

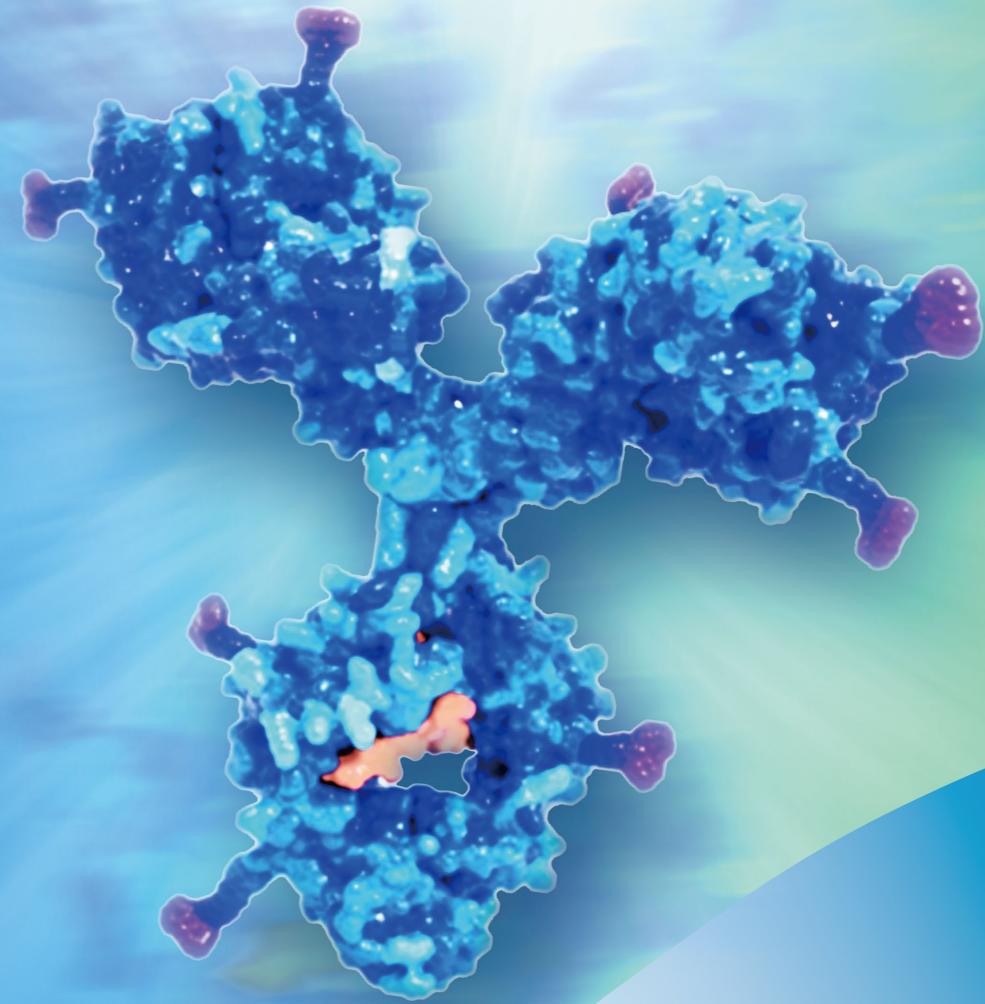
澳斯康生物(南通)股份有限公司
Thousand Oaks Biologics (Nantong) Co., Ltd.

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

An Integrated CMC Organization

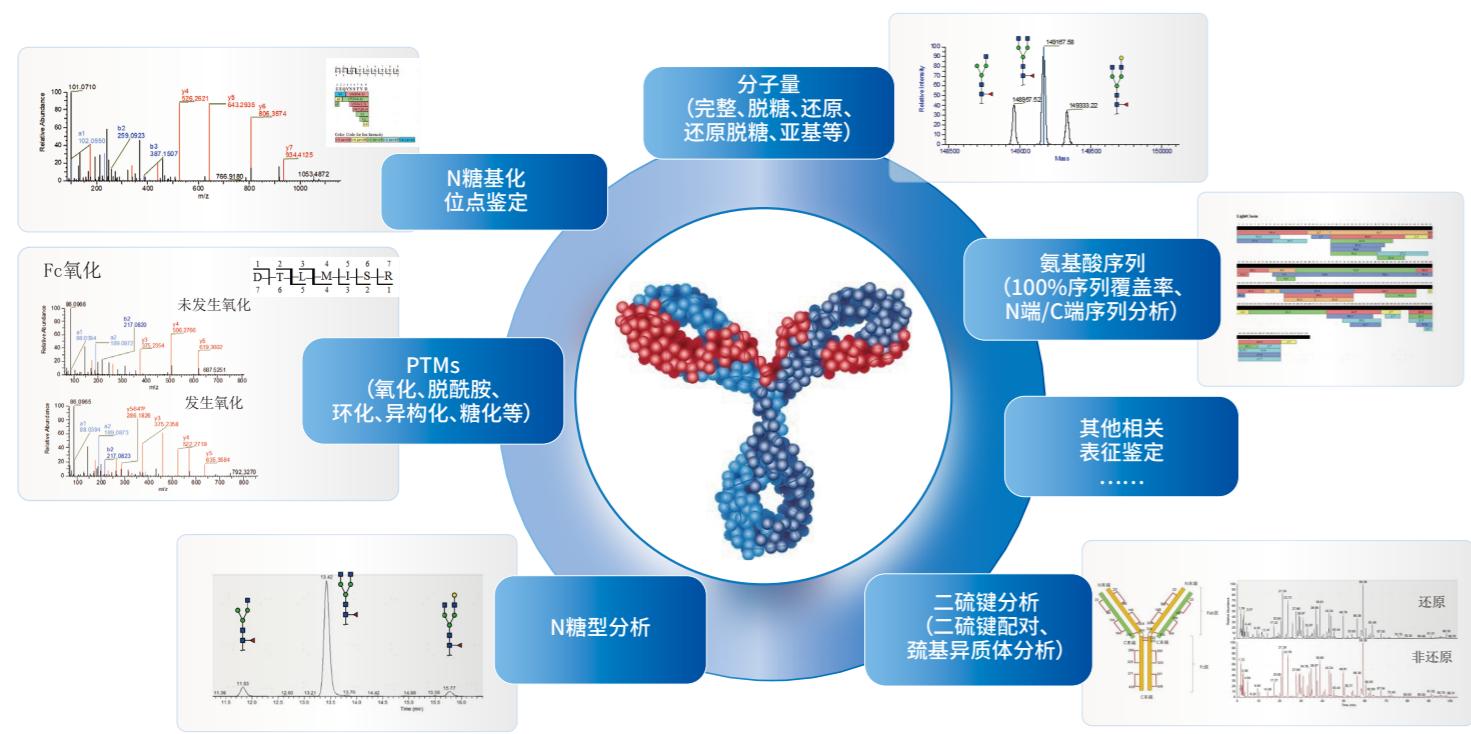


目录

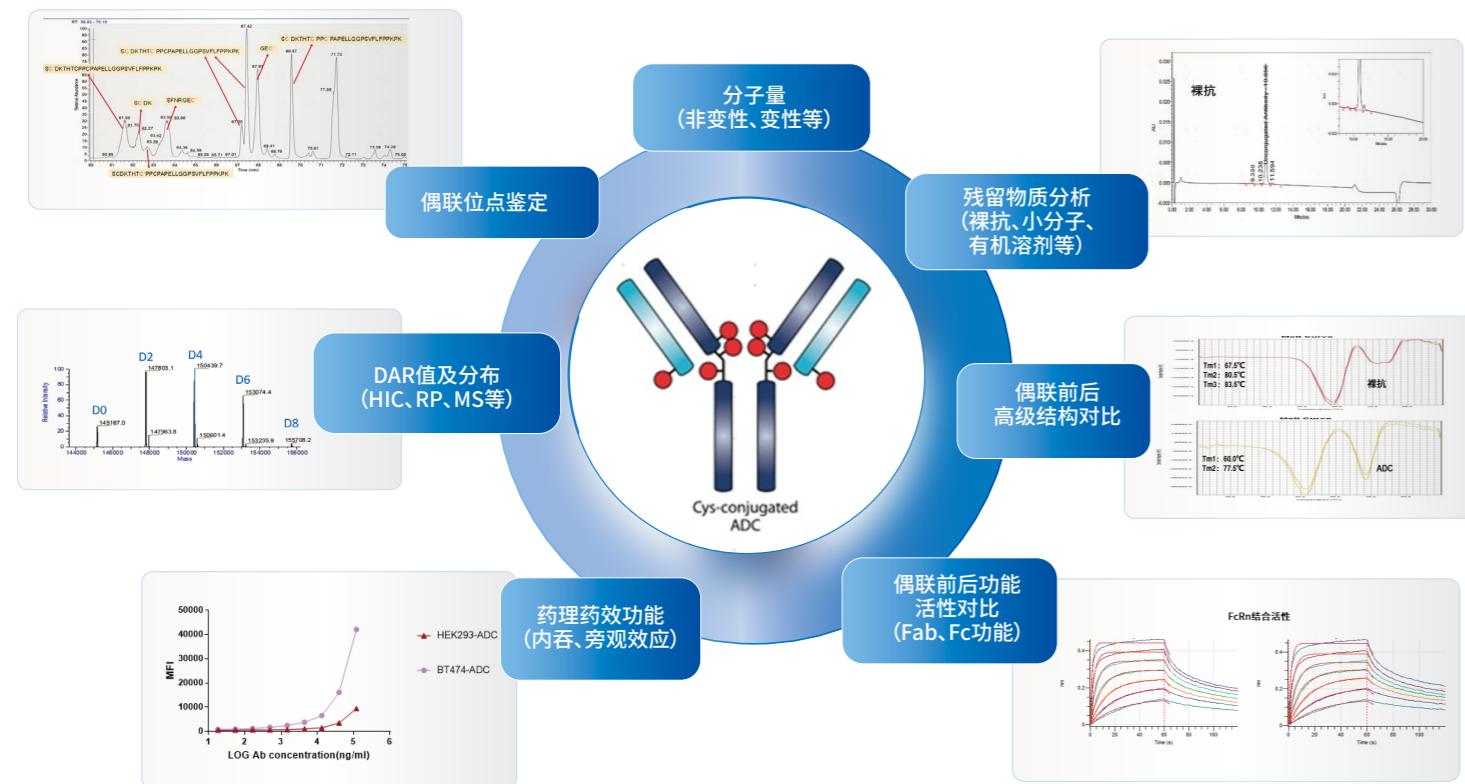
澳斯康生物表征分析平台介绍	01
澳斯康生物表征分析关键设备介绍	02
澳斯康生物表征鉴定服务内容	03
质量研究平台介绍	07
HCP质量研究平台	07
糖基化质量研究平台	10
Case1:复杂糖蛋白分子量水平质量研究	13
Case2:分子大小异质体研究——氨基酸交联	14
Case3:磷酸化/硫酸化修饰	15
Case4: 吐温降解研究	16
Case5:非变性质谱 CEX-MS	17
Case6:SEC-MALS聚体研究	18
Case7:未知蛋白De novo分析	19
Case8:原液颜色问题分析	20
Case9:三硫键表征	20

