



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2009년03월04일  
(11) 등록번호 10-0886777  
(24) 등록일자 2009년02월25일

(51) Int. Cl.  
*A61K 31/702* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2003-7009587  
(22) 출원일자 2003년07월18일  
심사청구일자 2007년01월08일  
번역문제출일자 2003년07월18일

(65) 공개번호 10-2004-0018329  
(43) 공개일자 2004년03월03일  
(86) 국제출원번호 PCT/FI2002/000043  
국제출원일자 2002년01월18일  
(87) 국제공개번호 WO 2002/56893  
국제공개일자 2002년07월25일

(30) 우선권주장  
20010118 2001년01월19일 핀란드(FI)

(56) 선행기술조사문헌  
W0200143751 A1  
EP0098252 B1  
EP0089938 A1

(73) 특허권자  
**바이오티에 세라피스 코퍼레이션**  
핀란드, 에프아이엔-20520 투르쿠, 바이오시티,  
티키스토카투 6비

(72) 발명자  
**밀러-포드라자 할리나**  
스웨덴 에스-42137 바스트라 프릴룬다 란트밀스가  
탄 20  
**테네베르크 수잔**  
스웨덴 에스-43063 힌다스 피엘 1639  
(뒷면에 계속)

(74) 대리인  
**박장원**

전체 청구항 수 : 총 25 항

심사관 : 이종국

**(54) 헬리코박터 파일로리의 신규한 수용체 및 그의 용도**

**(57) 요약**

본 발명은 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 결합하는 올리고사카라이드 서열  $[Gal(A)_q(NAc)_r/Glc(A)_q(NAc)_r \alpha 3/\beta 3]_s [Gal \beta 4GlcNAc \beta 3]_t Gal \beta 4Glc(NAc)_u$  (식 중, q, r, s, t 및 u는 각각 독립적으로 0 또는 1임)을 함유하는 물질 또는 수용체, 그의 용도, 예컨대 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)의 존재로 인한 증상을 치료하기 위한 약학적 및 영양학적 조성물에 있어서의 그의 용도를 설명한다. 본 발명은 또한 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)의 진단용 수용체의 용도에 관한 것이기도 하다.

(72) 발명자

**양스트림 요나스**

스웨덴 에스-41657 괴테보르크 데 기어스가탄 12

**칼손 카알-안데르스**

스웨덴 에스-41143 괴테보르크 닐손베르크 37

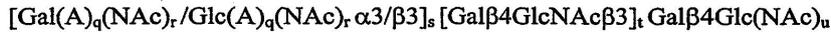
**나투넨 야리**

핀란드 핀-01520 반타아 울란네티에 10 이 18

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 결합하는 다음의 올리고사카라이드 서열



(식 중, q, r, s, t 및 u는 각각 독립적으로 0 또는 1이고, t=0이고 u=0이면 올리고사카라이드 서열이 다카 케리어에 연결되거나 1 내지 100g/l 농도의 유리 올리고사카라이드으로서 존재하거나, u=1이면, 환원 말단 GlcNAc의 아세트아미도기가 알킬아미도, 아릴아미도, 또는 2차아민 기에 의해 택일적으로 교체될 수 있음)을 포함하는 물질을 포함하고, 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 대한 결합 활성 또는 억제 활성을 갖는, 만성 표재성 위염, 위궤양, 십이지장 궤양, 사람 위장 중의 비호지킨씨 임파종, 위 선암종, 간 선암종, 동맥경화증, 자가면역 위염 및 악성 빈혈 및 비스테로이드성 항염약물 (NSAID) 관련 위장 질환, 또는 유아돌연사 증후군을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 2**

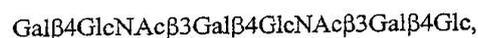
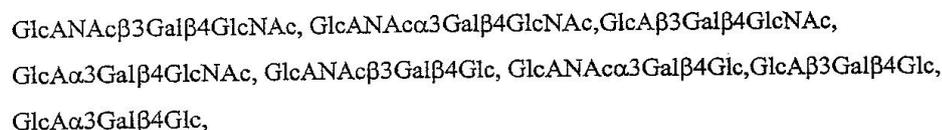
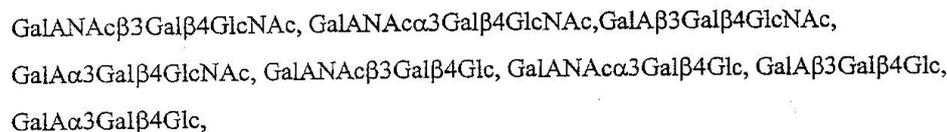
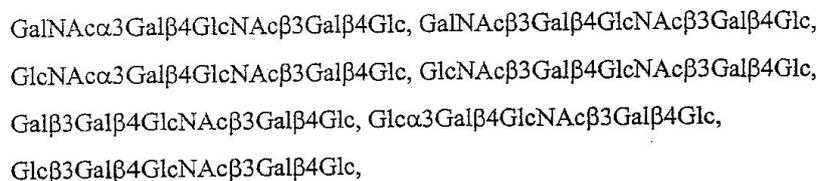
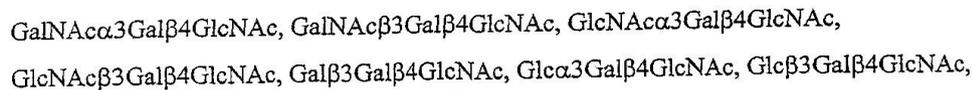
제 1항에 있어서, 상기 물질이 다음 올리고사카라이드 서열을 포함하는 것이 특징인 약학적 조성물:



식 중, 터미널 GlcNAcβ3의 C4 위치는 히드록실로 구성되거나, 글라이코사이드 결합에 의해 Galβ1- 또는 올리고사카라이드 사슬에 링크됨.

**청구항 3**

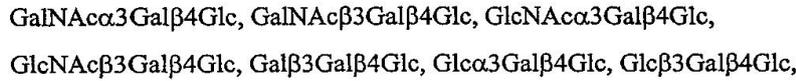
제 1항에 있어서, 상기 물질이 다음 올리고사카라이드 서열들 중 하나 이상을 포함하는 것이 특징인 약학적 조성물:



및 그의 환원-말단 다가 키투게이트.

**청구항 4**

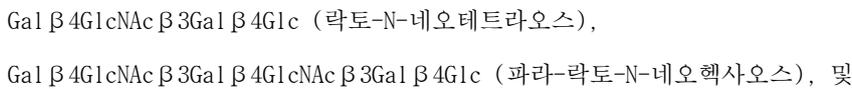
제 1항에 있어서, 상기 물질이 다음 올리고사카라이드 서열들 중 하나 이상을 포함하는 것이 특징인 약학적 조성물:



및 그의 환원-말단 다가 키투게이트.

**청구항 5**

제 3항에 있어서, 상기 물질이 다음 올리고사카라이드 서열들 중 하나 이상을 포함하는 것이 특징인 약학적 조성물:



그의 환원-말단 다가 키투게이트.

**청구항 6**

제 1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 물질이 폴리사카라이드에 키투게이션된 것이 특징인 약학적 조성물.

**청구항 7**

제 1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 물질이 당지질인 것이 특징인 약학적 조성물.

**청구항 8**

제 1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 물질이 적어도 2개 또는 3개의 올리고사카라이드 사슬을 함유하는 올리고머 분자인 것이 특징인 약학적 조성물.

**청구항 9**

제 1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 물질이 미셀(micelle)로 구성된 것이 특징인 약학적 조성물.

**청구항 10**

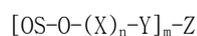
제 1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 물질(들)이 캐리어에 키투게이션된 것이 특징인 약학적 조성물.

**청구항 11**

제 1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 물질이 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 대한 페니실린계 타입 항생제와 공유적으로 키투게이션된 것이 특징인 약학적 조성물.

**청구항 12**

제 10항에 있어서, 상기 올리고사카라이드 서열 (OS)의 환원 말단 터미널 Glc 또는 GlcNAc의 C1 위치가, 직접 스페이서기 (Y) 또는 모노사카라이드 또는 올리고사카라이드 잔기 (X)를 통해 올리고가 또는 다가 캐리어 (Z)에 연결된 산소 (-O-)임으로 해서, 다음 구조를 형성하는 것이 특징인 약학적 조성물:



식 중, 정수 m과 n은  $m \geq 1$ 의 값을 갖고, n은 독립적으로 0 또는 1이며; X는 락토실-, 갈락토실-, 폴리-N-아세틸-락토스아미닐, 또는 O-글라이칸 또는 N-글라이칸 올리고사카라이드 서열의 일부이며, Y는 Z에 대한 결합 또

는 터미널 컨주게이트 또는 스페이서기임.

**청구항 13**

삭제

**청구항 14**

삭제

**청구항 15**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에서 정의된 물질을 포함하는, 만성 표재성 위염, 위궤양, 십이지장 궤양, 사람 위장 중의 비호지킨씨 입과종, 위 선암종, 간 선암종, 동맥경화증, 자가면역 위염 및 악성 빈혈 및 비스테로이드성 항염약물 (NSAID) 관련 위장 질환, 또는 유아돌연사 증후군을 진단하기 위한 약학적 조성물.

**청구항 16**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에서 정의된 물질을 포함하는, 만성 표재성 위염, 위궤양, 십이지장 궤양, 사람 위장 중의 비호지킨씨 입과종, 위 선암종, 간 선암종, 동맥경화증, 자가면역 위염 및 악성 빈혈 및 비스테로이드성 항염약물 (NSAID) 관련 위장 질환, 또는 유아돌연사 증후군의 치료 또는 예방을 위한 식품 또는 식품 첨가제 조성물.

**청구항 17**

제 16항에 있어서, 상기 식품 또는 식품 첨가제 조성물이 유아식인 식품 또는 식품 첨가제 조성물.

**청구항 18**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에서 정의된 물질을 포함하는, 세균 부착인자를 동정하기 위한 조성물.

**청구항 19**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에서 정의된 물질을 포함하는, 만성 표재성 위염, 위궤양, 십이지장 궤양, 사람 위장 중의 비호지킨씨 입과종, 위 선암종, 간 선암종, 동맥경화증, 자가면역 위염 및 악성 빈혈 및 비스테로이드성 항염약물 (NSAID) 관련 위장 질환, 또는 유아돌연사 증후군을 예방 또는 치료하기 위한 백신 조성물.

**청구항 20**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에서 정의된 물질을 포함하는, 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)를 분류하기 위한 조성물.

**청구항 21**

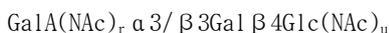
제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에서 정의된 물질을 포함하는, 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 분석을 위한 조성물.

**청구항 22**

올리고사카라이드 서열:



(식 중, q, r 및 u는 0 또는 1이고, 단 상기 올리고사카라이드 서열이 β3 결합을 포함할 경우, q와 r은 두가지 모두 0이거나 1임); 또는

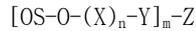


(식 중, r과 u는 독립적으로 0, 또는 1임)

을 포함하는 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질.

**청구항 23**

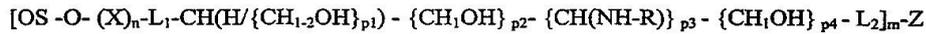
제 1항에 정의된 올리고사카라이드 서열을 포함하는 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 비산성 다  
가 물질: 여기서 상기 올리고사카라이드 서열 (OS)는 제 12항에 정의된 다음 구조의 일부임.



(식 중, Y는 친수성 스페이서)

**청구항 24**

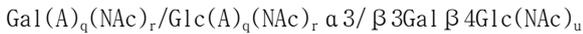
제 23항에 있어서, 링커 구조 Y가 다음의 식인 것인 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 비산성 다  
가 물질:



식 중 L<sub>1</sub>과 L<sub>2</sub>는 독립적으로 산소, 질소, 황 또는 탄소 결합 원자이거나 -O-, -S-, -CH<sub>2</sub>-, -N-, -N(COCH<sub>3</sub>)-, 아  
미드기 -CO-NH- 또는 -NH-CO- 또는 -N-N (히드라진 유도체) 또는 아미노 옥시-결합 -O-N- 및 -N-O-를 형성하는  
기의 2개의 링킹 원자이고; L<sub>1</sub>은 X의 환원 말단 모노사카라이드의 탄소 1로부터의 결합이고 또는 n=0이면, L<sub>1</sub>은  
-O-를 대체하여 OS의 환원 말단 C1으로부터 직접 링크되며; p<sub>1</sub>, p<sub>2</sub>, p<sub>3</sub> 및 p<sub>4</sub>는 독립적으로 0-7의 정수로서,  
단, p<sub>1</sub>, p<sub>2</sub>, p<sub>3</sub> 및 p<sub>4</sub> 중 적어도 하나는 적어도 1이고; 분지 단위 (branching term) {CH<sub>1-2</sub>OH}<sub>p1</sub> 중 CH<sub>1-2</sub>OH는 사  
슬 종결기가 CH<sub>2</sub>OH라는 것을 의미하며 p<sub>1</sub>이 1보다 크면, 스페이서의 나머지에 종결기를 링크시키는 2차 알콜기  
-CHOH-가 존재하고; R은 아세틸기 (-COCH<sub>3</sub>)이거나 또는 R이 Z에 대한 교대 결합이면 L<sub>2</sub>는 하나 또는 두개의 원자  
사슬 종결기이고 또 다른 구체예에서, R은 아미도 구조 또는 H 또는 C<sub>1-4</sub> 알킬 형성 아민을 포함하는 C<sub>1-4</sub> 아실기  
를 포함하는 유사체 형성기이고; m>1이면 Z는 다가 캐리어이며; OS와 X는 제 12항에서 정의된 것이다.

**청구항 25**

비환원성 말단 터미널 서열로서, 다음의 올리고사카라이드 서열을 포함하는 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter  
pylori*) 결합 물질:



식 중, q, r 및 u는 각각 독립적으로 0 또는 1이고, 단, 상기 올리고사카라이드 서열은 Gal α3Gal β4Glc/GlcNAC  
가 아님.

**청구항 26**

삭제

**청구항 27**

삭제

**청구항 28**

삭제

**청구항 29**

삭제

**청구항 30**

삭제

**청구항 31**

삭제

**청구항 32**

삭제

**청구항 33**

제 1항에 있어서, 상기 올리고사카라이드 서열이 환원 말단으로부터 GalNAc, GlcNAc, Gal 또는 Glc에 β 1-6 링 크되어 있는 약학적 조성물.

**청구항 34**

제 2항에 있어서, 상기 올리고사카라이드 서열이

Glc(A)<sub>q</sub>(NAc)<sub>r</sub>β 3Gal β 4GlcNAc인 약학적 조성물.

(식 중, q와 r은 제 1항에서 정의된 것임)

**명세서**

**기술분야**

<1> 본 발명은 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 결합하는 물질 또는 수용체, 및 그의 용도, 즉, 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)의 존재로 인한 증상을 치료하기 위한 약학적 및 영양학적 조성물에 있어서 그의 용도를 설명한다. 본 발명은 또한 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)의 진단을 위한 수용체의 용도에도 관한다.

**배경기술**

<2> 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)는 만성 위염, 비스테로이드성 항염약물 (NSAID: non-steroidal anti-inflammatory drug) 관련 위장 질환, 십이지장 및 위궤양, 위의 MALT 임파종, 및 위 선암 (gastric adenocarcinoma)을 비롯한 위장관의 몇가지 질병의 원인인 것으로 여겨져왔다 (Axon, 1993; Blaser, 1992; DeCross and Marshall, 1993; Dooley, 1993; Dunn et al., 1997; Lin et al., 1993; Nomura and Stemmermann, 1993; Parsonnet et al. 1994; Sung et al., 2000

<3> Wotherspoon et al., 1993). 전적으로 또는 부분적으로 위장관과 무관한 질환에는 유아돌연사 증후군 (Kerr 외, 2000 및 US6,083,756), 자가면역 위염 및 악성빈혈 (Appelmelk 외, 1998; Chmiela 외, 1998; Clyes 외, 1998; Jassel 외, 1999; Steininger 외, 1998) 및 몇가지 피부 질환 (Rebora 외, 1995), 췌장 질환 (Correa 외, 1990), 선암종을 비롯한 간 질환 (Nilsson 외, 2000; Avenaud 외, 2000) 및 동맥경화증과 같은 심장질환 (Farsak 외, 2000)이 포함된다. 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)가 일으키거나 그와 관련 있는 여러 가지 질환이 보고된 바 있다 (Pakodi 외, 2000). 세균 콜로니 형성 (colonization) 및 감염과 관련하여 특히 흥미로운 것은 이 세균이 위점막의 상피 세포 표면에 부착하는 메카니즘이다.

<4> 지질과 단백질 모두를 기제로 하는 글라이코킨주게이트가 이 미생물의 결합 수용체 역할을 하는 것으로 보고된 바 있으며, 예컨대 시알릴화된 글라이코킨주게이트 (Evans 외, 1988), 설파타이드 및 GM3 (Saitoh 외, 1991), Le<sup>b</sup> 결정인자 (Boren 외, 1993), 폴리글라이코실세라마이드 (Miller-Podraza 외, 1996; 1997a), 락토실세라마이드 (Angstrom 외, 1998) 및 강글리오테트라오실세라마이드 (Lingwood 외, 1992; Angstrom 외, 1998)이 예시될 수 있다. 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)의 다른 잠재적인 수용체로는 인지질 포스파티딜에탄올아민 (Lingwood 외, 1992) 뿐만 아니라, 다당류 헤파란 설페이트 (Ascensio 외, 1993)도 들 수 있다.

<5> Zopf 등의 미국특허 5,883,079호 (1999년 3월), 5,763 640호 (1998년 5월) 및 5,514,660호 (1996년 5월)에는 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 부착 저해제로서 Neu5Ac α 3Gal-함유 화합물이 설명되어 있다. 시알릴-락토스 분자는 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)가 인간의 위장관 세포주에 결합하는 것을 억제하며 또한 그의 레서스 (Rhesus) 원숭이 동물 감염 모델에서도 효과적이다. 이 화합물은 임상 시험 중에 있다.

<6> Krivan 등의 미국특허 5,446,681호 (1995년 11월)에는 페니실린 항생제에 커플링된 아시알로 강글리오사이드를 포함하는 세균 수용체 항생제 키투게이트가 설명되어 있다. 여기에는 특히 아목시실린-아시알로-GM1 키투게이트

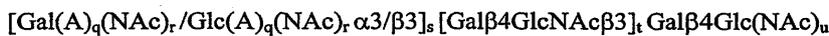
로 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)를 처리하는 것이 청구되어 있다. 이 발명에 설명된 올리고사카라이드 서열/당지질은 당지질의 강글리오시리즈에 속하지 않는다.

<7> Krivan 등의 미국특허 5,386,027호 (1995년 1월) 및 5,217,75호 (1993년 6월)에는 몇가지 병원균을 억제하기 위한 올리고사카라이드 서열 또는 당지질의 용도가 설명되어 있으나, 본 발명의 결합 특이성은 여기에 포함되지 않았으며 이 특허에서 연구 또는 청구된 세균에는 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)가 포함되어 있지 않다.

<8> 스트렙토코커스 (*Streptococcus*)의 수용체로서 당 서열 GlcNAc $\beta$ 3Gal이 개시된 바 있다 (Andersson 외, 1986). 몇몇 세균은 중복되는 결합 특이성을 가질 수 있지만, 밀접하게 관련된 세균성 부착인자 (bacterial adhesins)에 있어서도 그 결합을 예측하는 것은 불가능하다. 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)의 경우, Lewis b 결합 단백질을 제외하고는, 당 결합 분자들이 알려져 있지 않다.

<9> 발명의 요약

<10> 본 발명은 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 대한 결합 활성 또는 억제 활성을 갖는 조성물을 제조하는데 있어서의, 다음의 올리고사카라이드 서열



<11> <12> (식 중, q, r, s, t 및 u는 각각 독립적으로 0 또는 1이고, t=0이고 u=0이면 올리고사카라이드 서열이 다가 캐리어에 연결되거나 고농도 유리 올리고사카라이드으로서 존재함), 및 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 대한 결합 활성을 갖는 상기 올리고사카라이드 서열의 유사체 (analogs) 또는 유도체를 포함하는 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 결합하는 물질 또는 수용체의 용도에 관한 것이다.

<13> 본 발명의 목적 중 한가지는 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 결합하는, 본 발명에서 설명된 올리고사카라이드 서열의 의약으로서의 용도, 및 이것의 의약 조성물 제조시의 용도, 특히 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)의 존재로 인한 여하한 증상의 치료용 조성물을 제조하는데 있어서의 용도를 제공하는 것이다.

<14> 본 발명은 또한 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)의 존재로 인한 증상을 치료하기 위한 방법에 관한 것이기도 하다. 본 발명은 또한 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)를 진단하는데 있어서 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 결합하는 물질 또는 이것을 저해하는 물질로서의 본 발명에 설명된 수용체(들)의 용도에도 관한다.

<15> 본 발명의 또 다른 목적은 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 결합하는 올리고사카라이드 서열(들)을 함유하는 물질, 제약 조성물 및 영양학적 첨가제 또는 조성물을 제공하는 것이다.

<16> 본 발명의 또 다른 목적은 세균성 부착인자의 동정, 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)의 분류 및 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 분석에 있어서의, 상술한 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)-결합 물질의 용도를 제공하는 것이다.

<17> 본 발명의 또 다른 목적은 상술한 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)-결합 물질의 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 대한 백신 제조에 있어서의 용도를 제공하는 것이다.

**발명의 상세한 설명**

<18> 본 발명은 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 결합하는 특정 올리고사카라이드 서열 패밀리에 관한 것이다. 자연적으로 발생하는 수많은 글라이코스핑고지질을 박층 오버레이 분석에 의해 스크리닝하였다 (표 2). 사용된 글라이코스핑고지질의 구조는 양성자 NMR과 질량 스펙트로미터 실험으로 특징화하였다. 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 결합하는 물질들의 3차원 구조를 비교하기 위해 분자 모델링을 이용하였다.

<19> 네가지 펜타사카라이드 당지질을 비교한 결과 신규한 결합 특이성이 입증되었다. GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ Cer 중 비환원 말단 터미널 사카라이드를 GalNAcGlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ Cer3 (약칭  $x_2$  GSL), GalNAc $\alpha$ 3 또는 Gal $\alpha$ 3 (B5)중 어느 것으로 교환하던지, 아노머성의 차이, 아세트아미도 부분의 존재 여부 및 4-OH의 중형 위치의 차이에도 불구하고 모두 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 결합하였다. 이 특이성은 또한 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 대한 결합력이 보다 약한 구조: 단축형 Gal $\beta$

4G1cNAc β 3Gal β 4G1c β Cer 및 말단 N-아세틸글루코사민을 갖는 당지질의 β4- 연장 형태: Gal β 4G1cNAc β 3Gal β 4G1cNAc β 3Gal β 4G1c β Cer 및 NeuGc α 3Gal β 4G1cNAc β 3Gal β 4G1cNAc β 3Gal β 4G1c β Cer도 포함한다. 이전에 알려진 시알산 의존 특이성 (Evans 외, 1988; Miller-Podraza 외, 1996; 1997a)과 대조적으로 마지막으로 언급된 글라이코스핑고지질의 N-글라이콜릴 뉴라민산은 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)의 결합에 영향을 미치지 않아 방출될 수 있었다.

