

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014 년 10 월 9 일 (09.10.2014)



(10) 국제공개번호
WO 2014/163421 A1

- (51) 국제특허분류:
G01N 33/53 (2006.01) *G01N 30/00* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/002912
- (22) 국제출원일: 2014 년 4 월 4 일 (04.04.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0036748 2013 년 4 월 4 일 (04.04.2013) KR
- (71) 출원인: **충남대학교산학협력단 (INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, CHUNG-NAM NATIONAL UNIVERSITY)** [KR/KR]; 305-764 대전시 유성구 대학로 99 (궁동), Daejeon (KR).
- (72) 발명자: **안현주 (AN, Hyun Joo)**; 305-772 대전시 유성구 지족로 343, 211-2002 (지족동, 반석마을아파트), Daejeon (KR). **김재한 (KIM, Jae-Han)**; 305-772 대전시 유성구 지족로 343, 211-2002 (지족동, 반석마을아파트), Daejeon (KR). **한찬영 (HAN, Changyoung)**; 320-803 충청남도 논산시 번영로 29 번길 10, 103-401 (취암동, 취암 리슈빌아파트), Chungcheongnam-do (KR).
- (74) 대리인: **강성혜 (KANG, Seong-Hea)**; 305-340 대전시 유성구 대덕대로 530, 다-205 (도룡동), Daejeon (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

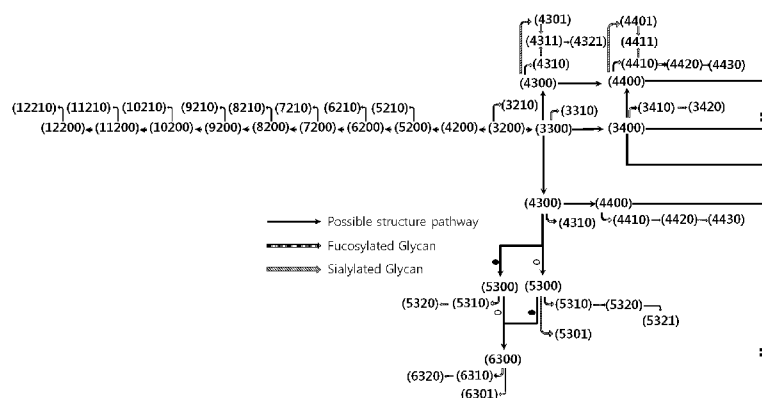
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: HUMAN SERUM SUGAR CHAIN MAP AND METHOD FOR TESTING SERUM SAMPLE USING SAME

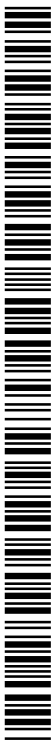
(54) 발명의 명칭 : 인간 혈청 당쇄 지도 및 이를 이용하여 혈청 시료를 검증하는 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a human serum N-sugar chain map, a human serum N-sugar chain library, and a method for testing a serum sample using the same. As a result of isolating and analyzing sugar chains from more than 200 serum samples from normal subjects and patients, 18 basic sugar chains were identified that were found in 100% of both normal subjects and patients. The presence of these 18 types of basic sugar chains can be used to verify that there is no problem in the process of collection and treatment of a human serum sample. In addition, the present inventors demonstrated that although the N-sugar chains of human serum protein have a great number of theoretically possible sugar chain types, only the structures as illustrated in figs. 3a, 3b, and 3c exist for the actual N-sugar chains. Furthermore, by determining the percentage of appearance of the N-sugar chains of existing structures, the present inventors demonstrated that the N-sugar chains having a low probability of appearance can be used as markers for a particular disease.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



WO 2014/163421 A1



본 발명은 인간 혈청 N-당쇄 지도, 인간 혈청 N-당쇄 라이브러리 및 이를 이용하여 혈청 시료를 검증하는 방법에 관한 것이다. 정상인과 환자의 혈청시료 200 여 개로부터 당쇄를 분리하여 분석한 결과, 정상인과 환자 모두에게서 100% 발견되는 18 개의 기본 당쇄를 찾아내었다. 이 기본 당쇄 18 종의 존재는 인간 혈청시료가 채취 및 처리과정에서 문제가 없음을 검증하는데 이용될 수 있다. 또한, 본 발명자들은 인간 혈청 단백질의 N-당쇄는 이론적으로는 가능한 당쇄 종류가 매우 많지만, 실제로 N-당쇄는 도 3a, 3b, 3c 에 나타난 것과 같은 구조만이 존재함을 밝혔으며, 존재하는 구조의 N-당쇄들의 출현 백분율을 밝힘으로써 출현 확률이 낮은 N-당쇄들을 특정 질환의 마커로 사용할 수 있음을 밝혔다.

명세서

발명의 명칭: 인간 혈청 당쇄 지도 및 이를 이용하여 혈청 시료를 검증하는 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 인간 혈청 글라이코믹스 지도 및 이를 이용하여 혈청 시료를 검증하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 글라이코믹스는 글라이칸 구조 및 특성에 관한 광범위한 연구를 포함한다. 글라이칸은 단당류 구조, 가지뻗기 (branching)의 정도 및 연결구조가 다양하기 때문에 구조가 매우 복잡하여 분석이 용이하지 않다. 게놈의 단선적인 DNA 주형과 직접적으로 관련되어 있는 단백질 구조와 달리, 글라이칸 구성은 일련의 글라이코실트랜스퍼레이즈 효소반응에 의해 결정된다.
- [3] N-당쇄화 (N-Glycosylation)는 펩타이드 골격의 아스파라긴에 올리고당이 추가되는 것이다. 이것은 그 위치와 구조적 다양성을 결정하는 생물학적 원칙에 의해 지배된다. N-당쇄화의 변화는 종양과 같은 질환에서 정상적인 당쇄화 장치에 오류가 생긴 것이다. 이러한 이유로, N-당쇄를 질병 마커로 사용하려는 시도가 있어왔다. 뿐만 아니라, N-당쇄화의 변화는 특정 종양에서만 발견되는 것이 아니라, 다양한 종양을 비롯한 질병에서 발견되어 왔다.
- [4] N-당쇄는 아주 다양하지만, O-당쇄, 글라이코스아미노글라이칸, 및 글라이코리피드와 같은 다른 글라이코콘주게이트와 구별되는 특징이 있다. N-당쇄는 아스파라긴 다음 다양한 아미노산이 오고 그 뒤에 세린, 트레오닌 또는 덜 일반적인 시스테인 아미노산이 오는 구조에서만 발견된다. 프롤린을 제외하고, 다양한 아미노산들이 아스파라긴 다음에 올 수 있다. 펩타이드 N-글라이코시데이즈 F (PNGase F)와 같은 효소가 생리학적 조건 하에서 N-연결 당쇄를 자르는데 이용될 수 있다. N-연결 코어는 키토바이오스 코어 (chitobiose core; $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$)에 부착된 세 개의 만노스 당으로 이루어져 있다. N-연결 당쇄는 N-연결 코어에 어떤 단당이 추가되느냐에 따라 종종 세 개의 주요 타입으로 분류된다. 고만노스 당쇄 (High Mannose Glycan) 형은 N-연결코어에 만노스 단당이 여섯 개 더해진 구조이다. 복합형 (Complex type) 당쇄는 N-연결 코어에서 돌리콜 전구체가 분해된 후 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc), 갈락토스, 디옥시헥소스 (퓨코스) 및 사이알릭산 단당들이 효소적으로 결합된다. 하이브리드형 당쇄는 고만노스 구조와 복합형 구조를 모두 포함한다.
- [5]
- [6] 발암 및 전이 과정에서 일어나는 세포 생물학적 변화를 보면, 세포막 표면에 존재하는 많은 종류의 당단백질이나 당지질이 암유전자 (oncogene)와 같은 특정 신호의 명령을 받아 "잘못된 당질화 (aberrant glycosylation)"가 일어나고 이로

인한 당쇄(sugar chain)의 변화가 세포간의 접착(adhesion), 인식(recognition)에 변화를 일으켜 세포의 암화 및 암전이를 일으키게 된다(Hakomori and Kannagi, 1983, J. Natl. Cancer Inst., 71:231-251; Feizi, 1985, Nature, 314:53-571). 세포 외부에서 자극이 오면 암유전자 ras, 전사인자 ets-1의 신호전달을 거쳐 당전이효소 GnT-V(Nacetylglucosaminyltransferase)의 발현이 강화된다. GnT-V는 당단백질의 기본적인 당쇄에 N-아세틸글루코사민을 β 1,6의 위치로 부가하는 반응을 촉매하는 효소로 암의 공격(invasion)과 전이(metastasis)에 직접 연관성이 있는 것으로 알려져 있다(Dennis et al., 1987, Science, 236:582-5853).

- [7] 일반적으로 당단백질은 단백질이 합성된 후 ER(endoplasmic reticulum)에서 기본적인 당쇄가 만들어진 후 골지체로 이동하여 세포의 다양한 생명현상의 결과로 여러 당전이효소에 의해 당의 부가가 이루어지는데 1차적으로 만들어지는 N-아세틸글루코사민 당전이효소 여섯가지(I-VI)가 촉매하여 얻어지는 당쇄들을 보여주고 있으며, 이중 β 1,6-N-아세틸글루코사민 당쇄를 만드는 GnT-V가 암의 발생과 전이에 가장 많이 관여한다고 알려져 있다. GnT-V 효소는 골지체에 위치하며, 목표 단백질들은 당쇄에 변화를 받아 세포 표면이나 밖으로 분비된다. 이때 당단백질은 대상세포의 표면 단백질과 인식(recognition), 접착(adhesion)하여 암을 유발하게 된다.

[8]

- [9] 이와 같이, 최근 유전자와 단백질의 기능에 관한 학문인 지노믹스, 프로테오믹스에 이어 단백질의 표면에 존재하면서 단백질의 기능, 인식 등에 매우 중요한 역할을 수행하는 당에 관한 연구인 글라이코믹스 (Glycomics)가 과학자들의 관심사로 떠오르고 있다. 글라이코믹스 중에서도 특히 각종 종양세포에서 특정 단백질의 당쇄에 의미 있는 변화가 일어난다는 것이 밝혀지면서 많은 연구자들은 당쇄의 변화를 탐지하여 종양을 초기에 진단하는 바이오마커 발굴에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

- [10] 혈액 등의 생체 시료에서 추출한 당(glycan)들을 질량분석기를 이용하여 프로파일하는 분석법은 글라이코믹스 기반 바이오마커 발굴 연구에서 널리 사용되고 있다. 그러나, 아직까지 시료로부터 당분석 추출과정의 정확도를 확인할 수 있는 품질관리 (quality control) 방법과 얻어진 당들 간의 총괄적인 생물학적 관계를 시각적으로 보여주고 확인할 수 있는 방법은 전무한 상태이다.

[11]

- [12] 한국특허 제475642호는 암의 발생과 전이에 관여하여 N-연결형 당쇄의 변화를 나타내는 단백질의 당쇄변화를 측정하여 암을 진단하는 방법 및 상기 단백질의 당쇄변화를 측정하는 방법을 이용한 진단키트에 관한 것이다.

- [13] 미국특허 제7,651,847호(2010.01.26.특허)는 종양에 특이적인 올리고당을 확인하는 방법, 개인의 종양 계통 (strain)을 결정하는 방법 및 특정 종양 마커의 존재 또는 부재를 탐지함으로써 개인의 종양을 진단 또는 종양 진행단계를 진단하는 방법에 관한 것이다.

[14]

발명의 상세한 설명**기술적 과제**

[15] 따라서, 본 발명은 혈액 내 질병의 유무와 상관없이 100% 존재하는 당들을 밝혀내고, 이를 이용하여 생체 시료로부터 당을 추출할 때 시료준비과정에서의 문제점을 확인하는 혈청시료 검증방법을 제공하려는 것을 목적으로 한다.

[16] 또한, 본 발명은 혈청 시료에 존재하는 당들의 존재 비율이 다름을 이용하여 질병의 바이오마커 발굴을 위한 인간 혈액 당쇄 지도를 구축하려는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

[17] 상기 과제 해결을 위하여 본 발명자들은 200여명의 혈액에서 분리 및 정제한 당쇄들 (평균 80여개의 당쇄)을 분석하여 질병의 유무, 개인의 건강 및 환경과 상관없이 일정하게 검출되는 당쇄 (중성 당쇄: 10개, 산성 당쇄: 8개, 총 18개; 표 1)들을 선정하여 당쇄 추출 및 분석과정에서 품질관리를 할 수 있는 지표로 선정하였다.

[18] 또한, 본 발명자들은 당 프로파일을 토대로 당 간의 생물학적 관계를 도식화하여 인간 혈액의 당쇄 지도를 완성하였다.

발명의 효과

[19] 본 발명에 의하면, 인간 혈청을 비롯한 인간 체액 시료의 당쇄를 분석하여 기본 당쇄 18종의 존재 유무를 탐지함으로써 체액 시료가 적절한가를 검증할 수 있다.

[20] 또한, 본 발명에 의하면, 당쇄지도를 통해서 정상군과 환자군 간의 특정 당쇄 출현 빈도에 현저한 차이가 있는 경우, 이 특정 당쇄를 종양을 비롯한 특정 질병의 빈도 마커로 이용할 수 있다.

[21] 또한, 본 발명에 의하면, 당쇄지도를 통해서 정상군과 환자군 간의 특정 당쇄의 강도 (intensity)에 현저한 차이가 있는 경우, 이 특정 당쇄를 종양을 비롯한 특정 질병의 강도 마커로 이용할 수 있다.

[22] 또한, 본 발명에 의하면, 당쇄지도를 통해서 종양의 진행단계에 따라 특정 당쇄의 발현 빈도 또는 발현 강도에 차이가 있는 경우, 이 특정 당쇄를 특정 종양의 단계를 파악하는 마커로 이용할 수 있다.

[23]

도면의 간단한 설명

[24] 도 1은 인간 혈청 시료로부터 당쇄지도를 작성하는 방법을 도식화한 것이다.

[25] 도 2는 인간 혈청 시료로부터 정제한 당쇄에 대한 MALDI-TOF 결과이다. 이하 도면에서 ●은 만노스, ■은 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc), ○은 육탄당 (Hex), □은 N-아세틸헥소사민 (HexNAc), ◆은 N-아세틸뉴라민산 (NeuAc), ◀은 푸코스 (Fuc)이다.

[26] 도 3a, 3b, 3c는 인간 혈청 시료로부터 얻은 당쇄지도이다. 도 3a, 3b, 3c는 세로

방향으로 연결되는 하나의 도면이며, 각 도면의 연결 부분은 인접한 두 개의 직사각형으로 나타내었다.

[27] 도 4 내지 도 13은 도 3a, 3b, 3c의 일부분을 확대하고 각 당의 구조를 표시한 당쇄지도이다.

[28] 도 14는 도 4 내지 도 13의 연결상태를 나타내는 도면이다. 도 4 내지 도 13이 연결되어 도 3a, 3b, 3c를 연결한 당쇄지도와 동일한 당쇄지도가 완성된다.

[29] 도 15 (A)는 난소암 환자에서 분리한 N-당쇄의 대표적인 MALDI-FTICR 질량 스펙트럼이고, (B)는 GCC 분획에서 당쇄 분포 및 질량스펙트럼 신호이다. 10, 20 및 40%는 양성 및 음성 이온 모드 질량 분광기에서 아세트나이트릴의 해당 분획에서 나온 당쇄를 나타낸다. 구조들은 정확한 질량 및 당생물학에 기초하여 추정된 것이다.

[30] 도 16 (A)는 환자(96사람) 및 대조군(48사람) 시료를 계산하고 단일 m/z 매스에 놓아 피크 배열을 보여준다. (B) GCC20% 분획에서 발견한 풍부한 당쇄의 Box-Whiskers 플롯이다.

[31] 도 17은 난소암 당쇄 마커의 추정 구조 및 구조간 관계이다.

[32] 도 18은 본 발명에 의한 질병단계결정의 잠재력을 나타낸다. 다섯 개의 N-당쇄 추정구조가 삽입되어 있다. S, N 및 L은 각각 다른 질병 단계(S1부터 S4까지)의 난소암 환자군, 정상(대조)군 및 LMP 난소종양 환자를 나타낸다.

[33] 도 19는 종양 환자(n=96) 대 건강한 대조군(n=48) 당쇄 마커의 ROC 커브이다. (A)는 빈도 마커, (B)는 강도 마커이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[34] 본 발명에서는 정상인과 암환자(폐암환자와 난소암환자) 200여명의 혈액 시료에서 추출한 당들을 질량분석기를 이용하여 프로파일하였다. 한 시료당 질량분석을 5회 실시하여 특정 피크가 5번 이상 검출된 경우에만 "존재 (presence)"로 인정하였다. 그 결과, 혈액 시료에는 개인별로 평균 80여개의 다양한 당들을 함유하고 있으며, 200여명 모두에게서 공통적으로 발견된 당들은 모두 18개였다 (표 1). 표 1에서는 10% 아세트나이트릴 분획에서 얻어지는 당쇄가 10종, 20% 아세트나이트릴 분획에서 얻어지는 당쇄가 4종, 40% 아세트나이트릴 분획에서 얻어지는 당쇄가 8종인 것으로 나타났고, 이중 10% 분획 및 20% 분획에서 공통적인 당쇄가 4개 존재하므로, 총 18종의 당쇄가 질병의 유무, 개인의 건강 및 환경과 상관 없이 일정하게 검출되는 것으로 나타났다.

[35] 따라서, 이와 같이 질병 유무와 관계 없이 일정하게 검출되는 18종의 당쇄를 이용하면 혈청 시료를 검증할 수 있다. 어떤 혈청 시료에서 이러한 18종의 당쇄 중 한 가지라도 탐지되지 않는 당쇄가 있다면 그 혈청 시료는 시료 채취 및 처리 과정에서 문제가 있음을 의미한다고 볼 수 있다.

