

液相色谱 - 超高分辨质谱用于多糖蛋白结合疫苗中 CDAP 及其相关物质的研究

龙珍 祝翔

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

关键字：CDAP，DMAP，杂质，定量，LCMS

1. 引言

多糖蛋白结合疫苗是疫苗中非常重要的类型^[1]。与多糖疫苗相比，多糖蛋白结合疫苗具有更高的免疫活性和更宽的使用范围。例如，肺炎多糖疫苗仅适用于较大的儿童和老人预防肺炎球菌感染，但将肺炎多糖与破伤风类病毒 / 白喉类病毒 / CRM197 结合生产的肺炎多糖结合疫苗可用于更低年龄儿童（婴幼儿）的免疫接种^[2-4]。虽然，结合疫苗具有优良的性能，但也需要更为复杂的工艺，例如多糖与载体蛋白的结合工艺。常见的结合工艺包括胺还原法、酰胺化反应、二硫键连接反应和异脲键连接反应等^[5]。在这些结合工艺中，多糖活化剂是不可或缺的试剂。例如，异脲键连接反应中使用的多糖活化剂 1- 氰基，4- 二甲氨基吡啶四氟硼酸盐（1-cyano-4-dimethylamino-pyridinium, CDAP）。它可用于脑膜炎球菌结合疫苗、流行性嗜血杆菌结合疫苗、肺炎球菌结合疫苗及 A 族乙型溶血性链球菌疫苗等多糖蛋白结合疫苗的工艺 [6]。CDAP 可以活化多糖，但也具有在碱性条件下容易快速水解的特点（水解成 4- 二甲氨基吡啶（4-dimethylaminopyridine, DMAP），如图 1 所示）。

这些多糖活化剂在后续的多糖蛋白结合疫苗的纯化过程中可以被部分除去，但仍然有少量残留。此外，还有一些多糖活性剂在疫苗生产和保存的过程中不稳定，会降解生产新的化合物。这些残留或转化而来的化合物成为疫苗的杂质存在于疫苗中，可能带来一定的风险。从风险监控的角度，需要 1) 对这些活性剂在生产和保存过程中的变化情况进行研究，阐释其变化机理和转化途径，为疫苗的风险监控提供定性依据；2) 对疫苗终产品中的活性剂相关物质做定量监控，为疫苗的不良反应研究提供定量依据。

本文以异脲键连接反应常用的活性剂 CDAP 为例，讲解多糖活性剂的变化研究。我们以液相色谱超高分辨质谱为基础，研究了不同来源的 CDAP 原料、不同存储介质（水溶液、不同浓度盐酸溶液和不同浓度碱水溶液）和疫苗成品中 CDAP 的转换。

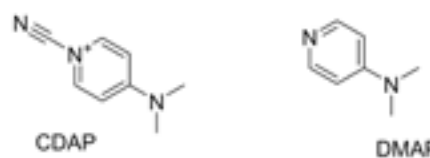


图 1 CDAP 和 DMAP 结构图

2. 实验部分

2.1 样品及前处理

样品编号	样品浓度	处理条件
1	10 mg/mL CDAP 标品 1	用乙腈稀释到 1 ppm 后, 进样分析
2	10 mg/mL CDAP 标品 1	用水稀释到 1 ppm 后, 进样分析
3	10 mg/mL CDAP 标品 2	用乙腈稀释到 1 ppm 后, 进样分析
4	10 mg/mL	取 100 μ L 样品, 加入 2 mol/L 的 NaOH 900 μ L, 室温, 反应 1-2 h/2-3 h / 过夜后, 用水稀释到 1 ppm, 进样分析
5	10 mg/mL	取 100 μ L 样品, 加入 0.2 mol/L 的 NaOH 900 μ L, 室温, 反应 1-2 h/2-3 h / 过夜后, 用水稀释到 1 ppm, 进样分析
6	10 mg/mL	取 100 μ L 样品, 加入 2 mol/L 的 HCl 900 μ L, 室温, 反应 1-2 h/2-3 h / 过夜后, 用水稀释到 1 ppm, 进样分析
7	10 mg/mL	取 100 μ L 样品, 加入 0.2 mol/L 的 HCl 900 μ L, 室温, 反应 1-2 h/2-3 h / 过夜后, 用水稀释到 1 ppm, 进样分析
8	10 mg/mL	取 100 μ L 样品, 加入水 900 μ L, 室温, 反应 1-2 h/2-3 h / 过夜后, 用水稀释到 1 ppm, 进样分析
9	10 mg/mL	取 100 μ L 样品, 加入水 (pH 8-9, 氢氧化钠 0.2 M 稀释 1000 倍), 室温, 反应 1-2 h/2-3 h / 过夜后, 用水稀释到 1 ppm, 进样分析
10	-	厂家 1 样品, 3 kDa 滤膜超滤后, 取滤液用水稀释 10 倍后分析
11	-	厂家 2 样品, 3 kDa 滤膜超滤后, 取滤液用水稀释 10 倍后分析