<20> 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 대한 일반적인 사카라이드 결합이 세균의 상 변이에 따라 곤란을 겪고, 높은 결합 친화성이 낮은 피코몰량의 당지질에서 볼 수 있었던 것임에도 불구하고 G1cNAc β 3Gal β 4G1cNAc β 3Gal β 4G1c β Cer 에 대한 결합은 재생성이 매우 높았다.

<21> 실험에 의해 결합 에피토프의 길이를 나타내었으며 실험결과 G1cNAc β 3Gal β 4G1c β Cer, Gal β 4G1cNAc β 3Gal β 4G1c β Cer, 및 Gal α 3Gal β 4G1cNAc β 3Gal β 4G1c β Cer (활성중의 단축형 및 N-데아세틸화 형)은 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 대해 결합하지 않는 것으로 나타났다. 상기 데이터는 내부의 G1cNAc 잔기는 결합에 참여하지만 단독으로는 충분히 강한 결합을 형성하지 않음을 보여준다. 결합 에피토프는 상술한 펜타사카라이드 에피토프 중 말단 트리사카라이드인 것으로 생각되었다. 잔기들 중 단지 두개가 Gal β 4G1cNAc β 3Gal β 4G1c β Cer로서 존재할 경우, 결합이 더 약하며, 헥사사카라이드 당지질 Gal β 4G1cNAc β 3Gal β 4G1cNAc β 3Gal β 4G1c β Cer로서 존재할 경우 말단의 Gal β 4는 결합을 저해하며, 이는 약한 활성을 설명해준다. 덜 활성적인 헥사사카라이드 당지질 구조인 Gal α 3Gal β 4G1cNAc β 3Gal β 4G1cNAc β 3Gal β 4G1c β Cer 상에 Gal α 3을 갖는 헥사사카라이드 당지질은 더 높은 활성을 가졌으며 이는 우수한 결합 활성을 위해서는 터미널 트리사카라이드 에피토프도 필요함을 가리키는 것이다.

<22> 활성중의 이성질체와 변형 형태를 분석함으로써 결합 특이성을 특정화시켰다. 터미널 Gal에 다음 변형을 갖는 Gal β 4G1cNAc β 3Gal β 4G1c β Cer의 연장된 형태는 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)와의 결합 분석에서 불활성적이었다 :Fuc α 2 (약칭 H5-2), Fuc α 2 및 Gal/GalNAc α 3 (B6-2, A6-2), Neu5Ac α 3 또는 Neu5Ac α 6 (시알릴과라글로보사이드), 또는 Gal α 4(P<sub>1</sub>). 이 결합은 또한 구조 Gal β 4G1cNAc β 3(Gal β 4G1cNAc β 6)Gal β 4G1c β Cer로 표시되는, β6-링크된 브랜치 내부 갈락토스를 가짐에 의해서도 파괴되었다. 이 브랜치는 Gal β 4G1cNAc β 3-에피토프의 체를 변화시키는 것으로 나타났고 디사카라이드 결합 부위는 아마도 입체적으로 방해된 것 같다 (Teneberg 외, 1994). (그러나 그 결과는 디사카라이드- 또는 트리사카라이드-결합 에피토프가 β3-결합에 의해 결합되어 있는 내부 갈락토스 잔기도 결합에 기여할 수 있다는 것을 보여준다). 뿐만 아니라, Neu5Ac α 3GalNAc β 3Gal β 4G1cNAc β 3Gal β 4G1c β Cer (결합 활성적인 x<sub>2</sub>-글라이코스핑고지질의 연장된 형태)이나 또는 GalNAc β 3Gal α 3Gal β 4G1cNAc β 3Gal β 4G1c β Cer (B5 GSL의 연장된 형태)는 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 결합하지 않는 것으로 나타났다.

<23> 활성 결합 구조와 불활성종을 비교하기 위해 분자 모델링을 이용하였다. 네가지 펜타사카라이드 글라이코스핑고지질의 계산된 최소 에너지 컨포머들 (G1cNAc β 3, GalNAc β 3, GalNAc α 3 or Gal α 3의 어느 하나로 연장된 Gal β 4G1cNAc β 3Gal β 4G1c β Cer)은 이들 화합물의 배열이 서로 밀접히 모방할 수 있음을 보여준다. 불활성 당지질의 배열은 달랐다. 터미널 사카라이드가 그의 아노머 결합 (2개의 알파- 및 2개의 베타-결합)에서도 다르다는 사실에도 불구하고, 분자 모델링은 최소 에너지 구조가 위상학적으로 매우 유사함을 나타냈다. 터미널 구조의 차이란, Gal α 3은 다른 세가지에는 존재하는 아세트아미도기를 결여하고, Gal과 GalNAc는 중 (axial) 위치에서 4-OH 및 횡 (equatorial) 위치에서 G1cNAc를 가지며, 알파 아노머 터미날의 고리 평면이 대응하는 베타 아노머 고리 평면 보다 약간 더 솟아있다는 것이다. 터미널 연장은 G1cNAc의 위치 4에서 허락되는데, 이는, Gal β 4 연장이 입체장해를 일으키에도 불구하고 4-OH는 결합에 그다지 중요하지 않음을 가리키는 것이다. 결론적으로 말하면, 네가지 펜타사카라이드 당지질 모두가 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 부착인자에 대해 유사한 친화성을 갖기 때문에 4-OH의 위치도, 아세트아미도기의 존재여부도, 터미널 모노사카라이드 잔기의 아노머 구조도, 결합에 중요하지 않다.

<24> 이들 결합 규칙에 비추어 볼 때, 결합 물질 중 네가지 다른 터미널 모노사카라이드 역시 트리사카라이드 결합 에피토프를 제공할 수 있다: Gal β 3Gal β 4G1cNAc, G1cNAc α 3Gal β 4G1cNAc, G1c β 3Gal β 4G1cNAc and G1c α 3Gal β 4G1cNAc. 이들은 아노머, 4-에피머 또는 C2 Nac/OH 구조상에서만 차이가 날 뿐인, 연구된 서열들과 유사하다. 첫번째 것은 인간의 적혈구로부터의 당지질상에 존재하는 반면, 나머지 세개는 이제까지 인간 조직으로부터 알려진 바 없었으나, 천연 수용체의 유사체를 나타낼 수 있을 것이다.

<25> 결합 에피토프는 활성 펜타사카라이드 당지질의 터미널 트리사카라이드 요소를 포함하는 것으로 나타났으며, 적어도 보다 큰 반복성 N-아세틸락토스아민에서는 에피토프 역시 사카라이드 사슬 가운데에도 존재할 수 있다. 본

발명자들은 결합 에피토프가 천연적으로 또는 생합성적으로 생산된 당단백질의 O-링크 또는 N-링크된 글라이칸과 같은 올리고사카라이드 및 글라이코컨쥬게이트 상에, 그리고 폴리-N-아세틸아세토아민 올리고사카라이드 상에 수많은 방식으로 제시될 수 있음을 깨달았다. 특히 탄수화물 분야에 있어서의 화학적 및 효소적 합성법은 거의 무한한 수의 유도체와 유사체의 생성을 가능케 해준다. 결합 에피토프의 크기는 어느 정도 변형이 가능하며, 예컨대 터미널 모노사카라이드의 C1, C2 및 C4 상에서 예시되는 바와 같이, 비환원 터미널 모노사카라이드의 손실 또는 GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4GlcNAc의 말단 GlcNAc의 C4로부터의 연장, 예컨대, GlcNAc $\beta$ 3의 C4 위치가 글라이코사이드 결합에 의해 올리고사카라이드 사슬에 링크될 수 있다. 올리고사카라이드 서열이 GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4Glc이면, 터미널 GlcNAc $\beta$ 3의 C4 위치가 글라이코사이드 결합에 의해 Gal $\beta$ 1- 또는 올리고사카라이드 사슬에 링크될 수 있다. 특히 트리사카라이드 에피토프 중 비환원성 터미널 모노사카라이드의 C2 및 C4 위치와 에피토프의 환원 말단이 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 대한 결합 활성을 갖는 유도체 및 올리고머 또는 폴리머 컨쥬게이트를 만드는데 이용될 수 있다. 유도체와 유사체를 만드는데 있어서 모노사카라이드 잔기의 C6 위치 역시 이용될 수 있으며, 특히, 트리사카라이드 서열 중의 비환원성 터미널 잔기 및 디- 및 트리사카라이드 결합 물질의 환원성 말단 잔기의 C6 위치가 특히 바람직하다.

<26> 본 발명에서 "유사체 (analog)" 및 "유도체 (derivative)"라는 용어는 다음과 같이 정의된다. 본 발명에 따라, 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 결합하는 올리고사카라이드 서열의 구조적 유사체 또는 유도체를 만드는 것이 가능하다. 따라서, 본 발명은 본 발명에 따른 물질의 구조적 유사체에 관한 것이기도 하다. 본 발명에 따른 구조적 유사체는 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)가 올리고사카라이드 서열에 결합하는데 있어서 중요한 구조적 요소를 포함한다. 효과적인 구조적 유사체를 고안하기 위해서는, 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)와 사카라이드 사이의 결합에 중요한 구조 요소들을 파악하는 것이 중요하다. 중요한 구조 요소들은 바람직하게는 변형되지 않는 것이 좋거나 이들은 중요한 구조 요소를 매우 근접하게 흉내내도록 변형되는 것이 좋다. 이 요소들은 바람직하게는 트리사카라이드 및 디사카라이드 에피토프 중 Gal $\beta$ 4 잔기의 4-, 및 6-히드록실기를 포함하는 것이 좋다. 고리 구조들 간의 결합 위치 역시 중요한 구조 요소이다. 고친화도 결합을 위해서는, 디- 또는 트리사카라이드 에피토프의 환원성 말단-GlcNAc의 아세트아미도기에 대응하는 위치 중 아세트아미도기 또는 아세트아미도를 모방하는 기가 바람직하다. 아세트아미도기를 모방하는 기는 알킬아미도, 아릴아미도, 2차 아민, 바람직하게는 N-에틸 또는 N-메틸, O-아세틸, 또는 O-알킬, 예컨대 O-에틸 또는 O-메틸과 같이 다른 아미드일 수 있다. 고친화성 결합을 위해서는 터미널 우론산의 카르복실산기로부터의 아미드 유도체 및 그의 유사체가 바람직하다. 비변형 우론산의 활성은 낮은 pH에서 상승하는 것으로 여겨진다.

<27> 본 발명에 따른 구조적 유도체들은 화학적으로 변형된 본 발명에 따른 올리고사카라이드 서열이기 때문에 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 대한 결합이 유지되거나 증가된다. 본 발명에 따라 올리고사카라이드 서열의 히드록실 또는 아세트아미도기 하나 또는 여러개를 유도화시키는 것이 바람직하다. 본 발명은 유사체나 유도체 제조시 변화될 수 있는 분자의 몇가지 위치들을 설명한다. 적어도 특정 변형을 관용하는 히드록실 또는 아세트아미도기가 식 1에서 R-기로 표시된다.

<28> 모노사카라이드 잔기와 같은 부피가 크거나 또는 산성인 치환기들 및 기타 구조물들은 적어도 Gal $\beta$ 4GlcNAc의 C2, C3, 또는 C6-히드록실 위치 및 트리사카라이드 에피토프의 C3-히드록실 비환원성 터미널 모노사카라이드 상에 링크될 경우에는 관용되지 못한다. 렉틴 결합을 위한 올리고사카라이드 유사체의 제조방법은 잘 알려져 있다. 예컨대, 시알릴-Lewis x 올리고사카라이드의 수많은 유사체가 제조된 바 있으며, 여러가지 활성 기능기 스캐폴드를 나타낸다. Sears 및 Wong 1996의 12090 페이지 참조. 마찬가지로 헤파린 올리고사카라이드의 유사체가 Sanofi사에 의해 생산되었으며 수많은 그룹이 Zanamivir 및 Tamiflu (Relenza)와 같은 시알리다제 효소에 대한 시알산 모방 저해제를 생산해왔다. 바람직하게는 올리고사카라이드 유사체가 적어도 하나의 6-원 또는 5-원 환 구조를 포함하는 분자 상에 만들어지는 것이 좋고, 더욱 바람직하게는, 이 유사체가 6개 또는 5개 원자를 함유하는 적어도 2개의 고리 구조를 함유하는 것이 좋다. 올리고사카라이드의 바람직한 유사체 종류는 Gal $\beta$ 4GlcNAc-사카라이드 모방 그조에 링크된 터미널 우론산 아미드 또는 유사체를 포함한다. 또는, 터미널 우론산 아미드는 GlcNAc 모방 구조에 링크된 Gal에 1-3-링크된다. 모방 구조에서 모노사카라이드 고리는 시클로헥산 또는 시클로펜탄, 벤젠 고리를 비롯한 방향족 고리와 같은 고리로 대체될 수 있으며 헤테로시클릭 고리 구조는 산소 이외에도 예컨대 질소와 황 원자를 함유할 수 있다. 활성 고리 배열을 잠그기 위해 고리 구조는 관용되는 링커 기에 의해 내부연결될 수 있다. 전형적인 모방 구조는 또한 올리고사카라이드 서열 또는 그의 일부를 위해 펩타이드 유사체-구조를 포함할 수도 있다.

<29> 결합 활성에 대한 활성기의 효과는 누적적이며 한가지 기가 결여될 경우 분자의 다른 쪽에 활성 잔기를 추가함으로써 이를 보상할 수 있다. 바람직하게는 컴퓨터에 의한 분자 모델링을 이용함으로써 본 발명에 따른 헬리코

박터 파일로리(*Helicogacter pylori*) 결합 올리고사카라이드 서열에 대한 유사체 구조를 생산할 수 있다. 여러 가지 올리고사카라이드 서열의 분자 모델링으로부터 얻어진 결과가 실시예에 제시되어 있으며, NMR 및 X-선 크리스탈로그래피 방법 이외에도 이와 같거나 유사한 방법들을 이용하여 본 발명에 따른 다른 올리고사카라이드 서열의 구조를 구할 수 있다. 유사체를 발견하기 위해 올리고사카라이드 구조를 헬리코박터 파일로리(*Helicogacter pylori*)의 탄수화물 결합 분자(들)에 (대부분 아마도 세균의 렉틴에) "도킹"시킬 수 있으며, 가능한 추가적인 결합 상호작용을 조사할 수 있다.

- <30> 조합 화학 (combinatorial chemistry)에 의해 올리고사카라이드의 유도체를 만듦으로써 렉틴에 대해 보다 높은 활성을 갖도록 일가, 올리고가 또는 다가 올리고사카라이드를 다중화시킬 수 있다는 것도 알려져 있다. 올리고사카라이드 서열 중의 하나 또는 몇몇 잔기를 치환으로써 라이브러리를 창설할 경우, 또는 본 발명에 의해 설명된 올리고사카라이드 서열의 유사체로부터 라이브러리가 창설될 경우, 이는 유도체 라이브러리로서 고려될 수 있다. 본 발명에 따른 올리고사카라이드 또는 그의 프리커서 또는 글라이코컨쥬게이트 상에 조합 화학 라이브러리를 만들 수 있다. 예컨대, 여러가지 환원 말단을 갖는 올리고사카라이드를 소위 카보하이드라이드 기술에 의해 제조할 수 있다.
- <31> 바람직한 구체예에서는 조합 화학 라이브러리를 본 발명에 의해 설명된 헬리코박터 파일로리(*Helicogacter pylori*) 결합 물질에 컨쥬게이션시킨다. 더욱 바람직한 구체예에서는 이 라이브러리가 적어도 6개의 다른 분자들을 포함한다. 바람직하게는, 조합 화학 변형이 식 1에 따른 R<sub>8</sub> 상의 카르복실산기로부터의 서로 다른 아미드들에 의해 생산되는 것이 좋다. R<sub>8</sub>에서 변형될 기 역시 알데하이드 또는 아민 또는 반응성기의 다른 유형일 수 있다. 이러한 라이브러리는 본 발명에 따른 올리고사카라이드 서열에 대한 미생물 결합을 분석하는데 바람직하다. 아미노산 또는 유기 아미드 컬렉션이 시판되고 있으며, 이 물질들은 우론산 아미드의 조합 라이브러리를 합성하는데 이용가능하다. 예컨대, 본 발명에 의해 설명된 당지질 또는 글라이코컨쥬게이트에 대한 세균성 결합을 억제하는데 라이브러리 화합물을 이용하는 억제 분석을 이용함으로써, 조합 라이브러리로부터 고친화도 바인더가 동정될 수 있었다. 본 발명에 따라 선호되는 구조적 유사체 또는 유도체는 헬리코박터 파일로리(*Helicogacter pylori*)에 대한 본 발명에 따른 헬리코박터 파일로리(*Helicogacter pylori*) 결합 올리고사카라이드 서열의 결합을 저해할 수 있다.
- <32> 지질 부분 또는 실리카 표면의 인접부에 의한 입체 장애 (steric hindrance)는 현행 TLC-분석에 있어서 에피토프 GlcNAc β3Gal β4Glc의 측정을 방해할 수 있다. 헬리코박터 파일로리(*Helicogacter pylori*)에 대해 설명된 (Teneberg 외, 1996) 것과 동일한 네개의 트리사카라이드 에피토프를 특이적으로 인식하는 클로스트리듐 디피실 (*Clostridium difficile*)로부터의 독소 A의 최근 연구에서는 이 서열의 분석 활성을 이용할 수 없었다. 그러나, 이 사카라이드의 커다란 폴리머 스페이서 변형된 컨쥬게이트를 이용한 다른 팀은 독소 A에 대한 Gal α3Gal β4Glc의 결합을 입증해냈다 (Castagliuolo 외, 1996). 또한, 터미널 모노사카라이드의 결합에 대한 기여가, 에피토프의 환원성 말단에서 Glc가 허여될 수 있었음을 가리킨다는 것을 고려하면; 비환성 N-데아실화 형태에서는, 유리 아미노기의 양하전이 히드록실기의 존재보다 결합에 대해 아마도 더욱 파괴적인 것이다. 환원성 말단에 Glc를 갖는 트리사카라이드 에피토프는, 올리고가 또는 더욱 바람직하게는 다가 형태로 존재할 경우 헬리코박터 파일로리(*Helicogacter pylori*) 결합 물질의 효과적인 유사체인 것으로 여겨진다. 본 발명의 한가지 구체예는 고농도, 바람직하게는 1 - 100 g/l, 더욱 바람직하게는 1-20 g/l 범위의 농도로, 유리 환원성 사카라이드로서 사용되는, 환원성 말단에 Glc를 갖는 사카라이드이다. 이 사카라이드들은 0,1-1g/l의 농도 범위에서 약한 활성을 가질 수 있는 것으로 인식된다.
- <33> 다음에, 올리고사카라이드 서열로서 헬리코박터 파일로리(*Helicogacter pylori*) 결합 서열이 설명된다. 여기에서 정의된 올리고사카라이드 서열은 천연 또는 합성 글라이코컨쥬게이트 또는 유리 올리고사카라이드 또는 유리 올리고사카라이드의 일부이다. 이러한 올리고사카라이드 서열은 예컨대, 사카라이드 서열이 세균성 폴리사카라이드의 일부로서 발견되는 경우, 여러가지 모노사카라이드 또는 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드 사슬 상의 폴리사카라이드에 결합될 수 있다. 뿐만 아니라, 올리고사카라이드 서열의 O-아세틸 또는 설페이트화 유도체에 의해 예시되는 바와 같이 모노사카라이드의 수많은 자연적인 변형예가 알려져 있다. 본문에 정의된 헬리코박터 파일로리(*Helicogacter pylori*) 결합 물질은 천연 또는 합성 글라이코컨쥬게이트의 일부로서 설명된 올리고사카라이드 서열 또는 대응하는 유리 올리고사카라이드 또는 유리 사카라이드의 일부를 포함할 수 있다. 헬리코박터 파일로리(*Helicogacter pylori*) 결합 물질은 또한 헬리코박터 파일로리(*Helicogacter pylori*) 결합 올리고사카라이드 서열의 혼합물도 포함할 수 있다.
- <34> 수용체 올리고사카라이드 서열의 몇몇 유도화는 현행 분석에 있어서 결합력을 검출 한계 미만으로

감소시켰는데, 이는, 인식 특이성을 보여준다. 결합 데이터는 만일 상기 올리고사카라이드 서열이 Gal α3Gal β4GlcNAc (치환 서열: GalNAc β3Gal α3Gal β4GlcNAc)에 링크된 GalNAc β3이나, 또는 GalNAc β3Gal β4GlcNAc (치환 서열: Neu5Ac α3GalNAc β3Gal β4GlcNAc)에 링크된 Neu5Ac α3 을 가질 경우, 그 화합물은 활성이 없음을 보여준다. 상기 올리고사카라이드 서열이 Gal β4GlcNAc이면, 이것은 α4-갈락토실화 (서열은 Gal α4Gal βGlcNAc가 아님), α3- 또는 α6-시알릴화 (서열은 Neu5Ac α3/6Gal β4GlcNAc가 아님), α2- 또는 α3-퓨코실화 [상기 올리고사카라이드 서열은 Fuc α2Gal β4GlcNAc 또는 Gal β4(Fuc α3)GlcNAc 또는 Fuc α2Gal β4(Fuc α3)GlcNAc가 아니며, α3-퓨코실화라 함은 Lewis x, Gal β4(Fuc α3)GlcNAc를 형성하는 락토스아민의 GlcNAc 잔기의 퓨코실화를 의미한다]되지 않는다. Gal β3이 GlcNAc β3에 링크된 구조를 갖는 사카라이드는 본문에 설명된 헬리코박터 파일로리(*Helicogacter pylori*) 결합 물질과 비교할 때 상이한 배열을 가지며 이들의 결합 특이성은 별도로 연구되어 왔다. 헬리코박터 파일로리(*Helicogacter pylori*) 결합 물질은 예컨대 Lewis b (Fuc α2Gal β3(Fuc α4)GlcNAc) 또는 Neu5Ac α3Gal β4Glc/GlcNAc와 같이 상이한 사카라이드 서열과 배열을 갖는 공지의 다른 헬리코박터 파일로리(*Helicogacter pylori*) 결합 에피토프를 함유하는 글라이코화합물의 사카라이드 사슬 또는 글라이코뉴클레오타이드 또는 화합물의 일부일 수 있다. 여러가지 결합 물질을 함께 사용하는 것이 치료에 이로울 수도 있다.

