



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년10월31일
(11) 등록번호 10-1324109
(24) 등록일자 2013년10월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-7000783
(22) 출원일자(국제) 2009년06월16일
심사청구일자 2011년01월12일
(85) 번역문제출일자 2011년01월12일
(65) 공개번호 10-2011-0033919
(43) 공개일자 2011년04월01일
(86) 국제출원번호 PCT/US2009/047532
(87) 국제공개번호 WO 2010/008736
국제공개일자 2010년01월21일
(30) 우선권주장
61/061,974 2008년06월16일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 2005,
vol. 258, no. 14, pages 8934-8942.
PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF
SCIENCES OF USA. 2006, vol. 103, no. 1, pages
15-20.
THE BIOCHEMICAL JOURNAL. 2007, vol. 401, no.
3, pages 689-699.
WO2006068758 A2

(73) 특허권자
아카데미아 시니카
대만 11529 타이페이 난강 섹션 2 아카데미아 로
드 128
(72) 발명자
웅, 츠-휴이
대만 115 타이페이 난강 아카데미아 로드 섹션 2
레인 61 얼레이 3 넘버 11 5층
우, 청-이
대만 115 타이페이 난강 아카데미아 시니카 로드
섹션 2 128
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인아주양현

전체 청구항 수 : 총 13 항

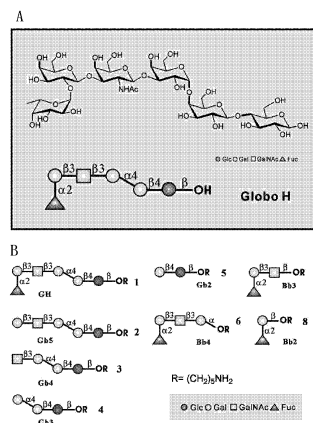
심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 G L O B O H 및 그의 절편들에 대한 항체의 양에 따른 암 진단방법

(57) 요약

본 발명은 Gb5 및, Globo H, Bb2, Bb3 및/또는 Bb4를 포함하는 글리칸 어레이를 사용하여 암을 진단하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

왕, 청-츠

대만 115 타이페이 난강 아카데미아 시니카 로드
섹션 2 128

유, 엘리스, 엘.

대만 115 타이페이 시티 난강 디스트릭트 아카데미
아 로드 섹션 2 레인 61 얼레이 2 넘버 8 1층

특허청구의 범위

청구항 1

- (i) 암을 가진 것으로 의심되는 개체로부터 수득한 항체를 함유하는 샘플을 제공하는 단계;
- (ii) 상기 샘플을 Gb5 및, Globo H, Bb2, Bb3 및 Bb4 중 하나 이상과 함께 인큐베이팅(incubating)하여, 상기 샘플 내의 항체들과 Gb5 및, Globo H, Bb2, Bb3 및 Bb4 중 하나 이상과 결합하도록 하는 인큐베이팅 단계;
- (iii) Gb5-결합 항체의 양 및 Globo H-결합, Bb-2 결합, Bb3-결합 또는 Bb4-결합 항체의 양을 모두 측정하는 단계; 및
- (iv) 상기 모든 결합 항체들의 양에 근거하여 상기 개체가 암이 있는지의 여부를 판정하는 단계를 포함하되,
- 여기서, 상기 암은 유방암으로서 Globo H-양성 및 Gb5-양성이고, 상기 Gb-5 결합 항체의 양에 대한 Globo-H 결합, Bb2-결합, Bb3-결합 또는 Bb4-결합 항체의 양의 비율이 암이 없는 개체의 비율과 비교할 때 더 크게 나타나는 경우, 상기 개체가 암이 있다는 것을 나타내는 것인 암 진단방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 인큐베이팅 단계는 상기 샘플을 Gb5 및 Globo H와 혼합함으로써 수행되는 것인 암 진단방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 인큐베이팅 단계는 상기 샘플을 Gb5 및 Bb3와 혼합함으로써 수행되는 것인 암 진단방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 인큐베이팅 단계는 상기 샘플을 Gb5 및 Bb2와 혼합함으로써 수행되는 것인 암 진단방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 인큐베이팅 단계는 상기 샘플을 Gb5, Globo H, Bb2, Bb3 및 Bb4와 혼합함으로써 수행되는 것인 암 진단방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 샘플은 혈청 샘플인 것인 암 진단방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 Gb5 및, Globo H, Bb2, Bb3 및 Bb4 중 하나 이상이 지지장치 상에 고정화되는 것인 암 진단방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

제2항에 있어서, 상기 Gb5 및 상기 Globo H는 지지장치 상에 고정되는 것인 암 진단방법.

