

生物制药研发和质量控制解决方案

高效、快速、准确，从药物表征到生产流程全方位助力新药上市

ThermoFisher
SCIENTIFIC

生物制药行业正在发生一场革命，生物治疗药物是目前增长最快的医药行业细分市场，2018 年全球药物销售额排名前十的药品中，生物治疗药物占据八席。赛默飞世尔科技作为科学仪器领域的世界领导者，在生物制药流程的每个阶段拥有创新的解决方案，加速新药从发现、开发、临床研究、生产及质量控制进程，并降低运营成本，实现高效生产。

从早期研发、表征分析、工艺优化到 CMC、QC 分析，生物制品在每一个环节均存在着极其复杂的不确定性，为准确监控整个生物制药过程中可能存在的变化，赛默飞解决方案提供稳定准确的分析方法，为您的药品申报上市保驾护航。



Thermo Fisher Scientific 提供极其广泛的平台和解决方案组合，可满足您自药物发现到 QA/QC 的各种分析需求。无论是为促进疗效而筛选克隆抑或了解抗体糖基化模式的完整表征，我们均可提供解决方案。

分析应用的理想平台

UHPLC 色谱柱

我们拥有尽可能广泛的色谱柱，适用于生物制品的分离和鉴定，包括独特的高特异性多模色谱柱（如 GlycanPac）。



LC

使用快速、灵活、宽范围的 Thermo Scientific UHPLC 系统及新一代 Vanquish 系列 UHPLC 可以提高液相色谱分离效率。



Orbitrap 质谱仪

采用业界一流的 Orbitrap 技术，快速分析高度复杂的蛋白质（如单克隆抗体），获取超乎想像的细节信息。



数据分析平台

源于客户，服务于客户，专为生物制药客户打造的一站式数据解析平台。

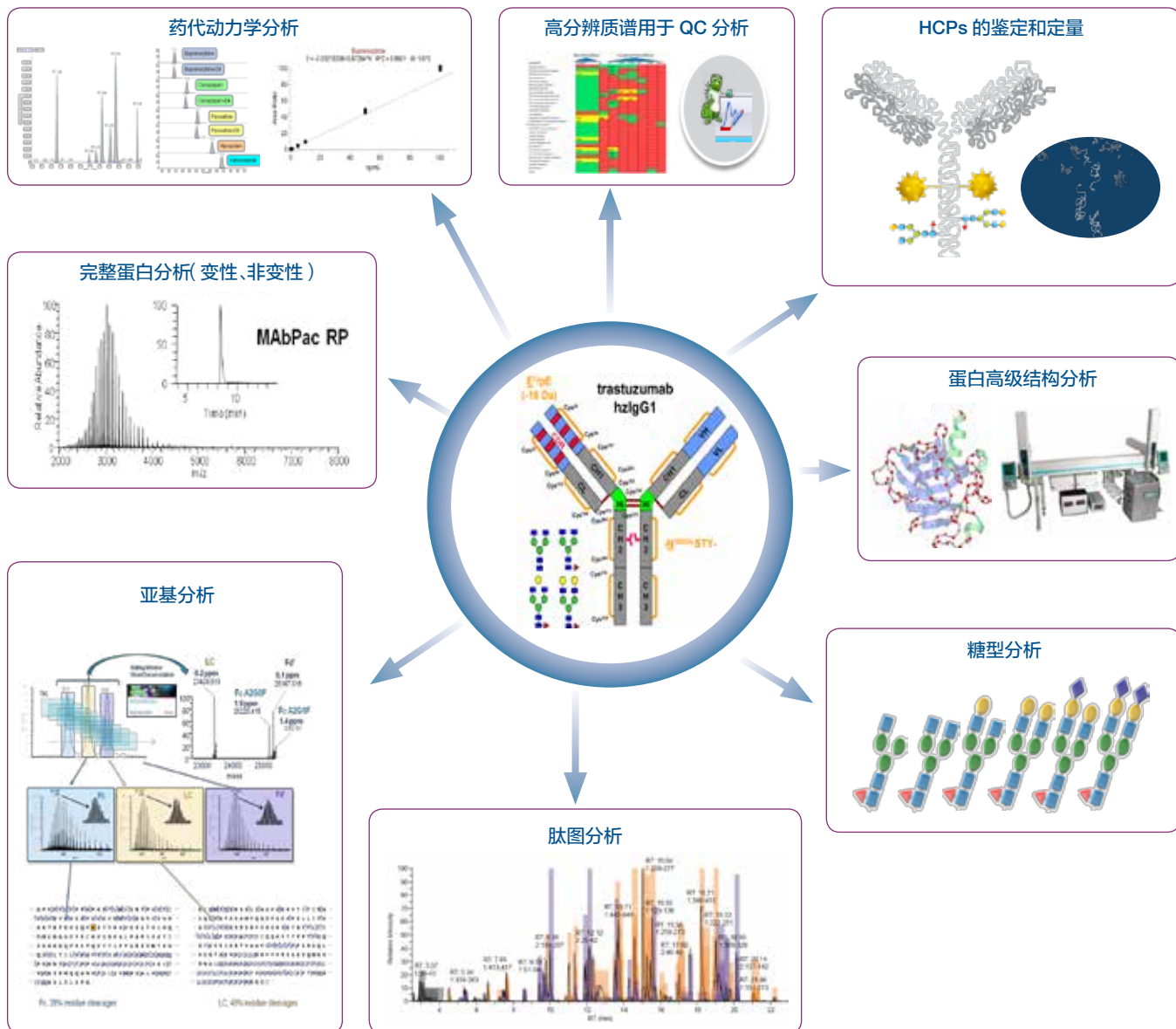


生物发酵工艺控制

		
细胞株	生物反应器条件	稳定性
SEC, IEX, RP-HPLC, HILIC, HIC 分析模式		
Folding/misfolding Cysteine pairing (S-S Bridges) Sequence Impurity	Charge variants Amino acid substitutions	Aggregation Deamidation N/C-terminal modifications Oxidation
Vanquish Flex 系统和 MabPac 色谱柱		

生物制药表征

				
肽谱	聚集体分析	电荷变异体	完整蛋白	糖苷分析
反相	SEC	IEX	反相, HIC	HILIC 混合模式 LC
确证序列	检测单体和聚集体	检查抗体样品的电荷变异	检查抗体的纯度	检测糖苷与其结构
UV and UV-MS	UV (UV-MS)	UV	UV 和 UV-MS	FLD, FLD-MS, CAD
重现性 峰容量	高盐条件生物兼容, 低扩散 重现性	生物兼容 选择性	生物兼容 梯度分离和 温控性能	梯度分离能力



目录

表征分析

- 一级结构分析：完整分子量 / 肽图分析 / 翻译后修饰分析 / 糖型分析
- 二级结构分析：二硫键确证和错配
- 高级结构解析

生物制品的纯度和杂质分析

- 电荷异质性分析
- 聚集体分析
- HCPs 定性和定量
- 重组多肽药物杂质定性和定量

生物制品的生物分析

关键质量属性监测 (MAM)

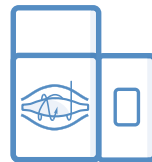
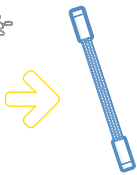
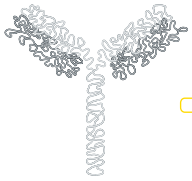
辅料检测

数据合规

一级结构分析：完整分子量

在药物开发和生产的所有阶段都必须进行生物药充分表征。在药物开发过程中，液相色谱-质谱（LC-MS）用于通过细胞系产生的单克隆抗体（mAbs）的结构表征，其主要目标是确定抗体分子结构，保证药物安全、有效，同时筛选目标单克隆细胞群。在整个生产过程中，需要持续监测制剂中抗体药物结构和成分，以评估批次放行所要求的纯度和异质性。

完整分子量测定是蛋白类药物产品（如单抗、抗体药物偶联物）研发与质控中最先进行的分析项目，通过实测值和理论值的比较，能够快速、准确的判断蛋白类药物分子量以及和小分子药物平均偶联比（DAR）是否正确。

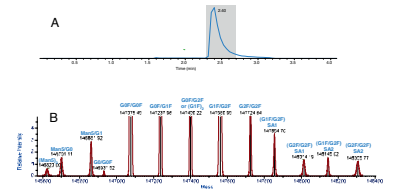


mAbs 和 ADCs 需要进行完全表征，包括糖型、更高级结构以及 PTMs。

我们的多种 HIC 色谱柱尤其适用于 ADCs 的表征，数分钟内即可完成 DAR 的测定。

Vanquish UHPLC 具有生物相容性流路且其合规性经过认证；与市场领先的质谱仪、荧光检测系统及电雾式检测器无缝集成；简单方便的一键式工作流程，AppsLab 在线数据库和 Viper 接头，操作简易。

ESI-Orbitrap MS（电喷雾离子化-静电场轨道阱质谱）已经成为的测量分子量最常用方法之一，包括完整分子量测定，切 N 糖后分子量测定，轻重链分子量测定，抗体-化学药物偶联物（ADC）分子量及 DAR（Drug to Antibody）值分析等。在 ESI（电喷雾离子化）条件下，蛋白分子信号落入 2000-4000m/z 范围内。在此质荷比区域内，Orbitrap 分辨率可达几万，可从容进行此项分析。



100 ng mAb 利妥昔单抗的质谱分析。（A）使用了 Thermo Scientific MSPac DS-10 除盐 Cartridge 的液相色谱图；（B）去卷积光谱图和带注释的糖链异质体。

使用 Q Exactive 系列高分辨质谱对 ADC 与 mAb 进行变性及非变性条件下分子量测定

随着生物制药工业的发展，通过将单克隆抗体的二硫键打开，由此在半胱氨酸的自由巯基上偶联小分子药物的 ADC 越来越多。该 ADC 在传统的变性质谱条件下会解离成抗体片段，无法测定完整蛋白的分子量。非变性质谱（Native MS）是近年来不断发展和推广的新兴分析技术，可以在保持蛋白非共价作用力条件下进行分子量测定。

Thermo Scientific Q Exactive Plus Biopharma 质谱仪在保持 Orbitrap 超高分辨质谱平台优点的基础上，对 mass range 做了进一步扩展，新增的可选项 High Mass Range Mode（HMR Mode）m/z 上限可至 8000，该平台包括三种不同分析模式（Standard Mode、Protein Mode 及 HMR mode），可覆盖生物制药领域的表征全流程。

Q Exactive Plus Biopharma 质谱平台与体积排阻色谱串联，方便快捷的测定非变性条件下 ADC 样品，尤其是 Cys 偶联样品的分子量。

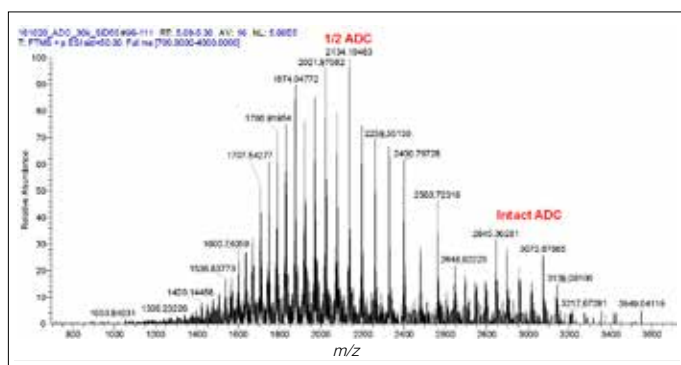


图 1. 变性条件下 Cys 偶联 ADC 分子量测定结果

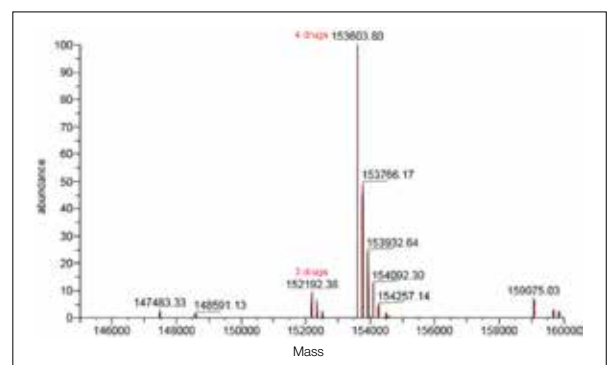


图 2. ADC 样品解卷积结果 (R=17500, m/z =5000~7000)

