

核磁共振技术在 A 群 C 群脑膜炎球菌荚膜多糖 质量控制中的应用

马庆华¹, 朱向国¹, 郑佳¹, 扶暉^{*2, 1}

(1.北京智飞绿竹生物制药有限公司, 北京 100176; 2.北京大学分析测试中心, 北京 100871)

摘要: 荚膜多糖是 A 群 C 群脑膜炎球菌多糖疫苗的主要抗原成分, 对其结构的常规质控方法均为化学法。这两种多糖的天然构象中均存在氧乙酰化, 且有两个氧乙酰化位点, 常规方法只能测定出氧乙酰基的总含量, 但并不清楚多糖结构中不同位点各自氧乙酰化的占比。通过核磁共振氢谱对多糖及水解后的多糖进行表征测试, 得到清晰的谱图, 通过指认和计算, 准确得到了二种糖氧乙酰化的具体情况, 为其质量控制提供了新的手段。

关键词: 核磁共振; 氢谱; 荚膜多糖; 脑膜炎; 质量控制

Application of nuclear magnetic resonance technology in the quality control of meningococcal group A and C capsular polysaccharides

Ma Qinghua¹, Zhu Xiangguo¹, Zheng Jia¹, Fu Hui^{*2}

(1.Beijing Zhifei Lvzhu Biological Products Co.,Ltd,Beijing 100176, China ;2. Analysis and Testing Center, Peking University, Beijing, 100871, China)

Abstract: Capsular polysaccharide is the main antigenic component of meningococcal group A and group C polysaccharide vaccine. The conventional quality control method for its structure is chemical method. There is O-acetylation in the native conformation of these two polysaccharides, and conventional methods can only measure the content of O-acetyl group. However, the respective O-acetylation ratios of C3 and C4 in the structure of group A polysaccharides and the respective O-acetylation ratios of C7 and C8 in the structure of group C polysaccharides are not clear. The characteristics of raw sugar and hydrolyzed polysaccharide were tested by nuclear magnetic resonance spectroscopy, and clear spectra were obtained. Through identification and calculation, the specific conditions of O-acetylation of the two sugars were accurately obtained, which provided a new means for their quality control.

Keywords: NMR; proton spectrum; Capsular polysaccharide; Meningitis; Quality control

¹通讯作者: 扶暉 北京大学分析测试中心 fuhui@pku.edu.cn

1 引言

荚膜是某些细菌表面的特殊结构，是位于细胞壁表面的一层松散的粘液物质，荚膜的成分因不同菌种而异，荚膜对细菌的生存具有重要意义，细菌不仅可利用荚膜抵御不良环境；保护自身不受白细胞吞噬；而且能有选择地黏附到特定细胞的表面上，表现出对靶细胞的专一攻击能力。组成细菌荚膜的多糖大都有良好的免疫原性且不易变异，能诱导特异性免疫应答，产生有效的保护性抗体。上世纪 30 年代，国外科学家发现肺炎球菌荚膜多糖在人体中具有免疫原性，二战中因为青霉素的出现，一定程度上延迟了多糖疫苗的发展，在 1978 年国外学者开发出了第一款四价流脑多糖疫苗。其中，A 群脑膜炎奈瑟菌荚膜多糖具有多聚氮乙酰甘露糖胺磷酸盐(ManNAc-6-P) (见图 1)，C 群脑膜炎奈瑟菌荚膜多糖是多聚 N-乙酰神经氨酸(Neup5Ac, NANA) (见图 2) [1,2,3]，氧乙酰基是其重要免疫原性表位[4]。脑膜炎球菌多糖质量控制方法通常包括化学法、免疫学法、生物学法和微生物法，其中，化学法主要针对的是多糖中杂质含量以及多糖结构的表征，通过测定磷含量、唾液酸含量、分子大小测定、氧乙酰基含量等得到各组分多糖抗原的结构及含量信息[5]。本文所做研究包括运用核磁共振技术对其中 A、C 两种多糖的结构进行确认，对与免疫原性相关的氧乙酰基含量进行测定以及多糖制备工艺中使用的有机溶剂的残余情况，通过这三方面的研究考察生产工艺的一致性。

