

幽门螺杆菌脂多糖抗原表位片段的化学合成及抗体亲和力研究

赵慧^{1#}, 邹小鹏^{1#}, 肖蕾¹, 胡静^{2*}, 尹健^{1,3**}

(¹ 江南大学生物工程学院糖化学与生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122; ² 江南大学无锡医学院, 无锡 214122; ³ 江南大学生命科学与健康工程学院, 无锡 214122)

摘要 幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 是引发慢性胃炎、消化性溃疡, 甚至胃癌的重要致病菌, 目前尚无上市预防或治疗 Hp 感染的疫苗。本研究通过化学法合成了 Hp 脂多糖核心寡糖中不同链长的 α -1,6-葡聚糖片段 (二糖至六糖), 使用基于酰基远程参与作用和溶剂效应的协同糖基化策略成功构建了 1,2-顺式-糖苷键。糖芯片筛选结果显示, 脂多糖免疫兔血清和患者血清中的 IgG 抗体均能与合成的 α -1,6-葡聚糖片段结合; 脂多糖免疫兔血清 IgG 抗体与 α -1,6-葡聚三糖具有较强的结合能力; 绝大多数 Hp 感染患者血清 IgG 抗体能够很好地识别 α -1,6-葡聚三糖和五糖, 部分患者血清 IgG 抗体与 α -1,6-葡聚二糖具有较强的结合作用。此研究结果表明, α -1,6-葡聚二糖、三糖和五糖可能是 Hp 脂多糖中的重要糖抗原片段。

关键词 幽门螺杆菌; 脂多糖; α -1,6-葡聚糖; 糖芯片; 抗体亲和力

中图分类号 O629.1; R914 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2024)05-0645-12

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2024031201

引用本文 赵慧, 邹小鹏, 肖蕾, 等. 幽门螺杆菌脂多糖抗原表位片段的化学合成及抗体亲和力研究 [J]. 中国药科大学学报, 2024, 55(5): 645–656.

Cite this article as: ZHAO Hui, ZOU Xiaopeng, XIAO Lei, *et al.* Chemical synthesis and antibody affinity of epitope fragments from *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide[J]. *J China Pharm Univ*, 2024, 55(5): 645–656.

Chemical synthesis and antibody affinity of epitope fragments from *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide

ZHAO Hui^{1#}, ZOU Xiaopeng^{1#}, XIAO Lei¹, HU Jing^{2*}, YIN Jian^{1,3**}

¹Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology (Ministry of Education), School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122; ²Wuxi School of Medicine, Jiangnan University, Wuxi 214122; ³School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract *Helicobacter pylori* (Hp) is responsible for chronic gastritis, peptic ulcers, and even gastric cancers. Currently, there is no vaccine to prevent or treat Hp infections. Here, we described the chemical synthesis of α -1,6-glucans with different lengths (di- to hexasaccharide), which are present in the core oligosaccharide of Hp lipopolysaccharide (LPS). The 1,2-*cis*-glucosidic bonds were constructed successfully using a synergistic glycosylation strategy based on acyl remote participation and solvent effects. The results of glycan microarrays indicated that all synthesized α -1,6-glucan fragments possessed a strong binding to IgG antibodies in both rabbit serum immunized with Hp O1 LPS and patient serum infected with Hp. The α -1,6-linked trisaccharide exhibited strong binding affinity to anti-LPS rabbit IgG antibodies. The α -1,6-glucan trisaccharide and pentasaccharide elicited a strong response to IgG antibodies in sera of most Hp-infected patients. Some patients' sera exhibited strong binding activity with α -1,6-linked disaccharide. The results suggest that the α -1,6-glucan disaccharide,

收稿日期 2024-03-12 通信作者 *Tel: 0510-85197039 E-mail: hujing@jiangnan.edu.cn

**Tel: 0510-85328229 E-mail: jianyin@jiangnan.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 22207042, No. 22177041, No. 22277042, No. 22325803); 江南大学糖化学与生物技术教育部重点实验室开放课题 (No. KLCCB-KF202203)

[#]赵慧和邹小鹏为共同第一作者

trisaccharide and pentasaccharide could be important carbohydrate antigen fragments in Hp lipopolysaccharide.

Key words *Helicobacter pylori*; lipopolysaccharide; α -1,6-glucan; glycan microarray; antibody affinity

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 22207042, No. 22177041, No. 22277042, No. 22325803); and the Open Project of Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology (Ministry of Education), Jiangnan University (No. KLCCB-KF202203)

*ZHAO Hui and ZOU Xiaopeng contributed equally to this work

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是一种螺旋弯曲状且含有多条鞭毛的革兰氏阴性菌,通常定植于人类的胃上皮细胞^[1]。全球 44 亿以上人口感染了 Hp,感染率超过 50%^[2]。长期感染 Hp 会导致慢性胃炎、消化性溃疡、黏膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤,甚至胃癌等疾病^[3-4]。早在 1994 年,世界卫生组织就将 Hp 定义为 I 级致癌物^[5-6]。2021 年,美国卫生与公众服务部在第 15 版致癌物报告中又将 Hp 列为明确致癌物^[7]。目前治疗 Hp 感染主要使用以抗生素为主的三联疗法[阿莫西林、质子泵抑制剂(PPI)和克拉霉素或甲硝唑]或含铋制剂的四联疗法(PPI、甲硝唑、铋剂和四环素)^[8-9]。由于抗生素的广泛使用而导致细菌耐药性的增强,使用抗生素去除 Hp 的效率大大降低,在一些经济相对落后的地区, Hp 根除率下降至 80% 以下^[10-12]。因此研究 Hp 感染的替代疗法十分迫切,开发 Hp 疫苗被认为是一种安全、有效的预防和治疗 Hp 感染的手段^[13-14]。近几十年来,各国学者在 Hp 疫苗的开发研究中做了许多工作并取得了重要进展。目前 Hp 疫苗中的保护性抗原研究主要集中在灭活全菌、尿素酶(Ure)、空泡毒素(VacA)、毒素相关蛋白 A(CagA)、热休克蛋白(Hsp)、中性粒细胞激活蛋白(NAP)、脂多糖等^[15]。大多数候选疫苗在动物实验中表现出较好的保护效果,但在临床试验中未能提供有效的保护作用^[16]。Zeng 等^[17]设计了一种含有尿素酶 B 亚基和不耐热肠毒素 B 亚基新型口服重组疫苗,在 III 期临床中显示出 71.8% 的保护效力,并可提供长达 3 年的持续性保护。然而,至今还没有用于预防和治疗的 Hp 疫苗上市。

细菌表面的脂多糖或荚膜多糖是重要的毒力因子,能够引发宿主的免疫反应,然而单独的糖物质通常是 T 细胞非依赖性抗原,不能在机体中(特别是两岁以下的婴幼儿)引发持续的免疫反应及免疫记忆^[18-20]。将多糖或者寡糖通过共价键与载体蛋白[破伤风类毒素(TT)、白喉毒素突变体

CRM197 等]偶联制成的糖-蛋白缀合物为 T 细胞依赖性抗原,可引发机体产生特异性的 IgG 抗体和激活记忆细胞^[21-22]。针对肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*)和 b 型流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae type b*, Hib)的糖缀合物疫苗已经批准上市,这些糖缀合物疫苗的使用有效遏制了肺炎、脑膜炎、菌血症等疾病的发生^[23]。

目前,大部分多糖蛋白结合疫苗中的糖抗原依赖于从细菌表面提取得到,存在细菌培养困难、关键抗原表位易丢失及提取多糖结构不均一等问题,限制了糖疫苗品质的提升^[24]。化学合成法不仅可以制备结构明确、均一的致病菌表面寡/多糖抗原,为进一步深入探究结构与免疫活性之间的关系提供物质基础,还可对糖抗原结构进行不同的官能团修饰,提高糖链的稳定性及免疫活性^[25]。

Hp 的脂多糖与其他革兰氏阴性菌相似,由类脂 A、结构保守的核心寡糖和 O-抗原 3 部分组成(图 1-A),其中核心寡糖包含一条 α -1,6-葡聚糖链,不同菌株的 α -1,6-葡聚糖链长度不同,平均含 3~4 个葡萄糖残基^[26-27]。Monteiro 等^[28]证明提取的 Hp 脂多糖与牛血清蛋白(BSA)结合制成的糖缀合物可以在小鼠中引起强烈的免疫反应,诱导产生的 IgG 和 IgM 抗体可与脂多糖核心结构及其他血清型脂多糖产生交叉反应。Harrison 等^[29]制备了抗 α -1,6-葡聚糖单克隆抗体,发现其对含有 α -1,6-葡聚糖链的 Hp 脂多糖表现出极好的特异性结合能力。近期 Altman 等^[30]通过化学酶法合成了 α -1,6-葡聚糖的混合物,将其与 BSA 或 TT 载体蛋白偶联后在小鼠和兔体内诱导了具备交叉反应能力的 IgG 抗体。2022 年,本课题组使用化学法合成了 Hp 脂多糖结构中的核心十一糖、外核心八糖、外核心五糖、内核心三糖、磷酸化内核心三糖及 α -1,6-葡聚三糖,并使用糖芯片技术对合成寡糖的抗体亲和力进行评估。实验结果表明 α -1,6-葡聚三糖对大