**Thermo Q Exactive Plus+ Vanquish F****质谱软件****超高分辨率****宽动态范围、线性范围****稳定的超高质量精度****超高灵敏度****AB SCIEX Zeno 7600+Waters I class plus****电子活化解离(EAD)****Zeno™ trap(Zeno阱)技术****离子源****软件****Waters Synapt G2Si****氢氘交换(HDX) MS****突破性的SYNAPT High Definition MSL™技术****卓越的定性和定量性能****QuanTof技术提供杰出性能**

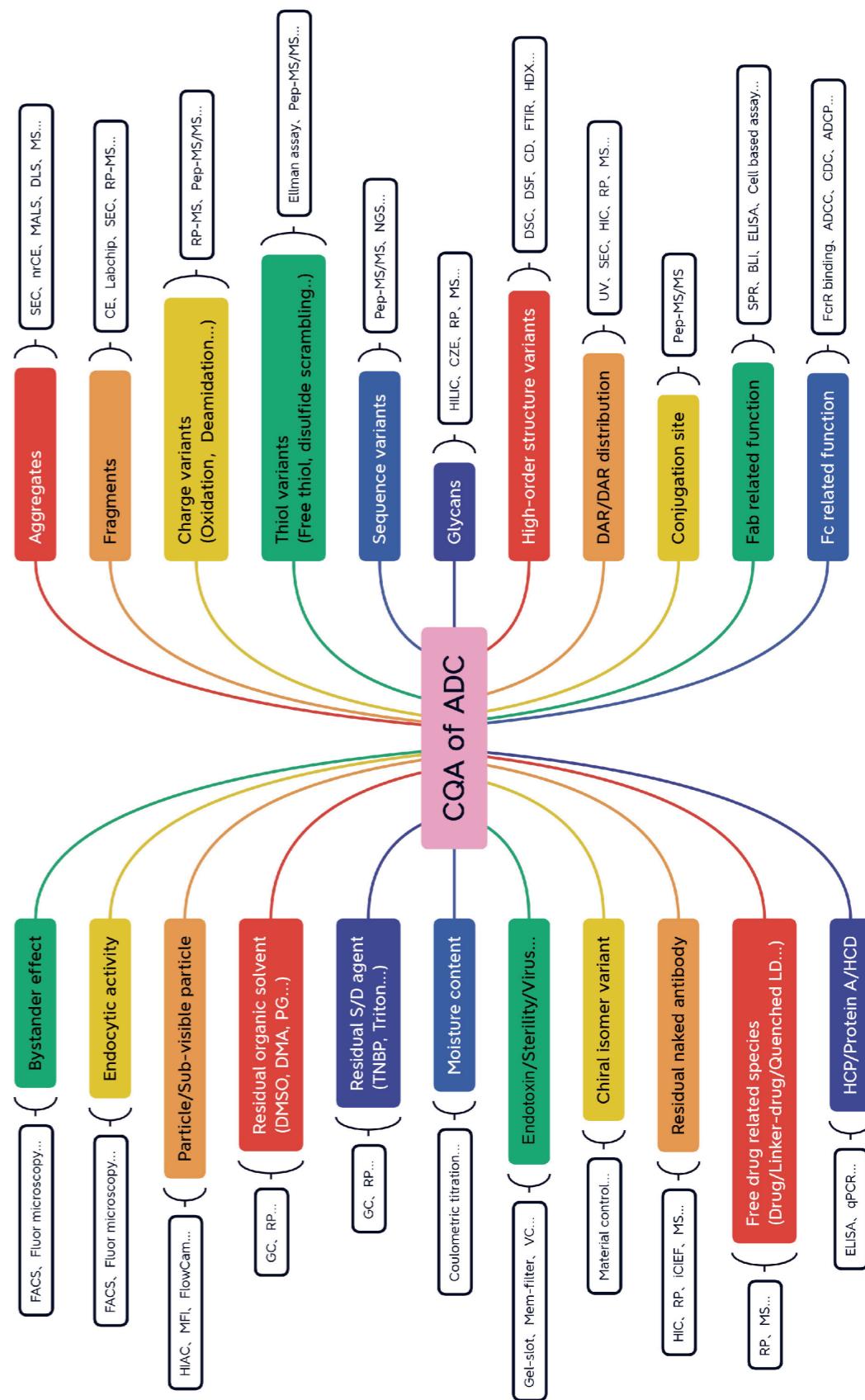
澳斯康生物抗体常规表征分析



澳斯康生物ADC表征分析



澳斯康生物表征分析服务内容 (ADC)

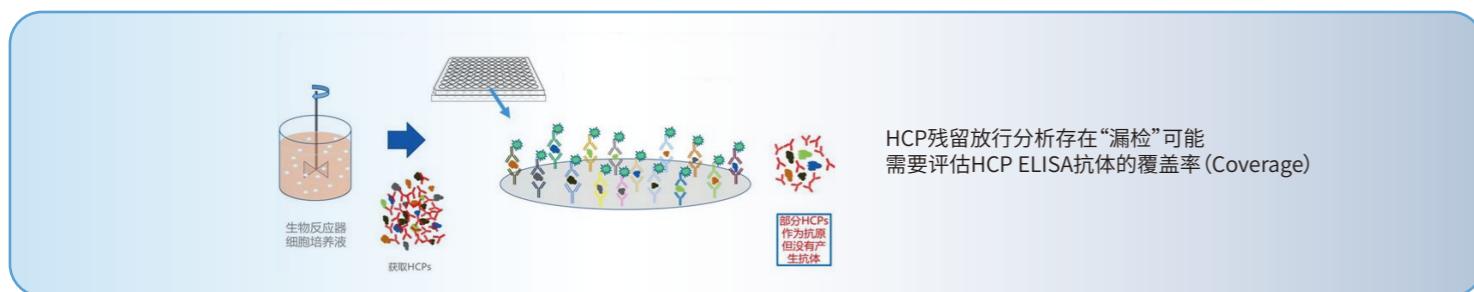


*请横向阅读

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	
	远紫外分析	CD	约7个工作日	
高级结构	二级结构分析	FTIR	约5个工作日	
	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	约5个工作日
	N糖	N-糖肽分析	LC-MSMS	约5个工作日
	O糖	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	O-糖肽分析	LC-MSMS	约7个工作日
	唾液酸	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	
	游离小分子残留量分析	RP	约7个工作日	
残留分析	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
HCP相关研究内容	非变性质谱	SEC-MS	约10个工作日
		CEX-MS	约10个工作日
		HIC-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宿主蛋白定性鉴定	LC-MSMS	约10个工作日
质量研究	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
	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
表征专属方法开发	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

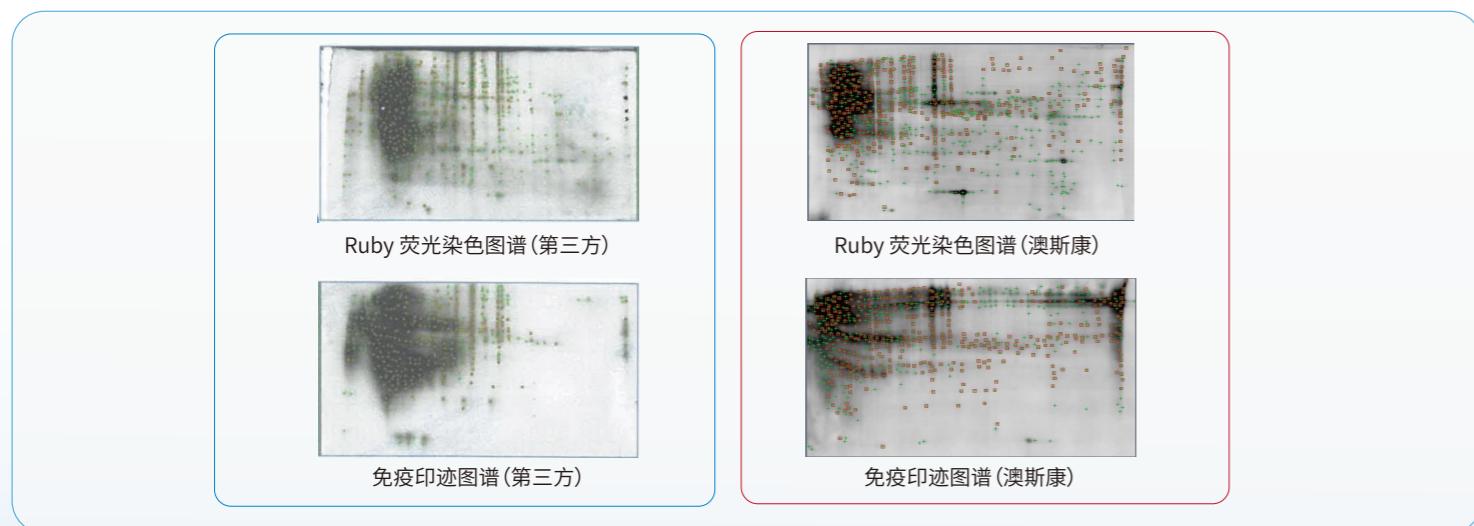


2D-WB 平台方法



- 《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。

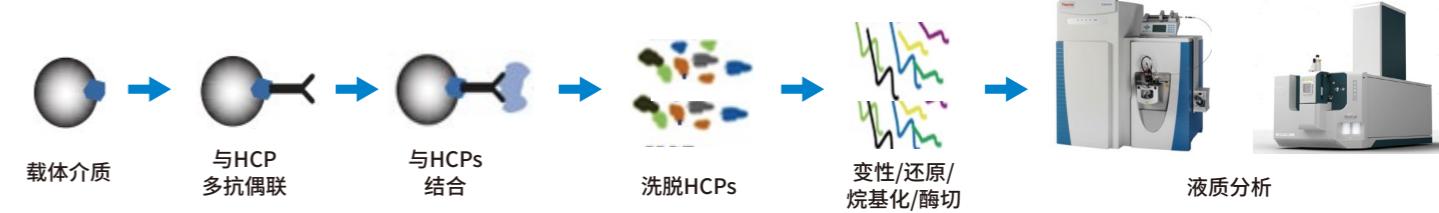
某项目HCP覆盖率表征(2D-WB)



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



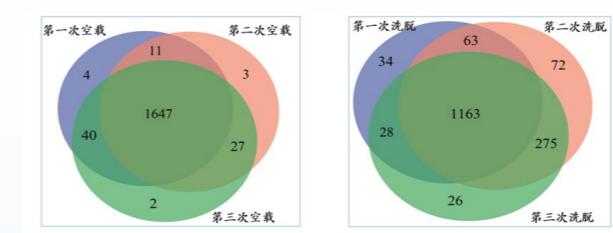
- 澳斯康 MS HCP平台将样品前端预处理及后端高分辨质谱表征研究相结合；
- 捕获前HCPs与捕获洗脱HCPs分别进行变性/还原/烷基化/蛋白酶切，经过高分辨质谱检测分析，可准确定性到HCP归属，计算获得抗体的覆盖率。

某项目 HCP 覆盖率表征(MS)