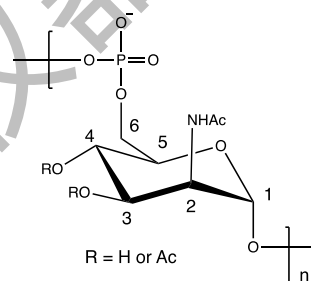


图 1 A 群脑膜炎球菌多糖重复单元结构

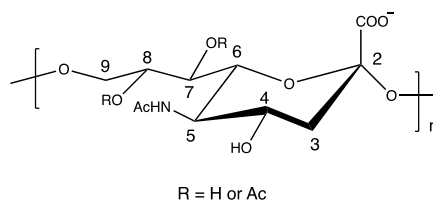


图 2 C 群脑膜炎球菌多糖重复单元结构

2 材料与amp;方法

2.1 超导核磁共振波谱仪(AVANCE III 600M)

主要工作参数：

- (1) 探头: 5 mm CP BBO 600S3 BB-H&F-D-05Z
- (2) 氢谱: 600 MHz; ^1H 灵敏度 ≥ 2700 ; ^1H 分辨率: 0.8 Hz
- (3) 碳谱: 150 MHz; ^{13}C 灵敏度 ≥ 1600 ; ^{13}C 分辨率: 0.3 Hz

2.2 A、C 群脑膜炎奈瑟菌荚膜多糖

20180311A-1、20180312A-2、20180313A-2、20180704C、20180705C、20180706C 均为北京智飞绿竹生物制药有限公司提供。

2.3 实验方法

2.3.1 取约 3-5mg 样品装入内径 5 mm 的核磁管, 向核磁管中加入约 0.5 mL 重水。样品溶解后将样品核磁管放入磁体, 依序进行谱仪的锁场、调谐和匀场。按照检测项目的不同, 设置合适的实验参数, 采样, 将所得到的 FID 信号进行傅里叶变换、相位校正、基线校正、标峰、积分等处理。

2.3.2 如需对样品进行水解和测试, 则在完成其它测试后, 向对应的核磁样品管中加入适量的 40% 氘代氢氧化钠重水溶液, 使得核磁管中碱浓度约为 100-200 mM。震荡摇匀并放置一段时间, 使样品去氧乙酰化反应完全。将水解后的样品再次放入磁体, 重复上述采样及处理步骤, 得到去氧乙酰化后的核磁谱图。

2.3.3 氢谱的检测使用脉宽为 30 度的单脉冲序列, 采样时间为 4.2 秒, 弛豫延时为 10 秒。所有氢谱谱图中定重水的溶剂残余峰的化学位移值为 4.70。

3 结果与讨论

3.1 A 群、C 群脑膜炎球菌多糖氢谱结果

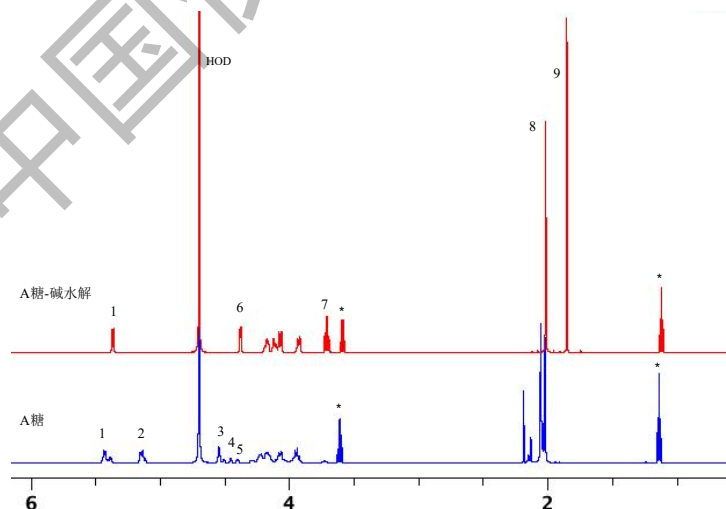


图3 A 群脑膜炎球菌多糖核磁氢谱。a: 原样; b: 去氧乙酰化后。其中各数字对应峰组的归属: 1: H1; 2: 3/4 位氧乙酰化的 H3/H4; 3: H2 (3 位氧乙酰化); 4: H2 (4 位氧乙酰化); 5: H2 (3/4 位未氧乙酰化); 6: H2; 7: H4; 8: 氮乙酰基的甲基; 9: 碱水解后产生的醋酸根的甲基。