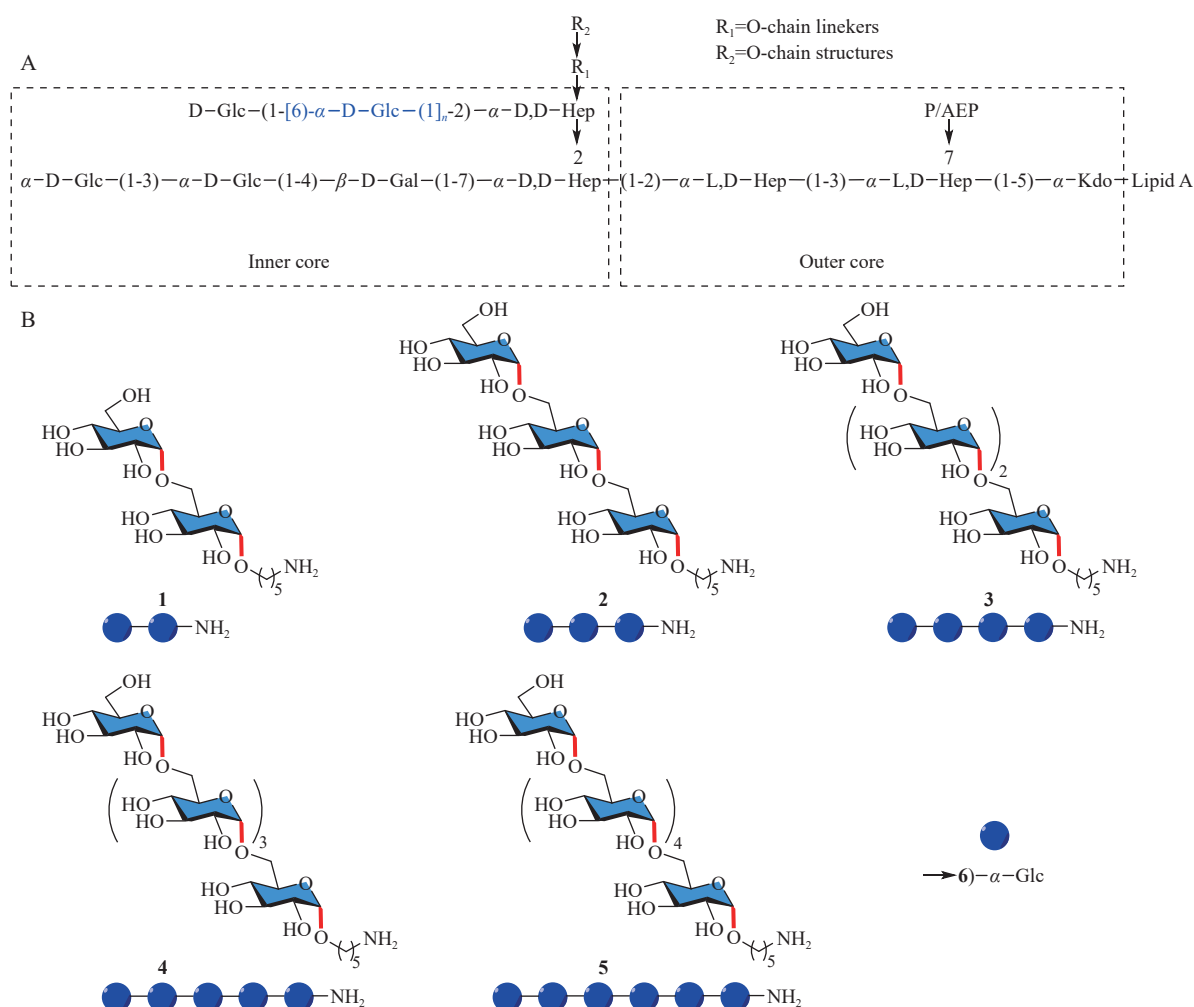


Figure 1 *Helicobacter pylori* (Hp) lipopolysaccharide (LPS) and target oligosaccharides

A: General structure of Hp LPS (P: phosphate group; AEP: 2-aminoethylphosphate; Glc: glucose; Gal: galactose; D,D-Hep: D-glycero-D-manno-heptose; L,D-Hep: L-glycero-D-manno-heptose; Kdo: 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid; $n = 3-4$ (average)); B: Target α -1,6-glucans 1-5

部分 Hp 感染患者血清 IgG 抗体表现出良好结合能力, 此研究证明 α -1,6-葡聚糖可能是 Hp 脂多糖重要的抗原表位^[31]。

基于上述研究背景, 为进一步明确 α -1,6-葡聚糖糖链长度与抗体亲和力之间的构效关系, 本研究通过化学法合成结构明确的 α -1,6-葡聚二糖、三糖、四糖、五糖、六糖(图 1-B), 利用糖芯片技术, 探究不同链长 α -1,6-葡聚糖与 Hp O1、O2 和 O6 血清型脂多糖免疫血清抗体及 Hp 感染患者血清抗体的结合能力。

1 合成路线

1.1 单糖砌块的合成

单糖供体 7 和受体 10 的合成如路线 1 所示, 以已报道的化合物 6^[32] 为起始原料, 在 *N*-碘代琥珀

酰亚胺(NIS)的作用下, 水解端基位的 4-甲基苯硫基(STol)得到半缩醛中间体, 而后半缩醛中间体与 2,2,2-三氟-*N*-苯基亚氨代乙酰氯在 1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯(DBU)催化作用下反应生成 *N*-苯基三氟乙酰亚胺酯供体 7。以三氟甲磺酸三甲基硅脂(TMSOTf)作为催化剂, 糖基供体 7 与五碳氨基连接臂 8 进行糖基化反应得到化合物 9。在甲醇钠的作用下, 化合物 9 脱去 C⁶ 号位苯甲酰基, 生成单糖受体 10。

1.2 寡糖 1~5 的合成

如路线 2-A 所示, 糖基供体 7 和受体 10 在 TMSOTf 的催化作用下进行糖基化实现了二糖 11 的合成。在甲醇钠的条件下, 脱除二糖 11 非还原端糖环上的 C⁶ 苯甲酰基, 得到二糖受体 12。在相同的糖基化条件下将供体 7 与受体进行偶联, 得到

的化合物继续与甲醇钠反应脱除 C⁶ 位苯甲酰基, 重复该步骤实现糖链延长, 制备寡糖 **14**、**16**、**18**、**20**。如路线 2-B 所示, 使用甲醇、四氢呋喃、水和乙酸作为溶剂, 在氢气和钯碳(Pd/C)的催化作用下脱除寡糖上的苄基和苄氧羰基得到目标寡糖 **1**~**5**。

2 实验部分

2.1 试剂及仪器

2.1.1 试剂 本研究所使用的化学试剂均为市售分析纯, 使用时无进一步纯化; 除非另有说明, 反应均在氮气或氩气保护下进行, 反应中添加的 4Å 分子筛使用微波炉进行活化, 石油醚和乙酸乙酯经过蒸馏纯化后用于硅胶柱色谱, 二氯甲烷、乙醚、*N,N*-二甲基甲酰胺等溶剂经溶剂干燥系统处理后使用。使用薄层色谱法(TLC)监测反应进程, TLC 在 254 nm 的紫外光下检测后, 用 CAM 显色剂进行显色, 200~300 目硅胶用于硅胶柱色谱。

硅胶板、硅胶(青岛海洋化工有限公司); 离子交换树脂(百灵威化学技术有限公司); 牛血清蛋白(上海源叶生物科技有限公司); 糖芯片玻片(Surmodics 公司); 钯碳催化剂、Sephadex LH-20 凝胶、Cy3 偶联的山羊抗人 IgG 抗体、Alexa Flour 532 偶联的山羊抗兔 IgG 抗体(Sigma-Aldrich 公司)。

2.1.2 仪器 MBraun MB-SPS 800 溶剂干燥系统(德国 Mbraun 公司); Avance III 400 MHz、Avance III 600 MHz 核磁共振仪(德国 Bruker 公司); Agilent 6220 高分辨质谱仪(美国 Agilent 公司); ultrafleXtreme 激光解析电离串联飞行时间质谱仪(美国 Bruker 公司); UniPo1 L 1000 全自动旋光仪(德国 Schmidt & Haensch 公司); ZR-3 中压氢化仪(北京佳维科创科技有限公司); FreeZone 6

