

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-533599  
(P2004-533599A)

(43) 公表日 平成16年11月4日(2004.11.4)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	4 B O 6 3
GO 1 N 33/15	GO 1 N 33/15	Z
GO 1 N 33/50	GO 1 N 33/50	Z
GO 1 N 33/566	GO 1 N 33/566	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 165 頁) 最終頁に続く		

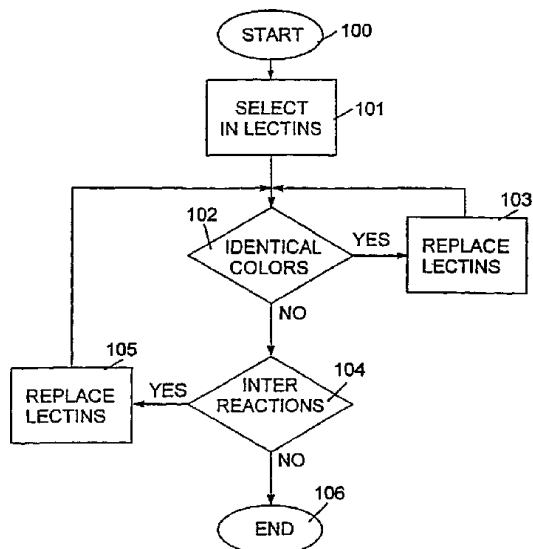
(21) 出願番号	特願2002-539810 (P2002-539810)	(71) 出願人	502396085 プロコグニア, リミテッド イスラエル国 77610 アシュドッド , ハボセン ストリート 3
(86) (22) 出願日	平成13年11月5日 (2001.11.5)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成15年5月2日 (2003.5.2)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/047064	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 国際公開番号	W02002/037106	(72) 発明者	マークマン, オファー イスラエル国 77610 アシュドッド , ハボセン ストリート 3
(87) 国際公開日	平成14年5月10日 (2002.5.10)		
(31) 優先権主張番号	60/246,006		
(32) 優先日	平成12年11月3日 (2000.11.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/246,009		
(32) 優先日	平成12年11月3日 (2000.11.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/245,887		
(32) 優先日	平成12年11月3日 (2000.11.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炭水化物ポリマーの比較分析のための方法

(57) 【要約】

炭水化物ポリマーに結合する少なくとも2つの結合因子を同定することによって、炭水化物ポリマーを特徴付けるための方法が開示される。結合は、好ましくは、炭水化物ポリマーと、基質上の前決定された位置で付着される複数の第1の糖類結合因子を含む基質を接触させることによって、決定される。炭水化物ポリマーは、第1の糖類結合因子と炭水化物ポリマーとの間で第1の複合体を形成させる条件下で、基質と接触することが可能となる。第2の糖類結合因子（好ましくは標識を含む）はまた、第2の結合因子と第1の複合体との間で第2の複合体を形成させる条件下で、炭水化物ポリマーに接触する。第1の結合因子と第2の結合因子の同定は、多糖類の特徴付けを可能にする。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

第 1 の糖タンパク質および第 2 の糖タンパク質の関連性を決定するための方法であって、以下：

第 1 の糖タンパク質の第 1 のフィンガープリントを提供する工程であって、該第 1 のフィンガープリントが、少なくとも、該第 1 の糖タンパク質についての第 1 の糖類結合因子、および第 2 の糖類結合因子に関する結合情報を含む、工程；

第 2 の糖タンパク質の第 2 のフィンガープリントを提供する工程であって、該第 2 のフィンガープリントが、少なくとも、該第 2 の糖タンパク質についての該第 1 の糖類結合因子および該第 2 の糖類結合因子に関する結合情報を含む、工程；

該第 1 のフィンガープリントおよび該第 2 のフィンガープリントを比較する工程であって、該比較する工程が、該第 1 の糖タンパク質および該第 2 の糖タンパク質が該第 1 の糖類結合因子に結合するか否か、ならびに、該第 1 の糖タンパク質および該第 2 の糖タンパク質が、該第 2 の糖類結合因子に結合するか否かを決定する工程を包含する、工程、  
これによって、該第 1 の糖タンパク質および該第 2 の糖タンパク質の関連性を決定する工程、  
を包含する、方法。

10

## 【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法であって、前記第 1 のフィンガープリントが、以下：

第 1 の炭水化物ポリマーを含む第 1 の糖タンパク質を提供する工程、

該第 1 の炭水化物ポリマーと前記第 1 の糖類結合因子を接触させる工程；

該第 1 の炭水化物ポリマーが、該第 1 の糖類結合因子に結合するか否かを決定する工程、

該炭水化物ポリマーと前記第 2 の糖類結合因子を接触させる工程であって、該第 2 の糖類結合因子が検出可能な標識を含む、工程；および

該第 1 の炭水化物ポリマーが、該第 2 の糖類結合因子に結合するか否かを決定する工程、  
これによって、該第 1 の糖タンパク質のフィンガープリントを生成する工程、  
を包含する方法によって同定される、方法。

20

## 【請求項 3】

請求項 2 に記載の方法であって、前記第 2 のフィンガープリントが、以下：

第 2 の炭水化物ポリマーを含む第 2 の糖タンパク質を提供する工程、

前記炭水化物ポリマーと前記第 1 の糖類結合因子を接触させる工程；

該第 2 の炭水化物ポリマーが前記糖類結合因子と結合するか否かを決定する工程；

該第 2 の炭水化物ポリマーと前記第 2 の糖類結合因子を接触させる工程であって、該第 2 の糖類結合因子が、検出可能な標識を含む、工程；および

該炭水化物ポリマーが、該第 2 の糖類結合因子に結合するか否かを決定する工程、  
これによって、該第 2 の糖タンパク質のフィンガープリントを生成する工程、を包含する  
方法によって同定される、方法。

30

## 【請求項 4】

請求項 2 に記載の方法であって、前記第 1 の炭水化物ポリマーと、少なくとも 5 つの糖類結合因子を接触させる工程、および前記炭水化物ポリマーが、該少なくとも 5 つの糖類結合因子の各々に結合するか否かを決定する工程を、さらに包含する、工程。

40

## 【請求項 5】

請求項 2 に記載の方法であって、前記第 1 の糖類結合因子および前記第 2 の糖類結合因子の結合が、以下：

a) 表面上の前決定された位置に付着する、少なくとも 1 つの第 1 の糖類結合因子を含む、該表面を提供する工程；

b) 該表面を、該第 1 の糖類結合因子と炭水化物ポリマーの間での第 1 の複合体の形成を可能にする条件下で、該炭水化物ポリマーと接触させる工程；

c) 該表面を、該第 1 の複合体と第 2 の糖類結合因子の間での第 2 の複合体の形成を可能にする条件下で、少なくとも 1 つの該第 2 の糖類結合因子と接触させる工程；および

50

d) 該第 2 の複合体において、該第 1 の糖類結合因子および該第 2 の糖類結合因子を同定する工程、  
によって決定される、方法。

【請求項 6】

請求項 2 に記載の方法であって、前記第 2 の糖類結合因子が、さらに、検出可能な標識を含み、そして、該第 2 の糖類結合因子が、該標識を検出することによって同定され、そして、前記第 1 の糖類結合因子が、基質上の該検出された標識の位置を決定することによって同定される、方法。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の方法であって、前記検出可能な標識が、色素生産性標識、放射標識、蛍光標識およびビオチン化標識からなる群から選択される、方法。 10

【請求項 8】

請求項 6 に記載の方法であって、前記表面が、該表面上に付着された、少なくとも 5 つの糖類結合因子を含む、方法。

【請求項 9】

請求項 6 に記載の方法であって、前記表面が、少なくとも 5 つの第 2 の糖類結合因子と接触される、方法。

【請求項 10】

請求項 6 に記載の方法であって、前記表面が、少なくとも 5 つの第 2 の糖類結合因子と接触される、方法。 20

【請求項 11】

請求項 6 に記載の方法であって、前記第 1 の糖類結合因子が、レクチン、糖類切断酵素、および糖類に対する抗体からなる群から選択される、方法。

【請求項 12】

請求項 6 に記載の方法であって、前記第 2 の糖類結合因子が、レクチン、多糖類切断酵素、または多糖類修飾酵素および糖類に対する抗体からなる群から選択される、方法。

【請求項 13】

請求項 6 に記載の方法であって、前記炭水化物ポリマーが、糖類切断因子によって消化された後に提供される、方法。

【請求項 14】

請求項 6 に記載の方法であって、前記炭水化物ポリマーが、前記糖類と前記第 2 の糖類結合因子を接触させる前に、糖類切断因子によって消化される、方法。 30

【請求項 15】

請求項 1 に記載の方法であって、前記第 1 のフィンガープリントおよび前記第 2 のフィンガープリントが、少なくとも 5 つの糖類結合因子に関する情報を含む、方法。

【請求項 16】

請求項 1 に記載の方法であって、試験糖タンパク質が生物学的流体中に存在する、方法。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の方法であって、前記生物学的流体が、血液、血清、尿、唾液、乳、導管流体、涙、および精液からなる群から選択される、方法。 40

【請求項 18】

糖タンパク質を同定するための方法であって、以下：

試験糖タンパク質の第 1 のフィンガープリントを提供する工程であって、該第 1 のフィンガープリントが、第 1 の糖タンパク質についての、少なくとも、第 1 の糖類結合因子、および第 2 の糖類結合因子に関する結合情報を含む、工程；

該第 1 のフィンガープリントと、少なくとも 1 つの参照フィンガープリントを比較する工程であって、該参照糖タンパク質フィンガープリントが、少なくとも 1 つの参照糖タンパク質についての、少なくとも、該第 1 の糖類結合因子、および該第 2 の結合因子に関する結合情報を含む、工程、

これによって、該試験糖タンパク質を同定する工程、 50

を包含する、方法。

【請求項 19】

請求項 18 に記載の方法であって、前記第 1 のフィンガープリントおよび前記参照フィンガープリントが、少なくとも 5 つの糖類結合因子に関する情報を包含する、方法。

【請求項 20】

請求項 18 に記載の方法であって、前記第 1 のフィンガープリントが、以下：  
第 1 の炭水化物ポリマーを含む、第 1 の糖タンパク質を提供する工程、  
該第 1 の炭水化物ポリマーと前記第 1 の糖類結合因子を接触させる工程；  
該第 1 の炭水化物ポリマーが該第 1 の糖類結合因子に結合するか否かを決定する工程；  
前記炭水化物ポリマーと前記第 2 の糖類結合因子を接触させる工程であって、該第 2 の糖  
類結合因子が、検出可能な標識を含む、工程；および  
該第 1 の炭水化物ポリマーが、該第 2 の糖類結合因子に結合するか否かを決定する工程、  
これによって、該第 1 の糖タンパク質のフィンガープリントを生成する、工程、  
を包含する方法によって同定される、方法。

【請求項 21】

請求項 18 に記載の方法であって、前記参照フィンガープリントが、以下：  
第 2 の炭水化物ポリマーを含む、第 2 の糖タンパク質を提供する工程  
前記炭水化物ポリマーと前記第 1 の糖類結合因子を接触させる工程；  
該第 2 の炭水化物ポリマーが、該糖類結合因子に結合するか否かを決定する工程；  
該第 2 の炭水化物ポリマーと前記第 2 の糖類結合因子を接触させる工程であって、該第 2  
の糖類結合因子が、検出可能な標識を含む、工程；および  
該炭水化物ポリマーが、該第 2 の糖類結合因子に結合するか否かを決定する工程、  
これによって、該第 2 の糖タンパク質のフィンガープリントを生成する工程  
を包含する方法によって同定される、方法。

【請求項 22】

請求項 21 に記載の方法であって、前記第 1 の炭水化物ポリマーと少なくとも 5 つの糖類結合因子を接触させる工程、および、該炭水化物ポリマーが、該少なくとも 5 つの糖類結合因子の各々に結合するか否かを決定する工程を、さらに包含する、方法。

【請求項 23】

請求項 22 に記載の方法であって、前記第 1 の糖類因子および前記第 2 の糖類因子の結合  
が、以下：  
a) 表面上の前決定された位置に付着される、少なくとも 1 つの第 1 の糖類結合因子を含む該表面を提供する工程；  
b) 該第 1 の糖類結合因子と炭水化物ポリマーとの間での第 1 の複合体の形成を可能とする条件下で、該表面と該炭水化物ポリマーとを接触させる、工程；  
c) 該第 1 の複合体と前記第 2 の糖類結合因子との間での第 2 の複合体の形成を可能とする条件下で、該表面と少なくとも 1 つの第 2 の糖類結合因子を接触させる工程；および  
d) 該第 2 の複合体における、該第 1 の糖類結合因子および該第 2 の糖類結合因子を同定する工程、  
によって決定される、方法。

【請求項 24】

請求項 23 に記載の方法であって、前記第 2 の糖類結合因子が検出可能な標識をさらに含み、そして、該第 2 の糖類結合因子が該標識を検出する工程によって同定され、そして、前記第 1 の糖類結合因子が基質上の該検出された標識の位置を決定する工程によって同定される、方法。

【請求項 25】

請求項 24 に記載の方法であって、前記検出可能な標識が、色素生産性標識、放射標識、蛍光標識およびビオチン化標識からなる群から選択される、方法。

【請求項 26】

請求項 23 に記載の方法であって、前記表面が、該表面上に付着「された、少なくとも 5

10

20

30

40

50

つの糖類結合因子を含む、方法。

【請求項 27】

請求項 23 に記載の方法であって、前記表面が、少なくとも 5 つの第 2 の糖類結合因子と接触する、方法。

【請求項 28】

請求項 26 に記載の方法であって、前記表面が、少なくとも 5 つの第 2 の糖類結合因子と接触する、方法。

【請求項 29】

請求項 23 に記載の方法であって、前記第 1 の糖類結合因子が、レクチン、糖類切断酵素、および糖類に対する抗体からなる群から選択される、方法。

10

【請求項 30】

請求項 23 に記載の方法であって、前記第 2 の糖類結合因子が、レクチン、多糖類切断酵素、または多糖類修飾酵素および糖類に対する抗体からなる群から選択される、方法。

【請求項 31】

請求項 23 に記載の方法であって、前記炭水化物ポリマーが、糖類切断因子によって消化された後に提供される、方法。

【請求項 32】

請求項 25 に記載の方法であって、前記炭水化物ポリマーが、前記糖類と前記第 2 の糖類結合因子を接触させる前に、糖類切断因子によって消化される、方法。

【請求項 33】

糖タンパク質を改変する方法であって、以下：

試験糖タンパク質の第 1 のフィンガープリントを提供する工程であって、該第 1 のフィンガープリントが、第 1 の糖タンパク質についての少なくとも第 1 の糖類結合因子、および第 2 の糖類結合因子に関する結合情報を含む、工程；

該第 1 のフィンガープリントと、少なくとも 1 つの参照フィンガープリントを比較する工程であって、該参照フィンガープリントが、少なくとも 1 つの参照糖タンパク質についての、少なくとも該第 1 の糖類結合因子、および該第 2 の糖類結合因子に関する結合情報を含む、工程；

該第 1 のフィンガープリントおよび該参照フィンガープリントにおける差異を同定する、工程；および

該第 1 のフィンガープリントおよび該参照フィンガープリントにおける差異を減少または増加させるために、試験糖タンパク質を変化させる工程であって、これによって、該糖タンパク質を改変する工程、

を包含する、方法。

20

30

【請求項 34】

請求項 33 に記載の方法であって、前記変させる工程が、前記第 1 のフィンガープリントと前記参照フィンガープリントとの間の差異を減少させる、方法。

【請求項 35】

請求項 33 に記載の方法であって、前記変化させる工程が、前記第 1 のフィンガープリントと前記参照フィンガープリントとの間の差異を増加させる、方法。

40

【請求項 36】

請求項 33 に記載の方法であって、前記変化させる工程が、該変化した試験糖タンパク質のフィンガープリントを生成する工程、および前記変化した試験糖タンパク質のフィンガープリントと前記参照フィンガープリントを比較する工程、を包含する、方法。

【請求項 37】

第 1 の多糖類および第 2 の多糖類の関係性を決定するための方法であって、以下：

第 1 の多糖類の第 1 のフィンガープリントを提供する工程であって、該第 1 のフィンガープリントが、該第 1 の多糖類についての、少なくとも第 1 の糖類結合因子、および第 2 の糖類結合因子に関する結合情報を含む、工程；

第 2 の多糖類の第 2 のフィンガープリントを提供する工程であって、該第 2 のフィンガー

50

プリントが、該第 2 の多糖類についての、少なくとも該第 1 の糖類結合因子、および該第 2 の糖類結合因子に関する結合情報を含む、工程；

該第 1 のフィンガープリントおよび該第 2 のフィンガープリントを比較する工程であって、該比較する工程が、該第 1 の多糖類および該第 2 の多糖類が該第 1 の糖類結合因子に結合するか否かを決定する工程、ならびに該第 1 の多糖類および該第 2 の多糖類が該第 2 の糖類結合因子に結合するか否かを決定する工程、これによって、該第 1 の多糖類および該第 2 の多糖類の関係性を決定する工程を包含する、工程、

を包含する、方法。

【請求項 38】

請求項 37 に記載の方法であって、前記第 1 の多糖類が、より大きい多糖類のフラグメントとして提供される、方法。 10

【請求項 39】

請求項 37 に記載の方法であって、前記第 2 の多糖類が、既知の生物的特性に関連する、方法。

【請求項 40】

請求項 37 に記載の方法であって、前記第 1 のフィンガープリントおよび前記第 2 のフィンガープリントが、少なくとも 5 つの糖類結合因子に関する情報を含む、方法。

【請求項 41】

請求項 37 に記載の方法であって、前記第 1 のフィンガープリントが、以下前記第 1 の多糖類を提供する工程、 20

該第 1 の多糖類と、前記第 1 の糖類結合因子を接触させる工程；

該第 1 の多糖類が、該第 1 の糖類結合因子に結合するか否かを決定する工程；

該第 1 の多糖類と、前記第 2 の糖類結合因子とを接触させる工程であって、該第 2 の糖類結合因子が、検出可能な標識を含む、工程；および

該第 1 の多糖類が、該第 2 の糖類結合因子に結合するか否かを決定する工程、

これによって、該第 1 の糖類のフィンガープリントを生成する工程、

を包含する方法によって同定される、方法。

【請求項 42】

請求項 41 に記載の方法であって、前記第 2 のフィンガープリントが、以下：

第 2 の炭水化物ポリマーを含む、第 2 の多糖類を提供する工程、 30

前記炭水化物ポリマーと前記第 1 の糖類結合因子を接触させる工程；

該第 2 の炭水化物ポリマーが、前記糖類結合因子に結合するか否かを決定する工程；

該第 2 の炭水化物ポリマーと前記第 2 の糖類結合因子を接触させる工程であって、該第 2 の糖類結合因子が、検出可能な標識を含む、工程；および

該炭水化物ポリマーが、該第 2 の糖類結合因子に結合するか否かを決定する工程、

これによって、該第 2 の多糖類のフィンガープリントを生成する、工程

を包含する方法によって同定される、方法。

【請求項 43】

請求項 41 に記載の方法であって、前記第 1 の炭水化物ポリマーと少なくとも 5 つの糖類結合因子を接触させる工程、および、該炭水化物ポリマーが、該少なくとも 5 つの糖類結合因子の各々に結合するか否かを決定する工程を、さらに包含する、方法。 40

