



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200480009311.9

[45] 授权公告日 2007 年 11 月 28 日

[11] 授权公告号 CN 100351265C

[22] 申请日 2004.4.2

[21] 申请号 200480009311.9

[30] 优先权

[32] 2003.4.2 [33] US [31] 60/460,184

[86] 国际申请 PCT/US2004/010007 2004.4.2

[87] 国际公布 WO2004/089969 英 2004.10.21

[85] 进入国家阶段日期 2005.10.8

[73] 专利权人 美国政府健康及人类服务部

地址 美国马里兰州

[72] 发明人 吉尔·本-梅恩-阿凯姆

乔安娜·库布勒-基尔布

雷切尔·施内尔松

约翰·B·罗宾斯 文斯·波日高伊

[56] 参考文献

US4189471 1980.2.19

审查员 陈真

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司

代理人 杨青 樊卫民

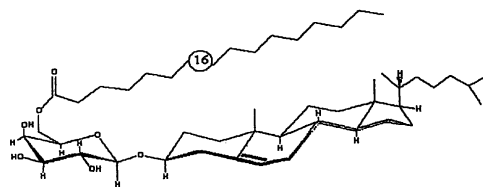
权利要求书 4 页 说明书 43 页 附图 10 页

[54] 发明名称

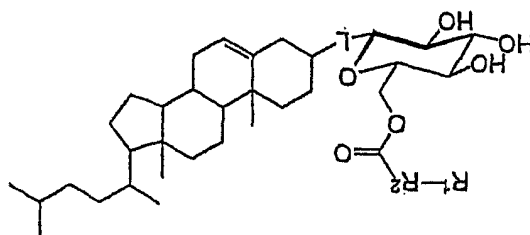
含胆固醇的化合物以及其用作针对伯氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*) 的免疫原的应用

[57] 摘要

本发明公开了通过施用治疗有效量的糖脂到受试者而用于诱导受试者对伯氏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*) 的免疫应答的独特的化合物。这种施用尤其可用于防止或治疗受试者的莱姆症 (Lyme disease)。所述化合物, 及其治疗用盐可以配制成药物或免疫原性的组合物。



1. 如下通式 A 的化合物，或其药用盐或复合物，其中通式 A 的化合物包括，



其中 R¹ 选自叠氮基，氨基，取代氨基，联氨基，酰肼，氨基脲，或碳酰肼；

R² 选自含有 1 到 25 个碳原子的饱和或不饱和碳链，或含有 1 到 25 个碳原子的饱和的到不饱和的取代碳链；和

L 选自 O，N，S，P 或亚烷基。

2. 权利要求 1 的化合物，其中 R¹ 选自叠氮基，氨基或酰肼；R² 是含有 5 到 20 个碳原子的饱和或不饱和的碳链；并且 L 是 O。

3. 权利要求 2 的化合物，其中所述化合物是化学合成的。

4. 权利要求 1 的化合物，其中 L 是 O。

5. 包括权利要求 1 的化合物与至少一种蛋白载体的共轭物，其中权利要求 1 的化合物共价结合于蛋白载体。

6. 包括权利要求 2 的化合物与至少一种蛋白载体的共轭物，其中权利要求 2 的化合物共价结合于蛋白载体。

7. 权利要求 5 的共轭物，其中权利要求 1 的化合物通过 R¹ 基团共价结合于蛋白载体。

8. 权利要求 6 的共轭物，其中权利要求 2 的化合物通过 R¹ 基团共价结合于蛋白载体。

9. 权利要求 5 的共轭物，其中所述蛋白载体包含牛血清白蛋白，卵清蛋白，匙孔血蓝蛋白，结核菌素纯蛋白衍化物，破伤风类毒素，霍乱类毒素，白喉类毒素，绿脓假单胞杆菌（*Pseudomonas aeruginosa*）类毒素，梭状芽胞杆菌（*Clostridium*）类毒素，志贺毒素，乙型肝炎抗原，或伯氏疏螺旋体（*Borrelia burdorferi*）多肽的氨基酸序列。

10. 权利要求 6 的共轭物，其中所述蛋白载体包含牛血清白蛋白，卵清蛋白，匙孔血蓝蛋白，结核菌素纯蛋白衍化物，破伤风类毒素，霍乱类毒素，白喉类毒素，绿脓假单胞杆菌类毒素，梭状芽胞杆菌类毒素，志贺毒素，乙型肝炎抗原，或伯氏疏螺旋体多肽的氨基酸序列。

11. 制备权利要求 1 的化合物的方法，其中 R¹ 是叠氮基，L 是 O，所述方法包括：

将半乳糖基卤素与胆固醇反应提供半乳糖基胆固醇；和
将叠氮酰胺与半乳糖基胆固醇反应提供权利要求 1 的化合物。

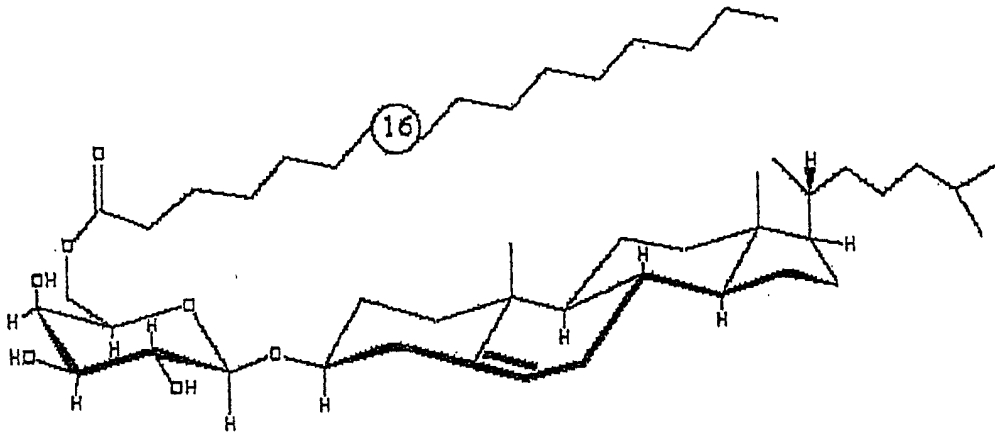
12. 包含治疗有效量的权利要求 1 的化合物和药用载体的药物组合物。

13. 包含治疗有效量的权利要求 2 的化合物和药用载体的药物组合物。

14. 包含治疗有效量的权利要求 5 的共轭物的药物组合物。

15. 包含治疗有效量的权利要求 6 的共轭物和药用载体的药物组合物。

16. 如下通式 B 的纯化化合物，或其药用盐或复合物，其中通式 B 的化合物包括



其中“16”表示通式中所示棕榈酰基中碳原子的数目。

17. 权利要求 16 的化合物，其中的化合物分离自伯氏疏螺旋体。

18. 包含治疗有效量的权利要求 16 的纯化化合物和药用载体的药物组合物。

19. 包含治疗有效量的与至少一种蛋白载体共轭的权利要求 16 的纯化化合物的药物组合物。

20. 权利要求 1 的化合物在预防或治疗受试者莱姆症中的应用，所述应用包括对受试者施用治疗有效量的权利要求 1 的化合物，从而预防或治疗受试者的莱姆症。

21. 权利要求 1 的化合物在制备用于诱导受试者对伯氏疏螺旋体的免疫应答的药用制剂中的应用。

22. 权利要求 1 的化合物在制备用于预防或治疗受试者的莱姆症的药用制剂中的应用。

23. 权利要求 16 的纯化化合物在制备用于诱导受试者对伯氏疏螺旋体的免疫应答的药用制剂中的应用。

24. 权利要求 16 的纯化化合物在制备预防或治疗受试者的莱姆症的药用制剂中的应用。

含胆固醇的化合物以及其用作针对伯氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*)的免疫原的应用

发明领域

此处的公开涉及含胆固醇的脂领域，并且涉及这些含胆固醇的脂在产生针对伯氏疏螺旋体(*B. burgdorferi*)的免疫应答中的应用。

背景技术

莱姆症是一种蜱媒的伯氏疏螺旋体(*B. burgdorferi*)引起的人畜共患疾病(Steere 等, *N. Engl. J. Med.*, 308: 733-740, 1983)。当易受感染的寄主被硬蜱咬过后，伯氏疏螺旋体进入皮肤内。伯氏疏螺旋体是具有围绕原生质圆柱复合体的外细胞膜的螺旋状游动细胞，所述复合体由细胞质，细胞壁，内细胞膜和不位于细胞表面而是位于外细胞膜和原生质圆柱之间的周质空间中的纤毛组成。外细胞膜和纤毛被认为在疾病过程中寄主-寄生虫相互作用中起重要作用，并已经进行多个研究，鉴定主要的表面暴露的作为重要的免疫原的蛋白质(Barbour 等, *J.Clin.Invest.*72:504-515, 1983)。

初期人的皮肤表现叫作慢性游走性红斑(ECM)，而皮肤的长期感染产生慢性萎缩性肢皮炎(Asbrink 等, *Acta Ders .Vene* 7-eol .64:506-512, 1984)。疏螺旋体还进入寄主的循环系统并分布到各种器官，包括脑和关节(Barbour 等, *Microbiol.Rev.* 50:381-400, 1986)。病原体的二次传播产生各种临床综合症，包括淋巴细胞脑膜神经根炎(Pfister 等, *J. Neurol* .118:1-4,1984)，心肌炎(Steere 等, *Ann. Intern .Med.* 93:8-10,1980)和慢性关节炎(Steere 等, *Ann. Intern .Med.* 90:286-291,1979)。在许多病人体内，一些组织，尤其是脑和关节的感染持续多年并可以严重的致残。这些形式的慢性莱姆症是寄主不能除去自身的传染物

的后果，并也许是自身免疫作用发展的结果(Steere 等, alvin .liiteri 7.Med. 99:76-82,1983)。

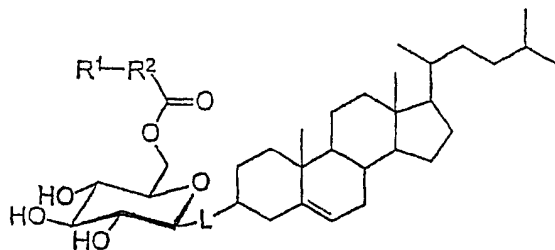
已经显示针对伯氏疏螺旋体 B31 株抗原最早形成的 IgM 抗体，其在 1983 年保存在美国典型培养物中心，获取号 ATCC 35210，是直接针对属特异性的分子量 41kd 的叫做鞭毛蛋白(flagellin)的纤毛多肽(Craft 等,J. Clin .Invest .78:934-939,1986)，并且其与单克隆抗体 H9724 反应(Barbour 等, Infect.Immun.52:549-554, 1986)。此外 IgG 抗体首先针对 41kd 鞭毛蛋白，但是更严重的疾病时 IgG 抗体形式针对其它的免疫原，尤其是针对两个分子量 31kd 和 34kd 的大量的蛋白。这两个蛋白，已经命名为 OspA(31kd)和 OspB(34kd)，被发现位于伯氏疏螺旋体表面并深入其外部液体细胞膜(Barbour 等, J. Clin. Invest. 72:504-515, 1983)。

US 专利 4,721,617 公开了灭活的完整伯氏疏螺旋体作为针对莱姆症的疫苗的应用。此外，US 专利 6,203,798 教导了蛋白质抗原，OspA 和 OspB 作为候选疫苗的应用。然而，2002 年 2 月 25 日生产商宣布包含 OspA 的 LYMErix™ 莱姆症疫苗将不再市场上可买到。

因此，需要一种可用于产生针对伯氏疏螺旋体的免疫应答，比如保护性的免疫应答的试剂，以生产有效的疫苗防止莱姆症。

发明简述

此处公开独特的化合物和其类似物比如其治疗用盐。根据一个方面，此处公开的是以下通式 A 的新型化合物，或其药物用盐或复合物。

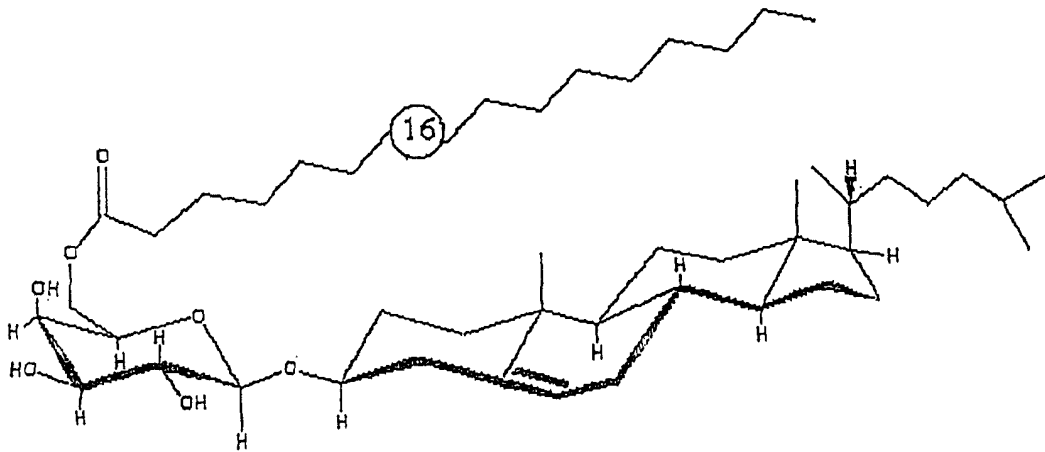


其中 R^1 选自叠氨基, 氨基, 取代氨基, 联氨基(例如 $-\text{NHNH}_2$), 酰肼(例如 $-\text{C}(\text{O})\text{NHNH}_2$), 氨基脒(例如 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$), 或碳酰肼(例如, $-\text{NHNHC}(\text{O})\text{NHNH}_2$);

R^2 选自含有 1 到 25 个碳原子的饱和或不饱和的碳链, 尤其是 5 到 20 个碳原子, 或含有 1 到 25 个碳原子饱和到不饱和取代碳链, 尤其是 5 到 20 个碳原子; 并且

L 选自 O, N, S, P, 或亚烷基 (例如, 亚甲基 $(-\text{CH}_2-)$).