- <35> 헬리코박터 파일로리(*Helicogacter pylori*) 결합 올리고사카라이드 서열은 글라이코실트랜스페라제에 의해 효소적으로 합성되거나 또는 글라이코시다제나 트랜스글라이코시다제 효소에 의해 트랜스갈라이코실화 촉매될 수 있다 (Ernst 외, 2000). 이 효소들의 특이성과 코-팩터 (co-factors)의 용도는 조작가능하다. 특이적으로 변형된 효소들을 사용하여 보다 효과적인 합성을 수행할 수 있으며, 예컨대 트랜스글라이코실화만을 수행하기 위해 글라이코신타제를 변형시킨다. 본문에 설명된 사카라이드와 컨주게이트 또는 이들과 유사한 화합물들의 유기 합성법이 알려져 있다 (Ernst 외, 2000). 사카라이드 물질을 천연 소스로부터 분리하여 헬리코박터 파일로리(*Helicogacter pylori*) 결합 화합물로 화학적으로 또는 효소학적으로 변형시킬 수 있다. 천연의 올리고사카라이드는 여러가지 반추동물에 의해 생산되는 우유 (milk)로부터 분리될 수 있다. 암소나 미생물과 같이 글라이코실화 효소를 발현하는 트랜스제닉 생물을 이용하여 사카라이드를 생산할 수 있다.
- <36> 본 발명에 설명된 우론산 모노사카라이드 잔기는 기술분야에 설명된 방법에 의해 얻을 수 있다. 예컨대, N-아세틸글루코사민이나 N-아세틸갈락토사민의 6-탄소의 히드록실은 화학적으로 산화시켜서 카르복실산으로 할 수 있다. 산화는 적절히 보호된 올리고사카라이드이나 모노사카라이드에 대해 수행할 수 있다.
- <37> 바람직한 구체예에서는, 모노사카라이드들 간의 결합이 탄소 6 원자들이 아닌, 육탄당을 포함하는 비보호 폴리머 또는 올리고머를
- <38> 1) 산화시켜 대응하는 우론산 잔기의 폴리머로 만들거나 또는 6-알데하이드모노사카라이드의 모노머를 포함하는 폴리머로 만들고
- <39> 2) 카르복실산기 또는 6-알데하이드기로부터, 바람직하게는 아미드 또는 아민으로 임의로 유도시키고
- <40> 3) 우론산 모노사카라이드 또는 우론산 유도체 모노사카라이드로 가수분해시킨다.
- <41> 모노사카라이드 잔기를 우론산으로 산화시키는 방법과 아민이나 우론산 폴리머를 화학적으로 또는 효소적으로 가수분해시키는 방법은 기술분야에 잘 알려져 있다. 대량으로 시판되는 셀룰로스, 전분 또는 1-2 또는 1-3 또는 1-4 결합을 갖는 다른 글루칸, 키틴 (GlcNAc 폴리머) 또는 키토산 (GlcN 폴리머)의 올리고머 또는 폴리머에 대한 방법을 이용하거나 또는 N-아세틸갈락토사민/갈락토사민 폴리사카라이드 (예컨대 세균성 소스로부터 알려진 것들)을 대응하는 1-4 결합된 사카라이드로 산화시키는 방법이 바람직하다. 이 방법은 또한 갈락탄 폴리머에도 적용될 수 있다. 우론산 유도체는 또한 N-아세틸헤파린, 히알루론 및 콘드로이틴 타인의 세균성 엑소폴리사카라이드를 비롯한 세균성 폴리사카라이드를 함유하는 글루쿠론산이나 펙틴과 같은 우론산을 포함하는 천연 폴리머로부터 생산될 수도 있다. 이 방법은
- <42> 1) 폴리사카라이드의 카르복실산기를 바람직하게는 아미드 결합에 의해 유도화시키고
- <43> 2) 폴리사카라이드를 우론산 모노사카라이드나 우론산 유도체 모노사카라이드로 가수분해시키는 것을 포함한다.
- <44> 폴리사카라이드의 탄소 6 상의 일차 알코올을 알데하이드나 카르복실산으로 산화시키는 화학적 및 효소적 방법도 알려져 있다. 알데하이드는 환원적 아민화에 의해 예컨대 아민으로 추가로 유도될 수 있다. 바람직하게는 일차 알코올 산화 효소-유사한 갈락토스 옥시다제에 의해 터미널 Gal이나 GalNAc를 산화시킨 다음 예컨대 아민에 의해 추가로 유도화시킬 수 있다.

- <45> 우론산 잔기는 유기 화학의 표준법에 의해 디사카라이드 또는 올리고사카라이드로 컨쥬게이트될 수 있다. 다른 한편, GlcA는 GlcA를 UDP-GlcA로부터 터미널 Lac(NAc)로 전달하는 글루쿠로닐 트랜스퍼라제에 의해 링크될 수 있다.
- <46> 1) 아민기를 2차 또는 3차 아민이나 아마이드로 유도화시키고
- <47> 2) 폴리머를 대응하는 모노사카라이드로 가수분해
- <48> 하는 것을 포함하는 방법에 의해, 유리 일차 아민기를 갖는 기타 모노사카라이드나 헥소스아민을 포함하는 올리고머 또는 폴리머로부터, 모노사카라이드 유도체 모방 N-아세틸헥소스아민을 생산할 수 있었다.
- <49> 키토산과 그의 올리고사카라이드는 폴리머나 올리고머를 포함하는 아민의 예이다.
- <50> 일반적으로 카르복실산 함유, 6-알데하이드 함유, 아민 및/또는 아마이드 함유 모노사카라이드/모노사카라이드를 제조하는 방법은 다음 단계들을 포함한다:
- <51> 1. 임의로 카르복실산 또는 6-알데하이드기를, 일차 히드록실을 변형시킬 수 있는 탄수화물 폴리머에 도입하고
- <52> 2. 폴리머의 일차 아민기 또는 6-알데하이드기 또는 카르복실산기를 2차 또는 3차 아민 또는 아마이드로 유도시키고 (이 때 상기 1 단계가 적용되면 2 단계는 임의 단계이다)
- <53> 3. 폴리머를 대응하는 모노사카라이드가 되도록 가수분해한다.
- <54> 모노사카라이드로 가수분해는 또한 부분적일수도 있으며 유사체 물질을 생산하기 위해 유용한 디사카라이드 또는 올리고사카라이드를 생산한다. 바람직하게는 가수분해가 적어도 30%의 모노사카라이드를 생산하는 것이 좋다. 화학적 단계를 생산하는 방법이 기술분야에 알려져 있다. 예컨대, 폴리사카라이드를 대응하는 모노사카라이드로 산화시키는 것은 Muzzarelli 외, 1999 및 2002 문헌에 설명된 방법대로 수행할 수 있다. 모노사카라이드의 보호 또는 반응성 환원 말단이 회피되기 때문에 이 방법들은 보호되지 않은 모노사카라이드를 사용하기에 적합하다.
- <55> 바람직한 구체예에서, 소의 간으로부터의 글루쿠로니다제와 같은 특정 글루쿠로니다제를 이용하는 트랜스글리코실화에 의해 GlcAβ3Lac 또는 GlcAβ3LacNac를 포함하는 올리고사카라이드 서열을 효과적으로 합성한다. 이 효소는 트랜스글리코실화 반응에 대해 예기치않게 높은 수율로, β1-3 결합으로부터 Galβ4GlcNac 및 Galβ4Glc로 부위-특이적으로 전달가능하다는 것이 밝혀졌다. 일반적으로, 이러한 선택성과 30% 이상에 근접하는 수율은 트랜스글리코실화 반응에서는 얻어지지 않는다.
- <56> 본 발명의 한가지 구체예는 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 대한 결합 활성 또는 억제 활성을 갖는 조성물을 제조하는데 있어서의, 다음의 올리고사카라이드 서열
- [Gal(A)<sub>q</sub>(Nac)<sub>r</sub>/Glc(A)<sub>q</sub>(Nac)<sub>r</sub>α3/β3]<sub>s</sub>[Galβ4GlcNacβ3]<sub>t</sub>Galβ4Glc(NAc)<sub>u</sub>**
- <57>
- <58> (식 중, q, r, s, t 및 u는 각각 독립적으로 0 또는 1이고, t=0이고 u=0이면 올리고사카라이드 서열이 다가 케리어에 연결되거나 고농도 유리 올리고사카라이드으로서 존재함), 및 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 대한 결합 활성을 갖는 상기 올리고사카라이드 서열의 유사체 (analog) 또는 유도체를 포함하는 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 결합하는 물질 또는 수용체의 용도이다.
- <59> 상기 올리고사카라이드 서열 중 A는 모노사카라이드 잔기의 우론산 또는 모노사카라이드 잔기의 탄소 6 유도체를 나타내며 가장 바람직하게는 탄소 6의 유도체는 우론산의 아마이드인 것이 좋다.
- <60> 다음의 올리고사카라이드 서열은 본 발명에 사용되기 위한 특히 바람직한 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질들이다.

Galβ4GlcNAc,

GalNAcα3Galβ4GlcNAc, GalNAcβ3Galβ4GlcNAc, GlcNAcα3Galβ4GlcNAc,  
GlcNAcβ3Galβ4GlcNAc, Galα3Galβ4GlcNAc, Galβ3Galβ4GlcNAc, Glcα3Galβ4GlcNAc,  
Glcβ3Galβ4GlcNAc,

Galβ4GlcNAcβ3Galβ4GlcNAc, Galβ4GlcNAcβ3Galβ4Glc,

GalNAcα3Galβ4GlcNAcβ3Galβ4Glc, GalNAcβ3Galβ4GlcNAcβ3Galβ4Glc,  
GlcNAcα3Galβ4GlcNAcβ3Galβ4Glc, GlcNAcβ3Galβ4GlcNAcβ3Galβ4Glc,  
Galα3Galβ4GlcNAcβ3Galβ4Glc, Galβ3Galβ4GlcNAcβ3Galβ4Glc,  
Glcα3Galβ4GlcNAcβ3Galβ4Glc, Glcβ3Galβ4GlcNAcβ3Galβ4Glc,

GalANAcβ3Galβ4GlcNAc, GalANAcα3Galβ4GlcNAc, GalAβ3Galβ4GlcNAc,  
GalAα3Galβ4GlcNAc, GalANAcβ3Galβ4Glc, GalANAcα3Galβ4Glc, GalAβ3Galβ4Glc,  
GalAα3Galβ4Glc,

GlcANAcβ3Galβ4GlcNAc, GlcANAcα3Galβ4GlcNAc, GlcAβ3Galβ4GlcNAc,  
GlcAα3Galβ4GlcNAc, GlcANAcβ3Galβ4Glc, GlcANAcα3Galβ4Glc, GlcAβ3Galβ4Glc,  
GlcAα3Galβ4Glc,

Galβ4GlcNAcβ3Galβ4GlcNAcβ3Galβ4Glc,

<61>

및 그의 환원-

말단 다가 컨주게이트,

GalNAcα3Galβ4Glc, GalNAcβ3Galβ4Glc, GlcNAcα3Galβ4Glc,  
GlcNAcβ3Galβ4Glc, Galα3Galβ4Glc, Galβ3Galβ4Glc, Glcα3Galβ4Glc, 및  
Glcβ3Galβ4Glc.

<62>

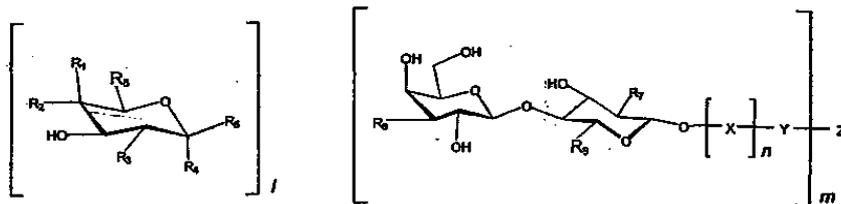
및

<63>

본 발명의 또 다른 구체예는 다음 식 1에 설명되어 있다.

<64>

식 1:



A-사카라이드

B-사카라이드

<65>

<66>

본 발명의 용도에 특히 바람직한 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질 또는 그의 혼합물은 식 1의 올리고사카라이드 구조 중, 정수 1, m 및 n은  $m \geq 1$ 이고 1과 n은 각각 0 또는 1이며, R<sub>1</sub>이 H이고 R<sub>2</sub>가 OH 이거나 R<sub>1</sub>이 OH이고 R<sub>2</sub>가 H 또는 R<sub>1</sub>이 H이고 R<sub>2</sub>는 모노사카라이드- 또는 올리고사카라이드-기, 바람직하게는 베타 글라이코시딜 링크된 갈락토실기, R<sub>3</sub>이 독립적으로 -OH 또는 아세트아미도 (-NHCOCH<sub>3</sub>)이거나 또는 아세트아미도 유사체 기인 것이다. R<sub>7</sub>은 아세트아미도 (-NHCOCH<sub>3</sub>)이거나 아세트아미도 유사체 기이다. 1=이면, R<sub>4</sub>는 -H이고, R<sub>5</sub>가 R<sub>6</sub>에 결합하도록 산소 링크되어 사카라이드 B에 베타 아노머 글라이코사이드 결합을 형성하거나, R<sub>5</sub>가 -H이고 R<sub>4</sub>가 R<sub>6</sub>에 결합되도록 산소 링크되어 사카라이드 B에 알파 아노머 글라이코사이드 결합을 형성하며, 1=0이면 R<sub>6</sub>은 B에 -OH 링크된다. X는 모노사카라이드 또는 올리고사카라이드 잔기, 바람직하게는 X는 락토실-,

갈락토실-, 폴리-N-아세틸-락토스아미닐, 또는 O-글라이칸 또는 N-글라이칸 올리고사카라이드 서열의 일부이며; Y는 스페이서기 또는 세라마이드 지질 부분과 같은 터미널 컨쥬게이트이거나 Z에 대한 결합이다. Z는 올리고가 또는 다가 캐리어이다. 결합물질은 또한 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 대한 결합 활성을 갖는 식 1에 따른 상기 물질의 유사체 또는 유도체일 수 있다. 즉, B 사카라이드의 C1 위치와 사카라이드 잔기 X 또는 스페이서기 Y 사이의 산소 결합 (-O-)은 탄소 (-C-), 질소 (-N-) 또는 황 (-S-) 결합으로 대체될 수 있다.

<67> 식 1에서 R<sub>8</sub>은 바람직하게는 카르복실산 아마이드, 예컨대 메틸아미드 또는 에틸아미드, 히드록시메틸 (-CH<sub>2</sub>-OH) 또는 카르복실산기 또는 그의 에스테르, 예컨대 메틸 또는 에틸 에스테르인 것이 좋다. 카르복실산 아마이드는 갈락토사민 폴리사카라이드이나 키토산과 같은 아민을 포함하거나 또는 일차 아민 함유 스페이서, 바람직하게는 친수성 스페이서를 포함하는 다가 캐리어 Z에 대한적인 결합을 포함할 수 있다. R<sub>8</sub>의 구조는 상기 설명한 당업자에게 알려진 구조를 모방할 수도 있다. 예컨대 2차 또는 3차 아민이나 아마이드화 2차 아민이 이용될 수 있다.

<68> 식 1에서 R<sub>9</sub>는 바람직하게는 히드록시메틸인 것이 좋지만 R<sub>8</sub>에 설명된 것과 같이 유도될 수도 있다.

<69> R<sub>3</sub>은 히드록실, 아세트아미도 또는 아세트아미도기 모방기, 예컨대 C<sub>1-6</sub> 알킬-아미드, 아릴아미도, 2차 아민, 바람직하게는 N-에틸 또는 N-메틸, O-아세틸, 또는 O-알킬, 예컨대 O-에틸 또는 O-메틸이다. R<sub>7</sub>은 R<sub>3</sub>가 동일하지만 바람직하게는 아세트아미도 또는 아세트아미도 모방기인 것이 좋다.

<70> R<sub>2</sub> 역시 바람직하게는 Gal β4-터미널을 모방하는 6원 고리 구조를 포함하는 것이 좋다.

<71> 이 세균 결합 물질은 세포막, 미셀 (micelles), 리포솜, 또는 분석에 이용되는 TLC-플레이트와 같은 고체 페이즈 상에 예컨대 당지질에 클러스터화된 형태로 제시되는 것이 바람직하다. 정확한 간격으로 클러스터화 된 형태는 고친화 결합을 나타낸다.

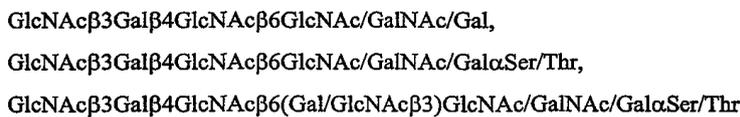
<72> 본 발명에 따라 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 에피토프도 사용가능하며 또는 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 대해 그와 유사하거나 더 나은 결합 활성을 갖는, 천연발생 또는 합성적으로 생산된 그의 유사체나 유도체를 이용할 수도 있다. 또한 본 발명에 설명된 수용체 활성 강글리오사이드와 같은 세균 결합 물질을 함유하는 물질이나 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 관해 그와 유사하거나 더 나은 결합 활성을 갖는 그의 유사체 또는 유도체를 이용할 수도 있다. 세균 결합 물질은 올리고사카라이드 사슬의 글라이코사이드 결합된 터미널 에피토프일 수 있다. 다른 한편 세균 결합 에피토프는 올리고사카라이드 사슬, 바람직하게는 폴리락토스아민 사슬의 브랜치일 수 있다.

<73> 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질은 항생물질, 바람직하게는 페니실린계 항생제에 컨쥬게이션될 수 있다. 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질은 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 대한 항생제를 표적으로 한다. 이러한 컨쥬게이트는 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)를 치료하거나 치료하는데 있어서 항생제를 더 적은 양으로 필요로 할 것이고, 그에 따라 항생제의 부작용도 감소될 것이어서 이롭다. 컨쥬게이트의 항생제 부분은 이 세균을 사멸 또는 약화시키는데 그 목적이 있지만, 이 컨쥬게이트는 또한 후술하는 바와 같이 항부착 (antiadhesive) 효과도 가질 수 있다.

<74> 바람직하게는 올리고가 또는 클러스터 형태의 이 세균 결합 물질은 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)의 존재에 의해 야기되는 증상이나 질환을 치료하는데 이용될 수 있다. 이것은 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질을 항부착, 즉, 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)가 표적 세포나 표적 조직의 수용체 에피토프에 결합하는 것을 억제하는데 이용함으로써 수행될 수 있다. 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질 또는 약학적 조성물이 투여되면 이것은 표적 세포상의 수용체 글라이코컨쥬게이트와 세균 결합을 놓고 경합을 벌일 것이다. 그렇게 되면 이 세균의 일부 또는 전부는 표적 세포나 표적 조직상의 수용체 대신에 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질에 결합하게 될 것이다. 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질에 결합한 세균을 환자로부터 제거하여 (예컨대 위장관 중에 유액을 흘려보냄으로써), 환자의 건강에 미치는 이 세균의 효과를 감소시킬 수 있다. 바람직하게는, 사용되는 물질이 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질을 포함하는 가용성 조성물인 것이 좋다. 이 물질은 바람직하게는 단백질 이외의 캐리어 물질에 부착될 수 있다. 캐리어 분자를 사용할 경우 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질 중 몇몇 분자를 하나의 캐리어에 부착시켜 억제 효과를 향상시킬 수 있다.

<75> 표적 세포는 주로 표적 조직, 특히 위장관의 상피 세포이며, 다른 잠재적인 표적 조직으로는 예컨대 간과 췌장을 들 수 있다. 표적 조직의 글라이코실화는 병원균에 의한 감염으로 인해 변할 수 있다 (Karlsson 외, 2000).

표적 세포들은 또한 표적 조직 중의 악성, 형질전환 암/종양 세포일 수 있다. 형질전환된 세포들과 조직들은 변형된 유형의 글라이코실화를 나타내며 세균에 대한 수용체를 제공할 수 있다. 당단백질이나 당지질 수용체 상의 사카라이드에 대한 렉틴이나 사카라이드의 결합 (탄수화물-탄수화물 상호작용)은 세포들을 활성화시킬 수 있으며 암/악성 세포의 경우, 이것은 암을 더 발달시키거나 전이시키는 결과를 초래할 수 있다. 여기에 설명된 올리고사카라이드 에피토프 중 몇몇, 예컨대, GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4GlcNAc (Hu, J. 외, 1994), Gal $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4GlcNAc (Castronovo 외, 1989), 및 악성 세포로부터의 중성 및 시알릴화 폴리락토스아민 (Stroud 외, 1996)은 암과 관련이 있거나 암 항원인 것으로 보고된 바 있다. 여기에 설명된 물질들을 함유하는 올리고사카라이드 사슬 역시 임파구로부터 설명되었다 (Vivier 외, 1993). 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)는 위의 임파종과 연관이 있다. 여기에 설명된 물질들은 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)가 전악성 (pre-malignant) 또는 악성 세포에 결합하여 암 발육이나 암 전이를 활성화시키는 것을 방지하는데 이용될 수 있다. 이러한 결합을 억제하여 위암, 특히 임파종을 치유할 수도 있을 것이다. 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 올리고사카라이드 서열이 인간의 위점막으로부터 GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 6GalNAc의 구조로 보고된 바 있다. 이 뮤신 에피토프와 유사한 O-글라이칸 글라이코폼은 사람의 위 속의 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 대해 자연적으로 아마도 가장 높은 친화 수용체일 것이다. 이것은 또한 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 대한 네오당지질 (neoglycolipid)로서 유사체 서열 GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 6GlcNAc의 높은 결합 친화성에 의해서도 나타내졌으며 서열 GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 6Gal 역시 동일 분석에서 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 대해 어느 정도 결합 활성을 갖는다. 따라서, 바람직한 올리고사카라이드 서열은



및

<76>

글라이코펩타이드 및 O-글라이칸 서열을 갖는 당펩타이드 유사체와 같은 O-글라이칸 서열의 유사체 및 O-글라이칸을 포함하는 것이 좋다. 비환원성 말단 GlcNAc가 결합된 서열조차 어느 정도의 활성을 가질 수 있다. 이에 기초할 때, 다른 모든 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 올리고사카라이드 서열 (OS) 및 특히 트리사카라이드 에피토프 역시 환원말단으로부터 링크되어 OS $\beta$ 6Gal(Nac)<sub>0-1</sub>이나 또는 OS $\beta$ 6Glc(Nac)<sub>0-1</sub>이나 또는 OS $\beta$ 6Gal(Nac)<sub>0-1</sub> $\alpha$ Ser/Thr이나 OS $\beta$ 6Glc(Nac)<sub>0-1</sub> $\alpha$ Ser/Thr 구조를 형성하는 것이 특히 바람직하다. Ser이나 Thr-화합물 또는 그의 유사체 또는 환원 올리고사카라이드는 다가 캐리어에 링크되어도 바람직하다. 환원성 올리고사카라이드는 다가 캐리어에 환원적으로 링크될 수 있다.

<78>

표적 세포는 또한 혈액 세포, 특히 백혈구를 포함한다. 본 명세서에서 주로 사용되는 균주인, 소화성 궤양과 연관이 있는 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 균주는 이 세균이 옅소나이즈되지 않은 때조차도 과립구로부터의 염증성 반응을 자극한다 (Rautelin 외, 1994 a, b). 이 세균의 대식작용 초반부는 과립구의 응집화를 일으키는 특이적인 렉틴-유사 상호작용을 포함하는 것 같다 (Ofek 및 Sharon, 1998). 대식작용에 이어 산화적 버스트 (oxidative burst) 반응이 일어나며 이것은 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)-관련 질환의 병인의 결과일 수 있다 (Babior, 1978). 반복되는 N-아세틸락토스아민 유닛을 갖는 몇몇 시알릴화 및 비산성 (non-acidic) 글라이코스핑고지질이 분리되어 과립구로부터 특징화되었으며 (Fukuda 외, 1985; Stroud 외, 1996) 따라서 백혈구 세포 표면에서 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 대한 잠재적인 수용체로서 작용할 수 있다. 뿐만 아니라, x<sub>2</sub> 글라이코스핑고지질 역시 동일 소스로부터 분리된 바 있다 (Teneberg, S., 출판되지 않음). 본 발명은 N-아세틸락토스아민 특이적 렉틴과 모노클로날 항체 (x<sub>2</sub>, GalNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4GlcNAc-)에 의해 인식될 수 있는 인간의 적혈구와 과립구 상의 수용체의 존재를 확인한다. 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질은 백혈구가 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 결합하는 것을 억제하는데 유용할 수 있으며 백혈구의 활성화에 이은 산화적 버스트 및/또는 염증을 예방하는데도 효과적일 수 있다.

