIT kit, Midispin 10 mg | Digests and purifies 10 mg IgG | A2-FR2-100 |
| FragIT kit, Maxispin 100 mg | Digests and purifies 100 mg IgG | A2-FR2-1000 |

FabRICATOR®-HPLC

HPLCに接続できるカラムに酵素を固定した製品



| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|-----------------|---------------------------------------|------------|
| FabRICATOR-HPLC | Number of injections per column: >200 | A0-FRC-050 |

FabRICATOR® MagIC

磁気ビーズに酵素を固定した製品, オートメーション向け



| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|----------------------------|-------------------------------|------------|
| FabRICATOR MagIC, 2 ml | Digests up to 24 × 200 µg IgG | A0-FRM-024 |
| FabRICATOR MagIC, 4 × 2 ml | Digests up to 96 × 200 µg IgG | A0-FRM-096 |



FabALACTICA®

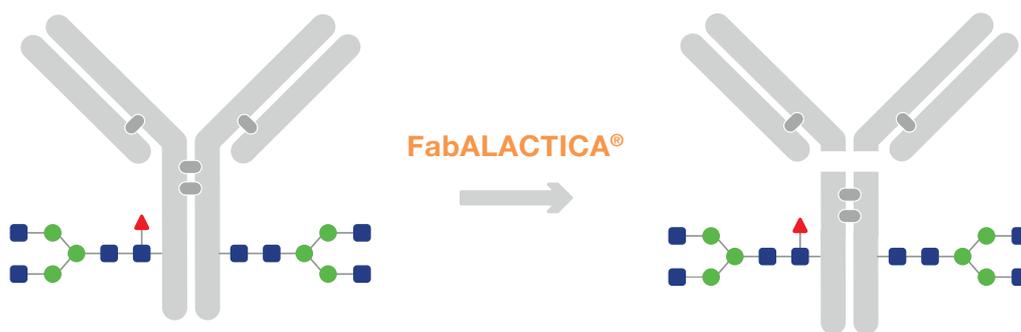
ヒトIgG1ヒンジ領域上部を切断



FabALACTICA (IgdE) は、ヒトIgG1のヒンジ上部の特定部位を消化し、インタクトかつ均質なFabおよびFcフラグメントを生成するシステインプロテアーゼです。この酵素は、二重および多重特異性抗体の特性評価やインタクトなFcグリコシル化の解析を促進します。また、一価の結合や高次構造、ジスルフィドスクランブル、ヒンジ領域が変異した抗体の研究も容易になります。

-  Human IgG1
-  KSCDKT / HTCPPC
-  O/N reaction
-  No reducing agents or co-factors needed

抗体のサブユニット化ワークフロー



IgGに特異性の高いプロテアーゼを用いることで、LC-MSを用いた抗体医薬品のサブユニットプロファイリングや鍵となる品質特性の研究が可能になります。酵素である

FabALACTICAは、ヒトIgG1のヒンジ領域上部の1カ所を特異的に消化します。生成されたフラグメントは、抗体の特性解析やNMRによる高次構造の研究など幅広い

用途に利用することが可能です。



FabALACTICA®
酵素の凍結乾燥品



Immobilized FabALACTICA®
スピナラムに酵素を固定した製品



FabALACTICA® Fab kit
Immobilized FabALACTICAとCaptureSelect™
(Fcフラグメント精製カラム)のセット

Thermo Scientific™ CaptureSelect™ resin from Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries.
Thermo Scientific and CaptureSelect are trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries.



Fabフラグメントの生成に使用される酵素の比較



FabALACTICAおよびGingisKHANは、IgGを単一の消化部位で切断し、ヒトIgG1から均質なFabおよびFcフラグメントを生成します。パパインやLys-Cのような従来の酵素もFabフラグメントの生成に使用できますが、非特異的な酵素活性のため、過消化を最小限に抑えるための慎重な最適化が必要です。

| Enzyme | FabALACTICA | GingisKHAN | Papain | Lys-C |
|---------------------|-------------------------------------|--------------------|--|--|
| Digestion site | | | | |
| Specificity | IgG-specific/ One digestion site | One digestion site | Unspecific/ Several digestion sites | Unspecific/ Several digestion sites |
| Selectivity | Human IgG1 | Human IgG1 | Several proteins | Several proteins |
| Reducing conditions | No | Yes, 2 mM cysteine | Yes | No |
| Reaction time | O/N (16-18 h) | 1 h | 1-24 h | 1-24 h |

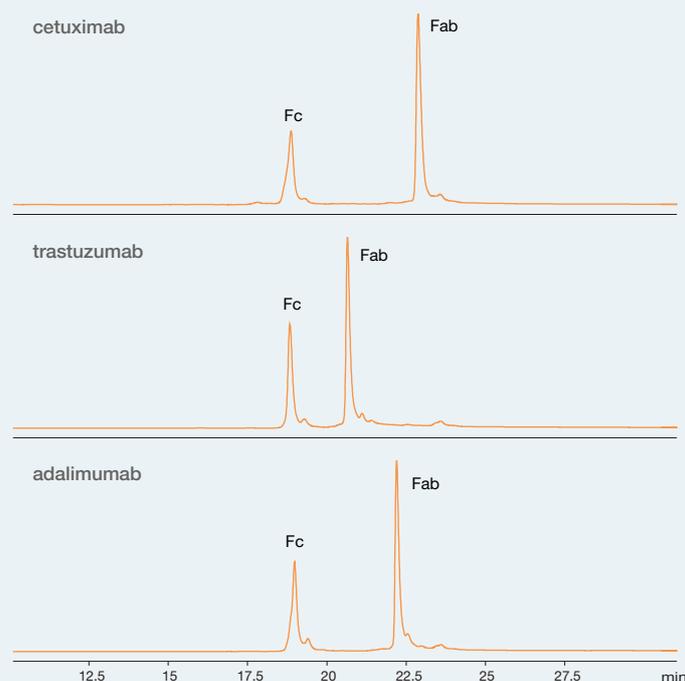
インタクトなFabおよびFcフラグメントの生成



FabALACTICAの活性を実証するために、3種類の治療用モノクローナル抗体 (cetuximab、trastuzumab、adalimumab-

mac)を消化し、得られたフラグメントをRP-HPLCを用いて分析しました。3種類のモノクローナル抗体を消化し、得ら

れたフラグメントをRP-HPLCで分析した結果、フラグメントの生成は均一で、酵素の性能も高いことが確認されました。



Separation of intact Fab and Fc fragments by RP-HPLC after FabALACTICA digestion. The digestion was performed O/N at 37°C.

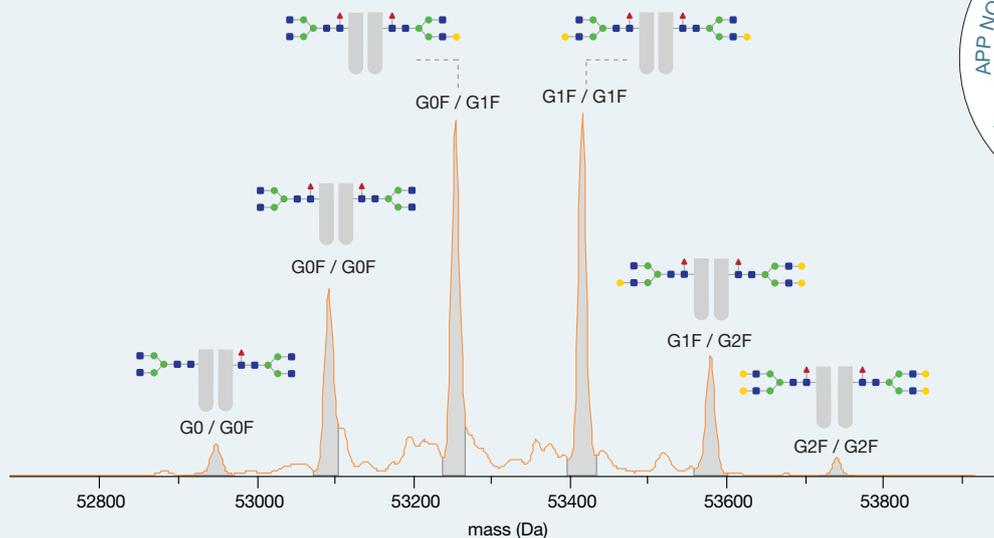
FabALACTICA®とLC-MS を用いたFc領域の糖鎖(ペアグリカン)の解析



Fc領域の糖鎖構造は、モノクローナル抗体の安定性、溶解性、薬力学的特性、薬物動態学的特性に影響を与える重要品質特性(CQA)です。この翻訳後修飾は、抗体

医薬品の開発および製造の双方において、綿密なモニタリングが必要です。ここでは、トラスツマブをFabALACTICAで消化し、得られたインタクトなFcフラグメント(約53

kDa)を用いて、2つの保存されたFc領域のグリコシル化とそのペアリングを高い質量精度で同時に特性評価することができました。



Paired glycan analysis of trastuzumab Fc fragments. Trastuzumab was digested using FabALACTICA O/N at 37°C, and intact Fc and Fab fragments were studied using LC-MS.



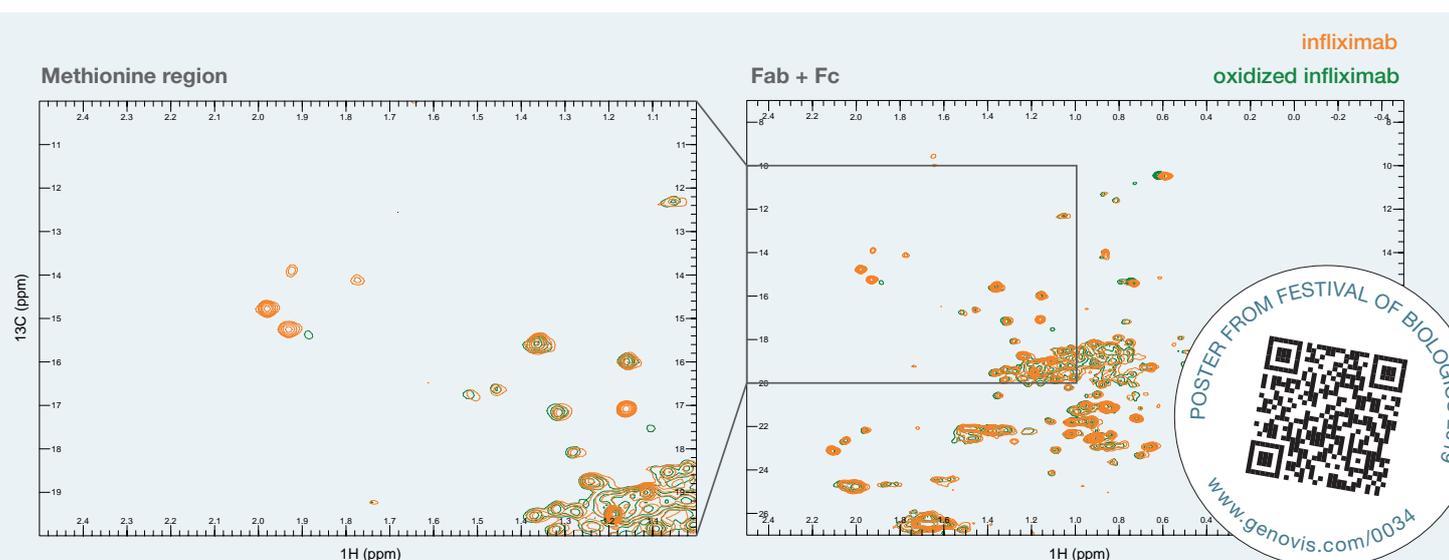
Immobilized FabALACTICA®を用いた2D-NMR分光分析



凝集や不要かつ固有の不均一性などの重要品質特性(CQA)は、タンパク質の高次構造(HOS)を測定することによって評価することができます。二次元核磁気共鳴分光法(2D-NMR)により、IgG

ベースのバイオ医薬品のHOSを原子レベルで正確に比較することができます。ここでは、まずインフリキシマブをH₂O₂で処理し酸化を誘導した後、Immobilized FabALACTICAを用いて消化しました。

酸化されたサンプルのNMRスペクトルは、FcおよびFabフラグメントの両方で酸化によるメチオニンの局所的な変性を示しましたが、高次構造はほとんど影響を受けていませんでした。



2D-NMR analysis following FabALACTICA digestion to evaluate the impact of oxidation on infliximab. 1H-13C methyl HSQC of the combined Fab and Fc fragments of infliximab. Originator (orange) and oxidized originator sample (green). The spectra were acquired at 310 K using an 800 MHz Bruker Avance at the Swedish NMR Center. Data was obtained in collaboration with SARomics Biostructures (Lund, Sweden).



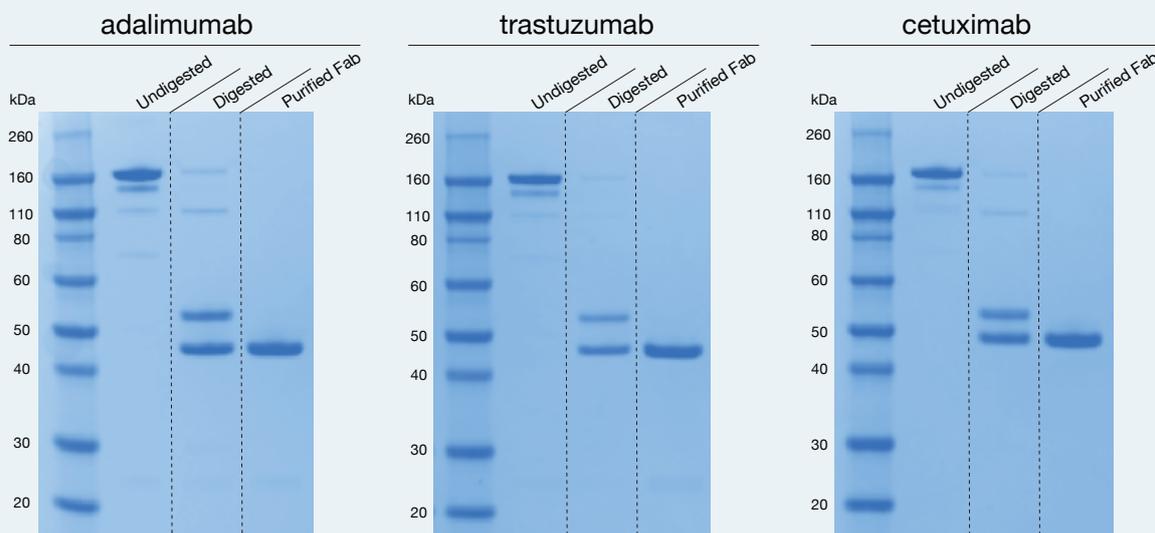
FabALACTICA® Fab Kitを利用した高純度なFabフラグメントの調製



FabALACTICA Fab kitは、抗体切断用の Immobilized FabALACTICA のスピнкаラムとFcフラグメントをアフィニティー結合するための CaptureSelect™ Fcスピнкаラム

から構成されています。ここでは、治療用抗体である adalimumab、trastuzumab、cetuximab を Immobilized FabALACTICA で消化した後、Fcフラグメントを Capture

Select™ Fcスピнкаラムに捕捉させました。Fabは遠心分離により容易に回収され、均質で純度の高いFabフラグメント溶液が得られました。



Preparation of pure Fabs from three monoclonal antibodies using the FabALACTICA Fab kit. Adalimumab, trastuzumab and cetuximab digested by Immobilized FabALACTICA. Pure Fab fragments were obtained in a high yield from all three mAbs using the FabALACTICA Fab kit.

FabALACTICA®

酵素の凍結乾燥品



| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|-------------------------|-------------------------|------------|
| FabALACTICA, 2000 units | Digests 2 mg human IgG1 | A0-AG1-020 |

Immobilized FabALACTICA®

スピнкаラムに酵素を固定した製品



| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|--|------------------------------|-------------|
| Immobilized FabALACTICA, Microspin 2×0.5 mg | Digests 2×0.5 mg human IgG1 | A0-AG6-010 |
| Immobilized FabALACTICA, Microspin 10×0.5 mg | Digests 10×0.5 mg human IgG1 | A0-AG6-050 |
| Immobilized FabALACTICA, Midispin 5-10 mg | Digests 5-10 mg human IgG1 | A0-AG6-100 |
| Immobilized FabALACTICA, Maxispin 10-100 mg | Digests 10-100 mg human IgG1 | A0-AG6-1000 |

FabALACTICA® Fab kit

Immobilized FabALACTICAとCaptureSelect™ (Fcフラグメント精製カラム)のセット



| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|---|--|-------------|
| FabALACTICA Fab kit, Microspin 0.5 mg | Digests and purifies 0.5 mg human IgG1 | A2-AFK-005 |
| FabALACTICA Fab kit, Microspin 5×0.5 mg | Digests and purifies 5×0.5 mg human IgG1 | A2-AFK-025 |
| FabALACTICA Fab kit, Midispin 10 mg | Digests and purifies 10 mg human IgG1 | A2-AFK-100 |
| FabALACTICA Fab kit, Maxispin 100 mg | Digests and purifies 100 mg human IgG1 | A2-AFK-1000 |

FabRICATOR® Z

マウスIgGヒンジ領域直下を切断



FabRICATOR Z (IdeZ) は、マウスIgG2aおよびIgG3のヒンジ領域より下流の特定部位を切断し、2時間のインキュベーション後にF(ab')₂およびFcフラグメントの均質なプールを生成するシステインプロテアーゼです。

- 

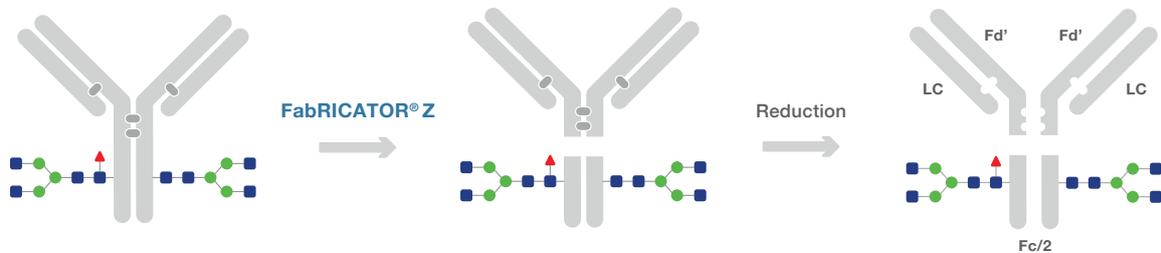
Mouse IgG2a and IgG3,
human IgG1-4, IgG of some
classes from monkey, rabbit
and sheep
- 

CPAPNLLG / GPSVF
- 

2h reaction
- 

No need for reducing
agents or co-factors

抗体の消化ワークフロー



FabRICATOR Zは、マウスIgG2aおよびIgG3をヒンジ領域下の特定の部位で切断し、インтактなF(ab')₂およびFcフラグメントを生成します。

FabRICATORが消化できない一部のマウスIgG2aは、FabRICATOR Zで容易に消化されますが、より長いイン

キュベーション時間が必要な場合があります。なお、酵素の特異性が高いため、過消化のリスクはありません。

製品フォーマット



FragIT™ Z

スピナラムに酵素を固定した製品



FabRICATOR® Z

酵素の凍結乾燥品



FragIT™ Z kit

FragITとCaptureSelect™
(Fcフラグメント精製カラム)のセット

Thermo Scientific™ CaptureSelect™ resin from Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries.

Thermo Scientific and CaptureSelect are trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries.

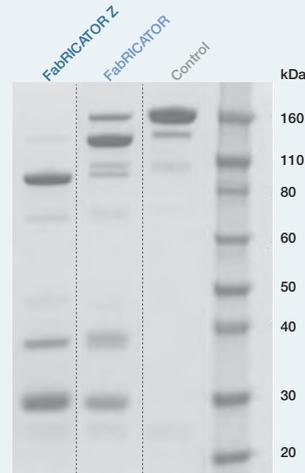
FabRICATOR® Zを利用したマウスMouse IgG2aの消化



ここでは、FabRICATOR Z(IdeZ)とFabRICATOR(IdeS)を用いて、マウスIgG2aの消化を行いました。2時間のインキュベーション後、FabRICATOR Z(IdeZ)はマウスIgG2aを容易に消化することがわかりました。一方、FabRICATORは少量の抗体しか消化できないことがわかりました。

Digestion of mouse IgG2a using FabRICATOR Z and FabRICATOR.

The F(ab')₂ fragment is detected at ~110kDa and the Fc fragments at ~30kDa. The enzyme is detected at ~37kDa.