[36]

- [37] 또한, 이와 같이 얻어진 당들의 구조와 관련하여 당 사이의 상관관계를 이용하여 당쇄가 어떤 순서로 형성되는지 생물학적 정보를 제시하는 지도는 지금까지 없었다. 뿐만 아니라, 혈액 시료에서 얻은 당들의 구성에 따라서 그 구조를 정의하고 기준이 되는 참고자료가 없기 때문에 불편을 겪고 있는 것이 현재의 상황이다.
- [38] 이러한 문제를 극복하기 위하여 본 발명자들은 인간 혈액 시료 내의 당쇄화 과정에서 나오는 당 구조들의 생물학적 지도를 제작하였고, 이를 이용하여 각각의 당 사이에 특정한 상관 관계, 순서와 관련성이 있다는 것을 확인하였다. 탠덤 질량분석(Tandem MS)을 통하여 당의 조성 및 구조를 하나하나 확인함으로써 각각의 분자량이 가지고 있는 구조에 대하여 왜 이러한 구조를 가질 수밖에 없는지를 분석하여 인간 혈청에서의 당 구조 지도를 완성하였다 (도 3a, 3b, 3c, 확대된 부분도는 도 4 내지 도 13).
- [39] 본 발명은 모든 당분석 플랫폼에 적용될 수 있으며, 특히 바이오시밀러를 포함하는 바이오의약품의 특성분석 또는 암표지자 발굴 등 생명공학이나 의학분야에서 활용할 수 있다.
- [40] 또한 처리된 데이터를 분석하는 바이오정보학과 관련하여서도 본 발명이 표준이 되는 자료를 제공함으로써 인간 혈청 내의 당과 관련하여 공통적인 기준을 제시하여 많은 시간을 투자하지 않고도 본 발명의 당쇄지도를 통하여 인간 혈청 내에서 나오는 당의 구성과 구조를 바탕으로 분석하는데 있어서 좀 더 명확한 방법 및 참고자료가 될 수 있다.
- [41] 본 발명은
- [42] (a) 인간 혈청 시료를 준비하는 단계;
- [43] (b) 준비된 인간 혈청 시료를 효소처리하여 N-당쇄를 분리하는 단계;
- [44] (c) 분리된 N-당쇄를 분획하는 단계;
- [45] (d) N-당쇄 분획을 질량분석하는 단계; 및
- [46] (e) 질량분석 결과, 키토바이오스 코어 ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$)에 결합된 당 구조가 $(\text{Hex})_2$ 이론적 단일동위원소 질량값 1257.423, $(\text{Hex})_3$ 이론적 단일동위원소 질량값 1419.475, $(\text{Hex})_4$ 이론적 단일동위원소 질량값 1581.528, $(\text{Hex})_5$ 이론적 단일동위원소 질량값 1743.581, $(\text{Hex})_6$ 이론적 단일동위원소 질량값 1905.634, $(\text{HexNAc})_2(\text{Fuc})_1$ 이론적 단일동위원소 질량값 1485.534, $(\text{Hex})_1(\text{HexNAc})_2(\text{Fuc})_1$ 이론적 단일동위원소 질량값 1647.586, $(\text{Hex})_2(\text{HexNAc})_2(\text{Fuc})_1$ 이론적 단일동위원소 질량값 1809.639, $(\text{Hex})_1(\text{HexNAc})_3(\text{Fuc})_1$ 이론적 단일동위원소 질량값 1850.665, $(\text{Hex})_2(\text{HexNAc})_3(\text{Fuc})_1$ 이론적 단일동위원소 질량값 2012.719, $(\text{Hex})_2(\text{HexNAc})_2(\text{NeuAc})_1$ 이론적 단일동위원소 질량값 1930.680, $(\text{Hex})_2(\text{HexNAc})_2(\text{NeuAc})_2$ 이론적 단일동위원소 질량값 2243.758, $(\text{Hex})_3(\text{HexNAc})_3(\text{NeuAc})_1$ 이론적 단일동위원소 질량값 2295.813, $(\text{Hex})_3(\text{HexNAc})_3(\text{NeuAc})_2$ 이론적 단일동위원소 질량값 2608.890, $(\text{Hex})_2(\text{HexNAc})_2(\text{Fuc})_1(\text{NeuAc})_1$ 이론적 단일동위원소 질량값 2076.738, $(\text{Hex})_2(\text{HexNAc})_2(\text{Fuc})_2(\text{NeuAc})_1$ 이론적

단일동위원소 질량값 2389.816, $(\text{Hex})_3(\text{HexNAc})_3(\text{Fuc})_1(\text{NeuAc})_1$ 이론적
단일동위원소 질량값 2441.871 및 $(\text{Hex})_3(\text{HexNAc})_3(\text{Fuc})_1(\text{NeuAc})_2$ 이론적
단일동위원소 질량값 2754.948의 18종 구조를 모두 포함하고 있는 경우에만
정상적인 시료로 판단하는 단계;를 포함하는 인간 혈청 시료 검증방법 {단, Man,
만노스 (Mannose); GlcNAc, N-아세틸글루코사민 (N-acetylglucosamine); Hex,
헥소스 (Hexose); HexNAc, N-아세틸헥소사민 (N-acetylhexosamine); Fuc, 푸코스
(Fucose); NeuAc, N-아세틸뉴라민산 (N-acetylneuraminic acid)}을 제공한다.

- [47] 또한, 본 발명은 인간 혈청 시료로부터 추출한 도 3a 내지 도 13에 개시된 N-당쇄의 당쇄화 지도를 제공한다.
- [48] 또한, 본 발명은 인간 혈청 시료로부터 추출한 도 3a 내지 도 13 및 표 8~10에 개시된 108개 당쇄로 이루어진 당쇄 라이브러리를 제공한다.
- [49] 또한, 본 발명은
- [50] (a) 정상군과 특정질병 환자군의 인간 혈청 시료를 준비하는 단계;
- [51] (b) 준비된 인간 혈청 시료를 효소처리하여 N-당쇄를 분리하는 단계;
- [52] (c) 분리된 N-당쇄를 분획하는 단계;
- [53] (d) N-당쇄 분획을 질량분석하는 단계; 및
- [54] (e) 질량분석 결과를 비교할 때 정상군과 특정질병 환자군 간에 도 3a 내지 도 13에 개시된 108개 당쇄 중 하나 이상의 특정 N-당쇄의 출현 빈도에 20% 이상의 차이가 있는 경우, 시료 내에 상기 특정 N-당쇄의 출현 빈도를 측정하여 특정질병의 유무를 결정하는 단계;를 포함하는, 특정 N-당쇄를 특정질병의 마커로 이용하는 방법을 제공한다.
- [55] 또한, 본 발명은
- [56] (a) 정상군과 특정질병 환자군의 인간 혈청 시료를 준비하는 단계;
- [57] (b) 준비된 인간 혈청 시료를 효소처리하여 N-당쇄를 분리하는 단계;
- [58] (c) 분리된 N-당쇄를 분획하는 단계;
- [59] (d) N-당쇄 분획을 질량분석하는 단계; 및
- [60] (e) 질량분석 결과를 비교할 때 정상군과 특정질병 환자군 모두에서 도 3a 내지 도 13에 개시된 108개 당쇄 중 특정 N-당쇄가 90% 이상의 확률로 발견되며, 정상군과 특정질병 환자군 간에 상기 특정 N-당쇄의 강도에 30% 이상의 차이가 있는 경우, 시료 내에 상기 특정 N-당쇄의 강도를 측정하여 특정질병의 유무를 결정하는 단계;를 포함하는, 특정 N-당쇄를 특정질병의 마커로 이용하는 방법을 제공한다.
- [61] 또한, 본 발명은
- [62] (a) 정상군과 특정질병 진행단계별 환자군의 인간 혈청 시료를 준비하는 단계;
- [63] (b) 준비된 인간 혈청 시료를 효소처리하여 N-당쇄를 분리하는 단계;
- [64] (c) 분리된 N-당쇄를 분획하는 단계;
- [65] (d) N-당쇄 분획을 질량분석하는 단계; 및
- [66] (e) 질량분석 결과를 비교할 때 특정질병 진행단계별 환자군에서 특정질병의

진행단계에 따라 도 3a 내지 도 13에 개시된 108개 당쇄 중 하나 이상의 특정 N-당쇄의 발현 빈도 또는 발현 강도에 유의한 차이가 있는 경우, 시료 내에 상기 특정 N-당쇄의 강도 또는 출현 빈도를 측정하여 특정질병의 진행단계를 결정하는 단계;를 포함하는, 특정 N-당쇄를 특정질병 진행단계의 마커로 이용하는 방법을 제공한다.

- [67] 또한, 본 발명은
- [68] $(\text{Hex})_3(\text{HexNAc})_3$ 이론적 단일동위원소 질량값 1136.4,
- [69] $(\text{Hex})_3(\text{HexNAc})_4$ 이론적 단일동위원소 질량값 1339.5,
- [70] $(\text{Hex})_3(\text{HexNAc})_5(\text{Fuc})_1$ 이론적 단일동위원소 질량값 1688.6,
- [71] $(\text{Hex})_4(\text{HexNAc})_5$ 이론적 단일동위원소 질량값 1704.6,
- [72] $(\text{Hex})_4(\text{HexNAc})_3(\text{NeuAc})_1$ 이론적 단일동위원소 질량값 1611.5,
- [73] $(\text{Hex})_6(\text{HexNAc})_3(\text{NeuAc})_1$ 이론적 단일동위원소 질량값 1935.6 및
- [74] $(\text{Hex})_4(\text{HexNAc})_5(\text{NeuAc})_1$ 이론적 단일동위원소 질량값 2017.7 중 1종 이상의 N-당쇄를 포함하는 인간 난소암 빈도 마커 (frequency marker)를 제공한다.
- [75] 또한, 본 발명은 상기 마커가 정상군 시료에 비하여 환자군 시료에서 20% 이상 높은 빈도로 발현됨을 특징으로 한다.
- [76] 또한, 본 발명은
- [77] $(\text{Hex})_3(\text{HexNAc})_4$ 이론적 단일동위원소 질량값 1339.5,
- [78] $(\text{Hex})_3(\text{HexNAc})_4(\text{Fuc})_1$ 이론적 단일동위원소 질량값 1485.5,
- [79] $(\text{Hex})_3(\text{HexNAc})_5$ 이론적 단일동위원소 질량값 1542.6,
- [80] $(\text{Hex})_4(\text{HexNAc})_5$ 이론적 단일동위원소 질량값 1704.6,
- [81] $(\text{Hex})_5(\text{HexNAc})_4(\text{Fuc})_1$ 이론적 단일동위원소 질량값 1809.6,
- [82] $(\text{Hex})_4(\text{HexNAc})_3$ 이론적 단일동위원소 질량값 1298.45,
- [83] $(\text{Hex})_6(\text{HexNAc})_5(\text{NeuAc})_1$ 이론적 단일동위원소 질량값 2295.8 및
- [84] $(\text{Hex})_6(\text{HexNAc})_5(\text{NeuAc})_2$ 이론적 단일동위원소 질량값 2608.9 중 1종 이상의 N-당쇄를 포함하는 인간 난소암 강도 마커 (intensity marker)를 제공한다.
- [85] 또한, 본 발명은 상기
- [86] $(\text{Hex})_3(\text{HexNAc})_4$ 이론적 단일동위원소 질량값 1339.5,
- [87] $(\text{Hex})_3(\text{HexNAc})_4(\text{Fuc})_1$ 이론적 단일동위원소 질량값 1485.5,
- [88] $(\text{Hex})_3(\text{HexNAc})_5$ 이론적 단일동위원소 질량값 1542.6,
- [89] $(\text{Hex})_4(\text{HexNAc})_5$ 이론적 단일동위원소 질량값 1704.6,
- [90] $(\text{Hex})_4(\text{HexNAc})_3$ 이론적 단일동위원소 질량값 1298.45 및
- [91] $(\text{Hex})_3(\text{HexNAc})_4(\text{Fuc})_1$ 이론적 단일동위원소 질량값 1485.5의 N-당쇄는 정상군 시료와 비교하여 환자군 시료에서 40% 이상 높은 강도로 발현됨을 특징으로 하는 인간 난소암 강도 마커 (intensity marker)를 제공한다.
- [92] 또한, 본 발명은 상기
- [93] $(\text{Hex})_5(\text{HexNAc})_4(\text{Fuc})_1$ 이론적 단일동위원소 질량값 1809.6,
- [94] $(\text{Hex})_6(\text{HexNAc})_5(\text{NeuAc})_1$ 이론적 단일동위원소 질량값 2295.8 및

- [95] (Hex)₆(HexNAc)₅(NeuAc)₂ 이론적 단일동위원소 질량값 2608.9의 N-당쇄는 정상군 시료와 비교하여 환자군 시료에서 30% 이하의 낮은 강도로 발현됨을 특징으로 하는 인간 난소암 강도 마커 (intensity marker)를 제공한다.

[96]

발명의 실시를 위한 형태

- [97] 아래에서는 구체적인 실시예를 통하여 본 발명의 구성을 좀더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에 의하여 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속한 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[98]

[99] 실시예 1: 인간 혈청 시료

- [100] 1) 분석하고자 하는 혈청 시료를 충분히 격렬하게 교반하고 충분히 방치하였다.
- [101] 2) 각각 50 μ l씩의 혈청 시료를 준비하였다.
- [102] 3) 준비된 혈청 시료에 50 μ l의 200mM NH₄HCO₃ (10mM DTT 포함)를 넣었다.
- [103] 4) 격렬하게 교반하고 충분히 방치하였다.

[104]

[105] 실시예 2: 효소를 이용한 N-당쇄 분리

- [106] 플라보박테리움 메닝고셉티쿰 (Flavobacterium meningosepticum) 유래 PNGase F (peptide N-glycosidase F; 500,000 unit/ml)을 New England BioLabs (Ipswich, MA)에서 구입하였다. 효소를 이용하여 글라이칸을 단백질로부터 분리하기 위해, 상기 실시예 1을 거친 50 μ l의 혈청을 소화 완충액 (pH 7.5, 100 mM 중탄산 암모늄, 5 mM DTT)에 용해시키고, 끓는 물에 2분간 가열하여 단백질을 변성시켰다. 실온에서 식힌 후 2 μ l의 PNGase F (1,000 units)를 가하고 혼합액을 36 °C 수조에서 16시간 동안 배양하였다.
- [107] 차가운 상태의 400 μ l 에탄올을 가하여 펩타이드와 단백질을 침전시켰다.
- [108] 얻은 용액은 -45 °C에서 60 분간 동결한 후 4 °C에서 분당 14,400 rpm으로 20분간 원심분리한 후 각 시료마다 400 μ l의 상층액을 취하고, 상층액에 포함된 에탄올을 완전히 건조시켰다.
- [109] 그 후 각 시료에 1 ml의 물을 가하고 격렬히 교반하여 정제를 위한 당쇄 함유 시료를 준비하였다.

[110]

[111] 실시예 3: 당쇄 정제

- [112] PNGase F로 분리된 당쇄 함유 시료를 흑연 처리한 탄소 카트리지 SPE (GCC-SPE; 충전량 150 mg, 카트리지 부피 4 ml)로 정제하였다. GCC SPE 카트리는 Alltech (Deerfield, IL)에서 입수하였다. 사용에 앞서 카트리를 초순수 6 ml로 세척하고 0.1% 트리플루오로초산 (TFA) 함유 80% (v/v) 아세트로나이트릴 (ACN) 6 ml로 세척한 후 다시 초순수 6 ml로 세척하였다. 당쇄

함유 시료는 GCC 카트리지에 넣고 카트리지 부피의 수 배의 초순수를 1 ml/min의 속도로 흘려주어 염을 제거하였다. 당쇄는 10% (v/v) 아세트나이트릴, 20% (v/v) 아세트나이트릴 및 40% (v/v) 아세트나이트릴과 0.05% (v/v) TFA로 순서대로 용출시켰다. 각 분획을 수집하여 원심식 증발기로 건조시켰다. 분획들은 질량분석에 앞서 초순수에 용해시켰다.

[113]

[114] **실시예 4: 질량분석**

[115] 질량 스펙트럼은 7.0 테슬라의 자석이 장착된 HiResMALDI (IonSped Corporation)를 외부 소스로 하는 FT-ICR MS (Fourier transform-ion cyclotron resonance mass spectrometer) 상에 기록되었다. HiResMALDI는 펄스 Nd:YAG 레이저 (355 nm)를 갖추었다. DHB (2,5-Dihydroxybenzoic acid)는 모든 당쇄 분석의 매트릭스 (50% ACN:H₂O 내에 0.05 mg/ μ l)로 사용되었다. 음성모드 분석을 위해 0.6 μ l의 올리고당 용액이 MALDI 프로브에 적용된 후 1 μ l의 적절한 매트릭스 용액을 적용시켰다. 시료는 진공건조 후 MS 분석에 적용하였다. 양성모드 분석을 위해 0.3 μ l의 0.01 M NaCl을 매트릭스-분석대상 혼합물에 가한 것을 제외하고는 동일한 시료 제조과정을 적용하였다.

[116] GCC-SPE 동안 용출된 세 분획 즉, 10% ACN 분획, 20% ACN 분획 및 40% ACN 분획은 각각 MALDI-FT-ICR로 분석하여 스펙트럼을 기록하였다. 당쇄들은 용매 극성에 따라 용출되었고, 그 결과 중성 당쇄는 10% 및 20% ACN 분획에서 탐지되었고, 산성 당쇄는 20% 및 40% ACN 분획에서 탐지되었다. 질량 스펙트로미터의 전하 극성은 이온 신호를 개선하고 각각 중성 또는 산성 당쇄의 이온 저해를 최소화하기 위해 양성모드와 음성모드 사이에서 변환되었다. 각 시료에 대해 네 개의 스펙트럼이 수집되었다. 즉, 양성 모드에서는 10% 및 20% ACN 분획, 그리고 음성 모드에서는 20% 및 40% ACN 분획을 얻었다.

[117]

[118] **실시예 5: 스펙트럼 데이터 선처리**

[119] 신호에서 노이즈를 제거하기 위해 6 S/N 트레쉬홀드를 이용하였다. 스펙트럼은 Omega 8 소프트웨어 (IonSpec)로 모든 스펙트럼에 존재하는 여섯 개의 알려진 글라이칸 매스를 이용하여 내부에서 계산하였다. 각 스펙트럼은 총 이온량 (total ion abundance)으로 표준화하였다.

[120]

[121] **실시예 6: 난소암 당쇄마커 시험**

[122] 난소암 환자군(1기: 21명, 2기: 14명, 3기: 52명, 4기: 13명), 건강한 여성 대조군 48명 및 LMP군 (Low malignancy Patient) 50명에 대하여 각 혈청시료를 위 실시예 1과 같이 준비하였다.

[123] 효소를 이용하여 실시예 2~4와 같이, 각 시료의 N-당쇄를 분리한 후 이를 정제하고 질량분석을 실시하였다. 실시예 5와 같이, 스펙트럼 데이터를 선처리하였다.

[124]

[125] 상기 실시예 6의 결과는 아래와 같다.

[126]

[127] **결과 1: 난소암 환자 혈청의 당쇄 프로파일링**

[128] 당쇄 분리를 포함하는 실험 단계를 도 1에 나타내었다. 이 방법은 시료 조작을 최소화하고 속도를 높이기 위해 개발되었다. 본 발명자들은 인간 혈청에서 O-당쇄보다 훨씬 더 풍부하기 때문에 N-당쇄를 선택하였다. N-당쇄는 또한 효소에 의해 좀더 쉽게 그리고 선택적으로 분리할 수 있다. 본 발명자들은 단백질 확인, 분리 및 정제가 필요 없이 N-당쇄를 프로파일하였다. 분리된 당쇄들은 먼저 농축한 다음 극성이 다른 용매에 분획되었다 (0.05% TFA를 포함하는 10, 20 및 40% 아세토나이트릴 수용액). 세 개의 분획에서 용출된 당쇄 혼합물들은 MALDI-FTICR MS를 이용하여 질량 분석하였다. 이러한 방법으로 다른 당쇄에 의하여 당쇄 신호가 억제되는 현상을 피할 수 있었다. 정확한 당쇄 구성은 정확한 질량을 바탕으로 추론하였다. 풍부한 당쇄는 CID (collision-induced dissociation) 또는 IRMPD (Infrared multiphoton dissociation)를 이용한 텐덤 질량분석으로 확인하였다.

[129] 100 개의 비점액 상피성 난소암 환자 혈청 (1기-21명; 2기-14명; 3기-52명; 4기-13명), 48 개의 건강한 여성 대조군 혈청 및 50 개의 낮은 악성 잠재력(Low malignancy potential; "LMP") 난소암 환자의 혈청을 포함하는 GOG 시료를 당쇄 마커 연구에 이용하였다. 표 2에 종양 단계, 나이, 혈청 시료 조직 등을 정리하였다. 모든 시료는 수술 후 병리 (pathology following surgery)로 확인하였다.

[130] 양성 및 음성 이온탐지 모드에서 10, 20 및 40% SPE 분획의 난소암 환자 혈청 유래 N-당쇄의 대표적인 질량 스펙트럼은 도 15A와 같다. N-당쇄들은 트리만노스 코어 ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$)로부터 잘 분리되어 FTICR MS (Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectroscopy)에서 정확한 질량을 얻을 수 있었다. 이 도면은 풍부한 N-당쇄들의 추정 구조만을 보여준다. 덜 풍부한 신호들을 확대한 결과, 좀더 많은 당쇄들을 밝힐 수 있었다. 10% ACN 스펙트럼에서, 당쇄들은 대부분 고만노스 및 복합형이었다. 좀더 높은 질량 구역에 있는 시알산 (NeuAc)을 포함하는 산성 올리고당들은 음성 모드의 40% ACN 분획에서 발견된다. 20% ACN 분획은 중간 질량 구역에서 중성 및 산성 올리고당들을 포함한다. 따라서, 양성 및 음성 스캔은 이 분획상에서 수행되었다. 중성 당쇄들은 산성에서 억제되며, 역도 마찬가지이다. 따라서, 10%에서 40% 분획까지 가면서 당쇄 크기가 증가할 뿐만 아니라 당쇄 산도도 증가한다. 당쇄의 수를 최대화하기 위해 각 시료에 대해 네 번의 질량 스펙트럼을 측정하였다. SPE-GCG 분획에서 당쇄 분리는 도 15의 B에 요약하였다. 이러한 접근으로 시료당 80 개 이상의 당쇄 구조들이 확인되었다.