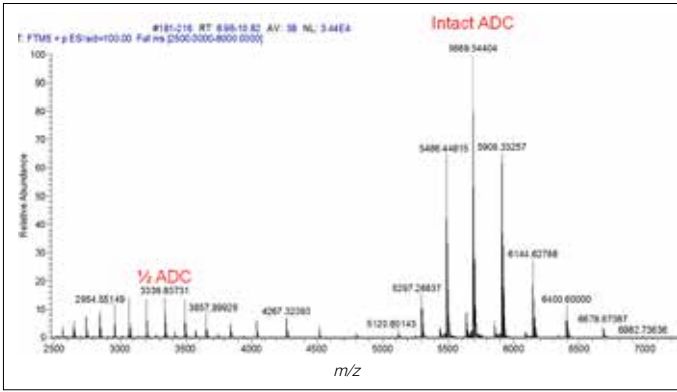


图 3. 非变性质谱条件下测定 ADC 分子量原始谱图 (R=35000)

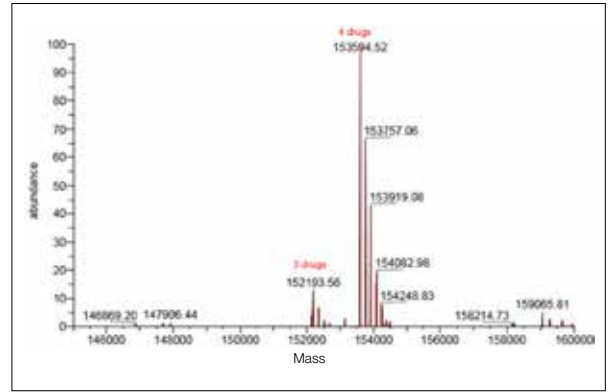


图 4. ADC 样品解卷积结果 (R=35000, m/z=5000~7000)

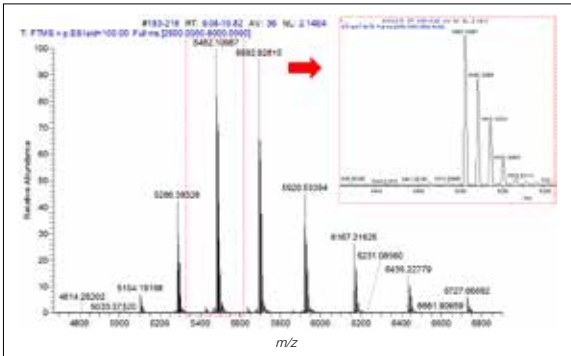


图 5. 非变性质条件下 mAb 样品原始谱图 (R=35000)

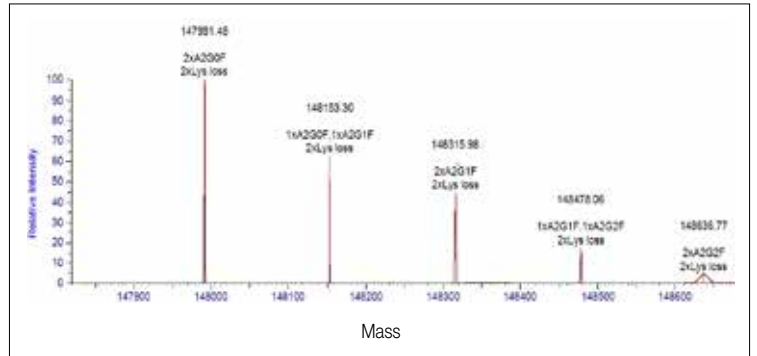
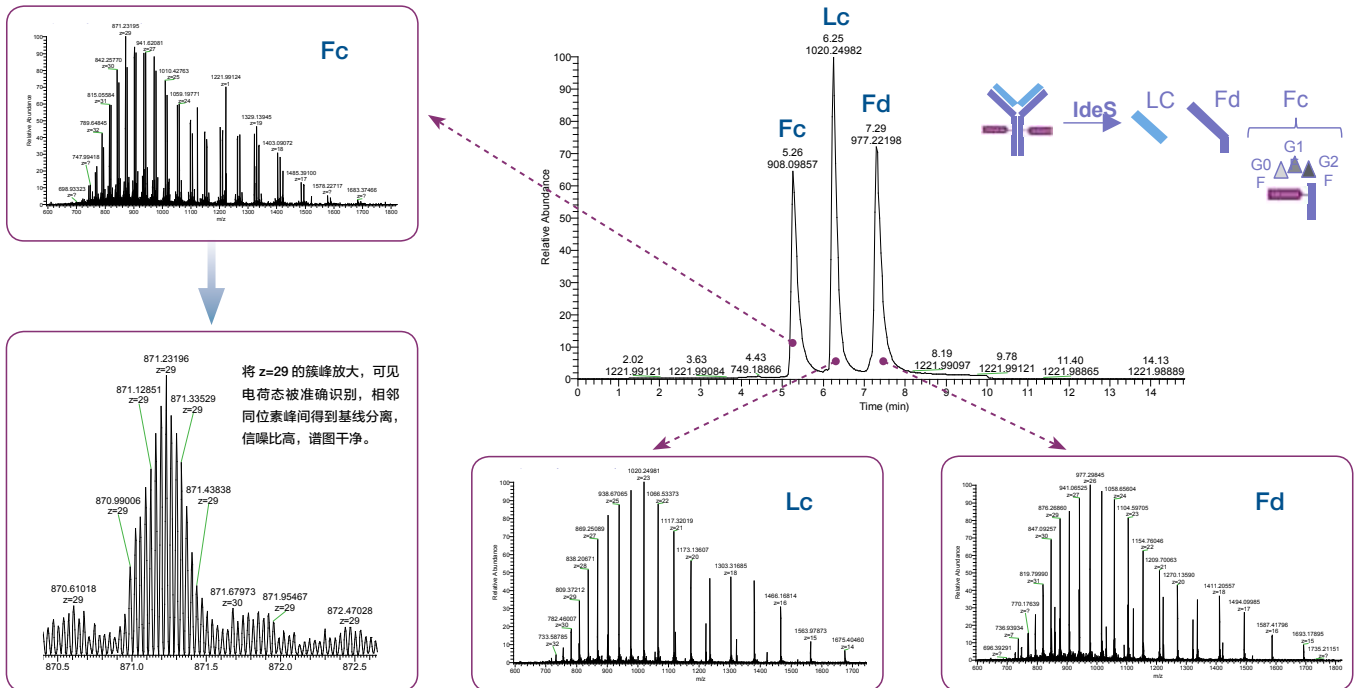


图 6. 非变性质条件下 mAb 样品去卷积后结果 (R=35000)

单克隆抗体亚基分析：质谱的高分辨率 (R=140,000) 可实现同位素峰基线分离

单抗经过 Ides 酶切再还原可得到 scFc, LC 和 Fd, 分子量约在 23~25kDa, MabPac RP 色谱柱对抗、轻重链和亚基的分离具有非常优异的表现 (如下图), 配合 Orbitrap 超高分辨率 (140K) 能够实现同位素峰基线分离的高质量原始谱图, 从而能得到高度准确的结果, 为生物药表征提供了一个强有力的分析工具。



一级结构分析：肽图分析

肽图分析是生物治疗药物表征过程中的关键步骤。通过“自下而上”的分析流程将蛋白类药物经蛋白酶消化成多肽，利用 LC-MS 鉴定多肽氨基酸的组成，从而判断完整蛋白药物的氨基酸组成与预期是否一致，以及实现蛋白翻译后修饰的鉴定和相对定量。

从药物发现和开发到临床试验阶段再到生物生产和 QA/QC，肽图分析仍然是关键分析方法。我们提供创新技术的独特组合，包括从头到尾的工作流程，旨在实现快速、可靠、可重现和易于使用的方法。

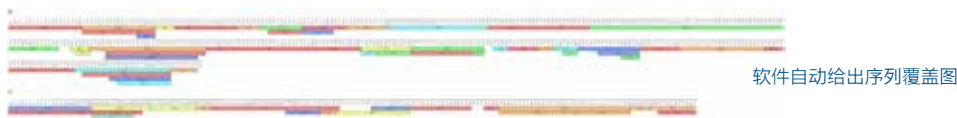


赛默飞与世界级制药领军企业 Amgen 联合开发了 Biopharma Finder 软件，其功能设计最初来源于分析人员的实际需求，除最基本的肽段氨基酸序列确认、覆盖率分析、修饰位点鉴定与定量、二硫键的确证并发现错配、CID/HCD/ETD 碎片解析等功能外，Biopharma Finder 还独具二级碎片离子的强度预测、未知修饰发现、氨基酸突变查找功能。此外，Biopharma Finder 还有更多贴心功能设计，如 CHO 和 Human 细胞系的 N、O 糖型库，便于完整分子量、糖肽分析；再如，除具有肽段鉴定可信度评价功能外，还可智能显示多肽的理论质谱碎片，并用于与实验图谱直观对比，以辅助分析。这些功能不但减少工作强度，也降低了对分析员理解质谱数据深度的要求。对于氨基酸固定修饰设置，不同于其它类似软件（只可精确至某一类氨基酸），Biopharma Finder 可以精确到特定的某个氨基酸位点。对于蛋白药的某些特殊分析需求提供了极大的便利。



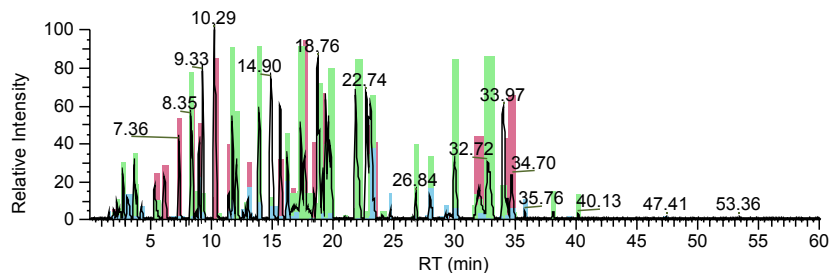
Herceptin 单抗药肽图分析

以 Herceptin 单抗药肽图为例，经 Trypsin 单一酶切后，轻松实现 100% 氨基酸序列覆盖度，同时实现对低丰度翻译后修饰的准确度和定量。

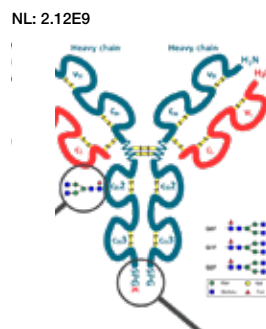


包含二硫键的样品也可在胰酶单酶切的情况下实现 100% 序列覆盖

Proteins	Number of MS Peaks	MS Peak Area	Sequence Coverage	Abundance (mol)
1: LC	562	23.0%	100.0%	34.26%
2: HC	1233	51.3%	100.0%	65.74%