청구항 13

삭제

청구항 14

제4항에 있어서, 상기 Gb5 및 상기 Bb2는 지지장치 상에 고정되는 것인 암 진단방법.

청구항 15

삭제

청구항 16

제3항에 있어서, 상기 Gb5 및 상기 Bb3는 지지장치 상에 고정되는 것인 암 진단방법.

청구항 17

삭제

청구항 18

제5항에 있어서, 상기 Gb5, Globo H, Bb2, Bb3 및 Bb4는 지지장치 상에 고정되는 것인 암 진단방법.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

제1항에 있어서, 상기 측정된 항체는 IgG 항체인, 암 진단방법.

청구항 22

제1항에 있어서, 상기 측정된 항체는 IgM 항체인, 암 진단방법.

명세서

기술분야

[0001] 관련출원

[0002] 본 출원은 2008년 6월 16일에 출원된 미국 특허 가출원 제61/061,974호에 대한 우선권을 주장하며, 상기 출원의 내용은 그 전체가 참조로 본원에 포함되어 있다.

[0003] 발명의 기술분야

[0004] 본 발명은 암을 진단하는 방법에 관한 것으로서, Globo H 및 그의 절편들에 대한 항체의 양을 측정함으로써 개체가 암을 갖고 있는지를 판정하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0005] 육당류 항원결정기(hexasaccharide epitope)를 포함하는 Globo H는 정상적인 상피 세포 및 내분비 조직뿐만 아니라 다양한 암들에서 발현된다. 이에 대해서는 하기의 문헌들을 참조할 수 있다: Huang 등., *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA 103:15-20(2006), Wang 등., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 33:11661-11666(2008), 및 Chang 등., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 33:11667-11672(2008). 유방암 환자들로부터 수득한 혈청 내에 높은 농도의 항-Globo H 항체들이 있음이 보고되었다. 그러나, 이들 항체들의 농도만으로는 유방암의 신뢰성 있는 지표가 되지 않는다.

발명의 내용

[0006] 본 발명은 Globo H, 그의 절편 Bb2, Bb3 또는 Bb4에 대한 항체의 농도를 Globo H의 다른 절편인 Gb5에 대한 항체의 농도에 대하여 구한 비율이 암이 없는 정상인에 비해 유방암 환자에서 현저히 더 높다는 사실을 우연히 발견한 사실에 기초한다.

[0007] 따라서, 본 발명은 암 진단방법을 특성화하는데, 상기 방법은 (i) 암(예를 들어, 유방암, 흑색종, 신경모세포종, 피부암, 간암, 전립선암, 난소암, 대장암, 위암, 폐암 및 췌장암)을 가진 것으로 의심되는 개체(예를 들어, 인간)로부터 수득한 항체를 함유하는 샘플(예를 들어, 혈청 샘플)을 제공하는 단계; (ii) 상기 샘플을 Gb5 및, Globo H, Bb2, Bb3 및 Bb4 중 하나 이상과 함께 인큐베이팅(incubating)하여 이들 분자들이 상기 샘플 내의 항체들과 결합하도록 하는 단계; (iii) Gb5-결합 항체의 양 및 Globo H-결합, Bb-2 결합, Bb3-결합 또는 Bb4-결합 항체의 양을 함께 측정하는 단계; 및 (iv) 상기 Gb-5 결합 항체의 양에 대한 Globo-H 결합, Bb2-결합, Bb3-결합 또는 Bb4-결합 항체의 양의 비율에 기초하여 상기 개체가 암이 있는지의 여부를 판정하는 단계. 더 높은 비율은 상기 개체가 암을 가졌음을 알려준다. Globo H, Gb5, Bb2, Bb3 및 Bb4는 지지장치에 고정화되어 글리칸 어레이를 형성할 수 있다. 일 실시예에서, 상기 어레이는 Gb5 및, Globo H, Bb2, Bb3 및 Bb4 중 하나를 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 어레이는 이들 분자들 모두를 포함한다.

[0008] 또한, 암 진단용 및 암 진단에 사용되는 의료기기의 제조를 위한 Gb5 및, Globo H, Bb2, Bb3 및 Bb4 중 하나 이상의 용도도 본 발명의 범주 내에 있다.