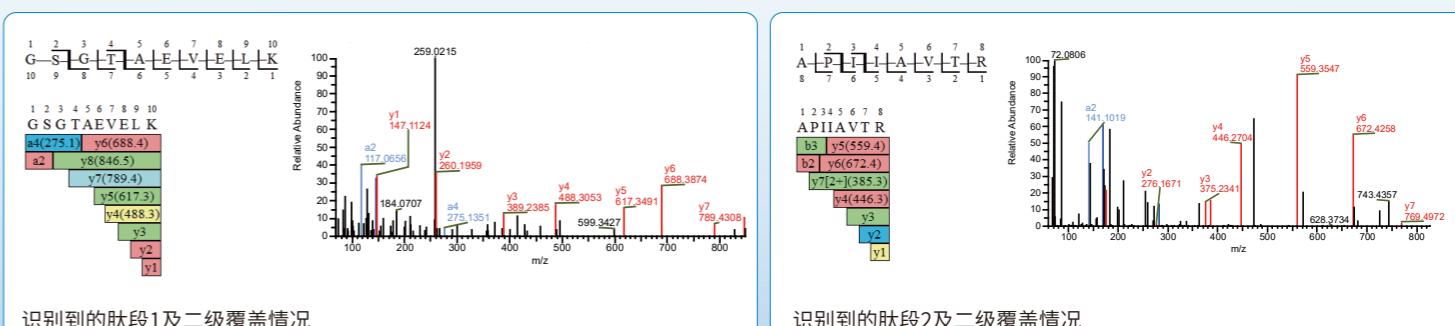
- 基于澳斯康 MS HCP平台方法鉴定到的HCP覆盖率为80%以上，优于第三方检测机构2D-WB法的覆盖率57.7%。

多批次实验考察 (MS)



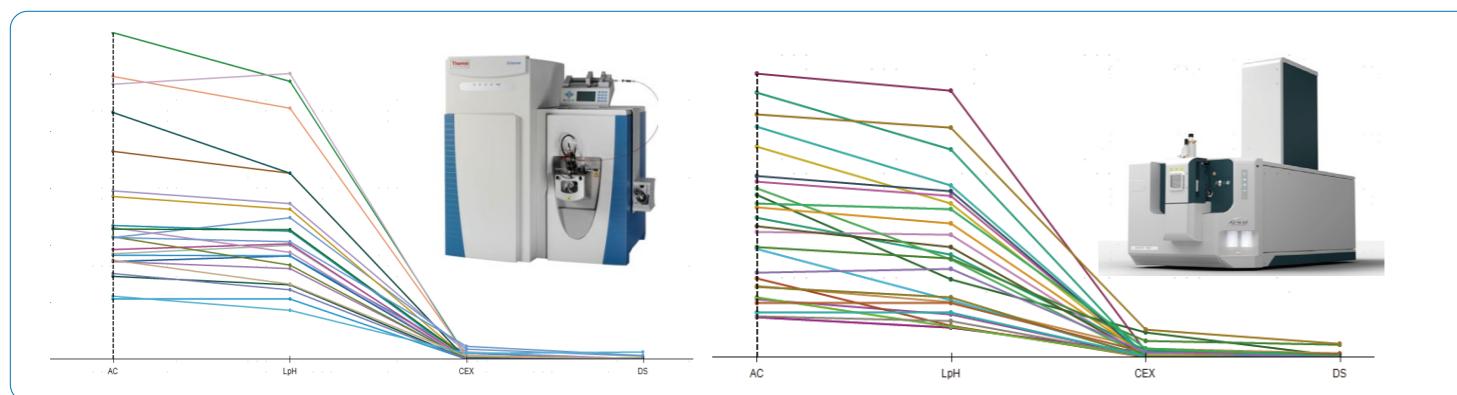
- 澳斯康MS HCP平台方法在某项目进行了三次HCP覆盖率检测，三次结果均较为相似，体现出澳斯康MS HCP平台方法的稳定性及可重现性。

HCP覆盖率表征中MS法的优势



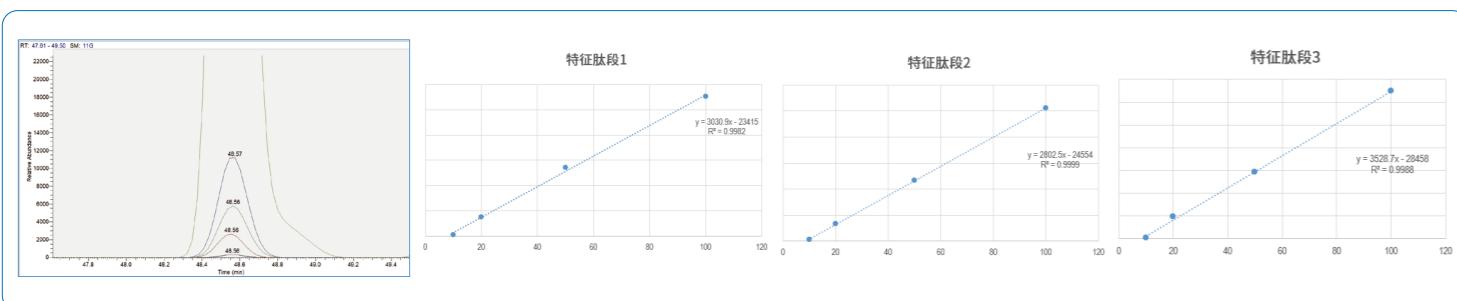
- 高分辨质谱可根据酶切到的peptides，匹配MS2信息提高鉴定可信度，进而对特定的HCP进行定性；
- 结合数据库可得特定HCP的MW等深入信息。

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



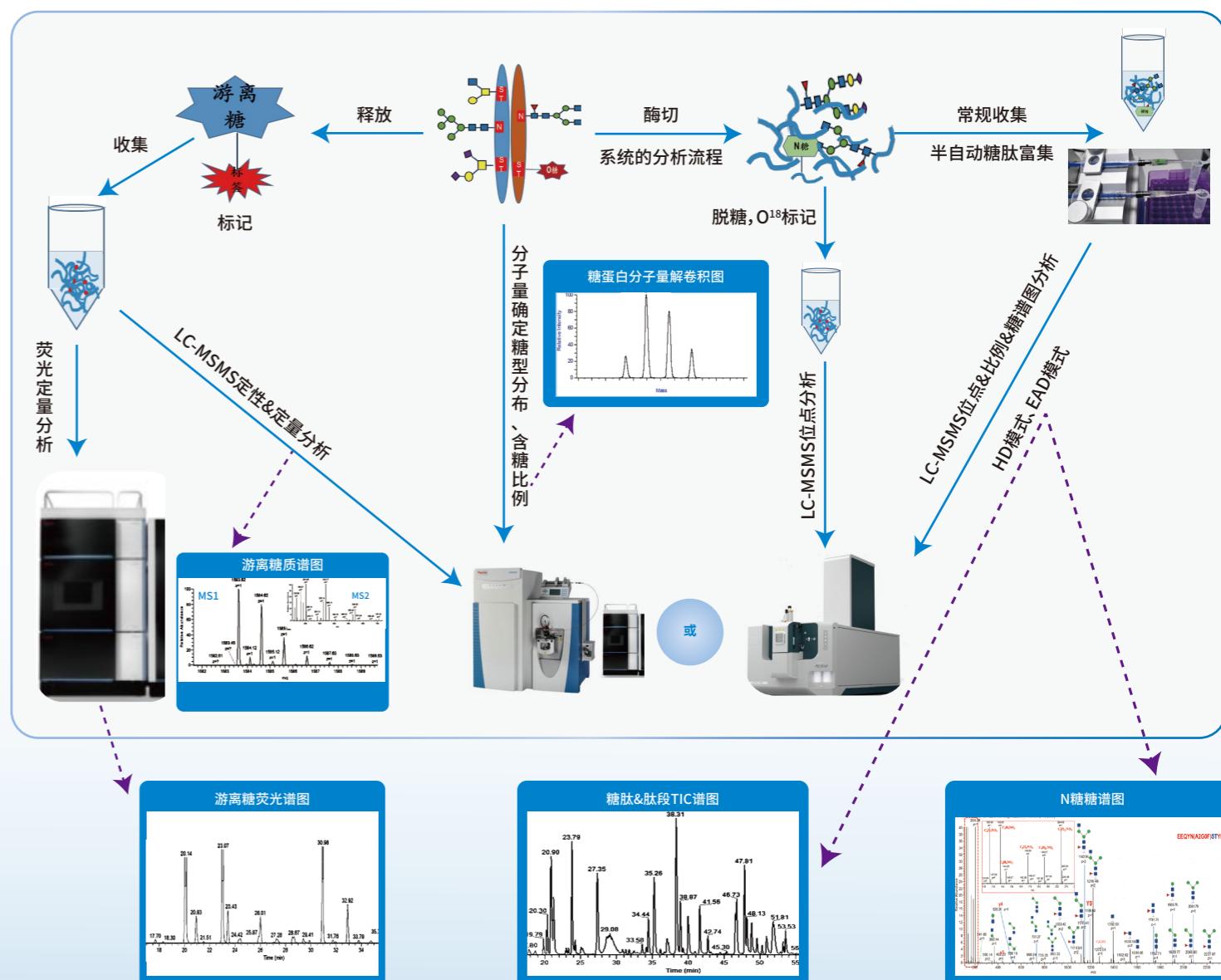
- 以某HCP为标准品, 在目标范围内建立标准曲线, 其响应呈线性, 可基于该标曲对未知样品中目标HCP含量进行定量分析。

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

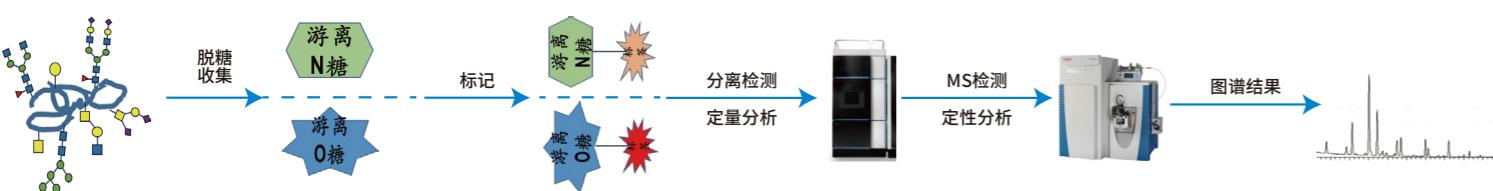
- 根据文献资料及项目数据积累, 自建立High Risk HCP Database, 服务HCP定性/高风险HCP识别/HCP定量分析流程。



