

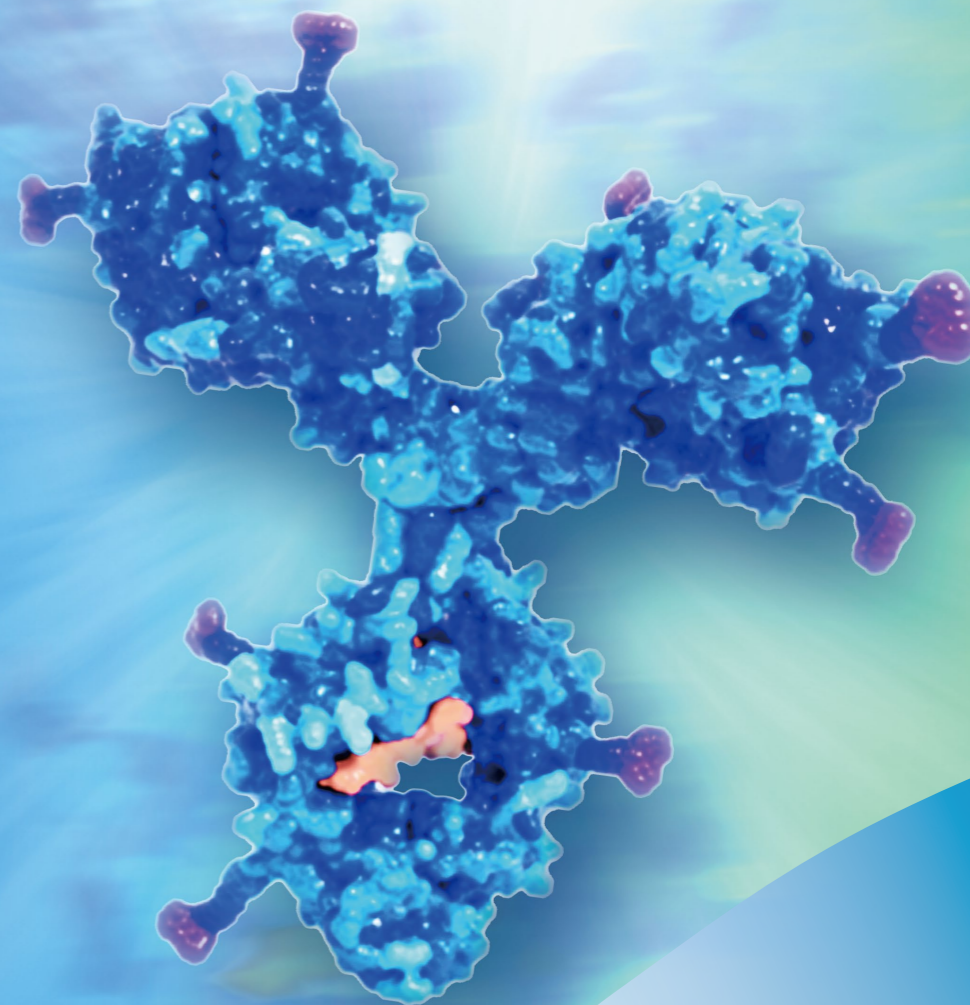
澳斯康生物(南通)股份有限公司
Thousand Oaks Biologics (Nantong) Co., Ltd.

澳斯康生物专有信息和资料, 仅供专业人员学习和研发用途, 不做商业推广
公司不负责及时更新或解释, 如有需要, 请联系公司专业人员进行咨询

联系我们

中国南通: 江苏省南通市海门生物医药科技园(总部)
中国上海: 中国(上海)自贸试验区临港新片区正嘉路1215号5幢
上海市浦东新区哈雷路1043号8号楼2楼206 - 207室
上海市浦东新区哈雷路1043号8号楼4楼402室

邮箱: services@tobiopharm.com 网址: www.tobiopharm.com



顶峰相“鉴”
澳斯康生物制药表征平台



目录

澳斯康生物表征分析平台介绍	01
澳斯康生物表征分析关键设备介绍	02
澳斯康生物表征鉴定服务内容	03
质量研究平台介绍	07
HCP质量研究平台	07
糖基化质量研究平台	10
Case1:复杂糖蛋白分子量水平质量研究	13
Case2:分子大小异质体研究——氨基酸交联	14
Case3:磷酸化/硫酸化修饰	15
Case4: 吐温降解研究	16
Case5:非变性质谱 CEX-MS	17
Case6:SEC-MALS聚体研究	18
Case7:未知蛋白De nove分析	19
Case8:原液颜色问题分析	20
Case9:三硫键表征	20

表征分析在产品不同开发阶段应用



十大优势

- 团队成员具有多年大分子表征分析经验
- 配备行业领先高精尖设备
- Fab/Fc功能表征分析
- 一级及高级结构表征分析
- 工艺相关杂质分析及风险评估
- 产品相关物质及杂质收集及深度鉴定
- 涵盖单抗、双抗、融合蛋白、ADC、CAR-NK等多种分子形式
- 覆盖分子评估、CMC开发、变更可比性研究等产品不同阶段应用
- 药理药效功能分析
- 阶段适用性关键质量属性评估及确定

澳斯康生物表征分析关键设备介绍

Thermo Q Exactive Plus+ Vanquish F

- 质谱软件**
 - 配备Biopharma Finder4.1质谱软件
- 超高分辨率**
 - Resolution: 140k (m/z 200)
 - Mass range: 50-8000 m/z
- 宽动态范围、线性范围**
 - 5~6个数量级
- 稳定的超高质量精度**
 - 3ppm (外标法)
 - 质量轴稳定, 无需时时校正维护简单
- 超高灵敏度**
 - 媲美高端三重四级杆
 - ag-fg级, 分辨率与灵敏度兼得

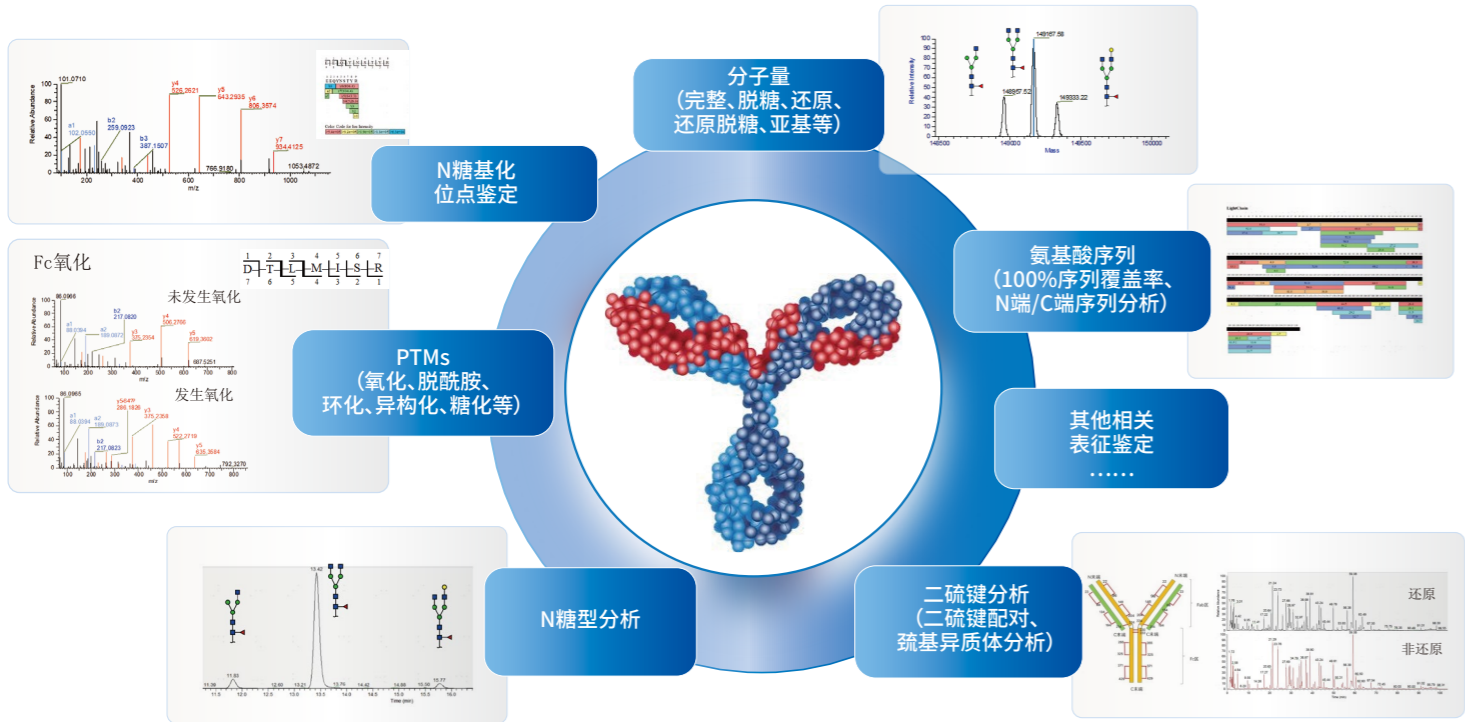
AB SCIEX Zeno 7600+Waters I class plus

- 电子活化解离(EAD)**
 - 精密调谐特定于您感兴趣的碎裂能量, 并获得大分子、多肽、脂质和小分子的关键 MS/MS 特征
- Zeno™ trap (Zeno 阱) 技术**
 - 在每次实验中, 获得更多更有用的 MS/MS 信息, 尤其是对于低丰度离子, 结合 EAD 或 CID 碎裂, MS/MS 灵敏度提高 5-20 倍
- 离子源**
 - 与先进的离子源设计兼容, 可更大幅度地减少污染, 并允许您在整个流速范围内获得快速、自动的校准
- 软件**
 - 配备 SCIEXOS 质谱软件, 算法直观且能自动处理数据
- 校准系统**
 - 配备先进的校准系统, 自动进行质量校准的同时, 确保系统的质量精度

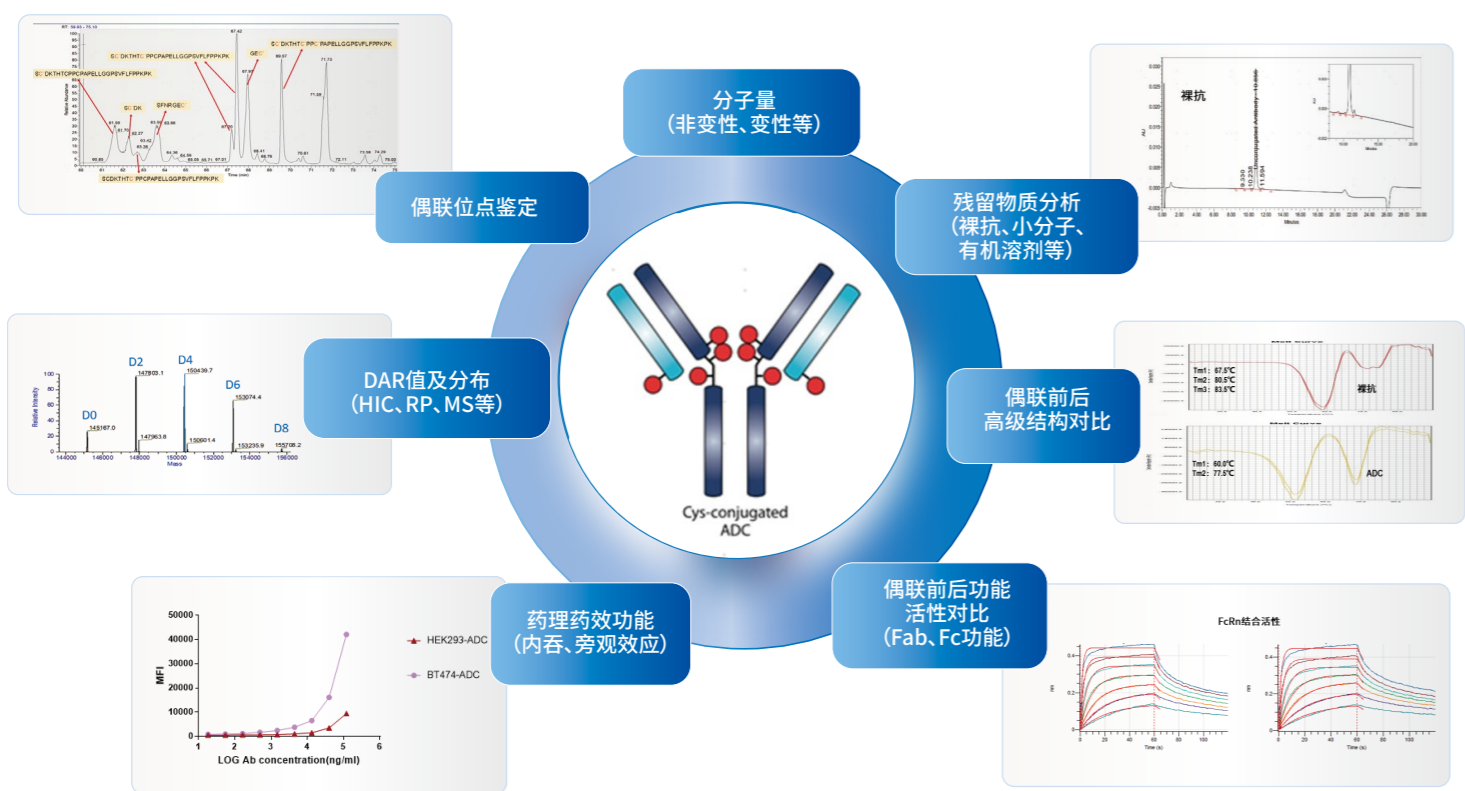
Waters Synapt G2Si

- 突破性的 SYNAPT High Definition MS™ 技术**
 - 通过将高效 T-Wave 离子淌度分离技术与高分辨率精确质量串联质谱相结合
- 卓越的定性和定量性能**
 - StepWave、QuanTof 和 MS^F 的“数据独立型”采集技术相结合, 可以在最低浓度水平的复杂基质中, 通过 UPLC/MS/MS 提供最全面和可靠的非靶向鉴定和化合物鉴定
- Quantof 技术提供杰出性能**
 - 超过 50000 FWHM 的质谱分辨率
 - 精确质量数 (<1 ppm RMS)
 - 准确的同位素丰度
 - 每秒最多可采集 30 个谱图
 - 可为 HD-MRM 和 HD-DDA 方法提供最大 ToF 占空比
- 氘气交换 (HDX) MS**
 - 表位定位
 - 蛋白质-药物之间的结合
 - 蛋白质间相互作用
 - 聚集
 - 突变对蛋白质构象和动力学的影响
 - 由于剂型和稳定性测试所导致的构型定位发生变化
- 高效的 T-Wave 离子淌度分离技术**
 - 显著提高了分析的峰容量、特异性和灵敏度