<79>

헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)는 몇가지 종류의 올리고사카라이드 서열에 결합할 수 있는 것으로 알려져 있다. 특이적 균주에 의한 결합 중 몇몇은 암이나 심각한 질환으로 이어지지 않는 보다 공생적인 상호작용을 나타낼 수 있다. 암-유형의 사카라이드 에피토프에 대한 결합에 관한 본 발명의 데이터는 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질이 보다 병원성인 상호작용을 방지할 수 있고, 이 과정에서 이것이 다른 수용체 구조에 결합하는 덜 병원성인 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 세균/균주를 남겨놓을 수 있음을 가리킨다. 따라서, 이 세균의 완전한 제거는 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 관한 질병을 예방하는데 있어서 필요하지 않을 수 있다. 심지어 덜 병원성인 세균도 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)

의 보다 병원성이 강한 균주를 예방하는데 있어서 프로바이오틱 효과를 가질 수 있다.

- <80> 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)가 그의 표면에 커다란 폴리락토스아민 올리고사카라이드를 함유한다는 것도 밝혀졌는데, 적어도 몇몇 균주에서는 이것은 본 발명에 의해 설명된 바와 같은 세균에 의해 결합될 수 있는 비펩코실화된 에피토프를 함유한다. 본 명세서에서 설명된 물질은 또한 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)균들 간의 결합도 예방할 수 있으며 예컨대 콜로니 형성 과정 중 세균을 억제한다.
- <81> 본 발명에 따라 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)의 존재로 인한 증상을 치료하는데 적합한 약학적 조성물 중에서 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질을 임의로 캐리어와 함께 혼합할 수도 있고, 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질을 이러한 증상을 치료하는 방법에 사용할 수 있다. 본 발명에 따라 치료할 수 있는 증상의 예로는 전적으로 또는 적어도 부분적으로는 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 감염에 기인하는, 만성 표재성 위염, 위궤양, 십이지장 궤양, 사람 위장 중의 비호지킨 씨 임파종, 위 선암종 및 특정한 체장, 피부, 간, 또는 심장 질환, 유아돌연사 증후군, 자가면역 위염을 비롯한 자가면역 질환 및 악성 빈혈과 비스테로이드성 항염약물 (NSAID) 관련 위장 질환을 들 수 있다.
- <82> 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질을 함유하는 약학적 조성물은 또한 다른 물질, 예컨대 당업자에게 잘 알려진 불활성 비히클, 또는 약학적으로 허용가능한 담체, 방부제 등을 포함할 수도 있다. 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질은 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 대해 사용되는 항생제와 같은 다른 약물과 함께 투여될 수 있다.
- <83> 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질 또는 이러한 물질을 함유하는 약학적 조성물은 몇가지 적절한 방식으로 투여될 수 있으며, 경구 투여가 특히 바람직하다.
- <84> 본 발명에서 "치료"라는 용어는 질환이나 증상을 치료 또는 완화시키기 위한 치료와, 질환이나 증상의 진전을 예방하기 위한 치료의 두가지 모두에 관한 것이다. 치료는 급성 또는 만성 방식으로 수행될 수 있다.
- <85> 본 발명에서 "환자"라 함은 본 발명에 따른 치료를 필요로 하는 인간이나 비인간 포유동물을 의미한다.
- <86> 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질에 결합하는 단백질이나 탄수화물을 스크리닝함으로써 (탄수화물-탄수화물 상호작용), 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질을 하나 이상의 부착인자를 동정하는데 이용하는 것도 가능하다. 탄수화물 결합 단백질은 렉틴이거나 탄수화물 결합 효소일 수 있다.
- <87> 스크리닝은 예컨대 친화성 크로마토그래피나 친화성 교차결합법에 의해 수행가능하다 (Ilver 외, 1998).
- <88> 뿐만 아니라, 인간의 조직에 존재하는 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질을 불활성화시키거나 특이적으로 결합하는 물질을 이용함으로써 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)의 결합을 방지할 수도 있다. 이러한 물질의 예로는 에리쓰리나 크리스타갈리(*Erythrina cristagalli*) 및 에리쓰리나 코랄로덴드론(*Erythrina corallodendron*)과 같은 식물성 렉틴을 들 수 있다 (Teneberg 외, 1994). 사람에게 대해 사용될 경우, 이 결합 물질은 비면역원성이면서 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질로부터의 터미널 모노사카라이드 잔기/잔기들을 절단할 수 있는 인간 기원의 재조합 글라이코시다제나 인간화 항체와 같은 그러한 용도에 적합하여야만 한다. 그러나, 위장관에서는, 예컨대 음식물에 기원하는 자연적으로 발생하는 많은 렉틴과 글라이코시다제가 관용된다.
- <89> 또한, 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질은 음식물- 및 사료를 비롯한 영양학적 조성물의 일부로서 이용될 수도 있다. 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)을 소위 기능성 또는 기능화 식품의 일부로서 사용하는 것이 바람직하다. 상기 기능성 식품은 표적화 세포나 조직에 대한 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)의 결합을 억제하거나 예방함으로써 그 사람 또는 동물에게 좋은 영향을 미친다. 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질은 소정의 식품이나 기능성 식품 조성물의 일부일 수 있다. 이러한 기능성 식품은 미국 식품의약청 (FDA: Food and Drug Administration in the USA)과 같은 당국이 허가한 다른 허용가능한 식품첨가물들을 함유할 수도 있다. 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질은 또한 영양학적 첨가제로서, 바람직하게는 기능성 식품이나 기능성 음료의 제조를 위한 식품 또는 음료 첨가제로서 사용될 수도 있다. 식품 또는 식품 첨가제는 예컨대 암소나 다른 동물과 같은 가축으로 하여금 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질을 그의 우유에서 대량 생산하도록 함으로써 생산할 수도 있다. 이것은 동물로 하여금 그의 우유에 적절한 글라이코실트랜스퍼라제를 과발현시킴으로써 달성될 수 있다. 특정 균주나 특정 종류의 가축을 선택하여 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질의 대량 생산을 위해 사육할 수 있다. 영양학적 조성물 또는 영양학적 첨가제를 위한 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질은

또한 세균이나 효모와 같은 미생물에 의해 생산될 수도 있다.

<90> 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질을 유아용 식품의 일부, 바람직하게는 유아식 (infant formula)의 일부로서 사용하는 것이 특히 유용하다. 많은 유아가 천연 모유 대신 특정 조성의 유아식을 먹고 있다. 이러한 유아식에는 모유의 특정 락토스 기체 올리고사카라이드, 특히, 락토-N-네오테트라오스, Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4Glc 및 그의 유도체와 같은 연장된 형태의 것이 결합되어 있을 수 있다. 모유로부터 Gal $\beta$ 3Gal $\beta$ 4Glc 뿐만 아니라 락토-N-네오테트라오스와 파라-락토-N-네오텡사오스 (Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4Glc)가 알려져 있으므로 이들은 유아식에 첨가해도 안전한 첨가제이거나 성분인 것으로 여겨진다. 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)는 특히 유아나 어린 아동에게 잘 감염되며 후에 이 균이 일으킬 질병을 생각하면 그러한 감염을 방지하는 것이 합리적이다. 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)는 또한 유아돌연사 증후군을 일으키는 것으로도 알려져 있지만 이 세균을 박멸시키는데 이용되는 강력한 항생제 치료는 어린 아동이나 유아에 대해서는 특히 적합치 못할 것이다.

<91> 소비될 기능성 식품 중의 모유 올리고사카라이드의 바람직한 농도 (예컨대 제조성된 유아식에 있어서)는 현행의 천연 모유의 그것과 유사하다. 천연 모유는 본 발명에 설명된 올리고사카라이드 서열(들)을 함유하는, 수많은 유리 올리고사카라이드과 글라이코진주게이트 (다가일 수 있음)를 함유한다는 것이 알려져 있으므로, 해로운 부작용 없이 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 대한 보다 강력한 억제 효과를 얻기 위해 단일 분자의 천연 농도보다 훨씬 높은 농도를 이용하는 것이 가능하다. 개인차는 있지만 천연 모유는 락토 N-네오테트라오스를 적어도 약 10-210 mg/l 범위로 함유한다 (Nakhla 외, 1999). 결론적으로, 락토-N-네오테트라오스는 기능성 식품 중에서 0.01 ~ 10 g/l, 바람직하게는 0.01 ~ 5 g/l, 가장 바람직하게는 0.1 ~ 1 g/l의 농도로 사용된다. 본문에 설명된 유리 올리고사카라이드가 환원 말단에 Gal $\beta$ 4Glc를 갖는 트리사카라이드이거나 디사카라이드이면, 이들은 바람직하게는 1 - 100 g/l, 더욱 바람직하게는 1 - 20 g/l의 농도로 사용된다. 다른 한편, 기능성 식품에 사용되는 사카라이드의 총 농도는, 설명된 물질들처럼 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 결합하거나 본 발명에서 지적인 결합 에피토프/올리고사카라이드 서열을 함유하는 천연 모유 사카라이드의 총 농도와 같거나 유사하다. 적어도 한가지 경우에 있어서 모유가 주요 중성 올리고사카라이드로서 Gal $\beta$ 3Gal $\beta$ 4Glc를 고농도로 함유한다는 것이 보고된 바 있다 (Charlwood 외, 1999).

<92> 또한, 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 감염에 의해 야기되는 증상을 진단하는데 있어서 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질을 이용하는 것이 가능하다. 진단 용도에는 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)를 분류하기 위해 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질을 이용하는 것도 포함된다. 이 물질이 진단 또는 분류 용도로 사용될 경우, 이것은 예컨대 임의로 테스트 키트의 일부를 구성하는 테스트 스틱이나 프로브에 포함될 수 있다. 이 프로브나 테스트 스틱을 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)를 함유하는 샘플과 결합시키면, 이 세균이 프로브나 테스트 스틱에 결합하여 샘플로부터 제거되므로 분석이 가능해진다.

<93> 그 결과는 또한 본 발명의 바람직한 트리사카라이드 서열 중의 비환원성 말단 터미널 모노사카라이드 잔기가 탄소 6에서 카르복실산을 함유하거나 (터미널 모노사카라이드 잔기가 우론산, HexA 또는 HexANAc이고 여기서 Hex는 Gal 또는 Glc임) 또는 HexA(NAc) 잔기의 탄소 6의 유도체 또는 대응하는 Hex(NAc) 잔기의 탄소 6의 유도체를 함유할 수도 있음을 보여준다. 이러한 터미널 잔기는 바람직하게는  $\beta$ 3-링크된 글루쿠론산과 더욱 바람직하게는 그의 메틸아미드와 같은 6-아미드를 포함한다. 따라서 이 서열의 유사체와 유도체는 트리사카라이드 에피토프의 터미널 6-위치를 변화 또는 유도화시킴으로써 생산할 수 있다.

<94> **바람직한 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질**

<95> 본 발명에 따른 올리고사카라이드 서열은 박층 표면에 제시될 경우 예상치 못할 정도로 효과적인 바인더인 것으로 밝혀졌다. 이 방법은 당지질 서열의 다가 제시 (polyvalent presentation)를 가능케 한다. 이 올리고사카라이드 서열의 다가 제시의 놀라운 정도로 높은 활성은 다가성을 본 발명의 올리고사카라이드 서열을 대표하는 바람직한 방법으로 만들어준다.

<96> 당지질 구조는 세포막 상에서 다가 형태로 천연적으로 제시된다. 이러한 표현 유형은 이하에서 설명되는 고상 분석에 의하거나 또는 당지질이나 네오당지질의 리포솜을 만듦으로써 모방될 수 있다.

<97> 소수성 헥사데실아닐린을 환원적으로 아민화시킴으로써 생산되는 본 발명의 신규한 네오당지질은 올리고사카라이드의 효과적인 제시를 제공할 수 있었다. 세균의 결합에 사용된 가장 앞서 알려진 네오당지질 컨주게이트는 포스포티딜 에탄올아민 네오당지질의 포스포 에스테르와 같은 음하전된 기를 함유하였다. 이러한 화합물들의 문

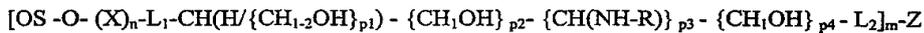
제점은 그 물질이 음하전을 띠는 것과 인지질 구조와 연관된 천연의 생물학적 결합을 갖는다는 것이다. 음하전된 분자는 단백질 및 기타 생물학적 물질과 수많은 비특이적 결합을 일으키는 것으로 알려져 있다. 더구나, 이 구조들중 많은 구조가 불안정하여 효소적으로나 화학적으로 분해될 수 있다. 본 발명은 올리고사카라이드 서열의 비산성 컨쥬게이트에 대한 것으로 이는 올리고 사카라이드 서열이 비산성 화학 구조에 링크되어 있음을 의미한다. 바람직하게는, 비산성 컨쥬게이트가 올리고사카라이드 서열이 중성, 비하전, 화학 구조에 링크된 중성 의미인 것이다. 본 발명에 따른 바람직한 컨쥬게이트는 다가 물질이다.

<98> 종래기술에서 바이오활성적인 올리고사카라이드 서열은 수용체 활성 올리고사카라이드 구조의 일부를 환원시킴으로써 종종 캐리어 구조에 링크된다. 알킬 사슬  $(-CH_2)_n$  및/또는 벤질 고리를 함유하는 소수성 스페이서가 사용되어왔다. 그러나, 소수성 구조는 일반적으로 단백질 및 기타 바이오활성 분자와 비특이적으로 상호작용하는 것으로 알려져있다.

<99> 후술하는 예의 네오당지질 데이터는 분석에 사용된 실험 조건 하에서 네오당지질 화합물의 헥사데실아닐린 부분들이, 연구된 세균에 대해 비특이적 결합을 일으키지 않음을 보여준다. 네오당지질에 있어서 컨쥬게이트의 헥사데실아닐린 부분은 아마도 지질층과 유사한 구조를 형성하며 결합에는 이용되지 못하는 것 같다. 본 발명은 결합 에피토프에 속하는 모노사카라이드 잔기를 환원시키면 결합이 파괴될 수도 있음을 보여준다. 또한 환원된 모노사카라이드는 수용체 에피토프를 링크하기 위한 소수성 스페이서 및 다가 제시 구조로서 이용될 수도 있다. 본 발명에 의하면 소수성 스페이서를 통해 바이오활성적인 올리고사카라이드를 다가 또는 멀티가 (multivalent) 캐리어 분자에 링크시켜 다가 또는 올리고가/멀티가 구조를 형성하는 것이 바람직하다. 응용목적에 따라서는 올리고가/멀티가 구조가 그보다 큰 다가 구조보다 더 바람직할 수도 있지만 모든 다가 (10개를 초과하는 올리고사카라이드 잔기를 포함함) 및 올리고가/멀티가 구조 (2~10개의 올리고사카라이드 잔기를 포함함)는 본 발명에서 다가 구조라고 칭한다. 친수성 스페이서는 바람직하게는 적어도 하나의 히드록실기를 함유하는 것이 좋다. 더욱 바람직하게는 스페이서는 적어도 2개의 히드록실기를 함유하는 것이 좋고 가장 바람직하게는 스페이서가 적어도 3개의 히드록실기를 함유하는 것이 좋다.

<100> 본 발명에 의하면, 친수성 스페이서는 하나 또는 수개의  $-CHOH-$ 기 및/또는 아세트아미도  $-NHCOCH_3$  또는 알킬아미도와 같은 아미드 측쇄를 포함하는 유연한 사슬인 것이 바람직하다. 히드록실기 및/또는 아세트아미도기는 또한 스페이서가 생체내에서 효소적으로 가수분해되는 것을 막아준다. 유연하다라는 용어는 스페이서가 유연한 결합을 포함하며 유연성이 없는 고리 구조는 형성하지 않는다는 의미이다. 본 발명에서 환원적 아민화에 의해 형성되는 것들과 같은 환원된 모노사카라이드 잔기들이 유연한 친수성 스페이서들의 예이다. 유연한 친수성 스페이서는 네오당지질 또는 다가 컨쥬게이트의 비특이적 결합을 피하는데 가장 적합하다. 이것은 예컨대 약학적 또는 기능성 식품의 바이오활성에 있어서나 바이오분석에 있어서 필수적인 최적의 활성이다.

<101> 유연한 친수성 링커에 대한 컨쥬게이트의 일반식은 다음 식 2로 표시된다:



<103> 식 중  $L_1$ 과  $L_2$ 는 독립적으로 산소, 질소, 황 또는 탄소 결합 원자이거나  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-CH_2-$ ,  $-N-$ ,  $-N(COCH_3)-$ , 아미드기  $-CO-NH-$  또는  $-NH-CO-$  또는  $-N-N$  (히드라진 유도체) 또는 아미노 옥시-결합  $-O-N-$  및  $-N-O-$ 와 같은 결합을 형성하는 기의 2개의 링킹 원자를 나타낸다.  $L_1$ 은 X의 환원 말단 모노사카라이드의 탄소 1로부터의 결합이고 또는  $n=0$ 이면,  $L_1$ 은  $-O-$ 를 대체하여 OS의 환원 말단 C1으로부터 직접 링크된다.

<104>  $p_1$ ,  $p_2$ ,  $p_3$  및  $p_4$ 는 독립적으로 0-7의 정수이며 단  $p_1$ ,  $p_2$ ,  $p_3$  및  $p_4$  중 적어도 하나는 적어도 1이다. 분지 단위 (branching term)  $\{CH_2OH\}_{p_1}$  중  $CH_2OH$ 는 사슬 종결기가  $CH_2OH$ 라는 것을 의미하며  $p_1$ 이 1보다 크면, 스페이서의 나머지에 종결기를 링크시키는 2차 알킬기  $-CHOH-$ 가 존재함을 의미한다. R은 아세틸기 ( $-COCH_3$ )인 것이 바람직하며 또는 R이 Z에 대한 결합이면  $L_2$ 는 하나 또는 두개의 원자 사슬 종결기이고 또 다른 구체예에서, R은 아미도 구조 또는 H 또는  $C_{1-4}$  알킬 형성 아민을 포함하는  $C_{1-4}$  아실기 (바람직하게는 히드록시 알킬과 같은 친수성)를 포함하는 유사체 형성기이다. 그리고  $m>1$ 이면 Z는 다가 캐리어이다. OS와 X는 식 1에서 정의된 바와 같다.

<105> 식 2에 따라 유연한 친수성 스페이서를 포함하는 바람직한 다가 구조는 Gal  $\beta$  4Glc(red)-Z에 링크된 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 올리고사카라이드 서열 (OS)  $\beta$  1-3, 및 OS  $\beta$  6GlcNAc(red)-Z 및 OS  $\beta$

6GalNAc(red)-Z (여기서 "(red)"는 환원성 말단 모노사카라이드 및 다가 캐리어 Z의 아민기로부터의 환원적 아민화에 의해 형성된 아민 결합 구조를 의미한다)를 포함한다.

<106> 본 발명에서 올리고사카라이드 기는 캐리어 (캐리어는 항원성 및 바람직하게는 알리지 반응을 피하기 위해 단백질이나 펩타이드가 아님)에 다가 또는 올리고가 형태로 링크되는 것이 바람직하고, 백본 (backbone)이 천연의 비항원성 폴리사카라이드인 것이 바람직하다.

<107> 당지질과 네오당지질의 결합 활성을 비교하면, Gal α3Gal β-를 갖는 서열이 박충 플레이트 상에서 다가 제시에 있어 보다 낮은 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다. 터미널 Gal β4GlcNAc-을 갖는 서열 역시 더 약했다. 따라서, 본 발명에 따른 최적의 다가 비산성 기질은 다음의 터미널 올리고사카라이드 서열 또는 그의 유사체나 유도체를 갖는 것이다



<108>

식 중 q1, q2, r1, r2 및 u는 각각 독립적으로 0 또는 1이고

<109>

단 q1과 r1이 모두 0이면, 비환원성 말단 터미널 모노사카라이드 잔기는 Gal α가 아니다. 더욱 바람직하게는 u=0이고 가장 바람직하게는 다가 형태로 제시된 올리고사카라이드 서열이 GalNAc/Glc(NAc)<sub>r2</sub> α3/β3Gal β4GlcNAc (여기서 r2는 독립적으로 0 또는 1임)인 것이다.

<110>

다음의 올리고사카라이드 서열들이 특히 바람직하다. 이들은 인간 또는 동물 조직으로부터 설명된 바 없는 구조들을 나타낸다:

<111>



<112>

단, 이 올리고사카라이드 서열이 β3 결합을 함유하면 q와 r은 1 또는 0이고; 또는 GalA(NAc)<sub>r</sub> α3/β3Gal β4Glc(NAc)<sub>u</sub>이다.

<113>

상기한 올리고사카라이드 서열의 신규성은 이들을 특히 바람직하게 만들어준다. 이러한 서열을 절단하는 공지의 글라이코시다제가 있다. 따라서, 이들 서열들은 특히 생물학적 조건 하에서 안정하고 바람직스럽다. 본 발명에서 설명된 서열들의 천연형은 글라이코시다제 효소에 의해 절단될 수 있는데, 이 때문에 이들이 인간이나 동물의 몸에 사용될 경우 특히 이들의 유용성이 감소된다. 이 서열들을 절단하는 글라이코시다제 효소는 인간의 위 장관에서 활성적인 것으로 알려져있다. N-아세틸헥소스아미니다제 또는 갈락토시다제와 같은 몇몇 글라이코시다제가 소화효소로서 알려져 있으며 식품 등에도 존재한다.

<114>

<115> 본 발명에 따른 신규한 물질은 또한 클로스트리듐 디피실(*Clostridium difficile*)의 독소 A를 억제하는데도 유용하다는 것이 밝혀졌다. S. Teneberg 외 1996. 종래 물질들과의 독소 A의 결합 프로파일은 본 발명의 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)의 특이성과 매우 유사하다. 따라서, 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 물질은 예컨대 클로스트리듐 디피실(*Clostridium difficile*)의 존성 설사를 치료하는데 이용될 수 있다.

<116>

당지질과 탄수화물의 명명법은 IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (Carbohydrate Res. 1998, 312,167; Carbohydrate Res. 1997,297,1; Eur. J. Biochem. 1998,257,29)의 권고에 따랐다.

<117>

Gal, Glc, GlcNAc 및 Neu5Ac는 D-배열, Fuc는 L-배열, 그리고 모든 모노사카라이드 유닛은 피라노스형인 것으로 추정된다. 글루코사민은 GlcN이나 GlcNH<sub>2</sub>로, 갈락토사민은 GalN이나 GalNH<sub>2</sub>로 표시한다. 글라이코사이드 결합은 부분적으로는 더 짧게, 부분적으로는 더 길게 명명되며, Neu5Ac-잔기 α3 및 α6은 α2-3 및 α2-6과 각각 동일한 의미이며, 다른 모노사카라이드 잔기 α1-3, β1-3, β1-4, 및 β1-6은 각각 α3, β3, β4, 및 β6으로 약칭할 수 있다. 락토사민은 N-아세틸락토사민, Gal β4GlcNAc를 가리키고, 시알산은 N-아세틸뉴라민산 (Neu5Ac) 또는 N-글라이콜릴뉴라민산 (Neu5Gc) 또는 그밖의 다른 천연 시알산을 가리킨다. 글라이칸이라는 용어는 본 명세서에서 인간이나 동물의 글라이코컨쥬게이트, 특히, 당지질 또는 당단백지질에 존재하는 올리고사카라이드거나 폴리사카라이드 사슬을 널리 지칭하는 의미로 사용된다. GSL이라는 약어는 글라이코스핑고지질을 가리킨다. 글라이코스핑고지질의 약칭이나 단축명 또는 기호는 표 1 및 표 2의 텍스트에 나타나있다. 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)는 또한 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)와 유사한 세균도 가리킨다.