图 3 为样品 A 群脑膜炎球菌多糖的氢谱，原样和去氧乙酰化后谱图的峰型和化学位移值均与文献报道中 A 群脑膜炎球菌多糖的谱图相似^[6,7]。图 4 为样品 C 群脑膜炎球菌多糖的氢谱，原样和去氧乙酰化后谱图的峰型和化学位移值均与文献报道中 C 群脑膜炎球菌多糖的谱图相似^[6,7]。

在原样中加入氘代氢氧化钠进行去氧乙酰化反应。去氧乙酰化反应在室温下完全完成，去氧乙酰后多糖氢谱的谱峰变尖锐，谱图变得相对简单（见图 3 和图 4）。

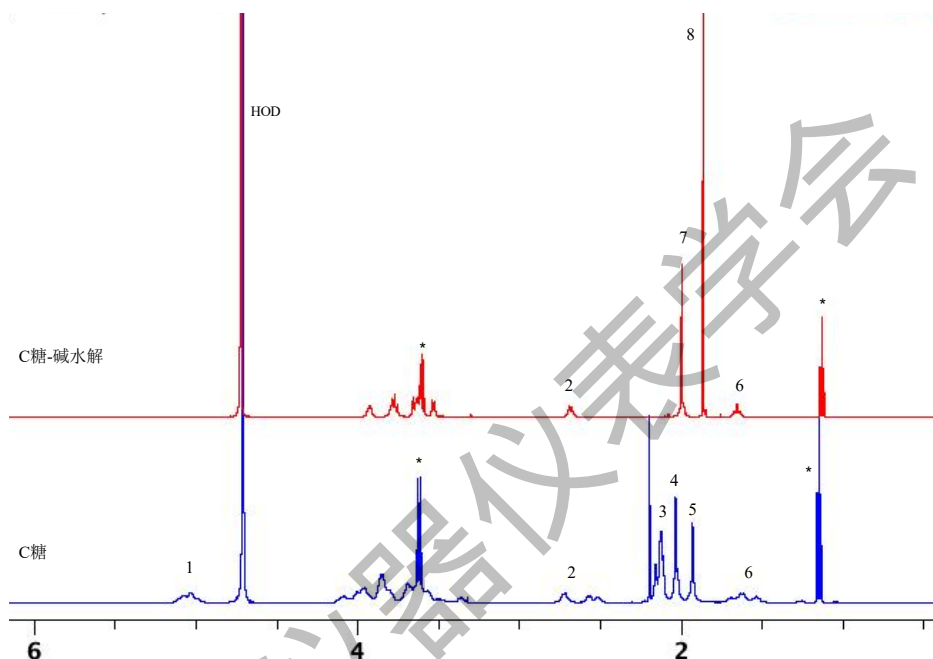


图 4 C 群脑膜炎球菌多糖的核磁氢谱。a：原样；b：去氧乙酰化后。其中各数字对应峰组的归属（*号标示的是杂质乙醇）：1：氧乙酰取代的 H7/H8；2：H3eq；3：氧乙酰的甲基；4：非 7 位氧乙酰的氮乙酰的甲基；5：7 位氧乙酰的氮乙酰的甲基；6：H3ax；7：氮乙酰的甲基；8：乙酸根中-CH₃。

3.2 样品中氧乙酰含量的计算^[6,7]