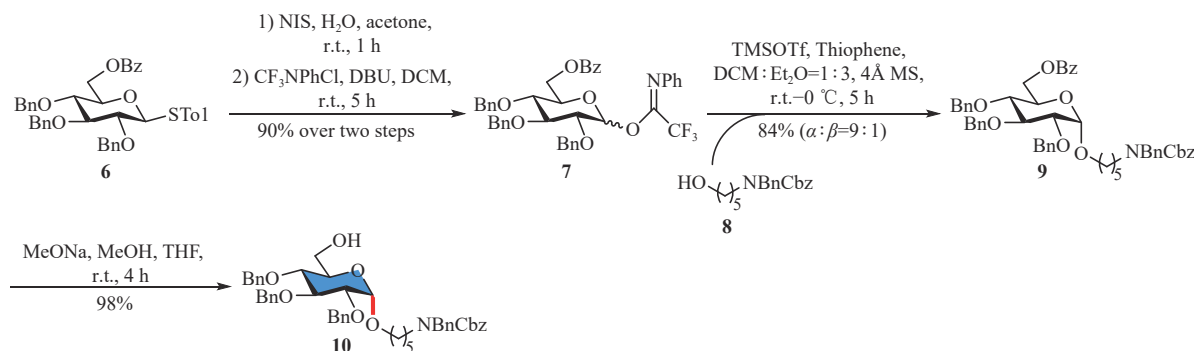
plus 冷冻干燥机(美国 Labconco 公司); Electro-X 多功能生物芯片点样仪(江苏瑞明生物科技有限公司); LuxScan 10K/B 微阵列芯片扫描仪(成都博奥晶芯生物科技有限公司)。

2.2 化学合成

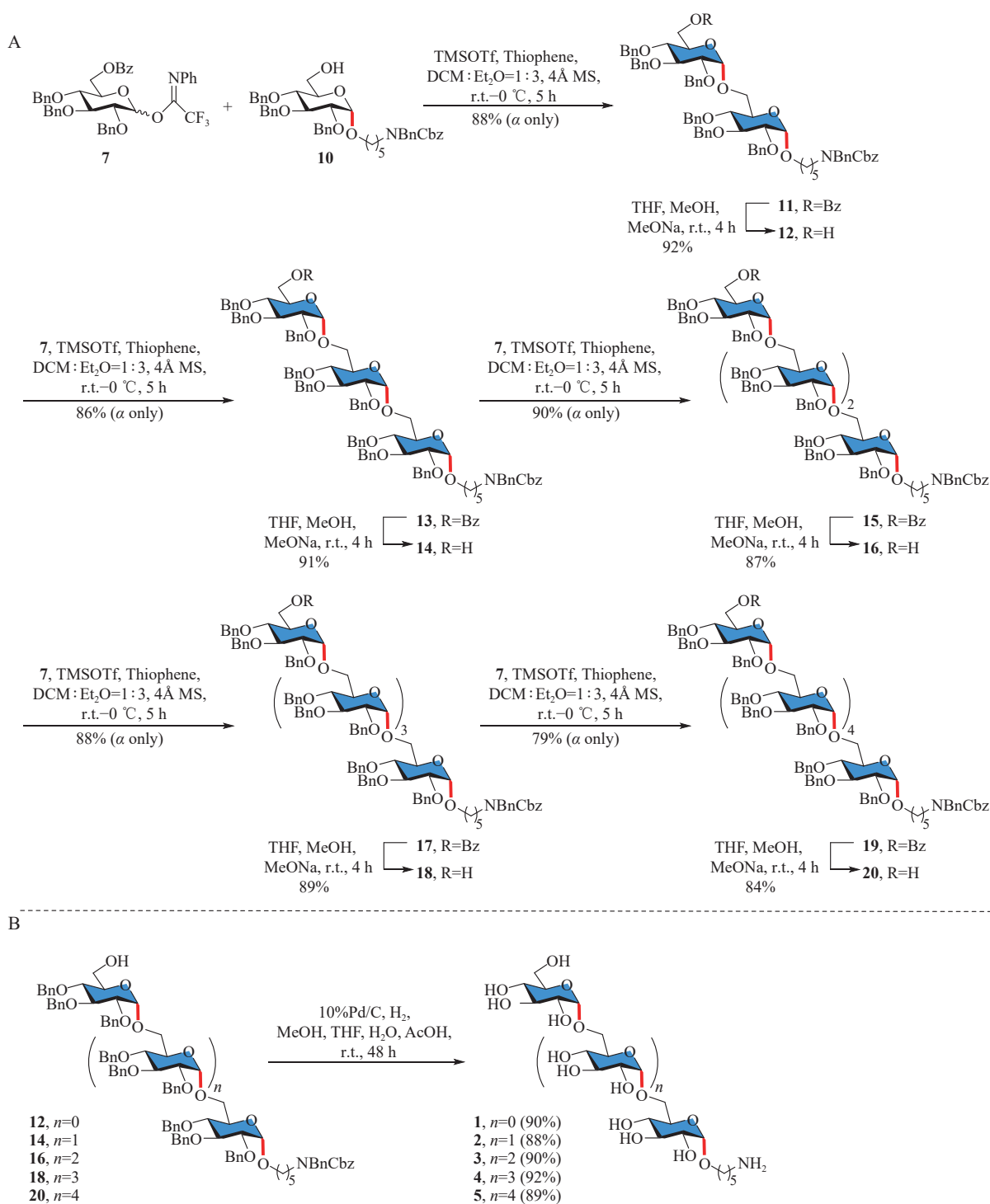
2.2.1 单糖 **7 的合成** 将化合物 **6** (4.71 g, 7.13 mmol) 溶解于丙酮-水 (10:1, 71 mL) 溶液中, 加入 NIS (4.81 g, 21.4 mmol) 并在室温下搅拌 1 h, 使用二氯甲烷对反应液进行稀释并用 0.1 g/mL 硫代硫酸钠洗涤, 有机相经无水硫酸钠干燥后减压浓缩, 粗产物通过硅胶柱色谱(石油醚-乙酸乙酯, 6:1)纯化, 得到半缩醛中间体 (3.56 g, 6.42 mmol)。将半缩醛中间体 (500 mg, 0.90 mmol) 溶于二氯甲烷 (9.0 mL) 中, 冷却至 0 °C 后, 加入 2,2,2-三氟-*N*-苯基氨基代乙酰氯 (0.7 mL, 4.50 mmol) 和 DBU (0.4 mL, 2.70 mmol), 将反应液恢复至室温继续搅拌 5 h, 浓缩后使用硅胶柱色谱(石油醚-乙酸乙酯, 30:1)进行纯化得到白色浆状供体 **7** (653 mg, 0.90 mmol), 两步总收率 90%。结构鉴定数据与报道文献一致^[33]。

2.2.2 单糖 **9 的合成** 在氩气保护下, 将供体 **7** (1.50 g, 2.07 mmol) 和连接臂 **8** (1.02 g, 3.11 mmol) 溶于无水二氯甲烷-无水乙醚 (1:3, 69 mL) 中, 加入活化的 4Å 分子筛和噻吩 (2.5 mL, 31.1 mmol), 反应液在室温下搅拌 0.5 h。冷却至 0 °C, 滴加 TMSOTf (56 μL, 0.31 mmol), 继续在 0 °C 下搅拌 4 h。使用三乙胺淬灭反应, 经硅藻土过滤, 用二氯甲烷稀释和饱和碳酸氢钠水溶液洗涤, 经无水硫酸钠干燥后减压浓缩。粗产物通过硅胶柱色谱(石油醚-乙酸乙酯, 12:1)纯化, 得到白色浆状物 **9** (1.50 g, 1.74 mmol), 收率 (84%, $\alpha:\beta=9:1$)。结构鉴定数据与报道文献一致^[34]。

2.2.3 单糖 **10 的合成** 将化合物 **9** (2.07 g, 2.40



Scheme 1 Synthesis of building blocks **7** and **10**



Scheme 2 Synthesis of oligosaccharides 1-5

mmol)溶解在甲醇-四氢呋喃(1:1, 24 mL)溶液中, 加入甲醇钠(64.8 mg, 1.20 mmol), 在室温下搅拌 4 h后, 用氢离子交换树脂调节反应液 pH 至 7 左右, 过滤并减压浓缩后, 粗产物通过硅胶柱色谱(石油醚-乙酸乙酯, 5:1)进行纯化, 得到白色浆状物 **10** (1.78 g, 2.35 mmol), 收率 98%。结构鉴定数据与报

道文献一致^[34]。

2.2.4 寡糖 11, 13, 15, 17, 19 的合成 在氩气保护下, 将受体(1.0 eq)和供体 **7** (1.5 eq)溶于无水二氯甲烷-无水乙醚(1:3, 0.03 mmol/L)中, 加入活化的 4Å 分子筛和噻吩(15 eq), 在室温下搅拌 0.5 h后, 冷却至 0 °C 并滴加 TMSOTf(0.15 eq), 在 0 °C 反应

4 h 后, 加入三乙胺淬灭反应并经硅藻土过滤, 混合物使用二氯甲烷稀释和饱和碳酸氢钠水溶液洗涤, 收集的有机相用无水硫酸钠干燥并减压浓缩, 通过硅胶柱色谱(石油醚-乙酸乙酯, 8:1→5:1)进行纯化得到产物。

