

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl<sup>6</sup>



# [12] 发明专利申请公开说明书

C12P 7/64  
A61K 39/04 A61K 35/74  
C11B 1/10 C07G 17/00

[21] 申请号 96193404.2

[43]公开日 1998年6月3日

[11] 公开号 CN 1183811A

[22]申请日 96.2.22

[30]优先权

[32]95.2.22 [33]ZA[31]95/1464

[86]国际申请 PCT/GB96/00416 96.2.22

[87]国际公布 WO96/26288 英 96.8.29

[85]进入国家阶段日期 97.10.20

[71]申请人 阿德科克因格拉姆有限公司

地址 南非米德兰德

[72]发明人 J·A·维尔斯科尔

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗宏 杨九昌

权利要求书 2 页 说明书 32 页 附图页数 23 页

[54]发明名称 分离和纯化细胞壁脂类成分的方法

[57]摘要

一种利用多相溶剂系统同时纯化和分离不同种类化合物的方法，这些化合物可以是相关细胞培养物中提取的或可被合成的细胞壁成分或其衍生物或类似物。细胞壁成分可以是微生物源的细胞壁脂类成分，能从污染物质中作为一个组（group）分离出来。

(BJ)第 1456 号



## 权 利 要 求 书

1. 一种从细胞壁成分或其衍生物或类似物的提取混合物和污染物中或从细胞壁成分或其类似物或衍生物的合成混合物和污染物中分离和纯化特定微生物细胞壁成分或其衍生物或类似物的方法, 包括步骤:
- 5 将提取混合物或合成混合物溶解于多相溶剂中以形成一种溶液; 并将此溶液进行液-液相萃取。
2. 根据权利要求1的方法, 其中特定的细胞壁成分或其衍生物或类似物是一种具有免疫调节性质的化合物。
3. 根据权利要求1或2的方法, 其中特定的细胞壁成分或其衍生物
- 10 或类似物是一种脂或糖。
4. 根据权利要求3的方法, 其中特定的细胞壁成分是脂。
5. 根据权利要求4的方法, 其中脂是脂肪酸。
6. 根据权利要求5的方法, 其中脂肪酸是分支菌酸。
7. 根据权利要求6的方法用于从分支菌酸提取或合成混合物和污染
- 15 物中作为一个组分离和纯化分支菌酸混合物。
8. 根据权利要求1至7任意一项的方法, 其中微生物细胞壁成分源自细菌、真菌或酵母。
9. 根据权利要求8的方法, 其中微生物细胞壁成分源自细菌。
10. 根据权利要求9的方法, 其中细菌选自分支杆菌、棒状杆菌、
- 20 诺卡氏菌、红球菌和无支酸菌。
11. 根据权利要求10的方法, 其中细菌选自结核分支杆菌、鸟分支杆菌和牝牛分支杆菌。
12. 根据权利要求1至10任意一项的方法, 其中多相溶剂系统包含氯仿、甲醇和水。
- 25 13. 根据权利要求12的方法, 其中多相溶剂系统是两相溶剂系统。
14. 根据权利要求13的方法, 其中两相溶剂系统包含上层液相和下层液相。
15. 根据权利要求14的方法, 其中该方法还包含步骤: 使溶剂系统的上层液相和下层液相混合并平衡。
- 30 16. 根据权利要求14或15的方法, 其中上层液相的组成为12 - 18%氯仿、45 - 55%甲醇和25 - 40%水。

17. 根据权利要求 16 的方法, 其中上层液相的组成为 15 % 氯仿、52 % 甲醇和 33 % 水。

18. 根据权利要求 14 至 17 任意一项的方法, 其中下层相组成为 50 - 80 % 氯仿、15 - 40 % 甲醇和 2 - 8 % 水。

5 19. 根据权利要求 18 的方法, 其中下层相组成为 68 % 氯仿、27 % 甲醇和 5 % 水。

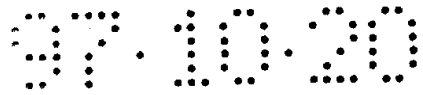
20. 根据前述权利要求任意一项的方法, 其中液-液相萃取是逆流萃取或每相多次萃取。

10 21. 根据前述权利要求任意一项的方法, 它还包含步骤: 将纯化的细胞壁成分或其类似物或衍生物进行丙酮提取以除去杂质。

22. 根据前述权利要求任意一项的方法, 其中细胞壁成分或其类似物或衍生物不需要任何化学衍生作用以将其从任意杂质中分离。

23. 根据前述权利要求任意一项的方法, 它还包括步骤: 使纯化的、分离的细胞壁成分或其衍生物或类似物皂化。

15 24. 根据权利要求 1 的方法, 参考说明实施例基本上如此处所述。



## 说明书

### 分离和纯化细胞壁脂类成分的方法

#### 发明背景

5 本发明涉及源自细菌的细胞壁脂类成分的分离和纯化，这些细菌隶属于分支杆菌属（*Mycobacterium*）、棒状杆菌属（*Corynebacterium*）、诺卡氏菌属（*Nocardia*）或红球菌属（*Rhodococcus*），其中最普遍存在的且从人类健康角度而言也是最重要的为分支杆菌属。

10 分支杆菌属包括大量的死物寄生菌种并且也是致病菌种。该属中最为人们熟知的成员结核分支杆菌（*M. tuberculosis*）和麻风分支杆菌（*M. leprae*）分别是引发结核病和麻风病的起因，这两种病均属于发生于人类的最严重的疾病。

#### 结核病：现状

15 结核病被认为是世界上大多数地区的主要传染病。虽然在医学科学取得了很大进展以及一系列有效药物的出现，它们有时会使人产生这种疾病已被征服的印象，且虽然进行了有组织的国际性的努力，结核病仍是一个存在许多难解部分的世界性健康问题：大约有 1/3 的世界人口被结核分支杆菌感染（Fouci, 1995），据报道仅在 1990 年在世界范围内就有 8 百多万新的感染病例且有 3 百多万人死亡（Snider, 1994）。世界健康组织（the World Health Organisation）所做的预测表明，到 20 2000 年每年将有升至 102, 000, 000 新的病例且有 35, 000, 000 人死亡，亚洲及撒哈拉附近（sub-Saharan）的非洲是感染最多的洲（De Cock 等, 1992；Dolin, Raviglione 和 Kochi, 1994；Raviglione, Snider 和 Kochi, 1995；Wilkinson 和 de Cock, 1996）。根据最近发布的 25 “WHO 关于结核病流行情况的报告, 1995（WHO Report on the Tuberculosis Epidemic, 1995）”，预测下一十年的数字更加令人惊悚：300, 000, 000 新的感染例，30, 000, 000 人死亡（Holler, 1995）。实际上，WHO 于 1993 年就指出结核病是全球性危害公众健康的急症（Bloomfield, 1995；Wilkinson 和 de Cock, 1996）。

30 结核病这种惊人的重现及毫不减弱的蔓延现象的主要原因可归结如下：

1) 基于使用 BCG\*) 的世界性范围预防接种计划不能提供足够的保护作用

\*) BCG: (卡介苗 (Bacillus of Calmette and Guerin)) Calmette 和 Guerin 将一株牛分支杆菌 (M. bovis) 在 13 年期间通过含甘油和牛胆 (oxbile) 的介质 231 次而使它减毒。

2) 与结核病检测有关的问题

3) 与结核病治疗及结核分支杆菌多种抗药性株的出现有关的问题

4) 与 HIV 感染相互作用

5) 社会 - 经济方面

10 1. 基于 BCG 的世界范围预防接种计划不能提供足够的保护作用

通过诱导对结构分支杆菌感染的抵抗作用来防止结核病传播的努力起始于本世纪初, 即利用 BCG 进行预防接种。根据大量的对照研究, 证实了用 BCG 进行预防接种所获得的保护性功效在 0 至 80 % 之间不等 (Snider, 1994; Hershfield, 1995), 根据出版文献的分析, 发现 BCG 预防接种约 50 % 有效 (Colditz 等, 1994; O' Brien, 1995)。针对这种不令人满意的情况已提出许多假设/解释 (Fine, 1994)。最重要的是:

i) BCG 疫苗间的变化, 这是由菌株变异或生产过程中的差异所造成的;

20 ii) 结核分支杆菌的致病机理的差异;

iii) 暴露于环境分支杆菌时的区别 - 环境中的分支杆菌可以对 BCG 产生拮抗作用或协同作用;

iv) 用 BCG 进行预防接种的人群间的遗传差异;

v) 不同人群间营养状况及暴露于阳光下的时间不同;

25 vi) 各种研究间设计方案的不同;

vii) 用于评估以 BCG 进行预防接种的保护性作用的标准不恰当。

2. 与结核病检测相关的问题

对于为战胜这些疾病而进行更为成功的全球性战略措施的实施而言, 对结核病和相关的分支杆菌疾病的准确且适时的检测是重要需求之一。

传统的实验室检测方法有很大缺点, 既不能区分活杆菌和死杆菌(快

速而简单的 Ziehl - Neelsen 染色), 且如果这些方法证明有活杆菌 (直接培养) 存在, 那么在实验室检测完成之前则需要数周时间。这样也就会延迟治疗的开始并且会导致疾病的进一步传播。

5 虽然最近开发的诊断结核病的分子手段 ( Godfrey - Faussett , 1994 ; Richeldi , Barnini 和 Saltini , 1995 ; Bloomfield , 1995 ; Vlaspolder , Singer 和 Roggeveen , 1995 ) 使得发达国家的先进实验室引入了这些快速且灵敏的检测工具, 但是这些工具昂贵、需要特殊的培训人员。由于这些原因, 它们不适于在资源贫乏、TB - 流行地区用来普查/检测结核病, 这些地区已过重地负担了控制疾病的费用 ( O' Brien , 10 1995 ; Voelker , 1995 ) 。

在快速药物过敏性检测 ( Schaberg 等, 1995 ; Pretorius 等, 1996 ) 和分支杆菌的快速培养 ( Bloomfield , 1995 ) 领域存在着类似问题。由于财政原因, 在这些领域取得的重大进展不适用于结核病广泛流行最严重的国家。

15 3. 与结核病治疗及结核分支杆菌多种抗药性株的出现有关的问题

针对结核病的有效化学疗法的开发使得治疗被感染病人成为可能, 由此防止了疾病的全面发展。虽然可以得到被证明有杀菌作用的抗结核病药物 ( 利福平、异烟肼和吡嗪酰胺 ) 及有抑菌性或防抗药性的药物 ( 链霉素硫酸盐、乙胺丁醇和氯硫脲 ) ( Weil , 1994 ) , 但至今在与这种 20 疾病的斗争中在世界范围内仍未取得成功, 这是由于两种主要因素: 病人对医生开处方制度的不顺从及存在于发展中国家的财政限制。

在发展中国家对于控制结核病异烟肼预防疗法的效果还不确知。这种方法虽然广泛用于北美洲, 但它有两大缺点, 第一, 它可能必须对 TB 患者终生给药; 第二, 其费用即每位病人每六个月 18 美元花费可能是过 25 于高昂的, 特别是在感染最严重的地区, 那里每位病人每年可获得的用于全部保健的费用为 4 美元 ( O' Brien , 1995 ) 。

中止的和/或未完成的治疗, 除了由于对相关个体产生有害影响效果外, 造成了结核分支杆菌多种抗药性株的意外出现和传播, 这会使总体情况进一步复杂化 ( Beyers 等, 1996 ) 。最近的 WHO 评估表明, 全世 30 界 50,000,000 人口可能已携带有抗一种或多种最常用抗 TB 药物的结核分支杆菌抗性株。已在 1991 年确证, 纽约 1/3 的 TB 患者对至少一种药

物有抗性，且几乎 20 % 对利福平和异烟肼结合药物有抗性（Henderson, 1995）。

#### 4. 与 HIV 感染相互作用

据文献报道的结核病与 HIV 感染之间的密切关系以及这两种病常同时发生增加了局势的严重性（Torres 等, 1990；De Cock, 1994；Cantwell 和 Binkin, 1994；Murray, 1994；Antonucci 等, 1995；Mofeson 等, 1995；Davies, Wilkinson 和 Colvin, 1996；Wilkinson 和 Moore, 1996）。根据公众健康报告（Public Health Reports）（1995），在亚洲，由于与 HIV 平行感染而患上结核病的人数在这一十年预测要增加 7 倍。

在结核分枝杆菌株中多种抗药性株的出现及其它非典型的分支杆菌对这个问题又附加了一方面因素（Blumberg, Miller 和 Koornhof, 1994；Morse, 1994；Yew 和 Chau, 1995）。

#### 5. 社会 - 经济方面

最近，Darbyshire（1995）、Fauci（1995）、Law 等（1995）和 Mangtani 等（1995）已对造成疾病进一步传播的其它原因作了综述，诸如失业、拥挤、经济条件的总体下降、酒精中毒和公众健康基础受到侵蚀。

从流行地区向结核病已被很好控制的国家如美国增加的移民流量在控制结核病传播中产生另一些问题（Huebner 和 Castto, 1995）。据报道，移向美国的移民中结核病发生率比当地人口中的发病率高 12 倍（Ballew 和 Becker, 1995）。

上述这些趋势对流行地区和发展中国家 TB 病人的病例管理现存途径的改进以及能抑制和/或抵御结核病的新药的开发造成巨大压力（Cole, 1995；Voelker, 1995）。虽然从这两个领域工作的研究者中可觉察到谨慎的乐观态度（Mwinga, 1995；Grosset, 1995），但由于最近盛行的经济限制，即使是在发达国家也对开发新的抗结核病药所需资金产生严重限制，据估计针对每一种新化合物的所需费用为 150,000,000 美元（Grosset, 1995）。

#### 30 预防和治疗的免疫学前景

考虑到上述所列问题的严重性、与抵御结核病的现存方法有关的一

些限制和开发新型化学预防法和化学疗法的高费用，免疫学途径可能会提供一种恰当的且实际的替代方法，即发现一种有效的、经济上可付得起的用于控制和治疗结核病及其相关疾病的方法。

5 从利用牦牛分支杆菌 (*M. vaccae*) 的死细胞进行治疗的大量试验得到的结果 (Stanford 和 Grange, 1994) 表明, 这种死物寄生的微生物可以作为一种单一试剂应用于结核病的免疫疗法中 (Bahr 等, 1990a; Bahr 等, 1990b; Stanford 等, 1990a) 或者可以结合用于化学疗法中 (Stanford 等, 1990b; Prior 等, 1995; Onybebujoh 等, 1995)。

10 最近已将因酰胺哌啶酮的使用所造成的发炎过程的调节作用用来抵御结核病。由 Cole (1995) 报道的酰胺哌啶酮对结核病临床表现产生的良好效果对认为此药物在疾病治疗中具有免疫调节性的想法提供了基础。酰胺哌啶酮的这些效果归因于它对肿瘤坏死因子的潜在的抑制作用, 肿瘤坏死因子是一种伴随结核病的发炎过程中的细胞因子。

15 源于这两种途径的优点可进一步用于处理结核病的抗药情形。在这方面已有来自在伊朗 (Etemadi, Farid 和 Stanford, 1992) 和科威特、罗马尼亚、越南和印度 (Stanford 和 Grange, 1993) 所做的大量实验报道的鼓舞人心的数据。

#### 免疫学目标

20 在过去几十年鉴别结核分支杆菌免疫活性成分的努力主要集中在蛋白质 (Daniel, 1984; Chaparas, 1984; Yanez 等, 1986; Deshpande 等, 1994; Torres 等, 1994)、多糖 (Daniel, 1984; Misaki, Azuma 和 Yamamura, 1987)、肽糖脂和磷脂 (Brennan, 1984)、脂多糖 (Hunter, Gaylord 和 Brennan, 1986)、糖脂 (Brennan, 1984; Mc Neil 等, 1989) 和 lipoarabinomannan (Arya, 1993; Sieling 等, 25 1995)。

虽然细胞壁脂类成分与结核分支杆菌的毒力有关 (Collins, 1994), 但这些化合物作为天然脂类即  $\beta$ -羟基脂肪酸被认为不具有免疫性。分支菌酸可能在人体对结核分支杆菌感染的免疫应答的复杂过程中起重要作用, 这一可能性只是在最近才变得明朗起来。

30 对分支菌酸-BSA 结合物的体液应答首先发现于 1994 (南美专利申请 No. 95/3077 和 PCT 专利申请 No. WO 95/28642)。大约在同时, 由



Beckman 等证明了对分支菌酸的可测细胞免疫应答 (1994)。作者们发现, 这些化合物刺激人类双阴性 T - 细胞 ( human double - negative T - Cells ) 稀有亚群的增殖, 还描述了一种发生于专职 ( professional ) 抗原呈递细胞如巨噬细胞和树状细胞上由 CD1 分子进行的抗原呈递新途径 ( Beckman 等, 1994; Beckman 等, 1995; Rosat 等, 1995 )。与此类似, 发现异戊二烯焦磷酸酯 ( prenyl pyrophosphate ) 也由抗原呈递细胞上的 CD1 分子呈递 ( Morita 等, 1995 )。

分支杆菌的细胞壁脂类成分

分支杆菌细胞壁被认为是一种高度分化的且复杂的结构, 它有极高含量的脂类, 构成细胞壁物质总量的 60 % ( Grange, 1988 )。图 1 给出其示意图形式。

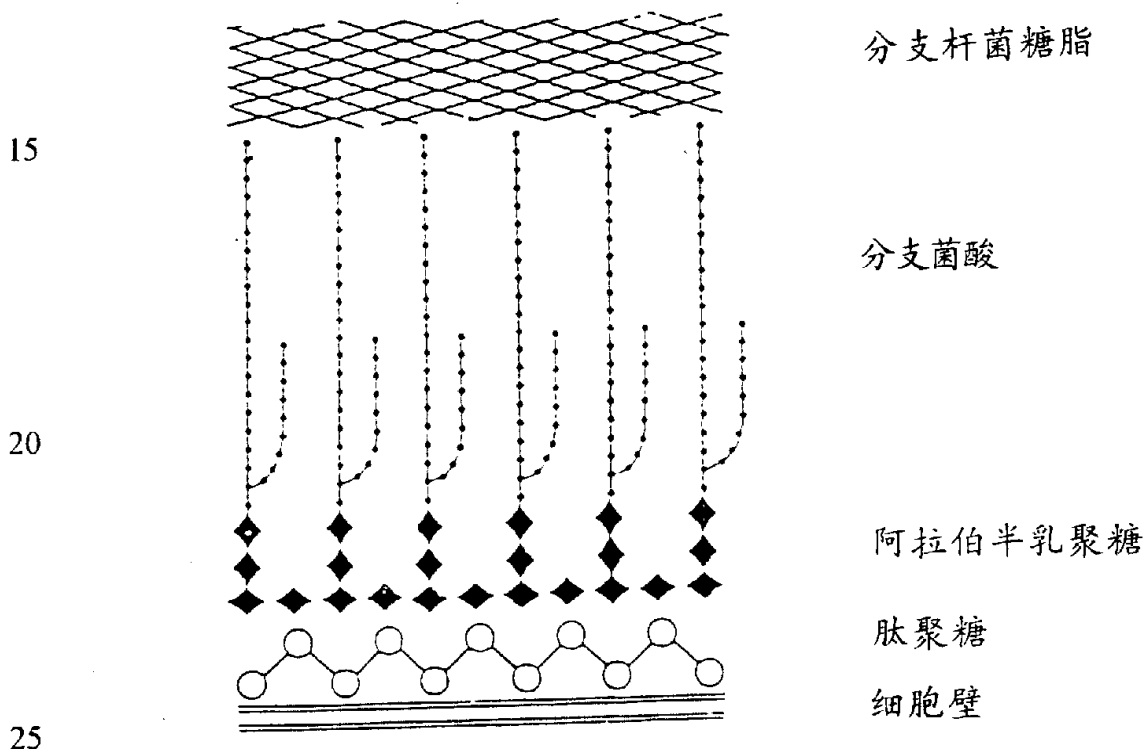


图 1 分支杆菌细胞壁示意图

分支菌酸 - 分支杆菌细胞壁的主要脂类 ( Petit 和 Lederer, 1984 ), 被认为是外层通透性屏障的一种主要成分 ( Wheeler 等, 1994 ), 并且承担着这组微生物的“耐酸性” ( Grange, 1988 )。与不同类型游离