- <118> 본 발명에서 hex(NAc)-우론산과 그의 유도체 및 잔기들은 다음과 같이 표시된다: GlcA는 글루쿠론산 및 글루코스나 글루쿠론산의 탄소 6의 유도체, GalA는 갈락투론산과 갈락토스 또는 갈락투론산의 탄소 6의 유도체, GlcANAc는 N-아세틸글루쿠론산과 N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸글루코사민 우론산의 탄소 6의 유도체이고 GalANAc는 N-아세틸갈락토사민 우론산과 N-아세틸갈락토사민 또는 N-아세틸갈락토사민 우론산의 탄소 6의 유도체를 가리킨다.
- <119> "터미널 올리고사카라이드 서열"이라는 표현은 올리고사카라이드가 다른 모노사카라이드 잔기에 의해 비환원성 터미널 잔기로 치환되지 않았음을 가리킨다.
- <120> "α3/β3"이라는 표현은 올리고사카라이드 서열 중의 인접 잔기들이 서로 α3- 또는 β3- 결합을 형성할 수 있음을 가리키는 것이다.
- <121> 다음에 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세히 설명하나 본 발명의 범위가 이들 실시예로 한정되는 것은 아니다.

**실시예**

<147> **재료 및 방법**

<148> 재료 - TLC 실리카겔 60 (알루미늄) 플레이트는 Merck (Darmstadt, Germany) 제품을 사용하였다. 조사된 모든 글라이코스핑고지질은 본 출원인의 실험실에서 획득하였다. β-갈락토시다제 (*Escherichia coli*)는 Boehringer Mannheim사 (Germany)로부터, Ham'sF12 배지는 Gibco사 (U.K.) 제품을, <sup>35</sup>S-메티오닌은 Amersham (U.K.) 제품을, 그리고 FCS (소의 태아 혈청)는 Sera-Lab (England) 제품을 사용하였다. β4-갈락토시다제 (*Streptococcus pneumoniae*), β-N-아세틸헥소사아미니다제 (*Streptococcus pneumoniae*) 및 시알리다제 (*Arthrobacter ureafaciens*)는 Oxford GlycoSystems (Abington, U.K.)의 것을 사용하였다. 위염 및 십이지장 궤양을 앓고 있는 환자로부터 각각 얻은 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)의 임상적 분리체 (균주 002 및 032)는 스웨덴, Orebro Medical Center의 D. Danielsson 박사가 기증하였다. 타일 균주 17875는 Culture Collection, University of Goeteborg (CCUG)로부터 얻었다.

<149> 글라이코스핑고지질. 도 7A 및 7B에 도시된 실험의 순수한 글라이코스핑고지질은 Karlsson, 1987에 설명된 바와 같이 표 2에 기재된 소스로부터 총 산 또는 비산성 분획으로부터 제조하였다. 일반적으로, 개개의 글라이코스핑고지질은 총 글라이코스핑고지질 분획을 아세틸화하여 (Handa, 1963), 반복적인 실리식산 컬럼 크로마토그래피에 의해 분리한 후 질량 스펙트럼 (Samuelsson 외, 1990), NMR (Falk 외, 1979 a, b, c; Koerner Jr 외, 1983) 및 분해적 공정 (Yang and Hakomori, 1971; Stellner 외, 1973)에 의해 그 구조를 특징화하였다. 토끼의 흉선으로부터 유래한 당지질을 후술한다.

<150> 당지질의 정제. 토끼의 흉선의 아세톤 분말 (Pel-Freez Biological Inc., North Arkansas, Ark. US) 1000g으로부터 산 글라이코스핑고지질을 분리하였다. 이 아세톤 분말을 클로로포름/메탄올 2/1 (달리 언급하지 않는 한 부피/부피 비율임)을 이용하여 24시간, 이어서 클로로포름/메탄올/물 8/1/1을 이용하여 36시간 동안 속실텍 장치로 추출하였다. 추출된 지질 240g을 Folch 분리 (Folch 외, 1957)시키고 수집한 친수성상을 DE23 셀룰로스 (DEAE, Whatman, Maidstone, UK) 상에서 이온-교환 겔 크로마토그래피시켰다. 이 분리 단계로부터 산 글라이코스핑고지질 2.5g이 얻어졌다. 유리컬럼 (내경 50 mm) 상에서 오픈-튜브식 크로마토그래피로 이온-교환 겔 크로마토그래피하여 시알산의 수에 따라 강글리오사이드를 분리하였다. 메탄올로 시작하여 메탄올 중 0.5M CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>로 종결하는 오목 구매 (미리-프로그램화시킨 구매 no 4, System Gold Chromatographic Software, Beckman Instruments Inc., CA, USA)를 제공하는 HPLC 펌프에 컬럼을 연결시켰다. 각각 유속 4ml/분과 8ml로 200개의 분획이 얻어졌다. 강글리오사이드 혼합물 300-400 mg을 DEAE Sepharose (CL6, Pharmacia, Uppsala, Sweden, 총고 약 130mm) 500g에 한번에 적용시켰다. 모노시알릴화된 강글리오사이드를 실리카 컬럼 300 mm x 22 mm 내경, 120Å 포어크기 10 μm 입도 (SH-044-10, Yamamura Ltd., Kyoto, Japan) 상에서 HPLC에 의해 추가분리시켰다. 약 150 mg의 모노시알릴화된 강글리오사이드를 한번에 적용시키고 스트레이트 용출 구매를 이용하였다 (클로로포름/메탄올/물을 60/35/8에서 10/103으로, 4ml/분, 240 분획).

<151> 부분적 산 가수분해 - 100°C 물 중 1.5% CH<sub>3</sub>COOH에서 강글리오사이드의 데시알릴화 (desialylation)를 수행한 후 재료를 NaOH로 중화시킨 후 질소하에 건조시켰다. 탄수화물 골격을 부분적으로 분해시키기 위해 당지질을 비등수조에서 7분간 0.5M HCl로 가수분해시켰다. 이어서 재료를 중화시키고 C/M/H<sub>2</sub>O (8:4:3, 부피/부피)<sup>2</sup> 중에서 분별시켰다. 하부층을 모아서 질소하 증발시키고 회수된 당지질을 분석하였다.

- <152> 핵사글라이코실세라마이드의 효소적 가수분해에 의한 펜타글라이코실세라마이드의 제조. 산 데시알릴화 (상기내용 참조)에 의해, 헵타글라이코실세라마이드 (4mg, 토끼 흉선으로부터) (구조 1, 표 1)로부터 얻어진 핵사글라이코실세라마이드 (구조 2, 표 1)을 C/M (2:1)에 재용해시키고 소형 실리카겔 컬럼 (0.4 x 5 cm)에 적용하였다. 컬럼을 C/M/H<sub>2</sub>O (60:35:8, 부피/부피)로 용출시켰다. 약 0.2 ml의 분획들을 모아서 탄수화물의 존재여부를 테스트하였다. 회수된 핵사글라이코실세라마이드 (2.0mg)을 소듐 타우로데옥시콜레이트 (1.5mg/ml), MgCl<sub>2</sub> (0.001M) 및 β-갈락토시다제 (*E. coli*, 500U 2-니트로페닐-β-D-갈락토시다제를 기질로하여 분석했을 때)를 함유하는 0.1M 포타슘 포스페이트 완충액 (pH 7.2) 1.5ml에 용해시키고, 샘플을 37℃에서 밤새 인큐베이션시켰다. 이어서 재료를 C/M/H<sub>2</sub>O (10:5:3)에서 분별시키고 하부층에 함유된 당지질을 위에서 핵사글라이코실세라마이드에 대해 설명한 바와 같이 실리카겔 크로마토그래피 (0.4 x 5 cm 컬럼)를 이용하여 정제시켰다. 모든 오염성 세정제를 제거하기 위해 크로마토그래피를 2회 반복하였다. 마지막으로 회수된 펜타글라이코실세라마이드의 양은 0.7 mg이었다.
- <153> 당지질의 엔도글라이코세라마이다제 절단 (Ito 및 Yamagata, 1989) - 반응 혼합물은 50mM 아세테이트 완충액 (pH 6.0) 160 μg 중 당지질 200 μg, 소듐 타우로데옥시콜레이트 80 μg 및 효소 0.8mM을 함유하였다. 샘플을 37℃에서 밤새 인큐베이션시킨 후, 물 (140 μl)과 C/M (2:1, 부피비, 1500 μl)을 첨가하고, 샘플을 진탕 및 원심 분리하였다. 상층을 질소 하에 건조시키고, 소량의 물에 재용해시킨 다음 H<sub>2</sub>O로 평형시킨 Sephadex G-25 컬럼 (0.4 x 10 cm) 상에서 탈염시킨 다음 물로 용출시켰다. 약 0.1ml의 분획을 수집해서 당 (sugar)의 존재여부에 대해 검사하였다.
- <154> 사카라이드의 과메틸화 (permethylation) - Larson 등의 1987 방법에 따라 과메틸화를 수행하였다. Needs 및 Selvendran 1993이 제안한바와 같이 요오드화메틸 전에 샘플에 산산화나트륨을 첨가하였다. 몇몇 실험에서는 메틸화에 앞서 사카라이드를 NaBH<sub>4</sub>로 환원시켰다. 이 경우 요오드화메틸의 양은 DMSO (디메틸설폭사이드)/요오드화메틸의 최종비율이 1:1이 되도록 증가시켰다 (Hansson 및 Karlsson, 1990).
- <155> 가스 크로마토그래피/질량 스펙트럼 - 온-컬럼 인젝터 및 화염이온화검출기가 구비된 Hewlett-Packard 5890A Series II 가스 크로마토그래피 상에서 가스 크로마토그래피를 수행하였다. 과메틸화된 올리고사카라이드를 가교된 PS264 (필름 두께 0.03 μm)로 코팅된 융합 (fused) 실리카 모세관 (Fluka, 11m x 0.25mm 내경) 상에서 분석하였다. 샘플을 에틸 아세테이트에 용해시키고 80℃에서 온-컬럼 인젝션시켰다. 온도는 10℃/분의 속도로 80℃에서 390℃로 높였고 최고 온도에서 2분간 유지시켰다. 과메틸화된 올리고사카라이드의 가스 크로마토그래피-질량 스펙트럼을 JEOL SC-102 질량 스펙트로미터에 결부시킨 Hewlett-Packard 5890A Series II 가스 크로마토그래피 상에서 수행하였다 (Hansson 및 Karlsson, 1990). JEOL SX-102 질량 스펙트로미터 상에서 FAB-MS 분석을 수행하였다. 매트릭스로서 트리에탄올아민 및 Xe 원자 폭발 (10kV)을 이용하여 네거티브 FAB 스펙트럼을 생성시켰다
- <156> NMR 스펙트로스코피 - Jeol Alpha 500 (Jeol, Tokyo, Japan) 스펙트로미터 상에서 11.75T로 양성자 NMR 스펙트럼을 기록하였다. 분석에 앞서 샘플들을 중성자 교환시킨 다음 0.35 Hz/pt의 디지털 해상도로 30℃에서 기록하였다. 화학적 이동은내부 용매 시그널을 이용하는 TMS (테트라메틸실란)에 대해 상대적으로 주어졌다.
- <157> 분석적 효소학적 테스트 - 각각의 인큐베이션 혼합물에 Trixon X-100을 최종농도 0.3%로 부가시킨 것을 제외하고는 제조업자의 권고사양에 따라 Oxford GlycoSystems 효소학적 테스트를 수행하였다. 시알리다제와 β4-갈락토시다제의 혼합물을 절단에 이용한 경우 β4-갈락토시다제 키트로부터의 인큐베이션 완충액을 사용하였다. 만일 β-헥소스아미니다제가 절단 혼합물 중에 존재하면 이 효소 키트로부터의 완충액을 사용하였다. 인큐베이션 혼합물 중의 효소의 농도는 Hexβ4HexNAc-갈락토시다제 (*S. pneumoniae*)의 경우 80mU/ml, β-N-아세틸헥소스아미니다제 (*S. pneumoniae*)의 경우에는 120 mU/ml, 그리고 시알리다제 (*Arthrobacter ureafaciens*)의 경우에는 1U/ml였다. 기질의 농도는 약 20 μM이었다. 37℃에서 밤새 효소 절단을 수행하였다. 절단 후 샘플들을 건조시키고 Sephadex G-25 (Wells 및 Dittmer, 1963)의 소형 컬럼 0.3g을 이용하여 탈염시키고, C/M/H<sub>2</sub>O (60:30:4.5, 부피비) 중에서 평형시켰다. 각 샘플을 동 용매 2ml 중 컬럼에 부가하고 C/M/H<sub>2</sub>O (60:30:4.5) 2.5ml와 C/M (2:1) 2.5 ml로 용출시켰다. 적용 및 세정 용액을 수집하여 질소 하에 증발시켰다.
- <158> 기타 분석방법 - Dubois 외, 1956의 방법에 따라 육탄당을 측정하였다.
- <159> De-N-아실화. 앞서 설명된 바와 같이 (Anstrom외, 1998) 여러가지 글라이코스핑고지질을 무수히드라진으로 처리함으로써, GlcNAc/GalNAc 잔기의 아세토아미도 부분을 아민으로 전환시켰다.

- <160> 세균 증식. 15% 글리세롤 (부피기준)을 함유하는 트립틱 대두 브로스 중, -80°C에서 헬리코박터 파일로리 (*Helicobacter pylori*)균주를 보관하였다. 이 세균은 처음에는 GAB-CAMP 한천 (Soltesz외, 1998) 상에서 습한 (98%) 마이크로호기성 조건 (O<sub>2</sub>: 5-7%, CO<sub>2</sub>: 8-10% 및 N<sub>2</sub>: 83-87%) 하에, 37°C에서 48-72시간 동안 배양하였다. *Brucella* 한천 (Difco, Detroit, MI)를 대신 사용한 도 1A와 1B에 제시된 결과를 제외하고, 라벨링을 위해 콜로니들을 GAB-CAMP 한천에 접종하고, 0.5ml 포스페이트-완충염수 (PBS), pH 7.3에 희석된 50 μCi<sup>35</sup>S-메티오닌 (Amersham, U.K.)을 플레이트 상에 끼얹었다. 마이크로호기성 조건 하, 37°C에서 12-24시간 인큐베이션시킨 후, 세포들을 벗겨내고, PBS로 3회 세척한 다음 PBS 중 1x10<sup>8</sup> CFU/ml로 재현탁하였다. 다른 한편, 콜로니들을 10% 열-불활성화된 소의 태아 혈청 (Sera-Lab)이 강화된 Ham'sF12 (Gibco BRL, U.K.) 중에 접종하였다 (1x10<sup>5</sup> CFU/ml). 라벨링을 위해, 배지 10 ml 당 50 μCi<sup>35</sup>S-메티오닌을 첨가하고, 24시간 동안 마이크로호기적 조건 하에서 진탕하면서 인큐베이션시켰다. 원심분리에 의해 세균 세포들을 수집하고, 배양체의 순도와 구형세포 형태의 저함량을 상-대조 현미경에 의해 확인하였다. PBS로 2회 세척한 후, 세포들을 PBS 중에 1 x 10<sup>8</sup> CFU/ml가 되도록 재현탁시켰다. 두가지 라벨링 과정 모두 100 헬리코박터 파일로리 (*Helicobacter pylori*) 생명체 당 약 1 cpm의 특이 활성을 갖는 현탁액을 결과시켰다.
- <161> TLC 세균 오버레이 분석. 용매계로서 클로로포름/메탄올/물 60:35:8 (부피비)을 이용하여 유리- 또는 알루미늄-지지된 실리카 겔 60 HPTLC 플레이트 (Merck, Darmstadt, Germany) 상에서 박층 크로마토그래피를 수행하였다. 아니스알데하이드 염색에 의해 화학적 검출을 수행하였다 (Waldi, 1962). 세균 오버레이 분석은 전술한 바와 같이 수행하였다 (Hansson 외, 1985). 알루미늄-지지된 실리카겔 플레이트 상에서 글라이코스핑고지질 (1-4 μg/레인, 또는 도면에 부호로 표시된 바와 같이)을 크로마토그래피시킨 다음 디에틸에테르/n-헥산 1:3 (부피비) 중 0.3-0.5% 폴리이소부틸메타크릴레이트로 1분간 처리한 다음 건조 후, 2% 소의 혈청 알부민과 0.1% Tween 20을 함유하는 PBS에 2시간 동안 침적시켰다. 방사능-표지된 세균의 현탁액 (PBS에 1x10<sup>8</sup> CFU/ml 및 1-5 x 10<sup>6</sup> cpm/ml가 되도록 희석함)을 크로마토그램에 뿌리고 2시간 인큐베이션시킨 다음 PBS로 반복적으로 행구었다. 건조 후 크로마토그램을 XAR-5 X-선 필름 (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA)에 12-72시간 동안 노출시켰다.
- <162> TLC-단백질 오버레이 분석. *Erythrina cristagalli* (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA)로부터의 렉틴과 모노클로날 항체 TH2의 <sup>125</sup>I-라벨링을 Iodogen법 (Aggarwal 외, 1985)에 의해 수행하여, 평균 2x10<sup>3</sup> cpm/μg을 얻었다. 이 오버레이 공정은 Tween을 사용하지 않은 것과, 세균 현탁액 대신, 2% 소의 태아 혈청을 함유하는 PBS로 약 2x10<sup>3</sup> cpm/μl가 되도록 희석시킨 <sup>125</sup>I-표지된 단백질을 사용한 것을 제외하고는 상기 세균에 대해 설명한 것과 동일하였다.
- <163> 분자 모델링. Silicon Graphics 4D/35TG 워크스테이션 상에서 Dreiding-II 렉장 (Mayo외, 1990)을 이용하여 Biograf 분자 모델링 프로그램 (Molecular Simulation Inc.)으로 표 1에 제시된 글라이코스핑고지질의 최소에너지 배열을 계산하였다. 전하평형법 (Rappe 및 Goddard III, 1991)을 이용하여 부분적인 원자 전하를 발생시키고, 거리 의존적인 유전상수 (ε = 3.5r)를 Coulomb 상호작용에 사용하였다. 이에 더해, 최대 상호작용 (D<sub>hb</sub>)을 -4kcal mol<sup>-1</sup>로 세팅시킨 특이적인 수소결합 턴을 이용하였다. Glcβ1Cer 결합의 2면각도 (dihedral angles)는 다음과 같이 정의하였다: 글루코스 말단으로부터 시작하여 Φ = H-1 - C-1 - O-1 - C-1, Ψ = C-1 - O-1 - C-1 - C-2 및 Θ = O-1 - C-1 - C-2 - C-3 (Nyholm 및 Pascher, 1993 참조).
- <164> 50mM TRIS-HCl pH 7.5 중 5일간 섭씨 37도에서 8mM MnCl<sub>2</sub>와 0.2mg/ml ATP의 존재 하에 UDP-GlcNAc와 인간 혈청 β3-N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제와 함께 역셉터 사카라이드를 인큐베이션시킴으로써 올리고사카라이드 GlcNAcβ3Galβ4GlcNAc는 Galβ4GlcNAc (Sigma, St. Louis, USA)로부터, GlcNAcβ3Galβ4GlcNAcβ6GlcNAc는 Galβ4GlcNAcβ6GlcNAc로부터 합성하였다. Galβ4GlcNAcβ6GlcNAc는 50mM MOPS-NaOH pH 7.4 중 20mM MnCl<sub>2</sub> 존재 하에 수시간 동안 β4갈락토실트랜스퍼라제 (우유, Calbiochem, CA, USA) 및 UDP-Gal을 디사카라이드를 함께 인큐베이션시킴으로써 GlcNAcβ6GlcNAc (Sigma, St Louis USA)로부터 수득하였다. 헥사사카라이드 Galβ3GlcNAcβ3Galβ4GlcNAcβ3Galβ4Glc (1mg, Dextra labs, UK로부터)를 제조업체의 제안에 따라 400 mU β3/6-갈락토시다제 (Calbiochem, CA, USA)로 밤새 처리하였다. 올리고사카라이드를 크로마토그래피 처리에 의해 정제하고 그의 순도를 MALDI-TOF 질량 스펙트럼과 NMR로 분석하였다. GalαGalβ4GlcNAcβ3Galβ4Glc는 Dextra laboratories, Reading, UK로부터 얻었다. Lanne 외 1995에 설명된 바와 같이 당지질 GlcAβ3Galβ4GlcNAcβ

3Gal β 4Glc β Cer (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan)를 환원시켜 Glc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer로 만들었다. Lanne 외 1995에 설명된 바와 같이 GlcA β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer의 글루쿠론산의 카르복실산기의 아마이드화에 의해 당지질 유도체 Glc(A-메틸아미드) β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer를 제조하였다.

<165> **결과**

<166> 헵타글라이코실세라마이드

<167> 상기한 바와 같이 HPLC에 의해 토끼 흉선으로부터의 NeuGc α Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer를 정제하였다. 이 구조를 NMR 및 질량 스펙트로미터 (데이터 제시하지 않음)에 의해 특징화하였다. 헵타사카라이드 강글리오사이드는 본 발명자의 실험실에서 시험된 대부분의 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 분리체 (약 60개)에 의해 결합되었다.

<168> 헵타글라이코실세라마이드 물질 중 가능한 소수의 이성체 성분들을 검출하기 위해, 강글리오사이드를 데시알릴화하고, 엔도글라이코세라마이다제로 처리한 후, 방출된 올리고사카라이드를 과메틸화시켜 가스 크로마토그래피와 EI/MS로 분석하였다 (도 1A 및 1B). 두가지 사카라이드가 6-슈가 대역 (six-sugar region)에서 동정되었으며 이것은 단편 이온 m/z 219, 464, 667, 913 및 1118에 의해 확인된 바와 같이 Hex-HexNAc-Hex-HexNAc-Hex-Hex의 예상된 탄수화물 서열을 나타내었다. 메틸화전에 탄수화물을 알디톨로 전환시키자 (NaBH<sub>4</sub>를 이용한 환원에 의해) 앞서 리스트된 이온에 더해 m/z 235, 684 및 1133에서 명백한 단편 이온들이 발견되었다 (데이터 미제시). 총 물질 중 90% 이상을 차지하는 가장 많은 사카라이드 (피크 B, 도 1A 및 1B)는 m/z 182에서 강한 단편 이온에 의해 특징지어졌으며 이는 β 4GlcNAc(네오락토게열, 타일 2 탄수화물 사슬0)의 존재를 확인시켜주었다. 소량의 사카라이드 (피크 A, 도 1A 및 1B)는 m/z 182에서 매우 약한 단편 및 m/z 228에서 강한 단편 이온을 갖는 타일-1 사슬(락토게열)에 전형적인 스펙트럼을 나타냈다. 조제물은 또한 동일 계열의 4- 및 5-슈가-함유 사카라이드일 수 있는 기타 슈가-포지티브 물질도 미량으로 함유하였다. 퓨코스-함유 사카라이드는 혼합물 중에서 발견되지 않았다. 아시알로강글리오사이드의 순도는 FAB/MS 및 NMR 스펙트로스코피에 의해서도 측정하였다. 헥사글라이코실세라마이드의 네거티브 FAB/MS (도 2A)는 예상된 탄수화물 서열을 확인해주었으며 이 세라마이드들이 주로 스펙고신과 C16:0 지방산 (m/z 536.5)으로 구성되어 있음을 나타내었다. 헥사글라이코실세라마이드로부터 얻어진 NMR 스펙트럼 (도 3A)은 아노머 대역에서 β-커플링과 함께 네개의 주요 더블릿 (doublets)을 나타냈다 (J~8 Hz). 이들은 2:2:1:1의 강도 비율을 가졌다. 4.655 ppm (GlcNAc β 3), 4.256 ppm (내부 Gal β 4), 4.203 ppm (너미널 Gal β 4) 및 4.166 ppm (Glc β)에서의 시그널들은 nLc0se<sub>6</sub>-Cer에 대해 이전에 공개된 결과 (Clausen 외, 1986)와 일치하였다. 또한 4.804 ppm에서 작은 더블릿도 있었는데 이것은 1.81 ppm에서의 작은 메틸 시그널과 함께 (라지 타일 2 메틸 레조넌스 상에서 쇼올더로 나타남) 작은 분회그이 타일1 사슬이 존재함을 가리켜준다. 4.15 내지 4.25 ppm 대역에서의 오버랩으로 인해 이 타일 1 결합의 위치와 분포는 측정할 수 없었다. 타일 1 결합의 총량은 대략 10%였다. β-갈락토시다제 절단에 의해 헥사글라이코실세라마이드로부터 얻어진 헵타글라이코실세라마이드 중에서 타일 1 사슬의 양 역시 5% (도 3B)였으므로, 타일 1 결합은 사카라이드 사슬의 내외부 사이에 균일하게 분포하는 것으로 보인다. 즉, 당지질의 5%가 타일 1-타일1일 수 있다.

