(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 1973202 B
(45)授权公告日 2011.05.04

(21)申请号 200580021186.8

(22)申请日 2005.05.20

(30)优先权数据
0411283.5 2004.05.20 GB
0420649.6 2004.09.16 GB

(85)PCT申请进入国家阶段日
2006.12.25

(86)PCT申请的申请数据
PCT/IB2005/001772 2005.05.20

(87)PCT申请的公布数据
WO2005/114171 EN 2005.12.01

(73)专利权人 启龙有限公司
地址 意大利锡耶纳

(72)发明人 D·普罗蒂 A·巴多蒂 S·里奇

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
代理人 范征

(51)Int.Cl.
G01N 30/78(2006.01)
G01N 30/74(2006.01)
G01N 30/64(2006.01)

(56)对比文件
CN 1410769 A,2003.04.16, 全文.
JP 11-51922 A,1999.02.26, 说明书第[0008],[0012]段.
US 2003062475 A1,2003.04.03, 全文.
KOTANI NOIHIRO ET AL.Analysis of 2-aminobenzamide-labeled oligosaccharides byhigh-pH anion-exchange chromatography with fluorometricdetection.ANALYTICAL BIOCHEMISTRY264 1.1998,264(1),66-73.
BARDOTTI A A ET AL.Quantitative determination of saccharide in haemophilusinfluenzae type b glycoconjugate vaccines, alone and incombination with DPT, by use of high-performanceanion-exchange chromatography with pulsed amperometricdetection.VACCINE18 19.2000,18(19),1982-1993.

审查员 孙春梅

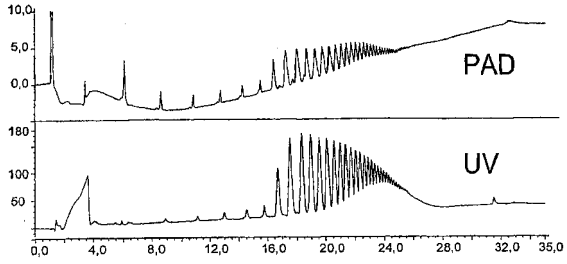
权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 9 页

(54)发明名称

液体色谱洗出液的分析

(57)摘要

当通过HPAEC分析糖类时,通常用电流检测器分析柱洗出液。根据本发明,电流检测与紫外检测两种方法结合用于洗出液。因此,本发明提供了一种分析液相色谱柱的流出液的方法,其中,洗出液同时用(a)电流检测和(b)紫外检测进行分析。用这两种检测类型得出的信息优于任何一种检测方法单独得出的信息。



CN 1973202 B

1. 一种检测样品中糖类分析物的方法，所述方法包括以下步骤：(a) 将样品施加到阴离子交换色谱柱，以使样品中的分析物结合该柱；(b) 从该柱洗脱分析物，所述洗脱用含有选自硝酸根离子和氯离子的离子且不含乙酸根和氢氧根的洗脱液进行；和 (c) 用电流分析法和光谱法分析洗出液。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述阴离子交换色谱柱是高效阴离子交换色谱 (HPAEC) 柱。

3. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，采用脉冲电流检测 (PAD)。

4. 如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，采用脉冲电流检测 (PAD)。

5. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，采用紫外 (UV) 吸收光谱法和 / 或可见光吸收光谱法。

6. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述洗出液包含细菌荚膜糖或细菌荚膜糖的含糖片段。

7. 如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述洗出液包含细菌荚膜糖或细菌荚膜糖的含糖片段。

8. 如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述洗出液包含细菌荚膜糖或细菌荚膜糖的含糖片段。

9. 如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述洗出液包含细菌荚膜糖或细菌荚膜糖的含糖片段。

10. 如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述洗出液包含细菌荚膜糖或细菌荚膜糖的含糖片段。

11. 如权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述细菌荚膜糖来自脑膜炎奈瑟球菌、肺炎链球菌、无乳链球菌、铜绿假单胞菌或金黄色葡萄球菌。

12. 如权利要求 7 所述的方法，其特征在于，所述细菌荚膜糖来自脑膜炎奈瑟球菌、肺炎链球菌、无乳链球菌、铜绿假单胞菌或金黄色葡萄球菌。

13. 如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述细菌荚膜糖来自脑膜炎奈瑟球菌、肺炎链球菌、无乳链球菌、铜绿假单胞菌或金黄色葡萄球菌。

14. 如权利要求 9 所述的方法，其特征在于，所述细菌荚膜糖来自脑膜炎奈瑟球菌、肺炎链球菌、无乳链球菌、铜绿假单胞菌或金黄色葡萄球菌。

15. 如权利要求 10 所述的方法，其特征在于，所述细菌荚膜糖来自脑膜炎奈瑟球菌、肺炎链球菌、无乳链球菌、铜绿假单胞菌或金黄色葡萄球菌。

16. 如前述权利要求中任一项所述的方法，其特征在于，所述色谱法用容量小于 50 μ eq 的柱进行。

17. 如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，所述方法采用氢氧化物选择性阴离子交换色谱柱。

18. 一种分析样品中糖类分析物的设备，其特征在于，所述设备包括：(i) 阴离子交换色谱柱，(ii) 含有选自硝酸根离子和氯离子的离子且不含乙酸根和氢氧根的洗脱液，(iii) 电流检测器，和 (iv) 光谱检测器，其中的两个检测器用来接收柱洗出液。

19. 如权利要求 9 所述的设备，其特征在于，所述阴离子交换色谱柱是 HPAEC 柱。

20. 如权利要求 18 或 19 所述的设备，其特征在于，所述电流检测器是 PAD。

21. 如权利要求 18 所述的设备，其特征在于，所述光谱检测器是 UV 检测器。

液体色谱洗出液的分析

[0001] 本文所引用的所有文件全文纳入作为参考。

技术领域

[0002] 本发明涉及糖类的分析领域。

背景技术

[0003] 含有与载体蛋白相偶联的荚膜糖的免疫原为本领域所熟知。这种偶联将不依赖于T细胞的抗原转化为T细胞依赖性抗原，从而提高了记忆应答并产生保护性免疫力，原型偶联物疫苗用于b型流感嗜血杆菌(Hib)[例如，参见参考文献1的第14章]。自Hib疫苗以来，开发了保护性的抗脑膜炎奈瑟球菌(Neisseria meningitidis)(脑膜炎球菌)和肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)(肺炎球菌)的偶联糖疫苗。感兴趣的偶联疫苗涉及的其它微生物有无乳链球菌(Streptococcus agalactiae)(B族链球菌)、铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)和金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)。

[0004] 当疫苗和其它生物制品中含有糖类时，之后的调节通常取决于它们的特性。用于糖类定型的常规技术是阴离子色谱法，尤其是高效阴离子交换色谱(HPAEC)，它通常带有脉冲电流检测(PAD)[2,1]。合适的HPAEC-PAD系统由Dionex™ Corporation(Sunnyvale，CA)提供，例如BioLC™系统。这些系统可定量分析混合物中的各种糖类，不需要进行衍生化(derivatisation)或预分析分离，且混合糖的分析可用于表征糖类。

[0005] 当分析糖类时，HPAEC柱的洗出液通常用脉冲电流检测器(PAD)分析，即检测是基于电流的。在合适的(高)pH时，通过施加正电势可在电极表面电催化氧化碳水化合物。用这种方法产生的电流与碳水化合物浓度成比例，从而可通过电流分析法检测并量化碳水化合物。与简单的电流检测相比，PAD技术在标准检测电势中加入了清除电势和再生电势的短脉冲，从而避免了分析物的氧化产物污染电极带来的问题。除了用于HPAEC分析，PAD也可用于分析HP阳离子交换色谱[2]和其它HPLC分离。

[0006] 为获得其它分析信息，尤其是当处理无电流分析活性的化合物和具有化学修饰的化合物时，发明人决定通过光谱方法分析洗出液。不幸的是，HPAEC分析荚膜糖时采用的高pH使洗出液中出现了氢氧化物离子，而这些离子的高吸收(尤其在紫外区域)使加入光谱分析变得不容易。用微膜化学抑制剂装置能除去氢氧化物离子，但通常用作洗脱荚膜糖的‘推进剂’(pushing agent)的乙酸盐会被抑制剂转变成高吸收剂乙酸，因此会带来新的问题。

[0007] 本发明的一个目的是提供另一种改进的用阴离子色谱法表征糖类的方法和系统。具体地说，其目的是克服由于存在氢氧化物离子或在氢氧化物离子被转化后存在乙酸而造成的对洗出液进行光谱分析中的困难。