二糖 11 透明浆状, 收率 88%。[α]_D²⁰ = +45.32° (*c* 1.00, CHCl₃)。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 7.99~7.95 (2H, m, Ar-H), 7.55~7.50 (1H, m, Ar-H), 7.39 (2H, dd, *J* = 7.6, 7.6 Hz, Ar-H), 7.36~7.26 (23H, m, Ar-H), 7.25~7.18 (17H, m, Ar-H), 5.15 (2H, d, *J* = 16.6 Hz, CH₂-Cbz), 4.99 (1H, d, *J* = 3.4 Hz, H-1b), 4.97~4.94 (2H, m, CH₂-Bn), 4.93~4.87 (2H, m, CH₂-Bn), 4.81~4.76 (2H, m, CH₂-Bn), 4.68 (1H, d, *J* = 12.0 Hz, CH₂-Bn), 4.66~4.61 (4H, m, H-1a, CH₂-Bn), 4.59 (1H, d, *J* = 11.0 Hz, CH₂-Bn), 4.53~4.43 (4H, m, H-6b, CH₂-Bn), 4.39 (1H, dd, *J* = 11.9, 4.4 Hz, H-6b'), 4.02~3.93 (3H, m, H-3b, H-5b, H-3a), 3.85~3.80 (1H, m, H-6a), 3.79~3.73 (1H, m, H-5a), 3.71~3.63 (2H, m, H-6a', H-4b), 3.61~3.52 (3H, m, H-4a, H-2b, CH₂-Linker), 3.37 (1H, dd, *J* = 9.6, 3.6 Hz, H-2a), 3.35~3.26 (1H, m, CH₂-Linker), 3.25~3.11 (2H, m, CH₂-Linker), 1.61~1.44 (4H, m, CH₂-Linker), 1.33~1.22 (2H, m, CH₂-Linker)。¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ : 166.19, 138.94, 138.51, 138.35, 138.33, 137.98, 133.03, 129.97, 129.64, 128.53, 128.42, 128.41, 128.38, 128.35, 128.19, 127.95, 127.94, 127.85, 127.82, 127.81, 127.77, 127.71, 127.64, 127.55, 96.95 (C-1b), 96.62 (C-1a), 82.07, 81.76, 80.39, 80.19, 77.81, 77.51, 75.77, 75.62, 75.12, 75.06, 73.07, 72.31, 70.54, 68.88, 67.89, 67.13, 65.87, 63.42, 50.25, 46.31, 29.11, 28.05, 23.50。HRMS(ESI) *m/z* Calcd. for C₈₁H₈₅NO₁₄Na [M+Na]⁺ 1318.5862, Found 1318.5856。

三糖 13 透明浆状, 收率 86%。[α]_D²⁰ = +83.25° (*c* 2.00, CHCl₃)。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 7.96 (2H, d, *J* = 7.7 Hz, Ar-H), 7.52 (1H, dd, *J* = 7.4, 7.4 Hz, Ar-H), 7.38 (2H, dd, *J* = 7.7, 7.7 Hz, Ar-H), 7.35~7.26 (27H, m, Ar-H), 7.26~7.10 (28H, m, Ar-H), 5.15 (2H, d, *J* = 16.9 Hz, CH₂-Cbz), 5.04 (1H, d, *J* = 3.5 Hz, H-1c), 4.97~4.87 (7H, m, H-1b, CH₂-Bn), 4.81~4.73 (3H, m, CH₂-Bn), 4.70~4.53 (8H, m, H-1a, CH₂-Bn), 4.52~4.42 (5H, m, H-6c, CH₂-Bn), 4.38 (1H, dd, *J* = 12.0, 4.2 Hz, H-6c'), 4.01

(1H, dd, *J* = 9.2, 9.2 Hz, H-3c), 3.98~3.89 (3H, m, H-3a, H-3b, H-5c), 3.86~3.79 (2H, m, H-6a, H-6b), 3.79~3.64 (6H, m, H-4a, H-4b, H-5a, H-5b, H-6a', H-6b'), 3.63~3.50 (3H, m, H-2c, H-4c, CH₂-Linker), 3.41~3.34 (2H, m, H-2a, H-2b), 3.34~3.25 (1H, m, CH₂-Linker), 3.24~3.11 (2H, m, CH₂-Linker), 1.60~1.45 (4H, m, CH₂-Linker), 1.35~1.28 (2H, m, CH₂-Linker)。¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ : 166.18, 138.99, 138.85, 138.59, 138.55, 138.51, 138.48, 138.40, 137.98, 133.01, 129.98, 129.64, 128.52, 128.44, 128.41, 128.38, 128.36, 128.34, 128.31, 128.28, 128.19, 128.04, 127.96, 127.90, 127.86, 127.82, 127.79, 127.73, 127.66, 127.58, 127.55, 127.50, 127.48, 127.38, 97.15 (C-1b), 96.95 (C-1c), 96.71 (C-1a), 82.07, 81.68, 81.65, 80.44, 80.35, 80.26, 77.77, 77.49, 75.73, 75.58, 75.46, 75.06, 74.97, 73.09, 72.26, 72.18, 70.75, 70.68, 68.89, 67.86, 67.12, 65.77, 65.55, 63.38, 50.58, 50.27, 46.25, 29.13, 27.61, 23.52。HRMS(ESI) *m/z* Calcd. for C₁₀₈H₁₁₃NO₁₉Na [M+Na]⁺ 1750.7799, Found 1750.7794。

四糖 15 透明浆状, 收率 90%。[α]_D²⁰ = +82.11° (*c* 1.0, CHCl₃)。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 7.98~7.95 (2H, m, Ar-H), 7.54~7.49 (1H, m, Ar-H), 7.38 (2H, dd, *J* = 7.7, 7.7 Hz, Ar-H), 7.35~7.26 (31H, m, Ar-H), 7.25~7.10 (39H, m, Ar-H), 5.14 (2H, d, *J* = 13.9 Hz, CH₂-Cbz), 5.04 (1H, d, *J* = 3.5 Hz, H-1d), 4.97~4.86 (10H, m, H-1b, H-1c, CH₂-Bn), 4.80~4.72 (4H, m, CH₂-Bn), 4.69~4.56 (8H, m, H-1a, CH₂-Bn), 4.56~4.52 (2H, m, CH₂-Bn), 4.50~4.42 (6H, m, H-6d, CH₂-Bn), 4.38 (1H, dd, *J* = 11.9, 4.2 Hz, H-6d'), 4.00 (1H, dd, *J* = 9.2, 9.2 Hz, H-3d), 3.97~3.91 (3H, m, H-3a, H-3b, H-3c), 3.91~3.87 (1H, m, H-5d), 3.85~3.65 (10H, m, H-4a, H-4b, H-4c, H-5a, H-5b, H-5c, H-6a, H-6b, H-6a', H-6b'), 3.64~3.51 (5H, m, H-2d, H-4d, H-6c, H-6c', CH₂-Linker), 3.39~3.33 (3H, m, H-2a, H-2b, H-2c), 3.33~3.24 (1H, m, CH₂-Linker), 3.23~3.10 (2H, m, CH₂-Linker), 1.57~1.42 (4H, m, CH₂-Linker), 1.35~1.27 (2H, m, CH₂-Linker)。¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ : 166.18, 138.85, 138.65, 138.53, 138.37, 137.94, 133.02, 129.94, 129.63, 128.52, 128.41, 128.33, 128.27, 128.21, 128.03, 127.98, 127.90, 127.82, 127.73, 127.66, 127.50, 127.46, 127.41, 127.34, 97.19 (C-1b, C-1c), 96.98 (C-1d),

96.70 (C-1a), 82.05, 81.64, 80.35, 80.24, 77.71, 75.73, 75.57, 75.43, 75.08, 74.97, 73.09, 72.29, 72.16, 70.77, 68.86, 67.83, 67.12, 65.71, 65.52, 65.44, 63.35, 50.56, 46.33, 29.12, 28.21, 23.52。MS (MALDI-TOF) Calcd. for $C_{135}H_{141}NO_{24}Na[M+Na]^+ 2182.9736$, Found 2182.847。

五糖 17 透明浆状, 收率 88%。 $[\alpha]_D^{20} = +92.29^\circ$ (c 1.0, $CHCl_3$)。 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.96 (2H, d, $J = 7.7$ Hz, Ar-H), 7.51 (1H, dd, $J = 7.4, 7.4$ Hz, Ar-H), 7.38 (2H, dd, $J = 7.7, 7.7$ Hz, Ar-H), 7.34~7.26 (40H, m, Ar-H), 7.25~7.10 (45H, m, Ar-H), 5.14 (2H, d, $J = 13.7$ Hz, CH_2 -Cbz), 5.03 (1H, d, $J = 3.5$ Hz, H-1e), 4.97~4.86 (13H, m, H-1b, H-1c, H-1d, CH_2 -Bn), 4.80~4.71 (5H, m, CH_2 -Bn), 4.68~4.57 (9H, m, H-1a, CH_2 -Bn), 4.55~4.50 (3H, m, CH_2 -Bn), 4.49~4.42 (7H, m, H-6e, CH_2 -Bn), 4.38 (1H, dd, $J = 12.0, 4.1$ Hz, H-6e'), 4.00 (1H, dd, $J = 9.2, 9.2$ Hz, H-3e), 3.97~3.91 (4H, m, H-3a, H-3b, H-3c, H-3d), 3.91~3.87 (1H, m, H-5e), 3.84~3.65 (13H, m, H-4a, H-4b, H-4c, H-4d, H-5a, H-5b, H-5c, H-5d, H-6a, H-6a', H-6b, H-6b', H-6d), 3.64~3.51 (6H, m, H-2e, H-4e, H-6c, H-6c', H-6d', CH_2 -Linker), 3.39~3.33 (4H, m, H-2a, H-2b, H-2c, H-2d), 3.32~3.23 (1H, m, CH_2 -Linker), 3.23~3.10 (2H, m, CH_2 -Linker), 1.54~1.41 (4H, m, CH_2 -Linker), 1.35~1.28 (2H, m, CH_2 -Linker)。 ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ : 166.18, 138.98, 138.86, 138.67, 138.65, 138.59, 138.56, 138.53, 138.38, 137.95, 133.03, 129.94, 129.64, 128.52, 128.41, 128.38, 128.35, 128.32, 128.30, 128.27, 128.26, 128.21, 128.05, 128.02, 127.98, 127.91, 127.86, 127.82, 127.79, 127.73, 127.67, 127.65, 127.57, 127.54, 127.51, 127.49, 127.46, 127.44, 127.40, 127.38, 127.34, 127.32, 127.30, 97.28 (C-1d), 97.23 (C-1b, C-1c), 96.98 (C-1e), 96.68 (C-1a), 82.05, 81.66, 81.63, 81.57, 80.43, 80.36, 80.25, 77.71, 77.46, 77.37, 75.73, 75.58, 75.42, 75.40, 75.08, 74.98, 74.93, 74.91, 73.08, 72.29, 72.14, 70.87, 70.82, 70.77, 70.70, 68.87, 67.12, 65.73, 65.54, 65.43, 63.35, 46.27, 29.12, 28.05, 23.52。MS (MALDI-TOF) Calcd. for $C_{162}H_{169}NO_{29}Na[M+Na]^+ 2615.1672$, Found 2615.072。