【請求項 44】

請求項 41 に記載の方法であって、前記第 1 の糖類因子および前記第 2 の糖類因子の結合が、以下：

a) 表面上の前決定された位置に付着される、少なくとも 1 つの第 1 の糖類結合因子を含む該表面を提供する工程；

b) 該第 1 の糖類結合因子と炭水化物ポリマーとの間での第 1 の複合体の形成を可能とする条件下で、該表面と該炭水化物ポリマーとを接触させる工程；

c) 該第 1 の複合体と該第 2 の糖類結合因子との間での第 2 の複合体の形成を可能とする条件下で、該表面と少なくとも 1 つの第 2 の糖類結合因子とを接触させる、工程；および 50

d) 該第 2 の複合体における、該第 1 の糖類結合因子および該第 2 の糖類結合因子を同定する、工程、  
 によって決定される、方法。

【請求項 4 5】

請求項 4 4 に記載の方法であって、前記第 2 の糖類結合因子が検出可能な標識をさらに含み、そして、該第 2 の糖類結合因子が該標識を検出する工程によって同定され、そして、前記第 1 の糖類結合因子が基質上の該検出された標識の位置を決定する工程によって同定される、方法。

【請求項 4 6】

請求項 4 5 に記載の方法であって、前記検出可能な標識が、色素生産性標識、放射標識、  
 蛍光標識およびビオチン化標識からなる群から選択される、方法。 10

【請求項 4 7】

請求項 4 4 に記載の方法であって、前記表面が、該表面上に付着された、少なくとも 5 つの糖類結合因子を含む、方法。

【請求項 4 8】

請求項 4 4 に記載の方法であって、前記表面が、少なくとも 5 つの第 2 の糖類結合因子と接触する、方法。

【請求項 4 9】

請求項 4 4 に記載の方法であって、前記表面が、少なくとも 5 つの第 2 の糖類結合因子と接触する、方法。 20

【請求項 5 0】

請求項 4 4 に記載の方法であって、前記第 1 の糖類結合因子が、レクチン、多糖類切断酵素、および糖類に対する抗体からなる群から選択される、方法。

【請求項 5 1】

請求項 4 4 に記載の方法であって、前記第 2 の糖類結合因子が、レクチン、多糖類切断酵素、または多糖類修飾酵素および糖類に対する抗体からなる群から選択される、方法。

【請求項 5 2】

請求項 4 4 に記載の方法であって、前記第 1 の多糖類が、糖類切断因子によって消化された後に提供される、方法。

【請求項 5 3】

請求項 4 4 に記載の方法であって、前記第 1 の多糖類が、該第 1 の多糖類と前記第 2 の糖類結合因子とを接触させる前に、糖類切断因子によって消化される、方法。 30

【請求項 5 4】

多糖類を改変するための方法であって、以下：

試験多糖類の第 1 のフィンガープリントを提供する工程であって、該第 1 のフィンガープリントが、第 1 の多糖類についての、少なくとも第 1 の糖類結合因子および第 2 の糖類結合因子に関する結合情報を含む、工程；

該第 1 のフィンガープリントと少なくとも 1 つの参照フィンガープリントを比較する工程であって、該参照フィンガープリントが、少なくとも 1 つの参照多糖類についての、少なくとも該第 1 の糖類結合因子および該第 2 の糖類結合因子に関する結合情報を含む、工程 40

；  
 該第 1 のフィンガープリントおよび該参照フィンガープリントにおける差異を同定する工程；および

該第 1 のフィンガープリントおよび該参照フィンガープリントにおける差異を減少または増加させるために、該試験多糖類を変化させる工程であって、これによって、該多糖類を改変する、工程、  
 を包含する、方法。

【請求項 5 5】

請求項 5 4 に記載の方法であって、前記変化させる工程が、前記変化した試験多糖類のフィンガープリントを生成する工程、および、該変化した試験多糖類のフィンガープリント 50

と前記参照フィンガープリントを比較する工程を包含する、方法。

【請求項 5 6】

請求項 5 4 に記載の方法によって生成される、多糖類。

【請求項 5 7】

請求項 5 6 に記載の多糖類を含む、複数の多糖類。

【請求項 5 8】

請求項 5 7 に記載の複数の含む、基質。

【請求項 5 9】

被験体中の炭水化物ポリマーに関連する病理を診断する方法であって、以下：

該病理を有すると疑われる被験体から、炭水化物ポリマーの試験フィンガープリントを提供する工程；および

該試験フィンガープリントと参照フィンガープリントを比較する工程であって、該試験フィンガープリントが、病理症状が既知の参照サンプルにおける炭水化物ポリマー由来であって、該試験フィンガープリントと該参照フィンガープリントの間の一致が、該被験体および該参照サンプルが同じ病理状態を有することを示す、工程、

を包含する、方法。

【請求項 6 0】

請求項 5 9 に記載の方法であって、前記参照サンプルがデータベースを含む、方法。

【請求項 6 1】

請求項 5 9 に記載の方法であって、前記炭水化物ポリマーが、糖タンパク質、多糖類または糖脂質である、方法。

【請求項 6 2】

請求項 5 9 に記載の方法であって、前記被験体がヒトである、方法。

【請求項 6 3】

炭水化物ポリマーに関連する機能を同定する方法であって、以下：

試験サンプルから、炭水化物ポリマーの試験フィンガープリントを提供する、工程；および該試験フィンガープリントと参照フィンガープリントを比較する工程であって、該試験フィンガープリントが、機能的状態が既知である炭水化物ポリマー由来であって、該試験フィンガープリントと該参照フィンガープリントの間の一致が、被験体および参照サンプルが同じ機能的状態を有することを示す、工程、

を包含する、方法。

【請求項 6 4】

請求項 6 3 に記載の方法であって、前記炭水化物ポリマーが、糖タンパク質、多糖類、または糖脂質である、方法。

【請求項 6 5】

請求項 6 3 に記載の方法であって、前記炭水化物ポリマーが、糖タンパク質である、方法。

【請求項 6 6】

炭水化物ポリマーを同定する方法であって、以下：

炭水化物ポリマーの試験フィンガープリントを提供する工程；および

該試験フィンガープリントと参照フィンガープリントを比較する工程であって、該試験フィンガープリントが、本体が既知である参照炭水化物ポリマー由来であり、該試験フィンガープリントと該参照フィンガープリントの間の一致が、被験体および参照炭水化物サンプルが同一であることを示す、工程、

を包含する、方法。

【請求項 6 7】

炭水化物ポリマーの構造を調節する因子を同定する方法であって、以下：

該炭水化物ポリマーを含む生物学的サンプルを提供する工程；

該サンプルと試験因子を接触させる工程；

該サンプル中の 1 つ以上の炭水化物ポリマーの炭水化物ポリマーフィンガープリントを同

定する、工程；

該炭水化物ポリマーフィンガープリントと該因子と接触していないサンプル中の該1つ以上の炭水化物ポリマーの炭水化物ポリマーフィンガープリントを比較する、工程；

試験フィンガープリントおよび参照フィンガープリントでの該炭水化物フィンガープリントの性質における差異を、存在する場合、同定する工程、

これによって、炭水化物ポリマーの構造を調節する因子を同定する工程、

を包含する、方法。

【請求項68】

炭水化物ポリマーに関連する病態生理学のための候補治療因子を同定する方法であって、以下：

該炭水化物ポリマーを発現できる細胞を含む、試験生物学的サンプルを提供する工程；

該試験生物学的サンプルと試験因子を接触させる工程；

該生物学的サンプル中の1つ以上の炭水化物ポリマーの、炭水化物ポリマーフィンガープリントを同定する工程；

該炭水化物ポリマーフィンガープリントと、病態生理学的状態が既知である少なくとも1つの細胞を含む参照生物学的サンプルにおける、1つ以上の炭水化物ポリマーの炭水化物ポリマーフィンガープリントを比較する工程；および

該試験生物学的サンプルおよび該参照生物学的サンプルでの該炭水化物フィンガーの性質における差異を、存在する場合、同定する工程、

これによって、該炭水化物ポリマーに関連する病態生理学のための、治療因子を同定する、工程

を包含する、方法。

【請求項69】

被験体中の炭水化物ポリマーに関連する病態生理学の処置に適する、個別化された治療因子を同定する方法であって、以下：

該炭水化物ポリマーを含む生物学的サンプルを、該被験体から提供する工程；

該試験生物学的サンプルと試験因子を接触させる工程；

該生物学的サンプルにおいて、1つ以上の炭水化物ポリマーの炭水化物ポリマーフィンガープリントを同定する工程；

該炭水化物ポリマーフィンガープリントと、病態生理学的状態が既知である参照生物学的サンプルにおける、該1つ以上の炭水化物ポリマーの炭水化物ポリマーフィンガープリントを比較する工程；および

該試験生物学的サンプルおよび参照生物学的サンプルでの該炭水化物フィンガーの性質における差異を、存在する場合、同定する工程、

これによって、該被験体のための個別化された治療因子を同定する工程、

を包含する、方法。

【請求項70】

炭水化物ポリマーに関連する病態生理学の処置の効果を評価する方法であって、以下：

該炭水化物ポリマーを含む試験生物学的サンプルを、被験体から提供する工程；

該炭水化物ポリマーの炭水化物フィンガープリントを決定する工程；および

該ポリマーの炭水化物フィンガープリントと、参照炭水化物ポリマーフィンガープリントを比較する工程であって、該参照炭水化物ポリマーフィンガープリントが、病態生理学的状態が既知である炭水化物ポリマー由来である、工程；

これによって、該被験体における病態生理学の処置の効果を評価する工程、

を包含する、方法。

【請求項71】

被験体中の炭水化物ポリマー媒介経路に関連する、病態生理学を処置する方法であって、患者中の炭水化物ポリマーを調節する因子を該被験体に投与する工程を包含し、該調節が、

該患者中の炭水化物ポリマーフィンガープリントを変化させる、方法。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

## 【0001】

(発明の分野)

本発明は、一般に、多糖類を含む分子を分析するための方法に関し、そしてより特定すると、レクチンのような糖類結合因子を使用することに基づく多糖類の分析方法に関する。

## 【0002】

(発明の背景)

多糖類は、グリコシド結合を介してお互いに結合した単糖類(糖)単位を含むポリマーである。これらのポリマーは、単糖類サブユニットの直鎖状配列に関して記載され得る構造を有し、このことは多糖類の二次元構造として公知である。多糖類はまた、それらの成分の単糖類サブユニットにより空間的に形成される構造に関して記載され得る。

10

## 【0003】

多糖類を形成する一連の単糖類は、2つの異なる末端を有する。一方の末端はアルデヒド基を含み、そして還元性末端として公知である。もう一方の末端は非還元性末端として公知である。多糖類の鎖はまた、多糖類鎖に結合される糖単位がヘキソースの場合、C1、C2、C3、C4またはC6原子のうちの任意のものと結合され得る。さらに、ある所定の単糖類は2を超える異なる単糖類と結合され得る。その上、C1原子への結合は、配置または配置のどちらかであり得る。従って、炭水化物ポリマーの二次元構造および三次元構造の両者は、高度に複雑であり得る。

## 【0004】

多糖類の構造決定は、糖生物学の発展に基本的に重要である。糖生物学における研究は、細菌の細胞壁合成に影響する抗生物質の同定および特定、血液グリカンの同定および特定、ウイルス疾患および自己免疫疾患(例えば、インスリン依存性糖尿病、慢性関節リウマチおよび(例えば、癌で起こる)異常細胞増殖)に関係する増殖因子および細胞表面レセプター構造の同定および特定と同程度に多岐に渡る課題と関係する。

20

## 【0005】

多糖類はまた、コンタクトレンズ、人工皮膚およびプロテアーゼデバイス用の生物材料の開発において使用されている。さらに、多糖類は多くの非医療分野(例えば、製紙業)において使用される。さらに、無論、食料産業および薬品産業が莫大な量の様々な多糖類および少糖類を使用する。

## 【0006】

上記分野の全てにおいて、改良された糖類分析技術が必要である。糖類分析情報は、例えば、品質管理、研究における構造決定、および構造-機能分析を実施することに対して、有用である。

30

## 【0007】

多糖類の構造的な複雑さは、それらの分析の障害となっている。例えば、糖類は鋳型非依存的な機構にて合成されると考えられる。従って、構造情報の無い場合、研究者は、今日まで公知であるあらゆる糖類単位から構成単位が選択されることを想定しなければならない。さらに、これらの単位は、合成中に、例えば硫酸基の付加によって、改変され得る。

## 【0008】

第2に、糖類は、糖類に結合される糖単位がヘキソースである場合、あらゆる炭素部分(例えば、C1原子、C2原子、C3原子、C4原子、またはC6原子)で結合され得る。さらに、C1原子への結合は、配置または配置のどちらかであり得る。

40

## 【0009】

第3に、糖類は分岐し得、このことは、糖単位の判明した数および種類を有する、糖類の構造および可能性ある構造の数をさらに複雑にする。

## 【0010】

第4の困難は、糖単位がヒドロキシル基(エピマー)の位置によってのみ別のものと区別され得るように、多くの糖の間の構造における差異が微細であるという事実より提供される。

## 【0011】

50

そのような糖類結合因子の複数の使用は、基盤に固定されるにせよ、そして/または第2 (可溶性の)糖類結合因子として使用されるにせよ、単糖類の「フィンガープリント」を提供することにより、目的の炭水化物ポリマーを同定する。次いで、そのようなフィンガープリントは、その炭水化物ポリマーについてのさらなる情報を得るために分析され得る。残念ながら、炭水化物ポリマーのフィンガープリントについてのデータの特徴付け過程および解読過程は、例えばDNAのような、他の生物学的ポリマーについてよりもさらにずっと複雑である。特徴付けを目的として、DNAサンプルに対してDNAプローブを結合させることとは異なり、炭水化物ポリマーのフィンガープリントは、必ずしも炭水化物ポリマー自身の成分の直接的な表示でない。適切な条件下において、プローブがDNAを認識し、そして結合することは、かなり直接的な過程であるので、DNAプローブの結合は、DNAサンプル自身の配列について、比較的直接的な情報を提供する。従って、プローブの結合より得られる、DNA「フィンガープリント」は、サンプル中の実際のDNA配列についての直接的な情報を生み出し得る。 10

#### 【0012】

対照的に、炭水化物ポリマーへの薬剤の結合は、あまり直接的でありそうではない。これまでに記載されるように、炭水化物ポリマーは分岐し得るので、炭水化物ポリマーの二次元構造(配列)ですら、DNAの配列よりも複雑である。これらの分岐は明らかにポリマーの三次元構造に影響し、そしてそれ故に結合因子に対する認識部位の構造に影響する。さらに、結合因子による炭水化物ポリマー上の結合性エピトープの認識は、エピトープを囲む分子の部位の「近隣のもの」によって影響され得る。従って、目的の炭水化物ポリマーへの薬剤の結合についての、そのような「フィンガープリント」データの分析は、例えばDNAプローブの結合に対するデータよりも、明らかにより困難である。 20

#### 【0013】

この問題に対する有用な解決策があれば、フィンガープリントデータが炭水化物ポリマーを特徴付けるために分析されることが可能となる。そのような分析は、糖類結合因子を炭水化物ポリマーとインキュベートする従来記載された工程より得られる生データを、それ自身が情報を含むフィンガープリントへと変換する必要がある。フィンガープリントはまた、異なる組み合わせの実験条件にわたる比較のために、そして異なる型の糖類結合因子のために、標準化される必要がある。残念ながら、そのような解決策は現在では使用可能ではない。 30

#### 【0014】

これらの困難にもかかわらず、糖類の構造分析のための多くの方法が開発された。例えば、PCT出願第WO93/24503号は、還元性末端の単糖類をそのケト型またはアルデヒド型に変換し、次いで少糖鎖中の単糖類とその隣の単糖類との間のグリコシド結合をヒドラジンを使用して切断することにより、少糖鎖の還元性末端より単糖類単位が連続して外されるという方法を開示する。遊離した単糖類は少糖鎖から分離され、そしてクロマトグラフィ方法により同定される。この工程は、全ての単糖類が切断されるまで次いで繰り返される。

#### 【0015】

PCT出願第WO93/22678号は、未知の少糖鎖の基本構造についての仮説を立て、そして次いで多くの配列決定ツール(例えば、グリコシダーゼ)から最も多量の構造情報を得ると予測されるツールを選択することにより、未知の少糖鎖の配列決定を行う方法を開示する。この方法は、少糖鎖の構造に関して幾つかの基礎情報(通常は単糖鎖の組成)を必要とする。この方法はまた、配列決定用の試薬を用いた反応が高額で時間が掛かり、そして従ってこれらの費用を低下させる方法の必要性があるという事実を例示する。 40

#### 【0016】

PCT出願第WO93/22678号は、VLSIチップ上に固定化されたプローブ(例えば、オリゴデオキシヌクレオチド)のモノリシックアレイをプローブすることにより分子を検出する方法を開示する。この公報は、非常に多くのプローブが固定化された表面に結合され得ること、およびVLSIチップ上の論理的回路を使用する様々な方法により、 50

分析物とのそれらプローブの反応が検出されることを教示する。

【0017】

欧州特許出願第421,972号は、少糖類の1つの末端を標識すること、標識された少糖類をアリコートに分配すること、およびそれぞれのアリコートを異なる試薬混合物（例えば、グリコシダーゼ混合物）と処理すること、異なる反応混合物を溜めること、そして次いでクロマトグラフィー方法を使用して反応生成物を分析することによる、少糖類の配列決定の方法を開示する。この方法は、糖鎖がタンパク質に連結する部位でN結合型グリカンが共通の構造を有するようなN結合型グリカンに対してのみ有用である。O結合型グリカンはより多様であり、そしてこの方法は、基本構造により広い多様性を有する、O結合型グリカンのような少糖類に対しては未だ適応されていない。