[0009] 본 발명의 하나 이상의 실시예들의 상세한 설명은 하기 명세서에 기술된다. 본 발명의 다른 특성 또는 장점은 하기 도면 및 다수 실시예들의 상세한 설명과 또한 첨부된 청구항들로부터 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 Globo H(GH) 내의 육당류 항원결정기 및 상기 항원결정기의 절편들의 구조를 도시하는 모식도로, 패널 A는 육당류 항원결정기의 구조이고 패널 B는 상기 육당류 항원결정기 및 이의 7개의 절편들의 구조임;

도 2는 글리칸 어레이(glycan array)의 용도를 나타내는 모식도로서, 해당글리칸 어레이는 암 세포 표면을 모방하여 항-글리칸 항체를 검출함.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 본 발명자들은 항-Globo H/항-Gb5, 항-Bb2/항-Gb5, 항-Bb3/항-Gb5, 또는 항-Bb4/항-Gb5 항체들의 비율 정도가 암이 없는 정상인에 비해 유방암 환자들에서 현저히 더 높다는 사실을 발견하였다. 이로 인해, 이들 비율 각각은 암 진단에서 신뢰성 있는 지표로 사용된다.

[0012] 따라서, 본원에 기술된 것은 암을 가진 것으로 의심되는 개체, 예를 들어 유전학적으로 암에 걸릴 위험이 높은 인간에서 Gb5 및, Globo H, Bb2, Bb3, Bb4 중 하나 이상에 대한 항체의 양을 검출하고, 상술한 비율 정도 중 어느 하나에 기초하여 상기 개체가 암을 가졌는지를 판정함으로써 암을 진단하는 방법이다. 상술한 항체들은 IgG, IgM, IgE, IgA 또는 IgD이며, 또한 이들의 혼합물이다.

[0013] Globo H는 도 1의 패널 A에 도시된 육당류 항원결정기 및 선택적으로 비-당 잔기(non-sugar moiety)를 포함하는 글리칸이다. 그의 절편(예: Gb5, Bb2, Bb3 및 Bb4)은 육당류 항원결정기의 절편 및 경우에 따라 비-당 잔기를 포함하는 글리칸이다. 상기 육당류 항원결정기의 7가지 절편이 도 1의 패널 B에 도시되어 있다. 이들 올리고당은 정형화된 방법에 의해 제조될 수 있다(참조: Huang 등., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:15-20(2006)). 바람직하게도, 상기 올리고당은 알킬아민(예: $(CH_2)_5NH_2$) 또는 알킬아자이드(예: $(CH_2)_5N_3$)와 같은 비-당 링커에 결합되는데, 이는 유리, 플라스틱, 나일론, 금속 또는 실리콘과 같은 다양한 재료들로 이루어진 지지체(예: 폴리머 기판)에 공유적으로 결합될 수 있다. Globo H, Gb5, Bb2, Bb3 및 Bb4 각각은 상기 지지체상의 정해진 구역에 위치할 수 있는데 이로써 글리칸 어레이를 형성한다. Globo H, Gb5, Bb2, Bb3 및 Bb4에 포함되어 있는 올리고당 항원결정기를 발현하는 암세포 표면을 모방하는 상기 어레이(참조: 도 2)는 상기 올리고당 항원결정기와 결합하

는 항체의 양을 검출하는데 사용될 수 있다.

[0014] 본 발명의 방법을 수행하기 위하여, 본원에 기술된 상기 글리칸 어레이는 암을 가진 것으로 의심되는 개체로부터 얻어진 항체-함유 샘플과 함께 인큐베이션된다. 상기 샘플의 예는 이에 제한되지는 않지만, 혈청, 타액 및 림프절액을 포함한다. 상기 어레이는 비결합된 항체들을 세척하여 제거한 후, 관심의 항체, 즉, 인간 IgG, IgA, IgD, IgE 또는 IgM이 될 수 있는 항체들과 특이적으로 결합하는 표지화된 2차 항체와 함께 인큐베이션된다. 상기 글리칸 어레이는 다시 한번 비결합된 2차 항체 분자들을 제거하기 위하여 세척되는데, 결합된 2차 항체 분자들로부터 방출되는 신호의 세기가 목표 항체의 양에 해당된다. 항-Globo H/항-Gb5, 항-Bb2/항-Gb5, 항-Bb3/항-Gb5 또는 항-Bb4/항-Gb5의 더 높은 비율 정도가 개체에서 관찰되는 경우, 상기 개체는 암이 있거나 암으로 발전될 위험이 있음으로 진단된다.

[0015] 추가의 설명이 없더라도, 상술한 바에 기초하여 당해 분야의 숙련자들은 본 발명을 최대한도로 이용할 수 있으리라 여겨진다. 따라서, 하기의 구체적인 실시예들은 단순히 예시를 위해 제공되는 것이지, 개시되지 않은 부분을 여하간의 방법으로 제한하려는 것이 아니다. 인용된 모든 문헌들은 참고로 본원에 포함되어 있다.