Proteins	Number of MS Peaks	MS Peak Area	Sequence Coverage	Abundance (mol)
1: LC	476	25.6%	100.0%	41.90%
2: HC	1168	62.4%	100.0%	58.10%

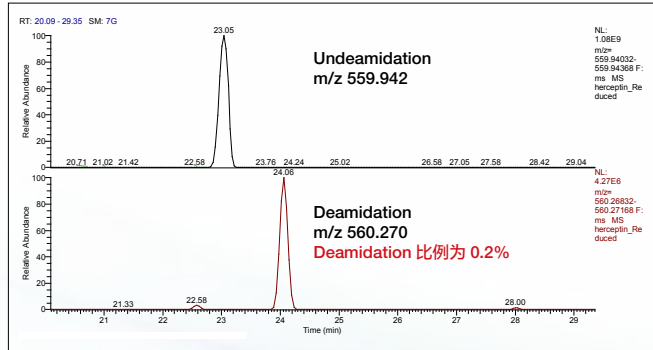


二硫键还原样品轻松实现 100% 序列覆盖

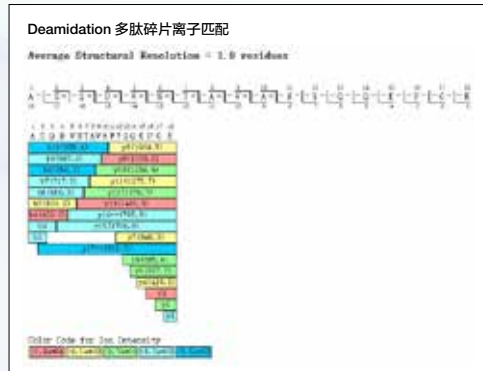
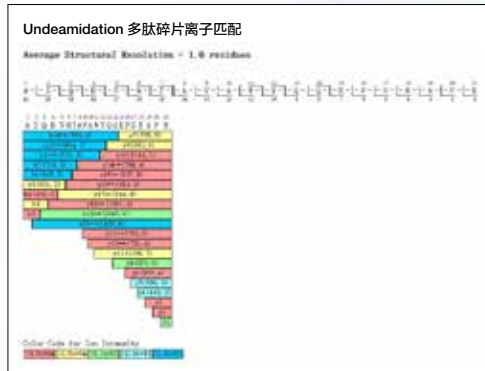
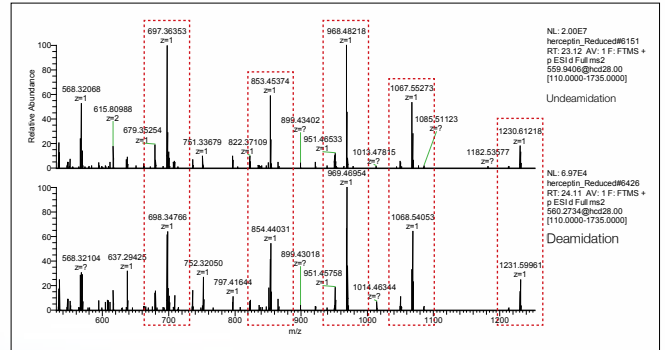
一级结构分析：翻译后修饰分析

Orbitrap 可以保证高灵敏和高分辨同时兼得；对低至 0.2% 的翻译后修饰仍能获得精确的质量和丰富的二级碎片离子谱图；BioPharma Finder 软件则根据多肽的一级峰面积自动准确的计算出翻译后修饰比例；

3ppm 进行精确提取一级质量



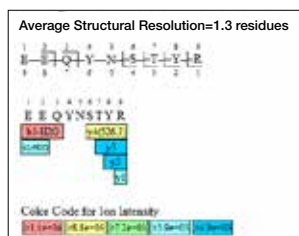
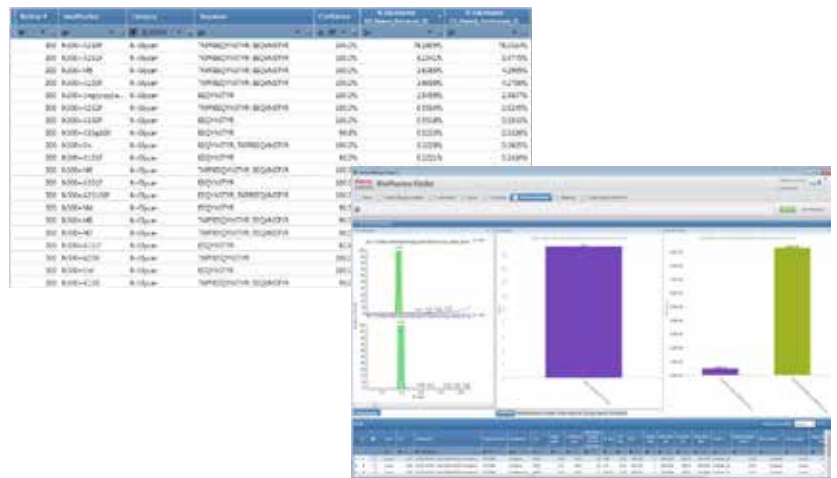
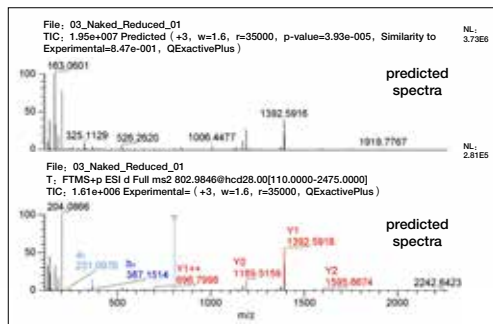
低丰度成分同样具有丰富的二级碎片离子



获得高可信度的糖肽定性与相对定量结果

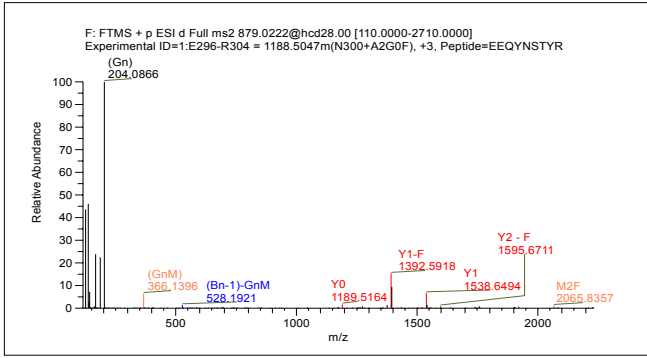
糖肽在 HCD/CID 中产生很强的糖肽特征碎片离子，m/z 138.0545, 204.0867, 366.1396，以及特征的 Y1 等离子；

BioPharma Finder 软件中自带近 182 种 CHO 细胞系 N-glycan 糖型；带有 39 种 Human N-glycan 糖型；带有 16 种 O-glycan 糖型；并准确计算其相对含量