10

【0018】

従って、多糖類に結合する薬剤を同定するための正確なハイスルーブットの方法を使用した、多糖類を特徴付けるための系および方法が必要とされる。

【0019】

（発明の要旨）

本発明は、所定の炭水化物ポリマーに結合する薬物を短時間で正確に同定する方法の発見の一部に基づく。また、本発明により、糖類結合因子に対する結合パターンに基づいた炭水化物ポリマーのフィンガープリントを作製する方法も提供される。

【0020】

1つの局面では、本発明は、第1炭水化物ポリマーおよび第2炭水化物ポリマー（例えば、第1糖タンパク質および第2糖タンパク質、または、第1多糖類および第2多糖類）の関連性を決定する方法を特徴とする。その方法は、第1炭水化物ポリマーの第1フィンガープリントを提供する工程を包含し、ここで第1フィンガープリントは、第1炭水化物ポリマーに関する、少なくとも第1糖類結合因子の結合情報、および第2糖類結合因子の結合情報を包含する。第2炭水化物ポリマーの第2フィンガープリントもまた提供される。第2フィンガープリントは、第2炭水化物ポリマーに関する、少なくとも第1糖類結合因子および第2糖類結合因子の結合情報を含む。

20

【0021】

第1フィンガープリントおよび第2フィンガープリントは、第1糖タンパク質および第2糖タンパク質が第1糖類結合因子に結合するかどうか、ならびに、第1糖タンパク質および第2糖タンパク質が第2糖類結合因子に結合するかどうかを決定することにより比較される。第1フィンガープリントと第2フィンガープリントとの間の類似性は、第1糖タンパク質および第2糖タンパク質の関連性を示す。

30

【0022】

さらなる局面において、本発明は、試験炭水化物ポリマーの第1フィンガープリントを提供することにより炭水化物ポリマー（例えば、糖タンパク質、多糖類、または糖脂質）を同定する方法を特徴とし、ここで、第1フィンガープリントは、第1炭水化物ポリマーに関する、少なくとも第1糖類結合因子の結合情報および第2糖類結合因子の結合情報を含む。第1フィンガープリントは少なくとも1つの参照フィンガープリントと比較され、ここで、参照炭水化物ポリマーのフィンガープリントは、少なくとも1つの参照炭水化物ポリマーに関する、少なくとも第1糖類結合因子および第2糖類結合因子の結合情報を含む。同様に、第1フィンガープリントと参照フィンガープリントとの間で類似の（例えば、同一な）フィンガープリントは、試験炭水化物ポリマーが参照炭水化物ポリマーに類似であること、例えば同一であることを示す。

40

【0023】

なおさらなる局面において、本発明は、試験炭水化物ポリマーの第1フィンガープリントを提供することにより、炭水化物ポリマー（例えば、糖タンパク質、多糖類、または糖脂質）を改変する方法を包含する。第1フィンガープリントは、第1炭水化物ポリマーに関する、少なくとも第1糖類結合因子の結合情報および少なくとも第2糖類結合因子の結合情報を含む。

50

## 【0024】

第1フィンガープリントは、少なくとも1つの参照フィンガープリントと比較される。参照フィンガープリントは、参照炭水化物ポリマーに関する、少なくとも第1糖類結合因子の結合情報および第2糖類結合因子の結合情報を包含し得る。第1フィンガープリントと参照フィンガープリントとの間の差異が同定される。試験炭水化物ポリマーは、次いで、そのフィンガープリントが所望される場合、参照炭水化物ポリマーのフィンガープリントに関して増加または減少されるように改変される。

## 【0025】

本発明において、炭水化物ポリマーを含む化合物（例えば、糖タンパク質）の合成方法もまた包含される。例えば、1つの実施形態において、本発明は、ポリペプチドを提供すること、および/またはポリペプチドに炭水化物ポリマーを結合させて、所望される改変糖タンパク質を作製することにより、糖タンパク質を作製する工程を包含する。

10

## 【0026】

さらなる局面において、本発明は、炭水化物ポリマーを特徴付ける方法を特徴とする。炭水化物ポリマーは、第1糖類結合因子と炭水化物ポリマーとの間で第1複合体の形成を可能とする条件下において、表面上の予め決定された位置に結合した少なくとも1つの第1糖類結合因子を含む表面と接触される。その表面は次いで、第1複合体と第2糖類結合因子との間で第2複合体の形成を可能とする条件下において、少なくとも1つの第2糖類結合因子と接触される。第1糖類結合因子および第2糖類結合因子はついで同定され、それによって炭水化物ポリマーを特徴付ける。

20

## 【0027】

本発明により、炭水化物ポリマーを第1糖類結合因子と接触させる工程、この炭水化物ポリマーが糖類結合因子に結合するかどうかを決定する工程、炭水化物ポリマーを第2糖類結合因子と接触させる工程、および炭水化物ポリマーが第2糖類結合性試薬に結合するかどうかを決定する工程により、炭水化物ポリマーのフィンガープリントを製作する方法が提供される。第1糖類結合因子および第2糖類結合因子の同定は、炭水化物ポリマーのフィンガープリントを製作するために使用される。

## 【0028】

好ましい実施形態において、本明細書に記載される方法にて使用されるフィンガープリントは、炭水化物ポリマーを提供する工程、および炭水化物ポリマーを第1糖類結合因子と接触させる工程を包含する方法により同定される。次いで、炭水化物ポリマーが第1糖類結合因子と結合するか否かに関して決定がなされる。

30

## 【0029】

炭水化物ポリマーはまた、好ましくは検出可能な標識を含む第2糖類結合因子と接触される。炭水化物ポリマーが第2糖類結合因子と結合するか否かについてもまた、決定がなされる。第1糖類結合因子および第2糖類結合因子の結合に関して集められた情報は、炭水化物ポリマーのフィンガープリントを製作するために編集される。

## 【0030】

より好ましい実施形態において、第1および第2の糖類結合因子の結合は、表面上の予め決定された位置に結合された、少なくとも1つの第1糖類結合因子を含む表面を提供すること、および第1糖類結合因子と炭水化物ポリマーとの間で第1複合体の形成を可能とする条件下において、表面を炭水化物ポリマーと接触させることにより、決定される。表面はまた、第1複合体と第2糖類結合因子との間で第2複合体の形成を可能とする条件下において、少なくとも1つの第2糖類結合因子と接触される。表面上の特定の位置での第2結合因子の同定は、表面のその位置に結合された、対応する第1糖類結合因子の同定もまた可能とする。

40

## 【0031】

別の局面において、本発明は、（炭水化物ポリマー）を含む生物学的サンプルを試験薬剤と接触させること、およびサンプル中の1つ以上の炭水化物ポリマーの1つの炭水化物ポリマーフィンガープリントを同定することにより、炭水化物ポリマーの構造を調節する薬

50

剤を同定する方法が提供される。炭水化物ポリマーフィンガープリントは、薬剤と接触されない試料中の炭水化物ポリマーの1つの炭水化物ポリマーフィンガープリントと比較される。炭水化物ポリマープロフィールにおける差異は、存在する場合には、試験フィンガープリントおよび参照フィンガープリントにおいて同定される。フィンガープリントプロフィールにおける差異は、試験薬剤が炭水化物ポリマーの構造を調節することを示す。

**【0032】**

本発明によりまた、炭水化物ポリマーに関連した病態生理学のための候補治療剤を同定する方法を特徴とする。その方法は、炭水化物ポリマーを含む試験生物学的サンプルを提供する工程、および試験の生物学的サンプルを試験薬剤と接触させる工程を包含する。生物学的サンプル中の1つ以上の炭水化物ポリマーの炭水化物ポリマーフィンガープリントは、同定され、そして病態生理学的機能が既知である参照生物学的サンプル中の1つ以上の炭水化物ポリマーからの1つの炭水化物ポリマープロフィールフィンガープリントと比較される。炭水化物フィンガープリントにおける差異は、存在する場合は、試料生物学的サンプルおよび参照の生物学的サンプル中にて同定され、それにより炭水化物ポリマーと関連した病態生理学についての治療剤を同定する。

10

**【0033】**

さらなる局面において、本発明は、被験体より炭水化物ポリマーを含む生物学的サンプルを提供すること、および試験生物学的サンプルを試験薬剤と接触させることにより、被験体において炭水化物ポリマーに関連する病態生理を処置するためにふさわしい、個別に処方した治療剤を同定する方法を特徴とする。生物学的サンプルにおける1つ以上の炭水化物ポリマーの炭水化物ポリマーフィンガープリントは同定され、病態生理学的な状態が既知である参照生物学的サンプル中の1つ以上の炭水化物ポリマーの炭水化物ポリマーフィンガープリントに対して比較される。そして試験生物学的サンプル中に炭水化物フィンガープリントのプロフィールおよび参照の生物学的サンプルにおける差異を、存在する場合には同定する。

20

**【0034】**

また本発明中に、炭水化物ポリマーに関連した病態生理の処置の有効性を評価する方法がある。その方法は、被験体より炭水化物ポリマーを含む試験生物学的サンプルを提供する工程、および炭水化物ポリマーの炭水化物フィンガープリントを決定する工程を包含する。炭水化物フィンガープリントは、参照炭水化物フィンガープリント（ここで参照炭水化物ポリマーフィンガープリントは、病態生理学的状況が既知である炭水化物ポリマーに由来する）と比較され、それにより被験体において病態生理の処置の有効性が評価される。

30

**【0035】**

また本発明中に、被験体中の炭水化物ポリマー媒介性の経路と関連した病態生理学の処置の方法があり、この方法は、患者中の炭水化物ポリマーを調節する薬剤を被験体に投与する工程を包含し、ここで、その調節は患者中の炭水化物フィンガープリントを変更する。患者は好ましくはヒトの患者である。

**【0036】**

また本発明中に、炭水化物ポリマーの構造を調節する薬剤を同定する方法がある。その方法は、炭水化物ポリマーを含む生物学的サンプルを提供する工程、および試験薬剤とサンプルとを接触させる工程を包含する。サンプル中の1つ以上の炭水化物ポリマーの炭水化物ポリマーフィンガープリントが同定され、薬剤と接触されないサンプル中の1つ以上の炭水化物ポリマーの炭水化物ポリマーフィンガープリントに対して比較される。炭水化物フィンガープリントプロフィールにおける差異は、存在する場合は、試験フィンガープリントおよび参照フィンガープリントにおいて同定され、これによって炭水化物ポリマーの構造を調節する薬剤を同定する。

40

**【0037】**

本発明はまた、炭水化物ポリマーを発現し得る細胞を含む試験生物学的サンプルを提供すること；生物学的サンプルを試験薬剤と接触させること；生物学的サンプル中の1つ以上

50

の炭水化物ポリマーの炭水化物ポリマーフィンガープリントを同定すること；この炭水化物ポリマーフィンガープリントを、病態生理学的状態が既知の少なくとも1つの細胞を含む参照生物学的サンプル中の1つ以上の炭水化物ポリマーの炭水化物ポリマーフィンガープリントと比較すること；そして試験生物学的サンプルおよび参照生物学的サンプル中の炭水化物フィンガープリントプロフィールにおける差異（存在する場合）を同定し、それにより、炭水化物ポリマーに関連する病態生理のための治療剤を同定することによって、炭水化物ポリマーに関連した病態生理に対する候補治療剤の候補を同定する方法を提供する。

**【0038】**

本明細書においてまた、被験体中の炭水化物ポリマーに関連する病態生理を処置するために適した個々に処方した治療剤を同定する方法が提供される。その方法は、被験体より炭水化物ポリマーを含む生物学的サンプルを提供する工程；試験生物学的サンプルを試験薬剤と接触させる工程；生物学的サンプル中の1つ以上の炭水化物ポリマーの1つの炭水化物ポリマーフィンガープリントを同定する工程；この炭水化物ポリマーフィンガープリントを、病態生理学的な状態が既知である参照の生物学的サンプル中の1つ以上の炭水化物ポリマーの炭水化物の炭水化物ポリマーフィンガープリントと比較する工程；そして存在する場合には試験生物学的サンプルおよび参照生物学的サンプル中の炭水化物フィンガープリントプロフィールにおける差異を同定し、それによって被験体のための個別に処方した治療剤を同定する工程、を包含する。

10

**【0039】**

さらなる局面において、本発明は炭水化物ポリマーに関連する病態生理の処置の有効性を評価する方法を包含する。その方法は、被験体より炭水化物ポリマーを含む試験生物学的サンプルを提供する工程；炭水化物ポリマーの炭水化物フィンガープリントを決定する工程；そしてこのポリマーの炭水化物フィンガープリントを参照炭水化物フィンガープリントと比較し（ここで、参照炭水化物ポリマーフィンガープリントは、病態生理状態が既知である炭水化物ポリマーに由来する）、それにより、被験体における病態生理の処置の有効性を評価する工程を包含する。

20

**【0040】**

さらなる局面において、本発明は、患者における炭水化物ポリマーの活性またはレベルを調節する薬剤を被験体に投与することにより、被験体における炭水化物ポリマー媒介性の経路に関連する病態生理の処置の方法を包含する。ここで、この調節は、患者における炭水化物ポリマーフィンガープリントを変更する。

30

**【0041】**

好ましい実施形態において、本明細書に記載された方法にて同定されまたは利用されるフィンガープリントの少なくとも1つは、複数のアドレス（各々のアドレスは糖類結合因子の炭水化物ポリマーに対する結合に関係する多くの数値を含む）を特徴とし、そしてフィンガープリントは以下の工程を包含する方法によって分析される：（a）フィンガープリントの第1アドレスを少なくとも他のアドレスと結びつけて、マップを作成する工程；（b）第1アドレスが少なくとも1つの他のアドレスと一致する場合、マップが内部的に一致すると決定する工程；（c）工程（a）および工程（b）を少なくとも1度繰り返して、少なくとももう1つのマップを形成する工程；（d）上記マップを少なくとももう1つのマップと比較して、これらのマップが相互に一致するかどうかを決定する工程；ならびに（e）任意の相互に一致しないマップを除外する工程。好ましい実施形態において、その方法はさらに次の工程を包含する：（f）第2アッセイより実験データを受取る工程；（g）実験データを変換して第2フィンガープリントを形成する工程；（h）第2フィンガープリントを用いて工程（a）および工程（b）を実施して、第2フィンガープリントマップを形成する工程；（i）上記マップを第2フィンガープリントマップと比較して、これらのマップが相互に一致するかどうかを決定する工程；ならびに（j）任意の相互に一致しないマップを排除する工程。

40

**【0042】**

50

所望される場合、工程 ( g ) は、( i ) 実験データの形式を分析する工程；( i i ) 形式が数値の形式ではない場合、実験データを少なくとも1つの数値に変換する工程；ならびに( i i i ) 少なくとも1つの数値より第2フィンガープリントを作出する工程、をさらに包含し得る。

【 0 0 4 3 】

いくつかの実施形態において、第2アッセイからの実験データは、既知の機能、既知の配列またはそれらの組み合わせのうちの少なくとも1つを有する既知の炭水化物ポリマーに対して、糖類結合因子を接触させることにより得られる。

【 0 0 4 4 】

いくつかの実施形態において、第2アッセイは炭水化物ポリマーに関して同一な実験条件下で実施される。 10

【 0 0 4 5 】

いくつかの実施形態において、第2アッセイは、炭水化物ポリマーに対する特定の炭水化物ポリマー物質（糖類結合因子の炭水化物ポリマーへの結合に関して同一である特定の炭水化物ポリマー物質）について、実施される。

【 0 0 4 6 】

いくつかの実施形態において、比較する工程は、外部データをサンプルの炭水化物ポリマーフィンガープリントに組み込む工程を包含し、ここでフィンガープリントは複数のアドレスを特徴とし、各々のアドレスは糖類結合因子の、サンプルの炭水化物ポリマーへの結合に関係する数値であり、その方法は以下の工程を包含する：( a ) 外部データを変換して、外部フィンガープリントを形成する工程であって、この外部データは、炭水化物ポリマーに対して行われた少なくとも1つのアッセイを含む、工程；( b ) 外部フィンガープリントを、サンプルの炭水化物ポリマーに対するフィンガープリントと比較する工程；ならびに( c ) 外部のフィンガープリントが、サンプルの炭水化物ポリマーのフィンガープリントと一致するかどうかを決定する工程。 20

【 0 0 4 7 】

いくつかの実施形態において、工程 ( a ) はさらに以下の工程を包含する：( i ) 外部データの形式を分析する工程；( i i ) 形式が数値形式でない場合、外部データを少なくとも1つの数値に変換する工程；および( i i i ) 少なくとも1つの数値から外部のフィンガープリントを作出する工程。 30

【 0 0 4 8 】

あるいは、形式が数値の形式でない場合、外部フィンガープリントは外部データより直接作出され得る。

【 0 0 4 9 】

いくつかの実施形態において、その方法は、さらに以下の工程により、炭水化物ポリマーを特徴付けるためのマップを製作する工程を包含する：( a ) 炭水化物ポリマーをフィンガープリントを用いて特徴付ける工程であって、そのフィンガープリントは多くのアドレスを特徴とし、各々のアドレスは炭水化物ポリマーについて実施された実験アッセイからのアッセイデータより得られる数値を含む、工程；( b ) フィンガープリントに従い、多くのマップを製作する工程；( c ) 炭水化物ポリマーを特徴付けるために追加データを獲得する工程；( d ) 各々のマップが追加データに一致するかどうかを決定する工程；および( e ) マップが追加データに一致しない場合、マップを棄却する工程。好ましくは、各々のマップは複数の要素を含み、各々の要素は、炭水化物ポリマーの少なくとも一部分の機能、炭水化物ポリマーの少なくとも一部分の配列の炭水化物ポリマーの少なくとも一部分の構造、およびそれらの組み合わせ、からなる群より選択される、炭水化物ポリマーの少なくとも1つの機能を含む。 40

【 0 0 5 0 】

いくつかの実施形態において、炭水化物ポリマーは複数の単糖類を有する配列の特徴とし、マップがその配列の少なくとも一部を特徴とするような配列の、少なくとも一部分に対する配列情報に従って、工程 ( b ) が実施される。 50

## 【0051】

いくつかの実施形態において、炭水化物ポリマーの少なくとも1つの機能性エピトープに従って工程(b)が実施され、少なくとも1つの機能性エピトープは、マップが機能性エピトープを特徴とするような機能を有する炭水化物ポリマーの少なくとも一部分である。