[0016] 실시예 1: 항체 V_K9, Mbr1 및 A488을 글리칸 어레이에 결합시키기

[0017] 도 1에 도시된 올리고당 Globo H, Gb5, Gb4, Gb3, Gb2, Bb4, Bb3, Bb2를 하기 문헌(Hung 등., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:15-20(2006))에 기술된 원-포트 프로그램화 가능한 프로토콜(one-pot programmable protocol)에 따라 제조하였다. 이들 올리고당은 Nexterion H slide사(SCHOTT North America)로부터 구입한 NHS-코팅된 글래스 슬라이드상에 공유적으로 부착되었는데, 하기 문헌(Hung 등. 및 Blixt 등., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:17033-17038(2004))에 기술된 표준 마이크로어레이 로보틱 프린팅 기술에 의해 부착되었다. 보다 구체적으로, 각 올리고당의 스탁 용액(80 μ M)으로부터의 분주액을 16-줄 포맷의 글래스 슬라이드상에 각 올리고당을 2줄씩 배치하였다.

[0018] 하기의 3가지 항체들이 본 연구에 사용되었다:

[0019] · Mbr1, 마우스 IgM 항-Globo H 모노클로날 항체,

[0020] · V_K-9, 마우스 IgG 항-Globo H 모노클로날 항체, 및

[0021] · A488, 항-마우스/인간 Gb5 모노클로날 항체.

[0022] 항체들 각각은 상술한 글래스 슬라이드(올리고당이 부착된 것)와 함께 0.05% Tween 20/PBS 완충용액(pH 7.4)의 조건하에서 인큐베이션되었는데, 가습 챔버 내에서 1시간 교반되었다. 상기 슬라이드는 그 후 세척되었는데, 0.05% Tween 20/PBS 완충용액(pH 7.4)으로 3회, PBS 완충용액으로 3회, 물로 3회 순서대로 세척되었다. 다음으로, 상기 슬라이드를 Cy3-결합된 염소 항-마우스 IgM(Mbr1 용) 또는 IgG(VK-9 및 A488 용) 항체와 함께 상기와 동일한 챔버 내에 인큐베이션하고 1시간 교반하였다. 상기 슬라이드를 다시 0.05% Tween 20/PBS 완충용액(pH 7.4)으로 3회, PBS 완충용액(pH 7.4)으로 3회, 그리고 물로 3회 세척하고 건조하였다. 마지막으로, 상기 슬라이드를 마이크로어레이 형광 칩 판독기(ArrayWorx microarray reader)를 사용하여 595nm(Cy3-결합된 2차 항체용) 및 488nm(A488 항-SSEA-3 항원 항체 용)에서 스캔하였다.

[0023] 상기 3가지 항체들 모두는 상술한 글리칸 어레이에 결합되었다. VK9은 Globo H 및 Bb4에 특이적으로 결합하였으며; Mbr1은 Globo H 및 BB4에 특이적으로 결합하였고, 또한 Bb3에도 좀 낮은 친화력이지만 결합되었으며; 그리고 A488은 Gb5에 특이적으로 결합하였다. 이들 결과들은 상기 글리칸 어레이가 Globo H 및/또는 그의 절편들과 결합하는 항체들을 포획할 수 있음을 의미한다.

[0024] 실시예 2: 유방암 환자에서의 Globo H 및 그의 절편들에 대한 항체를 검출하기 위한 글리칸 어레이의 용도

[0025] 유방암 환자 및 건강한 개인으로부터 수득한 혈장 샘플을 0.05% Tween 20/3% BSA/PBS 완충용액(pH 7.4)을 사용하여 1:20으로 희석하고, 가습 챔버 내에서 상기 실시예 1에 기술된 글리칸 어레이 슬라이드상에 인큐베이션하여 1시간 교반해주었다. 0.05% Tween 20/ PBS 완충용액(pH 7.4), PBS 완충용액(pH 7.4) 및 물로 각각 3회 세척해준 후, 상기 슬라이드를 가습 챔버 내에 Cy3-결합된 염소 항-인간 IgM 또는 IgG 항체와 함께 인큐베이션하고 1시간 교반하였다. 그 후, 상기 슬라이드를 0.05% Tween 20/PBS 완충용액(pH 7.4)으로 3회, PBS 완충용액(pH 7.4)으로 3회, 그리고 H₂O로 3회 세척하였다. 건조시킨 후, 상기 슬라이드를 마이크로어레이 형광 칩 판독기(ArrayWorx microarray reader)를 사용하여 595nm(Cy3-결합된 2차 항체용)에서 스캔하였다.