澳斯康生物抗体常规表征分析

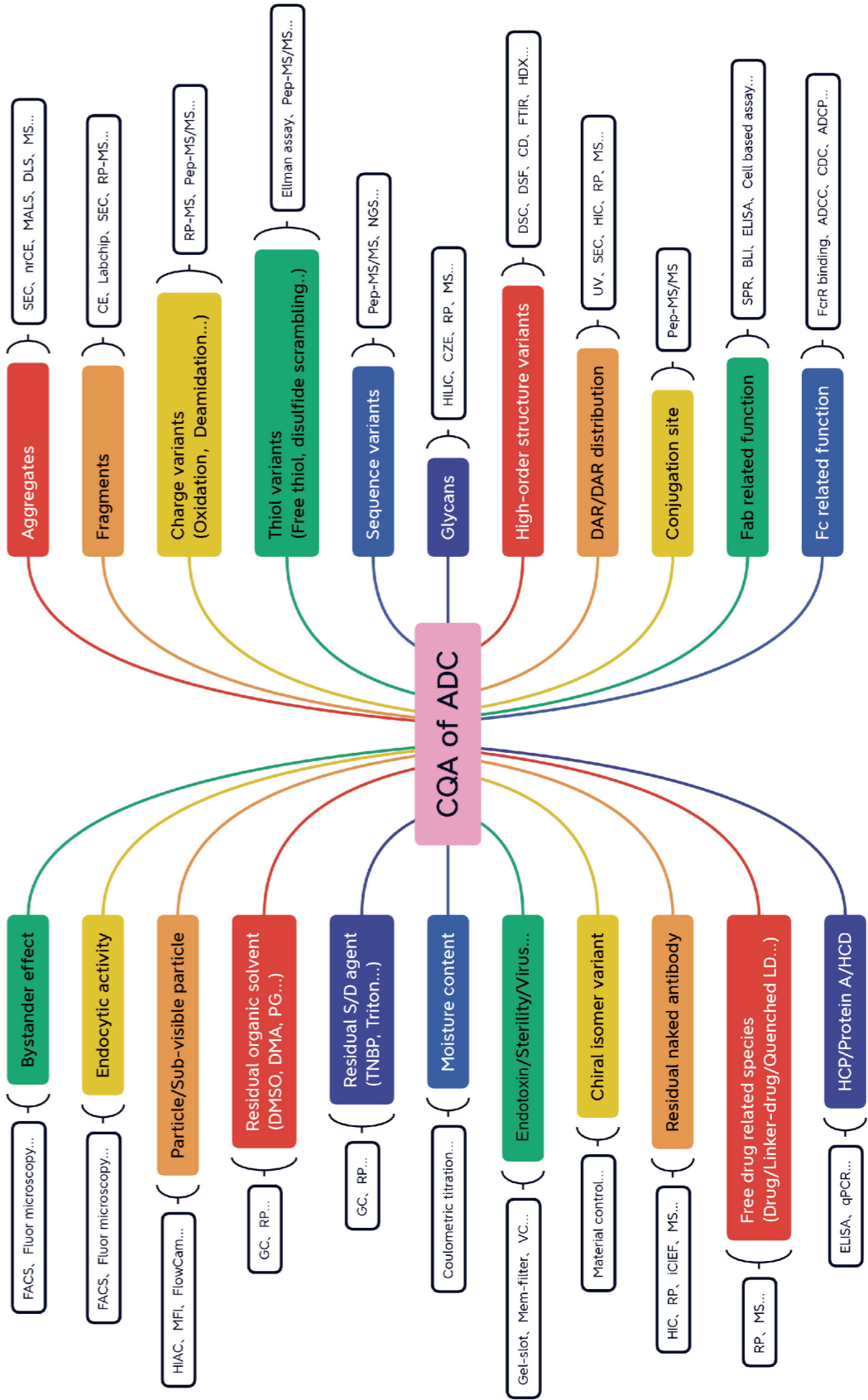


澳斯康生物ADC表征分析



澳斯康生物表征鉴定服务内容

澳斯康生物表征分析服务内容 (ADC)



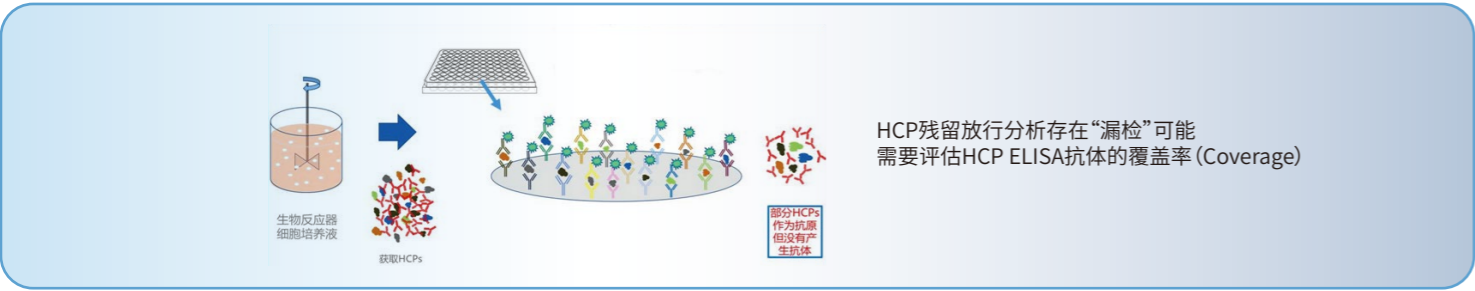
*请横向阅读

类型		表征研究项目		方法	交付周期
一级结构			完整分子量	LC-MS	约4个工作日
			还原分子量	LC-MS	约4个工作日
			完整脱糖分子量	LC-MS	约4个工作日
			还原脱糖分子量	LC-MS	约4个工作日
			氨基酸序列覆盖率分析	LC-MSMS	约5个工作日
			N端序列分析	LC-MSMS	约5个工作日
			C端序列分析	LC-MSMS	约5个工作日
			翻译后修饰	LC-MSMS	约5个工作日
			二硫键分析	LC-MSMS	约7个工作日
			消光系数	HPLC/Edelhoch	约7个工作日
			氨基酸组成	HPLC	约10个工作日
			自由巯基分析	Ellman	约5个工作日
			聚体分子量	SEC-MALS	约7个工作日
高级结构	二级结构		远紫外分析	CD	约7个工作日
			二级结构分析	FTIR	约5个工作日
	三级结构		近紫外分析	CD	约7个工作日
			蛋白自身荧光	酶标仪	约7个工作日
			热稳定性分析	DSF	约5个工作日
糖基化	N或O糖分析		分子量水平糖型分析	LC-MS	约5个工作日
		N糖		N-糖基化位点鉴定	LC-MSMS/H ₂ O ¹⁸ 法
			N-糖肽分析	LC-MSMS	约5个工作日
			游离N糖分析	HPLC-FLD/MS法	约5个工作日
	O糖		O-糖基化位点鉴定	LC-MSMS	约7个工作日
			O-糖肽分析	LC-MSMS	约7个工作日
			游离O糖分析	标记法	约15个工作日
	唾液酸		唾液酸含量分析	HPLC/UPLC	约10个工作日

类型	表征研究项目		方法	检测周期
ADC特异 分析方法	DAR分析	平均DAR值分析	UV	约7个工作日
			RP	约7个工作日
			SEC	约7个工作日
			LC-MS	约7个工作日
		DAR值分布分析	HIC	约7个工作日
			HIC	约7个工作日
			RP	约7个工作日
			LC-MS	约7个工作日
	非变性质谱 分析	分子大小异质体及电荷异质体	SEC-MS	约7个工作日
			HIC-MS	约7个工作日
			CEX-MS	约7个工作日
	质量研究 相关内容	偶联位点分析	LC-MSMS	约7个工作日
		DAR异质体收集及鉴定	LC-MSMS	约7个工作日
		ADC血浆稳定性分析	LC-MSMS	约2-4周
		ADC PK分析	LC-MSMS	约2-4周
		偶联前后一级结构对比分析	2D SDS-PAGE/Western Blot	约7个工作日
		偶联前后高级结构对比分析	LC-MSMS	约7个工作日
残留分析	游离小分子残留量分析	RP	约7个工作日	
	裸抗残留量分析	HIC	约7个工作日	
	DMSO残留量分析	GC	约7个工作日	
	DMA残留量分析	GC	约7个工作日	
	PG残留量分析	GC	约7个工作日	
	ACN残留量分析	GC	约7个工作日	

类型		表征研究项目		方法	交付周期
	非变性质谱	SEC-MS		LC-MS	约10个工作日
		CEX-MS		LC-MS	约10个工作日
		HIC-MS		LC-MS	约10个工作日
	亚基分子量分析		LC-MS		约5个工作日
	亚基还原分子量分析		LC-MS		约5个工作日
	亚基脱糖分子量分析		LC-MS		约5个工作日
	亚基还原脱糖分子量分析		LC-MS		约5个工作日
	质量肽图分析		LC-MSMS		约5个工作日
	放行肽图方法开发、特征峰鉴定		LC-MSMS		约5个工作日
	巯基异质体分析		LC-MSMS		约10个工作日
	胶内酶切分析		LC-MSMS		约10个工作日
	序列变异体分析		LC-MSMS		约10个工作日
	双抗错配分析		LC-MS		约10个工作日
	HCP相关研究内容	HCP宿主蛋白定性鉴定		LC-MSMS	约10个工作日
		高风险HCP宿主蛋白识别		LC-MSMS	约10个工作日
		高风险HCP宿主蛋白相对定量		LC-MSMS	约30个工作日
		高风险HCP宿主蛋白绝对定量		LC-MSMS	约30个工作日
		HCP宿主蛋白覆盖率分析		2D SDS-PAGE/Western Blot	约30个工作日
		HCP宿主蛋白覆盖率分析		LC-MSMS	约30个工作日
质量研究	De novo分析		LC-MSMS		约20个工作日
	氨基酸交联分析		LC-MS/LC-MSMS, etc.		约5个工作日
	吐温降解分析		LC-QDa/HPLC-CAD		约10个工作日
	酸碱峰分析		CEX-MS		约5-10个工作日
	酸碱峰鉴定分析 (CEX收集及分子量鉴定)		LC-MSMS, etc.		约2-4周
	聚体及片段峰鉴定分析		LC-MS/SEC-MS/SEC-MALS, etc.		约5-10个工作日
	聚体片段峰鉴定分析 (SEC收集及分子量鉴定)		LC-MSMS, etc.		约2-4周
	疏水变异体峰分析		HIC-MS		约5-10个工作日
	疏水变异体峰鉴定分析 (HIC收集及分子量鉴定)		LC-MSMS, etc.		约2-4周
	表征专属方法开发		LC-MSMS, etc.		约10个工作日
	原液质谱表征		LC-MSMS		约2-4周
	原液结构及理化性质表征		LC-MSMS, etc.		约2-4周
	可比性及相似性研究		LC-MSMS, etc.		约2-4周
	In silico预测分析		In silico		约5个工作日
	蛋白质鉴定		LC-MSMS		约10个工作日
	MSX残留分析		LC-MSMS		约10个工作日
	高级结构变化区域分析		LC-MSMS		约10个工作日
	非共价聚集区域分析		LC-MSMS		约10个工作日

