

中图分类号: R927.2; R979.1

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2024)01-0064-04

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.01.014



高效液相色谱-示差折光法测定 NMM 抗肿瘤 DNA 疫苗中甘露醇含量*

郭润姿, 黄言, 孙澳, 于继云, 王宇[△]

(固安鼎泰海规生物科技有限公司, 河北 廊坊 065500)

摘要:目的 建立测定 NMM 抗肿瘤 DNA 疫苗中甘露醇含量的高效液相色谱-示差折光法。方法 检测器为示差折光检测器, 色谱柱为 SUGAR SC1011 阳离子钙型交换柱(300 mm × 8 mm, 6 μm), 流动相为纯化水, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 80 °C, 检测池温度为 37 °C, 进样量为 10 μL。结果 甘露醇的质量浓度在 0.02~5.00 mg/mL ($R^2 = 1.0000$, $n = 6$) 范围内与峰面积线性关系良好; 定量限为 13.37 μg/mL; 精密性、重复性、稳定性试验结果的 RSD 均小于 2.0%; 加样回收率为 97.76%, RSD 为 0.97% ($n = 9$)。3 批小试样品和中试样品中甘露醇的含量分别为 20.02, 19.95 mg/mL。结论 该方法操作简便、重复性好、结果准确, 可用于 NMM 抗肿瘤 DNA 疫苗中甘露醇的含量测定。

关键词: NMM 抗肿瘤 DNA 疫苗; 重组生物制品; 甘露醇; 高效液相色谱法; 示差折光检测器; 含量测定

Content Determination of Mannitol in NMM Anti-Tumor DNA Vaccine by HPLC-RID

GUO Runzi, HUANG Yan, SUN Ao, YU Jiyun, WANG Yu

(Gu'an Dingtai Haigui Biotechnology Co., Ltd., Langfang, Hebei, China 065500)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography differential refractive index detector (HPLC-RID) method for the content determination of mannitol in NMM anti-tumor DNA vaccines. **Methods** RID was adopted, the chromatographic column was SUGAR SC1011 cation calcium exchange column (300 mm × 8 mm, 6 μm), the mobile phase was purified water, the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 80 °C, the temperature of detection cell was 37 °C, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear range of mannitol was 0.02 - 5.00 mg/mL ($R^2 = 1.0000$, $n = 6$). The limit of quantification (LOQ) was 13.37 μg/mL. The RSDs of precision, repeatability, and stability test results were lower than 2.0%. The recovery rate of mannitol was 97.76% with an RSD of 0.97% ($n = 9$). The contents of mannitol in three batches of small-test and pilot-test samples were 20.02 mg/mL and 19.95 mg/mL, respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate and specific, which can be used for the content determination of mannitol in NMM anti-tumor DNA vaccines.

Key words: NMM anti-tumor DNA vaccine; recombinant biological products; mannitol; HPLC; RID; content determination

NMM 肿瘤治疗性 DNA 疫苗裸质粒注射液(简称 NMM 抗肿瘤 DNA 疫苗^[1-2])属重组生物制品, 包括纽约食管鳞状细胞癌 1(NY-ESO-1)、黏蛋白 1(MUC-1)、黑色素瘤抗原家族 A3(MAGE-A3), 主要用于治疗黑色素瘤、淋巴瘤、乳腺癌等体表实体瘤, 终产品为质粒 DNA。肿瘤治疗性 DNA 疫苗接种后可诱导体液免疫和细胞免疫反应^[3], 是近年来创新药研究的热点。质粒 DNA 一般有超螺旋、开环及线性 3 种构型^[4], 而超螺旋质粒 DNA 因其转染效率高^[5], 是基因治疗^[6-9]及嵌合抗原受体 T 细胞(CAR-T 细胞)治疗产品^[10-11]的主要有效成分, 但易受温度、强光等因素的影响而转变为非超螺旋质粒 DNA^[12]。本公司设计和构建的 NMM 抗肿瘤 DNA 疫苗的质粒分子量高达 15 kbp, 其超螺旋构型质