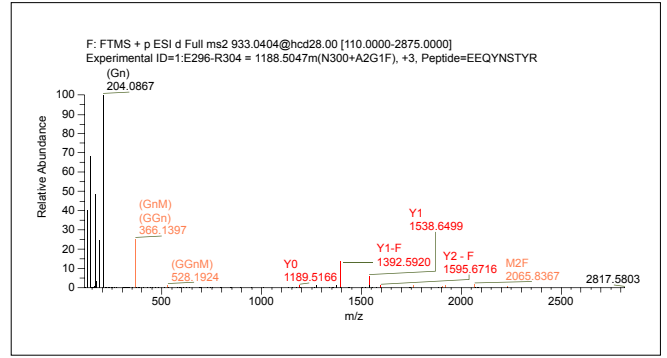


软件自动提供柱状图展示同一糖型在不同样品中含量对比，直观易读

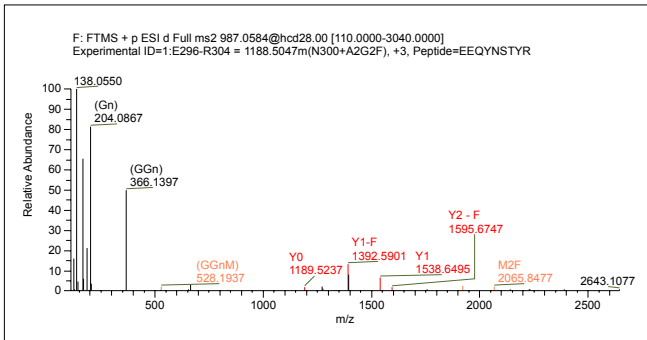
A2G0F 比例为 39.3%，碎裂离子如下



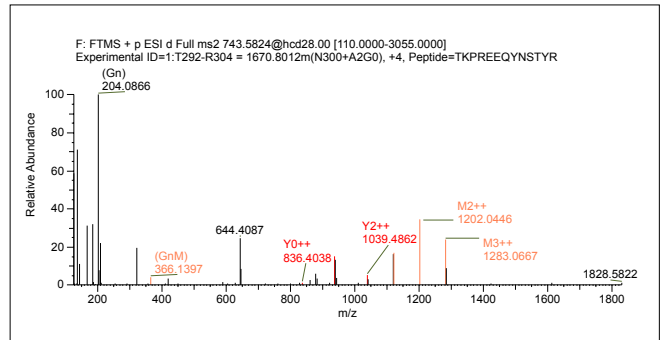
A2G1F 比例为 38.3%，碎裂离子如下



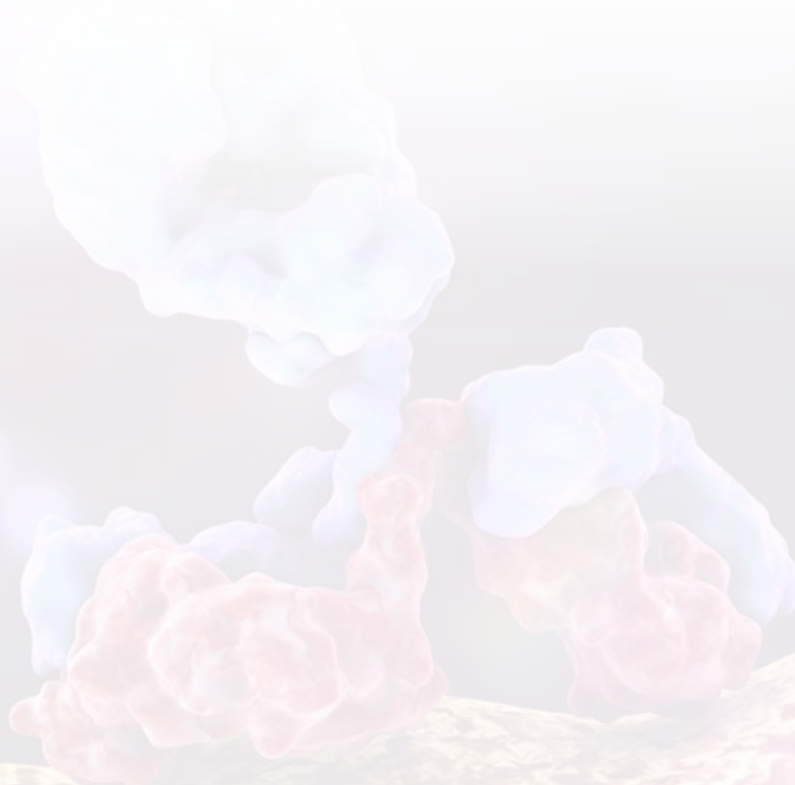
A2G2F 比例为 8.2%，碎裂离子如下



A2G0 比例为 4.2%，碎裂离子如下

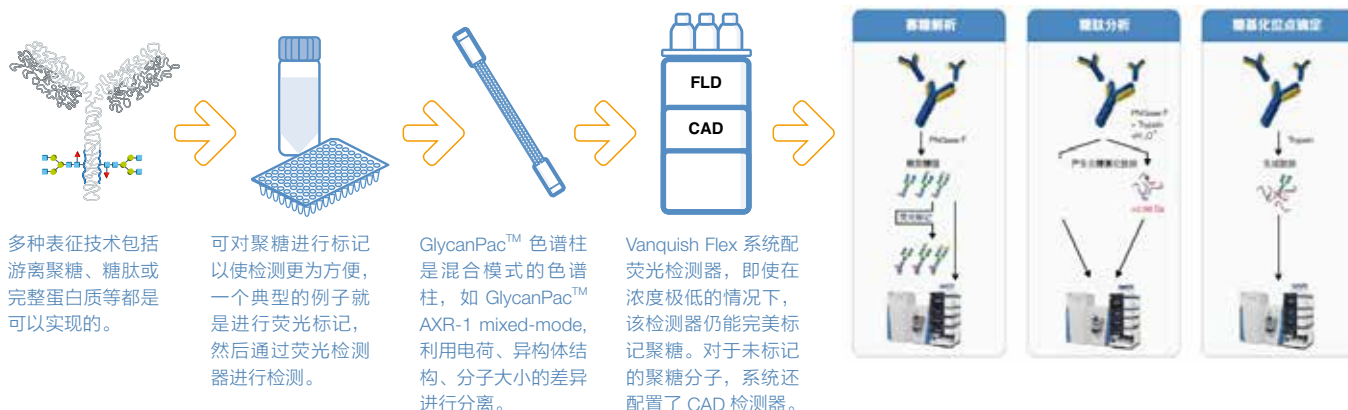


- BioPharma Finder 软件中自带近 182 种 CHO 细胞系 N-glycan 糖型
- 带有 39 种 Human N-glycan 糖型；
- 带有 16 种 O-glycan 糖型；



一级结构分析：糖型分析

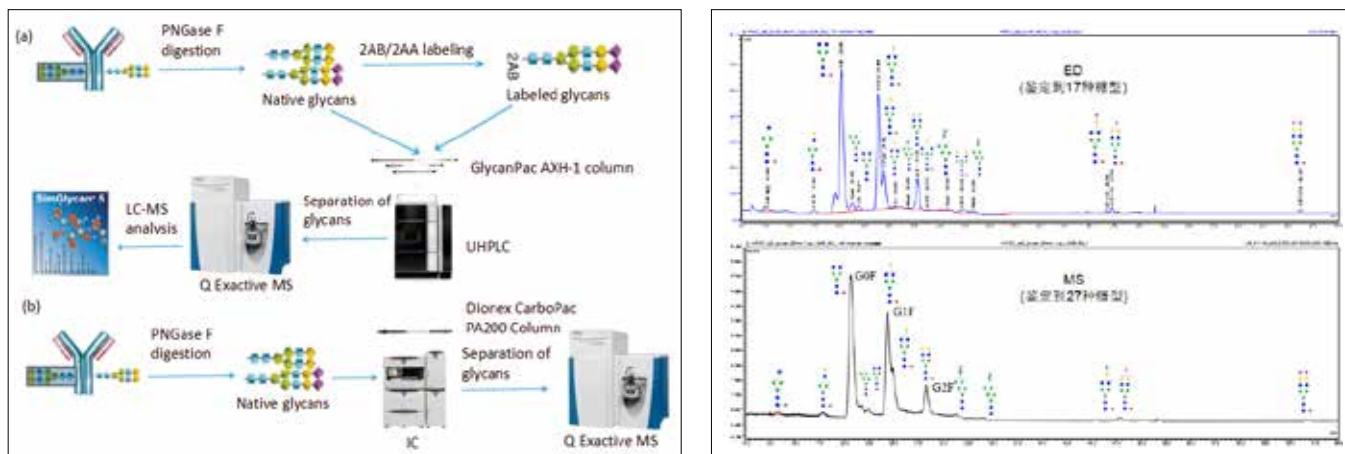
糖基化对蛋白药物的疗效、稳定性、免疫原性具有重要的影响。以单克隆抗体为例，如果出现 N- 糖型以外的糖型，则会影响免疫原性或半衰期，需要避免；另一方面，可以细胞工程及分子生物学技术，提高一些 N- 糖型的含量，以增强 ADCC, CDC, Anti-inflammatory 等效能。寡糖为非模板合成，并呈树状结构，其结构极其复杂，仅由 6 种单糖组成的寡糖链，其理论结构即达到惊人的 1012 种。这就要求用于寡糖的分析设备具有强悍的分析性能。赛默飞开发了一系列简单、高效的液相色谱 - 质谱表征方法，涵盖了从糖链结构分析、到糖基化位点鉴定、再到糖肽解析的完整分析流程。



寡糖链分析

糖链常用的分析方法有：液相色谱法、毛细管电泳法和高效阴离子交换色谱法。其中，液相色谱法为当前最常用的分析方法，主要采用 HILIC 色谱柱和赛默飞独有的 GlycanPac AXH-1 色谱柱进行分离，90% 以上的糖链分析都使用此方法。

高效阴离子交换色谱法一般与脉冲安培检测器联用（HPAE-PAD）对寡糖进行检测。通常 LCMS 的方法要求将糖链衍生化后再进行分析，样品前处理耗时，操作复杂。而 HPAE-PAD 可以直接分析未衍生化的糖链，避免样品在标记过程中唾液压的降解，减少了前处理的步骤和样品前处理的时间。



单克隆抗体 N- 糖链 (a) LC-MS/MS 完整分析流程, (b) IC-MS 分析流程

ED 安培检测器和 MS 检测 N- 糖型结果

糖基化位点分析

糖基化位点的发现与确证对质谱的分辨率与灵敏度具有较高要求。Orbitrap 由于具有超高分辨率和超高灵敏度，无论对于单抗等纯蛋白样品、还是全细胞蛋白等复杂样品，都是是糖基化位点表征的最佳工具。目前糖基化位点最大的数据集，共从小鼠组织与血浆中注释了 6367 个糖基化位点。该实验采用 PNGase F 释放糖链并标记 ^{18}O 方法，使用 Orbitrap 鉴定糖基化位点，共鉴定到 6367 个位 13 点，其中 5753 个位点是没有记载的新位点。该研究对糖蛋白的研究具有重要意义，也展示了 Orbitrap 超群的性能。在相对简单的抗体及其他蛋白药物糖基化位点表征中，Orbitrap 更可毫无疑问地胜任此工作。

二级结构分析：二硫键的确证及发现错配

二硫键对于稳定蛋白质药物的空间结构，保持其活性具有重大的作用。而在蛋白质药物的生产过程中，由于成本控制的需求，往往追求较大的蛋白质表达浓度，而使发生二硫键错配 (disulfide scramble) 的可能性有所上升。因此，二硫键的连接确证成为蛋白质药物质量表征的必须环节。串联质谱在灵敏度、准确性、操作性等多方面独具优势，已经成为二硫键表征的主流方法。

BioPharma Finder 软件根据多肽的一级精确质量 (Orbitrap 一般测定质量偏差最多在 ± 5 ppm 内) 和二级碎片离子的丰富度 (每条多肽至少 50% 的氨基酸有相应的 b、y 碎片离子)，检索二硫键的正配和错配。

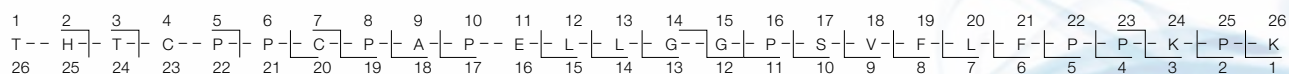
以较链区为例

碎片覆盖图

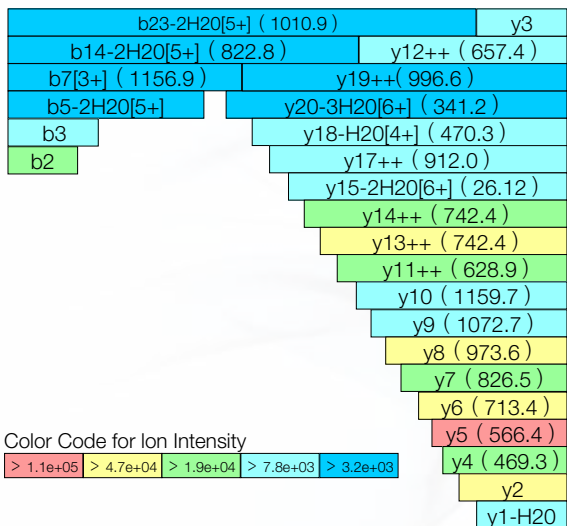
Fragment Coverage Map

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK/THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK [2ss] (7+)

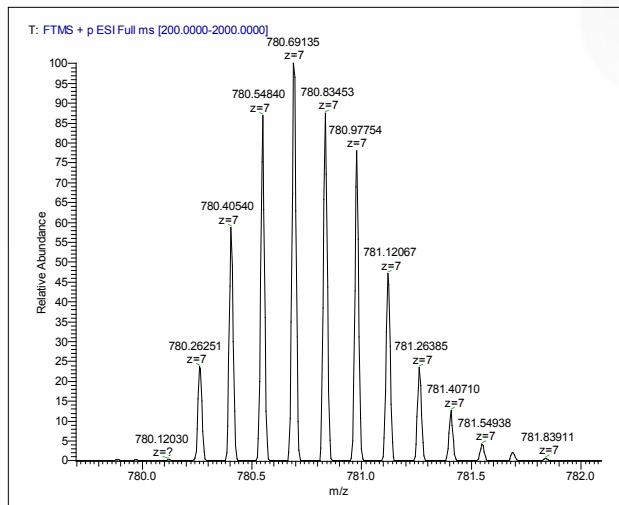
Average Structural Resolution=1.1 residues



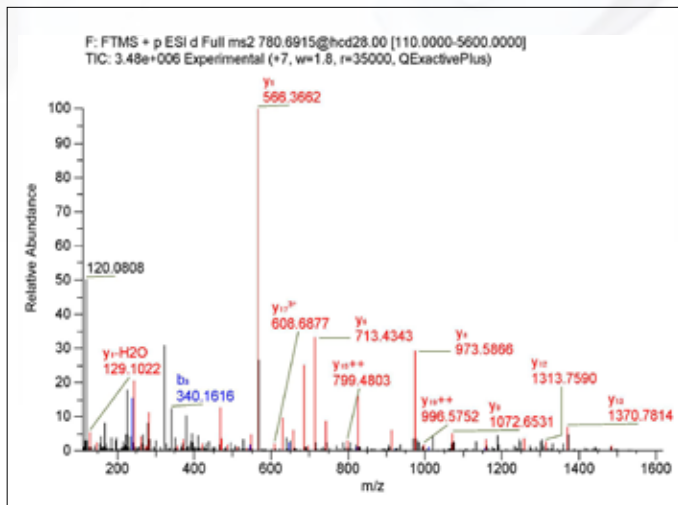
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK



一级质量偏差 0.09 ppm

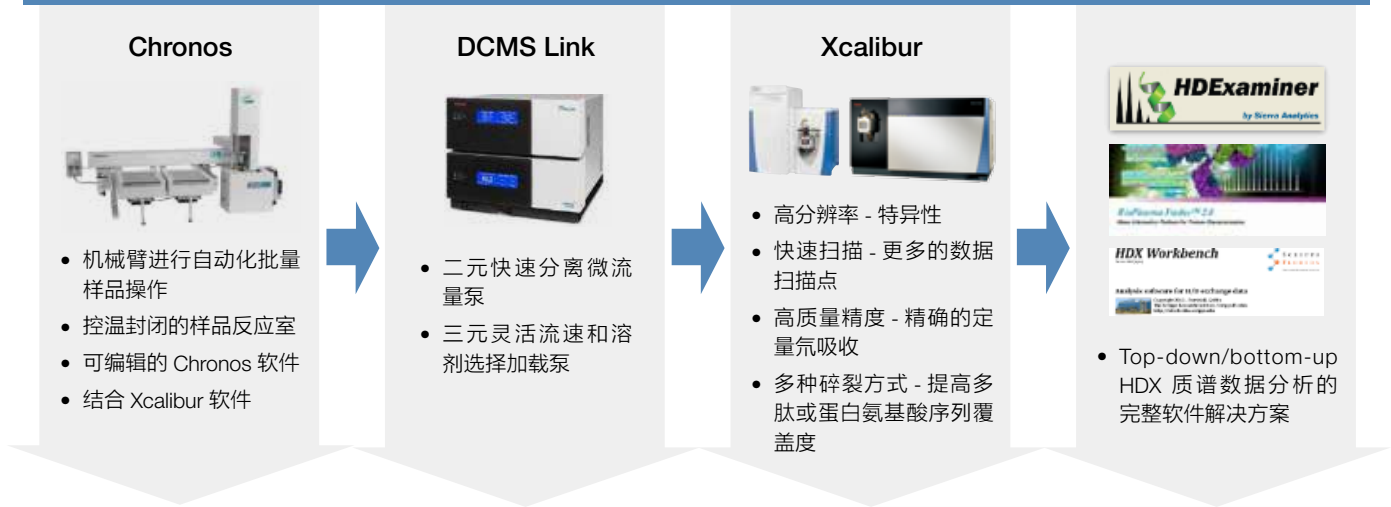


丰富的二级碎片离子



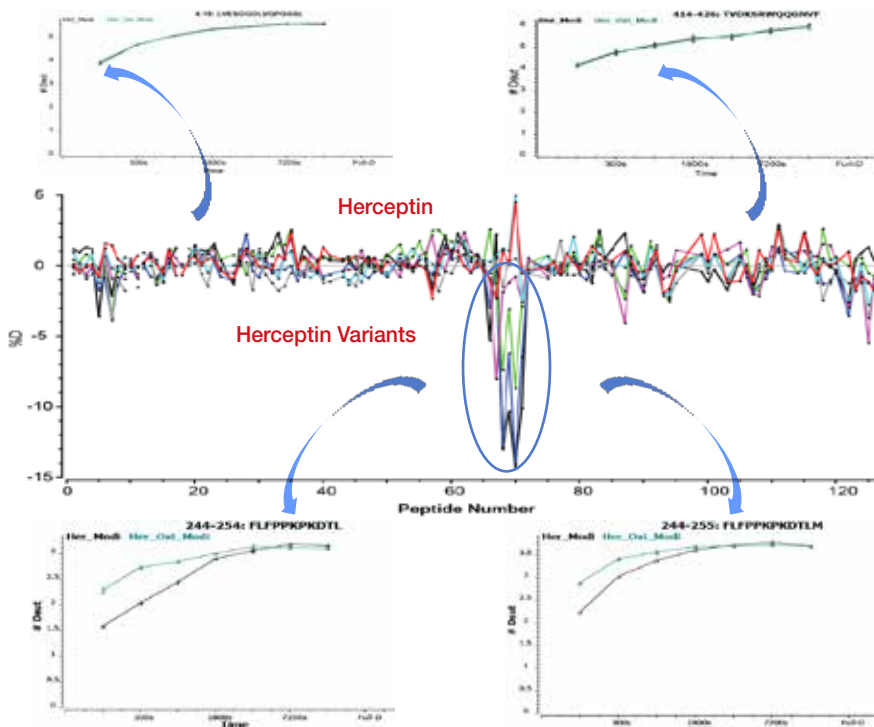
蛋白高级结构解析：氘气交换质谱解决方案

HDX MS workflow解决方案



蛋白质在天然状态下，侧链氨基和骨架上的氢原子是相对不稳定的。当蛋白质溶解在溶液中，蛋白质的氢原子通过会与溶解中的氘原子进行交换。氘气交换质谱（HDX-MS）就是利用了这个现象，将蛋白质中的氢置换成氘水溶液中的氘原子。氘气交换的速率揭示了溶剂中氘原子进入蛋白质特定区域能力的强弱，这个信息能够被用来解释蛋白质的三维结构和构象信息。除此之外，HDX-MS 还能够提供蛋白 - 蛋白或者蛋白 - 受体相互作用位点以及翻译后修饰引导的构象变化信息。

氧化修饰对抗体空间结构的影响

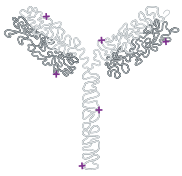


- Her/Her 变异样品大部分区域的氘吸收行为非常相似
- 局部含有氧化的甲硫氨酸，表现出不同的氘吸收动力学
- 当甲硫氨酸的 SCH_3 末端被氧化成 SOCH_3 或 SO_2CH_3 时，它更易于进行溶剂交换

生物制品的纯度和杂质分析

电荷变异体分析

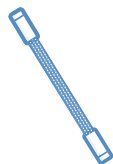
电荷异构体分析是生物治疗蛋白质药物的一项监管要求。这些大的异质分子在生产过程中历经多种酶促翻译后修饰，例如糖基化和Fc段赖氨酸切除。此外，在纯化和储存过程中可发生多种化学修饰，例如氧化和脱酰胺。蛋白质电荷的均一性对蛋白药物结构、稳定性、亲和力和疗效有着非常重要的影响。离子交换电荷异构体分析是一种高分辨率技术，在分析这些异构体时非常有用。ICH Q6B 等法规中规定使用蛋白质电荷异构体图谱分析法。



抗体变异体具有不同的电荷状态，因此可以使用 IEX 根据电荷的差异进行分离。



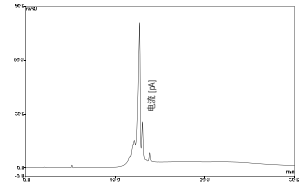
使用缓冲溶液 Kit 使得 pH 梯度方法的建立和完成非常简单。



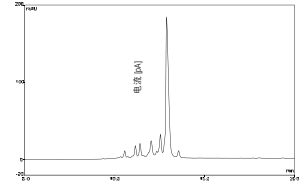
ProPac WCX- 单抗电荷变异体分离金标准。



对于常规高通量离子交换色谱法，无论是一般梯度还是陡梯度，Vanquish Flex UHPLC 系统都能够提供快速、稳定、可靠的服务，并且样品容量是许多 UHPLC 系统的两倍。

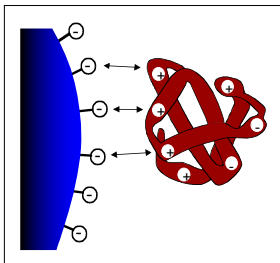


使用 MAbPac SCX-10 时，单克隆抗体的通用线性 pH 梯度分离。

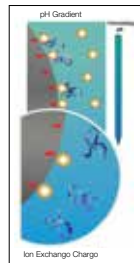


使用 ProPac WCX-10 监测核糖核酸酶脱氨基作用的优化盐梯度。

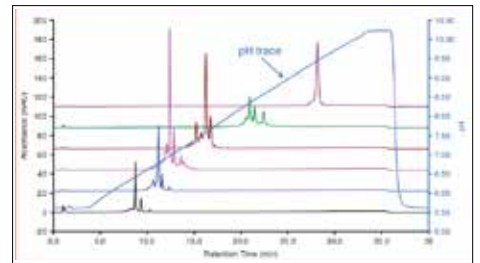
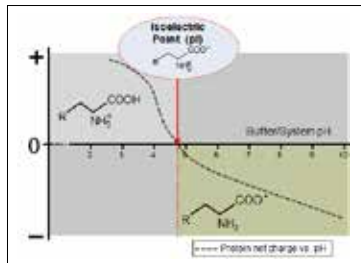
pH- 梯度 用于单抗电荷变异体分析



离子交换色谱

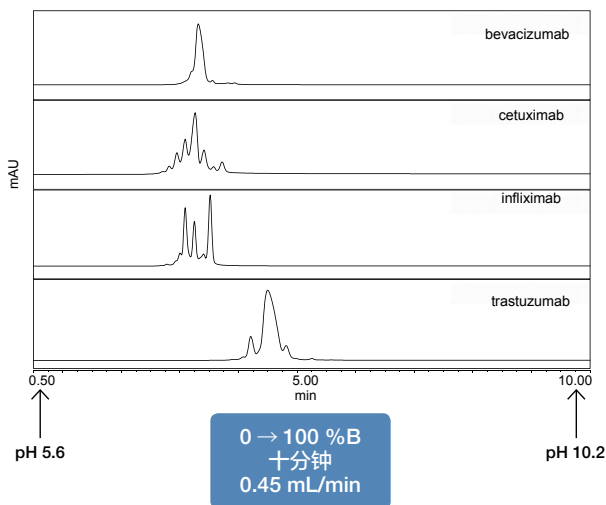


pH 梯度洗脱

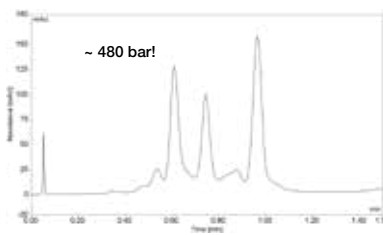


不同 mAbs 电荷变异体分离

使用短柱的 pH- 梯度通用筛选方法



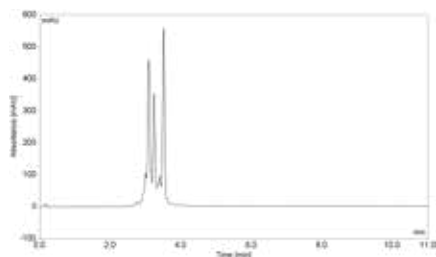
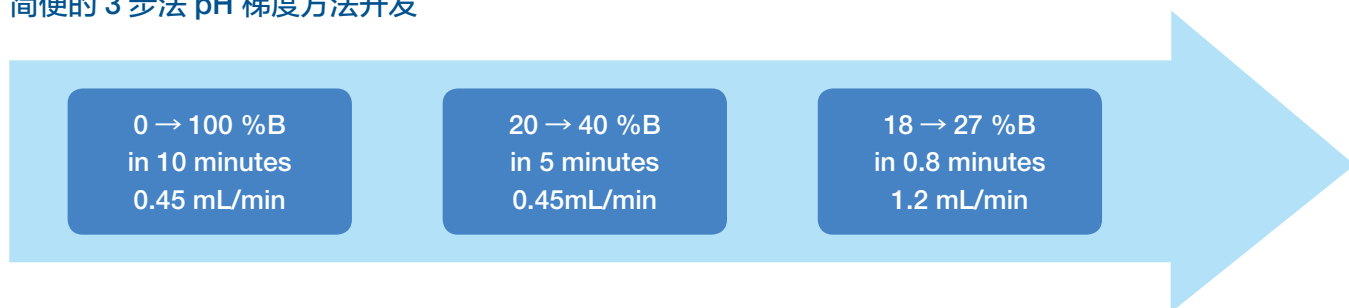
色谱柱： MAbPac SCX-10 RS, 5 μm
规格： 2.1 × 50 mm
pH 梯度： 0% B to 100% B, 10 分钟