HCP覆盖率分析-检测意义

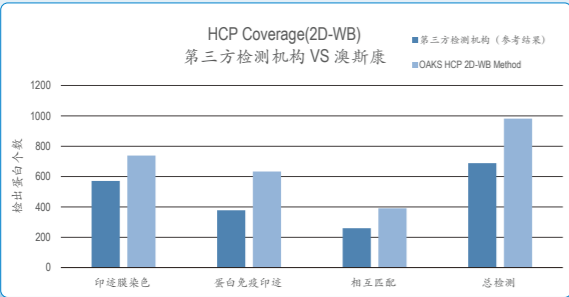
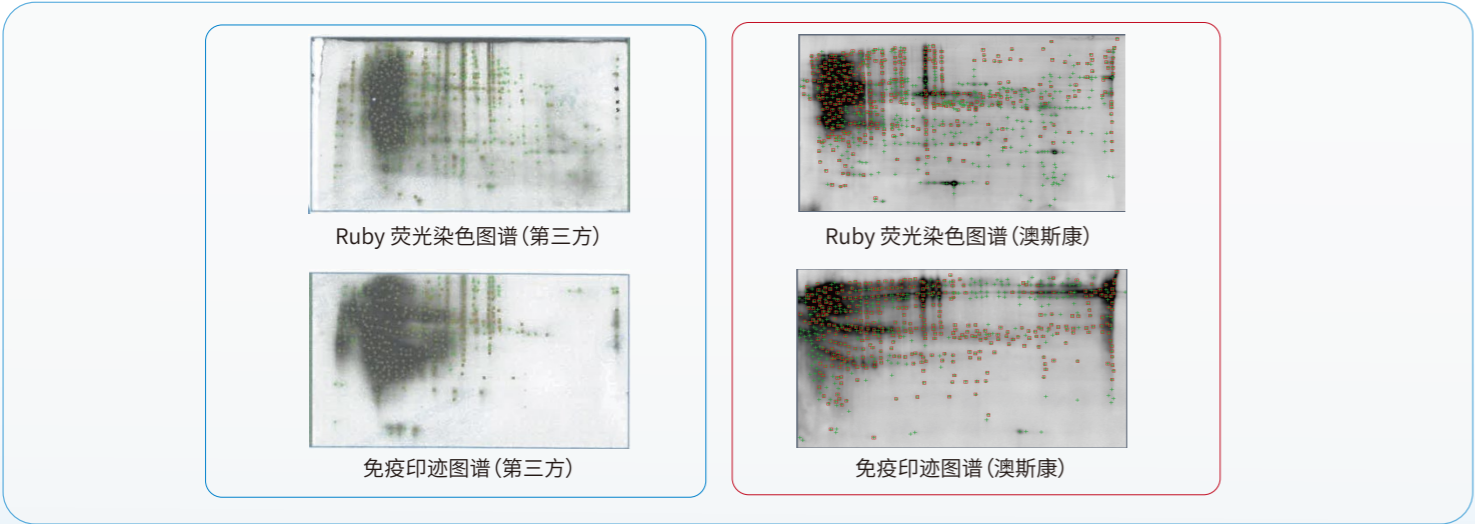


2D-WB 平台方法



- 《美国药典》1132和《欧洲药典》2.6.34推荐的HCP覆盖率表征经典方法;
- 澳斯康2D-WB HCP平台方法在经典2D-WB流程的基础上对前处理、2D、WB方面进行优化,得到更真实的覆盖情况。

某项目HCP覆盖率表征 (2D-WB)



PDQuest	第三方检测机构 (参考结果)	澳斯康 HCP 2D-WB Method
印迹膜染色检测出的蛋白点数	571	739
蛋白免疫印迹检测出的蛋白点数	378	634
两种检测相互匹配的蛋白点数	260	391
总共检测出的蛋白点数	689	982
覆盖率	54.8%	64.6%

- 基于澳斯康2D-WB HCP平台方法, A项目HCP覆盖率表征结果明显优于第三方检测机构结果。

HCP MS 平台方法



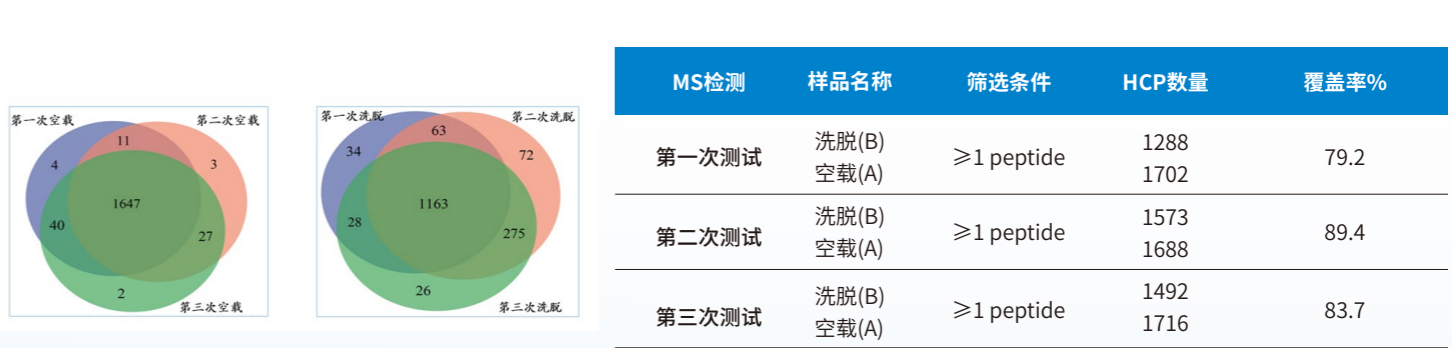
- 澳斯康 MS HCP平台将样品前端预处理及后端高分辨质谱表征研究相结合;
- 捕获前HCPs与捕获洗脱HCPs分别进行变性/还原/烷基化/蛋白酶切, 经过高分辨质谱检测分析, 可准确定性到HCP归属, 计算获得抗体的覆盖率。

某项目 HCP 覆盖率表征(MS)



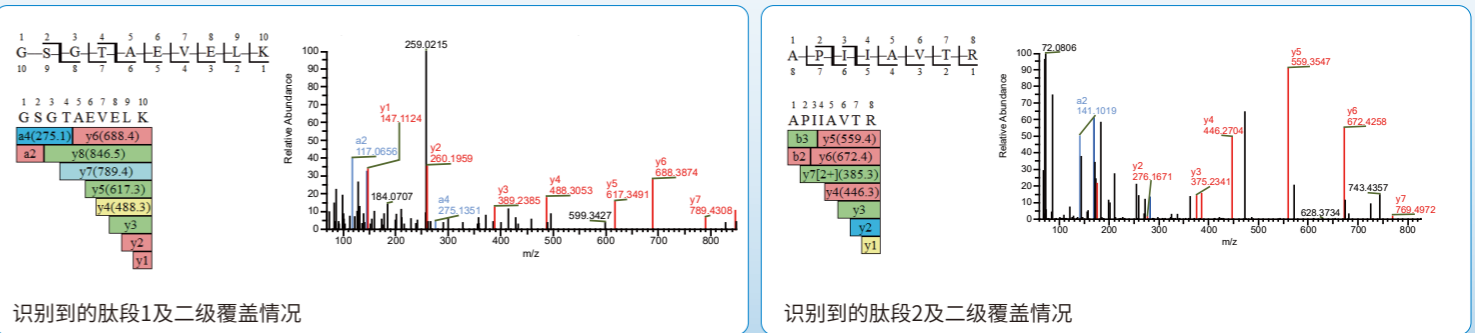
- 基于澳斯康 MS HCP平台方法鉴定到的HCP覆盖率在80%以上, 优于第三方检测机构2D-WB法的覆盖率57.7%。

多批次实验考察 (MS)



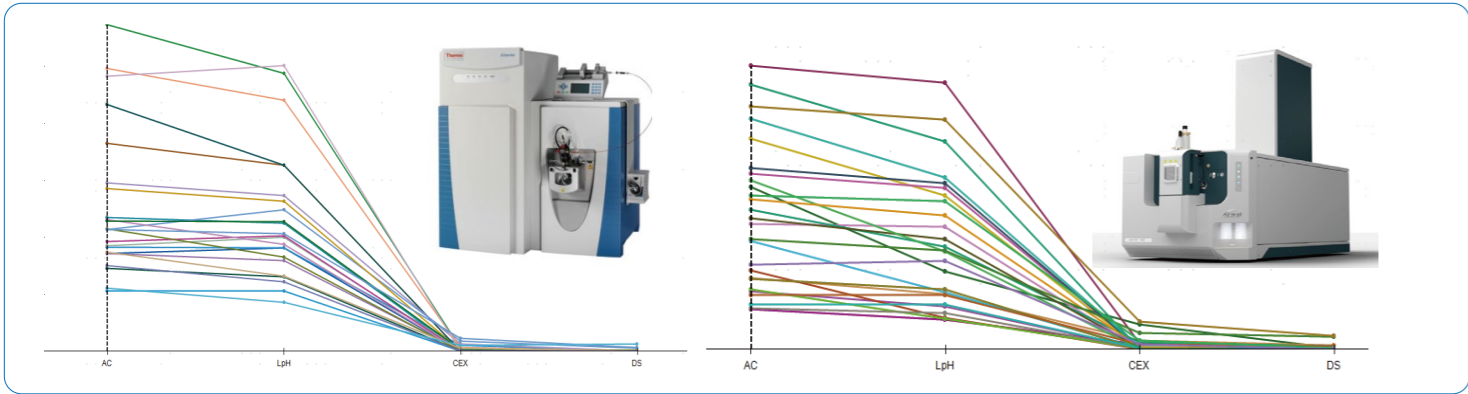
- 澳斯康MS HCP平台方法在某项目的进行了三次HCP覆盖率检测, 三次结果均较为相似, 体现出澳斯康MS HCP平台方法的稳定性及可重现性。

HCP覆盖率表征中MS法的优势



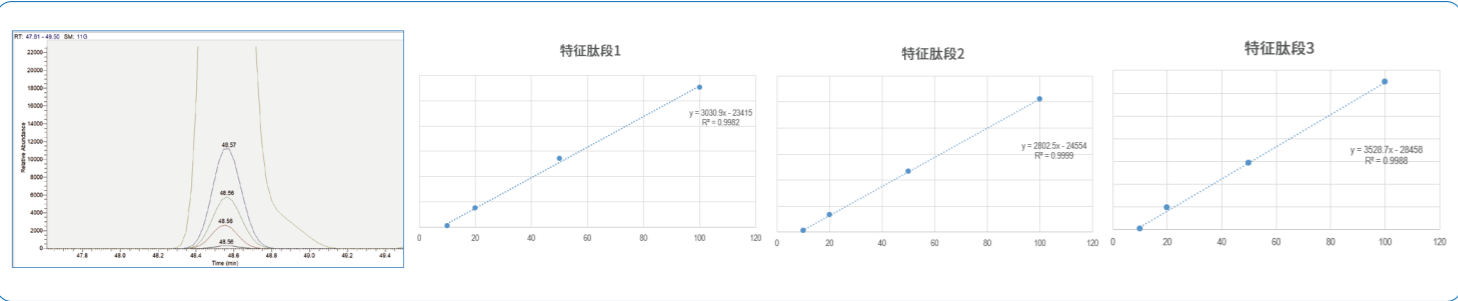
- 高分辨质谱可根据酶切到的peptides, 匹配MS2信息提高鉴定可信度, 进而对特定的HCP进行定性;
- 结合数据库可得特定HCP的MW等深入信息。