[0008] 发明概述

[0009] 为克服使用氢氧化物/乙酸盐-基洗脱液造成的这些困难，发明人采用了两种方法。首先，他们选择使用不需要乙酸盐推进剂的较弱的阴离子交换载体。这种柱目前不被

用于分析碳水化合物，而更常见用于分析大量无机酸和有机酸阴离子 [3]。其次，他们选择使用具有低光谱吸收的推进剂。这两种方法都能使光谱检测与 PAD 检测相结合。此外，它们还与常规 HPAEC-PAD 法兼容，并且即便当不需要光谱检测时它们也是有利的，尤其是它们能更好地分辨长链寡糖。

[0010] 因此，根据本发明的第一个方面，电流检测与光谱检测偶联，使得能使用这两种方法。因此，本发明提供了一种分析液相色谱柱的洗出液的方法，其中所述洗出液用电流分析法和光谱法分析。本发明还提供了一种分析样品的设备，其中所述设备包括 :(i) 液相色谱柱，(ii) 电流检测器，和 (iii) 光谱检测器，其中的两个检测器用来接收柱洗出液。

[0011] 曾报道了单独使用 PAD 或 UV 检测来分析 HPAEC 柱的流出液 [4]，但同时使用电流和光谱技术来分析同一种流出液是新的。使用这两种检测得出的信息优于任何一种检测方法单独得出的信息，例如可见图 1，一些峰在 UV 中的动态范围好于 PAD，而一些峰在 PAD 中好于 UV。

[0012] 在第二个方面，本发明还提供了一种从阴离子交换色谱柱洗脱荚膜糖分析物的方法，其中的分析物用含有除乙酸根和氢氧根之外的阴离子的洗脱液洗脱。所述洗脱液宜含有选自下组的阴离子 :硝酸根、氯离子、碳酸根和硼酸根。也可使用这些阴离子的钠盐。当洗脱液呈碱性时 (例如，pH ＞ 9) 该方法特别有用，如果使用氢氧化物离子的化学抑制剂则更有效，且这样可以更好地分辨长链寡糖。此外，该方法特别适用于分析乙酰化的糖类。

[0013] 在第三个方面，本发明还提供了一种通过阴离子交换色谱法分析糖类的方法，其中的色谱法用容量小于 50 μ eq(例如≤ 40 μ eq、≤ 30 μ eq、≤ 20 μ eq 等) 的柱进行。使用低容量柱能快速洗脱且无需使用推进剂。这样不用生成乙酸就能使用氢氧化物抑制。通常将使用不含乙酸盐的氢氧化物洗脱液，避免乙酸根离子对于分析乙酰化的糖类特别有用。低容量柱能更好地分辨长链寡糖。

[0014] 一起使用本发明的第二和第三方面是有利的，即本发明提供了一种通过阴离子交换色谱法分析荚膜糖分析物的方法，其中的色谱法用容量低于 50 μ eq 的柱进行，且其中从柱的洗脱用含有选自硝酸根离子和氯离子的离子的洗脱液进行。

[0015] 本发明还提供了本发明色谱方法的洗出液。本发明还提供了一种含有用本发明方法分析的物质作为活性成分的药物。具体地说，本发明提供了一种免疫原性组合物，如疫苗，该组合物含有用本发明方法分析的细菌荚膜糖。

[0016] 液相色谱柱

[0017] 本发明的第一方面用来分析液相色谱柱的流出液。该方面可用于各种液相色谱柱，但特别适用于高效液相色谱 (HPLC)。本发明特别适用于分析用高效阴离子交换色谱 (HPAEC) 或高效阳离子交换色谱 (HPCEC) 分离的结果。

[0018] 优选的柱是那些自发保留糖类的柱，这样就需要从柱上洗脱下糖类。从色谱柱上洗脱可以是等度洗脱或梯度洗脱。含有氢氧化钠和 / 或乙酸钠的洗脱液是糖类的 HPAEC-PAD 分析中通常使用的洗脱液。然而在本发明的第二个方面，使用了硝酸盐和 / 或氯盐洗脱液 (通常为钠盐)，通常基本上不存在任何乙酸盐洗脱液。为从阴离子交换柱上洗脱分析物，洗脱液通常呈碱性，例如可使用 pH ＞ 8、＞ 9、＞ 10、＞ 11、＞ 12、＞ 13 等的氢氧化物盐 (例如 NaOH) 以达到所需 pH，且氢氧化物离子通常被用于阴离子交换洗脱液。

[0019] 洗出液可进行化学抑制氢氧化物离子，尤其是当氢氧化物离子与使用的分析检测

技术相互干扰时。通常可使用微膜 (micromembrane) 抑制剂，如 Dionex™ 的 MMS 产品。‘MMS III’产品采用连续化学抑制以提高分析物的电导率同时降低洗脱液的电导率，并能在使用等度洗脱或宽浓度范围内的梯度洗脱进行离子交换时直接进行电导率检测。当洗脱液中含有乙酸根离子及产生的乙酸干扰所用分析检测技术时宜避免使用从乙酸根离子产生乙酸的抑制剂。

[0020] 用于本发明第一和第二方面的优选的 HPAEC 柱是 Dionex 牌的“CarboPac”柱，如 PA1[10μm 直径聚苯乙烯基质，2％与二乙烯基苯交联，与 500nm MicroBead 季铵官能化乳胶团聚 (5％交联)]、PA100、PA20、PA10[10μm 直径乙基乙烯基苯基质，55％与二乙烯基苯交联，与 460nm MicroBead 双官能季铵离子团聚 (5％交联)]、PA200 或 MA1 柱。优选的 HPCEC 柱是同为 Dionex 牌的“IonPac”柱，包括 CS10 柱。

[0021] 作为使用液相色谱法的一个替代，本发明的第一个方面也可用来分析毛细管电泳分离系统例如 Beckman-Coulter P/ACE 系统的流出液。

[0022] 本发明的第三方面是离子容量小于 50μeq(毫克当量电荷)，例如＜ 40μeq、＜ 30μeq、＜ 20μeq 等的阴离子交换柱。优选的 HPAEC 柱是 Dionex 牌的氢氧化物选择性“IonPacAS”柱，如 AS11 柱，该柱带有烷醇季铵官能团。当以其 2×250mm 分析模式使用时，AS11 柱的容量为 11μeq，当以 4×250mm 模式使用时其容量可增加到 45μeq。低容量氢氧化物选择柱是优选的。

[0023] 电流和光谱检测

[0024] 本发明的第一个方面通过电流和光谱分析了液相色谱柱的洗出液。从柱子上洗脱的物质可被分流，一部分通过电流分析，另一部分通过光谱分析。或者，从柱子上洗脱的物质可以不被分流先通过电流再通过光谱或者先通过光谱再通过电流连续分析。图 2 和 3 例举了这两种不同的常规方法。当采用连续分析时，优选先进行光谱检测再进行电流检测，特别是当光谱检测相对于电流检测无破坏性时。

[0025] 电流检测宜为脉冲电流检测 (PAD)。PAD 中可采用各种波长 [5]，包括图 4 所示的任何曲线。优选使用负电势来清洁电极。图 4A 的波形采用负电势进行电极清洁，这样提高了长期再现性并降低了电极损耗。

[0026] 用于电流检测的电极优选是金电极。

[0027] 光谱检测宜基于电磁辐射的吸收和/或发射，电磁辐射的波长宜在 100nm 和 900nm 之间 (例如，波长为 100-200nm、150-250nm、200-300nm、250-350nm、300-400nm、350-450nm、400-500nm、450-550nm、500-600nm、550-650nm、600-700nm、650-750nm、700-800nm、750-850nm、800-900nm)。可根据要检测的分析物选择采用的光的波长。紫外 (UV) 吸收光谱法 (例如，200nm) 和可见光吸收光谱法是两种特别优选的分析糖类的方法。

[0028] 作为电流检测的一种替代方法，本发明可采用电导率检测 (包括抑制电导率检测)。

[0029] 分析物

[0030] 本发明用来分析液相色谱柱的洗出液。洗出液是样品中一种或多种分析物的色谱分离结果。

[0031] 本发明特别适用于分析糖类分析物。它们可以是多糖 (例如聚合程度至少为 10，例如 20、30、40、50、60 或更高)、寡糖 (例如聚合程度从 2 到 10) 或是单糖。寡糖和单糖可

以是母体多糖解聚和/或水解的结果，例如分析物可以是较大糖类的含糖片段。

[0032] 优选的糖类分析物是细菌糖类，尤其是细菌荚膜糖，例如脑膜炎奈瑟球菌（血清组A、B、C、W135或Y）、肺炎链球菌（血清型4、6B、9V、14、18C、19F或23F）、无乳链球菌（Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VII或VIII型）、流感嗜血菌(Haemophilusinfluenzae)(a、b、c、d、e或f型菌株）、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌等的荚膜糖。其它糖类分析物包括葡聚糖（例如真菌的葡聚糖，如白色念珠菌(Candida albicans)的葡聚糖，和真菌的荚膜糖，如新型隐球菌(Cryptococcus neoformans)的荚膜糖。