<169> 당지질의 결합 활성이 네오락토 (타일 2) 구조의 우세와 연관이 있는지 알아보기 위해 아시알로-당지질을 β 4-갈락토시다제 및 β-헥소스아미니다제로 처리하고, 그 생성물을 오버레이 테스트 및 TLC에 의해 조사하였다 (도 4A, 4B 및 4C). 예상했던 것 처럼, 최초 효소는 헥사글라이코실세라마이드를 헵타글라이코실세라마이드로 변환시켰고 (4A, 라인 3), 두 효소의 혼합물은 이 물질을 락토실세라마이드로 분해시켰다 (4B, 라인 6). TLC 플레이트의 육안 평가에 의하면 두 반응 모두 종결되었거나 거의 종결되었다. 동일한 결과가 시알리다제- 및 산-처리된 물질에 대해서도 얻어졌다. 헥사글라이코실세라마이드의 β 4-갈락토시다제 분해는 헵타글라이코실세라마이드 대역에서 강한 활성의 동시적인 출현 (도 4C, 라인 3)과 함께 TLC 플레이트 상에서 이 당지질 대역에서의 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 활성의 소실을 수반하였다. 헵타글라이코실세라마이드를 더욱 효소적으로 분해시키자 이 대역에서 결합활성이 사라졌다. 4-슈가 대역에서는 결합 활성의 출현이 관찰되지 않았다. TLC 플레이트의 화학적 염색의 감도는 관찰하고자 하는 기질을 추적하기에는 너무 낮았다.

<170> 별도 실험에서 모 (parent) 강글리오사이드를 부분적으로 산 분해시키고, 방출된 당지질을 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 결합 활성에 대해 조사하였다. 도 5A와 5B는 가수분해물을 <sup>35</sup>S- 표지된 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)로 오버레이시킨 후의 가수분해물의 TLC (도 5A)와 대응하는 오토라디오그램 (도 5B)를 나타낸 것이다. 헥사-, 헵타-, 테트라- 및 디글라이코실세라마이드에 위치한 당지질은 결합 활성을 나타낸 반면, 트라이글라이코실세라마이드는 불활성이었다.

- <171> 헥사-, 헨타-, 테트라글라이코실세라마이드의 결합은 적어도 세가지 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 균주 (17875, 002 및 032)를 테스트한 경우 유사하였다.
- <172> 헥사글라이코실세라마이드로부터 터미널 갈락토스를 떼어낸 후 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제시킴으로써 생성되는, 강한 결합력의 펜타글라이코실세라마이드를 더욱 자세히 조사하였다. 이 당지질의 음이온 FAB/MS 스펙트럼으로부터 HexNAc-Hex-HexNAc-Hex-Hex의 탄수화물 서열이 확인되었고, 헥사글라이코실세라마이드로서 동일한 세라마이드 조성물이 나타났다 (도 2B). 펜타글라이코실세라마이드에 대해 얻어진 양성자 NMR 스펙트럼 (도 3B)는 아노머 대역에서 5개의 메이저  $\beta$ -더블렛을 나타냈으며 이는 GlcNAc  $\beta$  3Gal  $\beta$  4GlcNAc  $\beta$  3Gal  $\beta$  5Glc  $\beta$  Cer과 일치하고, 그의 터미널 Gal  $\beta$ 에서 6개의 슈가 화합물이 스트립된 것과도 완벽하게 일치하는 것이다: 4.653 ppm (내부 GlcNAc  $\beta$  3), 4.615 ppm (터미널 GlcNAc  $\beta$  3), 4.261 ppm (2배 강도, 내부 Gal  $\beta$  4), 4.166 ppm (Glc  $\beta$ ). 3-치환된 GlcNAc  $\beta$  (타일 1 사슬)에 대응하는 4.787 ppm에서도 작은  $\beta$ -더블렛이 있다. 예상된 메틸 시그널 역시 1.82 ppm에서 모다 커다란 메틸 시그널 상에서 쇼울더로서 관찰되었지만, 오버랩으로 인해 이들 시그널을 정량하지는 못했다. 아노머 양성자의 인테그럴로부터 당지질 6%가 타일 1 사슬을 함유하였음을 산출할 수 있었다. 따라서, 타일 2 및 타일 1 탄수화물 사슬의 상대적인 비율은 6개의 슈가 당지질의 그것과 유사하였다. 헥사- 및 펜타글라이코실 분획 모두에서의 TLC 플레이트상에서 보이는 2개의 스폿은  $\beta$ 4 갈락토시다제에 대한 그들의 민감도에 의해 판단되는 바와 같이 슈가 사슬 조성물에서의 차이라기보다는 세라마이드 이종성 (heterogeneity)를 반영하는 것이었다. 상부 헨타-대역 스폿은 아시알로강글리오사이드의 비선택적 가수분해 및 아시알로생성물로부터의 4-링크된 갈락토서의 선택적 분할의 두가지 모두 후에 나타났다. 뿐만 아니라, 상부 크로마토그래피 서브분획의 함량이 높은 헥사글라이코실세라마이드가  $\beta$ 4-갈락토시다제와  $\beta$ -헥소스아미니다제에 의해 분해되자, 결과적인 락토실세라마이드는 2개의 서로 다른 크로마토그래피 밴드를 나타내었다. 크로마토그래피적으로 균일한 헥사글라이코실세라마이드는 오직 하나의 락토실세라마이드 밴드만을 결과시켰다. 헨타-대역 중의 상부와 하부 서브분획 모두 오버레이 테스트에 의해 나타나는 바와 같이 매우 활성적이었다.
- <173> 6, 5, 및 4 슈가를 갖는 네오락토계열의 글라이코스핑고지질들 (구조 2, 4, 및 5, 표 I)을 TLC 오버레이 공정을 이용하여 반-정량 테스트에 의해 시험하였다. 이 당지질들을 시리즈 희석물 중에 실리카 플레이트 상에 적용시키고, 표지시킨 세균과 오토라디오그래피로 오버레이시킨 후 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 대한 그들의 결합력을 육안으로 평가하였다 (도 6A 및 6B). 가장 활성적인 종은 펜타글라이코실세라마이드로서 이것은 0.039 nmol/스폿에 이르는 양으로 TLC 플레이트 상에 양성 응답을 나타냈다 (7회 실험으로부터 산출한 평균 값임, 표준편차  $\delta_{n-1} = 0.016$  nmol). 헥사- 및 테트라글라이코실세라마이드는 각각 당지질/스폿 c:a 0.2 및 0.3 nmole의 양으로 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 결합하였다.
- <174> 조사된 시리즈의 보다 높은 당지지에 대한 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)의 결합은 재생성이 높았다. 펜타글라이코실- 및 헥사글라이코실세라마이드에 있어서 기록된 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*), 균주 032에 대한 결합 빈도는 ~ 90% 였다 (플레이트 총 수는 약 100개).
- <175> 이소수용체 (isoreceptors) 및 결합 특이성을 나타내는 결합 분석 (도 7A 및 7B)
- <176> 네오락토 코어를 갖는 토끼 흉선으로부터의 7-슈가 글라이코스핑고지질에 더해, NeuGc  $\alpha$  3Gal  $\beta$  4GlcNAc  $\beta$  3Gal  $\beta$  4GlcNAc  $\beta$  3Gal  $\beta$  4Glc  $\beta$  Cer 및 그로부터 유도된 테트라 내지 헥사글라이코실세라마이드, 결합 특이성은 네오락토 계열로부터의 다른 당지질을 포함할 수 있다.
- <177> 오버레이 분석을 이용하여 박층 플레이트 상에 분리된 정제된 글라이코스핑고지질에 대한 헬리코박터 파일로리 (*Helicobacter pylori*) (균주 032)의 결합을 도 7A 및 7B에 도시하였다. 부가적인 수의 정제된 글라이코스핑고지질로부터 얻어진 결과와 함께 이 결과들을 표 2에 요약하였다. 네오락토테트라오실세라마이드 (레인 1) 및 NeuGc  $\alpha$  3Gal  $\beta$  4GlcNAc  $\beta$  3Gal  $\beta$  4GlcNAc  $\beta$  3Gal  $\beta$  4Glc  $\beta$  Cer로부터 유도된 5- 및 6-슈가 글라이코스핑고지질 (레인 5 및 레인 6)에 대한 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)의 결합은 상기 결과들과 동일하다. 그러나 예기치 않게도, GalNAc  $\beta$  3Gal  $\beta$  4GlcNAc  $\beta$  3Gal  $\beta$  4Glc  $\beta$  Cer ( $x_2$  글라이코스핑고지질, 레인 7) 및 데퓨코실화된 A6-2 글라이코스핑고지질 GalNAc  $\alpha$  3Gal  $\beta$  4GlcNAc  $\beta$  3Gal  $\beta$  4Glc  $\beta$  Cer (no. 12, 표 2)에 서도 결합이 발견되었다. Gal  $\alpha$  3Gal  $\beta$  4GlcNAc  $\beta$  3Gal  $\beta$  4Glc  $\beta$  Cer (B5 글라이코스핑고지질, 레인 2) 역시 결합-활성적이라는 발견과 함께, 이 결과들은 이들 글라이코스핑고지질 각각에 대해 특이적인 복수 부착인자의 존재보다는 교차-결합의 가능성을 암시하고 있다. 뿐만 아니라, 방금 언급된, 세균 부착인자에 의해 관용되는 서로 다른 5-슈가-함유 글라이코스핑고지질의 연장판은 흉선-유도된 GlcNAc  $\beta$  3-종결된 화합물에 대한 Gal  $\beta$  4였다 (레인 6). 따라서, NeuAc- $x_2$  (레인 8) 및 GalNAc  $\beta$  3-B5 (no. 25, 표 2)와 같은 다른 연장된 구조들도 모두 비결합성인 것으로 밝혀졌다. B5 중 내

부 GlcNAc β3의 아세트아미도기가 결합에 필수적임도 추가로 인식될 수 있을 것인데, 이는, 무수 히드라진 처리에 의한 이 부분의 de-N-아실화가, 네오락토테트라오실세라마이드를 사한 방식으로 처할 경우 (no. 6, 표 2) 결합의 완전한 손실을 결과시키기 때문이다 (레인 3).

<178> 5-슈가 글라이코스핑고지질의 교차-결합. 이 연구에 이용된 여러가지 상이한 네오락토-기재 글라이코스핑고지질 분자들의 결합 특성을 이해하기 위해 불활성 구조 뿐만 아니라 활성 구조의 배열 선호도를 분자 모델링에 의해 조사하였다. 도 8A, 8B, 8C 및 8D는  $x_2$  글라이코스핑고지질을 세가지 다른 서열, 즉 데퓨코실화된 A6-2, B5 및 de-N-아세틸화된 B5와 함께 보여주는데 이들은 화학적으로 변형된 B5 구조를 제외하고는 유사한 결합 강도를 나타낸다. 토끼 흉선으로부터의 5-슈가 글라이코스핑고지질 (도 9A)을 이 비교에 포함시켜야 하는데, 이는 이 구조가  $x_2$  구조와 비교할 때 오직 터미널 잔기의 4 위치에서만 상이할 뿐 동등하게 활성적이기 때문이다. 이들 네 개의 활성 구조들은 모두 네오락토 코어를 가지며 따라서 각각 GalNAc β3, GalNAc α3, Gal α3 및 GlcNAc β3에 의해 종결된다. 이 구조들의 최소 에너지 컨포머는 전술한 바와 같이 생성되었다 (Teneberg 외, 1996). 표 2에 주어진 다른 최소 에너지 구조는 문헌 (Bock 외, 1985; Meyer, 1990; Nyholm 외, 1989)에서 발견된, 이전 결과에 기초한 것이다. 시알산-종결된 글라이코스핑고지질의 경우, 예컨대 도 9C에서 보여지는 바와 같은 α3-링크된 잔기들의 글라이코사이드 2면각에 대해 *신클리널* (*synclinal*) 배열이 채택되었지만, 다른 배열 (Siebert 외, 1992), 특히 *안티클리널* (*anticlinal*) 배열의 효과도 시험하였다. 또한 α6-링크된 버라이어언트에 대해서도 동일 목적으로 여러가지 저에너지 배열 (Breg 외, 1989)을 생성시켰다.

<179> 상기한 바와 같이, 모두 네오락토 코어를 갖는, 4개의 결합-활성적인 5-슈가 글라이코스핑고지질 (nos. 10-13, 표 2)이 존재한다는 사실은, 동일 부착인자 부위에 대한 교차 결합이 이러한 관찰결과의 이유가 될 수 있음을 시사한다. 그러나, 얼핏 볼때는, 토끼 흉선으로부터 얻어진 5-슈가 화합물과 비교할 때 터미널 위치가 서로 다른 B5 글라이코스핑고지질 (후자는 Gal α3을 전자는 GlcNAc β3을 가짐)이 동등하게 활성적이어서 네오락토계열의 결합 특이성 범주 내에 든다는 사실은 놀라운 것으로 보여질 수 있다. 이들 두가지 터미널 사카라이드들이 그들의 아노머 결합 측면에서도 차이가 난다는 사실에도 불구하고 최소 에너지 구조는 위상학적으로 서로 매우 유사하며, 단지 Gal α3은 아세트아미도기가 결합되고 축 위치 (axial position)에서 4-OH를 갖는 한편 그의 고리 평면이 대응하는 5-슈가 화합물의 평면보다 약간 더 솟은 것이 다름을 알 수 있다 (도 8C 및 9A). 그러나, 4-OH 위치도, 아세트아미도기의 부재/존재도 일어날 결합에 있어서 중요하지 않은 것으로 보이는데, 이는, 각각 GalNAc β3와 GalNAc α3에 의해 종결되는,  $x_2$  및 데퓨코실화된 A6-2 글라이코스핑고지질 (도 8A, 8B) 역시 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 부착인자에 대해 유사한 친화성을 가지기 때문이다. 이러한 발견에 비추어 볼때, 인간의 적혈구로부터 분리된 Gal β3Gal β4GlcNAc β3Gal β4Glc βCer (Stellner 및 Hakomori, 1974) 역시 이 세균의 부착인자에 결합할 것으로 기대된다. 결합 규칙에 비추어 볼 때, 헬리코박터 파일로리 (*Helicobacter pylori*) 결합 에피토프 중 세가지 다른 터미널 모노사카라이드들, 즉 GlcNAc α3Gal β4GlcNAc, Glc β3Gal β4GlcNAc 및 Glc α3Gal β4GlcNAc 역시 가능한 트리사카라이드 결합 에피토프들이다. 이러한 화합물들은 이제까지 인간 조직으로부터는 알려지지 않았으며 그보다는 천연 수용체의 유사체를 나타냈었다. 불행하게도 Gal β3Gal β4GlcNAc-당지질도, 이들 세가지 유사체도 시험에 이용할 수 없었다.

<180> 네오락토 7-슈가 화합물, NeuGc α3Gal β4GlcNAc β3Gal β4GlcNAc β3Gal β4Glc βCer 역시 분자 모델링시켰다. 도 10은 연장된 배열 중 Glc βCer 결합을 갖는 최소 에너지 구조의 두가지 상이한 프로젝션을 나타낸다. 시알산에는 *syn clinal* 배열이 주어졌지만 측쇄가 없는 구조에서는 *anti* 컨포머도 가능할 것이다 (Siebert 외, 1992). 시알산은 6-슈가 화합물, 9B에 비교할 때 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 대한 결합 활성에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 보인다. 도 9A와 9B의 최초 프로젝션을 비교하면 동일한 결합 에피토프가 7-슈가 구조에서도 입수가능한 것으로 추정된다.

<181> 네오락토 결합 에피토프의 설계. 토끼 흉선 7-슈가 화합물 (nos. 1, 5, 10 및 21, 표 2)의 화학적 및 효소적 분해에 의해 얻어진 구조물들의 상대적 결합 강도는 3-슈가 서열 GlcNAc β3Gal β4GlcNAc β3이 최소 결합 서열을 구성할 수 있음을 시사한다. 따라서, 6-슈가 화합물에서는 터미널 Gal β4로부터의 억제 효과가 기대되는 반면, 네오락토테트라오실세라마이드의 경우 GlcNAc β3의 결여는 결합 강도를 감소시키는데 이는 에피토프의 3 슈가들 중 오직 2개만이 존재하기 때문이다. 내부 GlcNAc β3의 필수성은 아민에 대한 아세트아미도기의 de-N-아실화에 이어 네오락토테트라오실세라마이드와 B5 두가지 모두에 대한 세균 결합력의 손실에 의해 명백히 입증된다 (nos. 6 및 14, 표 2). 이 비결합은 이들 글라이코스핑고지질들의 변형된 배열 선호성 및/또는 부착인자와 아세트아미도 부분 간의 바람직한 상호작용의 손실을 일으킬 수 있다. 그러나, 내부 Gal β4의 변형된 오리엔테이션이 결합 에피토프에 대한 접근성을 입체적으로 방해할지 짐작하기란 어려운 일이다. 따라서, 최소 결합 서열이

GlcNAc β3Gal β4GlcNAc β3 서열을 포함해야만 하는 것으로 밝혀졌으므로, P<sub>1</sub>, H5-2 및 두가지 시알릴파라글로보사이드 구조 (nos. 15, 18-20, 표 2)에 대한 결합 부재를 합리화시키는 것이 이제는 용이하다. 이는, 이들 연장체들이 제안된 결합 에피토프와 직접적으로 간섭하기 때문이다. 또한, 네오락토테트라오실세라마이드 (no. 26, 표 2)의 Gal β4에 부착된 Gal β4GlcNAc β의 β6-링크된 브랜치를 갖는 소의 버터밀크 (Teneberg 외, 1994)로부터의 글라이코스핑고지질 역시 결합 에피토프에 대한 접근이 차단됨으로 해서 비결합성이다.

<182> 표 2 중 결합-활성적인 서로 다른 5-슈가 서열들의 연장은 흥선-유도된 구조에 대한 Gal β4 부가만이 관용됨을 보여주는데, 이는 4-OH 위치가 횡방향이나 종방향일 수 있으나, 입체 장애로 인해 결합 친화성이 후속적으로 손실된다는 관찰과 잘 들어맞는 것이다. x<sub>2</sub>에 대한 NeuAc α3의 부가 또는 B5에 대한 GalNAc β3의 부가는 따라서 결합력을 완전히 손상시키는 결과를 초래한다 (nos. 24 및 25, 표 2). H5-2에서와 같이 Fuc α2 유닛의 부정적인 영향은 A6-2와 B6-2 (nos. 22 및 23, 표 2) 두가지 모두에 대한 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)의 비결합성에 의해 확인되는 것으로 나타났다. B5에서 발견된 것과 동일한 트리사카라이드에 의해 종결된, 연장된 구조 (no. 28, 표 2)의 경우, B5에서처럼, 비록 두번째 내부 결합 에피토프도 존재하기는 하나, 관찰된 결합에 대해 책임이 있는 것은 이 말단 트리사카라이드임이 분명하다. 그러나 내부 에피토프에 대한 결합은 배제될 가능성이 가장 큰데 이는 끝에서 두번째 (penultimate) Gal β4가 수득될 것으로 기대되고 또는 그러나 균주의 종류와 증식 조건의 두가지 모두에 의존하지 않을 것으로 기대되기 때문이다 (Miller-Podraza 외, 1996, 1997 a,b).

<183> 요약하면, 최대 활성을 얻기 위해서는 글라이코스핑고지질의 네오락토 계열의 결합 에피토프는 3-슈가 서열 GlcNAc β3Gal β4GlcNAc β3을 포함하여야만 한다는 것이다. 이 연구에 이용된 잠재적인 이소수용체 (isoreceptors)의 결합 패턴을 비교한 결과 도 8A-D 및 도 9A-D에 나타난 구조들로부터, 터미널 GlcNAc β3의 아세트아미도기와 동일 잔기상의 4-OH (이들은 중요하지 않음)을 제외하고는, 이들 트리사카라이드의 거의 모두가 발생할 결합에 있어서 중요하다고 추론할 수 있다.

<184> 수용체의 생물학적 존재. 생체외에서 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 대한 수용체로서 호환적으로 기능할 수 있는 4개의 5-슈가 글라이코스핑고지질 중, x<sub>2</sub>만이 인체 조직 중에서 자연발생하나, 이것은 중앙 조직에서만 동정되었을 뿐 위암 이외의 위점막에서는 아직까지 존재하는 것으로 밝혀진 바 없다 (Kannagi 외, 1982b). 그러나, Thorn 외, 1992의 연구 결과에 의하면, x<sub>2</sub> 글라이코스핑고지질과 터미널 GalNAc β3Gal β4GlcNAc β 서열을 갖는 연장된 구조가 몇몇 인체 조직에 존재하나, 위장 상피 조직은 불행하게도 조사된 것 중에 포함되지 않았다. 따라서, 몇가지 혈액군 A 개체 (레인 1-6)의 인체 위점막의 상피세포로부터 얻은 총 비산성 글라이코스핑고지질 조제물의 GalNAc β3Gal β4GlcNAc-특이적인 모노클로날 항체 TH2에 대해 박층 크로마토그램 오버레이가 수행되었다 (도 11B). 그러나, 이 분석을 이용하여 위장의 상피로부터 유도된 글라이코스핑고지질에 대해서는 어떠한 검출가능한 결합도 관찰되지 않았다. 도 11A, 11B 및 11C에 이. 크리스타갈리(*E. cristagalli*)로부터의 Gal β4GlcNAc-결합 렉틴을 이용한 대응 오버레이 결과를 도시하였다. 위장 상피 기원의 여러가지 글라이코스핑고지질 조제물 중 처음 세개의 레인은, 아마도 네오락토테트라오실세라마이드에 대응하는 4-슈가 대역 중의 밴드에 대해 약한 결합을 나타냈으나, 이 글라이코스핑고지질의 양이 작았기 때문에 이들 밴드에 대한 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)의 검출가능한 결합은 인지되지 못했다 (Teneberg 외, 2001).