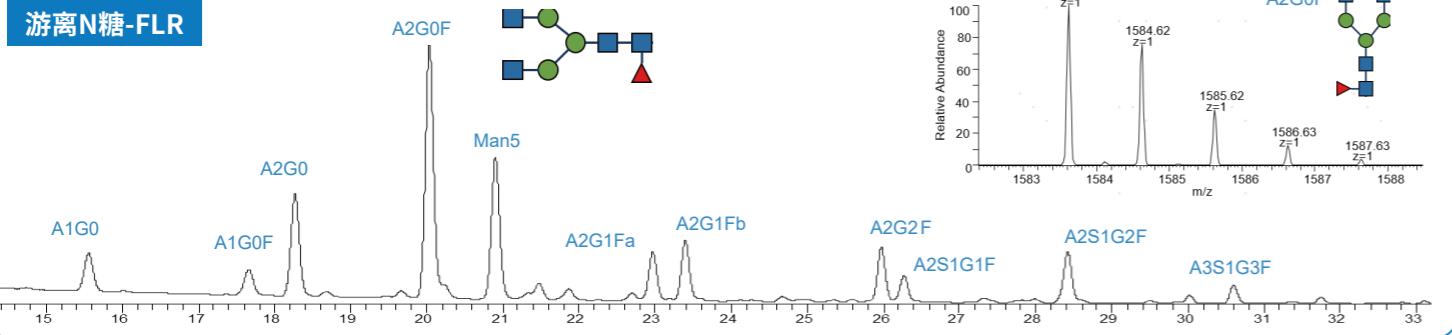
糖基化分析流程



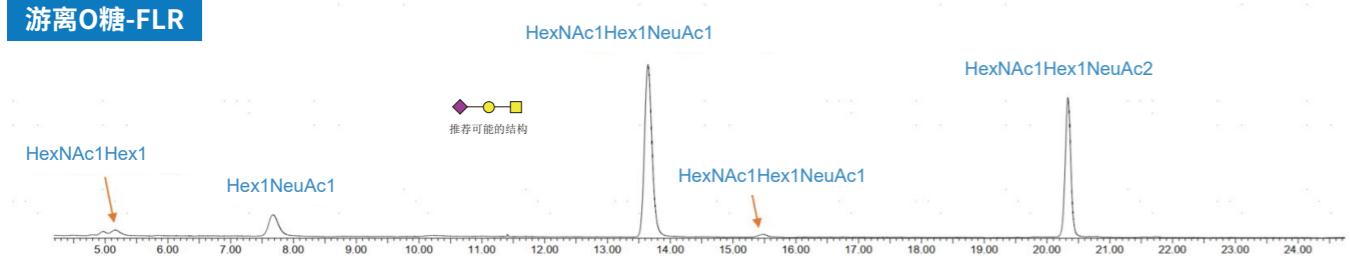
游离糖检测定性及定量分析



游离N糖-FLR



游离O糖-FLR



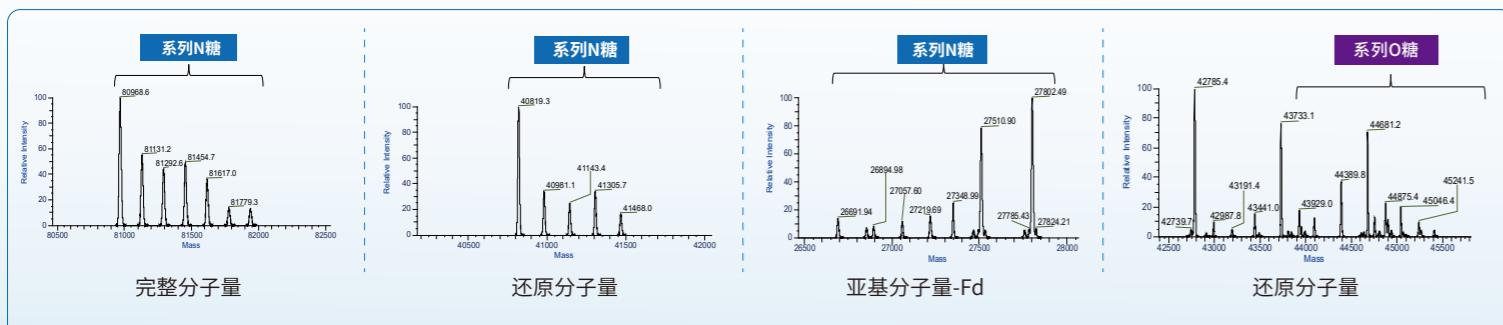
澳斯康定制脱糖策略

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

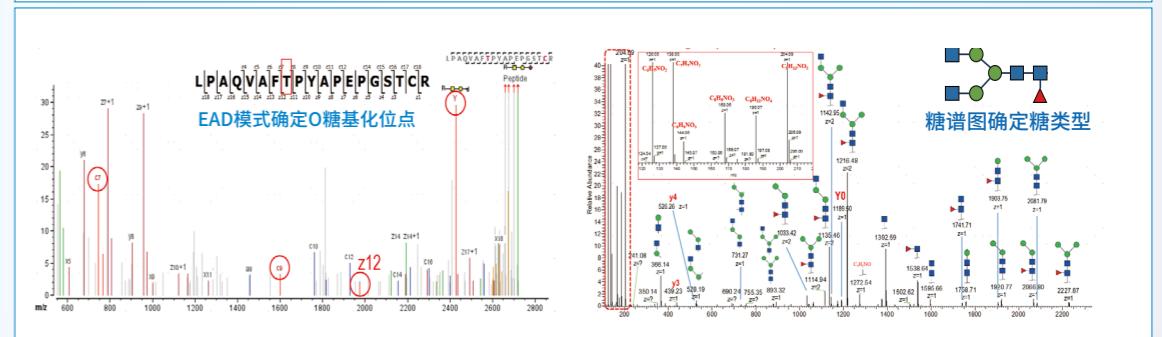
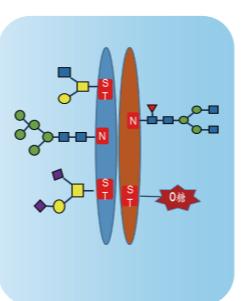
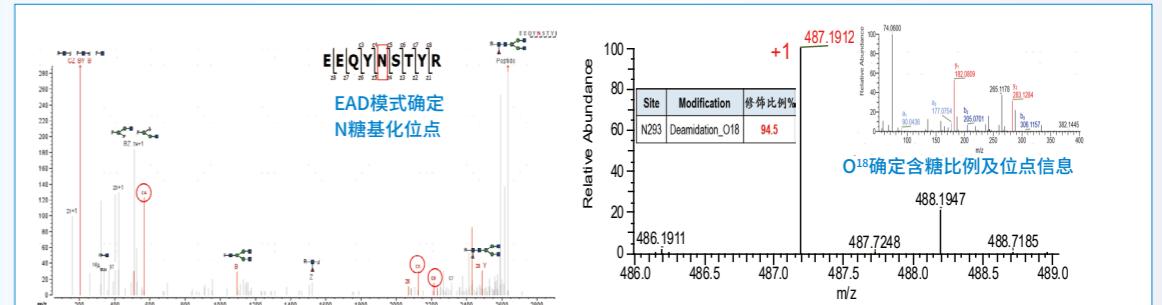
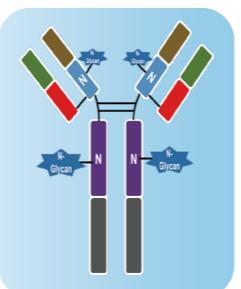
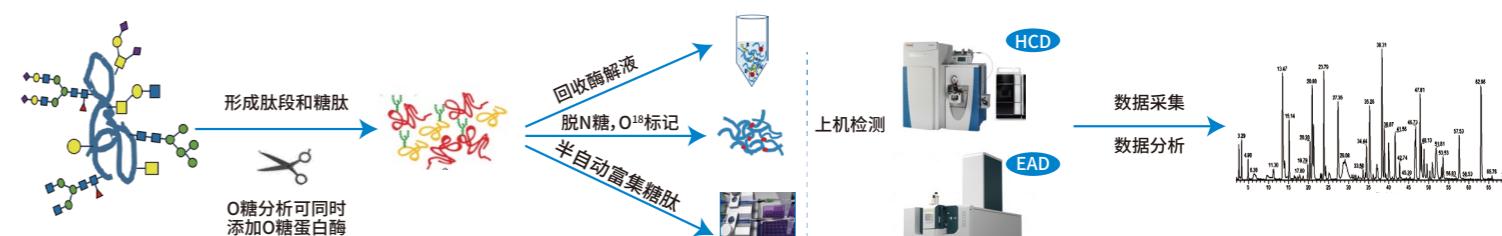
糖型分布确定

区域糖型确定

糖型比例计算

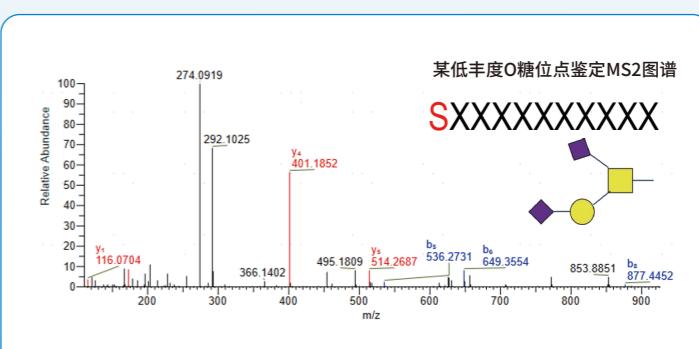
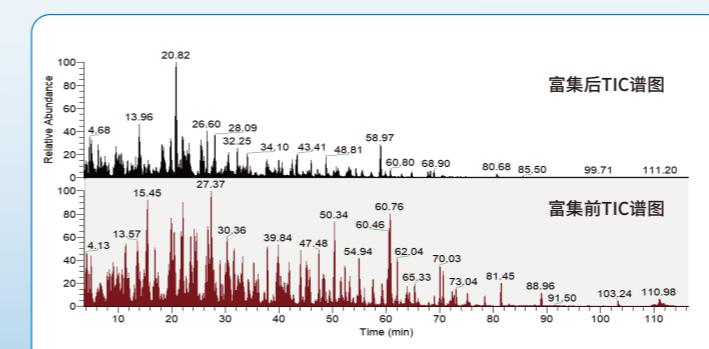
快速糖型检测

