

免疫球蛋白降解酶 IdeS 在大肠杆菌中的表达、纯化及功能鉴定

周思含, 刘恣之, 杨 燕, 王 伟*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室/国家卫生健康委员会天然药物生物合成重点实验室, 北京 100050)

摘要: 病原链球菌为逃避宿主的免疫反应, 分泌一种可特异地裂解免疫球蛋白 G 的降解酶 (immunoglobulin G-degrading enzyme of *Streptococcus pyogenes*, IdeS)。IdeS 既可作为工具酶用于 IgG 的指纹分析, 又可用于治疗与自身免疫反应相关的疾病。本研究基于质粒 pCold 构建了两种重组 IdeS 的表达载体, 并在大肠杆菌 Shuffle T7 中进行异源表达, 经亲和和色谱纯化后检测其蛋白活性。结果表明 N-端含有 His6-标签的重组 IdeS 产量为 $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 其与抗体 IgG1 以 1:200 (*m/m*) 在 37 °C 反应 30 min 即可完全酶解。而 N-端含有 His6-标签且 C-端含有硅胶亲和标签 (SiBP) 的重组 IdeS 产量为 $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 其与抗体 IgG1 以 1:20 (*m/m*) 在 37 °C 反应 30 min 才可反应完全。C-端融合肽对于 IdeS 产量与活性都有较大的影响, 使其活性降低, 不利于后续应用于药物研发。上述结果表明, 本系统所表达的 N-端含有 His6-标签的 IdeS 重组蛋白具有较高的活性, 完全能满足抗体类药物研发和作为工具酶用于 IgG 指纹分析的需求。

关键词: 免疫球蛋白 G 降解酶; 异源表达; IgG 指纹分析; 供体特异性抗体

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)07-2234-06

Expression, purification, and functional identification of immunoglobulin degrading enzyme IdeS in *Escherichia coli*

ZHOU Si-han, LIU Min-zhi, YANG Yan, WANG Wei*

(State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, NHC Key Laboratory of Natural Drug Biosynthesis, Institute of Materia Medica, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

Abstract: In the process of evolution, pathogenic *Streptococcus pyogenes* secretes an immunoglobulin G-degrading enzyme IdeS which can specifically cleave the hinge region of immunoglobulin G in order to escape the immune response against the host. On the one hand, IdeS can be used for IgG fingerprinting as a tool enzyme combined with mass spectrometry technology. On the other hand, IdeS can be used to treat the antibody-responsive diseases produced by autoimmunity as a therapeutic protein. In this study, the backbone of plasmid pCold was used to construct two expression vectors of recombinant protein IdeS, which were heterologously expressed in *Escherichia coli* Shuffle T7. After purification by affinity chromatography, the recombinant IdeS activity was detected and their activity differences between the two were compared. Among them, the yield of the recombinant IdeS containing the His6-tag at the N-terminus was $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, and the cleavage reaction with antibody IgG1 at 1:200 (*m/m*) at 37 °C for 30 min could complete. However, the yield of the recombinant IdeS containing both the N-terminal His6 tag and the C-terminal silica affinity tag (silica binding peptide, SiBP) is $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, and the degradation reaction with antibody IgG1 at 1:20 (*m/m*) at 37 °C for 30 min could reach the end. The C-terminal fusion peptide has a

收稿日期: 2022-03-28; 修回日期: 2022-05-31.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82073757, 81903487); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2021-I2M-1-029); 北京协和医学院合成生物学学科建设专项资助 (201920100801).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63165196, E-mail: wwang@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0364

great influence on the yield and activity of IdeS, which is not conducive to subsequent application in drug development. Above all, the recombinant IdeS containing the His6-tag at the N-terminus expressed by this system has high activity and can fully meet the needs of antibody drug development and mapping analysis of IgG.