HCP去除评估



- 澳斯康拥有Thermo QE Plus及AB Sciex 7600双平台, 可正交结果得出工艺样品HCPs相对变化趋势, 评估清除能力。

特定高风险HCP绝对定量



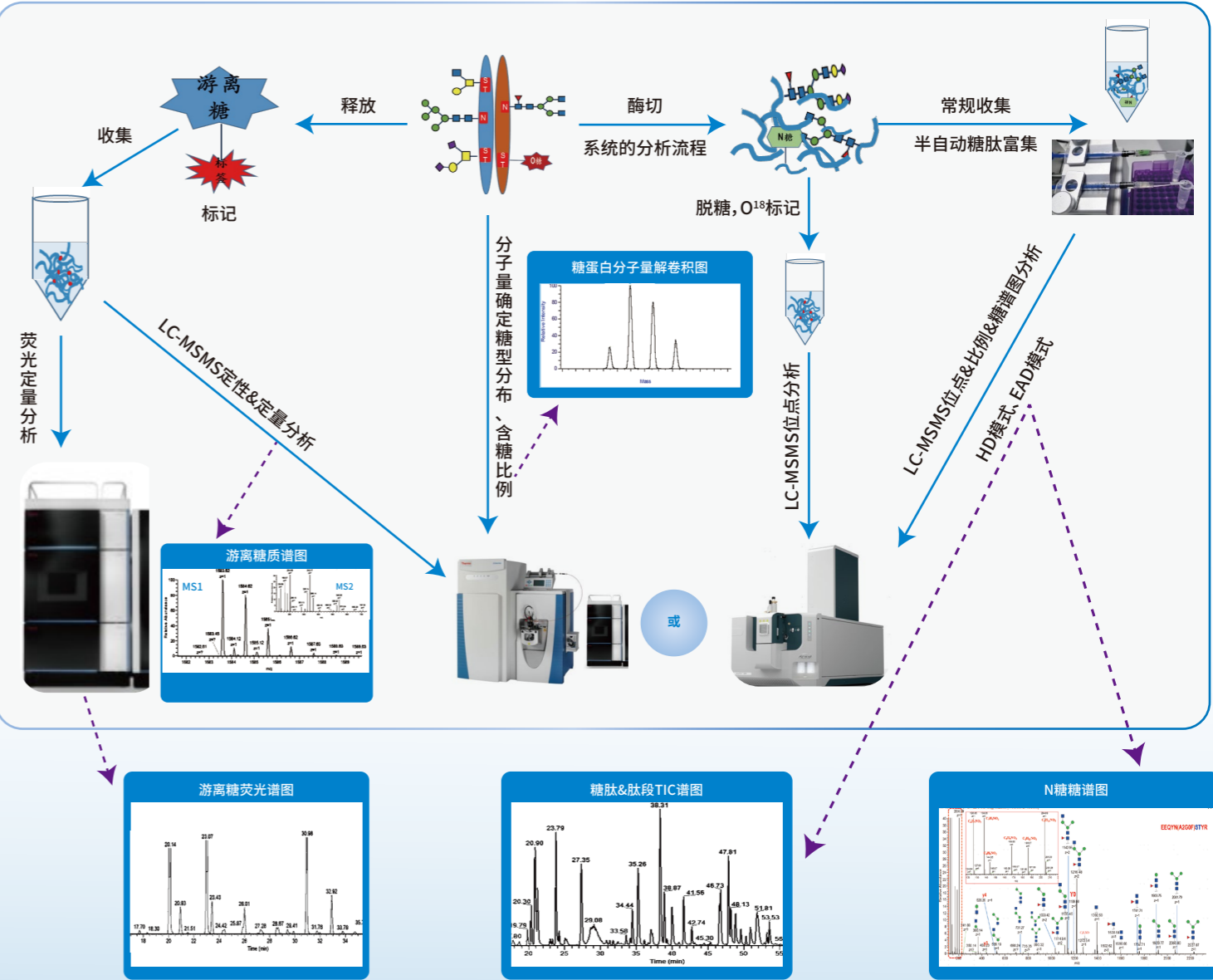
- 以某HCP为标准品, 在目标范围内建立标准曲线, 其响应呈线性, 可基于该标曲对未知样品中目标HCP含量进行定量分析。

序号	HCP蛋白名称	功能	影响类型
1	Lipoprotein Lipase (LPL)	催化LDL的三酰甘油水解并调节甘油三酯和HDL的血浆浓度	吐温降解
2	Lysosomal Acid Lipase (LAL)	水解胆固醇酯和甘油三酯	吐温降解
3	Lysosomal Phospholipase A2 (LPLA2)	将甘油磷脂的酰基酯键裂解产生游离脂肪酸	吐温降解
4	Palmitoyl-protein thioesterase 1(PPT1)	硫酯水解酶家族 (EC 3.1.2), 尽管底物偏好硫酯连接的脂肪酰基, 但PPT1能够水解PS20的羧酸酯键, 提示其他硫酯水解酶是DS/DP配方中PS降解的可能性	吐温降解
5	C-X-C motif chemokine 3 (CXCL3)	具有潜在致癌能力的细胞因子	安全性
6	Transforming Growth Factor-β1 (TGF-β1)	维持免疫稳态和免疫抑制, 与细胞因子释放相关	安全性
7	Matrix Metalloproteinase (MMP)	负责细胞外基质蛋白降解的内肽酶	药物降解
8	Serine Protease (HTRA1)	降解蛋白聚糖, 并可能切断N端	药物修饰

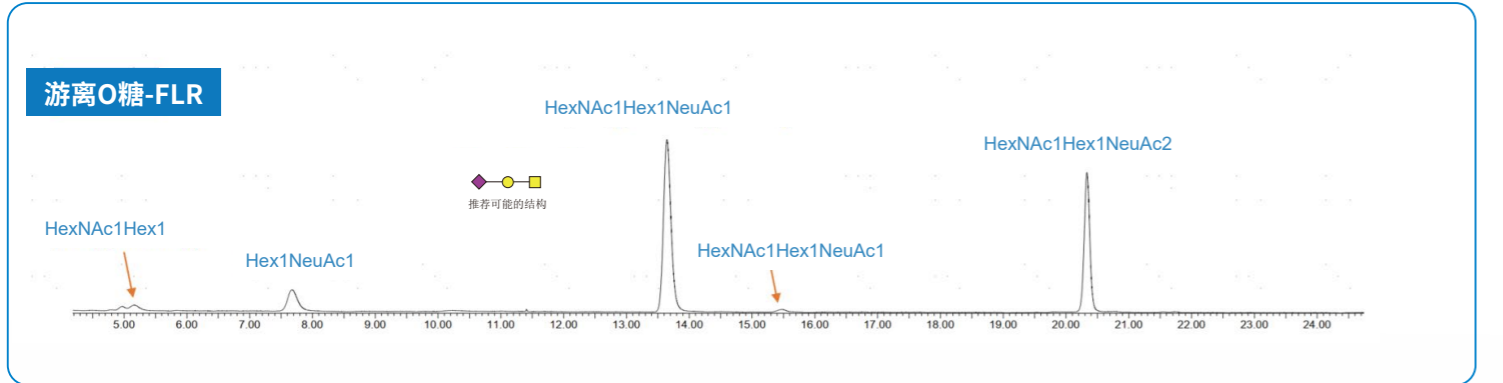
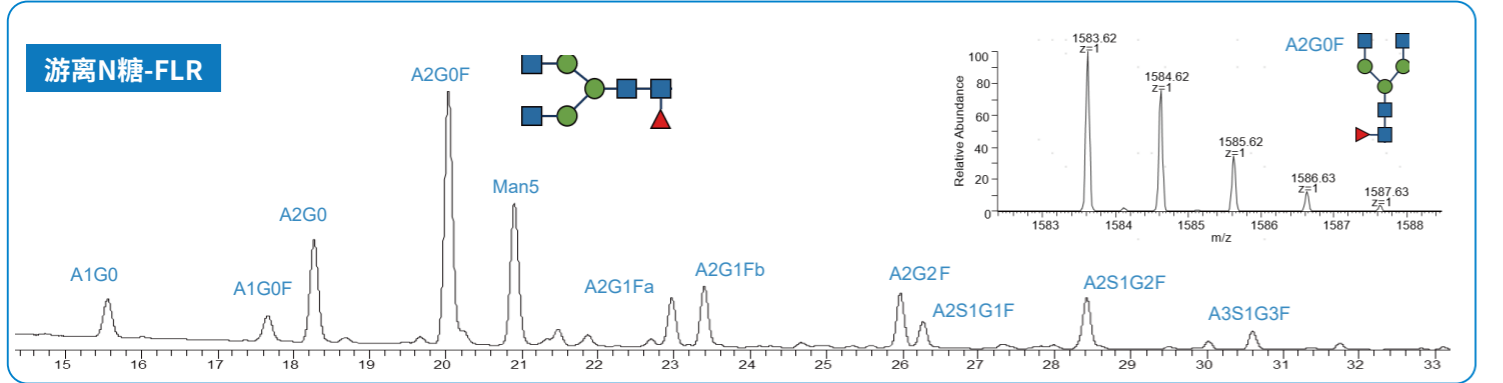
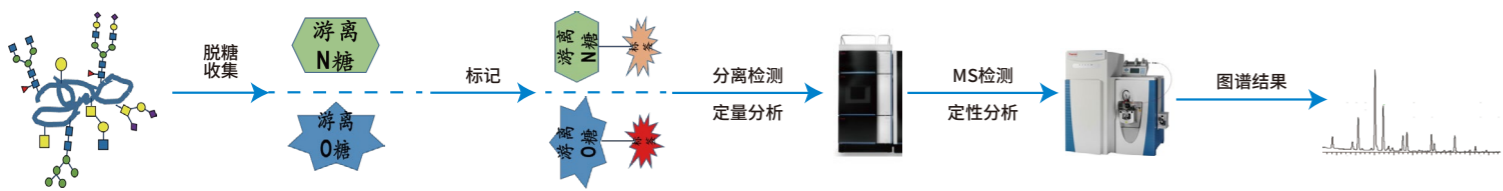
- 根据文献资料及项目数据积累, 自建立High Risk HCP Database, 服务HCP定性/高风险HCP识别/HCP定量分析流程。



糖基化分析流程



游离糖检测定性及定量分析



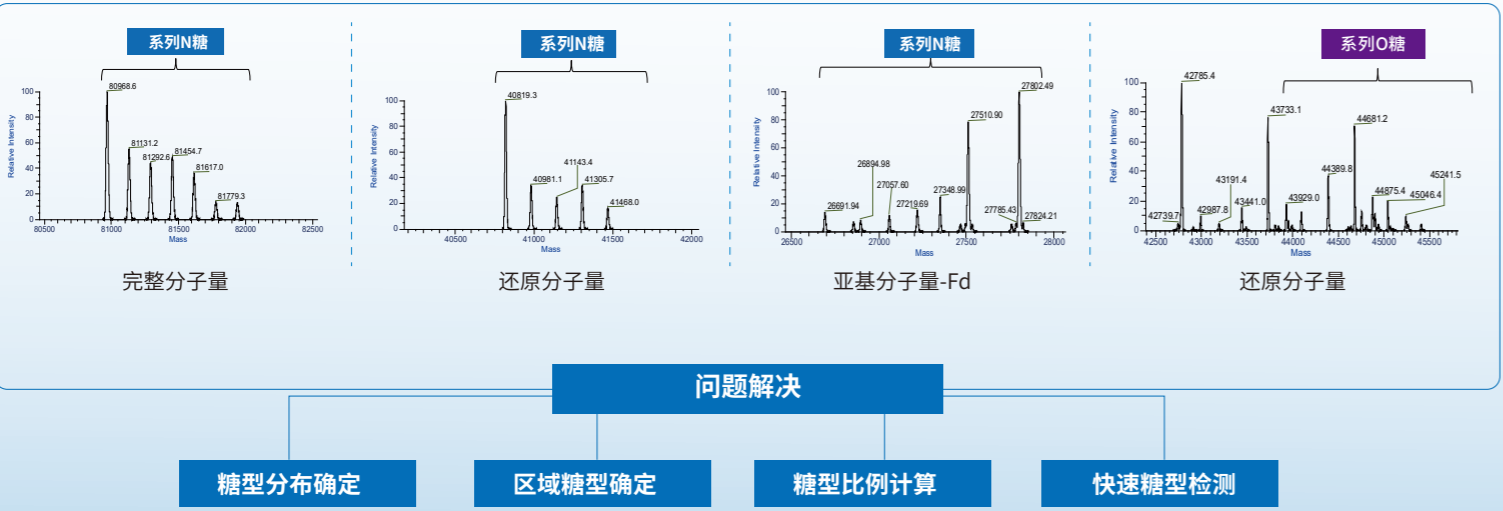
澳斯康定制脱糖策略

多种标记手段

高效液相色谱定量分析

高分辨率质谱定性检测

分子量水平糖基化分析



问题解决

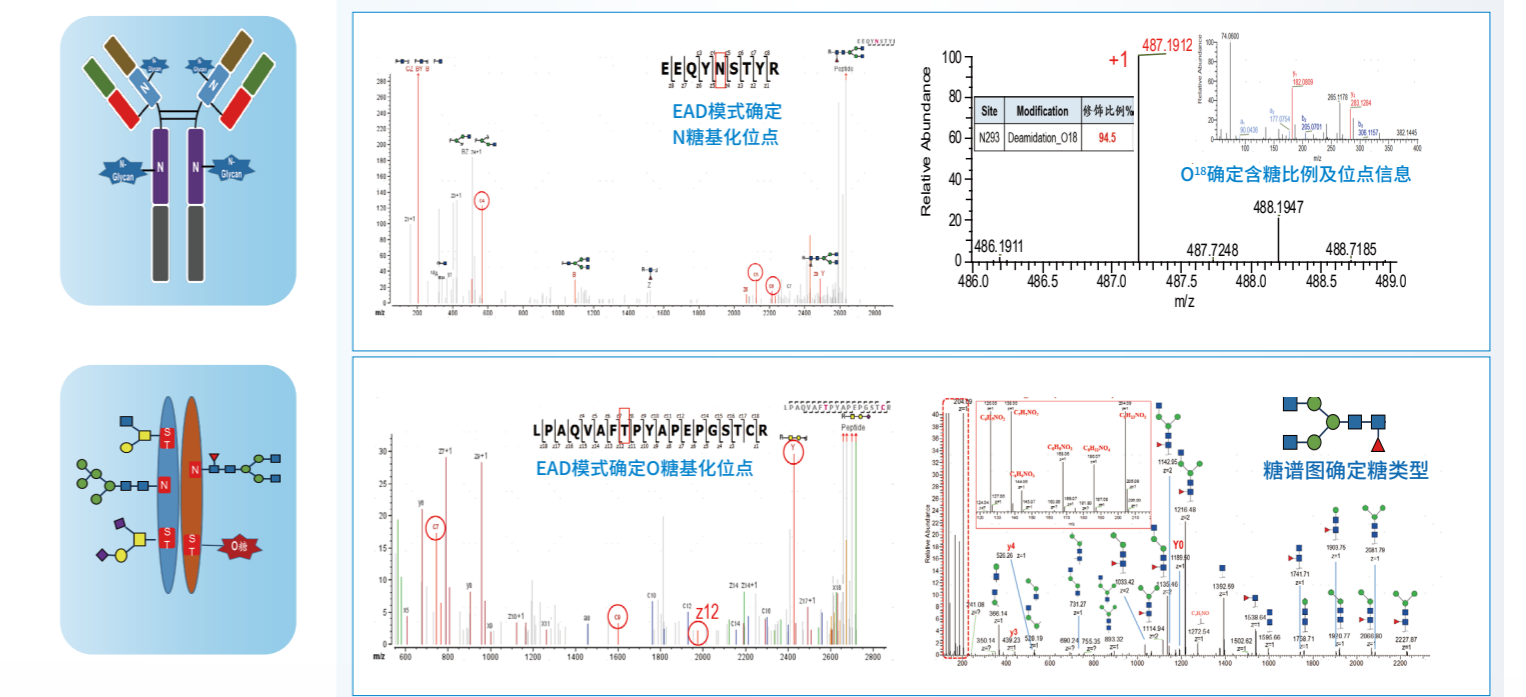
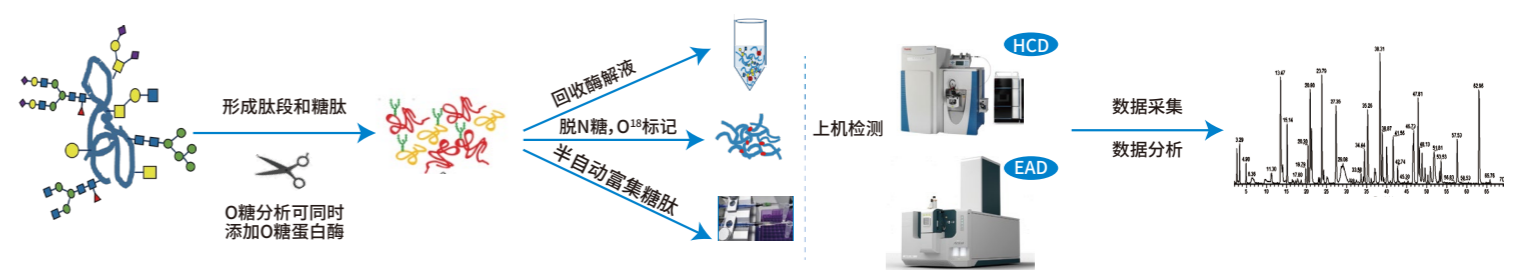
糖型分布确定