2.2 仪器

质谱仪器: Orbitrap Exploris 240 (赛默飞世尔科技, 美国);

色谱仪器: Vanquish Flex 液相色谱系统 (赛默飞世尔科技, 美国);

2.3 仪器方法

1) HCP 分析

分析柱: Premier BEH C18 130 \AA 2.1 mm x 100 mm, 1.7 μ m; 柱温: 60 $^{\circ}$ C; 流动相: A: 0.1% FA- 水; B: 0.1% FA- 乙腈; 流速: 0.3 mL/min; 进样体积: 2 μ L;

分析泵梯度:

时间 (min)	B/%
0	0
3	0
5	4
6	90
10.1	0
15	0

DDA 质谱条件:

检测模式	+
喷雾电压	3.8 kV
毛细管温度	320 $^{\circ}$ C
蒸发温度	350 $^{\circ}$ C
鞘气	40
辅助气	10
分辨率设置	一级 60,000@m/z 200; 二级 15,000@m/z 200
扫描范围	m/z 50-250/50 first mass
AGC	一级 300%; 二级 100%
(n)CE	100%
RF Lens	60

PRM 分析条件:

采集离子 m/z 123.0917 和 148.0869, 其余条件同 DDA 分析。

2.4 数据采集及分析

Xcalibur 4.4

Compound Discovery 3.3

3. 结果与讨论

3.1 CDAP 和 DMAP 检测方法的发展

对比图 1A 和 1B 可知，延长梯度时间对 CDAP 和 DMAP 的保留影响不大。对比图 1A 和 1C 以及图 1D 和 1E 可知，降低柱温可以增加 DMAP 的保留，但低柱温容易导致 DMAP 的峰分叉，所以选择 60 °C 作为柱温。由于样品中存在难挥发性盐，为了减少难挥发性盐对目标化合物的抑制和对离子源的影响，需要尽可能增加 CDAP 的保留，然后通过阀切换对比图 1A、1B 和 1E 可知，降低起始有机相可以增加保留，CDAP 最终可以优化到保留时间为 1.15 min 左右，充分平衡色谱柱后，DMAP 保留时间为 2.7 min 左右。但需要注意的是，DMAP 对色谱柱中硅醇基的活性极其敏感，色谱柱经过乙腈水或甲醇水等中性体系冲洗后，再次用甲酸乙腈水体系平衡需要在多针分析后（6 针），DMAP 的保留时间才可以达到稳定。在未充分平衡色谱柱的前 6 针，DMAP 保留时间在 3-5 min 之间（图 1E），随着色谱柱平衡逐渐稳定到 2.7 min。