Key words: immunoglobulin G-degrading enzyme; heterologous expression; IgG fingerprinting; donor-specific antibody

化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 的免疫球蛋白 G 降解酶 (immunoglobulin G-degrading enzyme of *Streptococcus pyogenes*, IdeS) 是一种高度特异性的半胱氨酸蛋白酶, 能够单位点切割人免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 的铰链区, 使其裂解为一个 F(ab')₂ 片段和两个 1/2 Fc 片段。在化脓性链球菌感染的过程中, 宿主发生炎症反应并募集 IgG 到感染部位, 为了抵抗 IgG, 链球菌分泌的 IdeS 对 IgG 进行特异性切割, 不仅降解了 IgG, 还抑制了下游由 Fc 调节的反应, 使链球菌得以继续存活在这种炎症环境中^[1-3]。

与化脓性链球菌分泌的典型的半胱氨酸蛋白酶 SpeB 不同, IdeS 的作用底物仅限于人 IgG 类的抗体^[4,5], 具有高度的特异性, 产物均一。IdeS 作用于下铰链区的第 236 位和 237 位的两个甘氨酸之间, 如图 1 所示。虽然缺乏与其他半胱氨酸蛋白酶的序列同源性, 但 IdeS 蛋白序列第 94 位的半胱氨酸和第 224 位的组氨酸之间的距离与其他半胱氨酸蛋白酶相似^[6]。与经典的半胱氨酸蛋白酶不同的是, IdeS 没有二硫键, 并且是在没有前肽的情况下合成的。

随着越来越多的治疗性抗体的研发与应用以及基因工程技术的发展, 对其结构和翻译后修饰 (post translational modifications, PTMs) 的分析方法要求也越来越高。质谱分析是蛋白质分析最广泛使用的方法, 能够提供主要氨基酸序列、转化后修饰、糖基化水平等其他结构特征信息, 在随后的评估与质量控制中发挥着重要作用。对于大分子的治疗性抗体而言, IdeS 的出现无疑为由于分子质量过大, 结构复杂而带来的繁琐质量控制工作减轻了负担, 可以分区域的根据不同目的来选择合适的方法进行结构表征与质量评估。作为已经商业化的 IgG 降解酶, IdeS 将抗体产品的快速和高通量分析与有限的样品制备相结合, 应用于抗体的关键质量属性的特征分析如糖基化、氧化、翻译后修饰等基本属性^[7-12]。

尽管 IgG 在抗击入侵微生物方面起着至关重要的作用, 但它也参与各种自身免疫性疾病。IdeS 对 IgG 的特异性降解, 使其成为生物治疗自身免疫疾病相关致病抗体的候选药物, 目前该酶正在临床前模型和临床试验中被评估为一种生物药物。2020 年 8 月, 汉莎

生物制药研发的静脉注射 IdeS (imlifidase) 在欧盟获得了首次全球批准, 作为孤儿药用于对高度致敏的成人肾移植患者进行脱敏治疗, 展现出良好的预后与安全性^[13-15]。由于存在超急性排斥的风险, 传统上在肾移植前数周内需要提前进行血浆或静脉免疫球蛋白的脱敏治疗, 但这对于没有活体捐献者的患者而言是十分困难的。IdeS 减少了供体特异性抗体, 使得器官的异体移植成为可能。Imlifidase 目前正在美国、澳大利亚、法国和奥地利进行预防肾移植排斥反应的临床评估, 并且正在法国、英国和荷兰进行抗肾小球基底膜疾病吉兰-巴雷综合征的临床开发^[16,17]。除此之外, IdeS 也被探索用于基因治疗以改善腺病毒载体的转基因表达情况^[18,19]。

IdeS 既可作为免疫抑制剂用于治疗器官移植引起的排斥反应等与自身免疫相关的疾病, 也可作为工具酶应用于 IgG 的结构表征、功能分析和亚单位制备。然而, 从宿主菌中提取 IdeS 无法满足如此庞大的需求, 购买进口的 IdeS 价格也十分高昂。本研究选择冷休克诱导表达系统, 通过 Shuffle T7 宿主菌异源表达, 以增加蛋白的可溶性, 促进蛋白正确折叠。在低温环境中, 大肠杆菌蛋白质从头合成受到抑制, 此时冷休克载体 CspA 启动子应激启动异源蛋白的特异性过表达, 同时, 低温也是提高异源蛋白在大肠杆菌宿主细胞中表达时的溶解度及表达水平的有效手段之一^[20]。考虑到 IdeS 属于半胱氨酸蛋白酶家族, 选择 Shuffle T7 宿主菌可以在胞质中提供还原性微环境以促进 IdeS 的正确折叠^[21]。其次, 通过在 IdeS 蛋白 N-端添加 His6-标签进行纯化。除了常规的镍离子亲和色谱纯化, 硅胶作为一种高活性吸附材料, 价格低廉易得, 尝试将硅胶亲和标签^[22] (silica-binding peptide, SiBP) 融合在 IdeS 蛋白的 C-端, 并考察其对 IdeS 产量及活性的影响。最后, 通过酶切 IgG 抗体对 IdeS 进行酶活分析, 对其今后应用于抗体药物质量控制、抗体修饰或融合蛋白生产均有重要的意义。