区域糖型确定

糖型比例计算

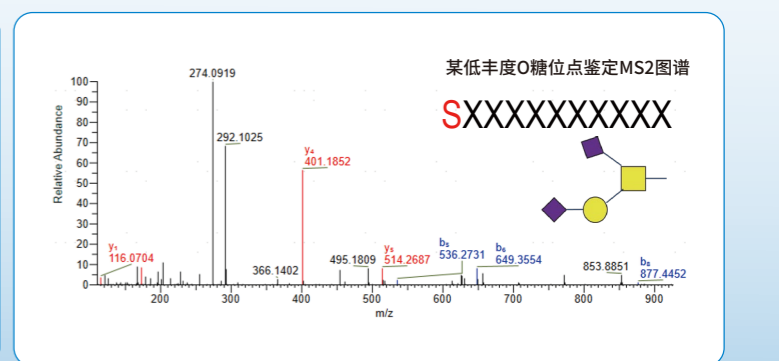
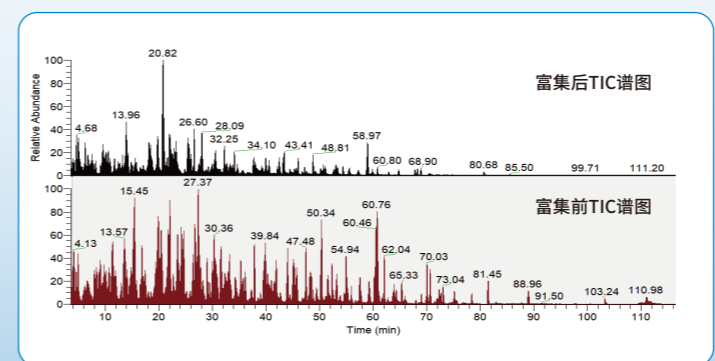
快速糖型检测

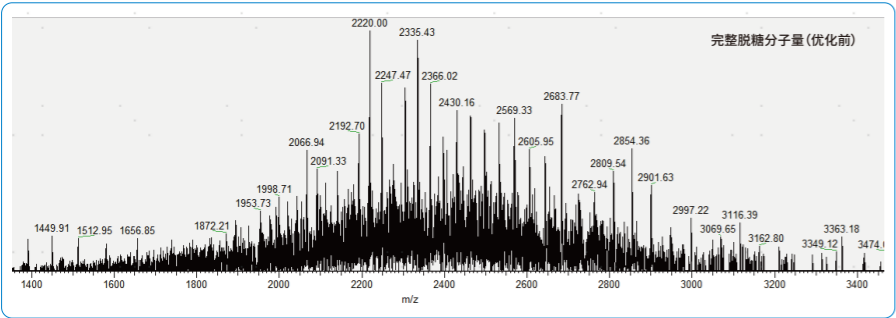
糖肽分析



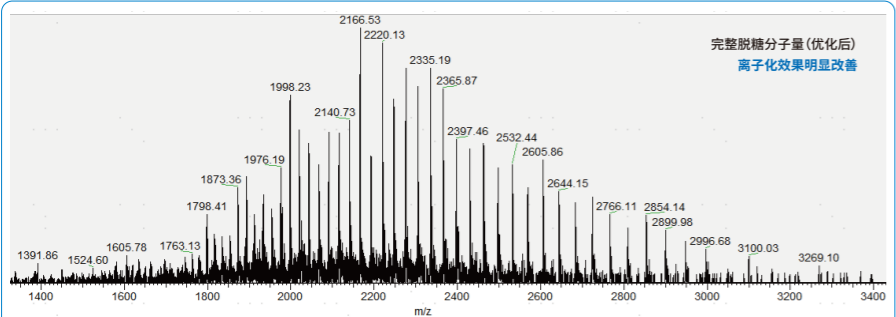
Site	N-Glycan	比例%
Nxx	A1G0F	7.6
	A1G1F	3.6
	A1S1F	3.1
	A2G0F	4.0
	A2G1F	4.8
	A2G2F	6.0
	A2S1G0F	12.1
	A2S1G1F	22.2
Nxx	A2S2F	26.6
	Unglycosylated	1.6
	A1G0F	3.9
	A2G0F	64.6
	A2G1F	23.0
	A2G2F	1.7
Nxx	Unglycosylated	3.0

Site	O-Glycan	比例%
Txx	HexNAc1Hex1NeuAc2	10.3
	HexNAc1Hex1NeuAc1	75.7
	HexNAc1Hex1	6.6
	HexNAc1	3.2
	Unglycosylated	4.3
Txx	HexNAc1Hex1NeuAc2	18.0
	HexNAc1Hex1NeuAc1	17.4
	Unglycosylated	64.7

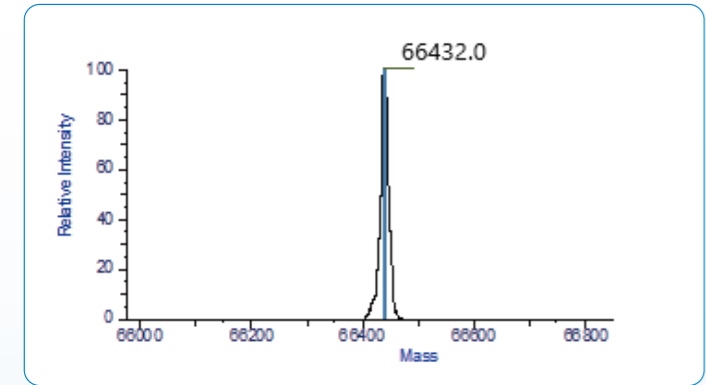




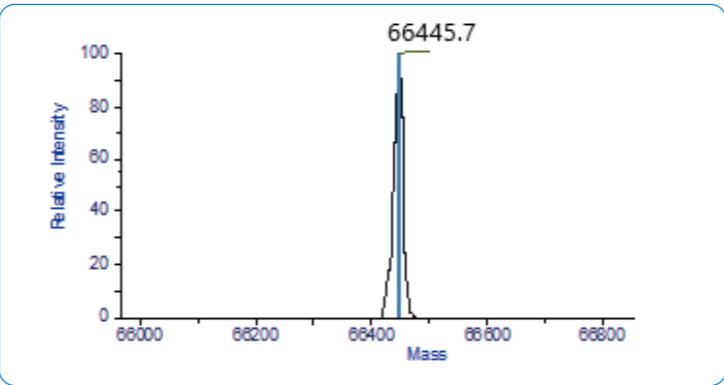
考察因素:切糖方式、切糖时长、仪器参数



- 在平台方法下对该分子进行检测,结果与理论出现较大偏差,结合序列信息及已有数据推测偏差原因与分子的多糖位点、糖型复杂与结构复杂的特性有关,因此针对该分子的分子量检测方法进行优化研究。



▲ 还原脱糖分子量-重链 (优化前)

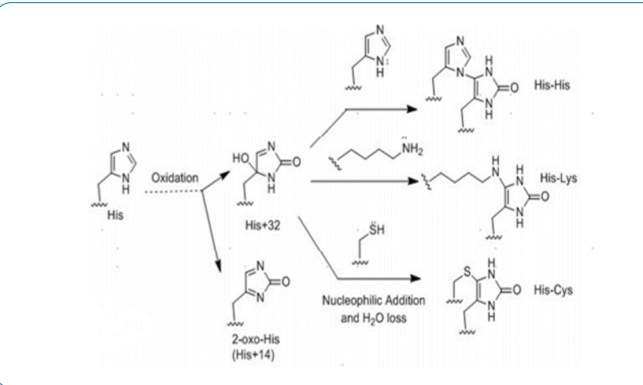
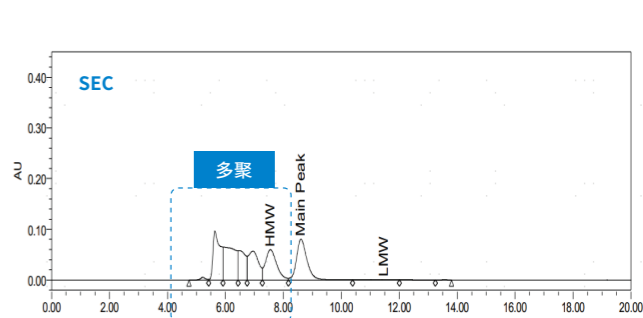
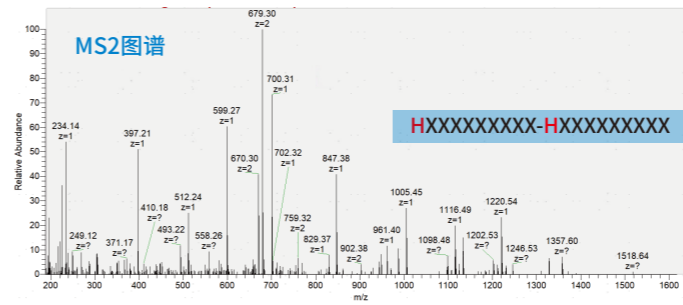
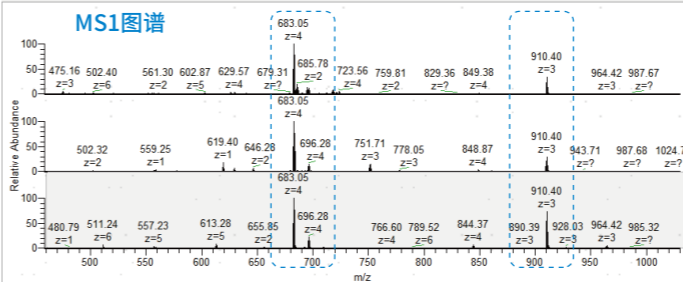
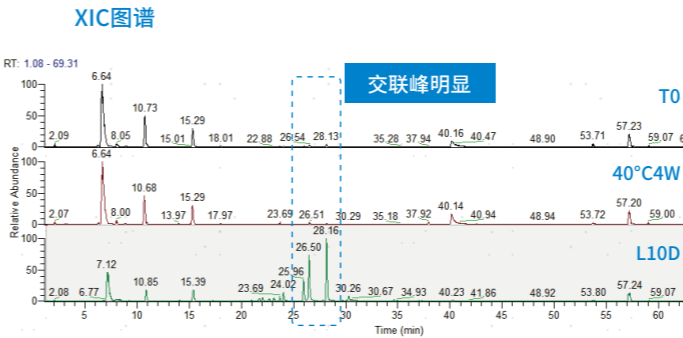
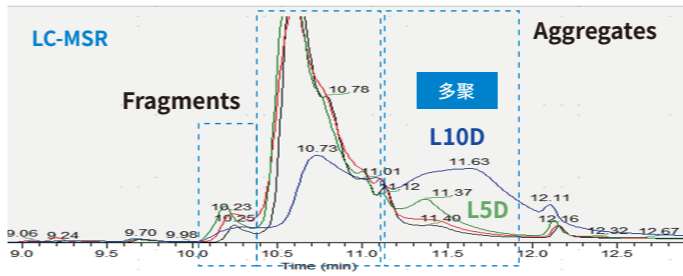
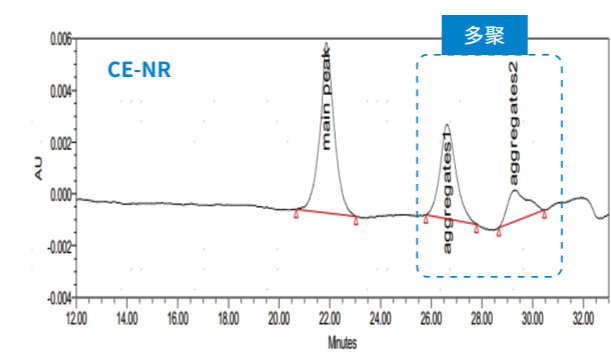
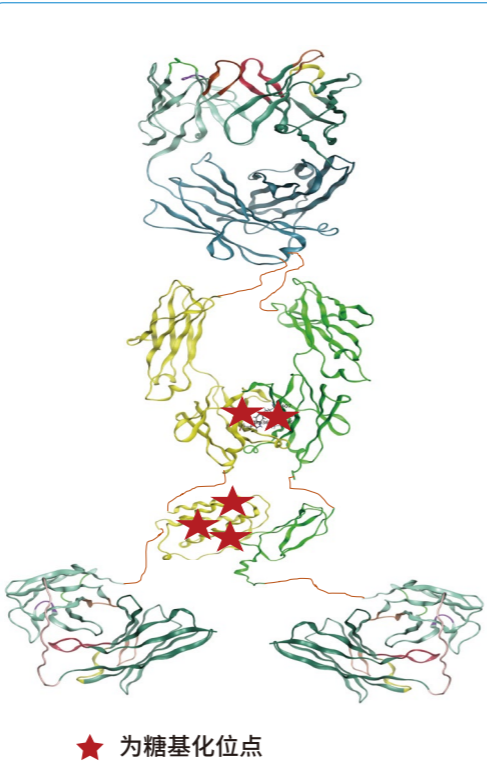