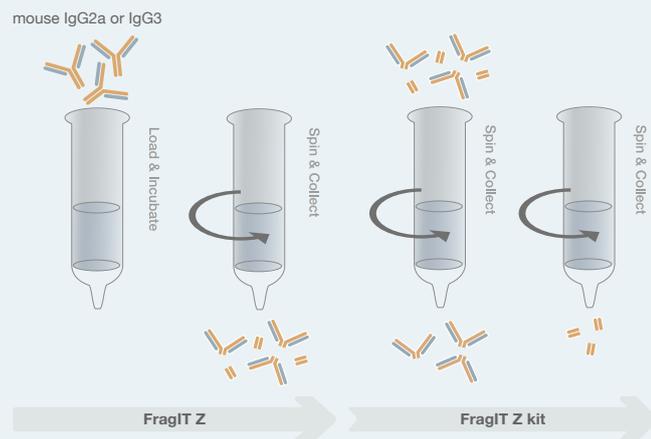


FragIT™ Z Kitを利用したマウスIgG2aおよびIgG3サブユニットの調製



サンプル中に酵素が残存しないように、迅速かつ容易にマウスIgG2aを消化する必要があるアプリケーションには、FabRICATOR Zをアガロースビーズに固定化したFragIT Zスピンカラムを使用することが可能です。FragIT Z kitを用いて、均質なF(ab')₂とFcフラグメントをアフィニティー精製カラムで分離し、純粋な抗体フラグメントを調製することが可能です。

Schematic overview of FragIT Z and FragIT Z kit. Generation and purification of F(ab')₂ and Fc fragments from mouse IgG2a and IgG3 using FragIT Z and FragIT Z kit.



FabRICATOR® Z



| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|--------------------------|------------------|------------|
| FabRICATOR Z, 2000 units | Digests 2 mg IgG | A0-FRZ-020 |

FragIT™ Z



| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|---------------------------------|-------------------------|------------|
| FragIT Z, Microspin 2 × 0.5 mg | Digests 2 × 0.5 mg IgG | A0-FZ6-010 |
| FragIT Z, Microspin 5 × 0.5 mg | Digests 5 × 0.5 mg IgG | A0-FZ6-025 |
| FragIT Z, Microspin 10 × 0.5 mg | Digests 10 × 0.5 mg IgG | A0-FZ6-050 |

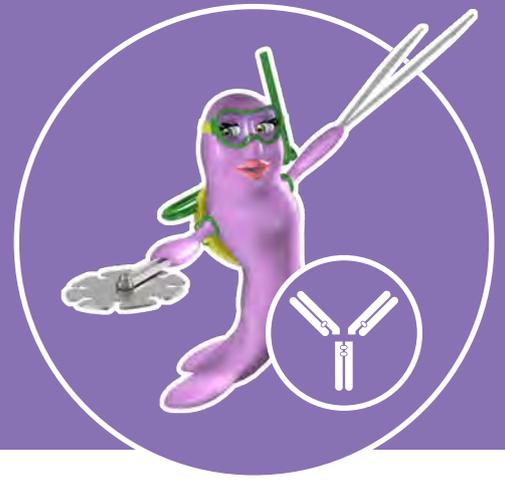
FragIT™ Z kit



| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|------------------------------------|-------------------------------------|------------|
| FragIT Z kit, Microspin 0.5 mg | Digests and purifies 0.5 mg IgG | A2-FZ2-005 |
| FragIT Z kit, Microspin 5 × 0.5 mg | Digests and purifies 5 × 0.5 mg IgG | A2-FZ2-025 |

FabULOUS™

IgG1ヒンジ領域上部を切断



FabULOUS (SpeB) はシステインプロテアーゼであり、様々な種やサブクラスの IgG のヒンジ領域を消化し、均一な Fab フラグメントのプールを生成します。調製された Fab フラグメントは、アフィニティ研究、Fab グリコシル化研究、構造研究などに使用することが可能です。

-  Human IgG and IgG from mouse, rat, goat, sheep and rabbit.
-  KTHT / CPPCPAP (human IgG1)
-  60 min reaction
-  Requires reducing conditions

抗体の消化ワークフロー



FabULOUSはIgGを消化し、FabとFcフラグメントを生成します。ヒトIgG1上の主要な切断部位は、アミノ酸T225とC226の間です。酵素であるFabULOUSは、マウス(マウスIgG1など)、ラット、ヤギ、ヒツジ、ウサギ

などを含む多様な種およびサブクラスのIgGを消化します。本酵素がIgGに対して活性を示すためには還元条件を必要とし、強い還元条件を用いた場合にはジスルフィド結合が還元される可能性があります。

反応は中性pHおよび還元条件下で行われ、37℃で1時間インキュベートすると消化が完了します。

製品フォーマット



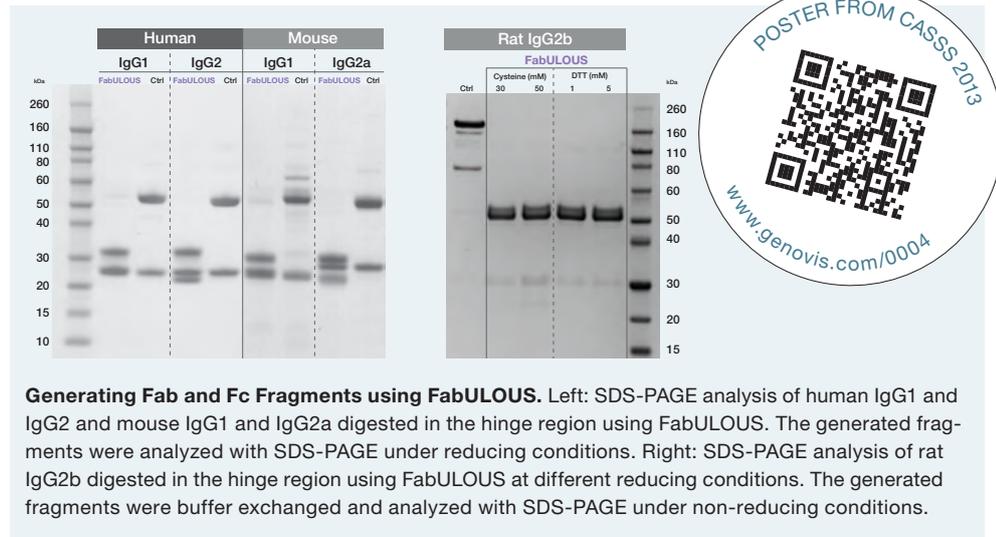
FabULOUS™
酵素の凍結乾燥品



FabULOUS™ Fab kit
酵素の凍結乾燥品と CaptureSelect™
LC-kappa (mur)(Fabフラグメント精製カラム)のセット

FabULOUS™を利用したFabおよびFcフラグメントの生成

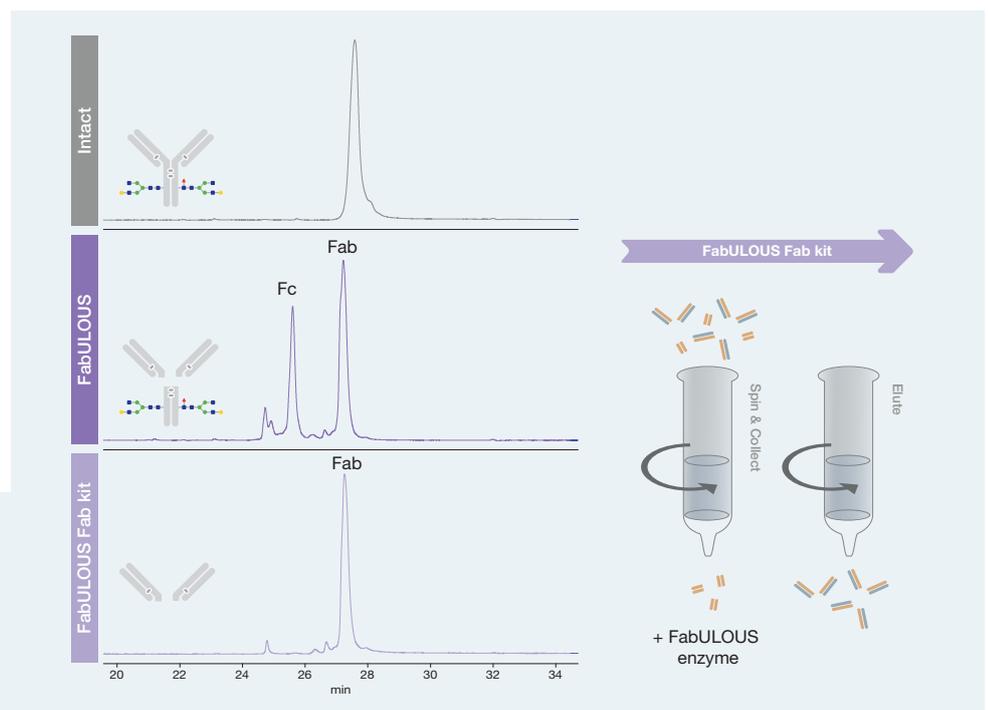
酵素によるインтактな抗体フラグメントの調製は、非特異的な酵素活性のために、様々な動物種やサブクラスのIgGでは困難な場合があります。FabULOUS は、マウスやヒトを含む数種類の IgG からインтактな Fab フラグメントを生成することができる貴重な研究ツールです。一部の動物種のIgG では、FabULOUSは穏やかな還元条件下で活性を発揮し、抗体の鎖間ジスルフィド結合を還元することなくインтактなFabフラグメントを生成することが可能です。また、より強い還元条件下で消化した後にバッファー交換を行うと、インтактなFabフラグメントを得ることができます。これにより、Fabフラグメント中のジスルフィド結合の再結合が可能となります。



Generating Fab and Fc Fragments using FabULOUS. Left: SDS-PAGE analysis of human IgG1 and IgG2 and mouse IgG1 and IgG2a digested in the hinge region using FabULOUS. The generated fragments were analyzed with SDS-PAGE under reducing conditions. Right: SDS-PAGE analysis of rat IgG2b digested in the hinge region using FabULOUS at different reducing conditions. The generated fragments were buffer exchanged and analyzed with SDS-PAGE under non-reducing conditions.

FabULOUS™ Fab Kitを利用したマウスIgGからのFabフラグメントの生成と精製

切断用の酵素であるFabULOUS (凍結乾燥品) と CaptureSelect™ LC-Kappa (mur) アフィニティースピニングカラムで構成されており、マウスIgGからFabフラグメントを簡単に精製することができます。凍結乾燥品のFabULOUSを用いて60分以内で抗体を消化し、その後、Fabフラグメントはアフィニティースピニングカラムに結合し、容易に溶出可能です。FabULOUS Fab Kitを用いてマウス IgG1 から調製した Fab フラグメントをここに示します。



Generation and purification of Fab fragments from mouse IgG1. The top panel shows the intact monoclonal mouse IgG1 antibody, the middle panel shows the analysis of the fragments after FabULOUS digestion, and the bottom panel shows the eluted Fab fragments from the CaptureSelect™ LC-Kappa (mur) column.

FabULOUS™

| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|----------------------|------------------|------------|
| FabULOUS, 2000 units | Digests 2 mg IgG | A0-PU1-020 |

FabULOUS™ Fab kit

| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|-------------------------|-------------------------------------|------------|
| FabULOUS Fab kit, mouse | Digests and purifies 2 mg mouse IgG | A1-PFK-020 |

GingisKHAN®

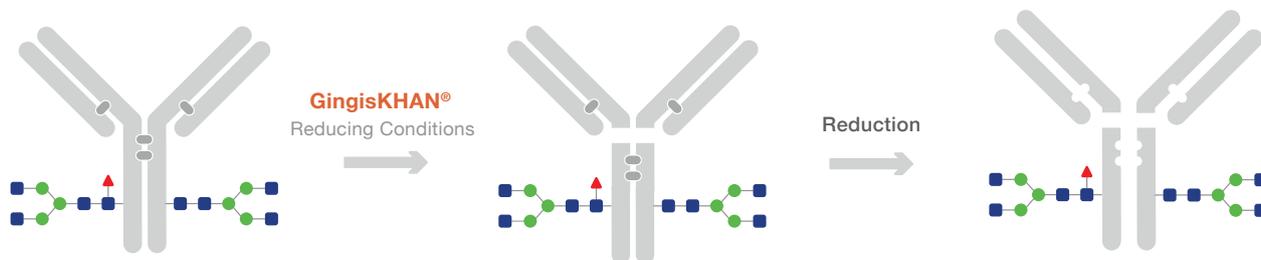
ヒトIgG1ヒンジ領域上部を切断



GingisKHAN (Kgp) は、ヒンジ領域の上流の特定の部位でヒトIgG1を切断し、インタクトで均質なFabおよびFcフラグメントを生成するシステインプロテアーゼです。この酵素は、LC-MSを使用した抗体ベースの生物学的治療法の特性評価、Fcグリカン分析、二重特異性抗体、親和性および結合力の影響の研究および翻訳後修飾の特定に使用されます。

-  Human IgG1
-  KSCDK / THTCPPCP
-  60 min reaction
-  Requires mild reducing conditions. 2mM cysteine is included

抗体のサブユニット化ワークフロー



GingisKHAN(Kgp)は、ヒンジ領域の上流の特定の部位でヒトIgG1を切断し、インタクトで均質なFabおよびFcフラグメントを

生成するシステインプロテアーゼです。この酵素は、LC-MSを使用した抗体ベースの生物学的治療法の特性評価、

Fcグリカン分析、二重特異性抗体、親和性および結合力の影響の研究および翻訳後修飾の特定に使用されます。

製品フォーマット



GingisKHAN®
酵素の凍結乾燥品



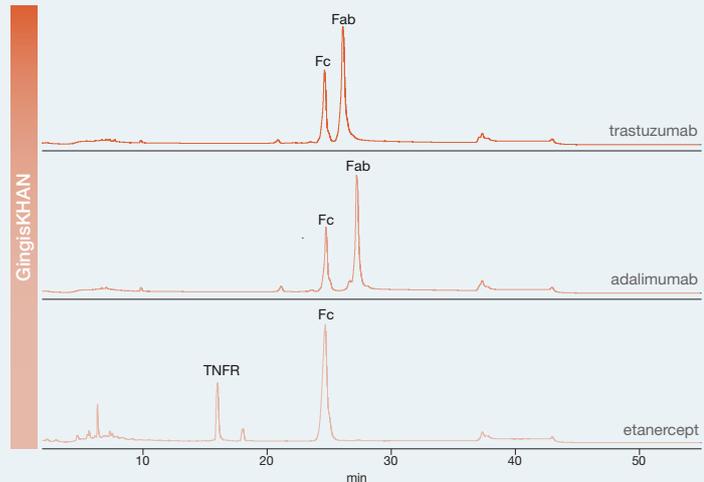
GingisKHAN® Fab kit
酵素の凍結乾燥品と CaptureSelect™ CH1 (Fabフラグメント精製カラム)のセット

Thermo Scientific™ CaptureSelect™ resin from Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries.
Thermo Scientific and CaptureSelect are trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries.



GingisKHAN®を利用した モノクローナル抗体およびFc融合タンパクの消化

Fc融合タンパクや変異したヒンジ領域を有する抗体を、より小さなサブユニットに特異的に分解することは困難です。酵素であるGingisKHANは、ヒトIgG1のヒンジ領域上部の露出したリジン1ヶ所を還元条件下で消化します。必要な還元条件は、鎖内および鎖間のジスルフィド結合を維持するのに十分マイルドであり、その結果、インтактなFabおよびFcフラグメントが得られます。ここでは、モノクローナルヒトIgG1抗体とFc融合タンパクをGingisKHANと37°Cで1時間インキュベートし、HPLCを用いて分析しました。その結果、得られたフラグメントは、GingisKHANの効率的な消化により、トラスツマブとアダリムマブからはインтактなFabフラグメントを生成し、エタネルセプトの融合TNFRドメインからFc部分を分離することを示しています。



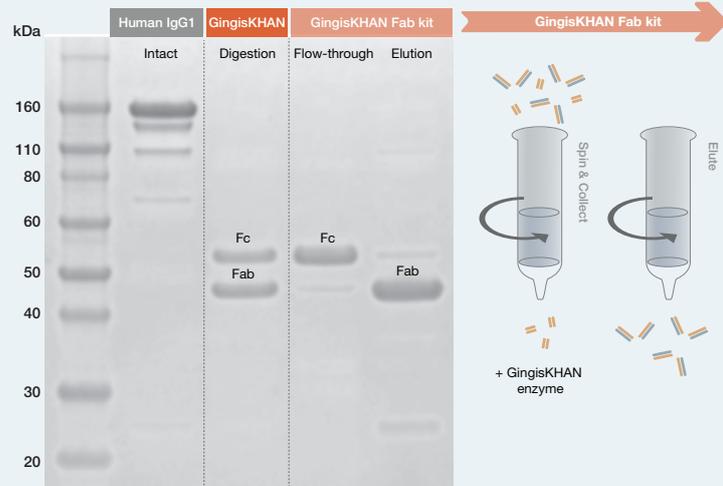
Specific digestion of human IgG1 using GingisKHAN. LC separation of Fab and Fc fragments from a selection of therapeutic antibodies (trastuzumab and adalimumab) and a Fc-fusion protein (etanercept) after GingisKHAN digestion.

GingisKHAN® Fab Kitを利用した高純度ヒトIgG1 Fabフラグメントの調製



GingisKHAN Fab kitを用いることで、高純度かつインтактなヒトIgG1 Fabフラグメントを作製・精製することができます。ここではGingisKHANの消化により、トラスツマブのFabフラグメントを作製し、このフラグメントをCaptureSelect™ human CH1 スピニングカラムを用いてアフィニティ精製を行いました。フロースルーにはトラスツマブFcとともに酵素が回収され、また、pHを下げることで容易にFabを溶出可能でした。

SDS-PAGE analysis under non-reducing conditions of the human IgG1 trastuzumab digested by GingisKHAN. After digestion, the Fab fragments were captured in the affinity spin column and could easily be eluted.



GingisKHAN®



| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|------------------------|-------------------------|------------|
| GingisKHAN, 2000 units | Digests 2 mg human IgG1 | B0-GKH-020 |

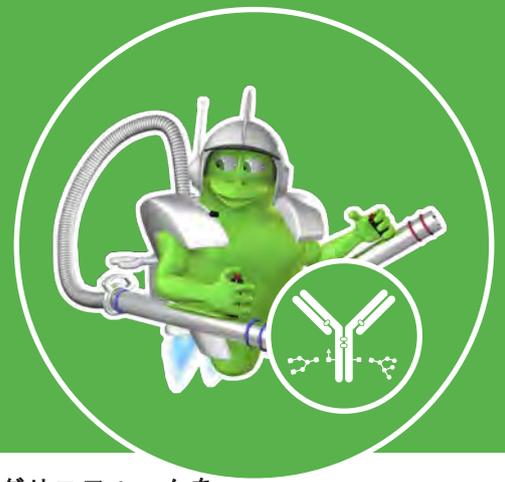
GingisKHAN® Fab kit



| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|--------------------|--------------------------------------|------------|
| GingisKHAN Fab kit | Digests and purifies 2 mg human IgG1 | B0-GFK-020 |

GlycINATOR®

IgG Fc領域の糖鎖を加水分解



GlycINATOR (EndoS2) は、Fc領域のグリコシル化された部位に存在する全てのグリコフォームを加水分解するIgG特異的なエンドグリコシダーゼです。この酵素はネイティブIgGに作用し、フコースの有無を問わず、コアGlcNAcを残します。本酵素は、アフコシル化（非フコシル化）研究のために抗体ベースの治療薬の複雑さを軽減する目的に使用されています。また、当社のGlyCLICKおよびTransGLYCITプラットフォームの初期ステップにおいても使用されています。

- 

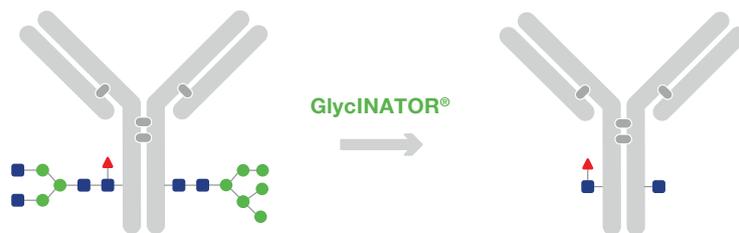
Human IgG1-4, Fc-fusion proteins, IgG from mouse, rabbit, rat, monkey, sheep, goat, cow and horse
- 

Hydrolyzes the β 1,4-linkage between the two innermost GlcNAc residues
- 

30 min reaction
- 

Requires native IgG fold

抗体の脱グリコシル化ワークフロー



N-結合型糖鎖をトリミングするために、酵素であるGlycINATORはFc領域のネイティブなフォールディングを必要とします。この酵素は、Fc領域の糖鎖の最も内側の2つのGlcNAc残基間の β 1,4-

結合を加水分解し、Fc領域上のコアGlcNAcをインタクトに残します。Fc領域のグリコシル化部位は多くの生物種で保存されており、GlycINATORは複数の生物種およびサブクラスの抗体を