<185> 뿐만 아니라, 서열 Gal α3Gal β4GlcNAc β는 상기한 B5 글라이코스핑고지질 중에 존재하던 또는 연장된 구조 중에 존재하던 (no. 28, 표 2), Gal α3의 부가에 책임이 있는 트랜스퍼라제의 비발연으로 인해 정상적인 인체 조직에서는 발견되지 않을 가능성이 있다 (Larsen 외, 1990). 따라서 그로부터 얻어지는 결론은, 상기 동정된 결합 에피토프를 지니는 표적 수용체(들)이 위장의 상피세포 표면에 존재하면, 이들은 지질-기초 구조물이 아니라, 당단백질 중 반복적인 N-아세틸락토스아민 요소에 기초할 것이라는 것이다.

<186> 그러나, 소화성 궤양과 연관된 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 균주 (본 발명에서 주로 사용된 균주이기도 함)는 옅소닌처리되지 않은 경우에조차, 과립구로부터의 염증성 응답을 자극한다 (Rautelin 외, 1994a,b). 이 세균의 대식작용의 초기 단계는 특이적인 렉틴-유사 상호작용과 연관이 있을 가능성이 크며 이는 과립구의 응집을 초래한다 (Ofek 및 Sharon, 1998). 이러한 대식작용 후에 산화적 버스트 반응이 일어나는데 이것은 결론적으로 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)-관련 질환의 원인이 될 수 있다 (Babior, 1978). 표 2의 no. 21을 비롯하여, 네오락터 코어와 반복적인 락토스아민 단위를 모두 갖는, 과립구로부터의 몇가지 산성 및 비산성 글라이코스핑고지질과, 시알산의 아세트아미도기가 아세틸 형태인 시알릴화된 7-슈가 화합물 (no. 27, 표 2)이 분리 및 특징화된 바 있으며 (Fukuda 외, 1985; Stroud 외, 1996), 따라서 백혈구 세포 표면 상에

서 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 대한 잠재적인 수용체로서 작용할 수 있다. 뿐만 아니라,  $x_2$  글라이코스핑고지질도 동일 소스로부터 분리된 바 있다 (Teneberg, S., 미출판).

<187> 도 11B로 돌아가서, 모노클로날 항체 TH2는 실제로 5-슈가 대역의 밴드들 중,  $x_2$  글라이코스핑고지질에 대응할 수 있는 과립과와 적혈구 (각각 라인 7 및 8) 두가지 모두에 대해 결합하는 것으로 나타났다 (Teneberg, S., 미출판; Thorn 외, 1992; Teneberg 외, 1996). 마찬가지로, 오버레이 분석 대신 *E. cristagalli* 렉틴을 이용하자 과립과와 적혈구 모두에서 네오락토테트라오실세라마이드가 존재하는 것으로 밝혀졌다 (도 11c, 라인 7 및 8). 이들 두가지 경우에서 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)는 네오락토테트라오실세라마이드에 결합한다 (Bergstrom, J., 미출판). 과립구의 경우, 아마도 N-아세틸락토스아민 단위 한개 만큼 연장된 네오락토테트라오실세라마이드에 대응하는, 6-슈가 대역 중 추가로 비교적 약한 결합이 Fukuda 등, 1985의 결과에 따라 발견된다 (참조 no. 21, 표 2). 그러나 이들 글라이코스핑고지질이 상기한 응집 프로세스에서의 주된 표적인지는 아직까지 밝혀지지 않고 있다.

<188> 네오당지질 및 신규한 당지질의 분석

<189> 올리고사카라이드  $\text{GlcNAc } \beta \text{3Gal } \beta \text{4GlcNAc}$ ,  $\text{GlcNAc } \beta \text{3Gal } \beta \text{4GlcNAc } \beta \text{6GlcNAc}$ ,  $\text{Gal } \alpha \text{3Gal } \beta \text{4GlcNAc } \beta \text{3Gal } \beta \text{4Glc}$  및  $\text{GlcNAc } \beta \text{3Gal } \beta \text{4GlcNAc } \beta \text{3Gal } \beta \text{4Glc}$  및 말토헤타오스 (Sigma, Saint Louis, USA)를 시아노보로하이드라이드에 의해 4-헥사데실아닐린 (약칭 HDA, Aldrich, Stockholm, Sweden 제품)으로 환원적으로 아민화시켰다 (Halina Miller-Podraza, 출판 예정). 생성물을 질량 스펙트로메트리에 의해 특징화시키자  $\text{GlcNAc } \beta \text{3Gal } \beta \text{4GlcNAc}$  (red)-HDA,  $\text{GlcNAc } \beta \text{3Gal } \beta \text{4GlcNAc } \beta \text{6GlcNAc}$  (red)-HDA,  $\text{Gal } \alpha \text{3Gal } \beta \text{4GlcNAc } \beta \text{3Gal } \beta \text{4Glc}$  (red)-HDA,  $\text{GlcNAc } \beta \text{3Gal } \beta \text{4GlcNAc } \beta \text{3Gal } \beta \text{4Glc}$  (red)-HDA 및 말토헤타오스(red)-HDA [여기서 "(red)"는 헥사데실아닐린 (HDA)의 아민기와 사카라이드의 환원말단 글루코스로부터의 환원적 아민화에 의해 형성되는 아민 결합 구조를 의미한다]인 것으로 확인되었다. 상술한 TLC 오버레이 분석에서 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)와 관련해서 화합물  $\text{Gal } \alpha \text{3Gal } \beta \text{4GlcNAc } \beta \text{3Gal } \beta \text{4Glc}$  (red)-HDA와  $\text{GlcNAc } \beta \text{3Gal } \beta \text{4GlcNAc } \beta \text{3Gal } \beta \text{4Glc}$  (red)-HDA는 명백한 결합 활성을 가졌으며,  $\text{GlcNAc } \beta \text{3Gal } \beta \text{4GlcNAc } \beta \text{6GlcNAc}$  (red)-HDA는 강한 결합 활성을 가진 반면,  $\text{GlcNAc } \beta \text{3Gal } \beta \text{4GlcNAc}$  (red)-HDA와 말토헤타오스(red)-HDA는 약하게 결합하거나 불활성인 것으로 나타났다. 이 실시예는 테트라사카라이드  $\text{GlcNAc } \beta \text{3Gal } \beta \text{4GlcNAc } \beta \text{3Gal}$ 이 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 결합하는 구조임을 보여준다. 환원 말단 Glc-잔기는 아마도 결합에 필요하지 않을 것인데, 이는 환원이 Glc-잔기의 피라노스 고리 구조를 파괴하기 때문이다. 이와 대조적으로, 환원 말단 GlcNAc의 본래의 고리 구조는 트리스카라이드  $\text{GlcNAc } \beta \text{3Gal } \beta \text{4GlcNAc}$ 의 우수한 결합을 위해 필요하다.

<190> NHK-1 당지질  $\text{GlcA } \beta \text{3Gal } \beta \text{4GlcNAc } \beta \text{3Gal } \beta \text{4Glc } \beta \text{Cer}$ 의 생합성 전구체 유사체, 및 신규한 당지질  $\text{Glc } \beta \text{3Gal } \beta \text{4GlcNAc } \beta \text{3Gal } \beta \text{4Glc } \beta \text{Cer}$  및  $\text{Glc}$  (A-메틸아미드)  $\beta \text{3Gal } \beta \text{4GlcNAc } \beta \text{3Gal } \beta \text{4Glc } \beta \text{Cer}$ 를 TLC 오버레이 분석하자 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 대해 결합 활성을 갖는 것으로 관찰되었다.  $\text{Glc}$ (A-메틸아미드)는 카르복실산기가 메틸아민에 의해 아미드화되어 있는 글루쿠론산 유도체를 의미한다.  $\text{Glc } \beta \text{3Gal } \beta \text{4GlcNAc } \beta \text{3Gal } \beta \text{4Glc } \beta \text{Cer}$  구조는 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 대해 강력한 결합 활성을 나타냈고  $\text{Glc}$  (A-메틸아미드)  $\beta \text{3Gal } \beta \text{4GlcNAc } \beta \text{3Gal } \beta \text{4Glc } \beta \text{Cer}$ 은 에 대해 매우 강력하게 결합하였다.

<191> 트랜스갈라이코실화에 의한  $\text{GlcA } \beta \text{3Gal } \beta \text{4Glc(NAc)}$ 의 제조

<192> 억셉터 사카라이드  $\text{Gal } \beta \text{4Glc}$  또는  $\text{Gal } \beta \text{4GlcNAc}$  (약 10-20 mM)을 pH 약 5의 완충액 중 10배물 과량의 파라니트로페닐-베타-글루쿠론산 및 소의 간  $\beta$ -글루쿠로니다제 (20,000U, Sigma)와 함께 섞여 37도에서 이 용액을 교반하면서 이틀간 인큐베이션시킨다. 생성물을 HPLC로 정제한다.

**참고문헌**

- 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
- Ångström, J., Teneberg, S., Abul Milh, M., Larsson, T., Leonardsson, I., Olsson, B.-M., Öwegård 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.
- Appelmelk, B.J., Faller, G., Claves, 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.
- 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 Thurin, J. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 8545-8551.
- 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.
- 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., Wadström, T., Folkesson, H., Planeta Malecka, I., Czkwianianc, E., Rehcinski, T., and Rudnicka, W. (1998) *Immunol. Lett.* **61**, 119-125.
- Clayes, D., Faller, 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 Sinaÿ, 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., Akyön, 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.
- 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.
- 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.-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
- 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., 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) 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
- 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.
- 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.
- 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.
- 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
- 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.
- 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.
- 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.
- Parsonnet, J., Friedman, G.D., Vandersteen, D.P., Chang, Y., Vogelman, J.H., Orentreich, N. and Sibley, R.K. (1991) *N. Engl. J. Med.*, **325**, 1127-31
- 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.
- 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.
- 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., Mobasseri, A., and Zopf, D. (1997) *Infect. Immun.* **65**, 750-757
- Soltész, 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.

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

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 Milh, M., Lanne, B., Jovall, P.-Å., Karlsson, H., Ångström, J., Ölwegård Halvarsson, M., Danielsson, D., Ljung, Å., Wadström, T. and Karlsson, K.-A. (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.

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.

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.

<197>

**도면의 간단한 설명**

<122>

도 1A 및 도 1B는 엔도글라이코세라미다제 절단에 의해 헥사글라이코실세라미드로부터 얻어진 과메틸화 올리고사카라이드(permethylated oligosaccharides)의 EI/MS를 나타낸 도면. 올리고사카라이드의 가스 크로마토그램 (위)과 피크 A 및 B의 EI/MS 스펙트럼 (아래)이 각각 도시되어 있다.

<123>

도 2A 및 도 2B는 헥사-(2A) 및 펜타글라이코실세라미드 (2B)의 음이온 FAB 질량 스펙트럼을 나타낸 도면.

<124>

도 3A 및 도 3B는 6-슈가 당지질 (six-sugar glycolipid) (3A)의 아노머 대역과 5-슈가 당지질 (3B)의 아노머 대역을 보여주는 양성자 NMR 스펙트럼. 마이너 유형 1 성분에 대한 우수한 시그널 대 노이즈를 얻기 위해 밤새 수행하여 얻어진 스펙트럼이다.

<125>

도 4A, 도 4B 및 도 4C는 토끼의 흉선 글라이코스핑고지질의 효소 분해 결과를 나타낸 도면이다. C/M/H<sub>2</sub>O (60:35:8, 부피비)에서 실리카겔 박층 플레이트를 전개시켰다. 도 4A와 4B는 4-메톡시벤즈알데하이드 가시화 플레이트를 나타내고, 도 4C는 <sup>35</sup>S-표지된 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)로 오버레이한 후의 오토라디오그램을 나타낸 도면이다. 1. 헵타글라이코실세라미드 (구조 1, 표 I); 2. 데시알릴화 헵타글라이코실세라미드 (산 처리 후에 얻어짐); 3. β4-갈락토시다제로 처리된 데시알릴화 헵타글라이코실세라미드; 4. 시알리다제 및 β4-갈락토시다제로 처리된 헵타글라이코실세라미드; 5. 인간의 적혈구로부터 얻어진 레퍼런스 글라이코스핑고지질 (락토실세라미드, 트리헥소실세라미드 및 글로보사이드); 6. β4-갈락토시다제 및 β-헥소사미니다제로 처리된 데시알릴화 헵타글라이코실세라미드; 7. 시알리다제, β4-갈락토시다제 및 β-헥소사미니다제로 처리된 헵타글라이코실세라미드.

- <126> 도 5A 및 도 5B는 토끼의 흉선 헵타글라이코실세라마이드를 부분적으로 산 가수분해한 후 얻어진 산물의 TLC 결과이다 (구조 1, 표 I). 전개 용매는 도 4A, 4B, 및 4C의 것과 동일하였다. 도 5A, 4-메톡시벤즈알데하이드-가시화 플레이트; 도 5B, <sup>35</sup>S-표지된 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)로 오버레이한 후의 오토라디오그램. 1, 헵타글라이코실세라마이드; 2, 데시알릴화 헵타글라이코실세라마이드 (산 처리); 3, 헵타글라이코실세라마이드; 4, 가수분해물; 5, 레퍼런스 글라이코스핑고지질 (도 4A, 4B, 및 4C 참조).
- <127> 도 6A 및 도 6B는 글라이코스핑고지질의 희석 시리즈를 나타낸다. TLC 플레이트에 대한 결합 활성을 세균 오버레이 기술을 이용하여 측정하였다. TLC 전개 용매는 도 4A, 4B, 및 4C의 경우와 같았다. 여러가지 당지질을 플레이트에 동물량씩 도포하였다. 당지질의 정량은 육탄당 함량에 기초하였다. 도 6A, 헥사 및 헵타글라이코실세라마이드 (구조 2 및 3, 표 I); 도 6B, 펜타- 및 테트라글라이코실세라마이드 (구조 4 및 5, 표 I). 당지질의 양 (pmol로 표시함)은 다음과 같았다: 1, 1280 (각각); 2, 640; 3, 320; 4, 160; 6, 80; 6, 40; 7, 20 pmols (각각).
- <128> 도 7A 및 7B는 4-메톡시벤즈알데하이드에 의해 검출된 분리된 글라이코스핑고지질의 박층 크로마토그램 (도 7A) 및 방사능 표지시킨 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 균주 032의 결합 후 오토라디오그램. 용매계로서 클로로포름/메탄올/물 60:35:8 (부피비)을 이용하여 알루미늄-백 실리카겔 60 HPTLC 플레이트 (Merck)상에서 글라이코스핑고지질을 분리하였다. 후술하는 "재료 및 방법"란에 설명된 바와 같이 섹션결합 분석을 수행하였다. 오토라디오그래피는 72시간 동안 수행하였다. 각각의 레인을 다음을 함유하였다:
- <129> 라인 1) Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer (네오락토테트라오실세라마이드), 4 μg ;
- <130> 라인 2) Gal α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer (B5 글라이코스핑고지질), 4 μg ;
- <131> 라인 3) Gal α 3Gal β 4GlcNH<sub>2</sub> β 3Gal β 4Glc β 1Cer, 4 μg ;
- <132> 라인 4) Gal α 3 (Fuc α 2) Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer (B6 타일 2 글라이코스핑고지질), 4 μg ;
- <133> 라인 5) GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer, 4 μg ;
- <134> 라인 6) Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer, 4 μg ;
- <135> 라인 7) GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer(x<sub>2</sub> 글라이코스핑고지질), 4 μg ;
- <136> 라인 8) NeuAc α 3GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer (NeuAc-x<sub>2</sub>), 4 μg ;
- <137> 라인 9) Fuc α 2Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer (H5 타일 2 글라이코스핑고지질), 4 μg ;
- <138> 라인 10) NeuAc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer (시알릴네오락토테트라오실세라마이드), 4 μg. 글라이코스핑고지질의 소스는 표 2에 제시된 것과 동일하다.
- <139> 도 8A, 8B, 8C 및 8D는 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 결합하는 세가지 글라이코스핑고지질의 산출된 최소 에너지 배열을 나타낸 도면이다;
- <140> GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer (8A),
- <141> GalNAc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer (8B) 및
- <142> Gal α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer (8C).
- <143> 비결합 Gal α 3Gal β 4GlcNH<sub>2</sub> β 3Gal β 4Glc β Cer 구조(8D)도 도시되어 있다. 산출된 최소 에너지 구조의 각각의 올리고사카라이드 부분의 정면도도 도시되어 있다. 아노머성 (anomerity), 아세트아미도기의 존재여부, 말단 당의 4-OH의 중형 위치의 차이 및 말단 α3-링크된 화합물의 고리 평면이 β3-링크된 것에 대응하는 평면보다 다소 높고 솟아올랐다는 사실에도 불구하고, 이들 구조 사이와 토끼 흉선으로부터 유래한 GlcNAc β3-말단 구조 (예컨대 도 9A) 사이에는 실질적으로 위상학적 유사성이 존재하며, 따라서 세균성 부착인자에 대한 이들의 유사한 친화도가 이로부터 설명된다. 이와 대조적으로, 내부 GlcNAc β3의 아세트아미도기는 결합에 있어서 필수적이다 (도 8C 및 8D 참조).
- <144> 도 9A, 도 9B, 도 9C 및 도 9D. 결합-활성 글라이코스핑고지질 GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer 및 Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4-GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer (9B) 및 비결합 글라이코스핑고지질 NeuAc α 3GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer (9C) 및 Gal α 3 (Fuc α 2) Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer (9D)의 산출된 최소 에너

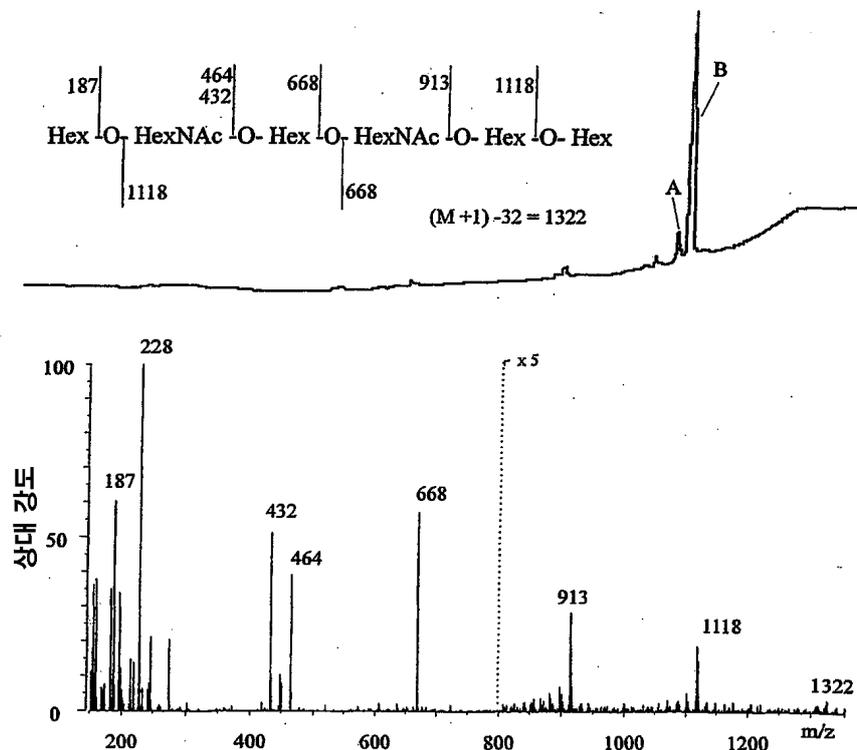
지 배열. 마지막 2개의 익스텐전 (도 9C 및 도 9D)은 헬리코박터 파일로리와 결함을 피하지만, 앞의 것 (도 9B)은 이를 관용하나 감소된 친화도가 초래된다. B5의 내부 GlcNAc의 아세트아미도 부분의 de-N-아실화 (도 8A, 8B, 8C 및 8D)가 결함을 완전히 회피한다는 발견과 함께, 말단에 위치한 N-아세틸갈락토사민의 아세트아미도기가 비필수적임에 비추어 볼때, 결합 에피토프를 구성하는 부분은 도 8C에 도시된 B5의 말단 트리사카라이드로 이루어졌음이 분명하다.

<145> 도 10은 서로에 대해 90도로 회전된 두가지 프로젝션으로 도시된 7-슈가 화합물 NeuGc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer의 최소 에너지 배열을 나타낸다. 관찰자의 오리엔테이션을 쉽게 하기 위해서 오직 2개의 내부 GlcNAc 잔기의 아세트아미도기의 메틸 카본 원자뿐만 아니라 시알산의 글라이콜릴 부분의 말단 탄소 원자들만을 검게 나타내었다. Glc β cer 결합에 있어서는 프레젠테이션을 위해 연장된 배열을 임의로 선택되었지만 최소 결합 서열 GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3이 여기에 나타난 다른 것들보다 Glc β Cer 배열 중의 근접 부착 인자를 향해 가장 잘 노출되어 있다.

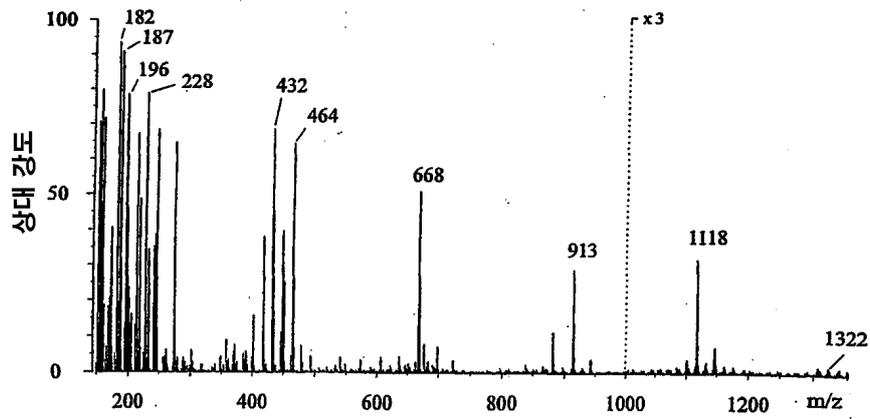
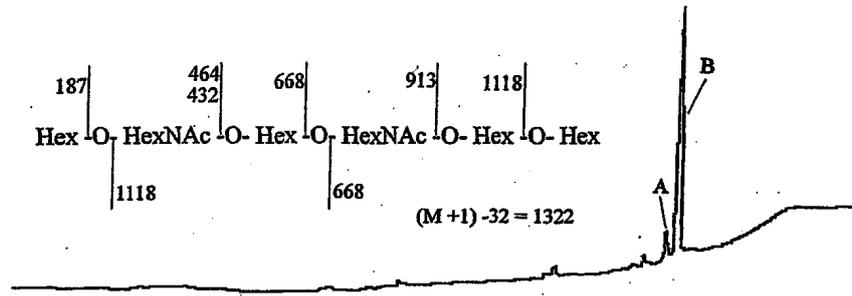
<146> 도 11A, 도 11B 및 도 11C. 박층 크로마토그램 상에 분리된 인간의 위점막의 상피세포, 인간의 과립구 및 인간의 적혈구로부터의 총 비산성 글라이코스핑고지질 분획에 대한 모노클로날 항체 TH2 (도 11B) 및 이. 크리스타갈리 (*E. cristagalli*)로부터의 렉틴 (도 11C)의 결합. 도 11A에서는 동일 분획들이 4-메톡시벤즈알데하이드로 염색된 것이 도시되어 있다. 도 11B와 11C의 경우 12시간 오토라디오그래피를 수행한 결과였다. 라인 1-6에서 다섯가지 서로 다른 혈액 그룹 A 개인들의 인간 위점막의 상피 세포로부터의 총 비산성 분획 80 μg을 적용한 반면, 라인 6에서는, 인간 과립구로부터의 총 비산성 분획 40 μg, 라인 7에는 인간 적혈구로부터의 총 비산성 분획 40 μg을 적용하였다. 오버레이 분석을 "재료 및 방법"란에 설명된 바와 같이 수행하였다.