[0033] 脑膜炎奈瑟球菌(N.meningitidis)血清组A的荚膜是（α1→6)-连接的N-乙酰-D-甘露糖胺-1-磷酸的均聚物。脑膜炎奈瑟球菌血清组B的荚膜是（α2→8)连接的唾液酸的均聚物。脑膜炎奈瑟球菌血清组C的荚膜糖是（α2→9)连接的唾液酸的均聚物。脑膜炎奈瑟球菌血清组W135的糖类是由唾液酸-半乳糖二糖单元[→4)-D-Neup5Ac(7/9OAc)-α-(2→6)-D-Gal-α-(1→]构成的聚合物。脑膜炎奈瑟球菌血清组Y的糖类类似于血清组W135的糖类，但二糖重复单元用葡萄糖代替半乳糖[→4)-D-Neup5Ac(7/9OAc)-α-(2→6)-D-Glc-α-(1→]。b型流感嗜血菌(H.influenzae)的荚膜糖是核糖、核糖醇和磷酸的聚合物[‘PRP’,（聚-3-β-D-核糖-(1,1)-D-核糖醇-5-磷酸）]。

[0034] 除了可用于分析全长荚膜糖，本发明也可用于分析它们的寡糖片段。

[0035] 其它优选的糖类抗原剪切自糖缀合物，例如来自糖类-蛋白质偶联疫苗抗原。在已经证明可用于人类的三种脑膜炎奈瑟球菌血清组C偶联疫苗中，Menjugate™[6]和Meningitec™基于寡糖，而NeisVac-C™使用全长多糖。

[0036] 其它优选的糖类抗原的真核生物的糖类，例如真菌的糖类、植物的糖类、人类的糖类（例如癌抗原）等。

[0037] 在中性pH时带有电荷的糖类（例如阴离子性的）是优选的分析物。可用本发明的方法分析带有多个磷酸基团和/或多个羧酸基团的糖类分析物。因此，本发明特别适用于分析多阴离子糖类分析物。

[0038] 其它优选的分析物是脂多糖和脂寡糖。

[0039] 本发明特别适用于包括各种不同长度的糖，例如同种母体糖的不同片段的分析物。

[0040] HPAEC的结果是，分析物通常在水溶液中，且这种溶液有高pH和高盐浓度。

[0041] 典型的分析物是那些可通过电流和光谱技术检测的分析物。

[0042] 要分析的含有感兴趣分析物的样品可包含其它物质。这些物质可能会或不会被色谱柱保留，因此可能会或不会出现在洗出液中。这种组分通常不会结合到柱上。

[0043] 因此，用本发明方法分析的洗出液将含有这些分析物或者可能含有这些分析物。

[0044] 分析物可以是释放前检测的产品（例如在制造或质量控制检测中），或者可以是释放后检测的产品（例如为评定稳定性、半衰期等）。

[0045] 其它步骤

[0046] 在分析液相色谱柱的洗出液之前，本发明方法可包括在柱中加入含有分析物的样品（或怀疑含有分析物）。因此，本发明提供了一种检测样品中分析物的存在的方法，该方法包括以下步骤：(a)将样品施加到液相色谱柱，以使样品中的分析物被该柱保留；(b)从该柱洗脱分析物；和(c)如上所述分析洗出液。

[0047] 为进行糖类分析，在进入柱之前可能需要从样品中过滤至少一些非分析物化合物，Dionex™的前置柱能用于这种目的的截留和防护，例如可以截留氨基以除去氨基酸、截留硼酸盐等。

[0048] 洗脱和分析之后，本发明还可包括测定所检测分析物的特征的步骤，如其DP（通常是平均DP）、其分子量、其纯度等。

[0049] 经过电流和光谱检测器之后，可将洗出液引入质谱仪，例如FAB/MS或ESI/MS。

[0050] 利用本发明选择所需糖类

[0051] 本发明在缀合之前特别有用，此时需要确保选择大小正确的糖链以制造缀合物。

[0052] 本发明能够在缀合之前检测或监测全长多糖的片段化过程。当需要特定长度（或长度范围）的寡糖时，重要的是不能使多糖的片段化程度过大而使解聚超过所需的点（例如最终得到单糖）。通过随时间推移测量糖链长度，本发明能够监测这种部分解聚过程。因此，本发明提供了一种分析组合物中的糖类的方法，该方法包括以下步骤：(a) 开始解聚组合物中的糖类；和在这之后的一个或多个时间点 (b) 分析上述糖类。在初次进行实验时通常在一些时间点进行分析以确定随时间的进展，但在已经建立标准条件之后，出于证实的目的通常在设定的时间点分析。一旦达到所需终点，该方法还可包括以下步骤：(c) 停止解聚，例如通过洗涤、分离、冷却等。该方法还可进一步包括在任选的化学活化之后将解聚的糖类缀合到载体蛋白上的步骤。

[0053] 本发明还能够在片段化之后选择所需寡糖链。因此，本发明提供了一种选择用于制备糖缀合物的糖类的方法，包括以下步骤：(a) 获得含有不同多糖片段的混合物的缀合物；(b) 将此混合物分离出亚混合物；(c) 用这里所述的方法分析一种或多种亚混合物；和 (d) 利用步骤 (c) 的结果选择一种或多种用于缀合的亚混合物。该方法可包括在步骤 (a) 之前片段化多糖，或者可以从已经制好的混合物开始。所述片段可以是同种多糖例如同种血清组的片段。步骤 (d) 之后，该方法可包括在任选的化学活化之后与载体蛋白缀合的步骤。

[0054] 缀合之前，通常将糖类化学活化以引入能与载体反应的官能团。糖类活化的条件可造成水解，因此在活化之后分析糖类是有益的。适当时，术语“糖类”可包括那些活化的糖类。此外，本发明提供了一种制备用于制造糖缀合物的活化的糖类的方法，包括以下步骤：(a) 获得糖类；(b) 化学活化糖类以引入能与载体蛋白反应的官能团；和 (c) 分析上述步骤 (b) 的产物。该方法还可包括以下步骤：(d) 使活化的糖类与载体蛋白（其自身也可已经被活化）反应以得到糖缀合物。该方法可包括在步骤 (a) 之前将多糖片段化，或者可以从已经制好的混合物开始。

[0055] 本发明还可在缀合之后使用。缀合后可采用本发明通过三种途径分析缀合物：首先，可测量组合物中的总糖。例如在混合不同缀合物之前或者在疫苗释放之前（出于调整或质量控制的目的）；第二，可测量组合物中游离的非缀合的糖类，例如以检查是否存在不完全缀合，或者通过监测游离糖随时间的增加来了解缀合物的水解情况；第三，出于同样的原因可测量缀合物中的缀合糖类。第一和第二途径需要糖类在分析之前从缀合物中释放出来。为单独评估缀合和非缀合糖类必须将它们分离。可用各种方法将水性组合物中的游离（即非缀合）糖类与缀合糖类分离。缀合反应改变了糖类的各种化学和物理参数，可利用这种差异来分离。例如，可利用大小分离来分离游离和缀合糖类，缀合物质由于含有载体蛋白

而具有较大质量。超滤是一种优选的大小分离方法。另一种方法是，如果缀合物已被吸附到佐剂上则将离心分离吸附的缀合物（颗粒）和水解后解吸的游离糖类（上清液）。

[0056] 本发明提供了一种分析糖缀合物的方法，包括以下步骤：(a) 处理糖缀合物以使糖类从载体释放；和 (b) 如文中所述分析释放的糖类。本发明提供了一种分析糖缀合物组合物的方法，包括以下步骤：(a) 将缀合物中的非缀合糖类与缀合糖类分离；和 (b) 如上所述分析非缀合和 / 或缀合糖类。

[0057] 本发明还提供了一种供医师使用的释放疫苗的方法，包括以下步骤：(a) 制造疫苗，包括这里所述的分析步骤；和，如果步骤 (a) 的结果显示疫苗可用于临床应用则 (b) 由临床医师释放疫苗。步骤 (a) 宜对包装的疫苗、对包装前的成批疫苗、对缀合前的糖类等进行。