根据另一个方面, 此处公开一种纯化的具有通式 B 的复合物,



其中“16”表示直链烷基取代基中碳原子数量。此处这个具体的纯化的化合物仅是为了方便起见称作“BBGL-II”(即, 伯氏疏螺旋体糖脂-II)。

在另一方面, 此处公开包含(i)载体和(ii)通式 A 或 B 的化合物的共轭物, 其中通式 A 或 B 的化合物与载体结合。

公开的化合物和共轭物(通式 A 和 B)可被用于在受试者中通过施用治疗有效量的化合物或共轭物到受试者而诱导针对伯氏疏螺旋体的免疫应答。这种施用尤其可用于防止或治疗受试者的莱姆症(Lyme disease)。所述化合物, 和其治疗用盐可以配制成药物或免疫原性组合物。

上述及其他特征和优点从以下多个参考附图的实施方案详细说明将变得更明显。

附图说明

图 1 是来自伯氏疏螺旋体的脂类提取物的 TLC 分析的数字图像。来自 B31(A 道), N40(B 道), 和 BL303(C 道)的总脂类提取物暴露于碘蒸汽, 用蒽酮试剂喷雾(D 道), 和用小鼠抗 BBGL-II 抗血清免疫染色(E 道)。或者, 超声处理的 B31 细胞上样到 Detoxi-凝胶柱, 用脱氧胆酸洗脱结合的物质, 并将其脂类暴露于碘蒸汽(F 道)。

图 2 是 BBGL-II 和 BBGL-III 钠加成物的 MALDI-TOF 质谱的部分数字图像。在 m/z 809.87 和 835.87 的两个假分子离子主峰 $[M+Na]^+$ 表示具有 BBGL-II(A)的棕榈酸(M^I)和油酸的(M^{II})衍生物的胆固醇基半乳糖, 在 m/z 780.1 和 806.1 的假分子离子 $[M+Na]^+$ 表示用二棕榈酰(M^{III})和棕榈酰油酰(M^{IV})衍生物 (B) 取代的单半乳糖基二酰基甘油(BBGL-III)。

图 3A-B 是糖脂 BBGL-II 在 $CDCl_3$ 中在 126MHz 的 DEPT ^{13}C NMR 谱的数字图像。图 3A 仅仅是通过 DEPT-90 试验获得的 CH 信号的数字图像。图 3B 是从 DEPT -150-fx DEPT-90 计算的阳性 CH_3 和阴性 CH_2 的数字图像, 其中 f 是试验性的校准因子。

图 4 显示糖脂 BBGL II- Ac_3 在 $CDCl_3$ 中在 500/126MHz 的部分 $2D^1H/^{13}C$ HMBC NMR 谱, 显示残基间, $^1H/^{13}C$ 对 Gal 1H /乙酰碳酰基 ^{13}C , Gal 1H /脂肪酸酯碳酰基 ^{13}C , 和胆固醇 H-3/Gal C-1 组合物的结合性。此外显示两个残基内的结合性。

图 5 显示 BBGL-II- Ac_3 在 $CDCl_3$ 中在 500MHz 的 $2D^1H/^1H$ COSY-30 NMR 谱, 显示邻近和成对的 $^1H/^1H$ 结合性。

图 6 显示糖脂 BBGL-III 在 $CDCl_3$ 中在 500MHz 的 $2D^1H/^1H$ TOCSY NMR 谱。鉴定了 Gal, Gro, 和脂肪酸 18:1 子谱的特征。

图 7 显示糖脂 BBGL-III- Ac_4 在 $CDCl_3$ 中在 500/126MHz 的部分 $2D^1H/^{13}C$ HMBC NMR 谱, 显示四个 Gal 质子与乙酰碳酰基 ^{13}C 核, 三

个甘油基质子与脂肪酸酯碳酰基 ^{13}C 核, 以及两个甘油基质子与 Gal 的 C-1' 的残基间 $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ 结合性。

图 8 是天然 BBGL-II 主要的级分, 胆固醇基 6-O-棕榈酰-b-d-半乳糖吡喃糖苷的结构示意图

图 9 是天然 BBGL-III 的主要级分, 1-油基, 2-棕榈酰, 3-[O- α -D-半乳糖吡喃糖基]-sn-甘油的结构示意图。

图 10 是显示来自用通式 B 的糖脂免疫的兔子血清的抗体滴度的图。抗体滴度通过 ELISA 按如下所述测量, 并且代表四个 1:100 稀释的不同兔子血清的平均值, 各自以三个独立的分析检验。空心条, IgG 滴度; 灰色条, IgM 滴度; 丁字符号, 标准偏差。

图 11 是显示来自用通式 B 的糖脂免疫的血清的抗体滴度的图。小鼠(10 个小鼠为一组)按如下所述用弗氏佐剂(CFA), PBS; DMSO, 或角鲨烯中的通式 B 的糖脂免疫。抗体滴度通过 1:100 稀释血清的酶联免疫吸测定, 并表示为三个独立分析的平均值。丁字符号, 标准偏差。

图 12-15 图示了制备此处描述的合成脂的例子的合成方案。

发明详述

I. 术语

除非另有说明, 技术术语根据常规的用法使用。分子生物学常见的术语的定义可以参见 Benjamin Lewin, *Genes V*, 由牛津大学出版社出版, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew 等编辑, *The Encyclopedia of Molecular Biology*, 由 Blackwell 科学有限公司出版 1994 (ISBN 0-632-02182-9); 和 Robert A. Meyers (主编), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, 由 VCH 出版公司出版, 1995 (ISBN 1-56081-569-8)。

为便于对本发明各种实施方案的评估, 提供以下专用名词的解释:

“施用”化合物应该理解为提供一种化合物, 化合物的前体药物, 化合物的共轭物, 或包括此处描述的化合物的药物组合物。

类似物:一种分子, 其与母化合物在化学结构上不同, 例如同系物(不同在于化学结构的增加, 比如烷基链长度的差异), 一种分子片段, 一种通过一种或者多种官能团而不同的结构, 或离子化的改变。结构类似物通常使用定量结构活性关系(QSAR)发现, 使用比如那些公开在 Remington : The Science and Practice of Pharmacology, 第十九版(1995), 28 章中的技术。

抗原:能够刺激免疫应答的化合物, 组合物, 或物质, 比如在动物中产生抗体或 T 细胞应答, 包括注入或吸收到动物体内的组合物。抗原与特异性的包括那些通过异源的免疫原诱导的体液或细胞免疫的产物反应。术语“抗原”包括所有相关的抗原决定簇。

抗体:免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分, 即包含特异性结合(与抗原免疫反应)到抗原的抗原结合部位的分子。

天然存在的抗体(如, IgG ,IgM ,IgD)包括四个多肽链, 通过二硫键相互连接的两个重(H)链和两个轻(L)链。然而, 已经表明抗体的抗原结合功能可以通过天然存在的抗体的片段来进行。因此, 这些抗原结合片段也通过所述术语“抗体”来定义。包括在术语抗体之内的结合片段特定的非限制的例子包括(i)由 VL ,VH ,CL 和 CH1 结构域组成的 Fab 片段; (ii)由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段; (iii)由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成 Fv 片段, (iv)由 VH 结构域组成的 dAb 片段(Ward 等,Nature 341:544-546,1989); (v)分离的互补决定区(CDR); 和(vi)F(ab')₂ 片段, 包含两个通过二硫键在绞链区连系的 Fab 片段的二价片段。

动物: 活的多细胞脊椎动物, 这一类包括, 例如, 哺乳动物和鸟类。术语哺乳动物包括人和非人哺乳动物。类似的, 术语“受试者”包括人和兽类受试者。

伯氏疏螺旋体：一种螺旋菌，首先被 Johnson 等在 1984 年描述。伯氏疏螺旋体可以从在称作 BSK (Barbour-Stoenner-Kelly) 修饰的 Kelly 介质中培养的其节肢媒介动物或脊椎动物寄主中获得。已经成功在 BSK 中培养来自蜱和来自莱姆症病人血液，皮肤和脑脊髓液的疏螺旋体。用 1.3% 琼脂糖固化的 BSK 允许从单个生物体生产克隆。伯氏疏螺旋体与大多数细菌相比较生长缓慢。各螺旋菌在 12 到 24 小时的延长之后分裂成两个细胞。这种感染人类的疏螺旋体在 US 称作狭义的伯氏疏螺旋体。在欧洲狭义的伯氏疏螺旋体和此外两个相关疏螺旋体，*B. garillii* 和 *B. afzelii* 也导致莱姆症。在亚洲，只有 *B. garinii* 和 *B. afzelii* 导致人莱姆症。

疏螺旋体，包括伯氏疏螺旋体，是由细胞膜包围的原生质圆柱体，7 到 11 根周质空间纤毛和与下面的结构松散连系的外膜组成的柔韧的螺旋状细胞。伯氏疏螺旋体 B31 典型株的 DNA 序列发表在 1997 年，并且包含 950 千碱基的线性染色体，9 个线型质粒，和 12 个环状质粒。伯氏疏螺旋体和其它的疏螺旋体的外膜独特之处在于编码蛋白质的基因位于线型质粒上；这些染色体外基因决定这些生物体的抗原性同一性并且估计可能帮助细菌在蜱和不同温血动物寄主中适应和存活。

共轭物：“共轭物”是包括此处公开的连结到药用载体的免疫原性化合物的任何构建物。因此，“共轭物”不局限于共价结合到蛋白载体的免疫原性的化合物的共轭物(共轭物的特定类型通常在本领域称作“共轭物疫苗”)。

衍生物：衍生物是来源于基本分子结构的生物学活性分子。

免疫应答：免疫系统细胞的应答，比如 B 细胞，T 细胞或单核细胞对刺激的应答。在一个实施方案中，所述应答是特定针对具体抗原的应答(“抗原特异性应答”)。在一个实施方案中，免疫应答是 T

细胞应答，比如 CD4⁺应答或 CD8⁺应答。在另一个实施方案中，所述应答是 B 细胞应答，并导致特异性抗体的产生。“免疫原性组合物”是当免疫原性组合物被注入或别的方式引入温血动物寄主时引发免疫应答的任何组合物。所述免疫应答可以是体液的，细胞的，或两者。“加强免疫”是指在随后将哺乳动物寄主暴露到相同的免疫原性组合物后针对免疫原性组合物的增强的免疫应答。

分离的：“分离的”生物组分(比如脂类)已经基本与天然存在组分的生物体细胞中其它的生物学组分，即其它的染色体或染色体外 DNA 和 RNA，蛋白质，脂类和细胞器分离或纯化。已经“分离的”脂类包括通过标准提纯法纯化的脂类。该术语还包含化学合成的脂类和其它的化合物。

标记：直接地或间接地结合到另外的分子以促进该分子检测的可检测化合物或组合物。标记的具体非限制性的例子包括荧光标签，酶连接，和放射性同位素。

莱姆症：莱姆症是由细菌伯氏疏螺旋体感染引起的。这些细菌是通过被感染的鹿蜱叮咬而传递到人并每年在美国导致超过 16,000 例感染。

莱姆症大多数通常特征为“靶心”皮疹，游走性红斑，伴随非特异性症状比如发热，不适，疲劳，头痛，肌肉痛(myalgia)，和关节痛(arthralgia)。

从感染到游走性红斑的潜伏期通常 7 到 14 天但是也许短至 3 天和长至 30 天。一些被感染的个体没有明显的疾病(无症状感染，通过血清学试验确定)，或仅仅显示非特异性症状比如发热，头痛，疲劳和肌痛。莱姆症螺旋菌从蜱叮咬部位通过皮肤，淋巴和血液携带途径散布。早期弥散性的感染体征通常发生在单发性游走性红斑损伤外观出

现后数天到数周。在多发的(二次的)游走性红斑损坏之外，早期的弥散性感染可以显示神经系统，肌骨骼系统，或心脏的疾病。早期的神经病学表现包括淋巴细胞性脑膜炎，颅侧神经病(尤其是面神经麻痹)和神经根神经炎。肌骨骼的表现可以包括有或没有关节发胀体征的移动性关节和肌肉痛。心脏的表现很少，但是可以包括心肌炎和不同程度的一过性房室传导阻滞。未经治疗或不适当治疗的病人的伯氏疏螺旋体感染可以发展为感染之后数周到数月的迟发弥散性疾病。迟发弥散性莱姆症最常见的表现是一个或几个关节间断的发胀和疼痛，通常是大的，负担重量的关节比如膝关节。有些病人发展慢性轴突多发性神经病，或脑病，后者通常通过认知异常，睡眠障碍，疲劳，和人格改变而表现。罕见的是，莱姆症病态可以是严重的，慢性的，和致残性的。一些人在接受治疗莱姆症之后发生原因不明的莱姆症后综合症。

淋巴细胞：一种参与机体免疫防御的白细胞。有两个主要类型的淋巴细胞：B细胞和T细胞。

药用载体：“载体”是一种生理可接受的物质，与此处公开的治疗的或生物学活性化合物有联系。所述载体可以促进治疗的或生物学活性化合物的某一种施用和/或增强通过治疗的或生物学活性化合物诱导的免疫应答。通常，载体的性质取决于所采用的施用的具体模式。例如，胃肠外的制剂通常包括包含药用和生理可接受的作为介质的液体比如水，生理盐水，平衡盐液，水性葡萄糖，甘油等可注射的液体。对于固体组合物(如，粉末，药丸，药片，或胶囊形式)而言，常规的非毒性的固体载体可以包括，例如，药物等级的甘露糖醇，乳糖，淀粉，或硬脂酸镁。除生物学中性载体之外，被施用的药物组合物可以包含较少量的无毒助剂物质，比如润湿或乳化剂，防腐剂，和pH缓冲剂等，例如乙酸钠或单月桂酸山梨醇酯。E. W. Martin的Remington's Pharmaceutical Science, Mack 出版公司, Easton, PA, 15版(1975), 描述了适于此处公开的BBGL II 药物递送的组合物和制剂。

本发明公开的化合物的“药物用盐”包括那些由阳离子形成的化合物，所述阳离子比如钠，钾，铝，钙，锂，镁，锌，和从比如氨，乙二胺，N-甲基-谷氨酰胺，赖氨酸，精氨酸，鸟氨酸，胆碱，N,N'-二苄乙烯二胺，氯普鲁卡因，二羟乙基胺，普鲁卡因，N-苄基苯乙胺，二乙胺，哌嗪，三(羟甲基)氨基甲烷，和羟化四甲铵的碱形成的化合物。这些盐可以通过标准方法制备，例如通过游离酸与合适的有机或无机碱反应。本说明书列举的任何化合物可以作为其药物用盐替换地施用。“药物的用盐”此外还包括游离酸，碱，和两性离子形式。合适的药物用盐的描述可以参见“Handbook of Pharmaceutical Salts, Properties, Selection and Use”，Wiley VCH (2002)。

本发明公开的雌激素试剂的“药用复合物”包括由金属离子形成的复合物或配位化合物。这样的复合物可以包括用于与雌激素因子结合的配体或螯合剂。

多肽:任何氨基酸链，不管长度或翻译后修饰(如，糖基化或磷酸化)。

纯化的:术语纯化的不要求绝对纯；而是作为相对的术语。因此，例如，纯化肽制剂是其中肽或蛋白质比细胞内自然环境下肽或蛋白更富集的制剂。在一个实施方案中，纯化化合物制剂使得此处公开的脂类表现所述化合物制剂至少 50%，尤其是至少大约 90%，和尤其至少大约 98%的总脂类含量。

“饱和的或不饱和碳链”包括烷基，烯基，炔基，二烯或环烷基团。

“取代氨基”是指基团-NZ¹Z²，其中 Z¹ 或 Z² 至少之一独立地选自烷基，环烷基，杂环烷基，芳基，杂芳基，烷氧基，芳氧基和其组合。

“取代碳链”是指碳链的一个或者多个氢原子被另外的基团比如卤素，芳基，环烷基，氨基及其组合取代的碳链。

T 细胞:免疫应答关键的白细胞。 T 细胞包括，但是不局限于，CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞。 CD 4⁺T 淋巴细胞是表面携带被称为“分化簇 4”(CD4)的标示物的免疫细胞。 这些细胞，又名 T 辅助细胞，帮助调节免疫应答，包括抗体反应以及 T 杀伤细胞应答。 CD8⁺T 细胞携带“分化簇 8”(CD 8)标记物。在一个实施方案中，CD8T 细胞是细胞毒性 T 淋巴细胞。 在另一个实施方案中，CD8 细胞是 T 抑制细胞。

治疗活性剂:引起诱导免疫应答的因子，通过临床的反应测量(例如免疫细胞群数目的增加，特异性结合的抗体的产生，或可测量的伯氏疏螺旋体感染的抵抗力)。治疗活性剂还可以包括模拟 BBGL-II 效果的有机的或其它的化合物。

上述术语描述只提供对读者的帮助，而将不会解释为比本领域普通技术人员的理解小的范围，或作为对权利要求书范围的限制。除非另外说明，此处使用的所有技术术语和科学名词具有本发明领域的一般技术人员所通常理解的相同的含意。单数词语“一种”、“一”“所述”，除非上下文清晰的显示其他内容，否则包括复数对象。相似的，词语“或”除非上下文清晰的显示另外含意，用来包括“和”。进一步应当理解对化合物给出的所有的碱基大小或氨基酸大小，和所有的分子重量或分子量值是大约的，提供用作描述。虽然与此处描述的那些相似的或等效的方法和材料可被用于本发明实践或检验，下面描述合适的方法和材料。术语“包含”表示包括。此外，材料，

