



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2024-0043818  
(43) 공개일자 2024년04월03일

- |   |  |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/><i>G01N 33/574</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/><i>G01N 33/57434</i> (2013.01)<br/><i>G01N 33/574</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2024-7009944</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2022년08월26일<br/>심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2024년03월25일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2022/073750</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2023/025927<br/>국제공개일자 2023년03월02일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>21193158.9 2021년08월26일<br/>유럽특허청(EPO)(EP)</p> | <p>(71) 출원인<br/>글리카노스틱스 에스.알.오.<br/>슬로바키아 841 01 브라티슬라바 - 메스츠크 차스트 두브라브카 쿠드라코바 1848/7</p> <p>(72) 발명자<br/>트카치, 안<br/>슬로바키아 841 01 브라티슬라바 - 메스츠크 차스트 두브라브카 쿠드라코바 1848/7 글리카노스틱스 에스.알.오. 내<br/>베르톡, 토마스<br/>슬로바키아 841 01 브라티슬라바 - 메스츠크 차스트 두브라브카 쿠드라코바 1848/7 글리카노스틱스 에스.알.오. 내</p> <p>(74) 대리인<br/>특허법인다나</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **암 진단을 위한 당단백질 바이오마커**

**(57) 요약**

본 발명은 대상체가 암에 걸릴 위험이 있거나 암을 앓게 되는지 여부를 진단하는 방법에 관한 것으로, 대조군 샘플과 비교하여 바이오마커 당단백질의 특정 글리칸 구조에 대한 결합제의 (현저하게) 낮거나 (현저하게) 높은 결합은 상기 대상체가 암에 걸릴 위험이 있거나 암을 앓을 것임을 나타낸다. 본 발명은 또한 바이오마커 단백질의 글리칸 구조에 결합할 수 있는 결합제를 포함하는, 대상체가 암에 걸릴 위험이 있거나 암을 앓게 되는지 여부를 진단하는 방법을 수행하기 위한 키트에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

**G01N 33/57469** (2013.01)

G01N 2800/34 (2013.01)

G01N 2800/50 (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

대상체가 암에 걸릴 위험이 있거나 암을 앓게 되는지 여부를 진단하는 방법으로서,

(1) 상기 대상체로부터 얻은 샘플을 접촉시키는 단계로서, 상기 샘플은 바이오마커 당단백질을 포함하고, 상기 바이오마커 당단백질의 글리칸 구조에 결합할 수 있는 결합제와 접촉시키는 단계,

여기서 상기 바이오마커 당단백질의 존재 또는 과발현은 상기 암의 위험 및/또는 존재를 나타내고, 및

여기서 상기 글리칸 구조는 상기 암의 위험이 없거나 상기 암을 앓고 있지 않은 대상체에서 발현되는 상기 바이오마커 당단백질의 글리칸 구조에서 벗어나며; 및

(2) 상기 결합제가 상기 바이오마커 당단백질의 글리칸 구조에 결합하는지 여부를 결정하는 단계;를 포함하고,

여기서 대조군 샘플과 비교하여 상기 바이오마커 당단백질의 상기 글리칸 구조에 대한 상기 결합제의 더 낮거나 더 높은 결합은 상기 대상체가 암에 걸릴 위험이 있거나 암을 앓을 것임을 나타내며,

여기서 상기 바이오마커 당단백질은 ZAG 및/또는 PAP인 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 대상체는 인간인 방법.

#### 청구항 3

전술한 항들 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 비뇨생식기암, 바람직하게는 전립선암(PCa)인 방법.

#### 청구항 4

전술한 항들 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합제는 렉틴, 항-글리칸 항체, 압타머, 또는 보론산 또는 이들의 유도체인 방법.

#### 청구항 5

전술한 항들 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 추가 바이오마커 당단백질은 PSA, TIMP-1, fPSA, tPSA, 오스테오펀틴(osteopontin) 및 스폰딘-2(spondin-2)로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

#### 청구항 6

전술한 항들 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합제는 코어 푸코스(core fucose), 안테나 푸코스(antennary fucose), N-연결 올리고당을 함유하는 Fuc α 1-6GlcNAc-N-Asn, Fuc α 1-6/3GlcNAc, α-L-Fuc, Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc, Fuc α 1-2Gal, Fuc α 1-6GlcNAc, Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc, 분지형 N-연결 6당류(hexasaccharide), Man α 1-3Man, α-D-Man, (GlcNAc β 1-4, Gal β 1-4GlcNAc, GlcNAc α 1-4Gal β 1-4GlcNAc, (GlcNAc β 1-4, Neu5Ac (시알산), Gal β 1-3GalNAc-세린/트레오닌, Gal α 1-3GalNAc, Gal β 1-6Gal, Gal β 1-4GlcNAc, Gal β 1-3GalNAc, GalNAc α 1-3GalNAc, GalNAc α 1-3Gal, GalNAc α / β 1-3/4Gal, α-GalNAc, GalNAc β 1-4Gal, GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal, GalNAc α 1-2Gal, GalNAc α 1-3GalNAc, GalNAc β 1-3/4Gal, GalNAc-세린/트레오닌 (Tn 항원), Gal β 1-3GalNAc-세린/트레오닌 (T 항원), GalNAc β 1-4GlcNAc (LacdiNAc), α-2,3Neu5Ac (α 2-3 연결 시알산), α-2,6Neu5Ac (α 2-6 연결 시알산), α-2,8Neu5Ac (α 2-8 연결 시알산), 시알산(α-2,3Neu5Ac, α-2,6Neu5Ac 또는 α-2,8Neu5Ac), Neu5Ac α 4/9-O-Ac-Neu5Ac, Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc/GlcNAc, Neu5Ac α 2-6Gal/GalNAc, N-연결 바이-안테나(bi-antennary), N-연결 트리/테트라-안테나(tri/tetra-antennary), 분지형 β 1-6GlcNAc, Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3/4GlcNAc, Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc, NeuAc α 2-3Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc, Fuc α 1-2Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc, Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc, NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc, Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc, 고 만노스(high mannose), 시알릴 루이스<sup>a</sup> (시알릴 Le<sup>a</sup>) 항원, 시알릴 루이스<sup>x</sup> (시알릴 Le<sup>x</sup>) 항원, 루이스<sup>x</sup> (Le<sup>x</sup>) 항원, 시알릴 Tn 항원, 시알릴 T 항원, 루이스<sup>y</sup> (Le<sup>y</sup>) 항원, 황산화 코어1 글리칸, Tn

항원, T 항원, 코어 2 글리칸, 루이스<sup>a</sup> (Le<sup>a</sup>) 항원, (GlcNAc $\beta$ 1-4)<sub>n</sub>,  $\beta$ -D-GlcNAc, GalNAc, Gal-GlcNAc, GlcNAc, Gal $\alpha$ 1-3Gal, Gal $\beta$ 1-3GalNAc,  $\alpha$ -Gal,  $\alpha$ -GalNAc, (GlcNAc)<sub>n</sub>, 또는 분지형 (LacNAc)<sub>n</sub> 중 하나 이상에 결합하는 방법.

**청구항 7**

전술한 항들 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합제는 갈락토스의 3 또는 6 위치에  $\alpha$  또는  $\beta$ 로 연결된 N-아세틸갈락토사민으로 종결되거나 LacdiNAc 에피토프(GalNAc1-4GlcNAc)를 포함하는 글리칸 구조에 결합하는 방법.

**청구항 8**

전술한 항들 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합제는 WFL이 글리칸 구조에 결합하는 친화도의 80% 이상의 친화도로 WFA/WFL과 동일한 글리칸 구조에 결합하는 것인 방법.

**청구항 9**

전술한 항들 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합제는 WFL/WFA, L-셀렉틴, P-셀렉틴, E-셀렉틴, AAL, MAA, GNL, PSL 또는 PHA-E인 방법.

**청구항 10**

전술한 항들 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합제는 WFL/WFA인 방법.

**청구항 11**

전술한 항들 중 어느 한 항에 있어서, 렉틴-기반 분석이 사용되는 방법.

**청구항 12**

제11항에 있어서, 효소-연결 렉틴-결합 분석(ELLBA)이 사용되는 방법.

**청구항 13**

전술한 항 중 어느 한 항의 방법을 수행하기 위한 키트로서, 상기 바이오마커 단백질의 글리칸 구조에 결합할 수 있는 결합제를 포함하는 키트.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 상기 결합제는 렉틴인 키트.

**청구항 15**

제13항 또는 제14항에 있어서, 상기 렉틴은 WFA이거나, WFL/WFA가 글리칸 구조에 결합하는 친화도의 80% 이상의 친화도로 WFL/WFA와 동일한 글리칸 구조에 결합하는 결합제인 키트.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 출원은 2021년 8월 26일 출원된 유럽 특허 출원 21 193 158.9의 우선권을 주장하며, 이 출원의 내용은 모든 목적을 위해 전체 내용이 본 문서에 참조로 포함된다.

[0002] 본 발명은 대상체가 암에 걸릴 위험이 있거나 암을 앓게 되는지 여부를 진단하는 방법에 관한 것으로, 대조군 샘플과 비교하여 바이오마커 당단백질의 특정 글리칸 구조에 대한 결합제의 (현저하게) 낮거나 (현저하게) 높은 결합은 상기 대상체가 암에 걸릴 위험이 있거나 암을 앓을 것임을 나타낸다. 본 발명은 또한 바이오마커 단백질의 글리칸 구조에 결합할 수 있는 결합제를 포함하는, 대상체가 암에 걸릴 위험이 있거나 암을 앓게 되는지 여부를 진단하는 방법을 수행하기 위한 키트에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0003] 암은 현재 문명의 가장 큰 허수아비 중 하나이다. 남성 암 사망의 가장 흔한 원인은 전립선암(PCa)이다. 이 진단이 심각하다는 사실에도 불구하고, 조기 발견과 적절한 치료를 받으면 예후는 좋다(Tkac et al., Interface Focus (2019), 9: 20180077). PCa의 선별 및 진단은 일반적으로 전립선 특이 항원(PSA)분석을 통해 수행된다. 이 단백질은 암의 영향을 받는 전립선 조직뿐만 아니라 건강한 전립선 및 다른 질병의 영향을 받는 전립선에서도 형성된다(Damborska et al., Acta (2017), 184: 3049-3067). PCa에 대해 PSA를 사용하는 특이성은 낮기 때문에 새롭고 보다 구체적인 바이오마커를 식별해야 한다. 당단백질 ZAG(아연 α-2-당단백질)는 이전에 전립선암의 잠재적 바이오마커로 식별된 바 있다(Katafigioti et al., Ital. Urol. Androl. (2016), 88: 195-200). ZAG는 예를 들어 유방, 전립선 또는 간에서 발견되는 여러 유형의 분비 상피 세포를 포함하여 다양한 조직에서 발현된다. 여러 연구에 따르면 질병의 초기 단계에서 소변과 혈액 모두에서 증가된 수준의 ZAG가 존재하며, 이는 전립선암 및 기타 비뇨생식기 암의 바이오마커가 될 수 있음을 나타낸다 Katafigiotis et al., BJU Int. (2012), 110: E688-E693). 그러나 ZAG는 비-암성 세포 표면에도 존재하기 때문에 단순한 ZAG 수준 검출만으로 진단을 내리기에는 불충분하다.