[131]

[132] **결과 2: 질량 스펙트럼 품질 관리**

[133] 모든 질량 스펙트럼은 스펙트럼 내에 존재하는 N-당쇄로 내부에서 보정되었다 (< 5ppm). 실험 캘리브란트 이온의 피크 선택은 바이오마커 발견에 매우 중요한데, 이는 잘못된 선택이 전체 스펙트럼을 잘못 계산하게 할 수 있기 때문이다. 질량 계산을 확실히 하기 위해 그리고 시료 준비를 확인하기 위해, 환자군과 대조군 모두에 존재하는 것으로 알려진 N-당쇄의 일군의 피크를 이용하여 질량 스펙트럼에 대한 품질관리를 수행하였다. 예를 들어 단일 시알화된 두 가지 (biantennary) N-당쇄 (NB1)와 이중시알화된 두 가지 (biantennary) N-당쇄 (NB2)와 같은 복합형 두 가지 (biantennary) 올리고당들은 대조군과 암환자의 혈청 모두에서 발견되었다 (Morelle, W. et al., *Glycobiology* 2006(16), 281-293). 이러한 피크가 없으면 보정 및/또는 시료 준비가 잘 수행되지 않았음을 나타낸다. 품질관리 및 내부 보정에 이용되는 당쇄는 표 6에 나타내었다. 환자(96 cases)와 대조군(48cases) 시료에 대한 개별 스캔이 보정되었다. 예컨대 m/z 1485.529의 단일 당쇄 (3Hex:4HexNAc:1Fuc) 피크는 피크 배열과 보정의 정확도를 나타내기 위해 겹쳐 관찰하였다 (도 16A). 처음에 본 발명자들은 198개의 GOG 시료 (100 개의 환자 시료, 50 개의 낮은 악성 잠재력 난소암 환자 시료 및 48 개의 정상 대조군 시료)로 연구를 시작하였으나, 194개 (96 환자 시료, 50 낮은 악성 잠재력 난소암 환자 시료 및 48 개의 정상 대조군 시료) 시료만으로 이후의 바이오마커 연구를 수행하였다. 네 개의 시료로부터 얻은 피크는 주 피크가 당질이 아니라 펩타이드인 이유로 품질관리에 의해 배제되었다.

[134]

[135] **결과 3: 난소암 환자에서 당쇄 변화**

[136] 본 실시예에서 관찰된 모든 질량 스펙트럼 신호는 총 이온강도에 의해 환자와 대조군 간의 좀더 직접적인 비교를 위해 표준화되었다. 환자와 대조군 간의 질량 스펙트럼의 전체적인 차이는 당쇄의 Box-Whiskers plot에 의해 설명될 수 있다. 일례로서, GCC 20% 분획에서 발견된 풍부한 당쇄의 분포는 도 16 B에 표현되었다. 바이오마커에 대해 말하자면, 두 가지 타입의 마커-즉, 빈도 마커 (frequency marker) 및 강도 마커 (intensity marker)로 각각 결정될 수 있다. 빈도 마커에서는, 먼저 대조군과 환자 시료에서 각 당쇄 피크의 존재가 %로 계산되었다. 표 3의 네 개의 중성 및 세 개의 산성 당쇄들을 포함하는 일곱 개 당쇄들은 빈도 마커로 확인되었다. 이들은 대부분 $[\text{Hex}]_{3-6}[\text{HexNAc}]_{3-5}[\text{NeuAc}]_{0-1}$ 로 이루어진 두 가지 (biantennary) 또는 세 가지 (triantennary) 복합/하이브리드형 N-당쇄들이다. 흥미롭게도, 잠재적 당쇄 마커들 또한 도 17에 나타낸 바와 같이 구조적으로 서로 관련이 있었다.

[137] 환자 및 대조군 모두에서 90% 이상 존재하는 피크들에 대해서는 강도 마커로서의 가능성을 시험하였다. 여덟 개의 중성 (10% 및 20% 분획에 존재) 및 두 개의 산성 당쇄 (40% 분획에 존재)를 포함하는 열 개의 N-당쇄에 대해 강도

마커로서의 가능성을 확인하였다 (표 4). 두 개의 시알화된 당쇄, 단일시알화된 3가지 N-당쇄 (NT-1, m/z 2295.812) 및 이중시알화된 세 가지 (triantennary) N-당쇄 (NT-2, m/z 2608.890)의 질량 스펙트럼 신호 강도는 각각 모든 질병 단계 (1기~4기)를 통해 환자 시료에서 감소하였다. 중성 당쇄 중 단일퓨코실화된 두 가지 (biantennary) N-당쇄 (NBF1, m/z 1809.640)는 복합/하이브리드 형에 해당하는 다른 당쇄들의 피크 강도가 증가하는 반면, 환자군에서 감소하였다. 잠재적 당쇄 마커의 추정 구조는 그들 간의 관계를 설명하기 위해 도 17에 도시되었다. 모든 당쇄 마커들은 그것이 빈도 마커 또는 강도 마커이냐에 관련 없이 서로 밀접하게 관련되어 있다. 일반적으로 그것이 강도 마커이든지 또는 빈도 마커이든지 중성 당쇄의 증가는 환자군에서 일반적으로 관찰되며, 반면, 산성(시알화된) 당쇄의 감소는 환자군에서 관찰된다.

- [138] 또한, 임상 단계가 초기 단계 (S1)에서 말기단계 (S4)로 올라갈수록 강도 마커의 수는 증가하였다 (도 18). 이들은 $[\text{Hex}]_{3,4}[\text{HexNAc}]_{3,5}[\text{Fuc}]_{0,1}$ 로 이루어진 전형적인 복합형 N-당쇄 (NB)이다. 이러한 결과는 난소암 환자에서 당쇄화의 변화가 질병의 진행을 통하여 계속되고 있음을 보여준다. 따라서, 단계 마커로서 당쇄는 질병의 진행을 조사하거나 예후를 예측하는데 이용될 수 있다.

[139]

[140] **결과 4: 낮은 악성 잠재력의 난소암 환자에서 당쇄 변화**

[141]

낮은 악성 잠재력의 난소암 환자 혈청 시료 50개에서 프로파일된 당쇄들은 각각 환자군 및 대조군과 비교하였다. 흥미롭게도 낮은 악성 잠재력 종양 유래 당쇄의 빈도 및 강도 패턴은 환자와 대조군의 가운데 단계를 보여준다. 몇 개의 당쇄는 환자군과 LMP 종양군을 구별하는데 이용될 수 있고, 반면, 다른 당쇄는 대조군과 LMP 종양군을 구별하는데 이용될 수 있다. LMP 난소암의 잠재적 당쇄 마커는 4개의 빈도 마커와 5개의 강도 마커인데, 표 5에 나타내었다. 각 시료군 (환자군, 대조군 및 LMP군)의 발생 빈도 (% 존재)는 당쇄 변화를 시험하기 위해 비교하였다.

[142]

$[\text{Hex}]_{3,5}[\text{HexNAc}]_{3,5}[\text{Fuc}]_{0,1}$ 로 이루어진 네 개의 복합/하이브리드 형 N-당쇄가 빈도 마커로 확인되었다. 이들은 난소암 환자에서는 많이 존재하였다 ($82.8\% < f(p) < 94.3\%$). 반면, 대조군은 50% 미만 ($27.9\% < f(N) < 48.8\%$)이었다. 흥미롭게도, 낮은 악성 잠재력 종양의 빈도 ($51.1\% < f(L) < 80.0\%$)는 환자군과 대조군의 중간이었다. 경계성 종양은 일반적으로 침투성 종양보다 낮은 마커수준을 나타낸다. 다섯 개의 당쇄가 낮은 악성 잠재력 종양의 강도 마커로 결정되었다. 이들은 세 개의 세 가지 복합형 (tri-antennary complex) (NT: m/z 2028.7, NT1: m/z 2295.8, NT1F: m/z 2441.9), 하나의 네 가지 복합형 (tetra-antennary complex) (NTe1: m/z 2660.0), 그리고 하나의 복합형 당쇄 (m/z 1542.6)이다. 이들 중 세 개의 당쇄 (m/z 1542.6, 2028.7 및 2295.8)는 환자군 및 LMP 군으로부터 대조군을 구별할 수 있으나, 반면 NT1F 및 NTe1은 환자군과 대조군에서 LMP 군을 구분할 수 있다. 임상에서 경계성 종양은 종종 CA125의

높은 수치로 인해 난소암으로 종종 오진된다. 또한, 많은 LMP 여성들은 높은 골반내 종양(high pelvic mass)을 가진다. 따라서, CA125와 복합된 방법, 초음파, 도플러 및 생검이 양성종양 진단에 이용되며, 이는 이 치명적인 종양의 진단에 CA125의 이용을 보충할 부가적인 마커가 필요함을 암시한다. LMP 난소암에서 당쇄 변화는 LMP 종양의 성질을 명확히 보여주며, 또한 특정 당쇄가 질병 개시에 대응하는 임상 셋팅에서 확인될 수 있음을 암시한다.

[143]

[144] **결과 5: 당쇄지도를 이용한 당쇄마커 평가**

[145] 질병 탐지에서 바이오마커의 시험 수행을 평가하기 위한 전략적 도구는 ROC (receiver operating characteristic) 커브이다. 일반적으로 AUC(area under the curve) 값이 0.50-0.75인 ROC 커브는 타당한 구별 (fair discrimination)을 가진 것으로 사료된다. 우리는 당쇄마커의 빈도 및 강도에 대하여 각각 ROC 커브에서 AUC를 계산하였다. 빈도 마커에 대하여는 각 빈도 마커들은 조합할 수 있었고, 하나의 ROC 커브는 같은 컷오프 값에 의해 만들어졌다. ROC 커브는 각 빈도 마커에 가중치를 부여함으로써 최적화된다 (표 3). 빈도 당쇄 마커에 대한 ROC 커브는 도 19A에 나타내었다. 모든 시료에 대한 ROC 커브에서 AUC는 0.93 (95% CI: 민감도 0.92, 특이도 0.91)이었다. 빈도 마커와 달리, 각 강도 마커는 컷오프 값이 다르기 때문에 독립적으로 고려하여야 한다. 각 강도 당쇄 마커에 대한 ROC 커브는 도 19 B에 나타내었다. 다른 강도 마커들에 대한 AUC는 표 4에 추가하였다. 강도 마커 중 (HexNAc)₃(Man)₃(GlcNAc)₂에 대응하는 *m/z* 1542.556은 가장 높은 AUC 값인 0.94를 나타내었다.

[146] 본 발명에서 당쇄에 의해 생성된 AUC는 CA125 분석방법에 의해 결정된 AUC와 직접 비교되지 않았다. CA125 35U/ml의 컷오프 값이 본 발명에서 사용된 시료에 대해 이미 확립된 값이므로, CA125 값에 있어서 training set은 완전히 편중된 시료이다 (표 7). 따라서, CA125 값은 AUC 값이 높기 때문에 당쇄 분석과 비교하여 ROC 커브를 생성하는데 이용될 수 없다. CA125에 대하여 특이하게 높은 AUC 값을 나타내는 GOG 시료는 다른 연구팀의 연구에서도 보고되었다.

[147]

[148] 난소암은 각각 구별되는 조직학 병리학 및 임상 행태를 갖는 30종 이상의 악성 서브타입이 있는 다양한 질병의 모음이다. 또한, 확인은 외과적으로 절개된 조직의 병리학적 시험을 통해서만 가능하다. 난소암의 다양성과 낮은 발병률은 바이오마커 연구를 방해한다. 스크린 마커로서 CA125의 유용성은 높은 허위 양성률로 인해 특히 양성 및 악성 조건에 대하여 한계가 있다. 따라서, CA125와 비교하여 진단 성과가 개선된 새로운 시험법 개발이 요구된다. 당쇄연구는 관련된 단백질을 고려하지 않고 생체액으로부터 당쇄를 얻는 과정을 포함한다. 당쇄화는 초기 당쇄에 덧붙이기 위해 서로 경쟁하는 글라이코실트랜스퍼레이즈를 포함한다. 당쇄화는 우선 세포의 두 부분에서 일어나는데, 소포체와 골지체이다. 따라서, 만약 당쇄화 장치가 오작동하면, 그

세포에서 유래하는 거의 모든 당단백질들은 잠재적으로 당쇄화에 오류가 생길 수 있다. 따라서, 당쇄를 모으는 것은 개체 내에서 당쇄화의 변화를 시험하는 방법을 제공한다. 나아가, 질병 단계에 따라 함량이 증가하거나 또는 감소하는 단백질과는 달리, 당쇄 변화는 좀더 뚜렷하다. 특정 당단백질은 세포 타입에 따라 다양한 속도로 생성될 수 있다. 그럼에도 불구하고, 당쇄화는 일반적인 세포와 비교하여 종양세포에서 매우 다양하게 변화하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 당쇄화의 변화를 모니터링하는 것은 제한된 수의 단백질 항원을 인식하는 단일클론항체를 이용하는 간접적인 방법에 비해 종양을 탐지하는 좀더 특이적이고 민감한 방법이 될 수 있다.

- [149] 본 발명에서는 인간 혈청에서 난소암 바이오마커의 N-당쇄를 결정하는 질량분석에 기초한 접근방법이 발명되었다. 일곱 개의 빈도 마커 및 열 개의 강도 마커를 포함하는 열일곱 개의 당쇄가 잠재적 바이오마커로 확인되었고, 이들은 대부분 복합/하이브리드형 N-당쇄였다. 어떤 강도 마커들은 임상 단계가 진행되면 증가하여 질병의 단계를 나타내기도 한다. 또한, LMP 종양은 LMP 종양을 어떻게 분류하느냐는 관점의 차이가 존재하기는 하지만, 당쇄 프로파일링에서 환자군과 대조군 사이의 중간적 특징을 나타낸다. 질병 마커 발견에서 글라이코믹스적인 접근은 관련된 단백질 분리 또는 분석에 의존적이지 않다. 대신 인간 혈청에서 N-당쇄를 분리하여 시료로 사용한다. 비록 이들 마커에 대한 확인과 확증이 필요하긴 하지만, 이 결과들은 높은 민감도와 특이도로 난소암을 탐지하기 위한 당쇄 바이오마커의 사용 가능성을 설명해 준다.

- [150] 표 1

[Table 1]

SPE Fraction	Type	Glycan composition ^a [+(Man) ₃ (GlcNAc) ₂]	m/z ^b
10%	High mannose	(Hex) ₂	1257.423
		(Hex) ₃	1419.475
		(Hex) ₄	1581.528
		(Hex) ₅	1743.581
		(Hex) ₆	1905.634
	Complex /hybride	(HexNAc) ₂ (Fuc) ₁	1485.534
		(Hex) ₁ (HexNAc) ₂ (Fuc) ₁	1647.586
		(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Fuc) ₁	1809.639
		(Hex) ₁ (HexNAc) ₃ (Fuc) ₁	1850.665
		(Hex) ₂ (HexNAc) ₃ (Fuc) ₁	2012.719
20%	Complex /hybride	(HexNAc) ₂ (Fuc) ₁	1485.534
		(Hex) ₁ (HexNAc) ₂ (Fuc) ₁	1647.586
		(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Fuc) ₁	1809.639
		(Hex) ₂ (HexNAc) ₃ (Fuc) ₁	2012.719
40%	Complex	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (NeuAc) ₁	1930.680
		(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (NeuAc) ₂	2243.758
		(Hex) ₃ (HexNAc) ₃ (NeuAc) ₁	2295.813
		(Hex) ₃ (HexNAc) ₃ (NeuAc) ₂	2608.890
	Fucosylated complex	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Fuc) ₁ (NeuAc) ₁	2076.738
		(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Fuc) ₂ (NeuAc) ₁	2389.816
		(Hex) ₃ (HexNAc) ₃ (Fuc) ₁ (NeuAc) ₁	2441.871
		(Hex) ₃ (HexNAc) ₃ (Fuc) ₁ (NeuAc) ₂	2754.948

	Stage I ^a	Stage II	Stage III	Stage IV	All Patients	Normal	LMP
Number of Subjects	21	14	52	13	100	48	50
Median Age	54 (33-73)	53 (34-80)	62 (32-85)	57 (45-76)	57 (32-85)	44 (22-65)	46 (21-71)
Mean Age (SD)	55 (12.2)	56 (13.8)	61 (13.6)	58 (9.4)	58 (13.0)	44 (8.1)	47 (11.8)
undifferentiated	0	0	1	1	2	-	-
Poorly differentiated	5	2	10	2	19	-	-
differentiated	3	0	0	0	3	-	-
clear cell	8	6	12	1	27	-	-
endometrioid	4	3	8	3	18	-	-
serous	0	3	21	6	30	-	-
hyperplasia	1	0	0	0	1	-	-

All samples were sourced from a single GOG study. LMP presents low malignancy potential ovarian tumor.
^a Staging based on FIGO, International Federation of Gynecology and Obstetrics.

[Table 2]

Glycan Compositions				Molecular Ion, [M+Na] ⁺			Patient Cancer Stage				Frequency	
Hex	HexNAc	Fuc	NeuAc	Exp	Theo	Dm	S1	S2	S3	S4	P_total	N
3	3	0	0	1136.402	1136.397	0.005	88.9%	83.3%	86.7%	75.0%	85.1%	41.9%
3	4	0	0	1339.476	1339.476	0.000	94.4%	100.0%	91.1%	100.0%	94.3%	48.8%
3	5	1	0	1688.613	1688.614	0.001	88.9%	91.7%	86.7%	91.7%	88.5%	48.8%
4	5	0	0	1704.612	1704.609	0.004	77.8%	75.0%	84.4%	91.7%	82.8%	27.9%
4	3	0	1	1611.539	1611.533	0.006	66.7%	58.3%	64.4%	75.0%	65.5%	30.2%
6	3	0	1	1935.639	1935.639	0.000	61.1%	41.7%	55.6%	41.7%	52.9%	20.9%
4	5	0	1	2017.689	2017.689	0.000	61.1%	50.0%	64.4%	75.0%	63.2%	11.6%

[Table 3]

Glycan Compositions					Normalized Signal Intensity Ratio ^a						GCC ^b AUC ^c	
Hex	HexNAc	Fuc	NeuAc	mass, m/z	S1	S2	S3	S4	N			
3	4	0	0	1339.480	1.6	1.8	2.0	2.5	1.0		10%	0.802
3	4	1	0	1485.529	1.8	2.0	2.1	2.7	1.0		10%	0.857
3	5	0	0	1542.559	3.1	3.6	3.8	6.9	1.0		10%	0.935
4	5	0	0	1704.610	1.8	2.1	1.9	2.5	1.0		10%	0.827
5	4	1	0	1809.640	0.6	0.6	0.5	0.4	1.0		10%	0.849
4	3	0	0	1298.450	2.0	2.2	2.5	4.1	1.0		20%	0.749
3	4	1	0	1485.534	1.5	1.7	2.4	2.8	1.0		20%	0.665
5	4	1	0	1809.640	0.7	0.7	0.6	0.5	1.0		20%	0.715
6	5	0	1	2295.812	0.6	0.5	0.5	0.4	1.0		40%	0.844
6	5	0	2	2608.890	0.6	0.4	0.6	0.3	1.0		40%	0.816

^aThe normalized peak intensity of patient samples was divided by the normalized peak intensity of control(normal) group to calculate the relative ratio of peak intensity between patients and control group.

S and N represent disease stage with ovarian cancer and normal (control) group, respectively.

^bGraphitized carbon cartridge (GCC) fraction.

^cAn area under the curve (AUC) in ROC curve was calculated.