## 【0052】

いくつかの実施形態において、炭水化物ポリマーは複数の単糖類を有する配列の特徴とし、そして、マップが機能性エピトープおよび少なくとも配列の一部の両方を特徴とするような、配列の少なくとも一部の配列情報に従って工程(b)がまた実施される。

## 【0053】

好ましくは、工程(c)は、炭水化物ポリマー上で実行される少なくとも1つのさらなる実験的アッセイからのアッセイデータを用いて実行される。 10

## 【0054】

いくつかの実施形態において、少なくとも1つのアッセイが、炭水化物ポリマーへの糖類結合因子の結合を決定するためであり、その結果、このアッセイデータは、炭水化物ポリマーへの糖類結合因子の結合が生じるか否かの検出から得られる。

## 【0055】

いくつかの実施形態において、この実験的アッセイは、炭水化物ポリマーに対して特異的な炭水化物ポリマー材料において実行され、そして少なくとも1つのさらなる異なるアッセイがまた、フィンガープリントに対するさらなるデータの直接的な比較のために工程(c)に対して特異的な炭水化物ポリマー材料において実行される。 20

## 【0056】

好ましい実施形態において、この炭水化物ポリマーは、複数の単糖類を有する配列を特徴とし、そしてここで工程(c)は、既知の機能、既知の配列、またはそれらの組み合わせの少なくとも1つを有する既知の炭水化物ポリマーにおいて実行される。

## 【0057】

好ましい実施形態において、この実験的なアッセイは、炭水化物ポリマーに対して特異的な炭水化物ポリマー材料において実行され、そしてこの実験的なアッセイはまた、フィンガープリントに対するさらなるデータの直接的な比較のために工程(c)について既知の炭水化物ポリマー上において実行される。いくつかの実施形態において、このマップは、炭水化物ポリマーの全体的な特徴に関連する。 30

## 【0058】

好ましくは、同定する工程はさらに、炭水化物ポリマーについてのマップを構築する工程を包含し、この方法は以下の工程を包含する：(a)炭水化物ポリマーにおいて実行される少なくとも1つの実験的アッセイから得られるアッセイデータに従って、炭水化物ポリマーを特徴付ける工程；(b)アッセイデータを、各アドレスがアッセイデータの値を特徴付ける複数のアドレスに分解する工程；(c)各アドレスを少なくとも1つの他のアドレスと結びつけることによって、複数のマップを形成する工程；および(d)炭水化物ポリマーの少なくとも1部の機能、炭水化物ポリマーの少なくとも1部の配列、炭水化物ポリマーの少なくとも1つの構造、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される炭水化物ポリマーの特徴に対して、各アドレスでの値を相関させることによって、各マップを特性ベクトルに変換する工程。 40

## 【0059】

好ましい実施形態において、工程(c)は、マップのためのアドレスの組み合わせ全てを決定するために徹底的に実行される。あるいは、またはさらに、工程(c)は、帰納的に実行される。

## 【0060】

好ましい実施形態において、工程(c)は、この特性が存在するか否かを決定するために、特性ベクトルのための少なくとも1つのテンプレートに対して、このアッセイを比較することによって実行される。

## 【0061】

この方法は、さらに以下の工程を含む方法によって炭水化物ポリマーについてマップを構築する工程を含み得る：(a)炭水化物ポリマーについての特徴データを提供する工程；(b)特徴データから複数のマップを誘導する工程；(c)炭水化物ポリマーを特徴付けるためのさらなるデータを得る工程；(d)さらなるデータが複数のマップのそれぞれと一致するか否かを決定する工程；(e)さらなるデータがマップと一致しない場合、そのマップを除外する工程；および(f)さらなるマップがさらなるデータおよび各残りのマップと一致する場合に限り、さらなるマップを加える工程。

**【0062】**

この方法は、既知の機能、既知の配列、またはこれらの組み合わせの少なくとも1つを有する既知の炭水化物ポリマーに従って、サンプルの炭水化物ポリマーを特徴付ける工程をさらに含み得る。この方法は、以下の工程を含む：(a)アッセイデータを得るために、サンプルの炭水化物ポリマーについて少なくとも1つの実験的アッセイを実行する工程；(b)比較のアッセイデータを得るために、既知の炭水化物ポリマーについて同一の実験アッセイを実行する工程；および(c)アッセイデータを比較のアッセイデータを比較することによって、既知の炭水化物ポリマーに照らしてサンプルの炭水化物ポリマーを特徴付ける工程。

10

**【0063】**

好ましくは、少なくとも1つの実験アッセイが、同一の実験アッセイとして同一のアッセイ条件下で実行される。

**【0064】**

特定の好ましい実施形態において、少なくとも1つの実験的アッセイは、炭水化物ポリマーおよび既知の炭水化物ポリマーに対する糖類結合因子の結合を測定するための少なくとも1つのアッセイを含む。

20

**【0065】**

好ましい実施形態において、炭水化物ポリマーのフィンガープリントは以下を包含する方法によって同定される：第1の炭水化物ポリマーを提供する工程；第1の炭水化物ポリマーを第1の糖類結合因子と接触させる工程；第1の炭水化物ポリマーが第1の糖類結合因子と結合するか否かを測定する工程；炭水化物ポリマーを、第2の糖類結合因子と接触させる工程で、ここで第2の糖類結合因子が、検出可能な標識を包含する工程；および第1の炭水化物ポリマーが、第2の糖類結合因子に結合するか否かを決定する工程で、これによって炭水化物ポリマーのフィンガープリントを作成する工程。

30

**【0066】**

本明細書中に開示されるように、この方法は、炭水化物ポリマーを、少なくとも5つの糖類結合因子と接触させる工程、および炭水化物ポリマーが少なくとも5つの各糖類結合因子に結合するか否かを測定する工程をさらに含み得る。

**【0067】**

いくつかの実施形態において、フィンガープリントは、実験データから得られるマップに従って炭水化物ポリマーを特徴付けるためのシステムおよび方法を用いて、同定および比較される。好ましくは、このデータは、炭水化物ポリマーを特徴付けるための複数の異なる型の実験アッセイから得られる。より好ましくは、少なくとも1つのこのようなアッセイは、糖類結合因子が炭水化物ポリマーに結合する工程を含む。次いで、好ましくは、1つ以上の炭水化物ポリマーの特徴が特徴付けられる。

40

**【0068】**

これらの特徴は、好ましくは、サンプルの炭水化物ポリマーを含むアッセイから得られるデータのマップに由来する。より好ましくは、これらのマップは、より抽象的な生物学的情報を提供する各レベルとともに複数のレベルで分析される。最も好ましくは、データのより複雑な分析を支持するために、新しい型の実験データが、各レベルで分析のプロセスに導入される。必要に応じて、そして最も好ましくは、マップは、各レベルで、実験データと一貫性がないとして除外される。データ分析の連続的なレベルでの組み合わせ的爆発を予防するために、新しいマップが、高いレベルで導入されている新しい実験的データに

50

由来する場合に限り、新しいマップは、最も好ましくは高いレベルで添加される。

【0069】

本発明に従って、炭水化物ポリマーについてのフィンガープリントを分析するための方法が提供され、このフィンガープリントは、複数のアドレスを特徴とし、各アドレスは、炭水化物ポリマーに糖類結合因子が結合する工程に関する数値を含み、この方法は、以下の工程を包含する：(a)第1のアドレスを、マップを形成するフィンガープリントの少なくとも1つの他のアドレスに接触させる工程；(b)第1のアドレスについての値が、少なくとも1つの他のアドレスについての値と相反しない場合、内部干渉されるマップを測定する工程；(c)少なくとも1つのさらなるマップを形成するために、少なくとも1度(a)および(b)を反復する工程；(d)マップが、相互干渉するか否かを測定するために、このマップを、少なくとも1つのさらなるマップと比較する工程；および(e)任意の相互に相反するマップを除外する工程。

10

【0070】

好ましくは、この方法は以下の工程をさらに包含する：(f)第2のアッセイから実験データを受け取る工程；(g)第2のフィンガープリントを形成するために、実験データを変換する工程；(h)第2のフィンガープリントマップを形成するために、第2のフィンガープリントを用いて(a)および(b)の工程を実行する工程；(i)マップが相互干渉するか否かを決定するために、マップを、第2のフィンガープリントマップと比較する工程；および(j)任意の相互に相反するマップを除外する工程。

20

【0071】

より好ましくは、工程(g)は、以下の工程をさらに包含する：(i)実験データの形式を分析する工程；(ii)形式が、数値の形式でない場合、実験データを少なくとも1つの数値に変換する工程；および(iii)少なくとも1つの数値から第2のフィンガープリントを作成する工程。

30

【0072】

本発明の別の実施形態に従って、サンプルの炭水化物ポリマーについてのフィンガープリントに外部データを統合するための方法が提供され、このフィンガープリントは複数のアドレスを特徴とし、各々のアドレスは、サンプルの炭水化物ポリマーへの糖類結合因子の結合に関する数値を含み、この方法は以下の工程を包含する：(a)外部フィンガープリントを形成するために外部データを変換する工程で、この外部データが炭水化物ポリマーにおいて実行されるアッセイの少なくとも1つを含む工程；(b)外部フィンガープリントを、サンプルの炭水化物ポリマーについてのフィンガープリントと比較する工程；および(c)外部フィンガープリントが、サンプルの炭水化物ポリマーについてのフィンガープリントと一致するか否かを決定する工程；(d)フィンガープリントにおけるデータを用いて、外部データを、新しく決定されたフィンガープリントまたは「構造ベクトル」に組み込む工程。

40

【0073】

本明細書中以下で、用語「糖分子」は、多糖類成分を有する任意の分子を含む。例としては、多糖類、糖タンパク質、および糖脂質が挙げられる。

【0074】

本明細書中以下で、用語「糖類結合因子」は、単糖類、少糖類、多糖類、またはこれらの組み合わせである糖に結合し得る任意の実体をいい、レクチン、抗体、糖質に結合するか、さもなければ認識する別のタンパク質、および多糖類を切断するか、または改変する酵素を含むが、これらに限定されない。

40

【0075】

本明細書中以下で、用語「炭水化物ポリマー」は、任意の多糖類、または少糖類、または複数の結合した単糖類単位を含む他の構造をいう。

【0076】

本明細書中以下で、用語「サンプルの炭水化物ポリマー」は、さらなる分析の目的のために実験データが誘導される試験下の炭水化物ポリマーをいう。

50

## 【0077】

本明細書中以下で、用語「比較炭水化物ポリマー」は、そのデータが、サンプルの炭水化物ポリマーとの比較のために得られる炭水化物ポリマーをいう。この対照の炭水化物ポリマーは、必要に応じて、その構造が既知である標準的な既知の炭水化物ポリマーであり得る。

## 【0078】

本明細書中以下で、用語「コンピュータのデバイス」は、操作システム（例えば、DOS、Windows（登録商標）<sup>TM</sup>、OS/2<sup>TM</sup>もしくはLinux）を有するパソコン（PC）；Macintosh<sup>TM</sup>コンピュータ；操作システムとしてJAVA（登録商標）<sup>TM</sup> - OSを有するコンピュータ；図面のワークステーション（例えば、Sun Microsystems<sup>TM</sup>およびSilicon Graphics<sup>TM</sup>のコンピュータ、およびいくつかのバージョンのUNIX（登録商標）操作システム（例えば、AIX<sup>TM</sup>もしくはSun Microsystems<sup>TM</sup>のSOLARIS<sup>TM</sup>）を有する他のコンピュータ）；または任意の他の公知かつ利用可能な操作システム、またはラップトップ、携帯型のコンピュータ、向上された携帯電話（例えば、WAPを可能にする携帯電話）、前記で定義されたようなネットワークに結合され得、そして操作システムを有する任意の分類の装着型コンピュータを含むがこれらに限定されない、任意のデバイスを含むがこれらに限定されない。本明細書中以下で、用語「Windows（登録商標）<sup>TM</sup>」は、Windows（登録商標）95<sup>TM</sup>、Windows（登録商標）NT<sup>TM</sup>、Windows（登録商標）98<sup>TM</sup>、Windows（登録商標）CE<sup>TM</sup>、Windows（登録商標）2000<sup>TM</sup>、およびMicrosoft Corp.（USA）による任意のアップグレードされたバージョンのこれらの操作システムを含むが、これらに限られない。

10

20

## 【0079】

本発明について、ソフトウェアアプリケーションは、実質的に任意の適切なプログラミング言語に書き込まれ得、これは、当業者によって容易に選択され得る。この選択されたプログラミング言語は、ソフトウェアアプリケーションが実行されるものに従うコンピュータのデバイスと互換性があるべきである。適切なプログラミング言語の例としては、C、C++およびJava（登録商標）が挙げられるが、これらに限られない。

## 【0080】

加えて、本発明は、ソフトウェア、ファームウェアもしくはハードウェア、またはこれらの組み合わせとして実行され得る。任意のこれらの実行について、方法によって実行される機能的工程は、データプロセッサによって実行される複数の命令として記載され得る。

30

## 【0081】

特に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書中に記載されるものと類似または等価の方法および材料が、本発明の実行または試験において用いられ得るが、適切な方法および材料は、以下に記載される。本明細書中に記載される刊行物、特許明細書、特許および他の参考文献の全ては、その全体を参考として援用される。コンフリクトの場合、定義を含む本明細書を調節する。加えて、材料、方法、および例は、例示のみで限定を意図されない。

40

## 【0082】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかにされる。

## 【0083】

（発明の詳細な説明）

糖類結合因子に対する炭水化物ポリマーの結合状態を記載する情報を用いる炭水化物ポリマーの同定および改変のための方法が、本発明によって提供される。本明細書中で記載する方法において使用される炭水化物ポリマーは、多糖類部分を含む任意の分子であり得る。従って、炭化水素は、多糖類および多糖類が第2の分子に結合する（例えば、共有結合

50

によって)分子であり得る。第2の分子は、例えば、硫酸塩またはポリマーであり得る。炭水化物ポリマーは、例えば、糖タンパク質または糖脂質であり得る。糖タンパク質の例は、増殖因子(例えば、エリスロポエチン(EPO)、インターフェロン(インターフェロン、インターフェロン、インターフェロンを含む)、ヒト慢性ゴナドトロピン(hCG)、GCSF、抗トロンピンIII、インターロイキン(例えば、IL-2)およびhCG)を含む。

【0084】

多糖類の例としては、例えば、グリコーゲン、デンプンセルロース、ヘパリン、硫酸ヘパリン、硫酸ヘパリンのフラグメント、および細胞壁成分(例えば、細菌のリボ多糖類または酵母の細胞壁において見出されるグルカン)が挙げられる。

10

【0085】

(炭水化物ポリマーの分析のための一般的な方法)

好ましい実施形態において、本明細書中に記載する方法において同定、改変または使用される炭水化物ポリマーは、多糖類の異型(例えば、ヘパリンまたは硫酸ヘパリン)であり得る。例えば、炭水化物ポリマーの異型は、炭水化物ポリマーの所望される構造的特性または機能的特性に基づいて選択され得る。例えば、ヘパリンもしくは硫酸ヘパリンの異型、またはこれらの分子のフラグメント(例えば、ヘパラナーゼによる切断に続いて生成されるもの)は、それらの高められた異型の能力に基づいて選択され得、細胞外基質の解離を調節するか、細胞移動を促進するか、ケモカインのようなポリペプチドまたは増殖因子に結合するか、炎症、脈管新生、腫瘍の転移、再狭窄、もしくは細胞増殖を調節するか、またはヘパラナーゼの活性を調節する。

20

【0086】

1つの局面において、本発明は、第1の炭水化物ポリマーおよび第2の炭水化物ポリマー(例えば、2つ以上の糖タンパク質)の関連性を決定するための方法を提供する。2つ以上の糖タンパク質の関連性を決定するために、第1の糖タンパク質の第1のフィンガープリントが、第2の糖タンパク質の第2のフィンガープリントと比較される。第1のフィンガープリントは、第1の糖タンパク質について、少なくとも第1の糖類結合因子および第2の糖類結合因子についての結合情報を含む。第2のフィンガープリントは、第2の糖タンパク質について、少なくとも第1の糖類結合因子および第2の糖類結合因子についての結合情報を含む。

30

【0087】

第1のフィンガープリントおよび第2のフィンガープリントは、第1の糖タンパク質および第2の糖タンパク質が、第1の糖類結合因子に結合するか否か、ならびに第1の糖タンパク質および第2の糖タンパク質が、第2の糖類結合因子に結合するか否かを測定することによって比較される。第1の糖タンパク質および第2の糖タンパク質が、第1の糖類結合因子および第2の糖類結合因子について同じ結合状態(すなわち、結合または非結合)を共有する程度は、第1の糖タンパク質と第2の糖タンパク質との関連性を示す。

【0088】

多糖類の関連性を決定するために、第1の多糖類の第1のフィンガープリントが提供される。第1のフィンガープリントは、第1の多糖類に対する少なくとも1つの第1の糖類結合因子および第2の糖類結合因子についての結合情報を含む。第1のフィンガープリントは、第2の多糖類の第2のフィンガープリントと比較され、ここで、第2のフィンガープリントは、第2の多糖類に対する少なくとも第1の糖類結合因子および第2の糖類結合因子についての結合情報を含む。この比較は、第1の多糖類および第2の多糖類が第1の糖類結合因子に結合するか否か、ならびに第1の多糖類および第2の多糖類が第2の糖類結合因子に結合するか否かを決定する工程を含む。

40

【0089】

本発明によって、炭水化物ポリマーのフィンガープリント情報を用いて炭水化物ポリマーを同定するための方法もまた提供される。例えば、1つの実施形態において、試験糖タンパク質の第1のフィンガープリントが提供される。第1のフィンガープリントは、第1の

50

糖タンパク質について、少なくとも第1の糖類結合因子および第2の糖類結合因子についての結合情報を含む。この第1のフィンガープリントは、少なくとも1つの参照フィンガープリントと比較され、ここで、参照糖タンパク質フィンガープリントは、少なくとも1つの参照糖タンパク質について、少なくとも第1の糖類結合因子および第2の糖類結合因子についての結合情報を含む。

【0090】

試験フィンガープリントと参照フィンガープリントとの間のフィンガープリントパターンにおける類似性は、試験糖タンパク質と参照糖タンパク質が関連することを示す。例えば、同一のパターンは、試験糖タンパク質が参照糖タンパク質と同一であることを示す。