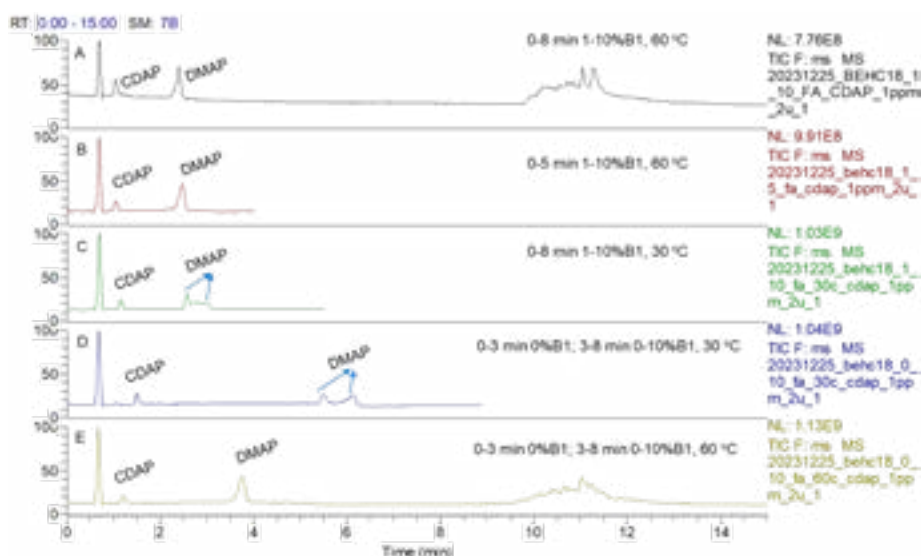


图 2 不同梯度、柱温条件下 CDAP 和 DMAP 的保留

3.2 CDAP 原料的组成分析

无论哪一种介质溶解 CDAP，都会出现 CDAP (148.0866 m/z) 的降解产物 DMAP (123.0914 m/z)。据报道 CDAP 在乙腈溶剂中较为稳定，但本分析发现，即使是乙腈溶解的 CDAP 样品，无论是用 98% 乙腈水分析还是用 100% 乙腈分析，均可检测到 DMAP 的信号。出现该现象的原因可能是：1) CDAP 固体在存放的过程中吸潮后降解，产生 DMAP。2) 溶解样品的乙腈和液相体系中有少量水残留，导致 CDAP 降解，产生 DMAP。

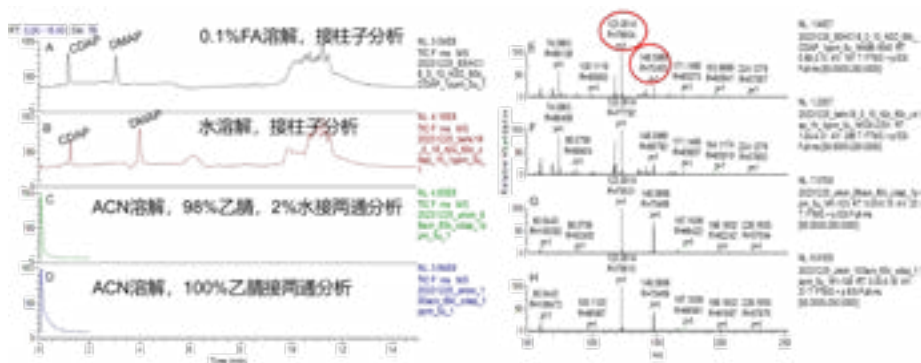


图 3 不同溶解介质和分析条件下 CDAP 原料的分析。左边 A-D 为各种条件的 TIC 图，右边 E-H 为 A-D 对应的 MS 结合一级和二级质谱图，可以对 CDAP 和 DMAP 的结构进行确证。如图 4 所示，因为 CDAP 是季铵类化合物，该化合物在 ESI+ 中不再结合质子，m/z 的理论值与精确质量数相同 (148.0896)。实测 CDAP 的 m/z 为 148.0896，两者相差 0.0 ppm。

如图 5，DMAP 的实测 m/z 与理论 m/z 仅相差 1 ppm（精确到小数点后第三位）。CDAP 和 DMAP 的 m/z 检测能如此准确，是因为 Orbitrap 的高分辨率。分辨率 $R=m/\Delta m$ ，对于特定的组分， m 是固定值，如果仪器的分辨率 R 越高，实测组分的 m/z 与理论值的偏差 Δm 就越小。因此，只有超高分辨率的仪器（OE240 可以提供最高 24 万分辨率），才可能保障待测化合物的精确质量检测。

除了精确的一级质量数，二级碎片是化合物结构分析不可或缺的证据。但 CDAP 和 DMAP 都具有非常稳定的结构，普通的碎裂方式并不能获得足够的二级碎片。Orbitrap 的 HCD 碎裂相对于 CID 碎裂具有更高的碎裂效率，再加上 Orbitrap 的高分辨率和高灵敏度，可以实现 CDAP 和 DMAP 丰富且精确质量的二级碎片获取（图 4 和 5）。