六糖 19 透明浆状, 收率 79%。 $[\alpha]_D^{20} = +83.60^\circ$ (c 1.0, $CHCl_3$)。 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$)

δ : 7.98~7.95 (2H, m, Ar-H), 7.53~7.49 (1H, m, Ar-H), 7.37 (2H, dd, $J = 7.8, 7.8$ Hz, Ar-H), 7.33~7.26 (21H, m, Ar-H), 7.26~7.09 (79H, m, Ar-H), 5.14 (2H, d, $J = 14.0$ Hz, CH_2 -Cbz), 5.04 (1H, d, $J = 3.5$ Hz, H-1f), 4.97~4.85 (16H, m, H-1b, H-1c, H-1d, H-1e, CH_2 -Bn), 4.80~4.70 (6H, m, CH_2 -Bn), 4.68~4.56 (10H, m, H-1a, CH_2 -Bn), 4.55~4.50 (4H, m, CH_2 -Bn), 4.48~4.41 (8H, m, H-6f, CH_2 -Bn), 4.38 (1H, dd, $J = 12.0, 4.1$ Hz, H-6f), 4.00 (1H, dd, $J = 9.2, 9.2$ Hz, H-3f), 3.96~3.91 (5H, m, H-3a, H-3b, H-3c, H-3d, H-3e), 3.90~3.87 (1H, m, H-5f), 3.85~3.50 (23H, m, H-2f, H-4f, H-4a, H-4b, H-4c, H-4d, H-4e, H-5a, H-5b, H-5c, H-5d, H-5e, H-6a, H-6a', H-6b, H-6b', H-6c, H-6c', H-6d, H-6d', H-6e, H-6e', CH_2 -Linker), 3.38~3.32 (5H, m, H-2a, H-2b, H-2c, H-2d, H-2e), 3.31~3.23 (1H, m, CH_2 -Linker), 3.23~3.09 (2H, m, CH_2 -Linker), 1.57~1.42 (4H, m, CH_2 -Linker), 1.36~1.28 (2H, m, CH_2 -Linker)。 ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ : 166.17, 138.97, 138.87, 138.66, 138.59, 138.53, 138.37, 137.95, 133.02, 129.94, 129.63, 128.51, 128.45, 128.40, 128.39, 128.34, 128.31, 128.29, 128.26, 128.25, 128.20, 128.04, 128.02, 127.97, 127.90, 127.86, 127.81, 127.78, 127.72, 127.67, 127.64, 127.57, 127.53, 127.51, 127.48, 127.45, 127.42, 127.39, 127.35, 127.32, 127.30, 127.29, 127.26, 97.33 (C-1e), 97.31 (C-1d), 97.24 (C-1b, C-1c), 96.97 (C-1f), 96.68 (C-1a), 82.04, 81.65, 81.61, 81.56, 80.43, 80.38, 80.35, 80.24, 77.70, 77.45, 77.37, 77.33, 75.72, 75.56, 75.42, 75.38, 75.07, 74.98, 74.91, 73.07, 72.26, 72.13, 72.10, 70.85, 70.80, 70.77, 70.71, 68.86, 67.11, 65.70, 65.55, 65.42, 63.35, 50.24, 46.21, 29.10, 27.61, 23.51。MS (MALDI-TOF) Calcd. for $C_{189}H_{197}NO_{34}Na[M+Na]^+ 3047.3609$, Found 3047.261。

2.2.5 C^6 苯甲酰基的脱除方法 将原料溶解于甲醇-四氢呋喃 (1:1, 0.1 mol/L) 中, 加入甲醇钠 (0.5 eq) 并在室温下搅拌 4 h。用氢离子交换树脂中和混合物并过滤, 减压浓缩后, 粗品使用硅胶柱色谱纯化 (石油醚-乙酸乙酯, 3:1), 得到化合物 **12** (92%), **14** (91%), **16** (87%), **18** (89%), **20** (84%)。结构鉴定数据与报道文献一致^[34]。

2.2.6 全脱保制备 α -1,6-葡聚糖 1~5 将原料溶解于甲醇-四氢呋喃-水-醋酸 (10:5:2.5:1, 4.0 mmol/L) 中并加入 Pd/C (10%), 在室温下搅拌 15 min。将反

应瓶放入氢气反应器中,使用氢气置换反应瓶中气体三次后在室温下反应 48 h。对混合物进行过滤并减压浓缩,使用 Sephadex LH-20 凝胶柱纯化。

α -1,6-葡聚二糖 **1** 透明糖浆, 收率 90%。

^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ : 4.95 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-1b), 4.93 (1H, d, $J = 3.2$ Hz, H-1a), 4.01~3.96 (1H, m, H-6), 3.88~3.83 (2H, m, H-5, H-6), 3.80~3.66 (6H, m, $2 \times \text{H-3}$, H-5, $2 \times \text{H-6}$, CH_2 -Linker), 3.60~3.49 (4H, m, $2 \times \text{H-2}$, H-4, CH_2 -Linker), 3.44 (1H, dd, $J = 9.5, 9.5\text{Hz}$, H-4), 3.02 (2H, dd, $J = 7.7, 7.7$ Hz, CH_2 -Linker), 1.74~1.65 (4H, m, CH_2 -Linker), 1.52~1.42 (2H, m, CH_2 -Linker)。 ^{13}C NMR (151 MHz, D_2O) δ : 98.12 (C-1a), 97.82 (C-1b), 73.41, 73.07, 71.81, 71.41, 71.17, 70.22, 69.47, 69.44, 67.90, 65.52, 60.43, 39.36, 28.01, 26.51, 22.42。 HRMS (ESI) m/z Calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{NO}_{11}[\text{M}+\text{H}]^+$ 428.2126, Found 428.2122。

α -1,6-葡聚三糖 **2** 透明糖浆, 收率 88%。结构鉴定数据与报道文献一致^[35]。

α -1,6-葡聚四糖 **3** 透明糖浆, 收率 90%。

^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ : 5.00~4.95 (3H, m, H-1b, H-1c, H-1d), 4.93 (1H, d, $J = 3.8$ Hz, H-1a), 4.03~3.95 (3H, m, $3 \times \text{H-6}$), 3.95~3.89 (2H, m, $2 \times \text{H-5}$), 3.88~3.83 (2H, m, H-5, H-6), 3.79~3.67 (10H, m, $4 \times \text{H-3}$, H-5, $4 \times \text{H-6}$, CH_2 -Linker), 3.62~3.49 (8H, m, $4 \times \text{H-2}$, $3 \times \text{H-4}$, CH_2 -Linker), 3.43 (1H, dd, $J = 10.0, 9.1$ Hz, H-4), 3.02 (2H, dd, $J = 7.6, 7.6$ Hz, CH_2 -Linker), 1.74~1.65 (4H, m, CH_2 -Linker), 1.52~1.42 (2H, m, CH_2 -Linker)。 ^{13}C NMR (151 MHz, D_2O) δ : 98.12 (C-1a), 97.76 (C-1b), 97.72 (C-1c), 97.65 (C-1d), 73.44, 73.38, 73.34, 73.06, 71.81, 71.45, 71.35, 71.31, 71.17, 70.23, 70.13, 69.53, 69.47, 67.90, 65.56, 65.49, 60.44, 39.36, 28.02, 26.50, 22.42。 HRMS (ESI) m/z Calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{54}\text{NO}_{21}[\text{M}+\text{H}]^+$ 752.3183, Found 752.3185。