표 5

[154]

[Table 5]

Type of Marker	Glycan Compositions					Mass, m/z	Frequency (f)			Intensity (I)		
	Hex	HexNAc	Fuc	NeuAc			P	N	LMP	P	N	LMP
Frequency	3	3	0	0		1136.397	85.1%	41.9%	51.1%	1.22	1.20	1.00
	3	4	0	0		1339.476	94.3%	48.8%	75.6%	1.42	0.80	1.00
	3	5	1	0		1688.614	88.5%	48.8%	80.0%	1.00	0.70	1.00
	4	5	0	0		1704.609	82.8%	27.9%	64.4%	1.15	1.32	1.00
Intensity	3	5	0	0		1542.556	100.0%	95.3%	97.8%	1.12	0.27	1.00
	6	5	0	0		2028.714	75.0%	97.7%	71.7%	1.21	2.06	1.00
	6	5	0	1		2295.813	100.0%	100.0%	100.0%	1.19	0.30	1.00
	6	5	1	1		2441.871	100.0%	100.0%	100.0%	1.84	1.90	1.00
	7	6	0	1		2660.931	78.3%	96.4%	91.1%	1.59	2.00	1.00

[155] ㉟ 6

[Table 6]

GCC fraction ^b	Glycan Type	Glycan Composition ^a	m/z
10%(+)	High mannose	2HexNAc:5Hex	1257.4226
		2HexNAc:6Hex	1419.4755
		2HexNAc:7Hex	1581.5283
		2HexNAc:8Hex	1743.5811
		2HexNAc:9Hex	1905.6339
	Complex/hybrid	4HexNAc:3Hex:1Fuc	1485.5337
		4HexNAc:4Hex:1Fuc	1647.5865
		4HexNAc:5Hex:1Fuc	1809.6393
		5HexNAc:5Hex:1Fuc	2012.7187
20%(+)	Complex/hybrid	4HexNAc:3Hex:1Fuc	1485.5337
		4HexNAc:4Hex:1Fuc	1647.5865
		4HexNAc:5Hex:1Fuc	1809.6393
		5HexNAc:5Hex:1Fuc	2012.7187
40%(-)	Complex(NB/NT)	4HexNAc:5Hex:1NeuAc	1930.6804
		4HexNAc:5Hex:2NeuAc	2243.7577
		5HexNAc:6Hex:1NeuAc	2295.8126
		5HexNAc:6Hex:2NeuAc	2608.8899
		4HexNAc:5Hex:1NeuAc:1Fuc	2076.7383
		4HexNAc:5Hex:2NeuAc:1Fuc	2389.8156
		5HexNAc:6Hex:1NeuAc:1Fuc	2441.8705

^a HexNAc, N-acetylhexosamine; Hex, Hexose; Fuc, Fucoses; NeuAc, sialic acid^b 10% and 20% fraction (+); [M+Na]⁺, 40% fraction (-), [M-H]⁻

* [M+Na-2H]

[156] ㉟ 7

[Table 7]

	Detemined as		Missing	Sensitivity
	P	N		
Patient	71	20	9	78.0%
Normal	1	38	8	*97.4%
LMP	27	24	0	*47.1%

[157] ㉟ 8

[Table 8]

	Glycan composition List	Molecular Mass	Frequency (%)			Glycan type
	(Hexose_HexNAc_Fucose_NeuAC)		10%	20%	40%	
1	12_2_0_0	2368.8030	-	-	65	High Mannose
2	11_2_0_0	2206.7502	-	25	-	High Mannose
3	10_2_0_0	2044.6974	24	-	-	High Mannose
4	9_2_0_0	1882.6446	100	-	-	High Mannose
5	8_2_0_0	1720.5918	100	-	-	High Mannose
6	7_2_0_0	1558.5390	97	-	-	High Mannose
7	6_2_0_0	1396.4862	100	100	-	High Mannose
8	5_2_0_0	1234.4334	100	100	-	High Mannose
9	3_2_0_0	910.3278				Core glycan
10	3_3_0_0	1113.4072	-	19	-	Complex/Hybrid
11	3_3_1_0	1259.4651	-	99	-	Complex/Hybrid
12	3_4_0_0	1316.4866	97	97	-	Complex
13	3_4_1_0	1462.5445	100	100	-	Complex
14	3_4_2_0	1608.6024	-	98	-	Complex
15	4_4_0_0	1478.5394	97	97	-	Complex
16	4_4_1_0	1624.5973	100	100	-	Complex
17	4_4_0_1	1769.6348	-	97	67	Complex
18	4_4_1_1	1915.6927	-	-	85	Complex
19	4_4_2_0	1770.6552	-	96	12	Complex
20	4_4_3_0	1916.7131	-	-	85	Complex
21	5_4_0_0	1640.5922	100	100	-	Complex
22	5_4_1_0	1786.6501	100	100	-	Complex
23	5_4_0_1	1931.6876	-	-	99	Complex
24	5_4_1_1	2077.7455	-	-	98	Complex
25	5_4_0_2	2222.7830	-	-	96	Complex
26	5_4_1_2	2368.8409	-	-	48	Complex
27	5_4_2_0	1932.7080	-	96	96	Complex
28	5_4_3_0	2078.7659	-	-	96	Complex
29	5_4_2_1	2223.8034	-	-	96	Complex
30	5_4_3_1	2369.8613	-	-	15	Complex
31	3_5_0_0	1519.5660	100	-	-	Complex
32	3_5_1_0	1665.6239	100	67	-	Complex
33	4_5_0_0	1681.6188	100	-	-	Complex
34	4_5_1_0	1827.6767	100	100	-	Complex

[158] ㉟ 9

[Table 9]

35	4_5_2_0	1973.7346	-	-	25	Complex
36	4_5_3_0	2119.7925	-	-	13	Complex
37	4_5_0_1	1972.7142	-	-	65	Complex
38	4_5_1_1	2118.7721	-	-	33	Complex
39	4_5_2_1	2264.8300	-	-	5	Complex
40	5_5_0_0	1843.6716	78	-	-	Complex
41	5_5_1_0	1989.7295	100	100	14	Complex
42	5_5_2_0	2135.7874	-	71	55	Complex
43	5_5_3_0	2281.8453	-	-	92	Complex
44	5_5_0_1	2134.7670	-	-	80	Complex
45	5_5_1_1	2280.8249	-	-	96	Complex
46	5_5_1_2	2571.9203	-	-	3	Complex
47	6_5_0_0	2005.7244	-	46	-	Complex
48	6_5_1_0	2151.7823	-	97	-	Complex
49	6_5_2_0	2297.8402	-	8	69	Complex
50	6_5_3_0	2443.8981	-	-	18	Complex
51	6_5_0_1	2296.8198	-	-	85	Complex
52	6_5_1_1	2442.8777	-	-	43	Complex
53	6_5_0_2	2587.9152	-	-	2	Complex
54	3_6_0_0	1722.6454	47	-	-	Complex
55	4_6_0_0	1884.6982	-	-	28	Complex
56	4_6_0_1	2175.7936	-	-	28	Complex
57	4_6_2_0	2176.8140	-	-	80	Complex
58	6_6_1_0	2354.8617	-	7	-	Complex
59	6_6_2_0	2500.9196	-	6	-	Complex
60	7_6_1_0	2516.9145	-	17	-	Complex
61	4_3_0_0	1275.4600	-	30	-	Complex/Hybrid
62	4_3_1_0	1421.5179	-	98	-	Complex/Hybrid
63	4_3_0_1	1566.5554	-	21	-	Complex/Hybrid
64	4_3_1_1	1712.6133	-	6	-	Complex/Hybrid
65	4_3_2_1	1858.6712	-	89	-	Complex/Hybrid
66	5_3_0_0	1437.5128	44	-	-	Hybrid
67	5_3_0_1	1728.6082	-	-	32	Hybrid
68	5_3_1_0	1583.5707	-	75	-	Hybrid

[Table 10]

69	5_3_1_1	1874.6661	-	5	-	Hybrid
70	5_3_2_1	2020.7240	-	25	-	Hybrid
71	6_4_0_0	1802.6450	-	100	-	Hybrid
72	6_4_1_0	1948.7029	-	68	-	Hybrid
73	6_4_2_0	2094.7608	-	35	-	Hybrid
74	6_3_0_0	1599.5656	34	54	-	Hybrid
75	6_3_1_0	1745.6235	-	45	-	Hybrid
76	6_3_0_1	1890.6610	-	-	15	Hybrid
77	6_3_2_1	2182.7768	-	25	-	Hybrid
78	5_2_1_0	1380.4913	4	-	-	Hybrid (Alternative glycan)
79	6_2_1_0	1542.5441	35	-	-	Hybrid (Alternative glycan)
80	5_3_0_0	1437.5128	44	-	-	Hybrid (Alternative glycan)
81	5_3_1_0	1583.5707	-	75	-	Hybrid (Alternative glycan)
82	6_3_0_0	1599.5656	34	54	-	Hybrid (Alternative glycan)
83	6_3_1_0	1745.6235	-	45	-	Hybrid (Alternative glycan)
84	6_3_0_1	1890.6610	-	-	15	Hybrid (Alternative glycan)
85	6_3_2_1	2182.7768	-	25	-	Hybrid (Alternative glycan)
86	3_5_0_0	1519.5660	Less than 5%			Bisecting (Alternative glycan)
87	3_5_1_0	1665.6239	Less than 5%			Bisecting (Alternative glycan)
88	4_5_0_0	1681.6188	Less than 5%			Bisecting (Alternative glycan)
89	4_5_1_0	1827.6767	Less than 5%			Bisecting (Alternative glycan)
90	4_5_0_1	1972.7142	Less than 5%			Bisecting (Alternative glycan)
91	4_5_1_1	2118.7721	Less than 5%			Bisecting (Alternative glycan)
92	4_5_2_0	1973.7346	Less than 5%			Bisecting (Alternative glycan)
93	4_5_2_1	2264.8300	Less than 5%			Bisecting (Alternative glycan)
94	4_5_3_0	2119.7925	Less than 5%			Bisecting (Alternative glycan)
95	5_5_0_0	1843.6716	Less than 5%			Bisecting (Alternative glycan)
96	5_5_1_0	1989.7295	Less than 5%			Bisecting (Alternative glycan)
97	5_5_0_1	2134.7670	Less than 5%			Bisecting (Alternative glycan)
98	5_5_1_1	2280.8249	Less than 5%			Bisecting (Alternative glycan)
99	5_5_1_2	2571.9203	Less than 5%			Bisecting (Alternative glycan)
100	5_5_2_0	2135.7874	Less than 5%			Bisecting (Alternative glycan)
101	5_5_3_0	2281.8453	Less than 5%			Bisecting (Alternative glycan)
102	6_5_0_0	2005.7244	Less than 5%			Bisecting (Alternative glycan)
103	3_6_0_0	1722.6454	Less than 5%			Bisecting (Alternative glycan)
104	4_6_0_0	1884.6982	Less than 5%			Bisecting (Alternative glycan)
105	4_6_0_1	2175.7936	Less than 5%			Bisecting (Alternative glycan)
106	4_6_2_0	2176.8140	Less than 5%			Bisecting (Alternative glycan)
107	6_6_1_0	2354.8617	Less than 5%			Bisecting (Alternative glycan)
108	6_6_2_0	2500.9196	Less than 5%			Bisecting (Alternative glycan)

산업상 이용가능성

- [160] 본 발명에 따르면 인간 혈청을 비롯한 인간 체액 시료의 당쇄를 분석함으로써 기본 당쇄 18종의 존재 유무를 탐지하여 시료가 오염되지 않았는지 등을 검증할 수 있으며, 또한, 당쇄지도를 통해서 정상군과 환자군 간의 특정 당쇄 출현 빈도 또는 강도에 현저한 차이가 있는 경우, 이 특정 당쇄를 종양을 비롯한 특정 질병의 빈도 또는 강도 마커로 이용할 수 있으며, 특정 종양의 진행 단계를 파악하는 마커로도 이용할 수 있어 질병 유무의 진단, 진행단계 파악 등을 위한 마커로 유용하다.

청구범위

[청구항 1]

(a) 준비된 인간 혈청 시료를 효소처리하여 N-당쇄를 분리하는 단계;
 (b) 분리된 N-당쇄를 분획하는 단계;
 (c) N-당쇄 분획을 질량분석하는 단계; 및
 (d) 질량분석 결과, 키토바이오스 코어에 결합된 당 구조가 각각 (Hex)₂ 이론적 단일동위원소 질량값 1257, (Hex)₃ 이론적 단일동위원소 질량값 1419, (Hex)₄ 이론적 단일동위원소 질량값 1582, (Hex)₅ 이론적 단일동위원소 질량값 1744, (Hex)₆ 이론적 단일동위원소 질량값 1906, (HexNAc)₂(Fuc)₁ 이론적 단일동위원소 질량값 1486, (Hex)₁(HexNAc)₂(Fuc)₁ 이론적 단일동위원소 질량값 1648, (Hex)₂(HexNAc)₂(Fuc)₁ 이론적 단일동위원소 질량값 1810, (Hex)₁(HexNAc)₃(Fuc)₁ 이론적 단일동위원소 질량값 1851, (Hex)₂(HexNAc)₃(Fuc)₁ 이론적 단일동위원소 질량값 2013, (Hex)₂(HexNAc)₂(NeuAc)₁ 이론적 단일동위원소 질량값 1931, (Hex)₂(HexNAc)₂(NeuAc)₂ 이론적 단일동위원소 질량값 2244, (Hex)₃(HexNAc)₃(NeuAc)₁ 이론적 단일동위원소 질량값 2296, (Hex)₃(HexNAc)₃(NeuAc)₂ 이론적 단일동위원소 질량값 2609, (Hex)₂(HexNAc)₂(Fuc)₁(NeuAc)₁ 이론적 단일동위원소 질량값 2077, (Hex)₂(HexNAc)₂(Fuc)₂(NeuAc)₁ 이론적 단일동위원소 질량값 2390, (Hex)₃(HexNAc)₃(Fuc)₁(NeuAc)₁ 이론적 단일동위원소 질량값 2442 및 (Hex)₃(HexNAc)₃(Fuc)₁(NeuAc)₂ 이론적 단일동위원소 질량값 2755의 18종 구조를 모두 포함하고 있는 경우에만 정상적인 시료로 판단하는 단계;를 포함하는 인간 혈청 시료 검증방법 {단, Man, 만노스 (Mannose); GlcNAc, N-아세틸글루코사민 (N-acetylglucosamine); Hex, 헥소스 (Hexose); HexNAc, N-아세틸헥소사민 (N-acetylhexosamine); Fuc, 퓨코스 (Fucose); NeuAc, N-아세틸뉴라민산 (N-acetylneuraminic acid)}.

[청구항 2]

청구항 1에 있어서,
 (b) 의 분획 단계는 크로마토그래피를 이용하여 수행함을 특징으로 하는, 인간 혈청 시료 검증방법.

[청구항 3]

청구항 1에 있어서,
 (c) 질량분석 단계는 MALDI-FT ICR MS (Matrix assisted laser desorption ionization Fourier transform-ion cyclotron resonance mass spectrometry)를 이용하여 수행함을 특징으로 하는, 인간 혈청 시료 검증방법.

[청구항 4]

키토바이오스 코어 (Man₃GlcNAc₂)에 결합된 당 구조가 (Hex)₂

이론적 단일동위원소 질량값 1257, (Hex)₃ 이론적 단일동위원소 질량값 1419, (Hex)₄ 이론적 단일동위원소 질량값 1582, (Hex)₅ 이론적 단일동위원소 질량값 1744, (Hex)₆ 이론적 단일동위원소 질량값 1906, (HexNAc)₂(Fuc)₁ 이론적 단일동위원소 질량값 1486, (Hex)₁(HexNAc)₂(Fuc)₁ 이론적 단일동위원소 질량값 1648, (Hex)₂(HexNAc)₂(Fuc)₁ 이론적 단일동위원소 질량값 1810, (Hex)₁(HexNAc)₃(Fuc)₁ 이론적 단일동위원소 질량값 1851, (Hex)₂(HexNAc)₃(Fuc)₁ 이론적 단일동위원소 질량값 2013, (Hex)₂(HexNAc)₂(NeuAc)₁ 이론적 단일동위원소 질량값 1931, (Hex)₂(HexNAc)₂(NeuAc)₂ 이론적 단일동위원소 질량값 2244, (Hex)₃(HexNAc)₃(NeuAc)₁ 이론적 단일동위원소 질량값 2296, (Hex)₃(HexNAc)₃(NeuAc)₂ 이론적 단일동위원소 질량값 2609, (Hex)₂(HexNAc)₂(Fuc)₁(NeuAc)₁ 이론적 단일동위원소 질량값 2077, (Hex)₂(HexNAc)₂(Fuc)₂(NeuAc)₁ 이론적 단일동위원소 질량값 2390, (Hex)₃(HexNAc)₃(Fuc)₁(NeuAc)₁ 이론적 단일동위원소 질량값 2442 및 (Hex)₃(HexNAc)₃(Fuc)₁(NeuAc)₂ 이론적 단일동위원소 질량값 2755의 18종 구조로 이루어진 인간 혈청 필수 N-당쇄 라이브러리 {단, Man, 만노스 (Mannose); GlcNAc, N-아세틸글루코사민 (N-acetylglucosamine); Hex, 헥소스 (Hexose); HexNAc, N-아세틸헥소사민 (N-acetylhexosamine); Fuc, 푸코스 (Fucose); NeuAc, N-아세틸뉴라민산 (N-acetylneuraminic acid)}.

[청구항 5]

도 3a 내지 도 13에 개시된 108개 당쇄로 이루어진 인간 혈청 유래 N-당쇄 라이브러리.

[청구항 6]

(a) 정상군과 특정질병 환자군의 인간 혈청 시료를 각각 효소처리하여 N-당쇄를 분리하는 단계;
 (b) 분리된 N-당쇄를 분획하는 단계;
 (c) N-당쇄 분획을 질량분석하는 단계;
 (d) 분석한 N-당쇄 분획에 상기 청구항 4의 인간 혈청 필수 N-당쇄 라이브러리의 18종 N-당쇄가 모두 존재하는지를 확인하는 단계; 및
 (e) 질량분석 결과를 비교할 때 정상군과 특정질병 환자군 간에 상기 청구항 5의 108개 당쇄 중 하나 이상의 특정 N-당쇄의 출현 빈도에 20% 이상의 차이가 있는 경우, 시료 내에 상기 특정 N-당쇄의 출현 빈도를 측정하여 특정질병의 유무를 결정하는 단계;를 포함하는, 특정 N-당쇄를 특정질병의 마커로 이용하는 방법.

[청구항 7]

(a) 정상군과 특정질병 환자군의 인간 혈청 시료를 각각 효소처리하여 N-당쇄를 분리하는 단계;

- (b) 분리된 N-당쇄를 분획하는 단계;
- (c) N-당쇄 분획을 질량분석하는 단계;
- (d) 분석한 N-당쇄 분획에 상기 청구항 4의 인간 혈청 필수 N-당쇄 라이브러리의 18종 N-당쇄가 모두 존재하는지를 확인하는 단계; 및
- (e) 질량분석 결과를 비교할 때 정상군과 특정질병 환자군 모두에서 상기 청구항 5의 108개 당쇄 중 특정 N-당쇄가 90% 이상의 확률로 발견되며, 정상군과 특정질병 환자군 간에 상기 특정 N-당쇄의 강도에 30% 이상의 차이가 있는 경우, 시료 내에 상기 특정 N-당쇄의 강도를 측정하여 특정질병의 유무를 결정하는 단계;를 포함하는, 특정 N-당쇄를 특정질병의 마커로 이용하는 방법.

[청구항 8]

- (a) 정상군과 특정질병 환자군의 인간 혈청 시료를 각각 효소처리하여 N-당쇄를 분리하는 단계;
- (b) 분리된 N-당쇄를 분획하는 단계;
- (c) N-당쇄 분획을 질량분석하는 단계;
- (d) 분석한 N-당쇄 분획에 상기 청구항 4의 인간 혈청 필수 N-당쇄 라이브러리의 18종 N-당쇄가 모두 존재하는지를 확인하는 단계; 및
- (e) 질량분석 결과를 비교할 때 특정질병 환자군에 상기 청구항 5의 108개 당쇄가 아닌 특정 N-당쇄가 존재하고, 정상군에는 특정 N-당쇄가 존재하지 않는 경우, 시료 내에 상기 특정 N-당쇄의 존재 여부를 측정하여 특정질병의 유무를 결정하는 단계;를 포함하는, 특정 N-당쇄를 특정질병의 마커로 이용하는 방법.