分支菌酸在非常有限范围的溶剂中是可溶的，这使得它们的纯化复杂化（Brennan 和 Nikaido，1995），并导致繁琐昂贵的方案。例如，Beckman 等人（1994）在用对-溴苯甲酰甲基溴衍生、逆相 HPLC 分离、收集分支菌酸峰群（peak cluster）组分、再皂化并萃取后才从结核分支杆菌中得到纯化分支菌酸。

希望细胞壁脂类成分特别是分支菌酸在结核病免疫疗法和免疫预防和/或其副作用中能发挥潜在的作用，本发明描述了一种新的、更为有效的纯化大量这种成分的方法。

#### 发明概述

10 根据本发明，一种从细胞壁成分或其类似物或衍生物的提取混合物和污染物中或从细胞壁成分或其类似物或衍生物的合成混合物和污染物中分离和纯化一种特定的微生物细胞壁成分或其衍生物或类似物的方法，包括下列步骤：

将此提取混合物或合成混合物溶解于一种多相溶剂中形成溶液；

15 将此溶液进行液-液相萃取。

该特定的细胞壁成分或其衍生物或类似物可以是脂或糖。

该特定的细胞壁成分或其类似物或衍生物优选为脂。

更优选脂是脂肪酸。

更优选脂是分支菌酸。

20 并且更优选细胞壁成分是一组成分或其类似物或衍生物，这组物质是霉素酸或其衍生物或类似物的混合物。

微生物细胞壁成分可以从来自细菌、真菌或酵母。

微生物细胞壁成分优选来自细菌，此细菌可以选自分支杆菌、棒状杆菌、诺卡氏菌、红球菌、无支酸菌和其它合适的细菌菌种。

25 当细菌选自分支杆菌时，它可以是选自结核分支杆菌、鸟分支杆菌（*M. avium*）和牝牛分支杆菌的菌株。

多相溶剂系统优选包括氯仿、甲醇和水。

多相溶剂系统更优选为两相溶剂系统。

两相溶剂系统优选包括上层液相和下层液相。

30 此方法还优选包括步骤：使溶剂系统的上层和下层两相混合并平衡。

优选上层液相的组成为 12 - 18 % 氯仿、45 - 55 % 甲醇和 25 - 40 % 水。更优选上层液相的组成为 15 % 氯仿、52 % 甲醇和 33 % 水。

优选下层液相组成为 50 - 80 % 氯仿、15 - 40 % 甲醇和 2 - 8 % 水。更优选下层液相的组成为 68 % 氯仿、27 % 甲醇和 5 % 水。

5 液-液相萃取可以是逆流萃取或每相多次萃取。

可以将纯化的细胞壁成分或其类似物或衍生物进行丙酮提取，以除去杂质。

10 细胞壁成分或其类似物或衍生物优选不需要进行化学衍生以从任何一种杂质中将其分离，杂质可以来自微生物生长物、微生物生长介质或合成混合物。

可将纯化的细胞壁成分或其衍生物或类似物进行皂化，以逆转它的任何一种甲基酯化作用。

附图的简要说明

15 现在参考附图仅以实施例的方式对本发明进行更为详细的描述，其中：

曲线 1a：是结核分支杆菌粗提取物的 HPLC

曲线 1b：是试剂粗提取物的 HPLC

曲线 1c：是培养基粗提取物的 HPLC

曲线 2a：是结核分支杆菌粗提取物的丙酮提取上清液的 HPLC

20 曲线 2b：是试剂粗提取物的丙酮提取上清液的 HPLC

曲线 2c：是培养基粗提取物的丙酮提取上清液的 HPLC

曲线 3a：是结核分支杆菌粗提取物经丙酮提取后的 HPLC

曲线 3b：是试剂粗提物经丙酮提取后的 HPLC

曲线 3c：是培养基粗提物经丙酮提取后的 HPLC

25 曲线 4a：是来自丙酮提取后的粗提物经逆流纯化的结核分支杆菌分支菌酸的 HPLC

曲线 4b：是来自丙酮提取后的粗提物经逆流纯化的试剂的 HPLC

曲线 4c：是来自丙酮提取后的粗提物经逆流纯化的培养基的 HPLC

30 曲线 5a：是来自未经丙酮提取的结核分支杆菌粗提物经逆流纯化的分支菌酸的 HPLC

曲线 5b：是来自未经丙酮提取的试剂粗提物经逆流纯化的试剂的 HPLC

曲线 5c: 是来自未经丙酮提取的培养基粗提物经逆流纯化的培养基的 HPLC

曲线 6a: 是逆流纯化后经丙酮提取的结核分支杆菌分支菌酸丙酮上清液的 HPLC

5 曲线 6b: 是逆流纯化后经丙酮提取的试剂的丙酮上清液 HPLC

曲线 6c: 是逆流纯化后经丙酮提取的培养基的丙酮上清液 HPLC

曲线 7a: 是逆流纯化后经丙酮提取后结核分支杆菌纯化分支菌酸的 HPLC

曲线 7b: 是逆流纯化后经丙酮提取后纯化的试剂的 HPLC

10 曲线 7c: 是逆流纯化后经丙酮提取后纯化的培养基 HPLC

曲线 8a: 是牝牛分支杆菌粗提物再皂化后的 HPLC

曲线 8b: 是逆流纯化后经丙酮洗涤的牝牛分支杆菌分支菌酸的 HPLC

15 下面的图 3 给出了对细菌细胞壁成分粗提物进行的各种纯化方法以及进行 HPLC 的各个步骤的图示说明。

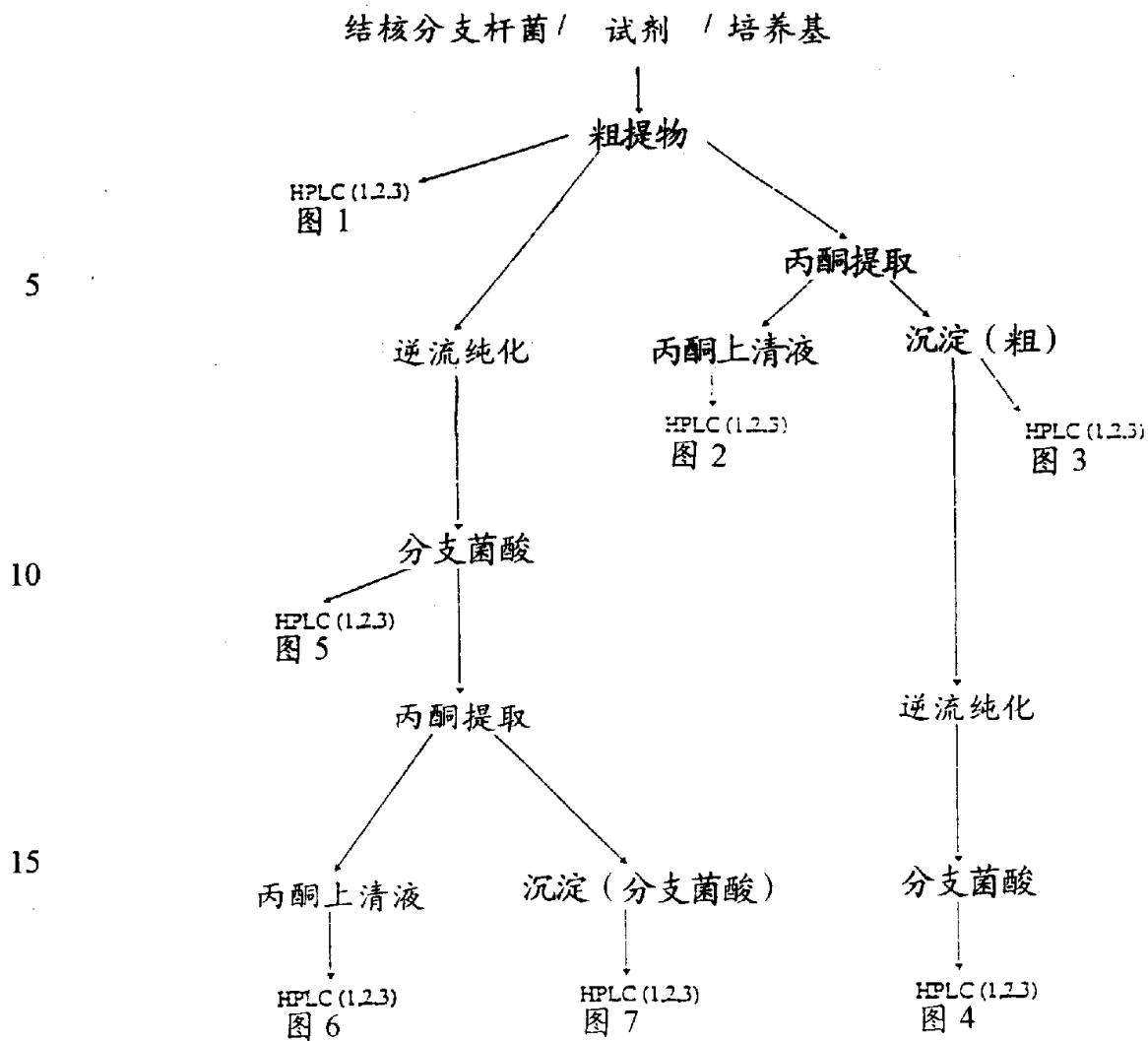


图 3 从结核分支杆菌细胞壁脂类粗提物中纯化分支菌酸的图示

20 优选实例描述

发明目的

本发明目的是分离和纯化微生物细胞壁脂类成分和其衍生物和类似物，特别是来自各种微生物菌株的分支菌酸，用于：

25 1. 抗结核病和其它抗分支杆菌的免疫预防制剂的开发，如用于人和兽的疫苗。这种制剂可以以分支菌酸为基础，有或没有其它分支杆菌细胞成分存在，并且可以要求或不要求使用各种类型的佐剂，包括白介素。这种制剂的开发将包括任何一种提供分支菌酸或其它细胞壁脂类成分致免疫的必要的操作（如致免疫结合物、亚单位疫苗的制备）。

30 2. 用于确定样品如唾液、脑脊髓液、血液、尿、粪便等中分支杆菌细胞存在的诊断试验的开发和生产。

3. 单一纯化细胞壁成分和生产商业化, 用于研究或其它目的(如用作标准或用于诊断试验的开发)。

4. 分支杆菌和其它起因的疾病包括自身免疫副作用的免疫疗法。

5. 多抗药性的分支杆菌感染的免疫疗法。

5 6. 用于确定体液或细胞免疫系统对免疫或感染过程反应(体液或细胞免疫系统的刺激程度)的试验(体外或体内)的开发。

7. 目标在于抑制细胞壁合成的新的抗结核病药物的开发。

8. 肿瘤疾病的免疫控制。

10 分支菌酸的高纯度对免疫预防制剂如疫苗、免疫疗法和/或检测方法而言很重要, 特别是针对下列情形则更为重要:

i) 溶剂系统的确定, 其中将进行结合物的制备;

ii) 实验动物免疫接种必需的结合物的制备;

iii) 确定分支菌酸与载体分子的偶联效率, 即用来监测结合过程;

15 iv) 用于监测免疫接种过程及用于 ELISA 型免疫分析的开发所需的其它结合物的制备;

v) 所产生抗体的特异性及抗体性质的评估;

vi) 目标在于抑制剂细菌细胞壁合成的新的抗结核病药物的开发。

20 本发明提供了一种利用两相溶剂系统同时纯化和分离不同类化合物的方法, 这些化合物可以是从小细胞培养物中提取的或是被合成的细胞壁成分或其衍生物或类似物。在本发明一优选实例中, 微生物源的细胞壁脂类成分可从污染物质中分离并能作为一个组从污染物中分离。通过这种方法, 可以将纯化的细胞壁脂类成分如分支菌酸以及来自微生物如分支杆菌、棒状杆菌、诺卡氏菌和红球菌的细菌细胞壁其它脂质成分作为一组分离。虽然该方法适用于所有的分支杆菌、棒状杆菌、诺卡氏  
25 菌和红球菌菌株, 但此处实施例只详述有关两株分支杆菌的实验。

实质上, 该方法包括将溶解于特定两相溶剂系统的微生物细胞壁粗提物进行逆流液/液分离以大量纯化特定的细胞壁成分。在分支菌酸情况下, 该方法纯化分支菌酸的收率约为细胞粗提物干重的 3 至 12 %。

30 该方法包括收集细菌如分支杆菌细胞生长物, 随后进行皂化并萃取细胞壁脂质成分。对于从细胞骨架剩余物中释放出脂类成分或从脂肪酸的任何一种形式酯中释放出游离脂肪酸盐来说, 皂化步骤是必需的, 对

于从细胞壁成分/试剂混合物中除去皂化试剂来说萃取步骤是必需的。

5 将从大规模萃取过程所得的细胞粗提物溶解于两相溶剂系统的下层相，并加入适量的两相溶剂系统的上层相。然后将此溶液通过连续约 25 个循环进行逆流分布，每一循环包括上层和下层液相的混合、相的分离以及将分离的相转移至干净的上下相中。

当纯化的细胞壁脂类成分存在于含甲醇的溶剂中延长几个阶段时，发生甲基酯化作用。通过皂化作用很易将其逆转，即在室温下加入试剂 A 并根据“方法”中所述的手段进行再萃取。

10 在各个试管中通过脂肪酸在下层或上层液相中的乳化型式可辨别来自细胞壁的不同组脂肪酸。例如，通过分支菌酸级分在起始的几个试管内的下层液相中主要乳化型式很快能识别出分支菌酸级分。然后将经逆流分离的物质从试管中抽出，分支菌酸级分即使在经逆流分布纯化后仍发现其含一些杂质。向纯化样品中加入适量丙酮，并发现这样能提取这些杂质。（发现如果向粗提物中加入丙酮，提取了一些但不是所有的

15 杂质，这些杂质可来自细菌培养基成分。）用 HPLC 分析纯化的分支菌酸以确定它们的纯度、特质（profile）和收率。

将本发明方法应用于来自结核分支杆菌、鸟分支杆菌和牝牛分支杆菌的分支菌酸的纯化，并证明了该方法对所有这些分支杆菌菌株是有效的。因此，利用本发明的方法，首次使得可能分离相对大量的分支菌酸

20 或其它特定的细胞壁脂类成分以及将其纯化用于随后的用途如上述任意一项应用中。

实施例

材料

培养物

25 结核分支杆菌 H37Rv ATCC 27294 - 一株致病株，最初分离自受感染的人肺，用于本实验中。

牝牛分支杆菌 ATCC 15483 - 一株源自母牛奶的菌株。

培养物呈冻干形式购自美国马里兰州的美国典型培养物中心（ATCC）。

30 培养基

下列培养基用于结核分支杆菌和牝牛分支杆菌的培养：



液体培养基: Bubos 肉汤

固体培养基: Lowenstein - Jensen (LJ) 培养基  
Middlebrook 7H - 10 培养基

- 5 根据亚特兰大的健康与人类服务机构公众健康美国部的 Kent 和 Kubica (1985) 在水平 III 实验室指南 (a Guide for the Level III Laboratory, Public Health U. S. Department of Health and Human Services, Atlanta.) 中。

### 试剂

下列试剂用于提取出的分支菌酸的纯化:

- 10 氯仿 (Saarchem, 分析级)  
甲醇 (Merck, 化学纯)  
丙酮 (BDH, 分析级)。

在制备用于分支菌酸的提取、衍生和高效液相色谱 (HPLC) 分析中的试剂时, 使用 HPLC 级甲醇和双蒸去离子水。

- 15 试剂 A: 溶解于甲醇 - 水 (1:1) 的 25% 氢氧化钾 (分析级): 62.5g 氢氧化钾溶于 125ml 水中, 并加入 125ml 甲醇 (BDH, HPLC 级)。

试剂 B: 浓盐酸 (BDH, 分析级) 以 1:1 的水稀释。

- 20 试剂 C: 溶解于甲醇 - 水 (1:1) 的 2% 碳酸氢钾 (BDH, 分析级): 10g 碳酸氢钾溶解于 250ml 水中, 并加入 250ml 甲醇。

试剂 D: 将冠醚中 (Pierce Chemical Co., 目录号 48891) 的对 - 溴苯甲酰甲基溴以 500 $\mu$ l 量分散于带有镀特氟隆的隔板的琥珀色螺钉帽小瓶中。将帽拧紧, 并用 Parafilm 包裹。于 4 $^{\circ}$ C 存放试剂 D。

- 25 试剂 E: 以 1:1 比例将试剂 B 与甲醇混合制备试剂 E。

### HPLC 标准:

- 30 来自 Ribi ImmunoChem Research Company, 目录号 No R - 50 的高分子量内标物 (High Molecular Weight Internal Standard) 将 1g 标准物悬浮于 2.0ml 二氯甲烷 (BDH, HPLC 级) 中, 将 350 $\mu$ l 等份试样被分散于带特氟隆镀隔板的小的螺钉帽小瓶中。用 Parafilm 包裹这些小瓶, 并于 4 $^{\circ}$ C 存放。

氯仿 ( Associated Chemical Enterprises, 化学纯级 )

二氯甲烷 ( BDH, HPLC - 级 )

采取所有必要的安全措施, 在实验前制备新鲜的试剂 A、B、C 和 E。

#### 5 逆流分布装置

在研究过程中使用 H O POST, Instrument Company Inc., Middle Village, New York 生产的逆流装置。图 4 显示出在 University of Pretoria 生物化学系所摄的此装置图片。该模型中“列车 ( train )”由  $2 \times 250$  内部 - 连接的试管组成。

10 当然也可以使用任何一种其它的逆流分布化工系统。

红外光谱仪

使用 BOMEM Michelson 100 FTIR 装置和 Hewlett Packard 绘图仪进行经逆流纯化的分支菌酸的红外光谱分析。

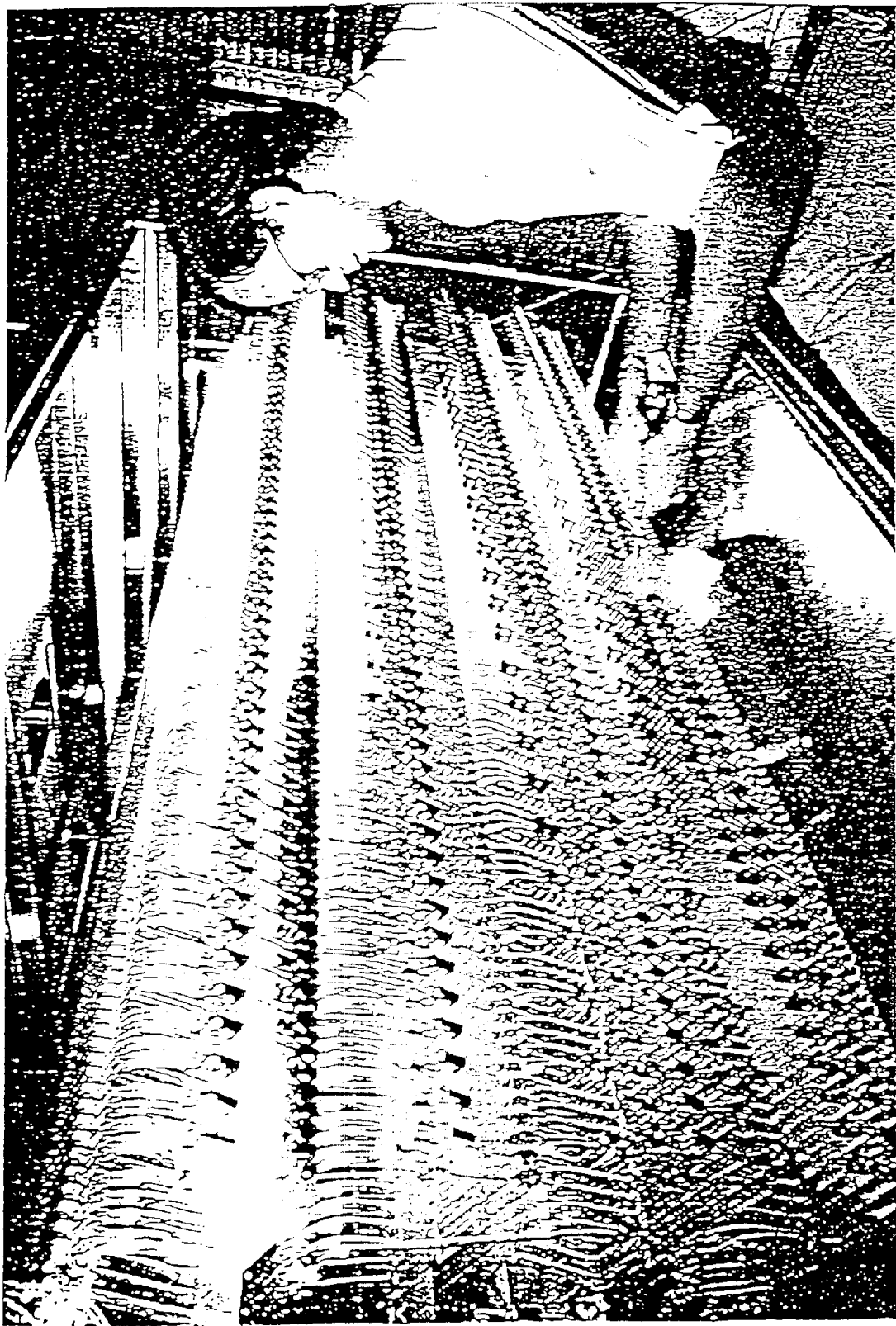


图4 用于分支菌酸纯化的逆流分布装置

## 方法

实验中使用下述方法:

### 细菌株的培养

于 37 °C 培养细菌株, 使用:

5 Dubos 肉汤

Lowenstein - Jensen 培养基 (斜面), 和  
Middlebrook 7H - 10 琼脂培养基 (斜面)。

10 根据 Kent 和 Kubica ( 1985 ) 在 a Guide for the Level III  
Laboratory, Public Health. U. S. Department of Health and  
Human Services, Atlanta 中推荐的方法进行培养基的接种和分支杆菌  
培养物的操作。

来自细菌样品的细胞壁脂类成分的制备

细菌样品的制备包括三步:

15 收集分支杆菌细胞

皂化及

萃取脂肪酸。

从培养基斜面的表面刮取细菌生长物来进行收集。也可通过离心从  
液体培养物中收集生长物。在试剂 A 中通过与灭菌玻璃珠一起振摇或涡  
旋所收集的细胞来制备匀质细菌悬浮液, 达最终浓度约  $1 \times 10^7$  cfu\*/ml

20 \*cfu = 菌落形成单位

在一个高压灭菌锅中 121 °C 进行试剂 A 中分支杆菌的皂化 1 小时。

根据 Butler、Jost 和 Kilburn ( 1991 ) 所述方法进行脂肪酸的皂化、  
萃取和衍生。

细胞壁脂类成分的萃取

25 使样品冷却, 并将 1.5ml 试剂 B 导入每个样品。涡旋之后, 检测每  
个样品的 pH, 必要时用试剂 B 调节 pH 至 1。

30 随后, 向每个样品中加入 2.0ml 氯仿并涡旋 30 秒钟。底层用巴斯德  
移液管除去, 转移至 WISP 瓶并于 85 °C 在一加热块蒸发器中氮气流下蒸  
发至干燥。为中和遗留的痕量酸, 向每一样品中加入 100µl 试剂 C, 并  
于 85 °C 在一加热块蒸发器上氮气流下将液体蒸发至干燥。将样品存放于  
暗处 4 °C 丙酮条件下直至使用或用于 HPLC 分析。

## 用于 HPLC 分析的脂肪酸的衍生

根据下述方法衍生经提取并纯化的脂肪酸（分支菌酸）：

通过在加热块蒸发器上 85 °C 氮气流下蒸发除去丙酮。向每个冷却的样品中加入 2.0ml 试剂 A。样品涡旋 30 秒钟，加入试剂 B（1.5ml），  
5 样品再次混合，需要的话将 pH 调节至 pH 1.0。接着，加入氯仿（2.0ml），随后加入 100 $\mu$ l 试剂 C。加盖样品涡旋 30 秒，通过导入氮气流于加热块蒸发器上 85 °C 加热 5 分钟并干燥。

通过导入 1.0ml 氯仿和 100 - 150 $\mu$ l 试剂 D、涡旋样品 30 秒钟、密封含有样品的小瓶并将它们置于加热块蒸发器上 85 °C 放置 20 分钟来进行衍生作用。样品冷却后加入试剂 E（1.0ml）。样品再次涡旋 30 秒，  
10 使层分离。底层用巴斯德移液管移去并转移至 WISP - 小瓶中。将小瓶置于加热块蒸发器上，利用氮气流 85 °C 下将其中内含物蒸发至干燥。

残余物重新悬浮于 0.212g（相当于 160 $\mu$ l）的二氯甲烷中、加盖并涡旋。在每一份重制样品中引入 5 $\mu$ l HPLC 内标物，通过一 0.45 $\mu$ m 膜  
15 过滤器过滤入琥珀色 WISP - 瓶中。重新加盖的小瓶存放于 4 °C 下直至准备 HPLC 分析。

## HPLC 分析及分支菌酸的定量

HPLC 分析时对每一份样品中 25 $\mu$ l（操作过程中保持于冰上）进行分析，在对每组样品分析前对对照样品即 25 $\mu$ l 经过滤的二氯甲烷进行分析。  
20 若分析大量样品时，为证实 HPLC 装置的可靠性，在每三份或四份测试样之后进行对照样分析。

使用 Waters System High Performance Liquid Chromatography 装置（Milford, MA）进行逆相 HPLC 分析，装置组成如下：

- 系统对照仪（Waters 600E）；
  - 25 检测仪（Waters 486 Tunalder）；
  - 自动样品仪（Waters 712 WISP）；
  - 数据组件（Microsep M741）；
  - Waters 柱（Nova - Pak C18 60A, 4 $\mu$ m, 3.9 × 150mm）和用于钢制萃取柱的端口连接设备；
  - 30 防护柱（Guard - Pak / Nova - Pak C18）。
- 操作条件为：

流动相:

溶剂 A: HPLC 级甲醇

溶剂 B: HPLC 级二氯甲烷

流速: 2.5ml / min

5 柱温: 30 °C

检测器设置在 260nm。

HPLC 梯度起始包含 98 % ( v/v ) 甲醇 ( 溶剂 A ) 和 2 % ( v/v ) 二氯甲烷 ( 溶剂 B )。1 分钟时梯度线性增至 80 % A 和 20 % B; 10 分钟时为 35 % A 和 65 % B, 保持 5 秒钟, 然后在 10 秒之内减回至 98% 10 A 和 2 % B。此比率保持 6 分钟, 使在注射下一个样品前系统平衡。

通过将测试样品的结合峰面积与导入量的高分子量 HPLC 内标物的峰面积相比较, 进行分支菌酸的数学定量。

分支菌酸的纯化及其它脂肪酸的组分离

15 含编号为 0 - 24 的 25 支试管逆流分布列 ( train ) 用于实验。将大约 900ml 上层液相导入缓冲区中。

将溶解于 10ml 下层液相和 10ml 上层液相的来自大规模提取实验 ( 30 - 150mg ) 的结核分支杆菌细胞粗提物样品导入 0 号试管。其余 24 支试管中导入 10ml 等量的下层液相。每一循环呈 10ml 体积的上层液相被自动分配于 0 号试管, 25 个循环中重复进行, 操作均为 16 小时。 20 由此执行 25 个逆流循环, 每一循环由 20 分钟的混合摆动和 40 分钟相分离时间组成。

该过程的图解说明示于图 5。

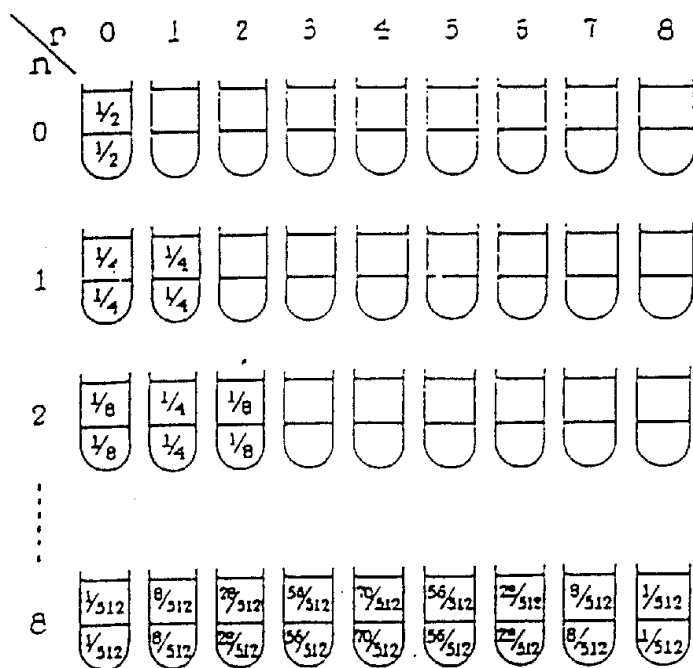


图 5 9 支试管的逆流分布系统示意图

每次转移时，来自样品的且存在于上层液相的任何一种溶质被转入下一试管。25 次转移完成后，分离开的溶质级分部分应分布于 25 支试管链中。

为确定脂肪酸在 25 支试管中的分布，在试管列中观察上层和下层液相中的乳化型式，由此确定级分部分。

然后使用一个附带一支特氟隆管子的 50ml 玻璃注射器从试管中抽出经逆流分离的物质。这些物质收集成七处级分部分，分别于 70 °C Buchi 蒸发器中真空干燥，将干燥的物质再溶解于氯仿、甲醇或水（约 5ml）中，转移至琥珀色 WISP 瓶中并于 4 °C 下存放直至使用。

### 丙酮提取

为除去逆流纯化物质中仍存在的任何残留杂质，再用丙酮进行提取，操作如下：

向置于 WISP 瓶中的纯化分支菌酸样品（约 5.0mg）中加入等份试样的丙酮（3.0ml），样品经涡旋混合。沉降后，吸气除去丙酮，且此过程重复两次。最终纯化和提取的样品在丙酮中存放。

通过逆流分离纯化的分支菌酸收率

为计算纯化/分离的大概收率，将逆流分离/纯化后所得样品中存在的分支菌酸重量与导入逆流装置的细胞粗提物中存在的这些化合物重量相比较，根据分支菌酸峰群的相对峰面积与细胞粗提物的 HPLC 色谱曲线中标准物的峰面积计算。

- 5 另一计算方法是，将纯化分支菌酸的 HPLC 色谱曲线分支菌酸峰群的峰面积与粗提物的峰面积比较，来评估产物的收率和纯度。

#### 纯化分支菌酸的红外光谱分析

- 10 使用从结核分支杆菌提取的逆流纯化样品（1mg）进行红外光谱分析。将分支菌酸溶解于 1ml HPLC 级氯仿，并注入液体瓶。HPLC 级氯仿用作参比。随后将参比的吸光度从样品曲线（profile）中减去。

#### 结果

#### 结核分支杆菌分支菌酸的纯化

- 15 根据 Butler、Jost 和 Kilburn（1991）提出的用于分离分支菌酸的方法，发现从结核分支杆菌 H37Rv（ATCC 27294）中提取的物质在 25 个循环的逆流萃取之后，含有少于 10% 的分支菌酸（图 6）。通过 HPLC 仅在级分 1 和 2 中鉴定出分支菌酸，级分 1、2 的总和包括 9.3% 的装载入逆流装置的粗提物干物质。分支菌酸呈现的分配系统仅为 0.08，使得从分配系数约为 1.26 的较短链皂化脂肪酸中能完全分离（图 6）。通过  
20 在逆流试管列中起初几个试管内分支菌酸的乳化型式很易识别出分支菌酸级份，随后 3 支试管不含任意显著量的物质。在含下层液相乳浊液的 4 支试管中可鉴别出皂化的短链脂肪酸，随后即是 8 支含上层液相乳浊液的试管，表明在分离过程中分解的脂肪酸（上层相乳浊液）与质子化的脂肪酸（下层相乳浊液）间平衡。剩下的级分 6 和 7 不能用 HPLC 分析，因为它们不溶于氯仿，这一性质也就排除了它们含有任何分支菌酸的可  
25 能性。

来自结核分支杆菌的粗提物、所用试剂及细菌培养基的 HPLC 特质/色谱分别示于曲线 1a、1b 和 1c。

- 30 经逆流分布纯化的分支菌酸仍含有一些杂质，可由 HPLC 在保留时间 4 - 6 分钟间检测出来（曲线 5a）。显示如何使用丙酮从样品中提取这些杂质的图示于图 3。该图代表了一项对单一大批结核分支杆菌粗提物的系统研究，使得能直接进行 HPLC 图形对比及计算相对产率。



杂峰不是来自于提取和纯化步骤所用的试剂(曲线 5b),但可来自细菌培养基成份(曲线 5c)。当在逆流纯化前对粗提物进行丙酮提取时,发现从细菌(曲线 2a)和生产培养基(曲线 2c)样品中提取了某种程度的杂质,但这不足以从最终逆流纯化产品中除去所有杂质(曲线 4a)。

5 当用丙酮提取干燥的、逆流纯化分支菌酸时,表明杂质可溶于丙酮(曲线 6a 和 6c)。丙酮清洗的分支菌酸级分的 HPLC 分析表明,此级分不含任何杂质(曲线 7a),也不含那些由于衍生试剂及可在来自纯化试剂(曲线 7b)和生长基质(7c)的对照提取物中观察到的杂质。

根据这些结果,我们要求保护一种分支杆菌粗提物,由 Butler、Jost 和 Kilburn 的方法获得,并通过上述的逆流分离纯化,随后以丙酮提取,得到不含任何由 HPLC 可检测出的杂质的分支菌酸(曲线 7a)。

通过将逆流纯化物质的量与根据 HPLC 色谱吸收峰的面积计算出的分支菌酸收率相比较,评估分支菌酸纯度。在上述衍生作用之后由 HPLC 分析丙酮清洗前的逆流纯化分支菌酸(曲线 5a; 0.3mg)。当将内标物的吸收峰面积(代表 5.01 $\mu$ g)与分支菌酸的相比较时,计算出 0.27mg 产量的分支菌酸,表明为标重物质的 90%。考虑到在衍生及提取过程中通过小瓶间相转移损失的一些物质,以及由丙酮提取除去的一些杂质,可认为在曲线 7a 中 HPLC 图形表示的分支菌酸纯度达 100%。

逆流纯化得到呈甲基酯衍生物的分支菌酸。从丙酮提取前逆流纯化分支菌酸的红外光谱(图 7)以及在省略纯化步骤后在试剂 A 中再皂化时通过 HPLC 分析(未示出结果)可证明这一点。试剂 A 的加入恢复了无酸条件并是用对-溴苯甲酰甲基溴有效衍生所需要的。

#### 牝牛分支杆菌分支菌酸的纯化

用提取和纯化结核分支杆菌同样的方法提取和纯化牝牛分支杆菌生长物。粗提物 HPLC 分析(曲线 8a)显示出保留时间大于 5 分钟的三个峰群及保留时间短于 2 分钟的宽的试剂/短链脂肪酸峰群。在逆流纯化和用丙酮清洗之后,在 HPLC 柱上保留时间大于 5 分钟处存留两个峰群(曲线 8b)。而且,试剂/短链脂肪酸峰群相当窄,没有可测出的杂质痕量。以物质质量为基础,被纯化的分支菌酸约 5% 收率,其中通过对比粗提物与纯化分支菌酸提取物的 HPLC 色谱分支菌酸峰群面积计算收率为 4.3%。