▲ 还原脱糖分子量-重链 (优化后)

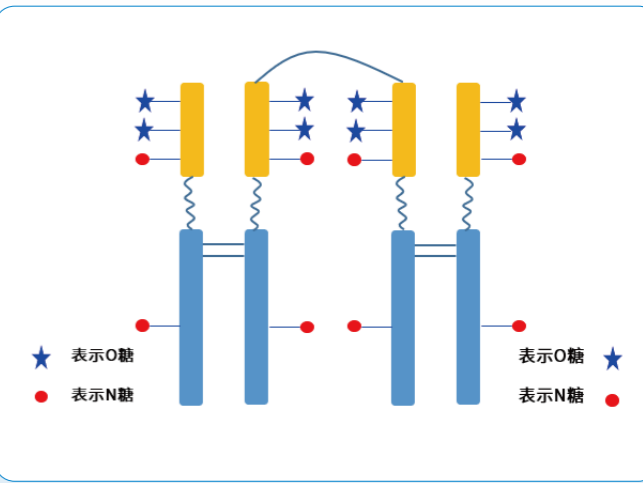
- 由于分子结构特性复杂,导致方法优化前的还原脱糖重链分子量与理论值误差较大;
- 得益于该分子专属的方法开发/优化研究,在项目后期顺利推进了结构表征研究工作。

优化前后	含修饰的理论分子量(Da)	实测分子量(Da)	误差 (ppm)
优化前	66445.3	66432.0	-200.2
优化后		66445.7	6.0

误差明显降低



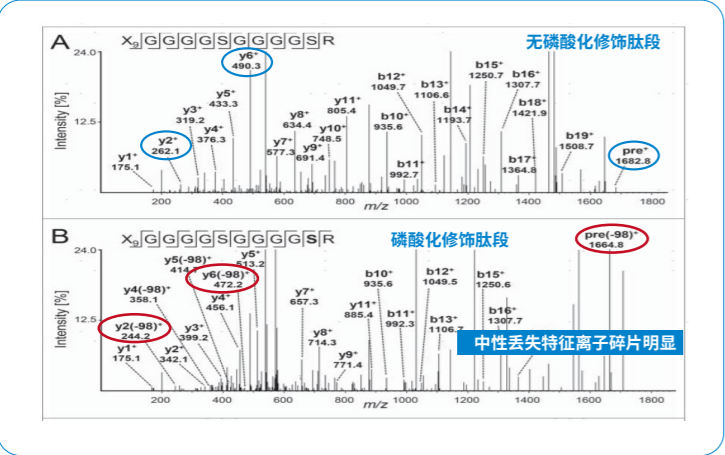
H-H共价交联



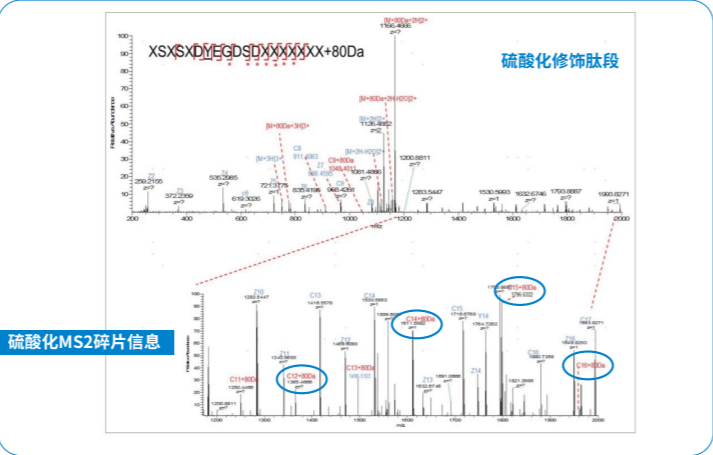
- 某项目光照样品在SEC以及nrCE出现大量的高聚产物,且根据数据展示为非共价形成,在还原条件进行LC-MS分析,发现聚体具有抗还原性.针对该问题进行PTMs分析,发现存在某些位点的His氧化,这一过程容易形成His-His的共价交联产物,导致样品形成聚体。

磷酸化/硫酸化判断依据：

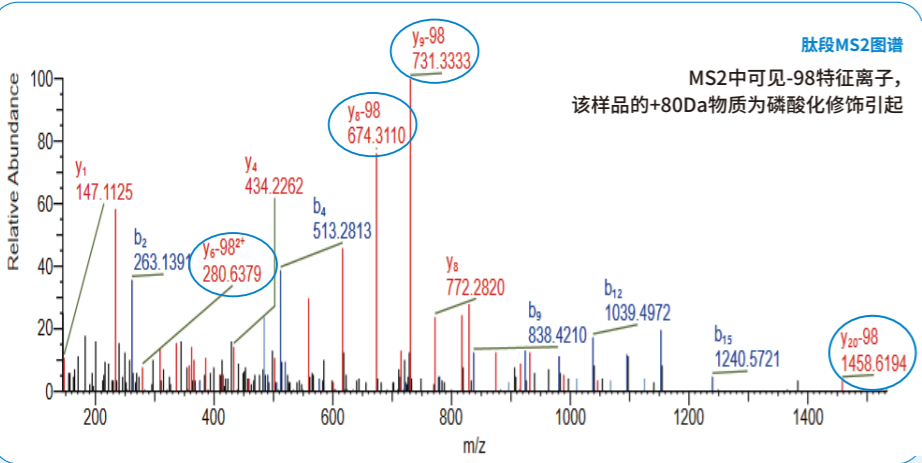
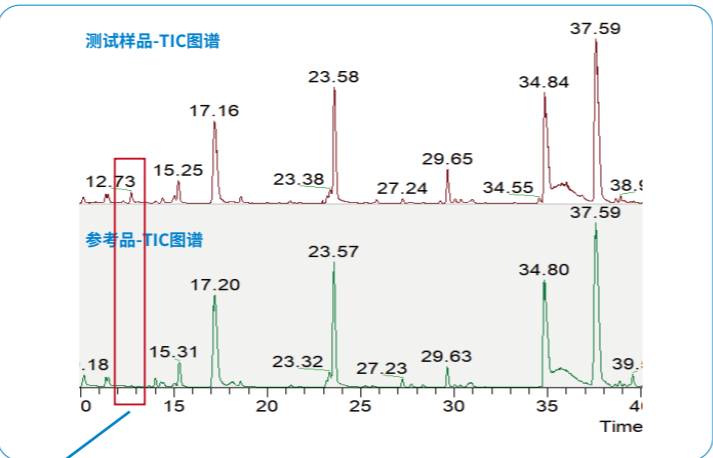
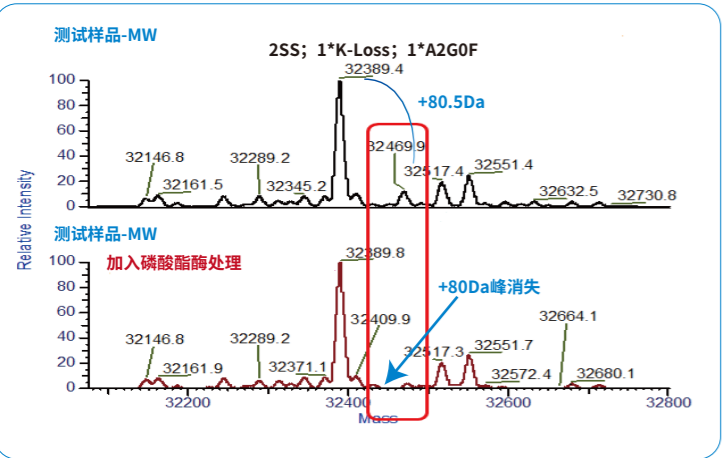
- 分子量水平:分子量约+80Da,推测可能与磷酸化或硫酸化修改相关;
- 修饰类型验证:酶法验证:去磷酸化酶/去硫酸化酶处理分子量验证;
- 肽图水平:磷酸化在CID/HCD模式中中性丢失-98(-H3PO4);硫酸化CID/HCD模式中中性丢失-80(-SO3),此模式下无法区分,常采用EAD/ETD模式确认。



▲ 文献-HCD模式-磷酸化



▲ 文献-EAD模式-硫酸化



b15(1240.6)	y9-98(731.3)
b14(1153.5)	y10-98(818.4)
b13(1096.5)	y11-98(875.4)
b12(1039.5)	y12-98(932.4)
b11(982.5)	y13-98(989.4)
b10(925.5)	y14-98(1046.5)
b9(838.4)	y8-98(674.3)
b8(781.4)	y7-98(617.3)
b7(724.4)	y6-98(560.3)
b4(513.3)	y20-98(1458.6)
b3	y5-98(503.2)
a2	y4(434.2)
	y3
	y2
	y1

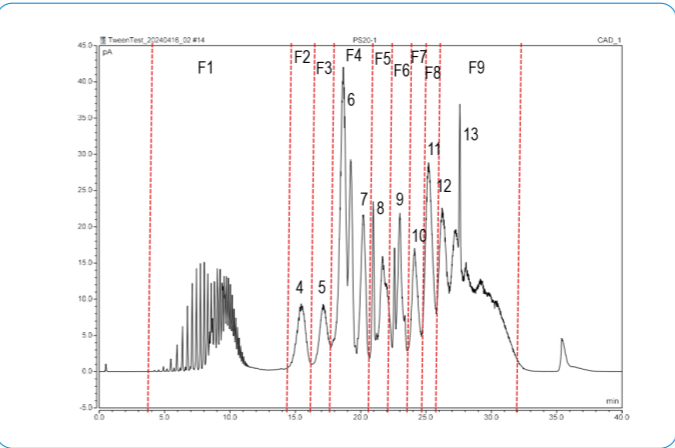
肽段MS2图谱覆盖率结果
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