[청구항 9]

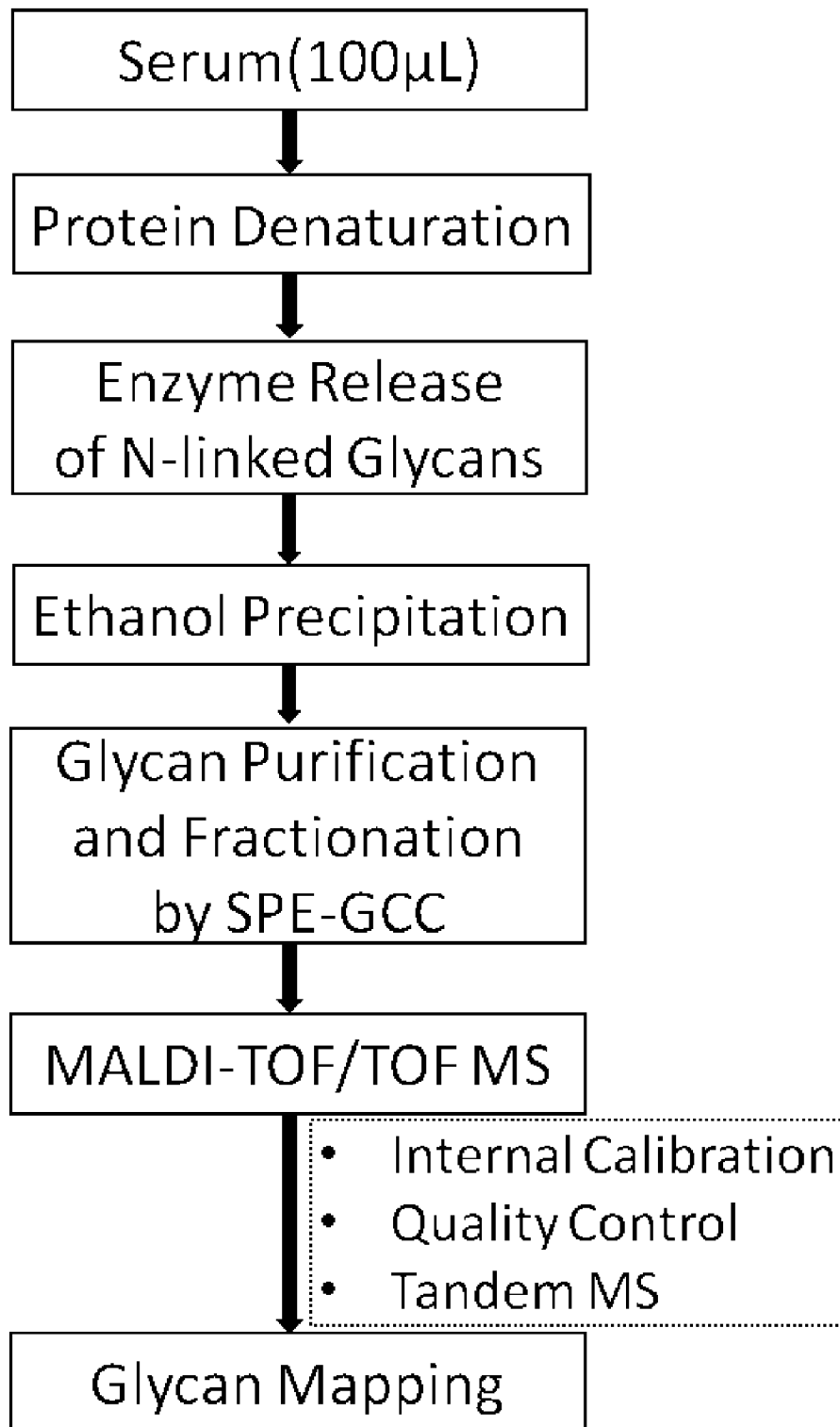
- (a) 정상군과 특정질병 진행단계별 환자군의 인간 혈청 시료를 각각 효소처리하여 N-당쇄를 분리하는 단계;
- (b) 분리된 N-당쇄를 분획하는 단계;
- (c) N-당쇄 분획을 질량분석하는 단계;
- (d) 분석한 N-당쇄 분획에 상기 청구항 4의 인간 혈청 필수 N-당쇄 라이브러리의 18종 N-당쇄가 모두 존재하는지를 확인하는 단계; 및
- (e) 질량분석 결과를 비교할 때 특정질병 진행단계별 환자군에서 특정질병의 진행단계에 따라 상기 청구항 5의 108개 당쇄 중 하나 이상의 특정 N-당쇄의 발현 빈도 또는 발현 강도에 유의한 차이가 있는 경우, 시료 내에 상기 특정 N-당쇄의 강도 또는 출현 빈도를 측정하여 특정질병의 진행단계를 결정하는 단계;를 포함하는, 특정 N-당쇄를 특정질병 진행단계의 마커로 이용하는 방법.

[청구항 10]

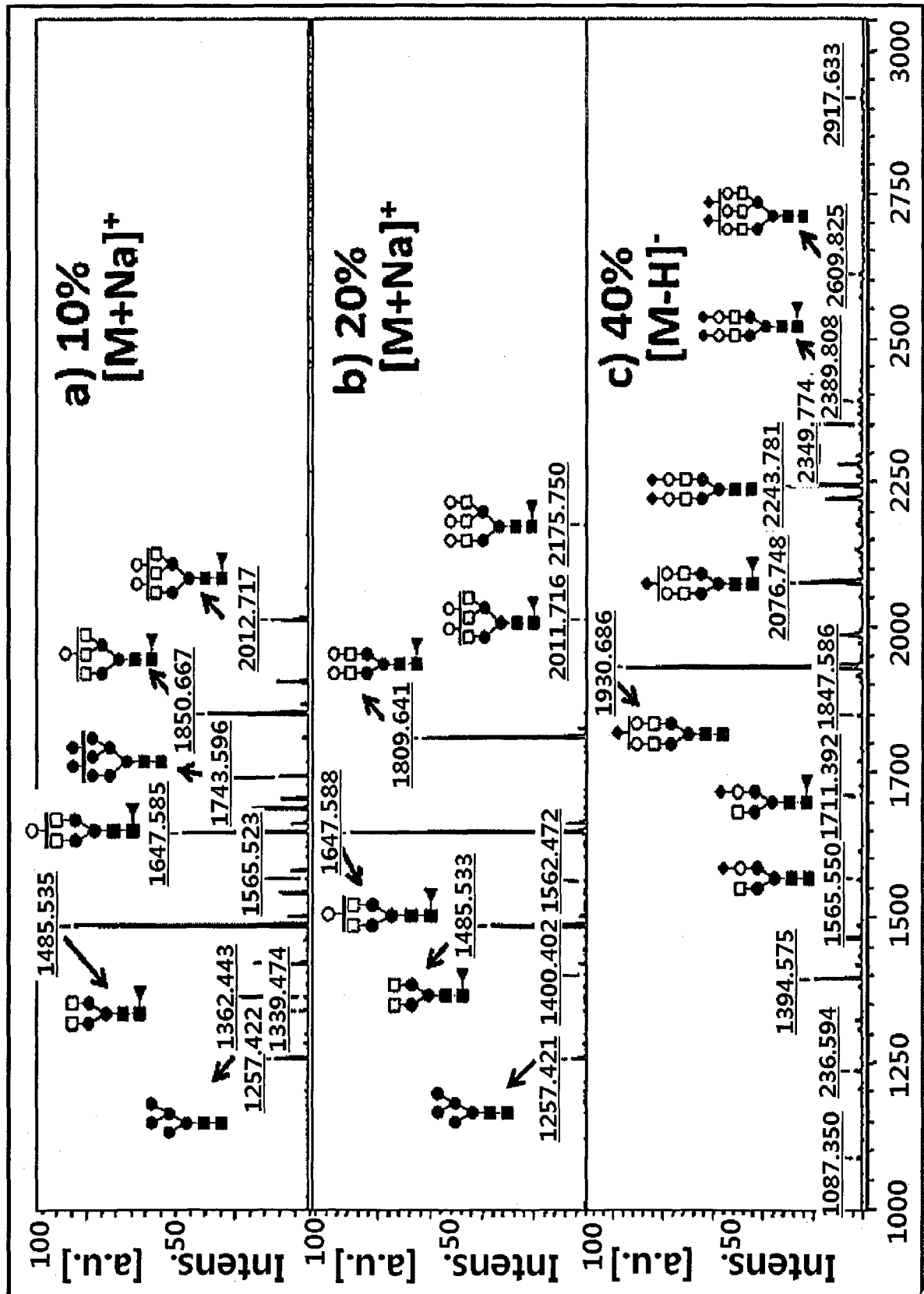
- 인간 혈청 시료로부터 추출한 도 3a 내지 도 13에 개시된 N-당쇄의

당쇄화 지도.

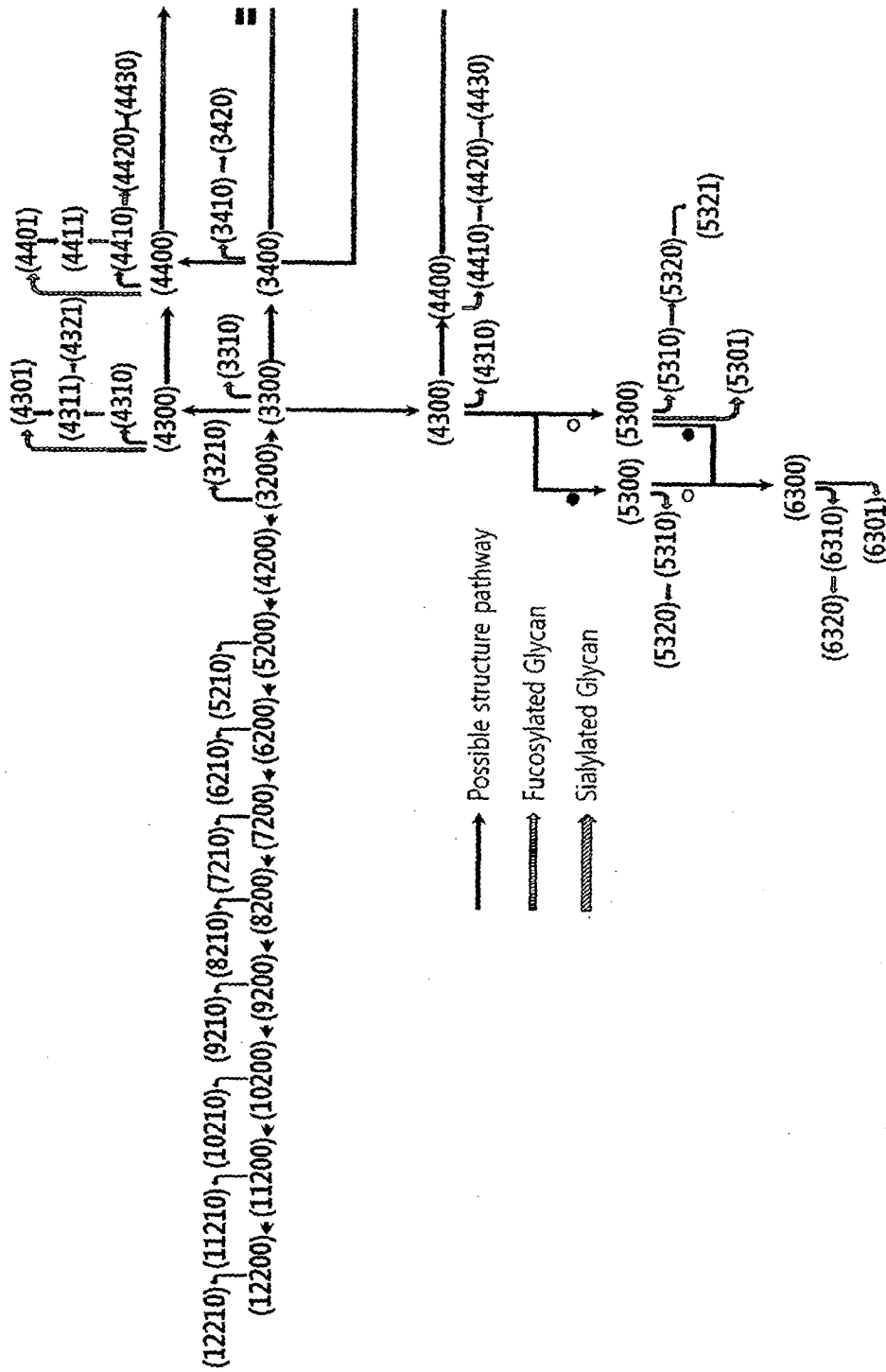
[Fig. 1]



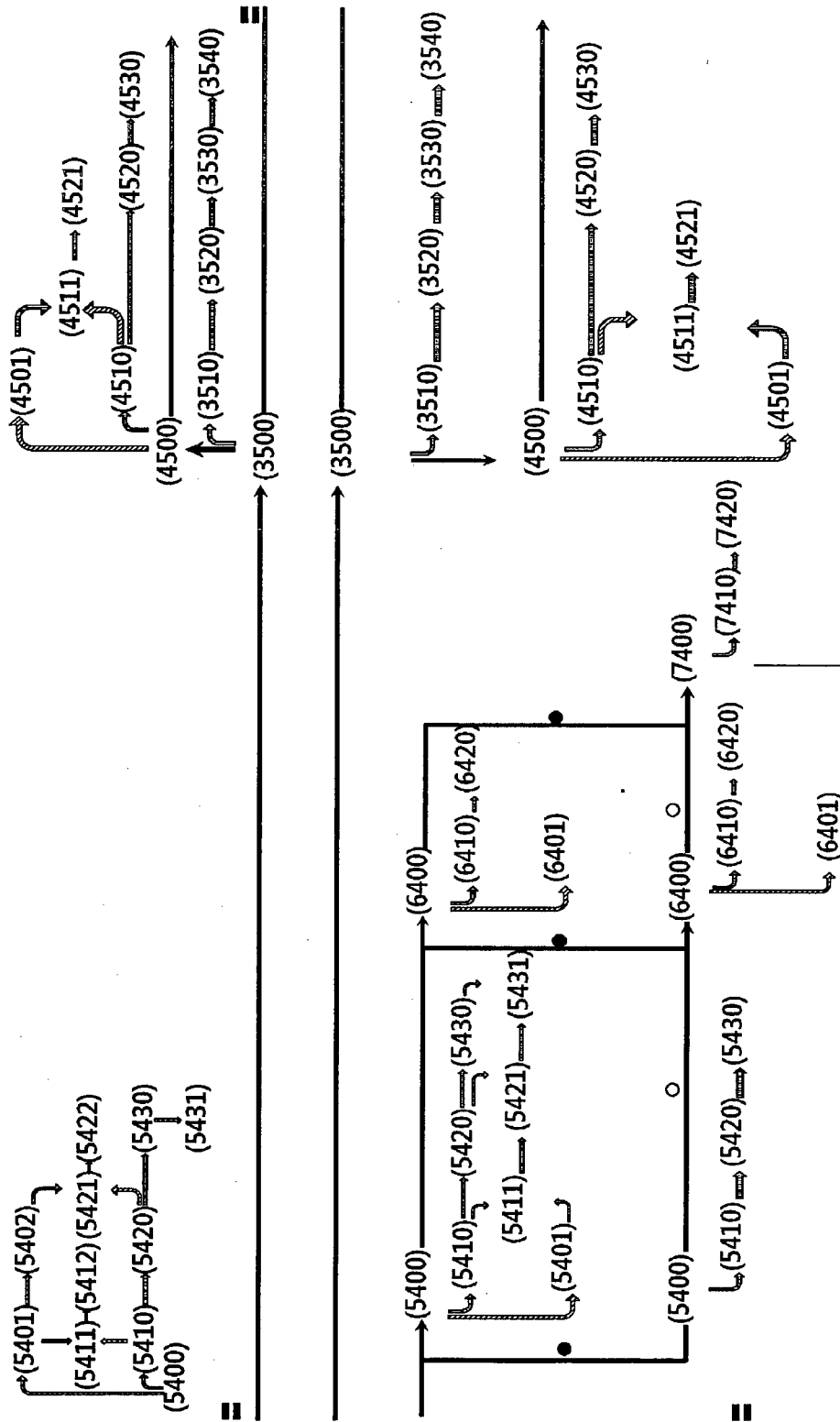
[Fig. 2]



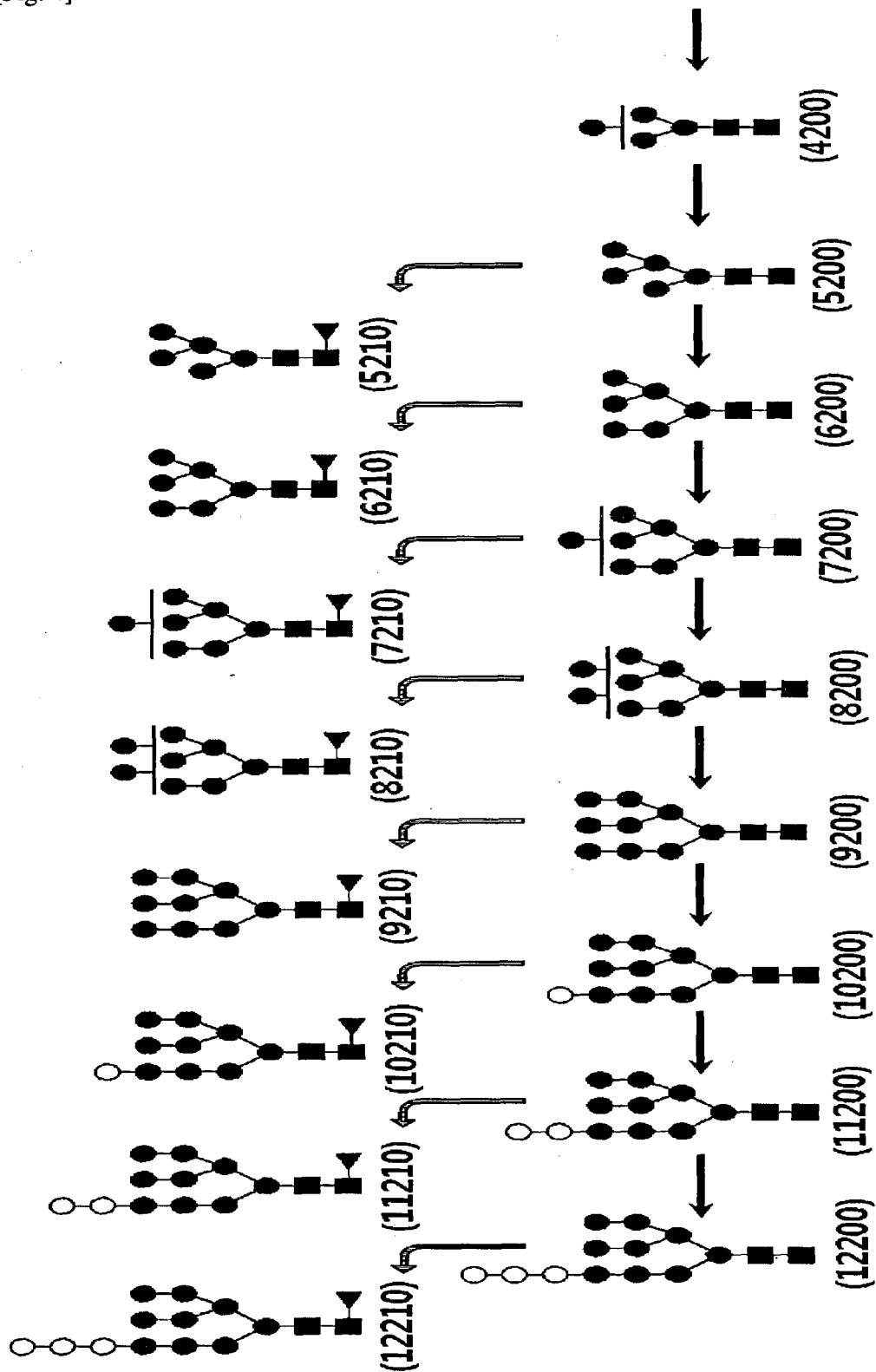
[Fig. 3a]