[0004] 이러한 단점과 추가적인 단점을 극복해야 한다. 따라서 본 발명은 이러한 요구와 기술적 목적을 해결하고 본 명세서 및 청구범위에 정의된 바와 같이 솔루션을 제공한다.

**발명의 내용**

- [0005] 본 발명은 대상체가 암에 걸릴 위험이 있거나 암을 앓게 되는지 여부를 진단하는 방법에 관한 것으로,
- [0006] (1) 상기 대상체로부터 얻은 샘플을 접촉시키는 단계로서, 상기 샘플은 바이오마커 당단백질을 포함하고, 상기 바이오마커 당단백질의 글리칸 구조에 (특이적으로) 결합할 수 있는 결합제와 접촉시키는 단계,
- [0007] 여기서 상기 바이오마커 당단백질의 존재 또는 과발현(예: 적어도 약 1.5배, 적어도 약 2배, 또는 적어도 약 3배의 과발현), 또는 과소발현(예: 적어도 약 1.5배, 적어도 약 2배, 또는 적어도 약 3배의 과소발현; 예를 들어, 글리칸 구조가 O-글리칸 또는 N-글리칸, 바람직하게는 O-글리칸인 경우의 과소발현)은 상기 암의 위험 및/또는 존재를 나타내고, 및
- [0008] 여기서 상기 글리칸 구조는 상기 암의 위험이 없거나 상기 암을 앓고 있지 않은 대상체에서 발현되는 상기 바이오마커 당단백질의 글리칸 구조에서 벗어나며; 및
- [0009] (2) 상기 결합제가 상기 바이오마커 당단백질의 글리칸 구조에 결합하는지 여부를 결정하는 단계;를 포함하고,
- [0010] 여기서 대조군 샘플과 비교하여 상기 바이오마커 당단백질의 상기 글리칸 구조에 대한 상기 결합제의 (현저히) 낮거나 (현저히) 높은 결합은 상기 대상체가 암에 걸릴 위험이 있거나 암을 앓을 것임을 나타내며,
- [0011] 바람직하게는 여기서 상기 바이오마커 당단백질은 ZAG 및/또는 PAP, 더 바람직하게는 ZAG이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0012] 본원에 사용되고 당업계에서 일반적으로 알려진 바와 같이, 본원에서 사용되는 "당단백질(또는 "당화 단백질")은 단당류에서 분지형 다당류에 이르는 다양한 유형의 하나 이상의 N-, O-, S- 또는 C- 공유 결합 탄수화물(설포기 또는 인산기 부착과 같은 변형 포함)을 함유하는 단백질을 의미한다. N-연결 글리칸은 아스파라긴의 -NH<sub>2</sub> 그룹에 결합된 탄수화물이다. O-연결 글리칸은 세린, 트레오닌 또는 하이드록실화 아미노산의 -OH 그룹에 결합된 탄수화물이다. S-연결 글리칸은 시스테인의 -SH 그룹에 결합된 탄수화물이다. C-연결 글리칸은 C-C 결합을 통해 트립토판에 결합된 탄수화물이다.
- [0013] "글리칸"이라는 용어는 글리코-RNA 및/또는 글리코시드 방식으로 연결된 단당류로 구성된 화합물을 지칭하며, 탄수화물이 단당류 또는 올리고당일지라도 당단백질, 당지질 또는 프로테오글리칸과 같은 당 접합체의 탄수화물 부분을 지칭할 수도 있다.
- [0014] 본 발명의 일 구현예에서, 암에 걸릴 위험이 있거나 암을 앓을 수 있는 상기 대상체는 인간이다.
- [0015] 본 발명과 관련하여 놀랍게도, 암(예: 전립선암, 신장암, 방광암 또는 고환암을 포함하는 비뇨생식기 암)의 위험 및/또는 존재에 대한 지표가 될 수 있는 특정 바이오마커 당단백질(예: 그러한 바이오마커 당단백질의 존재 또는 과발현)은 대상체가 암에 걸릴 위험이 있거나 암을 앓을 수 있는 경우 글리칸 구조의 변화를 나타낸다. 본

발명과 관련하여, 이는 동일한 당단백질의 "정상" 글리칸 구조에서 벗어난 이러한 당단백질 상의 특정 글리칸 구조가 암(예: 전립선암, 신장암, 방광암 또는 고환암을 포함하는 비노생식기암)의 위험 및/또는 존재를 나타낼 수 있다는 놀라운 발견으로 이어졌다. 본 발명에 따르면, 이러한 글리칸 구조에 결합할 수 있는 적합한 결합제를 사용하여 이러한 바이오마커 당단백질 상의 이러한 변화된 글리칸 구조를 식별하면 대상체가 암(예: 전립선암, 신장암, 방광암 또는 고환암을 포함하는 비노생식기암)에 걸릴 위험이 있거나 없을 수 있는지 여부를 진단할 수 있다.

[0016] 이러한 맥락에서, 본 발명에 따르면, 비-암 상태에서 바이오마커 당단백질의 글리칸 구조에 결합할 수 있는 결합제를 사용하고, 상기 결합제를 본원에서 설명 및 제공하는 방법의 단계 (1)에 따라 샘플에 접촉시키는 것이 가능하며, 본원에 제공된 방법에 기재된 바와 같이 대조군 샘플 (건강한 샘플, 즉 암 상태의 바이오마커 당단백질을 함유하지 않고, 상기 바이오마커 당단백질은 비암 상태의 바이오마커 당단백질의 글리칸 구조와 비교하여 변화된 글리칸 구조를 갖거나, 더 적은 양(예: 적어도 약 1.5배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 또는 적어도 약 3배 더 적은)의 암 상태의 바이오마커 당단백질을 함유하며, 상기 바이오마커 당단백질은 비암 상태의 바이오마커 당단백질의 글리칸 구조와 비교하여 변화된 글리칸 구조를 가짐)에 함유된 바이오마커 당단백질의 글리칸 구조에 대한 상기 결합제의 결합 능력을 비교하는 것이 가능하다. 결합제가 암에 걸릴 위험이 있거나 암을 앓을 수 있는 대상체의 샘플에 함유된 바이오마커 당단백질의 글리칸 구조에 대조군 샘플에 비해 더 낮은 정도(바람직하게는 유의하게 더 낮은 정도, 예를 들어 적어도 약 1.5배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배 또는 적어도 약 3배 더 낮은 정도)로 결합하는 경우, 이는 상기 대상체가 암에 걸릴 위험이 있거나 암에 걸릴 수 있음을 나타낼 수 있다.

[0017] 마찬가지로, 본 발명에 따르면, 암 상태에서 바이오마커 당단백질의 글리칸 구조에 결합할 수 있는 결합제를 사용하고, 상기 결합제를 본원에서 설명 및 제공하는 방법의 단계 (1)에 따라 샘플에 접촉시키는 것이 또한 가능하며, 본원에 제공된 방법에 기재된 바와 같이 대조군 샘플 (건강한 샘플, 즉 암 상태의 바이오마커 당단백질을 함유하지 않고, 비암 상태의 바이오마커 당단백질의 글리칸 구조와 비교하여 변화된 글리칸 구조를 갖거나, 더 많은 양(예: 적어도 약 1.5배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 또는 적어도 약 3배 더 많은)의 암 상태의 바이오마커 당단백질을 함유하며, 상기 바이오마커 당단백질은 비암 상태의 바이오마커 당단백질의 글리칸 구조와 비교하여 변화된 글리칸 구조를 가짐)에 함유된 바이오마커 당단백질의 글리칸 구조에 대한 상기 결합제의 결합 능력을 비교하는 것이 가능하다. 결합제가 암에 걸릴 위험이 있거나 암을 앓을 수 있는 대상체의 샘플에 함유된 바이오마커 당단백질의 글리칸 구조에 대조군 샘플에 비해 더 높은 정도(바람직하게는 유의하게 더 높은 정도, 예를 들어 적어도 약 1.5배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배 또는 적어도 약 3배 더 높은 정도)로 결합하는 경우, 이는 상기 대상체가 암에 걸릴 위험이 있거나 암에 걸릴 수 있음을 나타낼 수 있다.

[0018] 본 발명의 일 구현예에서, 대상체가 걸릴 위험에 있거나 앓을 수 있는 상기 암은 비노생식기 암일 수 있다. 특정 구현예에서, 그러한 비노생식기 암은 전립선암, 신장암, 방광암 또는 고환암, 바람직하게는 전립선암(PCa)일 수 있다.

[0019] 본 발명에 따르면, 본원에 기술된 바와 같이 바이오마커 당단백질의 글리칸 구조에 (특이적으로) 결합할 수 있는, 본원에 기술되고 제공된 방법에서 사용되는 결합제는 글리칸 구조에 결합할 수 있는 임의의 종류의 제제일 수 있다. 바람직하게는, 이러한 결합제는 글리칸 구조에 대한 결합이 측정 및 정량화될 수 있는 제제, 예를 들어, 결합 자체가 검출 및 측정될 수 있는 경우 및/또는 결합제가 적절한 방법으로 검출될 수 있는 마커 분자를 포함하는 경우이다. 본 발명과 관련하여, 적합한 결합제의 비제한적인 예로는 렉틴, 항-글리칸 항체, 압타머(핵산 압타머, 예를 들어 DNA 또는 RNA 압타머, 또는 펩타이드 압타머) 또는 보론산(boronic acid) 또는 이의 유도체가 포함될 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서, 본원에 기술되고 제공되는 방법에서 사용되는 결합제는 렉틴이다. 본원에 기술되고 제공되는 본 발명의 방법과 관련된 다른 예에서, 상기 결합제는 (특이적으로) 갈락토스의 3 또는 6 위치에  $\alpha$  또는  $\beta$ 로 연결된 *N*-아세틸갈락토사민으로 종결되는 글리칸 구조 또는 LacdiNAc 에피토프(GalNAc1-4GlcNAc)를 포함하는 글리칸 구조, 바람직하게는 갈락토스의 3 또는 6 위치에  $\alpha$  또는  $\beta$ 로 연결된 *N*-아세틸갈락토사민으로 종결되는 글리칸 구조에 결합할 수 있다.