粒 DNA 易受外界因素影响而转变为非超螺旋构象质粒 DNA, 故需添加保护剂以维持质粒 DNA 超螺旋构型。生物制品中常以乳糖、明胶、蔗糖、甘露醇等为赋形剂或稳定剂^[13-17]。前期研究中, 在 NMM 抗肿瘤 DNA 疫苗中添加质量浓度为 20 mg/mL 的甘露醇后, 发现质粒可在 $(4500 \pm 500) \times$ 、25 °C 条件下放置 45 d 及 40 °C 高温下放置 25 d, 超螺旋构型质粒 DNA 比例仍维持在 90% 以上, 确定 NMM 抗肿瘤 DNA 疫苗中需添加甘露醇保护剂。有研究表明, 辅料是药物和疫苗超敏反应的潜在原因^[18]。为此, 本研究中参考 2020 年版《中国药典(二部)》^[19]建立了测定 NMM 抗肿瘤 DNA 疫苗中甘露醇含量的高效液相色谱-示差折光(HPLC-RIP)法, 并进行方法学验证, 以确保此方法适用且结果准确可靠, 同时为 NMM

*基金项目: 河北省科学技术厅重点研发计划项目[20372404D]。

第一作者: 郭润姿, 女, 硕士研究生, 中级工程师, 研究方向为 DNA 疫苗的质量控制, (电子信箱) guorunzi7897@163.com。

[△]通信作者: 王宇, 男, 硕士研究生, 高级工程师, 研究方向为恶性肿瘤和传染病相关 DNA 疫苗或药物的基础和应用, (电子信箱) wangyu_amms@163.com。

抗肿瘤DNA疫苗及同类产品的质量控制提供参考。报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Chromaster 5260型高效液相色谱仪(株式会社日立制作所),配有示差折光检测器;BSA124S型电子分析天平(德国Sartorius公司,精度为0.1 mg);Master - RUVF型双级反渗透超纯水机(上海和泰仪器有限公司)。

1.2 试剂

甘露醇对照品(美国Pfanstiehl公司,批号为36991A,纯度为99.8% <以干燥品计>);水为自制超纯水;磷酸氢二钠(Na_2HPO_4),磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$),均为药用级,购自湖南九典制药股份有限公司;氯化钠(NaCl ,药用级,河北华晨药业有限公司);DNA疫苗原液(批号为Bulk20200704),NMM抗肿瘤DNA疫苗(固安鼎泰海规生物科技有限公司,批号分别为20200801,20200802,20200803 <小试样品>和20200902,20200903,20200904 <中试样品>,规格为每支0.3 mg:0.6 mL)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:SUGAR SC1011阳离子钙型交换柱(300 mm × 8 mm, 6 μm);流动相:纯化水;流速:1.0 mL/min;柱温:80 $^{\circ}\text{C}$;检测池温度:37 $^{\circ}\text{C}$;进样量:10 μL 。

2.2 溶液制备

原液空白溶剂:分别称取 Na_2HPO_4 1.93 g、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.44 g、 NaCl 6.0 g,精密称定,置1 000 mL容量瓶中,加纯化水溶解并定容,混匀,备用。

对照品溶液:取甘露醇对照品200 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,加纯化水溶解并定容,混匀,即得质量浓度为20 mg/mL的甘露醇母液;精密量取甘露醇母液和原液空白溶剂各200 μL ,置2 mL容量瓶中,加纯化水定容,摇匀,即得。