材料与方法

材料 冷休克载体 pCold 购于 TaKaRa 公司; 所用的克隆大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH10b 感受态细胞

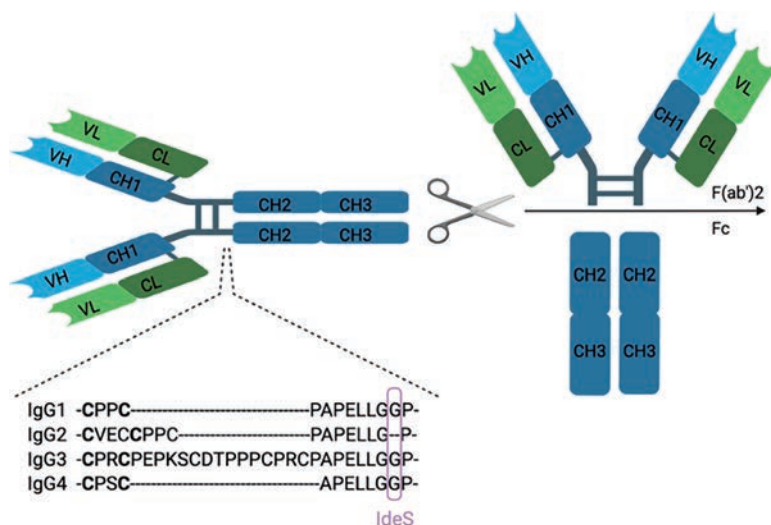


Figure 1 Schematic diagram of immunoglobulin G-degrading enzyme of *Streptococcus pyogenes* (IdeS) digestion sites on immunoglobulin G (IgG)

购于北京庄盟国际生物基因科技有限公司; 大肠杆菌 Shuffle T7 购于纽英伦生物技术(北京)有限公司; 大肠杆菌培养基为 LB (1% yeast extract, 0.5% tryptone, 1% NaCl) 培养基购于英国 OXOID 公司; 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 购于北京兰博利德生物科技有限公司; 0.22 μ m 滤膜购于默克公司。

试剂 质粒小量提取试剂盒购于威格拉斯生物技术有限公司; 凝胶 DNA 小量回收试剂盒购于广州美基生物科技有限公司; 限制性内切酶购于纽英伦生物技术(北京)有限公司; KAPA 热启动 HiFi 高保真酶购于罗氏诊断公司; ClonExpress® II One Step Cloning Kit 连接试剂盒购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 基因测序由北京睿博兴科生物技术有限公司完成; SDS-PAGE 染色液购于北京兰博利德生物科技有限公司。

IdeS 重组蛋白表达载体的构建 构建流程如图 2 所示, 根据化脓性链球菌 (*S. pyogenes*) 基因组序列 (GenBank No. CP013838) 委托上海捷瑞生物工程有限公司合成 IdeS 编码基因, 以含有 IdeS 编码框的质粒 IMM-WW2019-3 为模板, 用引物对 IdeS-F/IdeS-R (表 1) 扩增 IdeS 序列 (编码第 15~339 aa), 用引物对 IdeS-F/IdeS-SBP-R1 和 IdeS-F/IdeS-SBP-R2 连续两轮扩增 C-端含有 SiBP-标签的 IdeS 序列, 分别使用 ClonExpress® II One Step Cloning Kit 试剂盒, 利用 *Nde* I 和 *Sal* I 位点亚克隆到 pCold 载体上, 获得 N-端含有 His6-标签的 IdeS

重组蛋白表达载体 pCold-His-IdeS, 以及 N-端含有 His6-标签且 C-端还有 SiBP-标签的 IdeS 重组蛋白表达载体 pCold-IdeS-SiBP。连接产物转化大肠杆菌 DH10b, 挑取转化子菌落 PCR 鉴定后提取质粒测序验证。