[0020] 일반적으로, 본원에 사용된 "결합제"(또는 "인식 분자")는 표적 에피토프에 결합할 수 있는 하나 이상의 결합 영역을 포함하는 폴리펩타이드(예: 렉틴 또는 항-글리칸 항체, 또는 이의 단편) 뿐만 아니라 글리칸 구조에 결합할 수 있는 다른 분자(예: 압타머 또는 보론산 및 이의 유도체)를 포함한다. 말하자면, 결합제는 상기 결합 영역이 주어진 표적 구조/항원/에피토프와 결합/상호작용할 수 있도록 상기 하나 이상의 결합 영역에 대한 스캐폴드를 제공한다. 본 발명과 관련하여 용어 "결합 영역"은 주어진 표적 에피토프와 특이적으로 결합/상호작용하는 폴리펩타이드의 영역을 특징으로 한다. "에피토프"는 항원성이므로 용어 에피토프는 때때로 본원에서 "항원

성 구조" 또는 "항원성 결정자(determinant)"로도 지칭된다. 본 발명의 맥락에서, 글리칸 구조는 결합체, 예를 들어 렉틴, 항-글리칸 항체, 압타머(핵산 압타머, 예를 들어 DNA 또는 RNA 압타머, 또는 펩타이드 압타머) 또는 보론산 또는 이의 유도체, 바람직하게는 하나 이상의 렉틴 및/또는 항글리칸 항체, 바람직하게는 하나 이상의 렉틴에 대한 항원성 구조로 작용할 수 있다. 따라서, 결합 영역은 "항원-상호작용 부위"이다. 본 발명에 따르면, 용어 "항원-상호작용 부위"는 특정 항원 또는 특정 항원 그룹, 예를 들어 다른 종의 동일한 항원과 특이적으로 상호작용할 수 있는 폴리펩타이드의 모티프를 정의한다. 상기 결합/상호작용은 또한 "특이적 인식"을 정의하는 것으로 이해된다.

[0021] "에피토프"라는 용어는 또한 결합체가 결합하는 항원 상의 부위를 지칭한다. 바람직하게는, 에피토프는 결합체 (예: 렉틴, 항-글리칸 항체, 압타머(핵산 압타머, 예를 들어 DNA 또는 RNA 압타머, 또는 펩타이드 압타머), 또는 보론산 또는 이의 유도체, 바람직하게는 하나 이상의 렉틴 및/또는 항-글리칸 항체, 바람직하게는 하나 이상의 렉틴)가 결합할 분자 상의 부위이다.

[0022] 본 명세서에서 사용된 용어 "압타머"는 특정 표적 분자에 결합하는 핵산, 올리고뉴클레오타이드 또는 펩타이드 분자를 지칭한다. 본원에서 사용되는 용어 "핵산" 또는 "핵산 분자"는 특별히 다르게 정의하지 않는 한 "올리고뉴클레오타이드", "핵산 가닥" 등과 동의어로 사용되며, 1개, 2개 또는 그 이상의 뉴클레오타이드를 포함하는 중합체를 의미한다(예: 단일 또는 이중 가닥).

[0023] 본원에서 사용되는 "렉틴"이라는 용어는 렉틴, 갈렉틴, 셀렉틴, 재조합 렉틴 또는 전술한 렉틴의 단편뿐만 아니라 스캐폴드에 부착된 글리칸-결합 부위 조각을 포함한 모든 유형 및 기원의 탄수화물-결합 단백질을 지칭한다. 본 명세서에서 사용되는 "렉틴"이라는 용어는 글리칸 구조에 결합할 수 있는 렉틴의 단편도 포함한다. 렉틴은 탄수화물 모이어티 또는 탄수화물 모이어티들에 매우 특이적일 수 있다 (예: 당단백질의 글리칸과 같은 다른 분자의 말단 글리코시드 잔기(예: 당단백질의 분지형 당 분자, 예를 들어 본 발명의 의미 내의 표적 폴리펩타이드 및 본원의 표 1에 기술된 바이오마커)와 특이적으로 반응한다). 렉틴은 당업계에 일반적으로 알려져 있다. 당업자는 어떤 렉틴이 관심 있는 탄수화물 모이어티 또는 탄수화물 모이어티들(예: 단백질에 부착된 글리칸의 탄수화물 모이어티 또는 탄수화물 모이어티들)과 결합하는 데 사용될 수 있는지를 쉽게 결정할 수 있다. 본 발명의 맥락에서 적용되는 바람직한 렉틴이 본 명세서에 설명되어 있다. 또한 "렉틴"이라는 용어에는 시글렉(Siglec, 시알산-결합 면역 글로불린-유사 렉틴)도 포함된다. 특히, 본 명세서에서 사용되는 "렉틴"이라는 용어는 글리칸-결합 항체도 지칭한다. 따라서, 본 명세서에서 사용되는 "렉틴"이라는 용어는 렉틴, 시글렉 및 글리칸-결합 항체를 포함한다.

[0024] 본 명세서에 기술되고 본 발명과 관련하여 사용되는 렉틴은 당업계에 공지된 통상적인 방법을 사용하여 분리 및 선택적으로 정제될 수 있다. 예를 들어, 천연 공급원으로부터 분리된 렉틴은 적절한 고정화 탄수화물 매트릭스에서 균질하게 정제되고 적절한 합텐(hapten)에 의해 용출될 수 있다. Goldstein & Poretz (1986) In *The lectins. Properties, functions and applications in biology and medicine* (ed. Liener et al.), pp. 33-247. Academic Press, Orlando, Fla.; Rudiger (1993) In *Glycosciences: Status and perspectives* (ed. Gabius & Gabius), pp. 415-438. Chapman and Hall, Weinheim, Germany 참고. 대안적으로, 렉틴은 확립된 방법에 따라 재조합 방법으로 생산될 수 있다. Streicher & Sharon (2003) *Methods Enzymol.* 363:47-77 참고. 또 다른 대안으로서, 렉틴은 표준 펩타이드 합성 기술을 사용하거나 공지된 렉틴 또는 본원에 개시된 렉틴의 아미노산 서열에 기초하여 당업계에 잘 알려진 화학적 절단 방법을 사용하여 생성될 수 있다(예: US 9169327 B2). 또 다른 대안은 상기 특정 렉틴의 화학적 변형에 의해 제조된 인공 렉틴일 수 있다 (Y.W. Lu, C.W. Chien, P.C. Lin, L.D. Huang, C.Y. Chen, S.W. Wu, C.L. Han, K.H. Khoo, C.C. Lin, Y.J. Chen, BAD-Lectins: Boronic Acid-Decorated Lectins with Enhanced Binding Affinity for the Selective Enrichment of Glycoproteins, *Analytical Chemistry*, 85 (2013) 8268-8276 참고).

[0025] 본 발명의 맥락에서, 글리칸이 렉틴에 결합하는 경우(또는 그 반대의 경우), 결합 친화도는 약  $10^{-1}$  내지  $10^{-10}$  ( $K_D$ ), 바람직하게는 약  $10^{-2}$  내지  $10^{-8}$  ( $K_D$ ), 더 바람직하게는 약  $10^{-3}$  내지  $10^{-5}$  ( $K_D$ )의 범위인 것이 바람직하다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 결합체가 렉틴인 경우, 결합체와 글리칸 구조의 결합과 관련하여 "특이적으로" 또는 "특이적"이라는 용어는 약  $10^{-2}$  내지  $10^{-8}$  ( $K_D$ ), 더 바람직하게는 약  $10^{-3}$  내지  $10^{-5}$  ( $K_D$ )의 결합 친화도를 의미하는 것이 바람직하다. 글리칸과 렉틴의 결합에 대한 해당  $K_D$ 를 측정하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며 당업자가 쉽게 이용할 수 있다.

- [0026] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명과 관련하여 사용되는 결합체는 항체일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "항체"는 면역 글로불린 유전자 또는 면역 글로불린 유전자의 단편에 의해 실질적으로 또는 부분적으로 암호화되는 하나 이상의 폴리펩타이드(하나 이상의 결합 영역, 바람직하게는 항원 결합 영역을 포함)를 포함하는 단백질이다. "면역 글로불린"(Ig)이라는 용어는 본 명세서에서 "항체"와 상호 교환적으로 사용된다. 인식되는 면역글로불린 유전자에는 카파, 람다, 알파, 감마, 델타, 엡실론 및 뮤 불변 영역 유전자뿐만 아니라 무수히 많은 면역 글로불린 가변 영역 유전자가 포함된다.
- [0027] 특히, 여기서 사용되는 "항체"는 일반적으로 각각 약 25kDa의 경쇄(L) 2개와 약 50kDa의 중쇄(H) 2개로 구성된 사면체 당화 단백질이다. 람다와 카파라고 하는 두 가지 유형의 경쇄가 항체에서 발견될 수 있다. 중쇄의 불변 영역의 아미노산 서열에 따라 면역글로불린은 A, D, E, G, M의 5가지 주요 클래스로 분류될 수 있으며, 이들 중 여섯은 다시 하위 클래스(이소타입)로 나뉠 수 있다(예: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2). IgM 항체는 기본 헤테로테트라머 단위 5개와 J사슬이라는 추가 폴리펩타이드로 구성되며 10개의 항원 결합 부위를 포함하고, IgA 항체는 2-5개의 기본 4-사슬 단위를 포함하며, 이는 중합되어 J사슬과 결합하여 다량 집합체를 형성할 수 있다. IgG의 경우 4-사슬 단위는 일반적으로 약 150,000달톤이다.
- [0028] 각 경쇄는 N-말단 가변(V) 영역(VL)과 불변(C) 영역(CL)을 포함한다. 각 중쇄는 N-말단 V 영역(VH), 3-4개의 C 영역(CH), 및 힌지 영역을 포함한다. 불변 영역은 항체를 항원에 결합하는 데 직접 관여하지 않는다.
- [0029] VH와 VL의 쌍은 단일 항원-결합 부위를 형성한다. VH에 가장 가까운 CH 영역은 CH1으로 지칭된다. 각 L 사슬은 하나의 공유 이황화 결합으로 H 사슬에 연결되고, 두 개의 H 사슬은 H 사슬 이소형에 따라 하나 이상의 이황화 결합으로 서로 연결된다. VH 및 VL 영역은 프레임워크 영역(FR1, FR2, FR3, FR4)이라고 하는 비교적 보존된 서열의 4개 영역으로 구성되며, 이는 3개의 추가변 서열 영역(상보성 결정 영역, CDR)을 위한 스캐폴드를 형성한다. CDR에는 항체와 항원의 특이적 상호작용을 담당하는 대부분의 잔기가 포함되어 있다. CDR은 CDR1, CDR2 및 CDR3로 지칭된다. 따라서, 중쇄에 있는 CDR 성분을 H1, H2 및 H3라고 지칭하고, 경쇄에 있는 CDR 성분을 L1, L2 및 L3라고 지칭한다.
- [0030] "가변"이라는 용어는 면역글로불린 영역에서 서열에 가변성을 나타내며 특정 항체의 특이성 및 결합 친화성을 결정하는 데 관여하는 부분(즉, "가변 영역")을 의미한다. 가변성은 항체의 가변 영역 전체에 고르게 분포되어 있는 것이 아니라, 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 하위 영역(sub-domain)에 집중되어 있다. 이러한 하위 영역을 "초가변성" 영역 또는 "상보성 결정 영역"(CDR)이라고 한다. 가변 영역의 보다 보존된(즉, 비-초가변) 부분을 "프레임워크" 영역(FRM)이라고 한다. 자연적으로 발생하는 중쇄와 경쇄의 가변 영역은 각각 4개의 FRM 영역을 포함하며, 주로  $\beta$ -시트 구성을 채택하고, 3개의 초가변 영역으로 연결되며, 이는  $\beta$ -시트 구조를 연결하거나 경우에 따라  $\beta$ -시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 각 사슬의 초가변 영역은 FRM에 의해 근접하여 함께 유지되며, 다른 사슬의 초가변 영역과 함께 항원 결합 부위의 형성에 기여한다(Chothia *et al.*, *J MoI Biol* (1987), 196: 901; and MacCallum *et al.*, *J MoI Biol* (1996), 262: 732 참조). 불변 영역은 항원 결합에 직접 관여하지는 않지만, 예를 들어 항체 의존성, 세포 매개 세포 독성 및 보체 활성화와 같은 다양한 이펙터 기능을 나타낸다.
- [0031] "CDR" 및 복수의 "CDR"이라는 용어는 상보성 결정 영역(CDR)을 의미하며, 이 중 3개는 경쇄 가변 영역의 결합 특성을 구성하고(CDRL1, CDRL2 및 CDRL3) 3개는 중쇄 가변 영역의 결합 특성을 구성한다(CDRH1, CDRH2 및 CDRH3). CDR은 항체 분자의 기능적 활성화에 기여하며 스캐폴딩 또는 프레임워크 영역을 포함하는 아미노산 서열로 구분된다. 정확한 정의의 CDR 경계와 길이는 분류 및 번호 체계에 따라 달라질 수 있다. 서로 다른 경계에도 불구하고, 이러한 각 시스템은 가변 서열 내에서 소위 "초가변 영역"을 구성하는 부분이 어느 정도 겹친다. 따라서 이러한 시스템에 따른 CDR 정의는 인접한 프레임워크 영역과 관련하여 길이와 경계 영역이 다를 수 있다. 예를 들어 Kabat, Chothia, and/or MacCallum (Chothia *et al.*, *J MoI Biol* (1987), 196: 901; and MacCallum *et al.*, *J MoI Biol* (1996), 262: 732)을 참조할 수 있다.
- [0032] 본 명세서에서 사용되는 "아미노산" 또는 "아미노산 잔기"라는 용어는 일반적으로 다음과 같이 구성된 군에서 선택된 아미노산과 같이 당업계에서 인정된 정의를 갖는 아미노산을 지칭한다: 알라닌(Ala 또는 A); 아르기닌(Arg 또는 R); 아스파라긴(Asn 또는 N); 아스파르트산(Asp 또는 D); 시스테인(Cys 또는 C); 글루타민(Gln 또는 Q); 글루탐산(Glu 또는 E); 글리신(Gly 또는 G); 히스티딘(His 또는 H); 이소류신(He 또는 I); 류신(Leu 또는 L); 라이신(Lys 또는 K); 메티오닌(Met 또는 M); 페닐알라닌(Phe 또는 F); 프롤린(Pro 또는 P); 세린(Ser 또는 S); 트레오닌(Thr 또는 T); 트립토판(Trp 또는 W); 티로신(Tyr 또는 Y); 발린(VaI 또는 V), 필요에 따라 변형, 합성 또는 희귀 아미노산이 사용될 수 있음. 일반적으로 아미노산은 비극성 측쇄(예: Ala, Cys, He, Leu, Met,