糖肽分析



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

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



某低丰度O糖位点鉴定MS2图谱

SXXXXXX

X

X

X

X

X

X

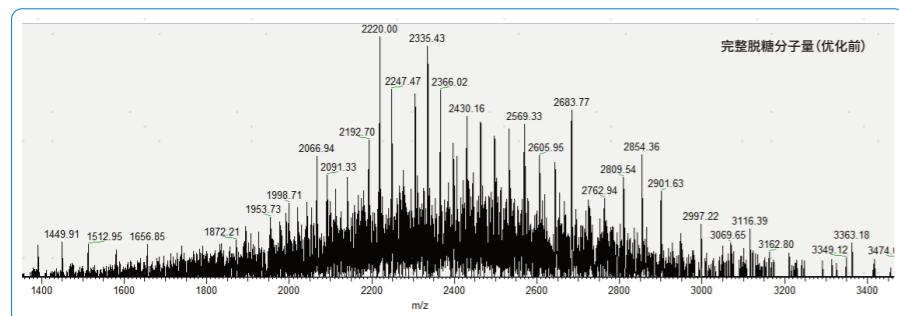
X

X

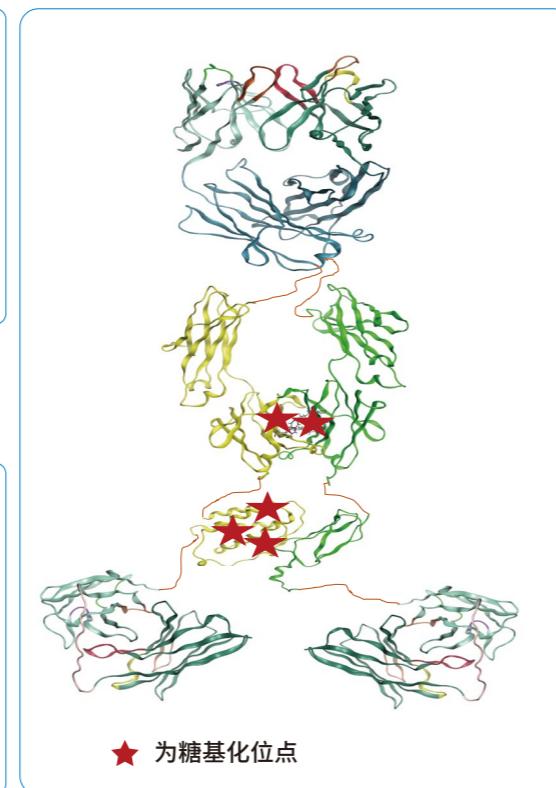
X

X

Case1: 复杂糖蛋白分子量水平质量研究

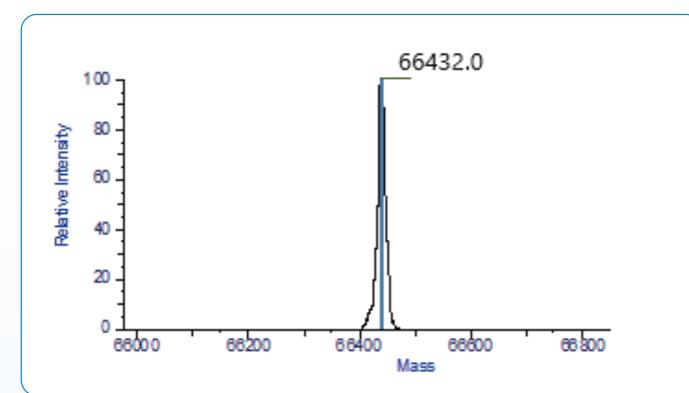


考察因素: 切糖方式、切糖时长、仪器参数

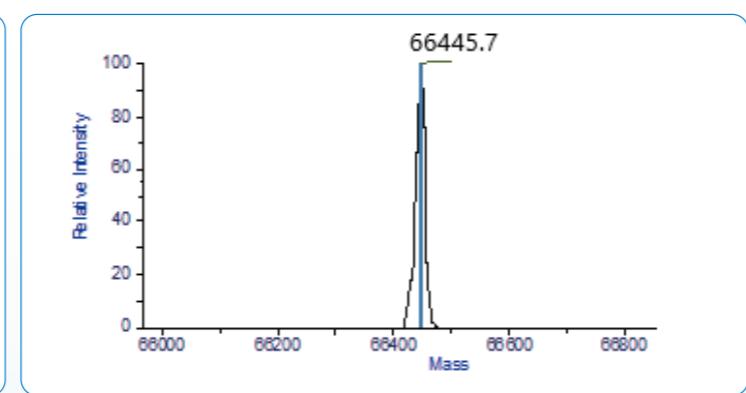


★ 为糖基化位点

- 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)



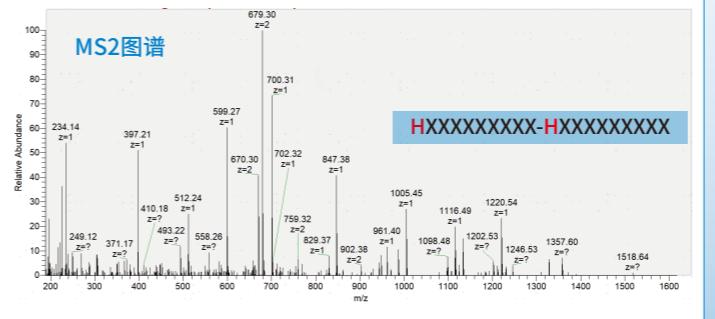
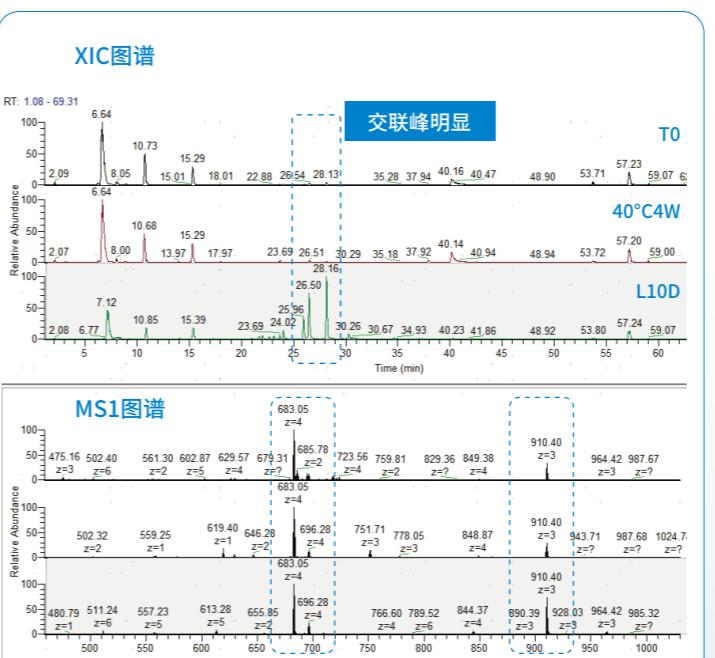
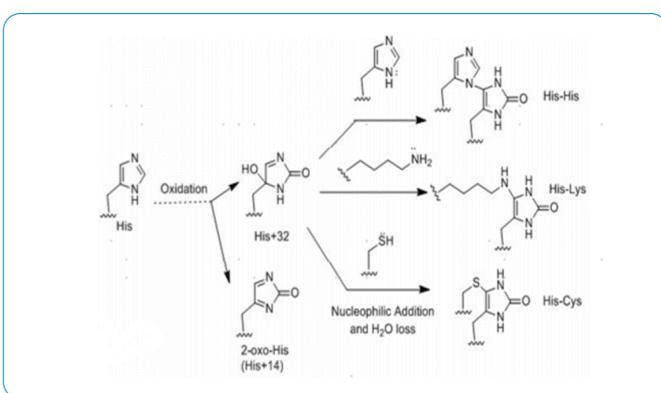
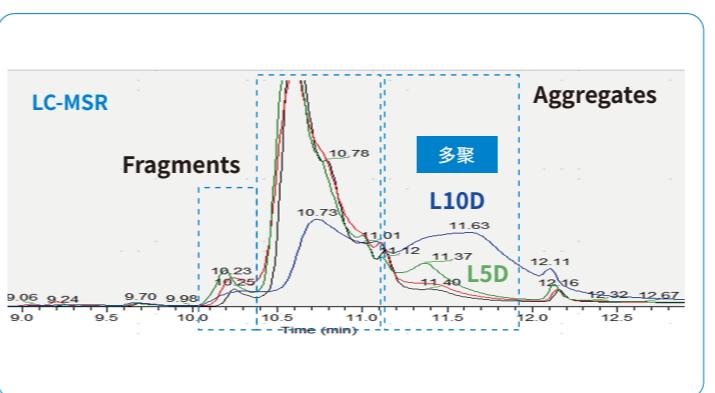
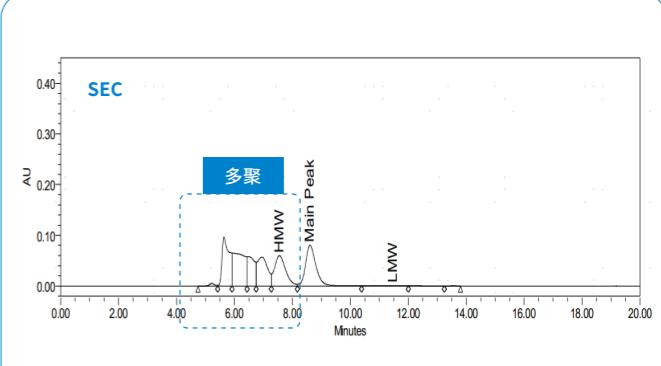
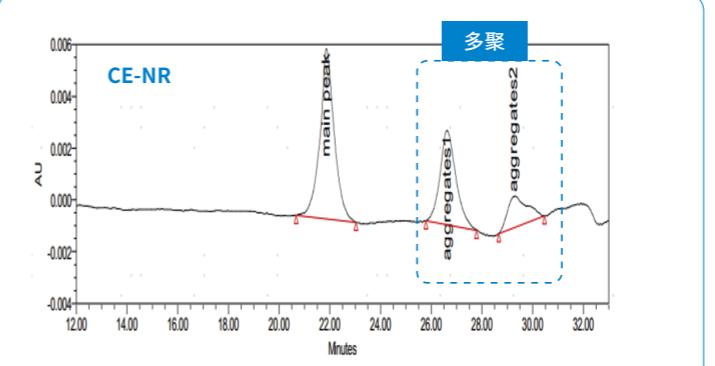
▲ 还原脱糖分子量-重链(优化后)

- 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。

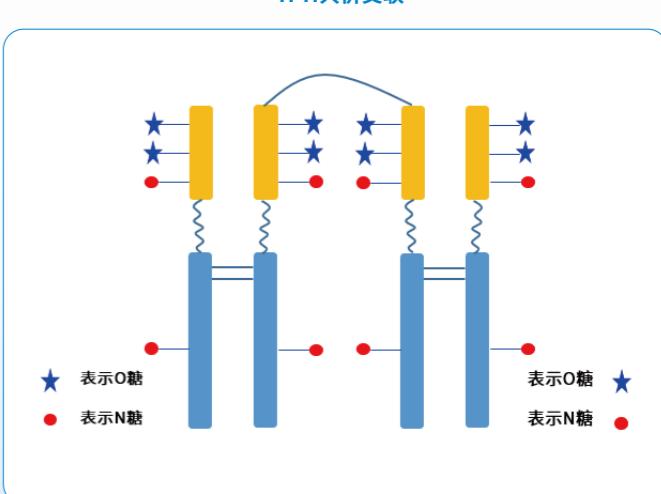
优化前后	含修饰的理论分子量(Da)	实测分子量(Da)	误差(ppm)
优化前		66432.0	-200.2
优化后	66445.3	66445.7	6.0

误差明显降低

Case2: 分子大小异质体研究——氨基酸交联

H-H交联
非共价

H-H共价交联

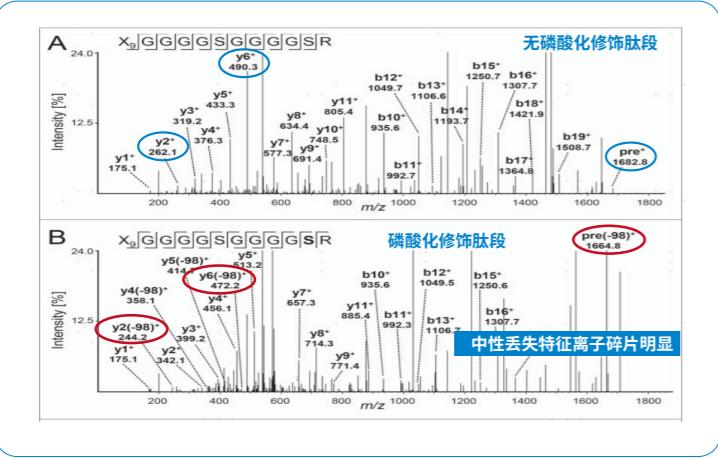


- 某项目光样品在SEC以及nrCE出现大量的高聚产物,且根据数据展示为非共价形成,在还原条件进行LC-MS分析,发现聚体具有抗还原性。针对该问题进行PTMs分析,发现存在某些位点的His氧化,这一过程容易形成His-His的共价交联产物,导致样品形成聚体。