【0091】

フィンガープリント分析の情報は、所望の特性を含むか、または欠失する糖タンパク質を改変するために用いられ得る。改変された糖タンパク質を作製するために、第1の糖タンパク質について、少なくとも1つの第1の糖類結合因子および第2の糖類結合因子についての結合情報を含む、第1のフィンガープリントが、少なくとも1つの参照フィンガープリントと比較される。参照フィンガープリントは、少なくとも1つの参照糖タンパク質について、少なくとも第1の糖類結合因子および第2の糖類結合因子についての結合情報を含む。目的の特性に関する参照糖タンパク質の状態は、好ましくは既知である。第1のフィンガープリントおよび参照フィンガープリントにおける差異が検出され、そしてこの情報は、試験糖タンパク質の炭水化物ポリマー成分を変更して第1のフィンガープリントおよび参照フィンガープリントにおける差異を減少または増加するために用いられる。

【0092】

いくつかの実施形態において、変更された試験糖タンパク質のフィンガープリントが、生成され、そして参照フィンガープリントと比較される。

【0093】

本発明によって、糖タンパク質の所望のアミノ酸配列を含むポリペプチドを提供し、そして炭水化物ポリマーをこのポリペプチドに付着して所望の改変糖タンパク質を生成することによって、糖タンパク質を合成する方法がまた提供される。このポリペプチドは、所望される場合、化学的に合成され得る。あるいは、ペプチドは、組み換え的に発現され得る。

【0094】

本明細書中に記載される方法の1つによって生成された炭水化物ポリマーもまた、本発明内である。この炭水化物ポリマーは、その糖質剤結合特性についての情報を用いて精製され得る。例えば、3つの異なる糖質剤に結合する既知の炭化水素は、これらの薬剤を含むアフィニティーカラムを用いて精製され得る。

【0095】

本発明はまた、被験体における炭水化物ポリマーと関連する病理を診断する方法を含む。この病理を診断するために、病原性を有すると疑われる被験体からの炭水化物ポリマーの試験フィンガープリントが、参照フィンガープリントと比較される。試験フィンガープリントは、その病理学的状態が既知の参照サンプルにおける炭水化物ポリマーに由来する。試験フィンガープリントと参照フィンガープリントとの間の一致は、対象および参照サンプルが同じ病理学的状態を有することを示す。例えば、参照サンプルが、病原性を有しない被験体（または被験体の集団）に由来する場合、次いで試験対象と参照フィンガープリントとの間のフィンガープリントにおける類似性は、試験対象が病理学的状態を有しないことを示す。この参考のサンプルは、データベースから引き出され得る。

【0096】

試験サンプルから炭水化物ポリマーの試験フィンガープリントを提供し、そして試験フィンガープリントを参照フィンガープリントと比較することによって、炭水化物ポリマーと関連する機能を同定する方法もまた、本発明内である。この試験フィンガープリントは、その機能的状態が既知である炭水化物ポリマーに由来する。試験フィンガープリントと参照フィンガープリントとの一致は、対象と参照サンプルが同じ機能的状態を有することを

10

20

30

40

50

示す。

【0097】

(炭水化物ポリマーフィンガープリントの同定)

フィンガープリントはまた、既知でない炭水化物ポリマーサンプルからの試験フィンガープリントを、その同一性が既知の炭水化物ポリマーに由来する参考のフィンガープリントと比較することによって、炭水化物ポリマーを同定するために用いられ得る。試験フィンガープリントと参考のフィンガープリントとの間の一致は、対象と参照炭水化物サンプルが同じであることを示す。

【0098】

本明細書中で使用される場合、炭水化物ポリマーのフィンガープリントは、炭水化物ポリマーおよび複数の散在した結合剤の結合状態についての情報の編集物である。いくつかの実施形態において、フィンガープリントは、糖類結合因子による炭水化物ポリマーへの結合の存在の検出の数値表現である。

【0099】

炭水化物ポリマーのフィンガープリントは、炭水化物ポリマーを第1の糖類結合因子と接触させる工程および炭水化物ポリマーが糖類結合因子に結合するか否かを測定する工程によって、生成され得る。この炭水化物ポリマーはまた、第2の糖類結合因子と接触させられ、そして、測定は、第2の結合剤が炭水化物ポリマーと結合するか否かに従う。

【0100】

炭水化物ポリマーは、好ましくは、少なくとも5つの糖類結合因子と接触させられ、そして測定は、炭水化物ポリマーが、少なくとも5つの各糖類結合因子に結合するか否かに従う。好ましい実施形態において、少なくとも10、15、20、または25以上の薬剤に対する炭水化物ポリマーの結合が、測定される。

【0101】

好ましい実施形態において、第1および第2の糖類結合因子の結合は、表面上の所定の位置に付着された少なくとも1つの第1の糖類結合因子を含む表面を提供する工程、および表面を、第1の糖類結合因子と炭水化物ポリマーとの間の第1の複合体の形成を可能にする条件下で、炭水化物ポリマーと接触させる工程によって、測定される。非結合ポリマーは、所望される場合、除去され、そして表面は、第1の複合体と第2の糖類結合因子との間で第2の複合体の形成を可能にする条件下で、少なくとも1つの第2の糖類結合因子と接触させられる。次いで、第1および第2の糖類結合因子は、同定され、そして発生した情報は、炭水化物ポリマーについてのフィンガープリントを提供する。複数の第1および/または第2糖類結合因子を含むことによって、炭水化物ポリマーの詳細なフィンガープリントを作成することが可能である。当然、炭水化物ポリマーに第1または第2の糖質剤が結合しないことがまた、多糖類について生成されるフィンガープリントに役立つことが、当業者に明らかである。

【0102】

第2の糖質剤は、好ましくは検出可能な標識を含む。第2の糖類結合因子が標識される場合、第2の標識の同一性は、第2の糖類結合因子の同一性を測定する。基質上の第2の標識の位置は、次に第1の糖類結合因子の同一性を明らかにする。

【0103】

結合状態を評価するために、炭水化物ポリマーは、表面の所定の位置に付着される少なくとも1つの糖類結合因子を含む表面に添加される。炭水化物ポリマーは、第1の糖類結合因子と炭水化物ポリマーとの間での複合体の形成を可能にする条件下で、表面と共にインキュベートされる。次いで、結合していない炭水化物ポリマーを除去することが所望される場合、この表面は、洗浄され得る。次いで、この表面は、第1の複合物と第2の糖類結合因子との間で第2の複合体の検出を可能にする条件下で、第2の糖類結合因子と接触させられる。第2の薬剤は、好ましくは、第2の複合体の形成を可能にする検出可能な標識を保有する。所定の結合剤の位置に対応する基質上の位置での第2の複合物の検出は、第1および第2の結合剤を炭水化物ポリマーに結合する薬剤として同定することを可能にす

10

20

30

40

50

る。第1および第2の結合剤を検出する工程は、炭水化物ポリマーについての構造の情報を提供する。

【0104】

この方法は、第1に炭水化物ポリマーを表面と接触させ、次いで検出可能な標識を添加することによって、説明されている一方で、この順序が必須でないことが理解される。従って、いくつかの実施形態において、第2の薬剤は、炭水化物ポリマーと混合され、そしてこの複合体が、表面に添加される。

【0105】

いくつかの実施形態において、複数の糖類結合因子が、表面に付着される。同様に、複数の第2の検出可能な糖類結合因子が、用いられ得る。好ましい実施形態において、複数の第1および第2の糖類結合因子の両方が、用いられる。

10

【0106】

従って、種々の実施形態において、少なくとも5、10、15、25、30、または50以上の、第1の糖類結合因子が、表面に結合される。好ましくは、第1の糖類結合因子は、基質の、空間的に別の領域に結合される。他の実施形態において、少なくとも5、10、15、25、30、または50以上の第2の糖類結合因子が、用いられる。好ましくは、各々の第2の糖類は、区別できるレベルでそれに対して結合される(すなわち、一方の第2の糖類結合因子と他方の第2の糖類結合因子を区別するレベル)。

【0107】

本明細書中に使用される場合、「炭水化物ポリマー」は、多糖類成分を有する任意の分子を含む。例としては、多糖類、糖タンパク質、および糖脂質が挙げられる。炭水化物ポリマーは、2つ以上の連結された単糖類残基を含む任意の糖類分子を含むが、ほとんどの実施形態において、炭水化物ポリマーは、10、25、50、1000、または10、000以上の単糖類単位を含むことが理解される。所望される場合、炭水化物ポリマーは、糖類切断因子を用いた消化の後に、その表面に付加され得る。あるいは、その炭水化物ポリマーは、その表面に付加され得、表面に結合された第1の糖類結合因子への結合を可能とし得、次いで、糖類切断因子を用いて消化され得る。

20

【0108】

一般的に、多糖類に結合する任意の因子は、第1の糖類結合因子または第2の糖類結合因子として用いられ得る。当該分野において知られるように、糖類に結合する多くの因子が、記載されている。1つのクラスの因子は、レクチンである。これらのタンパク質の多くは、特定の短い少糖類配列に、特異的に結合する。第2のクラスの因子は、糖類構造を特異的に認識する抗体である。第3のクラスの糖類結合因子は、炭水化物残基に結合するタンパク質である。例えば、グリコシダーゼは、糖鎖中のグリコシル結合を切断する酵素である。いくつかのグリコシダーゼは、特定の少糖類配列を特異的に認識し得る。別のクラスの酵素は、グリコシルトランスフェラーゼであり、この酵素は、糖鎖を、切断するが、さらに、1つの新しく作製された末端に、1単位の糖を移動させる。

30

【0109】

本出願の目的のために、用語「レクチン」はまた、動物種由来の糖類結合タンパク質(例えば、「哺乳動物レクチン」)を包含する。従って、DNAまたはタンパク質のような炭水化物ポリマーは、より詳細に研究されるべき重要な生物学的機能を、明白に有する。

40

【0110】

好ましくは、糖類結合因子は、実質的に配列特異的因子である。本明細書中に使用される場合、「実質的に配列特異的因子」とは、糖類に結合し得る因子を意味する。その結合は、通常、配列特異的である(すなわち、その因子は、単糖類単位の特定の配列にのみ結合する)。しかし、この因子は、他の関連する配列(例えば、1つ以上の糖類が欠失、変更、または挿入された単糖類配列)に結合し得るので、この配列特異性は、絶対的であり得ない。この因子はまた、所定の配列の単糖類に加えて、1つ以上の関連しない配列、または単糖類と結合し得る。

【0111】

50

実質的に配列特異的な因子は、通常、タンパク質（例えば、レクチン、サッカリッド特異的抗体、またはグリコシダーゼもしくはグリコシルトランスフェラーゼ）である。

【0112】

糖類結合因子レクチンの例としては、以下の植物から単離されたレクチンが挙げられる：

【0113】

【数1】

*Conavalia ensiformis, Anguilla anguilla, Triticum vulgare, Datura stramonium, Galanthus nivalis, Maackia amurensis, Arachis hypogaea, Sambucus nigra, Erythrina cristagalli, Lens culinaris, Glycine max, Phaseolus vulgaris, Allomyrina dichotoma, Dolichos biflorus, Lotus tetragonolobus, Ulex europaeus, and Ricinus communis.*

10

他の生物学的に活性な、炭水化物結合化合物としては、サイトカイン、ケモカイン、および増殖因子が挙げられる。これらの化合物もまた、本特許出願に関するレクチンであると考えられる。

【0114】

グリコシダーゼの例としては、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、N-アセチルヘキソサミニダーゼ、 $\alpha$ -マンノシダーゼ、 $\beta$ -マンノシダーゼ、 $\alpha$ -フルコシダーゼ等が挙げられる。いくつかのこれらの酵素は、それらの単離物の供給源に依存して、異なる特異性を有する。上記の酵素は、例えば、Oxford Glycosystems Ltd.、Abington、OX14 1RG、UK、Sigma Chemical Co.、St. Louis、Mo.、USA、またはPieace、POB. 117、Rockford、61105 USAから市販されている。

20

【0115】

糖類結合因子はまた、切断因子でもあり得る。「切断因子」とは、その認識配列で、糖鎖を切断する、実質的に配列特異的な因子である。代表的な切断因子は、グリコシダーゼであり、このグリコシダーゼとしては、エキソグリコシダーゼおよびエンドグリコシダーゼ、ならびにグリコシルトランスフェラーゼが挙げられる。しかし、グリコシド結合を切断し得る化学物試薬もまた、それらが実質的に配列特異的である限り、切断因子として作用し得る。用語「切断因子 (cleaving agent)」または「切断因子 (cleavage agent)」とは、本明細書の文脈において、用語「切断し得る、実質的に配列特異的な因子」と同意である。

30

【0116】

切断因子は、認識配列で、作用し得る。本明細書中に使用される場合、「認識配列」とは、実質的に配列特異的な因子によって認識される単糖類の配列である。認識配列は、通常、2~4の単糖類単位を含む。認識配列の例は、Gal 1~3 GalNAcであり、この配列は、*Arachis hypogaea*より精製されたレクチンによって認識される。本開示の目的のために、単一単糖類は、実質的に配列特異的な因子によって特異的に認識される場合、認識配列として定義され得る。

【0117】

種々の実質的に配列特異的な因子についての反応条件は、当該分野において公知である。あるいは、当業者は、各々の実質的に配列特異的な因子を用いる一連の試験を、容易に実施し得、種々の反応条件下で、それらの結合活性を測定し得る。有利には、特定の实質的に配列特異的な因子が反応する反応条件およびそれが不活性のままである条件の知見は、多数の実質的に配列特異的な因子が存在する反応を制御するために用いられ得る。例えば、第2の配列特異的試薬および第3の配列特異的試薬は、この反応に同時に添加され得るが、反応条件の変化を介して、第2の実質的に配列特異的な因子のみが、活性であることを可能とされ得る。次いで、反応条件のさらなる変化は、第2の実質的に配列特異的な因子を不活性化するためおよび第3の実質的に配列特異的な因子を活性化するために選択され得る。反応条件のいくつかの例示的な例を、以下の表1に列挙する。表1に列挙したpHおよび温度のデータに加えて、他の要因（例えば、Znのような金属の存在、またはM

40

50

n、Ca、Naのようなカチオンの塩（例えば、塩化ナトリウム塩）の存在）は、最適な反応条件または特定の実質的に配列特異的な因子が活性であり、一方で他の因子が不活性である条件を見出すために調査され得る。

【0118】

【表1】

表 1:

いくつかの実質的に配列特異的な因子についての反応条件

条件設定に関するコード	条件のシリアルナンバー	pH	温度 (°C)	酵素
♣ ♥	1	3.5	30	タチナタマメβガラクトシダーゼ
♥	2	5.0	37	エンド a-N アセチルガラクトシダーゼ α 1,2 フルコシダーゼ β1,2 ガラクトシダーゼ
♣ ♠	3	5.0	25	ウシ胎児腎臓 α フルコシダーゼ
♥ ♠	4	7.2	25	コーヒーマメ α ガラクトシダーゼ

10

♣ ♥ ♠	5	5.8	55	<i>B. Fragilis</i> エンドβ-ガラクトシダーゼ
	6	6.2	25	鶏卵リゾチーム
	7	4.3	37	ウシ胎児試験 β 1-3,4,6, ガラクトシダーゼ
	Biodiversa 由来	2-9.5	50	Gly 001-02
	Biodiversa 由来	3.0-8.0	50	Gly 001-04
	Biodiversa 由来	2-11	50	Gly 001-06

20

30

- ・記号は、外因的な条件によって分離可能である酵素群を表す。
- ・Diversa Corp. は、種々の pH および温度において広範な種類の活性を有する Thermophilic Endo/Exo グリコシダーゼを生産する。
- ・可能な条件はまた、金属および他の Zn、Mn、Ca、NaCl であり得る。

【0119】

第1の糖類結合因子は、任意の当該分野で認識された方法を用いて、固定化され得る。例えば、固定化は、タンパク質の官能基（例えば、アミノ基、カルボキシ基、ヒドロキシル基、またはチオール基）を使用し得る。例えば、ガラス支持体は、上記の PCT 出願に記載されるように、エポキシシランとの反応によって、エポド (epode) 基で官能基化される。エポド基は、リジン残基の遊離 - アミノ基のようなアミノ基と反応する。別の機構は、PCT 出願に記載されるように、金のような電位計物質で表面を覆うことにある。そのような物質が、チオール基と安定な結合体を形成する場合、タンパク質は、システイン残基の遊離チオール基によってそのような物質に直接的に連結され得る。あるいは、チオール基は、従来の化学物質によってか、1つ以上のチオール基および遊離アミノ基（例えば、システインの N - ヒドロキシルスクシンイミジルエステル）と反応する基を含む分子との反応によってタンパク質へと導入され得る。チオール切断可能な架橋剤（例えば、ジチオビス (スクシンイミジルプロピオネート)）は、タンパク質のアミノ基と反応し得る。続くスルフヒドリル剤での還元は、架橋剤の遊離チオール基を曝露する。

40

【0120】

いくつかの適用のために、特定の目的の炭水化物ポリマーに結合することが知られている

50

か、または結合することが予想される複数の糖類結合因子を含む基質を設計することが、好ましい。例えば、ヘパリン、硫酸ヘパリン、またはフラグメント（例えば、ヘパラナーゼ消化によって産生されたフラグメント）、およびそれらの多糖類の改変体形態は、それらの1種類以上のタンパク質（例えば、a F G F、b F G F、P D G F、V E G F、V E G F - R、H G F、E G F、T G F - 、M C P - 1、M C P - 2、およびM C P - 3、I L - 1、I L - 2、I L - 3、I L - 6、I L - 7、I L - 8、I L - 10、およびI L - 12、アネキシンIV、アネキシンV、およびアネキシンVI、M I P - 1、M I P - 1、エコタキシン（e c o t a x i n）、トロンボスポンジン、P F - 4、I P - 10、インターフェロン、インターフェロン、スレクチンL、およびスレクチンP、アンチトロンピン、プラスミノゲン活性化因子、ビトロネクチン（v i t r o n e c t i n）、C D 4 4、S O D、リポプロテインリパーゼ、A p o E、フィブロンネクチン、およびラミニン）と結合する能力についてスクリーニングされ得る。これらの推定の因子は、表面に結合され得る（すなわち、第1の糖類結合因子）。