脱グリコシル化することが可能です。高マンノース型、ハイブリッド型、複合型およびバイセクト型糖鎖を含むすべてのIgGのグリコフォームを効率的に加水分解します。

製品フォーマット



GlycINATOR®
酵素の凍結乾燥品



Immobilized GlycINATOR®
スピニングカラムに酵素を固定した製品

GlycINATOR®

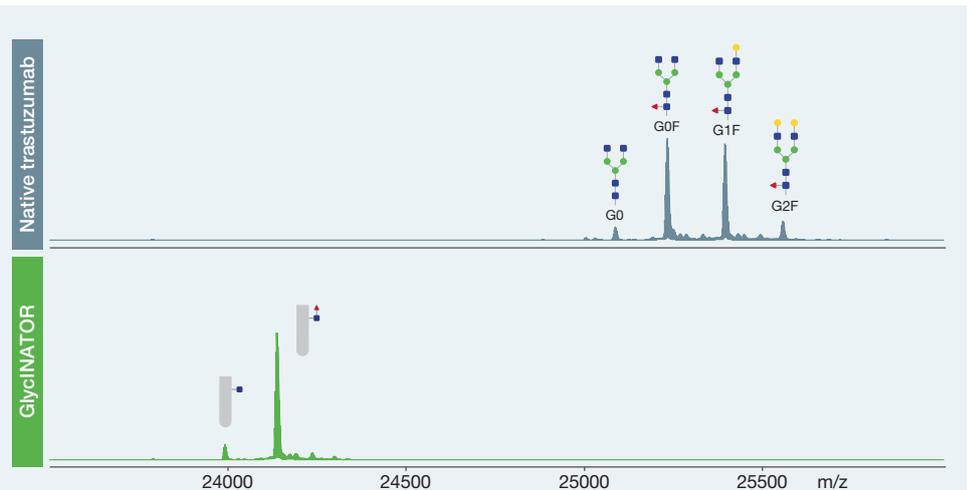


| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|---|-------------------------|------------|
| GlycINATOR, 2000 units | Deglycosylates 2 mg IgG | A0-GL1-020 |
| GlycINATOR LE (low endotoxin), 2000 units | Deglycosylates 2 mg IgG | A0-GL8-020 |

GlycINATOR®を利用したFc領域の糖鎖の加水分解

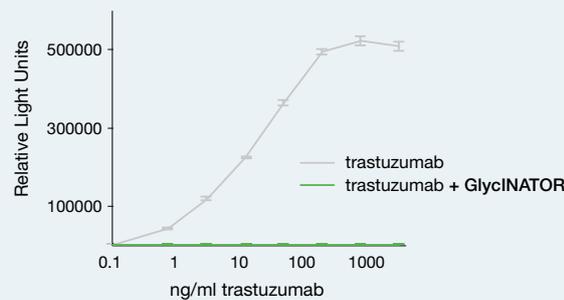
治療用抗体に対するGlycINATORの活性を特徴付けるために、GlycINATORをトラストズマブと37°Cで30分間インキュベートしました。次に、この抗体をFabRICATOR (IdeS) で消化し、LC-MS分析に適したF(ab')₂およびFc/2フラグメントを生成しました。抗体がGlycINATORとインキュベートされた際、フコースの有無を問わず、コアGlcNAc以降のグリコフォームが加水分解されていることを結果は実証しています。

LC-MS characterization of Fc glycan hydrolysis by GlycINATOR. Native and GlycINATOR-treated trastuzumab was digested with FabRICATOR to generate Fc/2 fragments before LC-MS analysis.



GlycINATOR®によって脱グリコシル化された抗体はADCCを誘発しない

IgGにおけるN-結合型糖鎖の脱グリコシル化は受容体への結合、ひいては抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)に影響を及ぼす可能性があります。細胞ベースのiLite® ADCCアッセイを用いて、ネイティブおよび脱グリコシル化トラストズマブのADCC誘導能を解析しました。ネイティブな抗体は、添加量を増やすと予想通りシグナルが増加しました。しかし、GlycINATORで脱グリコシル化された抗体は、より多くの量を投与してもシグナルを示さず、GlycINATOR処理後にADCC活性が消失したことが示唆されました。



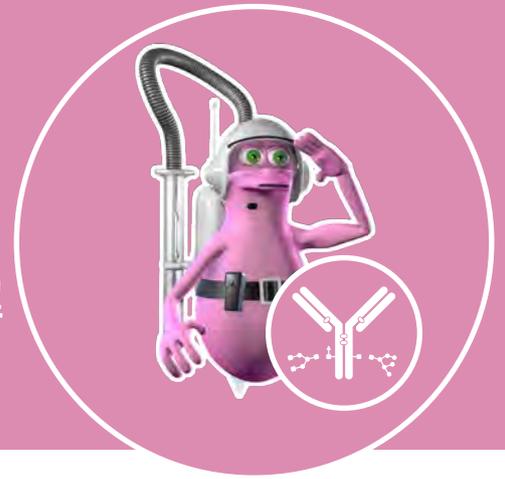
Study of ADCC by native and deglycosylated trastuzumab. The effect of trastuzumab was analyzed using iLite ADCC Effector (V) Assay Ready Cells (BM4001) and iLite ADCC Target HER2 (+) Assay Ready Cells (BM4011). Effector and Target cells were diluted and mixed with the antibody solutions. Incubation was performed at 37°C and 5% CO₂. Luminescence reading was performed after 6 h.

Immobilized GlycINATOR®

| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|---|--------------------------------|-------------|
| Immobilized GlycINATOR, Microspin 2 × 0.5 mg | Deglycosylates 2 × 0.5 mg IgG | A0-GL6-010 |
| Immobilized GlycINATOR, Microspin 5 × 0.5 mg | Deglycosylates 5 × 0.5 mg IgG | A0-GL6-025 |
| Immobilized GlycINATOR, Microspin 10 × 0.5 mg | Deglycosylates 10 × 0.5 mg IgG | A0-GL6-050 |
| Immobilized GlycINATOR, Midispin 1-10 mg | Deglycosylates 1-10 mg IgG | A0-GL6-100 |
| Immobilized GlycINATOR, Maxispin 10-100 mg | Deglycosylates 10-100 mg IgG | A0-GL6-1000 |

IgGZERO®

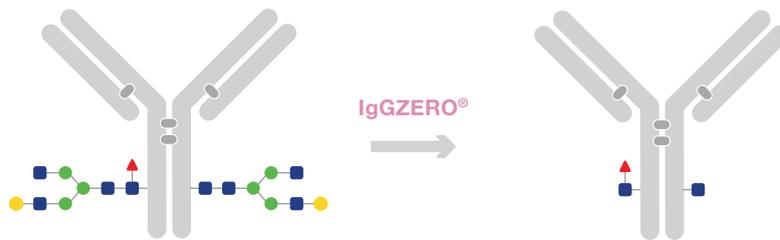
Fc領域の複合型N-結合型糖鎖を加水分解



IgGZERO (EndoS) は、Fc領域のグリコシル化部位の複合型N-結合型糖鎖を加水分解するIgG特異的なエンドグリコシターゼです。この酵素は、コアGlcNAc以降のIgGを脱グリコシル化し、高マンノース型およびハイブリッド型糖鎖には限られた活性しか示しません。本酵素は、サンプルの複雑さを迅速に軽減し、免疫アッセイにおけるFc領域を介したエフェクター機能を不活性化し、Fc領域の相互作用を低減することでイメージングを向上させるツールとして使用されています

-  Human IgG1-4, Fc-fusion proteins, IgG from mouse, rabbit, rat, monkey, sheep, goat, cow and horse
-  Hydrolyzes the β 1,4-linkage between the two innermost GlcNAc residues
-  30 min reaction
-  Requires native IgG fold

抗体の脱グリコシル化ワークフロー



酵素であるIgGZEROはIgGのFc領域のグリコシル化部位のN-結合型糖鎖を特異的に加水分解します。GLYCINATORとは対照

的に、IgGZEROは高マンノース型およびハイブリッド型糖鎖に対する活性は限定的です。複合型の加水分解は高速で、本酵素

の活性にはネイティブなIgGフォールディングが必要なため、ネイティブな生理的条件下で行われます。

製品フォーマット



IgGZERO®
酵素の凍結乾燥品



deGlycIT™
スピニングカラムに酵素を固定した製品

IgGZERO®



| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|--|-------------------------|------------|
| IgGZERO, 1000 units | Deglycosylates 1 mg IgG | A0-IZ1-010 |
| IgGZERO, 5000 units | Deglycosylates 5 mg IgG | A0-IZ1-050 |
| IgGZERO LE (low endotoxin), 2000 units | Deglycosylates 2 mg IgG | A0-IZ8-020 |



N-結合型糖鎖を分解するグリコシダーゼの比較

GlycINATOR、IgGZERO、EndoHはN-結合型糖鎖のコアGlcNAc間に作用するエンドグリコシダーゼであり、PNGase FはコアGlcNAcとペプチド鎖の結合に作用する

一般的なアミダーゼです。GlycINATORとIgGZEROはIgGのFc領域の糖鎖に特異的であり、EndoHは高マンノース型糖鎖に対する一般的なエンドグリコシダーゼです。

PNGase Fはすべての哺乳類のN-結合型糖鎖に広く作用しますが、コアGalNAcが α 1-3フコシル化された糖鎖は加水分解できません。

| | GLYCINATOR | IGGZERO | PNGASE F | ENDO H |
|-----------------------|-------------------|---|--|---|
| Digestion site | | | | |
| Works on native IgG | Yes | Yes | Yes | Yes/No |
| pH optimum | 7.4 | 7.4 | 7.5 | 5-6 |
| Reaction time | 30 min | 30 min | 15 min + | 1-16 h |
| IgG specific | Yes* | Yes | No | No |
| Glycoform specificity | All Fc glycoforms | Complex Fc glycoforms, limited activity on high-mannose and hybrid-type glycans | All glycoforms except core α 1,3 fucosylation | High-mannose and some hybrid-type glycans |

* GlycINATOR has one more known substrate, α -1-acid glycoprotein.

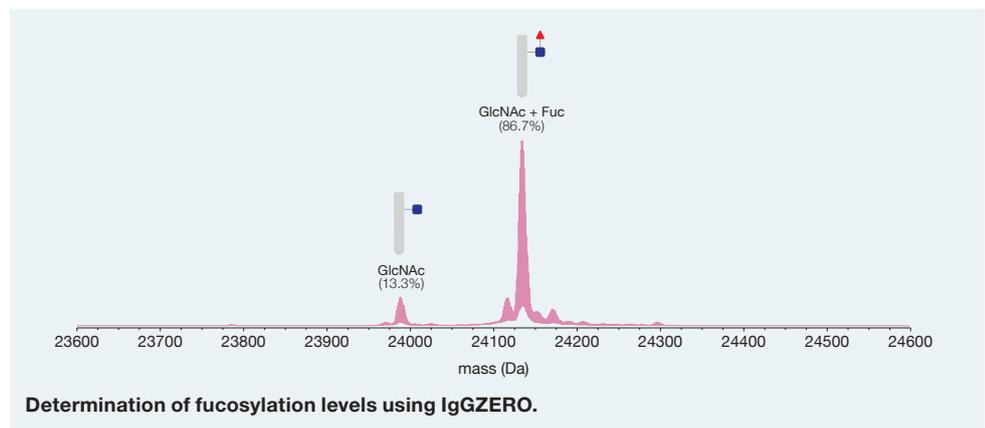
IgGZERO®を利用したクローン選択におけるフコシル化の度合いの利用



治療用抗体のFc領域のN-結合型糖鎖上にコアGlcNAcにフコースが存在しないことは、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)の増加と関連しており、多くの治療用抗体にとって望ましい特性です。IgGZEROは、不均質なFc糖鎖を除去し、フコシル化された最内のGlcNAc残基のみを残すことにより、サンプルの複雑さを迅速に軽減するので、MSデータの解釈が大幅に簡素化されます。IgGZEROを用いたフコシル化の度合いを調べる技術が、Institute PasteurとLFB Biotechnologiesの研究者によって開発されました。簡単に説明すると、

細胞上清を濃縮し、FabRICATORとIgGZEROで処理し還元した後、LC-MSで分析を行います。これにより、抗体の

フコシル化レベルを容易に決定し、クローン選択を迅速化することができました(Henninot et.al., 2015)。



References

Henninot, A. et al. *Characterization of monoclonal antibodies by a fast and easy LC- MS ToF analysis on culture supernatant.* Anal Biochem 1-8 (2015).

deGlycIT™



| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|------------------------------|-----------------------------|-------------|
| deGlycIT, Microspin 2×0.5mg | Deglycosylates 2×0.5mg IgG | A0-IZ6-010 |
| deGlycIT, Microspin 5×0.5mg | Deglycosylates 5×0.5mg IgG | A0-IZ6-025 |
| deGlycIT, Microspin 10×0.5mg | Deglycosylates 10×0.5mg IgG | A0-IZ6-050 |
| deGlycIT, Midispin 1-10mg | Deglycosylates 1-10mg IgG | A0-IZ6-100 |
| deGlycIT, Maxispin 10-100mg | Deglycosylates 10-100mg IgG | A0-IZ6-1000 |

GlyCLICK®

ネイティブなIgGを部位特異的に修飾



GlyCLICKは、3ステップによるFc領域特異的かつ定量的なIgG抗体の修飾テクノロジーであり、複数の動物種・サブクラスに対応しています。Fc領域のグリカンの特異的に加水分解することにより、クリックケミストリーを利用してコアとなるGlcNAcに対して修飾が可能となります。その結果、標識度(DOL)または抗体-薬物比(DAR)は2.0になります。信頼性の高いパフォーマンスにより、高感度が要求されるアプリケーションにおいて、定量的な修飾と免疫反応性が保証されます。このテクノロジーはさまざまなキット形式で利用することが可能となっています。

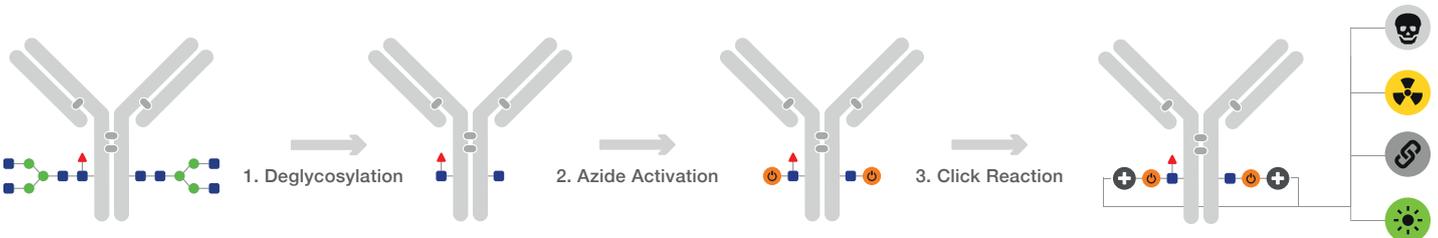
- 

Human IgG1-4, IgG from mouse, rabbit, rat, monkey, sheep, goat, cow and horse
- 

Conjugation occurs at the Fc N-glycan sites
- 

2-3 day protocol
- 

Alexa Fluor®, biotin, DFO, MMAE, PNU, Azide activation



脱グリコシル化: 複数の動物種・サブクラスのIgGに対して、Fc領域に特異的に作用するエンドグリコシダーゼであるGlycINATOR® (EndoS2)は、最も内側のGlcNAcにつながるFc領域のグリカンを加水分解します。この酵素は、ハイマンノース型、ハイブリッド型、バイセクト型、複合型のグリカンを除去します。

アジド導入による活性化: β -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ(Y289L)1とUDP-GalNAzを使用して、露出したGlcNAcに酵素的にGalNAzが結合し、活性のあるアジド基を有する抗体を生成します。これはsDIBOやDBCOといった反応性を持った機能的なシクロオクチン化合物と反応します。

クリック反応: 活性のあるアジド基を有する抗体は、生体直交型反応を利用して機能性のあるラベルで修飾することが可能です。これは歪み促進型アジド-アルキン付加環化(Strain-promoted alkyne-azide cycloaddition, SPAAC)を経由して、安定なトリアゾール環の形成を介しています。

製品フォーマット



GlyCLICK® Fluorophore
Alexa Fluor® (488, 555, 647)修飾用キット



GlyCLICK® Affinity
ビオチン修飾用キット



GlyCLICK® Chelator
DFO (desferrioxamine)修飾用キット



GlyCLICK® ADC
MMAE または PNU² 修飾用キット



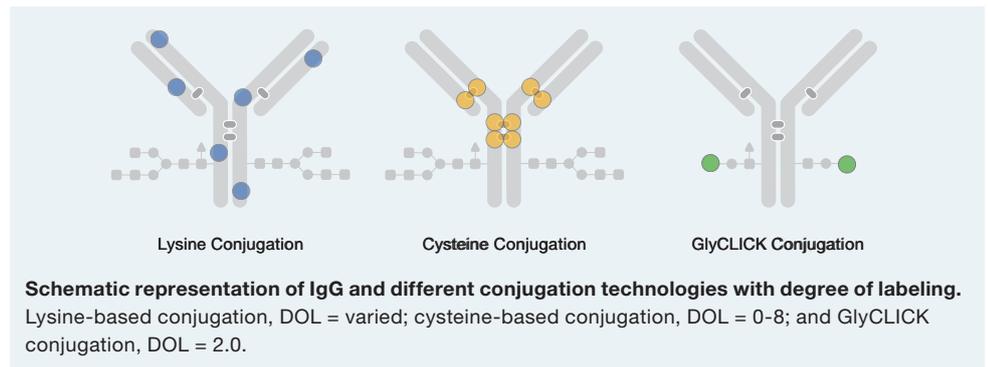
GlyCLICK® Azide Activation
アジド修飾用キット
アルキンによるクリック反応向け



GlyCLICK®を利用した次世代の抗体修飾について

従来の抗体修飾はランダム性の高い方法を使用しています。具体的には、リシン残基にあるアクセスが容易なアミンまたは溶媒によってアクセス可能になる鎖間のシステインに修飾・ラベルを行います。そのような方法においては、用途は広いですが、標識度(DOL)やサイト占有率のコントロールが制限されます。したがって、それらが最終製品の安定性、免疫反応性および再現性に影響する傾向があります。部位特異的な修飾方法は、こういった制限を打開するための魅力的なオプションですが、プロセスを制御・

安定化するためのエンジニアリングを要することも多いです。GlyCLICKによるFcグリカン部位での結合は、部位特異的であるだけでなく、Fc部位のグリカンを修飾することにより、免疫細胞にあるFc受容体(FcγR)との結合を阻害し、オフターゲット効果も減少させます。

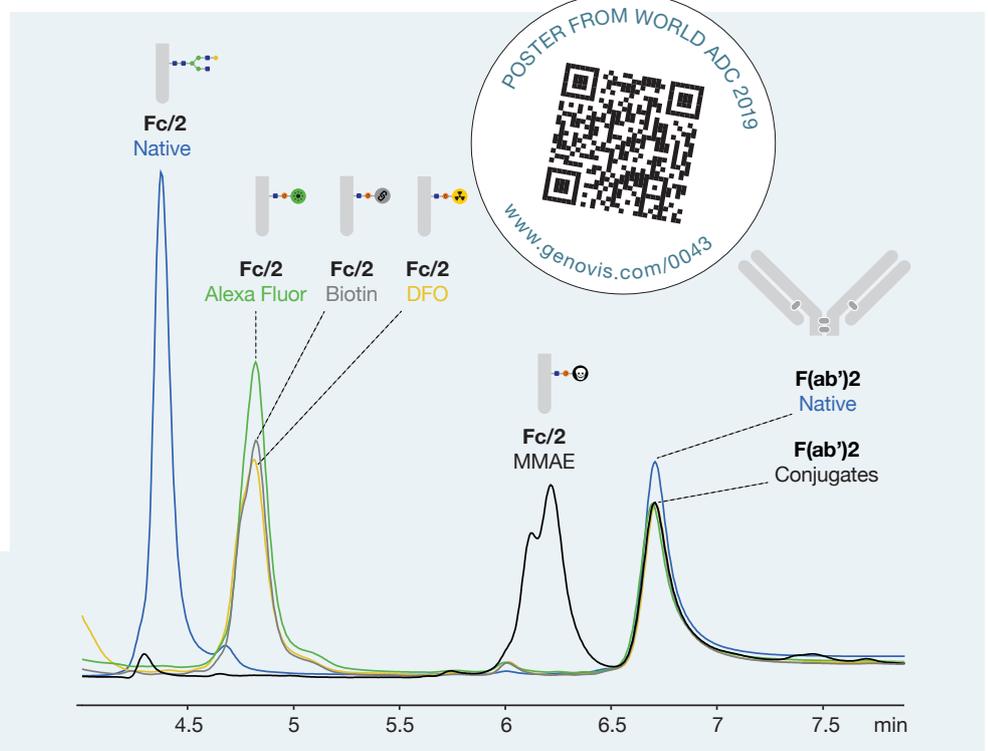


GlyCLICK®を利用した多様な目的に使用できる抗体ラベル化



酵素によるリモデリングと銅フリークリックケミストリー (SPAAC) の組み合わせにより、sDIBOやDBCOラベルなどの任意のシクロオクチンラベルを使用することが可能になります。これにより、GlyCLICKは、抗体に対して部位特異的に修飾を行うことができます。GlyCLICKを使用して得られた均質性を実証するために、パニツムマブに対して様々なラベルで修飾を行い、F(ab')₂およびFc / 2サブユニットレベルでRP-HPLCにより分析しました。ネイティブなコントロールと比較した場合、結果として得られたピークは、ラベルされたFc / 2サブユニットのもののみ検出されたことを示しています。つまり、使用されているラベルのタイプとは関係なく、GlyCLICKがFc-グリカン部位で特異的に修飾できることを示しています。

Analysis of Fc glycan conjugation using GlyCLICK. RP-HPLC analysis of unmodified panitumumab and panitumumab conjugated with desferrioxamine (DFO), Alexa Fluor® 488, biotin or monomethyl auristatin E (MMAE) after digestion with FabRICATOR.