空白溶剂:精密量取原液空白溶剂200 μL ,置2 mL容量瓶中,加纯化水定容,摇匀,即得。

供试品溶液:精密量取NMM抗肿瘤DNA疫苗200 μL ,置2 mL容量瓶中,加纯化水定容,摇匀,即得。

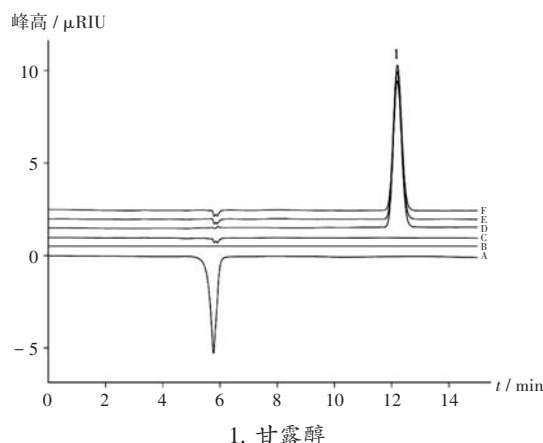
DNA疫苗原液供试品溶液:精密量取NMM抗肿瘤DNA疫苗原液200 μL ,置2 mL容量瓶中,加纯化水定容,摇匀,即得。

高温解超螺旋供试品溶液:取NMM抗肿瘤DNA疫苗,置40 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中放置30 d至超螺旋质粒DNA比例约为80%,作为高温解超螺旋供试品;精密量取200 μL ,置2 mL容量瓶中,加纯化水定容,摇匀,即得。

2.3 方法学考察

专属性试验:分别取流动相(纯化水)及2.2项下空

白溶剂、对照品溶液、供试品溶液、DNA疫苗原液供试品溶液、高温解超螺旋供试品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果对照品溶液色谱中,甘露醇保留时间约为12.20 min,峰面积约为163 $\mu\text{RIU} \cdot \text{s}$;流动相、空白溶剂和DNA疫苗原液供试品溶液在该色谱条件下,在甘露醇保留时间附近均无干扰峰,表明流动相、空白溶剂和质粒DNA对甘露醇检测均无干扰作用;供试品溶液及高温解超螺旋供试品溶液色谱中,甘露醇保留时间与对照品溶液甘露醇保留时间一致,且高温解超螺旋供试品中甘露醇含量与DNA疫苗中甘露醇含量一致,表明高温对DNA疫苗中甘露醇含量的检测无影响,方法专属性良好。色谱图见图1。



A. 流动相(纯化水) B. 空白溶剂 C. DNA疫苗原液供试品溶液
D. 对照品溶液 E. 高温解超螺旋供试品溶液 F. 供试品溶液
图1 专属性试验高效液相色谱图

1. Mannitol
A. Mobile phase (purified water) B. Blank solvent C. Test solution of DNA vaccine stock solution D. Reference solution E. Test solution of high temperature degradation of the superhelix F. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatogram of the specificity test

线性关系考察:分别精密量取2.2项下质量浓度为20 mg/mL的甘露醇母液2, 50, 100, 200, 400, 500 μL ,加200 μL 原液空白溶剂,置2 mL容量瓶中,加纯化水定容,混匀,即得甘露醇质量浓度分别为0.02, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00, 5.00 mg/mL的对照品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,以甘露醇质量浓度(X , mg/mL)为横坐标、峰面积(Y , $\mu\text{RIU} \cdot \text{s}$)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 82.528X - 1.4535$ ($R^2 = 1.0000$, $n = 6$)。结果表明,甘露醇的质量浓度在0.02 ~ 5.00 mg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

定量限确定:取2.2项下甘露醇对照品溶液适量,加水稀释至不同质量浓度,按2.1项下色谱条件进样测定,以信噪比(S/N)为10:1时的质量浓度为定量限,对该质量浓度的溶液连续测定6次,并计算峰面积的RSD值。结果定量限为13.37 $\mu\text{g/mL}$,甘露醇含量为133.7 ng,