10

20

30

40

50

#### 【0121】

他の実施形態において、特定の炭水化物ポリマーに結合することが知られているか、または予想される糖類結合因子は、第2の糖類結合因子として提供され得る。

第2の糖類結合因子に結合される標識は、検出されるか、または検出され得る任意の標識であり得る。適切な標識の例としては、例えば、色素性標識、放射性標識、蛍光標識、およびビオチン化標識が挙げられる。従って、その標識は、例えば、有色のレクチン、蛍光レクチン、ビオチン標識化レクチン、蛍光標識、蛍光抗体、ビオチン標識化抗体、および酵素標識化抗体であり得る。好ましい実施形態において、その標識は、色素性標識である。本明細書中に使用される場合、用語「染色体結合因子」とは、糖類に結合する全ての因子を含み、そしてその因子は、明確な色または他の検出可能なマーカーを有し、その結果、糖類への結合の後、その糖類は、色または他のマーカーを得る。固有の、可視領域内で容易に観察可能な色を有する化学的構造に加えて、用いられる他のマーカーとしては、蛍光基、ビオチンタグ、酵素（これは、有色の生成物の形成を生じる反応に用いられ得る）、磁性および同位体性マーカーなどが挙げられる。前出の検出可能なマーカーのリストは、例示目的のためのみのものであり、そして限定も、網羅も意図されない。類似する文脈において、本明細書中に使用される場合（例えば、上記の方法の工程（e）の文脈において）、用語「色」はまた、任意の検出可能なマーカーを含む。

#### 【0122】

標識は、当該分野において公知の方法を用いて、第2の糖類結合因子に結合され得る。標識は、糖類または実質的に配列特異的な因子に結合され、その機能を妨害しない、任意の検出可能な基を含む。標識は、ペルオキシダーゼおよびホスファターゼのような酵素であり得る。原理的には、グルコースオキシダーゼ、および - ガラクトシダーゼのような酵素もまた用いられ得る。その際、糖類が、そのような酵素と反応する単糖類単位を含む場合、その糖類は、改変されることが考慮されなくてはならない。用いられ得るさらなる標識としては、Fluorescein、Texas Red、Lucifer Yellow、Rhodamine、Nile-red、テトラメチル - ローダミン - 5 - イソチオシアネート、1,6 - ジフェニル - 1,3,5 - ヘキサトリエン、cis - Parinaric acid、Phycocerythrin、Allophycocyanin、4',6 - ジアミジノ - 2 - フェニルインドール（DAPI）、Hoechst 33258、2 - アミノベンズアミドなどのような蛍光標識が挙げられる。さらなる標識は、高電子密度金属（例えば、金）、リガンド、ハプテン（例えば、ビオチン）、放射性標識が挙げられる。

#### 【0123】

第2の糖類結合因子は、酵素標識を用いて検出され得る。酵素標識の検出は、ELISAおよび酵素的検出が通常用いられる他の技術の分野において周知である。酵素は、商業的に入手可能である（例えば、Pierceのような会社より）。

#### 【0124】

いくつかの実施形態において、その標識は、蛍光標識を用いて検出される。蛍光標識は、特定の波長での励起および異なる波長での検出を必要とする。蛍光検出のための方法は、当該分野において周知であり、そして多くの論文および教科書が出版されている。この主題の刊行物のセレクションは、Pierceの1994年のカタログ中、p. O - 124 ~ O - 126に見出され得る。蛍光標識は、例えば、SIGMAのような会社、または上記のPierceのカタログより商業的に入手可能である。

第2の糖類結合因子自体は、炭水化物部分および/またはタンパク質部分を含む。タンパク質および糖への標識の結合は、当該分野において周知の技術である。例えば、蛍光標識または放射性標識を用いて糖類を標識するための商業的なキットは、Oxford Glycosystems、Abingdon、UKより入手可能である。タンパク質を標識するためのそれらの使用に関する試薬および指示は、上記のPierceのカタログより入手可能である。

10

#### 【0125】

結合は、通常、ヒドロキシル、アルデヒド、ケト、アミノ、スルフヒドリル、カルボン酸などの基のような、官能基を用いて実施される。それらの基と反応する、多くの標識（例えば、蛍光標識）は、商業的に入手可能である。さらに、一方で標識と反応し、そして他方でタンパク質または糖類と反応する、二機能架橋剤が、用いられ得る。この架橋剤の使用は、タンパク質または糖類の機能の損失を回避するために、有利であり得る。

#### 【0126】

この標識は、当該分野において公知の方法を用いて検出され得る。いくつかの検出方法は、上記のWO 93/22678に記載され、その開示は、その全体が、本明細書中に参考として援用される。CCD検出機法は、本発明の方法に特に適し、それは、本出願に記載される。本方法は、特定の周波数の光を吸収する標識と組み合わせて用いられ得、そしてVLSI表面への試験光源の経路をブロックし、その結果、CCDセンサーは、標識された因子が結合した領域中の減少された光量を検出する。この方法はまた、蛍光標識と共に用いられ得、そのような標識が励起周波数の光を吸収するという事実を利用する。あるいは、このCCDセンサーは、励起後の蛍光標識の発光を検出するために用いられ得る。発光シグナルの、励起光からの分離は、異なる波長についての異なる感度を有するセンサーを用いてか、または時間的分解能によって、あるいはそれらの両方の組み合わせによって達成され得る。

20

30

#### 【0127】

いくつかの実施形態において、本方法は、さらに、第1の糖類結合因子および糖類結合因子の1つ以上の画像を得ることを含む。その情報は、例えば、写真またはデジタル化された画像として保存され得る。あるいは、第1の結合の画像および第2の結合の画像によって提供される情報は、データベース中に保存され得る。

#### 【0128】

本発明はまた、複数の複合体を含む基質を含む。各々の複合体は、基質上の予め決定された位置に結合されている第1の糖類結合因子を含む。その基質はまた、必要に応じて、第1の糖類結合因子および/または検出可能な第2の糖類結合因子に結合されている糖類結合因子を含む。いくつかの実施形態において、この基質は、固体支持体の形態で提供され、その基質は、予め規定された配列の、複数の可視マーカあるいは糖類または糖類配列もしくはフラグメントを代表する他の検出可能マーカを含む。好ましい基質は、ニトロセルロースである。

40

#### 【0129】

所望の場合、複数の第1の糖類結合因子を含む基質は、キットの形態で提供され得る。本発明の方法を用いる診断手順は、診断研究所、実験的研究所、開業医、または私的な個人によって実施され得る。本発明は、これらの施設で用いられ得る診断キットを提供する。特定の炭水化物ポリマーの存在または非存在は、糖類結合因子とのその反応パターンによって明らかされるように、提供されたサンプルにおいて明らかにされ得る。そのサンプルは、例えば、個体サンプルまたは他のサンプルより得られる臨床サンプルであり得る。

50

## 【0130】

好ましくは、各々のキットは、手順を特定にする糖類結合因子を含む。好ましくは、その試薬は、棚での保存、その後、試験が実施される場合の反応培地との置換または反応培地への添加に適切な固体形態または液体緩衝液で供給される。適切な包装が、提供される。そのキットは、必要に応じて、その手順に有用なさらなる成分を提供し得る。これらの任意の成分としては、緩衝液、補足剤、展開剤、標識、反応表面、検出のための方法、コントロールサンプル、指示、および解釈の情報が挙げられる。

## 【0131】

そのキットは、必要に応じて、検出可能な第2の糖類結合因子、および所望の場合、第2の結合因子を検出する試薬を含む。好ましくは、複数の第1の糖類結合因子は、基質上の予め決定された位置および検出可能な第2の糖類結合因子に結合されている。他の実施形態において、基質およびその基質に結合され得る第1の糖類結合因子、ならびに第2の糖類結合因子を備える、キットが、提供される。

10

## 【0132】

本明細書中に記載されるフィンガープリントにおいて提供される情報はまた、目的の炭水化物ポリマーを精製するために用いられ得る。例えば、炭水化物ポリマーは、それが結合する糖類結合因子に基づき精製機構を設計することによって精製され得る。1つの実施形態において、その糖類結合因子は、カラム中に提供され、そして炭水化物ポリマーを含む溶液は、そのカラムに導入される。目的の炭水化物ポリマーは、カラム上に保持される。次いで、目的の炭水化物ポリマーは、カラムより溶出され得る。1つの実施形態において、目的の炭水化物ポリマーは、糖類結合因子が結合するカラムへのさらなる糖類結合因子の添加によって用い、その因子は、目的の炭水化物ポリマーをカラムから取り除く。

20

## 【0133】

少なくとも1つの共通の機能または構造的特徴あるいはその両方を共有する、複数の炭水化物ポリマーまたはそのライブラリーを作製する方法もまた、本発明の範囲内にある。いくつかの実施形態において、その炭水化物ポリマーは、集団として提供される。所望の場合、それらは基質上に提供される。

## 【0134】

好ましい実施形態において、その炭水化物ポリマーは、フォーカスライブラリ (focus library) の形態で提供される (例えば、それらが共通のリガンドに結合するか、または別の共通の機能的特徴もしくは構造的特徴を共有することに起因して、そのフォーカスライブラリのメンバーは、選択される)。

30

## 【0135】

例えば、種々の実施形態において、炭水化物ポリマーのライブラリーは、種々の形態の多糖類 (例えば、ラミナリン、ラミナリンスルフェート、ヘパリン、または硫酸ヘパリン) を含む。ヘパリンまたは硫酸ヘパリンの多糖類の改変体形態に基づくライブラリーのメンバーは、その候補形態がヘパリンに関連する変更された特性を実証する能力に基づいて、選択され得る。例えば、その改変体は、細胞外マトリクスの分離を調節すること、細胞の移動を促進すること、細胞の移動を促進すること、ポリペプチド (例えば、ケモカインまたは増殖因子) に結合すること、炎症、血管新生、腫瘍転移、再狭窄または細胞増殖を調節すること、あるいはヘパラーゼ活性を調節することについてのそれらの増強された能力に基づき選択され得る。あるいは、そのライブラリーは、糖タンパク質の炭水化物ポリマー部分の改変体形態を含み得る。

40

## 【0136】

そのライブラリーは、炭水化物ポリマーの集団を提供することによって構築される。いくつかの実施形態において、その炭水化物ポリマーの集団は、コンビナトリアルケミストリーに関する分野において公知の技術を用いて構築され得る。炭水化物フィンガープリントは、その集団のうちの1つ以上のメンバーについて作製される。その集団のメンバーまた、それが目的の機能または構造を示す程度を決定するためにアッセイされる。所望の特性を有する集団のメンバーは、所望される場合、さらなる特徴づけまたは改変について選択

50

される。さらに、さらなる改変体炭化水素ポリマーは、獲得した情報に基づき設計され得、所望される特性を有する、改変された炭化水素ポリマー、またはフォーカスされたライブラリーの集団を生じ得る。

【0137】

本明細書中に記載される方法に関して作製されたフィンガープリントデータは、さらに、US S N 60/246,009(2000年11月3日出願);およびUS S N 60/258,887(2000年11月3日出願)(これらの内容は、その全体が、参考として援用され、そしてそれらは、以下に概説される)に記載される手順を用いて分析され得る。

【0138】

例えば、複数のアドレスを特徴とするフィンガープリント(各々のアドレスは、炭水化物ポリマーへの、糖類結合因子の結合に関連する絶対値を有する)は、第1のアドレスを、そのフィンガープリントの少なくとも1つの他のアドレスに関連させることによって、マップを形成し得(第1のアドレスが少なくとも1つの他のアドレスと一致する場合)、そのマップが内部で一致していることを決定し、そして少なくとも1回、その関連付けおよび決定を繰り返して、少なくとも1つのさらなるマップを形成し;そのマップを少なくとも1つのさらなるマップと比較し、そしてそのマップが、相互に一致するか否かを決定し;そして任意の相互に一致しないマップを除去する。

10

【0139】

あるいは、またはさらに、フィンガープリントデータ分析は、複数のアドレスを特徴とするフィンガープリントを用いて、サンプルの炭水化物ポリマーについてのフィンガープリントに、外部データをあわせる方法を用いて実施され得る。各々のアドレスは、外部データを変換して外部フィンガープリントを形成することによる、サンプルの炭水化物ポリマーへの糖類結合因子の結合に関する絶対値を含み、そしてその外部データは、炭水化物ポリマー上で実施される少なくとも1つのアッセイを含む。その外部フィンガープリントは、サンプル炭水化物ポリマーについてのフィンガープリントと比較され;そしてその決定は、その外部フィンガープリントがサンプルについての炭水化物ポリマーと首尾一貫するか否かで行われる。

20

【0140】

本明細書中に記載される方法に関するフィンガープリントはまた、フィンガープリントを有する炭水化物ポリマーを特徴付けることによって構築され得る。そのフィンガープリントは、複数のアドレスを特徴とし得、各々のアドレスは、炭水化物ポリマーについて実施された実験的アッセイからのアッセイデータより得られる値を含む。その特徴づけは、フィンガープリントに従い複数のマップを構築すること;炭水化物ポリマーを特徴づけするためのさらなるデータを得ること;そのマップがさらなるデータと一致するか否かを決定すること;および各々のマップがさらなるデータと一致しない場合、そのマップを却下することを含む。

30

【0141】

別の好ましい実施形態において、本明細書中に記載される方法に用いられるフィンガープリントは、炭水化物ポリマーについてのマップを構築することによって分析され得、ここでこのマップは、以下を含む:その炭水化物ポリマーについて実施された少なくとも1つの実験的アッセイから得られたアッセイデータに従い、炭水化物ポリマーを特徴づけること;そのアッセイデータを複数のアドレスに分解すること(各々のアドレスは、アッセイデータの値を特徴とする);少なくとも1つの他のアドレスに、各々のアドレスを関連させることによって複数のマップを形成すること;およびその炭水化物ポリマーの少なくとも一部分、炭水化物ポリマーの少なくとも一部分の配列、炭水化物ポリマーの少なくとも一部分の構造、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、炭水化物ポリマーの特徴に、各々のアドレスでの値を関連させることによって適切なベクトルに各々のマップを変換させること。

40

【0142】

50

別の好ましい実施形態において、本明細書中に記載される方法に用いられるフィンガープリントは、以下の工程を包含する方法でマップを構築することによって分析され得る：炭水化物ポリマーの特徴づけデータを提供する工程；この特徴づけデータから複数のマップを導く工程；炭水化物ポリマーを特徴付けるためのさらなるデータを得る工程；そのさらなるデータが複数のマップの各々と一致するか否かを決定する工程；そのさらなるデータがマップと一致しない場合、そのマップを却下する工程；およびそのさらなるマップがさらなるデータおよび各々の残っているマップと一致する場合のみさらなるマップを加える工程。

**【0143】**

別の好ましい実施形態において、その炭水化物ポリマーは、少なくとも1つの公知の機能、公知の配列、およびそれらの組合せのうち1つを有する公知の炭水化物ポリマーに従ってサンプル炭水化物ポリマーの特徴づけに関連して特徴付けられ得る。その方法は、以下の工程を含む：サンプル炭水化物ポリマーについての少なくとも1つの実験的アッセイを実施して、アッセイデータを得る工程；公知の炭水化物ポリマーについての同一の実験的アッセイを実施し、比較アッセイデータを得る工程；およびそのアッセイデータと比較アッセイデータとを比較することによって、サンプルの炭水化物ポリマーを、公知の炭水化物ポリマーに従い特徴付けする工程。

**【0144】**

別の好ましい実施形態において、本明細書中に記載される方法に用いられるフィンガープリントは、以下の工程によって構築される：炭水化物ポリマーへの糖類結合因子の結合を決定するための実験的アッセイを提供する工程；炭水化物ポリマーへの糖類結合因子が存在したか否かを生データとして検出する工程；その生データを絶対値に変換する工程；およびその絶対値をフィンガープリントのアドレスとして配置し、フィンガープリントを形成する工程。

**【0145】**

別の好ましい実施形態において、本明細書中に記載される方法に用いられるフィンガープリントは、複数のフィンガープリントと少なくとも1次炭水化物ポリマーおよび2次炭水化物ポリマーとを比較する方法を用いて比較され、各々のフィンガープリントは、複数のアドレスを特徴とし、各々のアドレスは、炭水化物ポリマーへの糖類結合因子の結合に関する絶対値を特徴とする。その方法は、以下の工程を含む：1次炭水化物ポリマーについての少なくとも1つのアドレスについての数値と、2次炭水化物ポリマーについてのフィンガープリントの対応するアドレスについての絶対値を比較する工程；および1次炭水化物ポリマーと2次炭水化物ポリマーとの間の類似性を、それらのアドレスについての数値の間の類似に従い決定する工程。

**【0146】**

別の好ましい実施形態において、そのフィンガープリントは、サンプルの炭水化物ポリマーのフィンガープリントを有するフィンガープリントデータのデータベースを通して検査する方法を用いて比較される（そのデータベースは、複数の類似の炭水化物ポリマーについてのフィンガープリントデータを含む）。その方法は、以下の工程を含む：アドレッシングシステム（*addressing system*）に従いデータベースを構築する工程、（そのアドレッシングシステムは、少なくとも部分的に、複数の比較炭水化物ポリマーについてのフィンガープリントデータから得られる）；サンプルの炭水化物ポリマーのフィンガープリントをキーに変換する工程；そのキーを用い、そのアドレッシングシステムを通して調査する工程；および少なくとも1つの比較炭水化物ポリマーからフィンガープリントデータを検索する工程。

**【0147】**

別の好ましい実施形態において、フィンガープリントは、炭水化物ポリマー（複数のアドレスの特徴をなすフィンガープリントで、各アドレスは、糖類結合因子の炭水化物ポリマーへの結合に関する数値を含む）のに関するフィンガープリントデータを広げるためのフィンガープリントを内部的に解析する方法を使用して、内部的に解析される。本方法は以

10

20

30

40

50

下を包含する：パターンを形成するために第1のアドレスを、少なくとも1つの他のフィンガープリントのアドレスに結合する工程；第1のアドレスに対する値が、少なくとも1つの他のアドレスに対する値と矛盾していない場合、内部干渉性となるパターンを決定する工程；および拡大されたフィンガープリントデータとしてのフィンガープリントに、各内部干渉パターン添加する工程。

**【0148】**

別の好ましい実施形態において、フィンガープリントは、炭水化物ポリマーサンプルのためのフィンガープリントを構築するための系によって、提供される。この系は、以下を含む：(a) 付着された複数の糖類結合因子を有する基質を含む湿式アレイで、各糖類結合因子を、湿式アレイの前決定されたアレイ部分に配置し、その結果、炭水化物ポリマーサンプルが湿式アレイとインキュベートされ、糖類結合因子と複合体を形成する、湿式アレイ；(b) 生データを形成するために複合体を検出するための、検出デバイス；および(c) フィンガープリントのアドレスに対する各アレイ部分の生データを変換するための、変換モジュール。