Phe, Pro, Val), 음전하를 띠는 측쇄(예: Asp, Glu), 양전하를 띠는 측쇄(예: Arg, His, Lys) 또는 하전되지 않는 극성 측쇄(예: Asn, Cys, Gln, Gly, His, Met, Phe, Ser, Thr, Trp 및 Tyr)로 그룹화할 수 있다.

- [0033] "프레임워크 영역"이라는 용어는 더 다양한(즉, 초가변) CDR 사이에 존재하는 항체 가변 영역의 당업계에서 인식된 부분을 의미한다. 이러한 프레임워크 영역은 일반적으로 프레임워크 1 내지 4(FR1, FR2, FR3 및 FR4)라고 지칭되며, 항원 결합 표면을 형성하기 위해 3차원 공간에서 6개의 CDR(중쇄에서 3개 및 경쇄에서 3개)을 제시하기 위한 스캐폴드를 제공한다.
- [0034] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항체"는 면역 글로불린(또는 온전한 항체)뿐만 아니라 그 단편도 지칭하며, 항원 결합 단편 또는 항원 결합 영역을 포함하는 임의의 폴리펩타이드를 포함한다. 바람직하게는, 항원 결합 기능을 보유하는 Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv, Fd, dAb 및 기타 항체 단편과 같은 단편이 포함된다. 전형적으로, 이러한 단편은 항원 결합 영역을 포함하고 본 명세서에 기술된 항체와 동일한 특성을 갖는다.
- [0035] 본 명세서에서 사용되는 "항체"라는 용어는 본 발명의 항체에 의해 결합된 에피토프와 동일한 에피토프에 결합하기 위해 경쟁하는 항체를 포함하며, 바람직하게는 본 명세서의 다른 부분에서 설명된 항체의 생성 방법에 의해 얻을 수 있다.
- [0036] 테스트 항체가 동일한 에피토프에 대한 결합에 대해 경쟁할 수 있는지를 결정하기 위해, 교차-차단 분석, 예를 들어, 경쟁 ELISA 검정이 수행될 수 있다. 예시적인 경쟁 ELISA 분석에서, 마이크로타이터 플레이트의 에피토프-코팅된 웰, 또는 에피토프-코팅된 세포파스 비드를 후보 경쟁 항체와 함께 또는 없이 사전-인큐베이션한 다음, 본 발명의 비오틴-표지된 항체를 첨가한다. 웰 내 또는 비드 상에서 에피토프에 결합된 표지된 항체의 양은 아비딘-과산화효소 접합체 및 적절한 기질을 사용하여 측정된다.
- [0037] 대안적으로, 항체는 예를 들면, 방사성, 효소 또는 형광 표지 또는 몇몇 다른 검출가능하고 측정가능한 표지로 표지될 수 있다. 항원에 결합하는 표지된 항체의 양은 항원 상의 동일한 에피토프에 대한 결합을 경쟁하는 후보 경쟁 항체(테스트 항체)의 능력에 역상관 관계를 가질 것이고, 즉 동일한 에피토프에 대한 테스트 항체의 친화도가 클수록, 덜 표지된 항체는 항원-코팅된 웰에 결합될 것이다.
- [0038] 후보 경쟁 항체가 항체의 결합을 (후보 경쟁 항체의 부재 하에 병렬로 수행되는 대조군과 비교하여(그러나 공지된 비경쟁 항체의 존재하에 있을 수 있음)) 20% 이상, 바람직하게는 20-50% 이상, 더욱 바람직하게는 50% 이상 차단할 수 있는 경우, 후보 경쟁 항체는 실질적으로 동일한 에피토프에 결합하거나 본 발명의 항체와 동일한 에피토프에 결합하기 위해 경쟁하는 항체로 간주된다. 동일한 정량적 값에 도달하기 위해 이 분석의 변형이 수행될 수 있음을 이해할 것이다.
- [0039] "항체"라는 용어는 또한 다클론성, 단클론성, 단일특이적, 다중특이적, 예를 들어 이중특이적, 비-특이적, 인간화, 인간, 단일 사슬, 키메라, 합성, 재조합, 하이브리드, 돌연변이, 접목 및 인비트로 생성 항체도 포함되나 이에 제한되는 것은 아니며, 다클론성 항체가 바람직하다. 상기 용어에는 영역 항체(domain antibodies, dAbs) 및 나노바디도 포함된다.
- [0040] 따라서, "항체"라는 용어는 정제된 혈청, 즉 정제된 다클론성 혈청과도 관련이 있다. 따라서, 상기 용어는 바람직하게는 혈청, 더욱 바람직하게는 다클론성 혈청, 가장 바람직하게는 정제된 (다클론성) 혈청에 관한 것이다. 항체/혈청은 수득할 수 있으며, 바람직하게는 예컨대 본 명세서에 기재된 방법 또는 용도에 의해 수득된다.
- [0041] "다클론 항체" 또는 "다클론 항혈청"은 항원 또는 항원들로 면역된 동물의 혈액으로부터 제조될 수 있는 하나(1)가 또는 특정 항혈청) 이상의 (다가 항혈청) 항원에 특이적인 항체의 혼합물을 포함하는 면역 혈청을 의미한다.
- [0042] 또한, 본 발명에 사용된 "항체"라는 용어는 본원에 기재된 항체들과 동일한 특이성을 나타내는 본 명세서에 기재된 항체들의 유도체 또는 변이체에 관한 것이기도 하다. "항체 변이체"의 예는 인간화된 비인간 항체의 변이체, "친화도 성숙" 항체(예를 들어, Hawkins *et al.*, J Mol Biol (1992), 254, 889-896; and Lowman *et al.*, Biochemistry (1991), 30: 10832- 10837 참조) 및 이펙터 기능(들)이 변경된 항체 돌연변이체(예를 들어, 미국 특허 5, 648, 260 참조)를 포함한다.
- [0043] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항원-결합 영역", "항원-결합 단편" 및 "항체 결합 영역"은 항체와 항원 간의 특이적 결합을 담당하는 아미노산을 포함하는 항체 분자의 일부를 지칭한다. 항체에 의해 특이적으로 인식되고 결합되는 항원의 부분을 본 명세서에서 기술된 바와 같이 "에피토프"라고 지칭한다. 상기 언급된 바와 같이, 항원 결합 영역은 전형적으로 항체 경쇄 가변 영역(VL) 및 항체 중쇄 가변 영역(VH)을 포함할 수 있으나, 이는 둘 모두를 포함할 필요는 없다. Fd 단편은 예를 들어, 2개의 VH 영역을 가지며, 종종 온전한 항원 결합 영역의 일부

항원 결합 기능을 유지한다. 항체의 항원 결합 단편의 예는 (1) VL, VH, CL 및 CH1 영역을 갖는 1가 단편인 Fab 단편; (2) 이황화 다리에 의해 힌지 영역에 연결된 2개의 Fab 단편을 갖는 2가 단편인 F(ab')<sub>2</sub> 단편; (3) 2개의 VH 및 CH1 영역을 갖는 Fd 단편; (4) 항체의 단일 팔의 VL 및 VH 영역을 갖는 Fv 단편, (5) VH 영역을 갖는 dAb 단편 (Ward et al., (1989) Nature 341 : 544-546), (6) 분리된 상보성 결정 영역 (CDR) 및 (7) 단일 사슬 Fv (scFv)를 포함한다. Fv 단편의 두 영역인 VL과 VH는 별도의 유전자에 의해 코딩되지만, 재조합 방법을 사용하면 VL과 VH 영역이 쌍을 이루어 1가 분자(단일 사슬 Fv(scFv))로 알려짐; 예를 들어 Bird et al., (1988) Science (1988), 242: 423-426; and Huston et al., (1988) PNAS USA (1988), 85: 5879-5883 참조)를 형성하는 단일 단백질 사슬로 만들어질 수 있는 합성 링커에 의해 결합될 수 있다. 이들 항체 단편은 당업자에게 공지된 통상적인 기술을 이용하여 수득되며, 상기 단편은 온전한 항체와 동일한 방식으로 기능을 평가한다.