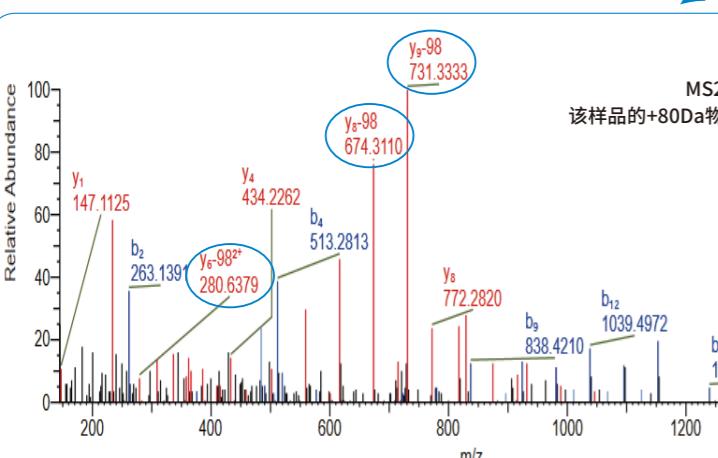
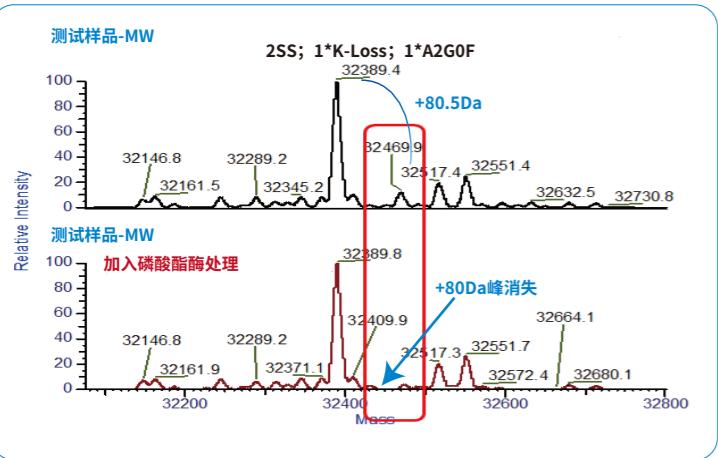
Case3: 磷酸化/硫酸化修饰

磷酸化/硫酸化判断依据:

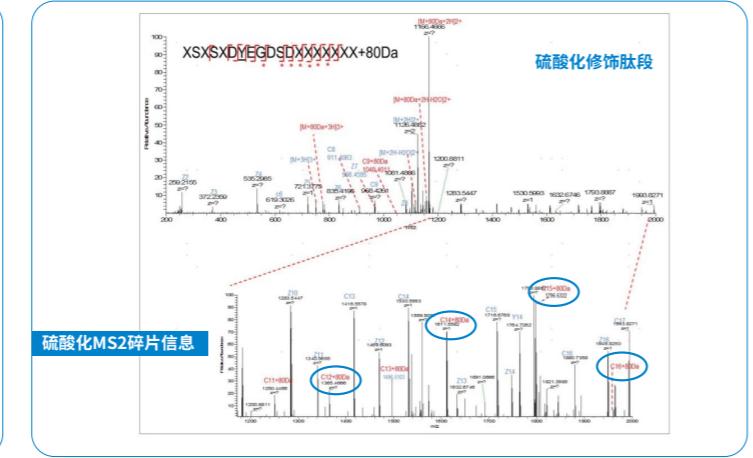
- 分子量水平: 分子量约+80Da, 推测可能与磷酸化或硫酸化修改相关;
- 修饰类型验证: 酶法验证: 去磷酸化酶/去硫酸化酶处理分子量验证;
- 肽图水平: 磷酸化在CID/HCD模式中中性丢失-98(-H3PO4); 硫酸化CID/HCD模式中中性丢失-80(-SO3), 此模式下无法区分, 常采用EAD/ETD模式确认。