10

**【0149】**

いくつかの好ましい実施形態において、フィンガープリントは、炭水化物ポリマーサンプルに対するフィンガープリントを構築するための系において、炭水化物ポリマーに対するフィンガープリントを構築するための方法を使用して生成され、この系は湿式アレイを特徴とし、この湿式アレイは、付着された複数の糖類結合因子を有する基質を含み、付着された各糖類結合因子は、湿式アレイの前決定されたアレイ部分、および検出デバイスに配置される。この方法は、以下を包含する：炭水化物ポリマーと糖類結合因子の結合が生じるような条件下で、炭水化物ポリマーと湿式アレイをインキュベートする工程；糖類結合因子と炭水化物ポリマーの結合が生じたか否かを、検出デバイスによって検出する工程；および、結合が生じたか否かによってフィンガープリントにアドレスを添加する工程。

20

**【0150】**

別の好ましい実施形態において、フィンガープリントは、少なくとも1つの炭水化物含有物質を含むサンプルを分析するための方法で、分析される。この方法は、サンプル中の炭水化物含有物質の少なくとも1つの特徴を決定するための、候補スペースを定義する工程を、包含する。

**【0151】**

(一般的なスクリーニング法および診断法)

本明細書中で開示された種々の方法は、試験生物学的サンプルおよび参照生物学的サンプル由来の細胞中の、炭水化物ポリマーフィンガープリントを比較する工程に関する。従って、その様々な局面および実施形態において、本発明は、1つ以上の目的炭水化物ポリマーを含むか、または含むと疑われる生物学的サンプルを少なくとも1つ含む、試験生物学的サンプルを提供する工程を包含する。

30

**【0152】**

目的のポリマーに対する炭水化物フィンガープリントは、炭水化物ポリマーのための1つ以上の糖類結合因子に関する結合状態を決定することによって、同定される。次いで、試験生物学的サンプルにおける1つ以上の炭水化物ポリマーの炭水化物フィンガープリントは、1つ以上の参照生物学的サンプル由来である炭水化物ポリマーの炭水化物フィンガープリントと、比較される。様々な実施形態において、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、15個、20個、25個、28個、30個、35個、40個または全ての糖類結合因子の発現が、決定される。

40

**【0153】**

参照生物学的サンプルは、比較されるパラメータの状態が既知である細胞、または組織サンプル由来である1つ以上の炭水化物ポリマーを、含む。測定されたパラメータの様式(試験生物学的サンプル中の炭水化物フィンガープリントの存在または程度が明かされるような、様式)は、参照生物学的サンプルの組成物に依存する。例えば、参照生物学的サンプルが、目的のパラメータを有することが既知の細胞由来である場合、試験生物学的サン

50

ブルおよび参照生物学的サンプル中の類似した炭水化物フィンガープリントは、試験生物学的サンプルが目的のパラメータを有していることを、示唆する。

【0154】

種々の実施形態において、試験生物学的サンプル中の炭水化物ポリマーが、1個、2個、3個、5個、10個、15個、20個または25個よりも大きい糖類結合因子の差で、参照生物学的サンプル中の対応するフィンガープリントと異なる場合、これは、改変されたと見なされる。

【0155】

いくつかの実施形態において、試験生物学的サンプルの炭水化物フィンガープリントは、多数の参照生物学的サンプル由来の炭水化物フィンガープリントと、比較される。この比較は、個々の炭水化物ポリマーについてのフィンガープリントに関してか、または複数のポリマーについて作製された情報に基づく複合性のフィンガープリントに関して、なされ得る。

10

【0156】

試験リガンドに曝される（すなわち、接触される）試験生物学的サンプルは、かなり多数の細胞または組織（すなわち、1つ以上の細胞）から単離され得、そして、インビトロ、インビボ、またはエキソビボで提供され得る。様々な実施形態において、生物学的サンプルは、体液（例えば、血液、血液画分（例えば、血清または血漿）、尿、唾液、乳、腺液、涙および精液）由来であり得る。多糖類の精製は、当該分野において公知の方法を使用して、実施され得る。

20

【0157】

所望される場合、試験生物学的サンプルは、2つ以上の亜集団へ分割され得る。この亜集団は、できる限り同一である亜集団を作製するために、細胞、細胞抽出物、または画分を含む他の炭水化物ポリマーの第1集団を分割することによって、作製され得る。これは、例えば、インビトロ、またはエキソビボのスクリーニング法に適する。いくつかの実施形態において、種々の亜集団は、コントロール因子および/または試験因子、複数の試験因子、あるいは、例えば、一緒にかもしくは種々の組合せかで処方される、1つもしくは複数の種々の用量の試験因子に曝され得る。

【0158】

好ましくは、参照生物学的サンプルは、試験生物学的サンプルとできる限り類似した組織型由来である。いくつかの実施形態において、コントロール生物学的サンプルは、試験サンプルと同じ被験体由来（例えば、被験体の明確な領域由来、または異なる時期に採取された同じ被験体由来（例えば、サンプルは、治療を始める前、および後に、被験体から取られ得る））であり得る。他の実施形態において、参照生物学的サンプルは、複数の細胞由来である。例えば、参照生物学的サンプルは、本明細書に記載されたパラメータまたは状態（例えば、スクリーニング、診断、または治療適用）の1つが既知である、以前試験された細胞由来の発現パターンのデータベースであり得る。

30

【0159】

被験体は、好ましくは哺乳動物である。その哺乳動物は、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマまたはウシであり得る。

40

【0160】

（炭水化物ポリマーに関連する病態生理学の治療または予防に関する候補治療因子の同定）

本明細書中に開示された方法はまた、特定の炭水化物ポリマーフィンガープリントに関連する病態生理学に関する候補治療因子を同定するために、使用され得る。病態生理学への治療的応答または予防的応答に関連する炭水化物フィンガープリントプロファイルの特性を有する試験生物学的試験サンプルにおいて、この方法は、候補治療因子が炭水化物フィンガープリントプロファイルを誘導するか否かを決定するために、候補治療因子のスクリーニングに基づく。

【0161】

50

この方法において、試験生物学的サンプルは、標的因子または標的因子の組合せ（経時的にまたは継続的に）に曝露され、そして、1つ以上の試験因子の炭水化物フィンガープリントが決定される。試験生物学的サンプル中のこの炭水化物フィンガープリントは、参照生物学的サンプル中の炭水化物フィンガープリントと比較される。炭水化物フィンガープリントプロファイルの誘導は、病態生理学への治療的または予防的応答を示す。

**【0162】**

標的因子は、以前記載されていない化合物であり得るか、または以前から既知の化合物であり得る。目的の炭水化物フィンガープリントをもたらすこと、または炭水化物ポリマー含有化合物の出現を抑制することにおいて有効な因子はさらに、病態生理学を予防または回復するための能力、およびこのような病態生理学の治療に対して潜在的に治療上有用であるものとしての能力を試験され得る。このような化合物の臨床上的有用性のさらなる評価は、治療因子の毒性および臨床的有効性を評価するための標準的方法を使用して、実施され得る。

10

**【0163】**

（特定の被検体に適切な炭水化物ポリマー治療因子の選択）

個々の遺伝的性質の差異は、種々の薬物を代謝するための相対的能力の差異を生じ得る。炭水化物ポリマー治療因子として作用するような、被検体中で代謝される因子は、病態生理学的状態に特有の炭水化物フィンガープリントパターンから非病態生理学的状態に特有の遺伝子発現パターンへの変化を誘導することによって、それ自身を明示し得る。従って、本明細書中で開示される炭水化物フィンガープリントは、特定の被検体に適切な推定治療因子または推定予防因子が選択されることを可能にする。

20

**【0164】**

特定の被検体に適する因子を同定するために、この被検体からの試験生物学的サンプルは治療因子に曝され、そして、1つ以上の炭水化物ポリマーの炭水化物フィンガープリントが、決定される。いくつかの実施形態において、試験生物学的サンプルは、特定の細胞型（例えば、肝細胞または含脂肪細胞）を含む。他の実施形態において、この因子は、最初に細胞抽出物（例えば、脂肪細胞抽出物）と混合され、この細胞抽出物は薬物を活性形態に代謝する酵素を含む。次いで、治療因子の活性化形態は、試験生物学的サンプルと混合され得、そして、遺伝子発現が測定され得る。好ましくは、生物学的サンプルは、エキソビボで、因子または活性化形態の因子と接触される。

30

**【0165】**

次いで、試験生物学的サンプル中の炭水化物フィンガープリントは、参照生物学的サンプル中の炭水化物ポリマーの炭水化物フィンガープリントと比較される。参照生物学的サンプルは、病理学的状態が公知の細胞集団または組織から、単離される。参照生物学的サンプルが病理学に関連しない場合、試験生物学的サンプルと参照生物学的サンプルとの間の類似炭水化物フィンガープリントプロファイルは、この因子が、被検体中の病態生理学の処置に適していることを、示す。対照的に、試験生物学的サンプル中の配列と参照生物学的サンプル中の配列との間の発現の差異は、因子が被検体中の病態生理学の処置に適していないことを、示す。

**【0166】**

参照細胞が病理学に関連する場合、試験生物学的サンプルと参照生物学的サンプルとの間の炭水化物ポリマーフィンガープリントパターンの類似性は、因子が被検体中の病態生理学の処置に適していないことを、示す。この場合における遺伝子発現パターンの差異は、この因子が被検体の処置に適していることを、示す。

40

**【0167】**

（被検体における炭水化物ポリマーの改変体に関連する病態生理学を処置するための方法および組成物）

処置法（例えば、病態生理学に関する、1つまたは種々の炭水化物ポリマーの発現または活性を調節する因子を被検体に投与することによって、被検体中の炭水化物ポリマーに関連する病態生理学の開始を阻害、予防、または遅延すること）もまた、本発明中に含まれ

50

る。用語「調節する」は、炭水化物ポリマーの発現または活性の増加または減少を含むことを意味する。好ましくは、調節が、被検体中の炭水化物ポリマーの発現または活性を病態生理学に罹患されていない患者と類似なまたは同一なレベルまで改変する変質を、生じる。この被検体は、例えば、ヒト、げっ歯類（例えば、マウスもしくはラット、またはイヌもしくはネコ）であり得る。

【0168】

いくつかの実施形態において、因子は、炭水化物ポリマーの有効な形態である。

【0169】

これらの因子、ならびに他のポリペプチド、抗体、アゴニスト、およびアンタゴニストは、治療的に使用される場合、本明細書中で「治療剤」といわれる。治療剤の投与方法としては、以下が含まれるが、これらに限定されない：皮内、筋内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、および経口。本発明の治療は、任意の便利な経路（例えば、注入またはポラス注入、上皮または粘膜上皮を介した吸入（例えば、口腔粘膜、直腸粘膜および腸粘膜など））によって投与され得、そして、他の生物学的活性因子とともに投与され得る。投与は、全身性または局所性であり得る。さらに、任意の適切な経路（心室注入および鞘内注入を含む）によって、治療を剤中中枢神経系投与することは、好都合であり得る。心室注入は、リザーバー（例えば、Ommayaリザーバー）を装着された心室カテーテルによって、容易にされ得る。肺投与はまた、吸入器または噴霧器、およびエアロゾル化剤を用いる処方の使用によって、使用され得る。治療剤を、処置が必要な領域に局所的に投与することもまた、所望され得る；これは、例えば、以下によって達成され得るが、これらに限定されない：手術中の局所注入、局所適用、注入、カテーテル、坐剤、または移植。特定の実施形態において、投与は、悪性腫瘍もしくは悪性新生物、または全新生物組織の部位（または前部位）に直接注入することによるものであり得る。

【0170】

種々の送達システムが公知であり、そして、このシステムを利用して、以下を含む本発明の治療剤を投与し得る：例えば、(i) リポソーム中のカプセル化、微粒子、マイクロカプセル；(ii) 治療を発現できる組換え細胞；(iii) レセプター媒介エンドサイトーシス（例えば、WuおよびWu、1987、J Biol Chem 262:4429~4432参照のこと）；(iv) レトロウイルスまたは他のベクターの一部としての治療核酸の構築、など。本発明の1つの実施形態において、治療剤は、小胞（特定のリポソーム中の）中に送達され得る。リポソームにおいて、本発明のタンパク質は、他の薬学的に受容可能なキャリアに加えて、両親媒性因子（例えば、水溶液中で、ミセル、不溶性単分子層、液晶、または葉状層として凝集形態で存在する脂肪）と合わせられる。リポソーム処方に適する脂質としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：モノグリセリド、ジグリセリド、スルファチド、リゾレシチン、リン脂質、サポニン、胆汁酸など。このようなりポソーム処方の調製は、例えば、米国特許第4,837,028号；および同第4,737,323号（全て本明細書中で参考として援用される）中に開示されるように、当業者のレベルの範囲内である。なお別の実施形態において、治療剤は、以下を含む制御された放出システムにおいて、送達され得る：例えば、送達ポンプ（例えば、Saudekら、1989、New Engl J Med 321:574参照のこと）および半透明のポリマー剤（例えば、Howardら、1989、J Neurosurg 71:105参照のこと）。さらに、制御された放出システムは、治療標的（例えば、脳）の近傍に配置され得、従って、わずかな全身用量のみを必要とする。例えば、Godson、Medical Applications of Controlled Release 1984、(CRC Press、Boca Raton、FL)を参照のこと。

【0171】

本明細書中で使用する場合、用語「治療的有効量」は、有意な患者の利益（すなわち、関連する医療状態の処置、治療、予防もしくは回復、またはこのような状態の処置率、治療率、予防率または回復率の増加）を示すのに十分な薬学的組成物または薬学的方法の各活

10

20

30

40

50

性成分の全量を、意味する。個々の活性成分が適用され、単独で投与される場合、この用語は、その成分だけをいう。組み合わせて適用される場合、この用語は、組合せの投与、連続投与または同時投与であろうとなかろうと、治療上の効果を生じる活性成分の合わせた量をいう。

【0172】

特定の障害または状態の処置に有効な本発明の治療の量は、その障害または状態の性質に依存し、そして、当該分野の標準的臨床技術によって、決定され得る。さらに、インビボアッセイは、必要に応じて、最適な投与量範囲の同定を介助するために、使用され得る。処方物において使用される正確な投与量はまた、投与経路および疾患または障害の総合的な重篤度に依存し、そして、医師の判断および各患者の状況に従って、決定されるべきである。最終的に、主治医は個々の患者を処置するための、本発明のタンパク質量を決定する。最初は、主治医は低投与量の本発明のタンパク質を投与し、そして、患者の応答を確認する。より多い投与量の本発明のタンパク質は、最適な治療効果はその患者に対して得られるまで投与され得、その時、投与量はさらに増加されない。しかし、本発明の治療剤の静脈内投与についての適切な投与量範囲は、一般に、体重1kgに対して約20μg～約500μgの活性化化合物である。鼻腔内投与についての適切な投与量の範囲は、一般に、約0.01pg/kg体重～1mg/kg体重である。有効な投与量は、インビトロまたは動物モデル試験系から誘導される、投与量応答曲線から、推定され得る。坐剤は一般に、0.5重量%～10重量%の範囲の活性成分を含む；経口処方物は、好ましくは、10%～95%の活性成分を含む。

10

20

【0173】

本発明の薬学的組成物を使用する静脈内治療の継続期間は、処置される疾患の重篤度、および各個々の患者の状態および潜在的に特有な応答に依存して、変化する。本発明のタンパク質についての各適用の継続期間は、12時間～24時間の範囲内の連続静脈内投与であることが企図される。最終的に、主治医は、本発明の薬学的組成物を使用する静脈内治療の適切な継続期間を決定する。

【0174】

細胞はまた、このような細胞中の所望の効果、または細胞中の所望の活性を増殖するか、または生成するために、本発明の治療因子またはタンパク質の存在下で、エキソビボで培養される。次いで、処置された細胞は、治療の目的のために、インビボへ導入され得る。

30

【0175】

(炭水化物ポリマーに関連する病態生理学の処置の効率の評価)

本明細書中に開示されるような差次的なフィンガープリントの同定もまた、炭水化物ポリマーに関連する病態生理学の処置の経過の測定を、可能にする。この方法において、試験生物学的サンプルは、炭水化物ポリマーに関連する病態生理学に対する処置を受けている被験体から、提供され得る。所望される場合、試験生物学的サンプルは、処置前、処置中、または処置後の種々の時点にて、被験体から採取され得る。1つ以上の炭水化物ポリマーについての1つ以上の炭水化物フィンガープリントが、決定される。このフィンガープリントは、病態生理学の状態が公知である細胞を含む参照生物学的サンプル由来のフィンガープリントと、比較される。

40

【0176】

参照生物学的サンプルが、病態生理学が欠如する細胞由来である場合、試験生物学的サンプルと参照生物学的サンプルとの間の炭水化物フィンガープリント中の類似性は、処置が有効であることを示す。しかし、試験集団とこの参照生物学的サンプルにおける炭水化物フィンガープリント中の差異は、処置が有効でない事を示す。

【0177】

「有効」は、処置が被験体中の病態生理学の減少を導くことを、意味する。処置が予防的に適用される場合、「有効」は、この処置が病態生理学を遅延するか、または予防することを意味する。有効性は、特定の病態生理学処置するための、任意の公知の方法に関連して、決定され得る。

50

## 【0178】

(フィンガープリントマップ)

所望される場合、フィンガープリントは、実験データから得られたマップに従う炭水化物ポリマーを特徴付けるための系および方法を使用して、同定され得、そして比較され得る。好ましくは、このデータは、炭水化物ポリマーを特徴付けるための実験アッセイの複数の異なる型から、取得される。より好ましくは、このような少なくとも1つのアッセイは、糖類結合因子の炭水化物ポリマーへの結合に関する。次いで、複数の因子による結合マップは、炭水化物ポリマーを少なくとも部分的に特徴付けるために、分析される。炭水化物ポリマーの1つ以上の特色の少なくとも部分的な特徴付けのために、結合マップは、フィンガープリントを形成するために使用され、これはまた、アッセイの他の型からデータを

10

## 【0179】

これらの特色は、好ましくは、炭水化物ポリマーサンプルに関するアッセイから取得されたデータのマップから、誘導される。これらのマップは、より好ましくは、複数のレベル(各レベルは、より抽象的な生物学的情報を提供する)にて、分析され得る。最も好ましくは、実験データの新規な型は、データのより複雑な分析を支援するために、各レベルでの分析プロセスに導入され得る。必要に応じておよび最も好ましくは、実験データに適していないようなマップは、各レベルにて除外される。最も好ましくは、連続レベルのデータ分析での組合せ的爆発を避けるために、新規なマップがより高いレベルで導入された新規な実験データから誘導される場合にのみ、新規なマップは、そのレベルにて添加され得る。