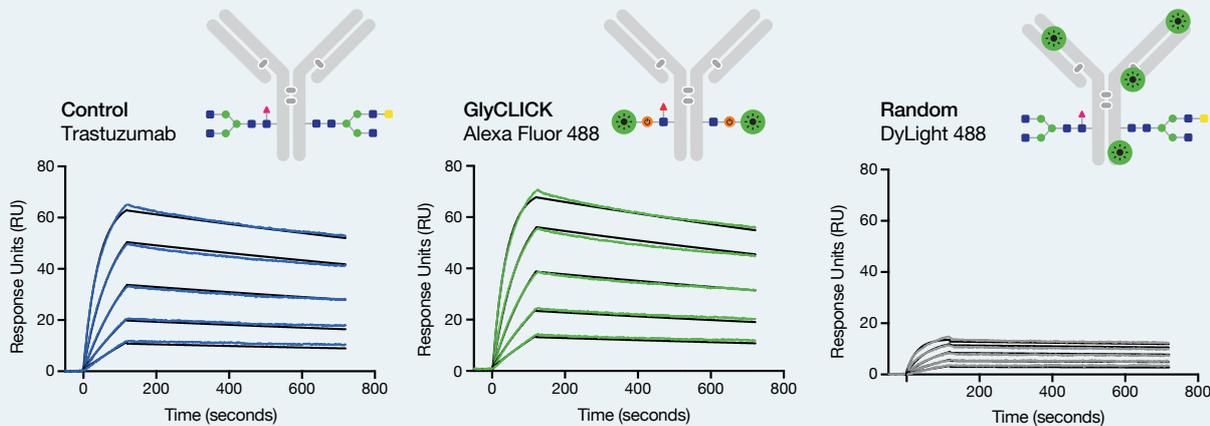
1. SiteClick™ is provided under an intellectual property license from Life Technologies Corporation. The trademark SiteClick™ is the property of Life Technologies Corporation.
2. Linker-toxin Payloads included in GlyCLICK® are provided under an intellectual property license from Glykos Finland Ltd.

信頼性の高い抗原検出

ランダムにラベルされた抗体を使用した免疫染色が、その結果イメージの品質に影響する可能性があります。これは、抗原が結合するFab領域での、過剰なラベルまたはラベルによる免疫反応性の障害に起因する、不十分なシグナルや非特異的結合によるものです。

ラベル化した抗体の免疫反応性を評価するために、トラスツマブを部位特異的にGlyCLICK によってAlexaFluor®488でラベル、またはNHS-activated DyLight® 488によってリシン残基にランダムにラベルを行いました。

表面プラズモン共鳴 (SPR) 応答曲線は、ランダムにラベルされたものでは、20%のみの結合能力を保持していたのに対し、GlyCLICKで修飾した抗体では、高感度かつ信頼性の高い完全な免疫反応性を保持していることが示されました。



Affinity analysis of native and conjugated trastuzumab. Anti-human IgG (Fc) was used as the capturing molecule for trastuzumab. Native (control), Alexa Fluor® 488 (GlyCLICK, DOL=2), DyLight® 488 (random, DOL=10). HER2 was injected in a range to ensure sufficient curvature. All data were fitted against a 1:1 mathematical model.

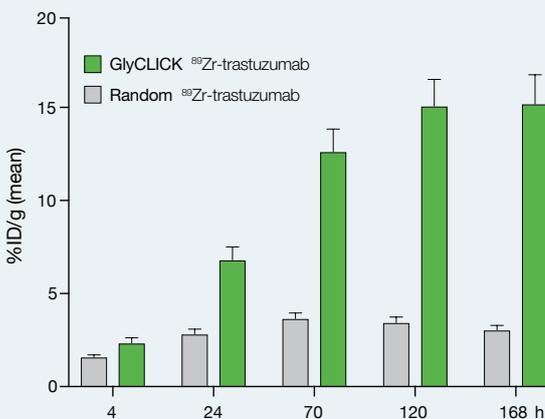
GlyCLICK®により修飾された抗体のIn Vivoにおけるパフォーマンス

GlyCLICKを使用して部位特異的に放射性ラベルされた抗体とリシン残基にランダムにラベルした抗体をPET / CTイメージングで使用してin vivoでの性能を評価しました。そのトレーサーは、担ガンマウスに対し注射により投与される前に、一度キレート化され、標準的な放射性同位元素であるジルコニウム-89 (^{89}Zr)で標識されました。

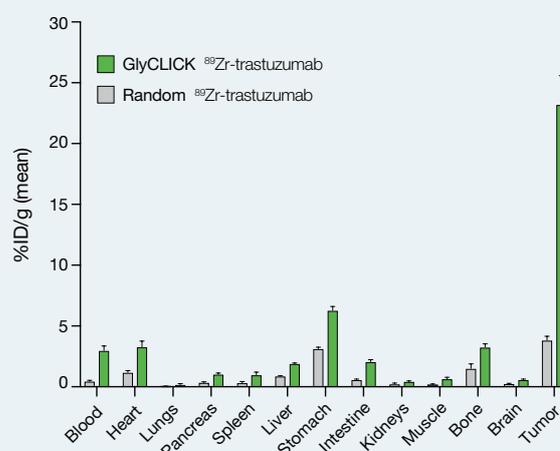
投与されたマウスの分析は、トレーサーの生体内分布と腫瘍取り込みを測定するために、PET / CTイメージングを使用して実施されました。結果は、ランダムにラベルされたトレーサーと比較して、GlyCLICKにより部位特異的なラベルトレーサーの優れた腫瘍取り込みと有意に長い循環時間を示しています。

GlyCLICKキット (DOL = 2) を使用して抗体ごとに結合するラベルの数が一定であると、in vivoでのパフォーマンスが向上するだけでなく、PETイメージング実験での定量化の可能性も高まります。

Tumor uptake



Biodistribution ex vivo



Analysis of PET/CT imaging of SK-OV-3 tumor-bearing mice. Mean tumor uptake (left panel) over a time interval of 0-168 hours post injection, and ex vivo biodistribution of ^{89}Zr -DFO-trastuzumab in major organs (right panel). Data was obtained in collaboration with Minerva Imaging (Copenhagen, Denmark).



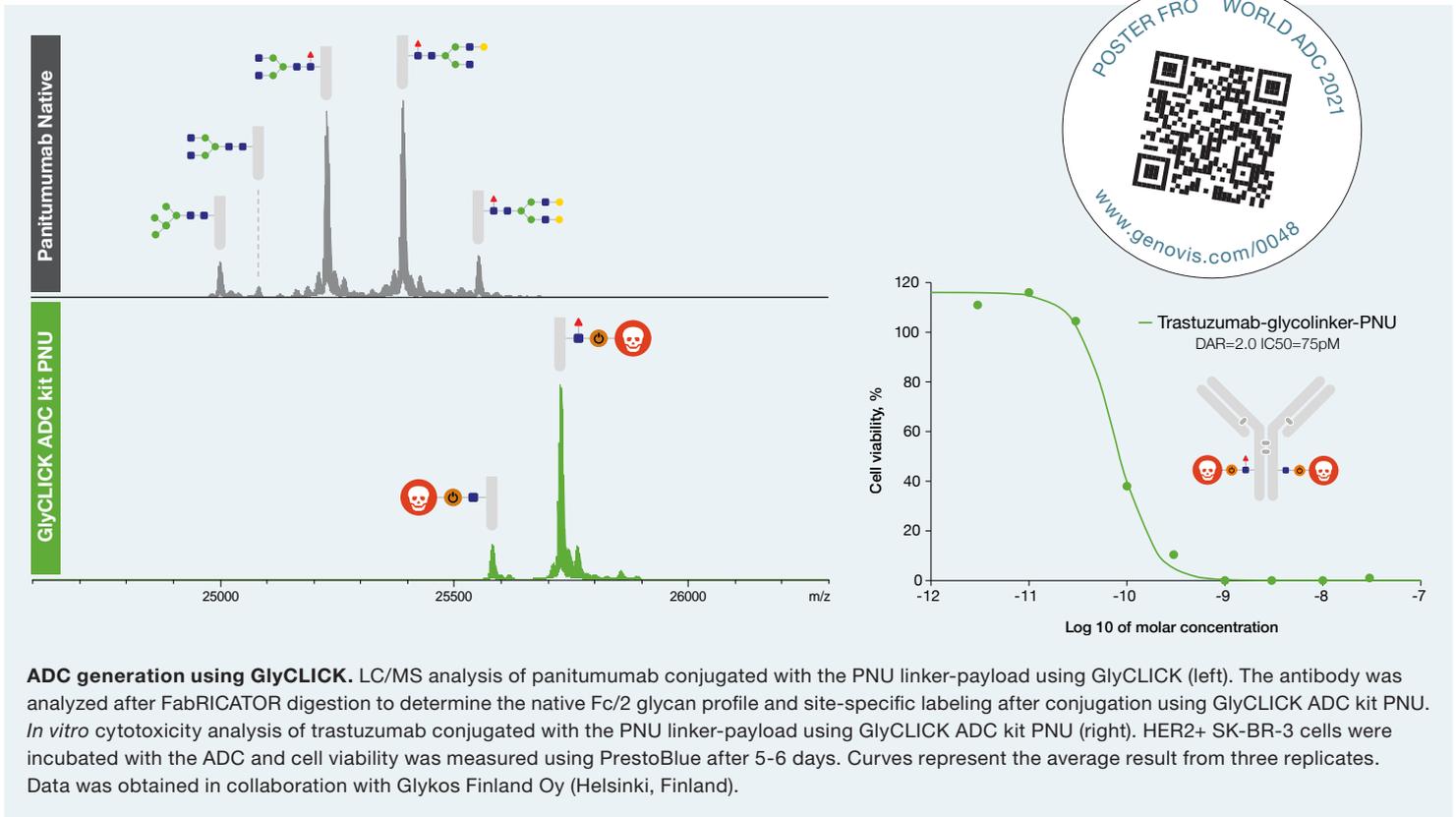
GlyCLICK® ADCキットを利用した非常に強力なADCの生成



MMAEまたはPNUのどちらかを運ぶ、2段階に切断可能なリンカー・ペイロードと任意のネイティブな抗体を結合させることができるようにGlyCLICK ADCキットはデザインされています。

GlyCLICKテクノロジーにより、DAR=2.0で抗体にリンカー・ペイロードを組み込んだ万全な修飾がもたらされます。このキットは、細胞内で薬物放出するために2段階で切断可能なリンカー・ペイロード

を備えた均質なADC、かつ、pMレンジで細胞毒性効果を示すコンジュゲートを生み出し、これは機能的で非常に強力なADCであることが示されています。



GlyCLICK® Fluorophore



| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|---------------------------|-------------------------|------------|
| GlyCLICK Alexa Fluor® 488 | Conjugates 250 µg IgG | L1-F01-025 |
| GlyCLICK Alexa Fluor® 488 | Conjugates 1 × 2 mg IgG | L1-F01-200 |
| GlyCLICK Alexa Fluor® 555 | Conjugates 250 µg IgG | L1-F02-025 |
| GlyCLICK Alexa Fluor® 555 | Conjugates 1 × 2 mg IgG | L1-F02-200 |
| GlyCLICK Alexa Fluor® 647 | Conjugates 250 µg IgG | L1-F03-025 |
| GlyCLICK Alexa Fluor® 647 | Conjugates 1 × 2 mg IgG | L1-F03-200 |

GlyCLICK® Affinity



| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|-----------------|-------------------------|------------|
| GlyCLICK Biotin | Conjugates 250 µg IgG | L1-A01-025 |
| GlyCLICK Biotin | Conjugates 1 × 2 mg IgG | L1-A01-200 |

GlyCLICK® Chelator



| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|--------------|-------------------------|------------|
| GlyCLICK DFO | Conjugates 250 µg IgG | L1-C01-025 |
| GlyCLICK DFO | Conjugates 1 × 2 mg IgG | L1-C01-200 |

GlyCLICK® ADC



| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|------------------------|-------------------------|------------|
| GlyCLICK ADC kit, MMAE | Conjugates 1 × 2 mg IgG | L1-T02-200 |
| GlyCLICK ADC kit, PNU | Conjugates 1 × 2 mg IgG | L1-T01-200 |

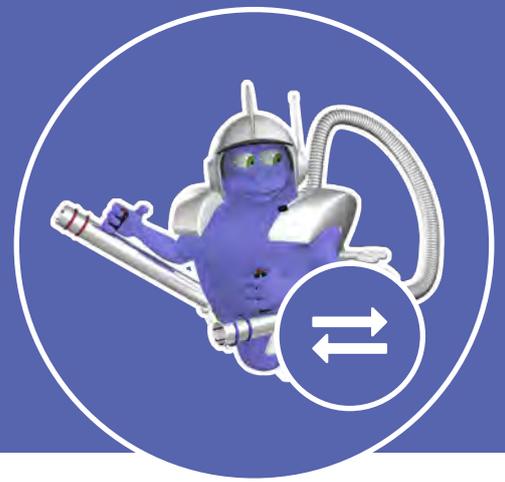
GlyCLICK® Azide Activation



| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|---------------------------|-------------------------|------------|
| GlyCLICK Azide Activation | Activates 250 µg IgG | L1-AZ1-025 |
| GlyCLICK Azide Activation | Activates 1 × 2 mg IgG | L1-AZ1-200 |
| GlyCLICK Azide Activation | Activates 1 × 10 mg IgG | L1-AZ1-100 |

TransGLYCIT™

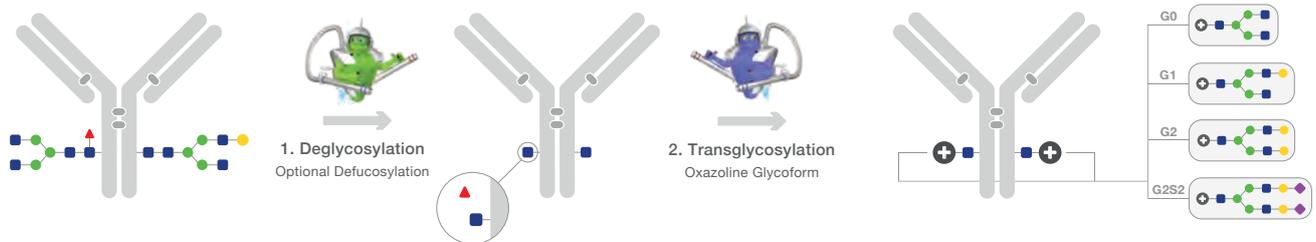
IgGをトランスグリコシル化



TransGLYCITは、ネイティブなヒトIgGを3時間以内に効率的にトランスグリコシル化するためのプラットフォーム技術です。酵素的リモデリングを用いて抗体のFc領域 N-結合型糖鎖をトランスグリコシル化する堅牢なワークフローにより、特定のグリコフォームを有する抗体調製物を得ることができます。この技術は、G0、G1、G2またはG2S2糖鎖プロファイル（±フコース）を有する抗体を作製するためのキット形式で提供されており、TransGLYCIT Afucosylated kitを使用してコアGlcNAcのフコースを除去するオプションも用意されています。

- 
Human IgG1, IgG2 and IgG4
- 
Transglycosylation occurs at the Fc N-glycan sites
- 
3 hour workflow
- 
Glycoform included, optional defucosylation using the Afucosylated kit

トランスグリコシル化ワークフロー



脱グリコシル化: Fc領域のN-結合型糖鎖は、IgG特異的な酵素であるImmobilized GlycINATOR (EndoS2)によって、コアGlcNAcにトリミングされます。この酵素はハイマンノース型、ハイブリッド型、バイセクト型および複合型を含むすべてのFc領域

のグリコフォームを加水分解します。アフコシル化(脱フコシル化)した糖鎖を得るために、Immobilized FucosEXO (TransGLYCIT Afucosylatedに含まれる)は α 1-6結合したコアフコースを加水分解します。

トランスグリコシル化: 人工設計されたグリコシターゼであるTransINATORはオキサゾリン反応性のG0、G1、G2またはG2S2グリコフォームとコアGlcNAcとの間のトランスグリコシル化反応を触媒します。

製品フォーマット



TransGLYCIT™
ヒトIgGの糖鎖リモデリング
(G0, G1, G2, G2S2)キット



TransGLYCIT™ Afucosylated
ヒトIgGの糖鎖リモデリング
(G0, G1, G2, G2S2+脱フコシル化)キット

TransGLYCIT™

| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|------------------------|--|------------|
| TransGLYCIT G0, 1 mg | Generates 1 mg human IgG with the G0 glycoform | T1-G0F-010 |
| TransGLYCIT G1, 1 mg | Generates 1 mg human IgG with the G1 glycoform | T1-G1F-010 |
| TransGLYCIT G2, 1 mg | Generates 1 mg human IgG with the G2 glycoform | T1-G2F-010 |
| TransGLYCIT G2S2, 1 mg | Generates 1 mg human IgG with the G2S2 glycoform | T1-S2F-010 |

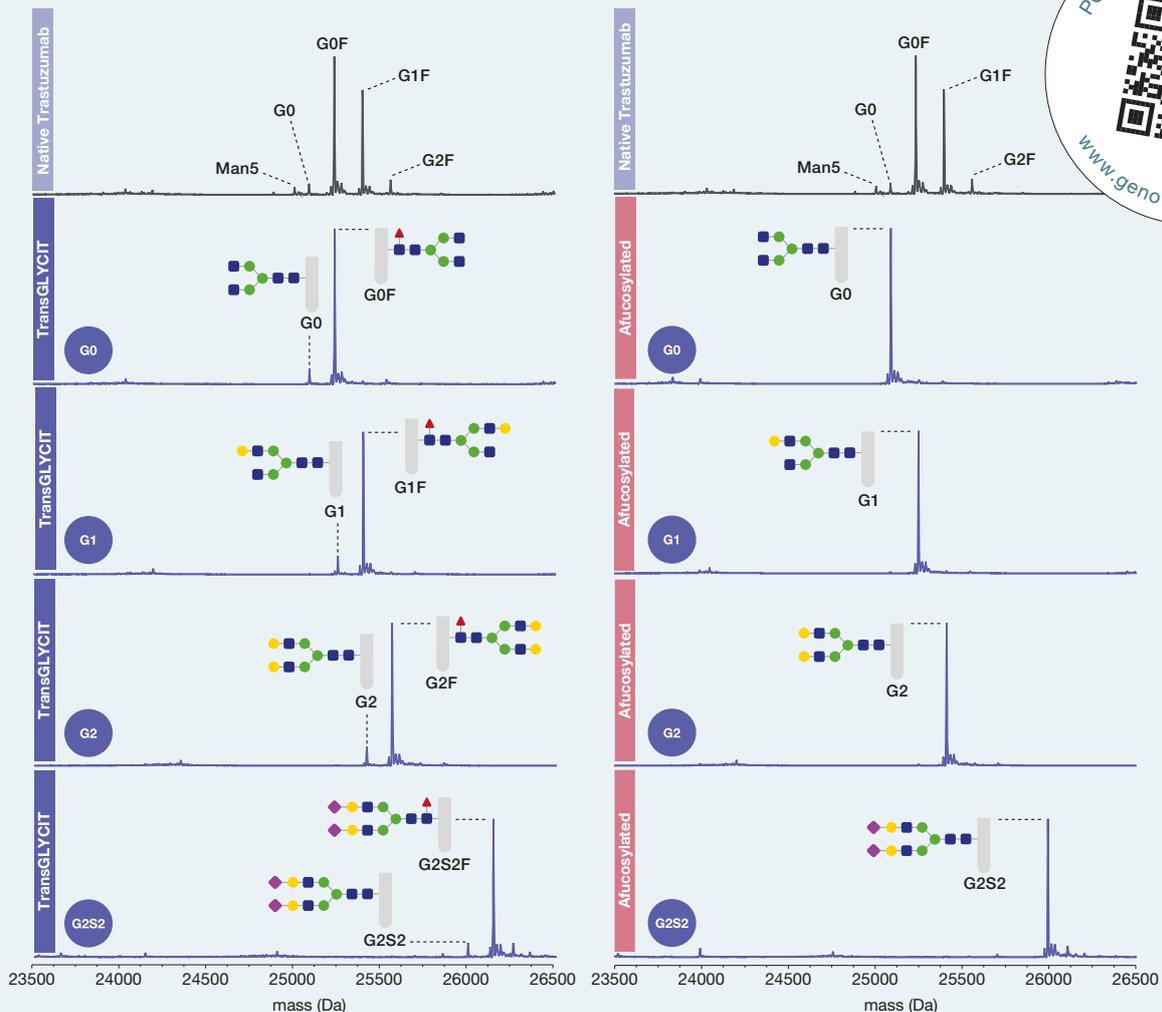
TransGLYCIT™利用したFc領域のアガラクトシル化(脱ガラクトシル化)、ガラクトシル化およびシアル酸化グリコフォームの生成

IgGの糖鎖プロファイルのエンジニアリングは、エフェクター機能を強化または抑制した次世代治療用抗体の開発に重要です。TransGLYCITは、アガラクトシル化(G0)、ガラクトシル化(G1、G2)、シアル化(G2S2)グリコフォームを有する抗体作製に使用されます。また、TransGLYCIT Afucosylated kitを用いてコアGlcNAcのフコースを欠くグリコフォームを作製すると、FcγIIIa受容体への結合と

ADCC活性が増大した抗体が得られます。これにより、フコース化抗体とアフコース化抗体を直接比較することが可能です。

ここでは、治療用抗体であるトラスツズマブの糖鎖プロファイルをリモデリングし、フコシル化またはアフコシル化したG0、G1、G2またはG2S2グリコフォームのいずれかを付加することに成功しました。得られたマススペクトルは、ネイティブなトラスツズマブの不均一な糖鎖

プロファイルと、TransGLYCITを用いてG0、G1、G2またはG2S2を付加し、抗体を完全にトランスグリコシル化した後のマススペクトルのシフトを示しています。また、均一なアフコシル化糖鎖プロファイルはTransGLYCIT Afucosylated kitを使用して生成されました。



Transglycosylation using TransGLYCIT. Deconvoluted mass spectra of the Fc/2 fragment of native trastuzumab (top) and after transglycosylation with TransGLYCIT (left panel) or TransGLYCIT Afucosylated (right panel). The mAb was digested with FABRICATOR and the subunits were analyzed by reversed-phase LC-MS on a Waters™ BioAccord™ system equipped with a Waters™ BioResolve™ RP mAb column (2.1 × 50 mm).