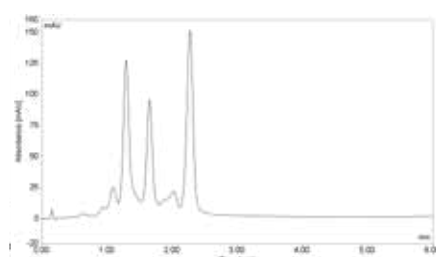
pH = 6.4-6.8

18 → 27 % B
0.8 分钟
1.2 mL/min

简便的 3 步法 pH 梯度方法开发



pH = 5.6-10.2



pH = 6.5-7.4



pH = 6.4-6.8

Antibody: Infliximab

基于 Orbitrap Fusion Lumos 平台的简单快速抗体药物天冬氨酸异构化解析

与小分子药物相比，单抗药物更易在生产、运输和储存的过程中，发生各种翻译后修饰的变化，影响药物分子的稳定性，同时影响蛋白的结构和功能。

由于异构化本身不会引起分子量和电荷的变化，因此大大增加分析的难度。在完整蛋白的水平上，可以使用离子交换和亲和色谱进行天冬氨酸异构化分析，不过对于低丰度的异构化水平就无法准确确定。本方法使用 ThermoFisher 纳升级液相和最新的三合一超高分辨质谱仪 Orbitrap Fusion Lumos，采用 ETD 碎裂方式，建立了天冬氨酸异构化质谱解析方法，可以广泛的应用到常规抗体药物肽段的精细解析中。

通过设置脱酰胺化后修饰和查找包含天冬氨酸异构化的特征碎片离子，在该抗体的酶解肽段中，最终准确鉴定到发生天冬氨酸异构化的肽段有两条，第一条发生天冬氨酸异构化的肽段为 VSVLTVLHQDWLNGK，其中第 14 位的 N 发生了脱酰胺化，并且在过程中，产生了异构化的天冬氨酸；第二条包含异构化位点的肽段为 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK，其中第 14 和第 19 位的 N 发生了脱酰胺化，并且在过程中，第 14 位的天冬酰胺发生了异构化。

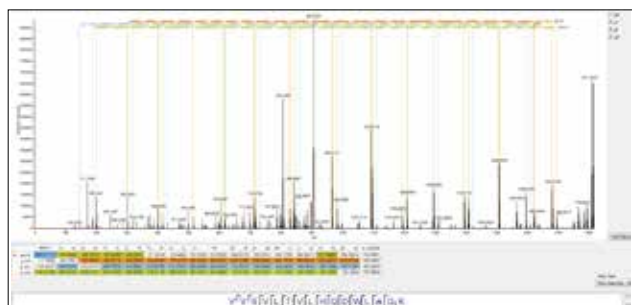


图 1. 肽段 VSVLTVLHQDWLNGK 的二级碎片谱图

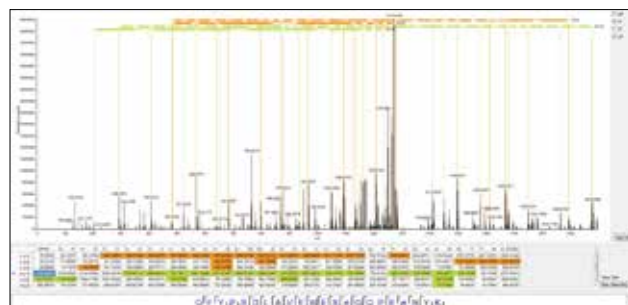


图 2. 肽段 VSVLTVLHQDWLNGK 二级碎裂谱图中 c13 和 c13+57 两个特征碎片离子的放大图

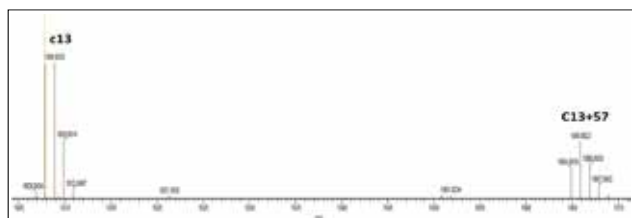


图 3. 肽段 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK 的二级碎片谱图

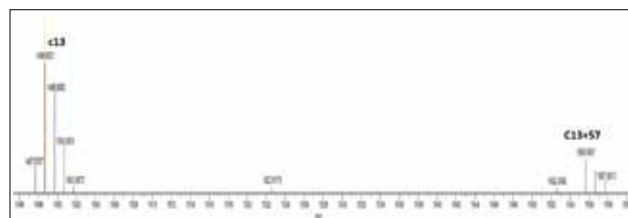
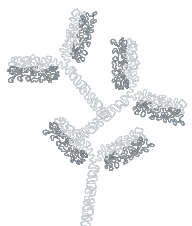


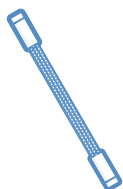
图 4. 肽段 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK 二级碎裂谱图中 c13 和 c13+57 两个特征碎片离子的放大图

聚集体分析

蛋白质聚集是指确定种类的蛋白质分子通过依赖于环境条件的各种途径和共价或非共价相互作用形成可逆或不可逆的非天然结构的寡聚体或多聚体，是蛋白质生物治疗药物开发中的关键挑战之一。其因免疫原性的潜力增加，而成为关键的产品质量问题以及潜在的安全问题，监管机构通常对其聚集度有一定的限制。通常使用配置 UV 检测器（HPLC-UV）或荧光检测器（FLD）的液相色谱测量蛋白质聚集体，其利用主要由存在的色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸产生的一些治疗性蛋白质（例如免疫球蛋白）的天然荧光进行测量。



二聚体、三聚体及更高级结构会影响药物的临床疗效，因为需将其去除，典型的处理方式通常为体积排阻色谱法（SEC）。



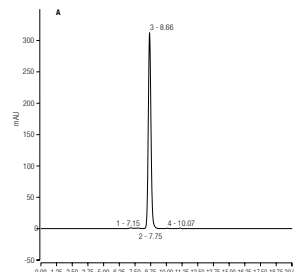
我们推荐的 SEC 色谱柱是 MAbPac SEC-1，该色谱柱采用球形全多孔超纯硅胶填料，粒径通常为 5 μm，多种柱长可选。



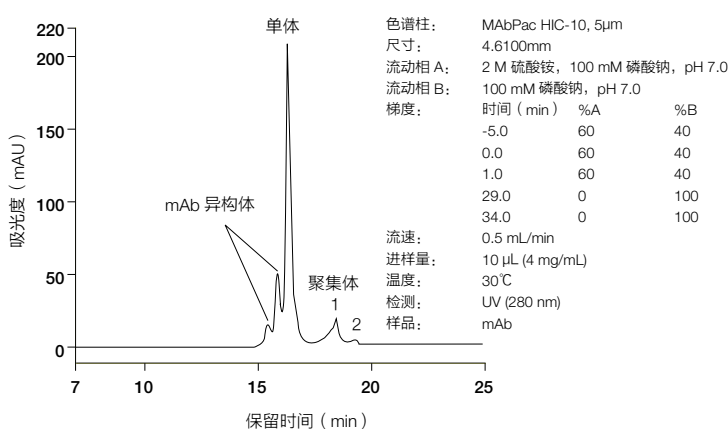
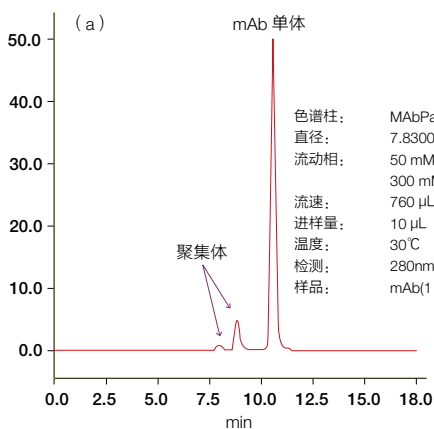
即使在非变性条件下，使用高盐和低盐流动相以及挥发性淋洗液，Vanquish Flex UHPLC 系统仍能提供高灵敏度、高分辨率 SEC。



使用 Thermo Scientific™ Dionex™ Chromeleon™ CDS 让数据管理和报告更加简单、合规。



使用 MAbPac SEC 色谱柱实现对曲妥单抗单体和聚集体的基线分离。



多肽药物杂质分析

多肽药物在合成和储存的过程中，容易形成结构相关杂质，许多结构相关杂质不但没有药物疗效，反而具有一定的毒副作用。欧盟药典规定需对含量在 0.5% 以上的相关结构杂质进行定性分析，对含量在 1% 以上的结构相关杂质进行定量分析并考察其毒副作用，美国药典也有类似规定，因此在多肽药物开发阶段控制杂质的性质及含量至关重要。

双三元液相高通量在线除盐技术与 Orbitrap 高分辨质谱联用进行合成类多肽药物杂质鉴定

胸腺法新的合成方法 主要为固相合成多肽法，合成步骤烦琐，易产生与胸腺法新结构类似的杂质。液质联用技术因其快速、高灵敏度和高专属性分析能力，已经被广泛的应用于药物杂质鉴定，但药典 LC 方法中流动相为硫酸铵缓冲液 - 乙腈条件，硫酸铵缓冲液与质谱不兼容，因此当进行杂质鉴定时，传统方法需对目标杂质峰进行收集、富集、除盐、旋干再鉴定，过程繁琐、且增加了杂质成分降解等不确定影响因素。

赛默飞特色的双三元液相色谱在线多组分中心切割二维除盐方法，可实现一次进样同时完成多组分除盐的目的，电雾式检测器（CAD）作为一种通用型检测器可辅助建立除盐方法，评价除盐效果。在确定了二维除盐条件后，利用 Orbitrap 高分辨质谱的高分辨率、出色的灵敏度、高质量精度等优势性能，实现对未知杂质组分的快速精确鉴定。大大的提升了样品的稳定性和分析效率，本实验结果为多肽药物的质量评价提供重要参考，同时为其纯化工艺和储存条件的优化提供重要的指导。

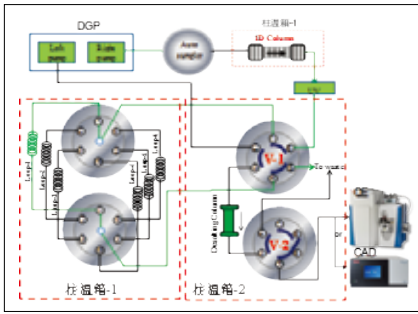


图 1. 全自动在线多中心切割 2DLC 在线除盐系统流程图

NO	Peptide Sequence	Modification	NO	Peptide Sequence	Modification
1	SDAAVD	Acetylation	12	SDAAVDTSSSEITTKDLKEKKE	Acetylation
2	LKEKKEVVEEAEN	None	13	SDAAVDTSSSEITTKDLKEKKEVVEEAEN	Acetylation
3	SDAAVDTS	Acetylation	14	SDAAVDTSSSEITTKD	Acetylation
4	SDAAVDTS	Acetylation	15	SDAAVDTSSSEITTKDLKEKKEVVEEAEN	2x
5	SDAAVD	Acetylation	16	SDAAVDTSSSEITTKDLKEKKEVVEEAEN	None
6	TSSEITTKDLKEKKEVVEEAEN	2x	17	SDAAVDTSSSEITTKDLKEKKEV	Acetylation
7	TSSEITTKDLKEKKEVVEEAEN	None	18	SDAAVDTSSSEITTKDLKEK	Acetylation
8	VDTSSSEITTKDLKEKKEVVEEAEN	None	19	SDAAVDTSSSEITTKDLKEKKEVVEEA	Acetylation
9	AVDTSSSEITTKDLKEKKEVVEEAEN	None	20	DAAVDTSSSEITTKDLKEKKEVVEEAEN	Acetylation
10	AAVDTSSSEITTKDLKEKKEVVEEAEN	2x	21	SDAAVDTSSSEITTKDLK	Acetylation
11	AAVDTSSSEITTKDLKEKKEVVEEAEN	None			