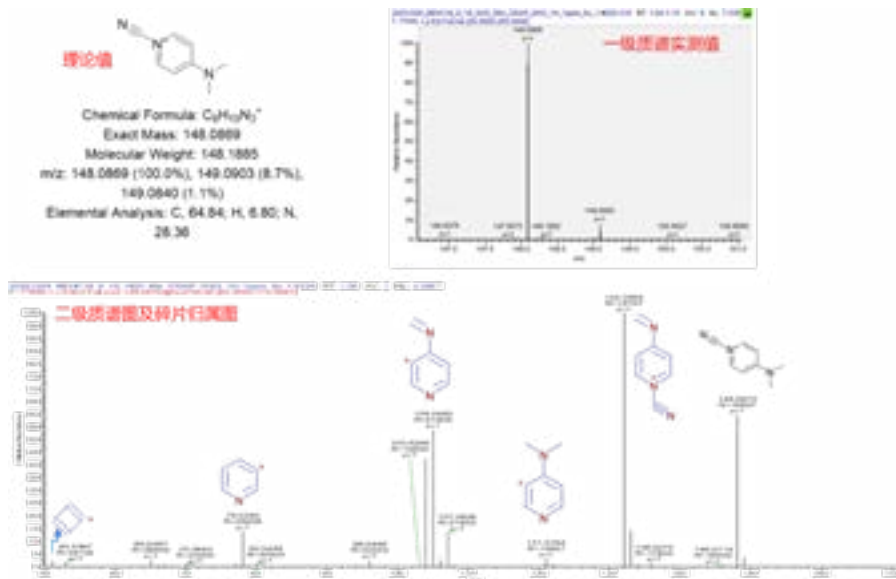


图 4 CDAP 的理论分子量、一级质量数和二级碎片归属图。

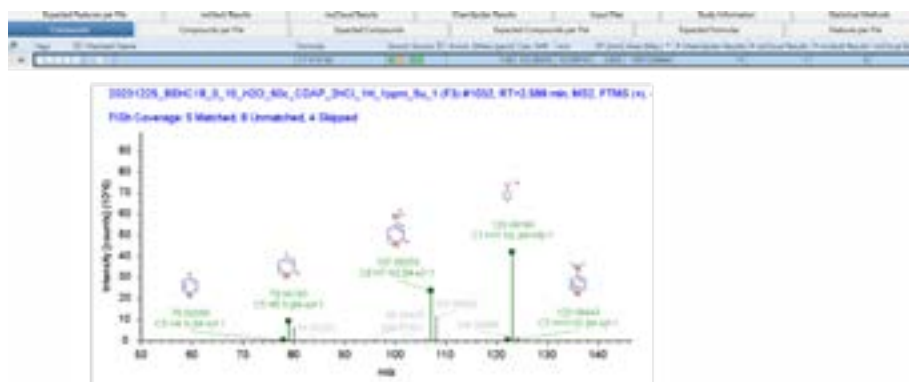


图 5 DMAP 的理论分子量、一级质量数和二级碎片归属图。

除了 CDAP 降解的 DMAP。我们在两种来源的 CDAP 原料中均发现了 m/z 为 190.1086 的未知杂质（图 6），该杂质在所有酸性和弱碱性（pH 9）溶液处理的样品中均可以检测到（图 8A、D-F），但强碱性溶液处理的样品中没有该组分的检出（图 8B、C）。CD 软件获得该组分的分子式为 $C_9H_{12}N_5$ （如果该化合物为季铵）/ $C_9H_{11}N_5$ （如果该化合物为叔胺）。通过该化合物的二级碎片与 CDAP 和 DMAP 的二级碎片比对，推测该化合物是 CDAP 的相关杂质。因为该化合物存在 123.0919 和 107.0606，推测它具有 DMAP 相同的结构。除去 DMAP 结构，N 杂环区域最可能结合基团的位置为 N 的位置。既要保留 DMAP 相似的结构，又要结合基团，N 最有可能以季铵形式存在。通过分子式的差减和不饱和度的计算，推测该化合物结构如图 7 所示。将该结构导入 CD 软件并做 Fish 分析，可归属二级碎片如图 7 所示。由于不清楚该化合物的毒性和活性，需要严格监测该化合物在疫苗成品中的存在。