α -1,6-葡聚五糖 **4** 透明糖浆, 收率 92%。

^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ : 4.99~4.96 (4H, m, H-1b, H-1c, H-1d, H-1e), 4.93 (1H, d, $J = 3.8$ Hz, H-1a), 4.02~3.96 (4H, m, $4 \times \text{H-6}$), 3.94~3.90 (3H, m, $3 \times \text{H-5}$), 3.87~3.83 (2H, m, H-5, H-6), 3.79~3.67 (12H, m, $5 \times \text{H-3}$, H-5, $5 \times \text{H-6}$, CH_2 -Linker), 3.61~3.50 (10H, m, $5 \times \text{H-2}$, $4 \times \text{H-4}$, CH_2 -Linker), 3.44 (1H, dd, $J = 10.0, 9.0$ Hz, H-4), 3.02 (2H, dd, $J = 7.6, 7.6$ Hz, CH_2 -Linker), 1.75~1.65 (4H, m, CH_2 -Linker), 1.53~1.42

(2H, m, CH_2 -Linker)。 ^{13}C NMR (151 MHz, D_2O) δ : 98.12 (C-1a), 97.76 (C-1b), 97.72 (C-1c), 97.67 (C-1d), 97.64 (C-1e), 73.44, 73.36, 73.34, 73.06, 71.81, 71.45, 71.36, 71.31, 71.17, 70.23, 70.13, 69.51, 69.47, 67.90, 65.56, 60.44, 39.36, 28.02, 26.50, 22.43。 HRMS (ESI) m/z Calcd. for $\text{C}_{35}\text{H}_{64}\text{NO}_{26}[\text{M}+\text{H}]^+$ 914.3711, Found 914.3707。

α -1,6-葡聚六糖 **5** 透明糖浆, 收率 89%。

^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ : 5.00~4.96 (5H, m, H-1b, H-1c, H-1d, H-1e, H-1f), 4.94 (1H, d, $J = 3.8$ Hz, H-1a), 4.03~3.96 (5H, m, $5 \times \text{H-6}$), 3.95~3.90 (4H, m, $4 \times \text{H-5}$), 3.86 (2H, m, H-5, H-6), 3.80~3.67 (14H, m, $6 \times \text{H-3}$, H-5, $6 \times \text{H-6}$, CH_2 -Linker), 3.62~3.50 (12H, m, $6 \times \text{H-2}$, $5 \times \text{H-4}$, CH_2 -Linker), 3.44 (1H, dd, $J = 9.5, 9.5\text{Hz}$, H-4), 3.02 (2H, dd, $J = 7.6, 7.6$ Hz, CH_2 -Linker), 1.76~1.66 (4H, m, CH_2 -Linker), 1.53~1.44 (2H, m, CH_2 -Linker)。 ^{13}C NMR (151 MHz, D_2O) δ : 98.10 (C-1a), 97.74 (C-1b), 97.70 (C-1c, C1-d), 97.65 (C-1e, C1-f), 73.41, 73.34, 73.03, 71.78, 71.43, 71.34, 71.14, 70.21, 70.11, 69.45, 67.88, 65.51, 60.41, 39.34, 28.00, 26.48, 22.40。 HRMS (ESI) m/z Calcd. for $\text{C}_{41}\text{H}_{74}\text{NO}_{31}[\text{M}+\text{H}]^+$ 1076.4239, Found 1076.4232。

2.3 血清的收集或制备

2.3.1 Hp 感染患者血清临床样本的收集 根据江南大学临床研究伦理委员会批准的《人类生物医学研究国际伦理准则》(CIOMS)(批准编号: JNU 20210318IRB09)对人血清临床样本进行收集和使用, Hp 感染情况通过 ^{13}C 尿素呼气试验确定。基于本课题组之前的研究结果^[31], 采用能够识别 α -1,6-葡聚三糖的 Hp 感染患者血清对本研究中不同链长 α -1,6-葡聚糖的 IgG 抗体亲和力进行评估。

2.3.2 免疫兔血清的制备 Hp O1, O2, O6 血清型脂多糖免疫兔血清为课题组前期制备, 脂多糖的热苯酚法提取方法和动物免疫已在前期发表文章中详细报道^[31, 36-37]。

2.4 糖芯片的制备及分析

将合成寡糖 **1~5** 和提取的 Hp O1 血清型脂多糖分别溶解在磷酸钠缓冲液 (50 mmol/L, pH = 8.5) 中, 使用芯片点样仪将样品点样至玻片上, 用脂多糖免疫兔血清或感染患者血清对芯片进行孵育, 使合成寡糖与血清中的 IgG 抗体结合, 分别将荧光标记的二抗 (Alexa Flour 532 偶联的山羊抗兔 IgG 抗体或 Cy3 偶联的山羊抗人 IgG 抗体) 进行二次孵

育,使其结合已和寡糖连接的 IgG 抗体,使用微阵列芯片扫描仪扫描芯片,通过分析结合后芯片的荧光强度,从而对合成聚糖的抗体亲和力进行评估。

3 结果与讨论

3.1 α -1,6-葡聚糖的合成

本研究设计的目标 α -1,6-葡聚糖 **1~5** 端基位均含有五碳氨基连接臂,为后续糖芯片及糖缀合物的制备做准备。高立体选择性合成 α -1,6-葡聚糖中的 1,2-顺式-糖苷键是本合成中的一个重要难点,如何高效获得不同链长的 α -1,6-葡聚糖也是设计合成策略中需要重点考虑的问题^[38]。如路线 1 及 2-A 所示,糖砌块 **7** 的 C⁶ 位羟基使用苯甲酰基保护, C² 位羟基使用非参与性苄基保护,采用基于 C⁶ 位苯甲酰基远程参与作用和乙醚溶剂效应的协同糖基化策略将三氟乙酰亚胺酯基供体 **7** 与不同受体 (**8**, **10**, **12**, **14**, **16**, **18**) 进行偶联,高立体选择性地实现了葡聚糖中 α 糖苷键的制备。在此基础上,利用 $[n+1]$ 迭代的糖链延长策略,高效合成了 α -1,6-葡聚糖二糖 **11**(88%)、三糖 **13**(86%)、四糖 **15**(90%)、五糖 **17**(88%)、六糖 **19**(79%)。

对化合物 (**12**, **14**, **16**, **18**, **20**) 进行全脱保合成目标寡糖 **1~5** 时,尝试使用甲醇、水和乙酸作为反应溶剂体系,由于半脱保的葡聚糖在该溶剂体系中的溶解性不佳,导致脱保护反应时间较长,反应效率降低,从而限制了规模化制备目标寡糖。经多次条件优化,发现使用甲醇、四氢呋喃、水和乙酸作为溶剂体系时(路线 2-B),起始反应物能够充分溶解,反应产率较高,成功制备得到全脱保的 α -1,6-葡聚糖二糖 **1**(90%)、 α -1,6-葡聚糖三糖 **2**(88%)、 α -1,6-葡聚糖四糖 **3**(90%)、 α -1,6-葡聚糖五糖 **4**(92%)、 α -1,6-葡聚糖六糖 **5**(89%)。此脱保护方法重复性好,产率稳定,可用于 α -1,6-葡聚糖规模化制备。

3.2 α -1,6-葡聚糖的抗体亲和力评价

通过糖芯片筛选可以检测合成寡糖与血清抗体的结合能力,从而分析寡糖片段链长与 IgG 抗体亲和力之间的关系。合成的 α -1,6-葡聚糖片段端基位含有氨基连接臂,通过共价键可以负载到芯片表面。糖芯片与 Hp O1 脂多糖免疫兔血清的筛选结果显示,血清中 IgG 抗体与 α -1,6-葡聚糖二至六糖 (**1~5**) 均有结合作用,其中抗体对 α -1,6-葡聚糖三糖 **2**、四糖 **3**、五糖 **4** 均有较强的识别(图 2)。与 Hp O2、

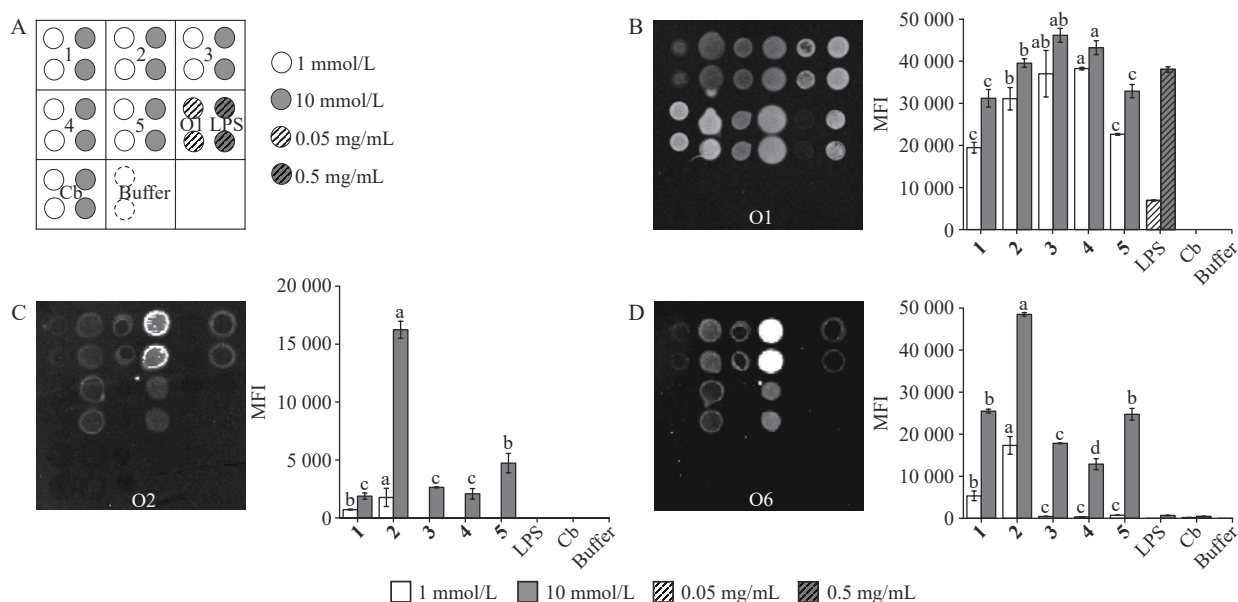


Figure 2 Antibody affinity evaluation of synthetic α -1,6-glucans by glycan microarrays with Hp (serotype O1, O2, and O6) LPS immunized rabbit sera