Case4:吐温降解研究

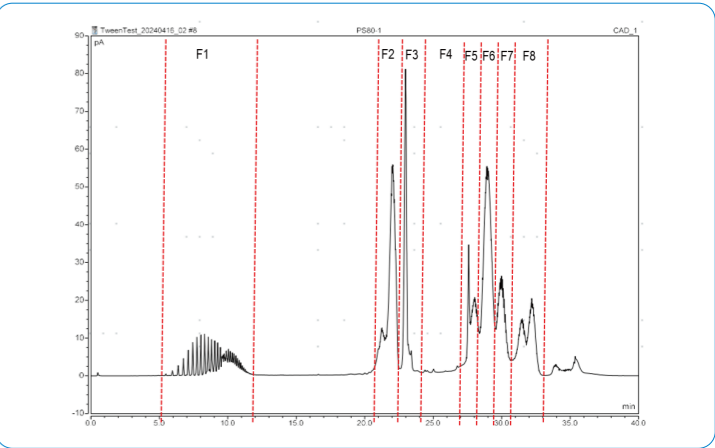
吐温检测流程



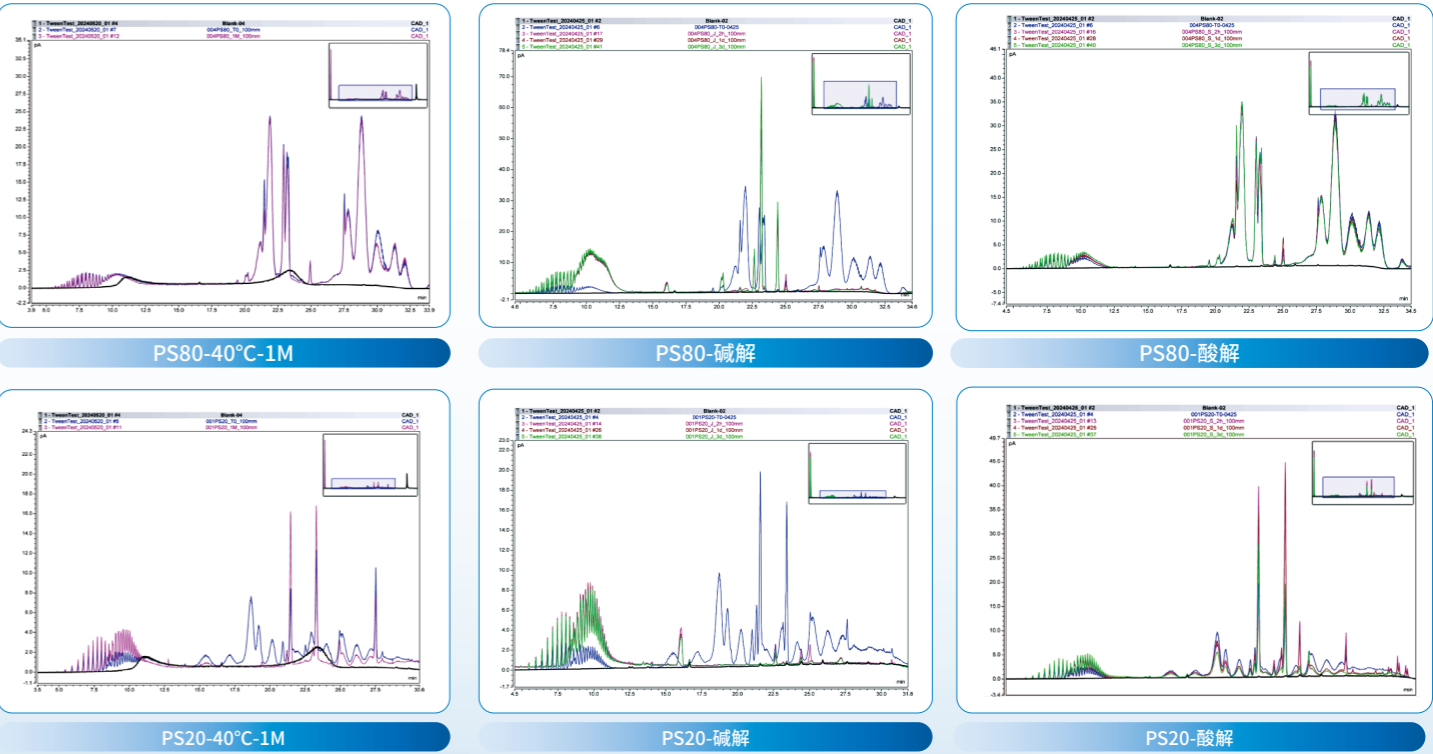
CAD-PS20-定性



CAD-PS80-定性



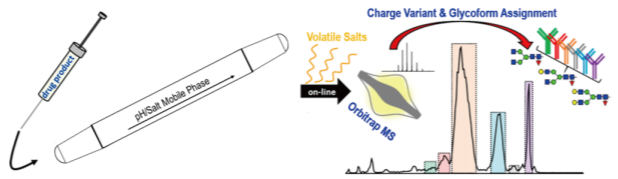
稳定性样品示例



- 吐温会随着所处条件的不同,降解趋势及程度产生差异性。

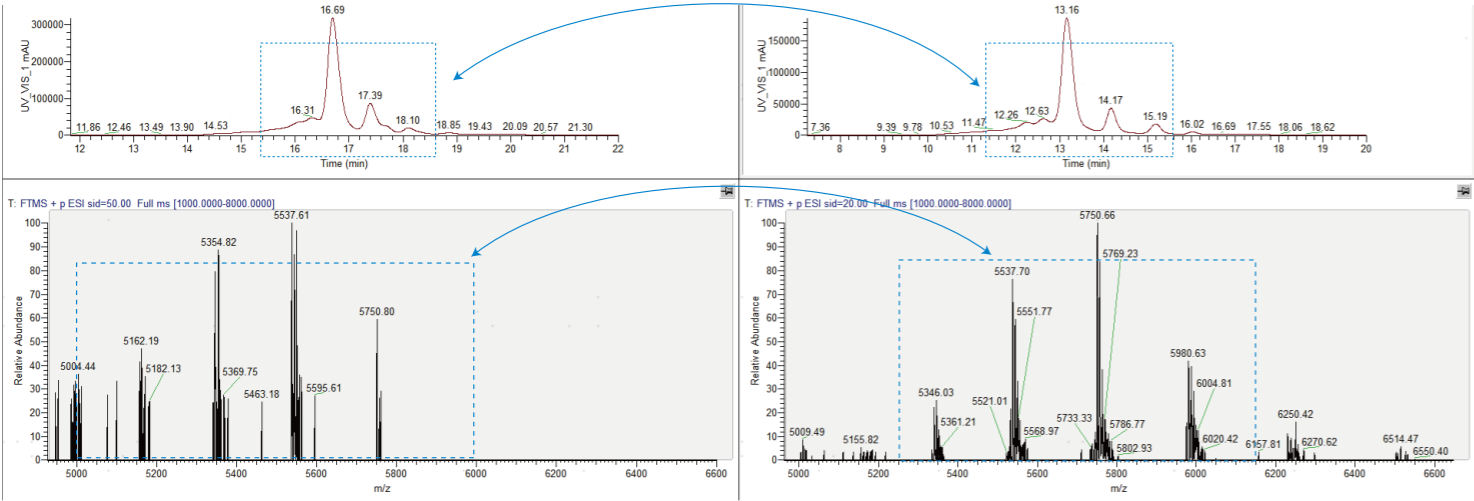
非变性质谱CEX-MS原理图

- 电荷异质体是重组蛋白质药物的关键质量属性，阳离子交换色谱 (CEX) 是目前蛋白质类药物电荷异质体分析的主要技术之一，通过CEX可以得到蛋白的电荷异质体各峰的相对含量，但不能得到各电荷异质体峰的结构信息；
- CEX-MS通过将常规HPLC-CEX中含有不可挥发盐的流动相替换成可挥发盐的流动相，在控制盐离子、pH强度的基础至质谱兼容的条件下，直接将CEX耦合MS进行质谱分析，可得到基于分子量的层面的电荷异质体结构信息。

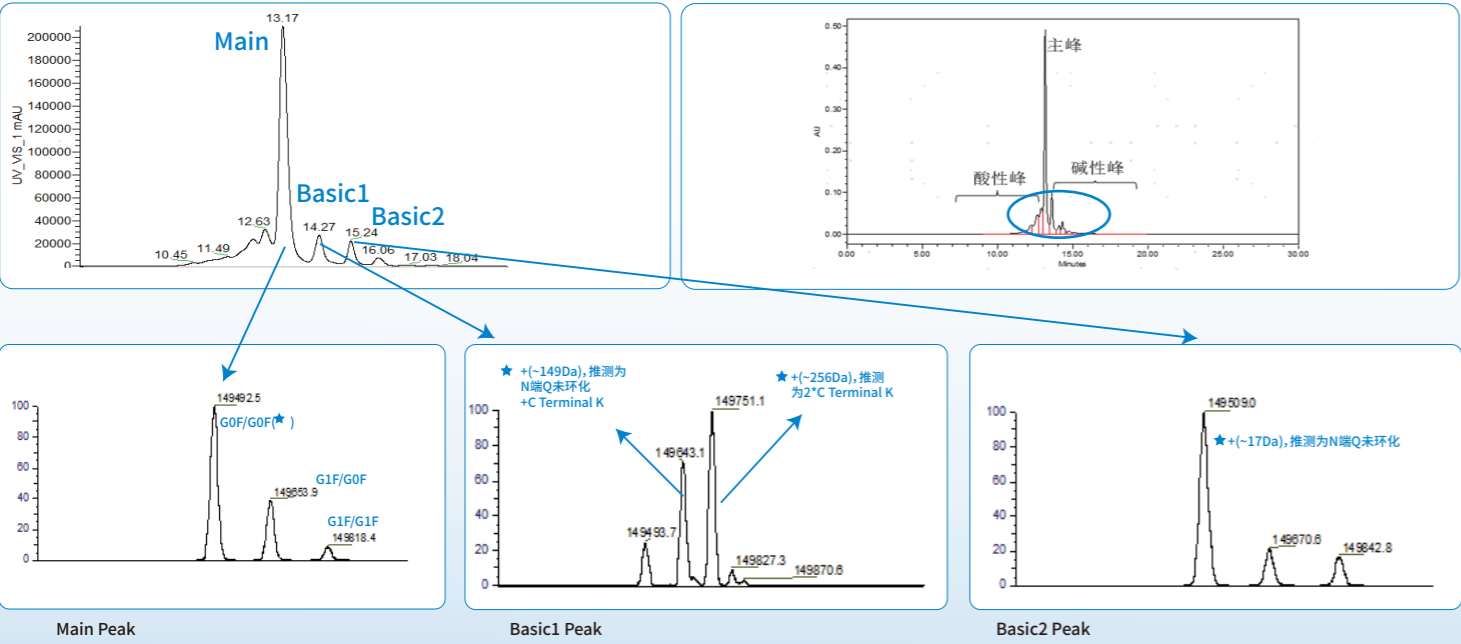


方法优化前 (参考HPLC-CEX方法, 仅替换流动相盐)
UV谱图上可见峰分离不完全且离子化效果不理想

方法优化后 (针对该分子优化液相参数&质谱参数)
对比方法优化前, 谱图上的分离以及离子化效果明显改善

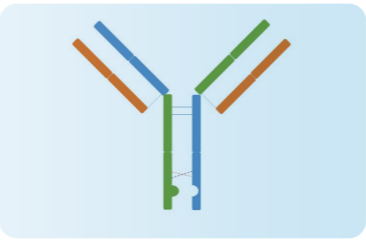


CEX-MS表征

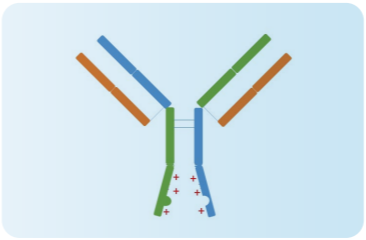


- 针对不同分子开发专属的Native-CEX-MS方法,与常规放行CEX谱图相比具有较高的一致性；
- CEX下各峰的电荷异质体鉴定是蛋白药物深度表征研究的需求,通过CEX-MS可更精细表征分子结构,识别潜在风险点,同时也能够为工艺开发提供更多技术支持,指明优化方向。

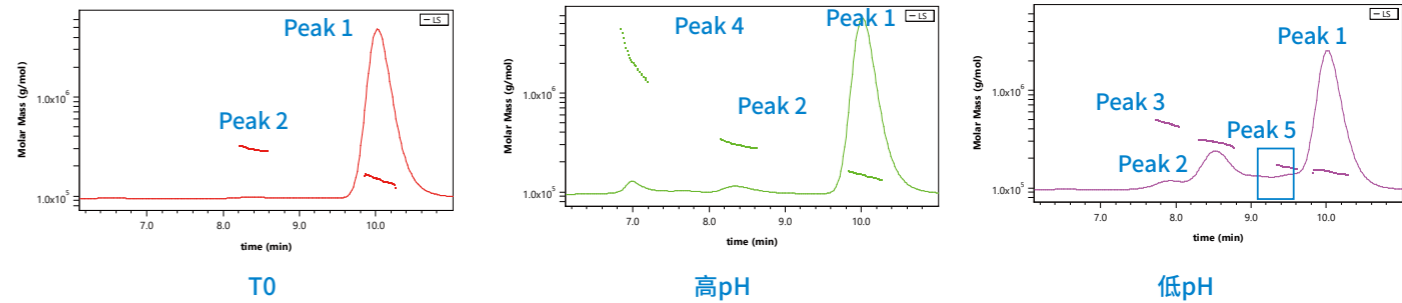
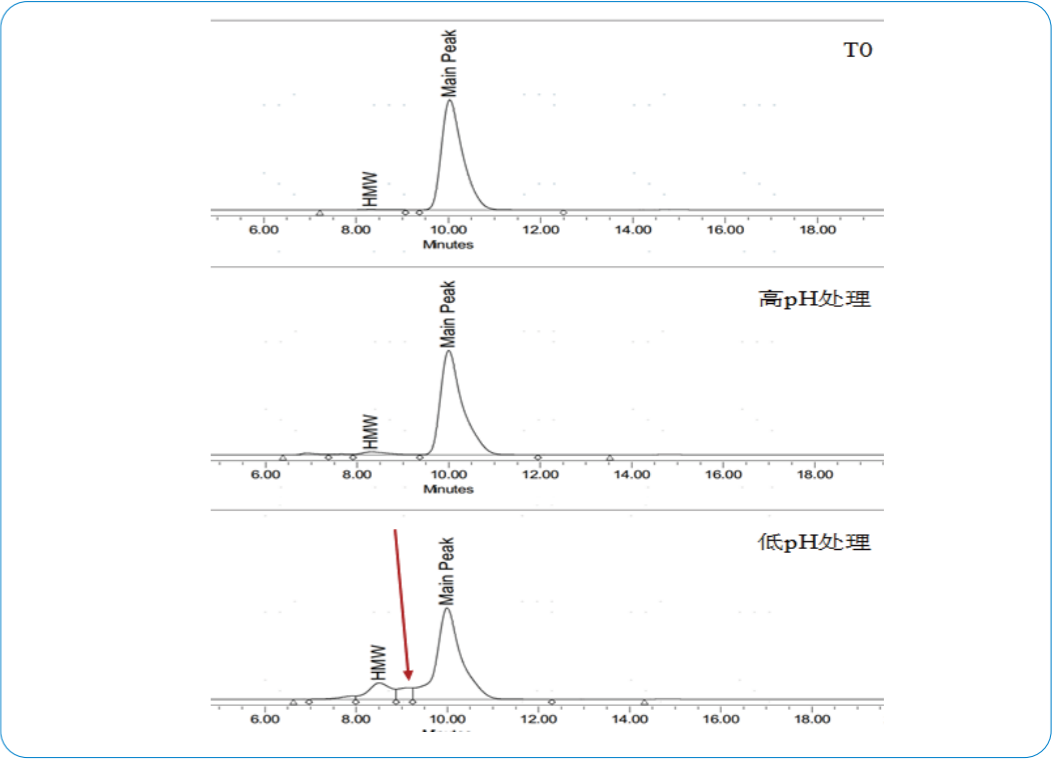
Case6:SEC-MALS聚体研究