[0026] 하기 표 1 및 표 2에 도시된 바와 같이, Globo H-결합된 IgG/Gb5-결합된 IgG(GH/Gb5 IgG) 및 Globo H-결합된

IgM/Gb5-결합된 IgM(GH/Gb5 IgM)의 비율 수준이, 건강한 개인의 혈장 샘플에 비해 유방암 환자의 혈장 샘플에서 보다 높게 나타났다. 상기 2개의 표에 도시된 바와 같이, 암 환자의 Bb2/Gb5 IgG, Bb4/Gb5 IgM, Bb3/Gb5 IgM, 및 Bb2/Gb5 IgM의 비율은 건강한 개인의 비율에 비해 현저하게 더 높았다. 이들 데이터는 상기 열거한 비율들이 암을 진단하는 데 있어서 신뢰성 있는 지표임을 나타낸다.

표 1

[0027]

암 환자(n=58) 및 건강인(n=47)에서의 Globo H 및 그의 절편인 Bb2, Bb3 및 Bb4의 Gb5에 대한 IgG 비율 수준								
IgG 비율 %	GH/Gb5		Bb4/Gb5		Bb3/Gb5		Bb2/Gb5	
	건강인	암환자	건강인	암환자	건강인	암환자	건강인	암환자
평균	26.92	58.31	11.91	17.84	15.22	22.54	78.02	120.8
표준편차	18.49	31.14	20.54	19.6	23.12	23.22	63.63	92.26
P	p < 0.0001***		p < 0.1360		p < 0.1106		p < 0.0063**	
***: p < 0.0001, 대단히 유의함 **: p=0.001-0.01, 매우 유의함								

표 2

[0028]

유방암환자(n=57) 및 건강인(n=47)에서의 Globo H 및 그의 절편인 Bb2, Bb3 및 Bb4의 Gb5에 대한 IgM 비율 수준								
IgM 비율 %	GH/Gb5		Bb4/Gb5		Bb3/Gb5		Bb2/Gb5	
	건강인	암환자	건강인	암환자	건강인	암환자	건강인	암환자
평균	27.82	53.98	15.73	22.74	15.36	40.51	16.19	30.36
표준편차	23.42	35.41	21.60	23.98	23.30	59.76	18.83	35.44
P	p < 0.0001 ***		P < 0.1259 *		p < 0.0043 **		p < 0.0105 *	
***: p < 0.001, 대단히 유의함 **: p=0.001-0.01, 매우 유의함 *: p=0.01-0.05, 유의함								

[0029]

실시예 3: Globo H 백신에 의해 유도된 면역반응을 관찰하기 위한 글리칸 어레이의 용도

[0030]

마우스(6주령 암컷 BALB/c 마우스, BioLASCO, 대만)를 Globo H-KLH 백신(Optimer Pharmaceuticals, Inc., San Diego, Ca.)으로 3주동안 매주 한번 피하에 면역시켰다. 대조구 마우스에는 인산완충식염수(PBS)를 주입하였다. 상기 처리한 마우스로부터 최종 면역화후 10일째의 혈청 샘플을 수집하였다. 이들 샘플을 30, 120, 240, 480, 960 및 1920배로 순차 희석하고, 상기 실시예 1에서 기술한 글리칸 어레이 슬라이드(스팟당 3.5×10^{-14} 몰의 올리고당) 또는 통상적인 ELISA(웰당 1.28×10^{-10} 몰의 Globo H로 코팅됨)를 사용하여 상기 희석한 혈청 샘플로부터 항-Globo H 항체의 역가를 측정하였다.

[0031]

상기 Globo H-KLH 백신은 상기 면역화된 마우스에서 항-Globo H 항체의 분비를 유도하였다. 하기 표 3을 참조하라. 또한, 상술한 글리칸 어레이 분석법이 통상적인 ELISA와 비교할 때 보다 민감도가 높다는 것을 발견하였다.

표 3

[0032]

글리칸 어레이 분석법 및 ELISA에 의해 측정된 Globo H 백신 유도의 면역반응		
	증가된 면역반응*	
희석 배수	글리칸 어레이 분석법	ELISA
30	374.7 ± 87.83	4.01 ± 1.58
120	188.4 ± 78.93	1.92 ± 0.75
240	102.2 ± 44.21	1.08 ± 0.48
480	44.86 ± 17.05	0.20 ± 0.10
960	12.13 ± 4.08	0.30 ± 0.14
1,920	3.203 ± 1.048	ND
*: 하기와 같이 계산됨: (면역후 신호 강도-면역전 신호 강도)/바탕 신호 강도		

도면2