[0058] 本发明还提供了一种疫苗批次，该批次中的一支疫苗已用本发明的方法分析。

[0059] 通用术语

[0060] 术语“含有”包括“包括”以及“由……组成”，例如“含有”X 的组合物可排他性地由 X 组成或者可以包括其它的物质，例如 X+Y。

[0061] 词“基本上”不排除“完全”，例如“基本上不含”Y 的组合物可以完全不含 Y。如果需要，词“基本上”可从本发明的定义中省去。

[0062] 与数值 x 相关的术语“约”表示，例如 x±10％。

[0063] 本发明的方法可用于分析和 / 或制备目的。当提及“分析”等时不能认为排除了制备方法。

[0064] 糖类的聚合度 (DP) 定义为糖类中重复单元的数目。因此，对于均聚物，SP 与单糖单元的数目相同。然而对于杂聚物，SP 是整个糖链中单糖单元的数目除以最小重复单元中单糖单元的数目，例如，$(Glc\text{-}Gal)_{10}$ 的 DP 是 10 而不是 20，$(Glc\text{-}Gal\text{-}Neu)_{10}$ 的 DP 是 10 而不是 30。

[0065] 附图简述

[0066] 图 1 显示了通过电流法（上图）和 UV_{200nm} 光谱法（下图）连续分析的 HPAEC 的流出液。上图的测量单位是 nC；下图采用任意单位。

[0067] 图 2 显示了电流和光谱检测的串联排列，而图 3 显示了平行排列。

[0068] 图 4 显示了三种 PAD 波形。x- 轴为时间，单位是秒。y- 轴为相比 Ag/AgCl 参考电极的电势，单位是伏特。所有三种波形都有延迟期（第一条竖线）、检测期（第二条竖线）和之后的清除期。

[0069] 图 5 显示了通过 PAD（下面的轨迹）或 UV（上面的轨迹）检测的 PA1 柱洗脱液的分析结果。

[0070] 图 6 显示了储存在不同条件下的血清组 A 样品的 PA1 柱洗出液的分析结果。洗脱程序与图 19 相同。

[0071] 图 7 和 8 显示了在 PA100 柱上用不同洗脱液洗脱血清组 W135 糖类的洗出液分析结果。

图 9 显示了在 PA1 柱上洗脱同种分析物的结果，

图 10 显示了在 PA200 柱上洗脱同种分析物的结果。

[0072] 图 11 显示了 Hib 寡糖在 PA100 柱上洗出液的分析结果。

[0073] 图 12 显示了水解的 Hib 糖类在 AS11 柱上洗出液的分析结果。

[0074] 图 13 显示了血清组 A 多糖在 SA11 柱上洗出液的分析结果。糖类水解后的相同分析结果示于图 14。

[0075] 图 15 显示了血清组 C 标准品的 MALDI-TOF 质谱，图 16 显示了相同标准品在 PA1 柱上的洗出液的分析结果。还用 AS11 柱分析了标准品，结果示于图 17。

[0076] 图 18 显示了用 AS11 柱分析水解的血清组 C 多糖的结果。

[0077] 图 19 显示了在 214nm 测得的水的洗脱曲线，采用 PA1 柱，用乙酸盐 / 氢氧化物和硝酸盐 / 氢氧化物作为洗脱液，有微膜抑制。洗脱程序与图 6 相同。

[0078] 实施本发明的方法

[0079] HPAEC 流出液的紫外检测

[0080] HPAEC 分析荚膜糖时采用的高 pH 是指洗出液中存在氢氧化物离子，但这些离子在紫外区域具有高吸收。如图 19 所示，使用在 CarboPac PA1 柱上仅用水得到的标准乙酸盐 / 氢氧化物洗脱液，得到的洗脱曲线在 UV 区域观察不到任何感兴趣的分析物。因此，为对 HPAEC 洗脱液的分析结果进行 UV 检测需要不同的方法。

[0081] HPAEC 洗脱液的 PAD 和 UV 联合分析

[0082] 将血清组 A 脑膜炎双球菌的荚膜糖解聚得到带有电荷的（磷酸盐，来自甘露糖胺 -1- 磷酸单体）混合长度的糖类（高 DP）。与 HPAEC 分离时采用的 PA1 柱不同，该混合物在带有制造商建议的保护柱的 Dionex IonPac AS11 柱上分离，采用氢氧化钠梯度作为洗脱液（流速为 1.0ml/min）。HPAEC 柱的洗出液用电化学 (PAD，金电极）和 UV 检测器依次分析。整个电流检测的结果示于图 1 的上部，UV 可见区检测 (200nm) 的结果示于下部。

[0083] AS11 柱具有低容量 (11μeq)。将相同的分析物加到高容量 Dionex CarboPac PA1 柱 (100μeq)，并将氯化钠用作洗脱液中的推进剂。如图 5 所示，PA1 柱的洗脱液不能通过 PAD 检测（下面的轨迹），但能通过 UV 检测（上面的轨迹）。因此通过 UV 检测使得低容量 AEC 柱能用于分析荚膜糖。

[0084] 硝酸盐和乙酸盐洗脱液的比较

[0085] 通过常规 HPAEC-PAD 分析血清组 W135 脑膜炎双球菌荚膜糖的寡糖片段集合，采用 CarboPac PA100 柱，用乙酸钠和 100mM 氢氧化钠梯度洗脱。结果示于图 7。

[0086] 为进行比较，在洗脱液中用硝酸钠代替乙酸钠进行相同分析。如图 8 所示，结果的动态范围很大，而高 DP 片段的分辨率较好。可检测 DP50 片段。

[0087] 变成 CarboPac PA1 柱进一步加大了动态范围（图 9），可检测 DP40 片段。用 5μmPA200 柱可看到 DP80 片段（图 10）。

[0088] 因此，硝酸盐可用于从阴离子交换柱洗脱不同长度的荚膜糖。

[0089] 硝酸盐洗脱液用于随时间进行 DP 检测

[0090] 偶联疫苗的糖类组分可被逐步水解，这样导致 DP 随时间降低并减少了结合到蛋白载体的糖类的量。可采用 CarboPac PA1 柱通过 HPAEC-PAD 监测脑膜炎球菌血清组 A 的糖类在不同 pH 条件下的解聚。洗脱液为 100mM 氢氧化钠中乙酸钠和硝酸钠的混合物，流速为 1.0ml/min。

[0091] 采用三种不同储存条件：(1)pH 约 9，37℃，4 天；(2)pH 约 4，37℃，4 天；和 (3)pH 约 7，-20℃，即推荐的储存条件。

[0092] 如图 6 所示，在洗脱液中加入硝酸盐使得 PAD 可用于洗出液，并使解聚后的低 DP 片段可被检测。对于储存于 37℃的材料可见到短片段，而对于储存于 0 度以下的材料在相同的地方看不到峰（顶上的线）。

[0093] 用低容量柱分析流感嗜血菌

[0094] 在 CarboPac PA100 柱上用常规 HPAEC-PAD 分析了 Hib 寡糖 (DP 2-6) 集合。洗脱液为 24 分钟内 30mM-100mM 的乙酸钠梯度和 100mM NaOH，流速为 0.8ml/min（分钟）。结果见图 11。

[0095] 只有短链低聚物从 CarboPac PA-100 上洗脱，洗脱需要高百分比的乙酸钠作为推进剂。即便如此，DP5 和 DP6 低聚物只能较弱分辨且灵敏度低。因此 CarboPac PA-100 不适合分析 DP ＞ 4 的 Hib 寡糖集合。因此研究了不同的色谱柱。

[0096] IonPac AS11 柱被用来分析平均 DP 为 12.44 的水解的 Hib 糖类集合。该柱具有高氢氧化物选择性，因此能够在低于以前用于强保留性聚阴离子（例如 Hib 片段）的氢氧化物浓度下洗脱带高电荷的阴离子。洗脱液为 15 分钟内 3mM-150mM NaOH。结果见图 12，该图还显示，低容量柱可用于分析细菌荚膜糖。洗脱非常快，且只需要氢氧化物梯度。Hib 集合的所有组分可在少于 10 分钟的色谱运行中分辨。

[0097] 用低容量柱分析脑膜炎球菌血清组 A 的糖类

[0098] IonPac AS11 柱被用于分析血清组 A 脑膜炎球菌荚膜多糖的分子量分布。图 13 显示了采用 19 分钟内 10-150mM 氢氧化物梯度得到的 DP 约 200 的多糖样品的色谱图。奇怪的是，该柱能分离如此高 MW 的聚阴离子，且该柱的效率如此之高以至于可在 17 分钟内在相对较窄的峰内洗脱出分析物。该结果远远好于诸如凝胶渗透色谱法的方法。