[0044] 본 명세서에서 사용되는 용어 "단클론 항체"는 화학적으로 변형된 단클론 항체 또는 그의 단편뿐만 아니라 실질적으로 균질한 항체의 집단으로부터 수득된 항체 (즉, 집단을 포함하는 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연적으로 발생하는 돌연변이 및/또는 번역 후 변형(예: 이성질화, 아미드화)을 제외하고는 동일함)을 포함한다. 단클론 항체는 단일 항원 부위에 대해 유도되며, 매우 특이적이다. 더욱이, 전형적으로 상이한 결정자(에피토프)에 대해 유도되는 상이한 항체를 포함하는 종래의 (다클론) 항체 제제와 대조적으로, 각각의 단클론 항체는 항원 상의 단일 결정자에 대해 유도된다. 이들의 특이성에 더하여, 단클론 항체는 이들이 다른 면역 글로불린에 의해 오염되지 않은 하이브리도마 배양에 의해 합성된다는 점에서 유리하다. "단클론"이라는 수식어는 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득되는 항체의 특성을 나타내며, 임의의 특정 방법에 의해 항체의 생산을 요구하는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용될 단클론 항체는 Kohler et al., Nature (1975), 256: 495에 의해 최초로 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있고, 또는 재조합 DNA 방법(예: 미국 특허 제4,816, 567호)에 의해 제조될 수 있다. "단클론 항체"는 또한 예를 들어 Clackson et al., Nature (1991), 352: 624-628; and Marks et al., J Mol Biol (1991), 222: 581-597에 기재된 기술을 사용하여 과거 항체 라이브러리로부터 분리될 수 있다.

[0045] 본 명세서의 단클론 항체는 구체적으로, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종으로부터 유래되거나 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체 내의 대응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항체(면역글로불린)를 포함하는 반면, 사슬의 나머지(들)는 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 다른 종으로부터 유래되거나 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체 내의 대응 서열과 동일하거나 상동성이다 (미국 특허 제4,816, 567호; Morrison et al., PNAS USA (1984), 81: 6851-6855). 본 명세서의 관심 키메라 항체는 비인간 영장류(예: 구세계 원숭이(Old World Monkey), 유인원(Ape) 등)로부터 유래된 가변 영역 항원 결합 서열 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 "영장류화(primitized)" 항체를 포함한다.

[0046] "인간화된" 형태의 비인간(예: 쥐) 항체는 비인간 면역글로불린에서 유래된 최소 서열을 함유하는 대부분 인간 서열의 키메라 면역글로불린, 면역글로불린 사슬 또는 이의 단편(예컨대, Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> 또는 항체의 다른 항원 결합 서브시퀀스)이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는 수용자의 추가 변 영역(또는 CDR)의 잔기가 원하는 특이성, 친화도 및 용량을 갖는 마우스, 쥐 또는 토끼와 같은 비인간 종(공여자 항체)의 추가 변 영역의 잔기로 대체되는 인간 면역글로불린(수용자 항체)이다. 일부 경우에, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 영역(FR) 잔기는 상응하는 비인간 잔기로 대체된다. 나아가, 본 명세서에 사용된 "인간화 항체"는 수용자 항체 및 공여자 항체 모두에서 발견되지 않는 잔기를 또한 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능을 더욱 정제하고 최적화하기 위해 이루어진다. 인간화 항체는 또한 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 인간 면역글로불린의 일부를 포함할 것이다. 보다 상세한 것은 Jones et al., Nature (1986), 321: 522-525; Reichmann et al., Nature (1988), 332: 323-329; and Presta, Curr. Op. Struct Biol (1992), 2: 593-596를 참조할 수 있다.

[0047] "인간 항체"라는 용어는 당업계에 공지된 인간 생식선 면역글로불린 서열에 실질적으로 대응하는 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함한다(예: Kabat et al. 포함(Kabat et al., loc. cit. 참조)). 본 발명의 인간 항체는 인간 생식선 면역글로불린 서열에 의해 암호화되지 않은 아미노산 잔기를 포함할 수 있다(예: 시험관 내에서 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이 유발에 의해 또는 생체 내에서 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이) (예를 들면 CDR에서, 특히 CDR3에서). 상기 인간 항체는 인간 생식선 면역글로불린 서열에 의해 암호화되지 않은 아미노산 잔기로 치환된 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 이상의 위치를 가질 수 있다.

[0048] 본원에서 사용되는 바와 같이, "시험관 내 생성 항체"는 비면역 세포 선택(예: 시험관 내 과거 디스플레이, 단백질 칩 또는 후보 서열이 항원에 결합하는 능력을 시험할 수 있는 임의의 다른 방법)에서 가변 영역의 전부 또는 일부(예: 적어도 하나의 CDR)가 생성되는 항체를 의미한다. 따라서, 이 용어는 바람직하게 면역 세포에서 유

전체 재배열에 의해 생성된 서열을 배제한다.

- [0049] "이중특이적" 또는 "이작용성(bifunctional) 항체"는 2개의 상이한 중쇄/경쇄 쌍 및 2개의 상이한 결합 부위를 갖는 인공 하이브리드 항체이다. 이중특이적 항체는 하이브리도마의 융합 또는 Fab' 단편의 연결을 포함하는 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, Songsivilai & Lachmann, Clin Exp Immunol (1990), 79: 315-321; Kostelny *et al.*, J Immunol (1992), 148: 1547-1553을 참조할 수 있다. 일 구현예에서, 이중특이적 항체는 면역글로불린 불변 영역을 통해 제2 결합 영역 폴리펩티드에 연결된 Fab' 단편과 같은 제1 결합 영역 폴리펩티드를 포함한다.
- [0050] 당업자에게 공지된 수많은 방법은 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 수득하는데 이용가능하다. 예를 들어, 항체는 재조합 DNA 방법을 이용하여 제조될 수 있다(미국 특허 4,816,567). 단클론 항체는 또한 공지된 방법에 따라 하이브리도마(예: Kohler and Milstein, Nature (1975), 256: 495-499)의 생성에 의해 제조될 수 있다. 이후 이러한 방식으로 형성된 하이브리도마를 효소-결합 면역흡착 분석(ELISA) 및 표면 플라즈몬 공명(BIACORE) 분석과 같은 표준 방법을 이용하여 스크리닝하고, 특정 항원과 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 하나 이상의 하이브리도마를 식별한다. 특정 항원의 임의의 형태는 면역원, 예를 들어, 재조합 항원, 자연적으로 발생하는 형태, 이의 임의의 변이체 또는 단편, 뿐만 아니라 이의 항원성 펩티드로서 사용될 수 있다.
- [0051] 항체를 제조하는 하나의 예시적인 방법은 단백질 발현 라이브러리, 예를 들어, 파지 또는 리보솜 디스플레이 라이브러리를 스크리닝하는 것을 포함한다. 예를 들어, 미국 특허 제5,223,409호; Smith, Science (1985), 228: 1315-1317; Clackson *et al.*, Nature (1991), 352: 624-628; Marks *et al.*, J Mol Biol (1991), 222: 581-597; WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; 및 WO 90/02809에 파지 디스플레이가 기재되어 있다.
- [0052] 다른 구현예에서, 비인간 동물로부터 단일클론항체를 수득한 후, 변형, 예를 들면 인간화, 면역화, 키메라 등을 당업계에 공지된 재조합 DNA 기술을 이용하여 제조할 수 있다. 키메라 항체를 제조하기 위한 다양한 접근법이 기재되어 있다. 예를 들면, Morrison *et al.*, PNAS USA (1985), 81: 6851; Takeda *et al.*, Nature (1985), 314: 452; U.S. Patent No. 4,816,567; U.S. Patent No. 4,816,397; EP 171496; EP 173494, GB 2177096 을 참조할 수 있다. 인간화 항체는 또한, 예를 들면, 인간의 중쇄 및 경쇄 유전자는 발현하지만, 내인성 마우스 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 유전자는 발현할 수 없는 형질전환 마우스를 이용하여 제조될 수 있다. Winter는 본원에 기재된 인간화 항체를 제조하기 위해 사용될 수 있는 예시적인 CDR-이식(grafting) 방법을 설명한다(미국특허 제5,225,539호). 특정 인간 항체의 CDR은 모두 비인간 CDR의 적어도 일부로 대체될 수도 있고, 일부 CDR만 비인간 CDR로 대체될 수도 있다. 인간화 항체가 미리 결정된 항원에 결합하는데 필요한 CDR의 수를 대체하기만 하면 된다.
- [0053] 인간화 항체 또는 이의 단편은 항원 결합에 직접적으로 관여하지 않는 Fv 가변 영역의 서열을 인간 Fv 가변 영역의 등가 서열로 대체함으로써 생성될 수 있다. 인간화 항체 또는 이의 단편을 생성하기 위한 예시적인 방법은 Morrison, Science(1985), 229: 1202-1207; Oi *et al.*, BioTechniques (1986), 4: 214; US 5,585,089; US 5,693,761; US 5,693,762; US 5,859,205; 및 US 6,407,213에 의해 제공된다. 이러한 방법은 면역글로불린 Fv 가변 영역의 전부 또는 일부를 암호화하는 핵산 서열을 중쇄 또는 경쇄 중 적어도 하나로부터 분리, 조작 및 발현하는 것을 포함한다. 이러한 핵산은 상기 기재된 바와 같이 미리 결정된 표적에 대한 항체를 생성하는 하이브리도마로부터 뿐만 아니라 다른 출처로부터 수득될 수 있다. 이후, 인간화 항체 분자를 암호화하는 재조합 DNA 는 적절한 발현 벡터에 클로닝될 수 있다.
- [0054] 특정 구현예에서, 인간화 항체는 보존적 치환, 공통(consensus) 서열 치환, 생식선 치환 및/또는 역돌연변이의 도입에 의해 최적화된다. 이러한 변경된 면역글로불린 분자는 당업계에 공지된 임의의 여러 기술에 의해 제조될 수 있으며 (예: Teng *et al.*, PNAS USA (1983), 80: 7308-731; Kozbor *et al.*, Immunology Today (1983), 4: 7279; Olsson *et al.*, Meth Enzymol (1982), 92: 3-16), WO 92/06193 또는 EP 239400의 교시에 따라 제조될 수 있다.
- [0055] 항체의 경우, 특이적 결합은 결합 도메인의 아미노산 서열의 특정 모티프에 의해 영향을 받는 것으로 여겨지며, 항원은 1차, 2차 또는 3차 구조뿐만 아니라 상기 구조의 2차 변형의 결과로 서로 결합한다. 항원-상호작용-부위와 이의 특이적 항원의 특이적 상호작용은 항원에 대한 상기 부위의 단순한 결합을 초래할 수도 있다. 더욱이, 항원-상호작용-부위와 이의 특이적 항원의 특이적 상호작용은 대안적으로, 예를 들면, 항원 형태의 변화의 유도, 항원의 올리고머화 등으로 인해 신호의 개시를 초래할 수도 있다. 본 발명과 일맥상통하는 결합 영역의 하나의 예는 항-글리칸 항체이다. 이러한 맥락에서, 결합체가 항체인 경우, 결합 친화도가  $10^{-1}$  M보다 높을 때

결합은 "특이적"으로 간주될 수 있다. 바람직하게는, 결합 친화도가 약  $10^{-5}$  내지  $10^{-12}$  M(KD), 바람직하게는 약  $10^{-8}$  내지  $10^{-12}$  M(여기서, 결합체는 항체)일 때 결합은 특이적으로 간주된다. 필요한 경우, 결합 조건을 달리하여 특이적 결합을 실질적으로 영향을 주지 않으면서 비특이적 결합을 감소시킬 수 있다. 인식 분자가 상기 본 명세서에 정의된 바와 같이 특이적으로 반응하는지 여부는, 특히, 에피토프와 상기 인식 분자의 반응을 상기 인식 분자와 다른 단백질(들)과의 반응과 비교함으로써 쉽게 시험할 수 있다.

