

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 31/702

C07H 15/04 C07H 3/06

A61P 1/04 A61P 31/04



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02805753.8

[43] 公开日 2004 年 9 月 1 日

[11] 公开号 CN 1525862A

[22] 申请日 2002.1.18 [21] 申请号 02805753.8

[30] 优先权

[32] 2001. 1. 19 [33] FI [31] 20010118

[86] 国际申请 PCT/FI2002/000043 2002.1.18

[87] 国际公布 WO2002/056893 英 2002.7.25

[85] 进入国家阶段日期 2003.8.29

[71] 申请人 比奥蒂治疗公司

地址 芬兰图尔库

[72] 发明人 哈利那·米勒-波德拉扎

苏珊·特尼伯格

乔纳斯·安格斯特罗姆

卡尔-安德斯·卡尔森

贾里·纳图南

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 5 页 说明书 44 页 附图 14 页

[54] 发明名称 新的幽门螺杆菌受体及其用途

[57] 摘要

本发明描述了含有结合幽门螺杆菌的寡糖序列
 $[Gal(A)_q(NAc)_r/Glc(A)_q(NAc)_r \alpha 3/\beta 3]_s$
 $[Gal \beta 4GlcNAc \beta 3]_t Gal \beta 4Glc(NAc)_u$ 的物质
或受体，其中 q、r、s、t 和 u 各自分别为 0 或 1，
以及它们在用于治疗由幽门螺杆菌引起疾病的药用
和营养组合物等中的用途。本发明还涉及使用该
受体来诊断幽门螺杆菌。

ISSN 1008-4274

1、含有结合幽门螺杆菌的寡糖序列 $[Gal(A)_q(NAc)_r/Glc(A)_q(NAc)_r\alpha 3/\beta 3]_s, [Gal\beta 4GlcNAc\beta 3]_t, Gal\beta 4Glc(NAc)_u$ 的物质, 以及具有结合幽门螺杆菌活性的所述寡糖序列的类似物或衍生物在制备具有幽门螺杆菌结合或抑制活性的组合物中的用途, 其中 q 、 r 、 s 、 t 和 u 各自独立为 0 或 1, 当 $t = 0$ 和 $u = 0$ 时, 寡糖序列与多价载体连接或以高浓度的游离寡糖存在。

2. 如权利要求 1 所述的用途, 其中所述物质包含寡糖序列 $GlcNAc\beta 3Gal\beta 4GlcNAc$ 或 $GlcNAc\beta 3Gal\beta 4GlcNAc\beta 3Gal\beta 4Glc$, 其末端 $GlcNAc\beta 3$ 的 C4 位任选通过糖苷键与 $Gal\beta 1-$ 或寡糖链连接。

3. 如权利要求 1 所述的用途, 其中所述物质包含一种或几种以下的寡糖序列:

$Gal\beta 4GlcNAc$,

$GalNAc\alpha 3Gal\beta 4GlcNAc$, $GalNAc\beta 3Gal\beta 4GlcNAc$, $GlcNAc\alpha 3Gal\beta 4GlcNAc$,

$GlcNAc\beta 3Gal\beta 4GlcNAc$, $Gal\beta 3Gal\beta 4GlcNAc$, $Glc\alpha 3Gal\beta 4GlcNAc$, $Glc\beta 3Gal\beta 4GlcNAc$,

$Gal\beta 4GlcNAc\beta 3Gal\beta 4GlcNAc$, $Gal\beta 4GlcNAc\beta 3Gal\beta 4Glc$, $GalNAc\alpha 3Gal\beta 4GlcNAc\beta 3Gal\beta 4Glc$, $GalNAc\beta 3Gal\beta 4GlcNAc\beta 3Gal\beta 4Glc$,

$GlcNAc\alpha 3Gal\beta 4GlcNAc\beta 3Gal\beta 4Glc$, $GlcNAc\beta 3Gal\beta 4GlcNAc\beta 3Gal\beta 4Glc$,

$Gal\beta 3Gal\beta 4GlcNAc\beta 3Gal\beta 4Glc$, $Glc\alpha 3Gal\beta 4GlcNAc\beta 3Gal\beta 4Glc$,

$Glc\beta 3Gal\beta 4GlcNAc\beta 3Gal\beta 4Glc$,

$GalNAc\beta 3Gal\beta 4GlcNAc$, $GalNAc\alpha 3Gal\beta 4GlcNAc$, $GalA\beta 3Gal\beta 4GlcNAc$,

$GalA\alpha 3Gal\beta 4GlcNAc$, $GalNAc\beta 3Gal\beta 4Glc$, $GalNAc\alpha 3Gal\beta 4Glc$,

GalA β 3Gal β 4Glc, GalA α 3Gal β 4Glc,

GlcANAc β 3Gal β 4GlcNAc, GlcANAc α 3Gal β 4GlcNAc, GlcA β 3Gal β 4GlcNAc,

- 5 GlcA α 3Gal β 4GlcNAc, GlcANAc β 3Gal β 4Glc, GlcANAc α 3Gal β 4Glc, GlcA β 3Gal β 4Glc, GlcA α 3Gal β 4Glc,

Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc, 和它们的还原-末端多价缀合物。

- 10 4. 如权利要求 1 所述的用途, 其中所述的物质包含一种或几种下列寡糖序列:

GalNAc α 3Gal β 4Glc, GalNAc β 3Gal β 4Glc, GlcNAc α 3Gal β 4Glc, GlcNAc β 3Gal β 4Glc, Gal β 3Gal β 4Glc, Glc α 3Gal β 4Glc, Glc β 3Gal β 4Glc, 和它们的还原-末端多价缀合物。

- 15 5. 如权利要求 3 所述的用途, 其中所述物质包含一种或几种下列寡糖序列:

Gal β 4GlcNAc β 3 Gal β 4Glc (乳-N-新四糖), Gal β 4GlcNAc β 3 Gal β 4GlcNAc β 3 Gal β 4Glc (对-乳-N-新六糖), 和它们的还原-末端多价缀合物。

- 20 6. 如权利要求 1-5 所述的用途, 其中所述物质与多糖缀合, 优选与聚乳糖胺链或其缀合物连接。

7. 如权利要求 1-5 所述的用途, 其中所述物质是一种糖脂。

8. 如权利要求 1-5 所述的用途, 其中所述物质是一种含有至少两个或三个寡糖链的寡聚分子。

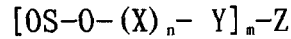
- 25 9. 如权利要求 1-5 所述的用途, 其中所述物质由含有一种或多种权利要求 1-8 所述物质的微团组成。

10. 如权利要求 1-9 中任一项所述的用途, 其中所述物质的一或多种结合于一种载体上。

- 30 11. 如权利要求 1-10 中任一项所述的用途, 其中所述物质与能有效抑制幽门螺杆菌的抗生素共价缀合, 其中优选青霉素类抗生素。

12. 如权利要求 10 中所述的用途, 其中所述寡糖序列(OS)的还原末端

Glc 或 GlcNAc 的 C1 位通过氧键 (-O-) 与低价或多价载体 (Z) 连接, 中间经由一个间隔基团 (Y) 和任选地经由一个单糖或寡糖残基 (X), 形成了以下结构



5 其中整数 m 和 n 的值为 $m \geq 1$, n 独立为 0 或 1; X 优选乳糖基、半乳糖基、聚-N-乙酰-乳糖胺基, 或 O-聚糖或 N-聚糖寡糖序列的一部分, Y 是间隔基团或末端缀合物如神经酰胺脂质部分或到 Z 的键;

或是具有结合幽门螺杆菌活性的所述结构物质的衍生物。

10 13、权利要求 1-12 所述的物质在制备治疗或预防由幽门螺杆菌存在引起的任一疾病的药用组合物中的用途。

15 14、如权利要求 13 所述的用途, 其中所述的药用组合物用于治疗慢性浅表性胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、胃腺癌、人胃部非霍奇金淋巴瘤、肝病、胰腺疾病、皮肤病、心脏病或自体免疫疾病包括自体免疫胃炎和恶性贫血以及非-类固醇抗炎症药物 (NSAID) 相关的胃病, 或用于预防婴儿猝死综合症。

15 15、如权利要求 1-12 所述的物质在诊断由幽门螺杆菌感染引起的疾病中的用途。

16、如权利要求 1-12 所述的物质在制备治疗或预防任何一种由幽门螺杆菌存在引起的疾病的营养添加剂或组合物中的用途。

20 17、如权利要求 16 所述的用途, 其中所述的营养添加剂或组合物用于婴儿食品。

18、如权利要求 1-12 所述的物质在鉴别细菌粘附素中的用途。

19、如权利要求 1-12 所述的物质或根据权利要求 18 鉴别的物质在制备抗幽门螺杆菌疫苗中的用途。

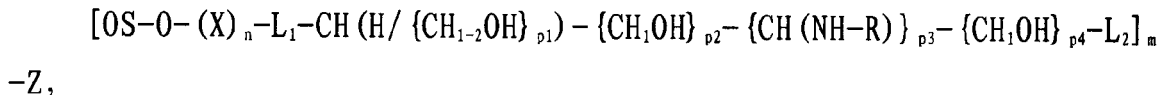
25 20、如权利要求 1-12 所述的物质在对幽门螺杆菌分型中的用途。

21、如权利要求 1-12 所述的物质在幽门螺杆菌结合检测中的用途。

30 22、一种结合幽门螺杆菌的物质及其结合幽门螺杆菌的类似物或衍生物, 该物质含有寡糖序列 $Glc(A)_q(NAc)_r\alpha 3/\beta 3Gal\beta 4Glc(NAc)_u$, 其中 q、r 和 u 独立选自 0 或 1, 其限制性条件是当寡糖序列含有 $\beta 3$ 键时, q 和 r 为 1 或 0; 或者含有寡糖序列 $GalA(NAc)_r\alpha 3/\beta 3Gal\beta 4Glc(NAc)_u$, 其中 r 和 u 独立选自 0 或 1。

23、一种含有权利要求 1 所述寡糖序列的结合幽门螺杆菌的非-酸性多价物质及其结合幽门螺杆菌的类似物和衍生物，其中所述的寡糖序列 (OS) 是权利要求 12 所述的结构 $[OS-0-(X)_n-Y]_m-Z$ 的一部分，Y 是亲水间隔基团，更优选一种柔性亲水间隔基团。

5 24. 如权利要求 23 所述的结合幽门螺杆菌的非-酸性多价物质，其中接头结构 Y 是



10 其中其中 L_1 和 L_2 是连接基团，它们各自独立含有氧、氮、硫或碳键合原子或两个联接的原子，这些原子形成的化学键如-0-，-S-，-CH₂-，-N-，-N(COCH₃)-，酰胺基团-CO-NH-或-NH-CO-或-N-N- (胍衍生物) 或氨基氧-键-0-N-和-N-0-； L_1 是自 X 的还原末端单糖的碳 1 位的键，或者当 $n=0$ 时， L_1 代替-0-并直接从 OS 的还原末端 C1 起连接； p_1 、 p_2 、 p_3 和 p_4 分别独立为从 0 到 7 的整数，限制条件是 p_1 、 p_2 、 p_3 和 p_4 中至少一个至少为 1；在支链形式 $\{CH_{1-2}OH\}_{p1}$ 中的 $CH_{1-2}OH$ 表明链的终止基团是 CH_2OH ，而且当 p_1 大于 1 时仲醇基-CHOH-将终止基团与间隔基团的剩余部分连接起来；R 优选乙酰基基团 (-COCH₃) 或 R 是一种与 Z 连接的可选择的键，然后 L_2 是一或二原子链终止基团，在另一个方案中，R 是形成类似物基团，包含含有酰胺结构或 H 的 C_{1-4} 酰基基团，或形成氨的 C_{1-4} 烷基；而且 $m > 1$ ，Z 是多价载体；OS 和 X 的定义如权利要求 12。

15 20

25、一种含有寡糖序列的结合幽门螺杆菌的物质及其结合幽门螺杆菌的类似物和衍生物，其中所述的寡糖序列 $Gal(A)_q(NAc)_r/Glc(A)_q(NAc)_r$ $\alpha 3/\beta 3 Gal\beta 4Glc(NAc)_u$ 作为非还原末端终止序列，其中 q 、 r 和 u 分别独立为 0 或 1，限制条件是所述寡糖序列不是 $Gal\alpha 3Gal\beta 4Glc/Glc NAc$ 。

25 26、如权利要求 22-25 中任一项所述的物质用于与细菌、毒素或病毒结合。

27、如权利要求 22-25 中任一项所述的物质用作药物。

28、一种治疗由于幽门螺杆菌存在引起的疾病的方法，其中给予需要这种治疗的对象有效药物量的如权利要求 1-12 或 22-25 中任一项所述的物质。

30 29、如权利要求 28 所述的方法，其中所述疾病是由于患者的胃肠道中存在幽门螺杆菌引起的。

30、如权利要求 28 所述的方法，该方法用于治疗慢性浅表性胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、胃腺癌、人胃部非霍奇金淋巴瘤、肝病、胰腺疾病、皮肤病、心脏病或自体免疫疾病包括自体免疫胃炎和恶性贫血以及非-类固醇抗炎药物 (NSAID) 相关的胃病，或用于预防婴儿猝死综合症。

5 31、根据权利要求 28-30 任一项所述的治疗方法，其中所述的物质是一种营养添加剂或营养组合物的一部分。

32、根据权利要求 26 所述的物质，其中所述的毒素是艰难梭菌的毒素。

33、根据权利要求 1 所述的用途，其中所述的寡糖序列是通过 β 1-6 键将还原末端和 GalNAc、GlcNAc、Gal 或 Glc 连接起来的。

10 34、根据权利要求 2 的用途，其中所述的寡糖序列是 $\text{Glc}(A)_q(\text{NAc})_r\beta$ $3\text{Gal}\beta$ 4GlcNAc ， q 和 r 的定义同权利要求 1。

新的幽门螺杆菌受体及其用途

5

发明领域

本发明描述了一种结合幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) 的物质或受体及其在例如治疗由幽门螺杆菌引起疾病的药用和营养组合物中的用途。本发明还涉及使用受体来诊断幽门螺杆菌。

10

发明背景

幽门螺杆菌被认为与几种胃肠道疾病相关, 包括慢性胃炎, 非类固醇抗-炎症药物 (NSAID) 相关联的胃病、十二指肠溃疡和胃溃疡、胃麦芽淋巴瘤和胃腺癌 (Axon, 1993; Blaser, 1992; DeCross 和 Marshall, 1993; Dooley, 1993; Dunn 等, 1997; Lin 等, 1993, Nomura 和 Stemmermann, 1993; Parsonnet 等, 1994; Sung 等, 2000; Wotherspoon 等, 1993)。全部或部分非肠胃疾病包括婴儿猝死综合症 (Kerr 等, 2000 和 US 6, 083, 756), 自体免疫疾病如自体免疫胃炎和恶性贫血 (Appelmeik 等, 1998; Chmiela 等, 1998; Clayes 等, 1998; Jassel 等, 1999; Steininger 等, 1998) 和某些皮肤疾病 (Rebora 等, 1995), 胰腺疾病 (Correa 等, 1990), 肝脏疾病包括腺癌 (Nilsson 等, 2000; Avenaud 等, 2000), 和如动脉硬化症等心脏疾病 (Farsak 等, 2000)。Pakodi 等于 2000 年回顾了由幽门螺杆菌引起或相关的多种疾病。人们对于细菌定居和感染的主要兴趣点在于细菌粘附于胃粘膜上皮细胞表面的机理。

已有报道称基于脂质-和蛋白-的糖缀合物作为受体来与这种微生物结合, 如唾液酸糖缀合物 (sialylated glycolconjugates) (Evans 等, 1988), 25 硫苷脂和 GM3 (Saitoh 等, 1991), Le^b 血型决定簇 (Boren 等, 1993), 聚糖基神经酰胺 (Miller-Podraza 等, 1996, 1997a), 乳糖基酰基鞘氨醇 (Angstrom 等, 1998), 和神经节四糖基酰基鞘氨醇 (Lingwood 等, 1992; angström 等, 1998)。其它潜在的幽门螺杆菌受体包括多糖硫酸乙酰肝素 (Ascensio 等, 1993) 和磷脂酰乙醇胺 (Lingwood 等, 1992)。

30

Zopf 等的美国专利 5, 883, 079 (1999 年 3 月)、5, 753, 630 (1998 年 5 月) 和 5, 514, 660 (1996 年 5 月) 描述了作为幽门螺杆菌粘附素抑制剂的包含

Neu5Ac α 3Gal 的化合物。唾液酸乳糖分子抑制了幽门螺杆菌与人类肠胃细胞系的结合 (Simon 等, 1999), 并且它在恒河猴感染的动物模型中也是有效的 (Mysore 等 2000)。该化合物已用于临床试验。

5 美国专利 5,446,681 (Krivan 等, 1995 年 11 月) 描述了一种细菌受体
5 抗生素共扼物, 该共扼物由一个脱唾液酸神经节苷脂缀合一个青霉素抗生素
构成。该专利还特别请求保护了用阿莫西林 (amoxicillin)-脱唾液酸-GM1
共扼物治疗幽门螺杆菌引起的疾病。本发明描述的寡糖序列/糖脂不属于神
经节类的糖脂。

10 美国专利 5,386,027 (Krivan 等, 1995 年 1 月) 和 5,217,715 (1993
10 年 6 月) 描述了寡糖序列或糖脂抑制几种致病菌的用途, 可是其中并没有涉
及本发明所述的结合特异性, 而且在其研究或要求的细菌中也没有包括幽门
螺杆菌。

15 已有报道糖序列 GlcNAc β 3Gal 作为链球菌的受体 (Andersson 等,
1986)。某些细菌可能具有重叠结合特异性, 但是由此不可能预测出甚至非
15 常接近相关细菌粘附素的结合物质。对于幽门螺杆菌来说, 除了 Lewis b 结
合蛋白外其他的糖结合分子还是未知的。

发明概述

20 本发明涉及含有寡糖序列 $[Gal(A)_q(NAc)_r/Glc(A)_q(NAc)_r \alpha 3/ \beta$
3], $[Gal \beta 4GlcNAc \beta 3]_s$, $Gal \beta 4Glc(NAc)_t$ 并能结合幽门螺杆菌的物质或受体
的用途, 其中 q、r、s、t 和 u 各自独立为 0 或 1, 所以当 t = 0 和 u = 0
时, 寡糖序列与多价载体连接或以高浓度的游离寡糖存在, 还涉及所述具有
25 结合幽门螺杆菌活性的所述寡糖序列的类似物或衍生物在生产具有结合幽
门螺杆菌的或抑制活性的组合物中的用途。

本发明的目的之一涉及本发明描述的作为介质的结合幽门螺杆菌的寡
糖序列的用途, 以及该物质在制备药物组合物中的用途, 尤其是将之用来治
疗由本发明所述幽门螺杆菌的存在引起的任何一种疾病。

30 本发明还涉及治疗由幽门螺杆菌存在引起的疾病的方法。本发明还涉及
30 使用本发明描述的作为幽门螺杆菌的结合或抑制物质的受体来诊断幽门螺
杆菌。

本发明的另一个目的是提供了含有结合幽门螺杆菌的寡糖序列的物质、药物组合物和营养添加剂或复合物。

本发明的另一个目的是上述结合幽门螺杆菌的物质在鉴定细菌粘附素、幽门螺杆菌分型和结合幽门螺杆菌检测中的用途。

- 5 本发明的另一个目的是上述结合幽门螺杆菌的物质在生产抗幽门螺杆菌疫苗中的用途。

发明详述

- 10 图 1A 和 1B 由内生糖神经酰胺酶 (endoglycoceramidase) 消化六糖基神经酰胺 (hexaglycosylceramide) 获得的过甲基化 (permethylated) 寡糖的 EI/MS, 该寡糖的气相色谱图 (上部) 和峰 A 和 B 各自的 EI/MS 波谱图 (底部)。

- 15 图 2A 和 2B 六糖基神经酰胺 (2A) 和五糖基神经酰胺 (2B) 的阴离子 FAB 质谱图。

- 图 3A 和 3B 显示了六糖糖脂 (3A) 和五糖糖脂 (3B) 端基异构体区域的质子 NMR 波谱图, 过夜获得的较小 1 型 (minor type 1) 成分的波谱达到了良好的信号-噪音比。
- 20

- 图 4A、4B 和 4C 兔胸腺糖鞘脂的酶降解结果。硅胶薄层板置于 C/M/H₂O (体积比为 60: 35: 8) 中, 其中图 4A 和 4B 为 4-甲氧基苯甲醛显像板, 图 4C 为涂覆 ³⁵S-标记的幽门螺杆菌后获得的放射自显影照片。1、七糖基神经酰胺 (结构 1, 表 I); 2、脱唾液酸 (desialylated) 七糖基神经酰胺 (经酸处理后获得); 3、用 β 4-半乳糖苷酶处理的脱唾液酸 (desialylated) 七糖基神经酰胺; 4、用唾液酸酶和 β 4-半乳糖苷酶处理的七糖基神经酰胺; 5、来自于人红血球的对照糖鞘脂 (glycosphingolipids) (乳糖苷神经酰胺 (lactosylceramide), 三己糖苷神经酰胺和红细胞糖苷脂); 6、用 β 4-半乳糖苷酶和 β -己糖胺酶处理的脱唾液酸七糖基神经酰胺; 7、用唾液酸酶、 β 4-半乳糖苷酶和 β -己糖胺酶处理的七糖基神经酰胺。
- 25
- 30

图 5A 和 5B 兔胸腺七糖基神经酰胺(结构 1, 表 I)的部分酸水解后获得产物的 TLC。显影溶剂同图 4A、4B 和 4C。5A, 4-甲氧基苯甲醛-显影板; 5B, 涂覆 ^{35}S -标记的幽门螺杆菌后获得的放射自显影照片。1、七糖基神经酰胺; 2、脱唾液酸七糖基神经酰胺(酸处理); 3、五糖基神经酰胺; 4、水解产物; 5、对照糖鞘脂(同图 4A、4B 和 4C)。

图 6A 和 6B 系列稀释的糖鞘脂。使用细菌覆盖技术在 TLC 板上鉴定结合活性。TLC 显影溶剂同图 4A、4B 和 4C。不同的糖脂以克分子数相等的量加到板上。基于己糖的量量化糖脂。6A、六和七糖基神经酰胺(结构 2 和 3, 表 I); 6B、五和四糖基神经酰胺(结构 4 和 5, 表 I)。糖脂数量(用 pmols 表示)如下所示: 1, 1280 (每一); 2, 640; 3, 320; 4, 160; 5, 80; 6, 40; 7, 20pmol (每一)。

图 7A 和 7B 用 4-甲氧基苯甲醛检测分离糖鞘脂的薄层色谱图(7A)和在结合放射标记的幽门螺杆菌 032 菌株后获得的放射自显影照片(7B)。采用体积比为 60: 35: 8 的氯仿/甲醇/水混合液作为溶剂体系在铝背景硅胶 60 HPTLC 板(Merck)上分离糖鞘脂。结合测定按照“材料与方法”章节描述的进行。放射自显影 72 个小时, 获得如下结果:

- 泳道 1) $\text{Gal } \beta \text{ 4GlcNAc } \beta \text{ 3Gal } \beta \text{ 4Glc } \beta \text{ 1 Cer}$ (新乳四糖基神经酰胺), 4 μg ;
- 泳道 2) $\text{Gal } \alpha \text{ 3Gal } \beta \text{ 4GlcNAc } \beta \text{ 3Gal } \beta \text{ 4Glc } \beta \text{ 1Cer}$ (B5 糖鞘脂), 4 μg ;
- 泳道 3) $\text{Gal } \alpha \text{ 3Gal } \beta \text{ 4GlcNH}_2 \beta \text{ 3Gal } \beta \text{ 4Glc } \beta \text{ 1Cer}$, 4 μg ;
- 泳道 4) $\text{Gal } \alpha \text{ 3 (Fuc } \alpha \text{ 2) Gal } \beta \text{ 4GlcNAc } \beta \text{ 3Gal } \beta \text{ 4Glc } \beta \text{ 1Cer}$ (2 型 B6 糖鞘脂), 4 μg ;
- 泳道 5) $\text{GlcNAc } \beta \text{ 3Gal } \beta \text{ 4GlcNAc } \beta \text{ 3Gal } \beta \text{ 4Glc } \beta \text{ 1Cer}$, 4 μg ;
- 泳道 6) $\text{Gal } \beta \text{ 4GlcNAc } \beta \text{ 3Gal } \beta \text{ 4GlcNAc } \beta \text{ 3Gal } \beta \text{ 4Glc } \beta \text{ 1Cer}$, 4 μg ;
- 泳道 7) $\text{GalNAc } \beta \text{ 3Gal } \beta \text{ 4GlcNAc } \beta \text{ 3Gal } \beta \text{ 4Glc } \beta \text{ 1Cer}$ (X_2 糖鞘脂), 4 μg ;
- 泳道 8) $\text{NeuAc } \alpha \text{ 3GalNAc } \beta \text{ 3Gal } \beta \text{ 4GlcNAc } \beta \text{ 3Gal } \beta \text{ 4Glc } \beta \text{ 1Cer}$ (NeuAc- X_2), 4 μg ;
- 泳道 9) $\text{Fuc } \alpha \text{ 2Gal } \beta \text{ 4GlcNAc } \beta \text{ 3Gal } \beta \text{ 4Glc } \beta \text{ 1Cer}$ (2 型 H5 糖鞘脂), 4

ug;

泳道 10) NeuAc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer (唾液酸新乳四糖苷神经酰胺(sialylneolactotetraosylceramide)), 4ug; 糖鞘脂的来源同表 2 中给出的。

5

图 8A、8B、8C 和 8D 计算出的以下三种能够结合幽门螺杆菌的糖鞘脂的最低能量构象: GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer (**8A**), GalNAc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer (**8B**) 和 Gal α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer (**8C**), 还显示了非结合的 Gal α 3Gal β 4GlcNH₂ β 3Gal β 4Glc β Cer 结构 (**8D**)。图中给出了每个计算出的最低能量结构中寡糖部分的顶视图。不管端基异构体中的差别及其在末端糖 4-OH 的轴向或纬向位置是否存在一个乙酰胺基团, 事实表明末端 α 3-连接的化合物的环状平面凸起超出了 β 3-连接的相应平面, 一个基本上地形学类似处存在于这些结构和来源于兔胸腺 (图 9A) 的 GlcNAc β 3-终止结构 (terminated structure) 之间, 由此说明了它们对细菌粘附素具有相近的亲合力。与此相对照, 内部的 GlcNAc β 3 的乙酰胺基对于结合是至关重要的 (参照 **8C** 和 **8D**)。

10
15

图 9A、9B、9C 和 9D 计算出的结合活性的糖鞘脂的最低能量构象 (conformer), 其中分别为糖鞘脂 GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer (**9A**) 和 Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4-GlcNAc β 3Gal β 4 Glc β Cer (**9B**), 非结合类的糖鞘脂为 NeuAc α 3GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer (**9C**) 和 Gal α 3 (Fuc α 2) Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer (**9D**)。当前者 (**9B**) 被容许但导致亲合力减少时, 后面两种延长形式丧失了其与幽门螺杆菌的结合 (**9C** 和 **9D**)。同时发现 B5 内在 GlcNAc 的乙酰氨基部分的脱-N-酰化作用 (图 8A、8B、8C 和 8D) 完全取消了结合, 故由于处于末端的 N-乙酰半乳糖胺的乙酰氨基不重要, 所以组成结合表位的部分必须含有图 8C 所示的 B5 的末端三糖。

20
25

图 10 在相对各自旋转 90 度的两个方案中显示了七糖化合物 NeuGc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer 的最低能量构象。唾液酸糖基部分的末端碳原子和两个内在 GlcNAc 残基的乙酰氨基的甲基碳原子

30

一样用黑色表示,这只不过是為了利于阅读的定位。可以任意选择 Glc β cer 联结的延长构型,但最合适的是最小结合序列 GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3,因为它更好地暴露于不同于这里描述的一种 Glc β Cer 构象中的邻近粘附素。

5 图 11A、11B 和 11C 显示了单克隆抗体 TH2 (11B) 和 E. cristagalli 凝集素 (11C) 与通过薄层色谱分离的来自于人胃黏膜、人粒细胞和人红血球的上皮细胞的总非酸糖鞘脂级分 (total non-acid glycol sphingolipid fractions) 的结合。相同级分中的通过 4-甲氧基苯甲醛染色显现出来 (11A)。例子 (11B) 和 (11C) 中的放射自显影进行了 12 个小时。泳道 1-6 分别点样来自
10 于五个不同血型 A 个体胃黏膜上皮细胞的总非酸级分 80 μ g, 但是泳道 6 是加了 40 μ g 来自于人粒细胞的总的非酸级分、泳道 7 是加了 40 μ g 来自于人红血球的总的非酸级分。按照“材料与方法”部分的描述进行涂覆测试。

发明详述

15

本发明描述了结合幽门螺杆菌的特定寡糖序列家族。通过薄层涂覆测试对众多天然存在的糖鞘脂进行筛选 (表 2)。使用的糖鞘脂的结构由质子 NMR 和质谱试验确定。分子模型用来比较结合幽门螺杆菌物质的三维结构。

20 通过比较四个五糖糖脂来证明新的结合特异性,不管端基异构体中的差别以及在末端糖 4-OH 的轴向或横向位置是否存在一个乙酰氨基,发现 GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer 中非还原的末端糖由 GalNAc β 3 (简短名称 x2 GSL)、GalNAc α 3 或 Gal α 3 (B5) 交换后都会导致与幽门螺杆菌的结合。特异性还包括减弱结合幽门螺杆菌的结构: 一种简短形式的 Gal
25 β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer 和含有末端 N-乙酰葡萄糖胺的 β 4-延长形式的糖脂如 Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer 和 NeuGc α 3Gal
30 β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer。与先前已知的依赖于特异性的唾液酸相对照 (Evans 等, 1988, Miller-Podraza 等, 1996; 1997a), 最后提及糖鞘脂中的 N-糖基神经氨酸可以被释放出来而不结合幽门螺杆菌。

虽然常规糖与幽门螺杆菌的结合会遭到细菌阶段变化的破坏,但对
30 GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer 的结合是完全可以重复的,在涂覆测试中低皮摩尔量的糖脂就明显表现出结合的高亲合力。

GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer、Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer 和 Gal α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer (一种截短形式和 N- 脱乙酰基形式的活性类型) 不与结合幽门螺杆菌的的试验指示了结合表位的长度。数据表明内在 GlcNAc 残基参与了结合但其单独存在并不能引起足够强的结合反应。结合表位被认为是上述讨论五糖表位中的末端三糖。当残基中仅有两个存在于如 Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer 中时, 结合是微弱的, 处于六糖糖脂 Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer 中时, 末端 Gal β 4 抑制了结合解释了微弱的活性。在较弱活性的六糖糖脂结构上有一个 Gal α 3 的七糖糖脂 Gal α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer 具有较高的活性, 这也表明末端三糖表位对于产生良好的结合活性是必需的。

通过分析异构体和活性类型的修饰构型来鉴定结合的特异性。含有末端修饰 Gal Fuc α 2 (缩写 H5-2)、Fuc α 2 和 Gal/GalNAc α 3 (B6-2, A6-2)、Neu5Ac α 3 或 Neu5Ac α 6 (唾液酸类红细胞糖苷脂) 或 Gal α 4 (P1) 的延长形式的 Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer 在结合幽门螺杆菌的检测中是没有活性的。结合还可以被含有 β 6-键合支链的内年半乳糖即 Gal β 4GlcNAc β 3 (Gal β 4GlcNAc β 6) Gal β 4Glc β Cer 所示的结构破坏。支链改变了 Gal β 4GlcNAc β 3-表位的表达已经被证实, 而二糖结合位点有可能受到了空间阻碍(Teneberg 等, 1994)。(然而结果表明被 β 3-键束缚的二糖或三糖结合表位的内年半乳糖残基也可以利于结合)。此外, Neu5Ac α 3GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer (具有结合活性的 x2-糖鞘脂的一种延长形式) 或 GalNAc β 3Gal α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer (延长的 B5 GSL) 不表现出结合幽门螺杆菌的活性。

分子建模用于比较活性结合结构和非活性种类。四种五糖糖鞘脂(Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer 加上 GlcNAc β 3 或 GalNAc β 3 或 GalNAc α 3 或 Gal α 3 延长) 适合的最低能量构象表明化合物的构象可以接近各自的模拟型。无活性糖脂的构象是不同的。尽管存在末端糖的端基异构键(两个 α 和两个 β 键) 也不相同的事实, 但分子建模显示最低能量结构在局部是非常近似的。末端结构的差别是 Gal α 3 缺乏一个存在于其它三个分子中的乙酰氨基, Gal 和 GalNAc 在轴向有一个 4-OH, 在 equatorial 位置有 GlcNAc, α -端基异构体的环状位面轻微升高至 β -端基异构体相应的平面上。虽然 Gal β 4 延长造成空间干扰, 但 GlcNAc 的第四位允许末端延长也表明了 4-OH 对

于结合是非常重要的。总的来说，由于所有的四种五糖糖脂对于幽门螺杆菌粘附素具有相近的亲合力，所以不管是4-OH的位置还是缺少/存在一个乙酰氨基或是末端单糖残基的端基异构结构均对于发生结合是至关重要的。

按照这些结合的原则，结合物质中的四种其它末端单糖也能提供三糖结合表位： $\text{Gal } \beta \text{ } 3\text{Gal } \beta \text{ } 4\text{GlcNAc}$ 、 $\text{GlcNAc } \alpha \text{ } 3\text{Gal } \beta \text{ } 4\text{GlcNAc}$ 、 $\text{Glc } \beta \text{ } 3\text{Gal } \beta \text{ } 4\text{GlcNAc}$ 和 $\text{Glc } \alpha \text{ } 3\text{Gal } \beta \text{ } 4\text{GlcNAc}$ 。这些类似于研究序列的物质仅在端基异构、4-端基异构或C2 NAc/OH结构上存在差别。第一种物质存在于人类红血球的糖脂中，而迄今为止还不知道后三种是来自于人类的什么组织，但很有可能是天然受体的类似物。

10 已经表明结合表位包含活性五糖糖脂的末端三糖元件，并且至少含有大量的N-乙酰基乳糖胺，表位也可以存在于糖链中间。本发明人意识到结合表位可以以多种途径存在于天然或生物合成产生的糖缀合物和寡糖中，如糖蛋白和聚-N-乙酰基乳糖胺寡糖中以O-键或N-键连接的多糖，特别是在碳水化合物领域的化学和酶合成方法允许制备几乎是无限数量的衍生物和类似物。结合表位的大小可以有一些变化，例如末端单糖的C1、C2和C4的例子中，通过丢失非还原末端单糖或是从 $\text{GlcNAc } \beta \text{ } 3\text{Gal } \beta \text{ } 4\text{GlcNAc}$ 末端 GlcNAc 的C4位延长，如 $\text{GlcNAc } \beta \text{ } 3$ 的C4位可以通过糖苷键与寡糖链连接，当寡糖序列是 $\text{GlcNAc } \beta \text{ } 3\text{Gal } \beta \text{ } 4\text{GlcNAc } \beta \text{ } 3\text{Gal } \beta \text{ } 4\text{Glc}$ 时，末端 $\text{GlcNAc } \beta \text{ } 3$ 的C4位可以通过糖苷结合方式与 $\text{Gal } \beta \text{ } 1$ -或寡糖链连接。尤其是三糖表位中的非还原末端单糖残基和表位中还原末端的C2和C4位可以用于制备具有结合幽门螺杆菌活性的衍生物和寡聚或多聚缀合物。单糖残基的C6位也可以用于生成衍生物和类似物，优选三糖序列的非还原末端残基和二糖和三糖结合物质的还原残基的C6位。

25 在本发明中，术语“类似物”和“衍生物”的定义如下。根据本发明有可能设计出结合幽门螺杆菌的寡糖序列的结构类似物和衍生物，因此，本发明还涉及本发明相关物质的结构类似物。相应于本发明的结构类似物包括幽门螺杆菌与寡糖序列结合的重要结构元件。为了设计有效的结构类似物，知道对于幽门螺杆菌和糖之间结合的重要结构元件是重要的。重要的结构元件优选没有进行修饰或对它们作了修饰但非常类似于重要结构元件。这些元件30 优选包括三糖和二糖表位中 $\text{Gal } \beta \text{ } 4$ 残基的4-和6-羟基，而且环状结构之间的联结位置是一个重要的结构元件。为了达到高亲合力，结合乙酰氨基团或

类乙酰氨基团优选位于相应于二或三糖表位还原末端 GlcNAc 中的乙酰氨基处。乙酰氨基类似基团可以是另一种酰胺，例如烷基胺，芳胺，仲胺，优选 N-乙基或 N-甲基，O-乙酰基，或 O-烷基如 O-乙基或 O-甲基。为了高亲合力，优选结合具有的来自于末端糖醛酸羧基团的胺衍生物和其类似物。未修饰的糖醛酸的活性在低 pH 升高。

5 本发明的结构衍生物是根据本发明化学修饰的寡糖序列，这样会保持或提高与幽门螺杆菌的结合活性。根据本发明优选对寡糖序列的一或几种羟基或乙酰氨基进行衍生。本发明描述了当制备类似物或衍生物时几种可能被改变的分子位置。通过通式 1 的 R-基团显示了可以容忍至少一定修饰的羟基或乙酰氨基。

10 至少当在 Gal β 4GlcNAc 的 C2、C3 或 C6-羟基位置或三糖表位的 C3-羟基非还原末端单糖处连接时，大的或酸性取代的结构和其它结构如单糖残基是不能容忍的。生产结合凝集素的寡糖类似物的方法是已知的，例如，通过该方法已经生产出大量的唾液酸路易斯 x 寡糖类似物，这表明活性功能基团不同的支架结构，参见第 12090 页 (Sears 和 Wong, 1996)。肝磷脂寡糖的类似相似物已经由 Sanofi 公司生产，并且对于唾液酸酶的唾液酸模拟 (mimicking) 抑制剂如 Zanamivir 和 Tamiflu (Relenza) 也通过不同的团体制造出来。优选寡糖类似物建立在一种包含至少六或五元环结构的分子之上，更优选类似物含有至少两个由 6 或 5 个原子组成的环结构。寡糖的一种优选类似物类型包含与 Gal β 4GlcNAc-糖模拟结构连接的末端糖醛酸氨基化合物或其类似物。作为选择，末端糖醛酸氨基化合物是 1-3-连接于 Gal，然后与 GlcNAc 模拟结构连接。在模拟结构中，单糖环可以是取代环，诸如环己胺或环戊烷，包括苯环的芳香环，杂环结构可以包含边氧如氮和硫原子。为了保持活性环的构象，各种环结构可以通过耐受性连接基相互连接起来。典型的模拟结构还可以包含对于寡糖序列或其部分的缩氨酸类似物结构。

25 活性基团结合活性的效应是累积的，而且缺少的一个基团可以通过在分子对面增加一个活性残基来补偿。分子模型优选通过计算机构建并可以使用它来生产本发明所述的结合幽门螺杆菌的寡糖序列的类似物结构。通过实施例及其相同或相近的方法给出几种寡糖序列分子模型的结果，此外核磁共振和 X-射线结晶学方法可以用来获得本发明所述的其它寡糖序列。寻找寡糖结构的类似物可以将研究集中于 (docked) 结合幽门螺杆菌的碳水化合物分子，

最有可能的是细菌的凝集素，对另外可能存在的结合交互作用也可以进行研究。

通过本发明发现利用组合化学 (combinatorial chemistry) 获得寡糖衍生物的方法可以将单价、低价或多价寡糖活化，使之对于凝集素具有较高的活性。当通过替换寡糖序列中一或几个残基构建文库时，该文库被认为是一个衍生物文库，或者文库可以由本发明所述的寡糖序列类似物组成，一个组合化学文库可以建立在本发明所述的寡糖或其前体或糖缀合物 (glycoconjugate) 之上，例如可以通过所谓糖化技术生产具有可变还原末端的寡糖。

10 组合化学文库的一个优选技术方案是使用与本发明描述的结合幽门螺杆菌的物质缀合的文库。在更优选的方案中文库包括至少 6 个不同的分子。优选的组合化学修饰是通过来自通式 1 中 R8 羧基的不同酰胺化合物来制备的。R8 中修饰的基团还可以是一种醛或胺或另一种类型的反应基。根据本发明文库优选用于对与寡糖序列结合的微生物进行鉴定。氨基酸或有机氨组是
15 通过商业途径可获得的，这些物质用于合成糖醛酸酰胺的组合文库。通过一种抑制检测，高亲合力的粘合剂可以从组合文库中鉴别出来，其中文库化合物用于抑制细菌与本发明所述糖脂或糖缀合物的结合。本发明优选的结构类似物和衍生物可以抑制本发明所述的能与结合幽门螺杆菌的的寡糖序列与幽门螺杆菌的结合。

20 在通用 TLC-检测中，脂质部分或硅酸表面的近端引起的位阻可能限制了表位 $\text{GlcNAc } \beta \text{ 3Gal } \beta \text{ 4Glc}$ 的测定，在最近对艰难梭菌毒素的研究中使用该检测不能获得该序列的活性，该检测特异性识别了相同的四个针对这里所述幽门螺杆菌的三糖表位 (Teneberg 等, 1996)。然而，其他人已经通过使用大聚合间隔区修饰的糖缀合物证实了 $\text{Gal } \alpha \text{ 3Gal } \beta \text{ 4Glc}$ 与毒素 A 结合
25 (Castagliuolo 等, 1996)。另外考虑到末端单糖对结合的作用表明 Glc 可以位于表位的还原末端，在非活性 N-脱乙酰作用形式中，游离胺基的正电荷可能比存在羟基更具有破坏性。还原末端含有 Glc 的三糖表位被认为是以单价或优选多价形式存在的结合幽门螺杆菌物质的有效类似物。本发明的一个方案涉及在还原末端含有 Glc 的糖，该物质可以以高浓度的游离还原糖使用，
30 浓度范围优选 1-100 g/l，更优选 1-20 g/l，可以意识到这些糖在浓度为 0, 1-1 g/l 时具有较低的活性。

以下结合幽门螺杆菌的序列是作为寡糖序列描述的。这里定义的寡糖序列可以是天然或合成糖缀合物、游离寡糖或游离寡糖的一部分。这种寡糖序列可以结合不同的单糖或低聚糖或涉及多糖链的多糖，例如假设该糖序列是作为细菌多糖的一部分表达。而且，众多单糖的天然修饰是已知的，例如 0-乙酰基化或硫酸盐化的寡糖序列衍生物。结合幽门螺杆菌的物质在这里定义为含有寡糖序列的物质，该物质作为天然或合成糖缀合物的一部分或相应的游离寡糖或游离寡糖的一部分。结合幽门螺杆菌的物质还可以包含混合的结合幽门螺杆菌的寡糖序列。

在现在的检测中，几种受体寡糖序列的衍生物将结合减少至察觉限度以下，这说明了识别的特异性。结合数据显示如果所述寡糖序列具有 GalNAc β 3 连接到 Gal α 3Gal β 4GlcNAc 上（替代序列 GalNAc β 3Gal α 3Gal β 4GlcNAc）或 Neu5Ac α 3 连接到 GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc 上（替代序列 Neu5Ac α 3GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc）时，化合物是没有活性的。当所述寡糖序列是 Gal β 4GlcNAc 时，它没有被 α 4-半乳糖基化（序列不是 Gal α 4Gal β 4GlcNAc）， α 3-或 α 6-唾液酸化（序列不是 Neu5Ac α 3/6Gal β 4GlcNAc）， α 2-或 α 3-岩藻糖基化[所述寡糖序列不是 Fuc α 2Gal β 4GlcNAc 或 Gal β 4 (Fuc α 3) GlcNAc 或 Fuc α 2Gal β 4 (Fuc α 3) GlcNAc，提到的形成 Lewis x 的乳糖胺 GlcNAc 残基岩藻糖基化的 α 3-岩藻糖基化，Gal β 4 (Fuc α 3) GlcNAc]。具有 Gal β 3 结合 GlcNAc β 3 结构（如 Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc/Glc）的糖与这里描述的结合幽门螺杆菌的物质相比具有不同的构象，已经对它们的结合特异性分别作了研究。结合幽门螺杆菌的物质可以是具有不同糖序列的糖链的一部分或一种糖缀合物或含有其它已知结合幽门螺杆菌的表位的糖缀合物混合物，例如 Lewis b (Fuc α 2Gal β 3 (Fuc α 4) GlcNAc) 或 Neu5Ac α 3Gal β 4Glc/GlcNAc。同时使用几种结合物质可以利于治疗。

结合幽门螺杆菌的寡糖序列可以通过糖基转移酶或糖苷酶转糖基化或转糖苷酶进行酶学合成 (Ernst 等, 2000)，可以对这些酶的特异性和协同因子的使用进行人工改变。特定修饰的酶可以用于获得更有效的合成，例如糖基合成酶被修饰后只用来完成转糖基化作用。这里所述糖类或与它们的相似化合物的有机合成和缀合方法是已知的 (Ernst 等, 2000)，糖原料可以从天然物质中分离和经由化学或酶学修饰成为幽门螺杆菌的结合化合物。天然寡糖可以从各种反刍动物、转基因生物如母牛或微生物产生的牛奶中分离，表

达的糖基化酶可用于产生糖类。

通过现有技术中已知的方法可以获得本发明所述的糖醛酸单糖残基。例如，N-乙酰葡糖胺或 N-乙酰半乳糖胺的 6-碳位的羟基可以被化学氧化成羧酸。氧化可以达到适当地保护寡糖或单糖。

5 在一个优选方案中，未-保护的聚合体或寡聚体包含己糖、N-乙酰己糖胺或己糖胺，其中单糖之间的键不处于 6 个碳原子之间，它们是

- 1) 氧化成相应的糖醛酸残基的聚合体或含有 6-醛单糖单体的聚合体，
- 2) 任选自羧酸基或 6-醛基衍生，优选衍生成一种酰胺或一种胺，和
- 3) 水解成糖醛酸单糖或糖醛酸衍生的单糖。

10

氧化单糖残基成为糖醛酸和化学或酶水解胺或糖醛酸聚合体的方法是本领域公知的，尤其优选使用纤维素、淀粉或具有 1-2 或 1-3 或 1-4 联接的其它葡聚糖、壳多糖(GlcNAc 聚合体)或脱乙酰壳多糖(GlcN 聚合体)低聚体或聚合体的方法，这些物质都是商业上广泛可获得的，或者 N-乙酰半乳糖胺

15 /半乳糖胺多糖（例如，已知来自于细菌的）被氧化成相应的 1-4-联接糖。该方法还可以应用于半乳糖聚合体。糖醛酸衍生物还可以产自包含糖醛酸的天然聚合体如胶质或含有细菌多糖的葡糖醛酸包括 N-乙酰肝磷脂、透明质酸和软骨素类型的细菌外源多糖。该方法包括：

- 1) 多糖羧酸基的衍生，优选通过一个氨基化合物连接和，
- 20 2) 水解多糖为糖醛酸单糖或糖醛酸衍生单糖。

通过化学和酶学方法来氧化多糖碳 6 伯醇生成醛或羧酸也已经是公知的。醛可以被进一步衍生成如通过还原剂氨化作用产生的胺。优选末端 Gal 或 GalNAc 通过伯醇氧化酶如半乳糖酶氧化，然后进一步被胺等化合物衍生。

25 采用有机化学的常规方法可以使糖醛酸残基与二糖或寡糖缀合，或者通过葡糖醛酸基转移酶从 UDP-GlcA 上转移一个 GlcA 至末端 Lac (NAc) 上来连接 GlcA。

模拟 N-乙酰己糖胺(acetylhexosamine)的单糖衍生物可以产自含有己糖胺的聚合体或寡聚体或其它具有伯胺基的单糖，该方法包括：

- 30 1) 胺基衍生成仲或叔胺或酰胺，
- 2) 水解聚合体成相应的单糖。

脱乙酰壳多糖和其寡糖是含有聚合物或寡聚体胺的实例。

通常，产生含有包含具有一或多个单糖的胺和/或酰胺的 6-醛的羧酸的

5 方法包括以下步骤：

1、在糖类聚合物中任选引入一个羧酸或 6-醛基，其中伯羟基可用于修饰，

2、衍生羧酸基或 6-醛基或聚合体的伯胺基为仲或叔胺或酰胺，当步骤 1 进行了，步骤 2 是任选的，

10 3、水解聚合物成相应的单糖。

还可以部分水解为单糖产生有用的二糖或寡糖来产生类似物。优选水解产生至少 30%的单糖。生产化学制品步骤的方法是本领域熟知的，例如可以参照 Muzzarelli 等 1999 和 2002 描述的方法氧化多糖至相应的单糖。由于
15 单糖没有采用保护或反应性还原末端，对于使用非保护的单糖这些方法是优选的。

在一个优选方案中，含有 $\text{GlcA } \beta \text{ 3Lac}$ 或 $\text{GlcA } \beta \text{ 3LacNAc}$ 的寡糖序列可以利用特异的葡糖醛酸酶如来自牛肝的葡糖醛酸酶通过转糖基作用可有效地合成。从中发现酶可以从 $\beta \text{ 1-3}$ 键到 $\text{Gal } \beta \text{ 4GlcNAc}$ 和 $\text{Gal } \beta \text{ 4Glc}$ 进行位点
20 特异性的转移，并且这种转糖基反应具有意想不到的高产量。通常这种选择性和近 30%或更多的产量在转糖基反应中是不能获得的。

本发明的一个方案是含有寡糖序列 $[\text{Gal}(\text{A})_q(\text{NAc})_r/\text{Glc}(\text{A})_q(\text{NAc})_r, \alpha \text{ 3}/\beta \text{ 3}]_s[\text{Gal } \beta \text{ 4GlcNAc } \beta \text{ 3}]_t[\text{Gal } \beta \text{ 4Glc}(\text{NAc})_u]$ 。并能够结合幽门螺杆菌的物质或受体，其中 q 、 r 、 s 、 t 和 u 分别独立为 0 或 1，当 $t = 0$ 和 $u = 0$ 时，寡糖
25 序列连接于一个多价的载体或以高浓度的游离寡糖存在，所述寡糖序列的类似物或衍生物具有结合幽门螺杆菌的活性，可以用来生产具有具有结合幽门螺杆菌活性的组合物。

上述的一个寡糖序列简要地说明了单糖残基的糖醛酸或单糖残基的碳 6 衍生物，最优选碳 6 衍生物是糖醛酸的酰胺。

30 本发明使用的结合幽门螺杆菌的物质优选下列寡糖序列：

$\text{Gal } \beta \text{ 4GlcNAc}$,

GalNAc α 3Gal β 4GlcNAc, GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc, GlcNAc α 3Gal β 4GlcNAc,

GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc, Gal α 3Gal β 4GlcNAc, Gal β 3Gal β 4GlcNAc, Glc α 3Gal β 4GlcNAc, Glc β 3Gal β 4GlcNAc,

5

Ga β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc, Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc,

GalNAc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc, GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc,

10

GlcNAc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc, GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc,

Gal α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc, Gal β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc,

15

Glc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc, Glc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc,

GalANAc β 3Gal β 4GlcNAc, GalANAc α 3Gal β 4GlcNAc, GalA β 3Gal β 4GlcNAc,

GalA α 3Gal β 4GlcNAc, GalANAc β 3Gal β 4Glc, GalANAc α 3Gal β 4Glc, GalA β 3Gal β 4Glc, GalA α 3Gal β 4Glc,

20

GlcANAc β 3Gal β 4GlcNAc, GlcANAc α 3Gal β 4GlcNAc, GlcA β 3Gal β 4GlcNAc,

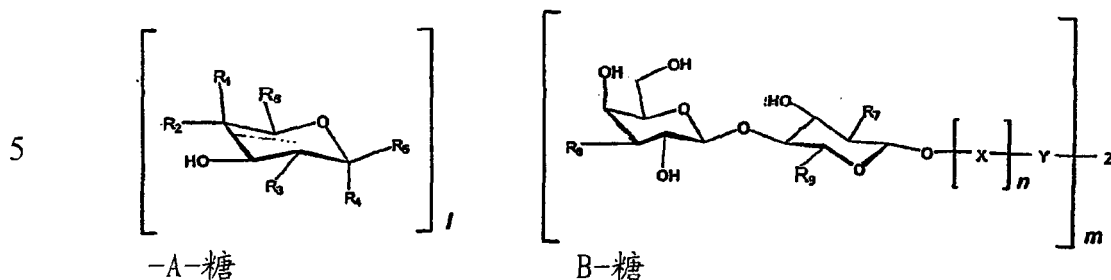
GlcA α 3Gal β 4GlcNAc, GlcANAc β 3Gal β 4Glc, GlcANAc α 3Gal β 4Glc, GlcA β 3Gal β 4Glc, GlcA α 3Gal β 4Glc,

25

Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc, 和其还原末端多价缀合物,

以及 GalNAc α 3Gal β 4Glc, GalNAc β 3Gal β 4Glc, GlcNAc α 3Gal β 4Glc, 30
GlcNAc β 3Gal β 4Glc, Gal α 3Gal β 4Glc, Gal β 3Gal β 4Glc, Glc α 3Gal β 4Glc, 和 Glc β 3Gal β 4Glc。

本发明的另一个方案如通式 1 所描述的:



本发明和本发明的用途优选的结合幽门螺杆菌的物质或混合物是基于通式 1 的寡糖结构, 其中整数 1、m 和 n 的值为 $m \geq 1$, 1 和 n 各自为 0 或 1, 其中 R1 是 H 和 R2 是 OH 或 R1 是 OH 和 R2 是 H 或 R1 是 H 和 R2 是单糖基或寡糖基优选一个 β 糖苷连接的半乳糖基, R3 独立地为 -OH 或乙酰氨基 (-NHCOCH₃) 或一种乙酰氨基类似基团, R7 是乙酰氨基 (-NHCOCH₃) 或一种乙酰氨基类似基团。当 1 = 1, R4 是 -H 且 R5 是氧连接于键 R6 上, 形成到糖 B 的 β 端基异构配糖连接 (anomeric glycosidic linkage), 或 R5 是 -H 且 R4 是氧连接于键 R6 上, 形成到糖 B 的 α 端基异构配糖连接; 当 1 = 0, R6 是与 B 连接的 -OH。X 是单糖或寡糖残基, 优选 X 是乳糖基、半乳糖基、聚-N-乙酰-乳糖胺, 或 O-聚糖或 N-聚糖寡糖序列的一部分, Y 是间隔基团或末端缀合物如神经酰胺脂质部分或到 Z 的键。Z 是一种低价 (oligovalent) 或多价载体。结合物质还可以是根据通式 1 所述的具有结合幽门螺杆菌活性的物质的类似物或衍生物, 例如 B 糖 C1 位和糖残基 X 或间隔基团 Y 之间的氧键 (-O-) 可以由碳 (-C-)、氮 (-N-) 或硫 (-S-) 键代替。

10

15

20

通式 1 中 R8 优选羧酸酰胺, 例如甲基酰胺或 ethylamide、羟甲基 (-CH₂-OH) 或羧酸基, 或其酯如甲基或乙基酯。羧酸氨基可以包括与多价载体 Z 的一种选择性联接, 其中载体包括胺如脱乙酰壳多糖或半乳糖胺多糖, 或者 Z 包括含有间隔基团的初级胺, 优选一种亲水的间隔基。R8 中的结构还可以是上述本领域公知的模拟结构, 例如可以使用仲或叔胺或酰胺化仲胺。

25

在通式 1 中 R9 优选羟甲基, 但它可以如 R8 描述的用于衍生物。R3 是羟基、乙酰氨基或乙酰氨基模拟基, 如 C₁₋₆ 烷基酰胺、芳基酰胺、仲胺, 30 优选 N-乙基或 N-甲基、O-乙酰基或 O-烷基如乙基或 O-甲基。R7 同 R3, 但更优选乙酰氨基或乙酰氨基模拟基。

R2 还可以优选包含一个六元环结构模拟的 Gal β 4 末端。

细菌结合物质优选以丛生形式出现，如通过细胞膜、微团、脂质体形式上的糖脂，或存在固相上如检测中使用的 TCL-板。具有恰当间隔的丛生表达产生了高亲合力的结合。

- 5 依照本发明还涉及结合幽门螺杆菌的表位或针对幽门螺杆菌具有相近或更好结合活性的天然存在或合成产生的其类似物或衍生物的可能应用。依据本发明还涉及含有细菌结合物质如本发明所述的受体活性神经节苷脂或其类似物或其衍生物的可能应用，该物质具有针对幽门螺杆菌相近或更好的结合活性。细菌结合物质可以是一种糖基连接的寡糖链末端表位。细菌结合表位还可以选择是寡糖链的支链，优选一种聚乳糖胺链。

- 10 可以将结合幽门螺杆菌的物质缀合至抗生素，优选青霉素类抗生素。结合幽门螺杆菌的物质将抗生素靶向在幽门螺杆菌上。这类缀合是有利于治疗的，因为由抗幽门螺杆菌的处理和治疗需要的抗生素量很少，这导致抗生素的副作用更低。缀合物的抗生素部分目标是杀灭或削弱细菌，但缀合物也可具有下述抗粘附作用。

- 15 优选低价或串形式中的细菌结合物质可以用于治疗由于幽门螺杆菌存在引起的疾病或症状，可以使用结合幽门螺杆菌的物质抗粘附，例如抑制幽门螺杆菌与靶细胞或组织受体的表位结合。当给予了结合幽门螺杆菌的物质或药用组合物时，它将在靶细胞上与受体糖缀合物竞争结合细菌。然后某些或全部细菌将结合结合幽门螺杆菌的物质而不是靶细胞或组织表面的受体。然后细菌附着于结合幽门螺杆菌的物质排出患者体外（例如通过体液在胃肠道的流动）导致细菌对患者健康的影响减弱。优选使用的物质是包括结合幽门螺杆菌的物质的可溶性组合物。也可以将物质附着于载体物质上，该物质优选不是蛋白。当使用载体分子时，可以将结合幽门螺杆菌的物质的几种分子附着于同一载体上，以此改进抑制效果。

- 20 靶细胞优选靶组织尤其是胃肠道的上皮细胞，其它潜在靶组织例如肝脏和胰腺，病原体的感染可以改变靶组织的糖基化(Karlsson 等, 2000)。靶细胞还可以是靶组织中的恶性的、转化的，或是癌/瘤细胞。转化的细胞和组织表达改变类型的糖基化，这样可以提供细菌的受体。凝集素或糖与糖蛋白或糖脂上的糖类结合(糖类-糖类相互作用)可以激活细胞，如果是癌/恶性细胞就可能致癌的生长或转移。这里描述的几种寡糖表位如 GlcNAc β 3Gal

β 4GlcNAc (Hu, J. 等, 1994)、Gal α 3Gal β 4GlcNAc (Castronovo 等, 1989) 和来自于恶性细胞的中性和唾液酸化聚乳糖胺 (Stroud 等, 1996) 已经被报道是癌相关的或癌抗原。来自于淋巴球并含有这里所述物质的寡糖链也已经被描述 (Vivier 等, 1993)。幽门螺杆菌与胃淋巴瘤相关, 这里所述物质可以用于抑制幽门螺杆菌与恶化前或恶化的细胞的结合以及抑制癌的发展或转移的活化。对结合的抑制可以治疗胃癌, 尤其是淋巴癌。据报道在来自于人胃粘液素的结构 GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6GalNAc 中存在结合幽门螺杆菌的寡糖序列, 该粘液素表位和相似的 O-聚糖糖形式是人胃中最有可能的幽门螺杆菌天然高亲合力的受体, 类似物序列 GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6GlcNAc 作为新糖脂 (neoglycolipid) 与幽门螺杆菌高亲合力的结合以及在某些检测中序列 GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6Gal 也具有某些结合活性。因此优选的寡糖序列包括 O-聚糖及 O-多糖序列的类似物, 如 GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6GlcNAc/GalNAc/Gal, GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6GlcNAc/GalNAc/Gal α Ser/Thr, GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6 (Gal/GlcNAc β 3) GlcNAc/GalNAc/Gal α Ser/Thr 以及糖肽和糖肽类似物包括 O-多糖序列。即使缺少非还原末端 GlcNAc 的序列也具有某些活性。基于此, 当连接还原末端形成结构 OS β 6Gal (NAc)₀₋₁ 或 OS β 6Glc (NAc)₀₋₁ 或 OS β 6Gal (NAc)₀₋₁ α Ser/Thr 或 OS β 6Glc (NAc)₀₋₁ α Ser/Thr 连接时, 所有其它的结合幽门螺杆菌的寡糖序列 (OS)、尤其是三糖表位也是特别优选的。当与多价载体连接时, Ser 或 Thr 化合物或其类似物或还原性寡糖也是优选的。还原性寡糖可以被还原性地连接到多价载体上。

靶细胞还可以包括血细胞, 尤其是白血球。现已知与胃溃疡相关的幽门螺杆菌菌株, 就如这里主要使用的菌株一样能刺激来自粒细胞的炎症反应 (Rautelin 等, 1994a, b), 即使是细菌不易受调理素的作用时。细菌嗜菌作用中的初始事件最有可能包括特异性的类凝集素交互作用, 该作用会导致粒细胞的粘合 (Ofek 和 Sharon, 1988)。吞噬事件之后存在氧化破裂反应 (burst reaction), 它是导致幽门螺杆菌相关疾病的发病机理 (Babior, 1978)。从粒细胞分离并鉴定几种包括 N-乙酰乳糖胺重复单位的唾液酸化和非-酸糖鞘脂 (Fukuda 等, 1985; Stroud 等, 1996), 因此可作为存在于白血球细胞表面的结合幽门螺杆菌的潜在受体。而且, X2 糖鞘脂分离自相同的来源 (Teneberg, S., 未出版)。本发明证实了人类红血球和粒细胞上的受体糖类

的存在,它们可以通过一种 N-乙酰乳糖胺特异性的外源凝集素和一种单克隆抗体(x2, GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc-)加以识别。结合幽门螺杆菌的物质可用于抑制白血球与幽门螺杆菌的结合以及防止发生氧化作用和/或白血球活化后的炎症反应。

- 5 已知幽门螺杆菌可以结合几种寡糖序列。特异性菌株引起的某些结合可能代表了某些不能导致癌或严重症状的共生的交互作用。关于结合癌-型糖类表位的已有数据表明结合幽门螺杆菌的物质可以抑制进一步的病理反应,这之中它可以允许某些更少病原性幽门螺杆菌细菌/菌株与其他的受体结构结合。因此全部消除细菌对于抑制幽门螺杆菌相关疾病不是必须的,较少的病原性细菌甚至可以对抑制更多的幽门螺杆菌致病性菌株产生前生命期效应。

- 15 通过本发明也可以理解到幽门螺杆菌含有大的聚乳糖胺寡糖在其表面,而且至少在某些菌株中含有本发明所述的能被细菌粘附的非藻糖基化表位。这里描述的物质还可以抑制幽门螺杆菌细菌之间的结合,从而抑制细菌的定居过程。

- 20 根据本发明的描述也可以混合结合幽门螺杆菌的物质,优选附着于载体上,以药用组合物的形式,该组合物用于治疗由患者体内的幽门螺杆菌引起的症状,或是结合幽门螺杆菌的物质在治疗这种疾病的方法中的用途。根据本发明可治疗的疾病的例子有慢性浅表性胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、人胃部非霍奇金淋巴瘤、胃腺癌,或某些胰腺、皮肤、肝脏或心脏疾病,婴儿猝死综合症,自体免疫疾病包括自体免疫胃炎和恶性贫血以及全部或至少是部分由幽门螺杆菌感染引起的非-类固醇抗炎药物(NSAID)相关疾病。

- 25 含有结合幽门螺杆菌的物质的药用组合物还可以包含其他物质,如惰性赋形剂,或药学上可接受的载体、防腐剂等,这些是本领域技术人员熟知的。结合幽门螺杆菌的物质可以与其他用于抗幽门螺杆菌的药物如抗生素一起给药。

含有这种物质的结合幽门螺杆菌的物质或药用组合物可以以任何方式给药,但优选使用口服给药。

- 30 本文使用的术语“治疗”既涉及为治愈或减轻疾病进行的治疗,也涉及为预防疾病或症状发展而进行的治疗。治疗可以以急性方式或者慢性方式进行。

本文使用的术语“患者”涉及任何按照本发明需要治疗的人类或非人哺乳动物。

通过筛选能连接结合幽门螺杆菌的物质的蛋白质或糖类(通过碳水化合物-碳水化合物之间的互作),结合幽门螺杆菌的物质可用来鉴别一种或多种粘附素。

糖类结合蛋白可以是一种外源凝集素或糖类结合酶。

可以通过如亲和层析或亲和交联法来进行筛选(Ilver等,1998)。

而且,可使用存在于人组织中的特异结合或阻止结合幽门螺杆菌的物质的物质并因此防止幽门螺杆菌的结合。这种物质的例子包括植物凝集素如Erythrina cristagalli和Erythrina corallodendron(Teneberg等,1994)。当用于人体时,该结合物质必须适宜于这种使用,例如人源化的抗体或来源于人的重组糖苷酶,其是非-免疫原性的并能从结合幽门螺杆菌的物质裂解末端的一或多个单糖残基。但在胃肠道中,对源于例如食物的多种天然凝集素和糖苷酶是耐受的。

而且,也可能将结合幽门螺杆菌的物质作为天然组合物包括食物和营养组合物的部分使用。优选将结合幽门螺杆菌的物质作为功能性或实用性食物的一部分,该功能性食物能够抑制或防止幽门螺杆菌与靶细胞或组织的结合,从而有利于人或动物的健康。结合幽门螺杆菌的物质可以是定义的食物或功能性营养组合物的一部分,该功能性食物可以包含其它可被如美国食品或药品管理局的权威机构接受的食物成分。结合幽门螺杆菌的物质还可以用于营养添加剂中,优选作为食物或饮料添加剂来生产功能性食物或功能性饮料。食物或食物添加剂还可以通过使驯养动物如奶牛或其它动物在乳汁中产生大量的结合幽门螺杆菌的物质。这可以通过使动物在其乳汁中过表达合适的糖基转移酶来完成。可选择并饲养特殊种系或种属的驯养动物以获得大量的结合幽门螺杆菌的物质。用于营养组合物或营养添加剂中的结合幽门螺杆菌的物质也可使用微生物如细菌或酵母来生产。

结合幽门螺杆菌的物质尤其可作为婴幼儿食物或营养组合物的一部分使用,优选作为婴儿配方食物的一部分。许多婴儿是用特殊的配方代替天然人乳的一部分。配方可能缺乏人乳中特定的以乳糖为基础的寡糖,尤其是延长类型的乳糖如乳-N-新四糖, $\text{Gal } \beta \text{ 4GlcNAc } \beta \text{ 3Gal } \beta \text{ 4Glc}$,及其衍生物。已知乳-N-新四糖和对-乳-N-新己糖($\text{Gal } \beta \text{ 4GlcNAc } \beta \text{ 3Gal } \text{ 4GlcNAc } \beta \text{ 3Gal}$

β 4Glc) 以及 Gal β 3Gal β 4Glc 来自于人乳并因此认为是婴儿食物的安全添加剂或成分, 考虑到其随后导致的疾病而预防其感染是明智的。也已知幽门螺杆菌能引起婴儿猝死症, 但用于根治细菌的强抗生素治疗可能对婴幼儿极为不合适。

- 5 在功能性食物中添加的人乳寡糖的浓度(例如, 在一种婴儿的再生配方中) 优选接近于天然人乳中存在的浓度。众所周知天然人乳中含有大量游离寡糖和包含本发明描述的寡糖序列的糖缀合物(可以是多价的), 因此有可能使用甚至高于天然浓度的单一分子来和获得强烈的抗幽门螺杆菌的抑制效应, 并且同时没有有害的副作用。天然人乳中含有除了个别差异外至少浓度范围为 10-210 mg/l 的乳-N-新四糖(Nakhlia 等, 1999), 因此, 用于功能性食物中的乳-N-四糖的浓度范围优选 0.01 - 10 g/l, 更优选 0.1 - 5 g/l, 最优选 0.1-1 g/l。当这里描述的游离寡糖是在还原末端具有 Gal β 4Glc 的三糖或二糖时, 优选添加的浓度为 1-100 g/l, 更优选浓度范围为 1-20 g/l。作为选择, 其在功能性食物中使用的总的浓度与天然人乳中乳糖类的浓度相同或相似, 这些乳糖类包括象描述的结合幽门螺杆菌的物质, 或是本发明所述的包含结合表位/寡糖序列的物质。至少有一例报道称人乳中含有一种以高浓度存在的主要的中性寡糖 Gal β 3Gal β 4Glc (Charlwood 等, 1999)。
- 10 15

- 另外, 有可能将结合幽门螺杆菌的物质用于诊断由幽门螺杆菌感染引起的疾病, 诊断用途还包括使用结合幽门螺杆菌的物质来对幽门螺杆菌进行分型。当该物质用于诊断或定型时, 它可以包括如探针或测试棒中, 优选构成试剂盒的组成部分。当将此探针或测试棒与包含幽门螺杆菌的标本接触时, 细菌将与探针或测试棒结合并且因此能从标本上分离以作进一步分析。
- 20

- 结果还表明在本发明优选的三糖序列的非还原末端单糖残基可以在碳6位包含一个羧酸基团(末端单糖残基是糖醛酸, HexA 或者 HexANAc, 其中 Hex 是 Gal 或 Glc), 或 HexA (Nac) 残基碳6位的衍生物, 或碳6位相应于 Hex (Nac) 残基的碳6衍生物。这种末端残基优选包括 β 3-连接的葡糖醛酸和更优选其6-酰胺如甲酰胺。因此序列类似物或衍生物可以通过对三糖表位的末端6-位进行改变或衍生产生。
- 25

30 优选的结合幽门螺杆菌的物质

当存在于薄层表面时, 可以发现本发明所述的寡糖序列是一种非显而易

见的有效的结合剂。该方法允许糖脂序列的多价表达(presentation),寡糖序列多价表达的惊人高活性形成多价的一种优选方法来表现本发明的寡糖序列。

5 糖脂结构以多价形式天然存在于细胞膜上,这种类型的代表可以通过以下描述的固相检测或制备糖脂或新糖脂的脂质体来模拟。

通过疏水十六烷基苯胺的还原性氯化产生所述的新的新糖脂(neoglycolipid)可以提供寡糖有效的表达。大多数先前知道的用于结合细菌的新糖脂糖缀合物含有一个负电荷基团,如磷脂酰(phosphadityl)乙醇胺新糖脂的磷脂。这种化合物的问题在于该物质带有负电荷并且其磷脂结构内
10 存在天然生物学的结合。在众多与蛋白和其他生物学物质的非-特异性结合中,负电荷分子的作用是已知的。而且,许多这样的结构是易变的,可以被酶促或化学降解。本发明涉及寡糖序列的非-酸性糖缀合物,其意思就是寡糖序列与非-酸性化学结构结合。优选的,非-酸性糖缀合物是中性的,其意思就是寡糖序列是与中性的、不带电的化学结构连接。根据本发明优选的糖
15 缀合物是多价物质。

现有技术中常常通过还原部分受体活性寡糖结构将具有生物活性的寡糖序列附着于载体结构上。已经使用了含有链 $(-CH_2-)_n$ 和/苯甲基环的疏水性间隔基团,然而,蛋白与其它生物活性分子的非特异性互作与疏水结构相关是公知的。

20 随后实施例的新糖脂数据表明,在检测中使用的试验条件下,新糖脂化合物中的十六烷基苯胺部分不能引起与所研究细菌的非-特异性结合。在新糖脂中,糖缀合物的十六烷基苯胺部分可能形成了一个脂质层似结构并不适宜于结合。本发明表明属于结合表位的还原性单糖残基可以破坏结合,这也使得我们进一步了解到还原单糖可以用作亲水的间隔基团来连接受体表位
25 和多价的表达结构。根据本发明优选经由亲水间隔基团将生物活性寡糖与多价或多化合价(multivalent)的载体分子连接以形成多价或低价/多化合价的结构。这里优选作为多价结构的所有多价(包含10个以上寡糖残基)和低价/多化合价结构(包含2-10个寡糖残基),尽管这依赖于应用,但低价/多化合价结构可能更优选大的多价结构。亲水的间隔基优选包括至少一个羟基,
30 更优选包括至少两个羟基,最优选包含至少三个羟基。

根据发明亲水间隔基优选是包含一或几个-CHOH-基的柔性链和/或一种

酰胺侧链如乙酰胺-NHCOCH₃或烷基酰胺。羟基基团和/或乙酰胺基团都能保护来自于体内酶水解产生的间隔基团。术语“柔性的”指间隔基团包含柔性键并且没有柔性时不能形成环状结构。本发明中通过还原性氨化等形成的还原单糖残基是柔性亲水间隔基团的例子。柔性亲水间隔基团是避免新糖脂或多价缀合物的非特异性结合的优选。例如，在生物检测及对药物或功能性食物的生物活性的基本最佳活性。

例如，一种具有柔性亲水接头的缀合物通式具有以下的通式 2:



其中 L₁ 和 L₂ 是连接基团，它们各自独立含有氧、氮、硫或碳键合原子或两个联接的原子，这些原子形成的化学键如-O-，-S-，-CH₂-，-N-，-N(COCH₃)-，酰胺基团-CO-NH-或-NH-CO-或-N-N-（胍衍生物）或氨基氧-键-O-N-和-N-O-。L₁是自 X 的还原末端单糖的碳 1 位的键，或者当 n = 0 时，L₁ 代替氧键并直接从 OS 的还原性末端 C1 起连接。

p₁、p₂、p₃ 和 p₄ 分别独立为从 0 到 7 的整数，限制条件是 p₁、p₂、p₃ 和 p₄ 中至少一个至少为 1。在支链形式 {CH₁₋₂OH}_{p₁} 中的 CH₁₋₂OH 表明链的终止基团是 CH₁₋₂OH，而且当 p₁ 大于 1 时仲醇基-CHOH-将终止基团与间隔基团的剩余部分连接起来。R 优选乙酰基基团(-COCH₃)或 R 是一种与 Z 连接的可选择的键，然后 L₂ 是一或二原子链终止基团。在另一个方案中，R 是一种包含含有形成胺的酰胺结构或 H 或 C₁₋₄ 烷基的 C₁₋₄ 酰基基团(优选亲水的如羟烷基)的类似物形成基团，而且 m > 1，Z 是多价载体，OS 和 X 已经在通式 1 中作了定义。

优选的多价结构包括相应于通式 2 中所述的一个柔性的亲水间隔基团。结合幽门螺杆菌的寡糖序列 (OS) β 1-3 与 Gal β 4Glc (red)-Z 和 OS β 6GalNAc (red)-Z 连接，其中“(red)”指通过将末端单糖和多价载体 Z 的氨基基团进行还原性氨化作用形成的胺键结构。

在本发明中，寡糖基团优选以一种多价或低价形式与载体连接，其中载体不是一种蛋白或肽，从而可以避免抗原性和可能的过敏反应，优选骨架是一种天然非抗原性的多糖。

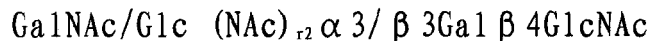
当对糖脂和新糖脂的结合活性进行比较时，发现含有 Gal α 3Gal β -的序列在薄层板上进行多价表达中具有较低的活性，末端带有 Gal β 4GlcNAc-的序列的活性还要更弱一些。因此依据本发明的最佳多价非酸性物质包括一

种末端寡糖序列



其中 $q1$ 、 $q2$ 、 $r1$ 、 $r2$ 和 u 分别各自为 0 或 1，具有限制性的是当 $q1$ 和 $r1$ 都为 0 时，非还原性末端终止单糖残基就不是 $\text{Gal} \alpha$ 。更优选 $u=0$ ，最优

5 选以多价形式存在的寡糖序列



其中 $r2$ 独立为 0 或 1，并且是其一种类似物或衍生物。

随后的寡糖序列是特别优选的，这些代表结构还未被从人或动物组织的组织描述过，如 $\text{Glc (A)}_q (\text{NAc})_r \alpha 3 / \beta 3 \text{Gal} \beta 4 \text{Glc (NAc)}_u$ ，其限制性条件是当寡糖序列含有 $\beta 3$ 键时， q 和 r 为 1 或 0；或者 $\text{Gal} \alpha (\text{NAc})_r \alpha 3 / \beta 3 \text{Gal} \beta 4 \text{Glc (NAc)}_u$ 。

上述寡糖序列的新颖性使得它们成为特别优选的方案，还没有已知的剪切这种序列的糖苷酶。因此，这种序列是尤其稳定的并且优选处于生物学环境下。本发明所述序列的天然形式可被糖苷酶剪切，从而当用于人体或动物体时，减少了它们的有效性。已知剪切序列的糖苷酶在人胃肠道中是具有活性的。几种糖苷酶如 N-乙酰己糖胺酶或半乳糖苷酶已经被作为消化酶描述过，并且还存在于食物材料中。

根据本发明可以认识到新物质还可用于抑制艰难梭菌 *S.* 的毒素 (Teneberg 等, 1996)。毒素 A 与已知物质的结合情形与这里描述的幽门螺杆菌的特异性相似。因此，结合幽门螺杆菌的物质可以用于治疗，如由艰难梭菌引起的腹泻。

糖脂和糖类命名法遵循 IUPAC-IUB 生化命名委员会 (Biochemical Nomenclature) 中的建议 (Carbohydrate Res., 1998, 312, 167; Carbohydrate Res., 1997, 297, 1; Eur. J. Biochem. 1998, 257, 29)。

25 设想 Gal、Glc、GlcNAc 和 Neu5Ac 是 D-构型，Fuc 为 L-构型，并且所有的糖以吡喃形式存在。葡糖胺指 GlcN 或 GlcNH_2 等，半乳糖胺指如 GalN 或 GalNH_2 。糖苷键的命名法部分遵循简略命名法，部分遵循长命名法，Neu5Ac-残基 $\alpha 3$ 和 $\alpha 6$ 之间的键分别与 $\alpha 2-3$ 与 $\alpha 2-6$ 相似，与其它单糖残基 $\alpha 1-3$ 、 $\beta 1-3$ 、 $\beta 1-4$ 和 $\beta 1-6$ 分别可以缩写为 $\alpha 3$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 和 $\beta 6$ 。乳糖胺指 N-乙酰乳糖胺， $\text{Gal} \beta 4 \text{GlcNAc}$ ，和唾液酸是 N-乙酰神经氨酸 (Neu5Ac) 或 N-羟乙醛基神经氨酸 (Neu5Gc) 或任何其他天然唾液酸。

术语聚糖在这里指存在于人或动物糖缀合物中尤其是糖脂或糖蛋白上广泛的寡糖或多糖链。在脂肪酸和碱的速记命名法中，冒号前的数字指碳链长度，且冒号后的数字指分子中双键的总数。缩写 GSL 指糖鞘脂。缩写或短命名或符号在本文中和表 1 和 2 中给出。幽门螺杆菌还指与幽门螺杆菌相似的细菌。

对本发明中十六 (Nac)-糖醛酸和它们的衍生物和残基作以下的说明：GlcA 是葡糖醛酸和葡萄糖或葡糖醛酸碳 6 衍生物，GalA 是半乳糖醛酸和半乳糖或半乳糖醛酸碳 6 衍生物，GlcANac 是 N-乙酰葡糖醛酸和 N-乙酰葡糖胺碳 6 衍生物或是 N-乙酰氨基葡萄糖糖醛酸碳 6 衍生物，和 GalANac 是 N-乙酰半乳糖胺糖醛酸及 N-乙酰半乳糖胺或 N-乙酰半乳糖胺糖醛酸碳 6 衍生物。

“末端寡糖序列”的措辞意思是寡糖没有被另一种单糖残基取代非还原性终端残基。

术语“ $\alpha 3 \beta 3$ ”表明寡糖序列中的相邻残基可以通过 $\alpha 3$ -or $\beta 3$ -1 相互连接。

本发明用以下的实施例作进一步的详述，但决不是用此来限定本发明的范围。

实施例

20 材料与amp;方法

材料 TLC 硅胶 60 (铝) 板来自于 Merck (Darmstadt, 德国)。所有研究的糖鞘脂都是在本实验室获得。 β -半乳糖苷酶 (埃希氏大肠杆菌) 购自 Boehringer Mannheim (德国), Ham's F12 培养基来自于 Gibco (U. K.), ^{35}S -甲硫氨酸从 Amersham (U. K.) 获得, FCS (胎牛血清) 从 Sera-Lab (英国) 获得。 β 4-半乳糖苷酶 (肺炎链球菌)、 β -N-乙酰己糖胺酶 (肺炎链球菌) 和唾液酸酶 (Arthrobacter ureafaciens) 来自于牛津 GlycoSystems (Abington, U. K.)。分别来自于胃炎患者和十二指肠溃疡患者的临床分离出的幽门螺杆菌 (菌株 002 和 032) 赠自于 D. Danielsson 博士 (Orebro 医学中心, 瑞典)。典型菌株 17875 来自于 Göteborg 大学 (CCUG) 的培养收集。

糖鞘脂_ 图 7A 和 7B 显示的试验用纯化糖鞘脂通过所述列于表 2 (Karlsson, 1987) 来源的总的酸性或非酸性片段来制备。通常, 个别糖鞘

脂通过对总糖鞘脂级分乙酰化 (Handa, 1963) 并且在硅胶柱上重复进行色谱而将各个糖鞘脂分离, 纯化的糖鞘脂用质谱法 (Samuelsson 等, 1990)、波谱 (Falk 等, 1979a, b, c; Koerner Jr 等, 1983) 和降解研究 (Yang 和 Hakomori, 1971; Stellner 等, 1973) 进行结构鉴定。后面将对来源于兔胸腺的糖脂进行描述。

5 纯化糖脂 从 1000 g 兔胸腺丙酮粉中分离出酸性糖鞘脂 (Pel-Freeze Biological Inc., North Arkansas, Ark. US)。丙酮粉在 Soxhlet 装置上用氯仿/甲醇 2: 1 (体积比, 除非另有说明) 萃取 24 小时, 接着用体积比为 8: 1: 1 的氯仿/甲醇/水提取 36 小时。提取的 240 g 脂质进一步用 Folch 法分
10 离 (Folch 等, 1957) 并通过 DE23 纤维素离子交换凝胶色谱收集亲水相 (DEAE, Whatman, Maidstone, UK)。经过分离步骤获得 2.5 g 酸性糖鞘脂。用开放管状色谱法通过离子交换凝胶在玻璃柱上根据硅酸的数量分离神经节苷脂 (50 mm i. d)。柱与 HPLC 泵连接产生一种凹面 (concave) 梯度 (pre-programmed gradient no 4, System Gold Chromatographic Software, Beckman
15 Instruments Inc., CA, USA), 开始使用甲醇, 用溶于甲醇的 0.5 M CH₃COONH₄ 终止。以流速 4 ml/分钟收集 200 种级分, 每一级分 8 ml。将 300-400 mg 神经节苷脂混合物同时加样在 500 g 的 DEAE 琼脂糖上 (CL6, Pharmacia, Uppsala, 瑞典, 基准高度约为 130 mm)。单唾液酸神经节苷脂在 300 mm x 22 mm 硅胶柱 (孔径为 120Å, 10µm 粒子孔径, SH-044-10, Yamamura Ltd., Kyoto,
20 Japan) 上进一步经 HPLC 分离。获得约 150 mg 单唾液酸神经节苷脂并通过强的洗提梯度洗脱 (氯仿/甲醇/水的体积比从 60/35/8 到 10/10/3, 流速为 4 ml/min, 240 级分)。

部分酸水解 在 100°C 时在 1.5% 的 CH₃COOH 水溶液中对神经节苷脂进行脱唾液酸作用, 获得物质经 NaOH 中和并在氮环境中干燥。为了部分降解
25 碳水化合物骨架, 在 0.5M HCl 中将糖脂置于热水浴中水解 7 分钟。这样该物质被中和并通过 C/M/H₂O (8 : 4: 3, v/v) 2 进行分离。收集下相, 氮下蒸发, 回收的糖脂用于分析。

通过酶水解六糖基神经酰胺制备五糖基神经酰胺 通过酸性脱唾液酸作用得自七糖基神经酰胺 (4 mg, 来自于兔胸腺) (结构 1, 表 1) 的六糖基神
30 经酰胺 (结构 2, 表 1) 溶解于 C/M (2: 1) 并经硅胶柱 (0.4 x 5 cm) 纯化, 用 C/M/H₂O (60: 35: 8, v/v) 洗脱。收集到约 0.2 ml 的级分并将之用于检

测糖类的存在。回收的六糖基神经酰胺(2.0 mg)溶于1.5 ml 0.1M的磷酸钾缓冲液,该缓冲液pH为7.2,其中含有牛磺酸脱氧胆酸钠(1.5 mg/ml)、 $MgCl_2$ (0.001 M)和 β -半乳糖苷酶(大肠杆菌,当用2-硝基苯- β -D-半乳糖苷作为底物检测时500 U),样本在37°C过夜培养,将物质置于C/M/H₂O (10:5:3)中进行分离并收集含有糖脂的下相,然后使用上述用于六糖基神经酰胺的硅胶柱层析(0.4 x 5 cm柱)法纯化获得糖脂。为了移走所有污染的洗涤剂,将层析重复两次,回收的五糖基神经酰胺的终产量为0.7 mg。

内源糖基神经酰胺酶消化糖脂(Ito和Yamagata, 1989) 反应混合物包含200 μ g糖脂、80 μ g牛磺脱氧胆酸钠和由pH 6.0的160 μ l 50 mM的醋酸盐缓冲液稀释的0.8 mU的酶,样品37°C过夜温育后,加水(140 μ l)和C/M(体积比为2:1, 1500 μ l),对样品进行振荡和离心。在氮气中干燥上相,并将之溶于少量的水后在Sephadex G-25柱(0.4x10 cm)上脱盐,该柱在H₂O中平衡并用水洗脱。收集到0.1 ml的级分并将之用于检测糖的存在。

糖的过甲基化 根据Larson等1987年报道的方法对糖进行过甲基化。按照Needs和Selvendran 1993年建议在甲基碘化物加入样本之前加入氢氧化钠。在某些实验中,在糖基甲基化之前用NaBH₄进行还原。在该例子中甲基碘化物的量增至终比率为DMSO(二甲基亚砷)/甲基碘化物为1:1(Hansson和Karlsson, 1990)。

气相色谱法/质谱法 气相色谱在Hewlett-Packard 5890A系列II气相色谱仪上进行,该色谱仪装备有一个柱注入器和一个火焰离子检波器。过甲基化的寡糖在一个覆盖有交联PS264(膜厚0.03 μ m)熔化的硅毛细管柱(Fluka, 1 lm x 0.25 mm i. d.)上分析,将样品溶于乙基醋酸盐溶液并在80°C时注射入进样柱(on-column),柱内温度以10°C/min的速度从80°C升至390°C。寡糖的过甲基化气相色谱法-质谱法在Hewlett-Packard 5890A系列II气相色谱仪连接JEOL SX-102质谱仪(Hansson和Karlsson, 1990)上进行,通过使用Xe原子轰击(10 kV)和三乙醇胺作为基质产生阴性FAB光谱。

NMR波谱 在Jeol Alpha 500(Jeol, Tokyo, Japan)波谱仪上于11.75 T获得质子NMR波谱。样品在分析之前进行氘交换,在30°C用0.35 Hz/pt的数字分辨记录波谱。使用内在溶解信号给出相对于TMS(四甲基矽甲烷)的化学位移。

分析性酶促试验 根据使用手册的说明进行 Oxford GlycoSystems 酶促试验,除了在每个温育的混合物中加入 Triton X-100 至终浓度为 0.3%,当唾液酸酶和 β 4-半乳糖苷酶混合物用来消化时,采用来自 β 4-半乳糖苷酶试剂盒的温育缓冲液;如果在消化混合物中存在 β -己糖胺酶时相应地使用该酶试剂盒的缓冲液。温育混合物中酶浓度为: Hex β 4HexNAc-半乳糖苷酶 (*S. pneumoniae*) 为 80mU/ml, 对于 β -N-乙酰己糖胺酶 (*S. pneumoniae*) 为 120 mU/ml, 和唾液酸酶 (*Arthrobacter ureafaciens*) 为 1 U/ml。底物浓度为约 20 μ M。37 $^{\circ}$ C 下酶消化过夜。消化后,干燥样品,采用 Sephadex G-25 小柱脱盐 (Wells and Dittmer, 1963), 0.3g, 在 C/M/H₂O (60: 30: 4.5, v/v) 平衡。每一样品上柱为同样溶剂中 2ml, 采用 2.5ml C/M/H₂O (60: 30: 4.5, v/v) 和 2.5ml C/M (2: 1) 洗脱。收集加样和洗涤溶液并在氮气中使之挥发。

其它分析方法 己糖根据 Dubois 等 (1956) 的方法来确定。

脱-N-酰化作用 通过用前述的 (Angstrom 等, 1998) 无水肼处理各种糖鞘脂, 将 GlcNAc/GalNAc 残基乙酰氨基部分转化为胺。

细菌生长 将幽门螺杆菌株贮存在 -80 $^{\circ}$ C 含有 15% 甘油 (按体积) 的胰蛋白酶大豆培养基中, 细菌首先在 GAB-CAMP 琼脂 (Soltesz 等, 1988) 上以湿度 (98%) 微需氧条件 (5-7% 的 O₂, 8-10% 的 CO₂, 和 83-87% 的 N₂) 于 37 $^{\circ}$ C 培养 48-72 小时。为进行标记, 将菌落接种于 GAB-CAMP 琼脂上, 除了图 1A 和 1B 显示的结果, 另外还替代使用了 Brucella 琼脂, 同时向平板上喷洒用 0.5 ml 磷酸缓冲液 (PBS) 稀释的 pH 7.3 的 50 μ Ci ³⁵S-甲硫氨酸 (Amersham, U. K.)。在微需氧条件下于 37 $^{\circ}$ C 培养 12-24 小时后将细胞刮下, 用 PBS 洗涤三次, 并在 PBS 中重悬成 1x10⁸ CFU/ml。或者, 将菌落接种于添加了 10% 热灭活的胎牛血清 (Sera-Lab) 的 Ham's F12 培养基 (Gibco BRL, U. K.) 中。为进行标记, 按每 10 ml 培养基 50 μ Ci ³⁵S-甲硫氨酸的量加入 ³⁵S-甲硫氨酸, 将培养基在 37 $^{\circ}$ C 微需氧条件下振荡保温 24 小时。经离心收集细菌细胞, 并纯化培养基和经相差显微镜检测以确保球菌形式含量很低。用 PBS 洗涤两次后将细胞在 PBS 中重悬成 1x10⁸ CFU/ml。两种标记方法得到每 100 个幽门螺杆菌大约 1 cpm 比活性的悬液。

TLC 细菌涂覆测试 在玻璃-或铝支持的 60 HPTLC 板 (Merck, Darmstadt, Germany) 上, 用氯仿/甲醇/水 (体积比为 60: 35: 8) 作为溶剂系统进行薄

层色谱。化学测定通过茴香醛染色来完成 (Waldi, 1962)。细菌涂覆测试按上述的方法 (Hansson 等, 1985) 进行。糖鞘脂 (1-4 μ g/泳道, 或如图例所示) 在铝支持的硅胶板上进行层析, 然后用 0.3-0.5% 的多聚异丁基异丁烯酯的二乙醚/n-正己烷 (按体积 1: 3) 处理 1 分钟, 干燥后浸入含有 2% 牛血清白蛋白和 1% Tween 20 的溶液中 2 小时。将放射性标记的细菌 (用 PBS 稀释成 1×10^8 CFU/ml 和 $1-5 \times 10^6$ cpm/ml) 的悬液喷洒在色谱上温育 2 小时并在用 PBS 重复洗涤。干燥后, 使用 XAR-5X-线胶片 (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA) 将薄层板进行放射自显影 12-72 小时。

TLC 蛋白涂覆测试 按照 Iodogen 法 (Aggarwal 等, 1985) 对单克隆抗体 TH2 和来自于 *Erythrina cristagalli* (载体实验室, Inc., Burlingame, CA) 的凝集素进行 125 I-标记, 产生的量平均为 2×10^3 cpm/ul。除了涂覆过程中没有试验 Tween 外其它与上述用于细菌的方法相同, 用 PBS 稀释成约 2×10^3 cpm/ul 含有 20% 牛血清白蛋白的 125 I-标记的蛋白用于替代细菌悬液。

分子建模 列于表 1 的糖鞘脂的最低能量构象用 Biograf 分子成模程序 (Molecular Simulations Inc.) 在 Silicon Graphics 4D/35TG 工作站上使用 Dreiding-II 分子力场 (force field) (Mayo 等, 1990) 计算。使用电荷平衡方法 (Rappe 和 Goddard III, 1991) 产生部分原子电荷, 并且将距离依赖的介电常数 ($\epsilon = 3.5r$) 用于 Coulomb 相互作用中。此外使用特殊的氢原子成键 term, 其中最大相互作用 (Dhb) 设置为 -4 kcal/mol。Glc β 1Cer 键的双面角的定义如下: 起始于葡萄糖末端的 $\Phi = \text{H}-1-\text{C}-1-\text{O}-1-\text{C}-1$ 、 $\Psi = \text{C}-1-\text{O}-1-\text{C}-1-\text{C}-2$ 和 $\theta = \text{O}-1-\text{C}-1-\text{C}-2-\text{C}-3$ (见 Nyholm 和 Pascher, 1993)。

当存在 8 mM MnCl_2 和 0.2 mg/ml ATP 时, 通过将受体糖类与人血清 β 3-N-乙酰糖胺转移酶和 UDP-GlcNAc 放入 50 mM pH 7.5 TRIS-HCl 中于 37 摄氏度温育 5 天, 可以由 Gal β 4GlcNAc 合成寡糖 GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc (Sigma, St. Louis, USA) 和由 Gal β 4GlcNAc β 6GlcNAc 合成 GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6GlcNAc。通过将二糖与 β 4-半乳糖苷转移酶 (牛奶, Calbiochem., CA, USA) 和 UDP-Gal 在 20mM MnCl_2 存在时在 50 mM MOPS-NaOH (pH 7.4) 中温育几个小时自 GlcNAc β 6GlcNAc (Sigma, St Louis, USA) 获得 Gal β 4GlcNAc β 6GlcNAc。按照生产者建议的用 400 mU β 3/6-半乳糖苷酶过夜处理己糖 Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc (1 mg, 获自 Dextra 实验室, UK), 寡糖经层析纯化, 它们的纯化度经由 MALDI-TOF 质谱法和 NMR 来确定。Gal

5 α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc 获自 Dextra 实验室 (reading, UK)。按照 Lanne 等 (1995) 描述的将糖脂 GlcA β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan) 还原成 Glc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer。根据 Lanne 等 (1995) 描述的通过将 GlcA β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer 的葡糖醛酸的羧基基团氨基化生成糖脂衍生物 Glc (A-甲酰胺) β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer。

结果

10 利用上述 HPLC 从兔胸腺中纯化七糖基神经酰胺 NeuGc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer, 并通过 NMR 和质谱法确定其结构 (数据未给出)。本发明人实验室中分离检测的大部分幽门螺杆菌都能结合七糖神经节苷脂。

15 为了检测七糖基神经酰胺物质中可能的最小异构成分, 神经节苷脂被脱唾液酸, 用内源性糖基神经酰胺酶处理后在其释放出的寡糖被过甲基化, 并通过气相色谱法和 EI/MS 分析, (图 1A 和 1B)。在六糖区域鉴别出两种显示出预期糖序列 Hex-HexNAc-Hex-HexNAc-Hex-Hex 的糖, 在 m/z 219、464、668、913 和 1118 的片断离子 (fragment ion) 证实了这一点。当在甲基化之前糖被转化为糖醇 (通过 NaBH_4 还原) 时, 除了先前列出的离子外在 m/z 235、684
20 和 1133 还发现了明显的片断离子 (数据未给出)。在 m/z 182 的强片断离子证实了 β 4GlcNAc (新乳系列, 2 型糖链) 的存在, 由此可以定性超过物质总量 90% 的主要的糖 (峰 B, 图 1A 和 1B)。少量糖 (峰 A, 图 1A 和 1B) 给出了 1 型糖链 (乳糖 (lacto) 系列) 的波谱, 其在 m/z 182 有一个非常弱的片断离子和在 m/z 228 有一个强片断离子。制备的物质还包括微量的其它糖类
25 (sugar-positive) 物质, 这些物质可能是含有 4-和 5-糖的相同系列的糖。在混合物中未发现含有糖的海藻糖。脱唾液酸神经节苷脂 (asialoganglioside) 的纯度还可以通过 FAB/MS 和 NMR 色谱测定。七糖基神经酰胺的阴性 FAB/MS (图 2A) 证实了预期糖序列并显示出神经酰胺主要由鞘氨醇和 C16:0 脂肪酸 (m/z 536.5) 组成。由七糖基神经酰胺获得的 NMR 波谱 (图 3A) 显示其在 β -结合 ($J_{1,2} \approx 8$ Hz) 的端基异构区含有 4 个主要的双
30 重峰 (doublets), 它们的强度比率为 2: 2: 1: 1。在 4.655 ppm (GlcNAc

β 3)、4.256 ppm (内在 Gal β 4)、4.203 ppm (末端 Gal β 4) 和 4.166 ppm (Glc β) 处的信号与先前出版的 nLc0se6-Cer (Clausen 等, 1986) 的结果一致。在 4.804 ppm 处还有一个小的双重峰, 它与 1.81 ppm 的一个小的甲基信号 (看作是大的 2 型甲基谐振的一个肩部) 连在一起, 这表
5 明了一个含有 1 型链的小的级分。由于 4.15 到 4.25 ppm 区域的重叠, 故不能确定这种 1 型键的位置和分布。1 型键的总量大致为 10%, 而通过 β -半乳糖苷酶消化获自己糖基神经酰胺的五糖基神经酰胺中 1 型链的数量约为 5%, 由此看来 1 型键均匀地分布于糖链的内在和外部, 例如 5% 的糖脂可能是 1 型-1 型。

10 为了查明糖脂的结合活性是否与主要的新乳糖 (neolacto) (2 型) 结构相关联, 用 β 4-半乳糖苷酶和 β 4-己糖胺酶处理脱唾液酸-糖脂, 并通过 TLC 和涂覆实验来研究产物 (图 4A, 4B 和 4C)。如预期的, 首先酶促使六糖基神经酰胺转化为七糖基神经酰胺 (4A, 泳道 3), 并且两种酶的混合物将物质降解成乳糖苷神经酰胺 (4B, 泳道 6)。根据对 TLC 板的目视评估, 两个
15 反应是完全的或几乎是完全的, 通过唾液酸和酸处理物质获得了相同的结果。伴随着六糖基神经酰胺被 β 4-半乳糖苷酶降解, 在 TLC 板上该糖脂结合幽门螺杆菌区域的结合活性消失了, 而同时在七糖基神经酰胺区域出现了强的活性 (4C, 泳道 3), 对七糖基神经酰胺的进一步酶降解导致了该区域结合活性的消失, 在四-糖区域没有观察到存在结合活性。TLC 板的化学染色的灵敏度太低以致于不能观察到微量的物质。
20

在个别实验中, 亲代神经节苷脂进行部分酸降解, 释放出的糖脂用于研究幽门螺杆菌的结合活性。图 5A 和 5B 显示了在用 ^{35}S -标记的幽门螺杆菌涂覆于水解产物上后水解产物的 TLC 结果 (5A) 和相应的放射自显影 (5B)。定位
25 于六-、五-、四-和二糖基神经酰胺区域的糖脂显示出结合活性, 但是三糖基神经酰胺却是失活的。

当用至少三种幽门螺杆菌菌株 (17875, 002 和 032) 来检测时, 六-、五-、四-糖基神经酰胺与菌株的结合是相近的。

在从六糖基神经酰胺分离出末端半乳糖并用硅胶层析纯化后, 在较大的尾部观察到产生的强的结合七糖基神经酰胺的活性, 该糖脂的阴性 FAB/MS
30 波谱证实了 HexNAc-Hex-HexNAc-Hex-Hex-糖序列的存在并且表明了象六糖基神经酰胺一样的神经酰胺组分 (图 2B)。由五糖基神经酰胺获得的质子 NMR

波谱 (图 3B) 在端基异构区含有 4 个主要的 β -双重峰 (doublet), 分别位于 4.653 ppm (内在 GlcNAc β 3)、4.615 ppm (末端 GlcNAc β 3)、4.261 ppm (两倍强度, 内在 Gal β 4) 和 4.166 ppm (Glc3), 与 GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer 一致并与被脱离掉末端 Gal β 的六糖化合物完全一致。

5 相应于 β -替代的 GlcNAc β (1 型链) 在 4.787 ppm 处还有一个小的 β -双重峰, 在 1.82 ppm 处也观察到了作为许多大的甲基化信号肩膀的预期的甲基化信号, 但重叠抑制了这些信号的量化。端基异构质子部分可以占到含有 1 型链糖脂的 6%, 因此 2 型和 1 型糖链的相对比例近似于六糖糖脂。在 TLC 板上在六-和五糖基-部分呈现的两个斑点反映了糖链化合物中存在的一种

10 神经酰胺异质, 而不是与通过它们对 β 4-半乳糖苷酶的易感性来判断的差异。在非选择性水解唾液酸神经节苷脂和选择性剪切来自于唾液酸产物的 4-键合半乳糖后均可以呈现上述五-区域的斑点, 而且, 当含有高通量上部层析亚片断的六糖基神经酰胺被 β 4-半乳糖苷酶和 β 4-己糖胺酶降解时, 产生的乳糖苷神经酰胺会显现出两条明显的色谱条带。色谱法同质的六糖基

15 神经酰胺导致仅有一条乳糖苷神经酰胺带。涂覆试验表明五-区域的上部和下部都是高度活性的。

使用 TLC 涂覆法通过半-定量实验来检测含有 6、5 和 4 糖 (结构 2、4 和 5, 表 I) 的新乳系列的糖鞘脂, 系列稀释的糖鞘脂加样到硅胶板上并涂覆标记过的细菌, 然后通过目测评估并进行放射自显影 (图 6A 和 6B)。最有

20 活性种类是五糖基神经酰胺, 其在降至 0.039 nmol/spot 的量 (7 个试验计算出的平均值, 标准离差 $\delta_{n-1} = 0.016$ nmol) 的过程中在 TLC 板上呈现为阳性反应, 六-和四糖基神经酰胺分别以 c: a 为每点 0.2 和 0.3 nmoles 糖脂的量粘附幽门螺杆菌。

结合幽门螺杆菌的研究系列中更高级糖脂是高度可重复的。记录的幽门

25 螺杆菌菌株 032 与五糖基-和六糖基神经酰胺的结合频率约为 90% (板的总数约为 100)

结合检测揭示了异构受体和结合的特异性 (图 7A 和 7B)。

除了来自于兔胸腺的七-糖糖鞘脂具有新乳核心 NeuGc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer 和来源于其的四-到六糖基神经酰胺

30 外, 来自于新乳系列的其它糖脂也可以具有结合特异性。

图 7A 和 7B 为通过涂覆实验显示的幽门螺杆菌与在薄层板上分离的纯化糖鞘脂的结合。这些结果与那些来自于额外数量的纯化糖鞘脂被归纳在表 2 中。幽门螺杆菌与新乳四糖基神经酰胺 (泳道 1) 及来源于 NeuGc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer 的五-和六-糖糖鞘脂 (泳道 5 和 6) 的结合与上述结果是等同的。然而出乎意料地是, 还发现了幽门螺杆菌与 GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer (x2 糖鞘脂, 泳道 7) 和脱岩藻糖基 A6-2 糖鞘脂 GalNAc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer 的结合 (第 12, 表 2), 同时还发现了 Gal α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer (B5 糖鞘脂, 泳道 2) 也具有结合活性, 这些结果表明存在交联的可能性而不是存在对这些糖鞘脂中每一个具有特异性的多重粘附 (见下文)。而且, 不同的含有只提及了可以耐受细菌粘附糖鞘脂的五-糖仅有的延长形式是将 Gal β 4 加至来源于胸腺的 GlcNAc β 3-终止的化合物上 (泳道 6)。其它延长结构如 NeuAc-x₂ (泳道 8) 和 GalNAc β 3-B5 (第 25, 表 2) 均被发现是不能结合的。由此可以进一步认识到 B5 中内在的乙酰氨基基团 GlcNAc β 3 对于结合是至关重要的, 因为通过无水肼处理使得这些部分脱-N-酰化作用导致了活性的完全丧失 (泳道 3), 就是当新乳四糖基神经酰胺被作相似处理时也出现了相同结果 (第 6, 表 2)。

五-糖糖鞘脂的交联结合。为了理解本研究中基于不同新乳-的糖鞘脂分子的结合特性, 通过分子建模来研究活性和非活性结构构象的参数选择。图 8A、8B、8C 和 8D 显示了 X₂ 糖鞘脂和其它三种序列脱岩藻糖基 A6-2、B5 及脱-N-酰化作用 B5 之间具有相近的结合强度, 其中除修饰的 B5 外。来自于兔胸腺的五-糖糖鞘脂 (图 9A) 也可以被包括进这种比较中, 因为仅在末端残基的位置 4 与 X₂ 结构不同的这种结构一样具有活性。因此四种均含有新乳核心的结构是分别由 GalNAc β 3, GalNAc α 3, Gal α 3 和 GlcNAc β 3 终止的序列。按前述方法 (Teneberg 等, 1996) 产生这些结构的最低能量构象, 表 2 中给出的其它最低能量结构是参考了文献中已经记载的 (Bock 等, 1985; Meyer, 1990; Nyholm 等, 1989)。关于唾液酸-终止的糖鞘脂, 采用倾斜的构象用于 α 3-键合残基的糖苷双面角, 如图 9C 所示, 但其它构象的效应 (Siebert 等, 1992) 尤其是背斜的构象也被进行了测试。为了相同的目还产生了几个 α 6-键合的几个不同的低能量构象 (Breg 等, 1989)。

如上所述, 四种具有结合活性的五-糖糖鞘脂(表 2 第 10-13) 都含有一个新乳核心的事实表明交联至相同粘附位点可能是隐藏在这些观察背后的反应。在第一次看时, 仍然让人惊讶的是虽然 B5 糖鞘脂与从兔胸腺获得的五-糖化合物比较在末端位置上不同, 前者具有 $\text{Gal } \alpha 3$, 后者具有 $\text{GlcNAc } \beta 3$, 但是它们一样都具有活性并都具有新乳系列的结合特异性。不管这些化合物存在两种末端糖的事实, 在它们的端基异构键中也存在差别, 从图 8C 和 9A 可以看出它们拓扑异构的最低能量结构是非常接近的, 差别在于 $\text{Gal } \alpha 3$ 缺少一个乙酰氨基而在轴向位置有一个 4-OH 并且它的环状平面微升至五-糖化合物中相应平面之上。然而既不是 4-OH 位置也不是缺少/存在一个乙酰氨基显示出对结合是至关重要的, 因为分别由 $\text{GalNAc } \beta 3$ 和 $\text{GalNAc } \alpha 3$ 终止的 X_2 和脱岩藻糖基的 A6-2 糖鞘脂(图 8A, B) 对于幽门螺杆菌粘附素都具有相近的亲合力。根据这些发现, 可以预见从人红血球分离的 $\text{Gal } \beta 3\text{Gal } \beta 4\text{GlcNAc } \beta 3\text{Gal } \beta 4\text{Glc } \beta \text{Cer}$ (Stellner 和 Hakomori, 1974) 也应具有结合细菌粘附素的活性。根据结合的法则结合幽门螺杆菌的表位中的三种其它末端单糖也有可能是三糖表位, 命名为 $\text{GlcNAc } \alpha 3\text{Gal } \beta 4\text{GlcNAc}$ 、 $\text{Glc } \beta 3\text{Gal } 4\text{GlcNAc}$ 和 $\text{Glc } \alpha 3\text{Gal } \beta 4\text{GlcNAc}$ 。迄今为止这些来源于人组织的化合物还是未知的, 但却代表了相当天然受体类似物, 而不仅仅是凑巧检测了 $\text{Gal } \beta 3\text{Gal } \beta 4\text{GlcNAc}$ -糖脂或这三种类似物而已。

新乳七-糖化合物 $\text{NeuGc } \alpha 3\text{Gal } \beta 4\text{GlcNAc } \beta 3\text{Gal } \beta 4\text{GlcNAc } \beta 3\text{Gal } \beta 4\text{Glc } \beta \text{Cer}$ 也用来分子建模。图 10 显示了在延长构象中含有 $\text{Glc } \beta \text{Cer}$ 键的最低能量构象的两种不同方案。

虽然给出了唾液酸的顺错 (*syn clinal*) 构象但在无支链结构中也可能有反构象异构体 (Siebert 等, 1992)。与六-糖化合物相比较, 唾液酸显现出能少影响与结合幽门螺杆菌的活性, 9B。将第一个方案与图 9A 和 9B 相比较说明在七-糖结构中也获得相同的结合表位。

新乳结合表位的描绘。通过化学和酶法降解兔胸腺七-糖化合物(第 1、5、10、21, 表 2) 获得结构的相对结合长度表明三-糖序列 $\text{GlcNAc } \beta 3\text{Gal } \beta 4\text{GlcNAc } \beta 3$ 可以构成最小结合序列。因此, 可以预见在六糖化合物中存在一种来自于末端 $\text{Gal } \beta 4$ 的抑制效应, 然而对于缺少末端 $\text{GlcNAc } \beta 3$ 残基的新乳四糖苷神经酰胺来说, 由于表位中仅有三糖的两个, 从而缩小了结合的长

度。通过将乳四糖基神经酰胺和 B5 的乙酰基进行脱-N-酰化作用生成胺后(第 6 和 14, 表 2), 它们就丧失了与细菌的结合能力, 由此非常清楚地显现出内在 GlcNAc β 3 的重要性。既可以通过缺失粘附素和乙酰氨基部分之间的有利互作也可以通过改变这些糖鞘脂构象的参数选择来产生这种非-结合。然而, 5 很难构建这样一种条件, 即通过改变其内在 Gal β 4 的定位来空间阻碍细菌与结合表位的接近。因此, 确定了最小结合序列必须包含 GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3 序列后, 现在很容易使 P1、H5-2 和两种唾液酸类红细胞糖苷脂结构(第 15、18-20, 表 2)的结合活性合理消失, 因为通过延长直接干扰了目标结合表位。还有来自于牛酪乳的糖鞘脂(Teneberg 等, 1994)是非 10 结合的, 因为该糖鞘脂含有一个附在新乳四糖基神经酰胺(第 26, 表 2)内在 Gal β 4 上的一个 3-6-键合的 Gal β 4GlcNAc β 支链, 它阻碍了细菌与结合表位的接近。

表 2 中具有不同结合活性的五-糖序列的延长形式表明在胸腺来源结构上仅加上 Gal β 4 是可行的, 这与观察到的 4-OH 既可以位于纬向也可以位于 15 轴向但由于空间阻碍作用确实使之丧失了结合亲合力情形相一致。NeuAc α 3 加至 X₂ 上或 GalNAc β 3 加至 B5 上会导致结合能力的完全丧失(第 24 和 25, 表 2)。进一步发现 Fuc α 2 单位在 H5-2 中的消极影响, 幽门螺杆菌与 A6-2 和 B6-2(第 22 和 23, 表 2)不结合证实了这点。关于由 B5 中发现的 20 相同三糖终止的延长结构(第 28, 表 2), 虽然其中也存在一个第二内在的结合表位, 但它必须是如在 B5 中一样能引起结合的末端三糖。然而, 最有可能排除的是与内在表位的结合, 因为倒数第二个 Gal β 4 可以预期获得或不依赖于菌株的类型和生长条件(Miller-Podraza 等, 1996, 1997a, b)。

总而言之, 为了获得最大活性, 新乳系列糖鞘脂的结合表位必须包含三-糖序列 GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3。根据本研究中使用的潜在异构受体的 25 结合模式的比较, 从图 8A-D 和 9A-D 显示的结构可以推导出几乎所有这样的三糖对于产生结合是重要的, 除了末端 GlcNAc β 3 的乙酰氨基和相同残基上的 4-OH 对结合不重要外。

受体的生物学存在。在四个体外可以功能性交换地作为幽门螺杆菌受体的 30 五-糖糖鞘脂中, 仅 X₂ 天然存在于人组织中但还没有发现在胃黏膜中存在, 除了在瘤组织中鉴别出的一例胃癌外(Kannagi 等, 1982b)。Thorn 等(1992)

的研究表明含有一个末端 GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 序列的 X₂糖鞘脂和延长结构存在于几种人组织中，但胃上皮组织恰巧不属于这些研究对象中，所以获得了由来源于几个血型 A 个体（泳道 1-6）胃黏膜的总非-酸性糖鞘脂制备的 GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc β -特异性单克隆抗体 TH2 的薄层色谱覆盖图（图 11 B）。可是使用该检测方法没有观察到来源于胃上皮细胞糖鞘脂的可鉴别的结合。图 11A、11B 和 11 C 显示了使用来源于 *E. cristagalli* 的 Gal β 4GlcNAc-结合凝集素的相应涂覆试验。在胃上皮细胞来源制备的不同的糖鞘脂中，在四-糖区域前三个泳道显现出微弱的与条带结合，这可能与乳四糖基神经酰胺相符，但由于这种糖鞘脂的数量少故不能清楚观察到幽门螺杆菌与这些条带的可鉴别的结合（Teneberg 等，2001）。

此外，不管序列 Gal α 3Gal β 4GlcNAc β 是否存在于 B5 糖鞘脂或在上述延长结构（第 28，表 2）中，由于增加（Larsen 等，1990）Gal α 3 引起转移酶不表达使得在正常人组织中不可能发现该序列。因此结论是如果运输上述鉴别的表位的靶受体存在于胃上皮细胞的表面，那么在糖鞘脂中它们可以建立在糖蛋白重复性 N-乙酰乳糖胺元件之上而不是基于脂质的结构之上。

但是，与胃溃疡相关联的幽门螺杆菌菌株是已知的，就象这里主要使用的菌株，其激活了粒细胞的炎症应答反应一样，即使细菌不易受调理素的作用（Rautelin 等，1994a, b）。细菌噬菌作用过程中的最初事件多数可能包括特异性的导致粒细胞粘合的类凝集素相互作用（Ofek 和 Sharon，1988）。在噬菌事件之后发生了氧化破裂反应，这可能是幽门螺杆菌-关联疾病发病机理的诱因（Babior，1978）。几种来自于粒细胞的酸性和非酸性糖鞘脂都有一个新乳核心和重复的乳糖胺单位，包括列于表 2 中的第 21 个化合物和唾液酸化七-糖化合物（第 27 个，表 2），其中唾液酸的乙酰氨基是以乙酰基的形式存在，它们被分离和定性（Fukuda 等，1985；Stroud 等，1996），并且由此可以作为在白血球细胞表面的潜在的幽门螺杆菌的受体。而且，X₂糖鞘脂也可以从相同的来源分离（Teneberg, S. unpublished）。

返回图 11B 可以看到单克隆抗体 TH2 实际结合于五-糖区域的条带，对于粒细胞和红细胞（分别为泳道 7 和 8）来说也是一样的，这可能与 X₂糖鞘脂相应（Teneberg, S., 未出版；Thorn 等，1992；Teneberg 等，1996）。同样地，当在涂覆测试中用 *E. cristagalli* 凝集素替代使用时，发现在粒细胞和红细胞中都存在新乳四糖基神经酰胺（图 11C，泳道 7 和 8）。在这两

例中，结合幽门螺杆菌的于乳四糖基神经酰胺 (Bergstrom, J., 未出版)。对于粒细胞来说，在六-糖区域发现了一条可能相应于延长了一个 N-乙酰乳糖胺单位的新乳四糖基神经酰胺 (参见第 21, 表 2) 的相当弱的条带，这与 Fukuda 等 (1985) 的结果一致。不管这些糖鞘脂在上述提及的粘合过程中是

5 否是首要靶点，仍然对它们进行了描述。

对新糖脂和新的糖脂的分析

通过氰硼氢化物 (Halina Miller-Podraza, 稍后将要公开) 并用 4-十六烷基苯胺 (缩写为 HDA, from Aldrich, Stockholm, Sweden) 将寡糖 GlcNAc

10 β 3Gal β 4GlcNAc、GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6GlcNAc、Gal α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc 和 GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc 及麦芽庚糖 (Sigma, Saint Louis, USA) 进行还原胺化。用质谱法鉴定产物并证实为 GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc (red)-HDA、GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6GlcNAc (red)-HDA、Gal α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc (red)-HDA、GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β

15 4Glc (red)-HDA 和麦芽庚糖 (red)-HDA [其中“(red)-”意思是从糖的末端还原性葡萄糖和十六烷基苯胺 (HAD) 的胺基还原胺化形成的胺键结构]。在与上述的 TLC-涂覆测定中幽门螺杆菌相比，化合物 Gal α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc (red)-HDA 和 GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc (red)-HDA 呈现明显的结合活性，GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6GlcNAc (red)-HDA 则具有强烈的

20 的结合活性，而 GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc (red)-HDA 和麦芽庚糖 (red)-HDA 的结合很微弱或是无活性的。此例显示四糖 GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal 是结合幽门螺杆菌的一个结构。还原末端 Glc-残基可能对于结合是不必需的，因为还原破坏了 Glc-残基的吡喃环结构。而作为对照，还原末端 GlcNAc 的完整的环结构对于三糖 GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc 很好地结合是必需的。

25 在 TLC 涂覆测试中检测生物合成的 NHK-1 糖脂的类似物 GlcA β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer 和新的糖脂 Glc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer 和 Glc (A-甲酰胺) β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer，从中观察到了它们相对于幽门螺杆菌的结合活性。Glc (A-甲基酰胺) 指葡萄糖醛酸衍生物，其中羧基被甲基胺酰胺化。Glc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer

30 结构具有强的结合幽门螺杆菌的活性，而 Glc (A-甲酰胺) β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer 则具有很强的结合活性。

GlcA β 3Gal β 4Glc (NAc)经转糖基作用的生产

受体糖 Gal β 4Glc 或 Gal β 4GlcNAc (约 10-20 mM)与过量的 10 倍摩尔的对硝基苯- β -葡糖醛酸和用缓冲液稀释的 pH 约为 5 的牛肝脏 β -葡萄糖苷酸酶 (20 000U, Sigma) 一起于 37 摄氏度搅拌着温育两天。产物经由 HPLC 纯化。

参考文献

- Aggarwal, B. B., Eessalu, T. E. and Hass, P. E. (1985) *Nature*, 318, 665-667.
- 10 Andersson, B., Porras, O., Halson, L. A., Lagergård, T., and Svanborg-Eden, C. (1986) *J. Inf Dis.* 153, 232-7
- Angstrom, J., Teneberg, S., Abul Milh, M., Larsson, T., Leonardsson, I., Olsson, B.-M., Olwegard Halvarsson, M., Danielsson, D., Näslund, I., Ljung, A., Wadström, T. and Karlsson, K.-A. (1998)
- 15 *Glycobiology*, 8, 297-309.
- Ascencio, F., Fransson, L-A. and Wadström, T. (1993) *J. Med. Microbiol.*, 38, 240-244.
- Appelmelk, B. J., Faller, G., Clayes, D., Kirchner, T., and Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E. (1998) *Immol. Today* 19, 296-299.
- 20 Avenaud, P., Marais, A., Monteiro, L., Le Bail, B., Biolac Saga, P., Balabaud, C., and Mégraud, F. (2000) *Cancer* 89, 1431-1439.
- Axon, A. T. R. (1993) *J. of Antimicrobial Chemotherapy*, 32, 61-68.
- Babior, B. M. (1978) *N. Eng J. Med.*, 298, 659-668.
- Blaser, M. J. (1992) *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 4 (suppl
- 25 1), 17-19.
- Bock, K., Breimer, M. E., Brignole, A., Hansson, G. C., Karlsson, K.-A., Larson, G., Leffler, H., Samuelsson, B. E., Strömberg, N., Svanborg-Eden, C. and Thurin, J. (1985) *J. Biol. Chem.*, 260, 8545-8551.
- Boren, T., Falk, P., Roth, K. A., Larson, G. and Normark, S. (1993)
- 30 *Science*, 262, 1892-1895.
- Breg, J., Kroon-Batenburg, L. M. J., Strecker, G., Montreuil, J.

- and Vliegenthart, F. G. (1989) *Eur. J. Biochem.*, 178, 727-739.
- Castagliuolo, I., La Mont, J. T., Qiu, B., Nikulasson, S. T., and Pothoulakis, C. (1996) *Gastroenterology* 111, 433-438.
- 5 Castronovo, V., Colin, C., Parent, B., Foidart, J.-M., Lambotte, R., and Mahieu, P. (1989) *J. Natl. Cancer Inst.*, 81, 212-216
- Charlwood, J., Tolson, D., Dwek, M., and Camillen, P. (1999) *Anal. Biochem.*, 273, 261-77.
- Clausen, H., Lavery, S. B., Kannagi, R. and Hakomori, S.-i. (1986) *J. Biol. Chem.*, 261, 1380-1387.
- 10 Chmiela, M., Wadström, T., Folkesson, H., Planeta Malecka, I., Czkwianianc, E., Rechcinski, T., and Rudnicka, W. (1998) *Immunol. Lett.* 61, 119-125.
- Claeys, D., Faller, G., Appelmelk, B. J., Negrini, R., and Kirchner, T. (1998) *Gastroenterology* 115, 340-347.
- 15 Correa, T. L., Fox, J., Fontham, E., Ruiz, b., Lin, Y., zaula, D., Taylor, N., Mackinley, D., deLima, E., Portilla, H., Zarama, G. (1990) *Cancer* 66, 596-574.
- DeCross, A. J. and Marshall, B. J. (1993) *Am. J. Med. Sci.*, 306, 381-392.
- 20 Dooley, C. P. (1993) *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 9, 112-117.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956) *Analytical Chemistry* 28, 350-356.
- Dunn, B. E., Cohen, H. and Blaser, M. J. (1997) *Clin. Microbiol. Rev.*, 10, 720-741.
- 25 Ernst, B., Hart, G. W., and Sinay, P. (eds.) (2000) *Carbohydrates in Chemistry and Biology*, ISBN 3-527-29511-9, Wiley-VCH, Weinheim.
- Eto, T., Ichikawa, Y., Nishimura, K., Ando, S. and Yamakawa, T. (1968) *J. Biochem. (Tokyo)*, 64, 205-213.
- Evans, D. G., Evans Jr, D. J., Molds, J. J., and Graham, D. Y. 30 (1988) *Infect. Immun.*, 56, 2896-06
- Falk, K.-E., Karlsson, K.-A. and Samuelsson, B. E. (1979a) *Arch.*

- Biochem. Biophys., 192,164-176.
- Falk, K.-E., Karlsson, K.-A. and Samuelsson, B. E. (1979b) Arch. Biochem. Biophys., 192,177-190.
- Falk, K.-E., Karlsson, K.-A. and Samuelsson, B. E. (1979c) Arch. Biochem. Biophys., 192,191-202.
- Farsak, B., Yildirim, A., Akyön, Y., Pinar, A., Oc, M., Boke, E., Kes, S., and Tokgözoğlu, L. (2000) J. clin. Microbiol. 38,4408-4411.
- Folch, J., Lees, M., And Sloane-Stanley, G. H. (1957) J. Biol. Chem. 226,497-509.
- 10 Fukuda, M. N., Dell, A., Oates, J. E., Wu, P., Klock, J. C. and Fukuda, M. (1985) J. Biol. Chem., 260,1067-1082.
- Handa, S. (1963) Jap. J. Exp. Med., 33,347-360.
- Hansson, G. C., Karlsson, K.-A., Larson, G., Strömberg, N. and Thurin, J. (1985) Anal. Biochem., 146,158-163.
- 15 Hansson, G. C. and Karlsson, H. (1990) Methods Enzymol., 193,733-738.
- Hu, J., Stults, C. L., Holmes, E. H., and Macher, B. A. (1994) Glycobiology 4,251-7.
- Ilver, D., Arnqvist, A., Ogren, J., Frick, I. M., Kersulyte, D., Incecik, E. T., Berg, D.E., Covacci, A., Engstrand, L., and Boren T. (1998) Science,279 (5349), 373-377.
- Ito, M. and Yamagata, T. (1989) Methods Enzymol., 179,488-496.
- Jassel, S. V., Ardill, J. E. S., Fillmore, D., Bamford, K. B., O'Connor, F. A., and Buchanan, K. D. Q. J. Med. 92,373-377.
- 25 Kannagi, R., Levine, P., Watanabe, K. and Hakomori, S.-i. (1982b) Cancer Res., 42,5249-5254.
- Karlsson, N. G., Olson, F. J., Jovall, P-A, Andersch, Y., Enerback, L., and Hansson G. C. (2000) Biochem. J., 350,805-814.
- Karlsson, K.-A. (1987) Meth. Enzymol., 138,212-220.
- 30 Karlsson, K.-A. (1989) Annu. Rev. Biochem., 58,309-350.
- Karlsson, K.-A. and Larsson, G. (1981a) J. Biol. Chem.

- 256, 3512-3524.
- Karlsson, K.-A. and Larsson, G. (1981b) FEBS Lett., 128, 71-74.
- Kerr, J. R., Al-Khattaf, A., Barson, A. J., and Burnie, J. P. (2000) Arch. Child. Dis., 83, 429-434
- 5 H., Demou, P. C. and Yu, R. K. (1983) Biochemistry, 22, 2676-2687.
- Koscielak, J., Piasek, A., Gorniak, H., Gardas, A. and Gregor, A. (1973) Eur. J. Biochem., 37, 214-215.
- Laine, R. A., Stellner, K. and Hakomori, S.-i. (1974) Meth. Membr. Biol., 2, 205-244.
- 10 Lanne, B., Uggla, L., Stenhagen, G., and Karlsson, K-A. (1995) Biochemistry 34, 1845-1850
- Lanne, B., Miller-Podraza, H., Abul Milh, M., Teneberg, S., Uggla, L., Larsson, T.,
- Leonardsson, I., Jovall, P.-A., Bergström, J. and Karlsson, K.-A.
- 15 (2001) manuscript in preparation
- Larsen, R. D., Rivera-Marrero, C. A., Ernst, L. K., Cummings, R. D. and Lowe, J. B. (1990) J. Biol. Chem., 265, 7055-7061.
- Larson, G., Karlsson, H., Hansson, G. C. and Pimlott, W. (1987) Carbohydr. Res., 161, 281-290
- 20 Ledeen, R. and Yu, R. K. (1978) Res. Methods Neurochem., 4, 371-410.
- Lin, J.-T., Wang, J.-T., Wang, M.-S., Wu, M.-S. and Chen, C.-J. (1993) Hepato Gastroenterol., 40, 596-599.
- Lingwood, C. A., Huesca, M. and Kuksis, A. (1992) Infect. Immun.,
- 25 60, 2470-2474.
- Mayo, S. L., Olafsen, B. D. and Goddard III, W. A. (1990) J. Chem. Phys., 94, 8897-8909.
- McKibbin, J. M., Spencer, W. A., Smith, E. L., Mansson, J. E., Karlsson, K-A, Samuelsson, B. E., Li, Y-T and Li, S. C. (1982) J. Biol.
- 30 Chem., 257, 755-760.
- Meyer, B. (1990) Topics Curez Chem., 154, 141-208.

- Miller-Podraza, H., Abul Milh, M., Bergström, J. and Karlsson, K.-A. (1996) *Glycoconj. J.*, 13, 453-460.
- Miller-Podraza, H., Bergstrom, J., Abul Milh, M. and Karlsson, K.-A. (1997a) *Glycoconj. J.*, 14, 467-471.
- 5 Miller-Podraza, H., Abul Milh, M., Teneberg, S. and Karlsson, K.-A. (1997b) *Infect. Immun.*, 65, 2480-2482.
- Miller-Podraza, H., Abul Milh, M., Angstrom, J., Jovall, P.-A., Wilhelmsson, U., Lanne, B., Karlsson, H., and Karlsson, K.-A. (2001) manuscript in preparation.
- 10 Muzzarelli, R. A. A., Mattioli-Belmonte, M., Miliani, M., Muzzarelli, C., Gabbanelli, F., and Biagini, G. (2002) *Carbohydrate Polym.* 48, 15-21
- Muzzarelli, R. A. A., Muzzarelli, C., Cosani, A., and Terbojevich, M. (1999) *Carbohydrate Polym.* 39, 361-367
- 15 Mysore, J. V., Wiggington, T., Simon, P. M., Zopf, D., Heman-Ackah, L. M. and Dubois, A. (1999) *Gastroenterology*, 117, 1316-1325
- Naiki, M., Fong, J., Ledeen, R. and Marcus, D. M. (1975) *Biochemistry*, 14, 4831-4836.
- Nakhla, T., Fu, D., Zopf, D., Brodsky, N., and Hurt, H. (1999)
- 20 *British J. Nutr.* 82, 361-367.
- Needs, P. W. and Selvendran, R. R. (1993) *Carbohydr. Res.*, 245, 1-10.
- Nilsson, H.-O., Taneera, J., Castedal, M., Glatz, E., Olsson, R., and Wadström, T. (2000) *J. Clin. Microbiol.* 38, 1072-1076.
- 25 Nilsson, O., Mansson, J.-E., Tibblin, E. and Svennerholm, L. (1981) *FEBS Lett.*, 133, 197-200.
- Nomenclature of glycoproteins (1988) *J. Biol. Chem.*, 262, 13-18.
- Nomura, A. and Stemmermann, G. N. (1993) *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 8, 294-303.
- 30 Nyholm, P. G., Samuelsson, B. E., Breimer, M. and Pascher, I. (1989) *J. Mol. Recog*, 2, 103-113.

- Nyholm, P.-G. and Pascher, I. (1993) *Biochemistry*, 32, 1225-1234.
- Ofek, I. and Sharon, N. (1988) *Infect. Immun.*, 56, 539-547.
- Pakodi, F., Abdel-Salam, O. M. E., Debraceni, A., and Mozsik, G. (2000) *J. Physiol. (Paris)*, 94, 139-152.
- 5 Parsonnet, J., Friedman, G. D., Vandersteen, D. P., Chang, Y., Vogelman, J. H., Orentreich, N. and Sibley, R. K. (1991) *N. Engl. J. Med.*, 325, 1127-31
- Rappe, A. K. and Goddard III, W. A. (1991) *J. Chem. Phys.*, 95, 3358-3363.
- 10 Rautelin, H., Blomberg, B., Jamerot, G. and Danielsson, D. (1994a) *Scand. J. Gastroenterol.*, 29, 128-132.
- Rautelin, H., von Bonsdorff, C.-H., Blomberg, B. and Danielsson, D. (1994b) *J. Clin. Pathol.*, 47, 667-669.
- Rebora, R., Drago, F., and Parodi, A. (1995) *Dermatology* 191, 6-8.
- 15 Saitoh, T., Natomi, H., Zhao, W., Okuzumi, K., Sugano, K., Iwamori, M. and Nagai, Y. (1991) *FEBS Lett.*, 282, 385-387.
- Samuelsson, B. E., Pimlott, W. and Karlsson, K.-A. (1990) *Meth. Enzymol.*, 193, 623-646.
- Sears, P., and Wong, C-H. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 20 93, 12086-12093.
- Siebert, H.-C., Reuter, G., Schauer, R., von der Lieth, C.-W. and Dabrowski, J. (1992) *Biochemistry*, 31, 6962-6971.
- Simon, P. M., Goode, P. L., Mobasser, A., and Zopf, D. (1997) *Infect. Immun.* 65, 750-757
- 25 Soltész, V., Schalen, C. and Mardh, P. A. (1988) *Proceedings of the Fourth International Workshop on Campylobacter Infections* (Kaijser, B. and Falsen, E., eds.) pp. 433-436, Goterna, Kungälv, Sweden.
- Steininger, H., Faller, G., Dewald, E., Brabletz, T., Jung, A., 30 and Kirchner, T. (1998) *Virchows Arch.* 433, 13-18.
- Stellner, K., Saito, H. and Hakomori, S.-i. (1973) *Arch. Biochem.*

- Biophys., 155, 464-472.
- Stellner, K. and Hakomori, S.-i. (1974) *J. Biol. Chem.*, 249, 1022-1025.
- Stroud, M. R., Handa, K., Salyan, M. E. K., Ito, K., Lavery, S. B., Hakomori, S.-i., Reinhold, B. B. and Reinhold, V. N. (1996) *Biochemistry*, 35, 758-769.
- Sung, J., Russell, R. I., Neyomans, Chan, F. K., Chen, S., Fock, K., Goh, K. L., Kullavanijaya, P., Kimura, K., Lau, C., Louw, J., Sollano, J., Triadiafalopulos, G., Xiao, S., Brooks, P. (2000) *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 15, Suppl : G58-68.
- Teneberg, S., angström, J., Jovall, P.-A. and Karlsson, K.-A. (1994) *J. Biol. Chem.*, 269, 8554-8563.
- Teneberg, S., Lonroth, I., Torres Lopez, J. F., Galili, U., Olwegard Halvarsson, M., Angstrom, J. and Karlsson, K.-A. (1996) *Glycobiology*, 6, 599-609.
- Teneberg, S., Abul Milh, M., Lanne, B., Jovall, P.-A., Karlsson, H., Angström, J., Olwegard Halvarsson, M., Danielsson, D., Ljung, A., Wadström, T. and Karlsson, K.-A. (2001, manuscript in preparation).
- Thorn, J. J., Lavery, S. B., Salyan, M. E. K., Stroud, M. R., Cedergren, B., Nilsson, B., Hakomori, S.-i. and Clausen, H. (1992) *Biochemistry*, 31, 6509-6517.
- Thurin, J., Brodin, T., Bechtel, B., Jovall, P.-A., Karlsson, H., Strömberg, N., Teneberg, S., Sjögren, H. O. and Karlsson, K.-A. (1989) *Biochim. Biophys. Acta*, 1002, 267-272.
- Vivier, E., Sorrell, J. M., Ackerly M., Robertson M. J., Rasmussen R. A., Levine H., and Anderson P. (1993) *J. Exp. Med.*, 178 (6), 2023-33.
- Waldi, D. (1962) in *Dünnschicht-Chromatographie* (Stahl, E., ed.) pp. 496-515, SpringerVerlag, Berlin.
- Watanabe, K. and Hakomori, S.-i. (1979) *Biochemistry*, 18, 5502-5504.
- Wells, M. E. and Dittmer, J. C. (1963) *Biochemistry*, 2, 1259-1263.

-
- Wotherspoon, A. C., Doglioni, C., Diss, T. C., Pan, L., Moschini, A., de Boni, M. and Isaacson, P. G. (1993) *Lancet*, 342, 575-577
- Yamakawa, T. (1966) *Colloq. Ges. Physiol. Chem.*, 16, 87-111.
- Yang, H. j. and Hakomori, S.-i. (1971) *J. Biol. Chem.*, 5 246, 1192-1200.

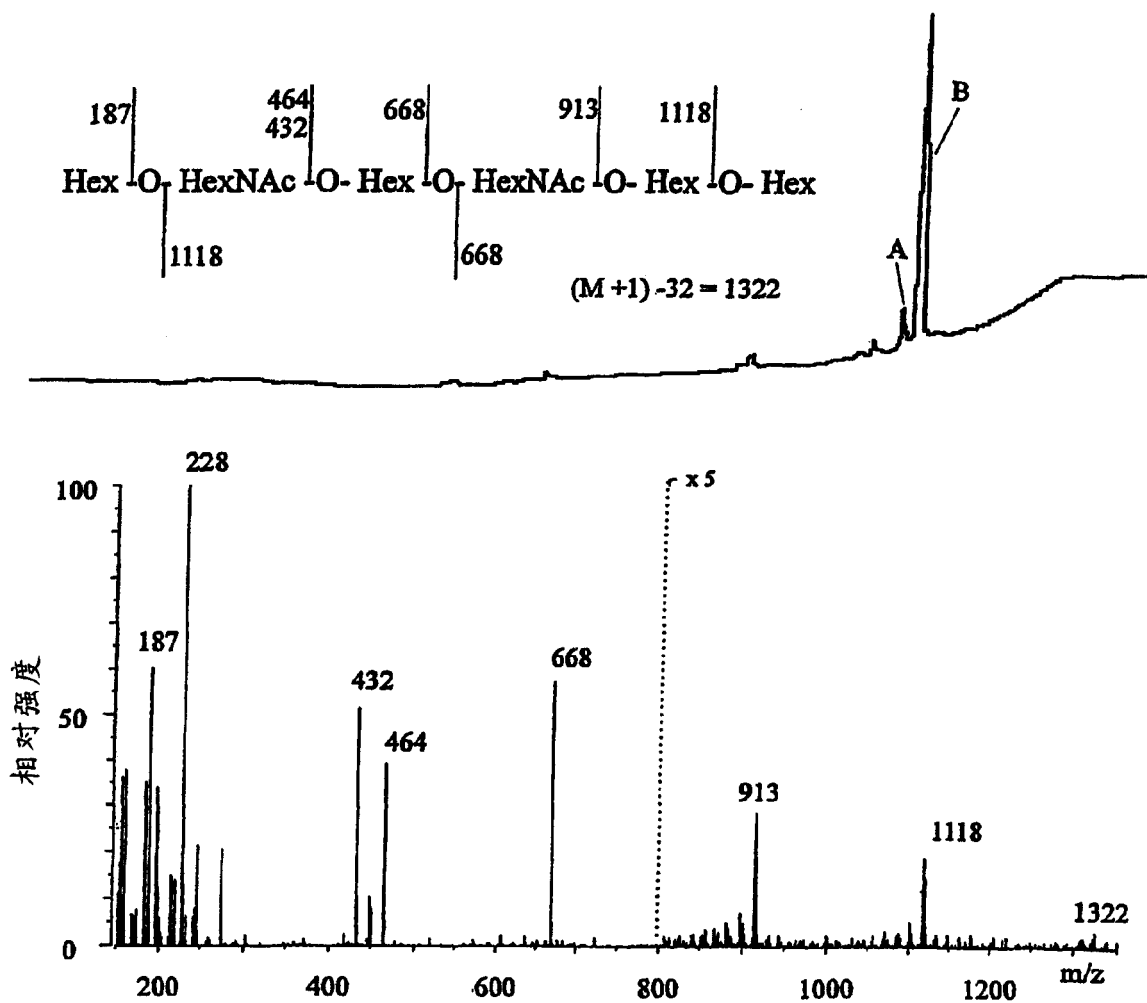


图 1A

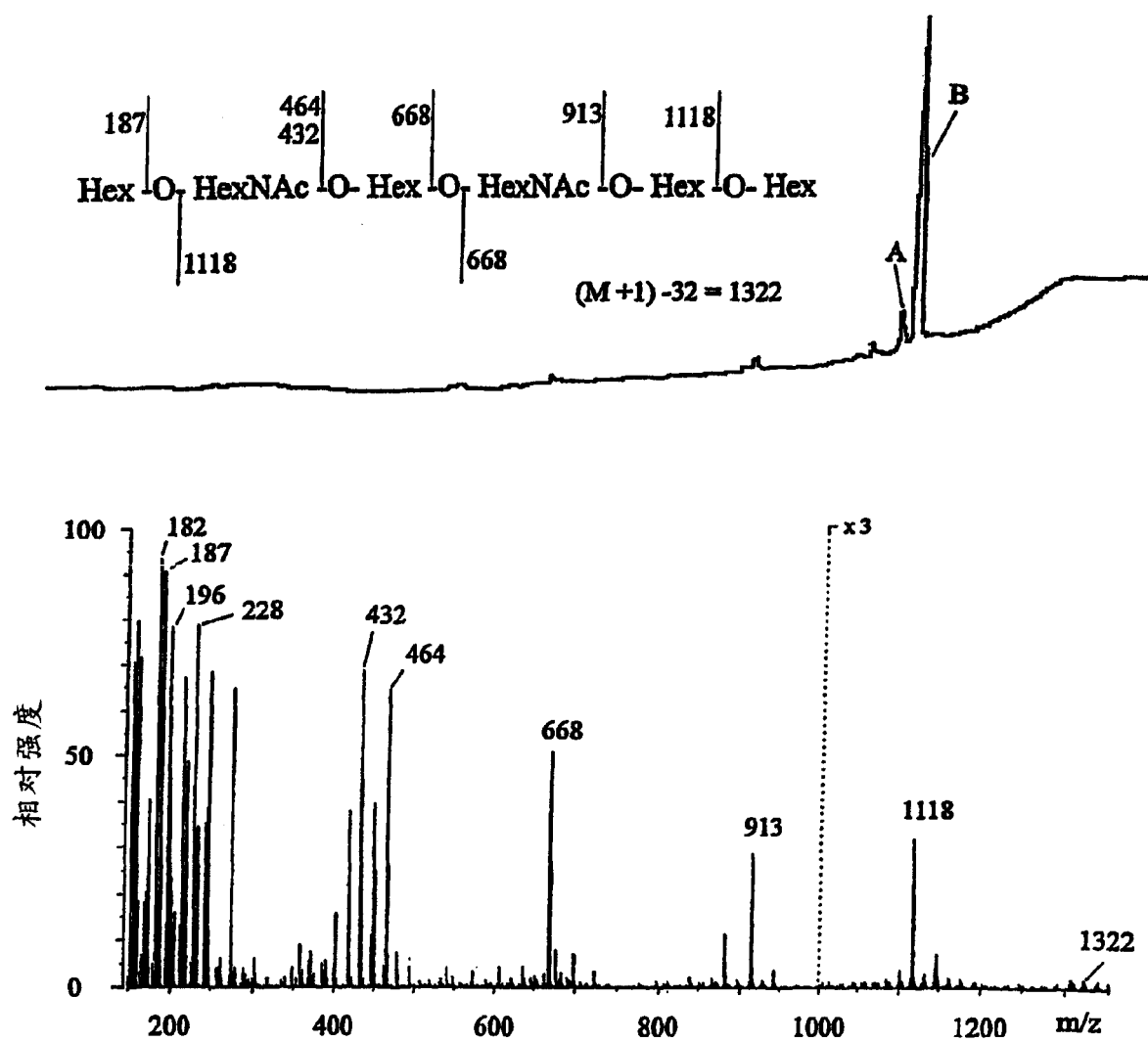


图 1B

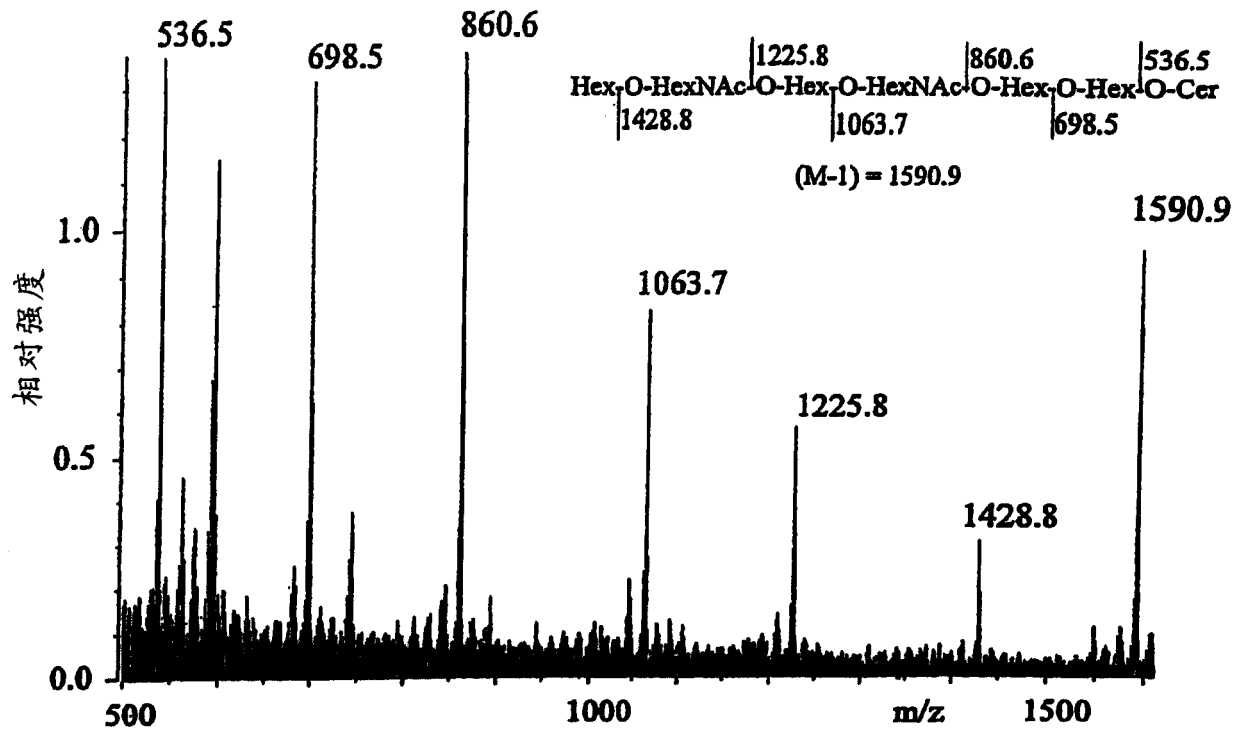


图 2A

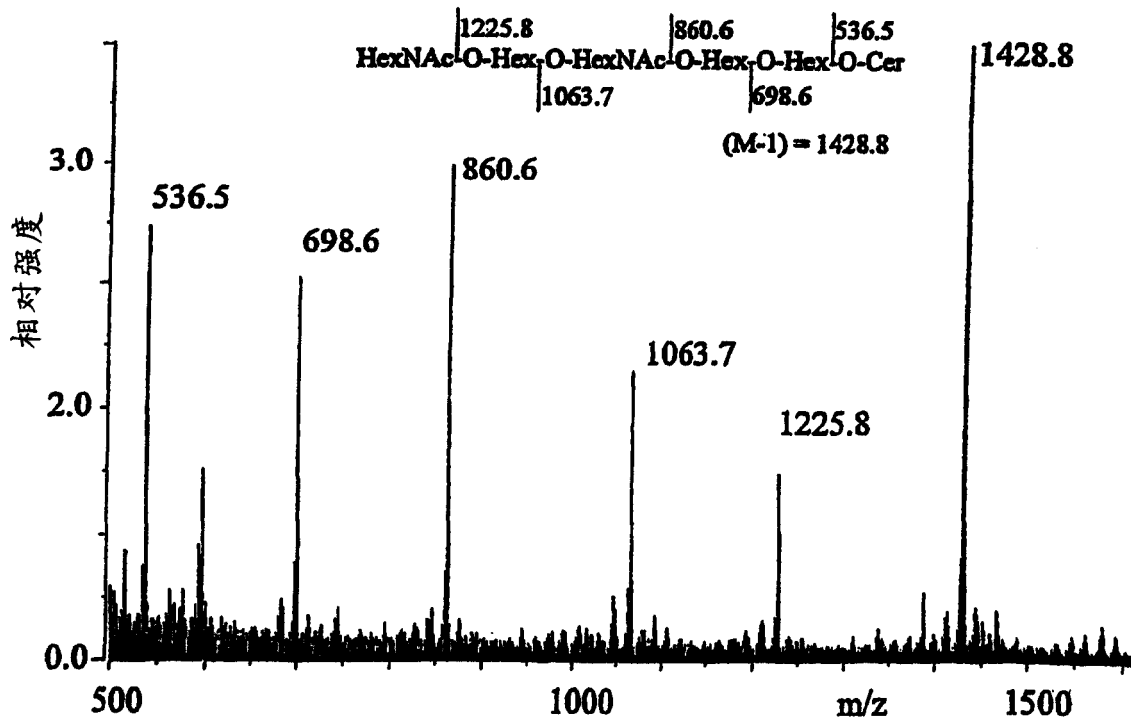


图 2B

图 3A

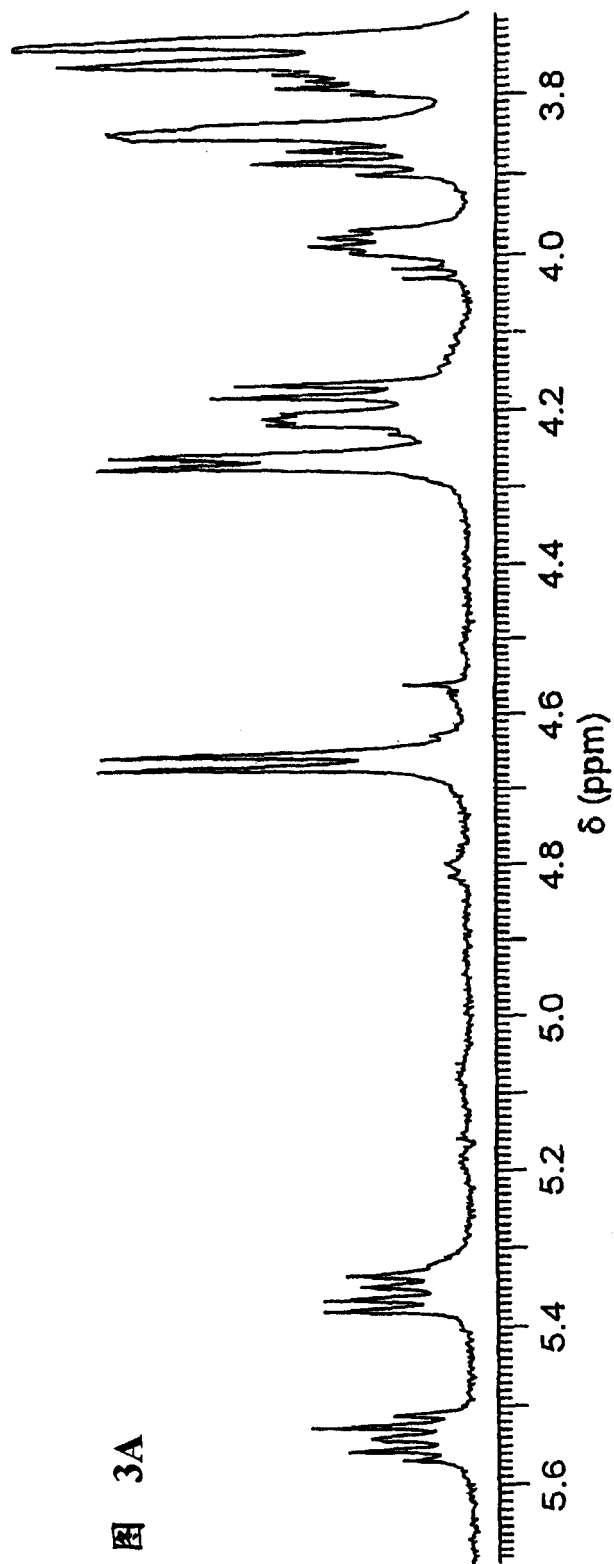


图 3B

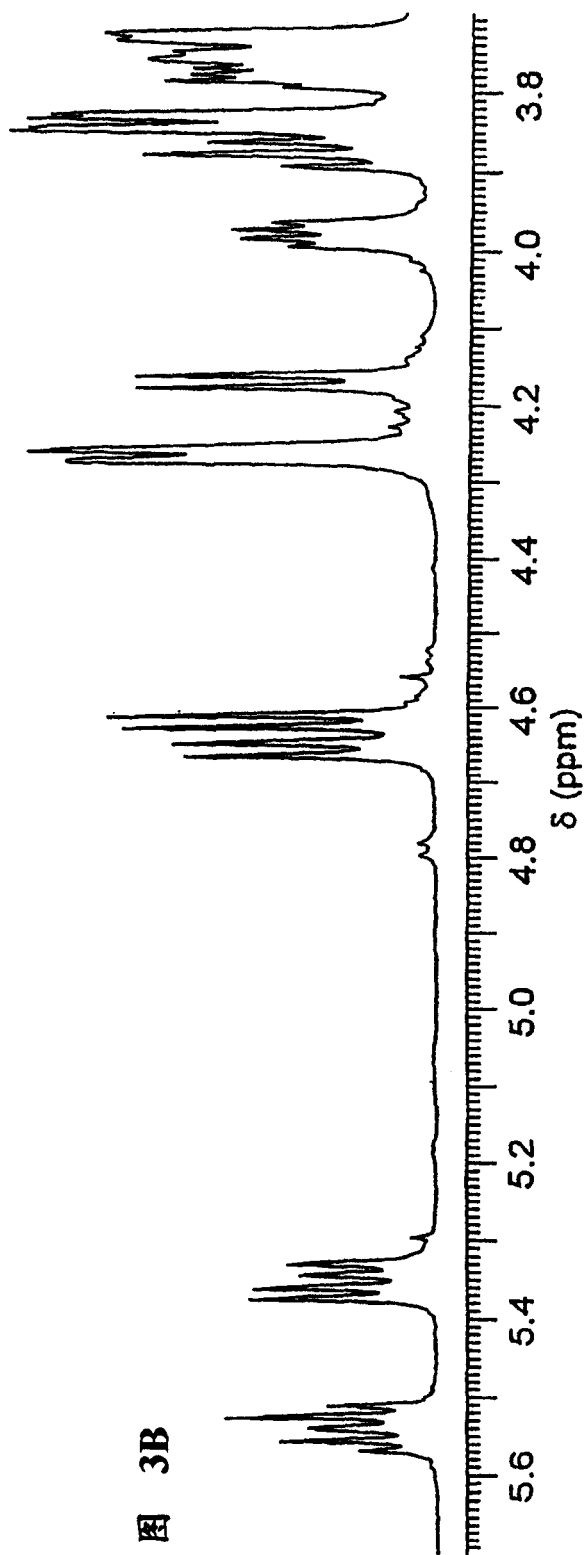
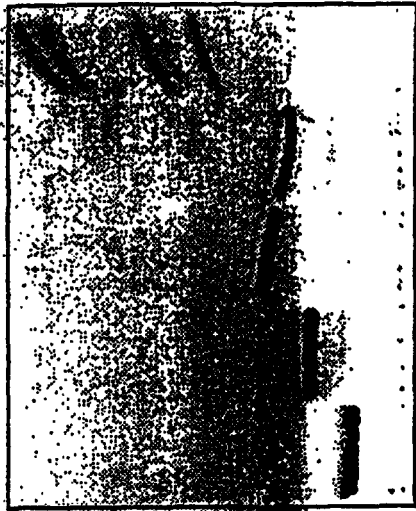
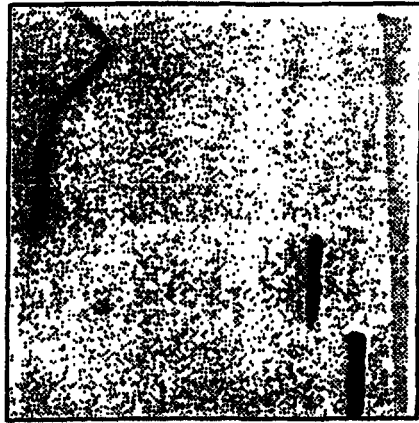


图 4A



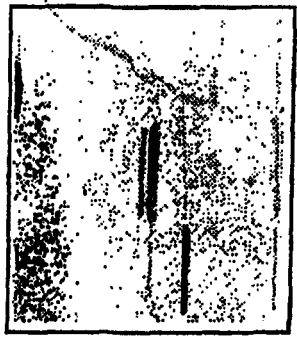
1 2 3 4 5

图 4B



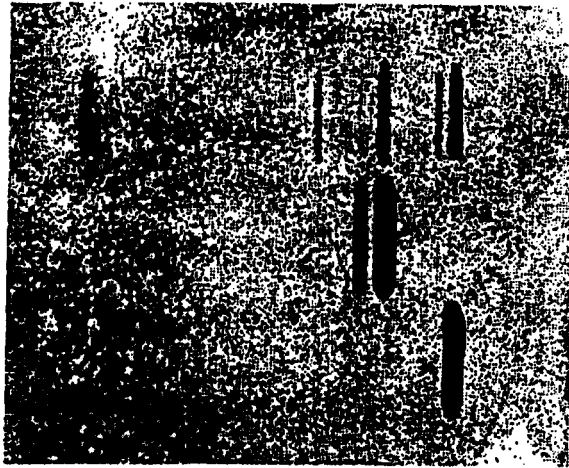
1 2 6 7

图 4C



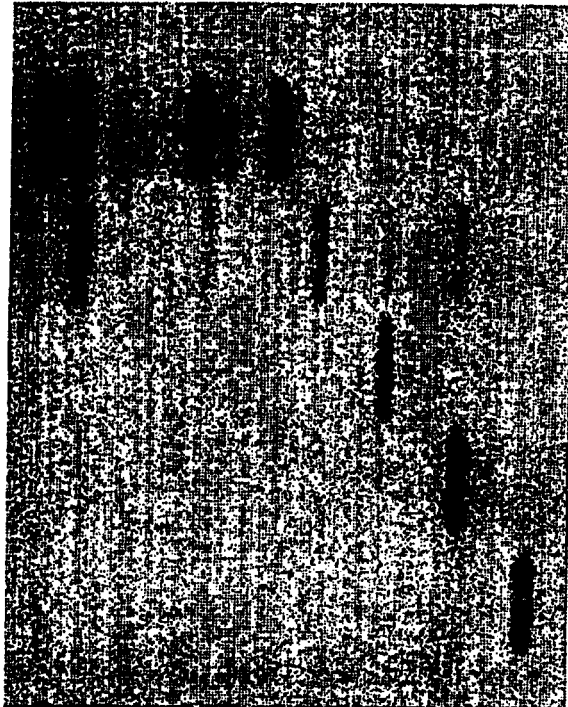
2 3 6

图 5B



2 3 4

图 5A



1 2 3 4 5

图 6A

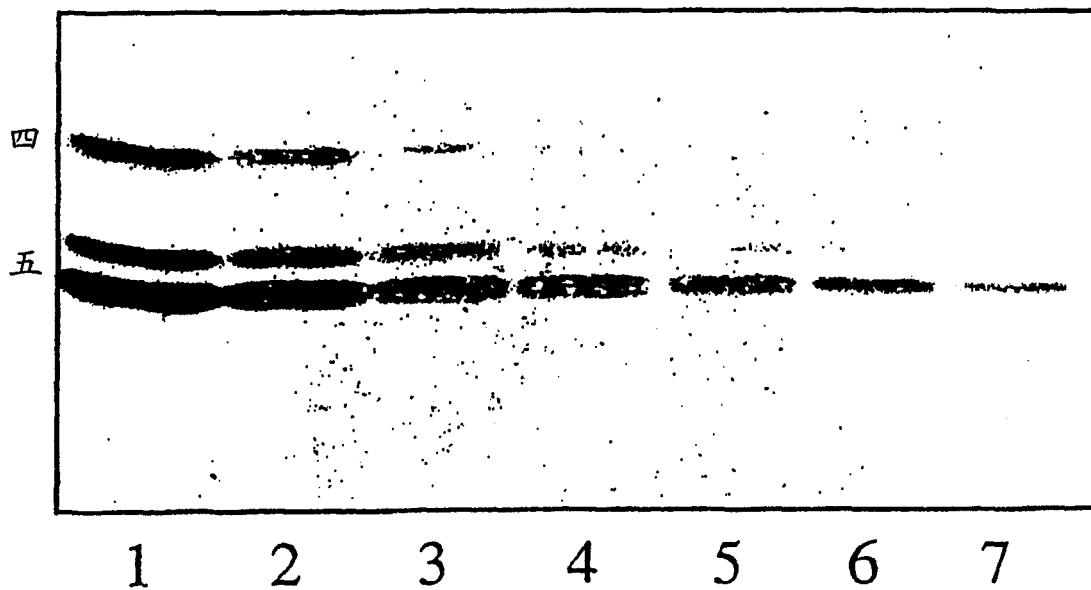
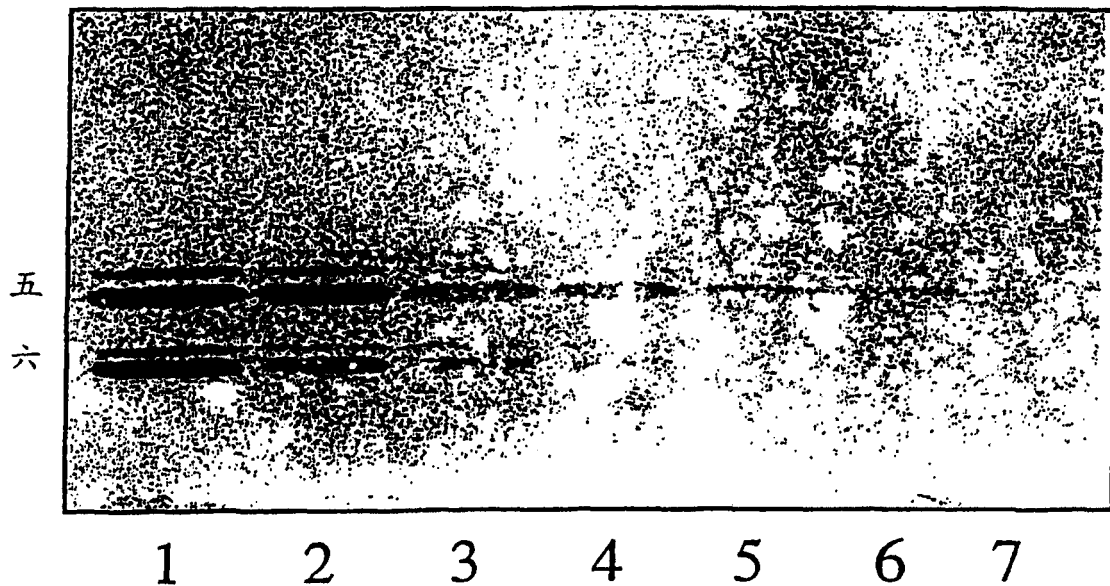


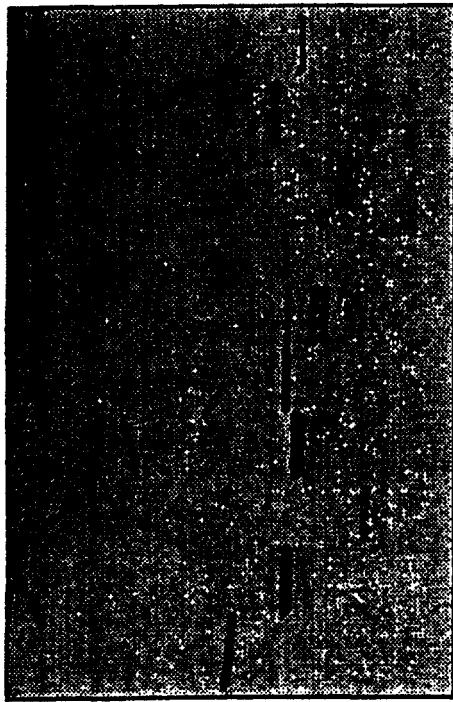
图 6B

图 7B



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

图 7A



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

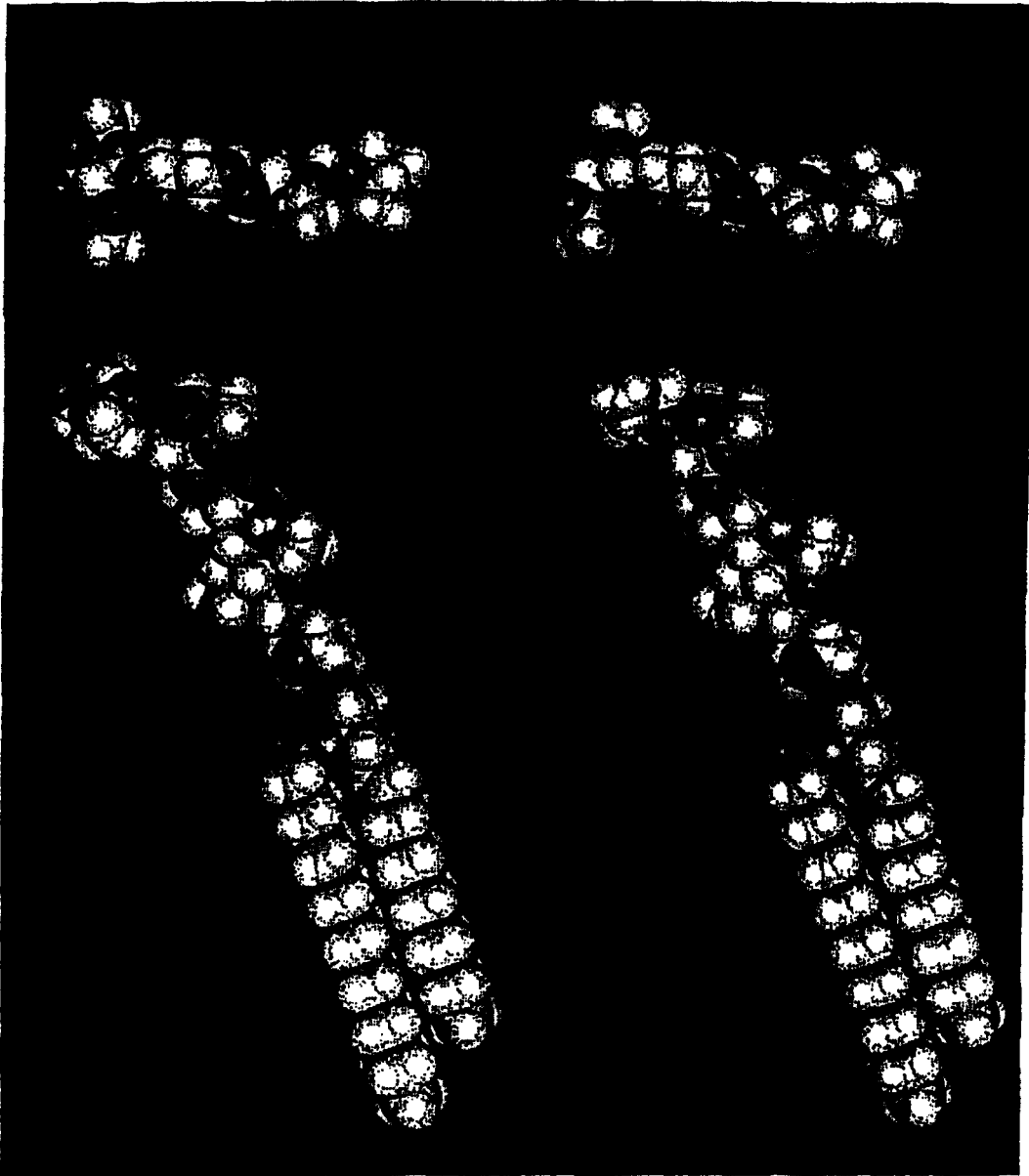


图 8A

图 8B

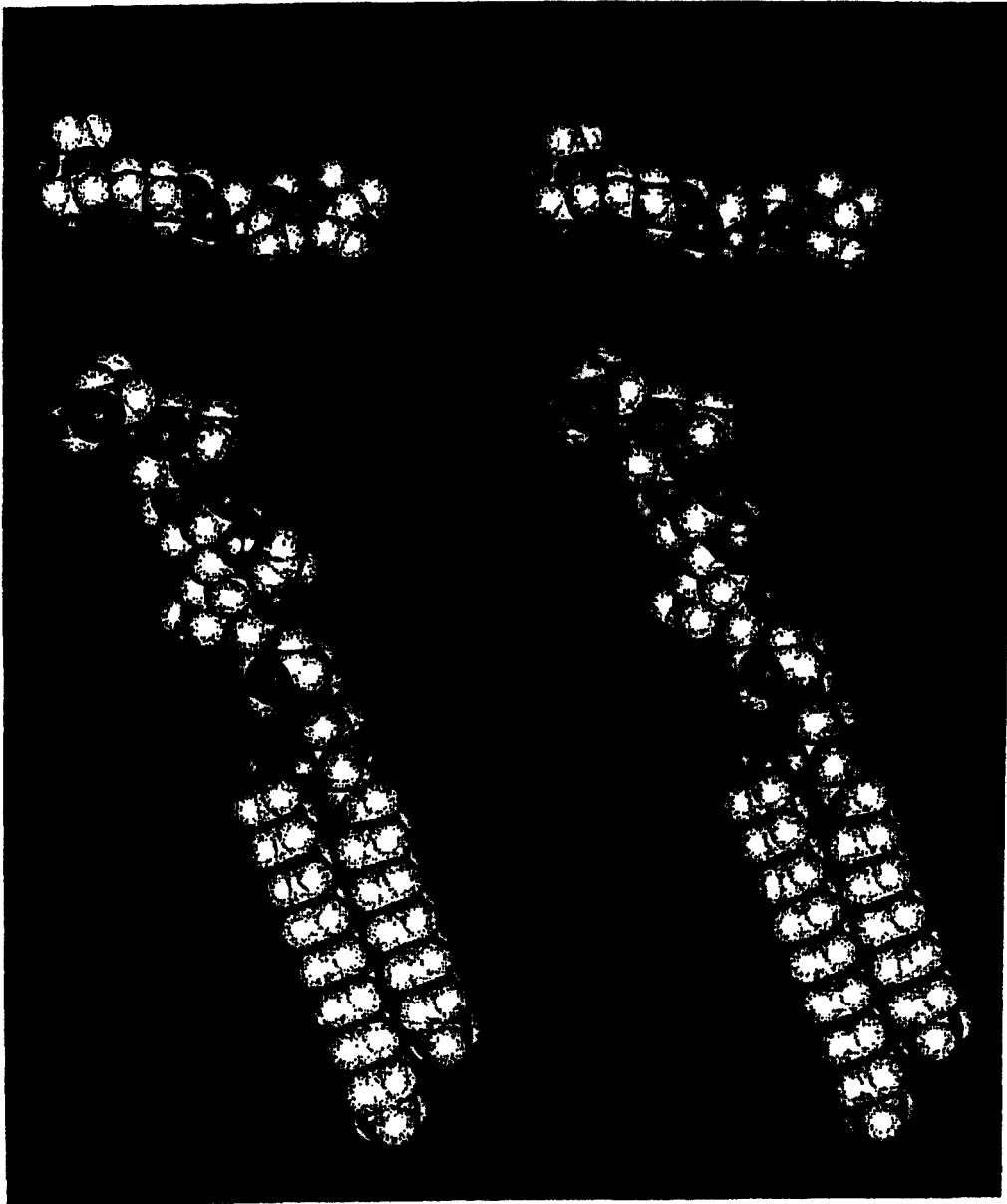


图 8C

图 8D

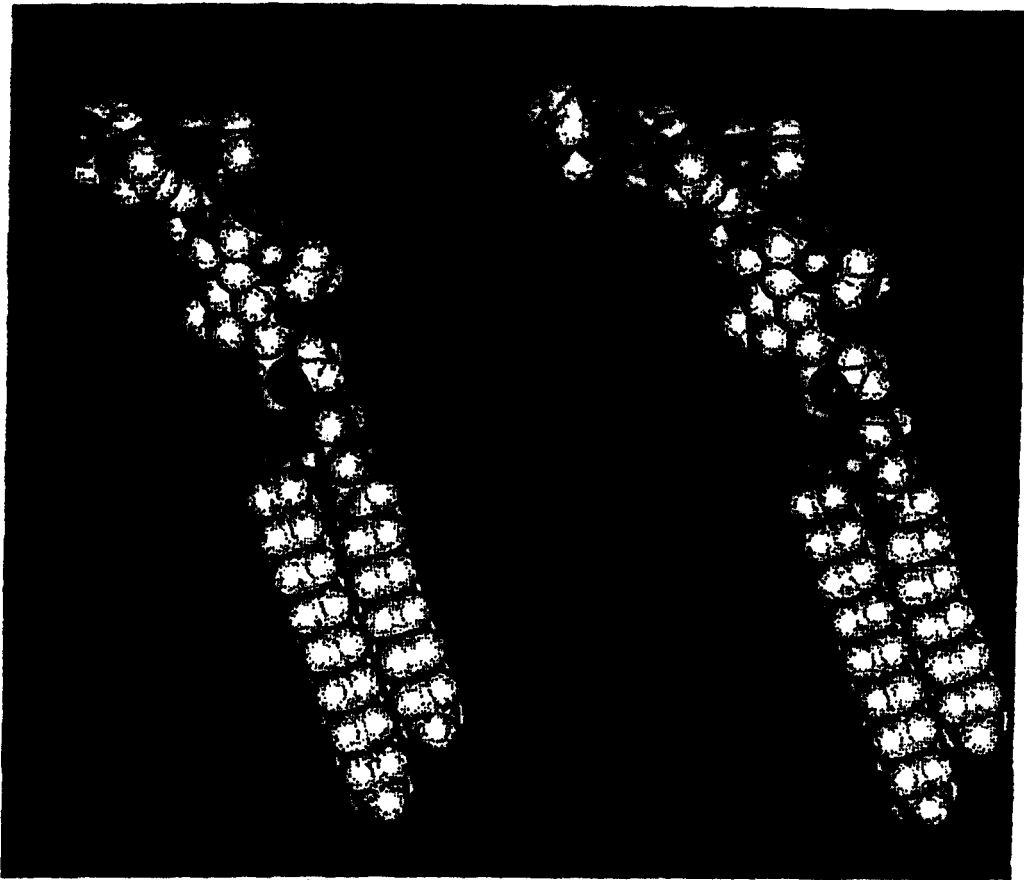


图 9A

图 9B

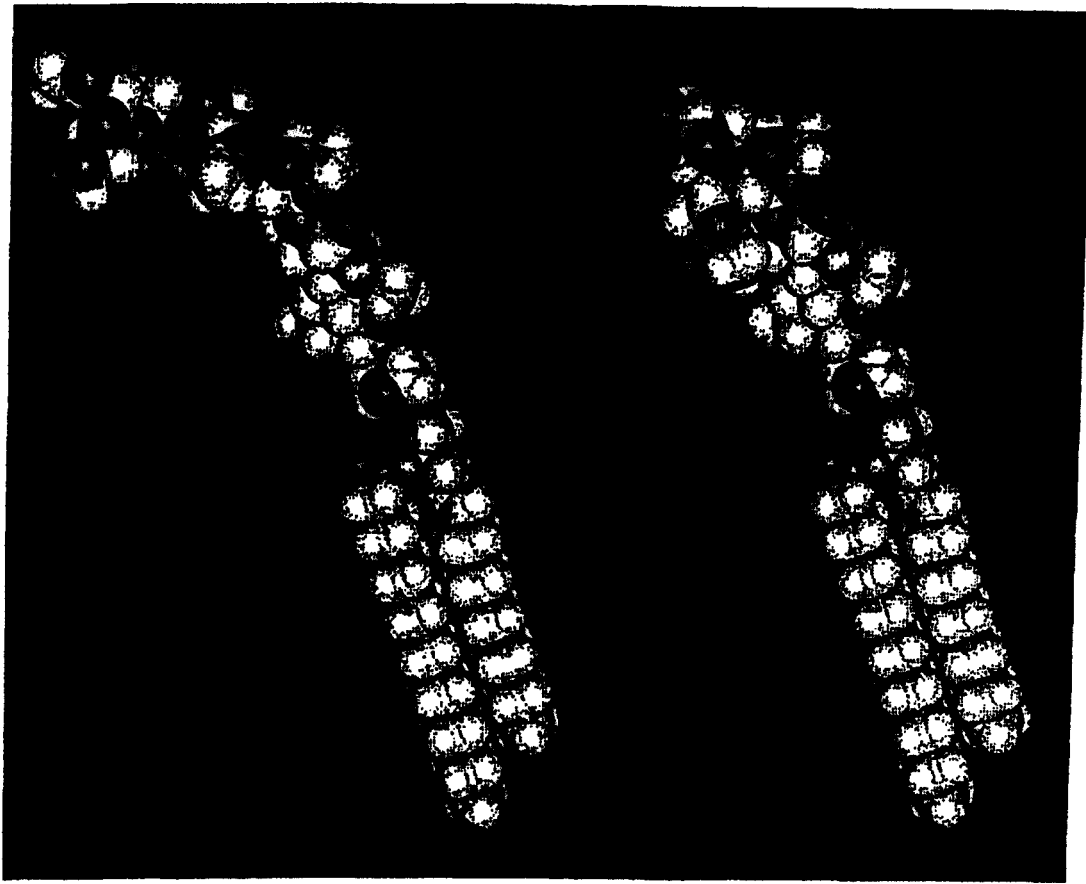


图 9C

图 9D

图 10

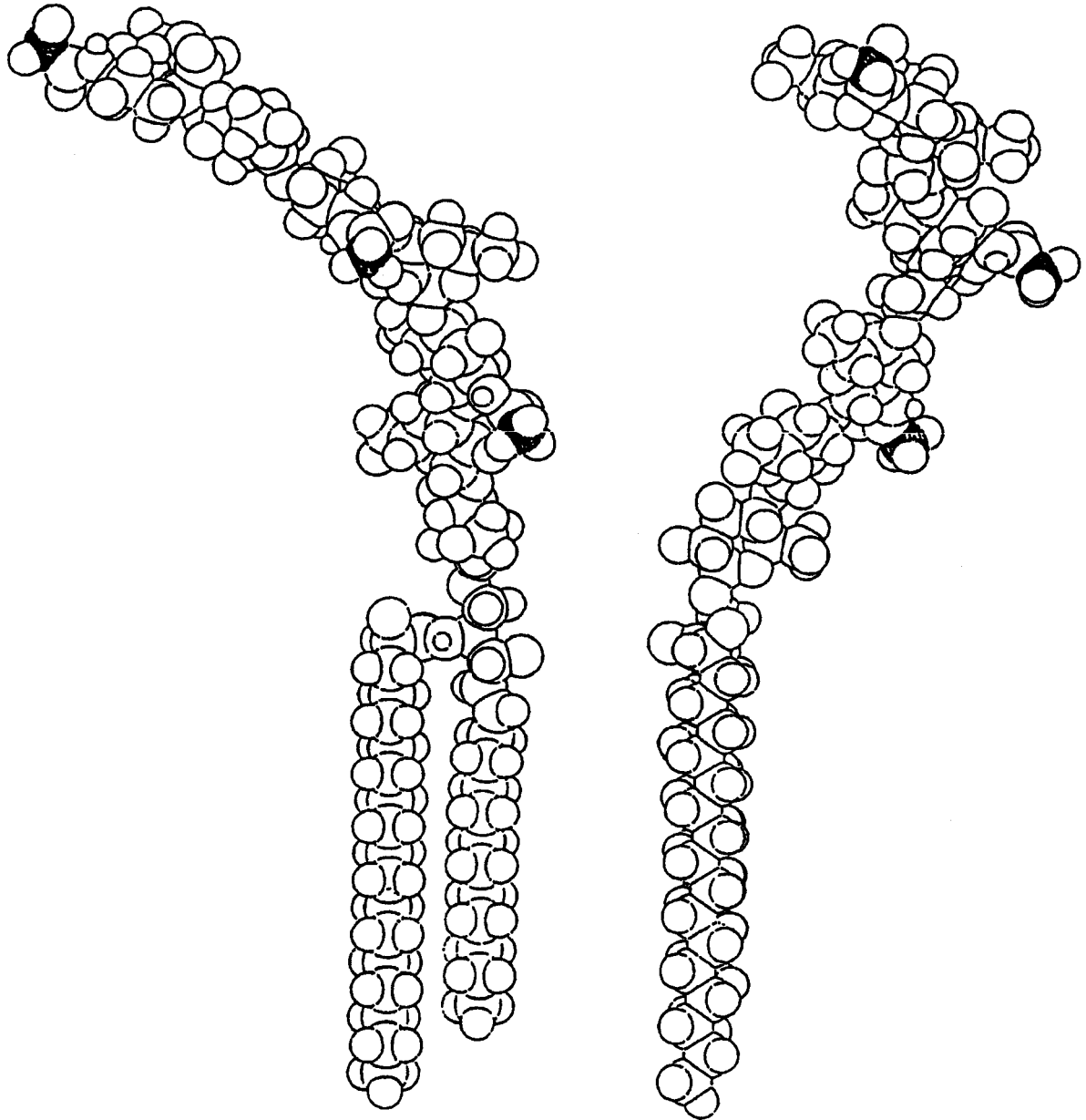
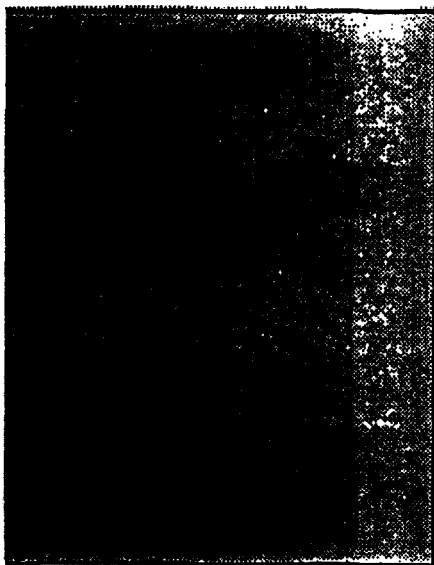
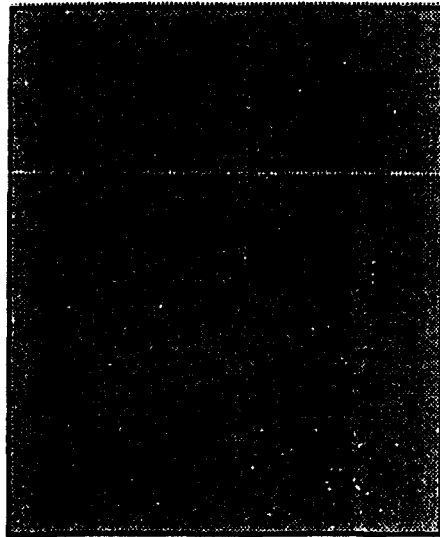


图 11A



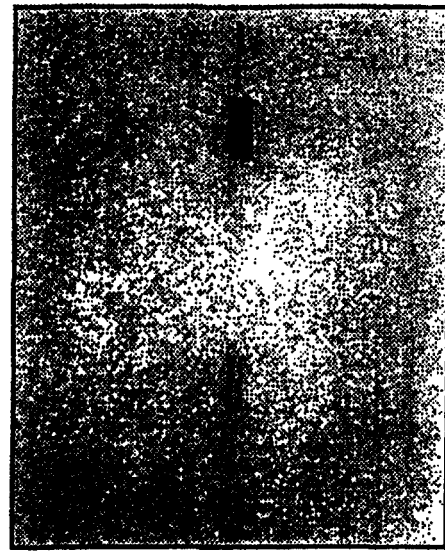
1 2 3 4 5 6 7 8

图 11B



1 2 3 4 5 6 7 8

图 11C



1 2 3 4 5 6 7 8

专利名称(译)	新的幽门螺杆菌受体及其用途		
公开(公告)号	CN1525862A	公开(公告)日	2004-09-01
申请号	CN02805753.8	申请日	2002-01-18
[标]申请(专利权)人(译)	比奥蒂治疗公司		
申请(专利权)人(译)	比奥蒂治疗公司		
当前申请(专利权)人(译)	比奥蒂治疗公司		
[标]发明人	苏珊特尼伯格 乔纳斯安格斯特罗姆 贾里纳图南		
发明人	哈利那·米勒-波德拉扎 苏珊·特尼伯格 乔纳斯·安格斯特罗姆 卡尔-安德斯·卡尔森 贾里·纳图南		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/43 A61K31/702 A61K31/715 A61K39/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P9/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/06 C07H3/06 C12N1/00 C12Q1/02 G01N33/569 C07H15/04		
CPC分类号	A61K31/702 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18		
优先权	2001000118 2001-01-19 FI		
其他公开文献	CN100455290C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明描述了含有结合幽门螺杆菌的寡糖序列[Gal(A)q(NAc)r/Glc(A)q(NAc)rα3/β3]s[Gal β 4GlcNAc β3]tGal β4Glc(NAc)u的物质或受体，其中q、r、s、t和u各自分别为0或1，以及它们在用于治疗由幽门螺杆菌引起疾病的药用和营养组合物等中的用途。本发明还涉及使用该受体来诊断幽门螺杆菌。