IdeS 重组蛋白的诱导表达及纯化 将 IdeS 重组蛋白表达载体转化大肠杆菌 Shuffle T7, 挑取单克隆至 25 mL LB 培养基中 37 °C 培养 4~6 h, 按 1% (v/v) 转接至 400 mL LB 培养基中继续培养, 待 A_{600} 值为 0.4~0.6 后, 15 °C 静置预冷 30 min, 加入终浓度 0.2 mmol·L⁻¹ IPTG, 15 °C 低温诱导 16~18 h。离心收集菌体, 并用 PBS (pH = 7.4) 重悬, 高压匀浆破碎菌体 (800 bar, 5 min)。离心收集上清, 将上清经 0.22 μ m 滤膜过滤后进行 Ni²⁺亲和和柱色谱纯化, 用咪唑梯度浓度洗脱并收集目的蛋白, 并利用 SDS-PAGE 分析纯化蛋白。

IdeS 重组蛋白的活性检测 取纯化后的 IdeS 酶切人抗体 IgG1, 37 °C, PBS (pH = 7.4) 缓冲盐 50 μ L 体系下, 酶与抗体质量比分别为 1:500、1:200、1:100、1:20, 反应 30 min, 以不添加蛋白酶的样品为对照, 利用 SDS-PAGE 分析酶切反应。

结果与分析

1 IdeS 重组蛋白表达载体的构建

如图 3 所示, 把 PCR 扩增获得的目的基因片段与限制性内切酶 *Nde* I 和 *Sal* I 酶切的 pCold 载体进行连

Table 1 Primers used for PCR in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')
IdeS-F	TCATATCGAAGGTAGGCATATGGGTGGAAGTGGCGGATTACCTGCTGTTACTTTATTTG
IdeS-R	TTACCTATCTAGACTGCAGGTCGACTTAATTAGTCTGATCCAAGAATCTTG
IdeS-SBP-R1	CGTTACCAGGCTTTTTAAAAACACGAGCACTGTCAGAAGGTCCAGATCCACCAT
IdeS-SBP-R2	TTACCTATCTAGACTGCAGGTCGACTTAACGCTTACCAGGCTTTTTAAAAAC