从鸟分支杆菌 ( ATCC 25291 ) 提取的逆流纯化分支菌酸得出相似的结果。

除产率稍有些低, 这些结果与结核分支杆菌分支菌酸的纯化中所观察的结果相似, 由此证明了在分支杆菌种中分支菌酸逆流纯化方法的较

5 广泛的应用。

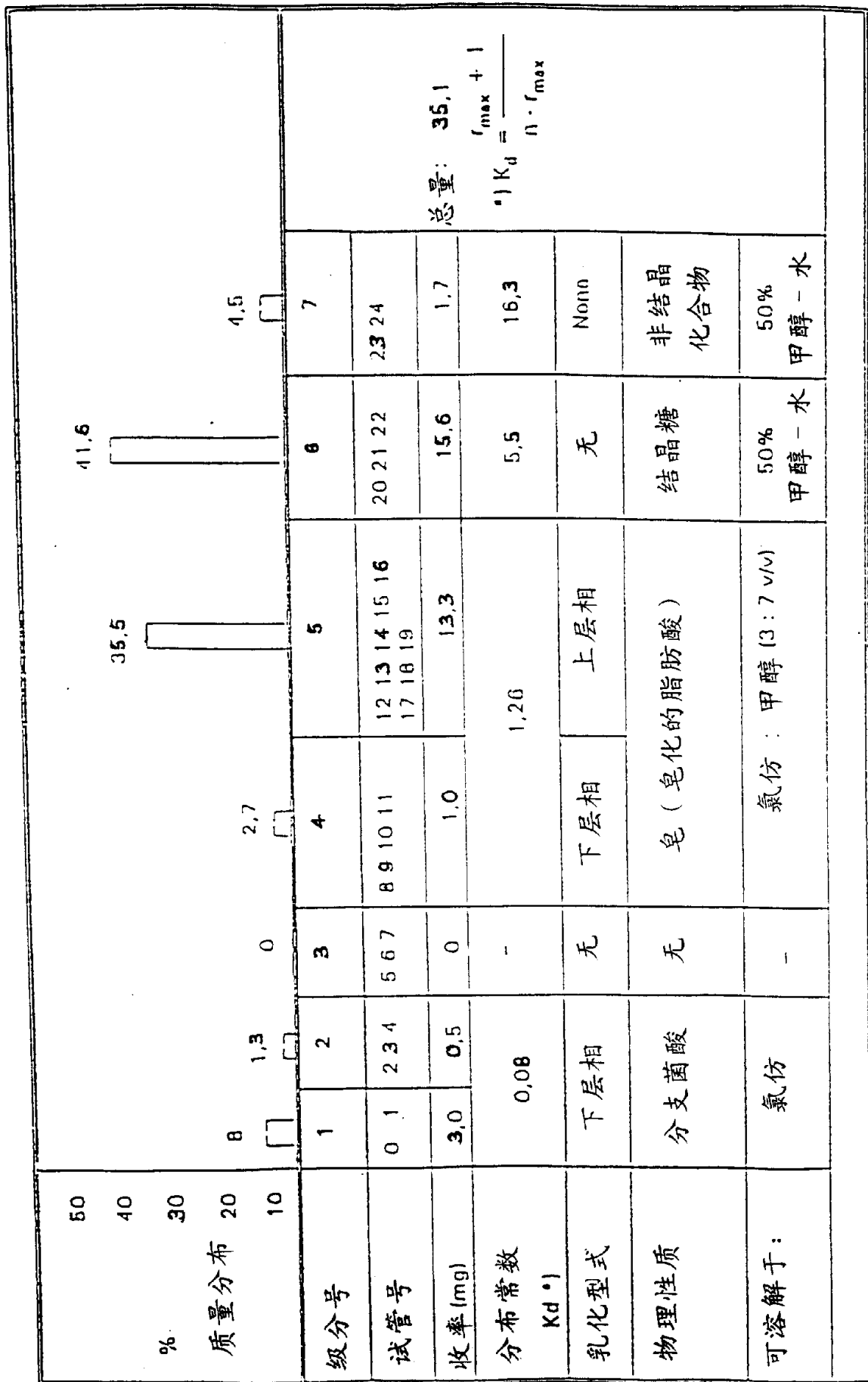


图 6 结核分支杆菌分支菌酸粗提物中成分的逆流分离

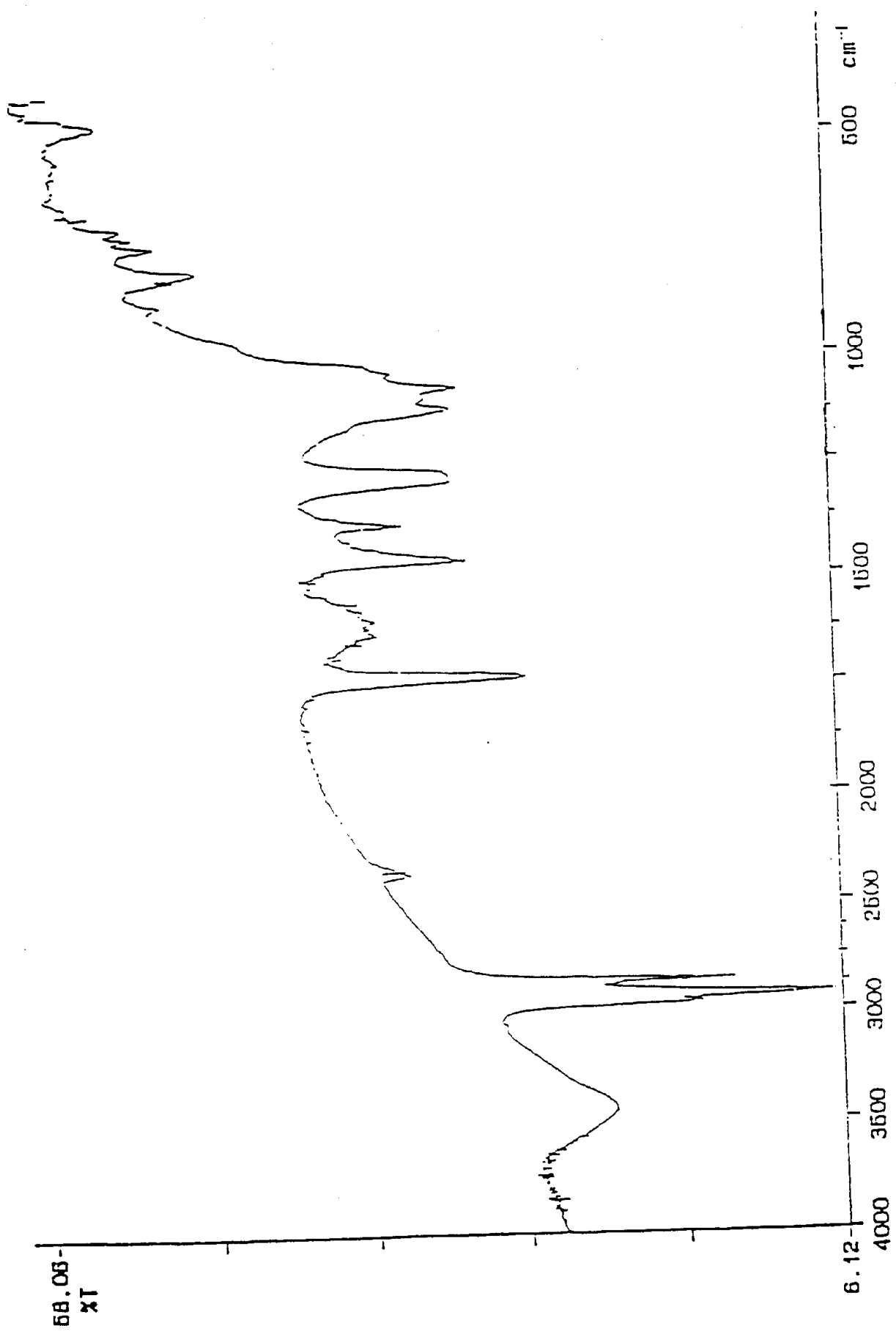


图7 来自结核分支杆菌逆流纯化分支菌酸的红外光谱

## 参考文献

- Antonucci, G., H., Girardi, M. C., Raviglione 和 G. Ippolito. 1995. HIV 感染者中发生结核病的危险因素: 未来群研究, JAMA, 美国医学会杂志, 274, 143 - 148.
- 5 Arya, S. C. 1993. 通过脂阿拉伯甘露聚糖抗原或抗体或溶菌酶水平的分析进行的结核病血清学诊断, 31, 2836 - 2837.
- Ballew, K. A. and D. M., Becker. 1995. 在接受卡介苗的成人中进行的结核病监测, 南部医学杂志, 88, 1025 - 1030.
- Bahr, G. M., J. L. Stanford, T. D. Chugh 等, 1990a. 对科威特肺结核  
10 患者的调查, 为牦牛分支杆菌免疫疗法研究作准备. 结核, 71, 77 - 86.
- Bahr, G. M., M. A. Shaaban, M. Gabriel 等, 1990b. 用牦牛分支杆菌进行的改进的肺结核免疫疗法, 结核, 71, 259 - 266.
- Beckman, E. M., S. A. Porcelli, C. T. Morita 等, 1994. 由 CD1 - 限制的 $\alpha\beta^+$ T 细胞对脂抗原的识别. 自然, 372, 691 - 694.
- 15 Beckman, E. M., S. A. Porcelli, C. T. Morita, S. Furlong 和 M. B. Brenner. 1995. DC1 分子: 抗原呈递的第三途径. 在: 第九次国际免疫大会汇编, 旧金山, 23 - 29 七月, 4190.
- Berger, F. M., Bona, C., Lechevalier, M. P., 1995. 免疫佐剂及其制备方法. 美国专利 No 4 877 612.
- 20 Besra, G. S., D. E. Minnilin, M. J. Simpson, M. S. Baird, P. R. Wheeler 和 C. Ratledge. 1993. 4 - (2 - 十八烷基环丙烷 - 1 - 基)丁酸甲酯的合成: 分支菌酸合成中可能的抑制剂, 脂化学与物理学, 66, 35 - 40.
- Beyers, A. D., P. R. Donald, P. D. van Helden 等, 1996. 结核病研究  
25 - 前途. SAMJ, 南非医学杂志, 86, 30 - 33.
- Bloomfield, G. 1995. 第 4 章, 59 - 84 页, 结核病诊断, 在: 结核病趋势与机会, PJB 出版有限公司.
- Blumberg, L., B. Miller 和 H. J. Koornhof. 1994. 结核分支杆菌各种药物抗性株摘要集: 结核病 - 面对 2000. 关于在发展中国家特别是南非结核病的短期未来的科学研讨会, Pretoria, 南非, 1994 年 3 月 13 -  
30 17 日.

Brennan, P. J. 1984. 抗原性肽聚糖脂, 磷脂和糖脂, 在: 分支杆菌 - 原始资料集, 第 18 章, 467 - 489 页。Marcel Dekker 公司出版, New York 和 Basel。

5 Brennan, P. J. 和 H. Nikaido, 1995. 分支杆菌细胞膜。生物化学年鉴, 64, 29 - 63。

Butler, W. r., K. C. Jost 和 J. O. Kilburn. 1991. 通过高效液相色谱辨别分支杆菌。临床微生物学杂志, 29, ( 11 ), 2468 - 2472。

10 Cantwell, M. C. 和 N. J. Binkin. 1994. 撒哈拉非洲的结核病与 HIV: 良好的结核病控制计划能产生什么不同吗? 摘要集: 结核病 - 面对 2000。关于在发展中国家重点是在南非的结核病的短期未来的科学研讨会。Pretoria, 南非, 1994 年 3 月 13 - 17 日。

Chaparas, S. D. 1984. 使用结核菌素和其它分支杆菌抗原的免疫学基础诊断试验, 在: 分支杆菌 - 原料资料集, 第 9 章, 195 - 220 页。Marcel Dekker 公司出版, New York 和 Basel。

15 Colditz, G. A., T. F. Brewer, C. S. Berkey 等, 1994. 在预防结核病中 BCG 疫苗的效力: 对已出版文献进行的分析, JAMA, 美国医学会杂志, 271, 698 - 702。

Cole, S. 1995. 结核病的挑战: 全球控制与预防论述, 基础科学 (柳叶刀会议)。柳叶刀, 346, 816 - 817。

20 Collins, F. M. 1994. 对分支杆菌感染的免疫应答 - 新疫苗进展。兽微生物学, 40, 95 - 110。

Daniel, T. M. 1984. 可溶分支杆菌抗原, 在: 分支杆菌 - 原始资料集, 第 17 章, 417 - 465 页, Marcel Dekker 公司出版, New York 和 Basel。

25 Darbyshire, J. H. 1995. 结核病: 新增长老原因? 英国医学杂志, 310, 954 - 955。

Davies, G. R., D. Wilkinson 和 M. Colvin. 1996. HIV 与结核病: SAMJ, 南非医学杂志, 86, 91。

30 De Cock, K. M. 1994. 与 HIV 相互作用的影响, 在: 回归未来的结核病, 伦敦卫生与热带医学学校, 第三年度公众健康论坛报告: 编者: J. D. H. Porter 和 K. P. J. McAdam. John Wiley 和 Sons 出版, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 第 2 章, 35 - 52 页。

De Cock, K. M., B. Soro, I. M. Coulibaly 用 S. B. Lucas. 1992. 在 sub 撒哈拉非洲的结核病与 HIV 感染。 JAMA , 美国医学会杂志, 268 , 1581 - 1587.

5 Deshpande, R. H., M. B. Khan, D. A. Bhat 和 R. G. Navalkar. 1994. 新的 66 - kDa 结核分支杆菌血清反应性蛋白 H<sub>37</sub>Rv 的纯化及部分特质。医学微生物杂志, 41, 173 - 178.

Dolin, P. J., M. C. Raviglione 和 A. Kochi. 1994. 全球 1990 - 2000 年间的结核病发病率与死亡率。世界健康组织公报, 72, ( 2 ), 213 - 230.

10 Etemadi, A., Farid 和 J. L. Stanford. 1992. 药物抗性结核病的免疫疗法。柳叶刀, 340, 1360 - 1361.

Fauci, A. S. 1995. 针对原始杀手的新科学。 JAMA , 美国医学杂志, 274 - 786.

15 Fine, P. E. M. 1994. 结核病中及对结核病的免疫性: 致病与免疫接种的关系, 在: 回归未来的结核病。伦敦卫生与热带医学学校, 第三年度公众健康论坛报告。编者: J. D. H. Porter 和 K. P. J. McAdam. John Wiley Sons 出版, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore , 第 1 章, 13 - 33 页。

20 Godfrey - Faussett, P. 1994. 分子与人: 结核病的检测、过去、现在和未来, 在: 回归未来的结核病, 伦敦卫生与热带医学学校; 编者: J. D. H. Porter 和 K. P. J. McAdam. John Wiley Sons 出版, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore , 第 4 章, 79 - 96 页。

Goren, M. B. 1972. 分支杆菌脂类: 选择的主题, 细菌学综述, 36, 33 - 64.

25 Grange, J. M. 1988. 第 2 章: 分支杆菌属, 在: 分支杆菌与人类疾病。Edward Arnold( 出版者 ) Ltd, London, UK; Victoria, Australia; Baltimore, Maryland, USA, 8 - 17 页。

Grosset, J. 1995. 结核病的挑战: 全球控制与预防论述。发达国家的治疗 ( 柳叶刀会议 ) 。柳叶刀, 346, 810 - 812.

30 Henderson C. W. 1995. WHO 报告每小时 1000 个新的 TB 病例。AIDS 周刊, 1995 年 5 月。

- Hershfield, E. S. 1995. 结核病的挑战: 全球控制与预防论述。发达国家的预防 (柳叶刀会议)。柳叶刀, 346, 813 - 814。
- Holler, A. 1995. ID 疫苗与巴梅氏 - Connaught 完全许可与结核病疫苗合作协议, 商业导线, 2, 1995 年 10 月, Vancouver, Canada。
- 5 Huebner, R. E. 和 K. G. Castro. 1995. 结核病的挑战, 医学年并综述 46, 47 - 55。
- Hunter, S. W., H. Gaylord 和 P. J. Brennan. 1986. 麻风与结核杆菌的磷酸化脂多糖抗原的结构与抗原性。生物化学杂志 261, 12345 - 12351。
- 10 Kent, P. T. 和 G. P. Kubica. 1985. 公众健康分支杆菌学 - 三级水平实验室指南, 健康与人类服务机构公众健康美国部、公众健康服务机构、疾病控制中心、实验室规划办公室, Atlanta, Georgia。
- Law, M. R., J. K. Morris, N. Bhatii, R. Halliday 和 J. Moore - Gillon. 1995. 结核病发病率提高的原因, 英国医学杂志 311, 688。
- 15 Mangtani, P., D. J. Jolley, J. M. Watson 和 L. C. Rodrigues. 1995. 1982 - 1991 间伦敦社会经济的损失与结核病的公告率, 英国医学杂志 310, 963 - 966。
- Mc Neil, M., D. Chatterjee, S. Wu Hunter 和 P. J. Brennan. 1989. 分支杆菌糖脂: 新抗原的分离、结构、抗原性及合成, 在: 酶学方法, 179, 20 215 - 242 页。
- Misaki, A., I. Azuma 和 Y. Yamamura. 1987. 对结核分支杆菌和其它分支杆菌种的 D - 阿拉伯糖基 - D - 甘露聚糖的结构及免疫化学研究, 生物化学杂志, 82, 1759 - 1770。
- Mofenson, L. M., E. M. Rodriguez, R. Hershow 等, 1995. 在妇女及婴儿传播研究中的在感染 HIV 的孕妇和非孕妇中结核分支杆菌的感染, Arch. Intern. Med., 155, 1066 - 1072。
- 25 Morita, C. T., E. Beckman, J. F. Bukowski 等, 1995. 对人  $\gamma\delta$  T 细胞的非肽焦磷酸异戊二烯酯抗原的直接呈递, 在: 第九次国际免疫学大会汇编, San Francisco, 23 - 29 July, 1495。
- 30 Morse, D. L. 1994. 多次抗药性; 纽约的经历, 在: 回归未来的结核病, 伦敦卫生与热带医学学校, 第三年度公众健康论坛报告; 编者: J. D. H. Porter 和 K. P. J. McAdam. John Wiley & Sons 出版, Chichester, New



York, Brisbane, Toronto, Singapore, 第 11 章, 225 - 237 页。

Murray, C. J. L. 1994. 资源分配的优先性: 结核病投资的价值。在: 回归未来的结核病, 伦敦卫生与热带医学学校, 第三年度公众健康论坛报告; 编者: J. D. H. Porter 和 K. P. J. McAdam. Publ. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 第 9 章, 193 - 211 页。

Mwinga, A. 1995. 结核病的挑战: 全球控制与预防论述。发展中国家的治疗 (柳叶刀会议), 柳叶刀, 346, 812 - 813。

O'Brien, R. 1995. 结核病的挑战: 全球控制与预防论述。发展中国家的预防 (柳叶刀会议), 柳叶刀, 346, 814 - 816。

Onyebujohi, P. V. C., T. Abdulmumini, S. Robinson, G. A. W. Rook 和 J. L. Stanford. 1995. 牦牛分支杆菌免疫疗法, 在非洲困难条件下作为治疗肺结核化学疗法的补充。呼吸医学, 89, 199 - 207。

Petit, J - F 和 E. Lederer. 1984. 分支杆菌细胞壁结构, 在: 分支杆菌, 原料资料。编者: G. P. Kubica 和 L. G. Wayne, Marcel Dekker, Inc. New York 和 Basel, A 部分, 第 12 章, 301 - 339。

Pretorius, G. S., F. A. Sirgel, H. S. Schaaf, P. D. van Helden 和 T. C. Victor. 1996. 结核分支杆菌对利福平的抗性 - 在化学疗法中快速检测及暗示。SAMJ, 南非医学杂志, 86, 50 - 55。

Prior, J. G., A. A. Khan, K. A. V. Cartwright, P. A. Jenkins 和 J. L. Stanford. 1995. 在抗药性肺结核中结合二线化学疗法的牦牛分支杆菌免疫疗法。K. Infect. 31, 59 - 61。

公众健康报告, 1995。110 - 109。

Raviglione, M. C., D. E. Snider 和 A. Kochi. 1995. 结核病的全球流行病学 - 世界流行的发病率和死亡率。JAMA, 美国医学会杂志, 273, 220 - 226。

Richeldi, L., S. Barnini 和 C. Saltini. 1995. 结核病的分子诊断, 欧洲呼吸杂志增补本 8/20, 689 - 700。

Rosat, J. P., E. M. Beckman, S. Porcelli 和 M. B. Brenner. 1995. 对分支杆菌抗原的限制 CD1 的  $\gamma\delta$  T 细胞应答, 在: 第九次国际免疫学大会汇编, San Francisco, 23 - 29 July, 1488。

Schaberg, T., B. Reichert, T. Schulin, H. Lode 和 H. Mauch. 1995. 利用常规固体培养基的结核分支杆菌快速药物敏感性检测, 8, 1688 - 1693.

5 Sieling, P., D. Chatterjee, T. Pirgozy 等, 1995. 微生物致病菌非肽配体的 CD1 对 $\alpha\beta$  TCR T - 细胞的呈递, 在: 第九次国际免疫学大会汇编, San Francisco, 23 - 29 July, 2726.

Snider, D. E. 1994. 结核病: 世界形式, 疾病的历史与抵御疾病的努力, 在: 回归未来的结核病, 伦敦卫生与热带医学学校, 第三年度公众健康论坛报告. 编著: J. D. H. Porter 和 K. P. J. McAdam. John Wiley & Sons (Publishers), Chichester, UK, 第 1 章, 13 - 33 页.