A: Printing pattern. Samples: **1~5** (di- to hexasaccharide). Negative control: Cb (a synthetic *Clostridium bolteae* disaccharide, α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Rhap). Positive control: O1 LPS. Blank control: buffer. B-D: Representative array scan of Hp LPS immunized rabbit sera (dilution 1:50) and quantification of mean fluorescence intensity (MFI) values of each oligosaccharide fragment. Error bars represent standard error of the mean (SEM) of two spots of two separate arrays. a, b, c and d represent the difference level between oligosaccharides **1~5** ($P < 0.05$). Different lowercase letters at the same concentration indicate significant differences

O6 脂多糖免疫血清的筛选结果显示, α -1,6-葡聚三糖 **2** 与 IgG 抗体的结合信号远强于其他链长的 α -1,6-葡聚寡糖。由此可见, 血清抗体对 α -1,6-葡聚糖片段的识别效果受不同血清型脂多糖影响。

接下来使用收集的 31 例 Hp 感染患者血清对糖芯片进行筛选以分析 α -1,6-葡聚糖片段的 IgG 抗体亲和力。其中 30 例血清样本可以识别合成的 α -1,6-葡聚糖二至六糖, 这说明 α -1,6-葡聚糖是 Hp 脂多糖的重要抗原表位。在 31 例 Hp 感染患者血清样本中: 有 10 例血清样本与 α -1,6-葡聚二糖 **1** 到五糖 **4** 的结合随链长延长而逐渐升高, 但与六糖 **5** 的结合减弱, 其中 α -1,6-葡聚五糖 **4** 与 IgG 抗体的结合信号最强(图 3-B); 另有 2 例血清样本对 α -1,6-葡聚糖的识别效果与糖链的长度呈正相关, 且与 α -1,6-葡聚六糖 **5** 的结合信号最强(图 3-C); 有 12 例血清样本与 α -1,6-葡聚三糖 **2** 和五糖 **4** 的结合信号都很强, 但低浓度情况下, 抗体与三糖 **2** 的结合强于五糖 **4**(图 3-D)。值得注意的是, 6 例血清样本对 α -1,6-葡聚糖的识别效果与糖链的长度呈负相

关, 且与短链的 α -1,6-葡聚二糖 **1** 的结合信号最强(图 3-E)。

Hp 感染患者血清对糖芯片的筛选结果显示, α -1,6-葡聚糖是 Hp 脂多糖中的重要抗原表位, 这一发现与之前文献报道的结果一致^[29-31]。31 例 Hp 血清样本未具体分型, 考虑到临床感染的复杂性, 因此芯片筛选的结果也呈现一定的多样性。总体来说, 血清样本中的抗体呈现出可能优先结合奇数糖的趋势, 其中 α -1,6-葡聚三糖 **2** 和五糖 **4** 是被绝大多数 Hp 感染患者血清识别片段, 具有较强的 IgG 抗体亲和力。而 α -1,6-葡聚二糖 **1** 对部分血清样本表现出良好的 IgG 抗体亲和力。

4 结 论

本研究通过化学法合成了 Hp 脂多糖核心寡糖中不同链长的 α -1,6-葡聚糖, 并利用糖芯片对它们的抗体亲和力进行评估。将糖环 C⁶ 位酰基的远程参与作用与乙醚的溶剂效应相结合, 高立体选择性构建了寡糖结构中的 α -葡萄糖苷键。采用 $[n+1]$ 迭

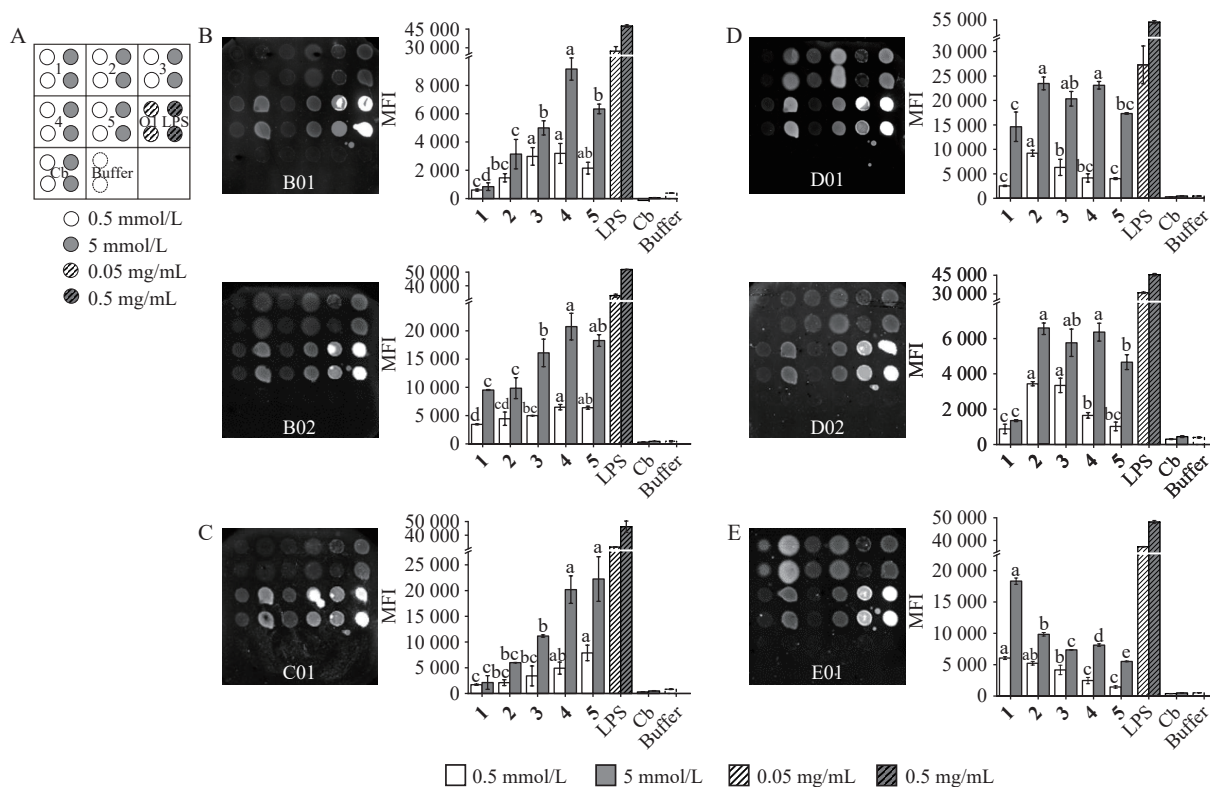


Figure 3 Antibody affinity evaluation of synthetic α -1,6-glucans by glycan microarrays with Hp-infected patient sera

A: Printing pattern. Samples: **1-5** (di- to hexasaccharide). Negative control: Cb (a synthetic *Clostridium botetoe* disaccharide, α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Rhap). Positive control: O1 LPS. Blank control: buffer. B-D: Representative array scan of Hp-infected patient sera (dilution 1:20) and quantification of MFI values of each oligosaccharide fragment. Error bars represent SEM of two spots of two separate arrays. a, b, c and d represent the difference level between oligosaccharides **1-5** ($P < 0.05$). Different lowercase letters at the same concentration indicate significant differences

代糖基化链延长策略, 高效地完成了 α -1,6-葡聚二糖至六糖的制备(化合物 **1~5**)。通过糖芯片进行的抗体亲和力检测发现, 合成的 α -1,6-葡聚糖均能被 Hp 脂多糖免疫动物和 Hp 感染患者血清中 IgG 抗体识别, 且不同糖链长度的寡糖片段与血清中抗体的结合能力具有明显差异, 其中 α -1,6-葡聚二糖、三糖和五糖具有较好的抗体亲和力, 需要进一步对其免疫原性进行探究。本研究为 Hp 糖缀合物疫苗的开发提供了重要的理论基础。