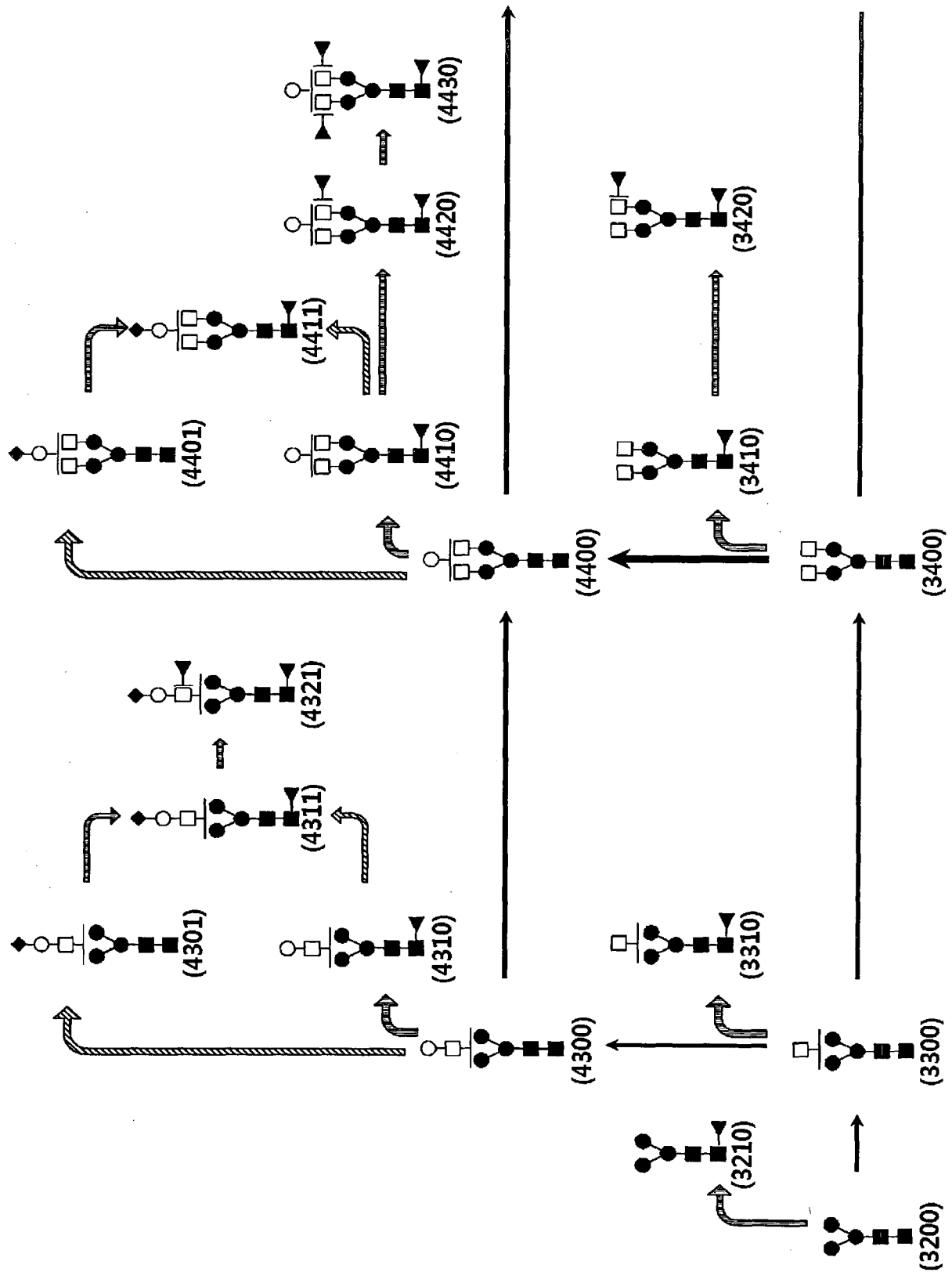
[Fig. 3b]



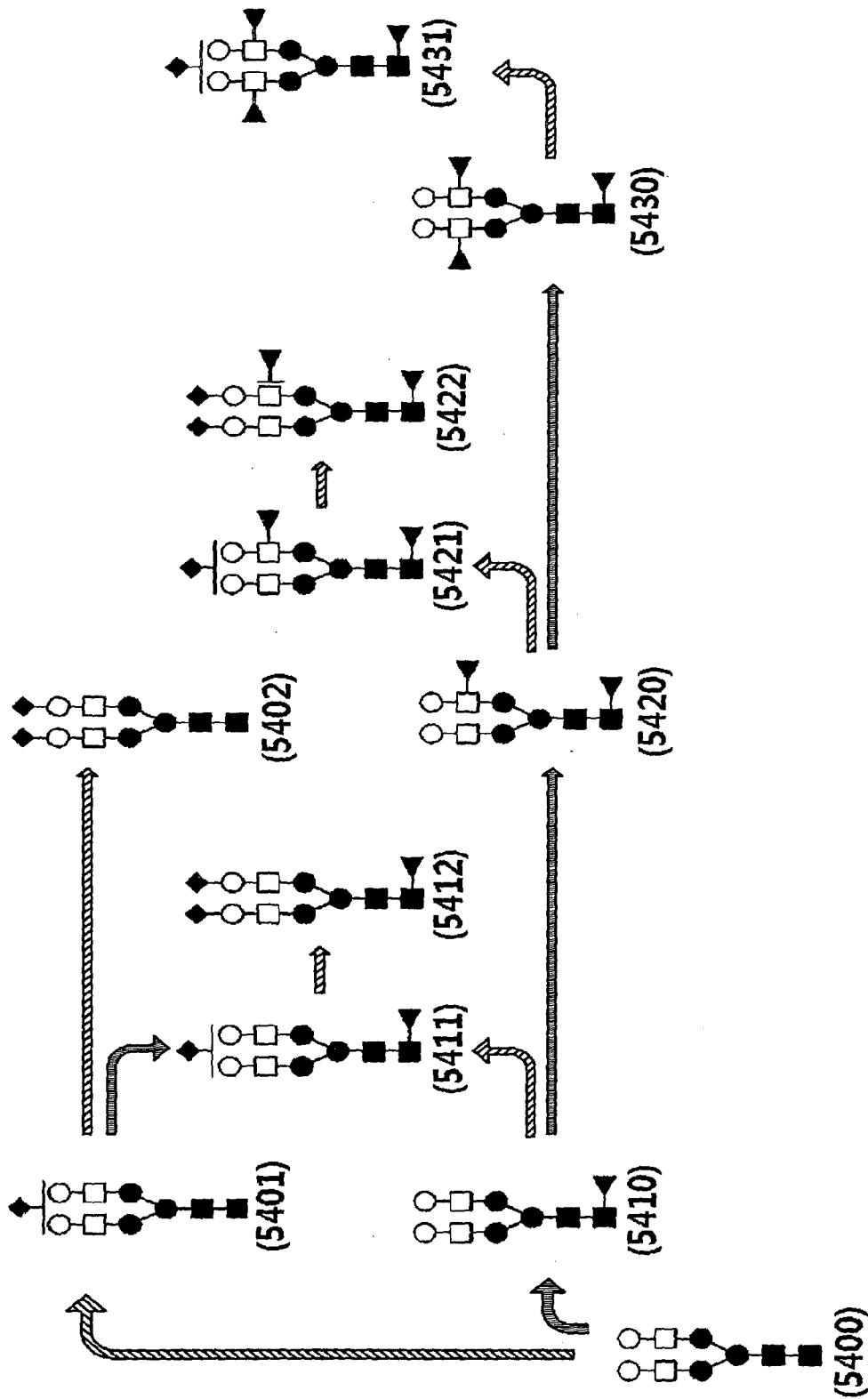
[Fig. 4]



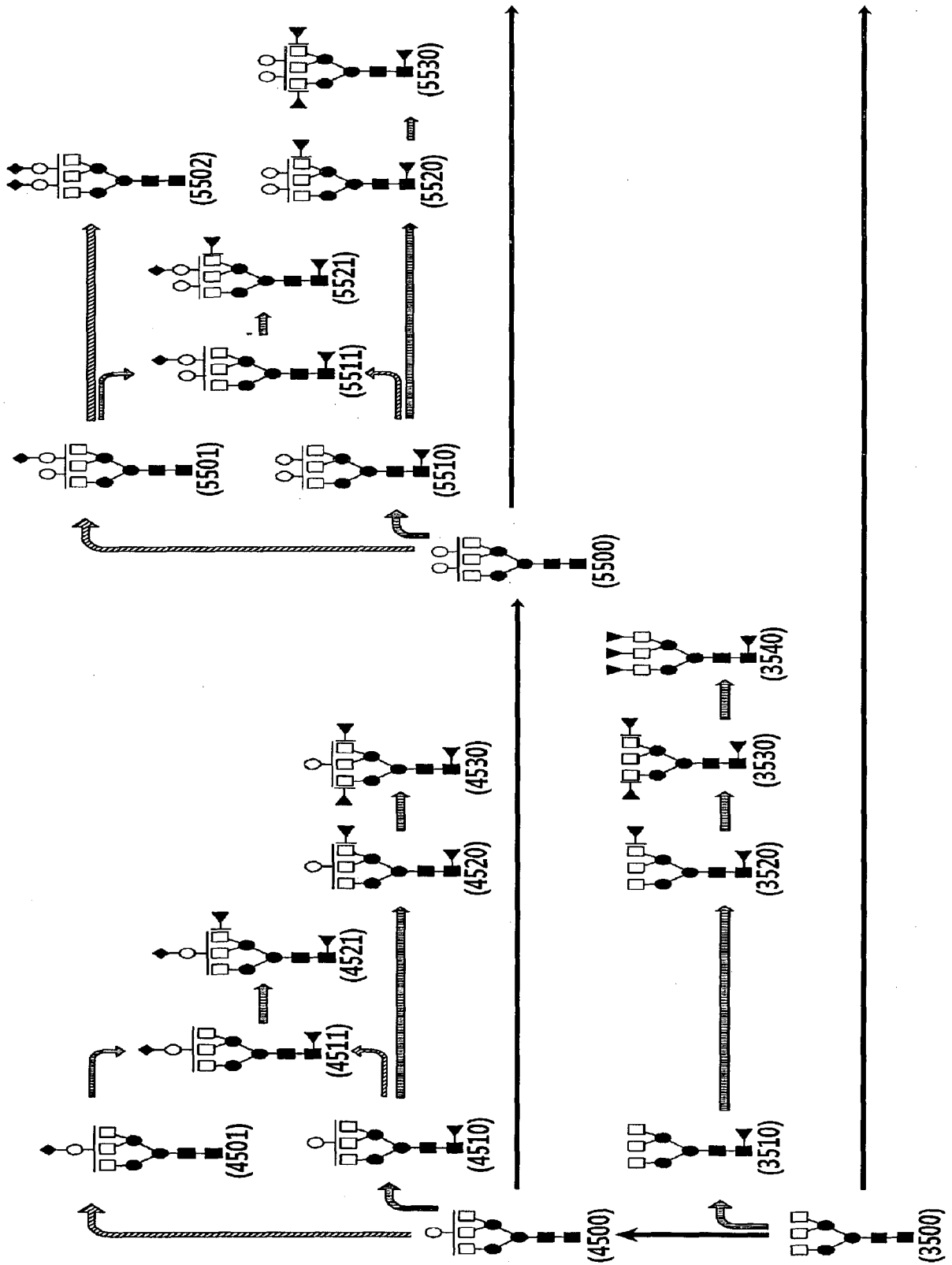
[Fig. 5]



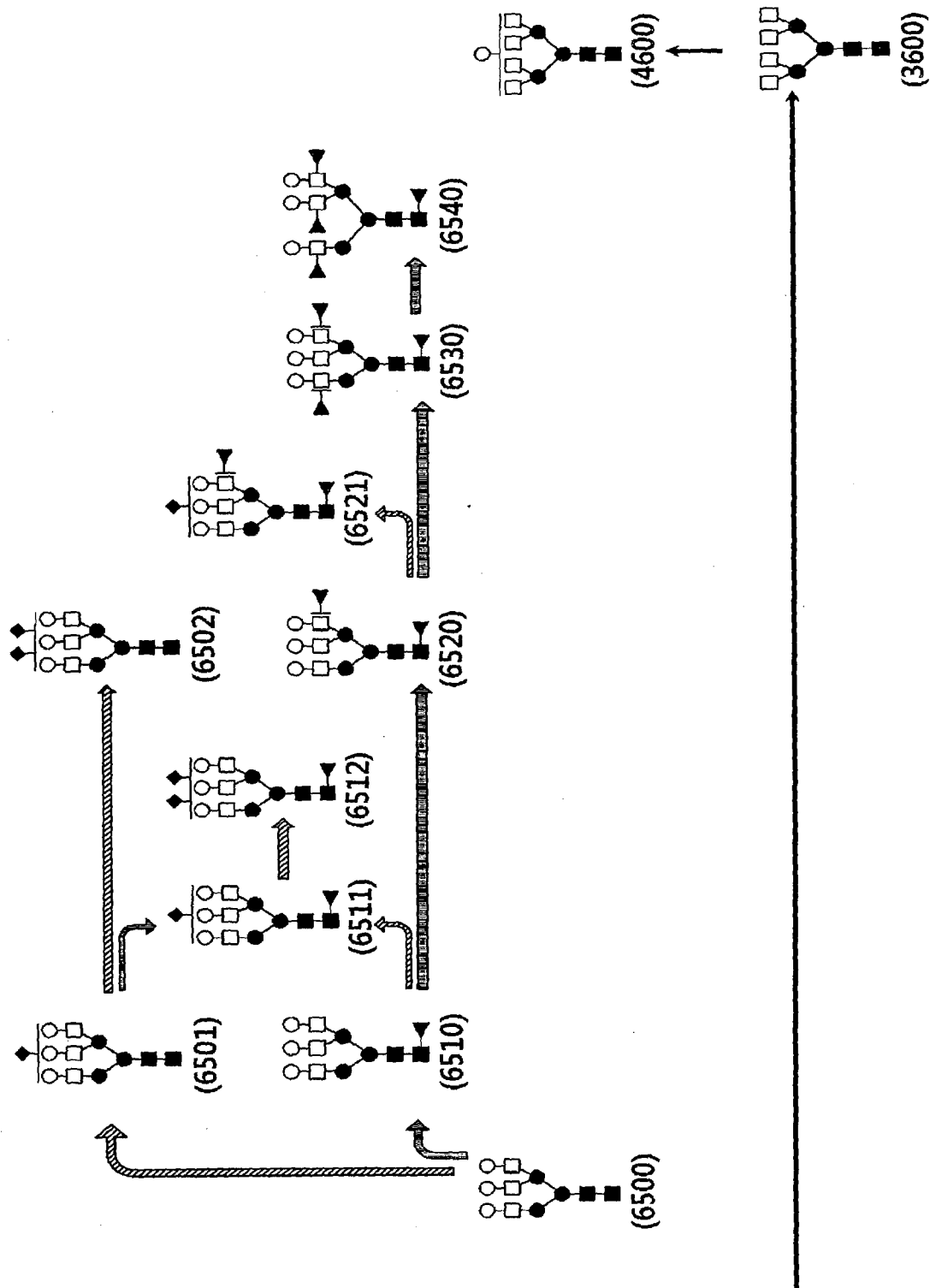
[Fig. 6]



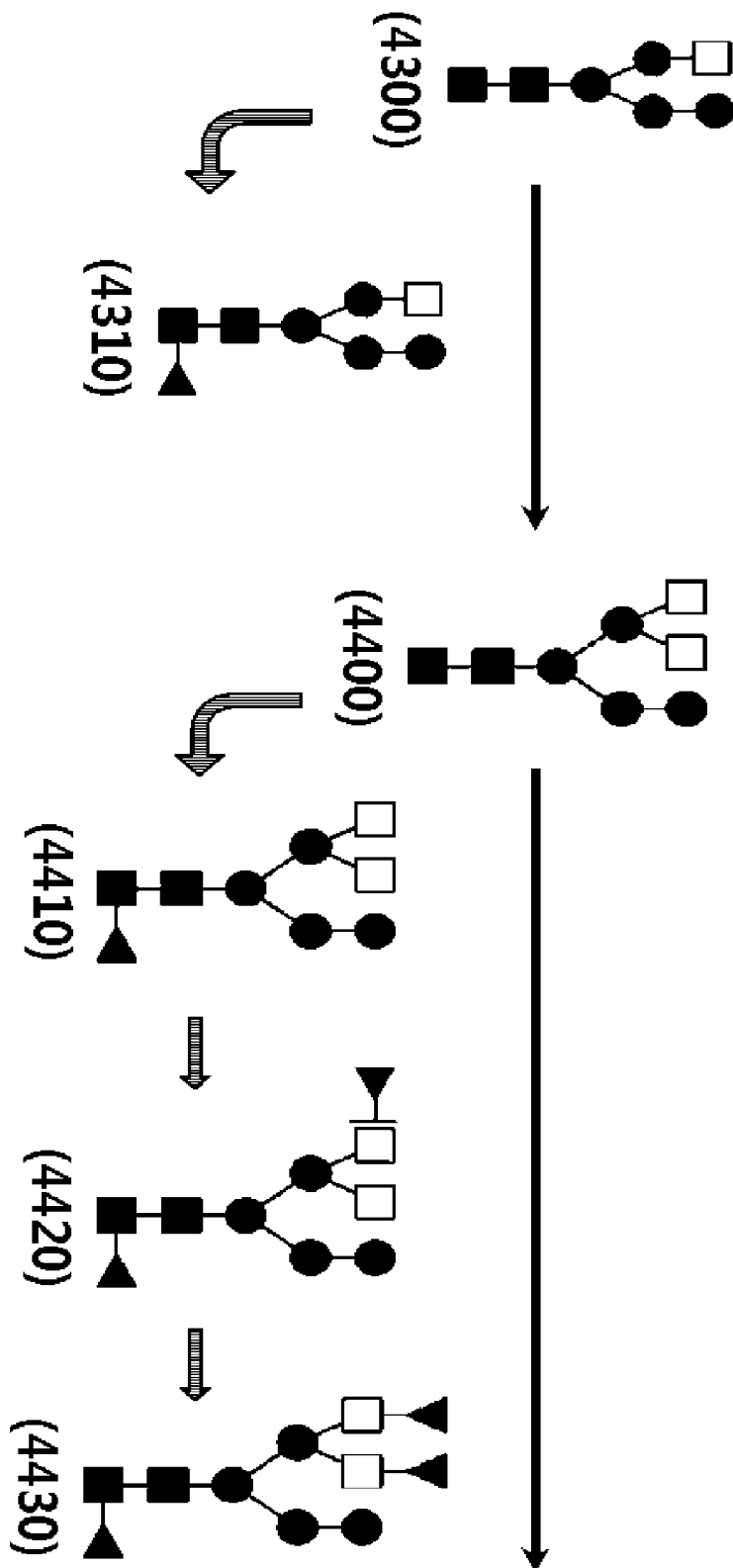
[Fig. 7]