（1）根据图 3 谱峰的归属，A 群脑膜炎球菌多糖的氧乙酰化含量计算方法为：

方法 1：氧乙酰化的 H-3+H-4 峰面积/全部 H1 的峰面积，即 A_2/A_1 ；

方法 2：加碱去氧乙酰化后乙酸根-CH₃ 峰面积/去氧乙酰化后 A 糖 H-1 的峰面积，即 $A_9/3A_1$ 。

通过表 1 可以看到，两种计算方法得到的氧乙酰化含量接近。A 群脑膜炎球菌多糖的氧乙酰化含量为 83-91%。

表 1 A 群脑膜炎球菌多糖的氧乙酰含量

样品编号	氧乙酰含量 (A_2/A_1)	氧乙酰含量 ($A_9/3A_1$)	3 位氧乙酰含 量	4 位氧乙酰含 量

			(A3/A1)	(A4/A1)
20180311A-1	83.4%	85.1%	66.8%	15.8%
20180312A-2	90.7%	90.9%	75.9%	12.6%
20180313A-2	89.7%	90.1%	76.8%	11.1%

(2) 根据图 4 谱峰的归属，C 群脑膜炎球菌多糖的氧乙酰化含量计算方法为：加碱去氧乙酰化后乙酸根-CH₃ 的峰面积/去氧乙酰化后 C 糖 H-3eq 的峰面积 (A8/3A2)。C 群脑膜炎球菌多糖的氧乙酰化含量大于 90%。

表 2 C 群脑膜炎球菌多糖的氧乙酰化含量

样品编号	氧乙酰化含量	7 位氧乙酰化含量
	(A8/3A2)	(A5/3A2)
20180704C	91.7%	39.5%
20180705C	92.7%	27.4%
20180706C	93.5%	33.4%

3.3 氧乙酰化位点含量计算

A 群脑膜炎球菌多糖和 C 群脑膜炎球菌多糖特定位点的羟基存在氧乙酰化，具体位点见前面两种多糖结构单元的结构式。氧乙酰化位点的不同会在核磁氢谱中产生特征峰，同时也会使核磁谱图变复杂。通过指认识别出分辨率好、不受其他谱峰干扰的特征峰，可以计算出不同位点氧乙酰化的程度。表 1 和表 2 可以看到不同批次的 A 群脑膜炎球菌多糖和 C 群脑膜炎球菌多糖，其不同位点氧乙酰化含量有较大的区别。

4 结论

结构是多糖活性的基础，氧乙酰化甚至氮乙酰化都是众多细菌荚膜多糖的重要属性，和其他众多指标一样关系到疫苗产品的有效性和产品生产的一致性。不同的氧乙酰化位点也会导致 C 群脑膜炎球菌荚膜多糖免疫原性的差异。核磁共振氢谱可为多糖的结构分析提供有用的信息，该技术对细微的结构变化敏感，在细菌荚膜多糖的质量控制中可以取代一些传统测量方法，提供更准确的质量控制数据。

参考文献:

- [1]Jennings H, Bhattacharjee AK, Bundle DR, Kenny CP, Martin A, Smith ICP. Structures of the capsular polysaccharide of *Neisseria meningitidis* as determined by ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Infect Dis* 1977;136: S78–83.

- [2] Jones C, Lemercinier X. Use and validation of NMR assays for the identity and O-acetyl content of capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* used in vaccine manufacture. *J Pharm Biomed Anal* 2002;30:1233–47.
- [3] Ravenscroft N, Wheeler JX, Jones C. Bioanalysis of meningococcal vaccines. *Bioanalysis* 2010;2:343–61.
- [4] Berry DS et al. Effect of O acetylation of *Neisseria meningitidis* serogroup A capsular polysaccharide on development of functional immune responses. *Infect Immun*, 2002, 70: 3707- 3713.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [S] 2020 年版. 三部. 中国医药科技出版社, 2020: ACYW135 群脑膜炎球菌多糖疫苗.
- [6] Lemercinier, X.; Jones, C., Full ^1H NMR assignment and detailed O-acetylation patterns of capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* used in vaccine production. *Carbohydrate Research* **1996**, 296 (1-4), 83-96.
- [7] Jones, C.; Lemercinier, X., Use and validation of NMR assays for the identity and O-acetyl content of capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* used in vaccine manufacture. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2002, 30 (4), 1233-1247.
- [8] 房明. 细菌多糖中氧乙酰基特性的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2015, 43(6), 63-66.