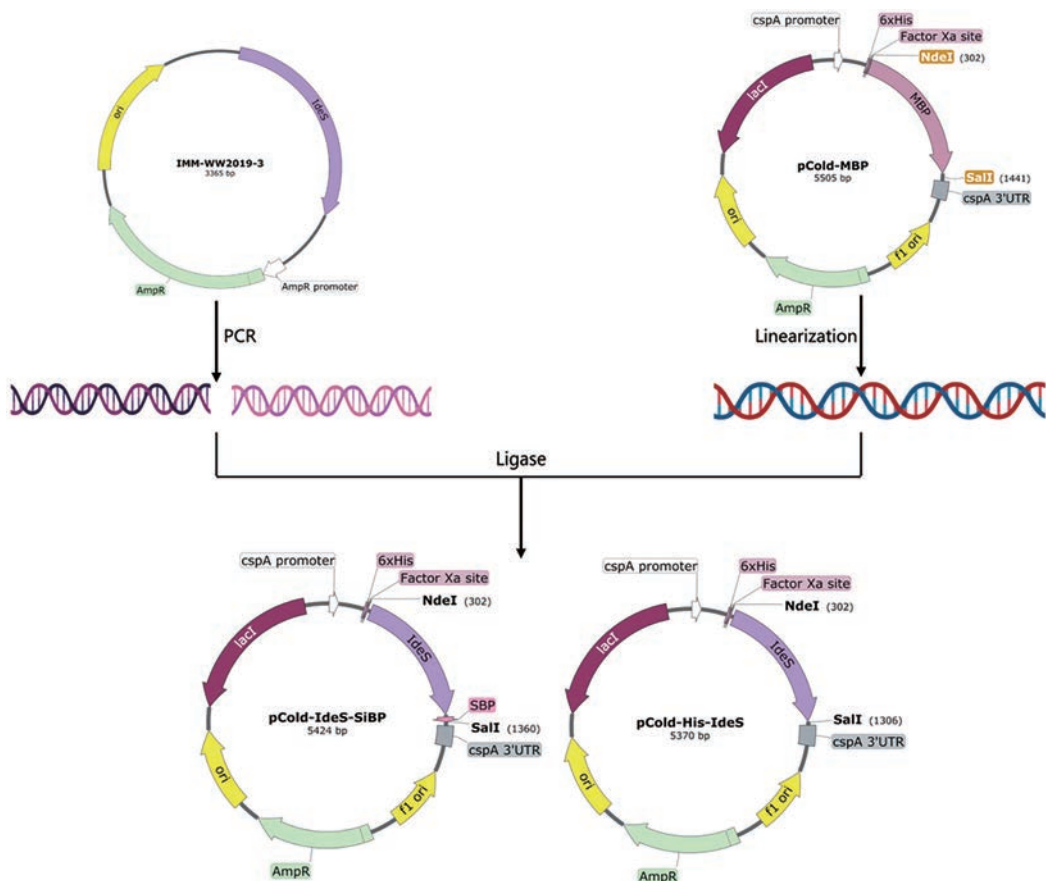


Figure 2 Construction of the recombinant vectors of pCold-His-IdeS and pCold-IdeS-SiBP

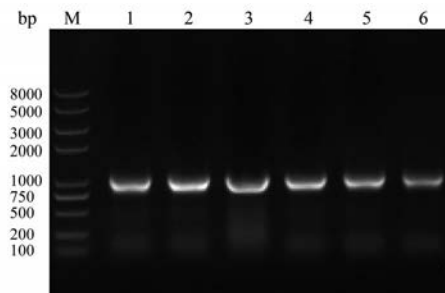


Figure 3 PCR verification of IdeS transformants. M: Marker; Lanes 1-3: pCold-His-IdeS; Lanes 4-6: pCold-IdeS-SiBP

接, 然后转化克隆宿主菌 DH10b; 再利用 PCR 方法进行阳性克隆的鉴定, 即 PCR 扩增得到长度约为 1 000 bp 的特异性条带, 提取质粒并测序验证该序列与 *IdeS* 基因一致, 表明重组质粒 pCold-His-IdeS 和 pCold-IdeS-SiBP 构建正确。

2 IdeS 重组蛋白的诱导表达及纯化

把测序正确的表达质粒 pCold-His-IdeS 和 pCold-IdeS-SiBP 转化到表达宿主中, 挑取单克隆进行种子液培养, 然后按 1% (v/v) 转接到诱导培养基中培养至 A_{600} 为 0.5 左右, 加入 IPTG 并低温诱导培养 16 h, 经 SDS-PAGE 电泳分析结果如图 4 所示, IdeS 重组蛋白分子质

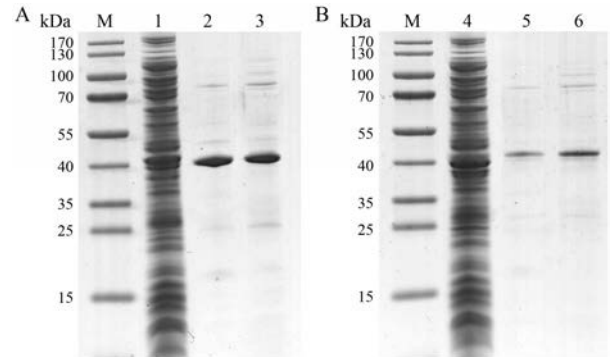


Figure 4 Expression and purification of recombinant proteinase IdeS. M: Marker; Lane 1: Intracellular proteins of His-IdeS; Lanes 2, 3: Elution of His-IdeS with imidazole; Lane 4: Intracellular proteins of His-IdeS-SiBP; Lanes 5, 6: Elution of His-IdeS-SiBP with imidazole

量约为 40 kDa, 与理论值相符。将重组蛋白进行 Ni^{2+} 离子亲和和色谱纯化, 在 100 和 300 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑梯度洗脱时可以获得纯度较高的重组蛋白 IdeS。但 C-端含有硅胶亲和和标签的重组 IdeS 蛋白产量为 $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 并低于仅 N-端含有 His6-标签的重组 IdeS 蛋白 $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的产量。