TransGLYCIT™ Afucosylated

| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|-------------------------------------|---|------------|
| TransGLYCIT G0 Afucosylated, 1 mg | Generates 1 mg afucosylated human IgG with the G0 glycoform | T1-G0A-010 |
| TransGLYCIT G1 Afucosylated, 1 mg | Generates 1 mg afucosylated human IgG with the G1 glycoform | T1-G1A-010 |
| TransGLYCIT G2 Afucosylated, 1 mg | Generates 1 mg afucosylated human IgG with the G2 glycoform | T1-G2A-010 |
| TransGLYCIT G2S2 Afucosylated, 1 mg | Generates 1 mg afucosylated human IgG with the G2S2 glycoform | T1-S2A-010 |

GingisREX®

アルギニン特異的にタンパクを切断



GingisREX (RgpB) はアルギニン残基のC末端でタンパクを切断するアルギニン特異的なプロテアーゼです。なお、他の酵素では切断が難しいアルギニン-プロリン配列も切断可能です。この酵素は、ペプチドマッピング、de novoペプチドシーケンシング、および翻訳後修飾の分析に有用です。

-  Digests any peptide or protein containing Arg. Specific for Arg-X motifs
-  Digests C-terminally of Arg residues
-  60 min reaction
-  Active in 6M urea and 0.1% SDS

タンパク切断ワークフロー



GingisREX は、アルギニン残基の C 末端にあるペプチド結合を特異的に切断するシステインプロテアーゼで、隣接するアミノ酸がプロリンの場合も切断します。トリプシンによる切断に比べ、長いペプチドが生成され、高分解能MSで分離・同定することが

可能です。これにより、ボトムアップアプローチのためのサンプル調製に関する選択肢が増え、分解プロファイルやシーケンスカバレッジを向上させることができます。

GingisREX には、Arg-Cにおいて一般的にみられるようなリシンへの活性はありません。

本酵素は5.0 - 9.0の広いpH範囲で活性を示し、システインを必要としますが、塩酸グアニジンにより阻害されます。

製品フォーマット



GingisREX®
酵素の凍結乾燥品

GingisREX®

| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|------------------------|------------------------------------|------------|
| GingisREX, 5 µg enzyme | Enzyme:Protein ratio: 1:20 - 1:200 | B0-GRX-005 |





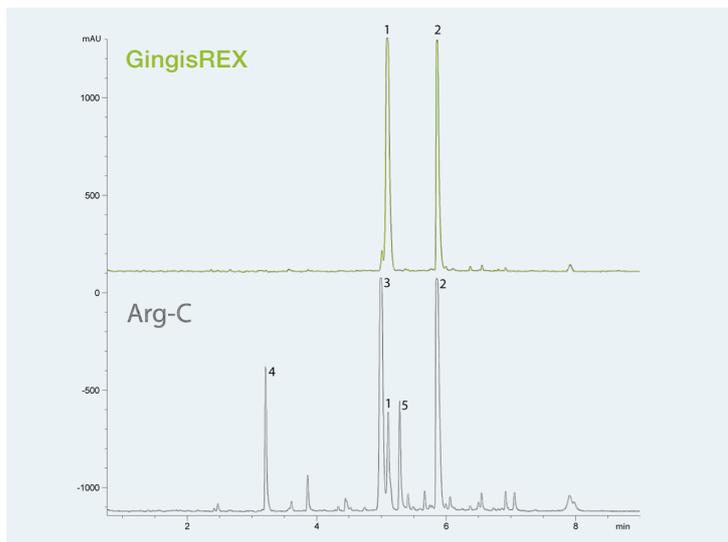
GingisREX®を利用したアルギニン特異的な切断

ボトムアップ質量分析データの解釈は、多くの場合、サンプルの消化に使用されたプロテアーゼの特異性に関する特定の仮定に基づいて行われます。

特異性のない活性は、データの解釈を困難にする不確実性をもたらし、分析時間と誤認識のリスクの両方を増大させます。そこで、酸化インスリンβ鎖を非常に単純

なモデル基質として、GingisREX と Arg-C の活性を比較しました。酸化インスリンβ鎖は、アルギニンとリシンを1つずつしか含まないため、アルギニン特異的なプロテアーゼによって1箇所しか消化されないはずですが、GingisREX と Arg-C により生成されたペプチドを RP-HPLC および MS により解析したところ、GingisREX はアルギ

ニン残基を特異的に消化し、リシン残基には活性を示さず、酵素/基質比を 1:5 として一晩中インキュベートしても他の非特異的活性は認められませんでした。一方、Arg-Cはアルギニン残基で主要な活性を示したが、リシン残基や他の多くのマイナーな部位での切断も観察されました。



Digestion of oxidized β-chain of insulin with GingisREX and Arg-C.

The digestion was performed O/N at 37°C, with an enzyme to substrate ratio of 1:20 (w/w), 20mM cysteine in buffers at pH 7.4 (GingisREX) and pH 7.6 (Arg-C). The peptides were separated on RP-HPLC.

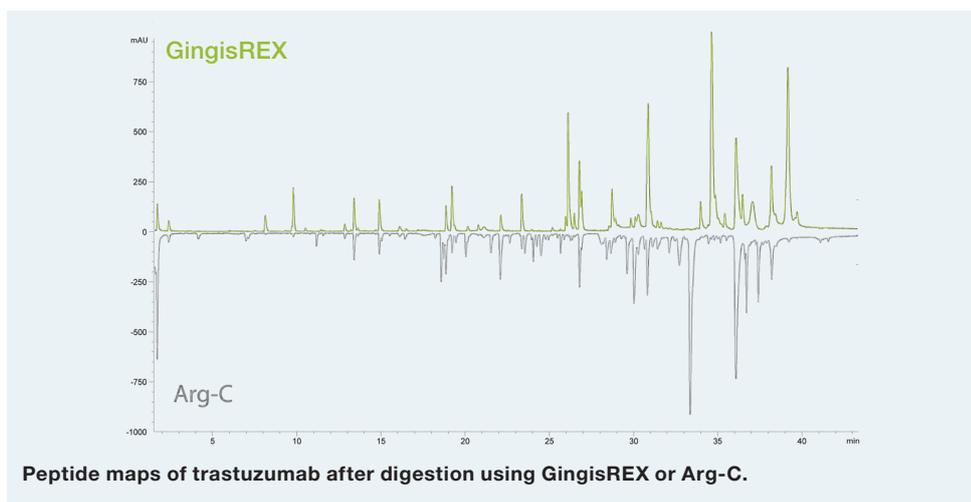
| PEPTIDE NO. | AMINO ACID SEQUENCE |
|----------------|-------------------------------|
| Intact protein | FVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKA |
| 1 | GFFYTPKA |
| 2 | FVNQHLGSHLVEALYLVCGER |
| 3 | GFFYTPK |
| 4 | FVNQHLGSH |
| 5 | LVEALYLVCGER + Na |

Sequences of oxidized insulin β-chain digested by GingisREX or Arg-C. Green indicates arginine residues and red indicates lysine residues.

GingisREX® を用いた治療用抗体のペプチドマッピング

治療用抗体のような大きく複雑なサンプルでは、アルギニン残基で切断することにより、より大きなペプチドが得られ、ペプチドマップのピークが少なくなります。ここでは、トラストズマブの GingisREX および Arg-C の消化プロファイルを紹介します。

GingisREXによるアルギニン部位での切断では、ピーク数が少なく、ペプチドマップも複雑でなく、マスフィンガープリント解析におけるデータの相互参照に有利な特徴を持っています。



Peptide maps of trastuzumab after digestion using GingisREX or Arg-C.

Immobilized PNGase F

N-結合型糖鎖を加水分解



Immobilized PNGase Fは、酵素であるPNGase F(Peptide N-glycosidase F)がスピンカラム形式でアガロースビーズに共有結合しており、抗体、融合タンパク質、その他のN-グリコシル化タンパク質上のN-グリカン簡単に除去できる製品です。この酵素は、MS分析におけるサンプル調製（タンパク質の不均一性を低減し、放出された糖鎖分析を可能にします）、およびN-グリカンの機能的役割の研究に幅広く利用されています。

-  N-linked glycans on glycoproteins
-  Hydrolyzes the glycosidic bond between N-glycans and Asn
-  15+ min denaturing or 1+h native reaction
-  RapiGest™ included in the Denaturing kit

脱グリコシル化ワークフロー



PNGase F (Peptide N-glycosidase F) はPNGase Fは、「ポリペプチドのアスパラギン」と「オリゴサッカライドの最も内側のGlcNAc」と間のアミド結合を加水分解するグリコアマダーゼです。これは、すべての哺乳類のアスパラギンに結合する

複合型・ハイブリッド型・高マンノース型のオリゴサッカライドに対して作用します。反応中、グリカンが除去されたアスパラギン残基は脱アミド化されてアスパラギン酸になります。サンプルである糖タンパクを、スピンカラム内でImmobilized PNGase F

とともに通常反応条件で1時間から一晩、または変性反応条件 (RapiGest™ SF Surfactantを利用) で15~60分間インキュベートします。その後、脱グリコシル化された糖タンパクは、遠心分離によって容易に収集可能です。

製品フォーマット



Immobilized PNGase F
スピンカラムに酵素を固定した製品



Immobilized PNGase F Denaturing
Immobilized PNGase Fと
RapiGest™ SF Surfactantのセット

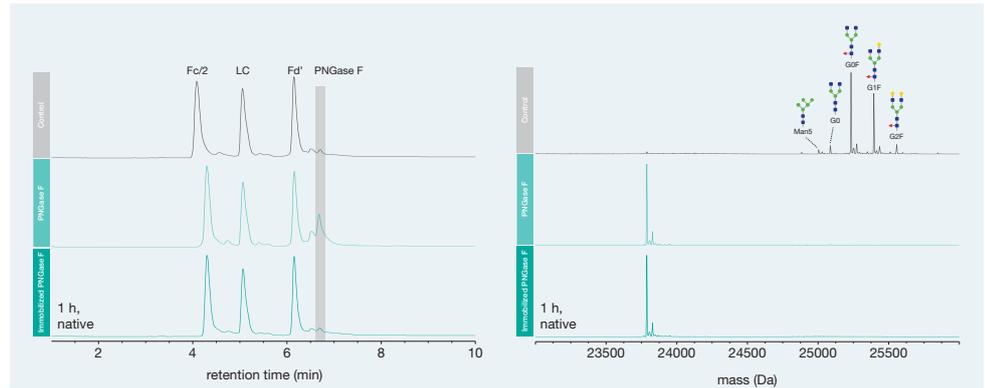
Immobilized PNGase F

| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|--|---------------------------------------|------------|
| Immobilized PNGase F, Microspin 5×0.2mg | Deglycosylates 5×0.2mg glycoproteins | G1-PF6-010 |
| Immobilized PNGase F, Microspin 10×0.2mg | Deglycosylates 10×0.2mg glycoproteins | G1-PF6-020 |

Immobilized PNGase Fを使用した通常反応条件でのN-結合型糖鎖の除去



ネイティブな反応条件で、PNGaseFを使用してFc領域のN-グリカン除去すると、遊離N-結合型糖鎖および脱グリコシル化抗体の構造・特性評価が可能になります。ネイティブな反応条件でのPNGaseFによるグリカンの効率的な除去を実証するため、トラスツマブを利用しました。質量のシフトは、溶液中のPNGase Fで処理されたサンプルと比較して、分析に干渉する酵素を残さずにFc領域のN-グリカンの除去に成功したことを示しています。

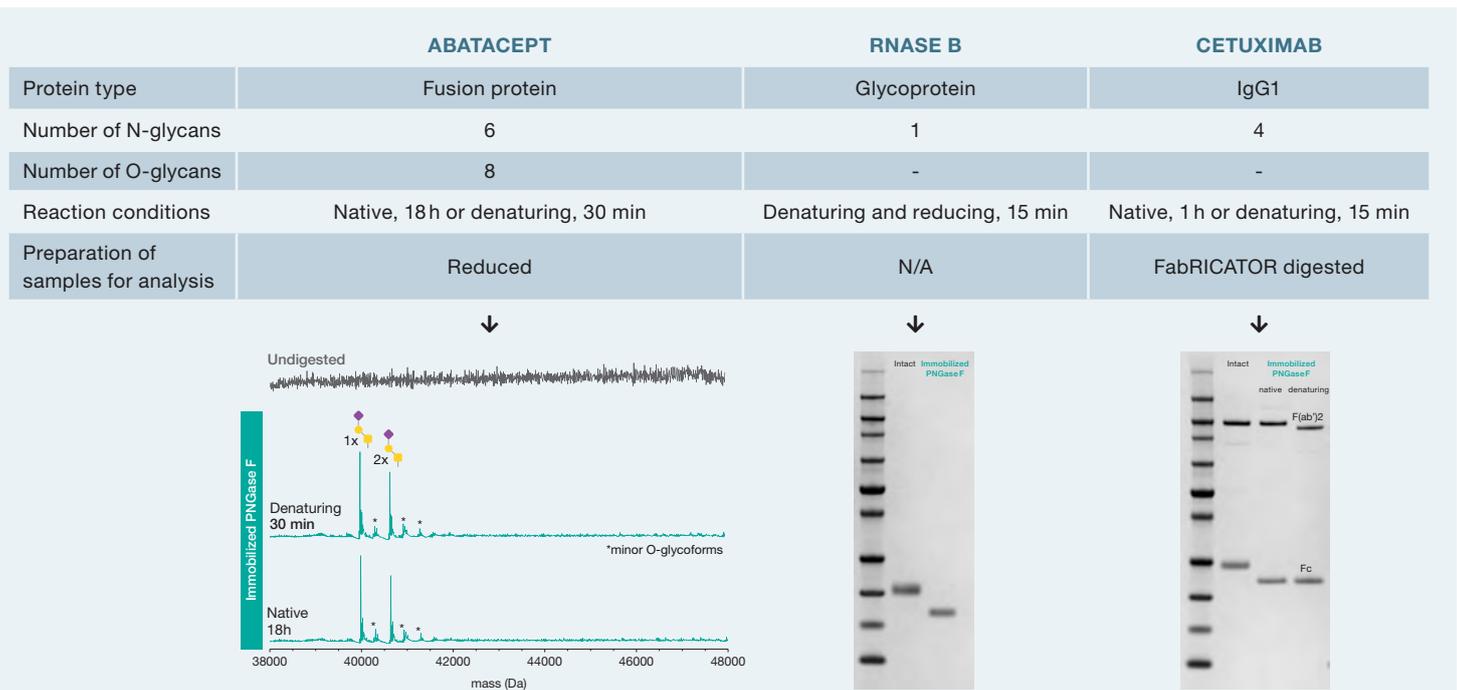


Removal of N-glycans under native conditions. TIC chromatogram (left) and deconvoluted mass spectra (right) of the Fc/2 fragment of intact trastuzumab (top panel) and trastuzumab treated with Immobilized PNGase F (bottom panel) or PNGase F in solution (middle panel). The antibody samples were analyzed after digestion with FabRICATOR.

Immobilized PNGase F Denaturingを使用した迅速なN-結合型糖鎖の除去



ある糖タンパクでのImmobilized PNGase Fの脱グリコシル化能がこちらに示されています。例として一般的に使用される糖タンパク質であるRNase Bは、Immobilized PNGase F Denaturingを使用して15分で完全に脱グリコシル化されました。



Key characteristics and deconvoluted mass spectra or SDS-PAGE assay of a selection of glycoproteins treated with Immobilized PNGase F. Abatacept was analyzed by reversed-phase LC-MS and RNase B and cetuximab were analyzed on SDS-PAGE. The mass shifts in the deconvoluted mass spectra or on the gels show the successful removal of N-glycans from the various glycoprotein substrates.

Immobilized PNGase F Denaturing

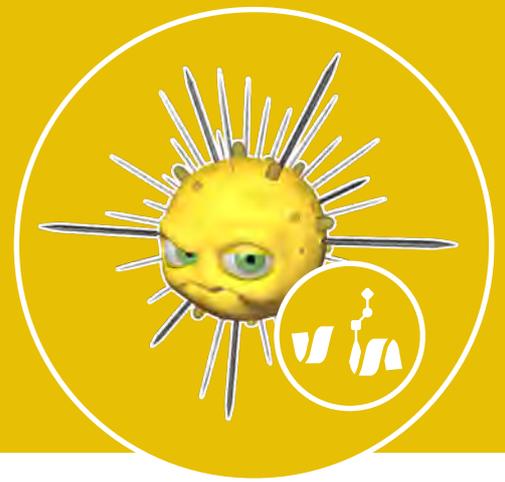


| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|---|---|------------|
| Immobilized PNGase F Denaturing, Microspin 5×0.2mg | Deglycosylates 5×0.2mg glycoprotein. 5×1 mg <i>RapiGest</i> [™] SF is included | G2-PDK-010 |
| Immobilized PNGase F Denaturing, Microspin 10×0.2mg | Deglycosylates 10×0.2mg glycoprotein. 10×1 mg <i>RapiGest</i> [™] SF is included | G2-PDK-020 |

RapiGest[™] SF Surfactant is included in Immobilized PNGase F Denaturing. *RapiGest*[™] SF Surfactant is a trademark of Waters Corporation.