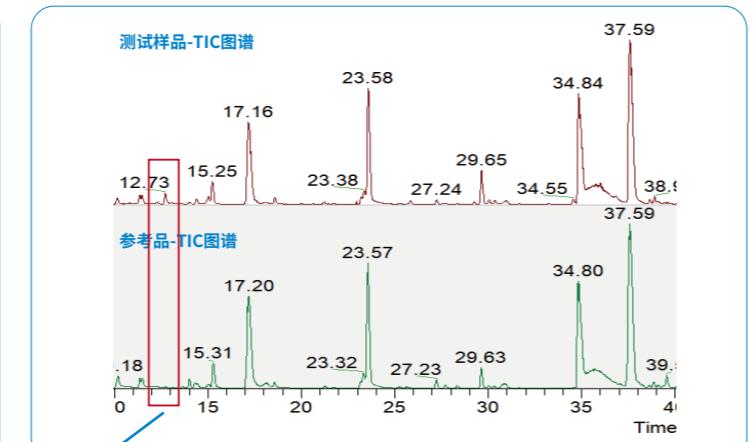
▲ 文献-HCD模式-磷酸化



肽段MS2图谱
MS2中可见-98特征离子,
该样品的+80Da物质为磷酸化修饰引起

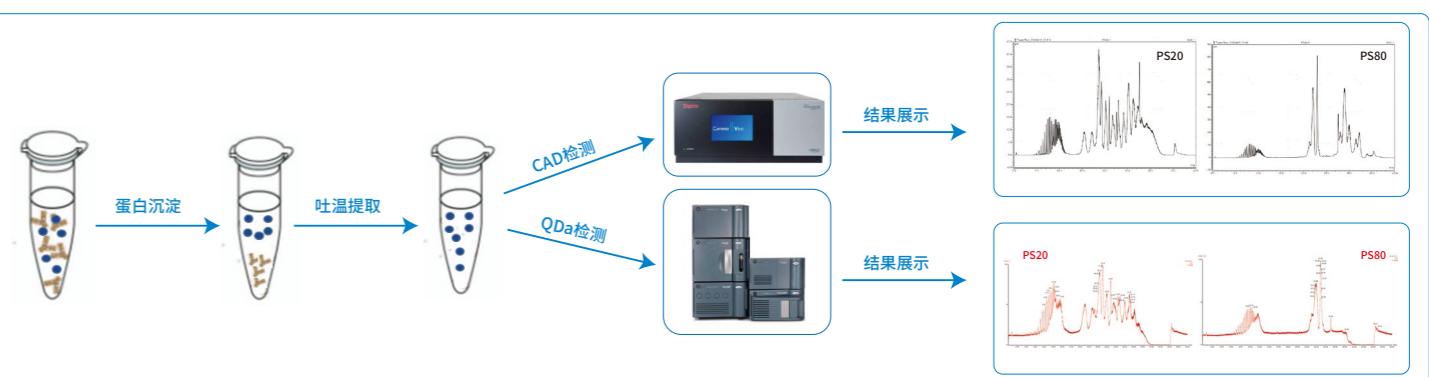


▲ 文献-EAD模式-硫酸化

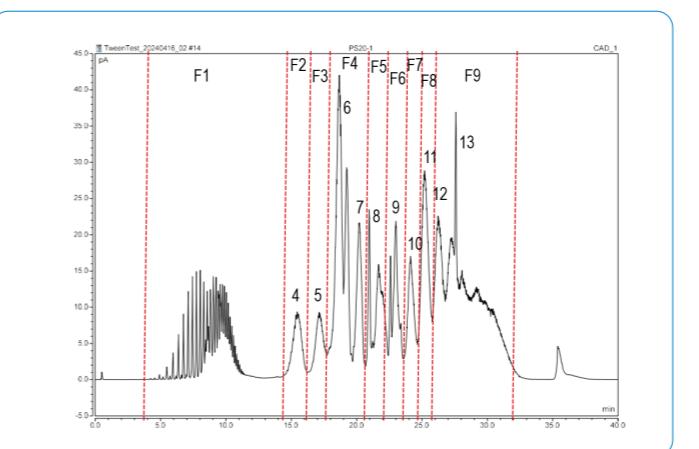


Case4: 吐温降解研究

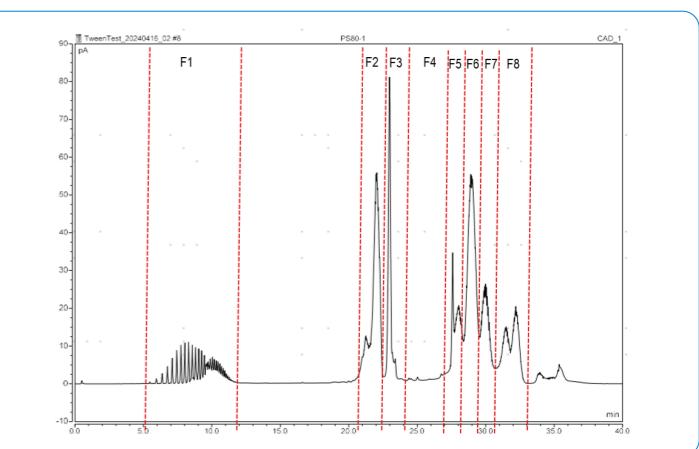
吐温检测流程



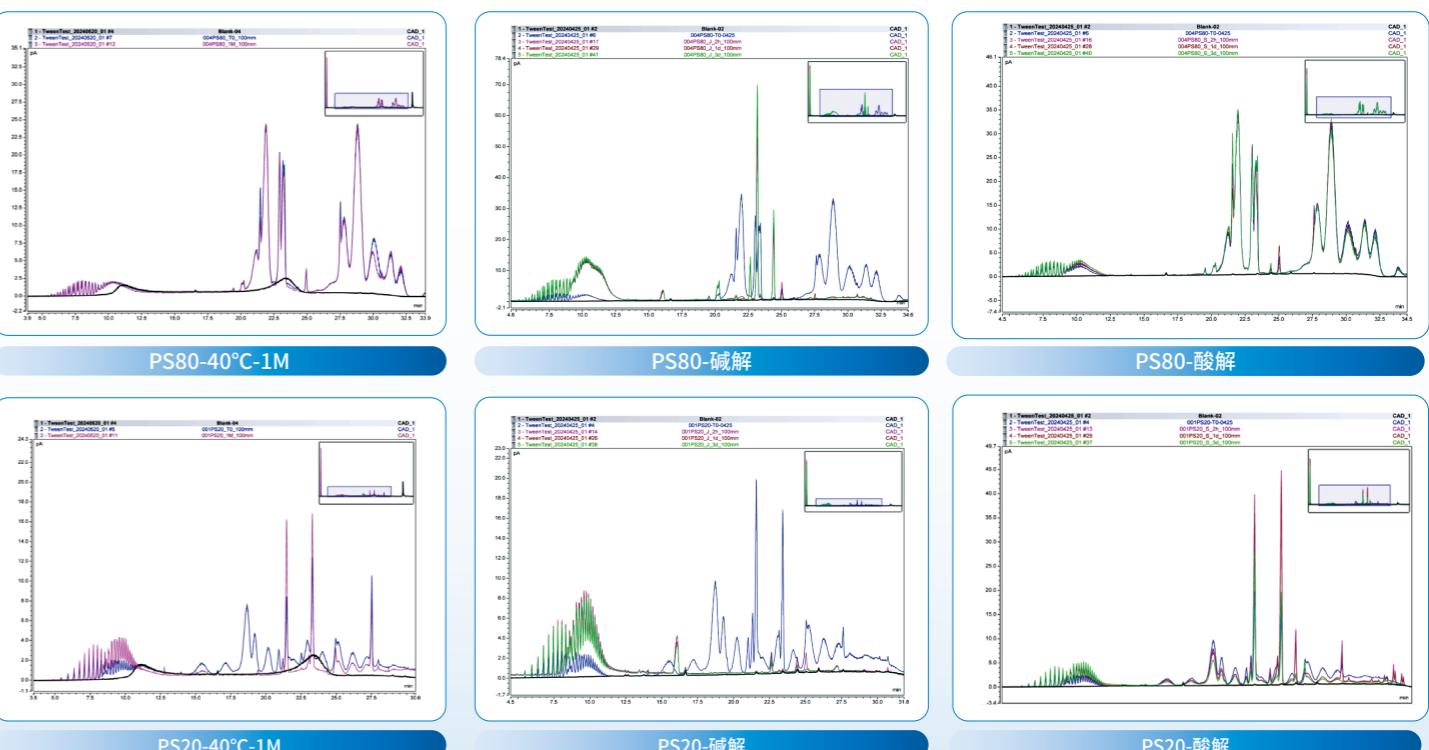
CAD-PS20-定性



CAD-PS80-定性



稳定性样品示例

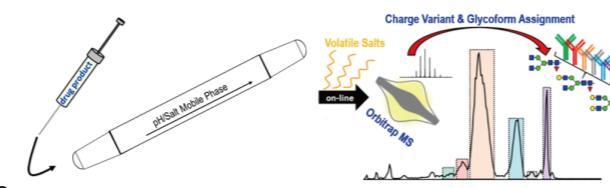


- 吐温会随着所处条件的不同, 降解趋势及程度产生差异性。

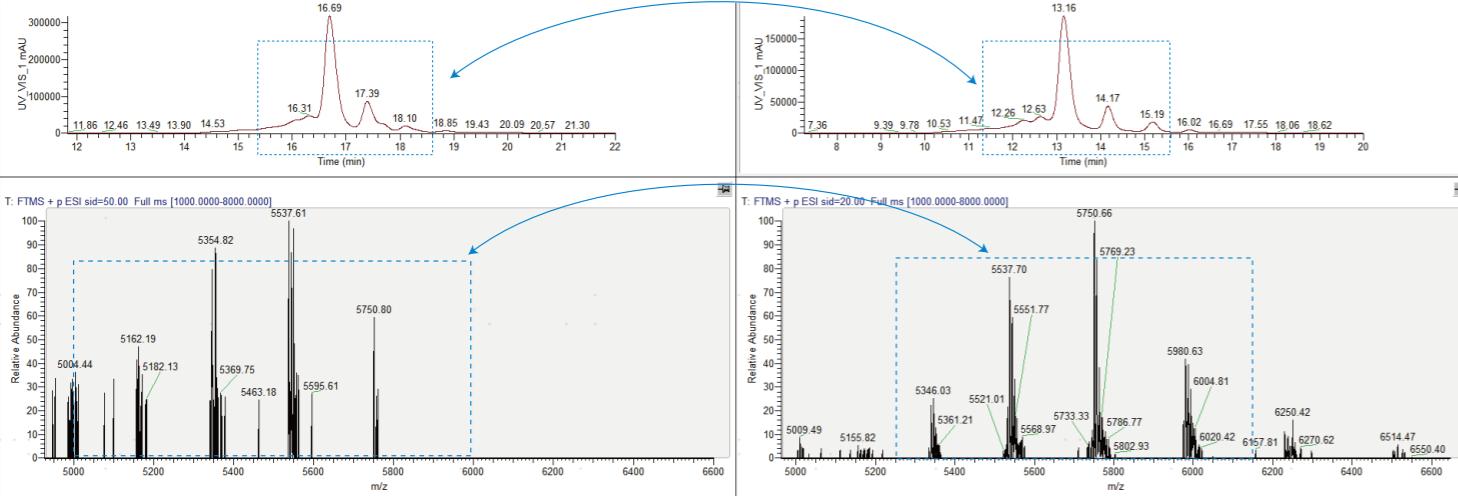
Case5: 非变性质谱 CEX-MS

非变性质谱 CEX-MS 原理图

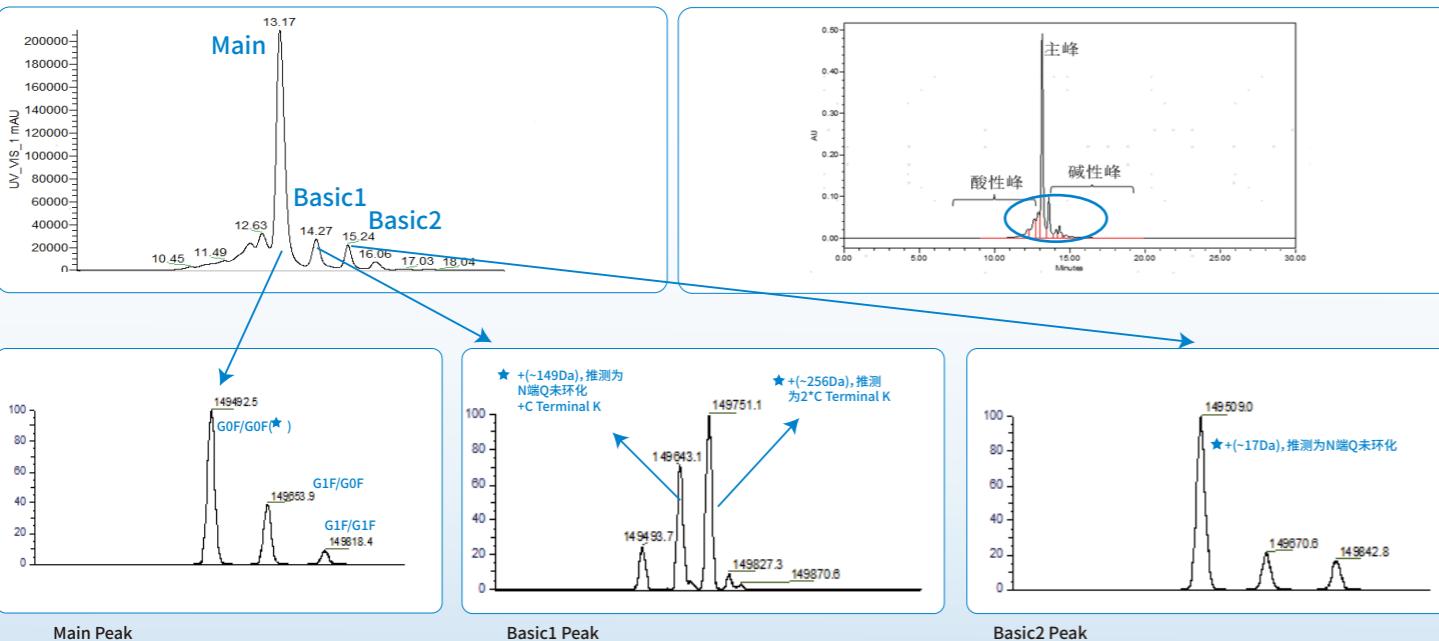
- 电荷异质体是重组蛋白类药物的关键质量属性，阳离子交换色谱(CEX)是目前蛋白类药物电荷异质体分析的主要技术之一，通过CEX可以得到蛋白的电荷异质体各峰的相对含量，但不能得到各电荷异质体峰的结构信息；
- CEX-MS通过将常规HPLC-CEX中含有不可挥发盐的流动相替换成可挥发盐的流动相，在控制盐离子、pH强度的基础至质谱兼容的条件下，直接将CEX耦合MS进行质谱分析，可得到基于分子量的层面的电荷异质体结构信息。



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

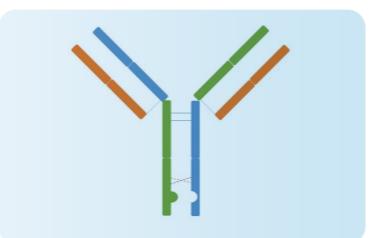


CEX-MS表征

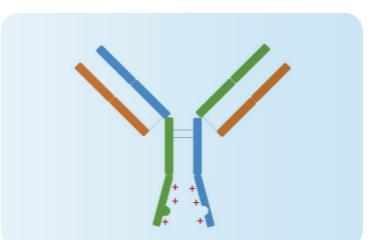


- 针对不同分子开发专属的Native-CEX-MS方法，与常规放行CEX谱图相比具有较高的一致性；
- CEX下各峰的电荷异质体鉴定是蛋白药物深度表征研究的需求，通过CEX-MS可更精细表征分子结构，识别潜在风险点，同时也能够为工艺开发提供更多技术支持，指明优化方向。