References

- [1] Xu DY, Zhao SS, Dou J, *et al.* Engineered endolysin-based “artilysins” for controlling the gram-negative pathogen *Helicobacter pylori*[J]. *AMB Express*, 2021, **11**(1): 63.
- [2] Xu WT, Xu LM, Xu CF. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and gastrointestinal microecology[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, **12**: 938608.
- [3] Reyes VE. *Helicobacter pylori* and its role in gastric cancer[J]. *Microorganisms*, 2023, **11**(5): 1312.
- [4] Lee YC, Dore MP, Graham DY. Diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori* infection[J]. *Annu Rev Med*, 2022, **73**: 183-195.
- [5] Abdullah M, Greenfield LK, Bronte-Tinkew D, *et al.* VacA promotes CagA accumulation in gastric epithelial cells during *Helicobacter pylori* infection[J]. *Sci Rep*, 2019, **9**(1): 38.
- [6] Shang Y, Zhao LY, Lu JK. Relationship between inflammatory cytokines and gastric cancer[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2015, **46**(1): 123-128.
- [7] Lunn RM, Mehta SS, Jahnke GD, *et al.* Cancer hazard evaluations for contemporary needs: highlights from new national toxicology program evaluations and methodological advancements[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2022, **114**(11): 1441-1448.
- [8] Graham DY. Transitioning of *Helicobacter pylori* therapy from trial and error to antimicrobial stewardship[J]. *Antibiotics*, 2020, **9**(10): 671.
- [9] Matos R, Taillieu E, De Bruyckere S, *et al.* Presence of *Helicobacter* species in gastric mucosa of human patients and outcome of *Helicobacter* eradication treatment[J]. *J Pers Med*, 2022, **12**(2): 181.
- [10] Jearth V, Rath MM, Chatterjee A, *et al.* Drug-resistant *Helicobacter pylori*: diagnosis and evidence-based approach[J]. *Diagnostics*, 2023, **13**(18): 2944.
- [11] Dascălu RI, Bolocan A, Păduaru DN, *et al.* Multidrug resistance in *Helicobacter pylori* infection[J]. *Front Microbiol*, 2023, **14**: 1128497.
- [12] Imoto I, Yasuma T, D'Alessandro-Gabazza CN, *et al.* Antimicrobial effects of lactoferrin against *Helicobacter pylori* infection[J]. *Pathogens*, 2023, **12**(4): 599.
- [13] Dieye Y, Nguer CM, Thiam F, *et al.* Recombinant *Helicobacter pylori* vaccine delivery vehicle: a promising tool to treat infections and combat antimicrobial resistance[J]. *Antibiotics*, 2022, **11**(12): 1701.
- [14] Xu XD, Ruan QP, Wu WT. Cloning of *UreB* from *Helicobacter pylori* and its expression in *E. coli*[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2004, **35**(2): 183-186.
- [15] Friedrich V, Gerhard M. Vaccination against *Helicobacter pylori* - An approach for cancer prevention[J]? *Mol Aspects Med*, 2023, **92**: 101183.
- [16] Dos Santos Viana I, Cordeiro Santos ML, Santos Marques H, *et al.* Vaccine development against *Helicobacter pylori*: from ideal antigens to the current landscape[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2021, **20**(8): 989-999.
- [17] Zeng M, Mao XH, Li JX, *et al.* Efficacy, safety, and immunogenicity of an oral recombinant *Helicobacter pylori* vaccine in children in China: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial[J]. *Lancet*, 2015, **386**(10002): 1457-1464.
- [18] Zhao Y, Arce-Gorvel V, Conde-Álvarez R, *et al.* Vaccine development targeting lipopolysaccharide structure modification[J]. *Microbes Infect*, 2018, **20**(9/10): 455-460.
- [19] Hulbert SW, Desai P, Jewett MC, *et al.* Glycovaccinology: the design and engineering of carbohydrate-based vaccine components[J]. *Biotechnol Adv*, 2023, **68**: 108234.
- [20] Nishat S, Andreana PR. Entirely carbohydrate-based vaccines: an emerging field for specific and selective immune responses[J]. *Vaccines*, 2016, **4**(2): 19.
- [21] Feng SJ, Xiong CH, Wang GR, *et al.* Exploration of recombinant fusion proteins YAPO and YAPL as carrier proteins for glycoconjugate vaccine design against *Streptococcus pneumoniae* infection[J]. *ACS Infect Dis*, 2020, **6**(8): 2181-2191.
- [22] Meena J, Kumar R, Singh M, *et al.* Modulation of immune response and enhanced clearance of *Salmonella typhi* by delivery of Vi polysaccharide conjugate using PLA nanoparticles[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2020, **152**: 270-281.
- [23] Qin CJ, Xiong DC, Yin J. Development of carbohydrate-based drugs driven by chemical glycobiology[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2024, **55**(4): 429-431.
- [24] Qin CJ, Tian GZ, Hu J, *et al.* Recent chemical synthesis and immunological evaluation of glycans related to bacterial lipopolysaccharides[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2024, **78**: 102424.
- [25] Del Bino L, Østerlid KE, Wu DY, *et al.* Synthetic glycans to improve current glycoconjugate vaccines and fight antimicrobial resistance[J]. *Chem Rev*, 2022, **122**(20): 15672-15716.
- [26] Sabnis A, Edwards AM. Lipopolysaccharide as an antibiotic target[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2023, **1870**(7):

- 119507.
- [27] Britton S, Papp-Szabo E, Simala-Grant J, *et al.* A novel *Helicobacter pylori* cell-surface polysaccharide[J]. *Carbohydr Res*, 2005, **340**(9): 1605-1611.
- [28] Monteiro MA, Britton S, Applebee LA, *et al.* Synthesis and immunogenicity of a *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide-based conjugate[J]. *Vaccine*, 2011, **29**(17): 3098-3102.
- [29] Harrison BA, Fernández H, Chandan V, *et al.* Characterization and functional activity of murine monoclonal antibodies specific for α 1, 6-glucan chain of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide[J]. *Helicobacter*, 2011, **16**(6): 459-467.
- [30] Altman E, Chandan V, Harrison BA, *et al.* Chemoenzymatic synthesis of an α -1, 6-glucan-based conjugate vaccine against *Helicobacter pylori*[J]. *Glycobiology*, 2022, **32**(8): 691-700.
- [31] Zou XP, Hu J, Zhao M, *et al.* Chemical synthesis of the highly sterically hindered core undecasaccharide of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide for antigenicity evaluation with human serum[J]. *J Am Chem Soc*, 2022, **144**(32): 14535-14547.
- [32] Zhao QP, Zhang H, Zhang YX, *et al.* Stereoselective synthesis of a branched α -decaglucan[J]. *Org Biomol Chem*, 2020, **18**(33): 6549-6557.
- [33] Komarova BS, Tsvetkov YE, Pier GB, *et al.* First synthesis of pentasaccharide glycoform I of the outer core region of the *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide[J]. *J Org Chem*, 2008, **73**(21): 8411-8421.
- [34] Zhang YQ, He HQ, Chen ZX, *et al.* Merging reagent modulation and remote anchimeric assistance for glycosylation: highly stereoselective synthesis of α -glycans up to a 30-mer[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, **60**(22): 12597-12606.
- [35] Zou XP, Qin CJ, Pereira CL, *et al.* Synergistic glycosylation as key to the chemical synthesis of an outer core octasaccharide of *Helicobacter pylori*[J]. *Chemistry*, 2018, **24**(12): 2868-2872.
- [36] Zhao M, Tian GZ, Qin CJ, *et al.* Immunological exploration of *Helicobacter pylori* serotype O₂ O-antigen by using a synthetic glycan library[J]. *Chin J Chem*, 2024, **42**(3): 243-251.
- [37] Tian GZ, Hu J, Qin CJ, *et al.* Chemical synthesis and immunological evaluation of *Helicobacter pylori* serotype O6 tridecasaccharide O-antigen containing a dd-heptoglycan[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2020, **59**(32): 13362-13370.
- [38] Ishiwata A, Tanaka K, Ao JM, *et al.* Recent advances in stereoselective 1, 2-*cis*-O-glycosylations[J]. *Front Chem*, 2022, **10**: 972429.

· 校园信息 ·

本刊编委李萍教授荣获“全国优秀教师”荣誉称号

2024年9月8日,庆祝第40个教师节暨全国教育系统先进集体和先进个人表彰活动在京举行。我刊编委、中国药科大学多靶标天然药物全国重点实验室李萍教授荣获“全国优秀教师”这一荣誉称号。

李萍教授现任多靶标天然药物全国重点实验室主任,入选国家级重大人才计划、是国家岐黄学者,领衔团队入选全国高校黄大年式教师团队和国家自然科学基金委创新研究群体。她坚持育人为本、科教融合的教学理念,聚焦科技前沿和国家重大需求,创立现代生药学教学新体系,获首批国家精品课程、首批国家精品资源共享课程、首批国家精品教材、药学类首个全国优秀教材一等奖。她创建中药等效成分群理论技术体系,开创中药传承创新研究新范式,在培养中医药拔尖创新人才、产出高水平科技成果、服务国家中医药事业发展中作出了一系列重要贡献,以第一完成人获国家科技进步二等奖。

全国优秀教师是全国教育系统教师的优秀代表,集中体现了新时期人民教师和教育工作者崇高的思想境界和良好的精神风貌。李萍教授荣获全国优秀教师这一殊荣,不仅是对她个人卓越成就的高度认可,也是对中国药科大学教育教学质量和师资队伍建设成果的充分肯定,更是对中国药科大学广大教师的巨大鼓舞和激励!

(党委教师工作部、多靶标天然药物全国重点实验室)