方法，和例子仅仅是例证性的而不意指限制。此处公开的所有化合物包括(+)和(-)立体异构体（以及(+)或(-)立体异构体），和其任何互变异构体。

如上所述，此处公开的是生物学活性的(例如，免疫原性的)通式 A 的糖脂。这些糖脂是 BBGL-II 合成类似物，也就是它们是通过与从 *B.burgdorferi* 中提取和纯化相反的化学合成获得的。通式 B 的化合物，另一方面，可以通过从伯氏疏螺旋体提取获得(换句话说，天然的 BBGL-II)。

天然的 BBGL-II 这里指“胆固醇基 6-O-棕榈酰- β -D-半乳糖基吡喃糖”。提取的天然 BBGL-II 被分离和纯化。例如，纯化的天然 BBGL-II 分离物基本上没有来自 *B.burgdorferi* 其他的脂类，化合物或分子片段。在一个例子中，纯化的天然 BBGL-II 分离物包括小于一个重量百分数的核酸和小于一个重量百分数的蛋白。

此处公开的 BBGL-II 的类似物(参见通式 A)也具有治疗作用。例如，在这样一个类似物中 BBGL-II 化学式显示的酰基(例如，棕榈酰)可能被其他的饱和或不饱和的含碳基团或包含 1 到 25 碳原子的链取代，尤其是被其他的来源于有机脂肪酸的酰基。胆固醇基和半乳糖基吡喃糖环状结构可能在任何环位置包括取代基团例如烷基(尤其来源于脂肪酸的酰基)，羧基，取代的羧基(-COR 其中 R 是烷基或羧酸或酯)，芳基，烷氧基，杂环，卤素，或氨基。桥连胆固醇基和半乳糖基吡喃糖环的 O 杂原子可以用烷基(如，-CH₂-)或杂原子例如 N，S 或 P 代替。

在通式 A 的化合物中，R² (与-C(O)O-基团一起)可以是来源于有机脂肪酸的酰基。这样的酰基包括棕榈酰，月桂酰，硬脂酰，十四酰，油酰和亚油酰基。所述酰基的衍生作用可以提供共价结合到载体蛋白的位点(例如，酰基叠氮)。

在某个变体中，R¹ 基团能够形成与载体蛋白的共价键(换言之，共轭连接到载体蛋白)，以下更详细地叙述。共轭连接到载体蛋白可以通过至少一个烷基或胆固醇基部分的链的衍生作用完成。这样的衍生作用按如下所述完成。或者，可以使用小分子例如己二酸二酰肼或 1,6-二氨基己烷。

BBGL-II 和 / 或它的类似物可以分离或纯化自如下所述的 *B.burgdorferi* 培养物，或它们可以化学合成。例如：化学式 A 的化合物可以通过首先获得其中半乳糖环的羟基已经具有保护基的半乳糖基卤化物而合成。该半乳糖基卤化物然后与胆固醇起反应提供半乳糖基胆固醇。半乳糖环上的保护基然后被除去，并替换为替代的保护基。分别地制备叠氮酰胺中间物。该叠氮酰胺的中间物与半乳糖基胆固醇浓缩以提供叠氮酰化的胆固醇 β -D-半乳糖基吡喃糖。

在这里公开的一个例子中，治疗有效量的纯化，天然的 BBGL-II(化学式 B)或 BBGL-II(化学式 A)化学合成类似物是用于产生免疫应答的量，或用于治疗或预防受试者伯氏疏螺旋体感染的量。治疗指缓解伯氏疏螺旋体感染的病征或症状，或莱姆症病征或症状的治疗干预。

免疫原性组合物及其应用

在一个实施方案中，提供了感染伯氏疏螺旋体的受试者的治疗方法，或预防或抑制感染，或临床的莱姆症发展的方法。或者，该方法可用于抑制已经存在的感染的发展。该方法包括给予受试者治疗有效量的纯化的天然 BBGL-II 或化学式 A 的化合物，从而治疗或预防感染，或延迟或逆转临床疾病。在形成在受试者中产生免疫应答的组合物，或为受试者接种时，使用 BBGL-II 或化学式 A 的化合物。

本发明公开的这些免疫原性的组合物引发哺乳动物宿主，包括人和其他的动物针对伯氏疏螺旋体的免疫应答。该免疫应答可能是细胞依赖的反应或抗体依赖的反应，或两者，并此外该反应可以为哺乳动

物宿主提供免疫记忆或加强效果或者两者。借助于 T 细胞引发抗体的抗原被称为 T 依赖的抗原。不要求 T 细胞帮助引发抗体生成而是能直接激活 B 细胞的抗原被称作 T-独立的抗原。这些免疫原性组合物可以用作疫苗并且可以提供哺乳动物受试者或宿主对病原微生物感染的保护性应答。

更具体地，此处描述的疫苗可以制备作为 T 细胞独立的疫苗和/或 T 细胞依赖的疫苗。根据特别的变体，化学式 A 或 B 的活性化合物主要是 T 细胞独立的但通过与载体(尤其是蛋白载体)结合被转化为 T 细胞依赖的应答疫苗。

载体提供给此处公开的化学式 A 或 B 的化合物。载体可以与免疫原性的化合物混合存在，或可以通过化学作用或键结合到免疫原性的化合物。例如：该免疫原性的化合物可以结合到大分子载体。载体可以是免疫原性的化合物通过疏水性的非共价作用结合的聚合物，例如塑料，如聚苯乙烯，或与免疫原性的化合物共价结合的聚合物，例如多糖，或多肽，如牛血清白蛋白，卵清蛋白或匙孔血蓝蛋白。载体优选是无毒的和非过敏原性的。该免疫原性化合物可以多价结合到大分子的载体而提供增加的疫苗制剂免疫原性。

在一个实施方案中，载体是氨基酸链(如多肽或蛋白)或其他部分。在另一个实施方案中，载体是 *B.burgdorferi* 多肽氨基酸序列的二聚物，寡聚物，或高分子聚合物。有用的免疫原性载体的例子包括匙孔血蓝蛋白(KLH)；白蛋白例如牛血清白蛋白(BSA)和卵清蛋白，PPD(结核菌素纯化蛋白衍化物)；红细胞；破伤风类毒素；霍乱类毒素；琼脂糖珠；活性碳；或膨润土。

此处公开的脂类可以连接任何目标蛋白，包括但不限于，rARU，包含难治梭状芽孢杆菌(*Clostridium difficile*)毒素 A 的重复单位的重组蛋白。选择载体以增加多糖的免疫原性和/或引发针对载体的医学上有

益抗体。满足这些标准的载体描述于现有技术中。聚合的载体可以是包含一种或多种可用于结合的官能团的天然的或合成材料，例如伯胺和/或仲胺，叠氮基，醛，酰肼，环氧化物，硫醇或羧基。该载体可以是水溶的或水不溶的。

水溶性肽载体是优选的，并包括但不局限于天然的或合成的多肽或蛋白，比如牛血清白蛋白，和细菌的或病毒蛋白质或无毒的突变体或其多肽片段。如，破伤风毒素或类毒素，白喉毒素或类毒素，绿脓假单胞杆菌外毒素或类毒素，重组体绿脓假单胞杆菌外蛋白 A，百日咳毒素或类毒素，产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)和韦氏梭菌(*Clostridium welchii*)外毒素或类毒素，突变的无毒的志贺毒素全毒素，志贺毒素 1 和 2，志贺毒素 1 和 2 的 B 亚基，和乙型肝炎(hepatitis B)表面抗原和核心抗原。

另外的载体是一些动物，植物，或矿物来源的物质，其是生理可接受的并起呈递 BBGL-II 脂类给免疫系统的作用。因此，可使用多种载体，包括惰性材料，或具有生物活性和/或促进免疫应答的材料。例如，蛋白载体的例子包括但不局限于匙孔血蓝蛋白和血蓝蛋白。多糖还可以被用作载体，包括分子量 10,000 到 1,000,000 的多糖，比如淀粉，葡聚糖，琼脂糖，聚蔗糖，或其羧甲基衍生物和羟甲基纤维素。

聚氨基酸也被考虑作为载体，并且这些聚氨基酸包括，除了别的以外，聚赖氨酸，聚内氨酰聚赖氨酸，聚谷氨酸，聚天冬氨酸和聚(C₂-C₁₀)氨基酸。

有机聚合物能被用作载体，这些聚合物包括，例如：胺，酰胺，烯烃，乙烯基，酯，乙缩醛，聚酰胺，碳酸酯和醚的聚合物和共聚物等。一般而言，这些聚合物的分子量会显著地不同。该聚合物可能具有从两个直到数千个重复单位，如两千重复单位。重复单位数目符合

宿主动物中免疫组合物的使用。一般而言，这样的聚合物具有低分子量，即在 10,000 和 100,000 之间(分子量通过超速离心法测定)。

还可以采用无机聚合物。这些无机聚合物可以是包含有机部分的无机聚合物。尤其是，硅酸盐和氢氧化铝可被用作载体。优选载体是免疫佐剂。在此情况下，特别考虑佐剂是胞壁酰二肽或其类似物。

该载体还可以是用于相互连接许多合成的包含多肽的链的交联剂的残基。交联剂以醛(例如戊二醛)，羧基，胺，氨基，亚氨基或叠氮苯基作为其官能团。尤其是，考虑利用丁醛作为交联剂，二价的亚氨基酯或碳二亚胺。

本公开内容此外包括制备免疫原性的组合物的方法，包括将此处公开的脂类结合到载体。这样的载体的例子包括如上所述那些以及可以作为载体或佐剂或与脂类结合具有其他的生物活性的多肽或非肽部分。化学式 A 或 B 的化合物可以通过在存在允许化合物和蛋白载体之间形成共价键的试剂的情况下与蛋白载体混合而结合到蛋白载体。示例的偶联剂包括戊二醛，羧基琥珀酰亚胺和碳二亚胺。另外，小化学分子可以连接于蛋白载体化合物和该分子中任何一个，通过它的反应性充当化合物和蛋白载体之间的接头分子。示例的接头包括己二酸二酰肼，氨基己酸，氯己醇二甲基乙缩醛，D-葡萄糖醛酸内酯和 p-硝基苯胺。

例如，化学式 A 或 B 的化合物可以通过许多方法之一结合到多肽，例如通过首先将多肽琥珀酰化和然后通过多肽与带有 1-乙基-3(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐的反应将脂类成分结合到多肽。另外，脂类成分的活化可以通过利用几个试剂中任何几个，但优选溴化氰实现。

化学式 A 或 B 的化合物还可以通过脂质体输送系统施用到受试者以便增强它们的稳定性和/或免疫原性。化合物通过脂质体递送可能是特别有利的，因为脂质体可以被吞噬细胞内在化在治疗的受试者体内。这样的细胞，在摄取脂质体后，会消化脂质体膜并随后连同其他引发强烈的免疫应答所需的其他分子将多肽呈递到免疫系统。该脂质体系统可以是任何种类的单层泡囊，多层泡囊，或稳定的多层泡囊，并可以根据本领域技术人员已知的方法制备和施用，例如根据美国专利 5,169,637, 4,762,915, 5,000,958 或 5,185,154 的教导进行。

本发明公开内容包括给受试者施用治疗有效剂量的包含至少化学式 A 或 B 的化合物之一的药物组合物。该药物组合物可以包括药用载体。本发明药物组合物的施用可以由本领域技术人员公知的任何方法实现。受试者是指任何哺乳动物，包括人。

药物组合物优选以剂量单位制备和施用。固体剂量单位是药片，胶囊和栓剂。为治疗受试者，根据化合物的活性，施用的方式，失调的性质和严重程度，病人的年龄和体重，必须有不同的每日剂量。然而在某种情况下，更高或更低的每日剂量可能是适当的。日剂量的施用既可以通过以单独的剂量单位形式或几个小剂量单位的单次施用，也可以通过以一定间隔多次施用细分的剂量施用。施用还可以通过连续的剂量持续比较久的时段而完成，例如 1-10 周。

药物组合物通常口头施用或肠胃外施用。肠胃外施用路线包括，但不局限于，皮下注射(SQ 和 depo SQ)，静脉内 (IV)，肌肉 (IM 和 depo IM)，椎管注射或输注方法，鼻内 (吸入)，鞘内，透皮，局部，和眼部的施用方式。化合物还可以由植入的储液器或泵施用。适当的固体或液体药物制剂形式是，例如，颗粒，粉末，药片，糖衣片剂，(微)胶囊，栓剂，糖浆，乳剂，悬浮剂，乳膏剂，气溶胶，安瓿形式的滴液或可注射的溶液，以及延缓释放的活性化合物，在所述制剂中赋形剂和添加剂和/或辅剂比如崩解剂，粘合剂，涂层剂，膨胀剂，润滑剂，

调味剂，甜味剂或增溶剂照例按如上所述使用。该药物组合物适合于在各种药物递送系统中使用。目前药物递送的方法的简评，参见 Langer, *Science* 249 : 1527-1533, 1990, 其在此引作参考。接种材料一般成生理容许的(可接受的)稀释剂例如水，盐水，磷酸盐缓冲液等的溶液从而制备形成水性药物组合物。助剂，例如氢氧化铝也可以包含在组合物中。

药物组合物通常口服施用或全身施用。治疗使用有效的量当然取决于疾病的严重度和病人的体重和一般情况。一般地，用于体外的剂量可以提供用于药物组合物原位施用量的有用指导，并且动物模型可以用来决定治疗具体的病症的有效剂量。不同的考虑描述于，例如，在 Gilman 等编辑，Goodman 和 Gilman 的：治疗的药理学基础 (*Pharmacological Bases of therapeutics*)，第 8 版，Pergamon 出版社，1990；以及 Remington's *Pharmaceutical Science*，17 版，Mack 出版公司，Easton, Pa, 1990，各自在此处引作参考。

此处公开的化合物的有效剂量取决于被治疗的疾病状况的性质和严重度，病人的年龄和体况和其他的临床的因素而变化。因此，最终决定的合适的治疗方案将由主治医生决定。一般地，公开的化合物的剂量范围从每千克体重大约 0.1 μg 到每千克体重大约 100 mg/kg。其他适当的范围包括每千克体重大约 1 μg 到 10 mg。施用方案可以从每周一次到每天一次变化，取决于许多临床的因素，例如受试者对于脂类的敏感性。就更具攻击性的疾病来说，优选可以通过其他途径包括静脉内或鞘内施用如上所述的那些剂量。连续输注也可能是合适的。

对动物施用而言，纯化的治疗活性分子通常与药用载体组合。药物制剂可以只包含一种治疗分子，或可以由几种类型治疗分子组成。通常，载体的性质取决于所采用的具体施用方式。例如，肠胃外的制剂通常包含可注射的液体，包括药物和生理可接受的液体比如水，生理盐水，平衡盐溶液，葡萄糖水溶液，甘油等等作为介质。对于固体

组合物(如, 粉末, 药丸, 药片或胶囊形式), 传统的无毒固体载体还可以包括例如药用等级的甘露醇, 乳糖, 淀粉或硬脂酸镁。除生物学中性的载体之外, 施用的药物组合物可以包含较小量的无毒助剂物质, 例如湿润剂或乳化剂, 防腐剂和 pH 缓冲剂等, 例如醋酸钠或单月桂酸山梨醇酯。

现有技术已知, 基于蛋白质的药物只可以通过摄取而效率不高地递送。然而, 基于药丸形式的药物蛋白质可以皮下地施用, 尤其是如果配制在缓释的组合物中。缓释剂型可以通过目标蛋白质与生物相容的基质, 比如胆固醇组合而生产。另一个可能的施用蛋白质药物的方法是通过利用缩型渗透泵。如上所述, 生物相容的载体也可与这些递送方法结合使用。