非对称双抗

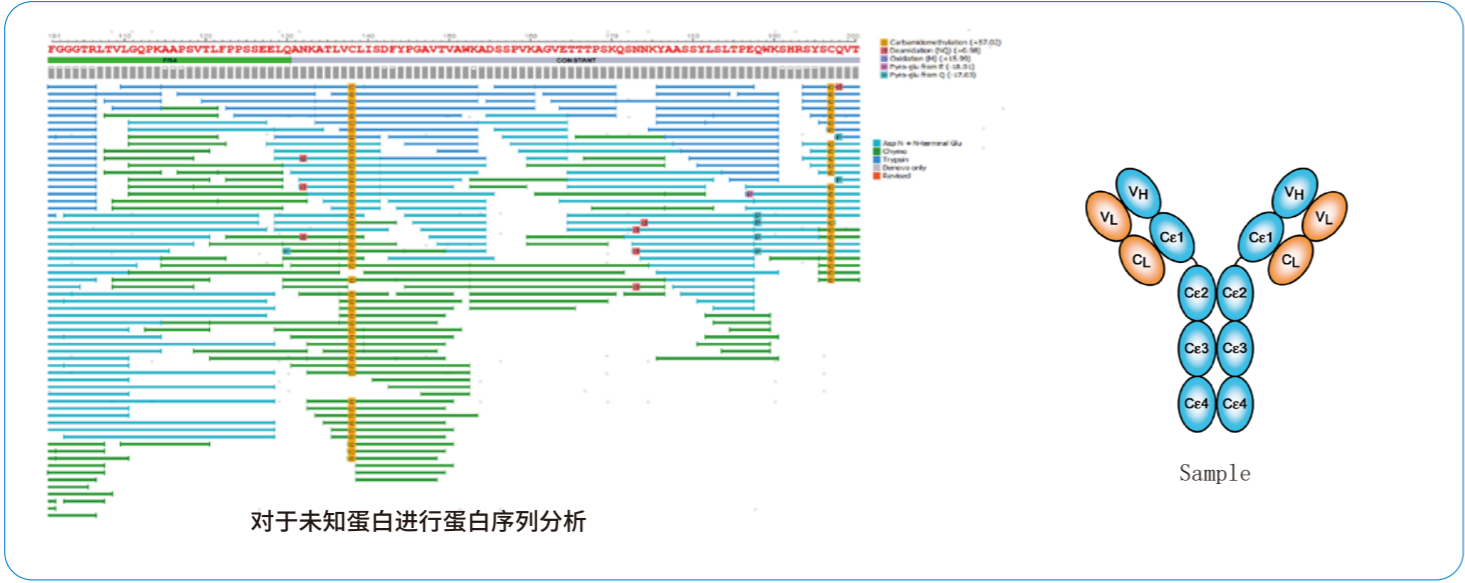


低pH处理非对称双抗

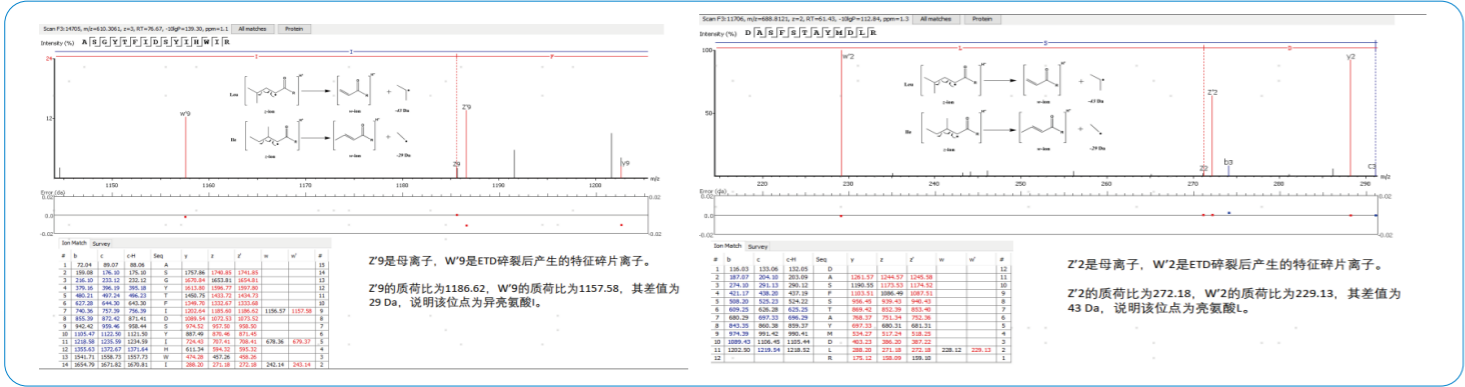


样品类型	MW (Da)				
	Peak 1	Peak 2	Peak3	Peak 4	Peak 5
T0样品	1.568×10 ⁵	2.979×10 ⁵	NA	NA	NA
高pH样品	1.572×10 ⁵	3.015×10 ⁵	NA	2.021×10 ⁶	NA
低pH样品	1.569×10 ⁵	2.981×10 ⁵	4.689×10 ⁵	NA	1.622×10 ⁵

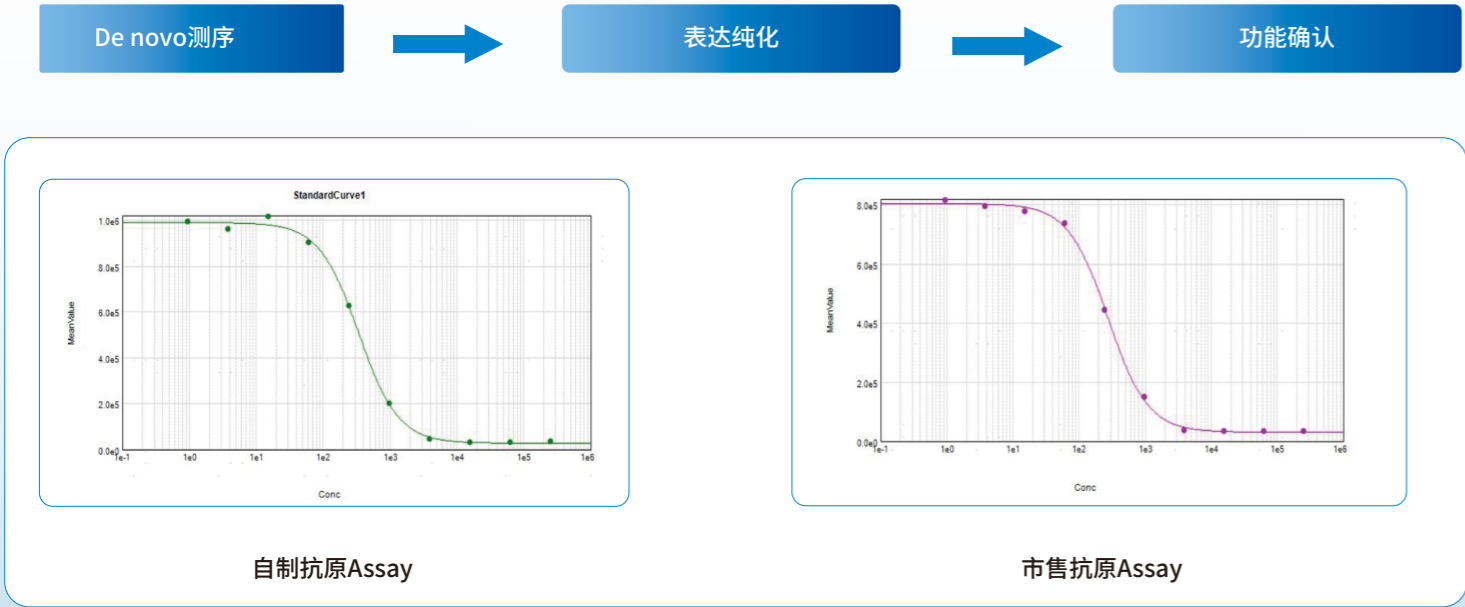
- 不同pH条件下容易导致构象变化产生异常峰；
- 主峰前的异常峰与主峰分子量接近,推测其构象产生了变化。



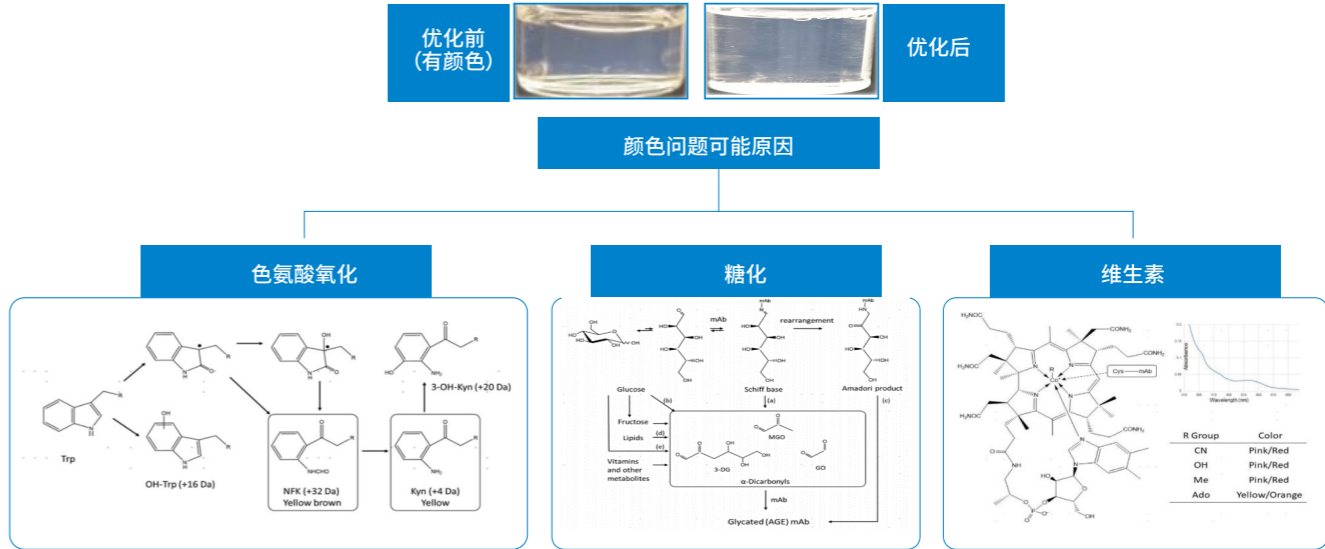
- 通过De novo分析获得序列并表达的自制抗原与市售抗原完全一致。



- 通过EAD模式下的C、Z特征离子区分I、L。



溶液颜色问题分析



- 色氨酸氧化形式主要有NFK N-甲酰基犬尿氨酸、Kyn犬尿氨酸、Kyn-OH3-羟基犬尿氨酸；
- 糖化Glycation进一步发生氧化产生的晚期糖化终产物 (advanced glycation end product, AGEs) 容易引起原液颜色发生变化、常见的AGEs包括羧甲基赖氨酸 (CML)、羧乙基赖氨酸 (CEL)、吡咯嗪、戊糖苷和甲基乙二醛-赖氨酸二聚体 (MOLD) 等；
- 通过ICP-MS检测金属离子Co含量,关注维生素含量。

样品	色氨酸氧化产物比例	ICP-MS检测Co含量 (PPb)	ICP-MS检测Fe含量 (PPb)	糖化终产物 (AGE) 修饰比例
原液-工艺1	<1%	32.55	317.46	68%
原液-工艺2	<1%	<LQQ (12.5)	<LQQ (50.0)	<5%

- 根据检测结果推断原液颜色主要由金属离子、糖化产物以及维生素共同作用导致。
- 优化工艺后颜色问题明显改善。

Case9:三硫键表征