10 南非临时专利申请 No 94/25/75: “检测分支杆菌种存在的方法及使用此方法的试剂盒与抗体”。

南非专利申请 No 95/30/77: “检测分支杆菌种存在的方法及使用此方法的试剂盒与抗体”。

15 Stanford, J. L., G. A. W. Rook, G. M. Bahr 等, 1990a. 麻风病与结核病的免疫预防和免疫疗法中的牝牛分支杆菌 (综述)。疫苗, 8, 525 - 530。

Stanford, J. L., G. M. Bahr, G. A. W. Rook 等, 1990b. 牝牛分支杆菌的免疫疗法作为治疗肺结核的化学疗法的辅助手段。结核, 71, 87 - 20 93。

Stanford, J. L. 和 J. M. Grange. 1993. 21 世纪控制结核病的新概念。J. R. Coll. Physicians Lond., 27, 218 - 223。

Stanford, J. L. 和 J. M. Grange. 1994. 结核病免疫疗法前景。呼吸医学 8, 8, 3 - 7。

25 默克索引, 1989. 编著: S. Budavari, M. J. O'Neil, A. Smith 和 P. E. Heckelman, 第 11 版, 6236 页。

Torres, R. A., S. Mani, J. Altholz 和 P. W. Brickner. 1990. 纽约收容所流浪者中人免疫缺陷病毒感染。Arch. Intern. Med., 150, 2030 - 2036。

Torres, M., P. Mendez - Sampeiro, L. Jimenez - Zamudio 等, 1994. 30 结核病患者与家庭接触者间对结核分支杆菌抗原的免疫应答的比较。Clin. Exp. Immunol., 96, 75 - 78。

Vlaspolder, F., P. Singer 和 C. Roggeveen. 1995. 扩增方法 (基因探针) 的诊断价值与用于结核病诊断的培养物间的比较。临床微生物杂志, 33, 2699 - 2703。

5 Voelker, R. 1995. 全球 TB 控制的新开端, JAMA, 美国医学会杂志, 274, 1255 - 1257。

Walter, H. 和 G. Johansson. 1986. 在水溶液两相系统中的分配: 综述分析化学, 155, 215 - 242。

Weil, D. E. C. 1994. 药物供应: 满足全球的需要, 在: 结核病, 回归未来, 伦敦卫生与热带医学学校, 第三年度公众健康论坛报告。编著: J. D. H. Porter 和 K. P. J. McAdam. John Wiley & Sons (出版者), Chichester, UK, 第 6 章, 123 - 143 页。

15 Wheeler, P. R., G. S. Besra, P. J. Brennan 和 D. E. Minnikin. 1994. 分支菌酸生物合成 - 早期阶段, 文摘版: 结核病 - 面对 2000, 针对发展中国家重点是南非结核病的短期未来的科学研讨会。 Pretoria, South Africa, 13 - 17 March 1994。

结核病流行 WHO 报告, 世界健康组织, WHO/TB/1995/183。

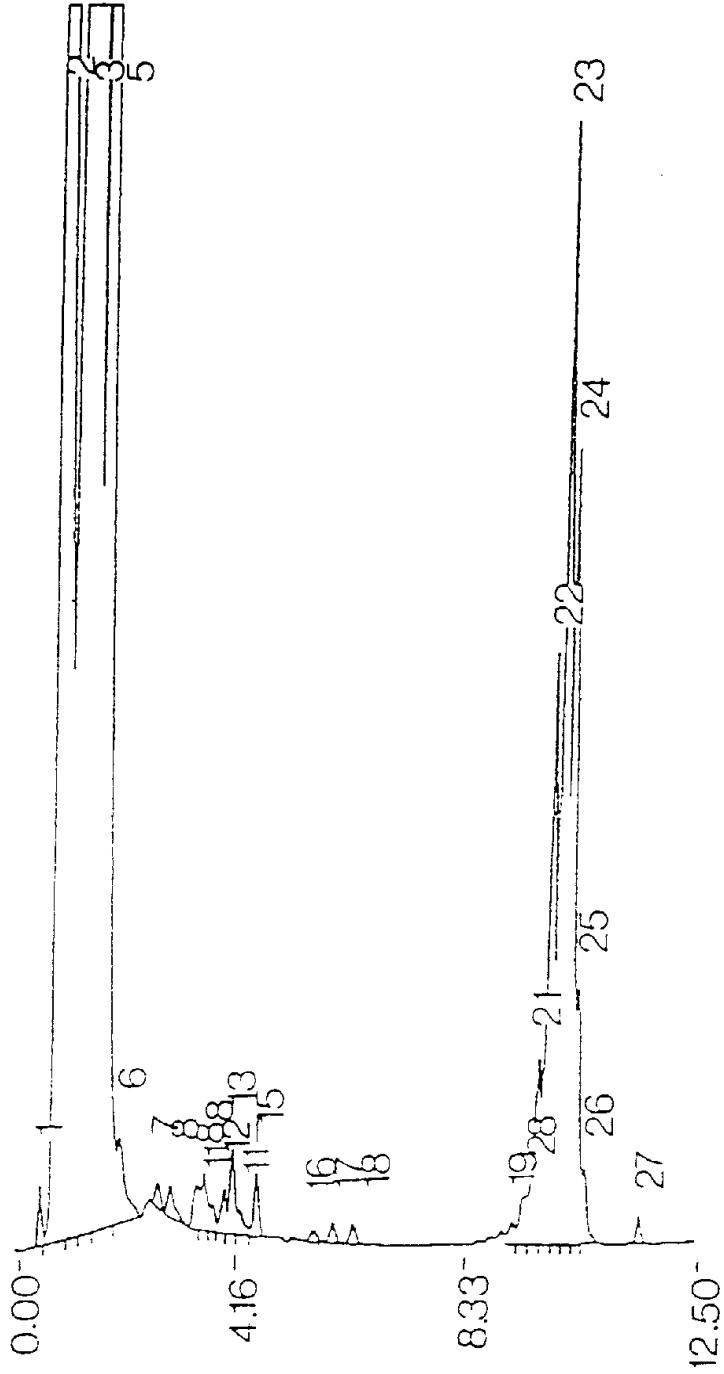
Wilkinson, D. 和 K. M. de Cock. 1996. 南非结核病控制 - 面对新病例的时候? SAMJ. 南非医学杂志, 86, 33 - 35。

20 Wilkinson, D. 和 A. J. Moore. 1996. 南非 HIV 相关结核病 - 临床特征与后果。 SAMJ. 南非医学杂志, 86, 64 - 67。

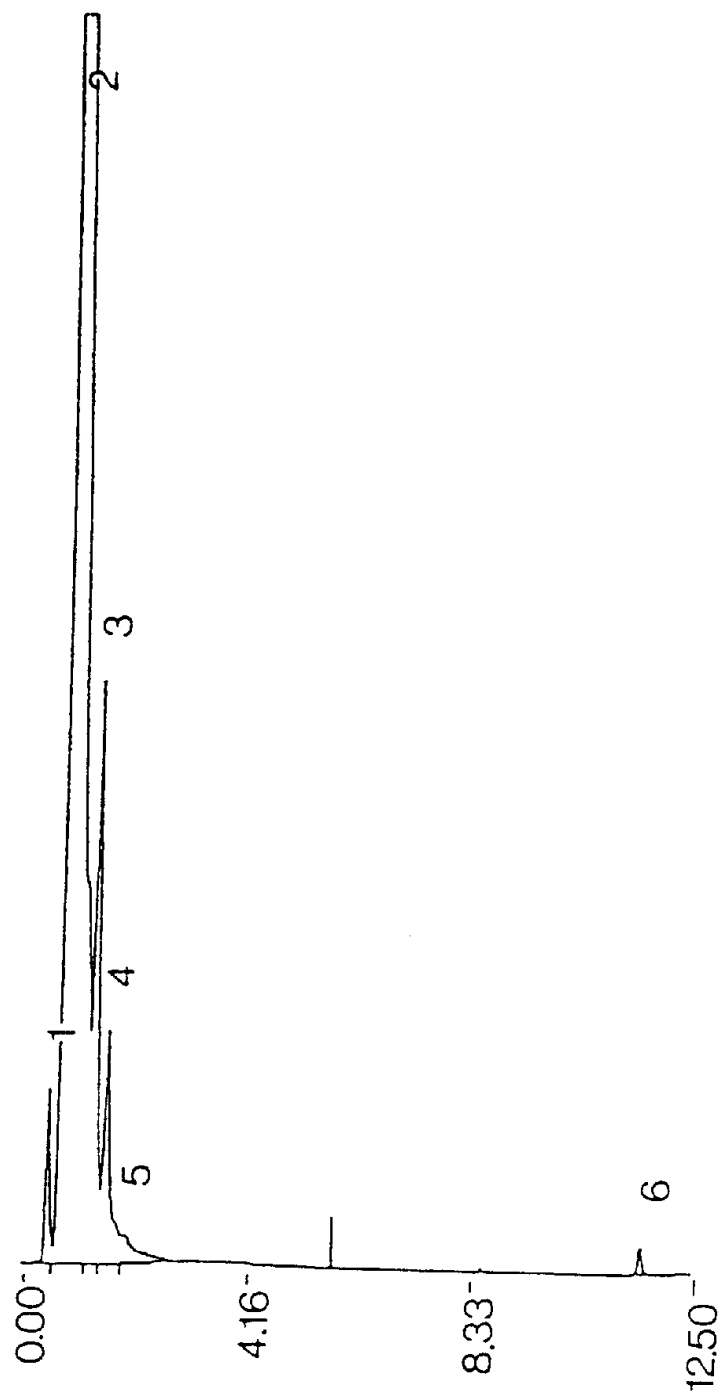
Yanez, M. A., M. P. Coppola, D. A. Russo 等, 1986. 通过酶免疫分析确定唾液中分支杆菌抗原, 临床微生物学杂志, 23, 822 - 825。