峰面积的RSD为6.30%($n=6$)。

精密度试验:精密量取2.2项下甘露醇母液200 μL ,置2 mL容量瓶中,加200 μL 原液空白溶剂,用纯化水定容,混匀,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果峰面积的RSD为0.09%($n=6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取样品(批号为20200902)6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定2次,记录峰面积,并计算供试品溶液中甘露醇的含量。结果甘露醇含量为20.11 mg/mL, RSD为0.35%($n=12$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取甘露醇对照品和样品(批号为20200902)各适量,分别按2.2项下方法制备对照品溶液和供试品溶液,分别于室温下放置0,2,4,6,8,10,12 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果对照品溶液和供试品溶液峰面积的RSD分别为0.45%, 0.43%($n=7$),表明对照品溶液和供试品溶液室温放置12 h内稳定性均良好。

耐用性试验:取2.2项下空白溶剂、对照品溶液、供试品溶液各适量,分别改变流速(0.8,1.0,1.2 mL/min)和柱温(75,80,85 $^{\circ}\text{C}$),其余同2.1项下色谱条件进样测定,考察色谱条件发生微小变动时对样品中甘露醇含量测定结果的影响。结果显示,流速越快,甘露醇保留时间越短,峰面积越小,但不影响甘露醇的质量浓度;柱温越高,甘露醇保留时间略早,但色谱峰面积未发生显著变化。表明改变流速和柱温均不影响样品中甘露醇的含量测定结果,方法耐用性良好。

加样回收试验:精密量取样品(批号为20200902)100 μL ,共9份,分别置2 mL容量瓶中,分别加入2.2项下甘露醇母液80,100,120 μL ,各3份,加流动相定容,摇匀,按2.1项下色谱条件进样测定,每份样品检测2次,记录峰面积,并计算回收率。结果见表1,表明方法准确度良好。

表1 加样回收试验结果($n=9$)

Tab.1 Results of the recovery test ($n=9$)

样品含量(mg/mL)	加入量(mg/mL)	测得量(mg/mL)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
1.015	0.80	1.79	96.88		
1.015	0.80	1.80	98.12		
1.015	0.80	1.78	95.62		
1.015	1.00	2.00	98.50		
1.015	1.00	2.00	98.50	97.76	0.97
1.015	1.00	2.00	98.50		
1.015	1.20	2.19	97.92		
1.015	1.20	2.19	97.92		
1.015	1.20	2.19	97.92		

2.4 样品中甘露醇含量测定

分别取3批(批号分别为20200801,20200802,20200803)小试样品及3批(批号分别为20200902,20200903,20200904)中试样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品中甘露醇的含量。结果小试样品、中试样品中甘露醇的含量分别为20.02,19.95 mg/mL,测定结果均符合标示量为20 mg/mL的要求。详见表2。

表2 样品中甘露醇含量测定结果(mg/mL)

Tab.2 Results of content determination of mannitol in samples

样品	序号			$\bar{X}$
	1	2	3	
小试	19.86	20.08	20.12	20.02
中试	19.98	19.82	20.06	19.95

3 讨论

DNA疫苗被誉为第3次疫苗革命^[20],可用于预防或治疗感染性疾病、肿瘤等,应用前景广阔。随着质粒DNA临床用量需求的增加,为保证临床用药的安全性,对质粒DNA的质量控制提出了更高要求。目前,关于DNA疫苗质量控制的研究多集中在产品相关杂质、工艺相关杂质、生物学活性方面,关于质粒DNA稳定性研究多集中在工程菌传代稳定性^[21]及冻干DNA疫苗稳定性研究方面^[22],而关于质粒DNA原液及液体制剂中甘露醇含量的研究尚未见相关报道。