主成分

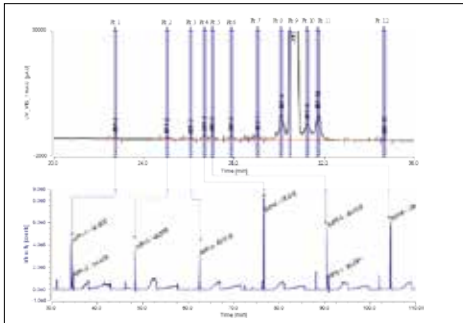


图 2. 样品前 6 个杂质在一维标准方法下的分离谱图 (上图) 及主要目标杂质被切割至第二维在线脱盐后的典型总离子流图 (右图)

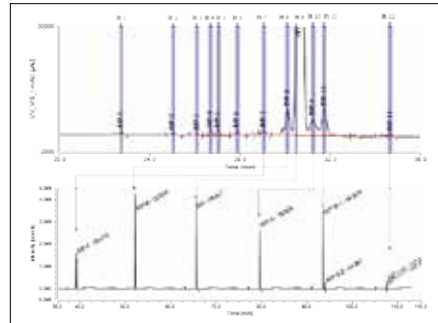


图 3. 样品后 5 个杂质在一维标准方法下的分离谱图 (左图) 及主要目标杂质被切割至第二维在线脱盐后的典型总离子流图 (右图)

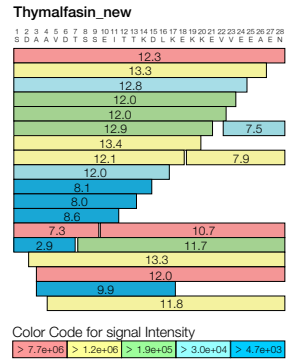
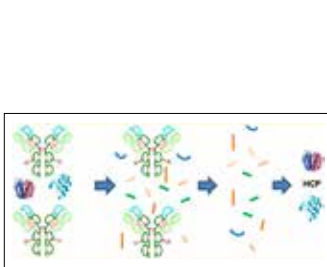
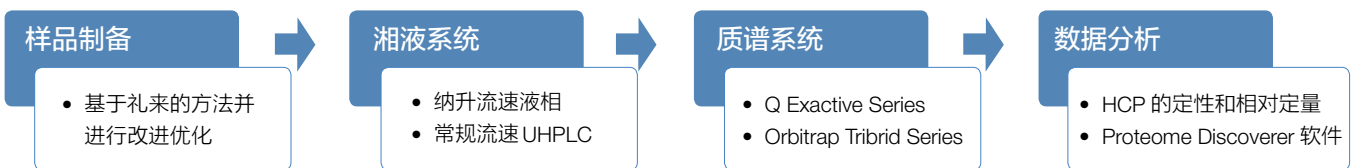


图 4. 将胸腺法新直接进入 LC-MS 分析, 获得其中氨基酸缺失类杂质的定性和相对定量信息

重组蛋白类药物杂质分析

重组蛋白类药物是由遗传修饰的原核或真核宿主细胞培养 / 发酵产生, 在此过程中, 宿主细胞也共同产生与正常细胞功能相关的蛋白质, 由于细胞凋亡 / 死亡 / 裂解, 其他非必需蛋白质也可能释放到细胞培养基 / 发酵液中, 因此残留在终产品中的其他蛋白质即为宿主细胞残留蛋白 (HCPs)。

HCPs 的存在会影响药物的安全性和有效性, 如引起机体免疫反应, 作为佐剂以增强对药物产品的免疫应答, 以及具有蛋白水解活性的 HCPs 影响药物产品的稳定性, 因此生物医药公司不断优化其纯化工艺, 从而控制终产品中 HCPs 的种类和含量。



在短的时间内, 保证主抗体被部分酶解



Ultimate 3000RSnanoLC

- 最灵敏的方案
- 每个 HCP 的定量下限达 0.3ppm(0.03ng/100ug)



UHPLC workflow

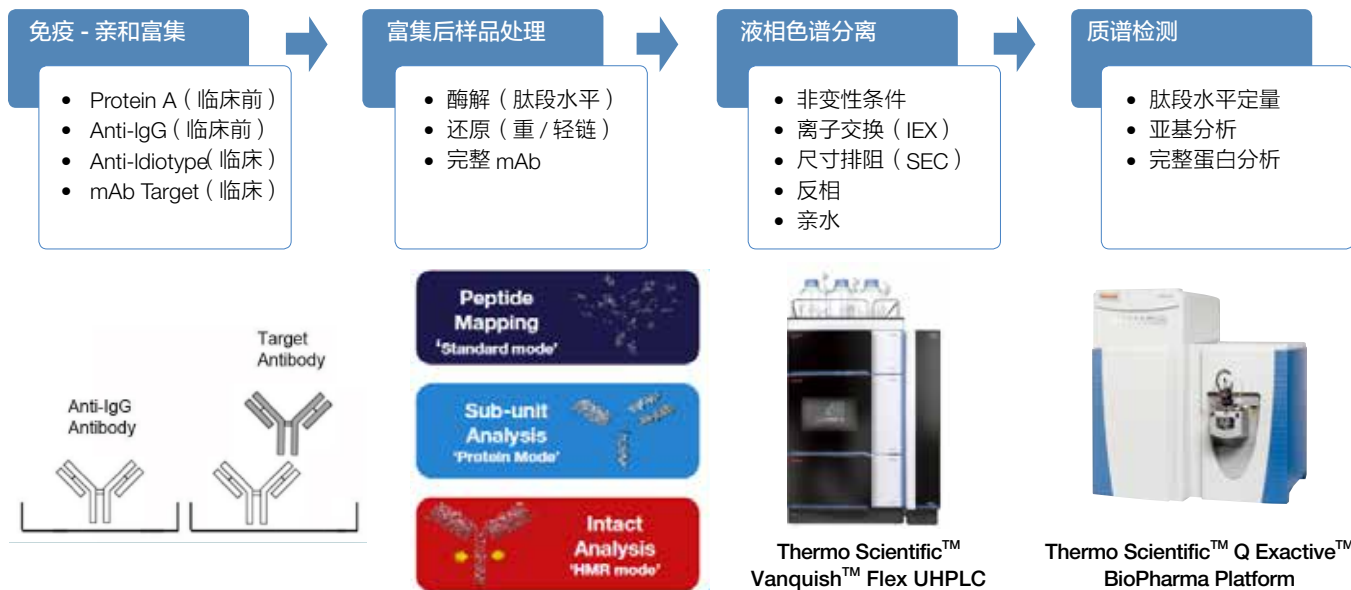
- 通用性最高的方案
- 每个 HCP 的定量下限达 1 ppm (0.1ng/100ug)



复杂蛋白鉴定和定量最强大的软件

生物制品的生物分析

生物分析全流程



MSIA 工作流程



基于 MSIA 的完整蛋白水平全流程



优势

- 监测变异、PTMs 和截断
- 生物转化评估
- 同时定性和定量

捕捉试剂

- 临床前：抗人 Fc 配体
- 临床：抗单抗可变区试剂、抗原
- 注意：选择生物素 - 链霉亲和素作为交联剂

内标选择

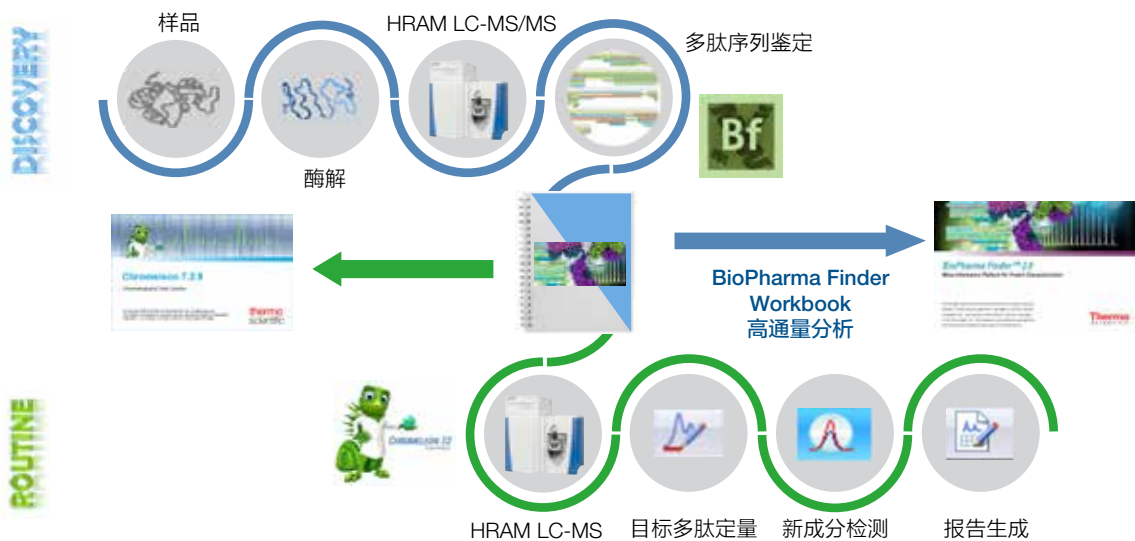
- 临床前：人 IgG Fc 区截断 (有 / 无铰链区)
- 临床：目标单抗 (Fab')₂ 区
- 注意：内标应与 LC 上完整的目标单抗分开

关键质量属性监测 (MAM)

MAM 优势

需要表征、监测的内容	MAM 方法	传统的监测方法
Aggregate Assessment	No	SEC
Deamidation (Isomerization) Assessment	Yes	CEX
Disulfide Isoform Assessment	Maybe	rCE-SDS
Glycation Assessment	Yes	nrCE-SDS
High Mannose Assessment	Yes	HILIC
Methionine Oxidation Assessment	Yes	ID ELISA
Signal Peptide Assessment	Yes	HCP ELISA
Unusual Glycosylation Assessment	Yes	
CDR Tryptophan Degradation Assessment	Yes	
Non-consensus Glycosylation Assessment	Yes	
N-terminal pyroGlutamate Assessment	Yes	
C-terminal Lysine Assessment	Yes	
Galactosylation Assessment	Yes	
Dimer Assessment	No	
Fragmentation (peptide bond) Assessment	Maybe	
Disulfide Reduction (DS Fragmentation) Assessment	Maybe	
Host Cell Protein Assessment	Yes	
Mutations/Misincorporations Assessment	Yes	
Hydroxylysine Assessment	Yes	
Thioether Assessment	Yes	
Trisulfide Assessment	Maybe	
Non-glycosylated Heavy Chain	Yes	
DNA Assessment	No	
Cysteine Adducts Assessment	Maybe	
C-terminal Amidation Assessment	Yes	
CDR Conformers (HIC Isoform) Assessment	No	
O-linked Glycans Assessment	Maybe	
Fucosylation Assessment	Yes	
Residual Protein A	Yes	
Identity	Yes	

MAM 完整工作流程



多质量属性方法工作流程 (HR Multi-Attribute Method, HR MAM) 是一种功能强大的高分辨率高质量精度工作流程, 可实现从研发直至质量控制 (QC) 阶段产品质量属性的全面表征和监控。

HR MAM 流程基于安全、合规的工作环境要求所开发, 由业内领先的硬件、符合法规的软件与专为此流程开发的系统稳定性测试所组成, 监测药物开发过程中每个阶段潜在的关键质量属性 (CQA), 同时能够对未知组分检测 (new peak detection, NPD)。