[0056] 본 발명에 따르면, 존재 또는 과발현(예: 적어도 약 1.5배, 적어도 약 2배, 또는 적어도 약 3배 과발현)이 암(예: 전립선암, 신장암, 방광암 또는 고환암을 포함하는 비뇨생식기 암)의 위험 및/또는 존재를 나타내는 바이오마커 당단백질(본원에서 바이오마커 또는 바이오마커 단백질로도 지칭됨)은, 이러한 암의 발병 위험이 없거나 이러한 암을 앓지 않는 (인간) 대상체의 세포에 비해, 암(예: 전립선암, 신장암, 방광암 또는 고환암을 포함하는 비뇨생식기 암) 발병 위험이 있거나 암을 앓고 있는 (인간) 대상체의 세포에 존재하거나 과발현(예: 적어도 1.5배, 2배, 또는 3배 과발현)될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명과 관련하여, 이러한 바이오마커 당단백질은 비-암 상태와 비교하여 암 상태에서 상이한 글리칸 구조를 갖는다. 예를 들어, 전립선암(PCa)의 발병 또는 고통의 위험에 있는 (인간) 대상체에서, ZAG(zinc alpha-2-glycoprotein; 아연 알파-2-당단백질), PAP(prostatic acid phosphatase; 전립선산 포스파타제), PSA(prostate-specific antigen; 전립선-특이적 항원), TIMP-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1; 금속단백분해효소-1의 조직 억제제), fPSA(유리 PSA), tPSA(총 PSA), 오스테오폰틴(osteopontin), PSMA(prostate specific membrane antigen; 전립선 특이적 막 항원) 및/또는 스폰딘-2(spondin-2)와 같은 당단백질은 전립선암의 발병 또는 고통의 위험에 있지 않은 (인간) 대상체에 비해 세포 내에 존재하거나 과발현될 수 있으며, 따라서 본 발명에 따른 바이오마커 당단백질의 역할을 할 수 있다. 따라서, 본 발명의 일 구현예에서, 바이오마커 당단백질(본원에서는 바이오마커 또는 바이오마커 단백질로도 지칭됨)의 존재 또는 과발현(예: 적어도 1.5배, 2배, 3배 과발현)또는 과소발현(예: 적어도 1.5배, 2배, 3배, 또는 3배 과소발현)은 암(예: 전립선암, 신장암, 방광암 또는 고환암을 포함한 비뇨생식기암)의 위험 및/또는 존재를 나타내며, 특히 이러한 암이 전립선암인 경우, ZAG, PAP, PSA, TIMP-1, fPSA, tPSA, 오스테오폰틴, PSMA 또는 스폰딘-2일 수 있다.

[0057] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 당단백질 또는 단백질의 "과발현"은, 암에 걸릴 위험이 없거나 앓고 있지 않은 대상체의 세포와 비교하여, 본 명세서에 기재된 바와 같이 암에 걸릴 위험이 있거나 앓고 있는 대상체의 세포에서 더 많은 양의 이러한 당단백질 또는 단백질을 초래하는 임의의 방법을 의미할 수 있다. 예컨대, 본 발명에 따르면, "과발현"은 증가된 번역 또는 전사 속도, 또는 그러한 당단백질 또는 단백질의 전반적인 합성 증가를 의미할 수 있고, 반면에, 과소발현은 감소된 번역 또는 전사 속도, 또는 그러한 당단백질 또는 단백질의 전반적인 합성 감소를 의미할 수 있다.

[0058] 본 발명의 맥락에서 발견된 바와 같이, ZAG는 전립선암에 걸릴 위험이 없거나 앓고 있지 않은 대상체의 샘플에 함유된 ZAG와 비교하여, 전립선암에 걸릴 위험이 있거나 전립선암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 상이한 글리칸 구조를 나타낸다. 본 발명의 구체적인 구현예에서, 특히 대상체가 진단된 상기 암이 전립선암인 경우, 상기 바이오마커 당단백질은 ZAG 및/또는 PAP, 바람직하게는 ZAG 또는 PAP, 더욱 바람직하게는 ZAG이다.

[0059] 본 발명의 방법은 추가적인 바이오마커의 분석을 추가로 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 PSA, TIMP-1, fPSA, tPSA, 오스테오폰틴 및 스폰딘-2로 이루어진 군으로부터 하나 이상의 추가적인 바이오마커 당단백질을 선택할 수 있다.

[0060] 본 발명과 관련하여, 본원에 기술된 바이오마커 당단백질의 글리칸 구조에 결합할 수 있는, 본원에 기술되고 제공된 방법에 사용되는 결합체는 본원에 기술된 바이오마커 당단백질의 글리칸 구조에 결합한다. 본 발명의 한 구현예에서, 결합체(바람직하게는 렉틴)는 상기 결합체는 코어 푸코스(core fucose), 안테나 푸코스(antennary fucose), N-연결 올리고당을 함유하는 Fuc α 1-6GlcNAc-N-Asn, Fuc α 1-6/3GlcNAc, α-L-Fuc, Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc, Fuc α 1-2Gal, Fuc α 1-6GlcNAc, Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc, 분지형 N-연결 6당류(hexasaccharide), Man α 1-3Man, α-D-Man, (GlcNAc β 1-4, Gal β 1-4GlcNAc, GlcNAc α 1-4Gal β 1-4GlcNAc, (GlcNAc β)<sub>1-4</sub>, Neu5Ac (시알산), Gal β 1-3GalNAc-세린/트레오닌, Gal α 1-3GalNAc, Gal β 1-6Gal, Gal β 1-4GlcNAc, Gal β 1-3GalNAc, GalNAc α 1-3GalNAc, GalNAc α 1-3Gal, GalNAc α/β 1-3/4Gal, α-GalNAc, GalNAc β 1-4Gal, GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal, GalNAc α 1-2Gal, GalNAc α 1-3GalNAc, GalNAc β 1-3/4Gal, GalNAc-세린/트레오닌 (Tn 항원), Gal β 1-3GalNAc-세린/트레오닌 (T 항원), GalNAc β 1-4GlcNAc (LacdiNAc), α-2,3Neu5Ac (α 2-3 연결 시알산), α-2,6Neu5Ac (α 2-6 연결 시알산), α-2,8Neu5Ac (α 2-8 연결 시알산), 시알산(α-2,3Neu5Ac, α-2,6Neu5Ac 또는 α-2,8Neu5Ac), Neu5Ac α 4/9-O-Ac-Neu5Ac, Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc/GlcNAc,

Neu5Ac α 2-6Gal/GalNAc, N-연결 바이-안테나(bi-antennary), N-연결 트리/테트라-안테나(tri/tetra-antennary), 분지형 B 1-6GlcNAc, Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal B 1-3/4GlcNAc, Gal B 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc, NeuAc α 2-3Gal B 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc, Fuc α 1-2Gal B 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc, Gal B 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc, NeuAc α 2-3Gal B 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc, Fuc α 1-2Gal B 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc, 고 만노스(high mannose), 시알릴 루이스<sup>a</sup> (시알릴 Le<sup>a</sup>) 항원, 시알릴 루이스<sup>x</sup> (시알릴 Le<sup>x</sup>) 항원, 루이스<sup>x</sup> (Le<sup>x</sup>) 항원, 시알릴 Tn 항원, 시알릴 T 항원, 루이스<sup>y</sup> (Le<sup>y</sup>) 항원, 황산화 코어1 글리칸, Tn 항원, T 항원, 코어 2 글리칸, 루이스<sup>a</sup> (Le<sup>a</sup>) 항원, (GlcNAc B 1-4)<sub>n</sub>, β-D-GlcNAc, GalNAc, Gal-GlcNAc, GlcNAc, Gal α 1-3Gal, Gal B 1-3GalNAc, α-Gal, α-GalNAc, (GlcNAc)<sub>n</sub>, 또는 분지형 (LacNAc)<sub>n</sub> 중 하나 이상에 (특이적으로) 결합한다.

[0061] 본원에 기술된 바와 같이, 본 발명의 일 구현예에서, 본원에 기술되고 제공되는 방법에 채용될 결합체는 특히, 갈락토스의 3 또는 6 위치에 α 또는 β로 연결된 N-아세틸갈락토사민으로 종결되는 글리칸 구조 또는 LacdiNAc 에피토프(GalNAc1-4GlcNAc)를 포함하는 글리칸 구조, 바람직하게는 갈락토스의 3 또는 6 위치에 α 또는 β로 연결된 N-아세틸갈락토사민으로 종결되는 글리칸 구조에 (특이적으로) 결합될 수 있다. 본 발명과 관련하여 놀랍게도 발견된 바와 같이, 전립선암에 걸릴 위험에 없거나 또는 전립선암을 겪고 있지 않은 대상체의 샘플에 함유된 ZAG와 비교하여, 전립선암에 걸릴 위험에 있거나 앓고 있는 대상체의 샘플에 함유된 ZAG("암 ZAG")는 상이한 글리칸 구조를 나타낸다. 본 발명에 따라, 이러한 "암 ZAG"는 본원에 기재된 바와 같은 이러한 "암 ZAG"의 글리칸 구조에 결합할 수 있는 결합체를 사용하여 검출될 수 있다. 본 발명의 맥락에서 추가로 발견된 바와 같이, 전립선암에 걸릴 위험에 있거나 또는 전립선암을 앓고 있는 대상체의 샘플에 함유된 ZAG("암 ZAG")는 예를 들어, 등나무 렉틴(*Wisteria floribunda* lectin) (WFA/WFL)과 같은 특정 렉틴을 사용하여 결합(및 이에 따라 검출)될 수 있다. 따라서, 본 발명의 일 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 바이오마커 당단백질의 글리칸 구조에 결합할 수 있는, 본 명세서에 기술되고 제공된 방법에 채용된 상기 결합체는, 등나무(*Wisteria floribunda*) 렉틴(WFA/WFL)이 글리칸 구조에 결합하는 친화도의 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 100%로, 등나무 렉틴(WFA/WFL)과 동일한 글리칸 구조에 결합할 수 있다. 글리칸 구조에 대한 결합체(예: 렉틴)의 친화도 수준을 결정하는 방법은 당업계에 일반적으로 공지되어 있으며, 특히 표면 플라즈몬 공명, 등온 마이크로열량계, 또는 ELISA 및 ELISA-유사 포맷, 바람직하게는 표면 플라즈몬 공명을 포함한다.