甘露醇作为NMM抗肿瘤DNA疫苗注射液的重要成分,在维持DNA疫苗中超螺旋质粒DNA构象稳定性方面发挥着重要作用。NMM抗肿瘤DNA疫苗注射液的长期稳定性研究结果表明,添加甘露醇保护剂的DNA疫苗于(5 $\pm$ 3) $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置30个月超螺旋质粒DNA比例仍保持在90%以上,无显著下降。但甘露醇过量使用会引起人体不良反应,每次用量不宜超过100 g,每日总量不宜超过300 g,每日尿量低于1 500 mL的患者应慎用^[23]。甘露醇作为NMM抗肿瘤DNA疫苗注射液的重要辅料,建立甘露醇的检测方法并控制该类DNA疫苗中甘露醇的含量对产品质量的可控性及临床安全性、有效性均有重要意义。

甘露醇含量的测定方法^[24-26]主要包括气相色谱-质谱法^[27]、HPLC法^[19,28]、高碘酸法^[29]、分光光度法^[30]等。本公司在研究中发现,采用高碘酸法检测NMM抗肿瘤DNA疫苗存在操作烦杂、结果重复性较差等不足,不宜用于该产品中甘露醇的质量控制。示差折光检测器为通用型检测器,理论上对样品中所有物质均有响应值,但DNA疫苗中质粒DNA在该色谱条件下未产生检测信号,可能是由于质粒DNA含量较低及示差折光

检测器灵敏度较低造成,也可能是由于质粒DNA吸附在色谱柱中,纯化水作为流动相时不能将吸附的质粒DNA进行洗脱导致无检测信号。本研究中,加样回收率为97.76%,RSD为0.97%($n=9$),符合2020年版《中国药典》的要求,质粒DNA的保留时间对甘露醇含量检测无显著影响;专属性结果显示,甘露醇特征峰不受DNA质粒拓扑异构结构的影响;甘露醇进样质量浓度为2 mg/mL,高于该方法的定量限13.37 $\mu\text{g/mL}$,且位于线性范围的中位数,检测结果可信度较高。