Yew, W. W. 和 C. H. Chau. 1995. 1990 年代抗药性结核病 (综述)。欧洲呼吸杂志, 8, 1184 - 1192。

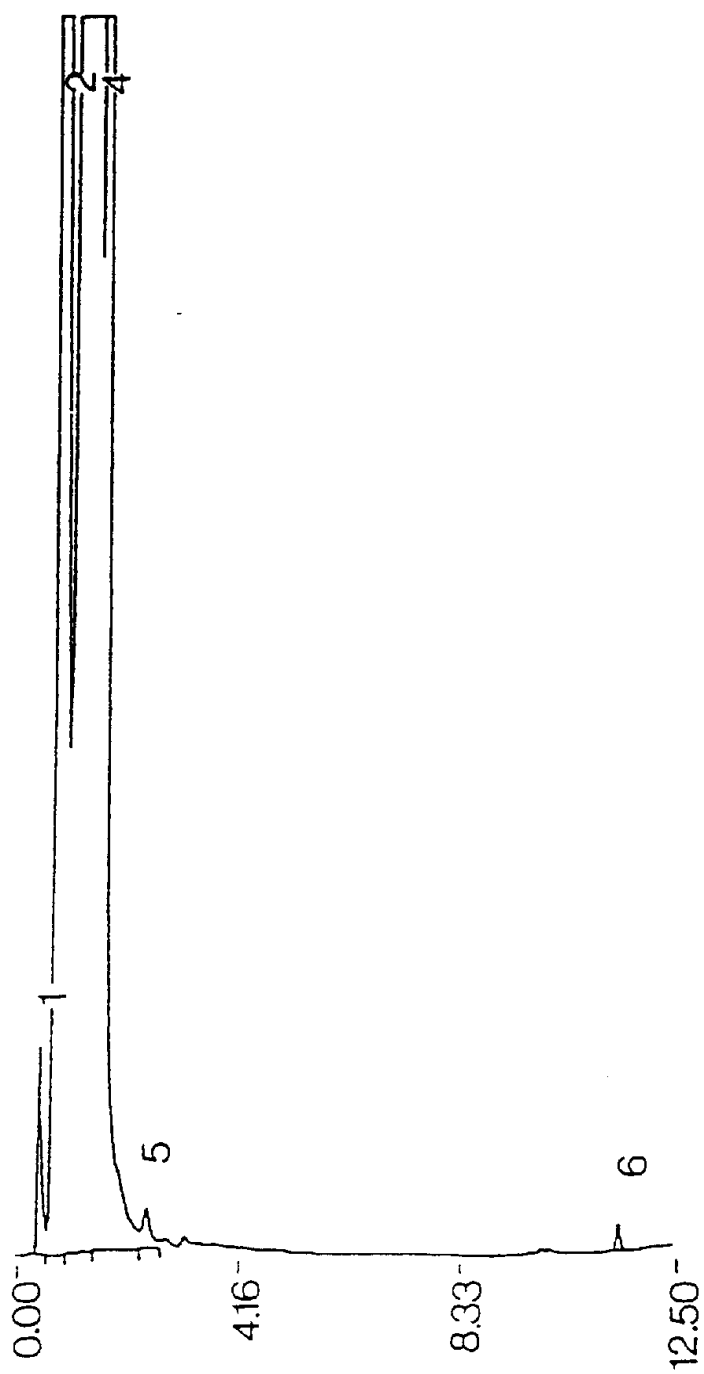
说明书附图



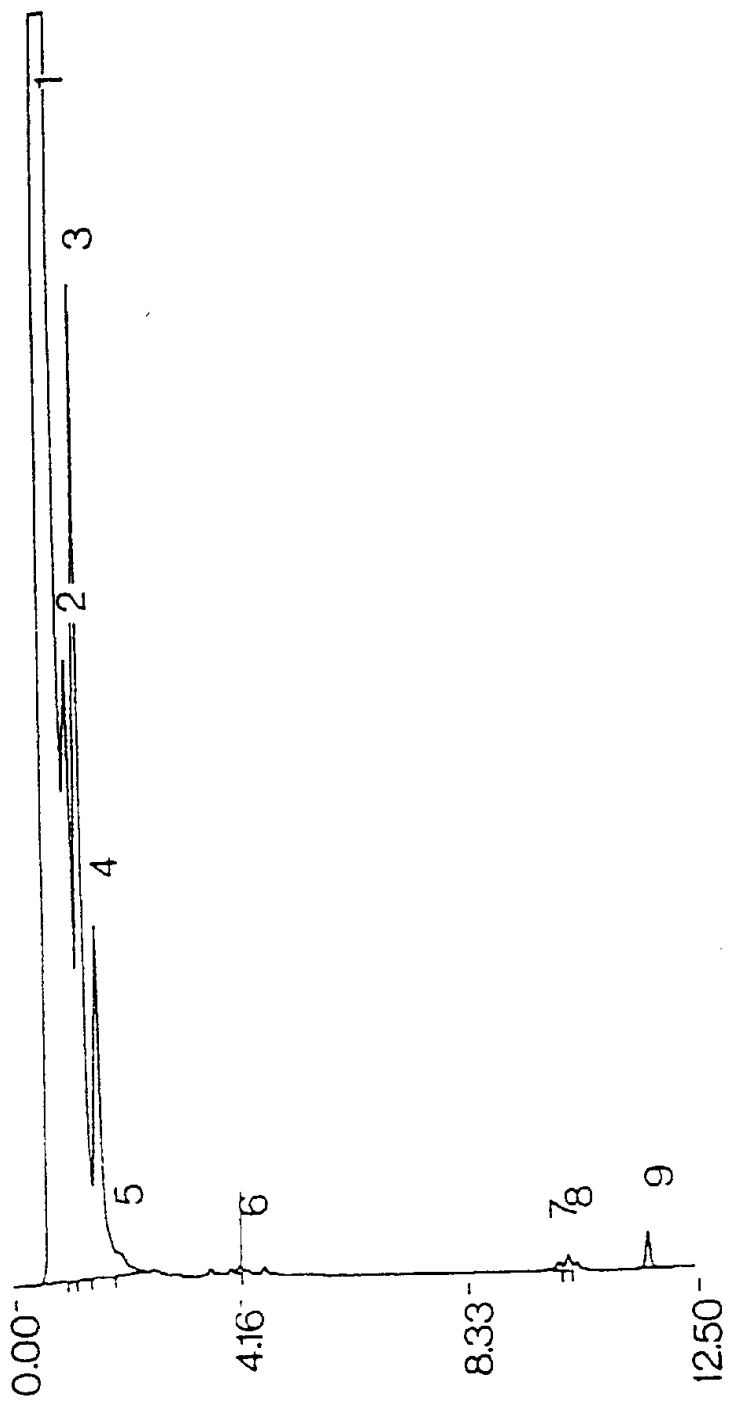
曲线 1 a: 分支杆菌粗提物



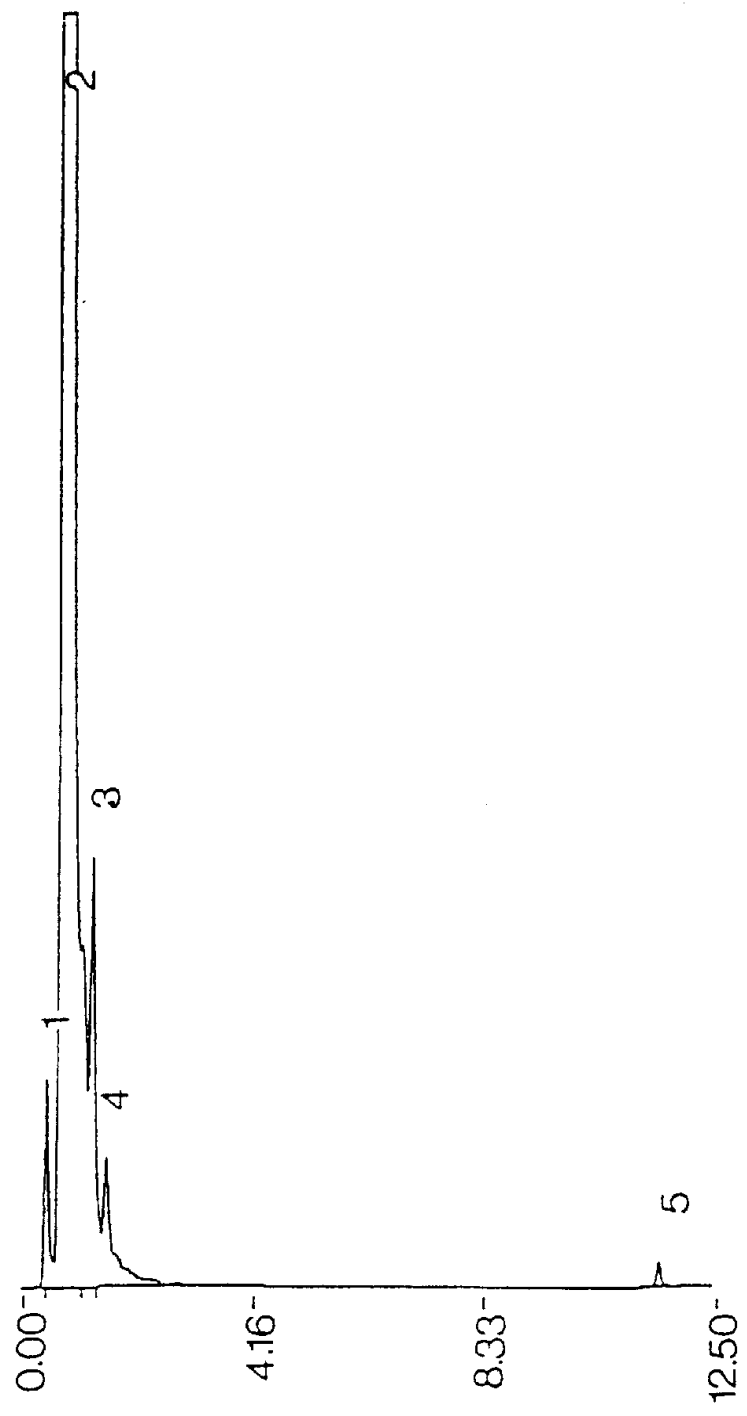
曲线 1b: 试剂粗提物



曲线 1c: 培养基粗提物

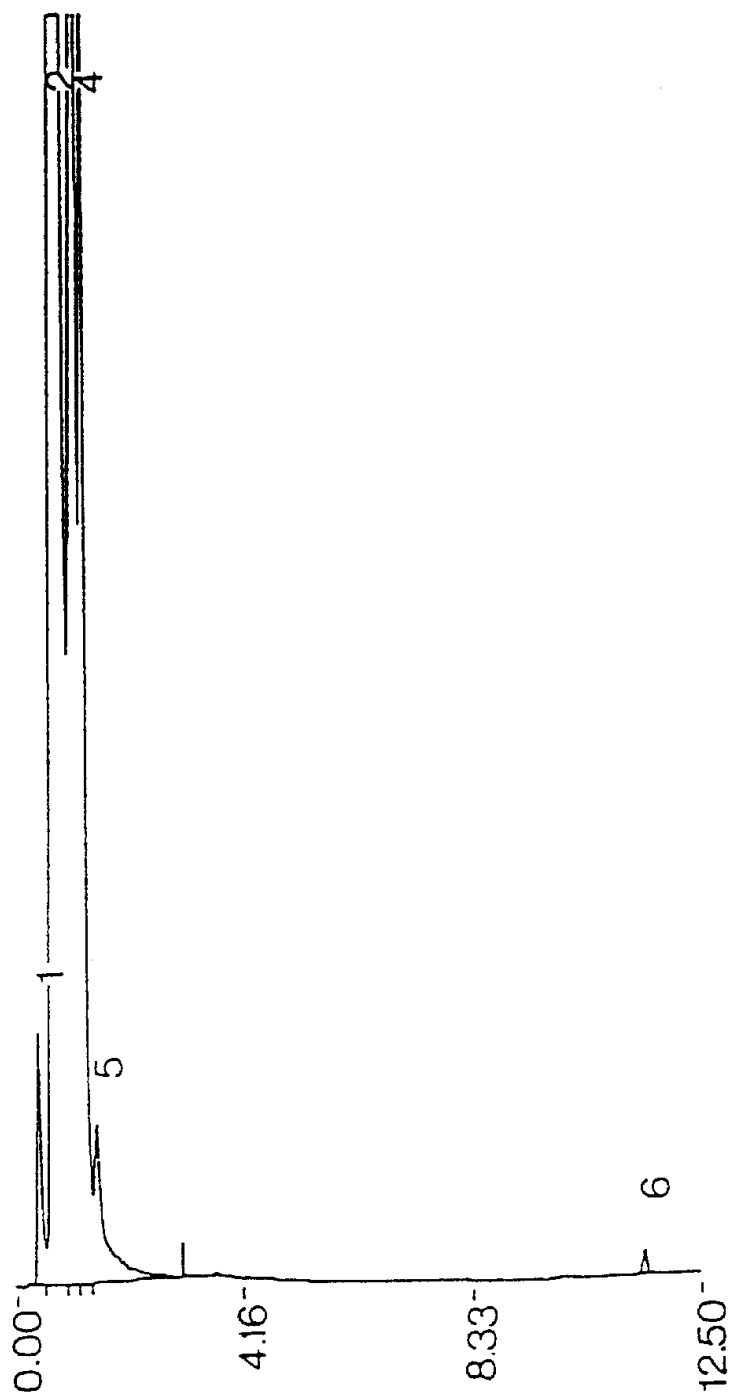


曲线 2a: 结核分支杆菌粗提物的丙酮提取上清液

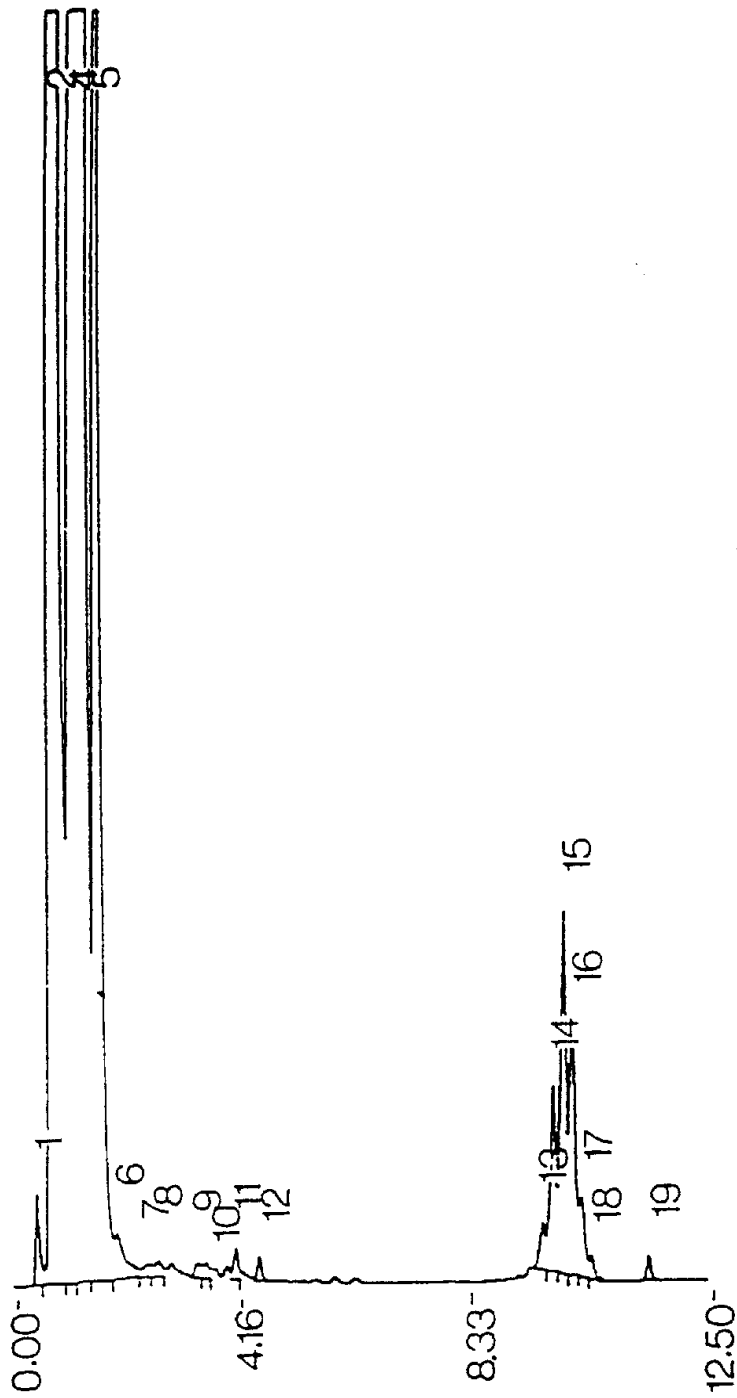


曲线 2b: 试剂粗提物的丙酮提取上清液

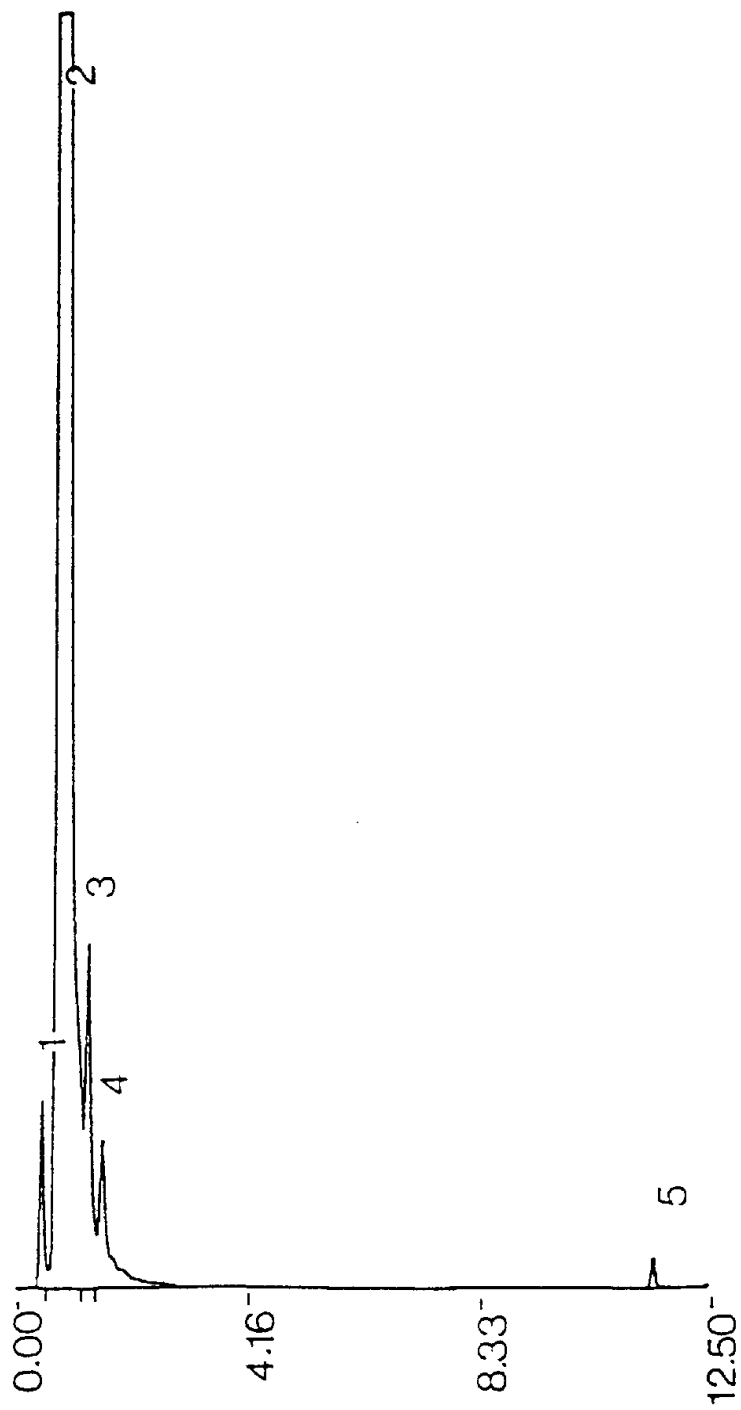




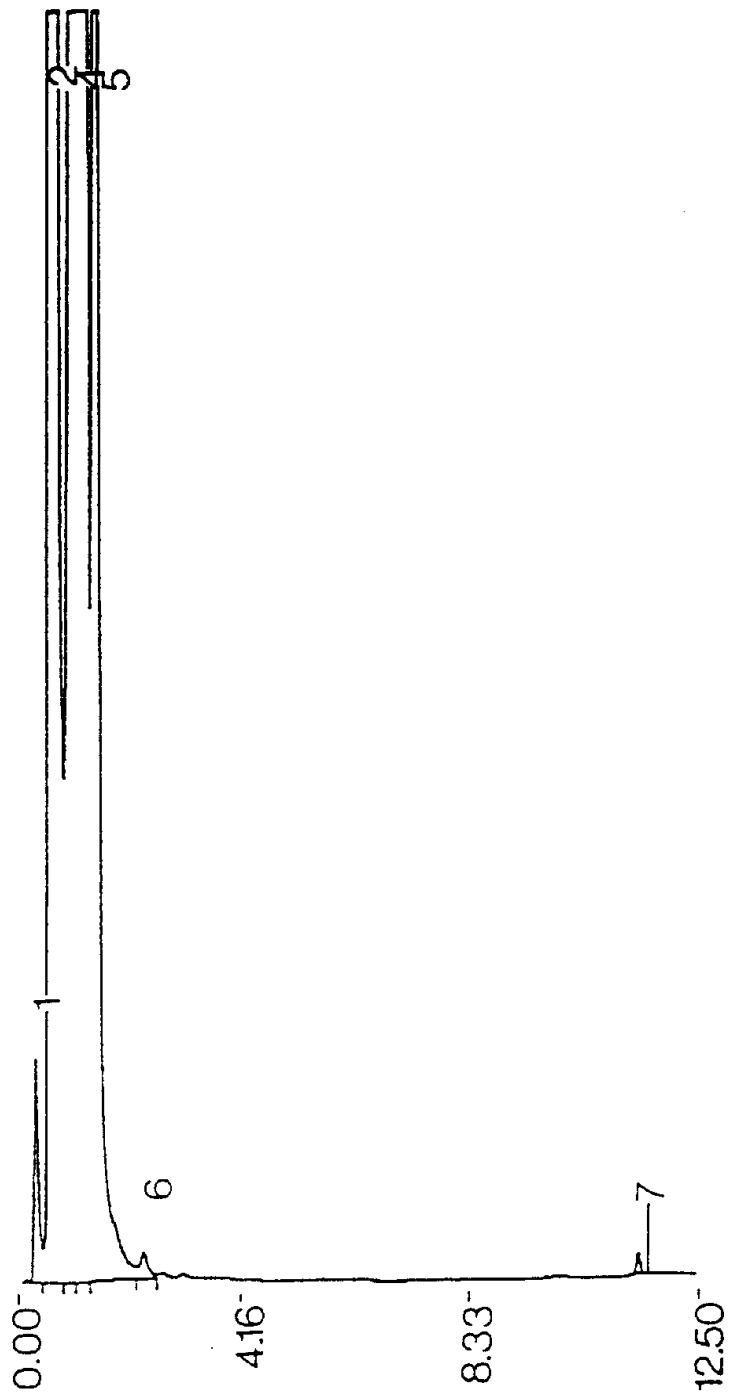
曲线 2c: 培养基粗提物的丙酮提取上清液



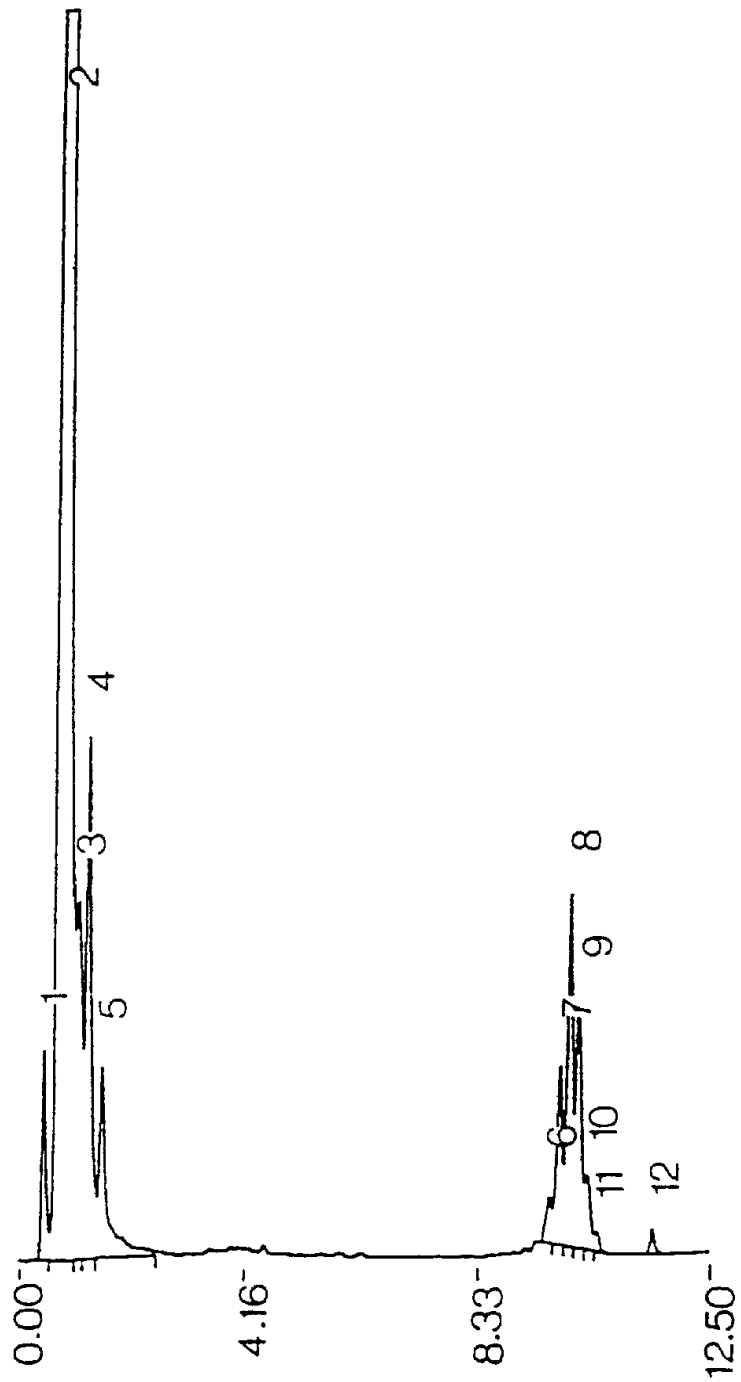