OpeRATOR®

0-結合型糖鎖を有する タンパクを特異的に切断



OpeRATOR は、ムチン型0-結合型糖鎖を持つタンパクの糖鎖残基である Ser と Thr の N 末端を切断する 0-結合型糖鎖に特異的プロテアーゼです。0-結合型糖鎖を持つ糖ペプチドが生成され、本酵素により0-結合型糖鎖プロファイリング、ペプチドのマッピング、部位占有率の決定、さらにMS解析による中間レベルのアプローチも可能になります。

- 

Native proteins with mucin-type O-glycosylation
- 

Digests N-terminally of O-glycosylated Ser and Thr residues
- 

2h to O/N (16-18h) reaction
- 

Desialylation using SialEXO (included) increases performance

0-糖化タンパク切断ワークフロー



OpeRATOR は高い特異性で、ムチン型0-糖化タンパクおよびペプチドと 0-結合型糖鎖を有するセリンまたはスレオニン残基の N 末端で切断します。N-結合型糖鎖部位の糖タンパクを消化することはあり

ません。この酵素はアシアル(脱シアル)化されたコア1 0-結合型糖鎖に対して最も活性が高いです。シアル化コア1およびコア3も切断するが、その程度はかなり低くなって

います。OpeRATORはSialEXO(複数のシアリダーゼの混合物)と共に使用可能で、購入時にSialEXOは同梱されています。

製品フォーマット



OpeRATOR®
酵素の凍結乾燥品

OpeRATOR®

| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|----------------------|-----------------------------|------------|
| OpeRATOR, 2000 units | Digests 2 mg O-glycoprotein | G2-OP1-020 |

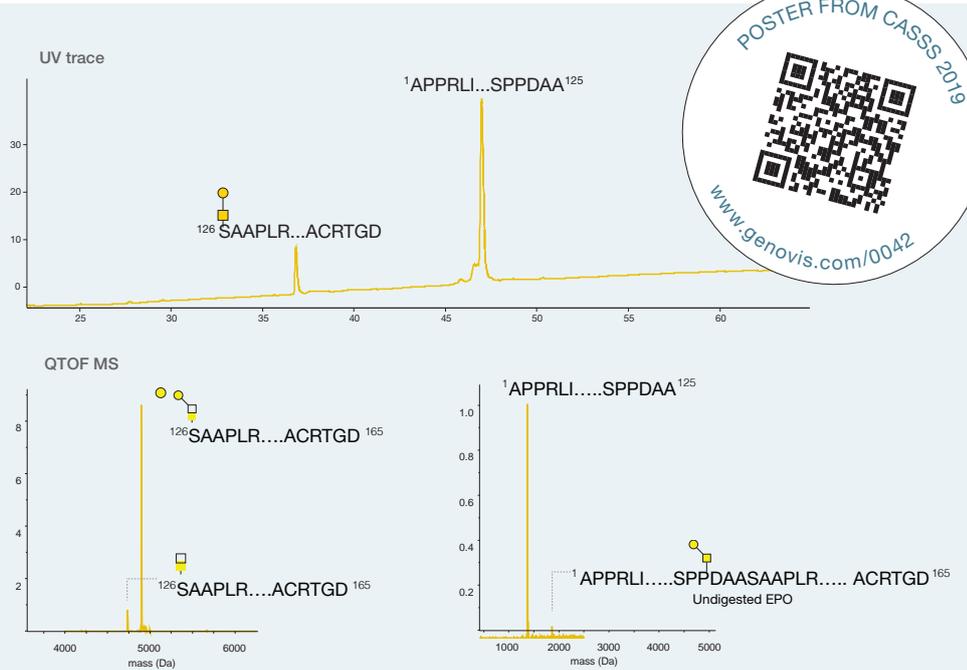


OpeRATOR®を利用したO-グリコシル化部位に特異的な切断

OpeRATORは、中間レベルのO-グリコシル化部位のマッピングに用いることが可能です。実際、1個または数個のO-結合型糖鎖しか持たないタンパクでは、OpeRATORによる切断部位の特定からO-グリコシル化部位を直接決定することが可能です。

エリスロポエチン(EPO)は、単一のO-グリコシル化部位を持つ約30 kDaの糖タンパクです。PNGaseFによるN-結合型糖鎖の除去とSialEXOによる脱シアル酸化の後、ネイティブなタンパクを、OpeRATORを用いてO-結合型糖鎖を有するアミノ酸のN-末端を切断しました。得られたタンパク断片は逆相LC-MSで分析されました。

Specific digestion N-terminally of the O-glycosylation site. The reduced fragments were separated on a reversed-phase C4 column followed by ESI-QTOF MS detection. The EPO protein carrying one core 1 O-glycan was hydrolyzed at a single specific site N-terminally of the O-glycosylated serine using OpeRATOR.

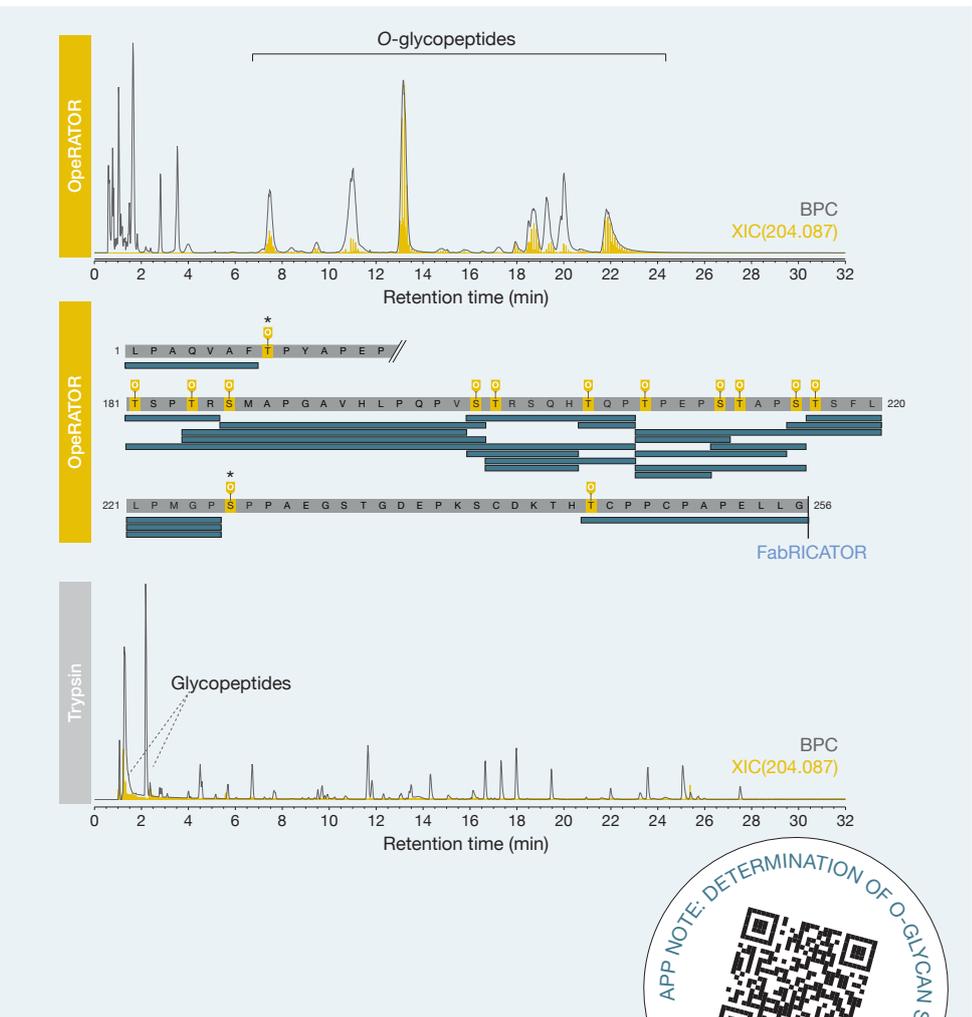


OpeRATOR®によるエタネルセプトのO-グリコシル化部位の完全なマッピング

O-グリコシル化されたヒンジ領域を持つため、従来のアッセイでは分析が困難でした。ここでは、このタンパクを OpeRATOR とインキュベートし、得られた糖ペプチドを LC-MS/MS で分析しました(上図)。タンパクのO-結合型糖鎖パターンの不均一性とOpeRATORのO-結合型糖鎖構造に対する特異性のために、オーバーラップしたペプチドが形成され、O-結合型糖鎖を有する部位の完全なマップを得ることができました(中央のパネル)。

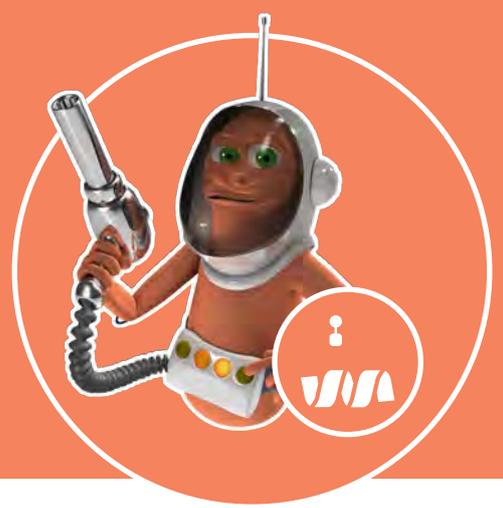
比較のために、同じ材料の標準的なトリプシン消化物(下図)を見ると、解析が困難なごく少数の非常に大きな糖ペプチドのみが示されています。

In-depth analysis of the O-glycosylation sites of etanercept originator. HILIC-MS analysis (top panel) of etanercept peptides generated by digestion with OpeRATOR. The middle panel shows the peptide map of the O-glycosylation sites of etanercept based on the results from the OpeRATOR-based workflow. The identified O-glycosylation sites are marked in yellow. Two sites (marked with an asterisk) could only be inferred from the OpeRATOR digestion pattern without direct identification of a peptide containing the glycosylated amino acid. The bottom panel shows a RP-MS analysis of etanercept digested with trypsin. Data was obtained in collaboration with Thermo Fisher Scientific (UK).



OglyZOR®

コア-1 O-結合型糖鎖を加水分解



OglyZORは、ネイティブな糖タンパク上のコア1 O-結合型糖鎖2つを特異的に加水分解するエンドグリコシダーゼ（O-グリコシダーゼ）です。OglyZORは、糖鎖分析のためのO-結合型糖鎖の除去、O-結合型糖鎖の存在確認、サンプルの不均一性の低減に使用されています。

-  O-glycans on glycoproteins
-  Hydrolyzes Core 1 disaccharides
-  2-4 h reaction
-  Requires removal of terminal sialic acids (SialEXO included)

O-糖化タンパクの脱グリコシル化ワークフロー



OglyZORは、ネイティブな糖タンパク上のコア1 (Gal- β 1-3-GalNAc) および限定的にコア3 (GlcNAc- β 1-3-GalNAc)の O-結合型糖鎖2つを加水分解するエンドグリ

コシダーゼ(エンド- α -N-アセチルガラクトサミナーゼ)です。この酵素は通常、基質の変性を必要としません。OglyZORの活性のためには、O-結合型糖鎖の末端

シアル酸を除去する必要があるため、複数のシアリダーゼの混合物であるSialEXOが同梱されています。最適な活性は、pH6.5から7.5、37°Cで得られます。

製品フォーマット



OglyZOR®
酵素の凍結乾燥品

OglyZOR®



| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|---------------------|----------------------------------|------------|
| OglyZOR, 2000 units | Deglycosylates 2 mg glycoprotein | G2-OG1-020 |

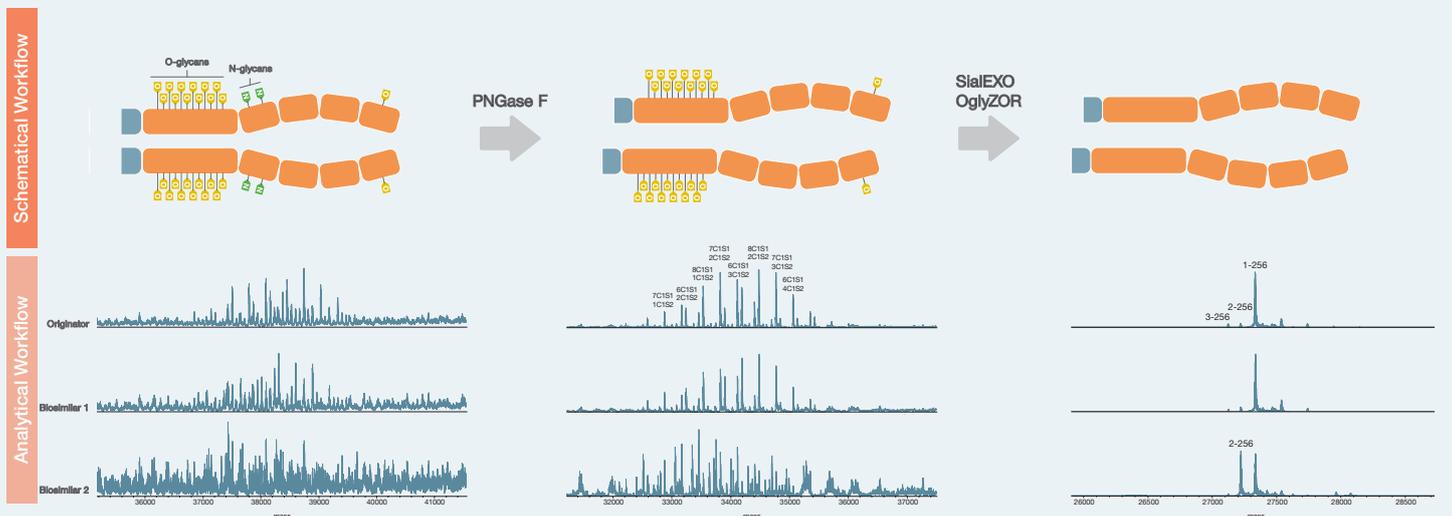


OglyZOR®を利用したバイオ医薬品の脱グリコシル化

エタネルセプトは高度にグリコシル化されたリコンビナントFc融合タンパクであり、そのインタクトな状態での解析は非常に困難です。FabRICATOR (IdeS) による消化により、2つのサブユニット (TNFR と Fc/2) をモデル

アップLC-MSアプローチで別々に分析することができます。未処理のTNFRドメインは複雑すぎて解析不可能でしたが、PNGase Fで処理するとO-結合型糖鎖の組成を分解して比較することができ

ました。また、完全な糖鎖除去により、TNFR部分の一次構造の情報を得ることができました。



Deglycosylation of the TNFR subunit of etanercept from three commercially available preparations.

Deconvoluted mass spectra. Left panel: The TNFR subunit carrying both N- and O-glycans is too complex for all variants to be resolved. Middle panel: Treatment with PNGase F for removal of N-glycans enabled assessment of the O-glycan composition. C1S1 = core 1 monosialylated, C1S2 = core 1 disialylated. Right panel: Complete glycan removal (using OglyZOR, SialEXO, PNGaseF) provided information of the primary structure of the TNFR part. N-terminal truncation, -L (2-256) and -LP (3-256) are visualized. A fraction of the deglycosylated subunits revealed mass shifts of +203 Da (HexNAc), indicating presence of incomplete core 1, not removed by OglyZOR.

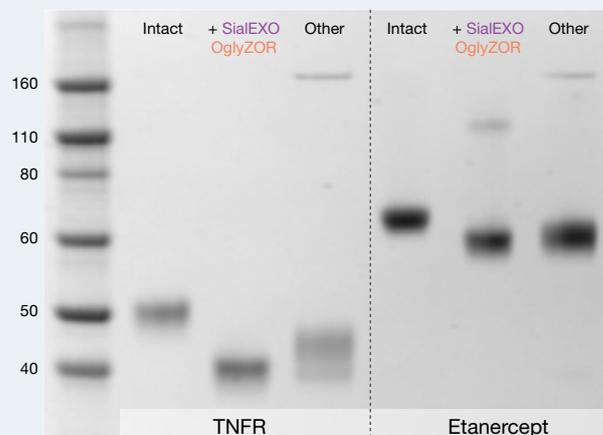


OglyZOR®活性のベンチマーク

ここでは、OglyZORとSialEXOの酵素活性を他の市販のエンドグリコシダーゼやシアリダーゼと比較しました。シアル酸を除去した場合、酵素であるOglyZORはTNFRとイン

タクトなエタネルセプト分子からO-結合型糖鎖を効率よく加水分解しました。OglyZORは、ネイティブな糖タンパク上のコア1の2糖を効率よく加水分解するので、

他の翻訳後修飾の同定やアミノ酸配列の確認のためのLC-MS分析前の試料調製に適した酵素です。



Comparison of the enzymatic activities of OglyZOR and SialEXO to commercially available endoglycosidases and sialidases.

All incubations (4 h) were performed according to the manufacturer's instructions, and the samples were analyzed by SDS-PAGE.

SialEXO®

シアル酸を加水分解



酵素であるSialEXOは、シアル酸の除去・分析に有用なシアルダーゼです。本酵素は、ネイティブな糖タンパクに存在するN-およびO-結合型糖鎖と遊離糖鎖の両方に活性を示します。SialEXOは、OpeRATORやOglyZORで消化する前のO-グリコシル化タンパクの処理に使用されます。その他の用途としては、サンプルの複雑さの軽減、チャージバリエーション解析、エキソグリコシダーゼアレイなどがあります。

- Sialic acids on N- and O-linked glycans
- α 2-3, α 2-6 and α 2-8-linked sialic acids
- 30 min – 2 h reaction
- Requires no co-factors

脱シアル酸化ワークフロー



シアル酸が持つ固有の負電荷は、分析ワークフローを複雑にし、他の重要な修飾をマスキングしてしまう可能性があります。

そのため、シアル酸を除去することで、タンパクに内在するバリエーションの研究が容易になります。SialEXOは

ネイティブな条件下で糖タンパクを加水分解し、6.5から9の幅広いpH領域で高い活性を示します。

製品フォーマット



SialEXO®
複数の酵素の凍結乾燥品



SialEXO® 23
 α 2-3結合に特異的な酵素の凍結乾燥品



Immobilized SialEXO®
スピナカラムに酵素を固定した製品

SialEXO®



| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|---------------------|--------------------------------|------------|
| SialEXO, 2000 units | Desialylates 2 mg glycoprotein | G1-SM1-020 |

SialEXO® 23



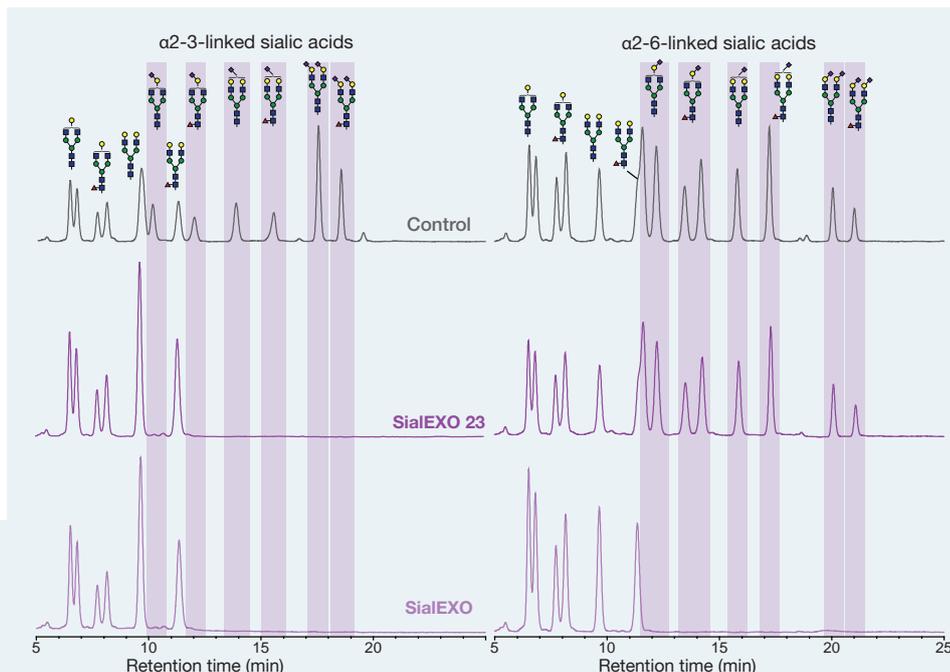
| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|-----------------------|----------------------------------|------------|
| SialEXO 23, 500 units | Desialylates 0.5 mg glycoprotein | G1-SD2-005 |

SialEXO®およびSialEXO® 23を利用した遊離糖鎖の分析



バイオ医薬品に含まれるシアル酸は、主に α 2-3 または α 2-6で結合しています。複数のシアリダーゼを含み、幅広い活性を示すSialEXOは α 2-3、 α 2-6および α 2-8を含む全てのシアル酸の結合を加水分解します。なお、SialEXO 23は α 2-3結合のシアル酸に対して高い特異性を示す酵素です。ここでは、親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) を用いて、2つの糖鎖ライブラリを解析しました。一方は α 2-3結合のシアル酸を含む遊離糖鎖、他方は α 2-6結合のシアル酸を含むライブラリです。SialEXO 23は α 2-3結合、SialEXOは α 2-6結合のシアル酸をそれぞれの糖鎖から遊離していることが、保持時間の変化から明確に示されています。

Analysis of released sialic acids. HILIC analysis of released glycans with α 2-3-linked (left) or α 2-6-linked (right) sialic acids after incubation with SialEXO 23 or SialEXO respectively. Sialylated glycan structures are shaded in purple.