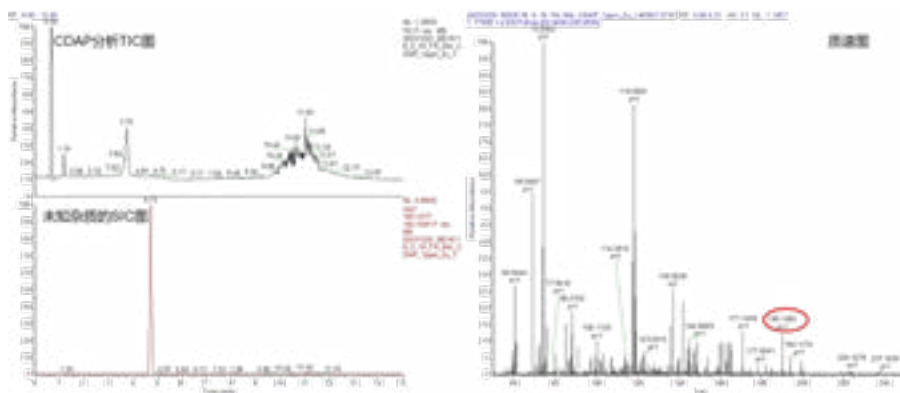


图 6 CDAP 原料的 TIC 图、未知杂质 (m/z 190.1087) 的 SIC 图和相应的质谱图。



图 7 未知杂质可能的结构和二级碎片归属

3.3 CDAP 在各反应介质中的转换

本节考察了 CDAP 在三种酸性条件 (0.1%FA、0.2M HCl 和 2 M HCl) 以及三种碱性条件 (pH9 左右的氢氧化钠溶液、0.2M 氢氧化钠和 2 M 氢氧化钠) 中存放 1-2 小时后的存在形式。从图 8A、8E 和 8F 可知, 无论哪种酸性条件, CDAP 都不能在 1-2 小时内完全降解成 DMAP。但在浓度较大的碱性条件 (0.2 M 氢氧化钠或更高浓度), CDAP 会快速且完全转化成 DMAP。在 pH 为 9 的碱性溶液中, 1-2 小时并不能使得 CDAP 完全完成转化。

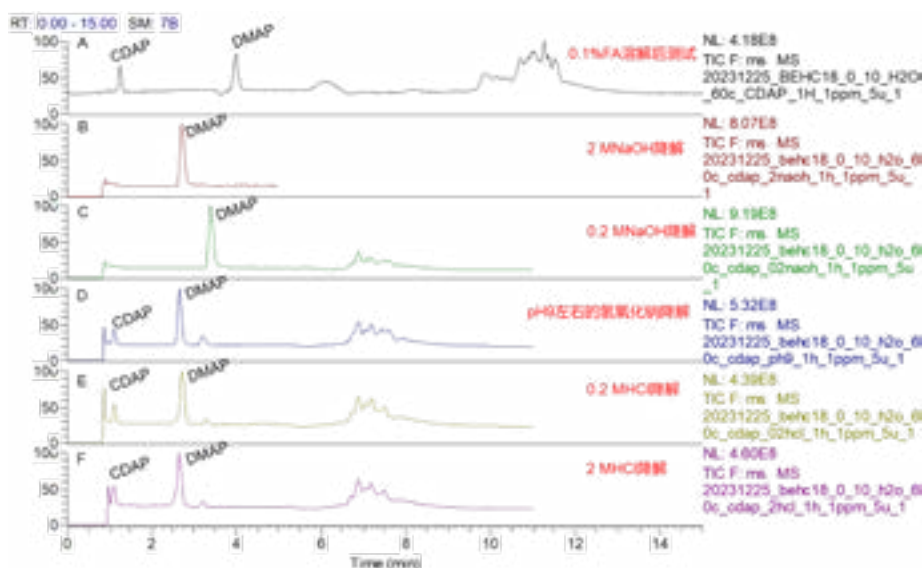


图 8 不同介质中存放 1-2 小时后, CDAP 样品的 TIC 图

为了提高目标化合物的检测灵敏度, 除了 DDA 检测以外, 随着样品的反应时间增加, 我们开始采用 PRM 的形式检测各样品中 CDAP 和 DMAP 两种化合物。如图 9 所示, 即使在灵敏度更高的 PRM 模式下, CDAP 在 0.2 M 或更高浓度氢氧化钠中存放 2-3 小时后也难以检测到其原形, 说明 CDAP 在该条件下已完全转换成了 DMAP。但在 pH 为 9 的氢氧化钠溶液溶解的 CDAP 样品中, CDAP 原形还能被检测到。