曲线 3a: 经丙酮提取后的结核分支杆菌粗提物



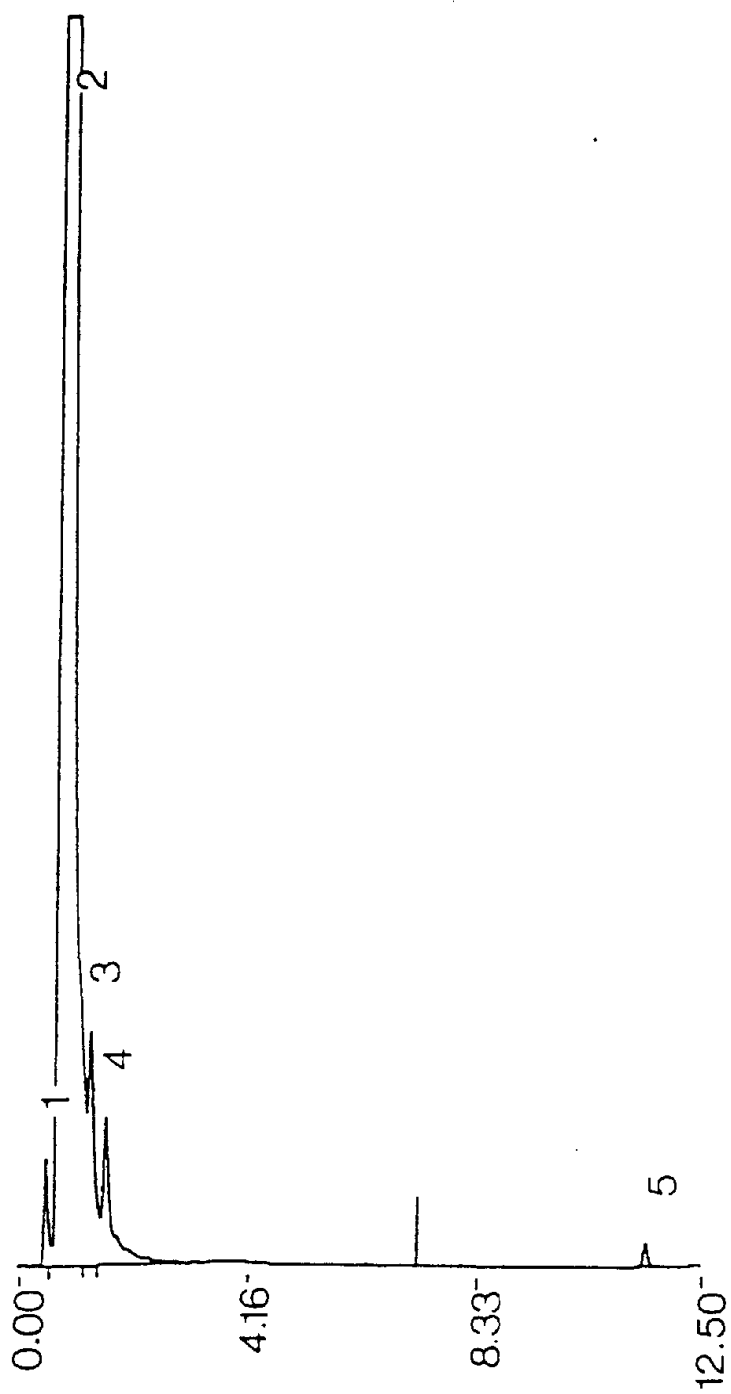
曲线 3b: 经丙酮提取后的试剂粗提物



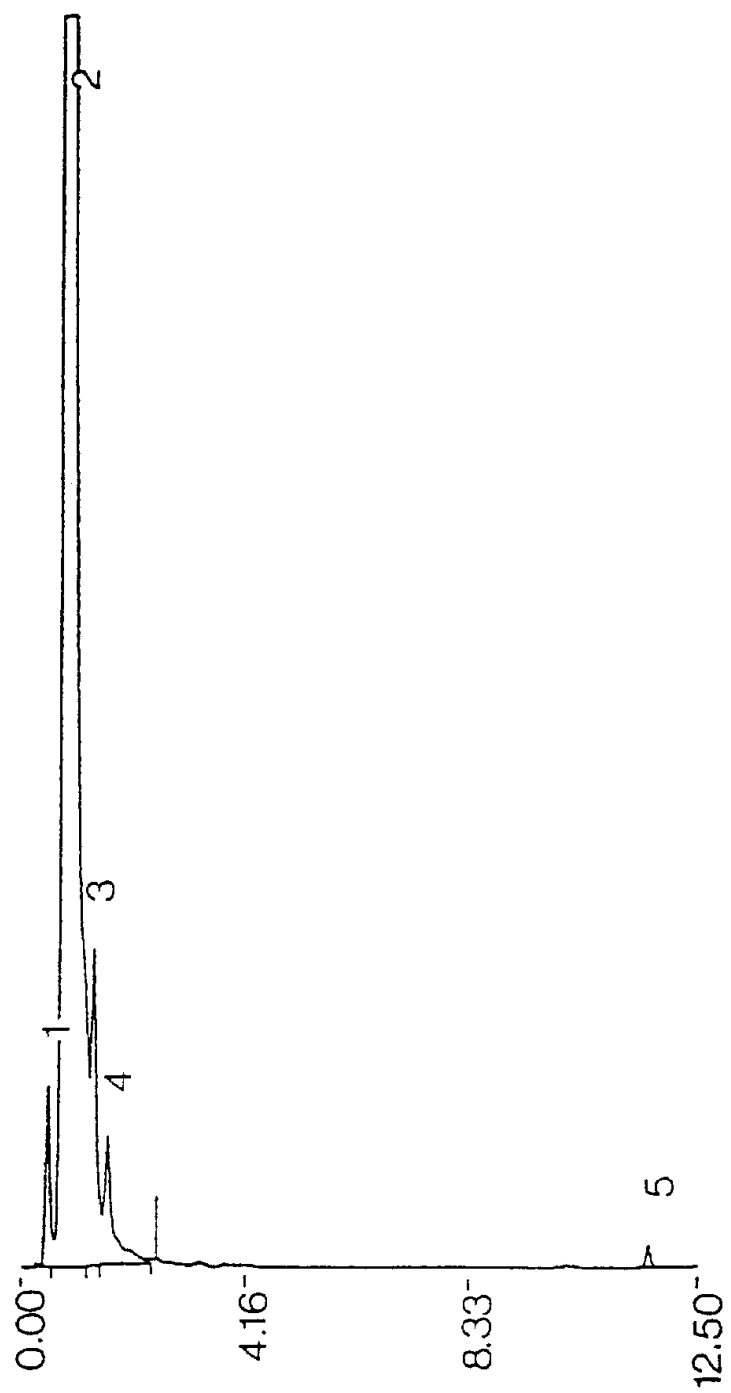
曲线 3c: 丙酮提取后的培养基粗提物



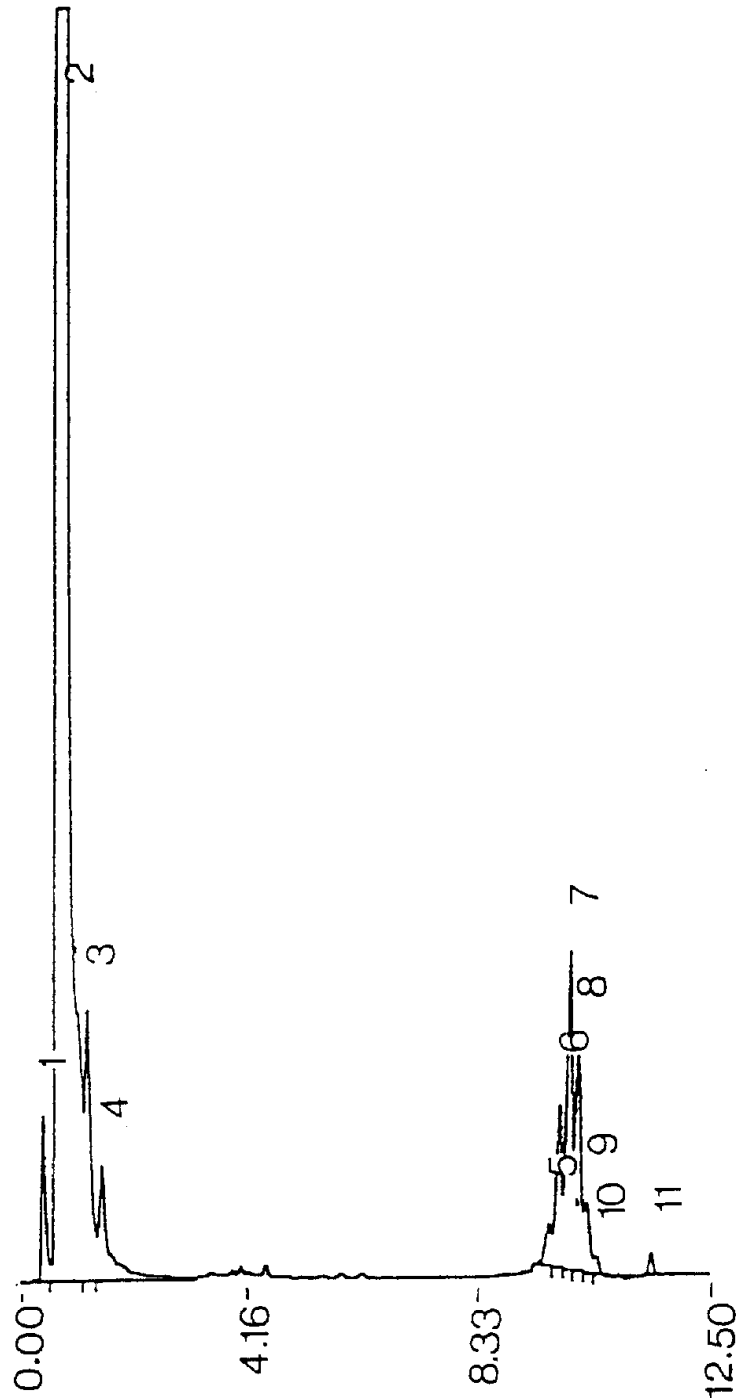
曲线 4a: 逆流纯化的结核分支杆菌  
霉菌酸来自丙酮提取的粗提物



曲线 4b: 来自丙酮提取后的试剂  
粗提物经逆流纯化的试剂

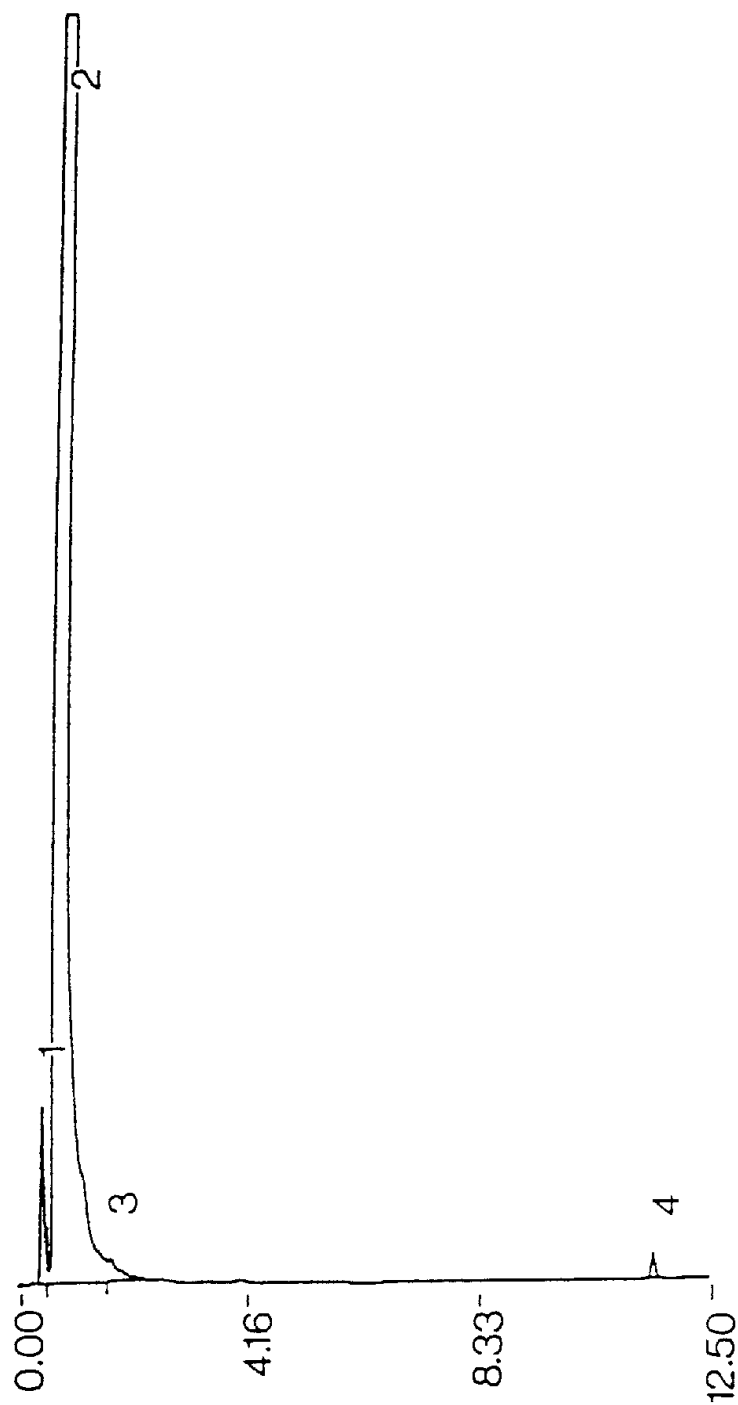


曲线 4c: 来自丙酮提取的培养基粗提物经  
逆流纯化的培养基

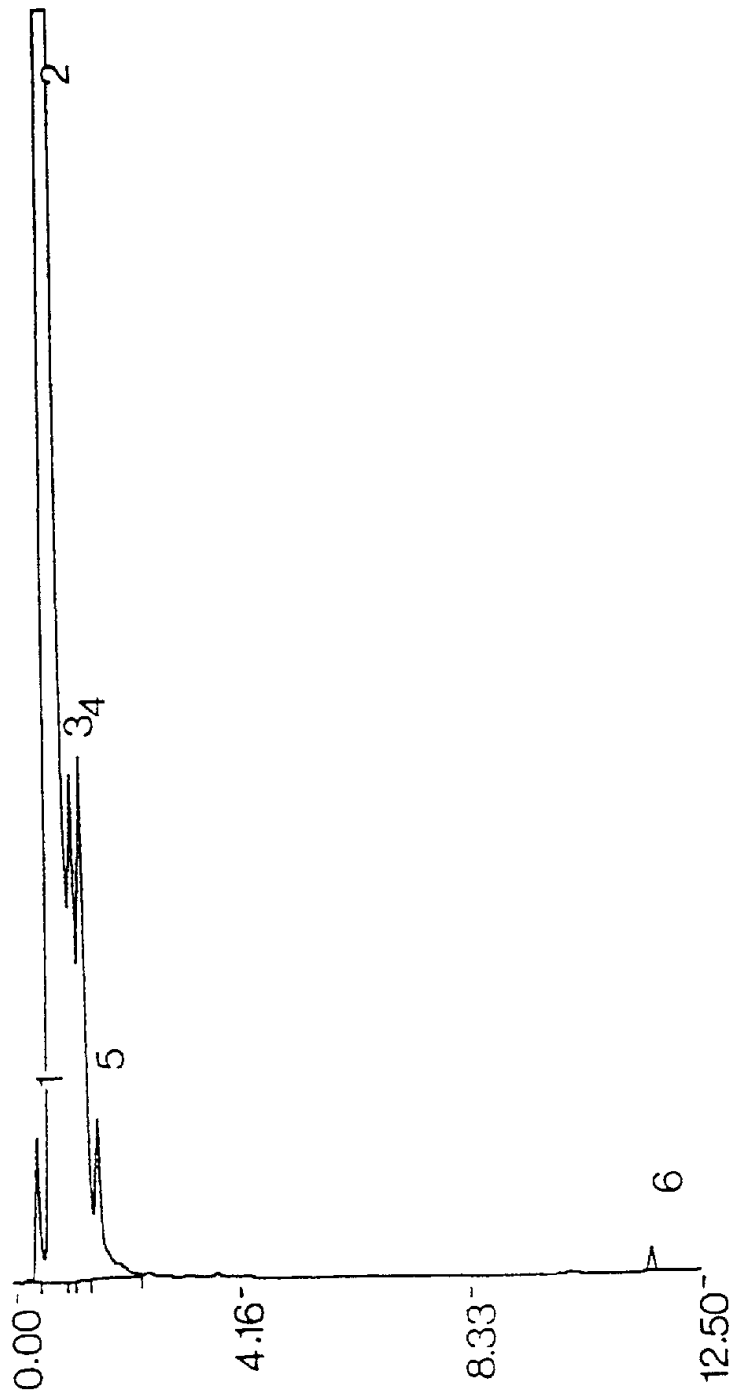


曲线 5a: 来自结核分支杆菌粗提物经逆流纯化的霉菌酸未经丙酮提取

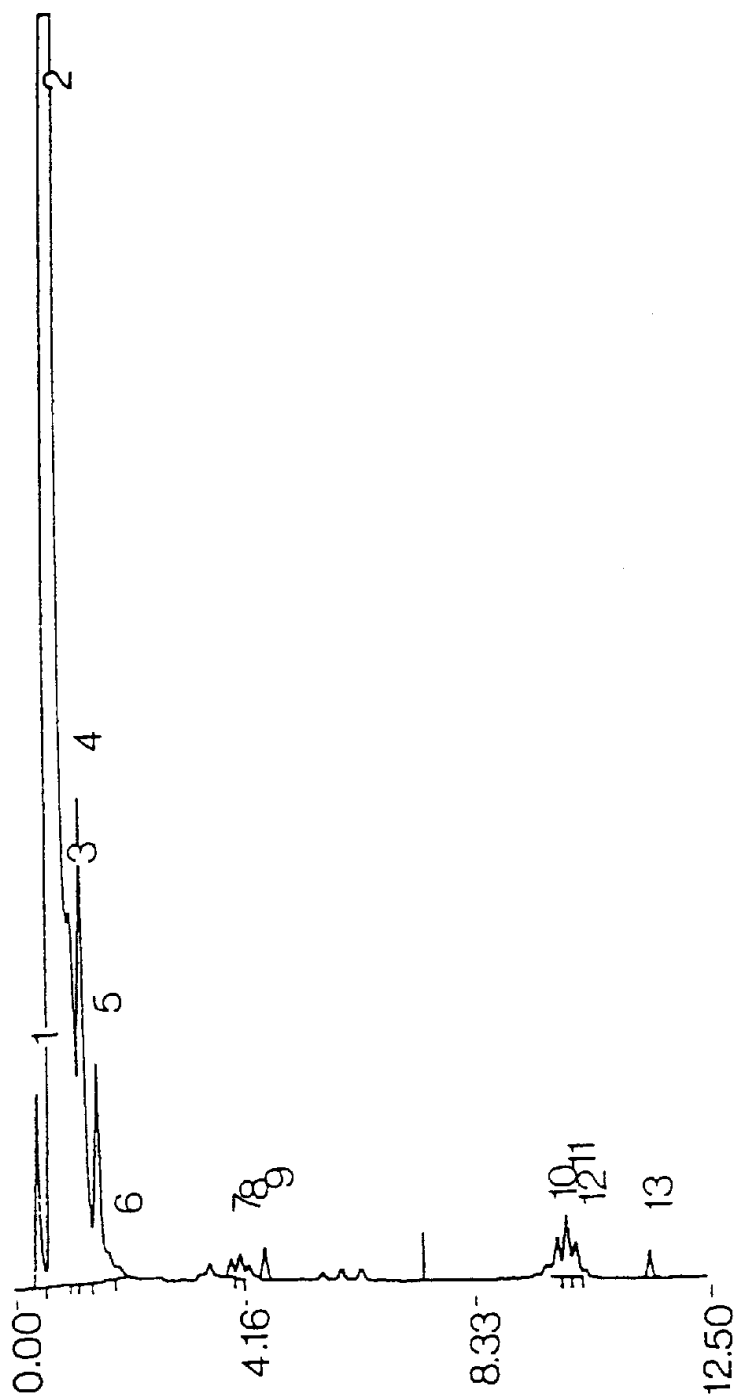




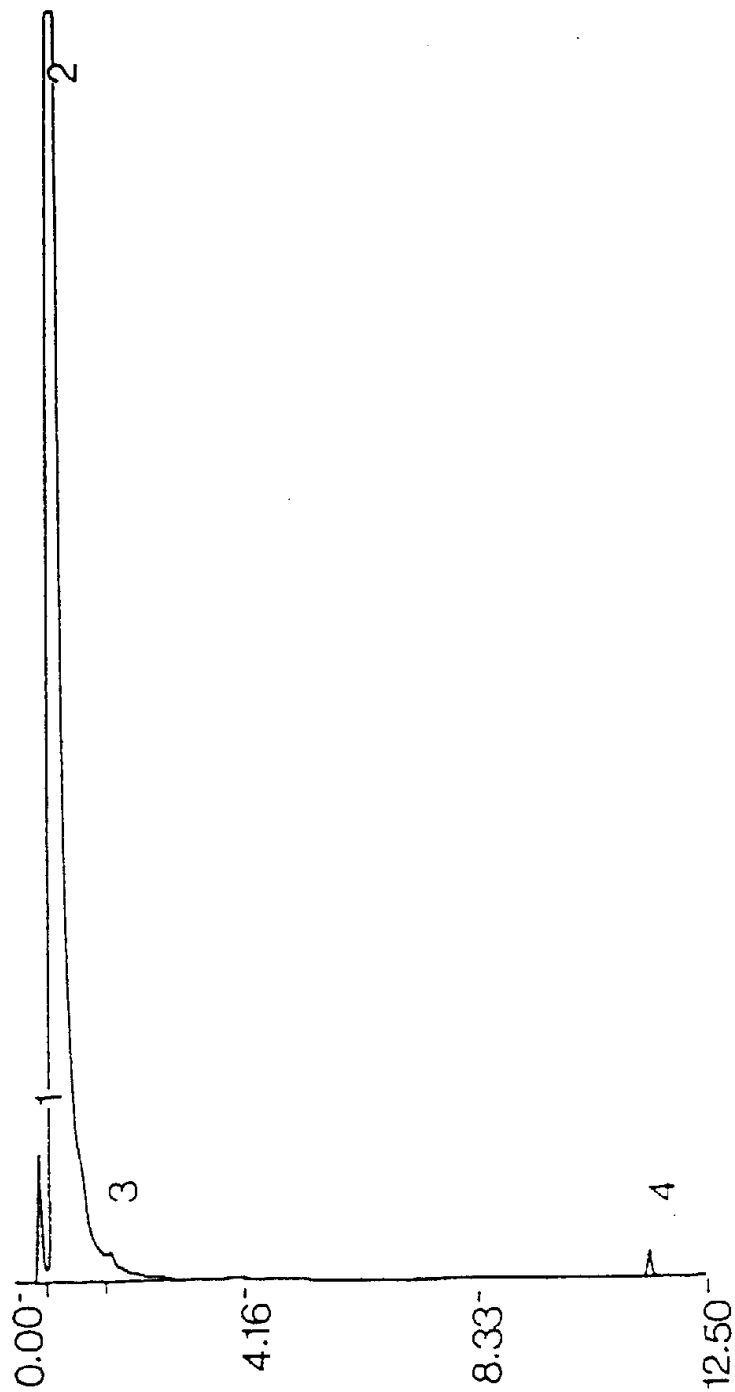
曲线 5b: 从试剂粗提物中逆流纯化的试剂未经丙酮提取