[0062] 본 발명의 보다 구체적인 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 바이오마커 당단백질의 글리칸 구조에 결합할 수 있는, 본원에 기술되고 제공된 방법에 사용되는 상기 결합체는 등나무 렉틴(WFA/WFL), L-셀렉틴, P-셀렉틴, E-셀렉틴, AAL(*Aleuria aurantia* 렉틴), MAA(*Maackia amurensis* agglutinin/렉틴), GNL(*Galanthus nivalis* 렉틴), PSL(*Pisum sativum* 렉틴) 또는 PHA-E(*Phaseolus vulgaris* erythroagglutinin)일 수 있다. 본 발명의 구체적인 구현예에서, 상기 결합체는 등나무 렉틴(WFA/WFL) 또는 PHA-E이며, 바람직하게는 등나무 렉틴(WFA/WFL)이다.

[0063] 본 발명과 관련하여, 본 명세서에 기재된 바와 같이 바이오마커 당단백질의 글리칸 구조에 결합할 수 있는 본 명세서에 기재되고 제공된 방법에 채용될 2종 이상의 결합체를 조합하는 것도 가능하다. 일부 경우에, 이러한 결합체 중 2종 이상을 조합함으로써, 진단 잠재력이 증가될 수 있다. 이러한 맥락에서, 본 발명에 따르면, 본 발명의 방법의 단계 (1)에서 동일한 분석에서 2종 이상의 결합체(예: 렉틴)를 사용하거나, 또는 - 바람직하게는 - 상이한 분석에서 이러한 2종 이상의 결합체(예: 렉틴)를 사용한 다음(예: 동일한 샘플을 사용함), 단계 (2)에서 각각의 상기 결합체가 상기 바이오마커 당단백질의 글리칸 구조에 결합했는지 여부를 개별적으로 결정한 다음, 이렇게 얻어진 정보를 조합하여 대상체가 암에 걸릴 위험이 있거나 또는 암으로 고통받을 수 있는지 여부를 진단하는 것이 가능하다. 본 발명의 일 구현예에서, 이러한 결합체 중 2종(또는 그 이상)이 본 발명의 방법에 채용되는 경우, 이러한 결합체는 모두 렉틴이다. 이와 관련된 특정 구현예에서, 이러한 결합체 중 2종(또는 그 이상)이 본 발명의 방법에 채용되는 경우, 이러한 렉틴은 등나무 렉틴(WFA/WFL) 및 PHA-E이거나 이를 포함한다.

[0064] 본 발명과 관련하여 본원에 기술되고 제공되는 방법의 경우, 본원에 기술된 바와 같이 바이오마커 당단백질에 대한 본원에 기술된 결합체의 결합이 검출 및 정량화될 수 있는 임의의 적합한 분석이 채용될 수 있다. 이러한 적합한 분석은 당해 기술분야에 일반적으로 공지되어 있으며, 특히, ELISA 또는 웨스턴 블롯(특히 결합체가 항체인 경우), 또는 렉틴-기반 분석(예: WO2019/185515에 기재된 분석), 또는 효소-연결 렉틴 결합 분석 ELLBA(세포, CELLBA; 예를 들어, Gavurioux et al., J Immunol Methods (1987), 104(1-2): 173-182 참조)를 포함한다. 본 발명의 일 구현예에서, 렉틴-기반 분석이 사용된다. 본 발명의 다른 구현예에서, 효소-연결 렉틴-결합 분석

(enzyme-linked lectin-binding assay, ELLBA) 또는 자기 효소-연결 렉틴 분석(or magnetic enzyme-linked lectin assay, MELLA), 바람직하게는 ELLBA가 사용된다.

- [0065] 본 발명은 또한 본 명세서에 기재된 바와 같이 상기 바이오마커 단백질의 글리칸 구조에 결합할 수 있는 결합제를 포함하는 키트에 관한 것이다. 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 결합제는 렉틴일 수 있다. 본 발명의 보다 구체적인 구현예에 있어서, 본 명세서에 기술되고 제공되는 방법에서 사용되는 상기 결합제는 본 명세서에 기술된 바와 같이 바이오마커 당 단백질의 글리칸 구조에 결합할 수 있고, 등나무 렉틴(WFA/WFL)이 상기 글리칸 구조에 결합하는 친화도의 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100%의 친화도로 등나무 렉틴(WFA/WFL)과 동일한 글리칸 구조에 (특이적으로) 결합하는 결합제일 수 있다. 본 발명의 더욱 구체적인 구현예에 있어서, 상기 결합제는 예를 들면, WFA/WFL, L-셀렉틴, P-셀렉틴, E-셀렉틴, AAL, MAA, GNL, PSL, PHA-E, 바람직하게는 WFA/WFL일 수 있다. 일부 경우에, 이러한 결합제 중 2종 이상을 조합함으로써 진단 가능성을 높일 수 있다. 따라서, 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 명세서에 기재되고 제공되는 키트는 이러한 결합제 중 2종 이상을 포함한다. 이러한 맥락에서, 본 발명의 구체적인 구현예에 있어서, 상기 키트에 포함되는 이러한 결합제 중 둘 또는 적어도 두 개는 렉틴이다. 이러한 맥락의 보다 구체적인 구현예에서, 상기 키트에 포함되는 이러한 2종 이상의 렉틴은 WFA/WFL 및 PHA-E이거나 이를 포함한다.
- [0066] 본 발명과 관련하여 설명되고 제공되는 키트는 또한 당업자가 쉽게 이해할 수 있는 추가적인 적합한 성분, 예를 들어 본 명세서에 설명된 적합한 분석(예: ELISA, 웨스턴 블롯, 렉틴-기반 분석, ELLBA, MELLA 또는 기타)을 사용하여 방법을 수행하는 데 필요한 효소 및 버퍼를 포함할 수 있다.
- [0067] 본 발명은 또한 다음 항목에 관한 것이다:
- [0068] 1. 대상체가 암에 걸릴 위험이 있거나 암을 앓게 되는지 여부를 진단하는 방법으로서,
- [0069] (1) 상기 대상체로부터 얻은 샘플을 접촉시키는 단계로서, 상기 샘플은 바이오마커 당단백질을 포함하고, 상기 바이오마커 당단백질의 글리칸 구조에 결합할 수 있는 결합제와 접촉시키는 단계,
- [0070] 여기서 상기 바이오마커 당단백질의 존재 또는 과발현은 상기 암의 위험 및/또는 존재를 나타내고, 및
- [0071] 여기서 상기 글리칸 구조는 상기 암의 위험이 없거나 상기 암을 앓고 있지 않은 대상체에서 발현되는 상기 바이오마커 당단백질의 글리칸 구조에서 벗어나며; 및
- [0072] (2) 상기 결합제가 상기 바이오마커 당단백질의 글리칸 구조에 결합하는지 여부를 결정하는 단계;를 포함하고,
- [0073] 여기서 대조군 샘플과 비교하여 상기 바이오마커 당단백질의 상기 글리칸 구조에 대한 상기 결합제의 더 낮거나 더 높은 결합은 상기 대상체가 암에 걸릴 위험이 있거나 암을 앓을 것임을 나타낸다.
- [0074] 2. 항목 1에 있어서, 상기 대상체는 인간인 방법.
- [0075] 3. 전술한 항목들 중 어느 하나에 있어서, 상기 암은 비뇨생식기암, 바람직하게는 전립선암(PCa)인 방법.
- [0076] 4. 전술한 항목들 중 어느 하나에 있어서, 상기 결합제는 렉틴, 항-글리칸 항체, 압타머, 또는 보론산 또는 이들의 유도체인 방법.
- [0077] 5. 전술한 항목들 중 어느 하나에 있어서, 상기 바이오마커 당단백질은 ZAG, PAP, PSA, TIMP-1, fPSA, tPSA, 오스테오펀틴(osteopontin) 및 스폰딘-2(spondin-2)로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.
- [0078] 6. 전술한 항목들 중 어느 하나에 있어서, 상기 결합제는 코어 푸코스(core fucose), 안테나 푸코스(antennary fucose), N-연결 올리고당을 함유하는 Fuc α 1-6GlcNAc-N-Asn, Fuc α 1-6/3GlcNAc, α-L-Fuc, Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc, Fuc α 1-2Gal, Fuc α 1-6GlcNAc, Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc, 분지형 N-연결 6당류(hexasaccharide), Man α 1-3Man, α-D-Man, (GlcNAc β 1-4, Gal β 1-4GlcNAc, GlcNAc α 1-4Gal β 1-4GlcNAc, (GlcNAc β 1-4, Neu5Ac (시알산), Gal β 1-3GalNAc-세린/트레오닌, Gal α 1-3GalNAc, Gal β 1-6Gal, Gal β 1-4GlcNAc, Gal β 1-3GalNAc, GalNAc α 1-3GalNAc, GalNAc α 1-3Gal, GalNAc α / β 1-3/4Gal, α-GalNAc, GalNAc β 1-4Gal, GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal, GalNAc α 1-2Gal, GalNAc α 1-3GalNAc, GalNAc β 1-3/4Gal, GalNAc-세린/트레오닌 (Tn 항원), Gal β 1-3GalNAc-세린/트레오닌 (T 항원), GalNAc β 1-4GlcNAc (LacdiNAc), α-2,3Neu5Ac (α 2-3 연결 시알산), α-2,6Neu5Ac (α 2-6 연결 시알산), α-2,8Neu5Ac (α 2-8 연결 시알산), 시알산 (α-2,3Neu5Ac, α-2,6Neu5Ac 또는 α-2,8Neu5Ac), Neu5Ac α 4/9-O-Ac-Neu5Ac, Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc/GlcNAc, Neu5Ac α 2-6Gal/GalNAc, N-연결 바이-안테나(bi-antennary), N-연결 트리/테트라-안테나(tri/tetra-antennary), 분지형 β 1-6GlcNAc, Gal

$\alpha$ 1-3(Fuc  $\alpha$  1-2)Gal  $\beta$ 1-3/4GlcNAc, Gal  $\beta$ 1-3(Fuc  $\alpha$ 1-4)GlcNAc, NeuAc  $\alpha$ 2-3Gal  $\beta$ 1-3(Fuc  $\alpha$ 1-4)GlcNAc, Fuc  $\alpha$ 1-2Gal  $\beta$ 1-3(Fuc  $\alpha$ 1-4)GlcNAc, Gal  $\beta$ 1-4(Fuc  $\alpha$ 1-3)GlcNAc, NeuAc  $\alpha$ 2-3Gal  $\beta$ 1-4(Fuc  $\alpha$ 1-3)GlcNAc, Fuc  $\alpha$ 1-2Gal  $\beta$ 1-4(Fuc  $\alpha$ 1-3)GlcNAc, 고 만노스(high mannose), 시알릴 루이스<sup>a</sup> (시알릴 Le<sup>a</sup>) 항원, 시알릴 루이스<sup>x</sup> (시알릴 Le<sup>x</sup>) 항원, 루이스<sup>x</sup> (Le<sup>x</sup>) 항원, 시알릴 Tn 항원, 시알릴 T 항원, 루이스<sup>y</sup> (Le<sup>y</sup>) 항원, 황산화 코어1 글리칸, Tn 항원, T 항원, 코어 2 글리칸, 루이스<sup>a</sup> (Le<sup>a</sup>) 항원, (GlcNAc $\beta$ 1-4)<sub>n</sub>,  $\beta$ -D-GlcNAc, GalNAc, Gal-GlcNAc, GlcNAc, Gal  $\alpha$ 1-3Gal, Gal  $\beta$ 1-3GalNAc,  $\alpha$ -Gal,  $\alpha$ -GalNAc, (GlcNAc)<sub>n</sub>, 또는 분지형 (LacNAc)<sub>n</sub> 중 하나 이상에 결합하는 방법.