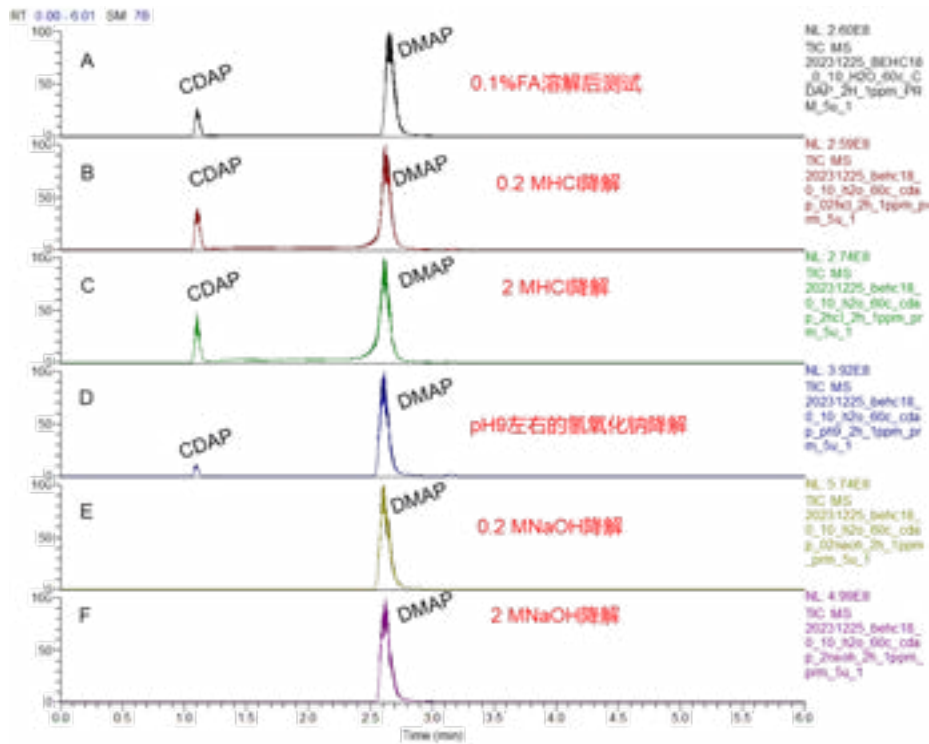


图 9 不同介质中存放 2-3 小时后，CDAP 样品的 PRM 图

CDAP 样品过夜放置后（图 10），酸性降解的样品中，CDAP 仍然可以被检测到，但 CDAP 与 DMAP 的峰强度比值降低，表明即使在酸性条件下，CDAP 也在缓慢降解。过夜反应后，pH9 左右的溶剂溶解的 CDAP 样品中，已经难以检测到 CDAP 的信号。

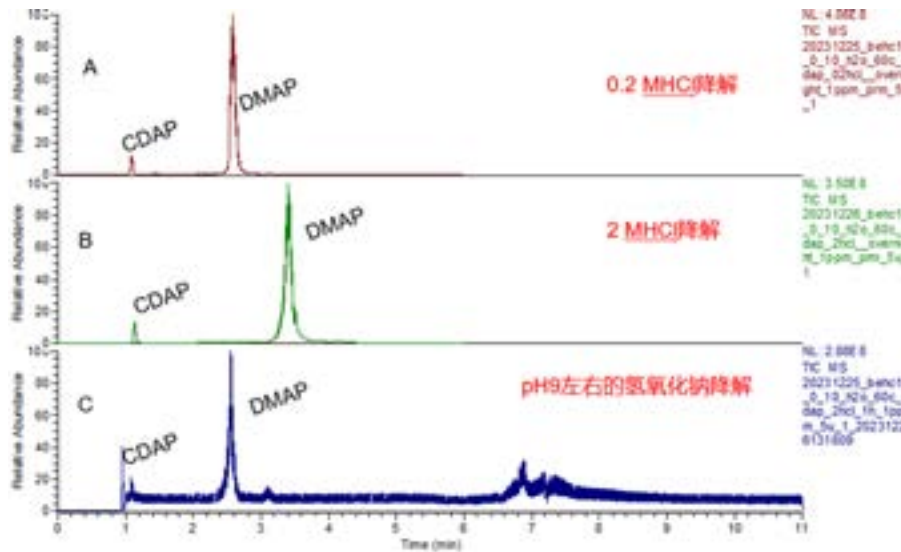


图 10 不同介质中存放过夜后，CDAP 样品的 PRM 图

3.4 肺炎多糖结合疫苗中 CDAP 和未知杂质的检测

本节用 DDA 和 PRM 两种形式检测了来自两个厂家的结合疫苗中 CDAP 及其相关物质的检测。两个厂家的样品中均没有 CDAP 和未知杂质 (m/z 190.1086) 的检出。厂家 1 在液相方法和 DDA 分析中均看不到明显的 DMAP 的信号，但在 PRM 分析和 DDA 峰提取分析中，可以检测到信噪比较高的 DMAP 信号，表明该方法相对于传统的 DMAP 方法具有更高的灵敏度，可以用于更严格的产品质量评价。