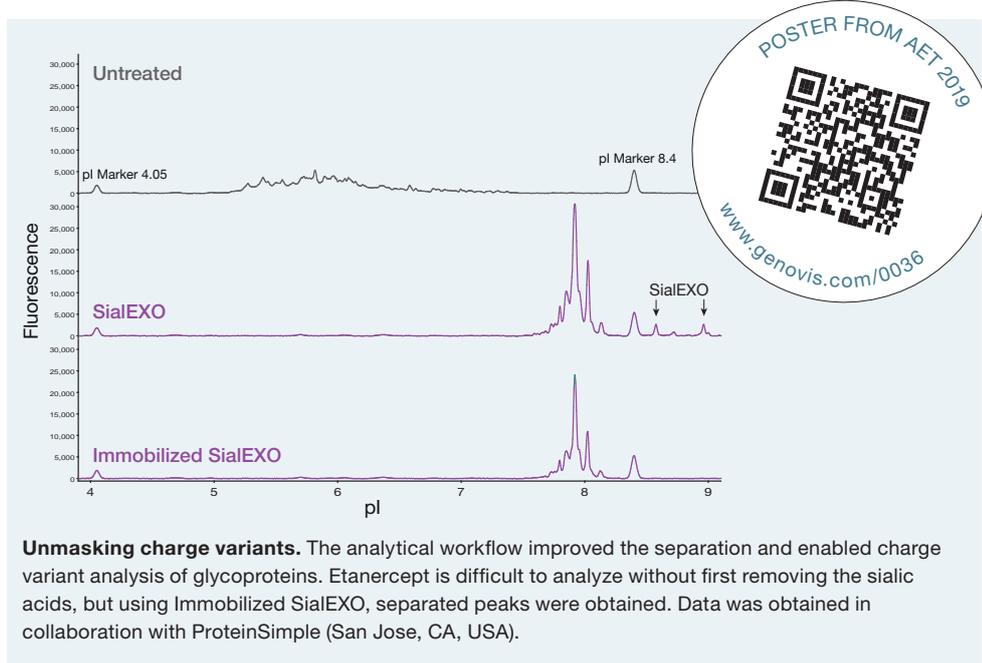


Immobilized SialEXO®を利用したチャージバリエーション分析



キャピラリー等電点電気泳動 (cIEF) は生物学的製剤の特性評価や品質管理において、チャージバリエーションを決定するために一般的に使用されています。エタネルセプトは高度にシアル酸化されたFc融合タンパクであるため、そのチャージバリエーションの解析は困難です。

エタネルセプトのチャージバリエーションを調べるために、ここではImmobilized SialEXOを用いてタンパクを脱シアル酸化し、ProteinSimple社のMauriceを用いてイメージングキャピラリー等電点電気泳動 (icIEF) で分析しました。脱シアル酸化により、シアル酸に由来する電荷の不均一性が取り除かれ、タンパク質のチャージバリエーションの分析が可能になりました。



Unmasking charge variants. The analytical workflow improved the separation and enabled charge variant analysis of glycoproteins. Etanercept is difficult to analyze without first removing the sialic acids, but using Immobilized SialEXO, separated peaks were obtained. Data was obtained in collaboration with ProteinSimple (San Jose, CA, USA).

Immobilized SialEXO®



| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|--|---------------------------------------|------------|
| Immobilized SialEXO, Microspin 2 × 0.5 mg | Desialylates 2 × 0.5 mg glycoprotein | G1-SM6-010 |
| Immobilized SialEXO, Microspin 5 × 0.5 mg | Desialylates 5 × 0.5 mg glycoprotein | G1-SM6-025 |
| Immobilized SialEXO, Microspin 10 × 0.5 mg | Desialylates 10 × 0.5 mg glycoprotein | G1-SM6-050 |

FucosEXO™

α1-2,3,4結合型フコースを加水分解



FucosEXOはα-フコシダーゼの混合物であり、N-およびO-糖化タンパクまたはフリーなオリゴ糖からα1-2、α1-3およびα1-4結合型フコースを効率的に除去します。これは、N-およびO-糖化タンパクのグリカン構造解析、およびオリゴサッカライドのエキソグリコシダーゼアレイにおける有用なツールです。

-  Fucose on N- and O-glycosylated proteins
-  Hydrolyzes α1-2,3,4-linked fucose
-  1-2h reaction
-  No need for co-factors

脱フコシル化ワークフロー



FucosEXOは、糖タンパク上のフコースをネイティブな条件下で加水分解し、pH6~8で高い活性を示します。酵素活性は補酵素や添加物に依存しないため、LC-MS

分析を含むほとんどの分析サンプル調製に適用可能です。基質の性質にもよりますが、FucosEXOは1~2時間で糖タンパク上のフコースを加水分解します。しかし、非常に

複雑なサンプルではより長いインキュベーションが必要な場合もあります。

製品フォーマット



FucosEXO™
酵素の凍結乾燥品



Immobilized FucosEXO™
スピンカラムに酵素を固定した製品

FucosEXO™

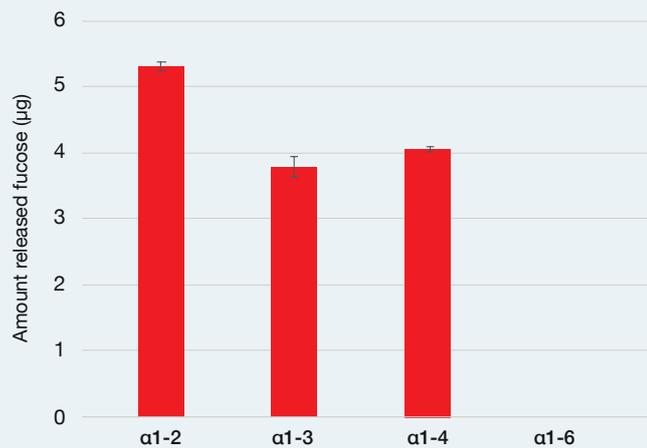
| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|----------------------|---------------------------------|------------|
| FucosEXO, 2000 units | Defucosylates 2 mg glycoprotein | G1-FM1-020 |





FucosEXO™の基質特異性

フコース残基はN-型結合糖鎖とO-型結合糖鎖の両方に異なる形で結合しています。一般的に α 1-2、 α 1-3および α 1-4結合型フコースはO-型結合糖鎖で最もよく見られ、またN-型結合糖鎖のアンテナ型フコースとして見られます。一方、コア α 1-6結合型フコースはN-型結合糖鎖の修飾として見つかっています。FucosEXOとのインキュベートした後のフコースの遊離を測定するために、ここでは様々な結合を示すオリゴサッカライド基質のパネルを使用しました。FucosEXOは、 α 1-2、 α 1-3および α 1-4結合型フコースを効率的に遊離することがわかりましたが、 α 1-6結合型フコースでは活性は観察されませんでした。



FucosEXO substrate specificity. The substrate specificity of FucosEXO was analyzed on equal molar amounts of synthetic oligosaccharides; α 1-2 (2'-fucosyllactose), α 1-3 (3-fucosyllactose), α 1-4 (Lewis a) and α 1-6 (α 1-6 fucosylated chitobiose). Substrates were incubated with FucosEXO for 30 min at 37°C and the amount of released fucose was measured spectrophotometrically using an L-Fucose Assay Kit (Megazyme).

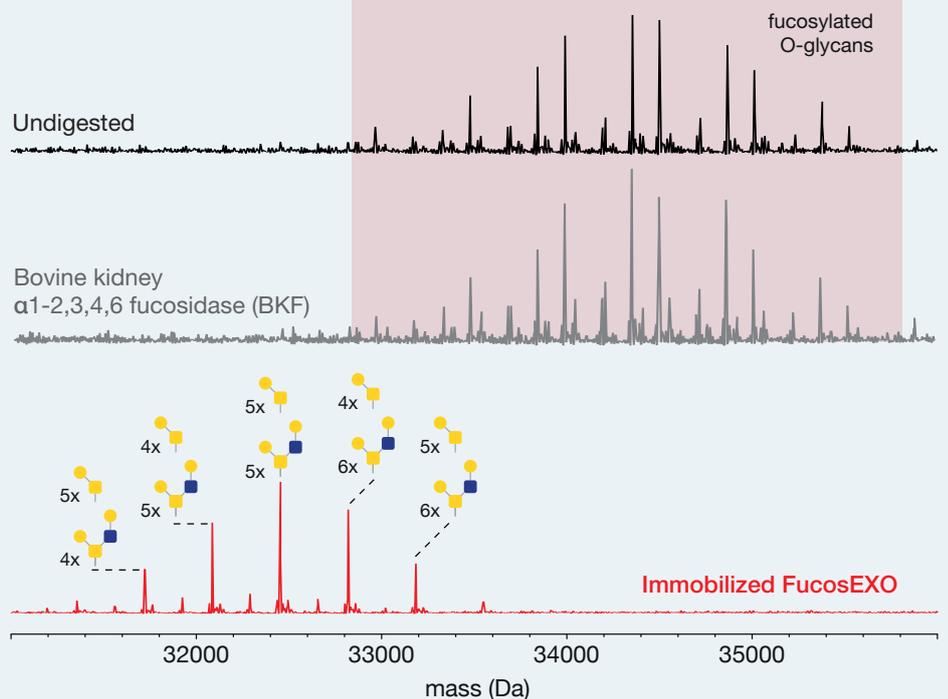
Immobilized FucosEXO™を使用したネイティブな糖タンパクの脱フコシル化



O-型結合糖鎖のフコースは、血液型抗原やルイス抗原など、機能的に重要な糖鎖エピトープの合成に関与しています。このような複雑な糖鎖で修飾された糖タンパクの分析は困難な場合があり、特定の効率的な酵素ツールが必要です。ここでは、 α 1-2および α 1-3結合型フコースで修飾された最大11個のO-型結合糖鎖を有するTNFRタンパクをImmobilized FucosEXOで処理し、その活性を市販の α -フコシダーゼと比較しました。1時間以内に、FucosEXOを使用してフコースの完全な除去が達成されましたが、市販の α -フコシダーゼによる処理はフコースにわずかな影響しか与えませんでした。

Defucosylation using Immobilized FucosEXO. Glycoengineered TNFR with core 1 and core 2 O-glycans decorated with both α 1-2 and α 1-3 fucose was incubated with bovine kidney fucosidase (1 h, 37°C) or Immobilized FucosEXO (1 h, RT). The processed protein was analyzed by reversed-phase LC-MS on a Waters™ BioAccord™ system equipped with a Waters™ BioResolve™ RP mAb column (2.1 × 50 mm).

Glycoengineered TNFR (PNGase F treated)



Immobilized FucosEXO™



| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|---|--|------------|
| Immobilized FucosEXO, Microspin 5 × 0.5 mg | Defucosylates 5 × 0.5 mg glycoprotein | G1-FM6-025 |
| Immobilized FucosEXO, Microspin 10 × 0.5 mg | Defucosylates 10 × 0.5 mg glycoprotein | G1-FM6-050 |

GalactEXO™

β 1-3,4結合型ガラクトースを加水分解



GalactEXOは、N-およびO-グリコシル化タンパクのβ 1-3,4結合した末端ガラクトースを加水分解するβ-ガラクトシダーゼの混合物です。本酵素は、エキソグリコシダーゼアレイにおける遊離糖鎖構造上のガラクトースのトリミングや、均質なG0/G0F糖鎖プロファイルを有する抗体の作製に有用です。

-  Galactose on N- and O-glycosylated proteins
-  Hydrolyzes β1-3 and β1-4-linked galactose
-  2h reaction
-  No co-factors needed

脱ガラクトシル化ワークフロー



GalactEXOは、β-ガラクトシダーゼの混合物で、糖タンパク上のβ 1-3,4結合型ガラクトースの加水分解を効率的に促進します。

酵素であるGalactEXOは、N-およびO-グリコシル化構造の両方に作用し、2時間以内に末端ガラクトースの完全な加水分解を行います。

本酵素は、インタクトな糖タンパクと遊離糖鎖の両方に使用でき、糖鎖配列決定や抗体Fc領域の糖鎖のトリミングに利用可能です。

製品フォーマット



GalactEXO™
酵素の凍結乾燥品



Immobilized GalactEXO™
スピンカラムに酵素を固定した製品

GalactEXO™



| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|-----------------------|------------------------------------|------------|
| GalactEXO, 2000 units | Degalactosylates 2 mg glycoprotein | G1-GM1-020 |

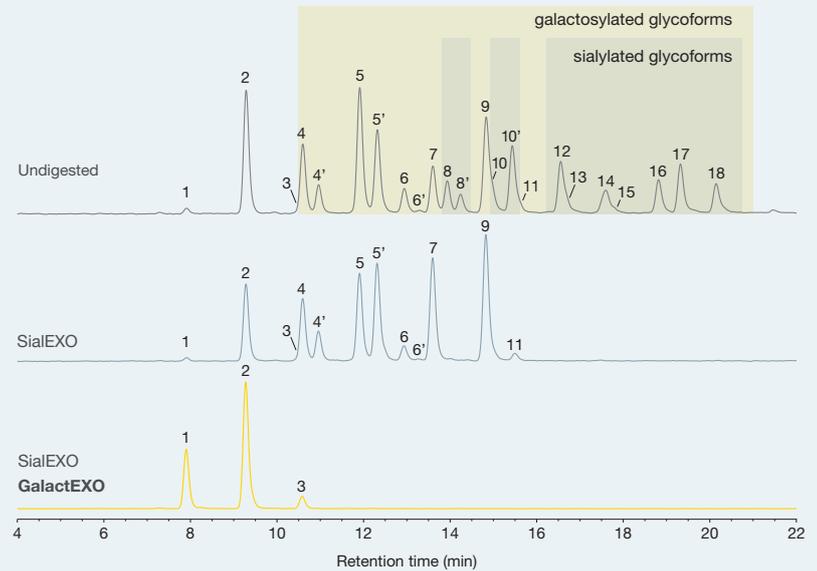
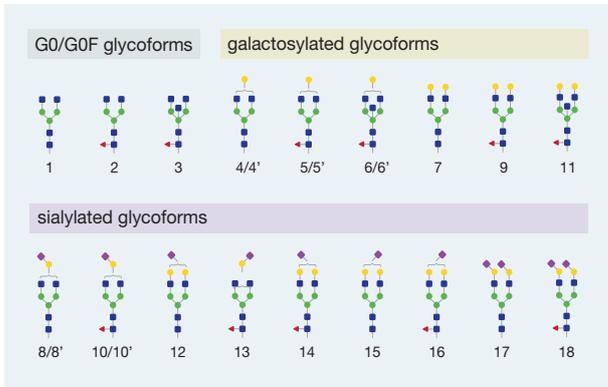


GalactEXO™ を利用した遊離糖鎖の分析

エキソグリコシダーゼを用いた遊離型糖鎖解析では、データの解釈におけるエラーを最小限に抑えるために、特異的かつ完全な加水分解が必要となります。標識された

N-結合型糖鎖ライブラリをシアリダーゼであるSialEXOおよびGalactEXOと1時間インキュベートし、UHPLCで分析を行いました。HILIC-FLD分離では、シアリ酸化および

ガラクトシル化構造が完全に除去され、残ったピークはG0、G0F、あるいはG0Fとして容易に同定できることが示されました。



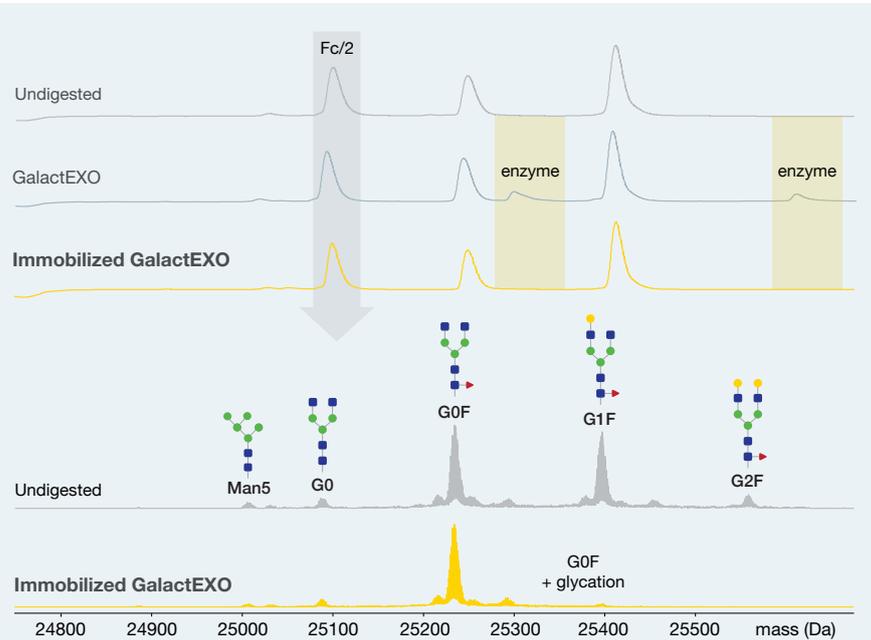
Released glycan analysis. HILIC-FLD UHPLC chromatograms of a 2-AB labeled glycan library analyzed undigested (top), after treatment with SialEXO (middle) or SialEXO and GalactEXO (bottom). Analyzed on Thermo Scientific Vanquish Duo UHPLC system equipped with Thermo Scientific Accurcore 150 Amide HILIC column (2.1 × 150 mm).

Immobilized GalactEXO™ と抗体糖鎖(G0)



抗体におけるガラクトースの存在はエフェクター機能に影響を与えます。この作用機序を研究するためには、ガラクトース残基を明確に除去することが必要な可能性があります。トラスツズマブに対して、FabRICATORを用いたサブユニットへの消化の前に30分間インキュベートし、LC-MSによる分析をすることでImmobilized GalactEXOのβ1-4ガラクトシダーゼ活性は、実証されました。UVクロマトグラムは、Immobilized GalactEXOで処理したサンプルには、酵素であるGalactEXOが存在しないことを明確に示しています(黄色の網掛け)。G0Fグリコフォームへのシフトは、マスペクトルで確認できました。

Degalactosylation of trastuzumab. Deconvoluted mass spectra of the Fc/2 fragment of trastuzumab treated with immobilized GalactEXO (bottom panel). The mAb was digested with FabRICATOR, separated by RP-HPLC (Waters™ BioResolve™ RP mAb (2.1 × 50 mm)) and analyzed by ESI-Q-TOF MS (Bruker Impact II).



Immobilized GalactEXO™



| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|--|---|------------|
| Immobilized GalactEXO, Microspin 5 × 0.5 mg | Degalactosylates 5 × 0.5 mg glycoprotein | G1-GM6-025 |
| Immobilized GalactEXO, Microspin 10 × 0.5 mg | Degalactosylates 10 × 0.5 mg glycoprotein | G1-GM6-050 |

GalNAcEXO™

α-結合型GalNAcの加水分解



酵素であるGalNAcEXOは、糖タンパク上の末端GalNAcを効率的に加水分解するα-N-アセチルガラクトサミニダーゼです。Tn抗原と呼ばれるセリンやスレオニンが結合したGalNAcは、GalNAcEXOによって迅速かつ効率的に加水分解され、α1-3結合型のGalNAcに対しても活性を示します。本酵素は、α結合型GalNAcを、伸長が途中で停止した糖鎖のコア1として持つ複雑なO-グリコシル化タンパクの分析において、試料の不均一性を低減する貴重なツールとなります。

-  α-linked GalNAc residues on O-glycoproteins
-  Tn antigen and α1-3-linked terminal GalNAcs
-  4 h reaction
-  No need for co-factors

GalNAcを除去



GalNAcEXOは、糖タンパク上のGalNAcをネイティブな条件下で加水分解し、pH6.0から7.6の範囲で活性を示します。補因子

や特別なバッファーは必要ありません。基質の性質にもよりますが、糖タンパク上のGalNAcEXOの反応は2時間で完了します。

しかし、複雑なサンプルでは一晩のインキュベーションが必要な場合もあります。

製品フォーマット



GalNAcEXO™
酵素の凍結乾燥品



Immobilized GalNAcEXO™
スピナラムに酵素を固定した製品

GalNAcEXO™



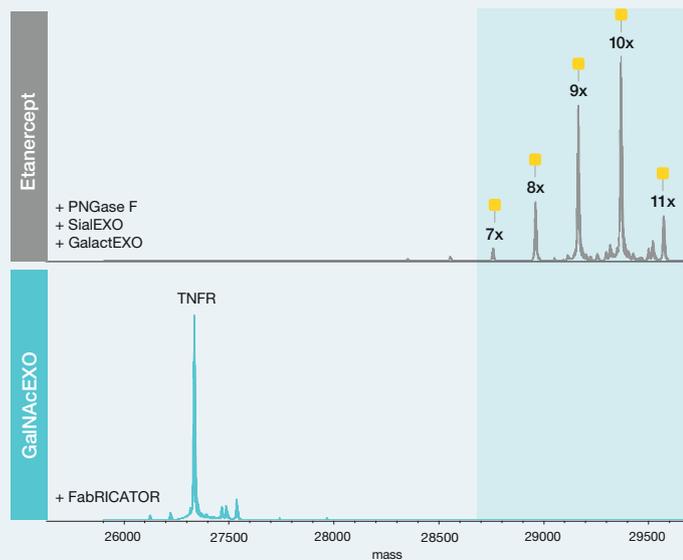
| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|-----------------------|---|------------|
| GalNAcEXO, 2000 units | Hydrolyzes GalNAcs from 2 mg glycoprotein | G1-NA1-020 |



複雑な基質におけるGalNAcEXO™のパフォーマンス

エタネルセプトは13か所のO-結合型糖鎖部位を持つ複雑なバイオ医薬品であり、そのうちの平均9~10か所が占有されています。PNGase FによるN-結合型糖鎖除去、SialEXOとGalactEXOによるO-結合型糖鎖のトリミングの後、マスペクトルによってGalNAc関連のピークを確認しました(図中の上)。GalNAcEXOとのインキュベーション後、残りのα結合型GalNAcの95%以上が除去されていました。(図中の下)。

GalNAcEXO activity on etanercept with truncated O-glycans. Deconvoluted mass spectra of partially deglycosylated etanercept (top) and after treatment with GalNAcEXO (O/N at 37°C, bottom). Samples were FabRICATOR-digested, separated by RP-HPLC (Waters™ BioResolve™ RP mAb, 2.7 μm, 2.1 × 100 mm) and analyzed by ESI-Q-TOF MS (Bruker Impact II).