众所周知, 生物制药开发和制造的最终目标是以最低的成本, 在尽可能短的时间内提供最高质量的产品。随着全新高分辨高质量精度 HR MAM 流程的发布, 生物制药行业科学家现在能够将其取代治疗蛋白质表征和质量控制中许多耗时的分析方法。

传统的分析方法多基于蛋白完整水平, 通常对氨基酸特异性的关键质量属性的定性、定量分析力不从心。HR MAM 的发布, 使得在一个经过验证的工作流程中同时对多种关键质量属性定性、定量、监控并进行未知组分检测成为可能, 并由来自单一供应商的技术专家提供服务与支持。

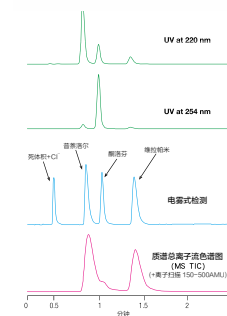
辅料检测

Corona Veo RS 电雾式检测器

Thermo Scientific Dionex Corona Veo RS (快速分离) 电雾式检测器的高采集速率和低峰分散使其超越了简单的 HPLC 应用范围。其比示差 (RI) 检测器或蒸发光散射检测器 (ELSD) 更宽广的动态范围, 意味着在同一次运行中可以测量低含量的杂质和活性药物成分 (API), 可为制药质量控制提供关于有机 API 及其无机反离子的全面配方化学计量信息。依靠独立于结构的响应, 即使不知道峰成分也能够评估相对含量。

- 简单直观的操作
- 与 UHPLC/RSLC 的兼容性
- 轻松切换并联检测器的能力 (例如 MS)
- 能够由挥发性流动相切换至非挥发性流动相而无需将检测器从系统中移除
- 0.01-2.0 mL/min. 的宽广流速范围
- 高达 200 Hz 的数据采集速率, 可捕捉最窄的峰

电雾式检测可用于大分子和小分子、生物分子、添加剂、补充剂、特种化学品和聚合物的分析。它在赋形剂和配方表征、强制降解研究、杂质检测、清洁流程验证或最终产品质量评价方面的表现尤为出众。Corona Veo 系列具有分析型研发需要的灵活性和出色性能, 同时也具有生产 QC/QA 所需的简单性和可重现性。



药用辅料类别及赛默飞分析检测解决方案

辅料分类	功能	常见药用辅料 (2015 版药典收录)	赛默飞色谱及痕量元素分析检测解决方案 辅料分析	辅料中杂质 / 有害物质分析
稀释剂	增加重量和体积, 利于成型和分剂量	淀粉、糊精、蔗糖、乳糖、甘露醇	• 环糊精 (IC) • 甘露醇/乳糖/棕榈酸/脂肪酸(HPLC-CAD)	
缓释剂	使药物有效成分根据需要逐步释放, 保证药效	聚酰胺、聚酯、胶类、空心纤维、甘油酯类	• 甘油酯类TAG和DAG (HPLC-CAD)	
载体(膏体/软膏基质)	乳化作用、药物有效成分的载体 (外用剂)	脂肪醇、棕榈酸、脂肪酸、聚乙二醇	• 脂肪醇/棕榈酸/脂肪酸(HPLC-CAD)	
湿润剂	润湿物料, 以产生足够强度的黏性, 利于制成颗粒	水、乙醇	• 维生素K3中的乙醇、正丁醇 (GC) • 发酵液中的乙醇 (GC)	
溶剂/助溶剂/乳化剂	溶解药物, 易于吸收	注射用水、乙醇、丙二醇、甘油、吐温、二苯酮、	• 水中甘油, 二苯酮, N,N-二甲基甘氨酸 (GC) • 氨茶碱片中的乙二胺 (IC) • 硫酸依替米星中的亚硫酸根 (IC) • 甘氨酸测定 (HPLC) • 哌拉西林中的PEG-400 (HPLC-CAD) • 注射液中的吐温-80 (HPLC-CAD) • 蛋白药物中的吐温-20 (HPLC-CAD) • 非离子型表面活性剂吐温-20,吐温-80和Triton X-100 (HPLC-CAD) • 维生素K3中的乙醇、正丁醇 (GC) • 发酵液中的乙醇 (GC)	• 淀粉中的乙二醇 (IC) • 硫酸铵中的痕量阴离子 (IC) • 乳酸中的乙醇酸 (IC) • 几丁糖中的氯乙酸 (IC) • 棕榈酸中的杂质(HPLC-CAD) • 药用辅料油中的磷脂(HPLC-CAD) • 生物缓冲液中的盐酸胍与氯离子 • 二甲亚砜中的甲醇、二氯甲烷、乙酸乙酯、乙酸以及N,N-二甲基甲酰胺 (GC)
包衣材料	改善片剂外观、增加药物稳定性、掩盖药物不良气味、控制药物释放部位等	丙烯酸树脂、羟丙甲纤维素、聚维酮、纤维醋酸酯	• 三氯蔗糖(HPLC-CAD) • 醋酸羟丙甲纤维素琥珀酸酯中的乙酸、琥珀酸 (HPLC)	• 药典方法溶剂残留 (GC) • 药品中的乙醛和乙酸 (GC)
崩解剂	促进片剂在胃肠液中迅速崩解成小粒子, 易于吸收	干淀粉、羟甲基淀粉钠、交联聚维酮	• 淀粉中的乙二醇 (IC)	• 药品中挥发性物质四氢呋喃、二氧六环、二氯甲烷、乙腈、甲苯、乙醇 (GC)
吸收剂	吸收片剂中的挥发油等液体成分, 保持干燥, 以利于制成片剂	硫酸钙、碳酸氢钙、氧化镁、碳酸钙	• 达替肝素钠中的硫酸根 (IC)	• 生理盐水中的杂质元素 (ICP-MS)
粘合剂	使无黏性或低黏性物料聚集成颗粒	羟丙甲纤维素HPMC、聚维酮PVP、淀粉浆、糖浆	• 2015版药典共聚维酮 (HPLC-UV)	• 药物中的金属元素 (AN 43100, AN 43143, AN 43174, ICP-MS)
润滑剂	使片剂在压片时顺利加料和出片, 减少药品成型中的摩擦力	硬脂酸镁、滑石粉、氢化植物油、聚乙二醇、微粉硅胶	• 哌拉西林中的PEG-400(HPLC-CAD)	• 隐形眼镜护理液中的汞元素 (AN 43141, ICP-MS)
着色剂	改善片剂外观, 便于识别	二氧化钛、日落黄、亚甲蓝、药用氧化铁红	• 饮品中的8种色素 (HPLC)	• 明胶中的铬 (AA)
缓冲剂	维持合适的pH值, 保持主药安全、稳定、有效	盐酸、乳酸、氢氧化钠、枸橼酸、枸橼酸钠; 酒石酸、酒石酸钠	• 头孢唑林中的乳酸和乙酸 (IC) • 三七皂苷冻干粉剂中的阴离子 (IC) • 甘氨酸 (HPLC-UV)	• 化药/鱼油/眼药水中的金属元素 (ICP)
抗氧化剂	延缓药物制剂的氧化	亚硫酸钠、焦亚硫酸钠、硫代硫酸钠	• 注射用绿原酸中的亚硫酸盐 (IC) • 亚硫酸氢钠 (IC) • 甘氨酸 (HPLC)	• 盐酸多西环素中的Pd元素 (ICP)
蛋白保护剂	与金属离子络合, 增强抗氧化效果	氨基酸、EDTA-Na	• 甘氨酸 (HPLC)	• 药物粉末中的Pd及药物溶液中的Cs (ICP)
抗菌剂	防止或抑制病原微生物发育生长	苯酚、苯甲醇、苯扎氯胺、没食子酸	• 苯扎氯胺 (AB 237)/没食子酸/羟苯丁酯/羟苯苄酯 (HPLC)	
等渗调节剂	调整注射液的渗透压, 避免出现生理不适症状, 如刺激、溶血等	氯化钠、葡萄糖	• 丹曲林钠中的钠(HPLC)	

实验室法规要求越来越严格，赛默飞提供从实验室整体运营环境到数据网络化管理、备份和归档的数字化整体解决方案，使科学仪器功能和效率更大化的同时确保实验室高效、合规运行。



先进的色谱数据系统 Chromeleon™ 变色龙软件

Chromeleon 变色龙软件是蜚声全球的色谱数据系统，以简约、智能、法规依从为主要特点，是世界上较早实现智能化、人性化、安全性、审计追踪及电子签名的软件之一；也是世界上第一个支持在企业环境中控制质谱仪器并进行数据处理，同时也能控制所有主流前端色谱技术（GC、LC、IC）的色谱数据系统平台；



…提高生产率

- 利用 eWorkflow，快速实现准确无误的序列设置
- 通过智能启动和智能运行控制（Intelligent Run Control, IRC），提高分析的“一次成功率”
- 借助内置的动态更新和智能工具，实现快速数据处理、查看和报告



…控制您的所有仪器

- 完全控制赛默飞的离子色谱、气相色谱、液相色谱和质谱仪
- 全面控制超过 400 种第三方仪器
- 自定义面板（ePanels），为所有仪器提供一致的界面外观



…确保法规依从性

- 自动化软件和仪器确认程序，确认监测
- 综合性安全工具，确保数据具有最高等级的完整性和可追溯性
- 电子报告和电子签名确保法规（包括 21 CFR Part 11）依从性



…简化管理

- 许可、用户和网络资源的集中管理
- 数据组织和存档
- 在实验室和其它场所之间，通过网络分配资源



…连接您的实验室

- 轻松连接其它实验室软件（例如 LIMS、SDMS）
- 访问 AppsLab，进入我们的分析应用数据库
- 从移动设备上控制仪器和查看数据

您还可以选择：

- 提供简化的开放式访问界面的 Chromeleon XPS Open Access 软件
仅需最少的培训即可允许任意用户运行样品，同时在后台充分使用 Chromeleon 的全部功能。
- 超越了色谱数据系统的 Chromeleon XTR 实验室管理系统软件
全面管理整个实验室，确保遵守流程，保持数据完整性，最终帮助客户实现完全的合规。

赛默飞世尔科技

上海

上海市浦东新区新金桥路27号3,6,7号楼
邮编 201206
电话 021-68654588*2570

生命科学产品和服务业务

上海市长宁区仙霞路99号21-22楼
邮编 200051
电话 021-61453628 / 021-61453637

北京

北京市东城区北三环东路36号环球贸易
中心C座7层/8层
邮编 100013
电话 +86 10 8794 6888

广州

广州国际生物岛寰宇三路36、38号合景
星辉广场北塔204-206单元
邮编 510000
电话 020-82401600

成都

成都市临江西路1号锦江国际大厦1406室
邮编 610041
电话 028-65545388*5300

沈阳

沈阳市沈河区惠工街10号卓越大厦3109室
邮编 110013
电话 024-31096388*3901

武汉

武汉市东湖高新技术开发区高新大道生物园路
生物医药园C8栋5楼
邮编 430075
电话 027-59744988*5401

南京

南京市中央路201号南京国际广场南楼1103室
邮编 210000
电话 021-68654588*2901

西安

西安市高新区科技路38号林凯国际大厦
1006-08单元
邮编 710075
电话 029-84500588*3801

昆明

云南省昆明市五华区三市街6号柏联广场写字
楼908单元
邮编 650021
电话 0871-63118338*7001

欲了解更多信息，请扫描二维码关注我们的微信公众账号

赛默飞世尔科技在全国有共21个办事处。本资料中的信息，说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。



赛默飞
官方微信



赛默飞色谱
与质谱中国

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC