

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-519459

(P2004-519459A)

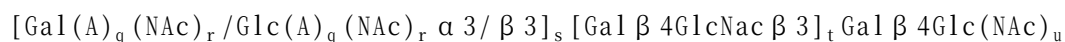
(43) 公表日 平成16年7月2日(2004.7.2)

(51) Int.Cl. ⁷		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K	31/702	A 6 1 K 31/702	4 B 0 6 3
A 6 1 K	31/43	A 6 1 K 31/43	4 B 0 6 5
A 6 1 K	31/715	A 6 1 K 31/715	4 C 0 5 7
A 6 1 K	39/00	A 6 1 K 39/00 H	4 C 0 8 5
A 6 1 P	1/04	A 6 1 P 1/04	4 C 0 8 6
		審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 120 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2002-557400 (P2002-557400)	(71) 出願人	502107469
(86) (22) 出願日	平成14年1月18日 (2002.1.18)		バイオティ セラピーズ コープ
(85) 翻訳文提出日	平成15年7月16日 (2003.7.16)		フィンランド国、エフアイエヌー2052
(86) 国際出願番号	PCT/FI2002/000043		O トウルク、ティキストカトゥ 6
(87) 国際公開番号	W02002/056893	(74) 代理人	100116838
(87) 国際公開日	平成14年7月25日 (2002.7.25)		弁理士 渡邊 潤三
(31) 優先権主張番号	20010118	(72) 発明者	ミラー ポラザ, ハリナ
(32) 優先日	平成13年1月19日 (2001.1.19)		スウェーデン国、エスー421 37 ヴ
(33) 優先権主張国	フィンランド (FI)		ェストラ フレルンダ、ランミルサーン
			20
		(72) 発明者	テネベリ, スサン
			スウェーデン国、エスー430 63 ヒ
			ンドス、アンデビケン ペーエル 163
			9
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヘリコバクターピロリに対する新規受容体およびその用途

(57) 【要約】

本発明は、ヘリコバクター ピロリ結合性オリゴ糖配列である



(式中、q、r、s、t および u は、各々独立に 0 又は 1 の整数である。)

を包含する結合性物質またはレセプター、ならびにその用途、例えば、ヘリコバクターピロリの存在によって生じる病態を治療するための医薬組成物または栄養補助組成物、を開示する。更に本発明は、上記レセプターを用いたヘリコバクター ピロリの診断方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記式：

$$[\text{Gal}(\text{A})_q(\text{NAc})_r / \text{Glc}(\text{A})_q(\text{NAc})_r \alpha 3 / \beta 3]_s [\text{Gal} \beta 4 \text{GlcNAc} \beta 3]_t \text{Gal} \beta 4 \text{Glc}(\text{NAc})_u$$

(式中、q、r、s、t 及び u は、各々独立に 0 又は 1 の整数である。)

で表され、式中の t および u が共に 0 である場合には、多価の担体に結合しているかまたは高濃度の遊離オリゴ糖として存在することを特徴とするオリゴ糖配列あるいはヘリコバクター ピロリに対する結合能を有する該オリゴ糖配列の類似体または誘導体を包含する結合性物質を、ヘリコバクター ピロリに対する結合能または阻害能を有する組成物の製造に用いる方法。

10

【請求項 2】

該結合性物質が、下記式のいずれかで表されるオリゴ糖配列であって、所望により、該オリゴ糖配列の GlcNAc β 3 末端の C 4 位が Gal β 1-または他のオリゴ糖鎖にグリコシド結合しているオリゴ糖配列を包含することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc そして

GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc。

【請求項 3】

該結合性物質が、下記式で表されるオリゴ糖鎖および該オリゴ糖鎖の還元末端含有多価結合体からなる群より選ばれる少なくとも 1 種を包含することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

20

Gal β 4GlcNAc,

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

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

Glc β 3Gal β 4GlcNAc,

Gal 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,

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

Gal β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc, 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,

30

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,

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, そして

Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc。

【請求項 4】

該結合性物質が、下記式で表されるオリゴ糖鎖および該オリゴ糖鎖の還元末端含有多価結合体からなる群より選ばれる少なくとも 1 種を包含することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

40

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, そして

Glc α 3Gal β 4Glc, Glc β 3Gal β 4Glc。

【請求項 5】

該結合性物質が、下記式ので表されるオリゴ糖鎖および該オリゴ糖鎖の還元末端含有多価結合体からなる群より選ばれる少なくとも 1 種を包含することを特徴とする、請求項 3 に記載の方法。

Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc(ラク トー N-ネオテトラオース) そして

Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc(パラ-ラク トー N-ネオヘキサオース)。

【請求項 6】

50

該結合性物質が、多糖、好ましくはポリラクトサミン鎖またはその結合体、に結合していることを特徴とする、請求項 1～5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

該結合性物質が糖脂質であることを特徴とする、請求項 1～5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

該結合性物質が、少なくとも 2 種のオリゴ糖鎖を含有するオリゴマー分子であることを特徴とする、請求項 1～5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

該結合性物質が、請求項 1～8 のいずれかにおいて定義されている結合性物質を包含するミセルからなることを特徴とする、請求項 1～5 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 10】

該結合性物質が担体に結合してなる構造体を用いることを特徴とする、請求項 1～9 のいずれかに記載の方法。

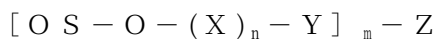
【請求項 11】

該結合性物質が、ヘリコバクター ピロリに対して有効な抗生物質、好ましくはペニシリン系抗生物質、に共有結合していることを特徴とする、請求項 1～10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

該構造体が、下記式で表される構造体であることを特徴とする、請求項 10 に記載の方法。

20



(式中、m は 1 以上の整数であり、n は 0 または 1 であり；

OS はオリゴ糖配列またはヘリコバクター ピロリに対する結合能を有する該オリゴ糖鎖の誘導体であり、

O は酸素原子であり；

X は単糖残基またはオリゴ糖残基、好ましくはラクトシル残基、ガラクトシル残基、ポリ-N-アセチルラクトサミニル残基、あるいはO-グリカンオリゴ糖配列またはN-グリカンオリゴ糖配列の一部であり；

Y はスペーサー、セラミド脂質成分などの末端結合基あるいは該Oまたは該XとZの間の結合であり；

30

Z はオリゴ価または多価の担体であり；

該OSのGlc還元末端またはGlcNAc還元末端は、該末端のC 1 位の酸素原子によって、該Yおよび所望により該Xを介して該Zに結合している。)

【請求項 13】

請求項 1～12 のいずれかにおいて定義されている結合性物質を、ヘリコバクター ピロリの存在によって生じる病態の治療または予防のための医薬組成物の製造に用いる方法。

【請求項 14】

該医薬組成物が、慢性表在性胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、胃腺癌、ヒトの胃における非ホジキン悪性リンパ腫、肝臓病、膵臓病、皮膚病、心臓病または自己免疫性胃炎、悪性貧血および非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) 関連胃疾患を含む自己免疫疾患の治療用、あるいは乳幼児突然死症候群の予防用であることを特徴とする、請求項 13 に記載の方法。

40

【請求項 15】

請求項 1～12 のいずれかにおいて定義されている結合性物質を用いた、ヘリコバクター ピロリの感染によって生じる病態の診断方法。

【請求項 16】

請求項 1～12 のいずれかにおいて定義されている結合性物質を、ヘリコバクター ピロリの存在によって生じる病態の治療または予防のための栄養補助剤または栄養補助組成物の製造に用いる方法。

【請求項 17】

50

該栄養補助剤または栄養補助組成物が乳児用ミルクであることを特徴とする、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

請求項 1 ～ 1 2 のいずれかにおいて定義されている結合性物質を、バクテリア性付着因子の同定に用いる方法。

【請求項 1 9】

請求項 1 ～ 1 2 のいずれかにおいて定義されている結合性物質または請求項 1 8 の方法によって同定されたバクテリア性付着因子をヘリコバクター ピロリに対するワクチンの製造に用いる方法。

【請求項 2 0】

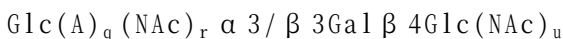
請求項 1 ～ 1 2 のいずれかにおいて定義されている結合性物質を含んでなる、ヘリコバクター ピロリの型の同定方法。

【請求項 2 1】

請求項 1 ～ 1 2 のいずれかにおいて定義されている結合性物質を用いた、ヘリコバクター ピロリ結合アッセイ。

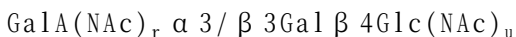
【請求項 2 2】

下記式で表されるいずれかのオリゴ糖配列、あるいはヘリコバクター ピロリに対する結合能を有する該オリゴ糖配列の類似体または誘導体を包含するヘリコバクター ピロリ結合性物質。



(式中、q、r および u は各々独立に 0 又は 1 の整数であり、

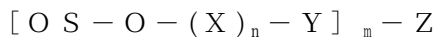
但し $\beta 3$ 結合が含まれる場合には、q と r は共に 0 または 1 である。) そして



(式中、r および u は各々独立に 0 又は 1 の整数である。)

【請求項 2 3】

請求項 1 において定義されているオリゴ糖鎖あるいはヘリコバクター ピロリに対する結合能を有する該オリゴ糖配列の類似体または誘導体を包含する、ヘリコバクター ピロリ結合性の非酸性多価物質であって、該オリゴ糖鎖は請求項 1 2 において定義されている下記式で表される構造体の一部である。

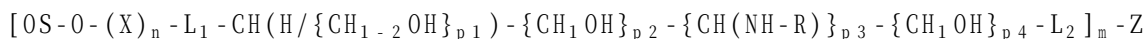


(式中、m、n、OS、X、Z は請求項 1 2 において定義した通りであり；

Y は親水性スパーサー、好ましくは可動性親水性スパーサーである。)

【請求項 2 4】

該 Y が下記式で表されることを特徴とする、請求項 2 3 に記載のヘリコバクター ピロリ結合性の非酸性多価物質。



(式中、

OS および X は請求項 1 2 において定義した通りであり；

L_1 および L_2 は結合基あって、各々独立に酸素原子、窒素原子、硫黄原子または炭素原子である結合原子あるいは置換基を形成する結合に含まれる 2 つの原子を包含し、該置換基を形成する結合は $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{N}-$ 、 $-\text{N}(\text{COCH}_3)-$ 、 $-\text{CO}-\text{NH}-$ または $-\text{NH}-\text{CO}-$ で表されるアミド基、 $-\text{N}-\text{N}-$ (ヒドラジン誘導体)、あるいは $-\text{O}-\text{N}$ または $-\text{N}-\text{O}$ で表されるアミノオキシ結合であり；

L_1 は該 X である単糖の還元末端の C 1 位に結合した結合基であり、n が 0 の場合には、

L_1 は該 X の $-\text{O}-$ を置換して、該 OS の還元末端の C 1 位に直接結合しており；

p 1、p 2、p 3 および p 4 は各々独立に 0 ～ 7 の整数であるが、p 1、p 2、p 3 および p 4 の少なくとも 1 つが 1 であり；

$\{\text{CH}_{1-2}\text{OH}\}_{p1}$ が分岐構造を表す場合には、末端基となる CH_{1-2}OH は CH_2OH であり、p 1 が 1 を超える場合には、該末端基をスパーサーである該 Y の残りの部分に結合させるための第二級アルコール基である $-\text{CHOH}-$ が存在し；

10

20

30

40

50

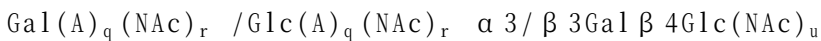
Rは好ましくはアセチル基 ($-COCH_3$)、Zに連結する結合または C_{1-4} アシル基を包含する類似体形成基であり、Rが結合である場合には L_2 は糖鎖末端基の1つまたは2つの原子であり、該 C_{1-4} アシル基はアミド構造、水素原子または C_{1-4} アルキル基を形成するアミンであり；

mは1を超える整数であり；

Zは多価の担体である。)

【請求項25】

下記式で表されるオリゴ糖配列を非還元末端として包含するヘリコバクター ピロリ結合性物質およびヘリコバクター ピロリに対する結合能を有する該結合性物質の類似体または誘導体。



(式中、q、rおよびuは各々独立に0または1であるが、該オリゴ糖配列は

$\text{Gal} \alpha 3 \text{Gal} 4 \beta \text{Glc} / \text{GlcNAc}$ ではない。)

【請求項26】

バクテリア、毒素またはウイルスの結合用である、請求項22～25のいずれかに記載の結合性物質。

【請求項27】

薬剤用である、請求項22～25のいずれかに記載の結合性物質。

【請求項28】

患者にヘリコバクター ピロリが存在することによって生じる病態の治療方法であって、薬学的に有効な量の請求項1～12および22～25のいずれかにおいて定義されている結合性物質を該患者に投与することを包含してなる治療方法。

【請求項29】

該病態が、患者の消化器系にヘリコバクター ピロリが存在することによって生じたものであることを特徴とする、請求項28に記載の治療方法。

【請求項30】

慢性表在性胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、胃腺癌、ヒトの胃における非ホジキン悪性リンパ腫、肝臓病、膵臓病、皮膚病、心臓病または自己免疫性胃炎、悪性貧血および非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) 関連胃疾患を含む自己免疫疾患の治療用、あるいは乳幼児突然死症候群の予防用であることを特徴とする、請求項28に記載の治療方法。

【請求項31】

該結合性物質が栄養補助剤であるか、または栄養補助組成物の一部であることを特徴とする、請求項28～30のいずれかに記載の方法。

【請求項32】

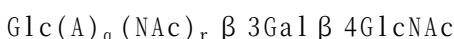
該毒素が Clostridium difficile の毒素であることを特徴とする、請求項26に記載の結合性物質。

【請求項33】

該オリゴ糖配列が $\beta 1-6$ 結合によって GalNAc 、 GlcNAc 、 Gal または Glc に結合していることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項34】

該オリゴ糖配列が下記式で表されることを特徴とする、請求項2に記載の方法。



(式中、qおよびrは請求項1において定義した通りである。)

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヘリコバクター ピロリに結合する物質またはレセプターおよびその用途、例えば、ヘリコバクター ピロリの存在によって生じる病態を治療するための医薬組成物または栄養補助組成物、を開示する。更に本発明は、上記レセプターを用いたヘリコバクター ピロリの診断方法に関する。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0002】

ヘリコバクター ピロリは、慢性胃炎、非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）関連胃疾患、胃や十二指腸の潰瘍、胃MALT悪性リンパ腫および胃腺癌を含む、様々な消化器系の疾患との関連が知られている（Axon, 1993; Blaser, 1992; DeCross と Marshall, 1993; Dooley, 1993; Dunn *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1993; Nomura と Stemmermann, 1993; Parsonnet *et al.*, 1994; Sung *et al.*, 2000; Wotherspoon *et al.*, 1993）。全体的にまたは部分的に胃腸疾患ではない疾患としては、乳幼児突然死症候群（Kerr *et al.*, 2000 および米国特許第6,083,756号）、自己免疫性胃炎や悪性貧血などの自己免疫疾患（Appelmelk *et al.*, 1998; Chmiela *et al.*, 1998; Clayes *et al.*, 1998; Jassel *et al.*, 1999; Steininger *et al.*, 1998）、ある種の皮膚病（Rebora *et al.*, 1995）、膵臓病（Correa *et al.*, 1990）、腺癌を含む肝臓病（Nilsson *et al.*, 2000; Avenaud *et al.*, 2000）およびじゅく状硬化症などの心臓病（Farsak *et al.*, 2000）が挙げられる。ヘリコバクター ピロリが原因であるかまたは関連する様々な疾患について検討されている（Pakodi *et al.*, 2000）。バクテリアのコロニー形成および感染において最も興味深い事柄は、バクテリアが胃粘膜の上皮細胞表面に付着するメカニズムである。

【0003】

糖脂質および糖タンパクを含む糖結合体、例えば、シアリル化糖結合体（Evans *et al.*, 1988）、サルファチドおよびGM3（Saitoh *et al.*, 1991）、Le^b決定基（Boren *et al.*, 1993）、ポリグリコシルセラミド類（Miller-Podraza *et al.*, 1996; 1997a）、ラクトシルセラミド（Angstrom *et al.*, 1998）およびガングリオテトラオシルセラミド（Lingwood *et al.*, 1992; Angstrom *et al.*, 1998）などは、上記微生物を結合するレセプターとして機能することが報告されている。ヘリコバクター ピロリに対するその他の潜在的なレセプターには、多糖硫酸ヘパリン（Ascensio *et al.*, 1993）のみならず、リン脂質ホスファチジルエタノールアミン（Lingwood *et al.*, 1992）も含まれる。

【0004】

Zopfらの米国特許第5,883,079号（1999年3月）、第5,753,630号（1998年5月）および第5,514,660号（1996年5月）には、ヘリコバクター ピロリの結合を阻害する物質としてNeu5Ac α 3Gal-を含有する化合物が記載されている。シアリルーラクトース分子はヒト胃腸器系細胞株に対するヘリコバクター ピロリの結合を阻害し（Simon *et al.*, 1999）、アカゲザルの感染モデルにおいても効果を示した（Mysore *et al.*, 2000）。この化合物は臨床試験中である。

【0005】

Krivanらの米国特許第5,446,681号（1995年11月）は、バクテリアのレセプターと抗生物質の結合体であって、アシアロガングリオシドがペニシリン系抗生物質に結合したものを開示している。特にこの特許では、アモキシシリン-アシアローGM1結合体によるヘリコバクター ピロリの治療を請求している。この発明で開示されるオリゴ糖配列／糖脂質はガングリオ系列の糖脂質には属していない。

【0006】

Krivanらの米国特許第5,386,027号（1995年1月）および第5,217,715号（1993年6月）は、オリゴ糖配列または糖脂質を病原性バクテリアの阻害に用いることを開示しているが、本願の結合特異性に関する記載はなく、ヘリコバクター ピロリは検討したバクテリアにも請求の範囲にも含まれていない。

【0007】

糖配列GlcNAc β 3Galはストレプトコッカスのレセプターとして報告されている（Andersson *et al.*, 1986）。複数のバクテリアが重複する結合特異性を示すことが考えられるが、たとえ関連性の非常に高いバクテリア性付着因子であっても、その結合性を予測することは不可能である。ヘリコバクター ピロリの場合、ルイスb結合タンパク以外に糖結合分子は知られていない。

10

20

30

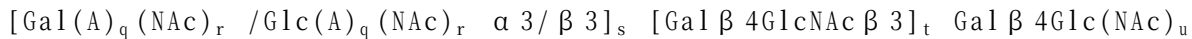
40

50

【0008】

発明の概要

本発明は、下記式：



(式中、q、r、s、t及びuは、各々独立に0又は1の整数である。)

で表され、式中のtおよびuが共に0である場合には、多価の担体に結合しているかまたは高濃度の遊離オリゴ糖として存在することを特徴とするオリゴ糖配列あるいはヘリコバクター ピロリに対する結合能を有する該オリゴ糖配列の類似体または誘導体を包含する結合性物質を、ヘリコバクター ピロリに対する結合能または阻害能を有する組成物の製造に用いる方法に関する。

10

【0009】

本発明の目的は、本願に記載したヘリコバクター ピロリ結合性オリゴ糖配列を用いた薬剤および上記オリゴ糖配列を用いた医薬組成物、特にヘリコバクター ピロリの存在によって生じる病態を治療するための薬剤、の製造方法を提供することである。

【0010】

更に本発明は、ヘリコバクター ピロリの存在によって生じる病態の治療方法に関する。また本発明は、本発明に記載のレセプターをヘリコバクター ピロリ結合性物質または阻害性物質として用いるヘリコバクター ピロリの診断剤に関する。

【0011】

本発明の他の目的は、ヘリコバクター ピロリ結合性オリゴ糖配列を含有する結合性物質、医薬組成物および栄養補助剤または栄養補助組成物を提供することである。

20

【0012】

本発明の更なる他の目的は、上記ヘリコバクター ピロリ結合性物質を用いたバクテリア付着因子の同定方法、ヘリコバクター ピロリの型の同定方法およびヘリコバクター ピロリ結合アッセイを提供することである。

【0013】

本発明の更なる他の目的は、上記ヘリコバクター ピロリ結合性物質をヘリコバクター ピロリに対するワクチンの製造に用いる方法を提供することである。

【0014】

発明の詳細の説明

本発明は、ヘリコバクター ピロリに結合する特定のオリゴ糖鎖からなるファミリーを開示する。種々の天然に存在するグリコスフィンゴ脂質を薄層オーバーレイアッセイ(表2)でスクリーニングした。使用したグリコスフィンゴ脂質の構造はプロトンNMRおよび質量分析実験で特徴付けた。ヘリコバクター ピロリに結合する物質の三次元構造を比較するために、分子モデリングを用いた。

30

【0015】

4種の五糖からなる糖脂質を比較することで、新規な結合特異性を明示した。GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cerの非還元末端の糖をGalNAc β 3(略称はx₂GS Lである)、GalNAc α 3またはGal α 3(B5)に置換すると、アノマー性、アセトアミド基の有無および末端糖の4-OH基の軸配座/赤道配座の違いがあるものの、いずれもヘリコバクター ピロリに対して結合性を示した。特異的結合を示すものには、ヘリコバクター ピロリに対して弱い結合性を示す、短いGal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer、および末端N-アセチルグルコサミンを有する β 4伸長型糖脂質であるGal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cerと NeuGc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cerも含まれる。一方、公知のシアリル酸依存性の特異性(Evans *et al.*, 1988; Miller-Podraza *et al.*, 1996; 1997a)と比べ、上記した最後のグリコスフィンゴ脂質のN-グリコリルノイラミン酸を放出させても、ヘリコバクター ピロリに対する結合性に影響することない。

40

【0016】

ヘリコバクター ピロリの一般的な糖結合性はバクテリアの相変異の影響を受けるものの、GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cerに対する結合は非常に再現性が高く、高親和

50

性の結合が低ピコモルの糖脂質を用いたオーバーレイアッセイでも視覚化された。

【0017】

結合エピトープの長さは、GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer、Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer および Gal α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer（活性種を短縮したものと脱N-アセチル化したもの）がヘリコバクター ピロリに結合しないことを示す実験結果より明らかとなった。このデータは、内部GlcNAc残基が結合に関与するものの、それだけでは十分に強い結合は形成しないことを示した。結合エピトープは、上述の五糖からなるエピトープの末端三糖であると考えられる。これら糖残基の2つしか存在しないGal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cerなどでは結合は弱く、六糖の糖脂質であるGal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cerにおいては、末端のGal β 4は結合を阻害し、弱い結合活性を説明した。活性の低い六糖の糖脂質構造にGal α 3を付加した七糖の糖脂質であるGal α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cerはより高い活性を示し、末端三糖からなるエピトープが優れた結合活性に必要であることを示した。

10

【0018】

結合特異性の特徴付けは、活性種の異性体およびの修飾体の分析によって行った。Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cerの末端Galに次の修飾を受けた伸長型は、ヘリコバクター ピロリに対する結合アッセイで不活性であった：Fuc α 2（略称はH5-2）、Fuc α 2とGal/GlcNAc α 3（B6-2とA6-2）、Neu5Ac α 3またはNeu5Ac α 6（シアリルパラグロボシド類）、およびGal α 4（P₁）。結合能は、Gal β 4GlcNAc β 3(Gal β 4GlcNAc β 6)Gal β 4Glc β Cerで示されるような β 6-結合した内部ガラクトース分岐鎖の存在によっても破壊された。分岐鎖はGal β 4GlcNAc β 3エピトープの提示に変化をもたらし、二糖の結合部位に立体障害を起こしていると考えられる（Teneberg et al., 1994）。（しかし、結果は、二糖または三糖からなる結合エピトープが β 3結合によって結合している内部ガラクトース残基も結合に関与している可能性を示した。）更に、Neu5Ac α 3GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer（結合活性種であるx₂-グリコスフィンゴ脂質の伸長型）またはGalNAc β 3Gal α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer（B5 G S Lの伸長型）はヘリコバクター ピロリに対する結合を示さなかった。

20

【0019】

結合活性種と結合不活性種を比較するために分子モデリングを用いた。4種の五糖グリコスフィンゴ脂質（Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β CerをGlcNAc β 3をGalNAc β 3、GalNAc α 3またはGal α 3で伸長したもの）について予測した最小エネルギー配座異性体は、これらの化合物がお互いの立体配置を非常に細かく模倣していることを示した。不活性な糖脂質の立体配置は異なっていた。末端糖のアノマー結合が異なる（2つは α 結合で2つは β 結合である）にもかかわらず、分子モデリングは最小エネルギー配座に類似点が存在することを示した。末端構造の違いは、Gal α 3が他の3種に存在するアセトアミド基を有していないこと、GalおよびGalNAcの4-OH基は軸配座にありGlcNAcが赤道配座にあること、ならびに末端 α 3-結合化合物の環の形成する平面構造が β 3-結合した対応化合物の平面構造よりも少し上に位置することである。GlcNAcの4位で末端は伸長することが可能であり、これはGal β 4伸長が立体障害を生じるにもかかわらず、4-OHは結合にあまり重要ではないことを示した。これらをまとめると、4種の五糖からなる糖脂質が全て同様の親和性をヘリコバクター ピロリ付着因子に対して示したので、4-OHの位置、アセトアミド基の有無および末端単糖残基のアノマー構造のいずれもが結合が生じるためには重要ではない。

30

40

【0020】

上述の結合の法則に鑑みて、結合性物質に見られる他の4種の末端単糖も以下の三糖からなる結合エピトープを提供すると考えられる：Gal β 3Gal β 4GlcNAc、GlcNAc α 3Gal β 4GlcNAc、Glc β 3Gal β 4GlcNAc および Glc α 3Gal β 4GlcNAc。これらは検討した配列と類似しており、アノマー構造、4-エピマー構造またはC2 NAc/OH構造の違いがあるだけである。1つ目の物質はヒト赤血球の糖脂質に提示されているものであり、残りの3つの物質は今のところヒト組織では見出されておらず、天然のレセプターの類似体であると

50

考えられる。

【0021】

結合エピトープは五糖からなる活性糖脂質の末端三糖因子を包含することが明らかとなり、少なくとも大きな繰り返しN-アセチルラクトサミンにおいては、エピトープは糖鎖の中心にも存在することがある。本発明者らは、結合エピトープは天然または生合成した糖結合体やオリゴ糖（例えば、糖タンパクのO-結合またはN-結合したグリカン類）やポリ-N-アセチルラクトサミンオリゴ糖類に様々な形で提示されることが可能であることを明示した。化学合成法および酵素合成法、特に炭水化物の分野においては、無限に近い数の誘導体や類似体を製造することができる。結合エピトープの大きさは変えることが可能であり、末端単糖のC1位、C2位およびC4位について例示したように、非還元末端単糖の欠失やGlcNAc β 3Gal β 4GlcNAcの末端GlcNAcのC4位から伸長する（例えば、GlcNAc β 3のC4位をグリコシル結合を介してオリゴ糖鎖に結合する）こともできる。オリゴ糖鎖がGlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glcである場合には、末端GlcNAc β 3のC4位はグリコシド結合を介してGal β 1-またはオリゴ糖鎖に結合することができる。特に、三糖からなるエピトープの非還元末端単糖残基のC2位とC4位およびエピトープの還元末端は、ヘリコバクターピロリ結合能を有する誘導体やオリゴ糖または多価の結合体の製造に用いることができる。単糖残基のC6位も誘導体や類似体の製造に用いることができ、特に三糖配列の非還元末端残基および二糖または三糖の結合性物質の還元末端残基のC6位が好ましい。

10

【0022】

本発明において、「類似体」および「誘導体」は次のように定義される。本発明によると、ヘリコバクターピロリ結合性オリゴ糖配列の構造類似体や誘導体を設計することができる。従って、本発明は、本発明の結合性物質の構造類似体にも関する。本発明における構造類似体は、ヘリコバクターピロリのオリゴ糖配列に対する結合に重要な構造因子を包含する。効果的な構造類似体を設計するには、ヘリコバクターピロリと糖類との結合に重要な構造因子を知ることが重要である。重要な構造因子は修飾されていないか、重要な構造因子を模倣するように修飾されていることが好ましい。これらの因子には、好ましくは三糖または二糖からなるエピトープのGal β 4残基の4-または6-ヒドロキシル基が含まれる。また、環構造の間の結合の位置も重要な構造因子である。高親和性結合には、三糖または二糖からなるエピトープの還元末端GlcNAcのアセトアミド基の位置に対応する位置にアセトアミド基またはアセトアミド模倣基であることが好ましい。アセトアミド模倣基は他のアミド基、例えば、アルキルアミド、アリールアミドおよび第2級アミンであり、好ましくはN-エチルまたはN-メチル、O-アセチルまたはO-アルキル（O-エチルやO-メチルなど）である。高親和性結合には、末端ウロン酸のカルボキシル基のアミド誘導体やその類似体が好ましい。未修飾のウロン酸の活性は低いpHで上昇すると考えられている。

20

30

【0023】

本発明における構造誘導体は、ヘリコバクターピロリに対する結合能を保持するか向上するように本発明のオリゴ糖鎖を化学的に修飾したものである。本発明によると、オリゴ糖鎖のヒドロキシル基またはアセトアミド基の1つまたは複数を誘導化することが好ましい。本発明は、類似体や誘導体を調製する際に変えることのできる分子上の位置を複数開示する。少なくともいくつかの修飾が可能なヒドロキシル基またはアセトアミド基を化1中のR基として示した。

40

【0024】

大きな置換基または酸性の置換基、あるいは単糖残基のような構造体は、少なくともGal β 4GlcNAcのC2、C3またはC6位のヒドロキシル基や三糖エピトープの非還元末端C3位ヒドロキシル基に結合している場合には許容されない。レクチン結合性のオリゴ糖類似体を製造する方法はよく知られている。例えば、シアリル化ルイスXオリゴ糖の類似体は複数製造されており、これらは異なる骨格の活性官能基である（SearsとWong 1996、12090ページを参照）。同様に、ヘパリンオリゴ糖の類似体もサノフィ社によって製造

50

されており、シアリダーゼに対するシアリル酸模倣阻害剤、例えばZanamivirやTamiflu (Relenza製)、が複数のグループによって製造されている。オリゴ糖類似体は少なくとも1つの六員環または五員環構造に基づいて構築されていることが好ましく、類似体は6個または5個の原子を包含する少なくとも2つの環構造を含有することがより好ましい。オリゴ糖の好ましい類似体は末端ウロン酸アミドを包含するか、または類似体がGal β 4GlcNAc-糖模倣構造に結合している。また、末端ウロン酸アミドがGalに1-3結合しており、更にGlcNAc模倣構造に結合しているものも好ましい。模倣構造においては、単糖環はシクロヘキサンやシクロペンタンなどの環状分子、ベンゼン環を含む芳香族環によって置換されていてもよく、そのようなヘテロ環構造は酸素原子の他に、例えば窒素原子や硫黄原子を包含してもよい。活性環状立体構造を固めるためには、環状構造が許容できる結合基で繋ぐこともできる。典型的な模倣構造は、オリゴ糖配列またはその一部に対するペプチド類似体構造を更に包含してもよい。

10

【0025】

活性基が結合活性に与える影響は累積するので、1つの活性基が失われても、分子の異なる場所に活性残基を付加することで補うことができる。分子モデリング、好ましくはコンピューターを用いた分子モデリングを本発明のヘリコバクター ピロリ結合性オリゴ糖配列の類似体構造を製造するのに用いることができる。種々のオリゴ糖配列の分子モデリングの結果が実施例に示されており、NMRとX線結晶回折を除く方法と同じまたは類似した方法を用いて本発明のオリゴ糖配列に対する類似体を得ることができる。類似体を見つけるためには、オリゴ糖をヘリコバクター ピロリの炭水化物結合分子、最も可能性が高いのは上記バクテリアのレクチン、と合体させ、考えられる更なる結合相互作用を探索することができる。

20

【0026】

コンビナトリアルケミストリーによって誘導体を調製することで、レクチンに対して高い活性を示すように1価、オリゴ価または多価のオリゴ糖を活性化することもできる。オリゴ糖配列の1つまたは複数の残基を置換することでライブラリーを構築した場合には、それは誘導体ライブラリーと考えることができ、また、本発明のオリゴ糖配列の類似体からライブラリーを構築することもできる。コンビナトリアルケミストリーによるライブラリーは本発明のオリゴ糖、その前駆体または糖結合体に基づいて構築することができる。たとえば、種々の還元末端を有するオリゴ糖をカーボハイドリッド技術(carbohydrid technology)と呼ばれる技法によって製造することができる。

30

【0027】

本発明の好ましい態様においては、コンビナトリアルケミストリーによるライブラリーは、本発明で開示するヘリコバクター ピロリ結合性物質に結合されている。より好ましい態様においては、ライブラリーは少なくとも6種の異なる分子を包含する。コンビナトリアルケミストリーによる修飾は、化1のR₈位であるカルボキシル基を種々のアミド基に変化させることで得られるものが好ましい。R₈位で修飾される置換基は、アルデヒド、アミンまたはその他の活性基でもよい。このようなライブラリーは、本発明のオリゴ糖配列に対する微生物性の結合を検出するために用いるのが好ましい。アミノ酸または有機アミド類のコレクションは市販されており、このような物質はウロン酸アミドのコンビナトリアルケミストリーによるライブラリーを合成するために用いることができる。コンビナトリアルケミストリーによるライブラリーから高親和性のバインダーを同定することができる。例えば、ライブラリー中の化合物を用いてバクテリアによる本発明の糖脂質または糖結合体に対する結合を阻害する物質を同定する阻害アッセイを行うことができる。本発明において好ましい構造類似体や誘導体は、本発明のヘリコバクター ピロリ結合性のオリゴ糖配列がヘリコバクター ピロリに結合するのを阻害することができる。

40

【0028】

現行のTLCアッセイでは、脂質部分または近接したシリカ表面による立体障害はエピソードGlcNAc β 3Gal β 4Glcの定量を制限しているものと考えられる。アッセイ系におけるこの配列の活性を用いても、本願明細書においてヘリコバクター ピロリについて記載し

50

た4種の三糖からなるエピトープを特異的に認識する *Clostridium difficile* のトキシンAを用いた近年の研究 (Teneberg *et al.*, 1996) と同様の結果は得られなかった。しかし、Gal α 3Gal β 4GlcのトキシンAに対する結合は、大きなポリマー様スパーサーによって修飾した糖結合体を用いた他の研究グループによって発表されている (Castagliuolo *et al.*, 1996)。更に、末端単糖が結合に寄与することを考慮すると、エピトープの還元末端にGlcが存在することは可能であり、非活性である脱N-アセチル型においては、ヒドロキシル基の存在よりも、遊離アミンの陽性電荷の方が結合にとって破壊的であると考えられる。Glcが還元末端に存在する三糖からなるエピトープは、オリゴ価、より好ましくは多価の形で存在する場合に、ヘリコバクター ピロリ結合性物質の有効な類似体であると考えられる。本発明の1つの態様はGlc還元末端を有する糖であり、高濃度、好ましくは1~100 g/l、より好ましくは1~20 g/l、の遊離還元糖として用いるものである。このような糖は0.1~1 g/lの濃度でも、微量な活性を示すことがわかっている。

10

【0029】

以下、本明細書においては、ヘリコバクター ピロリ結合性物質をオリゴ糖配列と称する。本発明においてオリゴ糖配列とは、天然または合成の糖結合体あるいは遊離オリゴ糖または遊離オリゴ糖の一部である。このようなオリゴ糖配列は、例えば、糖鎖がバクテリアの多糖である場合に、種々の単糖、オリゴ糖、多糖や多糖配列に結合してもよい。さらに、単糖に対する天然の修飾も多数知られており、オリゴ糖配列のO-アセチル化誘導体や硫酸化誘導体が例示できる。本発明においてヘリコバクター ピロリ結合性物質は、天然

20

【0030】

レセプターオリゴ糖配列から得られた複数の誘導体が現行のアッセイ法の検出限界を下回るほどに結合量を低下させ、認識の特異性を明らかにした。結合に関するデータは、上記オリゴ糖配列の配列が、GalNAc β 3Gal α 3Gal β 4GlcNAcに結合したもの（置換配列：GalNAc β 3Gal α 3Gal β 4GlcNAc）または Neu5Ac α 3GalNAc β 3Gal β 4GlcNAcに結合したもの（置換配列：Neu5Ac α 3GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc）である場合には、不活性であることを示した。上記オリゴ糖配列がGal β 4GlcNAcである場合には、該配列は α 4-ガラクトシル化されておらず（即ち、Gal α 4Gal β 4GlcNAcではなく）、 α 3-または α 6-シアリル化されておらず（即ち、Neu5Ac α 3/6Gal β 4GlcNAcではなく）、 α 2-または α 3-フコシル化されていない〔即ち、Fuc α 2Gal β 4GlcNAc または Gal β 4(Fuc α 3)GlcNAc または Fuc α 2Gal β 4(Fuc α 3)GlcNAc ではなく、 α 3-フコシル化とは、ルイスx、即ち、Gal β 4(Fuc α 3)GlcNAc、を構成するラクトサミンのGlcNAc残基のフコシル化を意味する〕。Gal β 3がGlcNAc β 3に結合した構造（例えば、Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc/Glc）を有する糖は、本発明で開示したヘリコバクター ピロリ結合性物質とは異なる立体構造を有し、その結合特異性については別途検討した。ヘリコバクター ピロリ結合性物質は糖鎖、糖結合体または他の公知のヘリコバクター ピロリ結合性エピトープを含有する糖化合物〔例えばルイスb（Fuc α 2Gal β 3(Fuc α 4)GlcNAc または Neu5Ac α 3Gal β 4Glc/GlcNAc）の

30

40

【0031】

ヘリコバクター ピロリ結合性オリゴ糖配列は、グリコシルトランスフェラーゼによって酵素的に合成するか、あるいはグリコシダーゼまたはトランスグリコシダーゼによって触媒されるトランスグリコシル化反応で合成することができる (Ernst *et al.*, 2000)。これらの酵素の特異性および補因子の必要性については改良することができる。修飾された特定の酵素を用いてより効率よく合成することもでき、例えば、グリコシンセターゼをトランスグリコシル化のみを触媒するよう修飾することができる。本発明で開示する糖および糖結合体またはそれらと類似した化合物の有機合成も知られている (Ernst *et al.*, 20

50

00)。糖物質は天然の原料から単離して、化学的または酵素学的に修飾してヘリコバクターピロリ結合性化合物とすることができる。種々の反芻動物の乳から天然のオリゴ糖を単離することができる。グリコシル化酵素を発現するトランスジェニックな生物、例えばウシや微生物も糖の製造に用いることができる。

【0032】

本発明で開示するウロン酸単糖残基は公知の方法で得ることができる。例えば、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンの6位の炭素に結合したヒドロキシル基を化学的に酸化してカルボン酸にすることができる。酸化反応は、正しく保護されたオリゴ糖や単糖に対して行うことができる。

【0033】

本発明の好ましい態様においては、ヘキソース、N-アセチルヘキソサミンまたはヘキソサミンを包含する未保護のポリマーまたはオリゴマーであって、単糖類残基間の結合が6位の炭素原子の間ではないものを、

1) 酸化して、ウロン酸残基からなる対応するポリマーまたは6-アルデヒドモノサッカリドをモノマーとして包含するポリマーを得、

2) 所望によりカルボン酸基または6-アルデヒド基を誘導化し、好ましくはアミドまたはアミンに変換する、そして

3) 加水分解によってウロン酸単糖類またはウロン酸誘導体単糖類を得る。

【0034】

単糖残基を酸化してウロン酸得るため、ならびにアミンまたはウロン酸ポリマーを加水分解するための化学的または酵素学的方法は当業界でよく知られている。このような方法を用いるのに特に好ましいのは、1-2結合、1-3結合または1-4結合を有する、セルロース、でんぷんまたは他のグルカン類のオリゴマーまたはポリマー、キチン（GlcNAcポリマー）またはキトサン（GlcNポリマー）などの大量に市販されている化合物、あるいはN-アセチルガラクトサミン／ガラクトサミン多糖類（例えば微生物由来のもの）を酸化して得た対応1-4結合糖質である。この方法はガラクタンポリマーに用いることもできる。ウロン酸誘導体はウロン酸含有天然ポリマー、例えば、ペクチンやバクテリア由来多糖類（N-アセチルヘパリン、ヒアルロン型またはコンロインチン型のバクテリア外生多糖類）を包含するグルクロン酸などが挙げられる。この方法は、以下の工程からなる。

1) 多糖類のカルボン酸基を誘導化し、好ましくはアミド結合に変換する、そして

2) 該多糖類の加水分解によってウロン酸単糖類またはウロン酸誘導体単糖類を得る。

【0035】

多糖類の6位炭素に結合した一級アルコールを酸化してアルデヒドまたはカルボン酸にするための化学的および酵素学的方法も知られている。アルデヒドは更に誘導化して、例えば還元的アミン化反応によってアミンに変換することができる。好ましくは、末端GalまたはGalNAcは、一級アルコール酸化酵素（例えば、ガラクトース酸化酵素）によって酸化し、その後さらに誘導化して、例えばアミン類にすることもできる。

【0036】

通常有機化学的手法によってウロン酸残基を二糖類またはオリゴ糖類に結合することができる。また、UDP-GlcAのGlcAを末端Lac(NAc)に転換するグロコニルトランスフェラーゼによってGlcAを結合することもできる。

【0037】

N-アセチルヘキソサミンを模倣する単糖誘導体は、ヘキソサミンまたは遊離アミン基を有する単糖類を包含するポリマーかオリゴマーを用い、以下の方法で得ることができる。

1) アミン基を誘導化して2級または3級アミンあるいはアミドに変換し、そして

2) 加水分解によって対応する単糖類を得る。

【0038】

キトサンおよびそのオリゴ糖は、アミンを含有するポリマーまたはオリゴマーの具体例である。

【0039】

10

20

30

40

50

一般的に、カルボン酸、6-アルデヒド、アミンおよび／またはアミドを含有する単糖／単糖類は、以下の工程からなる方法で得ることができる。

- 1) 所望により、炭水化物ポリマーにカルボン酸または6-アルデヒド基を導入し、但し、1級ヒドロキシル基は修飾のために存在し、
- 2) 該ポリマーのカルボン酸基、6-アルデヒド基または1級アミン基を誘導化して、2級または3級アミンあるいはアミドに変換するが、上記工程1)を実施した場合には、工程2)は所望により行えばよく、そして
- 3) 加水分解によって対応する単糖類を得る。

【0040】

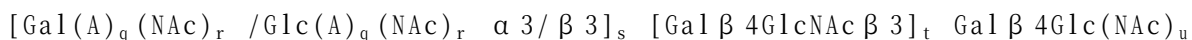
単糖類を得るための加水分解は部分的でもよく、類似体物質の製造に有用な二糖やオリゴ糖を得ることができる。加水分解によって少なくとも30%の単糖類が得られることが好ましい。化学的工工程を実施するための方法は公知である。例えば、多糖類を対応する単糖類に酸化するには、Muzzarelli *et al.* 1999と2002に記載の方法を行えばよい。これらの方法は、単糖類の保護または還元末端の活性化が防止できるので、未保護の単糖類に適している。

【0041】

好ましい態様において、GlcA β 3LacまたはGlcA β 3LacNAcを包含するオリゴ糖配列は、特定のグルコウロニダーゼ、例えばウシ肝臓のグルコウロニダーゼ、を用いたトランスグリコシル化によって効率よく合成する。この酵素は、予想しなかった高い収率でトランスグリコシル化反応を行い、部位特異的に β 1-3結合をGal β 4GlcNAcおよびGal β 4Glcを転移することができる。一般的に、トランスグリコシル化反応においては、30%以上の選択率および収率は得られない。

【0042】

本発明の1つの態様は、下記式：



(式中、q、r、s、t及びuは、各々独立に0又は1の整数である。)

で表され、式中のtおよびuが共に0である場合には、多価の担体に結合しているかまたは高濃度の遊離オリゴ糖として存在することを特徴とするオリゴ糖配列あるいはヘリコバクターピロリに対する結合能を有する該オリゴ糖配列の類似体または誘導体を包含する結合性物質を、ヘリコバクターピロリに対する結合能または阻害能を有する組成物の製造に用いる方法に関する。

【0043】

上記オリゴ糖配列において、Aは単糖残基のウロン酸または単糖残基の6位炭素原子の誘導体であって、最も好ましくは単糖残基の6位炭素原子の誘導体はウロン酸のアミドである。

【0044】

本発明の方法に用いることが好ましいヘリコバクターピロリ結合性物質であるオリゴ糖配列を以下に示す。

Gal β 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、

Gal 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、

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、

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、

10

20

30

40

50

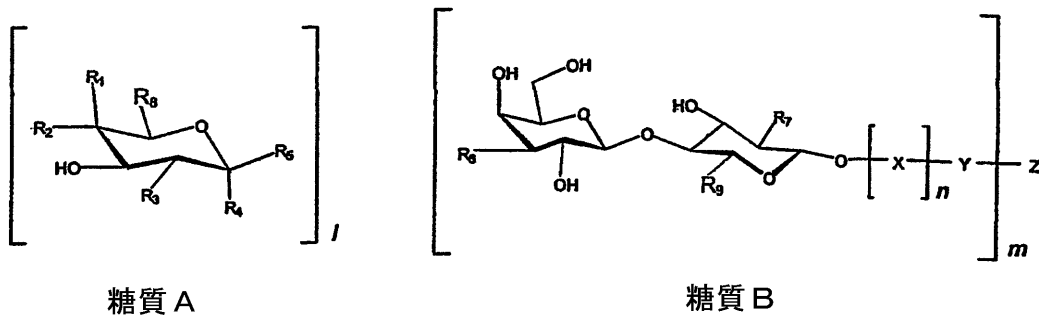
GlcANac β 3Gal β 4GlcNac、GlcANac α 3Gal β 4GlcNac、GlcA β 3Gal β 4GlcNac、
 GlcA α 3Gal β 4GlcNac、GlcANac β 3Gal β 4Glc、GlcANac α 3Gal β 4Glc、
 GlcA β 3Gal β 4Glc、GlcA α 3Gal β 4Glc、
 Gal β 4GlcNac β 3Gal β 4GlcNac β 3Gal β 4Glc およびこれらの還元末端含有多価結合体、
 更に GalNac α 3Gal β 4Glc、GalNac β 3Gal β 4Glc、GlcNac α 3Gal β 4Glc、
 GlcNac β 3Gal β 4Glc、Gal α 3Gal β 4Glc、Gal β 3Gal β 4Glc、Glc α 3Gal β 4Glc および
 Glc β 3Gal β 4Glc。

【0045】

本発明の他の態様として、下記化学式 1 を開示する。

【0046】

【化 1】



【0047】

本発明において好ましいヘリコバクター ピロリ結合性物質またはその混合物、あるいは本発明の方法に適した物質は化 1 で表されるオリゴ糖構造体であって、式中、 m は 1 以上の整数であり、 l と n は各々独立に 0 または 1 であり； R_1 が H で R_2 が OH であるか、 R_1 が OH で R_2 が H であるか、あるいは R_1 が H で R_2 がモノサッカリジル基またはオリゴサッカリジル基、好ましくはベータグリコシジル結合したガラクトシル基であり； R_3 は各々独立に $-OH$ 、アセトアミド基 ($-NHCOCH_3$) またはアセトアミド類似体基である。 R_7 はアセトアミド基 ($-NHCOCH_3$) またはアセトアミド類似体基である。
 更に l が 1 である場合には、 R_4 は $-H$ であり、 R_5 は結合 R_6 に結合した酸素原子であって、糖 B にベータ アノマー グリコシド結合を形成するか、 R_5 は $-H$ であり、 R_4 は結合 R_6 に結合した酸素原子であって、糖 B にアルファ アノマー グリコシド結合を形成し；
 l が 0 である場合には、 R_6 は B に結合した $-OH$ である。 X は単糖残基またはオリゴ糖残基であり、好ましくはラクトシル残基、ガラクトシル残基、ポリ-N-アセチルラクトサミニル残基、あるいは O-グリカンオリゴ糖配列または N-グリカンオリゴ糖配列の一部であり； Y はスペーサー、セラミド脂質成分などの末端結合基あるいは該 O または該 X と Z の間の結合である。 Z はオリゴ価または多価の担体である。結合性物質は、ヘリコバクター ピロリに対する結合能を有する、化 1 の物質の類似体または誘導体であり、例えば、糖 B の C 1 位と糖残基 X またはスペーサー Y との間の酸素結合 ($-O-$) を炭素結合 ($-C-$)、窒素結合 ($-N-$) または硫黄結合 ($-S-$) に置換したものである。

【0048】

化 1 において、 R_8 は好ましくはカルボン酸アミド、例えばメチルアミドやエチルアミド、ヒドロキシメチル基 ($-CH_2-OH$) またはカルボン基またはそれらのエステル (メチルまたはエチルエステル) である。また、カルボン酸アミドは、キトサンやガラクトサミン多糖などのアミンを包含する多価担体 Z あるいはスペーサー、好ましくは親水性スペーサー、を包含する Z に対する結合を有してもよい。 R_8 に含まれる構造は、上記した物質を模倣した公知の構造でもよい。例えば、2 級または 3 級アミン類やアミド化 2 級アミンを用いることができる。

【0049】

10

20

30

40

50

化1において、 R_9 は好ましくはヒドロキシメチル基であるが、 R_8 について記載したような誘導化に用いることもできる。

R_3 はヒドロキシル基、アセトアミド基またはアセトアミド基を模倣する基、例えば、 C_{1-6} アルキルアミド、アリルアミドまたは2級アミン、好ましくはN-エチルまたはN-メチル、O-アセチル、あるいはO-アルキル（例えば、O-エチルまたはO-メチル）である。 R_7 は R_3 と同じであるが、より好ましくは、アセトアミド基またはアセトアミド類似体基である。

R_2 も好ましくはGal β 4-末端を模倣した六員環構造を包含する。

【0050】

バクテリア結合性物質は、クラスター、即ち、細胞膜上の糖脂質、ミセルまたはリポソームとして提示されるか、あるいはアッセイに用いるTLCプレートのような固相に提示されていることが好ましい。正しい空間配置によって提示されたクラスターは高い結合親和性を示す。

【0051】

本発明においては、ヘリコバクター ピロリ結合性エピトープあるいはヘリコバクター ピロリに対して同様または改善された結合能を有する該エピトープの天然または合成した類似体や誘導体を用いることができる。さらに、バクテリア結合性物質を含有する物質、例えば、本願で開示するレセプター活性型ガングリオシドやヘリコバクター ピロリに対して同様または改善された結合能を有する該ガングリオシドの類似体や誘導体などを用いることもできる。バクテリア結合性物質は、オリゴ糖鎖のグリコシル結合した末端エピトープでもよい。又、バクテリア結合性エピトープはオリゴ糖鎖の分岐鎖、好ましくはポリラクトサミン鎖でもよい。

【0052】

ヘリコバクター ピロリ結合性物質は、抗生物質、好ましくはペニシリン系抗生物質、に結合していてもよい。ヘリコバクター ピロリ結合性物質は抗生物質をヘリコバクター ピロリに的中させる。このような結合体は、ヘリコバクター ピロリに対する処置や治療に必要な抗生物質が少量となるので治療に有利であり、その結果、抗生物質による副作用を低減させる。結合体の抗生物質部分はバクテリアを殺すか弱めるためのものであるが、後述するように、結合体には付着防止効果があってもよい。

【0053】

バクテリア結合性物質、好ましくはオリゴ糖またはクラスター状のものは、ヘリコバクター ピロリの存在によって生じる疾患または病態の治療に用いることができる。これはヘリコバクター ピロリ結合性物質を付着防止に用いることで達成され、例えば、ヘリコバクター ピロリがターゲット細胞や組織のレセプター エピトープに結合するのを阻害する。ヘリコバクター ピロリ結合性物質または医薬組成物を投与すると、それはバクテリアの結合に対してターゲット細胞上のレセプター糖結合体と競合する。その結果、バクテリアの一部またはすべてがターゲット細胞や組織のレセプターの代わりにヘリコバクター ピロリ結合性物質に結合する。ヘリコバクター ピロリ結合性物質に結合したバクテリアは患者から（例えば、胃腸器系における液体の流入によって）除去し、その結果、患者の健康にバクテリアが与える影響を低減させる。使用する結合性物質は、好ましくはヘリコバクター ピロリ結合性物質を包含する溶解性の組成物である。結合性物質は、担体、好ましくはタンパク以外の担体に結合してもよい。担体分子を用いる場合には、複数のヘリコバクター ピロリ結合性物質を1つの担体に結合し、阻害効率を改善することもできる。

【0054】

ターゲット細胞は主としてターゲット組織（特に胃腸器系）またはターゲット組織と考えられるその他の組織（肝臓や膵臓）の上皮細胞である。ターゲット組織のグリコシル化は病原体による感染によって変化すると考えられる（Karlsson *et al.*, 2000）。ターゲット細胞はターゲット組織の悪性細胞、形質転換細胞または癌化／腫瘍細胞でもよい。形質転換細胞または組織は異なる形のグリコシル化反応を発現し、バクテリアに対するレセプ

ターを提供する場合がある。レクチンまたは糖類が糖タンパクまたは糖脂質からなるレセプターの糖質と結合する（炭水化物－炭水化物間相互作用）ことによって細胞が活性化され、癌化／悪性細胞の場合には、これは癌の増殖または転移につながる。本願に記載のオリゴ糖エピトープのいくつか、例えば、GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc (Hu, J. *et al.*, 1994)、Gal α 3Gal β 4GlcNAc (Castronovo *et al.*, 1989) ならびに悪性細胞由来の天然およびシアリル化ポリラクトサミン (Stroud *et al.*, 1996) は、癌関連抗原または癌抗原として報告されている。本願に記載の結合性物質を包含するオリゴ糖配列はリンパ球についても報告されている (Vivier *et al.*, 1993)。ヘリコバクター ピロリは胃リンパ腫とも関連する。本願に記載の結合性物質はヘリコバクター ピロリの前癌状態または悪性の細胞に対する結合および癌の増殖および転移を防止しするために用いることができる。結合阻害は胃がん、特にリンパ腫を治療する可能性がある。ヘリコバクター ピロリ結合性オリゴ糖配列である、GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6GalNAcがヒト胃粘膜について報告されている。この粘膜性エピトープおよび類似したO-グリカン型糖構造体はヒトの胃に存在するヘリコバクター ピロリに対する天然の高親和性レセプターである可能性が非常に高い。これはネオグリコ脂質である類似配列GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6GlcNAcがヘリコバクター ピロリに高い親和性で結合し、同様のアッセイにおいてGlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6Galがヘリコバクター ピロリに対していくらかの結合親和性を示したことによって明示された。従って、好ましいオリゴ糖配列には、O-グリカン類や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等のO-グリカン類の類似体、ならびに糖ペプチドやO-グリカン配列を包含する糖ペプチドの類似体が含まれる。非還元末端GlcNAcを欠いた配列でさえもいくらかの活性を有する。このような知見に基づき、その他の全てのヘリコバクター ピロリ結合性オリゴ糖配列 (OS) および、特に三糖エピトープは、還元末端に結合して以下の構造を形成していることが特に好ましい：OS β 6Gal(NAc) $_{0-1}$ 、OS β 6Glc(NAc) $_{0-1}$ 、OS β 6Gal(NAc) $_{0-1}$ α Ser/ThrまたはOS β 6Glc(NAc) $_{0-1}$ α Ser/Thr。SerまたはThr化合物あるいはそれらの類似体あるいは還元オリゴ糖は、多価の担体に結合しているものが特に好ましい。還元オリゴ糖は多価担体に還元的に結合することができる。

【0055】

ターゲット細胞には血液細胞、特に白血球が含まれる。消化性潰瘍と関連するヘリコバクター ピロリ株、例えば、本発明で主として用いた株は、オプソニン作用を受けていないにもかかわらず、顆粒球による炎症反応を刺激した (Rautelin *et al.*, 1994a,b)。バクテリアの食作用において最初に起こる事柄は特定のレクチン様相互作用を含み、その結果、顆粒球の凝集が生じる (OfekとSharon, 1988)。食作用に続いて酸化的バースト反応が生じるが、これはヘリコバクター ピロリ関連疾患の病因を導くものとも考えられる (Babior, 1978)。N-アセチルラクトサミン繰り返し単位を有するシアリル化および非酸性グリコスフィンゴ脂質は顆粒球から単離され、特徴付けられており (Fukuda *et al.*, 1985; Stroud *et al.*, 1996)、白血球表面のヘリコバクター ピロリに対する潜在的レセプターとして機能しうる。更に、x₂グリコスフィンゴ脂質も同じ材料から単離されている (Tenenbergh, S., 未発表)。本発明は、N-アセチルラクトサミン特異的レクチンおよびモノクローナル抗体によって認識される、ヒト赤血球および顆粒球に存在するレセプター糖質の存在を立証する (X₂, GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc-)。ヘリコバクター ピロリ結合性物質は、ヘリコバクター ピロリに対する白血球の結合の阻害ならびに白血球の活性化に続く酸化的バーストおよび／または炎症の防止に有用である。

【0056】

ヘリコバクター ピロリは種々のオリゴ糖配列に結合することが知られている。特定の株による結合はより共生的な相互作用であり癌や重度の病態に進行することはない。癌型糖エピトープへの結合に関する本願のデータはヘリコバクター ピロリ結合性物質がより病原性の相互作用も防止することが可能であり、その際、他のレセプター構造に結合した病原性の低いヘリコバクター ピロリ株がいくらか残る。従って、バクテリアの完全な除去

10

20

30

40

50

はヘリコバクター ピロリ関連疾患の予防には必ずしも必要ない。病原性の低いバクテリアは、病原性の高いヘリコバクター ピロリ株の予防においてプロバイオティックな効果を発揮することも考えられる。

【0057】

更に、ヘリコバクター ピロリは大きなポリラクトサアミンオリゴ糖類をその表面に有し、少なくともいくつかの株は、本願で説明するようにバクテリアが結合する未フコシル化エピトープを含有する。本願に記載した結合性物質はヘリコバクター ピロリ同士の結合を防止し、そうすることによって、例えば、バクテリアのコロニー形成を阻害することができる。

【0058】

本発明によると、ヘリコバクター ピロリ結合性物質を、所望により担体と共に医薬組成物に導入することができる。このような医薬組成物は、ヘリコバクター ピロリが患者に存在することによって生じる病態の治療またはヘリコバクター ピロリ結合性物質を用いたこのような病態の治療方法に有用である。本発明によって治療することのできる病態の具体例としては、慢性表在性胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、ヒトの胃における非ホジキン悪性リンパ腫、胃腺癌、ならびにある種の脾臓病、皮膚病、肝臓病、心臓病、乳幼児突然死症候群、自己免疫疾患（自己免疫性胃炎、悪性貧血および非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）関連胃疾患を含む）であり、すべてまたは少なくとも一部がヘリコバクター ピロリ感染によって生じる病態である。

【0059】

ヘリコバクター ピロリ結合性物質を包含する医薬組成物は、更に他の物質、例えば不活性なベヒクルまたは医薬的に許容される担体や保存剤などの公知の物質を包含してもよい。ヘリコバクター ピロリ結合性物質は他の薬剤、例えばヘリコバクター ピロリに対する抗生物質、と共に投与してもよい。

【0060】

ヘリコバクター ピロリ結合性物質またはこのような結合性物質を含有する医薬組成物は、適当な方法で投与すればよく、経口投与が好ましい。

【0061】

本願において「治療」とは、疾患または病態を治癒または改善するための治療と、疾患または病態の発症を予防するための治療の両方を意味する。治療は急性的または慢性的に行うことができる。

【0062】

本願において「患者」とは、本発明による治療を必要とするヒトまたはヒト以外の哺乳類である。

【0063】

ヘリコバクター ピロリ結合性物質は、ヘリコバクター ピロリ結合性物質に結合するタンパクまたは（炭水化物-炭水化物総合作用によって結合する）炭水化物をスクリーニングすることで1つ以上の付着因子の同定に用いることもできる。炭水化物結合性タンパクはレクチンまたは炭水化物結合性酵素である。スクリーニングは、例えば、アフィニティークロマトグラフィやアフィニティー交差結合法で行うことができる (Ilver *et al.*, 1998)。

【0064】

さらに、ヒト組織に提示されているヘリコバクター ピロリ結合性物質に特異的に結合するか不活化する物質を用い、ヘリコバクター ピロリの結合を防止することもできる。このような物質の例としては、Erythrina cristagalliおよびErythrina corallodendronなどの植物性レクチンが挙げられる (Teneberg *et al.*, 1994)。ヒトに用いる場合には、このような結合性物質は、その用途に適したものでなければならず、例えば、ヒト化抗体またはヒト由来の組み換えグリコシダーゼなどの非免疫原生であり、ヘリコバクター ピロリ結合性物質の末端単糖残基を解裂させることのできる物質である。しかし、胃腸器系においては、例えば、食品に由来する多種の天然のレクチンやグリコシダーゼが許容されて

10

20

30

40

50

いる。

【0065】

また、ヘリコバクター ピロリ結合性物質を食品や飼料を含む栄養補助組成物の一部として用いることができる。ヘリコバクター ピロリ結合性物質を機能性食品または機能化食品の一部として用いることが好ましい。機能性食品は、ヘリコバクター ピロリがターゲット細胞または組織に結合するのを阻害するか防止することでヒトまたは動物の健康に正の影響を与える。ヘリコバクター ピロリ結合性物質は既に知られている食品や機能性食品組成物の一部でもよい。機能性食品は、専門機関、例えば米国FDA、によって許可されている他の許容される食品材料を含有してもよい。ヘリコバクター ピロリ結合性物質は栄養補助剤、好ましくは食品添加剤や飲料物添加剤として機能性食品または機能性飲料を製造するために用いることができる。食品または食品添加剤は、例えば、ウシやその他の家畜が多量のヘリコバクター ピロリ結合性物質を天然にその乳に産生するようにすることで得ることもできる。これは、動物がその乳に適切なグリコシルトランスフェラーゼを過剰発現させることで達成される。家畜の特定の品種または種を選択し、ヘリコバクター ピロリ結合性物質を多量に産生するように交配することができる。栄養補助組成物または栄養補助剤のためのヘリコバクター ピロリ結合性物質は、バクテリアや酵母などの微生物によって製造することもできる。

【0066】

ヘリコバクター ピロリ結合性物質を乳幼児用の食品の一部、好ましくは乳児用ミルクの一部として用いることは特に有用である。多くの乳児は、ヒトの天然乳の代わりとして特別な処方ミルクを与えられている。このような処方ミルクはヒト乳に存在する特別なラクトースに基づくオリゴ糖、特にラクト-N-ネオテトラオース、 $\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$ やその誘導体である伸長したオリゴ糖を欠くことがある。ラクト-N-ネオテトラオースおよびパララクト-N-ネオヘキサオース ($\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$) は $\text{Gal}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$ と共にヒト乳に存在することが知られており、乳幼児用食品の安全な添加物または原料と考えられる。ヘリコバクター ピロリは特に乳児および幼児に高い感染性を示し、この疾患を鑑みると、この段階で感染を予防することは妥当である。ヘリコバクター ピロリは乳幼児突然死症候群の原因となることが知られているが、バクテリアを一掃するための強い抗生物質を用いることは、特に幼児や乳児には不適切である。

【0067】

摂取される機能性食品（例えば、調製した乳児用ミルク）に含まれるヒト乳オリゴ糖の好ましい濃度は、天然のヒト乳に含まれる濃度と同じであることが好ましい。ヒト天然の乳は、本発明のオリゴ糖配列を包含する多数の遊離オリゴ糖と糖結合体（多価のものも含む）を含有するので、単一分子を天然の濃度よりも高い濃度で用いたとしても、危険な副作用を伴うことなく、ヘリコバクター ピロリに対して強い阻害能を発揮させることもできる。天然のヒト乳は、個体差があるものの、少なくとも $10\sim 210\text{ mg/l}$ のラクト-N-ネオテトラオースを含有する (Nakhla *et al.*, 1999)。その結果、機能性食品においても、ラクト-N-ネオテトラオースの使用量は好ましくは $0.01\sim 10\text{ g/l}$ であり、より好ましくは $0.01\sim 5\text{ g/l}$ 、最も好ましくは $0.1\sim 1\text{ g/l}$ である。本願に記載した遊離オリゴ糖が $\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$ を還元末端に有する三糖または二糖である場合には、好ましくは $1\sim 100\text{ g/l}$ 、より好ましくは $1\sim 20\text{ g/l}$ の濃度で食される。また、機能性食品に含まれる糖質の合計濃度は、本願のヘリコバクター ピロリ結合性物質を結合する糖質または本願で開示した結合エピトープ／オリゴ糖配列を含有する、ヒト乳に含まれる糖質の合計濃度と同じか類似している。少なくとも1つのケースにおいて、ヒト乳は $\text{Gal}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$ を主要な中性オリゴ糖として多量に含有することが報告されている (Charlwood *et al.*, 1999)。

【0068】

さらに、ヘリコバクター ピロリ結合性物質をヘリコバクター ピロリの感染によって生じる病態の診断に用いることができる。診断用途には、ヘリコバクター ピロリ結合性物質を用いたヘリコバクター ピロリの型の同定方法も含まれる。結合性物質を診断または型

同定に用いた場合、例えば、結合性物質はプローブやテストスティックに含まれていてもよく、所望により、テストキットの一部を構成してもよい。このようなプローブやテストスティックがヘリコバクター ピロリを含有するサンプルと接触すると、バクテリアはプローブまたはテストスティックに結合し、サンプルから取り出されてさらに分析される。

【0069】

結果は、本発明の好ましい三糖配列の非還元末端単糖残基はその6位炭素にカルボキシル基（末端単糖残基がウロン酸、HexAまたはHexANAcであり、HexはGalまたはGlcである）か、対応するHexA(NAc)残基の6位炭素の誘導体か、対応するHex(NAc)残基の6位炭素の誘導体を含有してもよいことを示した。このような末端残基は、好ましくはβ3結合したグルクロン酸であり、より好ましくはメチルアミドなどの6-アミド類である。従って、配列の類似体や誘導体は三糖エピトープの末端6位を変化させるか誘導化することによって製造することができる。

10

【0070】

好ましいヘリコバクター ピロリ結合性物質

本発明のオリゴ糖配列は、予想に反して薄層表面に提示された時に効果的なバインダーとなることが判明した。この方法は糖脂質配列を多価の状態に提示することを可能にした。多価の状態に提示されたオリゴ糖配列の活性は驚くほど高いので、多価の状態こそが本発明のオリゴ糖配列を提示するのに好ましい方法である。

【0071】

糖脂質は、天然では多価の状態に細胞膜に提示されている。このような提示方法は後述する固相アッセイ法や糖脂質またはネオ糖脂質のリポソームを形成することで模倣することができる。

20

【0072】

疎水性ヘキサデシルアニリンの還元的アミン化反応によって製造される本発明のネオ糖脂質はオリゴ糖を効果的に提示することができた。最近発見されたバクテリア結合性のネオ糖脂質は、フォスファチジル エタノールアミン ネオ糖脂質のフォスフォロエステルなどの負の電位を帯びた基を有している。このような化合物の問題点は、この物質の負の電位とリン脂質構造を含む天然の生物学的結合である。負の電位を帯びた分子はタンパクやその他の生物学的物質との多数の非特異的結合に関与することが知られている。さらに多くのこのような構造は不安定であり、酵素学的または化学的に分解されることがある。本発明は、オリゴ糖配列の非酸性結合体に関するものであり、これはオリゴ糖配列は非酸性化学構造に結合していることを意味する。非酸性結合体は中性の物質であることが好ましく、これはオリゴ糖配列が中性の、電位を帯びていない化学構造体に結合していることを意味する。本発明において好ましい結合体は多価の物質である。

30

【0073】

従来技術においては、生物活性を有するオリゴ糖配列は、レセプター活性型オリゴ糖構造の一部を還元することで担体に結合していることが多い。アルキル鎖 $(-\text{CH}_2-)_n$ および／またはベンジル環を含有する疎水性のスペーサーが用いられている。しかし、疎水性構造は、一般的にタンパクやその他の生物活性分子との非特異的相互作用に関与することが知られている。

40

【0074】

後述する実施例で得られたネオ糖脂質に関するデータによると、アッセイに用いた実験条件においてはネオ糖脂質化合物のヘキサデシルアニリン部分は、研究に用いたバクテリアに対する非特異的結合を起こさなかった。ネオ糖脂質においては、糖結合体のヘキサデシルアニリン部分は脂質層状の構造を形成すると考えられ、結合のためには存在していない。本発明は結合エピトープに属する単糖残基を還元すると結合が破壊されることを示す。さらに還元された単糖残基は、レセプターエピトープと多価に提示された構造体とを繋ぐ親水性スペーサーとして使えることを見出した。本発明によると、生物活性を有するオリゴ糖を親水性スペーサーを介して多価またはオリゴ価の担体分子に結合し、多価またはオリゴ価の構造体を形成することが好ましい。本願においては、多価構造体（10個を

50

超えるオリゴ糖残基を包含するもの) およびオリゴ価構造体 (2 ~ 10 個のオリゴ糖残基を包含するもの) を全ての多価構造体というが、用途によっては大きな多価構造体よりもオリゴ価の構造体のほうが好ましい場合がある。親水性スパーサーは少なくとも1つのヒドロキシル基を包含する。更に好ましいスパーサーは少なくとも2つ、最も好ましくは3つのヒドロキシル基を包含する。

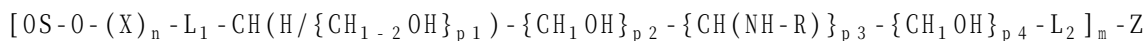
【0075】

本発明によると、親水性スパーサーは、好ましくは1つまたは複数の $-CH_2OH-$ および/またはアセトアミド $-NHCOCH_3$ やアルキルアミドなどのアミド側鎖を包含する可動性鎖であることが好ましい。ヒドロキシル基および/またはアセトアミド基はインビボにおける酵素的加水分解からスパーサーを保護する。可動性という用語は、スパーサーが可動性の結合を包含し、可動性ではない環構造を形成しないことを意味する。本発明において還元的アミン化反応によって得られた還元単糖残基は、可動性親水性スパーサーの例である。可動性親水性スパーサーはネオ糖脂質や多価結合体の非特異的結合を防止するために最適である。これは、例えば、医薬や機能性食品におけるバイオアッセイ及び生物活性において必須な最適活性である。

10

【0076】

可動性親水性リンカーを有する結合体は以下の一般式2で表される。



(式中、

OSおよびXは化1において定義した通りであり；

20

L_1 および L_2 は結合基あって、各々独立に酸素原子、窒素原子、硫黄原子または炭素原子である結合原子あるいは置換基を形成する結合に含まれる2つの原子を包含し、該置換基を形成する結合は $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-N-$ 、 $-N(COCH_3)-$ 、 $-CO-NH-$ または $-NH-CO-$ で表されるアミド基、 $-N-N-$ (ヒドラジン誘導体)、あるいは $-O-N$ または $-N-O$ で表されるアミノオキシ結合であり；

L_1 は該Xである単糖の還元末端のC1位に結合した結合基であり、nが0の場合には、 L_1 は該Xの $-O-$ を置換して、該OSの還元末端のC1位に直接結合しており；

p_1 、 p_2 、 p_3 および p_4 は各々独立に0 ~ 7の整数であるが、 p_1 、 p_2 、 p_3 および p_4 の少なくとも1つが1であり；

$\{CH_{1-2}OH\}_{p_1}$ が分岐構造を表す場合には、末端基となる $CH_{1-2}OH$ は CH_2OH であり、 p_1 が1を超える場合には、該末端基をスパーサーである該Yの残りの部分に結合させるための第二級アルコール基である $-CH_2OH-$ が存在し；

30

Rは好ましくはアセチル基 ($-COCH_3$)、Zに連結する結合または C_{1-4} アシル基 (好ましくは親水性の基、例えばヒドロキシアルキル) を包含する類似体形成基であり、Rが結合である場合には L_2 は糖鎖末端基の1つまたは2つの原子であり、該 C_{1-4} アシル基はアミド構造、水素原子または C_{1-4} アルキル基を形成するアミンであり；

mは1を超える整数であり；

Zは多価の担体である。)

【0077】

式2に示した可動性親水性スパーサーを有する好ましい多価構造体には、次のヘリコバクター ピロリ結合性オリゴ糖配列が含まれる： $(OS)\beta 1-3$ が $Gal\beta 4Glc(red)-Z$ に結合したもの、 $OS\beta 6GlcNAc(red)-Z$ および $OS\beta 6GalNAc(red)-Z$ 。式中、“(red)”は還元末端単糖および多価担体Zのアミン基の還元的アミン化によって得られたアミン結合構造である。

40

【0078】

本発明においてオリゴ糖基は、抗原性やアレルギー反応の出現を防止するために、多価またはオリゴ価の形でタンパクまたはペプチドではない担体に結合していることが好ましく、より好ましくは、担体の骨格は天然の非抗原性多糖である。

【0079】

糖脂質とネオ糖脂質の結合活性を比較すると、 $Gal\alpha 3Gal\beta -$ を有する配列は、薄層プレー

50

ト上に多価に提示された際に低い活性を示すことがわかった。末端Galβ4GlcNAc-を有する配列も弱い活性を示した。従って、本発明において最適な多価非酸性物質は以下の末端オリゴ糖配列を包含する。

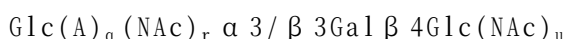


(式中、q1、q2、r1、r2およびuは各々独立に0または1であり、但し、q1とr1が共に0の場合には、非還元末端単糖残基はGalαではない。)

更に好ましい態様においてはuは0であり、最も好ましい態様においては多価の形態で提示されているオリゴ糖配列は下記の式で表されるものまたはその類似体または誘導体である。



下記のオリゴ糖配列が特に好ましい。下記の構造はヒトや動物の組織には見出されていない。



(式中、オリゴ糖配列がβ3結合を有する場合には、qとrは各々独立に1または0である)あるいは



【0081】

上記オリゴ糖配列はその新規性によって特に好ましいものである。このような配列を開裂させるグリコシダーゼは知られていない。従って、これらの配列は特に安定であり、生物学的環境において好ましい。本発明において開示する天然型配列はグリコシダーゼによって開裂させることができるので、特にヒトや動物の体内において用いる際の有用性が低い。このような配列を開裂させるグリコシダーゼはヒト胃腸器系において活性を示すことが知られている。N-アセチルヘキソサミニダーゼやガラクトシダーゼなどのいくつかのグリコシダーゼは消化酵素として報告されており、飼料などにも存在する。 20

【0082】

本発明による新規な結合性物質は、Clostridium difficile SのトキシンAを阻害するのにも有用である(Teneberg *et al* 1996)。トキシンAと公知物質との結合挙動は本願に記載したヘリコバクター ピロリの特異性と類似している。従って、ヘリコバクター ピロリ結合性物質は、例えばClostridium difficile依存性下痢の治療に用いることができる 30

【0083】

糖脂質および炭水化物の命名は、IUPAC-IUB生化学命名委員会の推奨する命名法(Carbohydrate Res. 1998, 312, 167; Carbohydrate Res. 1997, 297, 1; Eur. J. Biochem. 1998, 257, 29)に従った。

【0084】

Gal、Glc、GlcNAc および Neu5AcはD型であり、FucはL型であり、全ての単糖残基はピラナース環構造であるものとする。グルコサミンはGlcNまたはGlcNH₂と示し、ガラクトサミンはGalNまたはGalNH₂と示す。グリコシド結合は略記で示す場合と正式名称で示す場合とあり、Neu5Ac-残基のα3およびα6結合はそれぞれα2-3およびα2-6結合と同じである。他の単糖残基については、α1-3、β1-3、β1-4およびβ1-6結合はそれぞれα3、β3、β4およびβ6と略することができる。ラクトサミンはN-アセチルラクトサミン(Galβ4GlcNAc)を示し、シアル酸はN-アセチルノイラミン酸(Neu5Ac)、N-グリコリルノイラミン酸(Neu5Gc)またはその他の天然のシアル酸を示す。本願においてグリカンという用語は、ヒトまたは動物に存在する糖結合体、特に糖脂質または糖タンパクに含まれるオリゴ糖や多糖鎖を広く包含する。脂肪酸と塩基の略記命名法においては、コロンの前の数字が分子の炭素数の長さを示し、コロンの後の数字が分子の二重結合の合計を示す。GSLという略語はグリコスフィンゴ脂質を示す。グリコスフィンゴ脂質の略語、略称または記号は本文および表1と2に記載した。ヘリコバクター ピロリとは、ヘリコバクター ピロリに類似したバクテリアを意味する。 40 50

【0085】

本発明において、hex(NAc)-ウロン酸ならびにその誘導体および類似体は以下のように記載した：GlcAはグルクロン酸ならびにグルコースまたはグルクロン酸の6位の炭素の誘導体であり、GalAはガラクトン酸ならびにガラクトースまたはガラクトン酸の6位の炭素の誘導体であり、GlcANAcはN-アセチルグルクロン酸ならびにN-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルグルコサミンウロン酸の6位の炭素の誘導体であり、そしてGalANAcはN-アセチルガラクトサミンウロン酸ならびにN-アセチルガラクトサミンまたはN-アセチルガラクトサミンウロン酸の6位の炭素の誘導体である。

【0086】

「末端オリゴ糖配列」という表現は、他の単糖残基によってオリゴ糖が非還元末端残基に置換されていないことを示す。 10

【0087】

「 $\alpha 3 / \beta 3$ 」は、オリゴ糖配列において隣り合った糖残基は互いに $\alpha 3$ -または $\beta 3$ -結合していることを示す。

【0088】

本発明を以下の実施例によってさらに説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【発明を実施するための最良の形態】

【0089】

材料と方法 20

材料 — TLCシリカゲル60（アルミニウム）プレートはMerck製（ドイツ国、ダルムシュタット）である。実験に用いた全てのグリコスフィンゴ脂質は我々の研究室で得たものである。 β -ガラクトシダーゼ (*Escherichia coli*) はBoehringer Mannheim社（ドイツ国）、ハムのF12培地はGibco社（英国）、 ^{35}S -メチオニン はAmersham社（英国）、そしてFCS（ウシ胎児血清）はSera-Lab社（英国）より購入した。 β -4-ガラクトシダーゼ (*Streptococcus pneumoniae*)、 β -N-アセチルヘキソサミニダーゼ (*Streptococcus pneumoniae*) およびシアリダーゼ (*Arthrobacter ureafaciens*) はOxford GlycoSystems（英国、アピントン）のものである。ヘリコバクター ピロリ臨床単離株（002株および032株）はそれぞれ胃潰瘍および十二指腸潰瘍の患者から単離したものであり、スウェーデン国、エレブル医学センター（Örebro Medical Center）のD. Danielsson博士 30 によって寄贈されたものである。基準株である17875株はゲーテボルグ大学、カルチャーコレクション（CCUG）のものである。

【0090】

グリコスフィンゴ脂質類 — 図7Aおよび7Bに示した実験に用いた純粋なグリコスフィンゴ脂質は、(Karlsson, 1987) の記載に従って、表2に示した原料の全酸性画分または全非酸性画分から得た。一般的に、個々のグリコスフィンゴ脂質は全グリコスフィンゴ脂質画分のアセチル化 (Handa, 1963) によって得られ、シリル酸カラムクロマトグラフィーを繰り返すことで分離し、次いでマススペクトル分析 (Samuelsson *et al.*, 1990)、NMR (Falk *et al.*, 1979a,b,c; Koerner Jr *et al.*, 1983) および分解的手法 (degradative procedures) (Yang Hakomori, 1971; Stellner *et al.*, 1973) によって特徴付け 40 た。ウサギ胸腺由来の糖脂質については後述する。

【0091】

糖脂質類の精製 — 酸性グリコスフィンゴ脂質類はウサギ胸腺のアセトン粉末（米国、アーカンソー州、ノースアーカンソー、Pel-Freeze Biological Inc.製）1000gから単離した。アセトン粉末はSoxhlet装置 (Soxhlet Apparatus) によって、クロロフォルム／メタノール 2／1（特に記載がない限り容量比）を用いて24時間抽出し、さらにクロロフォルム／メタノール／水 8／1／1で36時間抽出した。抽出した脂質240gはフォルチ分配 (Folch *et al.*, 1957) に付し、回収した親水性相はDE23セルローズ (DEAE)（英国、メイドストーン、Whatman製）によるイオン交換ゲルクロマトグラフィーに付した。単離工程によって2.5gの酸性グリコスフィンゴ脂質が得られた。ガング 50

リオシドはシアル酸の数に基づいて、イオン交換ゲルを用いたガラス製カラム（内径 50 mm）によるオープン管状クロマトグラフィーで分離した。カラムは、凹状のグラジエント（予めプログラムされているグラジエント no. 4）を調製する HPLC ポンプ（米国、カリフォルニア州、System Gold Chromatographic Software および Beckman Instruments Inc. 製）につなぎ、グラジエントはメタノールで開始して、0.5 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ のメタノール溶液で終了した。流速は 4 ml / 分で各 8 ml の画分を 200 個回収した。300 ~ 400 mg のガングリオシド混合物をそれぞれ 500 g の DEAE Sepharose (CL 6、ベッド高さ：約 130 mm)（スウェーデン国、ウプサラ、Pharmacia 社）にアプライした。モノシアル化ガングリオシドはさらにシリカカラム（SH-044-10、300 mm x 22 mm（内径）、孔径：120 Å、粒子径：10 μm）（日本国、京都府、Yamamura Ltd. 製）を用いた HPLC で分離した。約 150 mg のモノシアル化ガングリオシドをそれぞれアプライし、直線的な溶出グラジエント（クロロフォルム / メタノール / 水を 60 / 35 / 8 ~ 10 / 103、4 ml / 分、240 画分）を用いた。

【0092】

部分酸加水分解 — ガングリオシドの脱シアル化は、100 °C の 1.5 % CH_3COOH 水溶液中で行い、その後、得られた産物を NaOH で中和し、窒素下で乾燥した。炭水化物骨格の部分分解には、沸騰水浴中で 0.5 M HCl をもちいて 7 分間加水分解を行った。その後、得られた産物を中和し、C / M / H_2O 、(8 : 4 : 3, v / v)² で分配した。下相を回収し、窒素下で蒸発し、回収した糖脂質を分析に用いた。

【0093】

酵素加水分解による、ヘキサグリコシルセラミドからのペンタグリコシルセラミドの調製

— ヘプタグリコシルセラミド（4 mg、ウサギ胸腺由来）（構造 1、表 1）の酸性脱シアル化（上記参照）によって得られたヘキサグリコシルセラミド（構造 2、表 1）を C / M（2 : 1）に再溶解し、小さなシリカゲルカラム（0.4 x 5 cm）にアプライした。このカラムは C / M / H_2O （60 : 35 : 8, v / v）で溶出した。1 本が約 0.2 ml の画分を複数回収し、炭水化物の存在を試験した。回収したヘキサグリコシルセラミド（2.0 mg）は 1.5 ml の 0.1 M リン酸カリウム緩衝液、pH 7.2（1.5 mg / ml タウロデオキシコレートナトリウム、0.001 M MgCl_2 および β-ガラクトシダーゼ（*E. coli*、2-ニトロフェニル-β-D-ガラクトシドを基質として測定した活性が 500 U）を含有）に溶解し、サンプルを 37 °C で一晩インキュベートした。次に、C / M / H_2O （10 : 5 : 3）を用いて分画し、下相に含まれる糖脂質をシリカゲルクロマトグラフィー（0.4 x 5 cm のカラム）を用いてヘキサグリコシルセラミドについて上述した方法で精製した。混入している界面活性剤を全て除去するために、クロマトグラフィーを 2 回繰り返した。最終的に回収したペンタグリコシルセラミドは 0.7 mg であった。

【0094】

糖脂質のエンドグリコシルセラミダーゼによる消化（Ito と Yamagata, 1989） — 反応混合物は、200 μg の糖脂質、80 μg のタウロデオキシコレートナトリウムおよび 0.8 mU の酵素を 160 μl の 50 mM 酢酸緩衝液（pH 6.0）に溶解したものだ。サンプルは 37 °C で一晩インキュベートし、その後、水（140 μl）と C / M（2 : 1, 容量比, 1500 μl）を加え、振とうした後、遠心分離に付した。上相は窒素下で乾燥し、少量の水に再度溶解し、水で飽和させた Sephadex G-25 カラム（0.4 x 10 cm）を用い、水で溶出することで脱塩した。1 本が約 0.1 ml の画分を複数回収し、そこに含まれる糖の存在を試験した。

【0095】

糖質のパーマチル化 — パーマチル化は Larson et al., 1987 に従って行った。Needs と Selvendran 1993 にて推奨されているように、ヨウ化メチルを加える前に水酸化ナトリウムをサンプルに加えた。いくつかの実験においては、糖質はメチル化の前に NaBH_4 で還元した。この場合、ヨウ化メチルの終濃度が DMSO（ジメチルスルフォキシド） / ヨウ化メチルが 1 : 1 となるようにヨウ化メチルの量を増加した（Hansson と Karlsson, 199

0)。

【0096】

ガスクロマトグラフィー／マススペクトル分析 — ガスクロマトグラフィーはon-カラム (on-column) インジェクターとフレイムイオン化検出器を設置したHewlett-Packard 5890AシリーズIIガスクロマトグラフィー装置で行った。パーメチル化オリゴ糖は、架橋PS264 (フィルム厚: 0.03 μm) でコートされた溶融シリカキャピラリーカラム (11 m x 0.25 mm (内径)) (Fluka製) を用いて分析した。サンプルは酢酸エチルに溶解し、on-カラムに80℃で注入した。温度は80℃～390℃に10℃/分で昇温し、390℃に2分維持するようにプログラムされていた。パーメチル化オリゴ糖のガスクロマトグラフィー／マススペクトル分析はJEOL SX-102マススペクトルに接続されたHewlett-Packard 5890AシリーズIIガスクロマトグラフィー装置を用いて行った (HanssonとKarlsson, 1990)。FAB-MS分析はJEOL SX-102マススペクトルで行った。陰イオンFABスペクトルはXe原子砲撃 (10 kV) およびマトリックスとしてトリエタノールアミンを用いて得た。

【0097】

NMRスペクトル分析 — プロトンNMRスペクトルは11.75 TでJeol Alpha 500 (日本国、東京、日本電子製) を用いて記録した。サンプルは分析前に重水素で置換しておき、スペクトルは30℃において、デジタル解像度が0.35 Hz/ptの条件下で記録した。化学シフトは内部溶液シグナルを用いてTMS (テトラメチルシラン) に対する相対値として示した。

【0098】

分析的酵素試験 — Oxford GlycoSystemsの酵素試験を、終濃度が0.3%となるようにTriton X-100を各インキュベーション混合物に加える以外は製造者の推奨する方法に従って行った。シアリダーゼと β 4-ガラクトシダーゼの混合物を消化に用いる場合には、 β 4-ガラクトシダーゼキットのインキュベーション用緩衝液を用いた。 β -ヘキソサミニダーゼが消化混合物に含まれる場合には、この酵素キットの緩衝液を用いた。インキュベーション混合物の酵素濃度は以下の通りである: Hex β 4HexNAc-ガラクトシダーゼ (*S. pneumoniae*) は80 mU/ml、 β -N-アセチルヘキソサミニダーゼ (*S. pneumoniae*) は120 mU/ml、シアリダーゼ (*Arthrobacter ureafaciens*) は1 U/ml。基質の濃度は約20 μM だった。酵素消化は37℃で一晩行った。消化後のサンプルは乾燥し、C/M/H₂O (60:30:4.5、容量比) で飽和させた小さなSephadex G-25カラム、0.3 gで脱塩した (WellsとDittmer, 1963)。各サンプルは同じ溶媒2 mlに溶解したものをカラムにアプライし、2.5 mlのC/M/H₂O (60:30:4.5) および2.5 mlのC/M (2:1) で溶出した。アプライした溶液および洗浄液を回収し、窒素下で蒸発させた。

【0099】

その他の分析方法 — ヘキソースはDubois et al. 1956に従って検出した。

【0100】

脱-N-アセチル化 — GlcNAc/GalNAc残基のアセトアミド成分のアミンへの変換は、公知の記載 (Angstrom et al., 1998) に従って、種々のグリコスフィンゴ脂質を無水ヒドラジンで処理することで行った。

【0101】

バクテリアの培養 — ヘリコバクター ピロリは15% (容量比) のグリセロールを含有するトリプシン ソイブロス中で-80℃で保存した。バクテリアは初めにGAB-CAMPアガー (Solteszet al., 1988) 中で湿度98%の微好気条件下 (O₂: 5~7%、CO₂: 8~10%およびN₂: 83~87%)、37℃で48~72時間培養した。標識する際には、コロニーをGAB-CAMPアガーに接種したが、図1Aと1Bに示した結果を得る際には代わりにブルセラアガー (ミシガン州、デトロイト、Difco製) を用いた。0.5 mlのリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS)、pH 7.3で希釈した50 μCi の³⁵S-メチオニン (英国、Amersham製) をプレートの上から振り掛けた。37℃の微好気

条件下で12～24時間インキュベートした後、細胞をそぎ取り、PBSで3回洗浄し、 1×10^8 CFU/mlとなるようにPBSに再懸濁した。この方法の代わりに、10%熱不活化ウシ胎児血清 (Sera-Lab製) を添加したハムF12培地 (英国、Gibco BRL製) にコロニーを接種した。標識には、培地10ml当たり50 μ Ciの 35 S-メチオニンを添加し、振とうしながら微好気条件下で24時間インキュベートした。バクテリアを遠心分離で回収し、培養物の純度と球状細胞が低濃度であることは位相差顕微鏡で確認した。PBSで2回洗浄した後、 1×10^8 CFU/mlとなるようにPBSに再懸濁した。いずれの標識方法で得られる懸濁液も、比活性がヘリコバクター ピロリ100体あたり1 cpmとなった。

【0102】

TLCバクテリアオーバーレイアッセイ — クロロフォルム/メタノール/水 60:35:8 (容量比) の溶媒系を用い、ガラスまたはアルミで裏打ちされたシリカゲル60HPTLCプレート (ドイツ国、ダルムシュタット、Merck製) で薄層クロマトグラフィを行った。化学的検出はアニサアルデヒド染色 (Waldi, 1962) で行った。バクテリアオーバーレイアッセイは公知の方法 (Hansson *et al.*, 1985) で行った。グリコスフィンゴ脂質 (1～4 μ g/レーン、または図の判例に示した濃度) をアルミで裏打ちされたシリカゲルプレートによるクロマトグラフィに付し、ジエチルエーテル/n-ヘキサン1:3 (容量比) を用いた0.3～0.5%ポリイソブチルメチルメタクリレート溶液で1分間処理し、乾燥した後、2%ウシ血清アルブミンと0.1%Tween 20を含有するPBSに2時間浸漬した。放射線標識されたバクテリア (PBSで 1×10^8 CFU/ml、且つ1～5 $\times 10^6$ cpm/mlとなるように希釈したもの) をクロマトグラムに振り掛けて2時間インキュベートし、次いで、PBSで繰り返し濯いだ。クロマトグラムを乾燥させた後、XAR-5X線フィルム (米国、ニューヨーク州、ロチェスター、Eastman Kodak Co., 製) に12～72時間露光した。

【0103】

TLCタンパクオーバーレイアッセイ — モノクローナル抗体TH2とErythrina cristagalli レクチン (カナダ国、バーリンガム、Vector Laboratories, Inc. 製) の 125 Iによる標識をヨウ素法 (Iodogen method) (Aggarwal *et al.*, 1985) で行い、平均 2×10^3 cpm/ μ gの標識物を得た。オーバーレイの方法は、Tweenを使用せず、 125 I標識タンパクを2%のウシ血清アルブミンを含むPBSで約 2×10^3 cpm/ μ lに希釈したものをバクテリア懸濁液の代わりに用いる以外はバクテリアについて上述した方法と同様に行った。

【0104】

分子モデリング — 表1に示したグリコスフィンゴ脂質類の最少エネルギー配座異性体は、バイオグラフ (Biograf) 分子モデリングプログラム (Molecular Simulations Inc. 製) 内で、Silicon Graphics 4D/35TGワークステーションを用いてドライディング—I力場 (Mayo *et al.*, 1990) で予測した。部分原子電荷を電荷平衡法 (RappeとGoddard III, 1991) を使って生成し、クーロン相互作用は距離依存電子誘導定数 ($\epsilon = 3.5$ r) とした。さらに、特別水素結合項を用い、その中で最大相互作用 (Dhb) を -4 kcal/molに設定した。Glc β 1Cer結合の二面角は次のように定義した: グルコース末端から $\Phi = \text{H}-1-\text{C}-1-0-1-\text{C}-1$ 、 $\Psi = \text{C}-1-0-1-\text{C}-1-\text{C}-2$ および $\omega = 0-1-\text{C}-1-\text{C}-2-\text{C}-3$ (Nyholm と Pascher, 1993 を参照)。

【0105】

オリゴ糖GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc は Gal β 4GlcNAc (米国、セントルイス、Sigma製) から合成し、GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6GlcNAc は Gal β 4GlcNAc β 6GlcNAcから合成した。いずれもアクセプターとなる糖質を、8 mM MnCl₂および0.2 mg/ml ATPの存在下、ヒト血清 β 3-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼおよびUDP-GlcNAcと共に50 mM TRIS-HCl、pH 7.5中、37℃で5日間インキュベートすることで行った。Gal β 4GlcNAc β 6GlcNAc は GlcNAc β 6GlcNAc (米国、セントルイス、Sigma製) より得られ、二糖を20 mM MnCl₂の存在下、 β 4ガラクトシルトランスフ

10

20

30

40

50

ェラーゼ（ウシ乳由来、米国、カリフォルニア州、Calbiochem製）およびUDP-Galと共に 50 mM MOPS-NaOH、pH 7.4 中、37℃で数時間インキュベートすることで行った。六糖であるGal β 3GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc（1 mg、英国、Dextralabs製）は、製造元の推奨する方法により、400 mUの β 3/6-ガラクトシダーゼ（米国、カリフォルニア州、Calbiochem製）で一晩処理した。オリゴ糖類はクロマトグラフィで精製し、純度はMALDI-TOFマスペクトルおよびNMRで求めた。Gal α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glcは英国、リーディング、Dextra laboratories製を用いた。糖脂質GlcA β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer（日本国、大阪府、和光純薬製）はLanne *et al.* 1995の記載に基づき、Glc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cerに還元した。糖脂質誘導体Glc(A-メチルアミド) β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cerは、Lanne *et al.* 1995の記載に従い、GlcA β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cerのグルクロン酸のカルボキシル基のアミド化によって製造した。

10

【0106】

結果

ヘプタグリコシルセラミドであるNeuGc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cerはウサギ胸腺より上述した方法に従ってHPLCで精製した。構造は、NMRおよびマスペクトルで特徴付けた（データは示していない）。七糖ガングリオシドは、本願発明者らによって試験した大部分の単離ヘリコバクター ピロリ株（約60株）に結合した。

【0107】

ヘプタグリコシルセラミド材料中に存在する可能性のある微量の異性体成分を検出するために、ガングリオシドを脱シアル化し、エンドグリコセラミダーゼで処理し、その後、放出されたオリゴ糖をパーメチル化し、ガスクロマトグラフィおよびEI/MSで分析した（図1Aと1B）。予想される炭水化物配列Hex-HexNAc-Hex-HexNAc-Hex-Hexを有する2つの糖質を六糖領域から同定し、それらをm/z 219, 464, 668, 913および1118のフラグメントイオンによって確認した。メチル化の前に（NaBH₄による還元によって）炭水化物がアルジトールに変換された場合には、既に記載されているイオンの他に、はっきりとしたフラグメントイオンがm/z 235, 684および1133に検出された（データは示さない）。全材料の90%以上を占めた主要な糖質（ピークB、図1Aと1B）は、m/z 182に見られる強いフラグメントイオンによって特徴付けられ、 β 4GlcNAc（ネオラクト系列、2型炭水化物鎖）の存在を証明した。小さな糖質（ピークA、図1Aと1B）は1型鎖（ラクト系列）の典型的なスペクトルを示し、m/z 182の非常に弱いフラグメントイオンとm/z 228の強いフラグメントイオンが検出された。調製物は、さらにトレース量のその他の糖陽性の物質を含んでおり、これは同じ系列の四糖含有糖類および五糖含有糖類である可能性がある。フコース含有糖類は混合物に存在しなかった。アシアロガングリオシドの純度はFAB/MSおよびNMRスペクトロスコピーで試験した。ヘキサグリコシルセラミドの陰イオンFAB/MS（図2A）は予想した炭水化物配列を証明し、セラミド類は主としてスフィンゴシンとC16:0脂肪酸（m/z 536.5）からなることを示した。ヘキサグリコシルセラミドに対して得られたNMRスペクトル（図3A）は β -カップリングを有するアノマー領域（J $\sim$ 8 Hz）に対して4つの主要なダブレットを示した。これらの強度比は2:2:1:1であった。4.655 ppm（GlcNAc β 3）、4.256 ppm（内部Gal β 4）、4.203 ppm（末端Gal β 4）および4.166 ppm（Glc β ）は既にnLc0se6-Cerについて報告されている結果（Clausen *et al.*, 1986）と附合していた。さらに小さなダブレットが4.804 ppmに検出され、これは1.81 ppmの小さなメチルシグナル（大きな2型メチル共鳴の肩に見られるもの）と共に1型鎖の小さな画分の存在を示した。4.15 $\sim$ 4.25 ppmの領域における重なりのために、この1型結合の位置と分布を決定することはできなかった。1型結合の全量は約10%だった。ヘキサグリコシルセラミドを β -ガラクトシダーゼで消化して得たペンタグリコシルセラミドに含まれる1型鎖も約5%（図3B）であり、1型結合は糖鎖内部領域および外部領域において均等に分布されている、即ち、糖脂質の約5%が1型-1型であると考えられる。

20

30

40

50

【0108】

糖脂質の結合活性が主要なネオラクト（2型）構造と関連しているかを調べるためにアシアロー糖脂質を β 4-ガラクトシダーゼおよび β -ヘキソサミニダーゼで処理し、処理産物をTLCおよびオーバーレイ試験によって検討した（図4A、4Bと4C）。予想した通り、最初の酵素はヘキサグリコシルセラミドをペンタグリコシルセラミドに変換し（4A、レーン3）、2つの酵素の混合物はラクトシルセラミドに分解した（4B、レーン6）。TLCプレートを目視で観察したところ、いずれの反応も完全またはほぼ完全であった。同様の結果がシアリダーゼ処理産物および酸処理産物についても得られた。ヘキサグリコシルセラミドの β 4-ガラクトシダーゼ分解は、TLCプレート上の糖脂質の対応領域のヘリコバクター ピロリ結合活性の消失を伴い、同時にペンタグリコシルセラミド中の領域における強い活性の出現が見られた（4C、レーン3）。更なるペンタグリコシルセラミドの酵素分解の結果、この領域における結合活性は消失した。四糖領域における結合活性の出現は見られなかった。TLCプレートの化学染色に対する感度は、全てのトレース量の物質を視覚化するには低かった。

10

【0109】

別の実験において、親ガングリオシドを部分酸分解に付し、放出された糖脂質のヘリコバクター ピロリ結合活性を検討した。図5Aと5Bは加水分解物のTLC（5A）と³⁵Sで標識したヘリコバクター ピロリを加水分解物にオーバーレイしたオートラジオグラム（5B）を示す。ヘキサー、ペンター、テトラおよびジグリコシルセラミド領域に位置する糖脂質は結合活性を示したが、トリグリコシルセラミドは不活性であった。

20

【0110】

少なくとも3種のヘリコバクター ピロリ株（17875株、002株と032株）で試験したヘキサー、ペンターおよびテトラグリコシルセラミドの結合活性は同等であった。

【0111】

ヘキサグリコシルセラミドから末端ガラクトースを外し、シリカゲルクロマトグラフィで精製した強い結合を示すペンタグリコシルセラミドについて詳細に検討した。この糖脂質の陰イオンFAB/MSスペクトルから炭水化物配列がHexNAc-Hex-HexNAc-Hex-Hex-であることが確認され、ヘキサグリコシルセラミドと同じセラミド組成物が見られた（図2B）。ペンタグリコシルセラミドより得られたプロトンNMRスペクトル（図3B）にはアノマー領域中に5つの主要な β -ダブレット、即ち、4.653 ppm（内部GlcNAc β 3）、4.615 ppm（末端GlcNAc β 3）、4.261 ppm（2倍強度、内部Gal β 4）および4.166 ppm（Glc β ）が検出された。これらはGlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cerと符合し、末端Gal β を失った六糖化合物とも一致した。さらに小さな β -ダブレットが、3置換GlcNAc β （1型鎖）に対応する4.787 ppmに検出された。予想したメチルシグナルはより大きな1.82 ppmのメチルシグナルの肩に見られたが、ピークの重なりがこれらシグナルの定量を妨げた。アノマープロトンの積分値から計算したところ、糖脂質の約6%が1型鎖であった。従って、2型と1型炭水化物鎖の相対比は六糖糖脂質のそれと同様であった。ヘキサグリコシル画分およびペンタグリコシル画分の両方についてTLCプレートに見られる2つのスポットは、 β 4-ガラクトシダーゼに対する感受性をから判断して、糖鎖の組成による差ではなくセラミドの多様性を反映していた。上方のペンタ領域のスポットは、アシアロガングリオシドの非選択的加水分解およびアシアロ産物からの4-結合ガラクトース選択的開裂の両方の場合に出現した。さらに、上方のクロマトグラフィ副画分を有するヘキサグリコシルセラミドを β 4-ガラクトシダーゼおよび β -ヘキソサミニダーゼで分解した場合には、得られるラクトシルセラミドは2つの明確なクロマトグラフィ上のバンドを示した。クロマトグラフィ上では相同なヘキサグリコシルセラミドは1つのラクトシルセラミドバンドについてのみ得られた。ペンタ領域の上方および下方の副画分はいずれもオーバーレイ試験で高い活性を示した。

30

40

【0112】

ネオラクト系列の六糖、五糖または四糖のグリコスフィンゴ脂質（構造2、4と5、表1）は、TLCオーバーレイ法による準定量試験によって試験した。糖脂質の希釈系列をシ

50

リカゲルプレートにアプライし、ヘリコバクター ピロリに対する結合を標識したバクテリアのオーバーレイおよびオートラジオグラフィ後に目視で評価した（図6Aと6B）。最も活性の高い種はペンタグリコシルセラミドであり、少なくとも $0.039 \text{ nmol / スポット}$ （7回の実験の平均値、標準偏差は $\delta_{n-1} = 0.016 \text{ nmol}$ ）の陽性反応をTLCプレート上で示した。ヘキサースおよびテトラグリコシルセラミドはそれぞれ約 0.2 と 0.3 nmol の糖脂質／スポットのヘリコバクター ピロリを結合した。

【0113】

試験した系列において、高次糖脂質類に対するヘリコバクター ピロリの結合は非常に再現性が高かった。ペンタグリコシルおよびヘキサグリコシルセラミドに対して記録されたヘリコバクター ピロリ032株の結合頻度は $\sim 90\%$ （プレートの合計数は約100）だった。

【0114】

イソレセプターの存在と結合特異性を明示した結合アッセイ（図7Aと7B）

ウサギ胸腺由来のネオラクト核を有する七糖グリコスフィンゴ脂質 $\text{NeuGc}\alpha 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta \text{Cer}$ およびそこから誘導したテトラ〜ヘキサグリコシルセラミドの他に、ネオラクト系列の他の糖脂質類に対しても結合特異性は存在した。

【0115】

薄層プレートで分離した精製グリコスフィンゴ脂質に対するヘリコバクター ピロリ（032株）の結合をオーバーレイアッセイで検出した結果を図7Aと7Bに示した。これらの結果は、他の精製グリコスフィンゴ脂質に関する結果と共に表2にまとめた。ヘリコバクター ピロリのネオラクトテトラオシルセラミドに対する結合（レーン1）ならびに $\text{NeuGc}\alpha 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta \text{Cer}$ から誘導した五糖および六糖グリコスフィンゴ脂質に対する結合（レーン5と6）は、上記の結果と同一であった。しかし、予想に反し、結合は $\text{GalNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta \text{Cer}$ （x2グリコスフィンゴ脂質、レーン7）および脱フコシル化A6-2グリコスフィンゴ脂質 $\text{GalNAc}\alpha 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta \text{Cer}$ （no.12、表2）にも見られた。 $\text{Gal}\alpha 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta \text{Cer}$ （B5グリコスフィンゴ脂質、レーン2）も結合活性を有するという結果と合わせて、これらの結果は、各グリコスフィンゴ脂質にそれぞれ特異的な付着因子が複数存在するのではなく、交差反応の可能性を示した（下記参照）。さらに、上述した異なるグリコスフィンゴ脂質含有五糖の伸長物の中でバクテリア付着因子によって許容されたものは $\text{Gal}\beta 4$ が胸腺由来 $\text{GlcNAc}\beta 3$ -末端化合物に結合したものだけだった（レーン6）。従って、その他の伸長構造である NeuAc-x2 （レーン8）と $\text{GalNAc}\beta 3\text{-B5}$ （no.25、表2）は結合を示さなかった。B5の内部 $\text{GlcNAc}\beta 3$ のアセトアミド基は結合に必須であり、この成分の水和ヒドラジンによる脱-N-アセチル化は結合の完全な消失を招いた（レーン3）。これはネオラクトテトラオシルセラミドを同様に処理した場合と同じであった（no.6、表2）。

【0116】

五糖グリコスフィンゴ脂質の交差結合 本発明で用いた種々のネオラクトを基礎とするグリコスフィンゴ脂質分子の結合特異性を理解するために、活性および不活性の構造体の好ましい立体配置について分子モデリングで検討した。図8A、8B、8Cおよび8Dにx2グリコスフィンゴ脂質とその他の3種の配列を示す：脱フコシル化A6-2、B5および脱-N-アセチル化B5であり、化学的に修飾されたB5構造以外は類似した結合強度を有する。さらにウサギ胸腺由来の五糖グリコスフィンゴ脂質（図9Aを参照）の構造は、x2構造と比べて末端残基の4位が異なるだけで活性は同等であることからこの比較に含めるべきである。4つの活性構造がすべてネオラクト核を有し、それぞれ $\text{GalNAc}\beta 3$, $\text{GalNAc}\alpha 3$, $\text{Gal}\alpha 3$ および $\text{GlcNAc}\beta 3$ の末端を有する。これらの構造の最小エネルギー立体配座異性体は公知の方法（Teneberg *et al.*, 1996）で製造した。表2に示したその他の最小エネルギー立体配座異性体は文献（Bock *et al.*, 1985; Meyer, 1990; Nyholm *et al.*, 1989）に見られる先行技術に基づくものである。シアル酸末端含有グリコスフィンゴ脂質類においては、例えば図9Cに示したように、 $\alpha 3$ -結合残基のグリコシジル二面

角として s c 配座を採用したが、その他の立体配座の影響 (Siebert *et al.*, 1992)、特に a c 配座のもの、についても試験した。さらに $\alpha 6$ -結合変異体についても、いくつかの最小エネルギー立体配座異性体 (Breg *et al.*, 1989) を同様の目的で作製した。

【0117】

上述したように、4種の結合活性を有する五糖グリコスフィンゴ脂質 (no. 10~13、表2) が存在し、いずれもネオラクト核を有することは、分析結果の裏に潜んだ理由が同じ付着部位に対する交差結合であることを示唆した。しかし、見た目には、ウサギ胸腺から得られた五糖化合物と比べて末端が異なる B5 グリコスフィンゴ脂質、即ち、先のは GlcNAc β 3 を有し、後のものは Gal α 3 である、が同様に活性を有することに驚くかも知れないが、これもネオラクト系列の結合特異性に含むべきである。これら2つの末端糖がアノマー結合においても異なる (図8Cと9A) にもかかわらず、最小エネルギー立体配座は立体構造上の非常に高い類似性を示し、違いは Gal α 3 がアセトアミド基を欠失し、4-OH が軸配座にあり、その環の形成する平面構造が対応する五糖化合物の平面構造よりも少し上に位置することである。しかし、4-OH の位置もアセトアミド基の有無も結合に重要ではなく、それぞれ末端が GalNAc β 3 と GalNAc α 3 である x2 および脱フコシル化 A6-2 グリコスフィンゴ脂質 (図8AとB) がヘリコバクター ピロリ付着因子に対する結合親和性を示すことから分かる。これらの発見を鑑みて、ヒト赤血球から単離した Gal β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer (StellnerとHakomori, 1974) はバクテリア付着因子に結合すると考えられる。結合の法則に鑑みて、さらにヘリコバクター ピロリ結合エ

10

20

30

【0118】

ネオラクト七糖化合物、NeuGc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer、の分子モデリングも行った。図10は Glc β Cer 結合を有する伸長物の最小エネルギー配座異性体の2種の投影図を示す。シアル酸は s n 配座で示したが、アンチ立体配座も同様に未分岐の構造に見られると考えられる (Siebert *et al.*, 1992)。シアル酸も、六糖化合物9Bと比べてヘリコバクター ピロリに対する結合活性にわずかな影響しか与えないようである。1つ目の投影図と図9Aおよび9Bとの比較は、七糖構造にも同様の結合エピトープが存在することを示唆した。

【0119】

ネオラクト結合エピトープの脱線状化 ウサギ胸腺の七糖化合物を化学的および酵素学的に分解して得た構造体 (no. 1、5、10と21、表2) の相対結合強度は、三糖配列 GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3 が最小結合配列を構成する可能性を示唆した。従って、六糖化合物においては、末端 Gal β 4 による阻害効果が予想され、オラクトテトラオシルセラミドにおいては、エピトープの3つの糖のうち2つしか存在しないので、末端 GlcNAc β 3 の欠失は結合強度を低下させると考えられる。内部 GlcNAc β 3 の必要性は、アセトアミド基を脱-N-アセチル化してアミンにしたネオラクトテトラオシルセラミドおよび B5 (no. 6と14、表2) が共にバクテリアに対する結合を失ったことによって明示される。この結合性の欠失は、付着因子とアセトアミド成分との好ましい相互作用の欠失および/またはこれらグリコスフィンゴ脂質の好ましい立体配座の変化によって生じると考えられる。しかし、内部 Gal β 4 の配置の変化によって結合エピトープに対する接触に立体障害が生じる状況を描くことは難しい。従って、最小結合配列が GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3 配列を包含しなければならないことを確立したので、今度は、P1、H5-2 および2つのシアリルパラグロポシド構造 (no. 15、18~20、表2) が結合性を欠く理由は、これら伸長物が提案した結合エピトープに直接干渉するという考えによって合理化するのは容易である。さらに、ウシバターミルク由来のグリコスフィンゴ脂質 (Teneberg *et al.*, 1994)、即ちネオラクトテトラオシルセラミドの内部 Gal β 4 に $\beta 6$ -結合した側鎖 Gal β

40

50

4GlcNAc β (no. 26、表2)は、結合エピトープへの接触がブロックされているために結合しない。

【0120】

表2の種々の結合活性五糖配列の伸長物は、胸腺由来構造においてはGal β 4の付加のみが許容されることを示し、これは4-OHの位置が赤道配座でも軸配座でもよく、それに続く立体障害による結合親和性の欠失を示した。NeuAc α 3のx2への付加や、GalNAc β 3のB5への付加の結果、結合は完全に失われる(no. 24と25、表2)。さらに、H5-2におけるFuc α 2単位の負の影響は、ヘリコバクター ピロリがA6-2とB6-2(no. 22と23、表2)の両方に結合しないことによって確認された。B5と同じ三糖が末端にある伸長構造(no. 28、表2)については、2つ目の内部結合エピトープが存在するにもかかわらず、B5と同様に、この末端三糖が観察された結合を担っていた。しかし、内部エピトープに対する結合は排除される可能性が高く、最後から2番目のGal β 4が得られるかどうかは、バクテリアの株と培養条件の両方に依存する(Miller-Podraza *et al.*, 1996, 1997a, b)。

10

【0121】

以上をまとめると、ネオラクト系列のグリコスフィンゴ脂質の結合エピトープは、最大活性を得るためには三糖配列GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3を包含しなければならない。本願で用いたイソレセプターの結合パターンの比較および図8A~Dおよび9A~Dの構造から演繹されることは、重要ではない末端GlcNAc β 3のアセトアミド基と同じ残基の4-OHを除けば、大部分の三糖は結合を生じるために重要である。

20

【0122】

レセプターの生物学的提示 インビトロにおいて入れ代わりヘリコバクター ピロリに対するレセプターとして機能する4種の五糖グリコスフィンゴ脂質のうち、x2のみが天然にヒト組織に見られるが、胃癌における腫瘍組織以外には胃粘膜に見られなかった(Kannagi *et al.*, 1982b)。Thorn *et al.*, 1992の研究は、しかしながら、x2グリコスフィンゴ脂質および末端GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 配列を有する伸長した構造が数種のヒト組織に存在することを示したが、残念なことに、胃上皮組織は検討した組織に含まれていなかった。そのため、数人の血液型Aの個人のヒト胃粘膜上皮細胞から得た全非酸性グリコスフィンゴ脂質(レーン1~6)に対してGalNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 特異的モノクローナル抗体TH2による薄層クロマトグラムオーバーレイを実施した(図11B)。しかし、このアッセイでは、胃上皮由来のグリコスフィンゴ脂質類に対する結合は検出されなかった。*E. cristagalli*のGal β 4GlcNAc-結合レクチンを用いた対応するオーバーレイを図11A、11Bと11Cに示した。胃上皮由来の種々のグリコスフィンゴ脂質において、初めの3つのレーンは四糖領域に対するバンドに対して弱い結合を示し、これはネオラクトテトラオシルセラミドに対すると考えられ、グリコスフィンゴ脂質の量が少なかったため、これらのバンドのヘリコバクター ピロリに対する結合は検出することができなかった(Teneberg *et al.*, 2001)。

30

【0123】

さらに、B5グリコスフィンゴ脂質または上述した伸長構造(no. 28、表2)に見られる配列であるGal α 3Gal β 4GlcNAc β は、Gal α 3の付加に関与するトランスフェラーゼが発現されないことから、健常なヒト組織には存在しないと考えられる(Larsen *et al.*, 1990)。従って、上述した結合エピトープを有するターゲットレセプターが胃上皮細胞表面に提示されている場合には、このようなレセプターは糖タンパクの繰り返しN-アセチルラクタミン因子に基づくものであり、脂質に基づく構造ではないと結論される。

40

【0124】

しかし、消化性潰瘍と関連するヘリコバクター ピロリ株、例えば、本発明で主として用いた株は、オプソニン作用を受けていないにもかかわらず、顆粒球の炎症反応を刺激した(Rautelin *et al.*, 1994a, b)。バクテリアの食作用において最初に起こる事柄は特定のレクチン様相互作用を含み、その結果、顆粒球の凝集が生じる(OfekとSharon, 1988)。食作用に続いて、酸化的バースト反応を生じるが、これはヘリコバクター ピロリ関連疾

50

患の病因を導くものとも考えられる (Babior, 1978)。顆粒球の酸性および非酸性グリコ
スフィンゴ脂質には、ネオラクト核と繰り返しラクトサミン単位の両方を有するものを含
み、表 2 の n o . 2 1 とシアル化七糖化合物 (n o . 2 7、表 2) も含まれる、これらはア
セチル型のシアル酸アセトアミド基が単離および特徴付けられているもの (Fukuda *et al.*
., 1985; Stroud *et al.*., 1996) を含み、ヘリコバクター ピロリに対する白血球表面の
潜在的レセプターとして機能しうる。更に、X₂グリコスフィンゴ脂質も同じ材料から単
離されている (Teneberg, S.、未発表)。

【0125】

図 1 1 B に戻ると、モノクローナル抗体 T H 2 は顆粒球と赤血球の両方の五糖領域、即ち
、x 2 グリコスフィンゴ脂質に対応するとも考えられる領域、のバンドに結合する (それ
ぞれレーン 7 と 8) (Teneberg, S.、未発表; Thorn *et al.*., 1992; Teneberg *et al.*., 19
96)。同様に、ネオラクトテトラオシルセラミドも顆粒球と赤血球の両方に存在すること
が E. cristagalli のレクチンを代わりに用いたオーバーレイアッセイ (図 1 1 C、レー
ン 7 と 8) から分かった。この 2 つのケースにおいて、ヘリコバクター ピロリはネオラ
クトテトラオシルセラミドに結合した (Bergstrom, J.、未発表)。顆粒球については、Fuk
uda *et al.*., 1985 の結果に基づいた、ネオラクトテトラオシルセラミドを 1 つの N-アセ
チルラクトースアミン単位で伸長させたもの (n o . 2 1、表 2 を参照) に対応すると考
えられる比較的弱いバンドが六糖領域に見られた。これらグリコスフィンゴ脂質が上述し
た凝集反応における主要なターゲットであるか否かは未だ明らかとなっていない。

【0126】

ネオ糖脂質および新規糖脂質の分析

オリゴ糖類 GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc, GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6GlcNAc, Gal α 3Gal β 4Glc
NAc β 3Gal β 4Glc および GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc ならびにマルトヘプタオー
ス (米国、セントルイス、Sigma 製) をシアノボロハイドライドを用いて 4-ヘキサアデ
シニルアニリン (HDA と略す、スウェーデン国、ストックホルム、Aldrich 製) を還元
的にアミン化した (Halina Miller-Podraza, いずれ発行される)。産物をマスマスペクトル
で特徴づけ、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 4Glc(
red)-HDA および マルトヘプタオース(red)-HDA [“(red)-”は糖質の還元末端グルコー
スおよびヘキサアデシニルアニリン (HDA) のアミン基の還元的アミン化によって得ら
れたアミン結合構造である] ことが確認された。化合物 Gal α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc
(red)-HDA および GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc(red)-HDA は、はっきりとした結
合活性を示し、GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6GlcNAc(red)-HDA は上述した T L C オーバー
レイアッセイにおいてヘリコバクター ピロリに対して強い結合を示し、GlcNAc β 3Gal β 4Glc
NAc(red)-HDA および マルトヘプタオース(red)-HDA は弱い結合を示すか、または不活性
であった。この例は四糖 GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal がヘリコバクター ピロリに結合す
る構造であることを示す。還元によって Glc-残基のピラノース環構造が壊れるので還元末
端 Glc-残基は結合に必要なはないと考えられる。一方、還元末端 GlcNAc のインタクトな環構
造は三糖 GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc の優れた結合に必要である。

【0127】

N H K-1 糖脂質 GlcA β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer の生合成した前駆体類似体およ
び新規な糖脂質である Glc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer および Glc(A-メチルアミ
ド) β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer を T L C オーバーレイアッセイで試験したところ
、ヘリコバクター ピロリに対する結合活性が見られた。Glc(A-メチルアミド) とはグル
クロン酸誘導体であって、カルボキシル基がメチルアミンによってアミド化されたもので
ある。Glc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer 構造はヘリコバクター ピロリに対して強い
結合を示し、Glc(A-メチルアミド) β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer はヘリコバクター
ピロリに対して非常に強い結合を示した。

【0128】

トランスグリコシル化反応による GlcA β 3Gal β 4Glc(Nac) の製造

10

20

30

40

50

アクセプターである糖質Gal β 4GlcまたはGal β 4GlcNAc(約10～20mM)を10倍モル量の、過剰量のパラニトロフェニル β -グルクロン酸とウシ肝臓 β -グルクロニダーゼ(20000U、Sigma製)を含むpHが約5の緩衝液と共に37℃で、攪拌しながら5日間インキュベートした。産物はHPLCで精製した。

【0129】

参考文献

- Aggarwal, B. B., Eessalu, T. E.とHass, P. E. (1985) Nature, 318, 665-667.
- Andersson, B., Porras, O., Halson, L. A., Lagergard, T.,と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., Naslund, I., Ljung, A., Wadstrom, T. and Karlsson, K.-A. (1998) Glycobiology, 8, 297-309.
- Ascencio, F., Fransson, L.-A. and Wadstrom, T. (1993) J. Med. Microbiol., 38, 240-244.
- Appelmelk, B.J., Fallner, G., Clayes, D., Kirchner, T., and Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E. (1998) Immol. Today 19, 296-299.
- Avenaud, P., Marais, A., Monteiro, L., Le Bail, B., Biolac Saga, P., Balabaud, C., and Megraud, 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 1), 17-19.
- Bock, K., Breimer, M. E., Brignole, A., Hansson, G. C., Karlsson, K.-A., Larson, G., Leffler, H., Samuelsson, B. E., Stromberg, N., Svanborg-Eden, C. and Thurn, J. (1985) J. Biol. Chem., 260, 8545-8551.
- Boren, T., Falk, P., Roth, K. A., Larson, G. and Normark, S. (1993) 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.
- 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., Levery, S.B., Kannagi, R. and Hakomori, S.-i. (1986) J. Biol. Chem., 261, 1380-1387.
- Chmiela, M., Wadstrom, T., Folkesson, H., Planeta Malecka, I., Czekwianianc, E., Rechcinski, T., and Rudnicka, W. (1998) Immunol. Lett. 61, 119-125.
- Claeys, D., Fallner, G., Appelmelk, B. J., Negrini, R., and Kirchner, T. (1998) Gastroenterology 115, 340-347.
- 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.
- 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.
- 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. (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., Akyon, Y., Pinar, A., Oc, M., Boke, E., Kes, S., and Tokgozoglu, L. (2000) J. clin. Microbiol. 38, 4408-4411.
- Folch, J., Lees, M., And Sloane-Stanley, G. H. (1957) J. Biol. Chem. 226, 497-509.
- 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., Stromberg, N. and Thurin, J. (1985) Anal. Biochem., 146, 158-163.
- 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.
- 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.
- 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.
- Koerner Jr, T. A. W., Prestegard, J. 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.
- Lanne, B., Ugglä, L., Stenhagen, G., And Karlsson, K-A. (1995) Biochemistry 34, 1845-1850.
- Lanne, B., Miller-Podraza, H., Abul Milh, M., Teneberg, S., Ugglä, L., Larsson, T., Leonardsson, I., Jovall, P.-A., Bergstrom, J. and Karlsson, K.-A. (2001) manuscript in preparation.
- Larsen, R. D., Rivera-Marrero, C. A., Ernst, L. K., Cummings, R. D. and Lowe, J.

10

20

30

40

50

- B. (1990) J. Biol. Chem., 265, 7055-7061.
- Larson, G., Karlsson, H., Hansson, G.C. and Pimlott, W. (1987) Carbohydr. Res., 161, 281-290.
- 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., 60, 2470-2474.
- Mayo, S. L., Olafsen, B. D. and Goddard III, W. A. (1990) J. Chem. Phys., 94, 88 97-8909.
- McKibbin, J. M., Spencer, W. A., Smith, E. L., Mansson, J. E., Karlsson, K-A, Sa 10
muelsson, B. E., Li, Y-T and Li, S. C. (1982) J. Biol. Chem., 257, 755-760.
- Meyer, B. (1990) Topics Curr. Chem., 154, 141-208.
- Miller-Podraza, H., Abul Milh, M., Bergstrom, J. and Karlsson, K.-A. (1996) Glyc 10
oconj. J., 13, 453-460.
- Miller-Podraza, H., Bergstrom, J., Abul Milh, M. and Karlsson, K.-A. (1997a) Gly 10
coconj. J., 14, 467-471.
- Miller-Podraza, H., Abul Milh, M., Teneberg, S. and Karlsson, K.-A. (1997b) Infe 10
ct. Immun., 65, 2480-2482.
- Miller-Podraza, H., Abul Milh, M., Angstrom, J., Jovall, P.-A., Wilhelmsson, U., 20
Lanne, B., Karlsson, H., and Karlsson, K.-A. (2001) 発行準備中.
- Muzzarelli, R. A. A., Mattioli-Belmonte, M., Miliiani, M., Muzzarelli, C., Gabban 20
elli, F., and Biagini, G. (2002) Carbohydrate Polym. 48, 15-21.
- Muzzarelli, R. A. A., Muzzarelli, C., Cosani, A., and Terbojevich, M. (1999) Car 20
bohydrate Polym. 39, 361-367.
- Mysore, J. V., Wiggington, T., Simon, P. M., Zopf, D., Heman-Ackah, L.M. and Dub 20
ois, A. (1999) Gastroenterology, 117, 1316-1325.
- Naiki, M., Fong, J., Ledeen, R. and Marcus, D. M. (1975) Biochemistry, 14, 4831- 20
4836.
- Nakhla, T., Fu, D., Zopf, D., Brodsky, N., and Hurt, H. (1999) British J. Nutr. 30
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 Wadstrom, 30
T. (2000) J. Clin. Microbiol. 38, 1072-1076.
- 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. Rec 40
og., 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 40
. (Paris), 94, 139-152.
- Parsonnet, J., Friedman, G. D., Vandersteen, D. P., Chang, Y., Vogelmann, J. H., 40
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.
- Rautelin, H., Blomberg, B., Jarnerot, G. and Danielsson, D. (1994a) Scand. J. Ga 40
stroenterol., 29, 128-132.
- Rautelin, H., von Bonsdorff, C.-H., Blomberg, B. and Danielsson, D. (1994b) J. C 50

lin. Pathol., 47, 667-669.

Rebora, R., Drago, F., and Parodi, A. (1995) Dermatology 191, 6-8.

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., 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 10, 750-757.

Soltesz, 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., Fallner, G., Dewald, E., Brabletz, T., Jung, A., 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. 20

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., Triadafalopoulos, G., Xiao, S., Brooks, P. (2000) J. Gastroenterol. Hepatol., 15, Suppl: G58-68.

Teneberg, S., Angstrom, J., Jovall, P.-A. and Karlsson, K.-A. (1994) J. Biol. Chem., 269, 8554-8563.

Teneberg, S., Lonnroth, I., Torres Lopez, J. F., Galili, U., Olwegard Halvarsson, M., Angstrom, J. and Karlsson, K.-A. (1996) Glycobiology, 6, 599

Teneberg, S., Abul Milh, M., Lanne, B., Jovall, P.-A., Karlsson, H., Angstrom, J., Olwegard Halvarsson, M., Danielsson, D., Ljung, A., Wadstrom, T. and Karlsson 30, K.-A. (2001, 発行準備中).

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., Stromberg, N., Teneberg, S., Sjogren, 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 Dunnschicht-Chromatographie (Stahl, E., ed.) pp. 496-515, Springer-Verlag, Berlin. 40

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., 246, 1192-1200.

【図面の簡単な説明】

【0130】

【図1A】ヘキサグリコシルセラミドをエンドグリコセラミダーゼで消化して得たパーメチル化オリゴ糖のEI/MS。上の図はオリゴ糖のガスクロマトグラムであり、下の図は 50

ガスクロマトグラムのピークAのEI/MSスペクトルである。

【図1B】ヘキサグリコシルセラミドをエンドグリコセラミダーゼで消化して得たパーメチル化オリゴ糖のEI/MS。上の図はオリゴ糖のガスクロマトグラムであり、下の図はガスクロマトグラムのピークBのEI/MSスペクトルである。

【図2A】ヘキサグリコシルセラミドの陰イオンFABマススペクトルである。

【図2B】ペンタグリコシルセラミドの陰イオンFABマススペクトルである。

【図3A】六糖からなる糖脂質のアノマー領域を示すプロトンNMRスペクトルであり、微量な1型成分に対して良好なシグナル/ノイズ比を達成するために一晩かけてスペクトルを取得した。

【図3B】五糖からなる糖脂質のアノマー領域を示すプロトンNMRスペクトルであり、微量な1型成分に対して良好なシグナル/ノイズ比を達成するために一晩かけてスペクトルを取得した。

【図4】ウサギ胸腺グリコスフィンゴ脂質の酵素分解を示す。シリカゲルの薄層プレートはC/M/H₂O（容量比は60：35：8）で展開した。AとBは4-メトキシベンザルデヒドで視覚化したプレートであり、Cは³⁵Sでラベルしたヘリコバクター ピロリをオーバーレイした後のオートラジオグラムである。レーン1：ヘプタグリコシルセラミド（構造1、表1）、レーン2：脱シアリル化ヘプタグリコシルセラミド（酸処理後に得たもの）、レーン3：β4-ガラクトシダーゼで処理した脱シアリル化ヘプタグリコシルセラミド、レーン4：シアリダーゼおよびβ4-ガラクトシダーゼで処理したヘプタグリコシルセラミド、レーン5：ヒト赤血球由来の参照用グリコスフィンゴ脂質類（ラクトシルセラミド、トリヘキソシルセラミドおよびグロボシド）、レーン6：β4-ガラクトシダーゼおよびβ-ヘキソサミダーゼで処理した脱シアリル化ヘプタグリコシルセラミド、レーン7：シアリダーゼ、β4-ガラクトシダーゼおよびβ-ヘキソサミダーゼで処理したヘプタグリコシルセラミド。

【図5】ウサギ胸腺ヘプタグリコシルセラミド（構造1、表1）の部分酸加水分解後に得たTLC産物を示す。展開溶媒は図4A、4Bおよび4Cと同じである。Aは4-メトキシベンザルデヒドで視覚化したプレートであり、Bは³⁵Sでラベルしたヘリコバクター ピロリをオーバーレイした後のオートラジオグラムである。レーン1：ヘプタグリコシルセラミド、レーン2：脱シアリル化ヘプタグリコシルセラミド（酸処理後）、レーン3：ペンタグリコシルセラミド、レーン4：加水分解物、レーン5：参照用グリコスフィンゴ脂質類（図4A、4Bおよび4Cと同じ）。

【図6A】グリコスフィンゴ脂質の希釈系列。TLCプレート上の結合活性をバクテリアオーバーレイ法で測定した。展開溶媒は図4と同じである。等モル量の種々の糖脂質をプレートで展開した。糖脂質の定量は六炭糖の含量に基づく。ヘキサグリコシルセラミドおよびペンタグリコシルセラミド（構造2と3、表1）を用い、各糖脂質の量（pmol）はレーン1：1280、レーン2：640、レーン3：320、レーン4：160、レーン5：80、レーン6：40、レーン7：20とした。

【図6B】グリコスフィンゴ脂質の希釈系列。TLCプレート上の結合活性をバクテリアオーバーレイ法で測定した。展開溶媒は図4と同じである。等モル量の種々の糖脂質をプレートで展開した。糖脂質の定量は六炭糖の含量に基づく。ペンタグリコシルセラミドおよびテトラグリコシルセラミド（構造2と3、表1）を用い、各糖脂質の量（pmol）はレーン1：1280、レーン2：640、レーン3：320、レーン4：160、レーン5：80、レーン6：40、レーン7：20とした。

【図7】Aは4-メトキシベンザルデヒドで検出した分離グリコスフィンゴ脂質を示す薄層クロマトグラムであり、Bはそこに放射線標識したヘリコバクター ピロリ032株を結合させた分離グリコスフィンゴ脂質を示すオートラジオグラムである。アルミニウムで裏打ちしたシリカゲル60HPTLCプレート（Merck製）上で、クロロフォルム/メタノール/水の容量比が60：35：8の溶媒系を用いてグリコスフィンゴ脂質を分離した。結合アッセイは、「材料と方法」の欄で記載したように行った。オートラジオグラフィは7時間行った。各レーンは以下のグリコスフィンゴ脂質を含んでいた。

レーン 1) Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer (ネオラクトテトラオシルセラミド)、4 μ g; レーン 2) Gal α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer (B 5 グリコスフィンゴ脂質)、4 μ g; レーン 3) Gal α 3Gal β 4GlcNH₂ β 3Gal β 4Glc β 1Cer、4 μ g; レーン 4) Gal α 3(Fuc α 2)Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer (B 6 2 型 グリコスフィンゴ脂質)、4 μ g; レーン 5) GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer、4 μ g; レーン 6) Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer、4 μ g; レーン 7) GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer (x 2 グリコスフィンゴ脂質)、4 μ g; レーン 8) NeuAc α 3GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer (NeuAc-x2)、4 μ g; レーン 9) Fuc α 2Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer (H 5 2 型 グリコスフィンゴ脂質)、4 μ g; レーン 10) NeuAc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer (シアリルネオラクトテトラオシルセラミド)、4 μ g。グリコスフィンゴ脂質の材料は表 2 と同じである。

【図 8 A】ヘリコバクター ピロリに結合するグリコスフィンゴ脂質である GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer について予測した、最少エネルギー配座異性体。最少エネルギー立体配座のオリゴ糖部分を上から見た図である。アノマー性に違いがあるものの、アセトアミド基の有無、末端糖の 4-OH 基の軸配座または赤道配座、ならびに末端 α 3-結合化合物の環の形成する平面構造が β 3-結合した対応化合物の平面構造よりも少し上に位置することは、図 8 A ~ 8 C に示したグリコスフィンゴ脂質類のみならず、ウサギ胸腺から誘導した GlcNAc β 3-末端を有する構造体 (図 9 A を参照) とも重要な立体構造上の類似点が存在することを示し、バクテリア付着因子に対してこれらが示す類似した親和性を説明した。一方、内部 GlcNAc β 3 のアセトアミド基は結合に必須であった (図 8 C と図 8 D を参照)。

【図 8 B】ヘリコバクター ピロリに結合するグリコスフィンゴ脂質である GalNAc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer について予測した、最少エネルギー配座異性体。最少エネルギー立体配座のオリゴ糖部分を上から見た図である。

【図 8 C】ヘリコバクター ピロリに結合するグリコスフィンゴ脂質である Gal α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer について予測した、最少エネルギー配座異性体。最少エネルギー立体配座のオリゴ糖部分を上から見た図である。

【図 8 D】ヘリコバクター ピロリに結合しないグリコスフィンゴ脂質である Gal α 3Gal β 4GlcNH₂ β 3Gal β 4Glc β Cer について予測した、最少エネルギー配座異性体。最少エネルギー立体配座のオリゴ糖部分を上から見た図である。

【図 9 A】結合活性を有するグリコスフィンゴ脂質である GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer について予測した、最少エネルギー配座異性体。B 5 の内部 GlcNAc におけるアセトアミド成分の脱 N-アセチル化 (図 8 A, 8 B, 8 C および 8 D) は結合能を完全に除去するという発見と共に、結合エピトープが図 8 C に示した B 5 の末端三糖からなるものでなければならないことが分かった。これは末端 N-アセチルガラクトサミンのアセトアミド基が必須ではないためである。

【図 9 B】結合活性を有するグリコスフィンゴ脂質である Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4-GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer について予測した、最少エネルギー配座異性体。このグリコスフィンゴ脂質はヘリコバクター ピロリに対する結合能を有しているが、その親和性は低下している。

【図 9 C】結合活性を有していないグリコスフィンゴ脂質である NeuAc α 3GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer について予測した、最少エネルギー配座異性体。このグリコスフィンゴ脂質はヘリコバクター ピロリに対する結合能を完全に失っている。

【図 9 D】結合活性を有していないグリコスフィンゴ脂質である Gal α 3(Fuc α 2)Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer について予測した、最少エネルギー配座異性体。このグリコスフィンゴ脂質はヘリコバクター ピロリに対する結合能を完全に失っている。

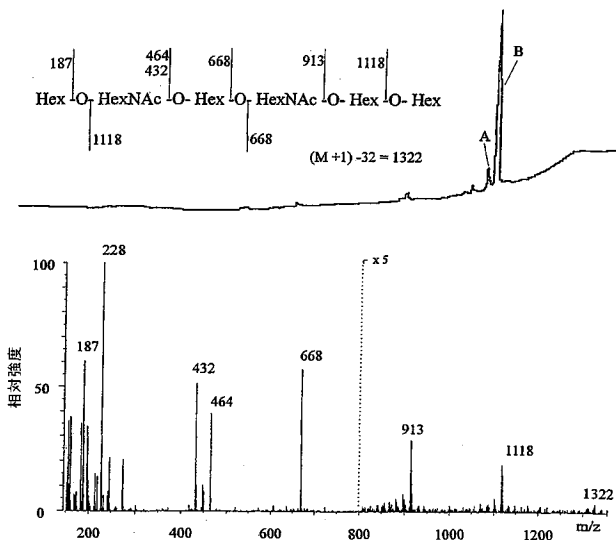
【図 10】七糖化合物である NeuGlc α 3Gal β 4-GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer の最少エネルギー配座異性体であって、互いに対して 90° 回転させた 2 種投影図である。シアリル酸のグリコリル成分の末端炭素原子および 2 つの GlcNAc 残基のアセトアミド基のメチル炭素原子は、配向を分かりやすくするために黒で示した。Glc β cer 結合について

は、図示するために長鎖の立体構造を任意で選択したが、ここに示したものよりも最小結合配列である $\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3$ のほうが近接する $\text{Glc}\beta\text{Cer}$ 立体構造中の付着因子に対してより露出した状態にあると考えられる。

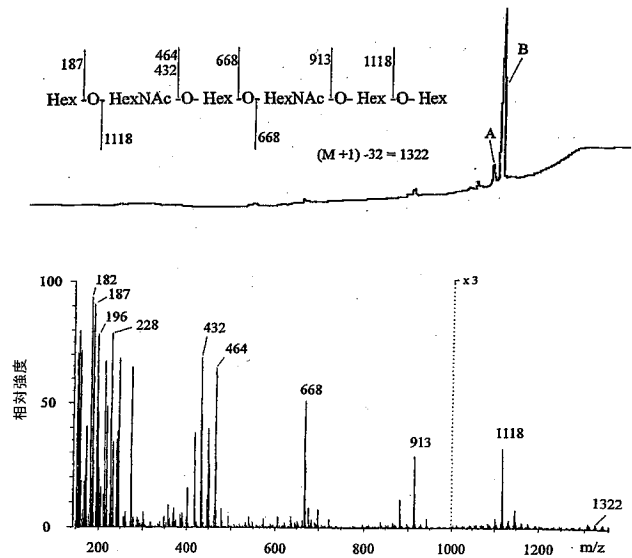
【図 1 1】ヒト胃粘膜から得た上皮細胞、ヒト顆粒球およびヒト赤血球のそれぞれより単離した全非酸性グリコスフィンゴ脂質画分の薄層クロマトグラムであり、B はモノクローナル抗体 TH 2 を結合させたもので、C は *E. cristagalli* 由来のレクチンを結合させたものである。A は同じ画分を 4-メトキシベンザルデヒドで染色した。オートラジオグラフィは 12 時間行った。レーン 1～6 には、血液型が A である 5 人から提供されたヒト胃粘膜から得た上皮細胞より単離した全非酸性グリコスフィンゴ脂質画分を $80\mu\text{g}$ ずつアプライし、レーン 6 にはヒト顆粒球より単離した全非酸性グリコスフィンゴ脂質画分を $40\mu\text{g}$ アプライし、レーン 7 にはヒト赤血球より単離した全非酸性グリコスフィンゴ脂質画分を $40\mu\text{g}$ アプライした。オーバーレイアッセイは、「材料と方法」の欄で記載したように行った。

10

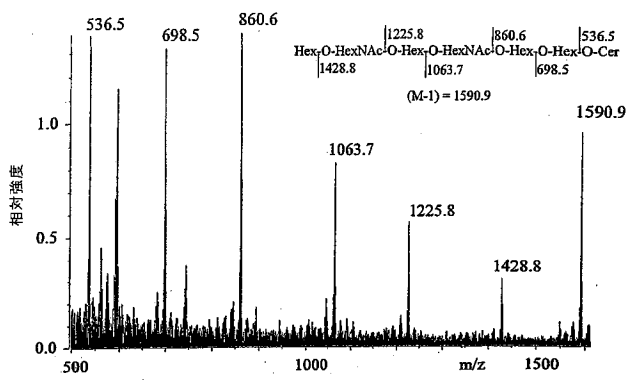
【図 1 A】



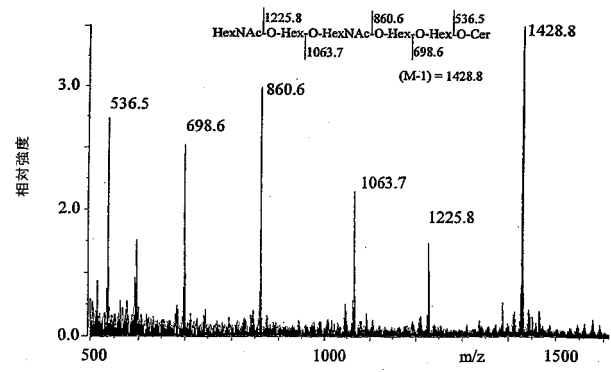
【図 1 B】



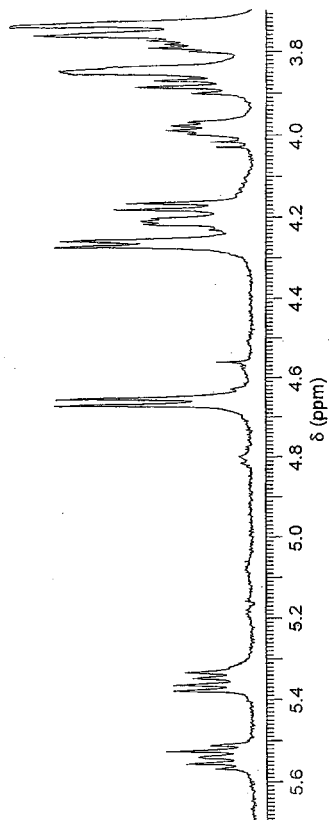
【図 2 A】



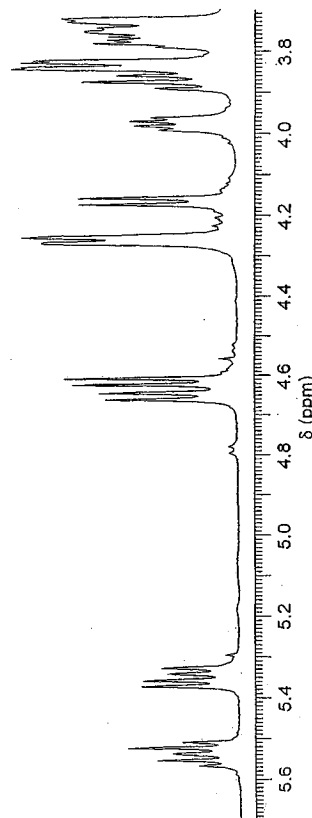
【図 2 B】



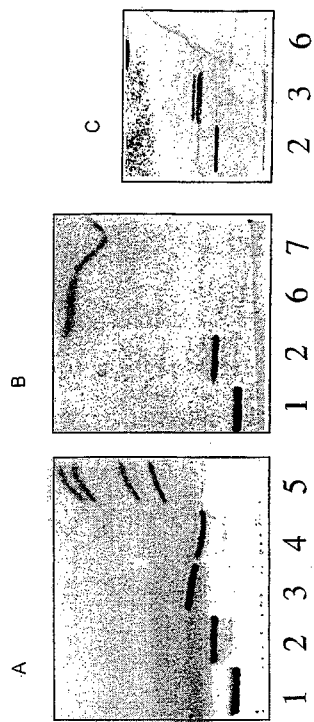
【図 3 A】



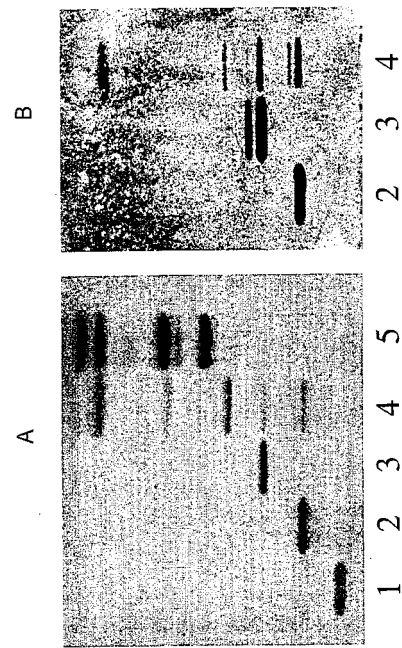
【図 3 B】



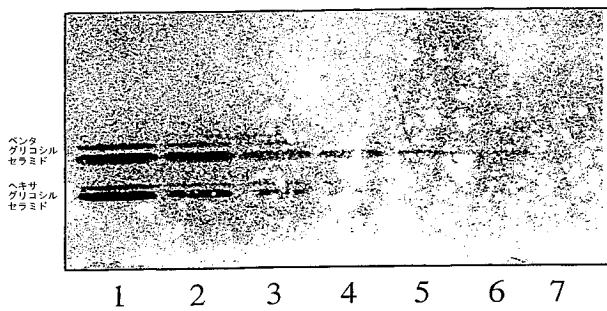
【図 4】



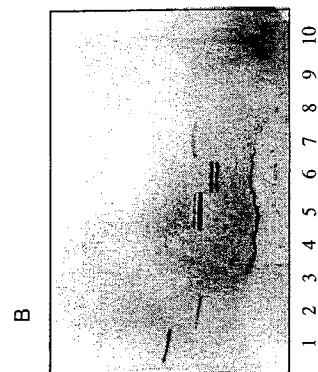
【図 5】



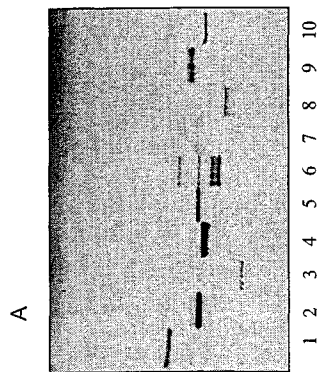
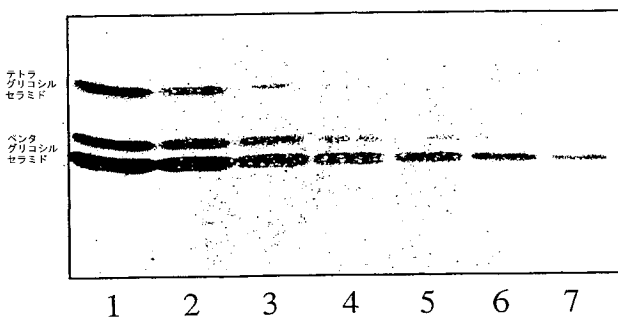
【図 6 A】



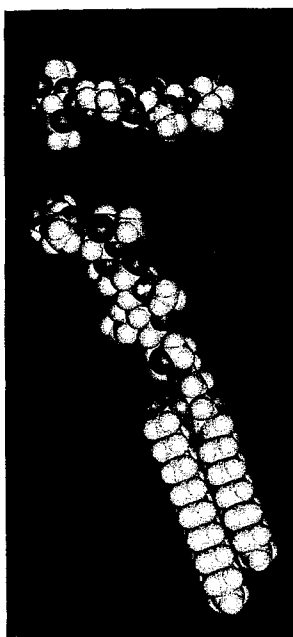
【図 7】



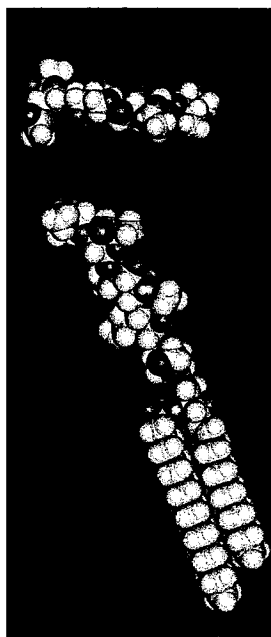
【図 6 B】



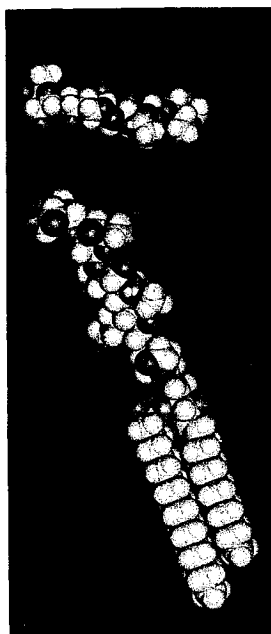
【図 8 A】



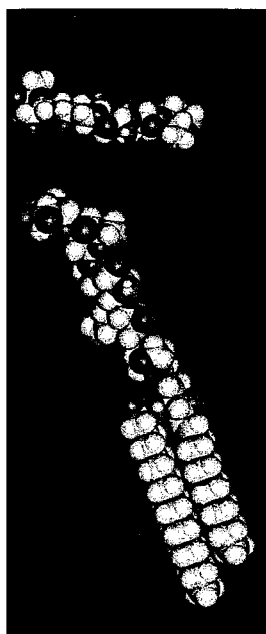
【図 8 B】



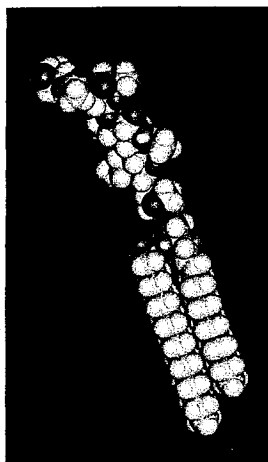
【図 8 C】



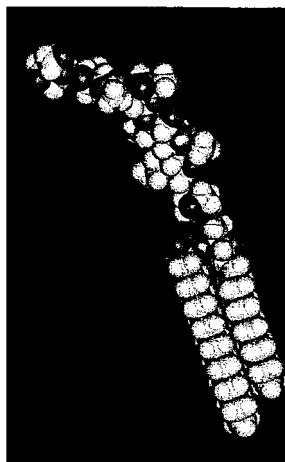
【図 8 D】



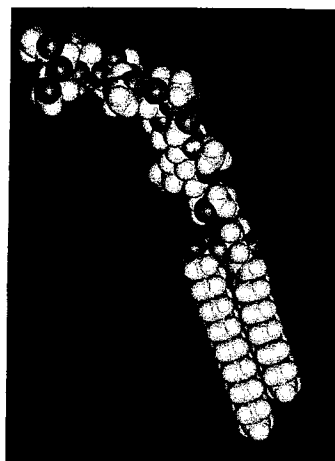
【図 9 A】



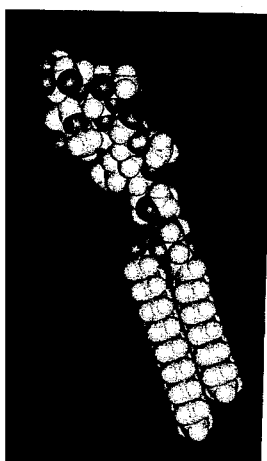
【図 9 B】



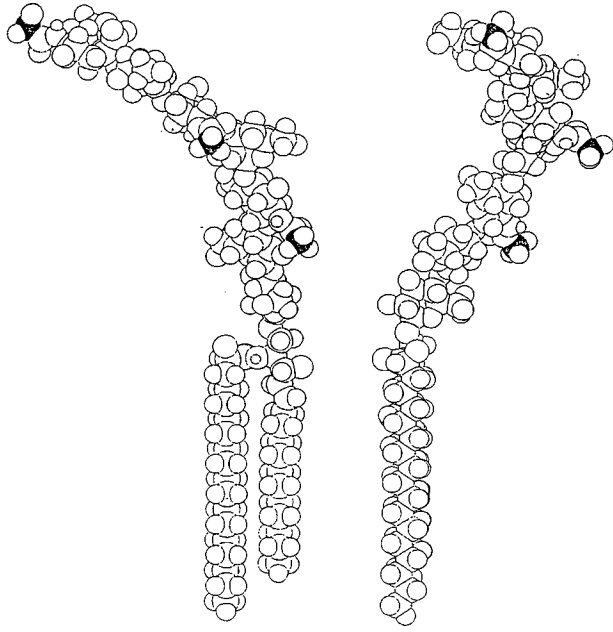
【図 9 C】



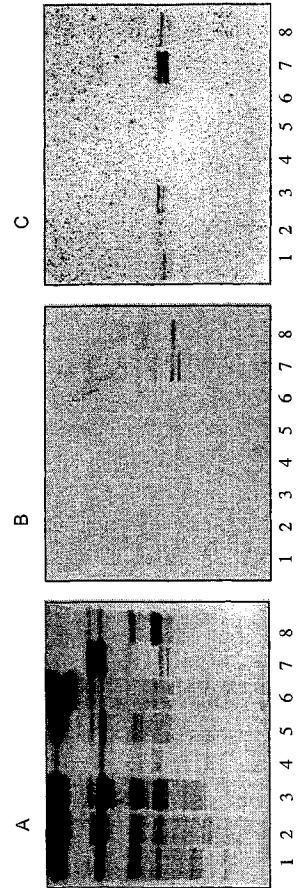
【図 9 D】



【図 10】



【図 11】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
25 July 2002 (25.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/056893 A1(51) International Patent Classification: A61K 31/702, (74) Agent: OY JALO ANT-WUORINEN AB: Iso
C07H 15/04, 3/06, A61P 1/04, 31/04 Roobertinkatu 4-6 A, FIN-00120 Helsinki (FI).

(21) International Application Number: PCT/FI02/00043

(22) International Filing Date: 18 January 2002 (18.01.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 20010118 19 January 2001 (19.01.2001) FI

(71) Applicant (for all designated States except US): CAR-
BION OY [FI/FI]; Viikinkaari 9, FIN-00710 Helsinki (FI).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): MILLER-PO-
DRAZA, Halina [SE/SE]; Lantmälsgratan 20, S-42137
Västra Frölunda (SE); TENEBERG, Susann [SE/SE];
FI, 1639, S-43065 Huddus (SE); ÅNGSTRÖM, Jonas
[SE/SE]; de Geersgatan 12, S-41657 Göteborg (SE);
KARLSSON, Karl-Anders [SE/SE]; Nilssonsberg 37,
S-41143 Göteborg (SE); NATUNEN, Jari [FI/FI]; Merit-
ullinkatu 6 C 18, FIN-00170 Helsinki (FI).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AT
(utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, CZ (utility model), DE, DE
(utility model), DK, DK (utility model), DM, DZ, EC, EE,
EE (utility model), ES, FI, FI (utility model), GB, GD, GE,
GH, GM, HN, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LI, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SI, SG, SI, SK, SK (utility model), SL, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

Published:

with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/056893 A1

(54) Title: NOVEL RECEPTORS FOR *HELICOBACTER PYLORI* AND USE THEREOF(57) Abstract: The present invention describes a substance or a receptor comprising *Helicobacter pylori* binding oligosaccharide
sequence $[Ga(A)_q(NAc)_rGlc(A)_s(\alpha3\beta3)_t[Gal\beta4GlcNAc\beta3]Gal\beta4GlcNAc)_u]$, wherein q, r, s, t, and u are each independently
0 or 1, and the use thereof in, e.g., pharmaceutical and nutritional compositions for the treatment of conditions due to the presence
of *Helicobacter pylori*. The invention is also directed to the use of the receptor for diagnostics of *Helicobacter pylori*.

WO 02/056893

PCT/FI02/00043

1

Novel receptors for *Helicobacter pylori* and use thereof.

FIELD OF THE INVENTION

- 5 The present invention describes a substance or receptor binding to *Helicobacter pylori*, and use thereof in, e.g., pharmaceutical and nutritional compositions for the treatment of conditions due to the presence of *Helicobacter pylori*. The invention is also directed to the use of the receptor for diagnostics of *Helicobacter pylori*.

10 BACKGROUND OF THE INVENTION

- Helicobacter pylori* has been implicated in several diseases of the gastrointestinal tract including chronic gastritis, non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) associated gastric disease, duodenal and gastric ulcers, gastric MALT lymphoma, and gastric adenocarcinoma (Axon, 1993; Blaser, 1992; DeCross and Marshall, 1993; Dooley, 1993; Dunn *et al.*, 1997; 15 Lin *et al.*, 1993; Nomura and Stemmermann, 1993; Parsonnet *et al.*, 1994; Sung *et al.*, 2000; Wotherspoon *et al.*, 1993). Totally or partially non-gastrointestinal diseases include sudden infant death syndrome (Kerr *et al.*, 2000 and US 6,083,756), autoimmune diseases such as autoimmune gastritis and pernicious anaemia (Appelmek *et al.*, 1998; Chmiela *et al.*, 1998; 20 Claves *et al.*, 1998; Jassel *et al.*, 1999; Steininger *et al.*, 1998) and some skin diseases (Rebora *et al.*, 1995), pancreatic disease (Correa *et al.*, 1990), liver diseases including adenocarcinoma (Nilsson *et al.*, 2000; Avenaud *et al.*, 2000) and heart diseases such as atherosclerosis (Farsak *et al.*, 2000). Multiple diseases caused or associated with *Helicobacter pylori* has been reviewed (Pakodi *et al.*, 2000). Of prime interest with respect 25 to bacterial colonization and infection is the mechanism(s) by which this bacterium adheres to the epithelial cell surfaces of the gastric mucosa.

- Glycoconjugates, both lipid- and protein-based, have been reported to serve as receptors for the binding of this microorganism as, e.g., sialylated glycoconjugates (Evans *et al.*, 1988), 30 sulfatide and GM3 (Saitoh *et al.*, 1991), Le^b determinants (Borén *et al.*, 1993), polyglycosylceramides (Miller-Podraza *et al.*, 1996; 1997a), lactosylceramide (Ångström *et al.*, 1998) and gangliotetraosylceramide (Lingwood *et al.*, 1992; Ångström *et al.*, 1998). Other potential receptors for *Helicobacter pylori* include the polysaccharide heparan sulphate (Ascensio *et al.*, 1993) as well as the phospholipid phosphatidylethanolamine 35 (Lingwood *et al.*, 1992).

US patents of Zopf *et al.*: 5,883,079 (March 1999), 5,753,630 (May 1998) and 5,514,660 (May, 1996) describe Neu5Acα3Gal- containing compounds as inhibitors of the *H. pylori*

WO 02/056893

2

PCT/FI02/00043

adhesion. The sialyl-lactose molecule inhibits *Helicobacter pylori* binding to human gastrointestinal cell lines (Simon *et al.*, 1999) and is also effective in a rhesus monkey animal model of the infection (Mysore *et al.*, 2000). The compound is in clinical trials.

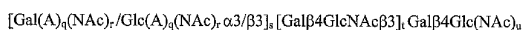
- 5 US patent Krivan *et al.* 5,446,681 (November 1995) describes bacterium receptor antibiotic conjugates comprising an asialo ganglioside coupled to a penicillin antibiotic. Especially is claimed the treatment of *Helicobacter pylori* with the amoxicillin-asialo-GM1 conjugate. The oligosaccharide sequences/glycolipids described by the invention do not belong to the ganglioseries of glycolipids.

- 10 US patents of Krivan *et al.*: 5,386,027 (January 1995) and 5,217,715 (June 1993) describe use of oligosaccharide sequences or glycolipids to inhibit several pathogenic bacteria, however the current binding specificity is not included and *Helicobacter pylori* is not among the bacteria studied or claimed.

- 15 The saccharide sequence GlcNAc β 3Gal has been described as a receptor for *Streptococcus* (Andersson *et al.*, 1986). Some bacteria may have overlapping binding specificities, but it is not possible to predict the bindings of even closely related bacterial adhesins. In case of *Helicobacter pylori* the saccharide binding molecules, except the Lewis b binding protein
20 are not known.

SUMMARY OF THE INVENTION

- The present invention relates to use of a substance or receptor binding to
25 *Helicobacter pylori* comprising the oligosaccharide sequence



wherein q, r, s, t, and u are each independently 0 or 1,

- 30 so that when t = 0 and u = 0, then the oligosaccharide sequence is linked to a polyvalent carrier or present as a free oligosaccharide in high concentration, and analogs or derivatives of said oligosaccharide sequence having binding activity to *Helicobacter pylori* for the production of a composition having *Helicobacter pylori*
35 binding or inhibiting activity.

WO 02/056893

3

PCT/FI02/00043

Among the objects of the invention are the use of the *Helicobacter pylori* binding oligosaccharide sequences described in the invention as a medicament, and the use of the same for the manufacture of a pharmaceutical composition, particularly for the treatment of any condition due to the presence of *Helicobacter pylori*.

5

The present invention also relates to the methods for the treatment of conditions due to the presence of *Helicobacter pylori*. The invention is also directed to the use of the receptor(s) described in the invention as *Helicobacter pylori* binding or inhibiting substance for diagnostics of *Helicobacter pylori*.

10

Another object of the invention is to provide substances, pharmaceutical compositions and nutritional additives or compositions containing *Helicobacter pylori* binding oligosaccharide sequence(s).

15

Other objects of the invention are the use of the above-mentioned *Helicobacter pylori* binding substances for the identification of bacterial adhesin, the typing of *Helicobacter pylori*, and the *Helicobacter pylori* binding assays.

20

Yet another object of the invention is the use of the above-mentioned *Helicobacter pylori* binding substances for the production of a vaccine against *Helicobacter pylori*.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

25

Figs. 1A and 1B. EI/MS of permethylated oligosaccharides obtained from hexaglycosylceramide by endoglycoceramidase digestion. Gas chromatogram of the oligosaccharides (top) and EI/MS spectra of peaks A and B, respectively (bottom).

30

Figs. 2A and 2B. Negative-ion FAB mass spectra of hexa- (2A) and pentaglycosylceramide (2B).

35

Figs. 3A and 3B. Proton NMR spectra showing the anomeric region of the six-sugar glycolipid (3A) and the five-sugar glycolipid (3B). Spectra were acquired overnight to get good signal-to-noise for the minor type 1 component.

35

Figs. 4A, 4B and 4C. Enzymatic degradation of rabbit thymus glycosphingolipids. Silica gel thin layer plates were developed in C/M/H₂O, (60:35:8, by vol.). 4A and 4B, 4-methoxybenzaldehyde visualized plates. 4C, autoradiogram after overlay with

WO 02/056893

4

PCT/FI02/00043

³⁵S-labeled *Helicobacter pylori*. 1, heptaglycosylceramide (structure 1, Table I); 2, desialylated heptaglycosylceramide (obtained after acid treatment); 3, desialylated heptaglycosylceramide treated with β 4-galactosidase; 4, heptaglycosylceramide treated with sialidase and β 4galactosidase; 5, reference glycosphingolipids from human erythrocytes (lactosylceramide, trihexosylceramide and globoside); 6, desialylated heptaglycosylceramide treated with β 4-galactosidase and β -hexosaminidase; 7, heptaglycosylceramide treated with sialidase, β 4-galactosidase and β -hexosaminidase.

Figs. 5A and 5B. TLC of products obtained after partial acid hydrolysis of rabbit thymus heptaglycosylceramide (structure 1, Table I). Developing solvent was as for Fig. 4A, 4B and 4C. **5A**, 4-methoxybenzaldehyde-visualized plate; **5B**, autoradiogram after overlay with ³⁵S-labeled *Helicobacter pylori*. 1, heptaglycosylceramide; 2, desialylated heptaglycosylceramide (acid treatment); 3, pentaglycosylceramide; 4, hydrolysate; 5, reference glycosphingolipids (as for Figs. 4A, 4B and 4C).

Figs. 6A and 6B. Dilution series of glycosphingolipids. The binding activity on TLC plates was determined using bacterial overlay technique. TLC developing solvent was as for Figs. 4A, 4B and 4C. Different glycolipids were applied to the plates in equimolar amounts. Quantification of the glycolipids was based on hexose content. **6A**, hexa- and pentaglycosylceramides (structures 2 and 3, Table I); **6B**, penta- and tetraglycosylceramides (structures 4 and 5, Table I). The amounts of glycolipids (expressed as pmols) were as follows: 1, 1280 (of each); 2, 640; 3, 320; 4, 160; 5, 80; 6, 40; 7, 20 pmols (of each).

Figs. 7A and 7B. Thin-layer chromatogram with separated glycosphingolipids detected with 4-methoxybenzaldehyde (**7A**) and autoradiogram after binding of radiolabeled *Helicobacter pylori* strain 032 (**7B**). The glycosphingolipids were separated on aluminum-backed silica gel 60 HPTLC plates (Merck) using chloroform/methanol/water 60:35:8 (by volume) as solvent system. The binding assay was done as described in the "Materials and methods" section. Autoradiography was for 72 h. The lanes contained:
lane 1) Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer (neolactotetraosylceramide), 4 μ g;
lane 2) Gal α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer (B5 glycosphingolipid), 4 μ g;
lane 3) Gal α 3Gal β 4GlcNH₂ β 3Gal β 4Glc β 1Cer, 4 μ g;
lane 4) Gal α 3(Fuco2)Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer (B6 type 2 glycosphingolipid), 4 μ g;

WO 02/056893

5

PCT/FI02/00043

- lane 5) GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer, 4 μ g;
 lane 6) Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer, 4 μ g;
 lane 7) GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer (x₂ glycosphingolipid), 4 μ g;
 lane 8) NeuAc α 3GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer (NeuAc-x₂), 4 μ g;
 5 lane 9) Fuc α 2Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer (H5 type 2 glycosphingolipid), 4 μ g;
 lane 10) NeuAc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer
 (sialylneolactotetraosylceramide), 4 μ g. The sources of the glycosphingolipids
 are the same as given in Table 2.
- 10 **Figs. 8A, 8B, 8C and 8D.** Calculated minimum energy conformations of three
 glycosphingolipids which bind *Helicobacter pylori*:
 GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer (**8A**),
 GalNAc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer (**8B**) and
 15 Gal α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer (**8C**). Also shown is the non-binding
 Gal α 3Gal β 4GlcNH₂ β 3Gal β 4Glc β 1Cer structure (**8D**). Top views of the
 oligosaccharide part of each of the calculated minimum energy structures are
 also shown. Despite differences in anomerity, absence or presence of an
 acetamido group, axial or equatorial position of the 4-OH of the terminal sugar
 20 and the fact that the ring plane of the terminal α 3-linked compounds is raised
 somewhat above the corresponding plane of the one being β 3-linked, a
 substantial topographical similarity exists between these structures and also the
 GlcNAc β 3-terminated structure derived from rabbit thymus (see Fig. 9A), thus
 explaining their similar affinities for the bacterial adhesin. In contrast, the
 25 acetamido group of the internal GlcNAc β 3 is essential for binding (*cf.* **8C** and
8D).
- Figs. 9A, 9B, 9C and 9D.** Calculated minimum energy conformations of the
 binding-active glycosphingolipids GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer
 30 (**9A**) and
 Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer (**9B**) and the non-binding
 glycosphingolipids NeuAc α 3GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer (**9C**) and
 Gal α 3(Fuc α 2)Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer (**9D**). The latter two extensions
 (**9C** and **9D**) abolish binding of *Helicobacter pylori* while the former (**9B**) is
 35 tolerated but results in a reduced affinity. Together with the finding that de-*N*-
 acylation of the acetamido moiety of the internal GlcNAc of B5 (Figs. 8A, 8B, 8C
 and 8D) completely abolishes binding, the part constituting the binding epitope

WO 02/056893

6

PCT/FI02/00043

must consist of the terminal trisaccharide of B5 shown in Fig. 8C since the acetamido group of a terminally situated *N*-acetylgalactosamine is non-essential.

- Fig. 10.** Minimum energy conformer of the seven-sugar compound NeuGc α 3Gal β 4-GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer shown in two projections rotated 90 degrees relative each other. The terminal carbon atom of the glycolyl moiety of the sialic acid as well as the methyl carbon atoms of the acetamido groups of the two internal GlcNAc residues are indicated in black only in order to facilitate the viewer's orientation. For the Glc β Cer linkage the extended conformation was arbitrarily chosen for presentation but the minimum binding sequence GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3 is most likely better exposed toward an approaching adhesin in Glc β Cer conformations other than the one shown here.

- Figs. 11A, 11B and 11C.** Binding of the monoclonal antibody TH2 (**11B**) and the lectin from *E. cristagalli* (**11C**) to total non-acid glycosphingolipid fractions from epithelial cells from human gastric mucosa, human granulocytes and human erythrocytes separated on thin-layer chromatograms. In (**11A**) the same fractions are shown with 4-methoxybenzaldehyde staining. Autoradiography was in cases (**11B**) and (**11C**) performed for twelve hours. In lanes 1-6 80 μ g of the total non-acid fractions from epithelial cells from human gastric mucosa of five different blood group A individuals were applied, whereas in lane 6 40 μ g from the total non-acid fraction from human granulocytes and in lane 7 40 μ g from the total non-acid fraction from human erythrocytes were applied. The overlay assays were performed as described in "Materials and methods".

25 DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

- The present invention describes a family of specific oligosaccharide sequences binding to *Helicobacter pylori*. Numerous naturally occurring glycosphingolipids were screened by thin-layer overlay assay (Table 2). The structures of the glycosphingolipids used were characterized by proton NMR and mass spectrometric experiments. Molecular modeling was used to compare three dimensional structures of the substances binding to *Helicobacter pylori*.

- The novel binding specificity was demonstrated by comparing four pentasaccharide glycolipids. It was found that the exchange of the non-reducing end terminal saccharide in GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer by either GalNAc β 3 (short name x2 GSL), GalNAc α 3 or Gal α 3 (B5) all resulted in binding of *Helicobacter pylori*, despite differences in anomericity, absence or presence of an acetamido moiety and axial/equatorial position of

WO 02/056893

7

PCT/FI02/00043

- the 4-OH. The specificity also includes structures with weaker binding to *Helicobacter pylori*: a shorter form Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer and β 4-elongated forms of the glycolipid with terminal N-acetylglucosamine:
Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer and
- 5 NeuGc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer. In contrast to previously known sialic acid depending specificities (Evans *et al.*, 1988; Miller-Podraza *et al.*, 1996; 1997a), the N-glycolyl neuraminic acid of the last mentioned glycosphingolipid could be released without effect to the binding of *Helicobacter pylori*.
- 10 The binding to GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer was very reproducible, though the general saccharide bindings of *Helicobacter pylori* suffer from phase variations of the bacterium, and high affinity of the binding was visible in the overlay assay at low picomolar amounts of the glycolipid.
- 15 The length of the binding epitope was indicated by experiments showing that GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer, Gal β 4GlcN β 3Gal β 4Glc β Cer, and Gal α 3Gal β 4GlcN β 3Gal β 4Glc β Cer (a shortened form and N-deacetylated forms of the active species) were not binding to *Helicobacter pylori*. The data reveal that the inner GlcNAc residue participates in binding but does not create strong enough binding alone. The
- 20 binding epitope was considered to be the terminal trisaccharide in the pentasaccharide epitopes discussed above. When only two of the residues are present as in Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer, binding is weaker, and in the hexasaccharide glycolipid Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer the terminal Gal β 4 inhibits the binding, explaining the weaker activity. A heptasaccharide glycolipid having Gal α 3 on the less active
- 25 hexasaccharide glycolipid structure, Gal α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer, had higher activity also indicating that terminal trisaccharide epitopes are required for good binding activity.
- Specificity of the binding was characterized by assaying isomers and modified forms of the
- 30 active species. Elongated forms of Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer having the following modifications on the terminal Gal: Fuca α 2 (short name H5-2), Fuca α 2 and Gal/GalNAc α 3 (B6-2, A6-2), Neu5Aca α 3 or Neu5Aca α 6 (sialylparaglobosides), or Gal α 4 (P1) were inactive in the binding assays with *Helicobacter pylori*. The binding was also destroyed by having a β 6-linked branch inner galactose, shown by the structure
- 35 Gal β 4GlcNAc β 3(Gal β 4GlcNAc β 6)Gal β 4Glc β Cer. The branch has been shown to change the presentation of the Gal β 4GlcNAc β 3-epitope and the disaccharide binding site is probably sterically hindered (Teneberg *et al.*, 1994). (However the result shows that the inner galactose residue to which the disaccharide- or trisaccharide binding epitopes are

WO 02/056893

8

PCT/FI02/00043

bound by β 3-linkage may also contribute to binding.) Furthermore Neu5Ac α 3GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer (an elongated form of the binding active x2-glycosphingolipid) or GalNAc β 3Gal α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer (elongated B5 GSL) did not appear to bind to *Helicobacter pylori*.

5 Molecular modeling was used to compare the active binding structures and inactive species. Calculated minimum energy conformers of the four pentasaccharide glycosphingolipids (Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer with elongation by either GlcNAc β 3, GalNAc β 3, GalNAc α 3 or Gal α 3) show that conformations of the compounds may closely mimic each other. The conformations of the inactive glycolipids were different. Despite the fact that the
10 terminal saccharides differ also in their anomeric linkage (two α - and two β -linked), molecular modeling revealed that the minimum energy structures are topographically very similar. The differences of the terminal structures are that Gal α 3 lacks an acetamido group present in the other three, Gal and GalNAc have the 4-OH in the axial position and GlcNAc
15 in the equatorial position, and the ring planes of the α anomeric terminal are raised slightly above the corresponding plane in the β anomeric ones. The elongation of the terminal is allowed on position 4 of GlcNAc, also indicating that the 4-OH is not very important for the binding, though the Gal β 4 elongation causes steric interference. In conclusion, neither the position of 4-OH nor the absence/presence of an acetamido group
20 nor the anomeric structure of terminal monosaccharide residue appear to be crucial for binding to occur, since all the four pentasaccharide glycolipids have similar affinities for the *Helicobacter pylori* adhesin.

In the light of these rules of binding four other terminal monosaccharides in the binding
25 substance may also provide trisaccharide binding epitopes: Gal β 3Gal β 4GlcNAc, GlcNAc α 3Gal β 4GlcNAc, Glc β 3Gal β 4GlcNAc and Glc α 3Gal β 4GlcNAc. These are analogous to the sequences studied only having differences in the anomeric, 4-epimeric or on C2 NAc/OH structures. The first one is present on a glycolipid from human erythrocytes, while the last three are not known from human tissues so far, but could rather represent
30 analogues of the natural receptor.

The binding epitope was shown to include the terminal trisaccharide element of active pentasaccharide glycolipids, and at least in larger repetitive *N*-acetylactosamines the epitope may be also in the middle of the saccharide chain. The inventors realize that the binding
35 epitopes can be presented in numerous ways on natural or biosynthetically produced glycoconjugates and oligosaccharides such as O-linked or N-linked glycans of glycoproteins and on poly-*N*-acetylactosamine oligosaccharides. Chemical and enzymatic synthesis methods, especially in the carbohydrate field, allow production of almost an infinite number

WO 02/056893

9

PCT/FI02/00043

- of derivatives and analogs. The size of the binding epitope allows some modifications, as exemplified on the C1, C2 and C4 of the terminal monosaccharide, by loss of the non-reducing terminal monosaccharide or elongation from C4 of terminal GlcNAc of GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc, e.g., the position C4 of GlcNAc β 3 can be linked to an
- 5 oligosaccharide chain by a glycosidic bond. When the oligosaccharide sequence is GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc, position C4 of terminal GlcNAc β 3 can be linked to Gal β 1- or an oligosaccharide chain by a glycosidic bond. Especially the C2 and C4 positions of the non-reducing terminal monosaccharide residue in the trisaccharide epitope and the reducing ends of the epitopes can be used for making derivatives and oligomeric or
- 10 polymeric conjugates having binding activity to *Helicobacter pylori*. The C6 positions of the monosaccharide residues can also be used to produce derivatives and analogs, especially the C6 position of the non-reducing terminal residue in trisaccharide sequence and the reducing end residue of di- and trisaccharide binding substances are preferred.
- 15 In this invention the terms "analog" and "derivative" are defined as follows. According to the present invention it is possible to design structural analogs or derivatives of the *Helicobacter pylori* binding oligosaccharide sequences. Thus, the invention is also directed to the structural analogs of the substances according to the invention. The structural analogs according to the invention comprises the structural
- 20 elements important for the binding of *Helicobacter pylori* to the oligosaccharide sequences. For design of effective structural analogs it is important to know the structural element important for the binding between *Helicobacter pylori* and the saccharides. The important structural elements are preferably not modified or these are modified by very close mimetic of the important structural element. These
- 25 elements preferably include the 4-, and 6-hydroxyl groups of the Gal β 4 residue in the trisaccharide and disaccharide epitopes. Also the positioning of the linkages between the ring structures is an important structural element. For a high affinity binding the acetamido group or acetamido mimicking group is preferred in the position corresponding to the acetamido group of the reducing end-GlcNAc of the
- 30 di- or trisaccharide epitopes. Acetamido group mimicking group may be another amide, such as alkylamido, arylamido, secondary amine, preferentially N-ethyl or N-methyl, O-acetyl, or O-alkyl for example O-ethyl or O-methyl. For high affinity binding amide derivatives from carboxylic acid group of the terminal uronic acid and analogues thereof are preferred. The activity of non-modified uronic acid is
- 35 considered to rise in lower pH.

The structural derivatives according to the invention are oligosaccharide sequences according to the invention modified chemically so that the binding to the *Helicobacter pylori* is retained or increased. According to the invention it is preferred to derivatize one or several of the hydroxyl or acetamido groups of the oligosaccharide sequences. The invention describes several positions of the molecules which could be changed when preparing the analogs or the derivatives. The hydroxyl or acetamido groups which tolerate at least certain modifications are indicated by R-groups in Formula 1.

10 Bulky or acidic substituents and other structures, such as monosaccharide residues, are not tolerated at least when linked in the position of the C2, C3 or C6 -hydroxyls of the Gal β 4GlcNAc and on C3-hydroxyl non-reducing terminal monosaccharide of the trisaccharide epitopes. Methods to produce oligosaccharide analogs for the binding of a lectin are well known. For example, numerous analogs of sialyl-Lewis x oligosaccharide has been produced, representing the active functional groups different scaffold, see page 12090 Sears and Wong 1996. Similarly analogs of heparin oligosaccharides has been produced by Sanofi corporation and sialic acid mimicking inhibitors such as Zanamivir and Tamiflu (Relenza) for the sialidase enzyme by numerous groups. Preferably the oligosaccharide analog is build on a molecule comprising at least one six- or five-membered ring structure, more preferably the analog contains at least two ring structures comprising 6 or 5 atoms. A preferred analogue type of the oligosaccharide comprise a terminal uronic acid amide or analogue linked to Gal β 4GlcNAc-saccharide mimicking structure.

25 Alternatively terminal uronic acid amide is 1-3-linked to Gal, which is linked to the GlcNAc mimicking structure. In mimicking structures monosaccharide rings may be replaced rings such as cyclohexane or cyclopentane, aromatic rings including benzene ring, heterocyclic ring structures may comprise beside oxygen for example nitrogen and sulphur atoms. To lock the active ring conformations the ring structures may be interconnected by tolerated linker groups. Typical mimetic structure may also comprise peptide analog-structures for the oligosaccharide sequence or part of it.

30

The effects of the active groups to binding activity are cumulative and lack of one

WO 02/056893

11

PCT/FI02/00043

group could be compensated by adding an active residue on the other side of the molecule. Molecular modelling, preferably by a computer can be used to produce analog structures for the *Helicobacter pylori* binding oligosaccharide sequences according to the invention. The results from the molecular modelling of several
5 oligosaccharide sequences are given in examples and the same or similar methods, besides NMR and X-ray crystallography methods, can be used to obtain structures for other oligosaccharide sequences according to the invention. To find analogs the oligosaccharide structures can be "docked" to the carbohydrate binding molecule(s) of *H.pylori*, most probably to lectins of the bacterium and possible additional
10 binding interactions can be searched.

It is also noted that the monovalent, oligovalent or polyvalent oligosaccharides can be activated to have higher activity towards the lectins by making derivative of the oligosaccharide by combinatorial chemistry. When the library is created by
15 substituting one or few residues in the oligosaccharide sequence, it can be considered as derivative library, alternatively when the library is created from the analogs of the oligosaccharide sequences described by the invention. A combinatorial chemistry library can be built on the oligosaccharide or its precursor or on glycoconjugates according to the invention. For example, oligosaccharides with variable reducing
20 end can be produced by so called carbohydrid technology

In a preferred embodiment a combinatorial chemistry library is conjugated to the *Helicobacter pylori* binding substances described by the invention. In a more preferred embodiment the library comprises at least 6 different molecules. Preferably the
25 combinatorial chemistry modifications are produced by different amides from carboxylic acid group on R₈ according to Formula 1. Group to be modified in R₈ may be also an aldehyde or amine or another type of reactive group. Such library is preferred for use of assaying microbial binding to the oligosaccharide sequences according to the invention. Aminoacids or collections of organic amides are commercially available, which substances
30 can be used for the synthesis of combinatorial library of uronic acid amides. A high affinity binder could be identified from the combinatorial library for example by using an inhibition assay, in which the library compounds are used to inhibit the bacterial binding to the glycolipids or glycoconjugates described by the invention. Structural analogs and derivatives

WO 02/056893

12

PCT/FI02/00043

preferred according to the invention can inhibit the binding of the *Helicobacter pylori* binding oligosaccharide sequences according to the invention to *Helicobacter pylori*.

Steric hindrance by the lipid part or the proximity of the silica surface probably limits the measurement of the epitope GlcNAc β 3Gal β 4Glc in current TLC-assay. Using the assay activity of this sequence could not be obtained in recent study of toxin A from *Clostridium difficile*, which specifically recognizes the same four trisaccharide epitopes described here for *Helicobacter pylori* (Teneberg *et al.*, 1996). However, the binding of Gal α 3Gal β 4Glc to the toxin A was demonstrated by others using a large polymeric spacer modified conjugate of the saccharide (Castagliuolo *et al.*, 1996). Also considering the contribution of the terminal monosaccharide to the binding indicates that Glc could be allowed at the reducing end of the epitope; in the non-active N-deacetylated form the positive charge of the free amine group is probably more destructive to the binding than the presence of the hydroxyl group. The trisaccharide epitopes with Glc at reducing end are considered as effective analogs of the *Helicobacter pylori* binding substance when present in oligovalent or more preferably in polyvalent form. One embodiment of the present invention is the saccharides with Glc at reducing end, which are used as free reducing saccharides with high concentration, preferably in the range 1 – 100 g/l, more preferably 1 – 20 g/l. It is realized that these saccharides may have minor activity in the concentration range 0,1 – 1 g/l.

In the following the *Helicobacter pylori* binding sequence is described as an oligosaccharide sequence. The oligosaccharide sequence defined here can be a part of a natural or synthetic glycoconjugate or a free oligosaccharide or a part of a free oligosaccharide. Such oligosaccharide sequences can be bonded to various monosaccharides or oligosaccharides or polysaccharides on polysaccharide chains, for example, if the saccharide sequence is expressed as part of a bacterial polysaccharide. Moreover, numerous natural modifications of monosaccharides are known as exemplified by O-acetyl or sulphated derivative of oligosaccharide sequences. The *Helicobacter pylori* binding substance defined here can comprise the oligosaccharide sequence described as a part of a natural or synthetic glycoconjugate or a corresponding free oligosaccharide or a part of a free oligosaccharide. The *Helicobacter pylori* binding substance can also comprise a mix of the *Helicobacter pylori* binding oligosaccharide sequences.

Several derivations of the receptor oligosaccharide sequence reduced the binding below the limit of detection in current assay, showing the specificity of the recognition. The binding data shows that if the said oligosaccharide sequences have GalNAc β 3 linked to Gal α 3Gal β 4GlcNAc (substituted sequence: GalNAc β 3Gal α 3Gal β 4GlcNAc), or Neu5Ac α 3 linked to GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc (substituted sequence:

WO 02/056893

13

PCT/FI02/00043

Neu5Ac α 3GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc) the compounds are not active. When the said oligosaccharide sequence is Gal β 4GlcNAc, it is not α 4-galactosylated (sequence is not Gal α 4Gal β 4GlcNAc), α 3-, or α 6-sialylated (sequence is not Neu5Ac α 3/6Gal β 4GlcNAc), α 2- or α 3-fucosylated [said oligosaccharide sequence is not Fuca2Gal β 4GlcNAc or Gal β 4(Fuca3)GlcNAc or Fuca2Gal β 4(Fuca3)GlcNAc, α 3-fucosylation referring to fucosylation of GlcNAc residues of lactosamine forming Lewis x, Gal β 4(Fuca3)GlcNAc]. Saccharides having structures where Gal β 3 is linked to GlcNAc β 3 (such as Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc/Glc) have different conformations in comparison to the *Helicobacter pylori* binding substances described herein and their binding specificities have been studied separately. The *Helicobacter pylori* binding substances may be part of a saccharide chain or a glycoconjugate or a mixture of glycoconjugates containing other known *Helicobacter* binding epitopes, with different saccharide sequences and conformations, such as Lewis b (Fuca2Gal β 3(Fuca4)GlcNAc) or Neu5Ac α 3Gal β 4Glc/GlcNAc. Using several binding substances together may be beneficial for therapy.

The *Helicobacter pylori* binding oligosaccharide sequences can be synthesized enzymatically by glycosyltransferases, or by transglycosylation catalyzed by glycosidase or transglycosidase enzymes (Ernst *et al.*, 2000). Specificities of these enzymes and the use of co-factors can be engineered. Specific modified enzymes can be used to obtain more effective synthesis, for example, glycosynthase is modified to do transglycosylation only. Organic synthesis of the saccharides and the conjugates described herein or compounds similar to these are known (Ernst *et al.*, 2000). Saccharide materials can be isolated from natural sources and modified chemically or enzymatically into the *Helicobacter pylori* binding compounds. Natural oligosaccharides can be isolated from milks produced by various ruminants. Transgenic organisms, such as cows or microbes, expressing glycosylating enzymes can be used for the production of saccharides.

The uronic acid monosaccharide residues described in the invention can be obtained by methods known in the art. For example, the hydroxyl of the 6-carbon of N-acetylglucosamine or N-acetylgalactosamines can be chemically oxidized to carboxylic acid. The oxidation can be done to a properly protected oligosaccharide or monosaccharide.

In a preferred embodiment a non-protected polymer or oligomer comprising hexoses, N-acetylhexosamines or hexosamines, wherein the linkage between the monosaccharides is not between carbon 6 atoms, is

WO 02/056893

14

PCT/FI02/00043

- 1) oxidized to corresponding polymer of uronic acid residues, or to polymer comprising monomers of 6-aldehydomonosaccharides
- 2) optionally derivatized from the carboxylic acid group or 6-aldehydo group, preferentially to an amide or an amine and
- 5 3) hydrolysed to the uronic acid monosaccharides or uronic acid derivative monosaccharides.

Methods to oxidize monosaccharide residues to uronic acids and to hydrolyse amine or uronic acid polymers chemically or enzymatically are well-known in the art. It is especially preferred to use the method to oligomers or polymers of cellulose, starch or other glucans with 1-2 or 1-3 or 1-4 linkages, chitin (GlcNAc polymer) or chitosan (GlcN polymer), which are commercially available in large scale or N-acetylgalactosamine/galactosamine polysaccharides (for example, ones known from a bacterial source) is oxidized to a corresponding 1-4-linked saccharide. This method can also be applied to galactan polymers. Derivatives of uronic acid can be produced also from natural polymers comprising uronic acids such as pectins or glucuronic acid containing bacterial polysaccharides including N-acetylheparin, hyaluronic and chondroitin type bacterial exopolysaccharides. This method involves

- 1) derivatization of the carboxylic acid groups of the polysaccharide, preferably by an amide bond and
- 20 2) hydrolysis of the polysaccharide to the uronic acid monosaccharides or uronic acid derivative monosaccharides.

Chemical and enzymatic methods are also known to oxidize primary alcohol on carbon 6 of the polysaccharide to aldehyde or to carboxylic acid. An aldehyde can be further derivatized, for example, to amine by reductive amination. Preferably terminal Gal or GalNAc is oxidized by a primary alcohol oxidizing enzyme-like galactose oxidase and can then be further derivatized, for example, by amines.

The uronic acid residues can be conjugated to disaccharides or oligosaccharides by standard methods of organic chemistry. Alternatively GlcA can be linked by a glucuronyl transferase transferring a GlcA from UDP-GlcA to terminal Lac(NAc).

WO 02/056893

15

PCT/FI02/00043

Monosaccharide derivatives mimicking N-acetylhexosamines could be produced from a polymer or an oligomer comprising hexosamines or other monosaccharides with free primary amine groups by method involving:

- 1) derivatization of the amine groups to a secondary or tertiary amine or amide
- 2) hydrolysing the polymer to corresponding monosaccharides.

Chitosan and oligosaccharides thereof are an example of an amine comprising polymer or oligomer.

- 10 In general the method to produce carboxylic acid containing, 6-aldehyde comprising, amine and/or amide comprising monosaccharide/monosaccharides involves following steps
 1. optionally introducing an carboxylic acid or 6-aldehyde group to a carbohydrate polymer wherein primary hydroxyl is available for modification
 - 15 2. derivatization of carboxylic acid groups or 6-aldehyde groups or primary amine groups of the polymer to secondary or tertiary amines or to amides, when step 1 is applied, step 2 is optional.
 3. hydrolysis of the polymer to corresponding monosaccharides.
- 20 The hydrolysis to monosaccharides may also be partial and produce useful disaccharide or oligosaccharide to produce analog substances. Preferably the hydrolysis produces at least 30 % of monosaccharides. Methods to produce the chemical steps are known in the art. For example oxidation of the polysaccharides to corresponding monoaccharides can be performed as described by Muzzarelli et al
- 25 1999 and 2002. These methods are preferred to the use of non-protected monosaccharides, because the protection or reactive reducing ends of the monosaccharides is avoided.

- In a preferred embodiment the oligosaccharide sequences comprising GlcA β 3Lac or
- 30 GlcA β 3LacNAc are effectively synthesised by transglycosylation using a specific glucuronidase such as glucuronidase from bovine liver. It was realized that the enzyme can site-specifically transfer from β 1-3 linkage to Gal β 4GlcNAc and Gal β 4Glc with unexpectedly high yields for a transglycosylation reaction. In general

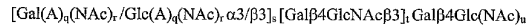
WO 02/056893

16

PCT/FI02/00043

such selectivity and yields close 30 % or more are not obtained in transglycosylation reactions.

One embodiment of the present invention is use of a substance or a receptor binding to *Helicobacter pylori* comprising the oligosaccharide sequence

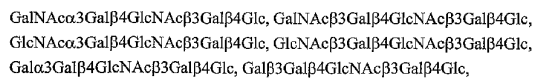
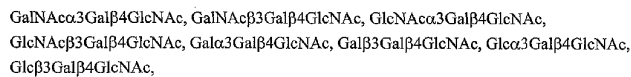
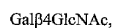


wherein q, r, s, t, and u are each independently 0 or 1,

so that when t = 0 and u = 0, then the oligosaccharide sequence is linked to a polyvalent carrier or present as a free oligosaccharide in high concentration, and analogs or derivatives of said oligosaccharide sequence having binding activity to *Helicobacter pylori* for the production of a composition having *Helicobacter pylori* binding or inhibiting activity.

A in the above oligosaccharide sequence indicates uronic acid of the monosaccharide residue or carbon 6 derivative of the monosaccharide residue, most preferably the derivative of carbon 6 is an amide of the uronic acid.

The following oligosaccharide sequences are among the preferable *Helicobacter pylori* binding substances for the uses of the invention



WO 02/056893

17

PCT/FI02/00043

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,

- 5 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,

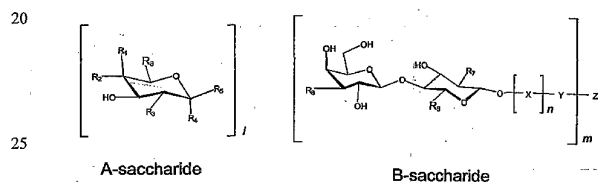
- Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc, and reducing-end polyvalent conjugates
10 thereof,

as well as GalNAc α 3Gal β 4Glc, GalNAc β 3Gal β 4Glc, GlcNAc α 3Gal β 4Glc,
GlcNAc β 3Gal β 4Glc, Gal α 3Gal β 4Glc, Gal β 3Gal β 4Glc, Glc α 3Gal β 4Glc, and
Glc β 3Gal β 4Glc.

15

Another embodiment of the invention is described in Formula 1.

Formula 1:



- Among the preferable *Helicobacter pylori* binding substances or mixtures of the
substances of the invention and for the uses of the invention are the oligosaccharide
30 structures according to Formula 1, wherein integers l, m, and n have values $m \geq 1$, l
and n are independently 0 or 1, and wherein R₁ is H and R₂ is OH or R₁ is OH and
R₂ is H or R₁ is H and R₂ is a monosaccharidyl- or oligosaccharidyl- group
preferably a beta glycosidically linked galactosyl group, R₃ is independently -OH or
acetamido (-NHCOCH₃) or an acetamido analogous group. R₇ is acetamido (-
35 NHCOCH₃) or an acetamido analogous group. When l = 1, R₄ is -H and R₅ is
oxygen linked to bond R₆ and forms a beta anomeric glycosidic linkage to
saccharide B or R₅ is -H and R₄ is oxygen linked to bond R₆ and forms an alpha

- anomeric glycosidic linkage to saccharide B, when $l = 0$ R₆ is -OH linked to B. X is monosaccharide or oligosaccharide residue, preferably X is lactosyl-, galactosyl-, poly-N-acetyl-lactosaminyl, or part of an O-glycan or an N-glycan oligosaccharide sequence; Y is a spacer group or a terminal conjugate such as a ceramide lipid moiety or a linkage to Z. Z is an oligovalent or a polyvalent carrier. The binding substance may also be an analog or derivative of said substance according to Formula 1 having binding activity with regard to *Helicobacter pylori*, e.g., the oxygen linkage (-O-) between position C1 of the B saccharide and saccharide residue X or spacer group Y can be replaced by carbon (-C-), nitrogen (-N-) or sulphur (-S-) linkage.
- In Formula 1 R₈ is preferably carboxylic acid amide, such as methylamide or ethylamide, hydroxymethyl (-CH₂-OH) or a carboxylic acid group or an ester thereof, such as methyl or ethyl ester. The carboxylic acid amide may comprise an alternative linkage to the polyvalent carrier Z comprising an amine such as chitosan or galactosamine polysaccharide or Z comprising a primary amine containing spacer, preferably a hydrophilic spacer. The structure in R₈ can be also a mimicking structure known in the art to ones described above. For example secondary or tertiary amines or amidated secondary amine can be used.
- In Formula 1 R₉ is preferably hydroxymethyl but it can be used for derivatisations as described for R₈.
- R₃ is hydroxyl, acetamido or acetamido group mimicking group, such as C₁₋₆ alkyl-amides, arylamido, secondary amine, preferentially N-ethyl or N-methyl, O-acetyl, or O-alkyl for example O-ethyl or O-methyl. R₇ is same as R₃ but more preferentially acetamido or acetamido mimicking group.
- R₂ may also comprise preferentially a six-membered ring structure mimicking Galβ4- terminal.
- The bacterium binding substances are preferably represented in clustered form such as by glycolipids on cell membranes, micelles, liposomes, or on solid phases such as TCL-plates used in the assays. The clustered representation with correct spacing creates high affinity binding.
- According to the invention it is also possible to use the *Helicobacter pylori* binding epitopes or naturally occurring, or a synthetically produced analogue or derivative

thereof having a similar or better binding activity with regard to *Helicobacter pylori*. It is also possible to use a substance containing the bacterium binding substance such as a receptor active ganglioside described in the invention or an analogue or derivative thereof having a similar or better binding activity with regard to

- 5 *Helicobacter pylori*. The bacterium binding substance may be a glycosidically linked terminal epitope of an oligosaccharide chain. Alternatively the bacterium binding epitope may be a branch of an oligosaccharide chain, preferably a poly lactosamine chain.
- 10 The *Helicobacter pylori* binding substance may be conjugated to an antibiotic substance, preferably a penicillin type antibiotic. The *Helicobacter pylori* binding substance targets the antibiotic to *Helicobacter pylori*. Such conjugate is beneficial in treatment because a lower amount of antibiotic is needed for treatment or therapy against *Helicobacter pylori*, which leads to lower side effect of the antibiotic. The
- 15 antibiotic part of the conjugate is aimed at killing or weaken the bacteria, but the conjugate may also have an antiadhesive effect as described below.

- The bacterium binding substances, preferably in oligovalent or clustered form, can be used to treat a disease or condition caused by the presence of the *Helicobacter*
- 20 *pylori*. This is done by using the *Helicobacter pylori* binding substances for anti-adhesion, i.e. to inhibit the binding of *Helicobacter pylori* to the receptor epitopes of the target cells or tissues. When the *Helicobacter pylori* binding substance or pharmaceutical composition is administered it will compete with receptor glycoconjugates on the target cells for the binding of the bacteria. Some or all of the
- 25 bacteria will then be bound to the *Helicobacter pylori* binding substance instead of the receptor on the target cells or tissues. The bacteria bound to the *Helicobacter pylori* binding substances are then removed from the patient (for example by the fluid flow in the gastrointestinal tract), resulting in reduced effects of the bacteria on the health of the patient. Preferably the substance used is a soluble composition
- 30 comprising the *Helicobacter pylori* binding substances. The substance can be attached to a carrier substance which is preferably not a protein. When using a carrier molecule several molecules of the *Helicobacter pylori* binding substance can be attached to one carrier and inhibitory efficiency is improved.

- 35 The target cells are primarily epithelial cells of the target tissue, especially the gastrointestinal tract, other potential target tissues are for example liver and pancreas. Glycosylation of the target tissue may change because of infection by a pathogen (Karlsson *et al.*, 2000). Target cells may also be malignant, transformed or

cancer/tumour cells in the target tissue. Transformed cells and tissues express altered types of glycosylation and may provide receptors to bacteria. Binding of lectins or saccharides (carbohydrate-carbohydrate interaction) to saccharides on glycoprotein or glycolipid receptors can activate cells, in case of cancer/malignant cells this may

5 be lead to growth or metastasis of the cancer. Several of the oligosaccharide epitopes described herein, such as GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc (Hu, J. *et al.*, 1994), Gal α 3Gal β 4GlcNAc (Castronovo *et al.*, 1989), and neutral and sialylated polylectosamines from malignant cells (Stroud *et al.*, 1996), have been reported to be cancer-associated or cancer antigens. Oligosaccharide chains containing

10 substances described herein have also been described from lymphocytes (Vivier *et al.*, 1993). *Helicobacter pylori* is associated with gastric lymphoma. The substances described herein can be used to prevent binding of *Helicobacter pylori* to premalignant or malignant cells and activation of cancer development or metastasis. Inhibition of the binding may cure gastric cancer, especially lymphoma. The

15 *Helicobacter pylori* binding oligosaccharide sequence has been reported in the structure GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6GalNAc from human gastric mucins. This mucin epitope and similar O-glycan glycoforms are most probably natural high affinity receptors for *Helicobacter pylori* in human stomach. This was also indicated by high affinity binding of an analogous sequence

20 GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6GlcNAc as neoglycolipid to *Helicobacter pylori* and that the sequence GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6Gal has also some binding activity towards *Helicobacter pylori* in the same assay. Therefore the preferred oligosaccharide sequences includes O-glycans and analogues of O-glycan sequences such as GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6GlcNAc/GalNAc/Gal,

25 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 and glycopeptides and glycopeptide analogs comprising the O-glycan sequences. Even sequences lacking the non-reducing end GlcNAc may have some activity. Based on this all the other *Helicobacter pylori* binding oligosaccharide sequences (OS) and

30 especially the trisaccharide epitopes are also especially preferred when linked from the reducing end to form structures OS β 6Gal(NAc) $_{0-1}$ or OS β 6Glc(NAc) $_{0-1}$ or OS β 6Gal(NAc) $_{0-1}$ α Ser/Thr or OS β 6Glc(NAc) $_{0-1}$ α Ser/Thr. The Ser or Thr-compounds or analogue thereof or the reducing oligosaccharides are also preferred

when linked to polyvalent carrier. The reducing oligosaccharides can be reductively linked to the polyvalent carrier.

- Target cells also includes blood cells, especially leukocytes. It is known that
- 5 *Helicobacter pylori* strains associated with peptic ulcer, as the strain mainly used here, stimulates an inflammatory response from granulocytes, even when the bacteria are nonopsonized (Rautelin *et al.*, 1994a,b). The initial event in the phagocytosis of the bacterium most likely involves specific lectin-like interactions resulting in the agglutination of the granulocytes (Ofek and Sharon, 1988).
- 10 Subsequent to the phagocytotic event oxidative burst reactions occur which may be of consequence for the pathogenesis of *Helicobacter pylori*-associated diseases (Babior, 1978). Several sialylated and non-acid glycosphingolipids having repeating N-acetylglucosamine units have been isolated and characterized from granulocytes (Fukuda *et al.*, 1985; Stroud *et al.*, 1996) and may thus act as potential receptors for
- 15 *Helicobacter pylori* on the white blood cell surface. Furthermore, also the X₂ glycosphingolipid has been isolated from the same source (Teneberg, S., unpublished). The present invention confirms the presence of receptor saccharides on human erythrocytes and granulocytes which can be recognized by an N-acetylglucosamine specific lectin and by a monoclonal antibody (X₂,
- 20 GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc-). The *Helicobacter pylori* binding substances can be useful to inhibit the binding of leukocytes to *Helicobacter pylori* and in prevention of the oxidative burst and/or inflammation following the activation of leukocytes.

- It is known that *Helicobacter pylori* can bind several kinds of oligosaccharide
- 25 sequences. Some of the binding by specific strains may represent more symbiotic interactions which do not lead to cancer or severe conditions. The present data about binding to cancer-type saccharide epitopes indicates that the *Helicobacter pylori* binding substance can prevent more pathologic interactions, in doing this it may leave some of the less pathogenic *Helicobacter pylori* bacteria/strains binding to
- 30 other receptor structures. Therefore total removal of the bacteria may not be necessary for the prevention of the diseases related to *Helicobacter pylori*. The less pathogenic bacteria may even have a probiotic effect in the prevention of more pathogenic strains of *Helicobacter pylori*.
- 35 It is also realized that *Helicobacter pylori* contains large polyglucosamine oligosaccharides on its surface which at least in some strains contains non-fucosylated epitopes which can be bound by the bacterium as described by the invention. The substance described herein can also prevent the binding between

Helicobacter pylori bacteria and that way inhibit bacteria for example in process of colonization.

According to the invention it is possible to incorporate the *Helicobacter pylori* binding substance, optionally with a carrier, in a pharmaceutical composition, which is suitable for the treatment of a condition due to the presence of *Helicobacter pylori* in a patient or to use the *Helicobacter pylori* binding substance in a method for treatment of such conditions. Examples of conditions treatable according to the invention are chronic superficial gastritis, gastric ulcer, duodenal ulcer, non-Hodgkin lymphoma in human stomach, gastric adenocarcinoma, and certain pancreatic, skin, liver, or heart diseases, sudden infant death syndrome, autoimmune diseases including autoimmune gastritis and pernicious anaemia and non-steroid anti-inflammatory drug (NSAID) related gastric disease, all, at least partially, caused by the *Helicobacter pylori* infection.

The pharmaceutical composition containing the *Helicobacter pylori* binding substance may also comprise other substances, such as an inert vehicle, or pharmaceutically acceptable carriers, preservatives etc, which are well known to persons skilled in the art. The *Helicobacter pylori* binding substance can be administered together with other drugs such as antibiotics used against *Helicobacter pylori*.

The *Helicobacter pylori* binding substance or pharmaceutical composition containing such substance may be administered in any suitable way, although an oral administration is preferred.

The term "treatment" used herein relates both to treatment in order to cure or alleviate a disease or a condition, and to treatment in order to prevent the development of a disease or a condition. The treatment may be either performed in a acute or in a chronic way.

The term "patient", as used herein, relates to any human or non-human mammal in need of treatment according to the invention.

It is also possible to use the *Helicobacter pylori* binding substance to identify one or more adhesins by screening for proteins or carbohydrates (by carbohydrate-carbohydrate interactions) that bind to the *Helicobacter pylori* binding substance. The carbohydrate binding protein may be a lectin or a carbohydrate binding enzyme.

The screening can be done for example by affinity chromatography or affinity cross linking methods (Ilver *et al.*, 1998).

- Furthermore, it is possible to use substances specifically binding or inactivating the *Helicobacter pylori* binding substances present on human tissues and thus prevent the binding of *Helicobacter pylori*. Examples of such substances include plant lectins such as *Erythrina cristagalli* and *Erythrina corallodendron* (Teneberg *et al.*, 1994). When used in humans, the binding substance should be suitable for such use such as a humanized antibody or a recombinant glycosidase of human origin which is non-immunogenic and capable of cleaving the terminal monosaccharide residue/residues from the *Helicobacter pylori* binding substances. However, in the gastrointestinal tract, many naturally occurring lectins and glycosidases originating for example from food are tolerated.
- Furthermore, it is possible to use the *Helicobacter pylori* binding substance as part of a nutritional composition including food- and feedstuff. It is preferred to use the *Helicobacter pylori* binding substance as a part of so called functional or functionalized food. The said functional food has a positive effect on the person's or animal's health by inhibiting or preventing the binding of *Helicobacter pylori* to target cells or tissues. The *Helicobacter pylori* binding substance can be a part of a defined food or functional food composition. The functional food can contain other acceptable food ingredients accepted by authorities such as Food and Drug Administration in the USA. The *Helicobacter pylori* binding substance can also be used as a nutritional additive, preferably as a food or a beverage additive to produce a functional food or a functional beverage. The food or food additive can also be produced by having, e.g., a domestic animal such as a cow or other animal produce the *Helicobacter pylori* binding substance in larger amounts naturally in its milk. This can be accomplished by having the animal overexpress suitable glycosyltransferases in its milk. A specific strain or species of a domestic animal can be chosen and bred for larger production of the *Helicobacter pylori* binding substance. The *Helicobacter pylori* binding substance for a nutritional composition or nutritional additive can also be produced by a micro-organisms such as a bacteria or a yeast.
- It is especially useful to have the *Helicobacter pylori* binding substance as part of a food for an infant, preferably as a part of an infant formula. Many infants are fed by special formulas in replacement of natural human milk. The formulas may lack the special lactose based oligosaccharides of human milk, especially the elongated ones

such as lacto-N-neotetraose, Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc, and its derivatives. The lacto-N-neotetraose and para-lacto-N-neohexaose (Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc) as well as Gal β 3Gal β 4Glc are known from human milk and can therefore be considered as safe additives or ingredients in an infant food. *Helicobacter pylori* is especially infective with regard to infants or

5 young children, and considering the diseases it may later cause it is reasonable to prevent the infection. *Helicobacter pylori* is also known to cause sudden infant death syndrome, but the strong antibiotic treatments used to eradicate the bacterium may be especially unsuitable for young children or infants.

10 Preferred concentrations for human milk oligosaccharides in functional food to be consumed (for example, in reconstituted infant formula) are similar to those present in natural human milk. It is noted that natural human milk contains numerous free oligosaccharides and glycoconjugates (which may be polyvalent) comprising the

15 oligosaccharide sequence(s) described by the invention, wherefore it is possible to use even higher than natural concentrations of single molecules to get stronger inhibitory effect against *Helicobacter pylori* without harmful side effects. Natural human milk contains lacto-N-neotetraose at least in range about 10 – 210 mg/l with individual variations (Nakhla *et al.*, 1999). Consequently, lacto-N-neotetraose is

20 preferably used in functional food in concentration range 0,01 – 10 g/l, more preferably 0,01 – 5 g/l, most preferably 0,1 – 1 g/l. When the free oligosaccharides described herein are trisaccharides or the disaccharide with sequence Gal β 4Glc at the reducing end, they are preferably consumed in concentrations 1 – 100 g/l, more preferably in the concentration range 1 – 20 g/l. Alternatively, the total concentration

25 of the saccharides used in functional food is the same or similar to the total concentration of natural human milk saccharides, which bind *Helicobacter pylori* like the substances described, or which contain the binding epitope/oligosaccharide sequence indicated in the invention. At least in one case human milk has been reported to contain Gal β 3Gal β 4Glc as a major neutral oligosaccharide with high

30 concentration (Charlwood *et al.*, 1999).

Furthermore, it is possible to use the *Helicobacter pylori* binding substance in the diagnosis of a condition caused by an *Helicobacter pylori* infection. Diagnostic uses also include the use of the *Helicobacter pylori* binding substance for typing of

35 *Helicobacter pylori*. When the substance is used for diagnosis or typing, it may be included in, e.g., a probe or a test stick, optionally constituting a part of a test kit. When this probe or test stick is brought into contact with a sample containing

Helicobacter pylori, the bacteria will bind the probe or test stick and can be thus removed from the sample and further analyzed.

5 The results also show that the non-reducing end terminal monosaccharide residue in the preferred trisaccharide sequences of the invention can contain a carboxylic acid group on the carbon 6 (terminal monosaccharide residue is a uronic acid, HexA or HexANAc, wherein Hex is Gal or Glc) or a derivative of the carbon 6 of the HexA(NAc) residue or a derivative of the carbon 6 of the corresponding Hex(NAc) residue. Such terminal residues includes preferably β 3-linked glucuronic acid and
10 more preferably 6-amides such as methylamide thereof. Therefore analogs and derivatives of the sequence can be produced by changing or derivatising the terminal 6-position of the trisaccharide epitopes.

Preferred *Helicobacter pylori* binding substances

15 The oligosaccharide sequences according to the invention were found to be unexpectedly effective binders when presented on thin layer surface. This method allows polyvalent presentation of the glycolipid sequences. The surprisingly high activity of the polyvalent presentation of the oligosaccharide sequences makes
20 polyvalency a preferred way to represent the oligosaccharide sequences of the invention.

The glycolipid structures are naturally presented in a polyvalent form on cellular membranes. This type of representation can be mimicked by the solid phase assay
25 described below or by making liposomes of glycolipids or neoglycolipids.

The present novel neoglycolipids produced by reductive amination of hydrophobic hexadecylaniline were able to provide effective presentation of the oligosaccharides. Most previously known neoglycolipid conjugates used for binding of bacteria have
30 contained a negatively charged groups such as phosphor ester or phosphadityl ethanolamine neoglycolipids. Problems of such compounds are negative charge of the substance and natural biological binding involving the phospholipid structure. Negatively charged molecules are known to be involved in numerous non-specific bindings with proteins and other biological substances. Moreover, many of these
35 structures are labile and can be enzymatically or chemically degraded. The present

invention is directed to the non-acidic conjugates of oligosaccharide sequences meaning that the oligosaccharide sequences are linked to non-acidic chemical structures. Preferably, the non-acidic conjugates are neutral meaning that the oligosaccharide sequences are linked to neutral, non-charged, chemical structures.

5 The preferred conjugates according to the invention are polyvalent substances.

In the previous art bioactive oligosaccharide sequences are often linked to carrier structures by reducing a part of the receptor active oligosaccharide structure. Hydrophobic spacers containing alkyl chains $(-\text{CH}_2-)_n$ and/or benzyl rings have been

10 used. However, hydrophobic structures are in general known to be involved in non-specific interactions with proteins and other bioactive molecules.

The neoglycolipid data of the examples below show that under the experimental conditions used in the assay the hexadecylaniline parts of the neoglycolipid compounds do not cause non-specific binding for the studied bacterium. In the neoglycolipids the hexadecylaniline part of the conjugate forms probably a lipid layer like structure and is not available for the binding. The invention shows that reducing a monosaccharide residue belonging to the binding epitope may destroy the binding. It was further realized that a reduced monosaccharide can be used as a

20 hydrophilic spacer to link a receptor epitope and a polyvalent presentation structure. According to the invention it is preferred to link the bioactive oligosaccharide via a hydrophilic spacer to a polyvalent or multivalent carrier molecule to form a polyvalent or oligovalent/multivalent structure. All polyvalent (comprising more than 10 oligosaccharide residues) and oligovalent/multivalent structures (comprising

25 2-10 oligosaccharide residues) are referred here as polyvalent structures, though depending on the application oligovalent/multivalent constructs can be more preferred than larger polyvalent structures. The hydrophilic spacer group comprises preferably at least one hydroxyl group. More preferably the spacer comprises at least two hydroxyl groups and most preferably the spacer comprises at least three

30 hydroxyl groups.

According to the invention the hydrophilic spacer group is preferably a flexible chain comprising one or several $-\text{CHOH}-$ groups and/or an amide side chain such as an acetamido $-\text{NHCOCH}_3$ or an alkylamido. The hydroxyl groups and/or the

acetamido group also protects the spacer from enzymatic hydrolysis in vivo. The term flexible means that the spacer comprises flexible bonds and do not form a ring structure without flexibility. A reduced monosaccharide residues such as ones formed by reductive amination in the present invention are examples of flexible hydrophilic spacers. The flexible hydrophilic spacer is optimal for avoiding non-specific binding of neoglycolipid or polyvalent conjugates. This is essential optimal activity in bioassays and for bioactivity of pharmaceuticals or functional foods, for example.

10 A general formula for a conjugate with a flexible hydrophilic linker has the following Formula 2:



15 wherein L₁ and L₂ are linking groups comprising independently oxygen, nitrogen, sulphur or carbon linkage atom or two linking atoms of the group forming linkages such as -O-, -S-, -CH₂-, -N-, -N(COCH₃)-, amide groups -CO-NH- or -NH-CO- or -N-N- (hydrazine derivative) or amino oxy-linkages -O-N- and -N-O-. L₁ is linkage from carbon 1 of the reducing end monosaccharide of X or when n = 0, L₁ replaces --
20 O- and links directly from the reducing end C1 of OS.

p₁, p₂, p₃, and p₄ are independently integers from 0-7, with the proviso that at least one of p₁, p₂, p₃, and p₄ is at least 1. CH_{1,2}OH in the branching term {CH_{1,2}OH}_{p1} means that the chain terminating group is CH₂OH and when the p₁ is more than 1
25 there is secondary alcohol groups -CHOH- linking the terminating group to the rest of the spacer. R is preferably acetyl group (-COCH₃) or R is an alternative linkage to Z and then L₂ is one or two atom chain terminating group, in another embodiment R is an analog forming group comprising C₁₋₄ acyl group (preferably hydrophilic such as hydroxy alkyl) comprising amido structure or H or C₁₋₄ alkyl forming an
30 amine. And m > 1 and Z is polyvalent carrier. OS and X are defined in Formula 1.

Preferred polyvalent structures comprising a flexible hydrophilic spacer according to formula 2 include *Helicobacter pylori* binding oligosaccharide sequence(OS) β1-3 linked to Galβ4Glc(red)-Z, and OSβ6GlcNAc(red)-Z and OSβ6GalNAc(red)-Z.,

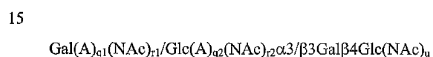
WO 02/056893

28

PCT/FI02/00043

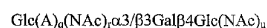
where "(red)" means the amine linkage structure formed by reductive amination from the reducing end monosaccharides and an amine group of the polyvalent carrier Z.

- 5 In the present invention the oligosaccharide group is preferably linked in a polyvalent or an oligovalent form to a carrier which is not a protein or peptide to avoid antigenicity and possible allergic reactions, preferably the backbone is a natural non-antigenic polysaccharide.
- 10 When the binding activities of glycolipids and neoglycolipids were compared, the sequences with Gal α 3Gal β - were found to have lower activity in the polyvalent presentation on thin layer plate. The sequences with terminal Gal β 4GlcNAc- sequence were also weaker. Therefore the optimal polyvalent non-acidic substance according to the invention comprises a terminal oligosaccharide sequence



wherein q1, q2, r1, r2, and u are each independently 0 or 1, with the proviso that when both q1 and r1 are 0, then the non-reducing end terminal
 20 monosaccharide residue is not Gal α . More preferably u=0 and most preferably the oligosaccharide sequence presented in polyvalent form is GalNAc/Glc(NAc) $_{r2}\alpha3/\beta3\text{Gal}\beta4\text{GlcNAc}$ wherein r2 is independently 0 or 1 and an analog or derivative thereof.

- 25 Following oligosaccharide sequences are especially preferred. These represent structures, which have not been described from human or animal tissues:



- with the proviso that when the oligosaccharide sequence contains $\beta3$ linkage, q and r
 30 are 1 or 0; or GalA(NAc) $_{r2}\alpha3/\beta3\text{Gal}\beta4\text{Glc}(\text{NAc})_u$.

The novelty of the above oligosaccharide sequences makes them especially preferred. There are no known glycosidases cleaving such sequences. Therefore, the

sequences are especially stable and preferred under biological conditions. The natural type of the sequences described by the invention can be cleaved by glycosidase enzymes which reduces usefulness of these especially when used in human and animal body. Glycosidase enzymes cleaving the sequences are known to
 5 be active in human gastrointestinal tract. Several glycosidases such as N-acetylhexosaminidases or galactosidases has been described as digestive enzyme and are also present in food stuffs.

It is realized that the novel substances according to the invention are also useful for
 10 inhibiting toxin A of *Clostridium difficile* S. Teneberg et al 1996. The binding profile of the toxin A with older substances is very similar to specificity of *Helicobacter pylori* described here. Thus, the *Helicobacter pylori* binding substances may be used for the treatment, for example, *Clostridium difficile* dependent diarrhea.

15 Glycolipid and carbohydrate nomenclature is according to recommendations by the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (Carbohydrate Res. 1998, 312, 167; Carbohydrate Res. 1997, 297, 1; Eur. J. Biochem. 1998, 257, 29).

It is assumed that Gal, Glc, GlcNAc, and Neu5Ac are of the D-configuration, Fuc of
 20 the L-configuration, and all the monosaccharide units in the pyranose form. Glucosamine is referred as GlcN or GlcNH₂ and galactosamine as GalN or GalNH₂. Glycosidic linkages are shown partly in shorter and partly in longer nomenclature, the linkages of the Neu5Ac-residues α 3 and α 6 mean the same as α 2-3 and α 2-6, respectively, and with other monosaccharide residues α 1-3, β 1-3, β 1-4, and β 1-6 can
 25 be shortened as α 3, β 3, β 4, and β 6, respectively. Lactosamine refers to N-acetylglucosamine, Gal β 4GlcNAc, and sialic acid is N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) or N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) or any other natural sialic acid. Term glycan means here broadly oligosaccharide or polysaccharide chains present in human or animal glycoconjugates, especially on glycolipids or glycoproteins. In the
 30 shorthand nomenclature for fatty acids and bases, the number before the colon refers to the carbon chain length and the number after the colon gives the total number of double bonds in the hydrocarbon chain. Abbreviation GSL refers to glycosphingolipid. Abbreviations or short names or symbols of glycosphingolipids are given in the text and in Tables 1 and 2. *Helicobacter pylori* refers also to the
 35 bacteria similar to *Helicobacter pylori*.

WO 02/056893

30

PCT/FI02/00043

In the present invention hex(NAc)-uronic acid and their derivatives and residues are indicated as follows: GlcA is glucuronic acid and derivatives of carbon 6 of glucose or glucuronic acid, GalA is galacturonic acid and derivatives of carbon 6 of galactose or galacturonic acid, GlcANAc is N-acetylglucuronic acid and derivatives of carbon 6 of N-acetylglucosamine or is N-acetylglucosamine uronic acid and GalANAc is N-acetylgalactosamine uronic acid and derivatives of carbon 6 of N-acetylgalactosamine or N-acetylgalactosamine uronic acid.

The expression "terminal oligosaccharide sequence" indicates that the oligosaccharide is not substituted to the non-reducing end terminal residue by another monosaccharide residue.

The term " α 3/ β 3" indicates that the adjacent residues in an oligosaccharide sequence can be either α 3- or β 3- linked to each other.

The present invention is further illustrated by the following examples, which in no way are intended to limit the scope of the invention:

EXAMPLES

20 Materials and methods

Materials - TLC silica gel 60 (aluminum) plates were from Merck (Darmstadt, Germany). All investigated glycosphingolipids were obtained in our laboratory. β -Galactosidase (*Escherichia coli*) was purchased from Boehringer Mannheim (Germany), Ham's F12 medium from Gibco (U.K.), 35 S-methionine from Amersham (U.K.) and FCS (fetal calf serum) was from Sera-Lab (England). β 4-Galactosidase (*Streptococcus pneumoniae*), β -N-acetylhexosaminidase (*Streptococcus pneumoniae*) and sialidase (*Arthrobacter ureafaciens*) were from Oxford GlycoSystems (Abington, U.K.). The clinical isolates of *Helicobacter pylori* (strains 002 and 032) obtained from patients with gastritis and duodenal ulcer, respectively, were a generous gift from Dr. D. Danielsson, Örebro Medical Center, Sweden. Type strain 17875 was from Culture Collection, University of Göteborg (CCUG).

Glycosphingolipids. The pure glycosphingolipids of the experiment shown in Figs. 7A and 7B were prepared from total acid or non-acid fractions from the sources listed in Table 2 as described in (Karlsson, 1987). In general, individual glycosphingolipids were obtained by acetylation (Handa, 1963) of the total glycosphingolipid fractions and separated by repeated silicic acid column chromatography, and subsequently characterized structurally by mass spectrometry (Samuelsson *et al.*, 1990), NMR (Falk *et al.*, 1979a,b,c; Koerner Jr *et al.*, 1983)

and degradative procedures (Yang and Hakomori, 1971; Stellner *et al.*, 1973). Glycolipids derived from rabbit thymus are described below.

Purification of glycolipids. Acid glycosphingolipids were isolated from 1000 g acetone powder of rabbit thymus (Pel-Freeze Biological Inc., North Arkansas, Ark. US). The acetone powder was extracted in a Soxhlet apparatus with chloroform/methanol 2/1 (vol/vol unless otherwise stated) for 24 h followed by chloroform/methanol/water 8/1/1 for 36 h. The extracted lipids, 240 g, were subjected to Folch separation (Folch *et al.*, 1957) and the collected hydrophilic phase to ion-exchange gel chromatography on DE23 cellulose (DEAE, Whatman, Maidstone, UK). These isolation steps gave 2.5 g of acid glycosphingolipids. The gangliosides were separated according to number of sialic acids by ion-exchange gel with open-tubular chromatography on a glass column (50 mm i.d.). The column was connected to an HPLC pump producing a concave gradient (pre-programmed gradient no 4, System Gold Chromatographic Software, Beckman Instruments Inc., CA, USA) starting with methanol and ending with 0.5 M CH₃COONH₄ in methanol. The flow rate was 4 ml/min and 200 fractions with 8 ml in each were collected. 300-400 mg of ganglioside mixture was applied at a time to 500 g of DEAE Sepharose, (CL6, Pharmacia, Uppsala, Sweden, bed height approx. 130 mm). The monosialylated gangliosides were further separated by HPLC on a silica column, 300 mm x 22 mm i.d., 120 Å pore size, 10 µm particle size (SH-044-10, Yamamura Ltd., Kyoto, Japan). Approximately 150 mg of monosialylated gangliosides were applied at time and a straight eluting gradient was used (chloroform/methanol/water from 60/35/8 to 10/103, 4 ml/min, 240 fractions).

Partial acid hydrolysis - Desialylation of gangliosides was performed in 1.5% CH₃COOH in water at 100°C after which the material was neutralized with NaOH and dried under nitrogen. For partial degradation of the carbohydrate backbone the glycolipid was hydrolyzed in 0.5M HCl for 7 min in a boiling water bath. The material was then neutralized and partitioned in C/M/H₂O, (8:4:3, v/v)². The lower phase was collected, evaporated under nitrogen and the recovered glycolipids were used for analysis.

Preparation of pentaglycosylceramide from hexaglycosylceramide by enzyme hydrolysis - Hexaglycosylceramide (structure 2, Table 1) obtained from heptaglycosylceramide (4 mg, from rabbit thymus) (structure 1, Table 1) by acidic desialylation (see above) was redissolved in C/M (2:1) and applied to a small silica gel column (0.4 x 5 cm). The column was eluted with C/M/H₂O (60:35:8, v/v). Fractions of about 0.2 ml were collected and tested for the presence of carbohydrates. The recovered hexaglycosylceramide (2.0 mg) was dissolved in 1.5 ml of 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.2, containing sodium taurodeoxycholate

(1.5 mg/ml), MgCl_2 (0.001M) and β -galactosidase (*E. coli*, 500 U when assayed with 2-nitrophenyl- β -D-galactoside as a substrate), and the sample was incubated overnight at 37°C. The material was next partitioned in C/M/ H_2O (10:5:3) and the glycolipid contained in the lower phase was purified using silica gel chromatography (0.4 x 5 cm columns) as described above for hexaglycosylceramide. To remove all contaminating detergent the chromatography was repeated twice. The final recovery of pentaglycosylceramide was 0.7 mg.

Endoglycoceramidase digestion of glycolipids (Ito and Yamagata, 1989) - The reaction mixture contained 200 μg of glycolipid, 80 μg of sodium taurodeoxycholate and 0.8 mU of enzyme in 160 μl of 50 mM acetate buffer, pH 6.0. The sample was incubated overnight at 37°C, after which water (140 μl) and C/M, (2:1, by vol., 1500 μl) were added, and the sample was shaken and centrifuged. The upper phase was dried under nitrogen, redissolved in a small volume of water and desalted on a Sephadex G-25 column (0.4x10 cm), which had been equilibrated in H_2O , and eluted with water. Fractions of about 0.1 ml were collected and tested for the presence of sugars.

Permethylation of saccharides - Permethylation was performed according to Larson *et al.*, 1987. Sodium hydroxide was added to samples before methyl iodide as suggested by Needs and Selvendran 1993. In some experiments the saccharides were reduced with NaBH_4 before methylation. In this case the amount of methyl iodide was increased to a final proportion of DMSO (dimethylsulfoxide)/methyl iodide of 1:1 (Hansson and Karlsson, 1990).

Gas chromatography/mass spectrometry - Gas chromatography was carried out on a Hewlett-Packard 5890A Series II gas chromatograph equipped with an on-column injector and a flame ionization detector. Permethylated oligosaccharides were analyzed on a fused silica capillary column (Fluka, 11m x 0.25 mm i.d.) coated with cross-linked PS264 (film thickness 0.03 μm). The sample was dissolved in ethyl acetate and injected on-column at 80°C. The temperature was programmed from 80°C to 390°C at a rate of 10°C/min with a 2 min hold at the upper temperature. Gas chromatography-mass spectrometry of the permethylated oligosaccharides was performed on a Hewlett-Packard 5890A Series II gas chromatograph interfaced to a JEOL SX-102 mass spectrometer (Hansson and Karlsson, 1990). FAB-MS analyses were performed on a JEOL SX-102 mass spectrometer. Negative FAB spectra were produced using Xe atom bombardment (10 kV) and triethanolamine as matrix.

NMR spectroscopy - Proton NMR spectra were recorded at 11.75 T on a Jeol Alpha 500 (Jeol, Tokyo, Japan) spectrometer. Samples were deuterium exchanged before analysis and

spectra were then recorded at 30 °C with a digital resolution of 0.35 Hz/pt. Chemical shifts are given relative to TMS (tetramethylsilane) using the internal solvent signal.

Analytical enzymatic tests - Oxford GlycoSystems enzymatic tests were

- performed according to the manufacturer's recommendations except that Triton X-
 5 100 was added to each incubation mixture to final concentration of 0.3%. When a mixture of sialidase and β 4-galactosidase were taken for digestion the incubation buffer from β 4-galactosidase kit was used. If β -hexosaminidase was present in the digestion mixture the buffer from this enzyme kit was employed. The enzyme concentrations in the incubation mixtures were: 80 mU/ml for Hex β 4HexNAc-galactosidase (*S. pneumoniae*), 120 mU/ml for β -N-Acetylhexosaminidase (*S. pneumoniae*) and 1 U/ml for sialidase (*Arthrobacter ureafaciens*). The concentration of substrate was about 20 μ M. Enzymatic digestion was performed overnight at 37°C. After digestion the samples were dried and desalted using small columns of Sephadex G-25 (Wells and Dittmer, 1963), 0.3 g, equilibrated in C/M/H₂O,
 10 (60:30:4.5, by vol.). Each sample was applied on the column in 2 ml of the same solvent and eluted with 2.5 ml of C/M/H₂O, (60:30:4.5) and 2.5 ml of C/M, (2:1).

Application and washing solutions were collected and evaporated under nitrogen.

Other analytical methods - Hexose was determined according to Dubois *et al.* 1956.

- 20 *De-N-acylation*. Conversion of the acetamido moiety of GlcNAc/GalNAc residues into an amine was accomplished by treating various glycosphingolipids with anhydrous hydrazine as described previously (Ångström *et al.*, 1998).

- Bacterial growth*. The *Helicobacter pylori* strains were stored at -80 °C in tryptic soy broth containing 15% glycerol (by volume). The bacteria were initially cultured on GAB-CAMP agar (Soltész *et al.*, 1988) under humid (98%) microaerophilic conditions (O₂: 5-7%, CO₂: 8-10% and N₂: 83-87%) at 37 °C for 48-72 h. For labeling colonies were inoculated on GAB-CAMP agar, except for the results presented in Figs.1A and 1B where Brucella agar (Difco, Detroit, MI) was used instead, and 50 μ Ci ³⁵S-methionine (Amersham, U.K.), diluted in 0.5 ml phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.3, was sprinkled over the plates.
 30 After incubation for 12-24 h at 37 °C under microaerophilic conditions, the cells were scraped off, washed three times with PBS, and resuspended to 1x10⁸ CFU/ml in PBS. Alternatively, colonies were inoculated (1x10⁵ CFU/ml) in Ham's F12 (Gibco BRL, U.K.), supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Sera-Lab). For labeling, 50 μ Ci ³⁵S-methionine per 10 ml medium was added, and incubated with shaking under
 35 microaerophilic conditions for 24 h. Bacterial cells were harvested by centrifugation, and purity of the cultures and a low content of coccoid forms was ensured by phase-contrast microscopy. After two washes with PBS, the cells were resuspended to 1x10⁸ CFU/ml in

PBS. Both labeling procedures resulted in suspensions with specific activities of approximately 1 cpm per 100 *Helicobacter pylori* organisms.

TLC bacterial overlay assay. Thin-layer chromatography was performed on glass- or aluminum-backed silica gel 60 HPTLC plates (Merck, Darmstadt, Germany) using
 5 chloroform/methanol/water 60:35:8 (by volume) as solvent system. Chemical detection was accomplished by anisaldehyde staining (Waldi, 1962). The bacterial overlay assay was performed as described previously (Hansson *et al.*, 1985). Glycosphingolipids (1-4 µg/lane, or as indicated in the figure legend) were chromatographed on aluminum-backed silica gel plates and thereafter treated with 0.3-0.5% polyisobutylmethacrylate in diethylether/*n*-
 10 hexane 1:3 (by volume) for 1 min, dried and subsequently soaked in PBS containing 2% bovine serum albumin and 0.1% Tween 20 for 2 h. A suspension of radio-labeled bacteria (diluted in PBS to 1×10^8 CFU/ml and $1-5 \times 10^6$ cpm/ml) was sprinkled over the chromatograms and incubated for 2 h followed by repeated rinsings with PBS. After drying the chromatograms were exposed to XAR-5 X-ray films (Eastman Kodak Co., Rochester,
 15 NY, USA) for 12-72 h.

TLC protein overlay assays. 125 I-labeling of the monoclonal antibody TH2 and the lectin from *Erythrina cristagalli* (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) was performed by the Iodogen method (Aggarwal *et al.*, 1985), yielding an average of 2×10^3 cpm/µg. The overlay procedure was the same as described above for bacteria except Tween was not used
 20 and that 125 I-labeled protein, diluted to approximately 2×10^3 cpm/µl with PBS containing 2% bovine serum albumin, was used instead of a bacterial suspension.

Molecular modeling. Minimum energy conformers of the glycosphingolipids listed in Table 1 were calculated within the Biograf molecular modeling program (Molecular Simulations Inc.) using the Dreiding-II force field (Mayo *et al.*, 1990) on a Silicon Graphics
 25 4D/35TG workstation. Partial atomic charges were generated using the charge equilibration method (Rappé and Goddard III, 1991), and a distance dependent dielectric constant ($\epsilon=3.5r$) was used for the Coulomb interactions. In addition a special hydrogen bonding term was used in which the maximal interaction (D_{hb}) was set to -4 kcal mol⁻¹. The dihedral angles of the Glcβ1Cer linkage are defined as follows: $\Phi = \text{H}-1 - \text{C}-1 - \text{O}-1 - \text{C}-1$, $\Psi = \text{C}-1 - \text{O}-1 - \text{C}-1 - \text{C}-2$ and $\theta = \text{O}-1 - \text{C}-1 - \text{C}-2 - \text{C}-3$ starting from the glucose end (see Nyholm and
 30 Pascher, 1993).

The oligosaccharide GlcNAcβ3Galβ4GlcNAc was synthesised from Galβ4GlcNAc (Sigma, St. Louis, USA) and GlcNAcβ3Galβ4GlcNAcβ6GlcNAc was synthesised from
 35 Galβ4GlcNAcβ6GlcNAc by incubating the acceptor saccharide with human serum β3-N-acetylglucosaminyltransferase and UDP-GlcNAc in presence of 8 mM MnCl₂ and 0.2 mg/ml ATP at 37 degree of Celsius for 5 days in 50 mM TRIS-HCl pH 7.5. Galβ4GlcNAcβ6GlcNAc was obtained from GlcNAcβ6GlcNAc (Sigma, St Louis, USA) by

WO 02/056893

35

PCT/FI02/00043

incubating the disaccharide with β 4Galactosyltransferase (bovine milk, Calbiochem., CA, USA) and UDP-Gal in presence of 20 mM $MnCl_2$ for several hours in 50 mM MOPS-NaOH pH 7.4. Hexasaccharide Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc (1 mg, from Dextra labs, UK)) was treated with 400 mU β 3/6-galactosidase (Calbiochem., CA, USA) overnight as suggested by the producer. The oligosaccharides were purified chromatographically and their purity was assessed by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR.

Gal α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc was from Dextra laboratories, Reading, UK. The glycolipid GlcA β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan) was reduced to Glc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer as described in Lanne et al 1995. The glycolipid derivative Glc(A-methylamide) β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer was produced by amidatation of the carboxylic acid group of the glucuronic acid of GlcA β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer as described in Lanne et al 1995.

RESULTS

The heptaglycosylceramide NeuG α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer was purified from rabbit thymus by HPLC as described above. The structure was characterized by NMR and mass spectrometry (data not shown). The heptasaccharide ganglioside was bound by most *Helicobacter pylori* isolates (about 60) tested in the laboratory of the inventors.

In order to detect possible minor isomeric components in the heptaglycosylceramide material, the ganglioside was desialylated, treated with endoglycoceramidase after which the released oligosaccharides were permethylated and analyzed by gas chromatography and EI/MS, (Figs. 1A and 1B). Two saccharides were identified in the six-sugar region which showed the expected carbohydrate sequence of Hex-HexNAc-Hex-HexNAc-Hex-Hex, as confirmed by fragment ions at m/z 219, 464, 668, 913 and 1118. When the carbohydrates were converted to alditols (by reduction with $NaBH_4$) before methylation distinct fragment ions at m/z 235, 684 and 1133 were found in addition to the previously listed ions (data not shown). The predominant saccharide, which accounted for more than 90% of the total material (peak B, Figs. 1A and 1B), was characterized by a strong fragment ion at m/z 182 confirming the presence of β 4GlcNAc (neolacto series, type 2 carbohydrate chain). The minor saccharide (peak A, Figs. 1A and 1B) gave a spectrum typical for type-1 chain (lacto series) with a very weak fragment ion at m/z 182 and a strong fragment ion at m/z 228. The preparation also contained traces of other sugar-positive substances which might be 4- and 5-sugar-containing saccharides of the same series. Fucose-containing saccharides were not found in the mixture. The purity of the asialoganglioside was tested also by FAB/MS and NMR

spectroscopy. The negative FAB/MS of the hexaglycosylceramide (Fig. 2A) confirmed the predicted carbohydrate sequence and showed that the ceramides were composed mainly of sphingosine and C16:0 fatty acid (m/z 536.5). The NMR spectrum obtained of hexaglycosylceramide (Fig. 3A) showed four major doublets in the anomeric region with β -couplings ($J \sim 8$ Hz). They had an intensity ratio of 2:2:1:1. The signals at 4.655 ppm (GlcNAc β 3), 4.256 ppm (internal Gal β 4), 4.203 ppm (terminal Gal β 4) and 4.166 ppm (Glc β) were in agreement with results previously published for nLcOse₆-Cer (Clausen *et al.*, 1986). There was also a small doublet at 4.804 ppm, which together with a small methyl signal at 1.81 ppm (seen as a shoulder on the large type 2 methyl resonance) indicated the presence of a small fraction of type 1 chain. Due to the overlap in the 4.15 to 4.25 ppm region the position and distribution of this type 1 linkage could not be determined. The total amount of type 1 linkage was roughly 10%. As the amount of type 1 chain in the pentaglycosylceramide obtained from hexaglycosylceramide by β -galactosidase digestion also was approximately 5% (Fig 3B) it seems likely that the type 1 linkage was evenly distributed between the internal and external parts of the saccharide chain, i.e. 5% of the glycolipids could be type1-type1.

To find out if the binding activity of the glycolipid was associated with the predominant neolacto (type 2) structure the asialo-glycolipid was treated with β 4-galactosidase and β -hexosaminidase, and the products were investigated by TLC and by overlay tests (Figs. 4A, 4B and 4C). As expected, the first enzyme converted the hexaglycosylceramide to a pentaglycosylceramide (4A, lane 3) and the mixture of the two enzymes degraded the material to lactosylceramide (4B, lane 6). According to visual evaluation of the TLC plates both reactions were complete or almost complete. The same results were obtained for sialidase- and acid-treated material. The β 4-galactosidase degradation of hexaglycosylceramide was accompanied by disappearance of the *Helicobacter pylori* binding activity in the region of this glycolipid on TLC plates with simultaneous appearance of a strong activity in the region of pentaglycosylceramides (4C, lane 3). Further enzymatic degradation of the pentaglycosylceramide resulted in the disappearance of binding activity in this region. Appearance of binding activity in the four-sugar region was not observed. The sensitivity of the chemical staining of TLC plates is too low to allow trace substances to be observed.

In a separate experiment the parent ganglioside was subjected to partial acid degradation and the released glycolipids were investigated for *Helicobacter pylori* binding activity. Figs. 5A and 5B show TLC of the hydrolyzate (5A) and the corresponding autoradiogram (5B) after overlay of the hydrolyzate with ³⁵S-labeled *Helicobacter pylori*. Glycolipids located in the regions of hexa-, penta-, tetra- and

WO 02/056893

37

PCT/FI02/00043

diglycosylceramides displayed binding activity, whereas triglycosylceramide was inactive.

The binding of the hexa-, penta-, tetraglycosylceramides were similar when tested with at least three *Helicobacter pylori* strains (17875, 002 and 032).

- 5 The strongly binding pentaglycosylceramide produced after detachment of the terminal galactose from hexaglycosylceramide and purification by silica gel chromatography was investigated in greater detail. The negative ion FAB/MS spectrum of this glycolipid confirmed a carbohydrate sequence of HexNAc-Hex-HexNAc-Hex-Hex- and showed the same ceramide composition as the
- 10 hexaglycosylceramide (Fig 2B). The proton NMR spectrum obtained for the pentaglycosylceramide (Fig. 3B) had five major β -doublets in the anomeric region: at 4.653 ppm (internal GlcNAc β 3), 4.615 ppm (terminal GlcNAc β 3), 4.261 ppm (double intensity, internal Gal β 4), 4.166 (Glc β), consistent with
- 15 GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer and also in perfect agreement with the six sugar compound having been stripped of its terminal Gal β . There is also a small β -doublet at 4.787 ppm corresponding to 3-substituted GlcNAc β (type 1 chain). The expected methyl signal was also seen as a shoulder on a much larger methyl signal at 1.82 ppm, but overlap prohibits quantitation of these signals. From the integral of the anomeric proton it can be calculated that 6% of the glycolipid contained type 1
- 20 chain. Thus the relative proportion of type 2 and type 1 carbohydrate chains was similar to that of the six sugar glycolipid. The two spots visible on TLC plates both in the hexa- and pentaglycosyl fractions reflected a ceramide heterogeneity rather than differences in sugar chain composition as judged by their susceptibility to β 4-galactosidase. The upper penta-region spot appeared both after unselective
- 25 hydrolysis of the asialoganglioside and selective splitting of 4-linked galactose from the asialoprotein. Furthermore, when hexaglycosylceramide with a high content of the upper chromatographic subfraction was degraded by β 4-galactosidase and β -hexosaminidase the resulting lactosylceramide gave two distinct chromatographic bands. Chromatographically homogenous hexaglycosylceramide resulted in only one
- 30 lactosylceramide band. Both upper and lower subfractions in the penta-region were highly active as shown by overlay tests.

- Glycosphingolipids of the neolacto series with 6, 5 and 4 sugars (structures 2, 4 and 5, Table I) were examined by semi-quantitative tests using the TLC overlay
- 35 procedure. The glycolipids were applied on silica gel plates in series of dilutions and their binding to *Helicobacter pylori* was evaluated visually after overlay with labeled bacteria and autoradiography (Figs. 6A and 6B). The most active species was pentaglycosylceramide, which gave a positive response on TLC plates in amounts down to 0.039 nmol/spot (mean value calculated from 7 experiments, standard

WO 02/056893

38

PCT/FI02/00043

deviation $\delta_{N-1} = 0.016$ nmol). Hexa- and tetraglycosylceramides bound *Helicobacter pylori* in amounts of ca 0.2 and 0.3 nmoles of glycolipid/spot, respectively.

The binding of *Helicobacter pylori* to higher glycolipids of the investigated series was highly reproducible. The binding frequency for *Helicobacter pylori*, strain 032, recorded for pentaglycosyl- and hexaglycosylceramides was ~90% (total number of plates was about 100).

Binding assays revealing the isoreceptors and specificity of the binding (Figs. 7A and 7B.)

In addition to the seven-sugar glycosphingolipid from rabbit thymus having a neolacto core, NeuGc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer, and tetra- to hexaglycosylceramides derived thereof, the binding specificity could involve other glycolipids from the neolacto series.

The binding of *Helicobacter pylori* (strain 032) to purified glycosphingolipids separated on thin-layer plates using the overlay assay is shown in Figs. 7A and 7B. These results together with those from an additional number of purified glycosphingolipids are summarized in Table 2. The binding of *Helicobacter pylori* to neolactotetraosylceramide (lane 1) and the five- and six-sugar glycosphingolipids (lanes 5 and 6) derived from NeuGc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer is identical to results above. Unexpectedly, however, binding was also found for GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer (x_2 glycosphingolipid, lane 7) and the defucosylated A6-2 glycosphingolipid GalNAc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer (no. 12, Table 2). Together with the finding that Gal α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer (B5 glycosphingolipid, lane 2) also is binding-active, these results suggest the possibility of cross-binding rather than the presence of multiple adhesins specific for each of these glycosphingolipids (see below). Furthermore, the only extension of the different five-sugar-containing glycosphingolipids just mentioned that was tolerated by the bacterial adhesin was Gal β 4 to the thymus-derived GlcNAc β 3-terminated compound (lane 6). Other elongated structures, as the NeuAc- x_2 (lane 8) and GalNAc β 3-B5 (no. 25, Table 2), were thus all found to be non-binding. It may be further noticed that the acetamido group of the internal GlcNAc β 3 in B5 is essential for binding since de-*N*-acylation of this moiety by treatment with anhydrous hydrazine leads to complete loss of binding (lane 3) as is the case also when neolactotetraosylceramide is similarly treated (no. 6, Table 2).

Cross-binding of five-sugar glycosphingolipids. In order to understand the binding characteristics of the different neolacto-based glycosphingolipid molecules used in this study the conformational preferences of active as well as inactive structures were investigated by molecular modeling. Figs. 8A, 8B, 8C and 8D show the x_2 glycosphingolipid together with three other sequences: defucosylated A6-2, B5 and de-*N*-acylated B5, which, except for the chemically modified B5 structure, show similar binding strengths. Also the five-sugar

glycosphingolipid from rabbit thymus (see Fig. 9A) should be included in this comparison since this structure differs only at position four of the terminal residue compared with the x_2 structure and is equally active. The four active structures all have neolacto cores which thus are terminated by GalNAc β 3, GalNAc α 3, Gal α 3 and GlcNAc β 3, respectively. The minimum energy conformers of these structures were generated as described previously (Teneberg *et al.*, 1996). Other minimum energy structures given in Table 2 are based on earlier results found in the literature (Bock *et al.*, 1985; Meyer, 1990; Nyholm *et al.*, 1989). Regarding sialic acid-terminated glycosphingolipids the *synclinal* conformation was adopted for the glycosidic dihedral angles of α 3-linked residues as seen in, e.g., Fig. 9C, but the effect of other conformations (Siebert *et al.*, 1992), in particular the *anticlinal* one, was also tested. Also for the α 6-linked variant several low energy conformers (Breg *et al.*, 1989) were generated for the same purpose.

As mentioned above, the fact that there are four binding-active five-sugar glycosphingolipids (nos. 10-13, Table 2), all having a neolacto core, suggests that cross-binding to the same adhesin site may be the reason behind these observations. At first glance, however, it might seem surprising that the B5 glycosphingolipid, which differs at the terminal position in comparison with the five-sugar compound obtained from rabbit thymus, the former having a Gal α 3 and the latter a GlcNAc β 3, is equally active and should be included within the binding specificity of the neolacto series. Despite the fact that these two terminal saccharides differ also in their anomeric linkage it is seen (Figs. 8C and 9A) that the minimum energy structures topographically are very similar, the differences being that Gal α 3 lacks an acetamido group, has the 4-OH in the axial position and its ring plane raised slightly above the corresponding plane in the five-sugar compound. However, neither the 4-OH position nor the absence/presence of an acetamido group appear to be crucial for binding to occur, since also the x_2 and defucosylated A6-2 glycosphingolipids (Fig. 8A, B), which are terminated by GalNAc β 3 and GalNAc α 3, respectively, have similar affinities for the *Helicobacter pylori* adhesin. In the light of these findings also Gal β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer, which has been isolated from human erythrocytes (Stellner and Hakomori, 1974), would be expected to bind the bacterial adhesin. In the light of the rules of binding also three other terminal monosaccharides in *Helicobacter pylori* binding epitopes are possible trisaccharide binding epitopes, namely GlcNAc α 3Gal β 4GlcNAc, Glc β 3Gal β 4GlcNAc and Glc α 3Gal β 4GlcNAc. Such compounds are not known from human tissues so far, but could rather represent analogues of the natural receptor. Neither the Gal β 3Gal β 4GlcNAc-glycolipid nor the three analogs were unfortunately available for testing.

The neolacto seven-sugar compound, NeuGca3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer, was also subjected to molecular modeling. Fig 10 shows two different projections of the

WO 02/056893

40

PCT/FI02/00043

minimum energy structure with the Glc β Cer linkage in an extended conformation. The sialic acid was given the *syn clinal* conformation but the *anti* conformer is also likely in unbranched structures (Siebert *et al.*, 1992). The sialic acid appears to have little influence on the binding activity towards *Helicobacter pylori* as compared with the six-sugar compound, 9B. Comparison of the first projection with Figs. 9A and 9B suggests that the same binding epitope is also available in the seven-sugar structure.

Delineation of the neolacto binding epitope. The relative binding strength of the structures obtained by chemical and enzymatic degradation of the rabbit thymus seven-sugar compound (nos. 1, 5, 10, and 21, Table 2) suggest that the three-sugar sequence GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3 may constitute the minimal binding sequence. Thus, in the six-sugar compound an inhibitory effect from the terminal Gal β 4 is expected, whereas for neolactotetraosylceramide lack of a terminal GlcNAc β 3 reduces the binding strength since only two out of three sugars in the epitope are present. The essentiality of the internal GlcNAc β 3 is clearly shown by the loss of bacterial binding both to neolactotetraosylceramide and B5 following de-*N*-acylation of the acetamido group to an amine (nos. 6 and 14, Table 2). This non-binding may occur either by loss of a favorable interaction between the adhesin and the acetamido moiety and/or altered conformational preferences of these glycosphingolipids. However, it is difficult to envision a situation where an altered orientation of the internal Gal β 4 would sterically hinder access to the binding epitope. Thus, having established that the minimal binding sequence must encompass the GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3 sequence it is now easy to rationalize the absence of binding for P₁, H5-2 and the two sialylparagloboside structures (nos. 15, 18-20, Table 2) since these extensions interfere directly with the proposed binding epitope. Also the glycosphingolipid from bovine buttermilk (Teneberg *et al.*, 1994), which has a β 6-linked branch of Gal β 4GlcNAc β attached to the internal Gal β 4 of neolactotetraosylceramide (no. 26, Table 2), is non-binding due to blocked access to the binding epitope.

Elongation of the different binding-active five-sugar sequences in Table 2 shows that only addition of Gal β 4 to the thymus-derived structure is tolerated, in accordance with the observation that the 4-OH position may be either equatorial or axial, but with an ensuing loss of binding affinity due to steric interference. Addition of either NeuAc α 3 to x₂ or GalNAc β 3 to B5 thus results in complete loss of binding (nos. 24 and 25, Table 2). It is further seen that the negative influence of a Fuc α 2 unit as in H5-2 is confirmed by the non-binding of *Helicobacter pylori* both to A6-2 and B6-2 (nos. 22 and 23, Table 2). Concerning the elongated structure (no. 28, Table 2), terminated by the same trisaccharide found in B5, it must, as in B5, be this terminal trisaccharide that is responsible for the observed binding although a second internal binding epitope also is present. However, binding to the internal epitope can most likely be excluded since the penultimate Gal β 4 would be expected to

is obtained or not depends, however, both on the type of strain and growth conditions (Miller-Podraza *et al.*, 1996, 1997a,b).

To summarize, the binding epitope of the neolacto series of glycosphingolipids has to involve the three-sugar sequence GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3 in order to obtain maximal activity. From a comparison of the binding pattern of the potential isoreceptors used in this study it can be deduced from the structures shown in Figs. 8A-D and 9A-D that nearly all of this trisaccharide is important for binding to occur, excepting the acetamido group of the terminal GlcNAc β 3 and the 4-OH on the same residue, which are non-crucial.

Biological presence of the receptors. Of the four five-sugar glycosphingolipids that *in vitro* may function interchangeably as receptors for *Helicobacter pylori* only x₂ occurs naturally in human tissue but has as yet not been found to be present in the gastric mucosa, excepting a case of gastric cancer where it was identified in the tumor tissue (Kannagi *et al.*, 1982b). A study by Thorn *et al.*, 1992, showed, however, that the x₂ glycosphingolipid and elongated structures having a terminal GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc β sequence are present in several human tissues, but gastric epithelial tissue was unfortunately not among the ones investigated. Thin-layer chromatogram overlay with the GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc β -specific monoclonal antibody TH2 of preparations of total non-acid glycosphingolipids from epithelial cells of human gastric mucosa of several blood group A individuals (lanes 1-6) was therefore performed (Fig. 11B). No detectable binding, however, was observed to the glycosphingolipids derived from stomach epithelium using this assay. The corresponding overlay using the Gal β 4GlcNAc-binding lectin from *E. cristagalli* is shown in Figs. 11A, 11B and 11C. Of the different glycosphingolipid preparations of gastric epithelial origin the first three lanes show weak binding to bands in the four-sugar region, which probably correspond neolactotetraosylceramide, but no detectable binding of *Helicobacter pylori* to these bands was discerned due to the low amounts of this glycosphingolipid (Teneberg *et al.*, 2001).

Furthermore, the sequence Gal α 3Gal β 4GlcNAc β , whether present in B5 glycosphingolipid or in the elongated structure discussed above (no. 28, Table 2), is possibly not found in normal human tissue due to non-expression of the transferase responsible for the addition of Gal α 3 (Larsen *et al.*, 1990). One is therefore left with the conclusion that if target receptor(s), carrying the binding epitope identified above, are present on the surface of the gastric epithelial cells they may be based on repetitive *N*-acetylglucosamine elements in glycoproteins and not on lipid-based structures.

However, it is known that *Helicobacter pylori* strains associated with peptic ulcer, as the strain mainly used here, stimulates an inflammatory response from granulocytes, even when the bacteria are nonopsonized (Rautelin *et al.*, 1994a,b). The initial event in the phagocytosis of the bacterium most likely involves specific lectin-like interactions resulting the agglutination of the granulocytes (Ofek and Sharon, 1988). Subsequent to the phagocytotic

WO 02/056893

42

PCT/FI02/00043

- event oxidative burst reactions occur which may be of consequence for the pathogenesis of *Helicobacter pylori*-associated diseases (Babior, 1978). Several acid and non-acid glycosphingolipids from granulocytes, having both a neolacto core and repeating lactosamine units, including no. 21 in Table 2 and the sialylated seven-sugar compound (no. 27, Table 2), where the acetamido group of the sialic acid is in the acetyl form, have been isolated and characterized (Fukuda *et al.*, 1985; Stroud *et al.*, 1996) and may thus act potential receptors for *Helicobacter pylori* on the white blood cell surface. Furthermore, also the x₂ glycosphingolipid has been isolated from the same source (Teneberg, S., unpublished).
- Returning to Fig. 11B it is seen that the monoclonal antibody TH2 indeed binds to bands in the five-sugar region, both for granulocytes and erythrocytes (lanes 7 and 8, respectively), which may correspond to the x₂ glycosphingolipid (Teneberg, S., unpublished; Thorn *et al.*, 1992; Teneberg *et al.*, 1996). Similarly, neolactotetraosylceramide is found to be present both in granulocytes and erythrocytes when using the *E. cristagalli* lectin instead in the overlay assay (Fig. 11C, lanes 7 and 8). In these two cases *Helicobacter pylori* binds to neolactotetraosylceramide (Bergstöm, J., unpublished). For granulocytes a further rather weak band in the six-sugar region, probably corresponding to neolactotetraosylceramide extended by one *N*-acetylglucosamine unit (*cf.* no. 21, Table 2), is found in accordance with the results of Fukuda *et al.*, 1985. Whether these glycosphingolipids are prime targets in the agglutination process referred to above remains, however, to be elucidated.

Analysis of neoglycolipids and novel glycolipids

- The oligosaccharides GlcNAcβ3Galβ4GlcNAc, GlcNAcβ3Galβ4GlcNAcβ6GlcNAc, Galα3Galβ4GlcNAcβ3Galβ4Glc and GlcNAcβ3Galβ4GlcNAcβ3Galβ4Glc and maltoheptaose (Sigma, Saint Louis, USA) were reductively aminated with 4-hexadecylaniline (abbreviation HDA, from Aldrich, Stockholm, Sweden) by cyanoborohydride (Halina Miller-Podraza, to be published later). The products were characterized by mass spectrometry and were confirmed to be GlcNAcβ3Galβ4GlcNAcβ6GlcNAc(red)-HDA, Galα3Galβ4GlcNAcβ3Galβ4Glc(red)-HDA, GlcNAcβ3Galβ4GlcNAcβ3Galβ4Glc(red)-HDA and maltoheptaose(red)-HDA [where "(red)-" means the amine linkage structure formed by reductive amination from the reducing end glucoses of the saccharides and amine group of the hexadecylaniline (HDA)]. The compounds Galα3Galβ4GlcNAcβ3Galβ4Glc(red)-HDA and GlcNAcβ3Galβ4GlcNAcβ3Galβ4Glc(red)-HDA had clear binding

WO 02/056893

43

PCT/FI02/00043

- activity and GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6GlcNAc(red)-HDA had strong binding activity with regard to *Helicobacter pylori* in TLC overlay assay described above, while the GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc(red)-HDA and maltoheptaose(red)-HDA were weakly binding or inactive. The example shows that the tetrasaccharide
- 5 GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal is a structure binding to *Helicobacter pylori*. The reducing end Glc-residue is probably not needed for the binding because the reduction destroys the pyranose ring structure of the Glc-residue. In contrast, the intact ring structure of reducing end GlcNAc is needed for good binding of the trisaccharide GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc.
- 10 The a biosynthetic precursor analog of NHK-1 glycolipid
 GlcA β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer, and novel glycolipids
 Glc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer and Glc(A-
 methylamide) β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer were tested in TLC overlay assay
 15 and were observed to be binding active with regard to *Helicobacter pylori*. Glc(A-
 methylamide) means glucuronic acid derivative wherein the carboxylic acid group is
 amidated with metylamine. The Glc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer structure had
 strong binding towards *H. pylori* and Glc(A-
 methylamide) β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer had very strong binding to
 20 *Helicobacter pylori*.
- Production of GlcA β 3Gal β 4Glc(NAc) by transglycosylation
 The acceptor saccharide Gal β 4Glc or Gal β 4GlcNAc (about 10-20 mM) is incubated
 with 10 fold molar excess paranitrophenyl-beta-glucuronic acid and bovine liver β -
 25 glucuronidase (20 000U, Sigma) in buffer having pH of about 5 for two days at 37
 degrees of Celsius stirring the solution. The product is purified by HPLC.

References

- Aggarwal, B. B., Eessalu, T. E. and Hass, P. E. (1985) *Nature*, **318**, 665-667.
- Andersson, B., Porras, O., Halson, L. Å., Lagergård, T., and Svanborg-Edén, C. (1986) *J. Inf. Dis.* **153**, 232-7
- 5 Ångström, J., Teneberg, S., Abul Milh, M., Larsson, T., Leonardsson, I., Olsson, B.-M., Öiwegård Halvarsson, M., Danielsson, D., Näslund, I., Ljung, Å., Wadström, T. and Karlsson, K.-A. (1998) *Glycobiology*, **8**, 297-309.
- Ascencio, F., Fransson, L.-Å. and Wadström, T. (1993) *J. Med. Microbiol.*, **38**, 240-244.
- 10 Appelmelk, B.J., Faller, G., Clayes, D., Kirchner, T., and Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E. (1998) *Immol. Today* **19**, 296-299.
- 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.
- 15 Babior, B. M. (1978) *N. Eng. J. Med.*, **298**, 659-668.
- Blaser, M. J. (1992) *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **4** (suppl 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-Edén, C. and Thuring, J. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 8545-8551.
- 20 Borén, T., Falk, P., Roth, K. A., Larson, G. and Normark, S. (1993) *Science*, **262**, 1892-1895.
- Breg, J., Kroon-Batenburg, L. M. J., Strecker, G., Montreuil, J. and Vliegthart, 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.
- 25 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., Levery, S.B., Kannagi, R. and Hakomori, S.-i. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 1380-1387.
- 30 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.
- 35 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.

- 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.
- 5 Ernst, B., Hart, G.W., and Sinaý, P. (eds.) (2000) *Carbohydrates in Chemistry and Biology*, ISBN 3-527-29511-9, Wiley-VCH, Weinheim.
- Etó, 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. (1988) *Infect. Immun.*, **56**, 2896-06
- 10 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.
- 15 Falk, K.-E., Karlsson, K.-A. and Samuelsson, B. E. (1979c) *Arch. Biochem. Biophys.*, **192**, 191-202.
- Farsak, B., Yildirim, A., Akýön, Y., Pinar, A., Öç, M., Böke, 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.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 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.
- Kannagi, R., Levine, P., Watanabe, K. and Hakomori, S.-i. (1982b) *Cancer Res.*, **42**, 5249-5254.
- 35 Karlsson, N. G., Olson, F. J., Jovall, P.-Å, Andersch, Y., Enerbäck, L., and Hansson G. C. (2000) *Biochem. J.*, **350**, 805-814.
- Karlsson, K.-A. (1987) *Meth. Enzymol.*, **138**, 212-220.

- 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 Koerner Jr, T. A. W., Prestegard, J. 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.
- 10 Laine, R. A., Stellner, K. and Hakomori, S.-i. (1974) *Meth. Membr. Biol.*, **2**, 205-244.
- 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.-Å., Bergström, J. and Karlsson, K.-A. (2001)
- 15 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.*, **60**, 2470-2474.
- Mayo, S. L., Olafsen, B. D. and Goddard III, W. A. (1990) *J. Chem. Phys.*, **94**, 8897-8909.
- 25 McKibbin, J. M., Spencer, W. A., Smith, E. L., Månsson, J. E., Karlsson, K.-A., Samuelsson, B. E., Li, Y.-T and Li, S. C. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 755-760.
- Meyer, B. (1990) *Topics Curr. Chem.*, **154**, 141-208.
- Miller-Podraza, H., Abul Milh, M., Bergström, J. and Karlsson, K.-A. (1996) *Glycoconj. J.*, **13**, 453-460.
- 30 Miller-Podraza, H., Bergström, J., Abul Milh, M. and Karlsson, K.-A. (1997a) *Glycoconj. J.*, **14**, 467-471.
- Miller-Podraza, H., Abul Milh, M., Teneberg, S. and Karlsson, K.-A. (1997b) *Infect. Immun.*, **65**, 2480-2482.
- Miller-Podraza, H., Abul Milh, M., Ångström, J., Jovall, P.-Å., Wilhelmsson, U., Lanne, B., Karlsson, H., and Karlsson, K.-A. (2001) manuscript in preparation.
- 35 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
- Mysore, J.V., Wiggington, T., Simon, P.M., Zopf, D., Heman-Ackah, L.M. and Dubois, A. (1999) *Gastroenterology*, **117**, 1316-1325
- 5 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) *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.
- 10 Nilsson, O., Månsson, 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.
- Nyholm, P. G., Samuelsson, B. E., Breimer, M. and Pascher, I. (1989) *J. Mol. Recog.*, **2**, 103-113.
- 15 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.
- 20 Parsonnet, J., Friedman, G.D., Vandersteen, D.P., Chang, Y., Vogelmann, J.H., Orentreich, N. and Sibley, R.K. (1991) *N. Engl. J. Med.*, **325**, 1127-31
- Rappé, A. K. and Goddard III, W. A. (1991) *J. Chem. Phys.*, **95**, 3358-3363.
- Rautelin, H., Blomberg, B., Järnerot, G. and Danielsson, D. (1994a) *Scand. J. Gastroenterol.*, **29**, 128-132.
- 25 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.
- Saitoh, T., Natomi, H., Zhao, W., Okuzumi, K., Sugano, K., Iwamori, M. and Nagai, Y. (1991) *FEBS Lett.*, **282**, 385-387.
- 30 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.*, **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
- 35 Soltesz, V., Schalen, C. and Mårdh, 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., 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.
- 5 Stroud, M. R., Handa, K., Salyan, M. E. K., Ito, K., Levery, 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., Triadafalopoulos, G., Xiao, S., Brooks, P. (2000) *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **15**, Suppl: G58-68.
- 10 Teneberg, S., Ångström, J., Jovall, P.-Å. and Karlsson, K.-A. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 8554-8563.
- Teneberg, S., Lönnroth, I., Torres Lopez, J. F., Galili, U., Ölwegård Halvarsson, M., Ångström, J. and Karlsson, K.-A. (1996) *Glycobiology*, **6**, 599-609.
- Teneberg, S., Abul Millh, M., Lanne, B., Jovall, P.-Å., Karlsson, H., Ångström, J., Ölwegård Halvarsson, M., Danielsson, D., Ljung, Å., Wadström, T. and Karlsson, K.-A.
- 15 (2001, manuscript in preparation).
- Thorn, J. J., Levery, 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.-Å., Karlsson, H., Strömberg, N., Teneberg, S., Sjögren, H. O. and Karlsson, K.-A. (1989) *Biochim. Biophys. Acta*, **1002**, 267-272.
- 20 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, Springer-Verlag, Berlin.
- 25 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.
- 30 Yang, H.-j. and Hakomori, S.-i. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 1192-1200.

WO 02/056893

49

PCT/FI02/00043

What is claimed:

1. Use of a substance comprising *Helicobacter pylori* binding oligosaccharide sequence

5

$[\text{Gal}(\text{A})_q(\text{NAc})_r/\text{Glc}(\text{A})_s(\text{NAc})_t, \alpha 3/\beta 3]_n [\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3]_t, \text{Gal}\beta 4\text{Glc}(\text{NAc})_u$

wherein q, r, s, t, and u are each independently 0 or 1,

10 so that when $t = 0$ and $u = 0$, then the oligosaccharide sequence is linked to a polyvalent carrier or present as a free oligosaccharide in high concentration, and analogs or derivatives of said oligosaccharide sequence having binding activity to *Helicobacter pylori* for the production of a composition having *Helicobacter pylori* binding or inhibiting activity.

15

2. The use according to claim 1, wherein said substance comprises the oligosaccharide sequence

$\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}$ or $\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$

20

where position C4 of terminal $\text{GlcNAc}\beta 3$ is optionally linked to $\text{Gal}\beta 1$ - or an oligosaccharide chain by a glycosidic bond.

25 3. The use according to claim 1, wherein said substance comprises one or several of the following oligosaccharide sequences

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

$\text{GalNAc}\alpha 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}$, $\text{GalNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}$, $\text{GlcNAc}\alpha 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}$,

30 $\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}$, $\text{Gal}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}$, $\text{Glc}\alpha 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}$, $\text{Glc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}$,

$\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}$, $\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$,

WO 02/056893

50

PCT/FI02/00043

- GalNAc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc, GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc,
 GlcNAc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc, GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc,
 Gal β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc, Glc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc,
 5 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,
 10 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,
- 15 Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc, and reducing-end polyvalent
 conjugates thereof.
4. The use according to claim 1, wherein said substance comprises one or several of
 the following oligosaccharide sequences
 20 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, and
 reducing-end polyvalent conjugates thereof.
- 25 5. The use according to claim 3, wherein said substance comprises one or several of
 the following oligosaccharide sequences
- Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc (lacto-N-neotetraose),
 Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc (para-lacto-N-neohexaose), and
 30 reducing-end polyvalent conjugates thereof.

6. The use according to any one of claims 1 – 5, wherein said substance is conjugated to a polysaccharide, preferably to a poly(lactosamine) chain or a conjugate thereof.
- 5 7. The use according to any one of claims 1 – 5, wherein said substance is a glycolipid.
8. The use according to any one of claims 1 – 5, wherein said substance is an oligomeric molecule containing at least two or three oligosaccharide chains.
- 10 9. The use according to any one of claims 1 – 5, wherein said substance consists of a micelle comprising one or more of the substances as defined in claims 1 – 8.
10. The use according to any one of claims 1 – 9, wherein said substance(s) is/are conjugated to a carrier.
- 15 11. The use according to any one of claims 1 – 10, wherein said substance is covalently conjugated with an antibiotic effective against *Helicobacter pylori*, preferably a penicillin type antibiotic.
- 20 12. The use according to claim 10, wherein position C1 of reducing end terminal Glc or GlcNAc of said oligosaccharide sequence (OS) is oxygen linked (–O–) to an oligovalent or a polyvalent carrier (Z), via a spacer group (Y) and optionally via a monosaccharide or oligosaccharide residue (X), forming the following structure
- 25
- $$[\text{OS} - \text{O} - (\text{X})_n - \text{Y}]_m - \text{Z}$$
- where integers m, and n have values $m \geq 1$, and n is independently 0 or 1; X is preferably lactosyl-, galactosyl-, poly-N-acetyl-lactosaminyl, or part of an O-glycan
- 30 or an N-glycan oligosaccharide sequence, Y is a spacer group or a terminal conjugate such as a ceramide lipid moiety or a linkage to Z;

or a derivative of the substance of said structure having binding activity to
Helicobacter pylori.

13. Use of the substance as defined in claims 1 - 12 for the production of a
5 pharmaceutical composition for the treatment or prophylaxis of any condition due to
the presence of *Helicobacter pylori*.

14. The use according claim 13, wherein said pharmaceutical composition is for the
treatment of chronic superficial gastritis, gastric ulcer, duodenal ulcer, gastric
10 adenocarcinoma, non-Hodgkin lymphoma in human stomach, liver disease,
pancreatic disease, skin disease, heart disease, or autoimmune diseases including
autoimmune gastritis and pernicious anaemia and non-steroid anti-inflammatory
drug (NSAID) related gastric disease, or for prevention of sudden infant death
syndrome.

15
15. Use of the substance as defined in claims 1 - 12, for the diagnosis of a condition
due to infection by *Helicobacter pylori*.

16. Use of the substance as defined in claims 1 - 12 for the production of a
20 nutritional additive or composition for the treatment or prophylaxis of any condition
due to the presence of *Helicobacter pylori*.

17. The use according to claim 16 wherein said nutritional additive or composition is
for infant food.

25
18. Use of the substance as defined in claims 1 - 12, for the identification of
bacterial adhesin.

19. Use of the substance as defined in claims 1 - 12 or a substance identified
30 according to claim 18, for the production of a vaccine against *Helicobacter pylori*.

20. Use of the substance as defined in claims 1 - 12 for typing *Helicobacter pylori*.

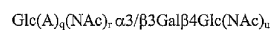
WO 02/056893

53

PCT/FI02/00043

21. Use of the substance as defined in claims 1 – 12 for *Helicobacter pylori* binding assays.

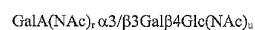
22. A *Helicobacter pylori* binding substance comprising an oligosaccharide
5 sequence



wherein q, r and u are independently 0 or 1,

10

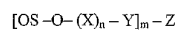
with the proviso that when said oligosaccharide sequence contains $\beta 3$ linkage, both q and r are 0 or 1; or



15

wherein r and u are independently 0 or 1, and *Helicobacter pylori* binding analogs and derivatives thereof.

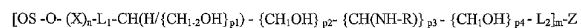
23. A *Helicobacter pylori* binding non-acidic polyvalent substance comprising the
20 oligosaccharide sequence as defined in claim 1, wherein said oligosaccharide sequence (OS) is a part of structure



25 as defined in claim 12, Y being a hydrophilic spacer, more preferably a flexible hydrophilic spacer, and *Helicobacter pylori* binding analogs and derivatives thereof.

24. The *Helicobacter pylori* binding non-acidic polyvalent substance according to claim 23, wherein linker structure Y is

30



WO 02/056893

54

PCT/FI02/00043

wherein L_1 and L_2 are linking groups comprising independently oxygen, nitrogen, sulphur or carbon linkage atom or two linking atoms of the group forming linkages such as -O-, -S-, -CH₂-, -N-, -N(COCH₃)-, amide groups -CO-NH- or -NH-CO- or -N-N- (hydrazine derivative) or an amino oxy-linkages -O-N- and -N-O-; L_1 is linkage from carbon 1 of the reducing end monosaccharide of X or when $n=0$, L_1 replaces -O- and links directly from the reducing end C1 of OS; p_1 , p_2 , p_3 , and p_4 are independently integers from 0-7, with the proviso that at least one of p_1 , p_2 , p_3 , and p_4 is at least 1; CH₁₋₂OH in the branching term {CH₁₋₂OH} _{p_1} means that the chain terminating group is CH₂OH and when the p_1 is more than 1 there is secondary alcohol groups -CHOH- linking the terminating group to the rest of the spacer; R is preferably acetyl group (-COCH₃) or R is an alternative linkage to Z and then L_2 is one or two atom chain terminating group, in another embodiment R is an analog forming group comprising C₁₋₄ acyl group comprising amido structure or H or C₁₋₄ alkyl forming an amine; and $m > 1$ and Z is polyvalent carrier; OS and X are as defined in claim 12.

25. A *Helicobacter pylori* binding substance comprising the oligosaccharide sequence

20 Gal(A)_q(NAc)_r/Glc(A)_q(NAc)_r: α 3/β3Galβ4Glc(NAc)_u

wherein q , r and u are each independently 0 or 1, with the proviso that said oligosaccharide sequence is not Gal α 3Galβ4Glc/GlcNAc,

25 as a non-reducing end terminal sequence, and *Helicobacter pylori* binding analogs and derivatives thereof.

26. The substance according to any one of claims 22-25 for use in binding bacteria, toxins or viruses.

30 27. The substance according to any one of claims 22-25 for use as a medicament.

WO 02/056893

55

PCT/FI02/00043

28. A method for the treatment of a condition due to presence of *Helicobacter pylori*, wherein a pharmaceutically effective amount of the substance as defined in any one of claims 1 – 12 or 22-25 is administered to a subject in need of such treatment.
- 5 29. The method according to claim 28, when said condition is caused by the presence of *Helicobacter pylori* in the gastrointestinal tract of a patient.
30. The method according to claim 28, for the treatment of chronic superficial gastritis, gastric ulcer, duodenal ulcer, gastric adenocarcinoma, non-Hodgkin
- 10 lymphoma in human stomach, liver disease, pancreatic disease, skin disease, heart disease, or autoimmune diseases including autoimmune gastritis and pernicious anaemia and non-steroid anti-inflammatory drug (NSAID) related gastric disease, or for prevention of sudden infant death syndrome.
- 15 31. The method of treatment according to any one of claims 28 – 30, wherein said substance is a nutritional additive or a part of a nutritional composition.
32. The substance according to claim 26, wherein said toxin is toxin a of *Clostridium difficile*.
- 20 33. The use according to claim 1, wherein said oligosaccharide sequence is β 1-6 linked from the reducing end to GalNAc, GlcNAc, Gal or Glc.
34. The use according to claim 2, wherein said oligosaccharide sequence is
- 25 $\text{Glc(A)}_q(\text{NAc})_r\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}$
- q and r being as defined in claim 1.

30

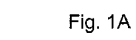


Fig. 1A

WO 02/056893

PCT/FI02/00043

2/14

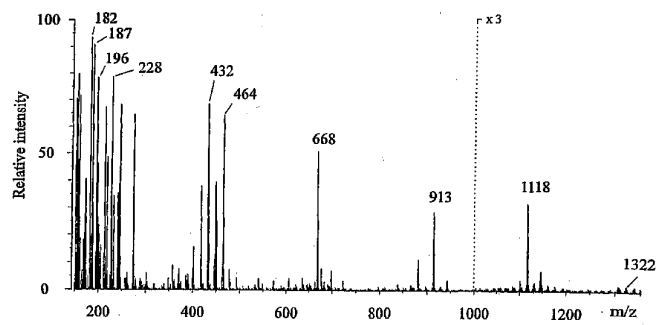
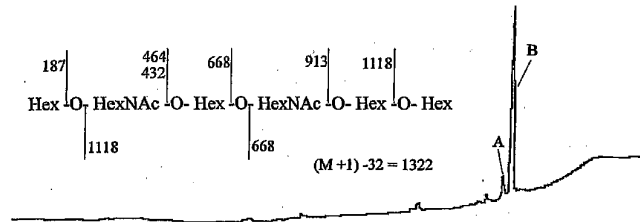


Fig. 1B

WO 02/056893

PCT/FI02/00043

3/14

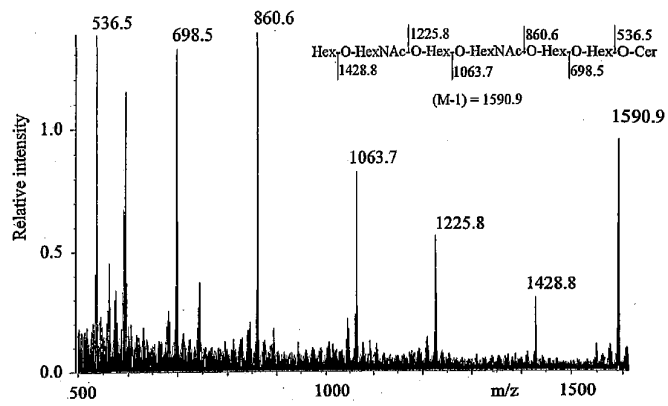


Fig. 2A

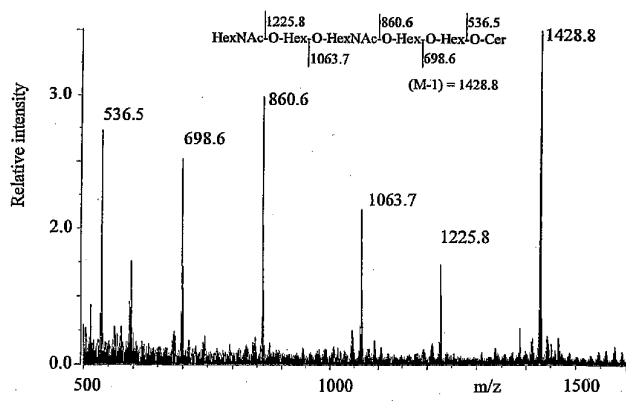


Fig. 2B

WO 02/056893

PCT/FI02/00043

4/14

Fig. 3A

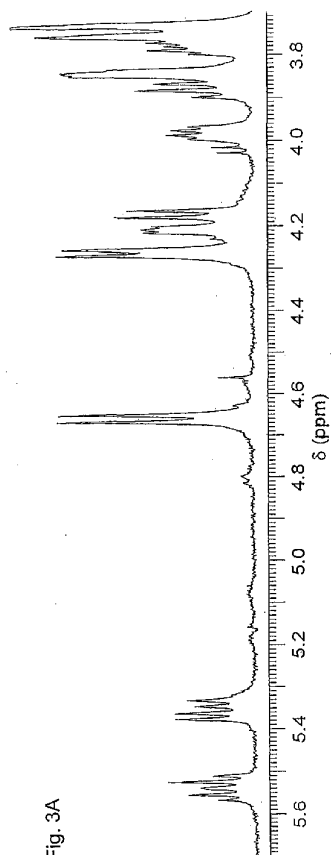
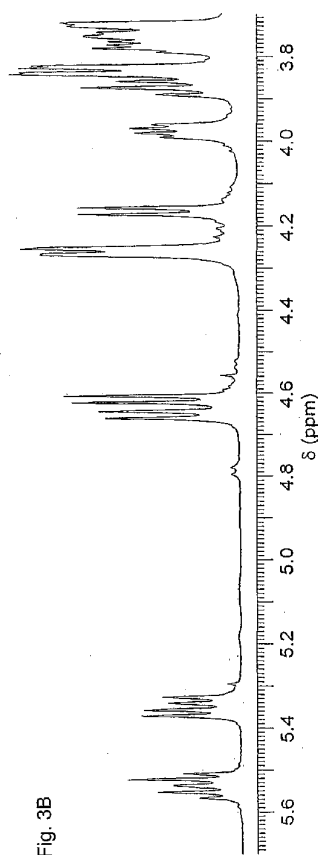


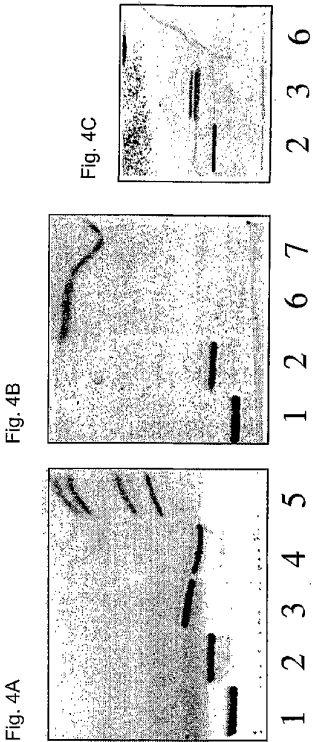
Fig. 3B



WO 02/056893

PCT/FI02/00043

5/14



WO 02/056893

PCT/FI02/00043

6/14

Fig. 5B

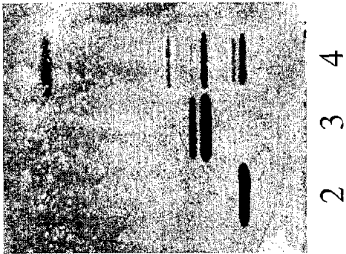
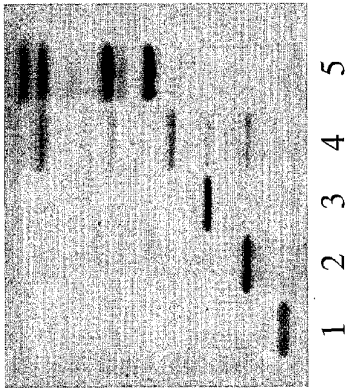


Fig. 5A



WO 02/056893

PCT/FI02/00043

7/14

Fig. 6A

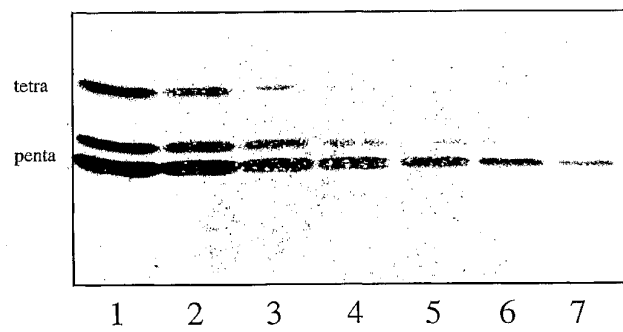
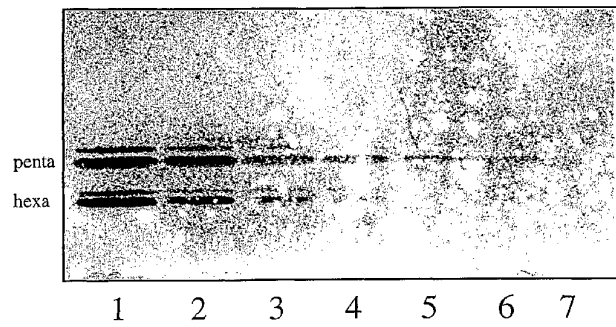


Fig. 6B

WO 02/056893

PCT/FI02/00043

8/14

Fig. 7B

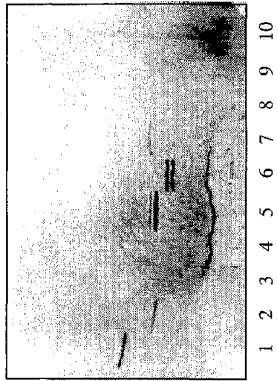
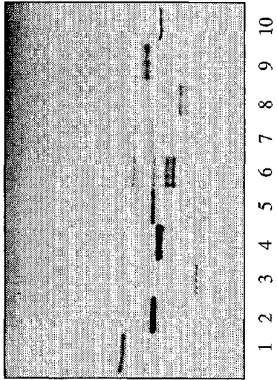


Fig. 7A



WO 02/056893

PCT/FI02/00043

9/14

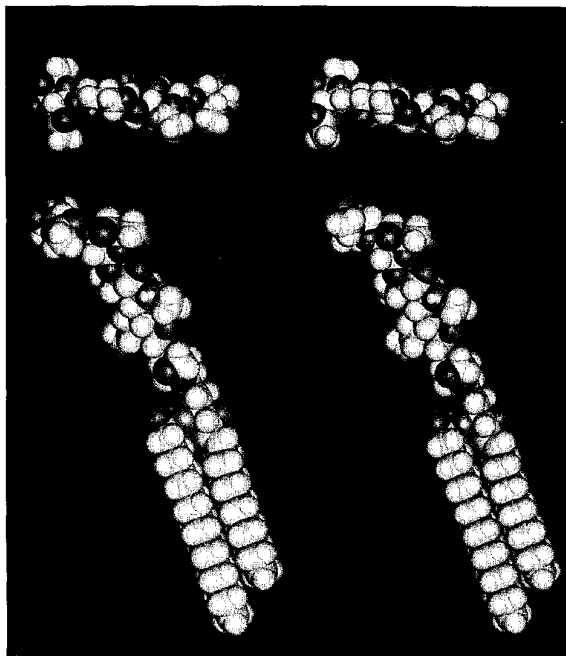


Fig. 8A

Fig. 8B

WO 02/056893

PCT/FI02/00043

10/14

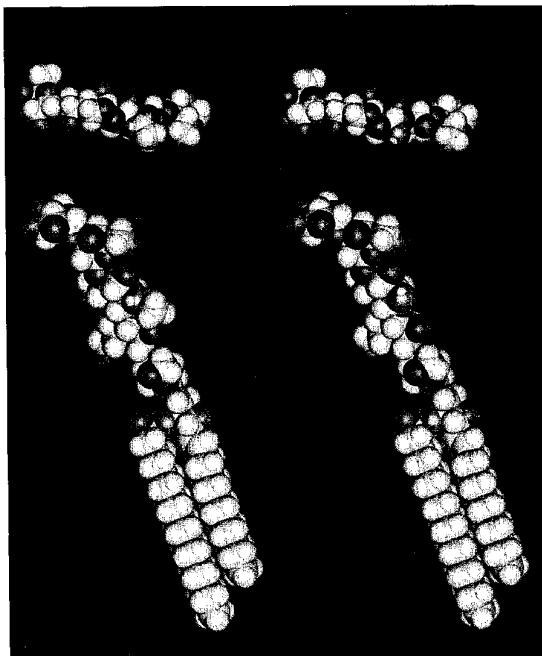


Fig. 8C

Fig. 8D

WO 02/056893

PCT/FI02/00043

11/14



Fig. 9A

Fig. 9B

WO 02/056893

PCT/FI02/00043

12/14

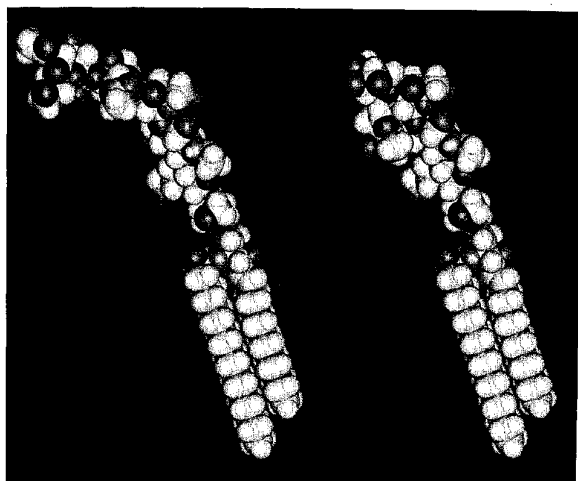


Fig. 9C

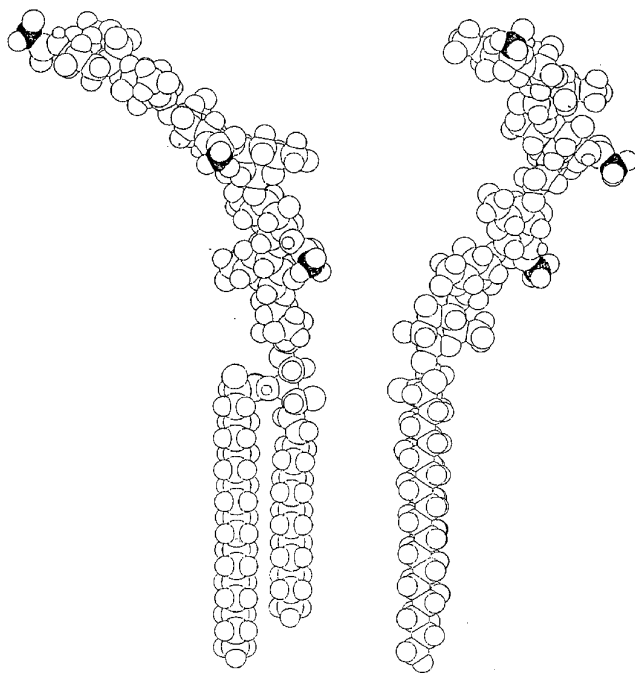
Fig. 9D

WO 02/056893

PCT/FI02/00043

13/14

Fig. 10



WO 02/056893

PCT/FI02/00043

14/14

Fig. 11C

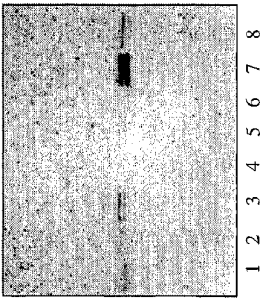


Fig. 11B

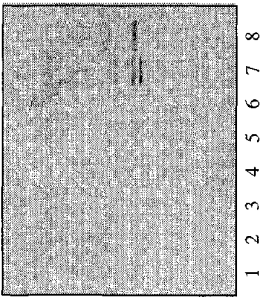
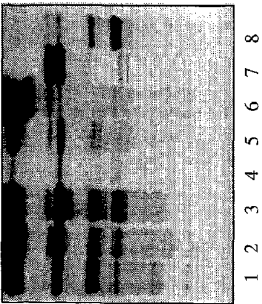


Fig. 11A



【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
25 July 2002 (25.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/056893 A1

- (51) International Patent Classification: A61K 31/702, C07H 15/04, 3/06, A61P 1/04, 31/04
- (21) International Application Number: PCT/FI02/00043
- (22) International Filing Date: 18 January 2002 (18.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 20010118 19 January 2001 (19.01.2001) FI
- (71) Applicant (for all designated States except US): BIOTIE THERAPIES CORP. [FI/US]; Työskytäjän 6, FIN-20520 Turku (FI).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): MILLER-PO-DRAZA, Halina [SE/SE]; Lantmästargatan 20, S-42137 Västra Frölunda (SE). TENEBERG, Susann [SE/SE]; PL 1639, S-43063 Ilindås (SE). ÅNGSTRÖM, Jonas [SE/SE]; de Geersgatan 12, S-41657 Göteborg (SE). KARLSSON, Karl-Anders [SE/SE]; Nilssonberg 37, S-41143 Göteborg (SE). NATUNEN, Jari [FI/FI]; Meritullinkatu 6 C 18, FIN-00170 Helsinki (FI).
- (74) Agent: OY JALO ANT-WUORINEN AB; Iso Roohertinkatu 4-6 A, FIN-00120 Helsinki (FI).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT (utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), CZ, DE (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EG (utility model), FR, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CH, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
- (48) Date of publication of this corrected version: 13 November 2003
- (15) Information about Correction: see PCT Gazette No. 46/2003 of 13 November 2003, Section II
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/056893 A1

(54) Title: NOVEL RECEPTORS FOR *SH*(*HELICOBACTER PYLORI*) AND USE THEREOF

(57) Abstract: The present invention describes a substance or a receptor comprising *Helicobacter pylori* binding oligosaccharide sequence [Gal(A)₄(NAc)₄Glc(A)₄(NAc)₄α3/β3][Galβ4GlcNAcβ3][Galβ4Glc(NAc)₄], wherein q, r, s, t, and u are each independently 0 or 1, and the use thereof in, e.g., pharmaceutical and nutritional compositions for the treatment of conditions due to the presence of *Helicobacter pylori*. The invention is also directed to the use of the receptor for diagnostics of *Helicobacter pylori*.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/FI 02/00043
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7: A61K 31/702, C07H 15/04, C07H 3/06, A61P 1/04, A61P 31/04 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC7: A61K, C07H, A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPD-INTERNAL, CHEM.ABS.DATA, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 0143751 A1 (A+ SCIENCE INVEST AB), 21 June 2001 (21.06.01)	1,6-21, 23-24,26-33
	--	
X	Glycobiology, Volume 8, No. 4, 1998, Jonas Ångström et al: "The lactosylceramide binding specificity of Helicobacter pylori", pages 297-309	1-33
	--	
X	Infection and Immunity, June 1993, B.D. Gold et al: "Helicobacter mustalae and Helicobacter pylori Bind to Common Lipid Receptors in Vitro", pages 2632-2638	1-33
	--	
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
22 April 2002		25-04-2002
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86		Authorized officer EVA JOHANSSON/BS Telephone No. +46 8 782 25 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FI 02/00043

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Archives of Biochemistry and Biophysics, Volume 277, No. 1, February, 1990, Eric H. Holmes et al: "Characterization of Two Monoclonal Antibodies Specific for Lacto-Series Type 1 Chain Gal β 1-3GlcNAc-Terminal Structures", pages 181-188 --	1-33
X	EP 0098252 B1 (BIOCARB AB), 11 January 1984 (11.01.84) --	1-33
X	WO 8604065 A1 (SYNTEK AB), 17 July 1986 (17.07.86) --	1-33
A	Glycoconjugate Journal, Volume 18, 2001, Maan Abul-Milh et al: "In vitro binding of Helicobacter Pylori to Monohexosylceramides", pages 253-260 --	1-33
A	J. Biochem., Volume 108, 1990, Per Falk et al: "Bacteria of the Human Intestinal Microbiota Produce Glycosidases Specific for Lacto-Series Glycosphingolipids", pages 466-474 --	1-33
A	Infection and Immunity, Volume 65, No. 6, June, 1997, Halina Miller-Podraza et al: "Binding of Helicobacter pylori to Sialic Acid-Containing Glycolipids of Various Origins Separated on Thin-Layer Chromatograms", pages 2480-2482 --	1-33
A	Patent Abstracts of Japan, abstract of JP,A,10045602 (MURAKAMI MOTOYASU; KAKEN PHARMACEUT CO LTD), 17 February 1998 (17.02.98) --	1-33
A	EP 0089938 A1 (SVENSKA SOCKERFABRIKS AB), 28 Sept 1983 (28.09.83) -- -----	1-33

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FI02/00043**Box I** Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 15, 18, 28-31
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see next sheet
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FI02/00043

Claims 15,18,28-31 relate to methods of treatment of the human or animal body by surgery or by therapy/ diagnostic methods practised on the human or animal body/Rule 39.1.(iv). Nevertheless, a search has been executed for these claims. The search has been based on the alleged effects of the compounds/compositions.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

28/01/02

International application No.

PCT/FI 02/00043

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0143751 A1	21/06/01	AU 2418801 A SE 9904581 D	25/06/01 00/00/00
EP 0098252 B1	11/01/84	SE 0098252 T3 AT 43847 T DE 3380025 D DK 284283 A FI 78707 B,C FI 832254 A JP 59025399 A SE 8203925 D US 4675392 A	15/06/89 00/00/00 24/12/83 31/05/89 24/12/83 09/02/84 00/00/00 23/06/87
WO 8604065 A1	17/07/86	AT 42559 T AU 588854 B AU 5351586 A CA 1316170 A CN 1022687 B CN 86100178 A DE 3663029 D DK 17685 D DK 439486 A EP 0208749 A,B SE 0208749 T3 FI 83659 B,C FI 863703 A IE 58778 B IL 77602 A JP 2510176 B JP 62502258 T NO 166865 B,C NO 863645 A US 4868289 A	15/05/89 28/09/89 29/07/86 13/04/93 10/11/93 15/07/87 00/00/00 00/00/00 12/09/86 21/01/87 30/04/91 12/09/86 17/11/93 13/05/93 26/06/96 03/09/87 03/06/91 13/11/86 19/09/89
EP 0089938 A1	28/09/83	SE 0089938 T3 AT 29385 T AU 561067 B AU 1263183 A DE 3373415 D DK 130883 A FI 830958 A JP 58172319 A NO 831010 A US 4665060 A US 4851338 A	15/09/87 30/04/87 29/09/83 00/00/00 23/09/83 23/09/83 11/10/83 23/09/83 12/05/87 25/07/89

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 1/18	A 6 1 P 1/18	
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/06	
C 0 7 H 3/06	C 0 7 H 3/06	
C 1 2 N 1/00	C 1 2 N 1/00	Z
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	Z
G 0 1 N 33/569	G 0 1 N 33/569	F

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 オングストロム, ヨーナス

スウェーデン国、エスー4 1 6 5 7 イェーテボリ、デ イェーエシュガタン 1 2

(72)発明者 カールソン, カールーアンデシュ

スウェーデン国、エスー4 1 1 4 3 イェーテボリ、ニルソンスベル 3 7

(72)発明者 ナトゥネン, ヤリ

フィンランド国、エフアイエヌー0 1 5 2 0 ヴァンター、オーランニンティエ 1 0 エー 1 8

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ06 QR41 QR43 QR45 QR51 QS03 QS17

QS24 QS36 QX07

4B065 AA01X AA95X BD35 BD37 BD39 CA45 CA46

4C057 BB04

4C085 AA03 BB24

4C086 AA01 CC04 EA01 HA21 MA04 NA14 ZA36 ZA66 ZA68 ZA75

ZB08 ZB26

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004519459A5	公开(公告)日	2010-06-24
申请号	JP2002557400	申请日	2002-01-18
[标]申请(专利权)人(译)	Tessera公司生物在内比的合作社		
申请(专利权)人(译)	生物三通Serapyizu小屋		
[标]发明人	ミラーボラザハリナ テネベリスサン オングストロムヨナス カールソンカールアンデシュ ナトゥネンヤリ		
发明人	ミラー-ボラザ,ハリナ テネベリ,スサン オングストロム,ヨナス カールソン,カール-アンデシュ ナトゥネン,ヤリ		
IPC分类号	A61K31/702 A61K31/43 A61K31/715 A61K39/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P9/00 A61P35/00 A61P37/06 C07H3/06 C12N1/00 C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	A61K31/702 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P9/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/06		
FI分类号	A61K31/702 A61K31/43 A61K31/715 A61K39/00.H A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P9/00 A61P35 /00 A61P37/06 C07H3/06 C12N1/00.Z C12Q1/02 G01N33/53.Z G01N33/569.F		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ06 4B063/QR41 4B063/QR43 4B063/QR45 4B063 /QR51 4B063/QS03 4B063/QS17 4B063/QS24 4B063/QS36 4B063/QX07 4B065/AA01X 4B065 /AA95X 4B065/BD35 4B065/BD37 4B065/BD39 4B065/CA45 4B065/CA46 4C057/BB04 4C085/AA03 4C085/BB24 4C086/AA01 4C086/CC04 4C086/EA01 4C086/HA21 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086 /ZA36 4C086/ZA66 4C086/ZA68 4C086/ZA75 4C086/ZB08 4C086/ZB26		
优先权	2001000118 2001-01-19 FI		
其他公开文献	JP2004519459A		

摘要(译)

本发明描述了包含幽门螺杆菌结合寡糖序列[Gal (A) q (NAc) r / Glc
(A) q (NAc) r alpha3 / beta3] s [Galbeta4GlcNAcbeta3] tGalbeta4Glc
(NAc) u的物质或受体。 r , s , t和u各自独立地为0或1 , 及其在例如药
物和营养组合中用于治疗幽门螺杆菌引起的疾病的用途。 本发明还涉
及该受体在幽门螺杆菌诊断中的用途。