- [0079] 7. 전술한 항목들 중 어느 하나에 있어서, 상기 결합체는 갈락토스의 3 또는 6 위치에  $\alpha$  또는  $\beta$ 로 연결된 N-아세틸갈락토사민으로 종결되거나 LacdiNAc 에피토프(GalNAc1-4GlcNAc)를 포함하는 글리칸 구조에 결합하는 방법.
- [0080] 8. 전술한 항목들 중 어느 하나에 있어서, 상기 결합체는 WFL이 글리칸 구조에 결합하는 친화도의 80% 이상의 친화도로 WFA/WFL과 동일한 글리칸 구조에 결합하는 것인 방법.
- [0081] 9. 전술한 항목들 중 어느 하나에 있어서, 상기 결합체는 WFL/WFA, L-셀렉틴, P-셀렉틴, E-셀렉틴, AAL, MAA, GNL, PSL 또는 PHA-E인 방법.
- [0082] 10. 전술한 항목들 중 어느 하나에 있어서, 상기 결합체는 WFL/WFA인 방법.
- [0083] 11. 전술한 항목들 중 어느 하나에 있어서, 렉틴-기반 분석이 사용되는 방법.
- [0084] 12. 항목 11에 있어서, 효소-연결 렉틴-결합 분석(ELLBA)이 사용되는 방법.
- [0085] 13. 전술한 항목들 중 어느 하나의 방법을 수행하기 위한 키트로서, 상기 바이오마커 단백질의 글리칸 구조에 결합할 수 있는 결합체를 포함하는 키트.
- [0086] 14. 항목 13에 있어서, 상기 결합체는 렉틴인 키트.
- [0087] 15. 항목 13 또는 항목 14에 있어서, 상기 렉틴은 WFA이거나, WFL/WFA가 글리칸 구조에 결합하는 친화도의 80% 이상의 친화도로 WFL/WFA와 동일한 글리칸 구조에 결합하는 결합체인 키트.
- [0088] 본 발명을 특징으로 하는 구현예들은 본 명세서에 기술되고, 실시예들에 예시되며, 청구항들에 반영되어 있다.
- [0089] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태인 "a", "an" 및 "the"는 문맥상 명백하게 달리 지시되지 않는 한 복수형을 포함한다는 점에 유의해야 한다. 따라서, 예를 들어, "시약"에 대한 언급에는 그러한 상이한 시약 중 하나 이상을 포함하고, "방법"에 대한 언급에는 본 명세서에 기술된 방법을 수정 또는 대체할 수 있는 당업자에게 공지된 동등한 단계 및 방법에 대한 언급을 포함한다.
- [0090] 달리 명시되지 않는 한, 일련의 요소들에 선행하는 "적어도"라는 용어는 일련의 요소 중 모든 요소를 지칭하는 것으로 이해되어야 한다. 당업자는 단지 일상적인 실험을 사용하여 본 명세서에 기술된 본 발명의 특정 구현예에 대한 많은 등가물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0091] 본 명세서에서 사용되는 용어 "및/또는"은 "및", "또는" 및 "해당 용어에 의해 연결된 요소들의 전부 또는 임의의 다른 조합"의 의미를 포함한다.
- [0092] 본 명세서에서 사용되는 "약" 또는 "대략"이라는 용어는 주어진 값 또는 범위의 20% 이내, 바람직하게는 10% 이내, 더욱 바람직하게는 5% 또는 2% 이내를 의미한다.
- [0093] 본 명세서 및 이어지는 청구범위 전체에서, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, "포함하다(comprise)"라는 단어 및 "포함하다(comprises)" 및 "포함하는(comprising)" 등의 변형은 언급된 정수 또는 단계 또는 정수 또는 단계의 그룹을 포함하지만 다른 정수 또는 단계 또는 정수 또는 단계의 그룹을 배제하지 않는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다. 본원에서 사용되는 용어 "포함하는"은 "함유하는(containing)" 또는 "포함하는(including)"이라는 용어로 대체될 수 있으며, 때로는 본원에서 사용되는 경우 "가지는(having)"이라는 용어로 대체될 수 있다.
- [0094] 본 문서에서 사용된 "구성하는(consisting of)"이라는 용어는 청구범위 요소에 명시되지 않은 모든 요소, 단계 또는 성분을 제외한다. 본원에서 사용된 "본질적으로 구성하는"이라는 용어는 청구항의 기본적인이고 새로운 특성

에 실질적으로 영향을 미치지 않는 재료나 단계를 제외하지 않는다.

[0095] 본원의 각 경우에 "포함하는", "본질적으로 구성하는" 및 "구성하는"이라는 용어는 다른 두 용어 중 하나로 대체될 수 있다.

[0096] 본 발명은 본 명세서에 설명된 특정 방법론, 프로토콜 및 시약 등에 제한되지 않고 다양할 수 있음을 이해해야 한다. 본 명세서에 사용된 용어는 단지 특정 구현예를 설명하기 위한 목적일 뿐이며, 청구범위에 의해서만 정의되는 본 발명의 범위를 제한하려는 의도가 아니다.

[0097] 본 명세서 본문 전반에 걸쳐 인용된 모든 출판물 및 특허(모든 특허, 특허 출원, 과학 간행물, 제조업체의 사양, 지침 등 포함)는 상위 또는 하위에 관계없이 그 전체 내용이 참조로 본 명세서에 포함된다. 본원의 어떠한 내용도 본 발명이 선행 발명으로 인해 그러한 개시에 선행할 자격이 없다는 것을 인정하는 것으로 해석되어서는 안된다. 참조로 포함된 자료가 본 명세서와 모순되거나 일치하지 않는 범위 내에서, 본 명세서는 그러한 자료를 대체한다.

[0098] 본 발명은 다음의 실시예에 의해 추가로 설명된다. 그러나, 여기에 설명된 실시예 및 특정 구현예는 본 발명을 그러한 특정 구현예에 한정하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0099] **실시예**

[0100] 본 명세서에 사용된 방법론은 잘 알려져 있으며, 예를 들어, Mislovicova et al., *Biointerfaces* (2012), 94: 163-169에도 게재되어 있다. 다클론 항-ZAG 항체를 ELISA 플레이트 웰의 바닥에 고정시켰다. 세척 단계 후, 표면을 (인간 혈청 알부민으로) 차단하고 이전에 최적화된 프로토콜을 사용하여 다시 세척하였다. 이어서 (다음 각 단계 후에 추가 세척 단계를 거쳐) (i) 희석된 인간 혈청 샘플, (ii) 비오틴화된 렉틴 및 (iii) 스트렙타비딘-과산화효소(홀스래디쉬로부터)를 플레이트에 첨가하여 샌드위치 구성(sandwich configuration)을 완료하였다. OPD/과산화수소 시스템을 사용하여 신호를 생성하고, 황산을 사용하여 반응을 중단한 후, 450 nm에서 신호를 판독하였다. 자성 비드를 사용하는 것이 고려될 수 있고 최소한 명확한 결과를 생성해야 하지만, ZAG는 PSA에 비해 훨씬 높은 농도로 혈액에 존재하여 자성 비드를 사용하여 ZAG를 사전 농축할 필요가 없으므로 자성 비드를 사용하지 않고 분석 포맷을 단순화하였다.

[0101] 이전에 보고된 바와 같이, 자유 버전의 RStudio에서 OriginPro® 소프트웨어 및 R을 사용하여, 개별 샘플(적어도 중복 측정)에서 렉틴 결합에 대한 반응을 각각 개별 마커(PSA 수준, ZAG 수준, 연령 및 개별 렉틴) 및 그 조합에 대한 ROC 곡선과 AUC 파라미터를 사용하여 평가하였다 (cf. Bertokova et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2021), 116156; Bertok et al., *Glycoconjugate Journal* (2020), 37: 703-711).

[0102] 실제 혈청 샘플은 슬로바키아의 대학 병원에서 수집되었다. 연구에서 혈청 샘플의 총 양은 n = 69이다. 두 가지 개별 실험이 수행되었다 (즉, CASE1: 양성 코호트(n = 18) 대 이미 치료 중인 PCa 코호트(n = 15)의 비교, 및 CASE2: BPH 코호트(n = 21) 대 조기 검출된 PCa 환자(n = 15)의 비교).

[0103] 결과는 ZAG의 글리코프로파일링이 초기 단계 PCa를 BPH로부터 구별하는 데 적용 가능하다는 것을 보여주었다 (CASE2). 초기 단계 PCa를 BPH로부터 구별(CASE2)하는 가장 좋은 렉틴은 0.892의 AUC를 갖는 WFL인 것으로 나타났다 (표 1)(여기에 사용된 WFL은 등나무(*Wisteria Floribunda*) 렉틴 (WFA/WFL)이다).

[0104] ZAG 글리코프로파일링을 사용하는 것의 구별 가능성을 더욱 향상시키기 위해 두 개의 렉틴을 결합하는 것이 가능했다. 어떤 경우에는 두 개의 렉틴을 사용하는 것이 PCa를 BPH로부터 구별(CASE2)하는 데 더 적합했으며, 두 개의 렉틴의 최상의 조합은 0.917의 AUC를 갖는 WFL+PHA-E였다 (표 1).

**표 1**

[0105] 개별 WFL 마커(첫 번째 행) 및 다른 마커와의 조합에 대한 매개변수(왼쪽 및 오른쪽 신뢰 구간이 있는 AUC 값), 특이도, 민감도 및 분석 정확도.

마커(들)	AUC	CI (좌)	CI (우)	특이도 (Specificity)	민감도 (Sensitivity)	정확도 (Accuracy)
WFL	0.892	0.768	0.994	0.857	0.933	0.902
WFL + AAL	0.908	0.784	1	0.857	1	0.940
WFL + MALII	0.914	0.809	0.990	0.810	0.933	0.882
WFL + SNA	0.895	0.762	0.994	0.857	0.933	0.902

WFL + PHAL	0.898	0.771	0.997	0.857	0.933	0.902
WFL + Esel	0.905	0.784	0.990	0.857	0.933	0.902
WFL + Psel	0.892	0.759	0.994	0.857	0.933	0.902
WFL + Lsel	0.905	0.790	0.990	0.857	0.933	0.902
WFL + WGA	0.898	0.765	0.994	0.905	0.867	0.883
WFL + RCAI	0.892	0.765	0.990	0.857	0.933	0.902
WFL + GNL	0.914	0.787	1	0.905	0.933	0.921
WFL + PHAE	0.917	0.806	1	0.857	0.933	0.902
WFL + ZAG	0.898	0.775	0.987	0.857	0.933	0.902
WFL + PSA	0.921	0.816	0.994	0.857	0.933	0.902
WFL + Age	0.927	0.829	0.990	0.905	0.867	0.883