3 IdeS 重组蛋白的活性检测

重组蛋白 IdeS 与人 IgG1 反应 30 min 后, SDS-PAGE 检测发现, 人 IgG1 能够被切割成为 F(ab')₂ 片段和 1/2 Fc 片段, 大小为 25~30 kDa, 如图 5 所示。N-端含有 His6-标签的重组 IdeS 蛋白在酶与抗体质量比 1:200 时, 就能有较高的酶切效率。而 C-端含有硅胶亲和标签的重组 IdeS 蛋白则是在酶与抗体质量比 1:20 时, 才能有较高的酶切效率。

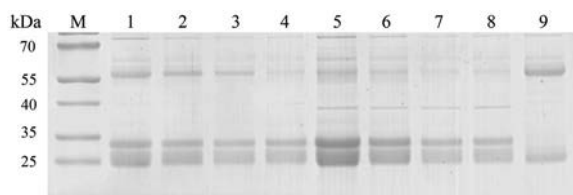


Figure 5 IdeS reacts with human IgG1 in 30 minutes. M: Marker; Lanes 1-4: His-IdeS reacts with human IgG1 in variety of mass ratio; Lanes 5-8: His-IdeS-SiBP reacts with human IgG1 in variety of mass ratio; Lane 9: Human IgG1

讨论

随着治疗性抗体的研发与应用, 基于安全性、特异性、生物物理性质和疗效的整体考虑, 治疗性抗体一方面形式更加简化; 另一方面也有可能出现更加复杂的抗体工程化修饰方式。IdeS 作为抗体产品的指纹分析和质量控制的重要工具酶^[7-12], 为今后的治疗性抗体类药物质量控制提供了一条十分有竞争力的分析技术。

IdeS 已经作为治疗性蛋白被应用于肾移植^[13-15], 虽然 IdeS 与宿主和免疫细胞之间的相互作用已被证实会影响免疫细胞的功能和调节免疫反应, 但其中的分子机制与相互作用仍然需要进一步的阐明。尤其是 IdeS 独特于其他典型半胱氨酸蛋白酶之处, 包括结构上的差异、抑制剂的差异和特异性的差异等。这些机制的阐明将会为 IdeS 的应用提供更多的提示, 以在将来被更广泛地用于其他与自身免疫相关的疾病的治疗^[16,17]。此外, IdeS 也可以用于抗体蛋白质工程研究, 制备高纯度 F(ab')₂ 片段^[23,24], 促进新型抗体药物的发现和工程化应用。

无论是作为工具酶, 还是治疗性蛋白, 后续研发都离不开高效的异源表达和生产高活性的重组 IdeS。本研究利用冷休克载体 pCold 在大肠杆菌中成功表达了高特异性、高活性的目的蛋白酶 IdeS, N-端融合 His6-标签的重组 IdeS 与人抗体 IgG1 以 1:200 (m/m) 的比例在 37 °C 反应 30 min, 即可酶切完全。而相同条件下, C-端融合了 SiBP-标签的重组 IdeS 活性降低了约 90%, 推测 IdeS 的 C-端融合肽段会影响蛋白的表达与活性, 这给进一步简化和蛋白质工程改造 IdeS 提供了实验

依据。因此, 本研究所表达的重组 IdeS 既可以作为抗体药物的分析表征工具酶, 也可在未来为 IdeS 成为适应症范围更广的治疗性蛋白提供支持。

作者贡献: 周思含参与本文的主要实验工作和论文的撰写; 刘恣之参与实验设计工作; 杨燕参与数据分析和稿件修改; 王伟作为通讯作者负责研究工作的实验设计和论文修改。