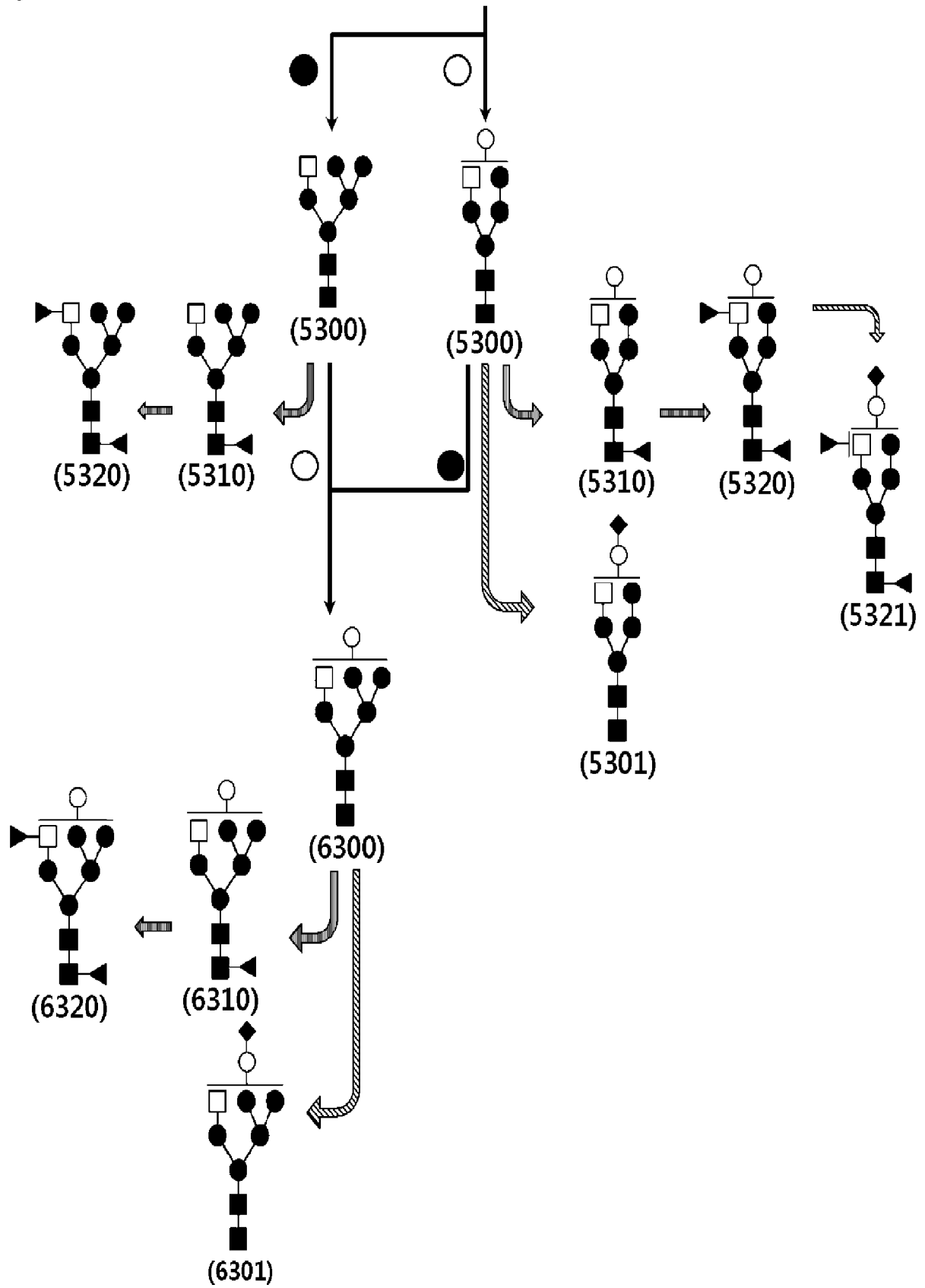
[Fig. 8]



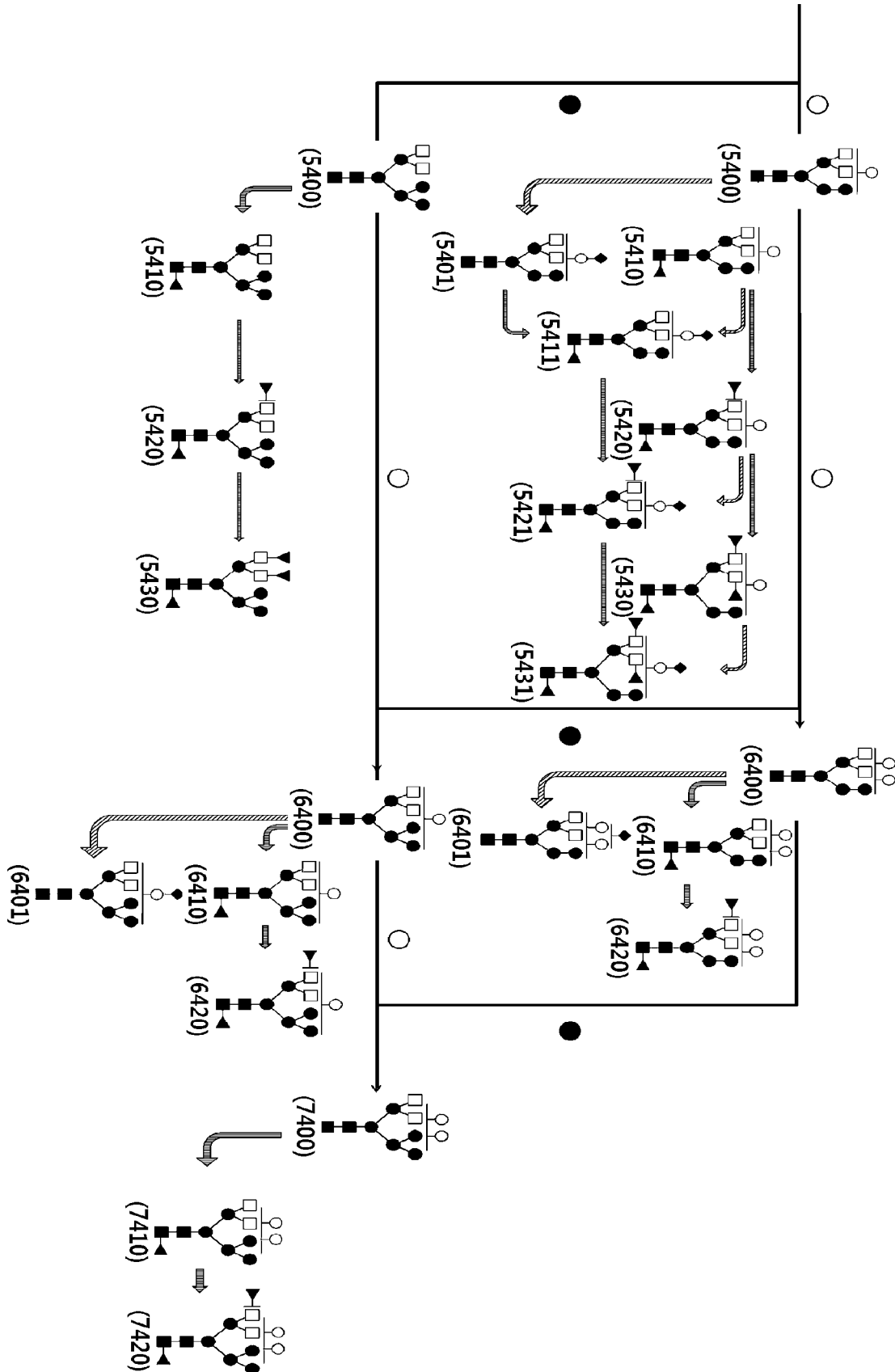
[Fig. 9]



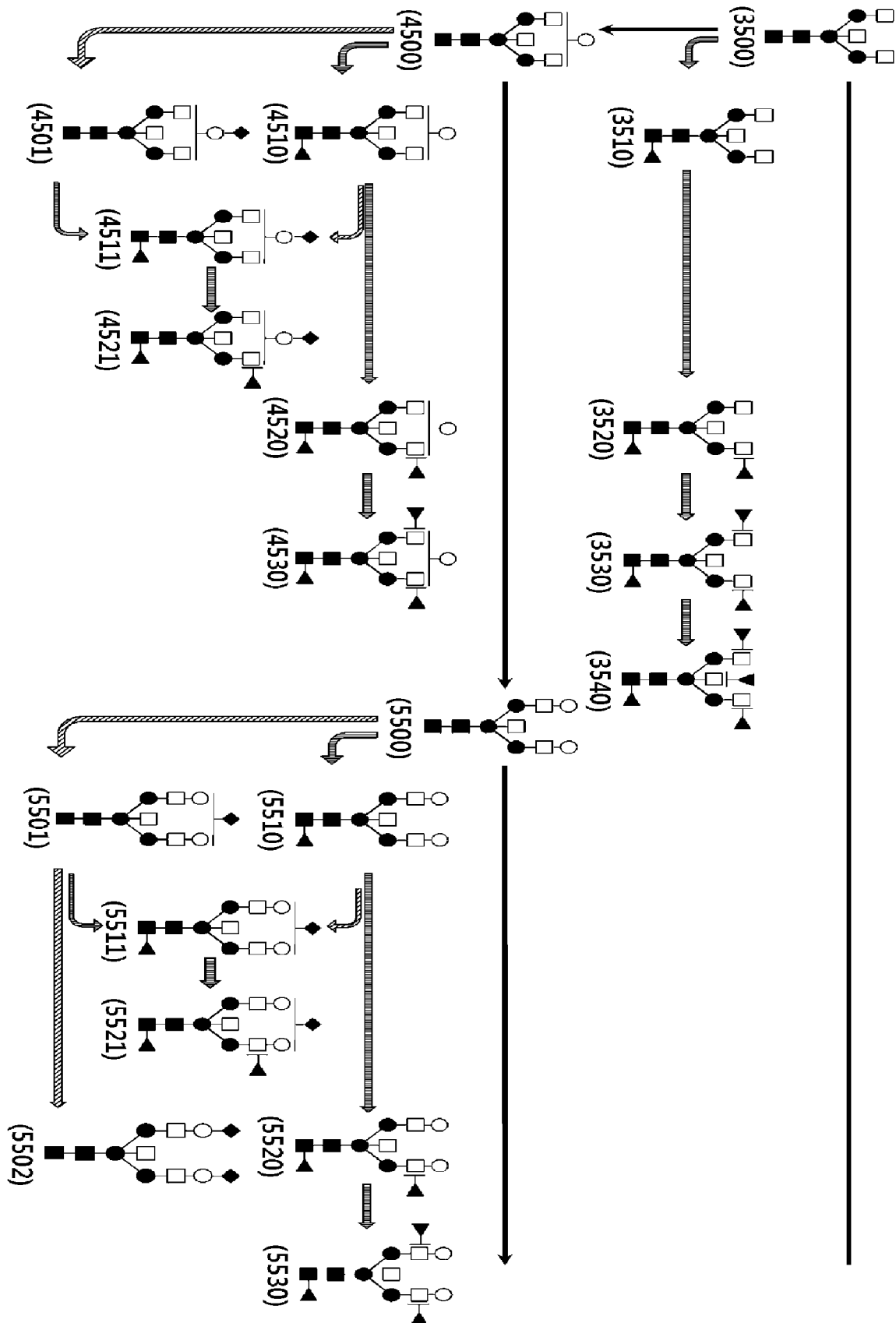
[Fig. 10]



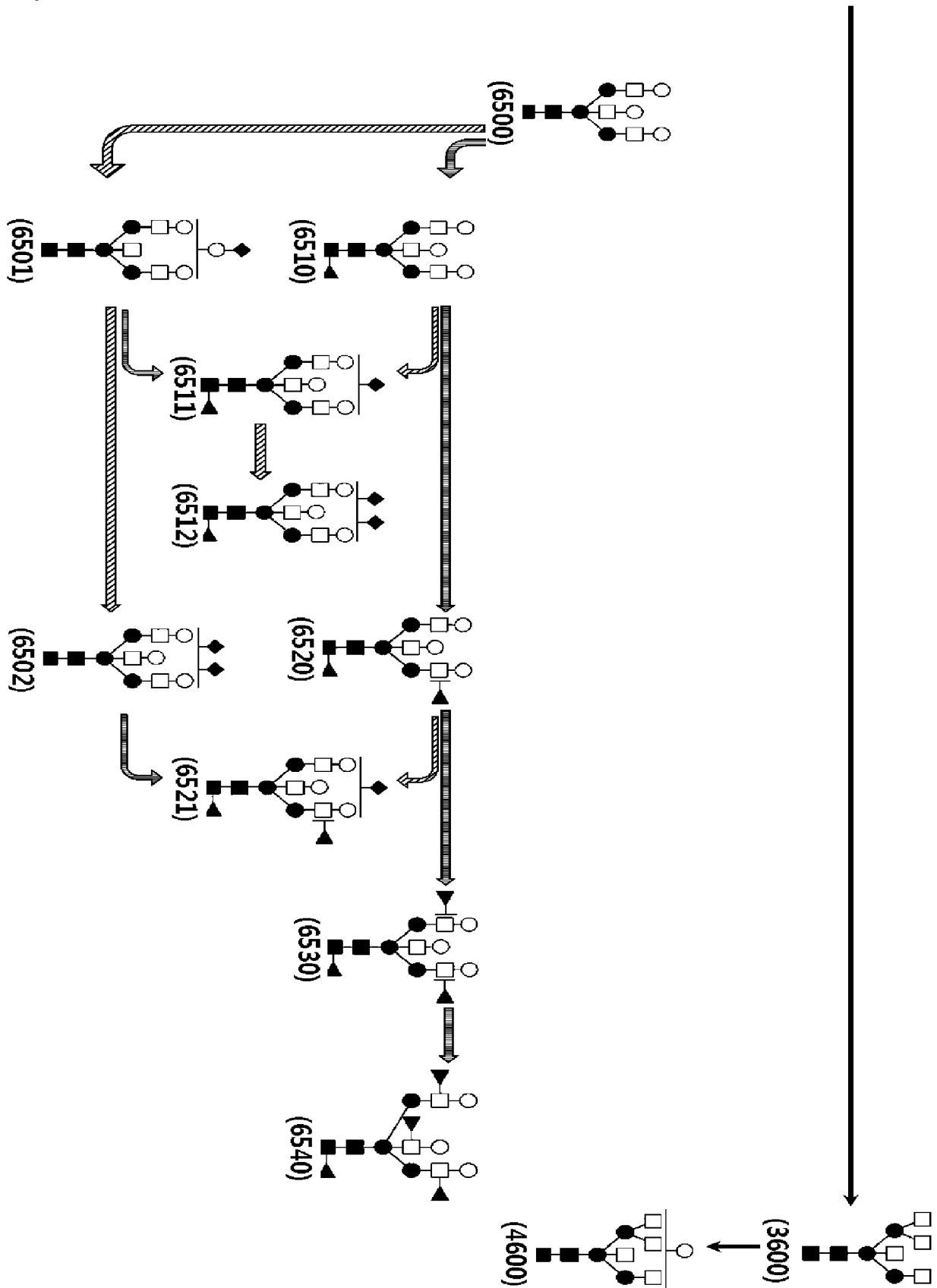
[Fig. 11]



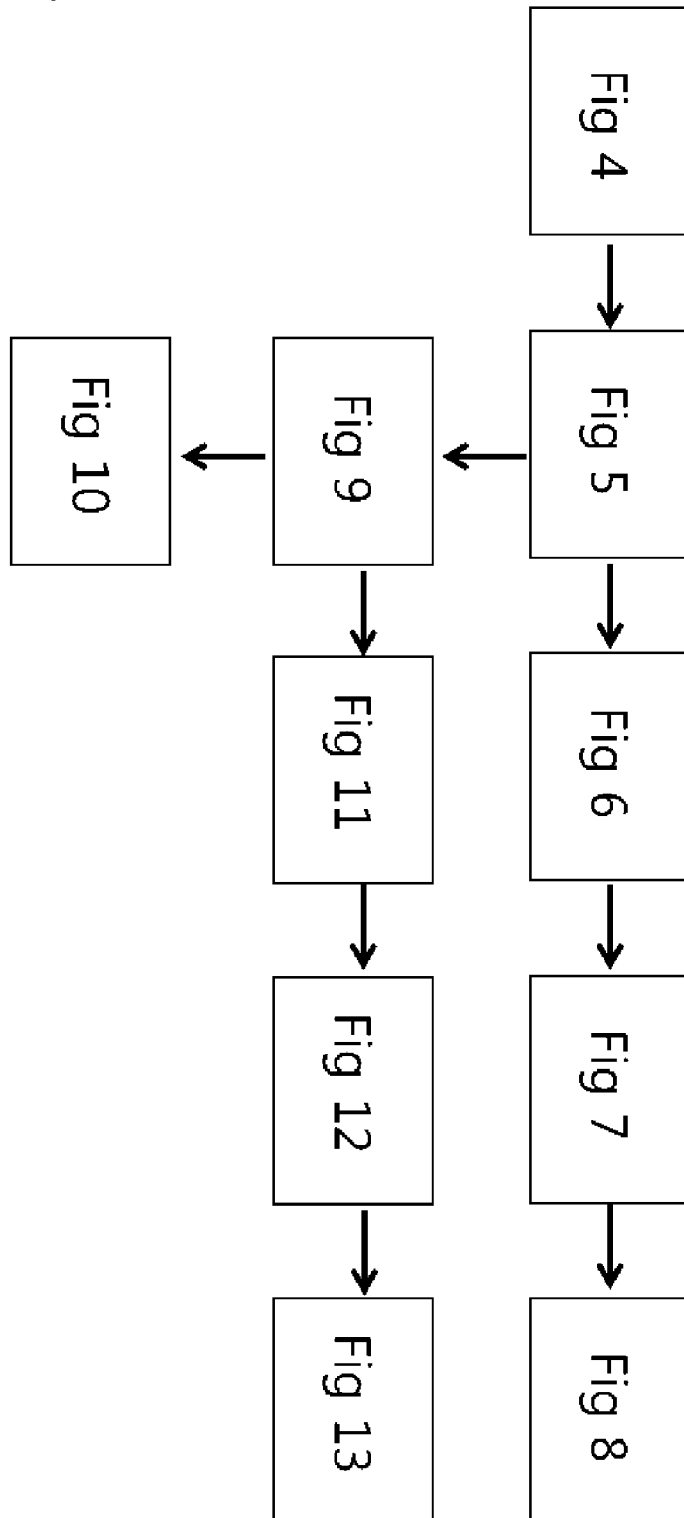
[Fig. 12]