综上所述,本研究中建立的方法操作简便、重复性好、结果准确,可用于NMM抗肿瘤DNA疫苗中甘露醇的含量测定。

参考文献

- [1] 固安鼎泰海规生物科技有限公司. 一种抗肿瘤重组NMM融合抗原质粒DNA疫苗:CN109081873A[P]. 2018-12-25.
- [2] WANG Y, SONG WW, XU Q, et al. Adjuvant DNA vaccine pNMM promotes enhanced specific immunity and anti-tumor effects[J]. Human Vaccines & Immunotherapeutics, 2023, 19(1): 2202127.
- [3] COBAN C, KOBITAMA K, AOSHI T, et al. Novel strategies to improve DNA vaccine immunogenicity[J]. Current Gene Therapy, 2011, 11(6): 479-484.
- [4] 李亮,柳方方,宛煜嵩,等. 基于色谱法的超螺旋质粒DNA纯化与分析进展[J]. 分析测试学报, 2014, 33(9): 1089-1094.
- [5] 哈小琴,吴祖泽,张庆林,等. 质粒超螺旋比例对其细胞转染效率及表达的影响[J]. 生物技术通讯, 2005, 16(4): 392-394.
- [6] 胡春生,张庆林,张通. 基因治疗用质粒DNA生产面临的问题及研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(4): 119-123.
- [7] SHEETS R, KANG HN, MEYER H, et al. WHO informal consultation on the guidelines for evaluation of the quality, safety, and efficacy of DNA vaccines, Geneva, Switzerland, December 2019[J]. NPJ Vaccines, 2020, 5(1): 52.
- [8] 陈鸣晓. 治疗用超螺旋DNA质粒的纯化与质量控制[D]. 上海:上海交通大学, 2018.
- [9] 国家药品监督管理局药品审评中心. 体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)[A/OL]. (2022-05-31) [2023-02-13]. <https://www.cde.org.cn/zdyz/domesticinfopage?zdyzIdCODE=c78a179af7edac00e6d8893dcdfe01f>.
- [10] 孟淑芳,王佑春,吴雪伶,等. CAR-T细胞治疗产品质量控制检测研究及非临床研究考虑要点[J]. 中国药事, 2018, 32(6): 829-852.
- [11] 豆敏华,朱冰美,宗伟英,等. 建立CAR-T细胞治疗产品质量控制检测方法及其定量参考品的数字PCR方法研究[J]. 中国新药杂志, 2021, 30(24): 2306-2314.
- [12] 石燕飞,饶桂荣,黄彬,等. 治疗性双质粒HBV DNA疫苗制剂的稳定性[J]. 中国生物制品学杂志, 2017, 30(1): 43-48.
- [13] 周志平,韩斌,董洁,等. ACYW135群脑膜炎球菌多糖疫苗中乳糖含量测定[J]. 今日药学, 2020, 30(8): 541-543.
- [14] 张晋,崔子豪,白亮,等. 无明胶保护剂冻干乙型脑炎灭活疫苗(Vero细胞)稳定性研究[J]. 国际生物制品学杂志, 2013, 36(4): 173-176.
- [15] 马超,路俭,孙燕,等. 冻干人用狂犬病疫苗(Vero细胞)稳定剂配方的筛选[J]. 微生物学免疫学进展, 2016, 44(1): 28-31.
- [16] LEE YC, NELSON J, SUEDE K, et al. The protective effect of lactose on lyophilization of CNK-20402[J]. AAPS Pharm Sci Tech, 2005, 6(1): E42-E48.
- [17] 赵慧,王董云,吴珺. 甘露醇原料药及其制剂中甘露醇的高效液相色谱-电喷雾检测器分析方法[J]. 中国药业, 2022, 31(11): 79-82.
- [18] CABALLERO ML, KRANTZ MS, QUIRCE S, et al. Hidden Dangers: Recognizing Excipients as Potential Causes of Drug and Vaccine Hypersensitivity Reactions[J]. J Allergy Clin Immunol Pract, 2021, 9(8): 2968-2982.
- [19] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2020: 140.
- [20] 杨晓明. 当代新疫苗(第2版)[M]. 北京:高等教育出版社, 2020: 107.
- [21] 柯尊阳,孔垂占,于继云,等. 可复制型DNA疫苗生产用工程菌的筛选[J]. 中国科技论文在线精品论文, 2022, 15(3): 311-317.
- [22] 王炯,吴浩飞,闭兰,等. 冻干龋齿DNA疫苗稳定性观察[J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(9): 1206-1208.
- [23] 熊斌. 甘露醇治疗急性脑血管意外并发急性肾功能衰竭病因分析[J]. 中国医药指南, 2011, 9(4): 104-105.
- [24] 陈毅坚,张灼. 示差折光检测-高效液相色谱内标法测定虫草中的甘露醇[J]. 光谱实验室, 2004, 21(3): 492-494.
- [25] 杨昕,涂秩平,李高. HPLC-ELSD法测定不同来源人工蛹虫草子实体中甘露醇的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(10): 1668-1671.
- [26] 李爱欣,周贤,翁丽丽,等. 星裂硬皮马勃不同部位甘露醇含量的高效液相色谱-示差折光检测[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(9): 2067-2068.
- [27] 许丽卫,陈闻,耿梅梅,等. 气相色谱-质谱联用法测定山羊血浆中甘露醇和乳糖含量[J]. 动物营养学报, 2020, 32(6): 2824-2830.
- [28] 顾晓风,李玥琦,田沛霖,等. 高效液相色谱-电喷雾检测器法测定甲钴胺注射液中甘露醇含量[J]. 中国药业, 2023, 32(2): 75-78.
- [29] 余炜,伍时华,张英,等. 甘露醇测定方法的研究[J]. 广西民族师范学院学报, 2012, 29(3): 19-23.
- [30] 焦锐,邹翔,王英. 分光光度法测定海产藻类中甘露醇的含量[J]. 连云港师范高等专科学校学报, 2016, 33(1): 106-108.

(收稿日期:2023-03-16;修回日期:2023-08-18)