利益冲突: 本文的研究内容无任何利益冲突。

References

- [1] Su Y, Chuang W, Wang S, et al. The deficient cleavage of M protein-bound IgG by IdeS: insight into the escape of *Streptococcus pyogenes* from antibody-mediated immunity [J]. *Mol Immunol*, 2011, 49: 134-142.
- [2] Happonen L, Hauri S, Svensson G, et al. A quantitative *Streptococcus pyogenes*-human protein-protein interaction map reveals localization of opsonizing antibodies [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 1-15.
- [3] Söderberg J, von Pawel-Rammingen U. The streptococcal protease IdeS modulates bacterial IgG Fc binding and generates 1/2Fc fragments with the ability to prime polymorphonuclear leucocytes [J]. *Mol Immunol*, 2008, 45: 3347-3353.
- [4] Collin M, Olsén A. Effect of SpeB and EndoS from *Streptococcus pyogenes* on human immunoglobulins [J]. *Infect Immun*, 2001, 69: 7187-7189.
- [5] von Pawel-Rammingen U, Björck L. IdeS and SpeB: immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Streptococcus pyogenes* [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2003, 6: 50-55.
- [6] von Pawel-Rammingen U, Johansson BP, Björck L. IdeS, a novel streptococcal cysteine proteinase with unique specificity for immunoglobulin G [J]. *EMBO J*, 2002, 21: 1607-1615.
- [7] Boztzanowski T, Hernandez-Alba O, Malissard M, et al. Middle level IM-MS and CIU experiments for improved therapeutic immunoglobulin subclass fingerprinting [J]. *Anal Chem*, 2020, 92: 8827-8835.
- [8] Sénard T, Gargano A, Falck D, et al. MS-based allotype-specific analysis of polyclonal IgG-Fc N-glycosylation [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1-13.
- [9] Zhao PY, Gunawardena HP, Zhong XQ, et al. Microdroplet ultrafast reactions speed antibody characterization [J]. *Anal Chem*, 2021, 93: 3997-4005.
- [10] Faid V, Leblanc Y, Bihoreau N, et al. Middle-up analysis of monoclonal antibodies after combined IgdE and IdeS hinge proteolysis: investigation of free thiols [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 149: 541-546.
- [11] Giorgetti J, Beck A, Leize-Wagner E, et al. Combination of intact, middle-up and bottom-up levels to characterize 7 therapeutic monoclonal antibodies by capillary electrophoresis-mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 182: 113107.

- [12] van der Burgt YEM, Kilgour DPA, Tsybin YO, et al. Structural analysis of monoclonal antibodies by ultrahigh resolution MALDI in-source decay FT-ICR mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2019, 91: 2079-2085.
- [13] Lorant T, Bengtsson M, Eich T, et al. Safety, immunogenicity, pharmacokinetics, and efficacy of degradation of anti-HLA antibodies by IdeS (imlifidase) in chronic kidney disease patients [J]. *Am J Transplant*, 2018, 18: 2752-2762.
- [14] Jordan SC, Lorant T, Jus C, et al. IgG endopeptidase in highly sensitized patients undergoing transplantation [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377: 442-453.
- [15] Lonze BE, Tatapudi VS, Weldon EP, et al. IdeS (imlifidase): a novel agent that cleaves human IgG and permits successful kidney transplantation across high-strength donor-specific antibody [J]. *Ann Surg*, 2018, 268: 488-496.
- [16] Al-Salama ZT. Imlifidase: first approval [J]. *Drugs*, 2020, 80: 1859-1864.
- [17] Wang Y, Shi Q, Lv H, et al. IgG-degrading enzyme of *Streptococcus pyogenes* (IdeS) prevents disease progression and facilitates improvement in a rabbit model of Guillain-Barré syndrome [J]. *Exp Neurol*, 2017, 291: 134-140.
- [18] Leborgne C, Barbon E, Alexander JM, et al. IgG-cleaving endopeptidase enables *in vivo* gene therapy in the presence of anti-AAV neutralizing antibodies [J]. *Nat Med*, 2020, 26: 1096-1101.
- [19] Irene RG, Mirja H, Laia TM, et al. Optimising the IgG-degrading enzyme treatment regimen for enhanced adeno-associated virus transduction in the presence of neutralising antibodies [J]. *Clin Transl Immunol*, 2022, 11: e1375.
- [20] Sugiki T, Fujiwara T, Kojima C. Latest approaches for efficient protein production in drug discovery [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2014, 9: 1-16.
- [21] Lobstein J, Emrich CA, Jeans C, et al. SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm [J]. *Microb Cell Fact*, 2012, 11: 56.
- [22] Coyle BL, Baneyx F. A cleavable silica-binding affinity tag for rapid and inexpensive protein purification [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2014, 111: 2019-2026.
- [23] Sjögren J, Andersson L, Mejäre M, et al. Generating and purifying Fab fragments from human and mouse IgG using the bacterial enzymes IdeS, SpeB and Kgp [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1535: 319-329.
- [24] Rosenstein S, Vaisman-Mentesh A, Levy L, et al. Production of F(ab')₂ from monoclonal and polyclonal antibodies [J]. *Curr Protoc Mol Biol*, 2020, 131: e119.