[0099] 相同的柱子被用来分析多糖酸解后得到的寡糖。如图 14 所示，可分辨 DP 升高的寡糖，DP 与 HPAEC-PAD 保留时间相关。

[0100] 用低容量柱分析脑膜炎球菌血清组 C 的糖类

[0101] 血清组 C 的多糖是部分 O- 乙酰化的 α -2,9- 连接的 N- 乙酰 - 神经氨酸的均聚物。因此是聚羧酸阴离子。由于 O- 乙酰基的存在，血清组 C 糖类的色谱图较为复杂，因为各低聚物都会根据结构中乙酰基的分布产生许多峰。

[0102] 通过 MALDI-TOF 质谱分析了纯化的 DP5 标准品，发现其中分布有多种不同的低聚物（图 15）。在 CarboPac PA1 柱上通过 HPAEC-PAD 对相同标准品的分析示于图 16。从该柱上洗脱需要较强条件 (500mM 乙酸钠，100mM 氢氧化钠)，图 15 和 16 之间的区别显示，乙酸盐处理改变了糖类中乙酰基的天然分布。因此采用非常高容量的 AEC 柱分析乙酰化的糖类不是最佳的。

[0103] 因此使用与受抑电导率检测偶联的 IonPac AS11 柱作为替代。如图 17 所示，采用 10mM-60mM 氢氧化钠梯度（无乙酸盐）能够洗脱 DP5 标准品，其洗脱曲线显示出不同的寡糖和 O- 乙酰基分布。这种色谱图的解释比 MALDI-TOF 图谱简单得多，后者由于存在不同量的分子量等于乙酰基重量一半的钠作为抗衡离子而比较复杂。

[0104] 对荚膜多糖不同长度的水解产物进行重复，也可见到这种 DP5 标准品的洗脱图（图 18）。

[0105] 应理解，只是以举例的方式描述了本发明，可对本发明作出修改而仍在本发明的范围和精神之内。

[0106] ————————————

[0107] Hardy 等，(1988)Anal Biochem 170 :54-62.

[0108] Wang 等，(1990)Anal Biochem 190 :182-187.

[0109] Mellor 等，(2000)Anal Biochem 284 :136-142.

[0110] IonPac™ AS11 柱产品手册，Dionex™ 文件 034791，第 8 版 .

[0111] Gert-Jan 等，(2002)J Biol Chem 277 :25929-25936.

[0112] LaCourse&Johnson(1993)Anal Chem 65 :50-55.

[0113] Jones(2001)Curr Opin Investig Drugs 2 :47-49.