该药物组合物可以任何实现它们的预定目的的方式施用。施用治疗分子的量和方案可以通过临床技术领域治疗莱姆症和任何其他与伯氏疏螺旋体感染的状况有关的一般技术人容易地确定。为治疗这些症状, 分子以有效抑制伯氏疏螺旋体 i 复制的量施用。典型的最初施用量是足以在已经发现实现体外预期效果的作用位点获得组织浓度的量。化学式 A 或 B 的化合物可以活体内施用到宿主, 例如通过全身性施用, 例如静脉内的或腹膜内的施用。此外, 化学式 A 或 B 的化合物可以损伤部位内施用: 即将肽或蛋白质直接注射进损伤部位。为了增强免疫应答, 最初的注射大约 4 到 6 周后施用继发的或加强剂量。继发的剂量可以如此处指明的方式施用, 或按照医师指导施用。

通过下列非限制的实施例说明本发明。

实施例

实施例 1

材料和方法

生物体和生长条件-伯氏疏螺旋体 B31 (ATCC 35210), BL303 和 N40 株在 BSK-H 培养基(Sigma)中培养。培养基中接种 2% (体积)的冰冻培养物并在 37°C 静止培养 72 小时到指数生长中期(pH 7.0)。通过在 12,000 g 离心 30 分钟收获细胞, 用冷 PBS 洗三次并在 -20°C 保存备用。

脂类提取和分析-脂类从洗涤过的细胞中通过 Bligh 和 Dyer(14)的方法提取。使用旋转蒸发器蒸发氯仿相, 继之以氮流, 并且将干燥的脂类(0.1-0.2 mg/ml 细胞蛋白质)再溶解在 1-2 ml 氯仿中。BBGLs 的定量分离通过硅胶吸附柱层析法实现。5 ml 氯仿的总脂类提取物(10 mg)被上样到硅胶柱(20 x 3 cm, Kieselgel 60, Merk, 230-400 目), 顺序地用 10 倍床体积氯仿(级分 1); 2.5% 甲醇: 氯仿(体积: 体积; 级分 2); 5% 甲醇: 氯仿(体积: 体积; 级分 3), 10% 甲醇: 氯仿(体积: 体积; 级分 4)和甲醇(级分 5)洗脱。这些级分在旋转蒸发器和氮流中被蒸干, 再溶解在 1 毫升氯仿并保存在 -20°C。级分 3 几乎只包含 BBGL-II, 而级分 4 包含 BBGL-III。为定性分析脂类, 总脂类级分(20 μ l 含 200 μ g)在硅胶 HR 包被的铝板(Merck, Darmstadt, 德国)上进行层析并使用氯仿: 甲醇(体积比 9:1)展开。脂类斑点通过碘蒸气检出, 糖脂通过蒽酮喷显剂检出。

放射性标记-伯氏疏螺旋体的胆固醇标记通过在接种的时候添加 [4-¹⁴C]胆固醇(Amersham Pharmacia, GB, W. Prinz 惠赠, NIDDK, NIH)到 100 ml 培养基中而完成。标记的胆固醇(比放射性 58.0 m Ci/mmol)以 0.1 μ Ci/ml 被添加到 Tween 80:乙醇(1:1 体积比)最终容积 50 μ l 的混合物中。如所述提取脂类。为测定脂斑点的放射性, 总脂在 TLC 板上分离, 板然后短暂暴露于碘蒸气, 斑点被刮入含 1 ml 闪烁液的闪烁室。在 Perkin Elmer 闪烁计数器(I450 microbeta 型号)中测量放射性并表示为每分钟的衰变(dpm)。

亲和层析-使用 Detoxi-凝胶去除内毒素凝胶(Pierce, Rockford, IL)亲和层析纯化 BBGL-II。疏螺旋体细胞用 PBS 洗 5 次, 再悬浮在相同

缓冲液中，并通过在 Branson 超声波仪在 50%工作循环在 100 W 超声波处理 30 分钟进行破碎。膜从可溶组分通过在 37000 g 离心 30 分钟而分离，上清液(1ml 含 1mg 总蛋白)被上样到 detoxi 凝胶(琼脂糖固相化的多粘菌素 B)柱(0.9 x 10 cm)。柱用 10 倍床体积 PBS 洗涤。通过用 10 倍床体积包含 1%脱氧胆酸(w/v) PBS 根据厂家说明书洗涤进行共轭物质的洗脱。结合的级分用蒸馏水透析，冻干并如所述提取脂类。

免疫和免疫染色-10 只一组的雌性 NIH 瑞士白化小鼠(5-6 周龄，通常)腹膜内免疫 2 剂量的在完全弗氏佐剂中乳化的(第一剂量) 或弗氏不完全佐剂中乳化的(第二剂量)BBGL-II，时间间隔两周。该剂量每 0.1 ml 包含 10 μ g BBGL-II，并以 0.1 ml IP 施用。替代地，小鼠被免疫三次，间隔为 2 周，用 0.1 ml DMSO，角鲨烯或 PBS 中乳化的 10 μ g BBGL-II 免疫。小鼠在第二剂量之后 2 周取血，并将获得的血清保存在-20 $^{\circ}$ C 备用。兔(雌性，新西兰白兔，8 周龄)用两个剂量 BBGL-II 免疫，各 75 μ g，在弗氏佐剂中，i.m.和 i.c.施用 20 \times 0.05ml。

膜脂的免疫染色按前述方法(15)进行。包含脂类斑点的展开的层析板，用聚异丁基-异丁烯酸溶液(0.05%的己烷溶液)涂布并干燥。该板然后用包含 1% BSA 和 0.05% tween 20 的 PBS 封闭 15 分钟，然后用以 1:100 在 PBS-BSA 缓冲液中稀释的抗 BBGL-II 抗血清在 22 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。该板用 PBS-BSA 缓冲液冲洗 5 次，并用 1:25,000 在 PBS-BSA 中稀释的碱性磷酸酶结合的大鼠抗小鼠 IgG (KPL, MD)在 22 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。然后洗涤该板，并使用 BCIP/NBT (KPL, MD)显色。

分析方法-糖分析根据 Sawardeker 等(16)方法进行。简单地说，0.5 mg BBGL-II 或 BBGL-III 在 1 M HCl 中在 100 $^{\circ}$ C 水解 4 小时，在还原和过乙酰化之后，通过使用具有 HP-5 型玻璃毛细管柱的 Hewlett-Packard 仪器(HP 6890 型号)的 GLC-MS (0.32 mm 30 分钟)，温度程控在 8 $^{\circ}$ C/分钟，从 125-250 $^{\circ}$ C 以电子电离方式(106 eV)进行分析。在干燥的糖脂用 1 M HCl/MeOH 在 80 甲醇醇解 5 小时之分析脂肪酸。在氮

流下除去溶剂，并用氯仿提取游离脂肪酸甲基酯。用 GLC-MS 在上述条件下进行分析。

双键定位-双键在不饱和脂肪酸中的位置由 4,4-二甲基噁唑啉衍生化作用(17)之后通过 GLC-MS 确定。氯仿相在氮气流下干燥，然后与 500 μ l 的 2-氨基-2-甲基丙醇混合并在 150 $^{\circ}$ C 加热过夜。冷却后，反应混合物被溶于 3 ml 二氯甲烷，并用 2 ml 蒸馏水洗两次。

甲基化分析-天然的和 O-脱酰基的糖脂根据(18)进行甲基化。甲基化的产物用 1 M HCl 在 100 $^{\circ}$ C 水解 4 小时，变为糖醇乙酸酯，并用 GLC-MS 分析。

O-脱酰作用-糖脂(2 mg)用 0.33 ml 甲醇的 0.25 M NaOCH₃ 在 37 $^{\circ}$ C O-脱酰。该反应通过 TLC 监控。2 小时后，没有发现表示原始的，未改性的糖脂斑点。溶剂在氮气流下蒸发，产物用氯仿：水(1:1 体积)提取。通过 GLC-MS 分析有机和无机相的糖和脂肪酸。

绝对构型的确定-BBGL-II 用 1 M HCl 在 100 $^{\circ}$ C 水解 4 小时。干的中性样品中的 D-半乳糖通过使用半乳糖氧化酶(19)酶促方法进行定量。甘油绝对构型的确定根据(1)用在前的糖脂 O-脱酰作用(20)完成。这些方法中糖脂皂化后释放的甘油的伯醇羟基通过 TEMPO 氧化并转化为甘油酸残基。在酸水解之后甘油酸用(R)-(-)-2-丁醇酯化，乙酰化并用 GLC-MS 分析。保留时间与从 D 和 L 甘油酸获得的基准试样的相比。

FAB 质谱分析法-使用 6 keV 原子从 3-硝基苄醇或甘油作为基质的样品记录质谱。样品的泛乙酰化作用按 Dell(21)的描述进行。

基质辅助的激光解吸/离子化飞行时间质谱法(MALDI-TOF)-使用 PerSeptive BioSystems Voyager Elite DE-STR (PE-Biosystems,

Framingham, MA) MALDI-TOF 仪器获得质谱。质谱在 2600 的衰减积累 100 次激光照射。仪器以 20 kV 加速电压和 150 毫微秒离子提取延迟时间的线性模型运转。样品和基质按以前的描述(22)制备。简单地说, BBGL-II 和 BBGL-III 溶于氯仿: 甲醇(1:1 体积)至浓度 $4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, 并用作 $0.5 \mu\text{l}$ 小滴施加以分隔多个样品板中心的位置。相等体积的基质, 2,5-二羟基苯甲酸, $10 \text{ mg}/\text{mL}$ 水被应用到各样品, 并在插入到质谱仪之前干燥。

核磁共振光谱学-单半乳糖基甘油二酯(MGDG, 主要是 1,2-二-O-硬脂酰-3-O- β -D-半乳糖吡喃糖基甘油)获自 Matreya, 州立大学, PA。1, 2-二-O-棕榈酰甘油(1, 2-二棕榈精)获自 NuChek, New Elysian, MN。自身制备甲基 α -D-半乳糖吡喃糖苷, 甲基- β -D-半乳糖吡喃糖苷获自 Aldrich, Milwaukee, WI。氘化溶剂购买自剑桥同位素实验室, Andover, MA。

在 300 K 不自旋, 利用装配 5 mm 宽带(BBO)探针 Bruker DRX-500 光谱计获得核磁共振光谱。5-10 毫克化合物的 CDCl_3 溶液(0.5 mL, 99.96 原子% D)或它与 $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ (99.9 原子% D)或 CD_3OD (99.8 原子% D)的混合物用于脂类, 用四甲基硅烷作为 ^1H 和 ^{13}C NMR 光谱化学位移的参考。检验异头的甲基 D-半乳糖吡喃糖苷(11 毫克)以其在 D_2O (0.4mL, 99.96 原子%D)中的溶液, 用 4,4-二甲基-4-硅杂戊酸-2,2,3,3-d4 (TSP)作为 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱的内部参照。通过在数据通过在 SGI O2 或 Octane 2 处理器上运行的 Bruker XWINNMR 程序 3.0 版本处理和获得数据。32,768 点数据用于 1D 谱, 在有些情况下清零(zero filling)到 32, 768 或 65,536 点。在 500 MHz 用 4.25 kHz 谱宽, 30° 脉冲($3.2 \mu\text{s}$)和再循环时间 6s 记录 1D ^1H NMR 谱。在 126 MHz 通过使用 25.1 kHz 谱宽, 45° 脉冲($3 \mu\text{s}$)和循环时间 1 s 获得 1D ^{13}C NMR 谱, 另外为密集的 ^{13}C 胆固醇共振高分辨率研究, 使用 65,536 点数据, 清零到 131,072 点。通过 DEPT 方法使用 30° , 90° 和 150° 在 ^1H 频率阅读脉冲获得的谱的组合编辑 1D ^{13}C NMR 谱。在其它情况下, 135° ^1H 读数脉冲被用于

产生具有反相 CH_2 共振，连同正相 CH 和 CH_3 共振的 ^{13}C NMR 谱。用核奥弗豪泽效应使用 gated 照射在 ^1H 频率在 3.42 s 松弛延迟中获得 ^1H 偶连的 ^{13}C NMR 谱。

通过包含 z-梯度相干性选择的脉冲序列获得大部分 2D NMR 数据。

以 2048 x 512 点据系列收集 2D COSY ^1H NMR 谱，使用 30° 或者 45° 阅读脉冲清零到 2048 x 2048 点。傅里叶变换之前在两个维数应用无位移的正弦 bell 方格纸函数，其后以量度方式显示频率数据。使用 16384 x 256 点据获得 2D TOCSY ^1H NMR 谱，使用梯度挑选的相位灵敏的回声/反回声协议清零到 16384 x 2048 点。在两个维数应用被 $\pi/2$ rad 位移的正弦 bell 方格纸。个别残基的 1D ^1H NMR 子谱 (subspectra) 通过从 2D TOCSY 谱提取 F2 切面而得到。对一些 ^1H NMR 谱，赋值还通过数字的选择性的同核的 ^1H 去耦确认。

2D HSQC 和 HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR 谱以 2048 x 512 点据被记录，清零到 2048 x 2048 点，对 HSQC 使用梯度选择的，灵敏度增强的，相敏的回声/反回声方式，对 HMBC 使用梯度选择的，低通滤波器远程的非去耦脉冲序列，数据以量度方式展示。用 83 ms 进化延迟获得 2D HMBC NMR 谱，即为 $^2J_{\text{CH}}$ 6.0 Hz 而优化。使用在两个维数位移的 $\pi/2$ rad 正弦 bell 方格纸函数获得最佳灵敏度。根据需要通过平均排减法在 Bruker AURELIA 程序 (版本 2.8.12) 中除去 2D 谱 t1 维数的脊。在 202 MHz 处的 ^{31}P NMR 测量表明在调查的样品中没有磷。

实施例 2

BBGL-II 和 BBGL-III 的分离

通过 Bligh 和 Dyer 提取法由 2.17 g 干细胞获得伯氏疏螺旋体(B31 株)的糖脂。它们通过硅胶吸附柱(20 X 3 cm)和用氯仿和甲醇的混合物以增加的极性逐步洗脱纯化到均一。来自 0.7 g 总脂质的 BBGL-II 的

产量为 163 mg (23.2%)，BBGL-III 的产量为 87 mg(12.4%)，因此 BBGL-II 和 BBGL-III 是 *B.burgdorferi* 中主要的脂类。从临床分离株 BL303 和 N40 获得类似的产量，其脂类储量类似 B31 株(图 1)。因为来自 B31 株的生物量高很多，全部后续实验用此菌株进行。

实施例 3

亲和层析

BBGL-II 结合到 Detoxi 凝胶内毒素除去凝胶(Pierce)。该树脂由琼脂糖上固相化的多粘菌素 B 组成，用于通过结合 LPS 的脂类 A 部分而去除内毒素。当超声处理后的细胞 *B.burgdorferi* 被上样到该柱时，通过 TLC 以及免疫标记显示共轭物质中用 1%脱氧胆酸从柱上洗脱的 BBGL-II 的存在(图 1)。共轭物质中没有检测到 BBGL-III 的存在。

实施例 4

BBGL-II 的放射性标记

在 ^{14}C 胆固醇存在的情况下培养时，总数脂类提取物中发现的 80% 的放射性归于 BBGL-II(表 1)。在对应于 BBGL-III，游离胆固醇或胆固醇酯的脂类条带中没有检测到放射性。

表 1 伯氏疏螺旋体糖脂的化学组成

组分	BBGL-II		BBGL-III	
	天然的	O-去酰化的	天然的	O-去酰化的
糖 ^a				
半乳糖	1.0	1.0	1.0	1.0
甘油	0	0	0.93	1.05
脂肪酸 ^b				
C 14:0	0.07		0.15	
C 16:0	1.15		1.00	
C 18:2(9,12)b	0.23		0.12	
C 18:1(9)b	1.0		0.65	
C 18:0	0.16		0.25	

¹⁴ C 胆固醇 ^c	79.30%	ND	0.40%	ND
----------------------------------	--------	----	-------	----

^a通过 GLC-MS 测定摩尔比

^b 双键的定位

^c总脂级分中放射标记相对量(参见实施例 1 详细描述)