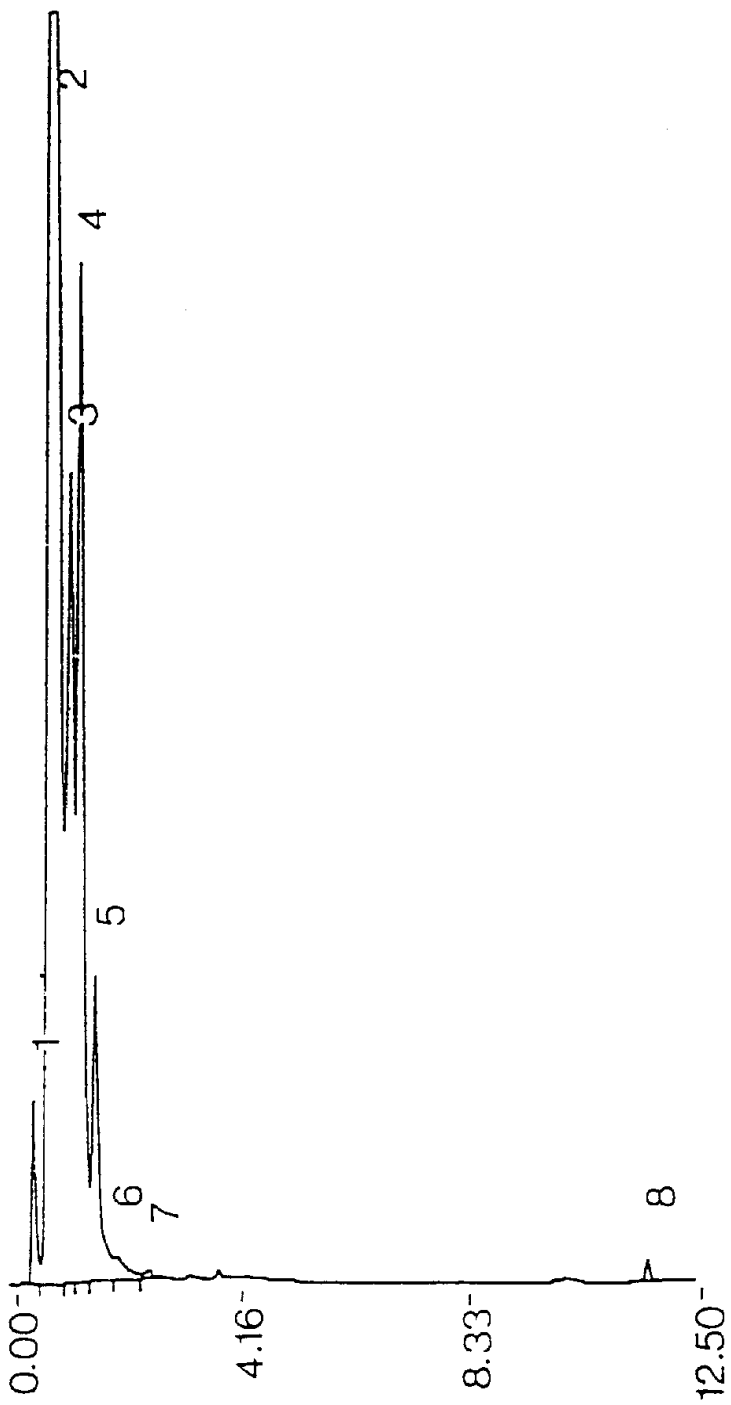
曲线 5c: 从培养粗提物中逆流纯化的培养基,  
未经丙酮提取



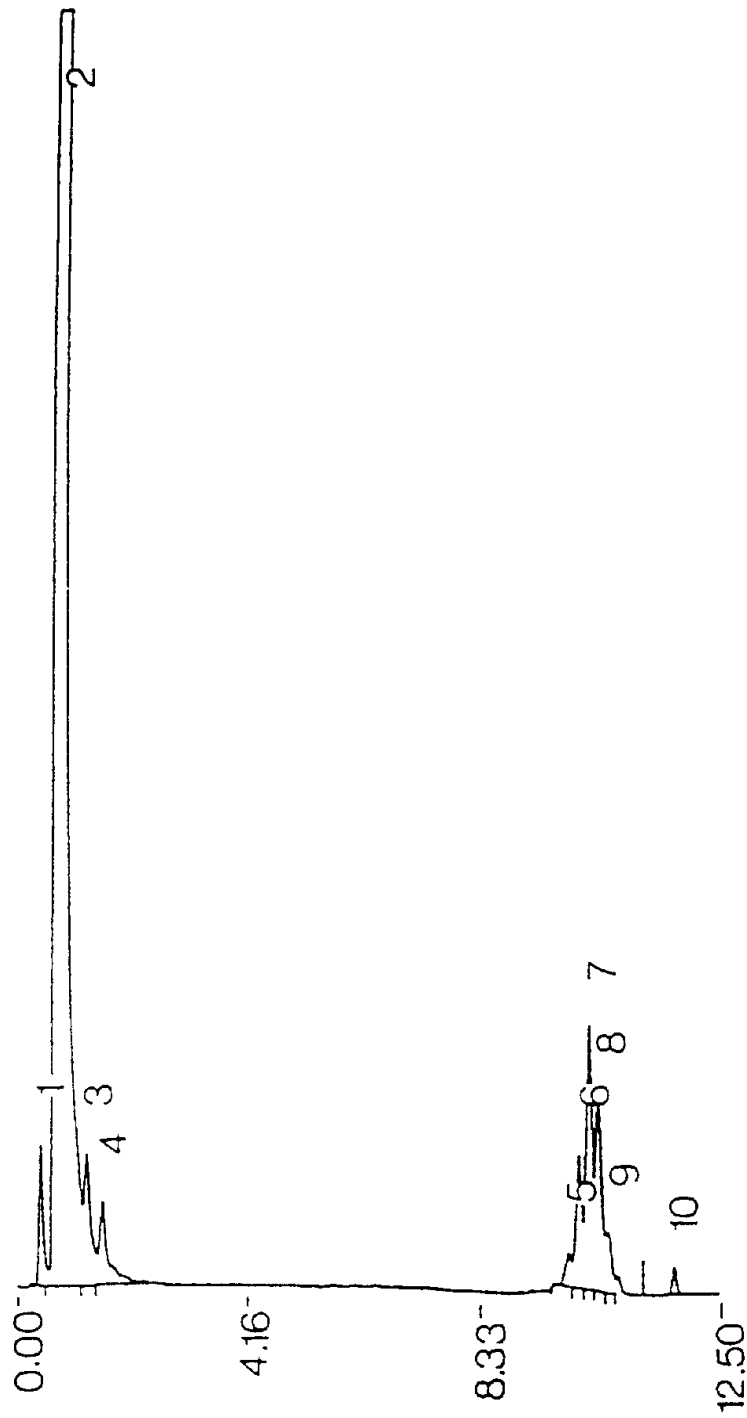
曲线 6a: 结核分支杆菌霉菌酸的丙酮上清液,  
在逆流纯化后用丙酮提取



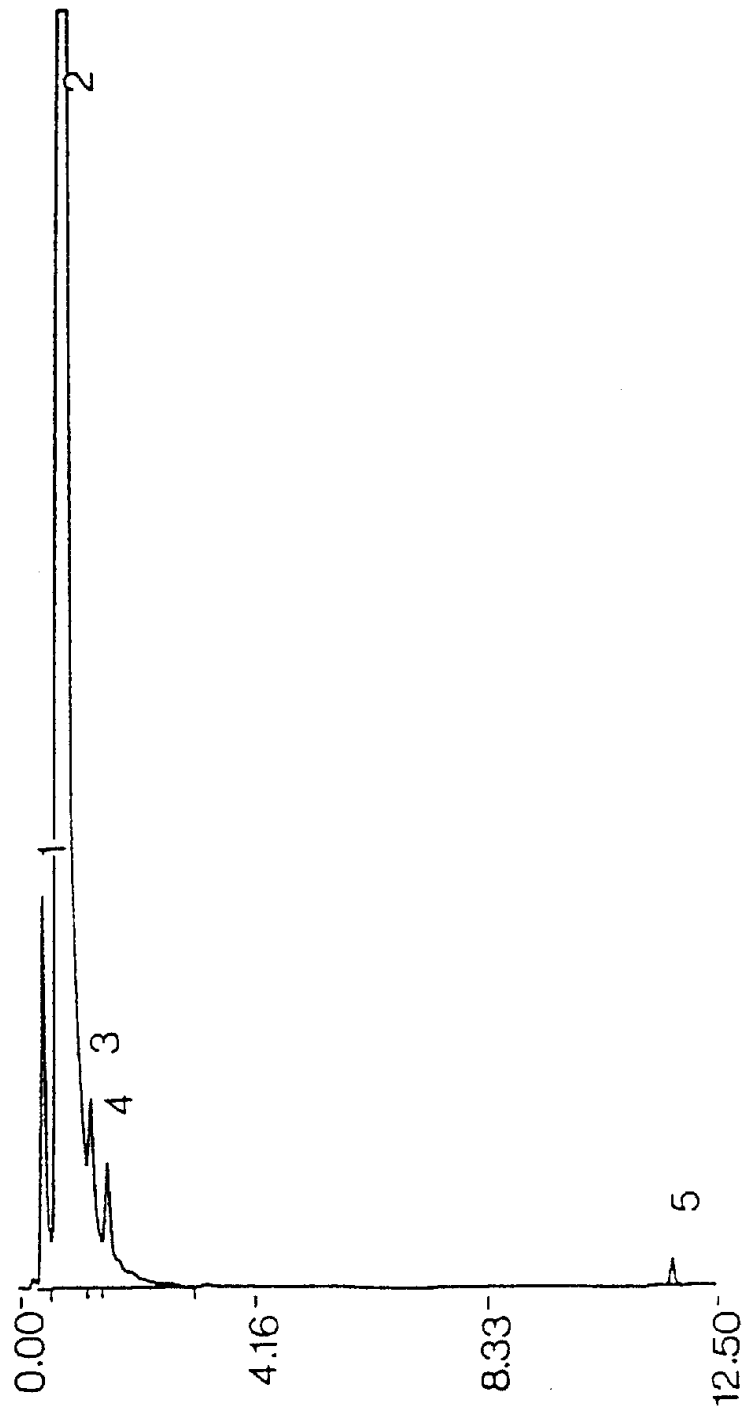
曲线 6b: 在逆流纯化后用丙酮提取的试剂的丙酮上清液



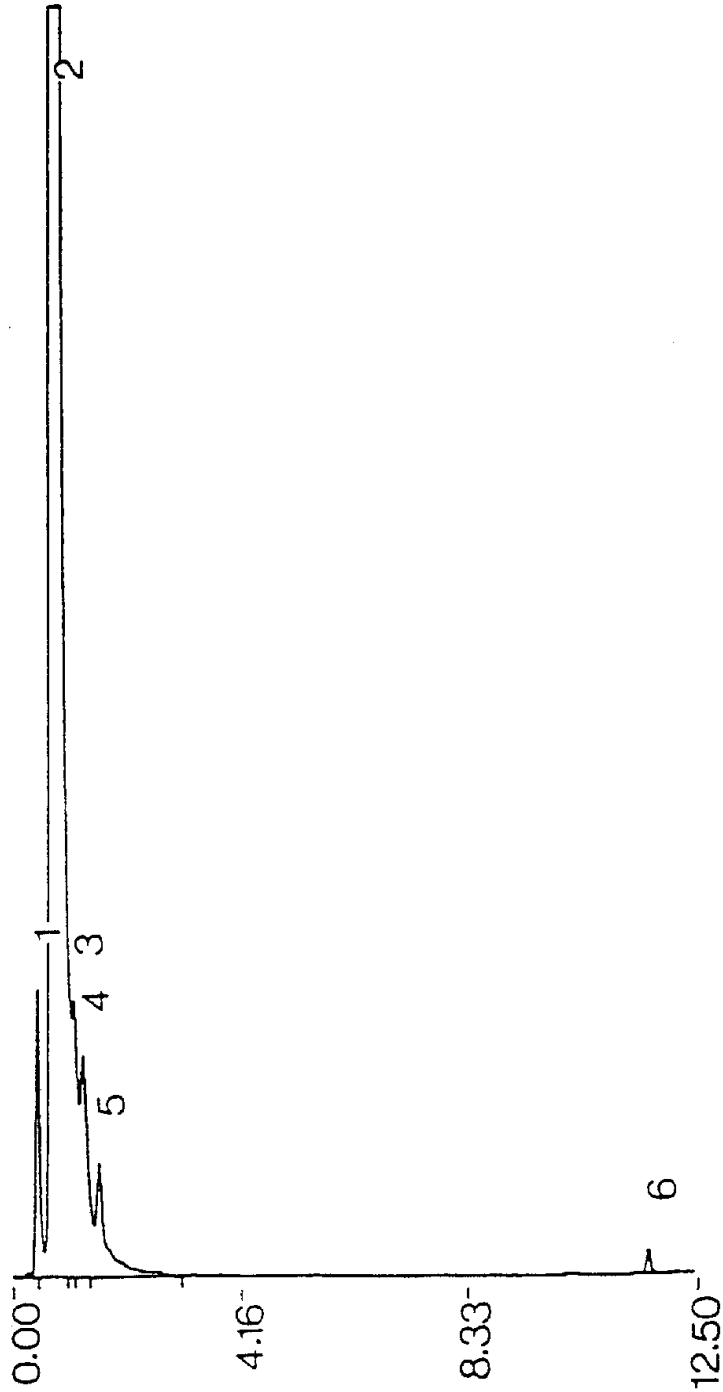
曲线 6c: 逆流纯化后用丙酮提取的培养基丙酮上清液



曲线 7a: 结核分支杆菌纯化的霉菌酸,  
逆流纯化后用丙酮提取

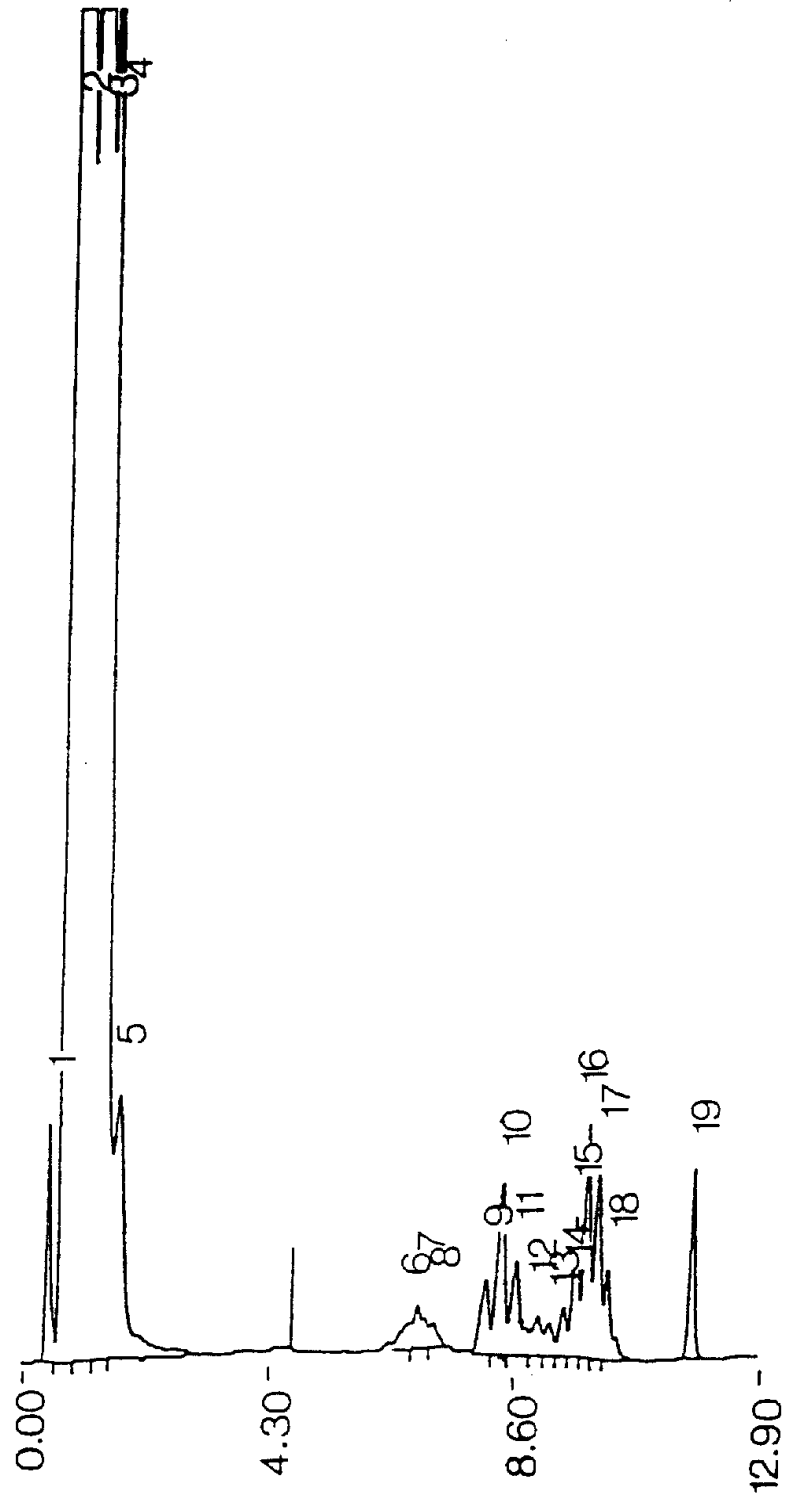


曲线 7b: 纯化的试剂,逆流纯化后用丙酮提取

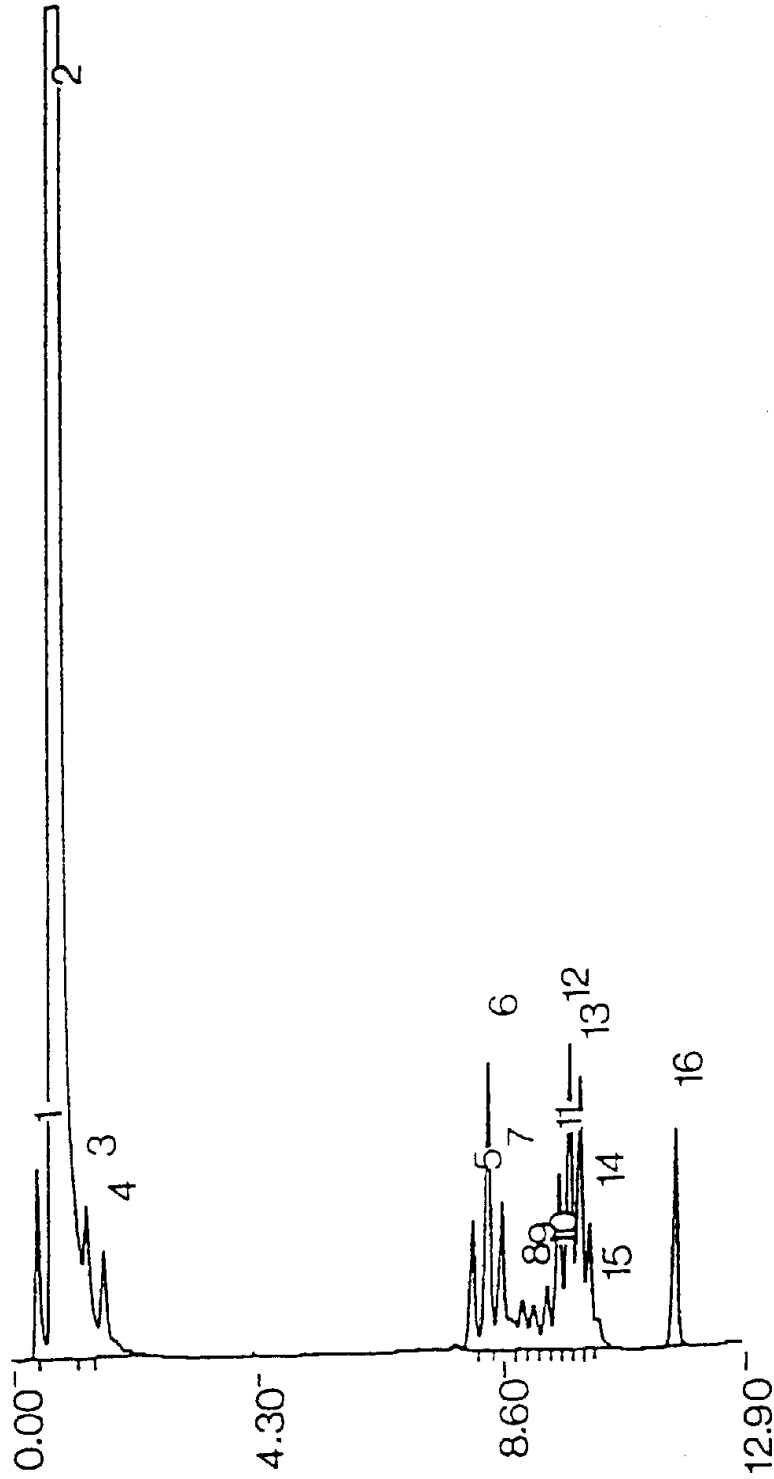


曲线 7c: 纯化的培养基,逆流纯化后用丙酮提取





曲线 8a: 牦牛分支杆菌粗提取物,再皂化



曲线 8b: 牝牛分支杆菌酸,逆流纯化后用丙酮提取