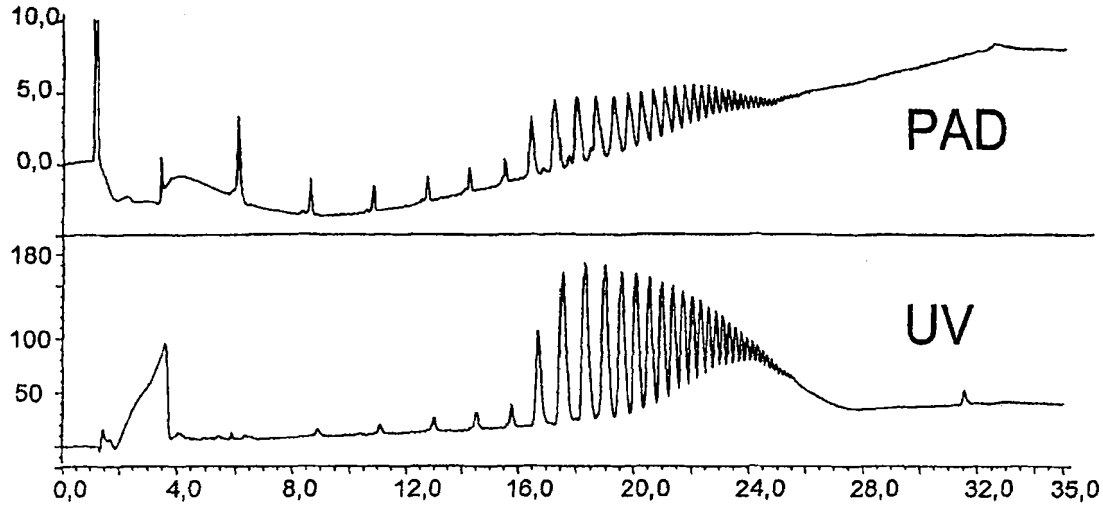

10,0
5,0
0,0
PAD
180
100
50
UV
0,0
4,0
8,0
12,0
16,0
20,0
24,0
28,0
32,0
35,0

图 1

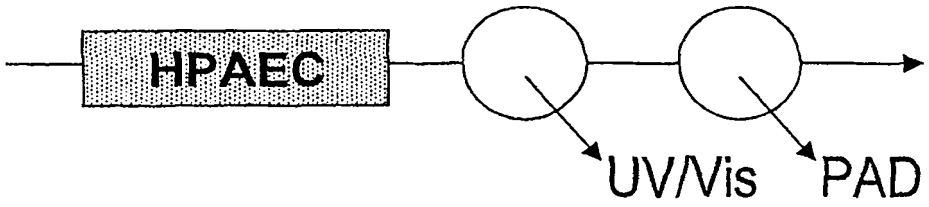

HPAEC
UV/Vis
PAD

图 2

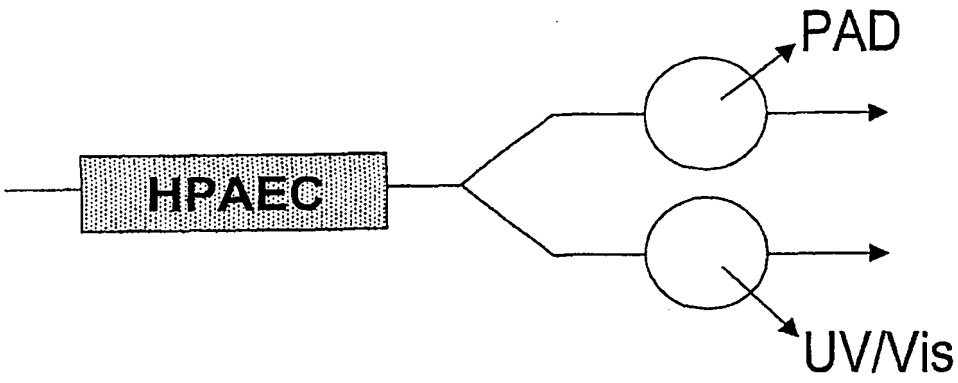

PAD
HPAEC
UV/Vis

图 3

图 4

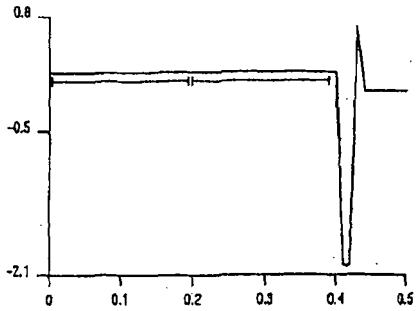


图 4A

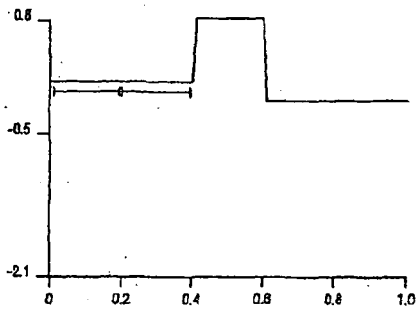


图 4B

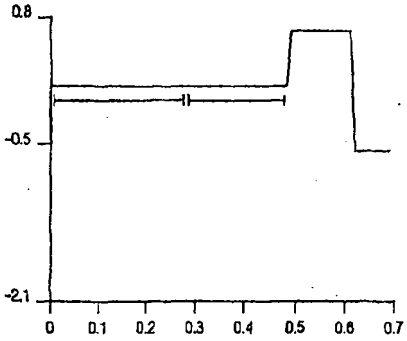


图 4C

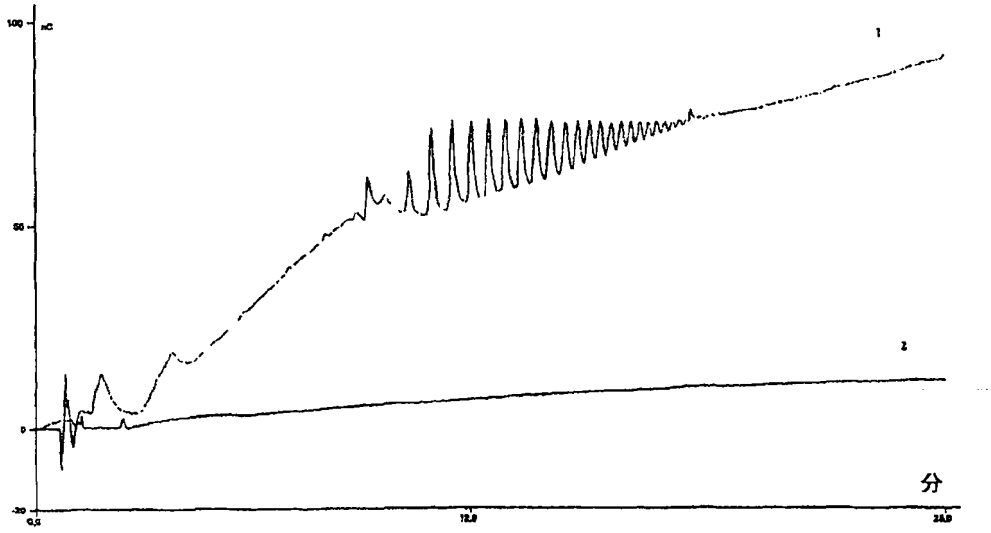