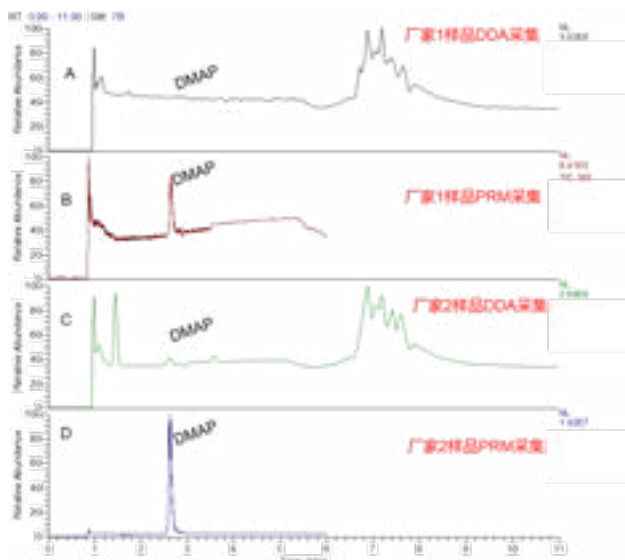


图 11 DDA 和 PRM 检测厂家 1 和 2 中 CDAP 及相关物质

结论

本文以 Orbitrap 超高分辨质谱平台和 CD 软件为基础，发展了 CDAP 及其相关化合物的检测方法，并将该方法用于 CDAP 原料、CDAP 转化条件以及多糖蛋白结合疫苗中 CDAP 及其转化产物的检测。由于 Orbitrap 超高的分辨率和极高的灵敏度，可以实现 CDAP 及其转化产物的精准分子量检测、疫苗产品中微量转化产物的检测，以及 CDAP 原料中未知杂质的检测。HCD 的高能碎裂，为 CDAP、DMAP 及未知杂质的结构确定提供了丰富的碎片，结合 Orbitrap 超高分辨率带来的一级和二级精准质量数，可实现相关化合物的准确检测。在转化条件的研究中，本文系统研究了常见的酸性和碱性条件，再次验证 CDAP 在碱性条件极不稳定的特点，但也发现在酸性条件下该化合物降解更为缓慢。同时，也发现 CDAP 的原料可能在保存过程中吸潮也会导致原料的降解。

参考文献

- [1] F. Berti, M.R. Romano, F. Micoli, R. Adamo, Carbohydrate based meningococcal vaccines: past and present overview, 38 (2021) 401-409.
- [2] D.E. Shafer, B. Toll, R.F. Schuman, B.L. Nelson, J.J. Mond, A. Lees, Activation of soluble polysaccharides with 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate (CDAP) for use in protein-polysaccharide conjugate vaccines and immunological reagents. II. Selective crosslinking of proteins to CDAP-activated polysaccharides, Vaccine, 18 (2000) 1273-1281.
- [3] Whitney et al. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. N Engl J Med 2003;348:1737-46, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 112 (2003) 1256.
- [4] C.G. Grijalva, J.P. Nuorti, P.G. Arbogast, S.W. Martin, K.M. Edwards, M.R. Griffin, Decline in pneumonia admissions after routine childhood immunisation with pneumococcal conjugate vaccine in the USA: a time-series analysis, The Lancet, 369 (2007) 1179-1186.
- [5] 王玺, 沈荣, 多糖 - 蛋白结合疫苗的结合化学与检测方法, 中国生物制品学杂志, 21 (2008) 913-916.
- [6] 董威, 袁军, 李红, 陈煜, 刘昊智, 李津, 庄再成, 吴克, 多糖活化剂 1-氰基, 4-2 甲氨基吡啶四氟硼酸盐降解产物的结构分析, 中国生物制品学杂志, 34 (2021) 152-154.



赛默飞
官方微信

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

thermo scientific