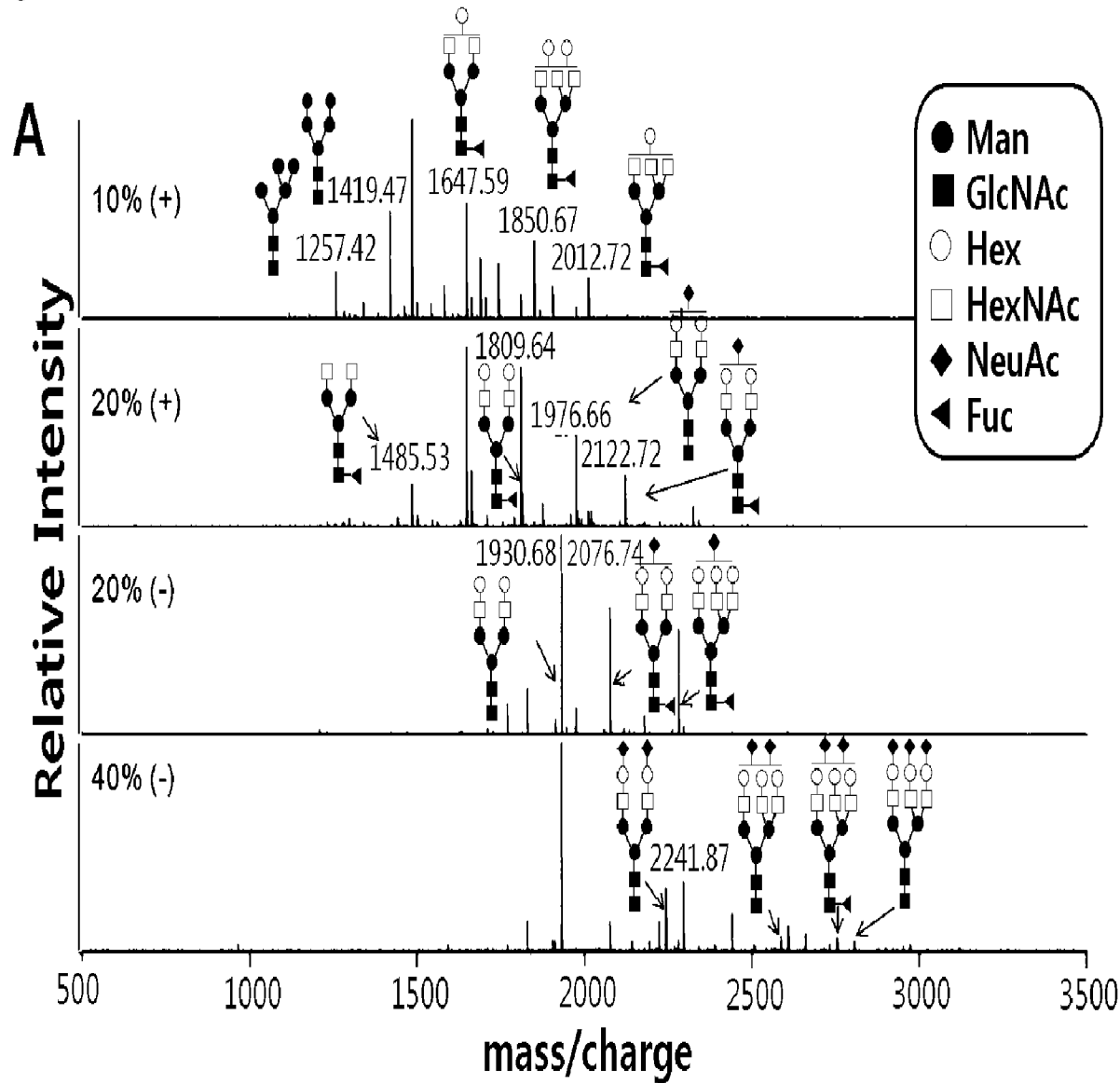
[Fig. 13]



[Fig. 14]



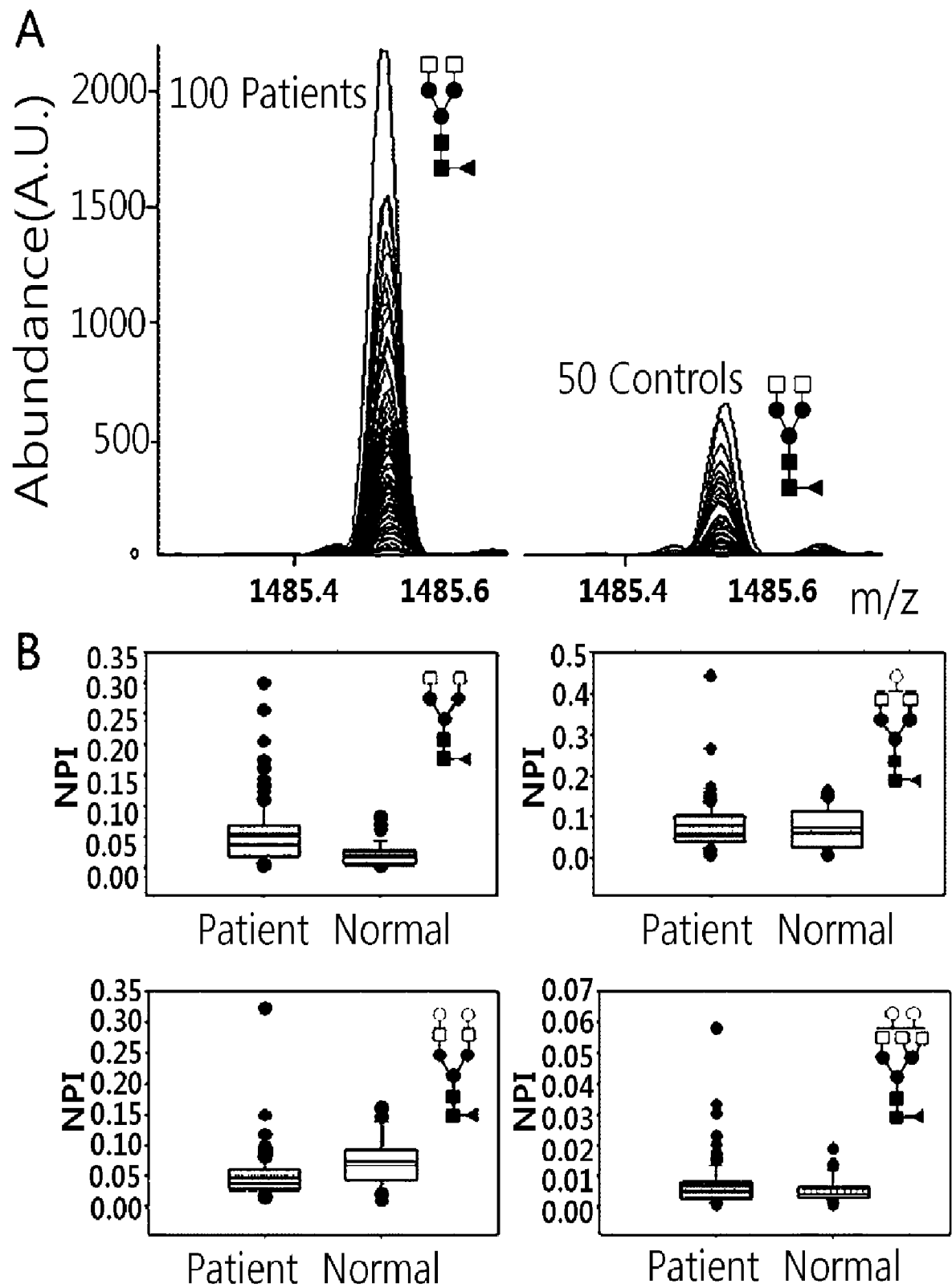
[Fig. 15]



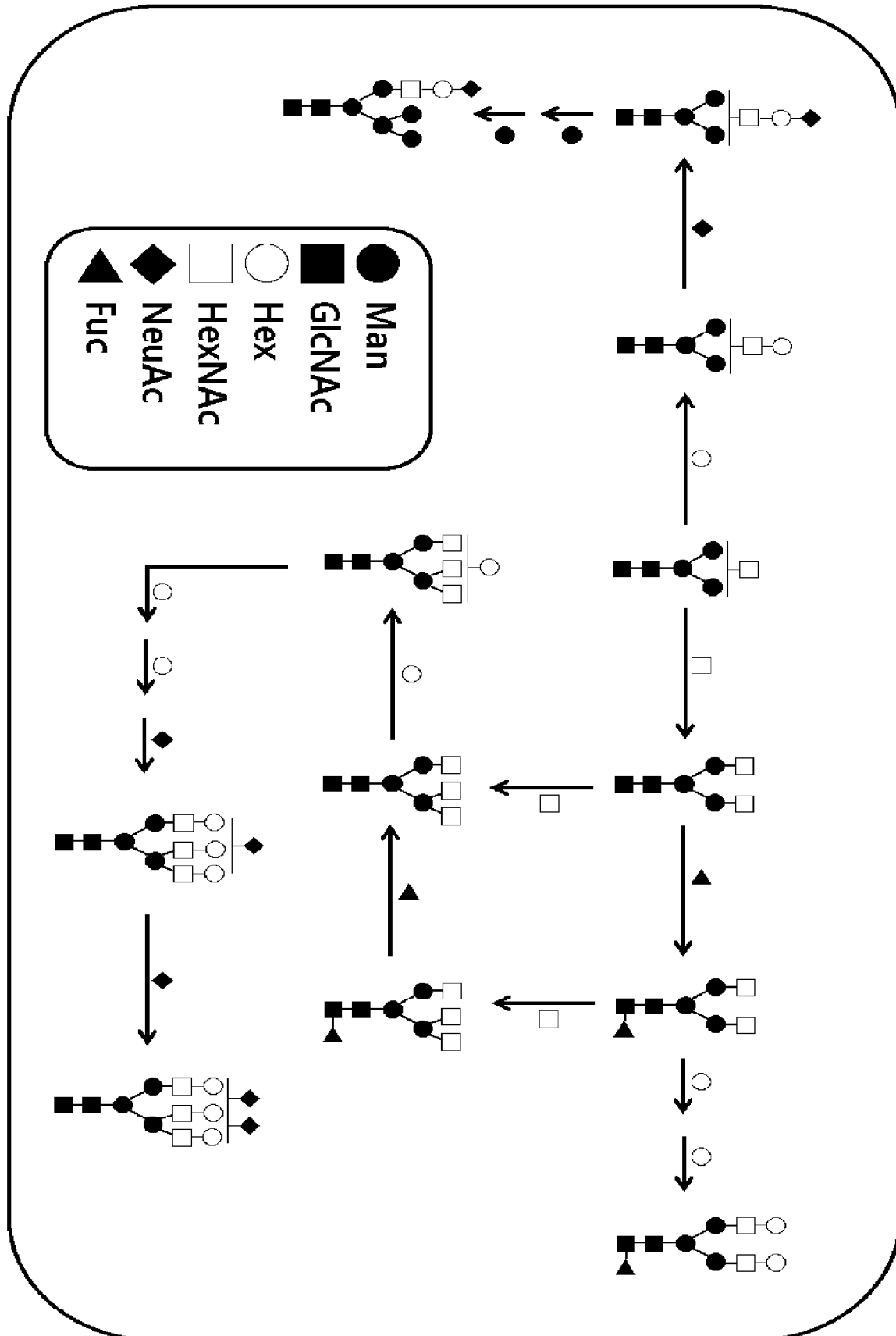
B

Detection	GCC fraction		
	10% ACN	20% ACN	40% ACN w/0.05% TFA
Positive Ion Mode	Neutral Glycans [M+Na] ⁺	Neutral Glycans [M+Na] ⁺	n/a
Negative Ion Mode	n/a	Acidic Glycans [M-H] ⁻	Acidic Glycans [M-H] ⁻

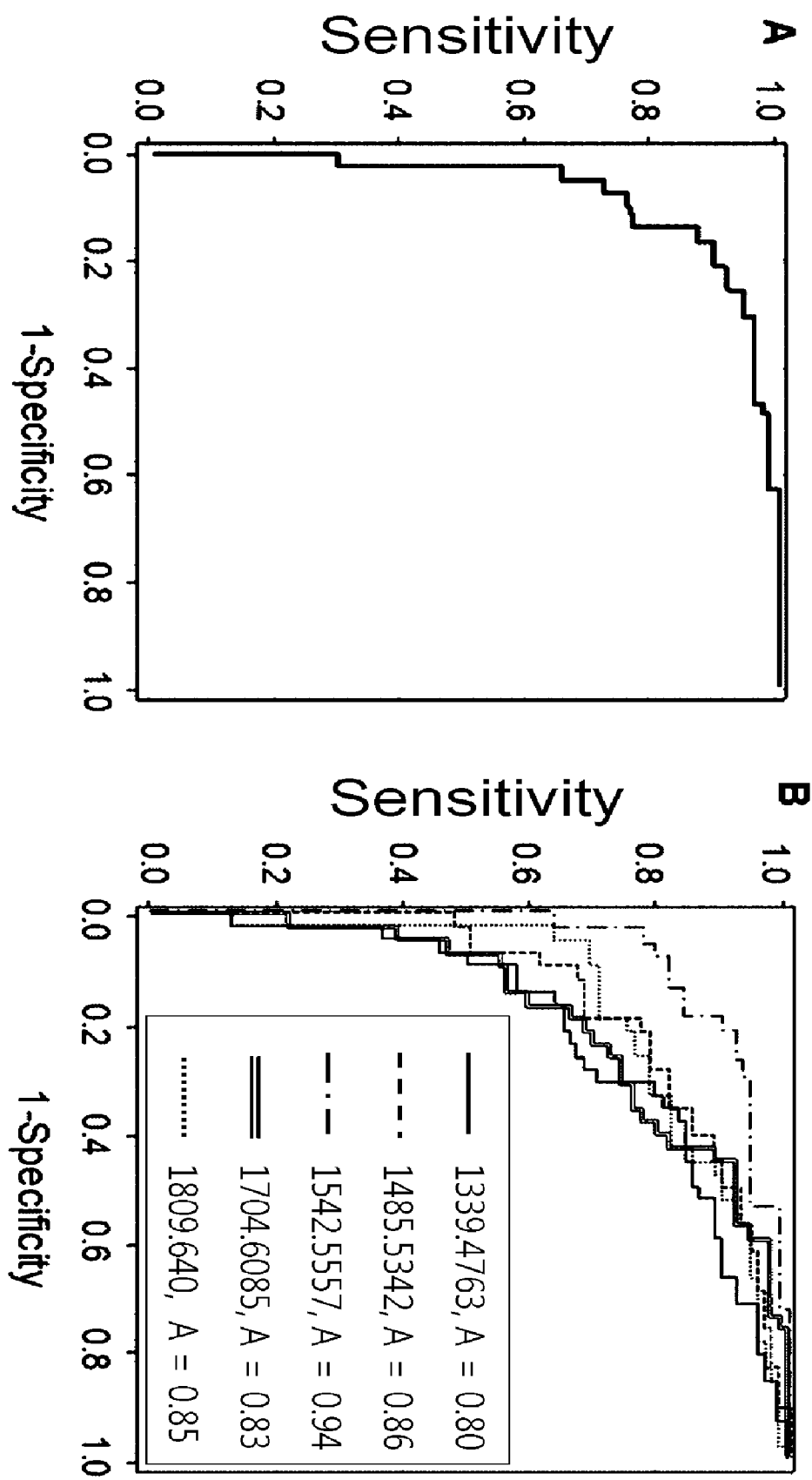
[Fig. 16]



[Fig. 17]



[Fig. 19]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/002912**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****G01N 33/53(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, G01N 30/00(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/53; G01N 33/68; G01N 30/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal), Google, PubMed: serum, serum, glycosylation, glycosyl, glycosyl, serum, glycome, n-glycosylation, n-glycan, enzyme, maldi-FT-ICR, mass spectrometry

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Scott R. Kronewitter et al., "The development of retrosynthetic glycan libraries to profile and classify the human serum N-linked glycome", Proteomics(2009), vol. 9, pp. 2986-2994 See abstract and the entire document.	1-4
A	Serenus Hua et al., "Comprehensive Native Glycan Profiling with Isomer Separation and Quantitation for the Discovery of Cancer Biomarkers", Analyst(11 September 2011), vol. 136, no. 18, pp. 3663-3671 See abstract and the entire document.	1-4
A	Serenus Hua et al., "Glycoscience aids in biomarker discovery", BMB Reports(2012), vol. 45, no. 6, pp. 323-330 See abstract and the entire document.	1-4
A	WO 2007-010089 A2 (GLYKOS, Finland Oy et al.) 25 January 2007 See abstract and claim 1.	1-4



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 MAY 2014 (12.05.2014)

Date of mailing of the international search report

13 MAY 2014 (13.05.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/002912

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☒ Claims Nos.: 6-9
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 6 to 9 pertain to a method for using a specific sugar chain as a marker for a specific disease, and pertain to a method for treatment of humans by surgery or therapy or to a diagnostic method, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☒ Claims Nos.: 5-10
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claim 5 pertains to a N-sugar chain library derived from human serum consisting of 108 sugar chains which is illustrated in figure 3a to figure 13, however the 108 sugar chains cannot be determined only by the drawings. Claim 10 pertains to a glycosylation map illustrated in figure 3a to figure 13, however it cannot be determined which technical feature is necessary for the matter for which protection is sought since the claimed matter is the drawings themselves or features in the drawings, which is unclear. Claims 6 to 9 pertain to a method for using sugar chains in claims 4 and 5 as markers for the specific diseases or a marker for checking the progression of the specific diseases, however the examples in the detailed description of the invention related thereto only includes the use of the marker for ovarian cancer and it is not considered that the claims represent a method for diagnosing all of the specific diseases claimed in claims 6 to 9. Thus, the claims are not supported by the detailed description of the invention.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

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

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/002912

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2007-010089 A2	25/01/2007	AT553382 T	15/04/2012
		CA 2658311 A1	25/01/2007
		DK 1910838 T3	16/07/2012
		EP 1910838 A2	16/04/2008
		EP 1910838 A4	18/03/2009
		EP 1910838 B1	11/04/2012
		EP 2431743 A2	21/03/2012
		EP 2431743 A3	18/07/2012
		FI 20055417A0	20/07/2005
		FI 20055417D0	20/07/2005
		US 2009-0117106 A1	07/05/2009
		WO 2007-010089 A3	31/05/2007

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 33/53(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, G01N 30/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 33/53; G01N 33/68; G01N 30/00 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템), Google, PubMed: 혈청, 세럼, 당쇄, 글리코실, 글라이코실, serum, glycome, n-glycosylation, n-glycan, enzyme, maldi-FT-ICR, mass spectrometry		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	Scott R. Kronewitter et al., "The development of retrosynthetic glycan libraries to profile and classify the human serum N-linked glycome", Proteomics(2009), vol.9, pp.2986-2994 요약 및 전문 참조	1-4
A	Serenus Hua et al., "Comprehensive Native Glycan Profiling with Isomer Separation and Quantitation for the Discovery of Cancer Biomarkers", Analyst(2011, 9.11), vol.136, no.18, pp.3663-3671 요약 및 전문 참조	1-4
A	Serenus Hua et al., "Glycoscience aids in biomarker discovery", BMB Reports(2012), vol.45, no.6, pp.323-330 요약 및 전문 참조	1-4
A	WO 2007-010089 A2 (GLYKOS FINLAND OY 외 7명) 2007.01.25 요약 및 청구항 제1항 참조	1-4
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2014년 05월 12일 (12.05.2014)		국제조사보고서 발송일 2014년 05월 13일 (13.05.2014)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 김성길 전화번호 +82-42-481-5472 

제2기제란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 6-9
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제6항 내지 제9항은 특정 당체를 특정 질병의 마커로 이용하는 방법에 관한 것으로, 이는 실질적으로 인간을 대상으로 수술 또는 치료에 의한 사람의 치료방법 또는 진단방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1 (iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☒ 청구항: 5-10
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 제5항은 도3a 내지 도13에 개시된 108개 당체를 이루어진 인간혈청 유래 N-당체 라이브러리에 관한 것이나 상기 도면만으로는 108개의 당체가 무엇인지 판단되지 않습니다. 청구항 제10항은 도3a 내지 도13에 개시된 당체화 지도에 관한 것이나 청구하는 바가 도3a 내지 도13의 그림 자체인지 도면에 기재된 무엇인지 불분명하므로 보호받고자 하는 사항이 어떠한 기술적 특징이 필요한지를 결정할 수 없습니다.
청구항 제6항 내지 제9항은 청구항 제4항 및 제5항에 기재된 당체를 특정 질병의 마커 또는 특정 질병의 진단단계의 마커로 이용하는 방법에 관한 것이나 이와 관련하여 발명의 상세한 설명의 실시예에는 난소암에 대한 마커로서의 사용만이 기재되어 있고 이는 상기 청구항에서 청구하는 모든 특정 질병에 대한 진단하는 방법을 대표한다고 인정되지 않습니다. 이에 상기 청구항들은 발명의 상세한 설명에 의해 뒷받침되지 않습니다.
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기제란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2007-010089 A2	2007/01/25	AT553382 T	2012/04/15
		CA 2658311 A1	2007/01/25
		DK1910838T3	2012/07/16
		EP 1910838 A2	2008/04/16
		EP 1910838 A4	2009/03/18
		EP 1910838 B1	2012/04/11
		EP 2431743 A2	2012/03/21
		EP 2431743 A3	2012/07/18
		FI20055417A0	2005/07/20
		FI20055417D0	2005/07/20
		US 2009-0117106 A1	2009/05/07
		WO 2007-010089 A3	2007/05/31