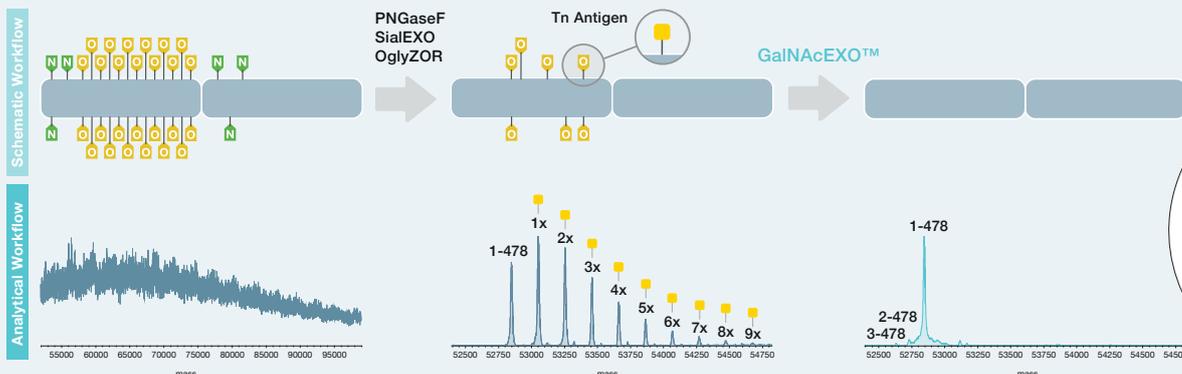


GalNAcEXO™利用したC1インヒビターの脱グリコシル化

O-グリコシル化されたバイオ医薬品の製造中における、コアGalNAc残基の不完全な処理の結果として、製品にTn抗原が出現することがあります。これはHexNAc (203 Da)単位の規則的な差を伴う反復的な質量シフトとして現れます。高度(26ヶ所)にO-グリコシル化されたC1

インヒビター上のTn抗原の存在を確認するために、以下のワークフローを適用しました。まず、PNGase Fを用いてN-結合型糖鎖を除去し、OglyZORとSialEXOを用いてコア1 O-結合型糖鎖除去を除去しました。その結果、マスペクトルに反復的なピークのパターンが観察されました。

残ったGalNAcはGalNAcEXOを用いて完全に除去され、1つのピークが残りしました。このワークフローは、コアGalNAcの数を定量化し、残存する不均一性を減少させ、インタクトなGalNAcの質量の確認を容易にしました。



Total deglycosylation of the recombinant C1 inhibitor. The C1 inhibitor was analyzed by LC (Waters™ ACQUITY UPLC Protein BEH C4 column, 1.7 μm, 2.1 × 100 mm) and ESI-Q-TOF mass spectrometry (Bruker Impact II). In its intact form (left), the protein is highly complex, and deconvolution of the mass spectra only yielded noise. After removal of N- and core 1 O-glycans, the Tn antigens remained (middle) and could efficiently be removed by incubation with GalNAcEXO (O/N at 37°C, right).

Immobilized GalNAcEXO™



| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|--|--|------------|
| Immobilized GalNAcEXO, Microspin 5 × 0.5 mg | Hydrolyzes GalNAcs from 5 × 0.5 mg glycoprotein | G1-NA6-025 |
| Immobilized GalNAcEXO, Microspin 10 × 0.5 mg | Hydrolyzes GalNAcs from 10 × 0.5 mg glycoprotein | G1-NA6-050 |

GlycOCATCH®

O-糖化タンパクの濃縮



GlycOCATCHは、ムチン型O-糖化タンパク・ペプチドを精製するためのアフィニティーレジンです。このアフィニティーレジンには、O-糖化タンパク・ペプチドと高い親和性で結合するように設計された不活性なOpeRATOR（酵素）をベースにしています。GlycOCATCHの用途は、O-糖化タンパク・ペプチドの特異的な濃縮や除去、グリコミクス、複雑なサンプルの研究、バイオ医薬品の特性評価などです。

-  Mucin-type O-glycosylated proteins and peptides
-  Binds to glycoproteins and peptides carrying mucin-type O-glycans.
-  2h workflow
-  Desialylation using SialEXO (included) increases the binding

アフィニティ精製ワークフロー



GlycOCATCHは、ムチン型O-糖化タンパクの濃縮を簡便に行うために、スピンカラム形式で提供されています。GlycOCATCHタンパクはO-糖化タンパクと強い相互作用により高い親和性で結合し、

8M尿素を用いて溶出を行うことができます。また、同梱されているOpeRATOR（酵素）を用いて、結合したO-糖化タンパクのO-結合型糖鎖部位のN末端を切断することで溶出を行うことも可能です。

この場合、ペプチドはネイティブな状態で回収されます。シアル酸化されていないO-結合型糖鎖はこのレジンに効率よく結合するため、シアリダーゼ混合物であるSialEXOも同梱されています。

製品フォーマット



GlycOCATCH®
O-糖化タンパクの濃縮用キット

GlycOCATCH®

| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|------------|-------------------------------------|------------|
| GlycOCATCH | Enrichment of 0.2 mg O-glycoprotein | G3-OC6-002 |



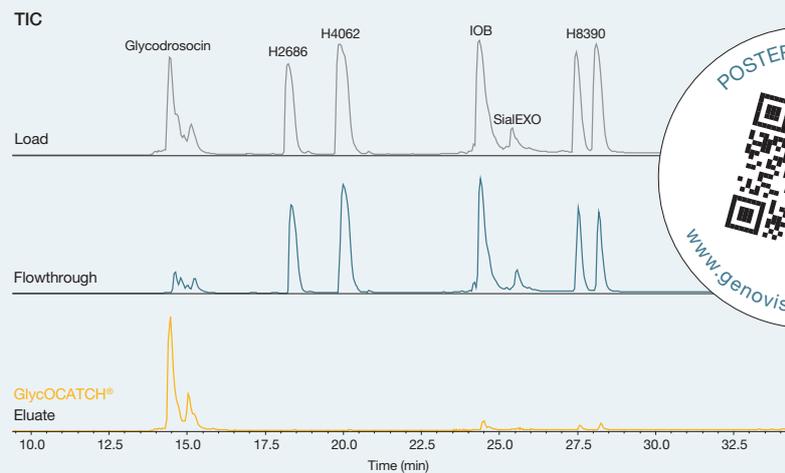
GlycOCATCH®を利用したO-糖化ペプチドの選択的精製

ここでは、GlycOCATCHのO-結合型糖鎖への特異性をペプチドレベルで検討しました。O-糖化ペプチドであるglycodrosocinを非糖化ペプチド混合物にスパイクしてGlycOCATCHにローディングし、洗浄した後、結合しているペプチドを8M尿素で溶出させました。

精製後、分離し、RP-LC-MSで分析を行いました。このデータから、コア1 O-結合型糖鎖を持つglycodrosocinが選択的に精製されることが示されました。

Affinity purification using GlycOCATCH.

Selective purification of an O-glycosylated peptide (glycodrosocin) carrying a core 1 O-glycan.



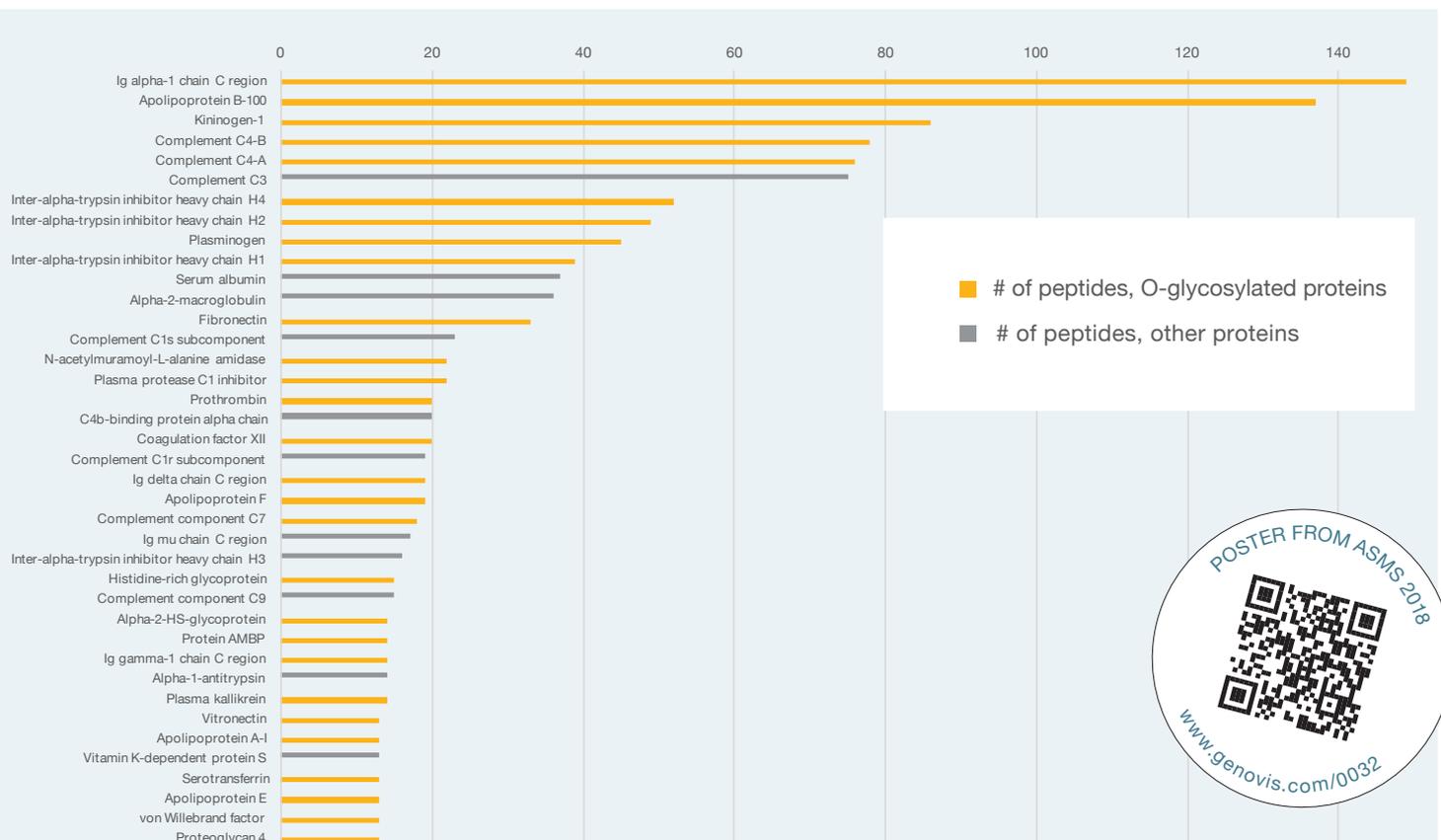
GlycOCATCH®を利用したO-糖化タンパクのアフィニティー精製



GlycOCATCHは、MS分析に先立ち、O-糖化タンパク・ペプチドを特異的に濃縮するために使用することができます。

ここでは、ヒト血清のような複雑なマトリクスからO-糖化タンパクを濃縮するためにGlycOCATCHの強い結合力が有効に

利用されています。



Enrichment of O-glycoproteins from human serum. Human serum was treated with SialEXO and incubated with the GlycOCATCH resin. The eluted proteins were denatured, reduced, alkylated and trypsin digested. Peptides were analyzed using RP-LC-MS/MS, and searched against the Swiss Prot database. Identified O-glycosylated proteins and other proteins with > 12 matching peptides and a MASCOT score > 200 are listed.

Anti-FabRICATOR®

FabRICATOR® (酵素) の検出



Anti-FabRICATOR (Anti-IdeS) は、酵素であるFabRICATOR (IdeS) を検出するヤギポリクローナル抗体で、アフィニティー精製品、ビオチン結合・アフィニティー精製品、プロテインG精製品の3つのタイプから選択いただけます。Anti-FabRICATORは、ウェスタンブロットやELISAアッセイでIdeSを検出するために使用することが可能です。

- 
Detects the FabRICATOR (IdeS) enzyme
- 
Source: goat
- 
Polyclonal
- 
Concentrations ranging from 0.5 mg/ml to 4 mg/ml



**Anti-FabRICATOR®
Affinity Purified**



**Anti-FabRICATOR®
Affinity Purified Biotin Conjugated**

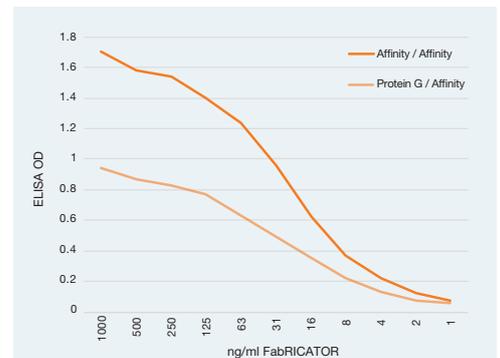


**Anti-FabRICATOR®
Protein G Purified**

Anti-FabRICATOR® Affinity Purifiedのパフォーマンス

Anti-FabRICATORシリーズは、酵素であるFabRICATOR (IdeS)の検出に鋭敏な試薬です。Anti-FabRICATOR Protein G Purifiedと比較して、Anti-FabRICATOR Affinity Purifiedは分析対象であるFabRICATORに対して高い親和性を示すことが確認されました。これはサンドイッチELISAによって証明され、それはFabRI

CATORを結合させる前にプレートをAnti-FabRICATOR Protein G PurifiedまたはAnti-FabRICATOR Affinity Purifiedでコートティングする方法で行われました。また、biotinylated Anti-FabRICATOR Affinity Purifiedは二次抗体として使用され、HRP標識ストレプトアビジンによって検出されました。



Performance of Anti-FabRICATOR Affinity Purified. To display the difference in performance between the Anti-FabRICATOR Protein G Purified and the Anti-FabRICATOR Affinity Purified, wells were coated with either Anti-FabRICATOR Protein G Purified or Anti-FabRICATOR Affinity Purified at 2 µg/ml. The FabRICATOR enzyme was added in dilutions from 1 µg/ml to 1 ng/ml. Anti-FabRICATOR Affinity Purified Biotin Conjugated was then added at 1 µg/ml. HRP-Streptavidin was added in a 1:2000 dilution, followed by visualization using ABTS.

Anti-FabRICATOR®

| PRODUCT | DESCRIPTION | ID |
|--|--|------------|
| Anti-FabRICATOR Affinity Purified | Frozen solution of 0.1 ml, concentration 1 mg/ml | A3-AF2-010 |
| Anti-FabRICATOR Affinity Purified, Biotin Conjugated | Frozen solution of 0.1 ml, concentration 0.5 mg/ml | A3-AF3-005 |
| Anti-FabRICATOR Protein G Purified | Frozen solution of 0.1 ml, concentration 4 mg/ml | A3-AF1-010 |

Legal and Disclaimers

All rights reserved. Genovis products may be covered by one or more patents, trademarks and copyrights owned or controlled by Genovis AB. For more information about commercial rights, please contact the Genovis team at licensing@genovis.com.

Genovis products are intended for research use only. They are not intended to be used for therapeutic or diagnostic purposes in humans or animals. All goods and services are sold subject to Genovis' General Terms and Conditions of Sale.

FabRICATOR®

This product is provided under an exclusive world-wide intellectual property license from Hansa Biopharma AB derived from international publication WO03051914, including granted US Patent No US 7,666,582 and granted European Patent No 1458861. The license encompasses IdeS from *Streptococcus pyogenes* for biotechnical industrial applications which are neither therapeutic nor diagnostic, other than the following exception which is included within the license: digesting IgG *in vitro* in clinical samples for diagnostic purposes.

POROS® included in FabRICATOR®HPLC

This product is provided under an intellectual property license from Life Technologies Corporation. The transfer of this product is conditioned on the buyer using the purchased product solely in research or for analytical testing during manufacturing, all conducted by the buyer, excluding contract research or any fee for service research, and the buyer must not (1) use this product or its components

for (a) diagnostic, therapeutic or prophylactic purposes; (b) testing, analysis or screening services, or information in return for compensation on a per-test basis; and/or (c) sell or transfer this product or its components for resale, whether or not resold for use in research. For information on purchasing a license to this product for purposes other than as described above, contact Thermo Fisher Scientific, 5826 Newton Drive, Carlsbad, CA 92008 USA or outlicensing@thermofisher.com. The trademark POROS® trademark is the property of Life Technologies Corporation.

FabRICATOR® Magic

The trademarks Thermo Scientific™, KingFisher™ and BindIt™ are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries.

SiteClick™ included in GlyCLICK®

This product is provided under an intellectual property license from Life Technologies Corporation. The transfer of this product is conditioned on the buyer using the purchased product solely in research conducted by the buyer, excluding contract research or any fee for service research, and the buyer must not (1) use this product or its components for (a) diagnostic, therapeutic or prophylactic purposes; (b) testing, analysis or screening services, or information in return for compensation on a per-test basis; or (c) manufacturing or quality assurance or quality control, and/or (2) sell or transfer this product or its components for resale, whether or not resold for use in research. For information on purchasing a license to this product for purposes other than

as described above, contact Life Technologies Corporation, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008 USA or outlicensing@thermofisher.com. The trademark SiteClick™ is the property of Life Technologies Corporation.

Linker-toxin Payloads included in GlyCLICK®

This product is provided under an intellectual property license from Glykos Finland Ltd. The transfer of this product is conditioned on the buyer using the purchased product solely in research conducted by the buyer. The buyer must not (1) use this product or its components for (a) diagnostic, therapeutic or prophylactic purposes; or (b) manufacturing or quality assurance or quality control, and/or (2) sell or transfer this product or its components for resale, whether or not resold for use in research.

CaptureSelect™

Thermo Scientific™ CaptureSelect™ resin from Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries. Thermo Scientific and CaptureSelect are trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries.

TransGLYCIT™

TransGLYCIT contains a technology licensed from GlycoT Therapeutics, LLC.

Immobilized PNGase F Denaturing

RapiGest™ SF Surfactant from Waters Corporation is included in Immobilized PNGase F Denaturing. *RapiGest™* is a trademark of Waters Corporation.

© Genovis AB

The SmartEnzymes portfolio consists of enzymatic products and technologies designed to improve the efficacy and throughput in analytical or preparative workflows for complex biopharmaceuticals such as antibodies, Fc-fusion proteins, complex glycoproteins and antibody conjugates.



FabRICATOR®
Below hinge
digestion of IgG



FabALACTICA®
Above hinge
digestion of human IgG1



FabRICATOR® Z
Below hinge
digestion of mouse IgG



FabULOUS™
Above hinge
digestion of IgG



GingisKHAN®
Above hinge
digestion of human IgG1



GlycINATOR®
Hydrolysis of
IgG Fc glycans



IgGZERO®
Hydrolysis of
complex Fc glycans



GlyCLICK®
Site-specific
conjugation of native IgG



TransGLYCIT™
Transglycosylation
of IgG



GingisREX®
Arginine-specific
protein digestion



**Immobilized
PNGase F**
Hydrolysis of N-glycans



OpeRATOR®
O-glycan-specific
protein digestion



OglyZOR®
Hydrolysis of
core-1 O-glycans



SialEXO®
Hydrolysis of
sialic acids



FucoseEXO™
Hydrolysis of
 α 1-2,3,4 fucose



GalactEXO™
Hydrolysis of β 1-3,4-
linked galactose



GalNAcEXO™
Hydrolysis of
 α -linked GalNAcs



GlycOCATCH®
Enrichment of
O-glycoproteins



Anti-FabRICATOR®
Detection of the
FabRICATOR enzyme

輸入元



重松貿易株式会社 化学品部
Shigematsu & Co., Ltd.

本社：〒541-0047 大阪市中央区淡路町2丁目2番5号
TEL: (06) 6231-6146 (代) FAX: (06) 6231-6149

www.shigematsu-bio.com/

info@shigematsu-bio.com

販売元