도면

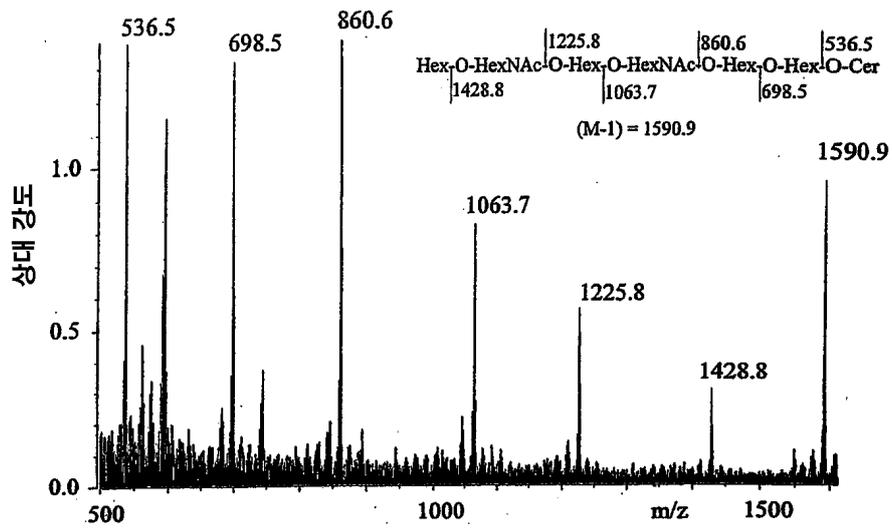
도면1A



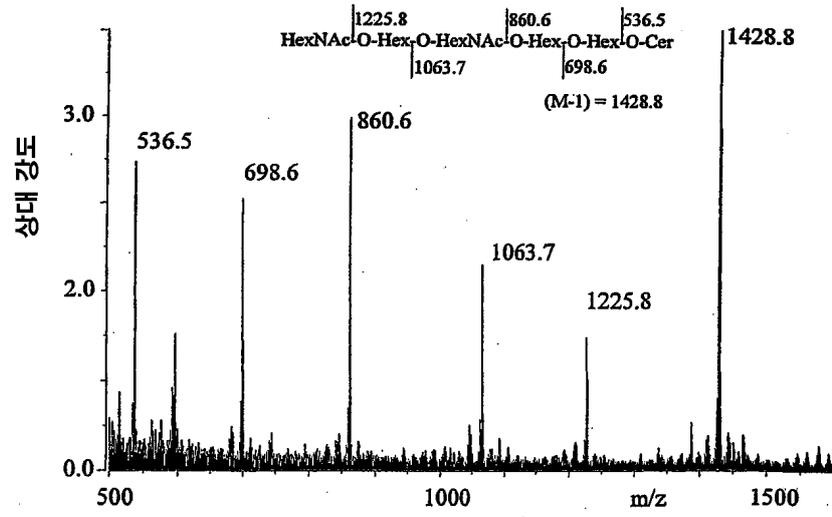
도면1B



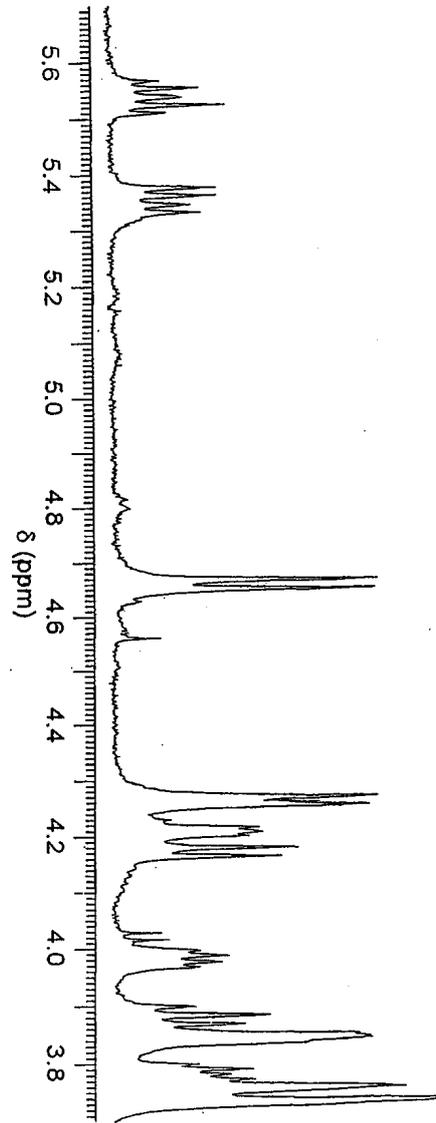
도면2A



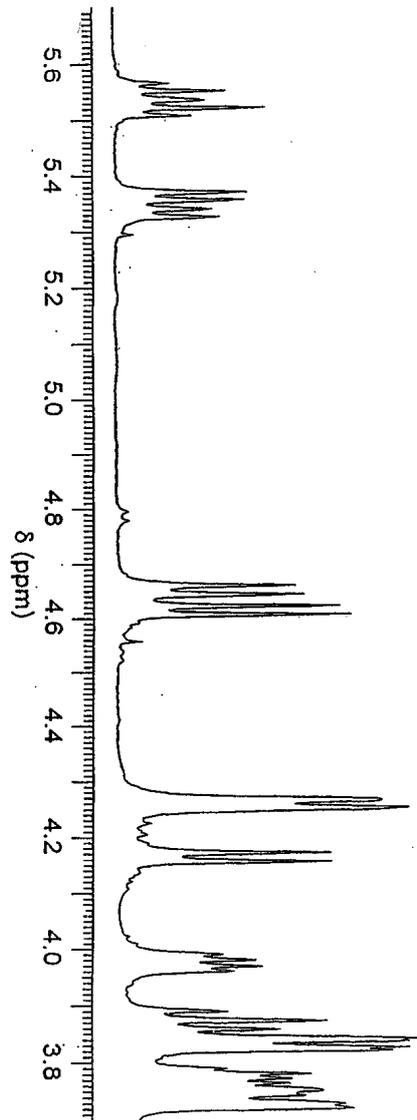
도면2B



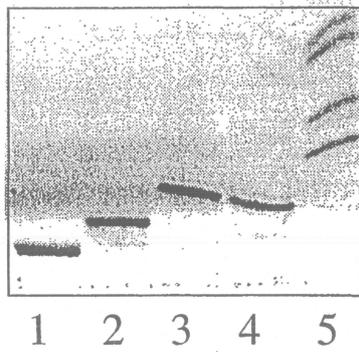
도면3A



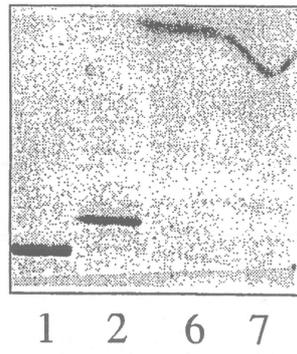
도면3B



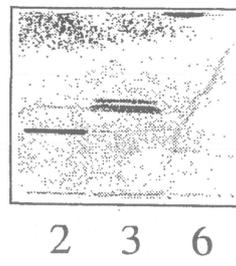
도면4A



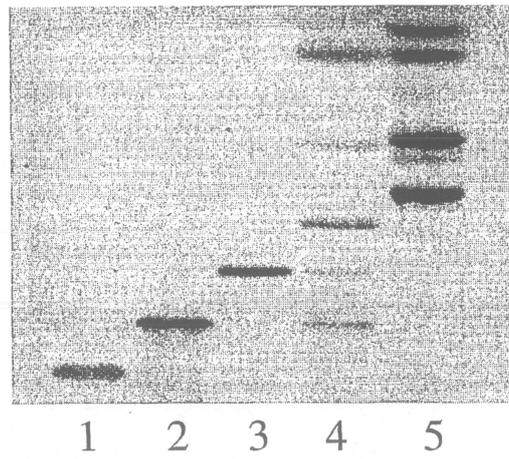
도면4B



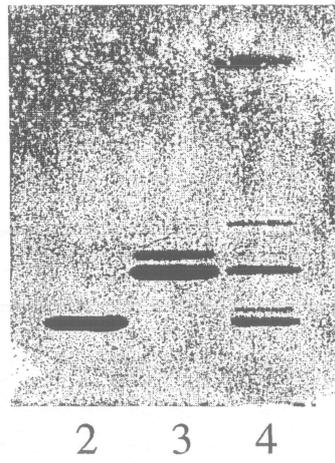
도면4C



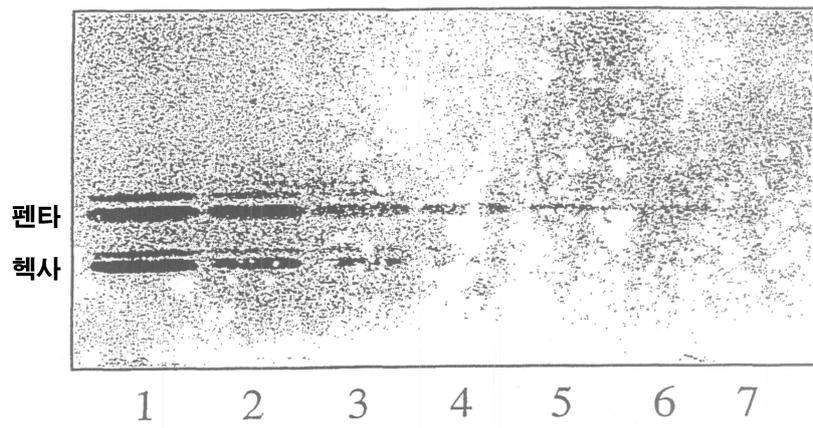
도면5A



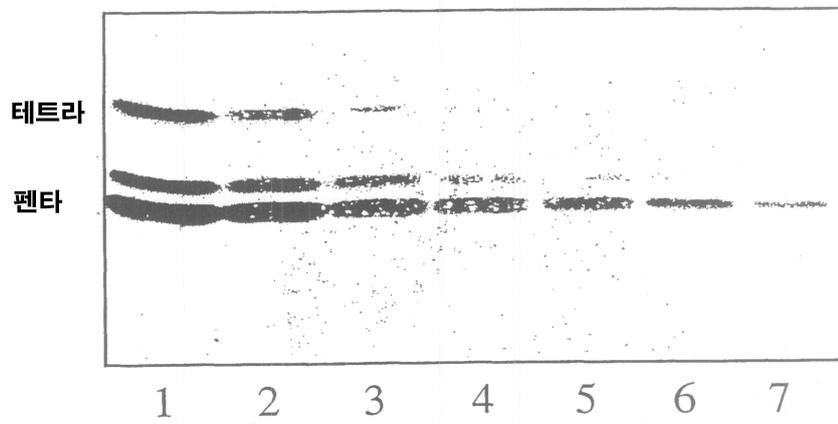
도면5B



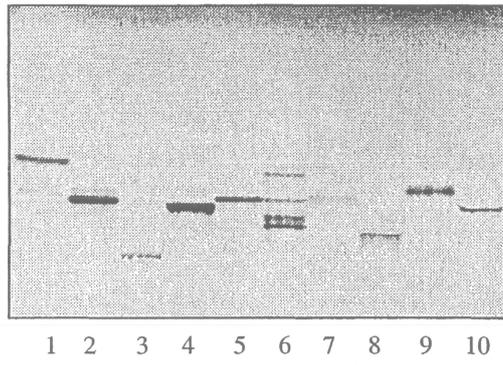
도면6A



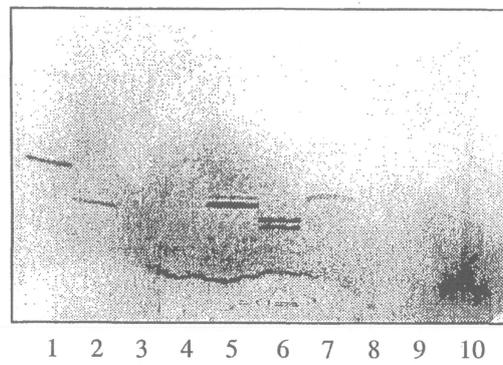
도면6B



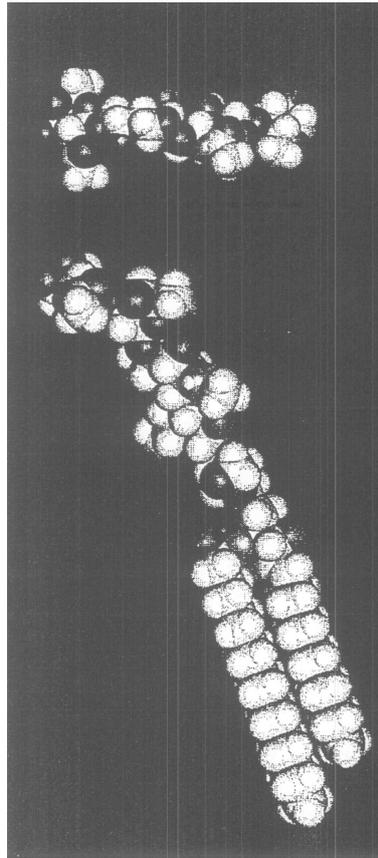
도면7A



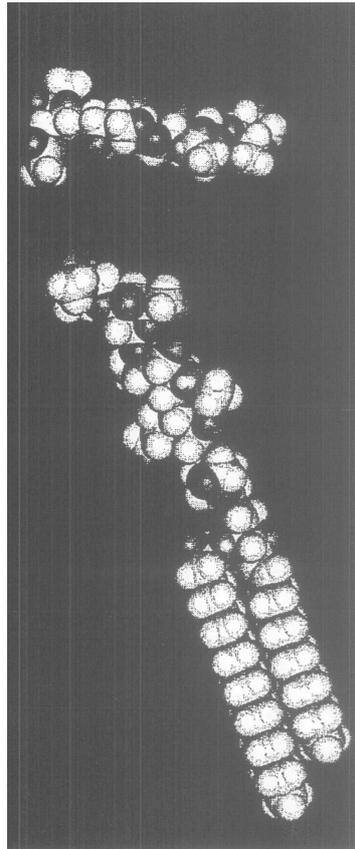
도면7B



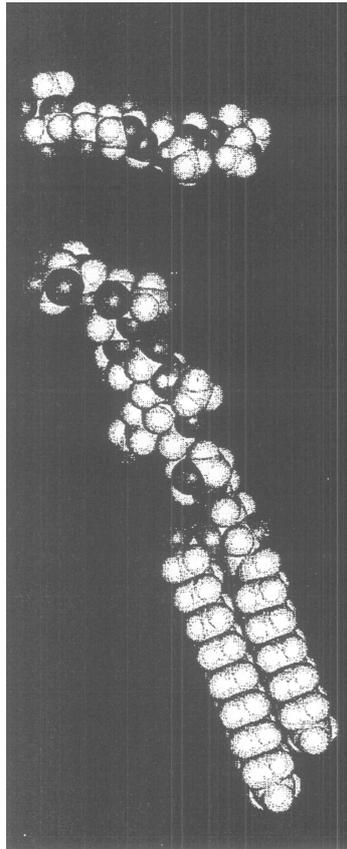
도면8A



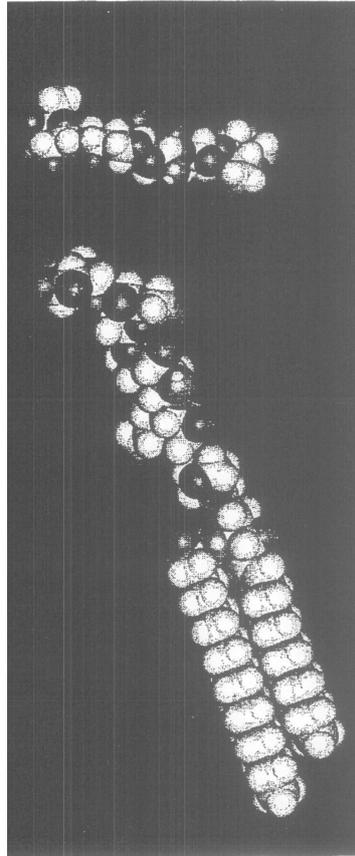
도면8B



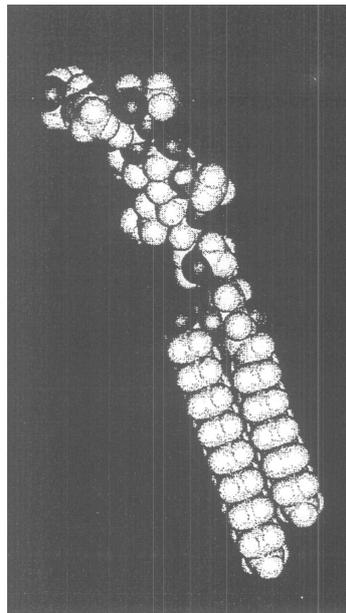
도면8C



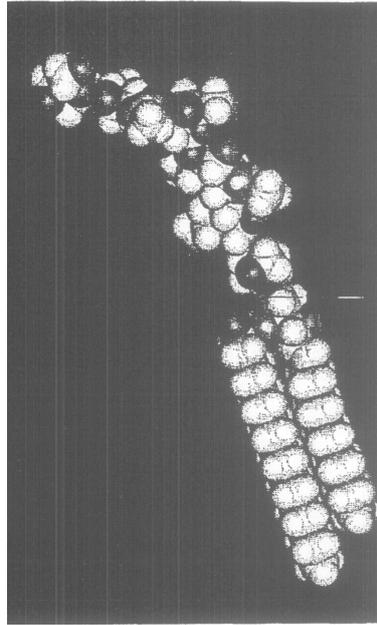
도면8D



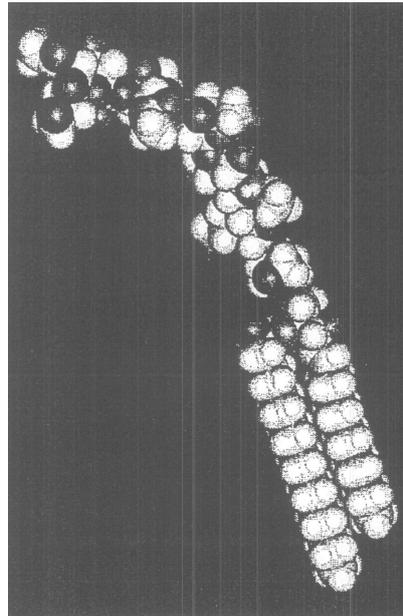
도면9A



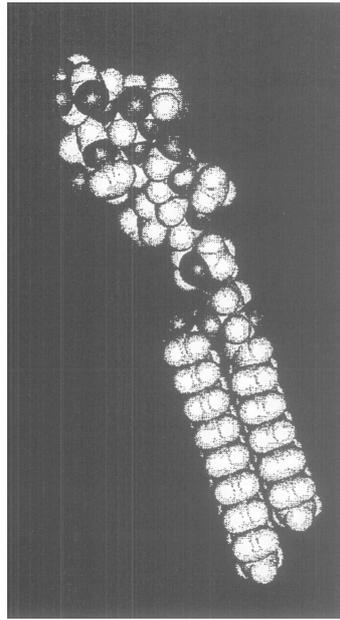
도면9B



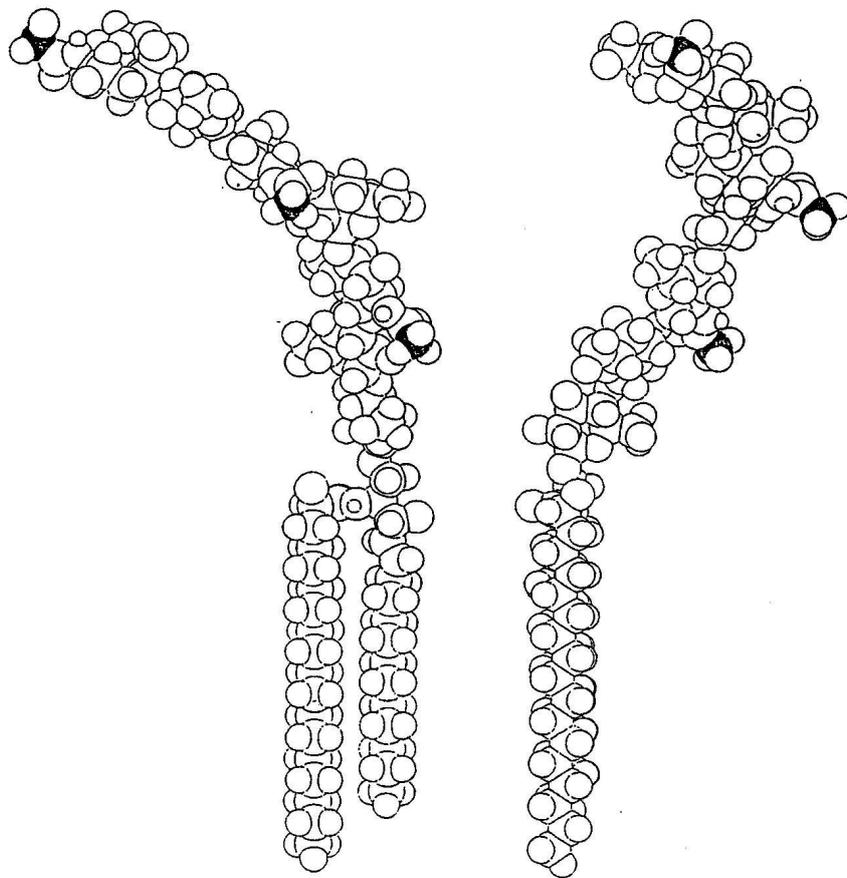
도면9C



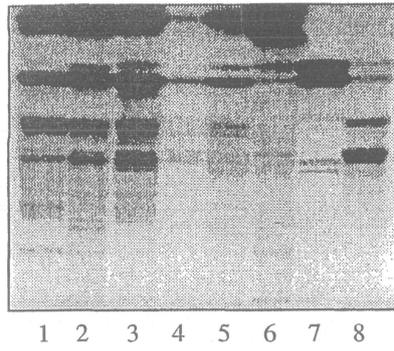
도면9D



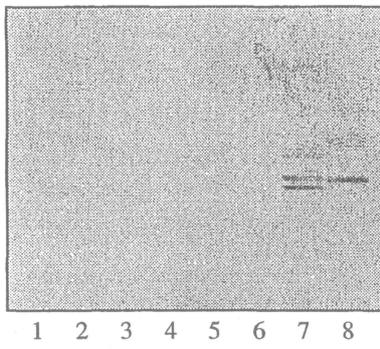
도면10



도면11A



도면11B



도면11C