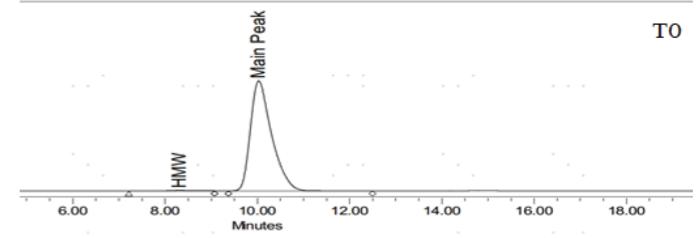
Case6: SEC-MALS聚体研究



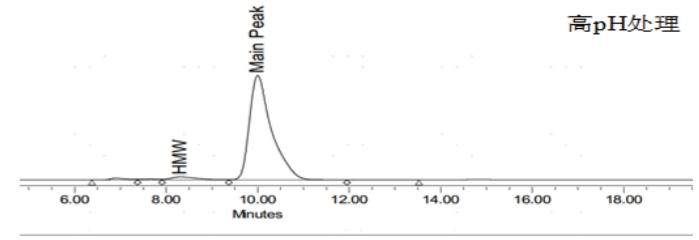
非对称双抗



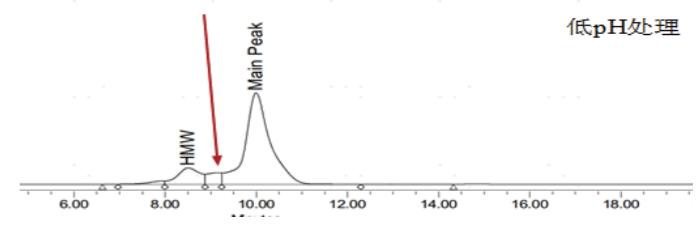
低pH处理非对称双抗



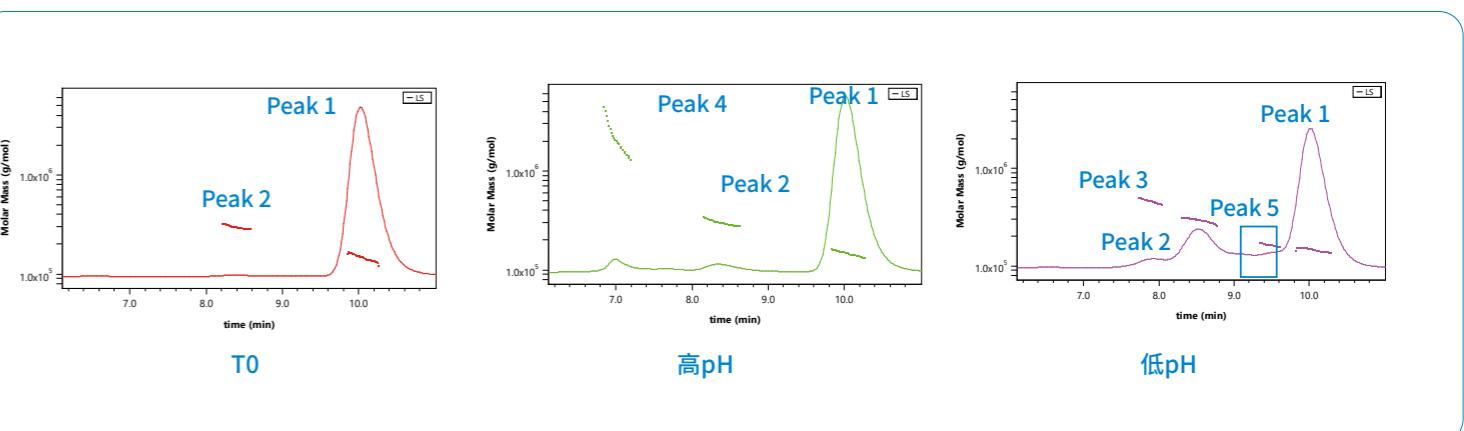
T0
Main Peak
HMW



高pH处理
Main Peak
HMW



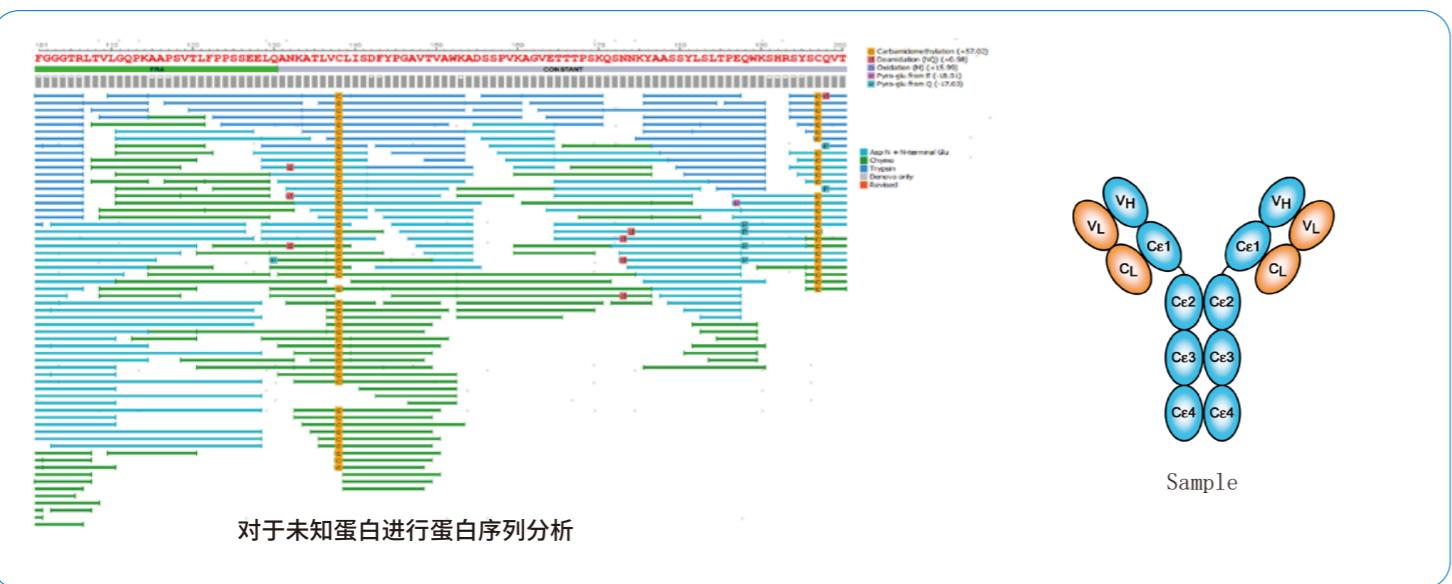
低pH处理
Main Peak
HMW



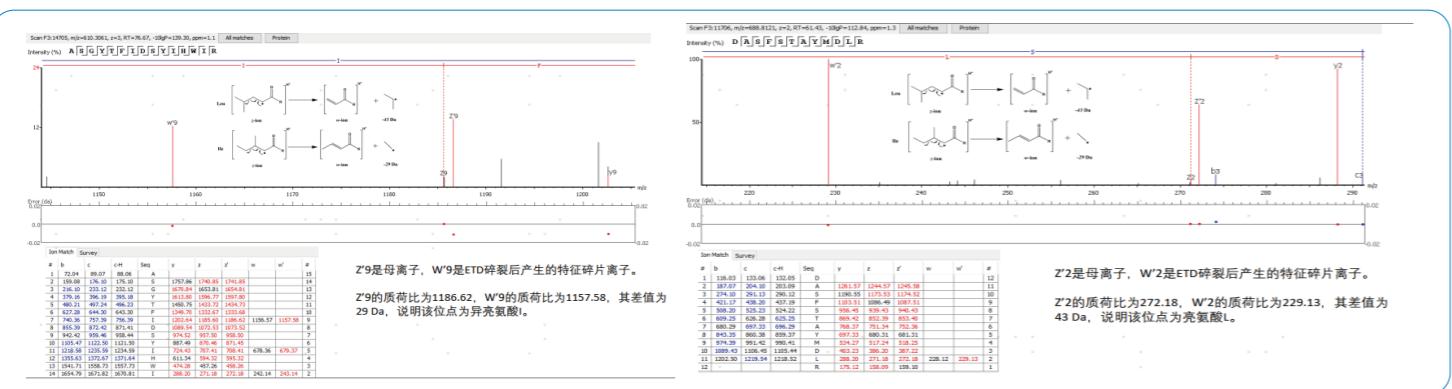
样品类型

样品类型	MW (Da)				
	Peak 1	Peak 2	Peak 3	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

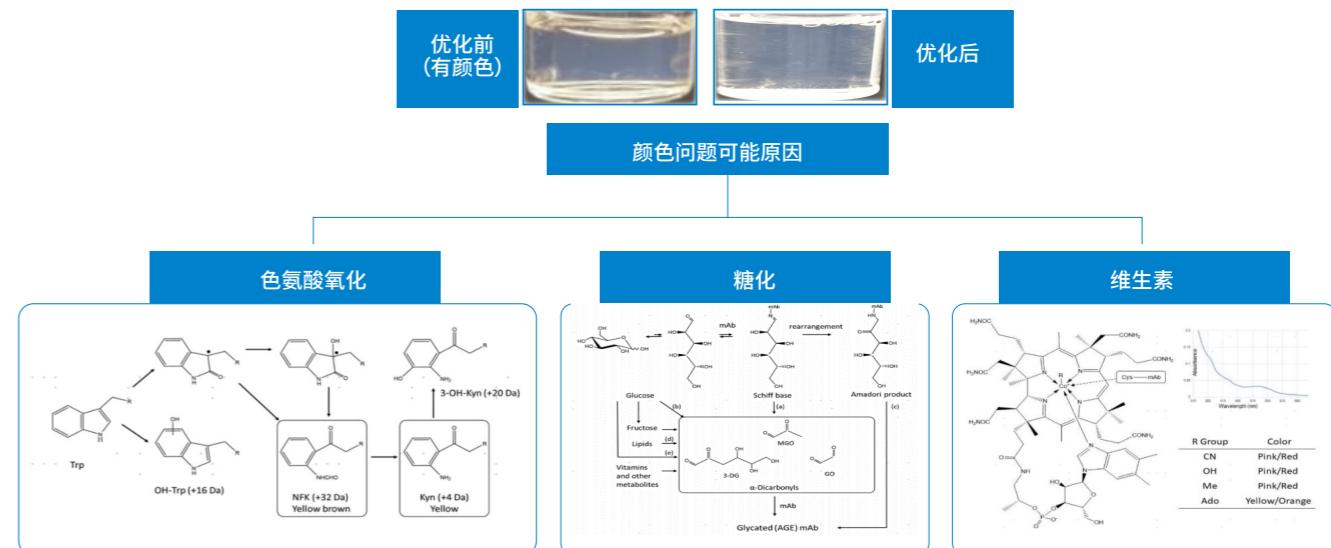
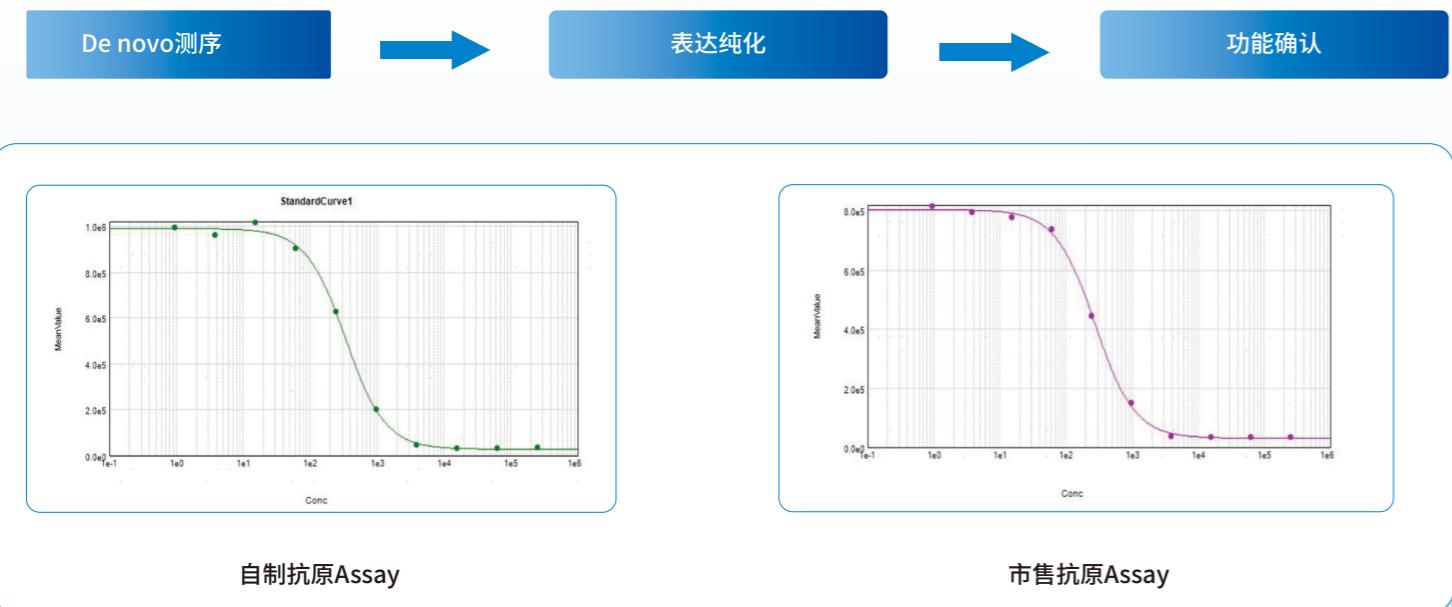
- 不同pH条件下容易导致构象变化产生异常峰；
- 主峰前的异常峰与主峰分子量接近，推测其构象产生了变化。



- 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。



- 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)、吡咯啉、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。