图 5

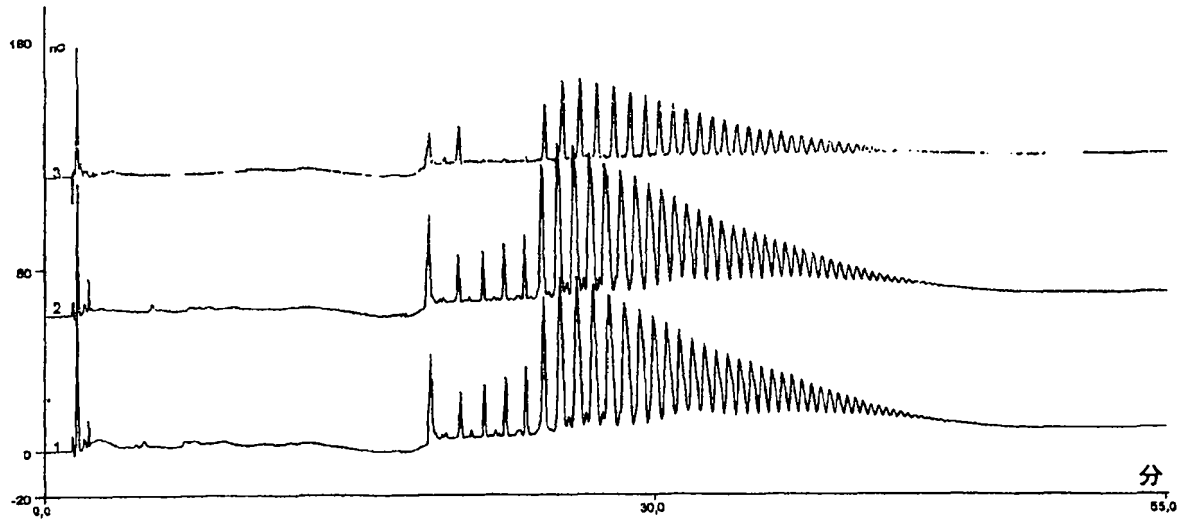


图 6

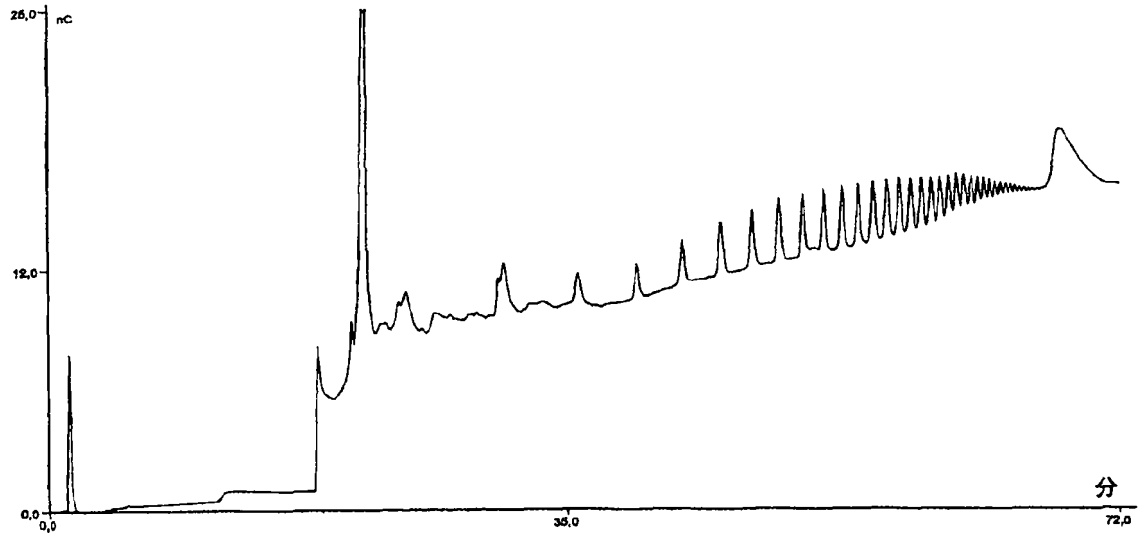


图 7

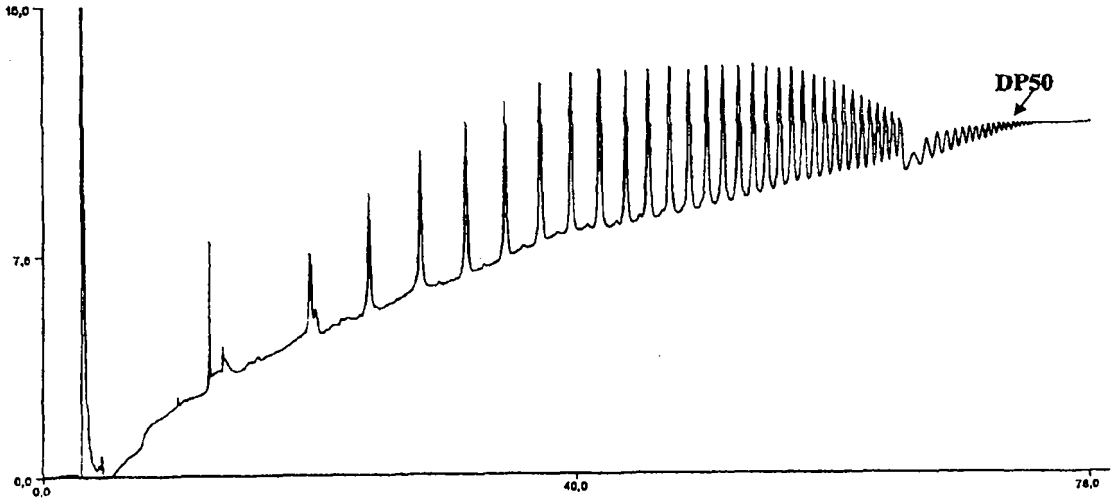


图 9

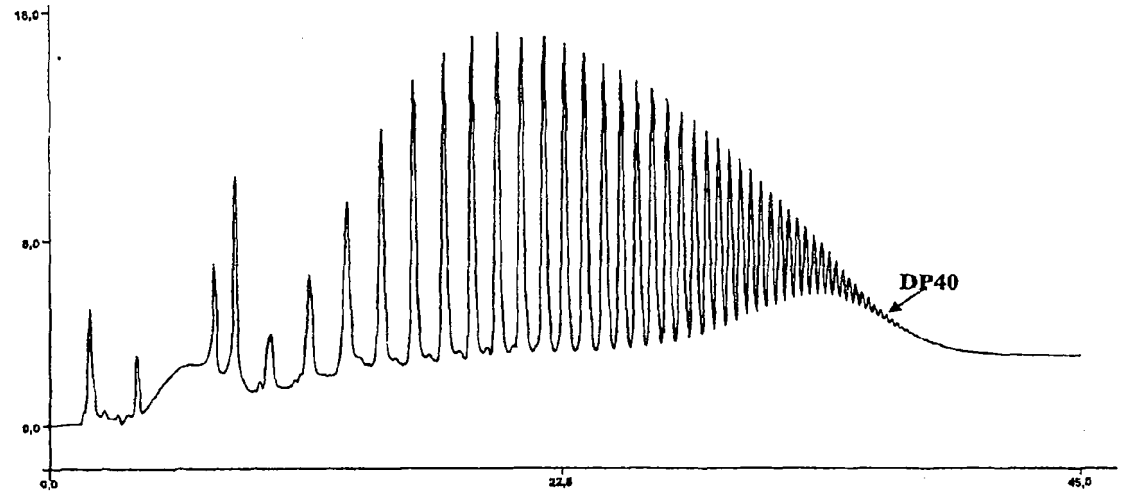


图 10

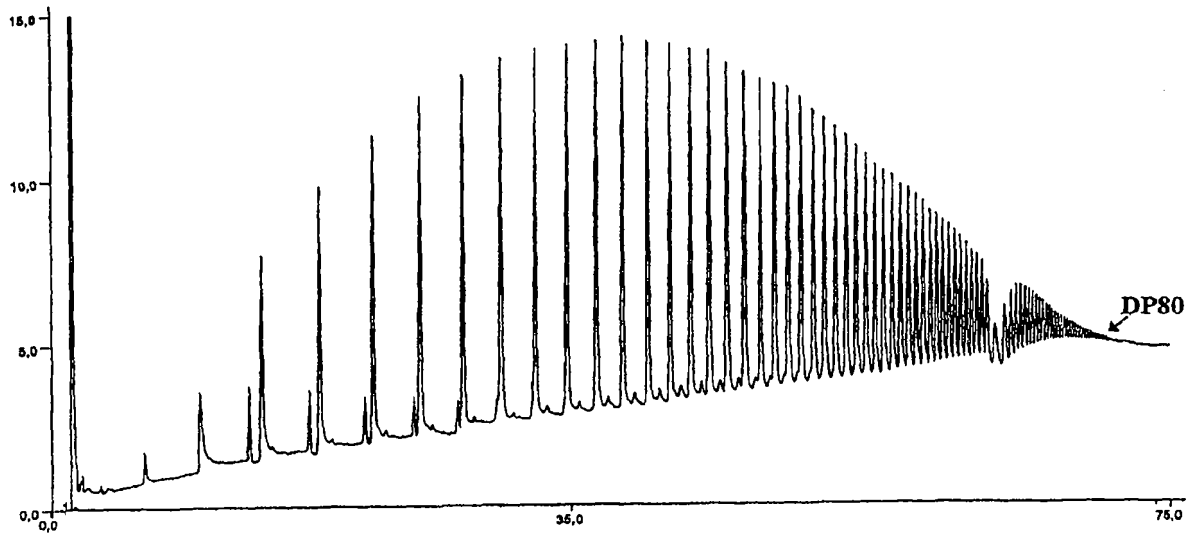


图 10

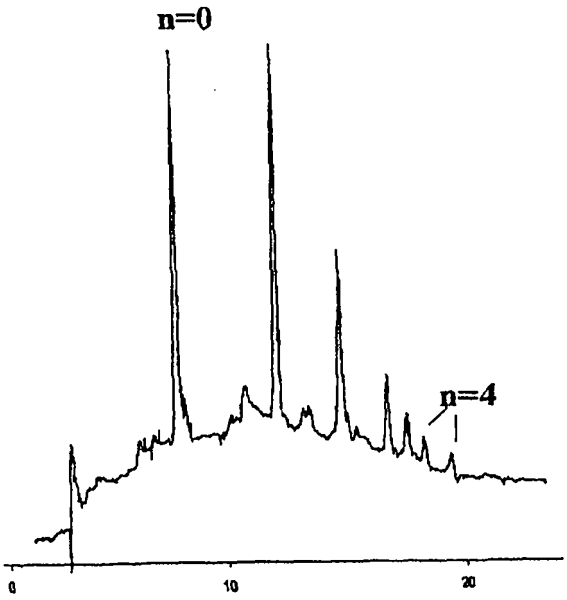


图 11

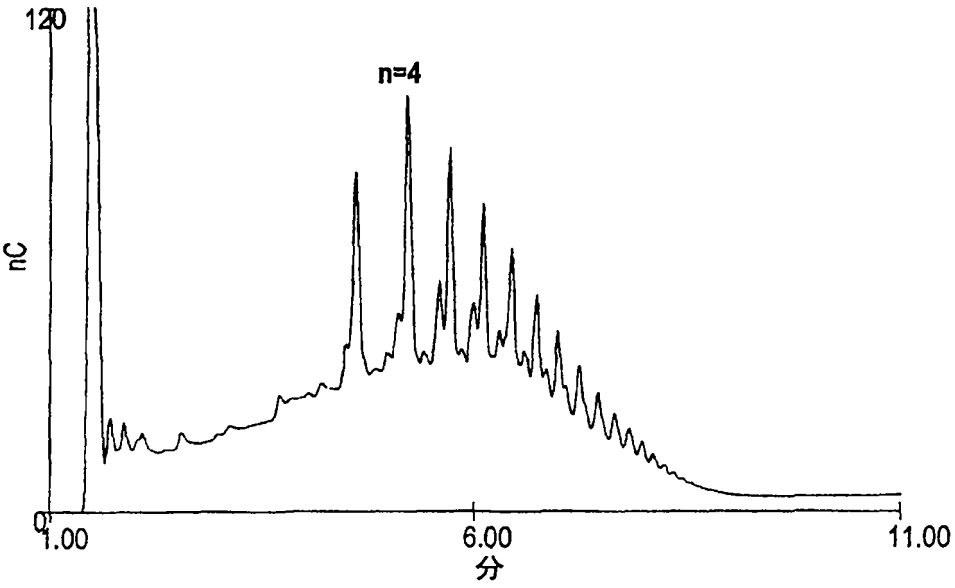


图 12

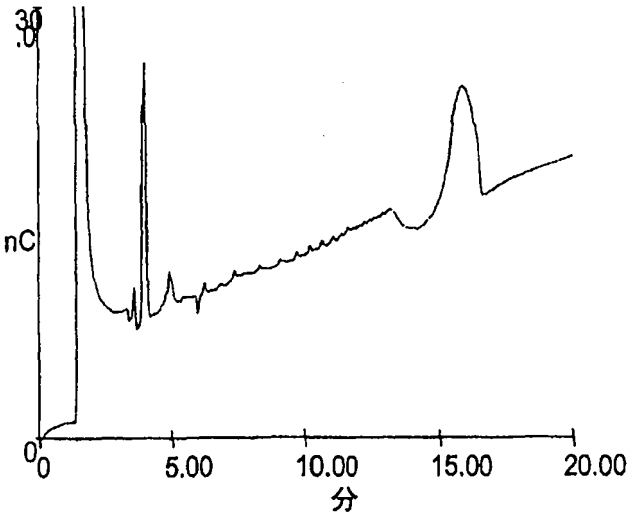


图 13

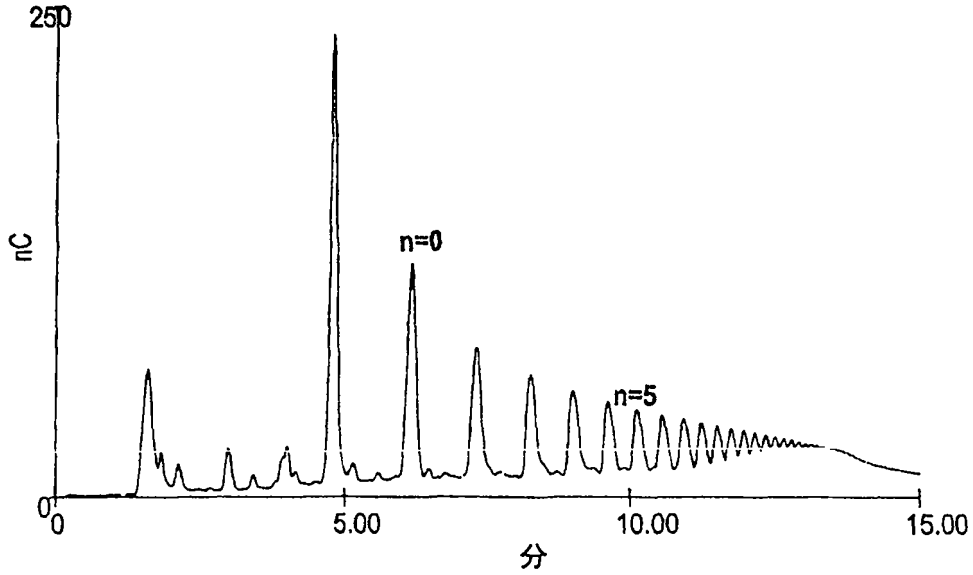


图 14

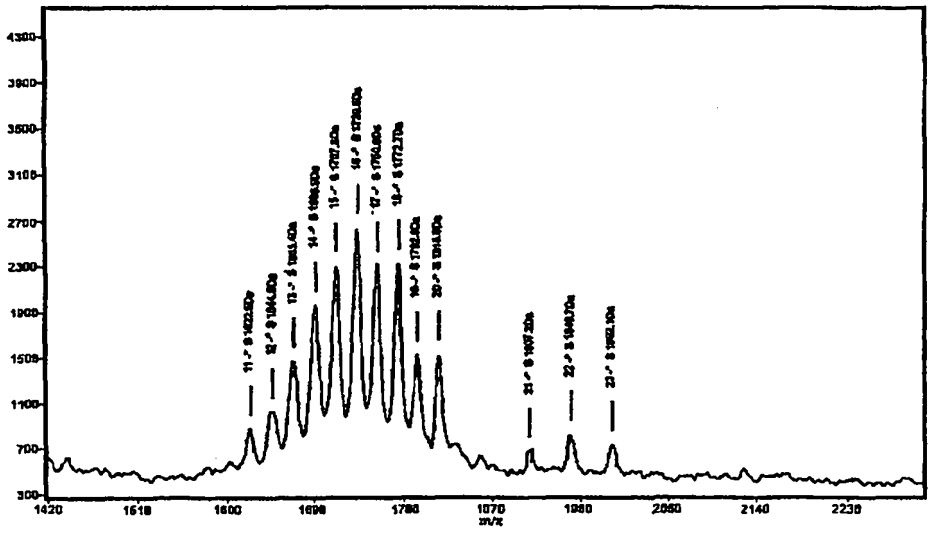


图 15

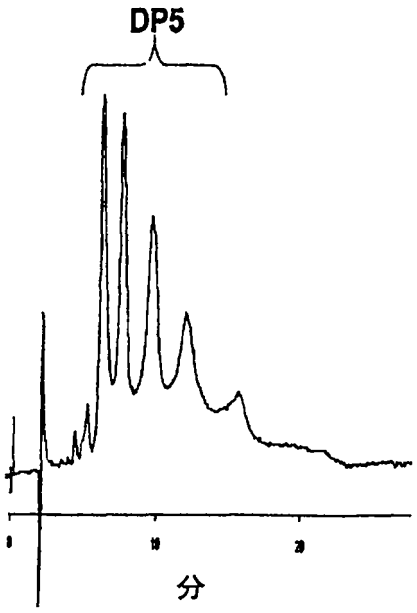


图 16

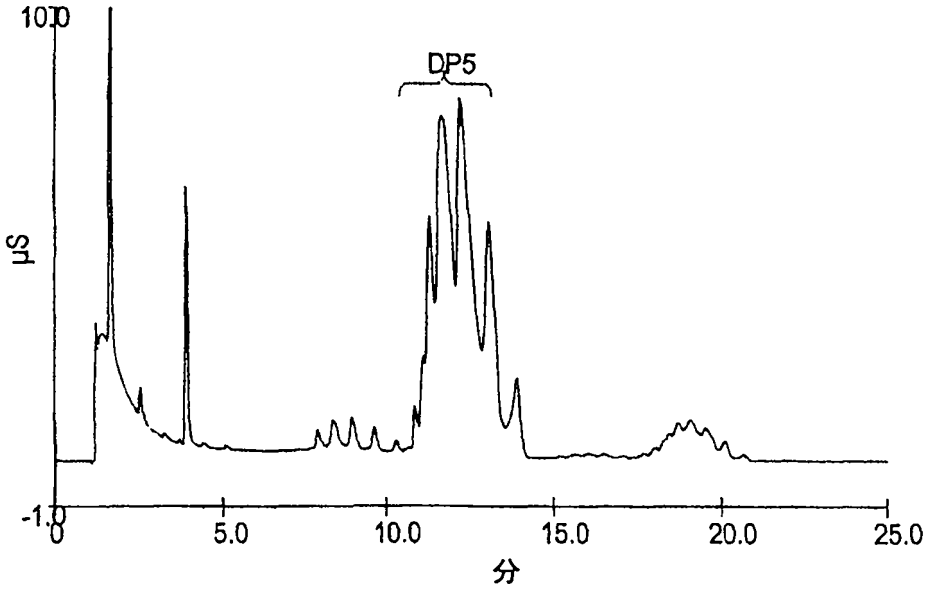


图 17

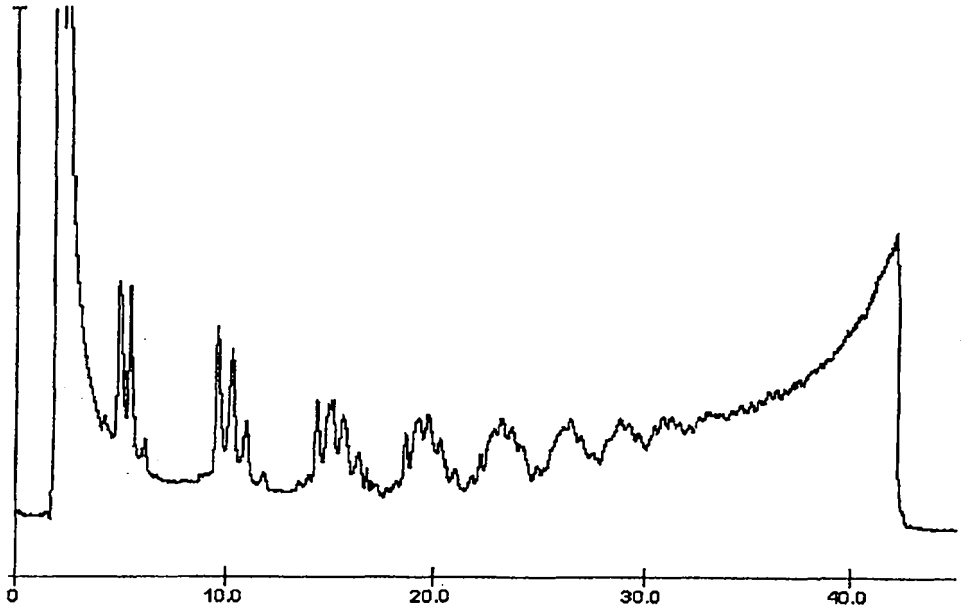

0
10.0
20.0
30.0
40.0

图 18

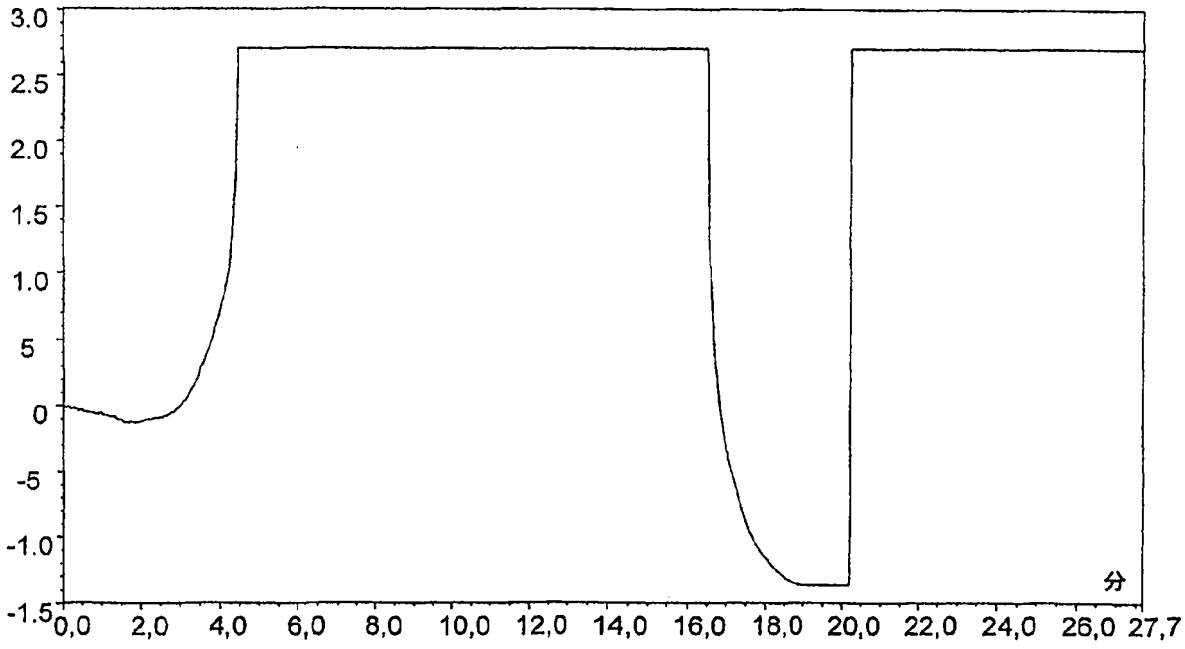

3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
5
0
-5
-1.0
-1.5
0,0
2,0
4,0
6,0
8,0
10,0
12,0
14,0
16,0
18,0
20,0
22,0
24,0
26,0
27,7
分

图 19