实施例 5

组成分析

两个糖脂的糖分析显示半乳糖作为仅有的单糖存在。只在 BBGL-III 中检出甘油。甲醇醇解鉴定两个主要的酯结合的脂肪酸的存在：C16:0 和 C18:1 和几个次要的脂肪酸：C14:0, C18:0 C18:2 (表 1)。双键分别定位在 C18:1 和 C18:2 的位置 $\Delta 9$ 和 $\Delta 9,12$ ，表明这些脂肪酸为油酸和亚油酸。

半乳糖氧化酶分析表示半乳糖部分处于 D 构象。BBGL-III 甘油部分 C-2 位置碳的绝对构型，与 C-3 位置糖残基和 C-1 和 C-2 位置脂肪酸的绝对构型被确定为 L。这与碳被立体特异的编号的 sn 结构相符合。

实施例 6

甲基化分析

天然的 BBGL-II 甲基化分析显示 1,5 二-O-乙酰-2,3,4,6-四-O-甲基半乳糖醇和 1,5,6-三-O-乙酰基 2,3, 4-四甲基半乳糖醇摩尔比为 1.0 到 0.9，鉴别末端和 6-取代的半乳糖残基。在前样品的去-O-酰化作用产生缺失 6-取代的半乳糖和末端半乳糖是仅有的检出成分。这表明在根据(23)进行甲基化期间未完全地除去的脂肪酸链，位于半乳糖的 C6 位置。BBGL-III 的甲基化分析检出表明末端半乳糖存在的 1,5-二-O-乙酰-2,3,4,6-四-O-甲基-半乳糖醇。

实施例 7

质谱分析

以阳离子方式记录的 BBGL-II 的 MALDI-TOF 谱检出两个 810.1 和 836.1 大小的分子。分子量之间的差异($\Delta m/z = 26$)表明脂类成分的变异性,表示胆固醇基半乳糖的钠加合物被棕榈酸或者油酸脂肪酸取代(图 2)。这与通过 GLC-MS 获得的结果一致,显示脂肪酸作为主要的部分。天然的 BBGL-II FAB-MS 分析检出分子质量 809.7 和 835.7,而泛酰化的 BBGL-II 分析检出分子量 935.7 和 961.7。 $\Delta m/z = 126$ 分子量的增加表示三个乙酰基的掺入,证实 BBGL-II 存在三个游离羟基。为证实 BBGL-II 的成分,记录高分辨率 FAB-MS。该化合物的铯加合物的理论的 m/z 值,包括己糖,胆固醇和油酸($C_5^1H_{86}O_7Cs$),计算为 943.5428。观察到的 m/z 重量为 943.5469。这证实 $C_5^1H_{86}O_7Cs$ 的理论成份(误差[ppm/mmu] = +4.3/+4.1)。

BBGL-III 的 MALDI-TOF 谱显示质量 780.1 和 806.1 的两个离子,其表示具有两个 16:0 脂肪酸或分别具有 16:0 和 18:1 脂肪酸的单半乳糖酰二酰基甘油的钠加合物(图 2)。

实施例 8

核磁共振光谱

通过在 500 MHz 处的一维的(1D)和二维的(2D) NMR 谱进一步研究 BBGL-II 和 BBGL-III 和它们的泛酰化派生物的结构。 1H NMR 分布(表 II)通过 2D 关联能谱法(COSY),总相关光谱(TOCSY)或选择性的自旋-去耦试验确认,而 ^{13}C NMR 赋值(表 III)通过 2D 杂环的单个量子相关(HSQC)根据已经测定的 1H NMR 赋值确定。残基内连通性和 ^{13}C 分布进一步的证据获自 2D 杂环的多重键相关(HMBC)。

表II 糖脂及相关化合物的半乳糖和甘油残基的 ^1H 化学位移 (ppm)

	BBGL-II	BBGL-II-Ac ₂	BBGL-III	BBGL-III-Ac ₂	MGDG	1,2-二棕榈酸 甘油酯 ^b	Me- α -D-Galp (G ₁ D ₂ O)	Me- β -D-Gal (G ₁ D ₂ O)
H-1'	4.327	4.945	4.943	5.124	4.232		4.844	4.323
H-2'	-1.617	5.184	-1.54	5.104	3.550		3.854	3.509
H-3'	-1.617	5.924	3.770	5.317	3.502		3.812	3.453
H-4'	3.877	5.770	4.094	5.440	3.474		3.974	3.971
H-5'	3.644	3.844	3.807	4.203	3.510		3.903	3.703
H-6'a	4.251, 4.244	4.191	3.917	4.107	3.829		3.744	3.404
H-6'b	4.200, 4.294	4.101, 4.104	-3.82	4.075	3.757		3.742	3.759
OMe							3.422	3.581
OMe		2.142, 2.041		2.134, 2.071				
		1.932		2.041, 1.943				
H-1''a			4.377	4.340	4.311	4.319		
H-1''b			4.123	4.147	4.229	4.238		
H-2''			3.253	3.198	3.279	3.043		
H-3''a			3.840	3.814	3.954	3.751, 3.738		
H-3''b			3.634	3.620	3.723	3.724, 3.710		
HO-C				5.343				

a 可商业获得的“单半乳糖基甘油二酯”,主要是1,2-O- β -D-半乳糖吡喃糖基甘油 b 1,2-O-棕榈酸甘油

表III 糖脂和相关化合物的 ^{13}C 化学位移 (ppm)

	BBGL-II MGDG 酸 酸	BBGL-II-Ac ₂ 软脂酸 油酸	Cholesterol 1,2-二棕榈酸 甘油酯 (D ₂ O中)	BBGL-III Me- α -D-Galp (D ₂ O中)	BBGL-III-Ac ₂ Me- β -D-Galp
C-1 (C1al)	37.30	37.24	37.28		
C-2	38.89	38.98	31.38		
C-3	79.46, 79.45	80.40	72.80		
C-4	29.73	29.73	42.33		
C-5	140.37	140.35	140.75		
C-6	122.12	122.18	121.71		
C-7	31.97	31.96	31.82		

C-1	31.89	31.89	31.68		
C-9	50.21	50.20	50.16		
C-10	36.75	36.74	36.51		
C-11	21.09	21.08	21.10		
C-12	28.24	28.24	28.24		
C-13	42.35	42.35	42.34		
C-14	56.79	56.78	56.79		
C-15	24.30	24.30	24.31		
C-16	39.80	39.78	39.80		
C-17	56.22	56.20	56.18		
C-18	11.07	11.87	11.87		
C-19	19.37	19.36	19.40		
C-20	35.80	35.80	35.80		
C-21	18.75	18.75	18.75		
C-22	36.22	36.21	36.21		
C-23	23.86	23.85	23.84		
C-24	39.54	39.54	39.55		
C-25	28.03	28.03	28.02		
C-26	22.57	22.57	22.57		
C-27	22.82	22.82	22.81		
C-1' (Gal)	101.43 104.20	100.31		99.32 102.27	96.62 106.69
C-2'	71.90 ^a	69.18		69.37	67.99
C-3'	71.40 ^a 73.30 ^a	71.07		72.33 70.88	73.59 67.50
C-4'	73.37 ^a 68.33, 68.32 68.98	67.17, 67.15		71.84 70.31 72.08	75.65 67.89 71.54
C-5'	72.27, 72.25 75.25	70.69		70.04 73.59	66.51 78.00
C-6'	62.46, 62.42 61.59	61.27, 61.24		63.06 64.09	61.61 63.84
OMe					
Ac (Me)		20.81, 20.69,		57.88	60.02
Ac (C=O)	20.61	170.36, 170.26,		20.65, 20.61	20.70, 20.66
C-1 ^a (C=O)	169.30 173.82 ^b	173.32 ^a 179.82	173.79, 173.43	170.17, 169.95 173.59 ^a , 173.56 ^a	173.27 ^a , 173.24 ^a
C-2 ^a	34.27 ^a	34.03 ^b		34.28	34.22 ^b
C-3 ^a	34.48, 34.34 24.94 ^b	34.00 24.86	34.33, 34.14	34.00	24.90
C-4 ^a -C-13 ^a	23.08 29.77-29.18 29.88-29.29	24.69 29.79-29.12 29.69-29.08	24.97, 24.92	24.90	29.78-29.11
C-14 ^a	31.95 32.11	31.96 31.95	31.95	31.94 ^d	31.94 ^a
C-15 ^a	22.70 ^a 22.86	22.70 ^a 22.69	22.71	22.70	22.70
C-16 ^a	14.13 14.17	14.12 14.12	14.12	14.12	14.12
C-1 ^a (C=O)	173.80 ^b	173.29 ^a 179.87		173.26 ^d	172.97 ^a
C-2 ^a	34.24 ^a	34.03 ^b 34.01		34.10	34.05 ^d
C-3 ^a	24.95 ^b	24.86 24.68		24.90	24.90
C-4 ^a -C-13 ^a	29.77-29.18	29.79-29.12 29.79-29.05		29.78-29.11	29.78-29.09
C-16 ^a	31.95	31.96 31.92		31.92 ^d	31.92 ^a
C-17 ^a	22.71 ^a	22.60 ^a 22.69		22.70	22.70
C-18 ^a	14.13	14.12 14.11		14.12	14.12
C-9 ^a -C-10 ^a	130.07, 129.70	130.03, 129.75 130.04, 129.74		130.06, 129.70	130.04, 129.71
C-8 ^a -C=C	27.25 ^a	27.24 27.24 ^d		27.24 ^d	27.24 ^a
C-11 ^a -C=C	27.21 ^a	27.24 27.17 ^a		27.20 ^d	27.20 ^a
C-1 ^a (Gro)	63.04		62.02	62.11	62.04
C-2 ^a	70.58		72.16	69.90	69.81
C-3 ^a	64.06		61.62	64.76	66.64

a-c 命名可互换

f 该基团的位移指硬脂酰取代基, 而非棕榈酰

g-s 命名可互换

表 IV 显示糖脂主要的同型和异型核的耦合常数的值。几个参考化合物或糖脂的结构组分的 NMR 数据也显示在表 II-IV 中。 ^{13}C NMR 共振的分布进一步的通过极化传递(DEPT) NMR 谱编辑实验的 1D 不失真的增强而得到支持, 其中辨别具有不同数目连接的氢原子的碳核。

表IV 糖脂衍生物及其它参考化合物的半乳糖吡喃糖和甘油残基的偶联常数 (J,Hz)

	BBGL-II	BBGL-II-Ac ₂	BBGL-III	BBGL-III-Ac ₂	MGDG	1,2-二棕榈酸 甘油酯	Me- α -D-Gal ₂	Me- β -D-Gal ₂
	CDCl_3	CDCl_3	CDCl_3	CDCl_3	$\text{CDCl}_3/\text{CD}_2\text{Cl}_2$ (4:1 v/v)	CDCl_3	D_2O	D_2O
	溶剂							
$J_{1,2}(\text{Gal})$	7.5	8.0	3.8	3.7	7.3		3.4	8.0
$J_{2,3}$	ND ^a	10.5	9.8	10.0	9.7		10.1	9.9
$J_{3,4}$	3.2 ^b	3.5	3.2	3.3	3.3		2.8	3.3
$J_{4,5}$	1.0 ^b	1.0	1.1	1.1	1.1		1.6	0.8
$J_{5,6}$	6.3	6.7	3.1	6.4	6.5		6.8	7.9
$J_{6,7}$	7.2	6.7	ND	7.0	3.4		3.3	4.4
$J_{6,8}$	11.1	11.2	11.5	11.2	11.6		11.7	11.7
$^{13}\text{C}_{1,6}$	138.7	137.4	170.5	172.4	160.2		170.2	160.6
$J_{1-2,3,4}(\text{Gal})$			11.9	11.8	12.1	11.9		
$J_{1-2,3,5}$			4.1	4.1	3.2	4.5		
$J_{1-2,3,6}$			5.9	6.1	6.7	3.7		
$J_{1-2,3,7}$			4.8	4.3	3.4	4.8		
$J_{1-2,3,8}$			6.2	3.2	6.0	3.2		
$J_{2-3,4,5}$			10.9	11.2	10.9	12.2		

a 未测量 b 在 $\text{CD}_2\text{Cl}_2/\text{CDCl}_3$ (7:3 v/v) 溶液中

实施例 9

BBGL-II

氯仿-d 溶液中的 BBGL-II 的 1D ^1H NMR 谱被不完全地分散在 500 MHz, 糖残基的 H-2' 和 H-3' 信号在 $\sim 3.62 \text{ ppm}^1$ 显著地重叠。也观察到 H-1', H-6'a, 和 H-6'b 多重峰²的重叠, 通过在 2D TOCSY 谱这些信号 1D 切面产生包含全部七个糖链质子信号(H-1'-H-6'b)的谱, 推测上作为两个由 H-1'-H-4' 和 H-5'-H-6'b 子群组成的子集。根据那些甲基- β -D-半乳糖基吡喃糖糖(表 II)的脂糖亚甲基质子去屏蔽 0.55 ppm 表明糖的 O-6' 被酰化。TOCSY 实验也证明 1:2:1 三联体的 1:2:1 三联体的 $\delta 3.553$ 不是糖质子自旋系统的一部分, 这些多重峰分配给胆固醇部分的 H-3, 特别因为它也在 1D TOCSY 切面通过 BBGL-II 的烯烃质子信号观察到。通过集成, 由于胆固醇部分单个的烯烃质子(H-6)信号与分离的糖脂中一部分不饱和脂肪酸的烯烃质子信号重合, 后者信号在 1D ^1H NMR 谱中达到 ~ 2.5 个质子。支持这个赋值的是, TOCSY 切面烯烃质子信号在该脂肪族的质子区($\delta 2.8-0.9$)由于胆固醇和不饱和脂肪酸的脂肪族质子也包含很多多重峰。

BBGL-II 的 ^{13}C NMR 谱显示 59 个主要的, 解析的共振, 其中五个是由于四价的 ^{13}C 核, 即, 未被 ^{13}C DEPT 检出的。从低场到高场(表 III), 五个四价的 ^{13}C 共振被归因于两个酯羰基共振, 和胆固醇部分的 C-5 (烯烃), C-13, 和 C-10 共振。总 ^{13}C 共振的总数量而言, 15 可以通过 DEPT 谱编辑(图 3a)鉴定为 CH, 连同 27 个 CH_2 和六个 CH_3 基团(图 3b)。五个 CH_3 共振分配给胆固醇残基(表 III), 较弱的第六个共振在 $\delta 14.13$ 到脂肪酸酯基团 ω 甲基碳的信号的组合, 其典型地可以不必彼此解析。该两个主要的在 $\sim 130 \text{ ppm}$ 的烯烃 CH 共振分配给主要的不饱和脂肪酸酯基(油酸, 18:1), 尽管在该区另外的弱的共振表明存在较小比例的其他不饱和脂肪酸酯基。在 122.12 和 79.46 ppm 的 CH 共振分别地分配给胆固醇部分的 C-6 和 C-3。在 BBGL-II 的 ^{13}C 化学位移和它的脂类成分, 胆固醇, 棕榈酸和油酸的 ^{13}C 化学位移之间获得

良好的匹配，除接近残基附着点的核之外(表 III)。氯仿-d 溶液的胆固醇的 ^{13}C 分配基于那些吡啶-d₅ 溶液的报道(24)，而保证该赋值与 DEPT 实验的结果一致。

¹胆固醇，半乳糖，棕榈酸，油酸和甘油残基被分别地标记作为未致敏(unprimed)的，和单倍，两倍，三倍，和四倍的致敏。

²质子标记为 a 和 b，a 标记指在较低场共振的质子，而 b 标记指高场质子。

剩余的五个 101.43-68.32 ppm 范围的 CH 共振分配给半乳糖的 C-1'-C-5'，其也显示出 CH₂ 信号在 61.3 ppm (表 III)。观察到半乳糖 C-4',C-5'和 C-6 信号的加倍，其可以分配到在半乳糖的 O-6'带有不同的脂肪酸酯基团(棕榈酰和油酰基)的两个糖脂的存在。观察到的胆固醇 C-3 信号的加倍较难以用这种方式解释，因为 C-3 比 C-4'，C-5'和 C-6'更远离半乳糖的 O-6'取代基。这个加倍可能是由于 C-1'-O-1'键(25)周围的旋光异构。

胆固醇基团在 BBGL-II 半乳糖(Gal)残基的 O-1'的定位通过在 2D HMBC 谱在 3.556/101.49 ppm 观测到 H-3/C-1'交叉峰来显示。同样地，酰氧基在半乳糖 C-6'的定位根据在 HMBC 谱分别在 4.351/173.86 ppm 和 4.297/173.86 ppm 观察到 H-6'a/C=O 和 H-6'b/C=O 交叉峰而推定。BBGL-II ¹H NMR 谱的胆固醇 H-3 多重峰的分析产生常数 $J_{2\text{eq},3} = J_{4\text{eq},3} = 4.7 \text{ Hz}$ ，和 $J_{2\text{ax},3} = J_{4\text{ax},3} = 11.4 \text{ Hz}$ 的偶连。这些值限定 H-3 的方向为轴向，因此附着于 C-3 的氧原子(O-1')是平展的。所以，C-3 具有在胆固醇发现的通常的立体化学结构。BBGL-II 的 NMR 数据与两个结构的混合物一致，就是，3--(6-O-棕榈酰-β-D-半乳糖吡喃糖基)胆固醇，和 3-O-(6-O-油酰基-β-D-半乳糖吡喃糖基)胆固醇。糖环大小的分配基于 BBGL-II 糖环与甲基-β-D-半乳糖吡喃糖(表 IV)的偶连常数的相似性。BBGL-II 的异头构象在下面讨论。

实施例 10

糖脂 BBGL-II-Ac₃

证明 BBGL-II 中存在半乳糖的有说服力的 NMR 证据通过其泛酰化获得, 其产生三乙酰衍生物, 其 ¹H NMR 谱比 BBGL-II 的 ¹H NMR 谱分散和解析得更好。该谱显示半乳糖结构特征性的窄的 H-4' 四重峰 ($J_{3',4'} 3.5 \text{ Hz}$, $J_{4',5'} 1.0 \text{ Hz}$), 和预计 H-2' 和 H-3' 宽的四重峰。这些全部三个信号根据它们在非乙酰化的 BBGL-II 的位置 (表 II) 显著地去屏蔽 (+1.41-1.57 ppm), 表明在 HO-2', HO-3', 和 HO-4' 发生乙酰化。三个乙酰基位置的确认通过观察 H-2', H-3', H-4' 和三个不同的 ¹³C=O 基团之间的 2D HMBC 交叉峰而获得 (图 4)。该谱也显示 Gal 的 C-1' 和胆固醇的 H-3 和 Gal 的 H-6'a/H-6'b 和脂肪酸酯 C=O 之间的交叉峰, 从而证实胆固醇基定位在 Gal 的 O-1', 和脂肪酰氧基定位在 C-6'。 ¹H 信号赋值通过 2D COSY 确认 (参见图 5)。

分别观察到 BBGL-II 和 BBGL-II-Ac₃ 的 $J_{1,2'}$ 7.5 Hz 和 8.0 Hz 的大值 (表 IV), 表明 H-1' 和 H-2' 在这些糖脂中具有反式方向并且, 因此它们具有 β 异头结构。这分别通过测量 BBGL II 和 BBGL-II-Ac₃ 的 $J_{C-1',H-1'}$ 158.7 Hz 和 157.4 Hz 值而确认 (表 IV), 其落在 β 异头结构 (26) 合适的范围内, 通过观察到甲基- β -D-半乳糖吡喃糖 (Me- β -D-Galp, 表 IV) 的 $J_{C-1',H-1'}$ 160.6 Hz 的值而举例说明。

BBGL-II 和 BBGL-II-Ac₃ 糖环大小的赋值基于糖环常数偶连到甲基- β -D-半乳糖吡喃糖 (表 IV) 的那些常数的相似性进行。一个方面 BBGL-II 和 BBGL-II-Ac₃ 和甲基 β -D-半乳糖吡喃糖苷的 $J_{5',6'a}$ 和 $J_{5',6'b}$ 值的差异可以导致由于糖脂 O-6' 出现大的取代基而产生的 C-5'-C-6' 键的不同旋转分布。BBGL-II-Ac₃ 的 NMR 数据与其作为混合物的特征相符合, 所述混合物是 3-O-(2,3, 4-三-O-乙酰基-6-O-棕榈酰基- β -D-半乳糖吡喃糖基) 胆固醇, 和 3-O-(2,3,4-三-O-乙酰基-6-O-油酰基- β -D-半乳糖吡喃糖基) 胆固醇的混合物。

实施例 11

BBGL-III

氯仿-d 溶液的 BBGL-III 的 ^1H NMR 谱分散良好；尤其是，甘油质子在 500 MHz 完全分散，并且 2D COSY 谱和 2D TOCSY 谱(图 6) 含有代表(从低场到高场)甘油质子 H-2''', H-1''',a, H-1''',b, H-3''',a, 和 H-3''',b 的五个多重峰系列。这些 2D 谱具有相似的外观，因为 H-2''' 旋转偶连到甘油碳链上所有其他质子，从而在与 TOCSY 谱相似的 COSY 谱产生一系列交叉峰。后一谱(图 5)还显示半乳糖构型特征性的 H-1'-H-4'多重峰系列，H-4'到 H-5', H-6'a, 和 H-6'b 的磁化转移，通常被 $J_{4',5'}$ 小幅度抑制(参见表 IV)。结果，Gal 残基的 H-4'多重峰特征性是窄的 ($J_{3',4'}$ 3.2 Hz, $J_{4',5'}$ 1.1 Hz)。2D TOCSY 谱的七重峰系列代表烯烃质子 (δ 5.344) 和不饱和脂肪酸(18:1)的脂肪族质子之间磁化的相互交换。

BBGL-III 的 DEPT-135 ^{13}C NMR 谱在糖区域显示六个 CH 共振和三个 CH_2 信号，与存在一个甘油残基和一个醛糖残基相符合，以及在分配到脂肪酸的脂肪碳链碳区域 25 个不完全解析的 CH_2 信号和一个 CH_3 共振。在 δ_c 130.06 和 129.70 的两个强烈的共振显示存在一个主要的不饱和脂肪酸残基。然而，在烯烃碳区域观察到两个弱的信号对显示较少比例的其他不饱和脂肪酸的存在。在 $\text{C}=\text{O}$ 区域观察到三个强烈的 ^{13}C 共振(表 III)，和一个弱的共振。BBGL-III 甘油基残基的 H-1''',a, H-1''',b, 和 H-2''' 质子的基本去屏蔽 (分别 +0.724, +0.567, 和 +1.470 ppm)，参考母甘油对应的质子 (δ_H 在 D_2O 中, 3.653, H-1''',a ; 3.561, H-1''',b; 3.783, H-2''') 指出甘油基残基 O-1''' 和 O-2''' 的乙酰化(表 II)。通过观察 BBGL-III 的 2D HMBC 谱中的 H-1''',a/ $\text{C}=\text{O}$, H-1''',b/ $\text{C}=\text{O}$, 和 H-2'''/ $\text{C}=\text{O}$ 交叉峰确认乙酰基团的位置。该谱还显示 H-3''',b/ $\text{C}-1'$ 交叉峰，其将半乳糖基残基定位于甘油部分的 O-3'''。

实施例 12

BBGL-III-Ac₄

BBGL-III 泛酰化产生的产物其 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱分别显示四个强烈的乙酰甲基质子信号, 和四个乙酰甲基碳和羰基碳信号, 表明形成了四-O-乙酰衍生物。Gal H-2', H-3', 和 H-4'的基本去屏蔽 (+1.266 到+1.547 ppm), 和 H-6'a 和 H-6'b 更限制性的去屏蔽 (+0.180 到+0.255 ppm, 表 II)指示 Gal 残基 O-2', O-3', O-4', 和 O-6'的乙酰化。这通过在 BBGL-III-Ac₄的 2D HMBC 谱(图 6)检测 H-2'/C=O, H-3'/C=O, H-4'/C=O, H-6'a/C=O, 和 H-6'b/C=O 交叉峰而证实, 这种情况下, 乙酰和脂肪酸酯基团的羰基碳信号很容易通过它们分别在 170 ppm 和 173 ppm 区域的 ^{13}C 化学位移而区分(表 III)。在 173 ppm 区域, BBGL-III-Ac₄的 2D HMBC 谱还显示具有脂肪酸酯羰基碳的 H-1'''a, H-1'''b, 和 H-2'''的交叉峰, 连同 H-3'''a/C-1' 交叉峰, 证明了在甘油单元中 Gal 残基分配在 O-3'''的位置。

BBGL-III 和 BBGL-III-Ac₄(参见表 IV)的小值分别为 $J_{1,2}$, 3.8 Hz 和 3.7 Hz, 显示 H-1' 和 H-2'在衍生物中的左方向, 这表明它们的 Gal 残基具有异头构型。这通过 BBGL-III 和 BBGL-III-Ac₄(表 IV)的大值 $J_{\text{C-1}', \text{H-1}'}$, 170.5 Hz 和 172.4 Hz 分别得到证实, 所述值落在异头体(26)预期的范围内, 其在甲基 α -D-半乳糖吡喃糖苷(Me- α -D-Galp, 表 IV)中观察到。

BBGL-III 的 NMR 数据与 3-O- α -D-半乳糖吡喃糖基-1(2)-O-油酰基-2 (1)-O-棕榈酰基-甘油的结构一致, 并且 BBGL-III-Ac₄的数据支持了 3-O-(2, 3,4, 6-四-O-乙酰基- α -D-半乳糖吡喃糖基)-1(2)-O-油酰基-2 (1)-O-棕榈酰基-甘油的结构。此外, 糖环大小的赋值基于糖环偶连常数与甲基 α -D-半乳糖吡喃糖苷偶连常数的相似性(表 IV)。

实施例 13

单半乳糖甘油二酯

本发明人认识到商业获得的单半乳糖甘油二酯 (MGDG)是 BBGL-III 结构非常相似的类似物, 该产物因此被研究用作参考化合

物，并完善此处描述的分析技术。MGDG 的 ^1H NMR 谱在 500 MHz 分散非常好，并且容易识别来自 Gal 残基的七个旋转多重峰的方向，包括半乳糖构型特征性的窄的 H-4' 四重峰 ($J_{3,4}$ 3.3 Hz, $J_{4,5}$ 1.1 Hz)。此外，环质子偶连常数(表 IV)显示半乳糖残基以吡喃糖基环存在，和此前论述的糖脂衍生物相对应。没有观察到 MGDG 的烯烃质子信号。

MGDG 的 2D COSY 和 TOCSY ^1H NMR 谱包含在 C-1''' 和 C-2''' 带有酰氧基的甘油残基特征性的相同高度分散的五个多重峰系列，是被 H-1''''a, H-1''''b, 和 H-2'''' 的低场位移支持的替代的模式(表 II)。DEPT-135 ^{13}C NMR 谱显示在糖区域(Gal + Gro)六个主要的 CH 共振和三个主要的 CH_2 信号，连同在代表两个脂肪酸酯残基的脂肪族区域 14 个解析的 CH_2 信号和一个 CH_3 共振，这通过在通常的 ^{13}C NMR 谱 δ_c 174.31 和 174.01 检测两个 C=O 信号而证实。酰氧基基团在 C-1''' 和 C-2''' 的定位通过在 MGDG 的 2D HMBC 谱观察 H-1''''a/C-O, H-1''''b/C=O, 和 H-2''''/C=O 交叉峰而证实。该谱还显示 H-3''''a/C-1' 和 H-3''''b/C-1' 交叉峰，其证实 Gal 残基的 C-1' 连接到甘油部分的 O-3''''。MGDG, BBGL-III, 和 BBGL-III-Ac₄ 的所有三个甘油基碳获得 ^{13}C 化学位移之间良好的匹配(参见表 III)，但对于 1,2-二棕榈精，C-3'''' 位移基本是对应的其他化合物的位移的高场，这是由于在甘油二酯中缺乏甘油基取代基的去屏蔽。

大值 $J_{1',2'}$ 7.3 Hz 和小值 $J_{c-1',H-1'}$, 160.2 Hz (表 IV) 证明 MGDG 具有 β 异头构型，即，与糖脂 BBGL-III 相反的构型。MGDG 的 NMR 和 GC-MS 数据一起表明其主要由 1,2-二-O-硬脂酰-3-O- β -D-半乳糖吡喃糖基甘油组成，尽管 NMR 和 GC-MS 谱中弱的峰指示少量其他组分的存在。MGDG 和 BBGL-III 非对映异构关系和 MGDG 缺少不饱和脂肪酸残基不足以导致这两个糖脂具有不同的溶解性。与其他所研究的脂质不同的是，MGDG 在 CDCl_3 中的溶解需要添加大约 20% 的 CD_3OD 。

因此, BBGL-II 和 BBGL-III 分离自伯氏疏螺旋体 B31, N40 和 BL303 (15)株, 由硅胶柱层析纯化到几乎均一。使用不同的分析方法 (GLC, MALDI-TOF, FAB,和 NMR 谱法), 伯氏疏螺旋体主要的极性膜糖脂的结构被鉴定为胆固醇 6-O-酰基- β -D-半乳糖吡喃糖苷 (BBGL-II, 图 8), 和 1, 2-二酰基-3-[O- α -D-半乳糖吡喃糖基]-sn-甘油(BBGL-III, 图 9)。

BBGL-III 显示与 BOLIP-7 的高度结构同源性, BOLIP-7 是以前描述的单半乳糖基二酰基甘油。然而, 获得的结果清楚地显示 BBGL-II 的末端半乳糖部分实际上连接到胆固醇, 而不像 BBGL-III 中半乳糖连接到甘油。

BBGL-II 中胆固醇部分进一步的证据通过用 ^{14}C 胆固醇培养细胞后而代谢标记该糖脂而获得。在这些实验中, 总脂级分中 80% 的放射性来自于 BBGL-11。在这些实验中, 没有观察到显著量的游离胆固醇, 显示膜脂库中缺少游离胆固醇, 以及其快速掺入到 BBGL-11 中。游离胆固醇, 或胆固醇酯被显示掺入到许多种类细菌的膜中, 包括支原体, 幽门螺旋菌(*Helicobacter pylori*), *Micrococcus lysodeilcticus*, 巨大芽胞杆菌(*Bacillus megaterium*), 和奇异变形菌(*Proteus mirabilis*)。然而, 从头合成的胆固醇基葡萄糖苷显示只在支原体、幽门螺旋菌、和 *B. hermsi* 中发现, 上述所有微生物的碳水化合物为葡萄糖, 在所述胆固醇基葡萄糖苷中来自生长培养基的胆固醇被掺入从而与糖和/或脂部分连接。以前的研究表明胆固醇是高度免疫原性的分子。因此, 伯氏疏螺旋体膜中含胆固醇的 BBGL-III 大量存在能导致在莱姆症发病期间抗胆固醇抗体滴度的升高。

聚阳离子环状肽多粘菌素 B, 被用作去除内毒素, 主要为 LPS 和脂 A 的亲合吸附剂。当超声过的伯氏疏螺旋体细胞被上样到含固化的多粘菌素 B 的柱上, 可以在用脱氧胆酸洗脱结合的物质后显示 BBGL-II 的存在。有意思的是在相同条件下, BBGL-III 不结合到柱。

内毒素结合到多粘菌素 B 的动力是这两种结构之间的疏水相互作用。可以假设 BBGL-II 的一些结构元素显示与脂 A 相似的特征。

BBGL-II 对脂 A 的分子模拟还通过在使用含 BBGL-II 的各种伯氏疏螺旋体制剂刺激细胞培养物后激发前炎性介质例如白介素-1, IL-6、TNF- α , 和 PGE₂ 而证实。不限于理论, 因此有可能 BBGL-II 在伯氏疏螺旋体中用作“功能 LPS”。

实施例 14

免疫学结果

在用不同的通式 B 的化合物(BBGL-11)的制剂注射的小鼠和兔中诱导了特异性的抗体 (参见图 10 和 11)。BBGL-III 诱导的抗体, 主要是 IgM, 其与两种糖脂都反应(数据未显示)。PBS 中的 BBGL-II (可能是微胶粒)比其作为 DMSO 或角鲨烯中的溶解物更有免疫原性。用弗氏佐剂获得最高的梯度。

令人惊奇的是, 尽管尺寸不大, BBGL-II 在小鼠和兔体内引发抗体, 多数是 IgM 同种型。这些抗体对同源的糖脂是特异性的。作为对比, BBG-III 引发与两个糖脂都反应的抗体。

实施例 15

BBGL-II 类似物("叠氨基 BBGL-II") 的合成

目标化合物 ("叠氨基 BBGL-II", 化合物 19, 参见图 15)与天然糖脂 BBGL-II 的区别在于其在棕榈酰基团末端含有取代质子的叠氨基。19 的合成通过主要的中间产物半乳糖基溴 4, 胆固醇 5 和共-叠氨基棕榈酸 16 获得。

化合物 4 (参见图 12)从用特戊酰氯的吡啶溶液处理过的半乳糖 1 制备得到。并非预期的五特戊酰衍生物, 部分特戊酰化的化合物 2 以高得率和高纯度无需层析纯化而获得。化合物 2 的游离羟基被乙酰基

团(3)保护。随后用溴化氢的乙酸溶液处理以提供半乳糖基溴4。溴化物4与胆固醇5在银三氟甲烷磺酸盐的二氯甲烷溶液的促进下偶连以立体选择的方式提供所需的 β -半乳糖基-胆固醇6(参见图13)。1-H NMR谱显示 β -异头构型。O-保护基团随后通过用甲醇钠的无水二氯甲烷和甲醇的混合溶液处理以提供非结晶固体形式的胆固醇基 β -D-半乳糖吡喃糖苷。

尝试大量的保护基团组合以在四醇7的HO-6位置引入特戊酰部分。根据经验,使用酰基类保护基团,包括乙酰基,果聚糖酰、氯乙酰基团被证明多数是不成功的,因为这些基团在半乳糖部分中的移动不可控制。最终,这个问题通过使用丙烯基、异亚丙基和甲硅烷基保护基团的组合而得到克服。因此,7中伯醇羟基被叔-丁基-二苯基甲硅烷基保护以提供化合物8而不影响其他的羟基。其次,三元醇8用二甲氧基丙烷在存在樟脑磺酸的情况下处理以向HO-3和HO-4引入异亚丙基从而提供化合物9。随后,中间产物9用烯丙基溴/NaH的二甲基甲酰胺溶液处理以提供完全保护的衍生物10,从10中选择性除去甲硅烷基保护基团而不影响该分子的其他部分以提供化合物11。该衍生物的特征是游离HO-6羟基,其是棕榈酰部分连接点。

16-叠氮基棕榈酸中间产物16的合成显示于图14。因此,商业可获得的16-羟基棕榈酸12用叠氮甲烷处理以定量的产量提供甲基酯13。然后,醇13用p-甲苯磺酰氯的吡啶溶液处理以提供磺酸盐14,其随后用叠氮钠的二甲基甲酰胺处理以提供叠氮基酯15。然后,甲基酯用氢氧化钾的二噁烷和水的混合溶液除去以提供酸16。

胆固醇基棕榈酰半乳糖吡喃糖苷19通过在存在二环己基碳二亚胺的乙酸乙酯溶液的情况下以定量的产量(17)浓缩化合物11与叠氮棕榈酸16(参见图15)。随后,以两个步骤除去保护基团。首先化合物17用乙酸/水处理以除去异亚丙基基团从而提供二醇18。然后用铱复合物 $(\text{MePh}_2)_2(\text{C}_8\text{H}_{12})\text{IrPF}_6$ 的四氢呋喃溶液处理,并使用钨四氧化

物和三甲胺 N 氧化物的组合氧化除去得到的丙烯基基团，以提供非结晶固体形式的叠氮化物 19。

ELISA 和 TLC 薄层分析表明针对合成的化合物 19 的抗体产生的程度与针对纯化的天然 BBGL-II 产生的程度一样。

明显的是所述方法或组合物精确的细节可能是变化或修饰的只要不离开本发明的精神。我们主张所有这些修改和变化落在以下权利要求书的范围和精神中。

参考文献

1. Orloski, K. A., Hayes, E. B., Campbell, G. L., and Dennis, D. T. (2000) *MMWR CDC Surveill Summ.* 49, 1-11
2. Steere, A. C. (2001) *N.Engl.J.Med.* 345, 115-125
3. Sadziene, A. and Barbour, A. G. (1996) *Infection* 24, 195-202
4. Rahn, D. W. (2001) *Infect.Dis.Clin.North Am.* 15, 171-187
5. Lathrop, S. L., Ball, R., Haber, P., Mootrey, G. T., Braun, M. M., Shadomy, S. V., Ellenberg, S. S., Chen, R. T., and Hayes, E. B. (2002) *Vaccine* 20, 1603-1608
6. Vinh, T. U., Shi, M. H., Adler, B., and Faine, S. (1989) *J.Gen.Microbiol.* 135 (Pt 10), 2663-2673
7. Halter, M. R. and Joens, L. A. (1988) *Infect.Immun.* 56, 3152-3156
8. Takayama, K., Rothenberg, R. J., and Barbour, A. G. (1987) *Infect.Immun.* 55, 2311-2313
9. Cinco, M., Banfi, E., Balanzin, D., Godeas, C., and Panfili, E. (1991) *FEMS Microbiol.Immunol.* 3, 33-38
10. Eiffert, H., Lotter, H., Jarecki-Khan, K., and Thomssen, R. (1991) *Med.Microbiol.Immunol.(Berl)* 180, 229-237
11. Wheeler, C. M., Garcia Monco, J. C., Benach, J. L., Golightly, M. G., Habicht, G. S., and Steere, A. C. (1993) *J.Infect.Dis.* 167, 665-674
12. Radolf, J. D., Goldberg, M. S., Bourell, K., Baker, S. I., Jones, J. D., and Norgard, M. V. (1995) *Infect.Immun.* 63, 2154-2163
13. Hossain, H., Wellensiek, H. J., Geyer, R., and Lochnit, G. (2001) *Biochimie* 83, 683-692
14. Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1969) *Can.J.Biochem.Physiol.* 37, 911-917
15. Ben Menachem, G., Wagner, F., Zahringer, U., Rietschel, E. T., and Rottem, S. (1997) *FEMS Microbiol.Lett.* 154, 363-369
16. Sawardeker, J. S., Sloneker, J. H., and Jeanes, A. (1965) *Biochem.J.* 37, 1602-1604
17. Fay, L. and Richli, U. (1991) *J.Chromatography* 541, 89-98

18. Rasley, A., Anguita, J., and Marriott, I. (2002) *J.Neuroimmunol.* **130**, 22-31
19. Roth, h., Segal, S., and Bertoli, D. (1965) *Anal.Biochem.* **10**, 32-52
20. Pasciak, M., Ekiel, I., Grzegorzewicz, A., Mordarska, H., and Gamian, A. (2002) *Biochim.Biophys.Acta* **1594**, 199-205
21. Dell, A. (1987) *Adv.Carbohydr.Chem.Biochem.* **45**, 19-72
22. Zahringer, U., Wagner, F., Rietschel, E. T., Ben Menachem, G., Deutsch, J., and Rottem, S. (1997) *J.Biol.Chem.* **272**, 26262-26270
23. Ciucanu, I. and Kerek, F. (1984) *Carbohydr.Res* **131**, 209-217
24. Reich, H. J., Jautelat, M., Messe, M. T., Weigert, F. J., and Roberts, J. D. (1969) *Journal of the American chemical society* **91**, 7445-7453
25. Hirai, Y., Haque, M., Yoshida, T., Yokota, K., Yasuda, T., and Oguma, K. (1995) *J.Bacteriol.* **177**, 5327-5333
26. Bock, K. and Pedersen, C. (1975) *Acta Chemica Scandinavica B* **29**, 258-264
27. Honarvar, N., Schaible, U. E., Galanos, C., Wallich, R., and Simon, M. M. (1994) *Immunology* **82**, 389-396
28. Beck, G., Benach, J. L., and Habicht, G. S. (1990) *Biochem.Biophys.Res Commun.* **167**, 89-95
29. Beck, G., Habicht, G. S., Benach, J. L., and Coleman, J. L. (1985) *J.Infect.Dis.* **152**, 108-117
30. Habicht, G. S., Beck, G., Benach, J. L., and Coleman, J. L. (1986) *Zentralbl.Bakteriol.Mikrobiol.Hyg.[A]* **263**, 137-141
31. Rottem, S. (2002) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **292**, 1289-1292
32. Razin, S. (1975) *J.Bacteriol.* **124**, 570-572
33. Mayberry, W. R. and Smith, P. F. (1983) *Biochim.Biophys.Acta* **752**, 434-443
34. Livermore, B. P., Bey, R. F., and Johnson, R. C. (1978) *Infect.Immun.* **20**, 215-220
35. Alving, C. R. and Swartz, G. M., Jr. (1991) *Crit Rev.Immunol.* **10**, 441-453
36. Anspach, F. B. (2001) *J.Biochem.Biophys.Methods* **49**, 665-681
37. Srimal, S., Surolia, N., Balasubramanian, S., and Surolia, A. (1996) *Biochem.J.* **315** (Pt 2), 679-686

38. Habicht, G. S., Beck, G., Benach, J. L., Coleman, J. L., and Leichtling, K. D.
(1985) *J.Immunol.* 134, 3147-3154

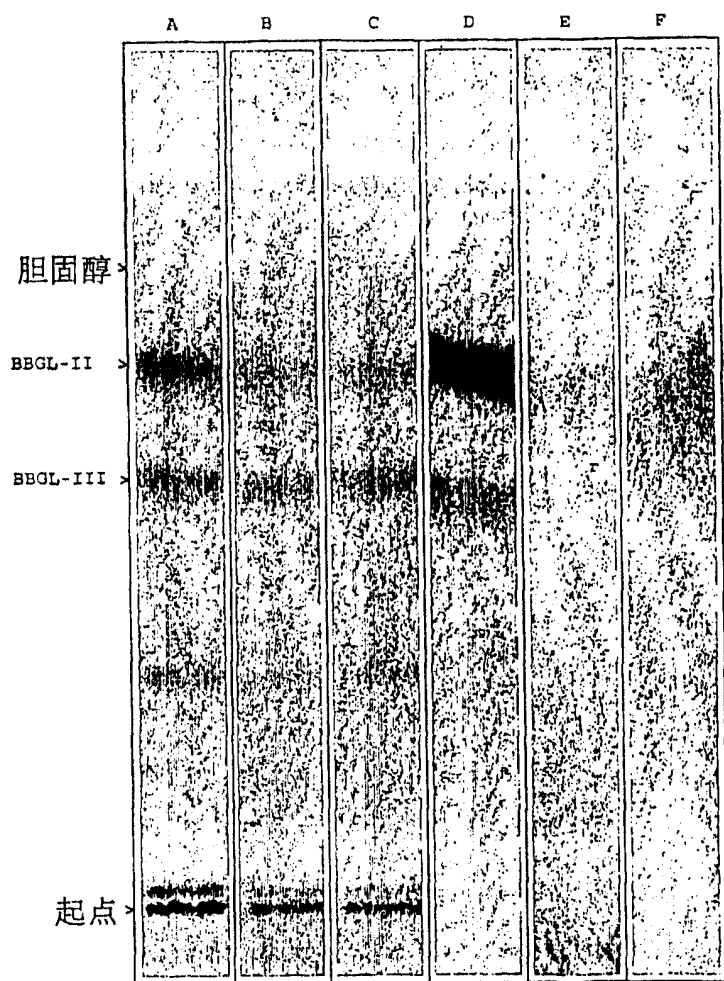


图1

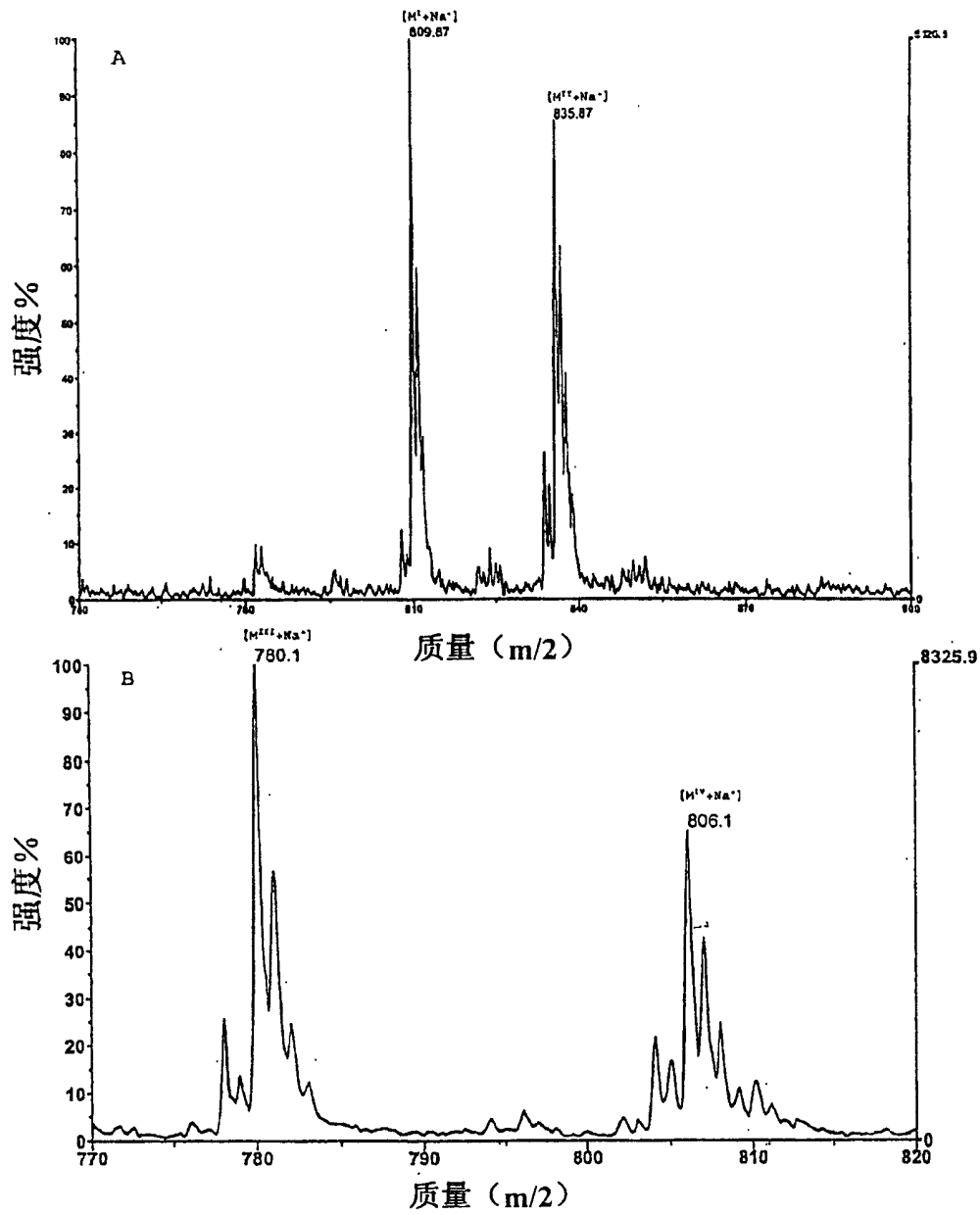


图2

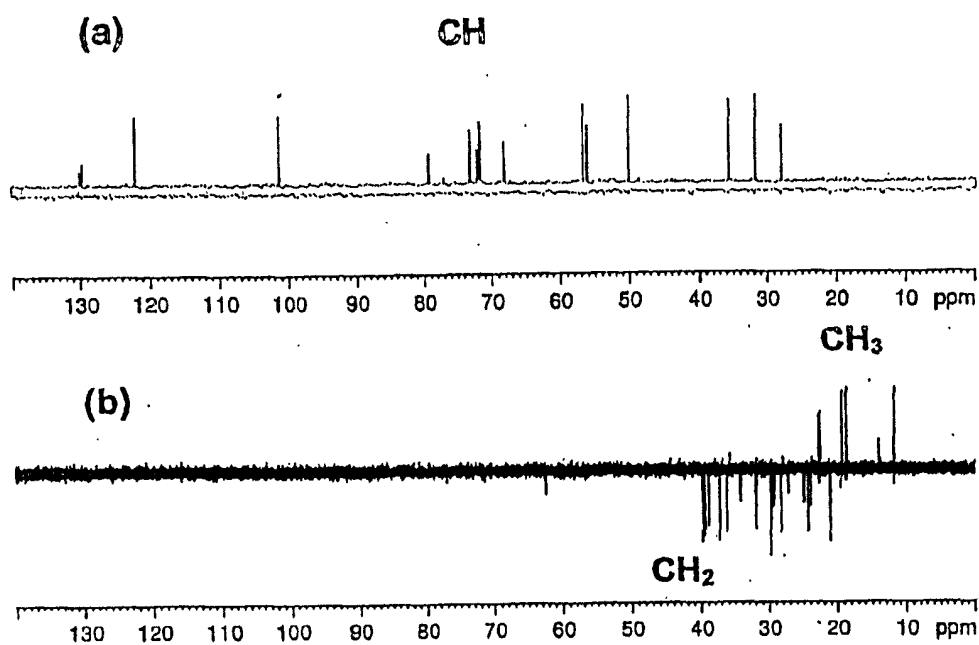


图3

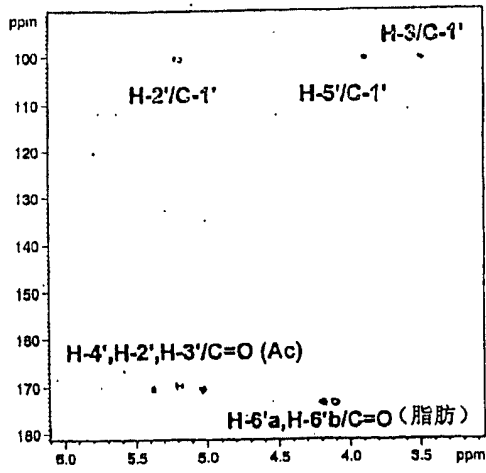


图4

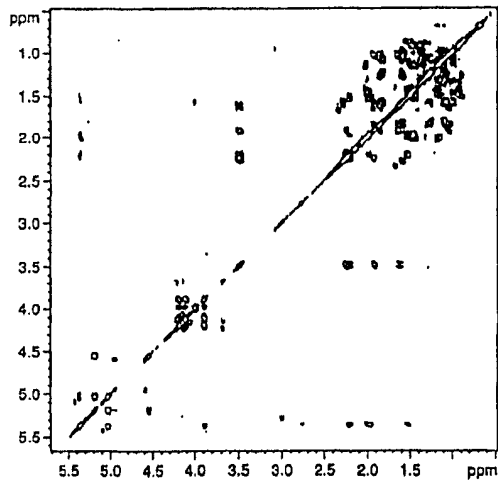


图5

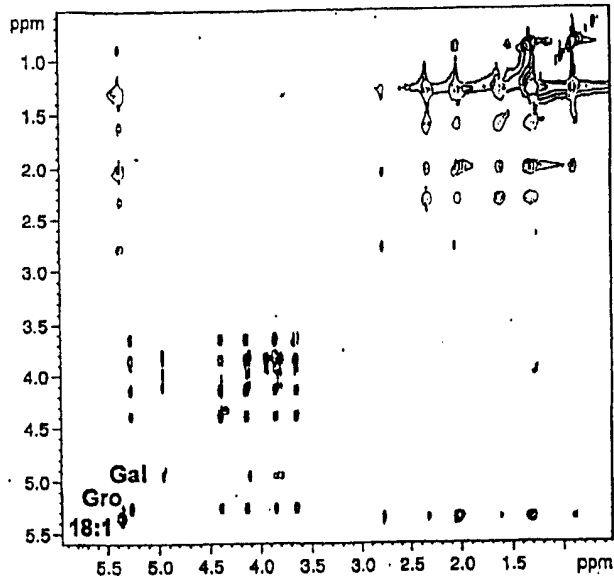


图6

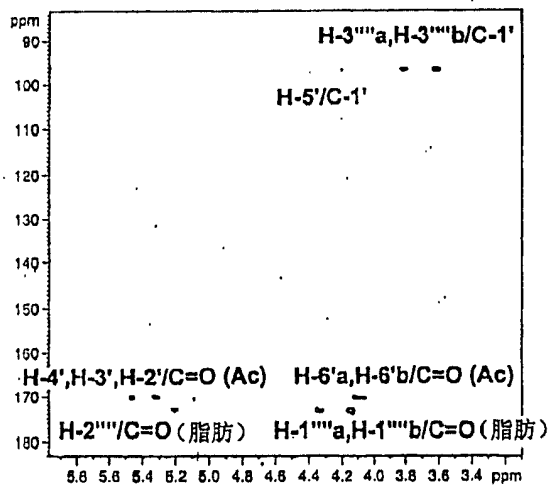


图7

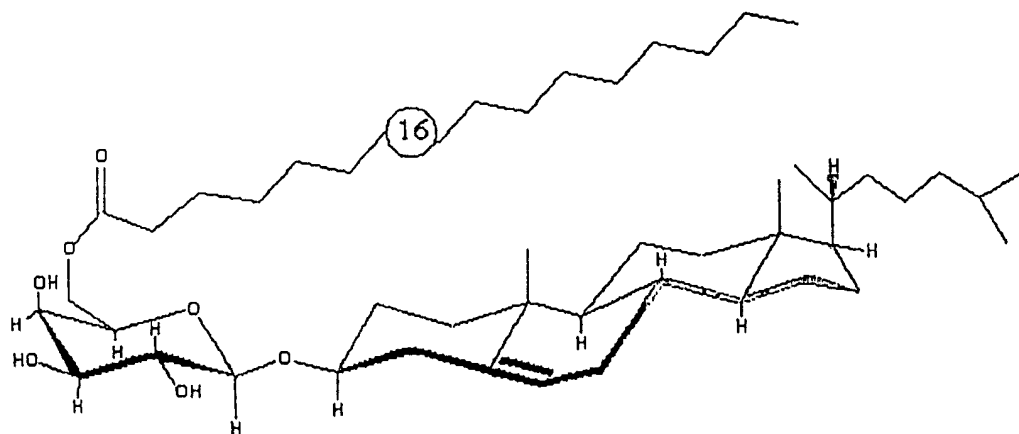


图8

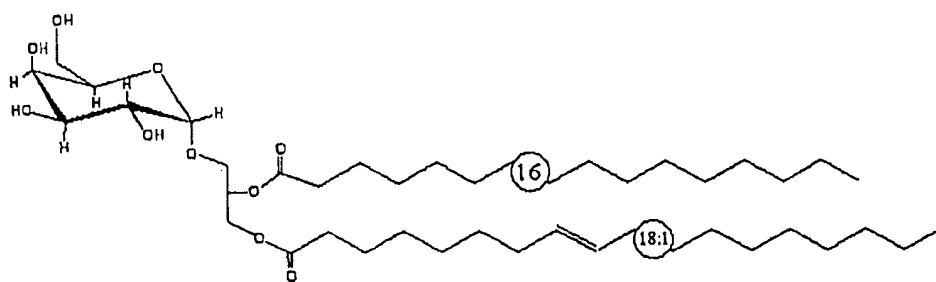


图9

图10

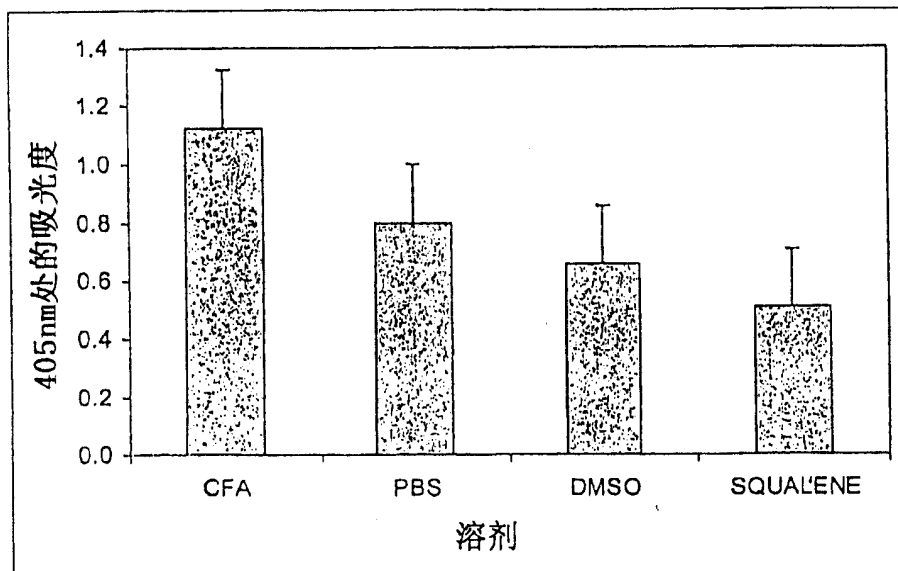
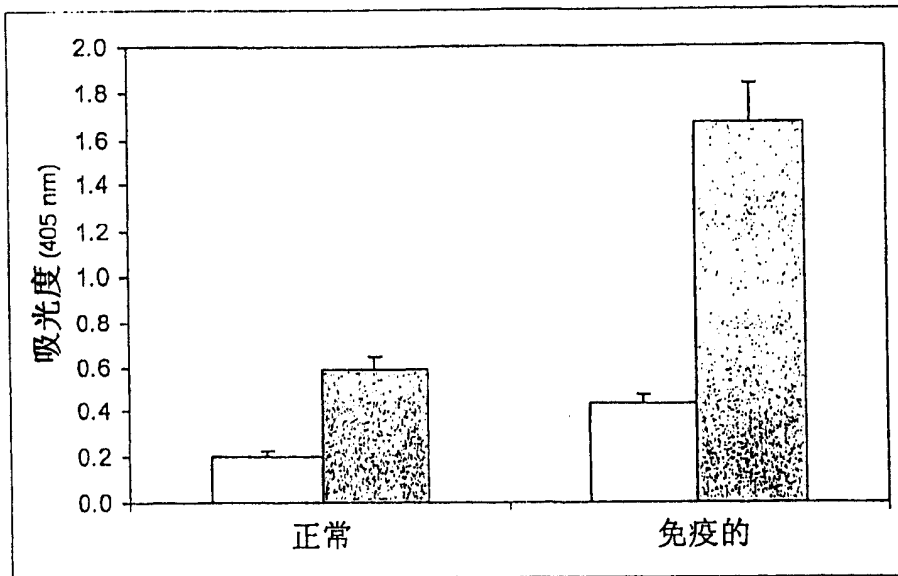


图11

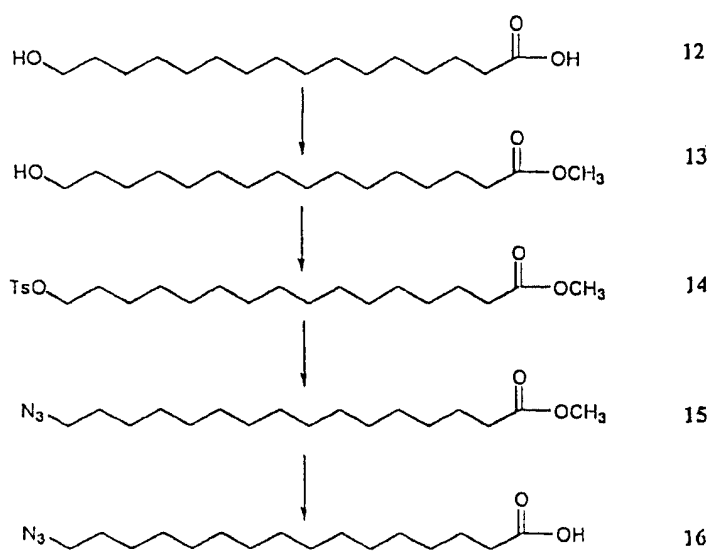


图14

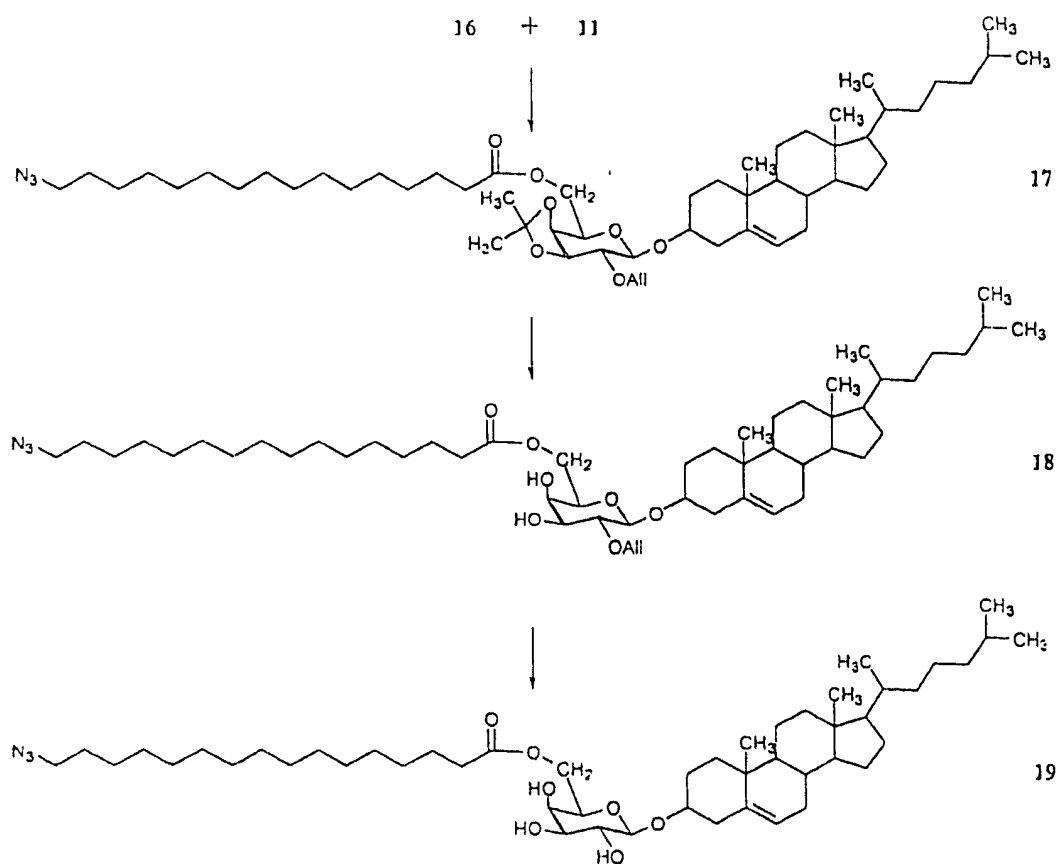


图15