20

## 【0180】

基本レベルにて、分析された結合データは、炭水化物ポリマーのためのフィンガープリントを決定するために、使用される。このフィンガープリントは、実際は、糖類結合因子による炭水化物ポリマーへの結合の存在の検出についての数値表現である。従って、フィンガープリント自体により、あるレベルにて、炭水化物ポリマーを特徴付ける。

## 【0181】

次に、フィンガープリントは、必要に応じて、実験データに適する種々の可能なマップを取得するために、内部的に分析される。例えば、モデル糖類結合因子のセットと特異的に結合するレクチンの特定のマップは、炭水化物ポリマーの特定の型または分類の存在を、示し得る。別の特定のマップは、特定の部位に結合するが、実際は結合していないレクチンまたは他の糖類結合因子に関して、偽陰性または「孔」の存在を、示し得る。偽陰性の存在は、糖類「近傍」の特定の型の存在を示し得、この糖類「近傍」は糖類結合因子の結合に影響を与え、その結果、特定の配列が存在したとしても、因子自体のその配列への結合は妨げられる。

30

## 【0182】

分析のこのレベルでは、別々で、相互に矛盾する多くのマップが考えられ得る。好ましくは、これらのマップに対するカットオフまたは確率的閾値は、可能な限り多くのマップが考えられるために、低い。次いで、これらのマップは、以下でより詳細に記載するように、好ましくは検査され、必要に応じて、分析の引き続くレベルにおいて排除される。

40

## 【0183】

分析の次のレベルでは、アッセイの他の型からの好ましい情報が、取り込まれる。これらのアッセイは、必要に応じて、そして好ましくは、実験上の人為的結果を減少、またはさらに排除するために、フィンガープリントデータに対するものと同様または類似な実験材料を用いて、実施される。さらに、少なくとも類似な実験材料の使用は、実験アッセイの正確な精度ではなく再現性のみを必要とすることで、サンプル炭水化物ポリマーの結果が標準的で既知の炭水化物ポリマーと比較され得る。例えば、このアッセイは、必要に応じて、グルコシダーゼ、還元末端の排除、および炭水化物ポリマーサンプルの他の改変の使用を含む。より好ましくは、以前取得されたマップは、実験データと矛盾するデータとして、このレベルで排除される。

50

## 【0184】

次のレベルは、好ましくは、データが外部のデータベースから組み込まれることを可能にし、その結果、必要に応じて、データは異なる実験材料から使用される。このような情報は、糖類、その供給源、および同様に可能な他の情報に組成に関連し得る。例えば、この情報は、この炭水化物サンプルが糖タンパク質の一部であろうとなかろうと、糖類結合因子（例えばサイトカイン）の他の型などの使用を含み得る。例えば、以前の段階から取得されたデータのマップは、明らかに糖類の供給源または組成に適合せず、次いで、これらのマップは排除されるべきである。このようなデータの導入は、好ましくは、既知の炭水化物ポリマーからの情報を用いて、少なくとも部分的に実施される。例えば、未知の糖類は、「EPO様」として分類され得、さらなる実験を導くことを助け得る。

10

## 【0185】

分析のさらなるレベルでは、データのマップが変換され、その結果、本来の生データについてのいずれの参考も、排除される。このような変換は、好ましくは、炭水化物ポリマーサンプル内の目的の特性部分を位置付けることによって、実施される。これらの目的の特性部分は、必要に応じて、より大きいポリマー配列内の単糖類の短い配列またはその配列の一部であり得る。このような特性部分の非常に単純な例は、グリコシダーゼ認識部位である。このような特性部分はまた、必要に応じて、「配列に基づく（基づいた）」特性部分として記載され、その時、これらは、少なくとも炭水化物ポリマーの配列の一部として、特徴付けられる。このような特性は、単なる再現性よりも、むしろ、実験データの絶対的正確さを必要とする不利さを有する。しかし、この特性は、かつて記載された外部のデータベースから得られるデータを介して、広範の種々の公知の異なる炭水化物ポリマーを通じて比較可能であるという有点を有する。

20

## 【0186】

あるいはおよび/またはさらに、ならびに好ましくは、これらの目的の特性部位は、目的の生物学的機能を有する機能的エピトープ、および/または配列に基づくエピトープに関する。「機能的」エピトープとは、炭水化物ポリマーの実際の配列に関係なく、少なくとも一部の炭水化物ポリマーが特定の機能および/または機能の型に関連しているようであることを、意味する。このような機能的エピトープは、必要に応じて、絶対的正確度よりもむしろ再現性の必要性のみを用いた複数の炭水化物ポリマーに関する同一のアッセイの実施を通じて、位置され得る。もちろん、機能的エピトープはまた、必要に応じて、配列によって特徴付けられ得、その結果、同一のエピトープはまた、必要に応じて、配列に基づくエピトープと機能的エピトープの両方であり得る。

30

## 【0187】

あるいはおよび/またはさらに、ならびに好ましくは、これらの目的の特徴部位は、「特徴付けられた」特性に関する。これらの特徴部位は、炭水化物ポリマーの分散した部分である必要は必ずしもないが、むしろ全ポリマーまたはそれらのいくつかの組合せの分類、機能または性質を示す。例えば、このような特徴付けられた特性は、炭水化物ポリマーが「EPO様」であることが決定されることを可能とし得る。この決定は、ポリマー内の特定の機能的エピトープの部位を直ちに生じる必要は必ずしもないが、例えば、炭水化物ポリマーが、このような機能的エピトープが存在する可能性についてさらに試験されるべきであるということの指標を提供し得る。

40

## 【0188】

本発明の原理および操作は、図面および添付の説明を参照して、より理解され得る。

## 【0189】

ここで図面について言及すると、図4は、目的の炭水化物ポリマーについてのフィンガープリントを決定するための生データを取得するために、先に援用されたPCT出願番号PCT/IL00/00256に従った模範的な実験系を示す。示されるように、系10は湿式アレイ12を特徴とし、ここで、実際のアッセイが複数の固定化糖類結合因子を用いて実施される。このような各固定化因子は、前決定されたアレイ部分14に位置し、これは、基質16上の前決定された位置にある。好ましくは、各アレイ部分14は、異なる固

50

定化糖類結合因子を特徴とする。示される複数のアレイ部分 14 は、湿式アレイ 12 の全体を含む。従って、各アレイ部分 14 は、湿式アレイ 12 上のアドレスである；このアドレスから取得されたデータは、以下でより詳しく記載するように、目的の炭水化物ポリマーについてのフィンガープリントの一部を形成する。

【0190】

次いで、炭水化物ポリマーが 1 つ以上の固定化された糖類結合因子に特異的に結合可能な条件の下で、炭水化物ポリマーを、湿式アレイ 12 を用いてインキュベートした。このような特異的結合は、特定の アレイ部分 14 での炭水化物ポリマーと固定化された糖類結合因子との複合体形成を導く。

【0191】

次いで、複合体の存在を、湿式アレイ 12 を用いる可溶化された第 2 の糖類結合因子のインキュベーションにより検出する。可溶化された第 2 の因子は、検出のための標識を特徴とする。従って、可溶化された因子が、任意の特定の アレイ部分 14 で複合体に結合した場合、このような複合体の存在は、標識を検出することにより検出され得る。次いで、検出デバイス 18 は、標識の存在を検出するために使用され、その結果、任意の特定の検出デバイス 18 の選択は、標識の性質に依存する。例えば、励起されそして蛍光を発するようになる色素のような色素標識は、検出デバイス 18 のためのカメラまたは他の画像化デバイスを用いて随意的に検出され得る。検出デバイス 18 は、各アレイ部分 14 からの標識からのシグナル間を識別可能であり得る。

【0192】

一旦各アレイ部分 14 からのシグナルが、検出デバイス 18 によって集められ、電子（デジタル）データに変換されると、得られた生データは、フィンガープリントの各アドレスについての数値が、湿式アレイ 12 についてのアドレスと一致するように、好ましくはフィンガープリントについて数値に変換される。この変換の過程は、必要に応じてそして好ましくは、コンピュータデバイス 22 によって操作するためのソフトウェアモジュールとして必要に応じて実行され得る、変換モジュール 20 によって行われる。次いで、このフィンガープリントデータは、データベース 24 に好ましくは保存され、より好ましくはコンピュータデバイス 22 によっても制御される。当然、コンピュータデバイスのネットワークにわたって分散する実装もまた、本発明の範囲内であり得る（示さない）。

【0193】

本発明の好ましい実施形態に従って、糖類結合因子のモデルセットが、このアッセイのために使用される。このモデル因子は、炭水化物ポリマーサンプルの個々の特徴付けを提供するために、好ましくは前もって選択される。例えば、前もって EPO から得られた結果に基づいて炭水化物ポリマーサンプルを特徴付けるために、モデル糖類結合因子は、「EPO 様」であるために必要に応じて選択され得る。特に、このような因子のモデルセットは、このような特徴付けを個別に示すデータを提供するために選択されるべきである。この因子は、必要に応じて、そしてより好ましくは、既知の標準的な炭水化物ポリマーに対して、異なる糖類結合因子を用いる実験を行い、次いで炭水化物ポリマーサンプルの特徴付けのために最も有用なデータを提供するそれらの因子を選択することにより選択される。

【0194】

因子のこれらの異なる型のモデルセットの 1 つの例は、病巣ライブラリーである。病巣ライブラリーの構成要素は、共通のリガンドと結合するか、または別の共通の機能的プロパティもしくは構造的プロパティを共有するので、選択される。後者の例としては EPO、インターフェロン、CGSF および HCG のような糖タンパク質の改変体形態が挙げられる。

【0195】

次に、必要に応じてそして好ましくは、炭水化物ポリマーサンプルのフィンガープリントと少なくとも 1 つの他のフィンガープリントとを比較するための比較方法が実行される。より好ましくは、比較のためのフィンガープリントは、標準的な既知の炭水化物ポリマーか

10

20

30

40

50

ら得られるか、あるいは、他のフィンガープリントもまた、必要に応じて別の炭水化物ポリマーサンプルから得られ得る。このような方法の例が、図5に関して記載されている。

【0196】

第1の工程では、比較フィンガープリントを得る。上記に記載されるように、比較フィンガープリントは、好ましくは標準的な既知の炭水化物ポリマーから得られる。しかし、フィンガープリントデータの由来に関わらず、好ましくは比較フィンガープリントデータは、そのデータを得るために使用された少なくとも糖類-結合因子セットを含む、実験条件についての情報を含み、より好ましくは、洗浄条件、インキュベーション条件のストリンジェンシー、可溶化された糖類結合因子の標識の型などについての情報を含む。

【0197】

第2の工程では、フィンガープリントの実際のアドレスを、比較する。必要に応じて比較をアドレス毎に行い、少なくとも1つの比較の肯定的な結果が、正の数値を与えられる。より好ましくは、比較の否定的な結果は、負の数値を与えられる。次いで、第2の工程は、好ましくは比較される全てのアドレスについて繰り返される。

【0198】

第3の工程では、アドレス毎の比較についての全ての数値が、いくつかの関数に基づいて好ましくは類似因子 (similarity factor) に変換される。この関数は、必要に応じて単純であり、例えばアドレス毎の比較プロセスからの全ての正の値と負の値を加算するものである。あるいは、そして好ましくは、この結果は、重みづけられ得る。より好ましくは、この結果は、前に記載された実験条件に由来する解釈用の情報に基づいて重みづけられ得、その結果、例えばより大きな重みが、フィンガープリントの2つのアドレスの間の比較の結果として必要に応じて与えられ、ここでさらなる確実性が、実験結果に対して割り当てられ得る。

【0199】

2つのフィンガープリントを比較するための定量的ツールの例は、必要に応じて、そしてより好ましくは、類似性/非類似性の単なる数値測定とは対照的に、2つ以上のフィンガープリント間の距離を再帰する利点を有する系統的な分析を使用する。生物学的配列(例えば、タンパク質配列またはDNA配列)間の進化的関係を調べるために最初に使用される、系統的分析は、2つ以上の配列間の距離の定量的測定、または2つ以上の配列間の差異の程度を提供する。系統的分析の使用は、本発明の任意であるが好ましい実施形態に対して特に好ましく、この本発明の任意であるが好ましい実施形態において、サンプル炭水化物ポリマーのフィンガープリントは、多数のこのようなフィンガープリントを含むデータベースと比較される。より好ましくは、フィンガープリントデータは、標準的な炭水化物ポリマーのフィンガープリントデータである。いかなる場合においても、本発明のこの好ましい実施形態について、工程3は、異なる関数で置換され、これは必要に応じて、データベース中の各フィンガープリントについて工程2を反復することを必要とする。

【0200】

系統的分析は、長年研究されていて、そして当該分野における周知の話題であるので、多くの異なる方法が当該分野で公知である。さらに、多数の企業が、系統的情報を分析するための多数の製品および有用物を提供している。

【0201】

本発明に従って、必要に応じて、そしてより好ましくは、系統的情報を計算するために以下の関数を使用され、ここで、フィンガープリントの情報は、距離の行列として表現される。これらの距離は、必要に応じて、いくつかの公知の関数(例えば、Hamming関数など)に従って得られる。本発明の好ましい実施形態に従って、距離は、以下のように得られる:

【0202】

【数2】

10

20

30

40

$$(4) \quad D = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^C V_i$$

ここで：

Dは、距離についての表示であり；

Nは、フィンガープリント1およびフィンガープリント2の中のアドレスの数であり；

Cは、フィンガープリントのアドレス*i*において識別され得る最大のカラー数であり；

$V_i$ は、フィンガープリント1のアドレス*i*中に見出されるカラーがフィンガープリント2中の同じアドレスに存在する場合、1であり、そうでなければ、 $V_i$ は、0である。

#### 【0203】

先の2つの図は、実験的フィンガープリントデータを得るため、そして2つ以上の炭水化物ポリマー間のフィンガープリントデータを比較するための、いくつかの基礎的なツールを記載する。次の図は、フィンガープリントデータからのより高レベルの情報（例えば、サンプル炭水化物ポリマーを特徴付けるマップなど）を誘導するための方法を記載する。後の各図の方法は、サンプル炭水化物ポリマーのマップまたは他の特徴付け（これは、排除される実験データに適合しない）を獲得し、そしてまた必要に応じて、サンプル炭水化物ポリマーのマップまたは他の特徴付けを可能にする、高レベルの情報を増大させることを可能にする。好ましくは、各高レベルにおいて、さらなる実験データおよび分析を、マップを獲得および調べるためのプロセスに取り込み、可能な限りサンプル炭水化物ポリマーを特徴づけ、そしてまた、個々の実験から誘導され得る有用な情報を拡張する。

#### 【0204】

本発明の好ましい実施形態に従って、サンプル炭水化物ポリマーのフィンガープリントは、図6の方法に関して記載されるように、それ自体内的に分析されて、フィンガープリントデータを拡張する。この例示的な方法に従って、フィンガープリントアドレスは、最初に、再帰的に分析されて、簡単なマップまたはマップフラグメントを見出す。次に、このマップフラグメントは、好ましくは再び再帰的分析を介して、大きなマップに集合される。必要に応じて、そしてより好ましくは、このマップは、Q S A R（定量的構造 - 活性関係）アルゴリズムにおける使用のために、プロパティベクトル、またはプロパティデスクリプターに変換される。これは、フィンガープリントデータを構造プロパティ（すなわち、シアル酸含有量レベル、特定のモノマーまたはダイマーの存在または非存在など）を直接記載する数値のセットに変換する。Q S A Rは次に、必要に応じて分子薬物設計における活性の推定のために使用され得る。

#### 【0205】

図6に関して示されるように、この方法の第1段階において、サンプル炭水化物を特徴付ける第1セットのマップが、好ましくは、必要に応じてフィンガープリントデータの再帰的分析を介して作製される。このような再帰的分析は、必要に応じて単純に、フィンガープリントの各アドレスを工程1における1つ以上の他のアドレスの配列と連続的に組み合わせる形態をとり得る。次に工程2において、このような各組み合わせを分析して、このマップ（またはマップのフラグメント）が内的に整合するか否かを決定する。工程3において、内的に整合することが示されたマップまたはマップのフラグメントを、次の段階の分析のために保持する。

#### 【0206】

この型の分析の例として、マップは、サンプル炭水化物ポリマーが切断剤を用いて最初に消化され、その後の工程において結合剤と反応させる実験から獲得され得る。このようなアッセイは、P C T出願P C T / I L 0 0 / 0 0 2 5 6に関してより詳細に記載される。しかし、簡単な例として、還元末端において標識されるサンプル炭水化物ポリマーを、第1の糖結合剤（これは、必要に応じて、認識配列aを有するグリコシダーゼであり得る）

と反応させる。コントロール反応において、標識されたサンプル炭水化物ポリマーを、未処理のままにする。次いでこの反応を、固定された糖結合剤（これは、必要に応じて、認識配列 b を有するレクチンであり得る）と独立してさらに反応させる。未結合のサンプル炭水化物ポリマーを洗浄除去した後、検出工程を実施する。標識の存在は、部位 b がサンプル炭水化物ポリマー中に存在することを示す。

**【0207】**

第1の糖結合剤が存在する反応を第1の糖結合剤が存在しない独立したコントロール反応と比較することによって、標識の存在下におけるグルコシダーゼの効果が決定され得る。例えば、標識が、認識配列 b を有するレクチンに対する結合後にコントロール反応の中で検出されるが、第1の糖結合剤が認識配列 a を有するグリコシダーゼである反応中で検出されない場合、認識部位の配列は、b - a 還元末端である。他方、標識がコントロール反応およびグリコシダーゼ反応の両方に存在する場合、これは、認識部位の配列が、a - b 還元末端であることを示す。認識部位 a は、サンプル炭水化物ポリマーの内側に位置し得ず、すなわち、認識部位 a は、糖配列中に存在し得ない。

10

**【0208】**

本発明の好ましい実施形態に従って、工程1は、階層的な木 (hierarchical tree) の上の節 (node) としてフィンガープリントの各アドレスを最初に配置することによって実施される。フィンガープリントアドレスによって示されるデータの型に依存して、このアドレスは、必要に応じて、1つより多くの節の上に現れ得る。好ましくは、この木の階層は、多数のデータカテゴリーに従って構築される。例えば、この木の 20 一部は、必要に応じて、サンプル炭水化物ポリマーに対する糖結合剤の単純な結合を示し得る。次いで、この木のこの部分は、好ましくは、各糖結合剤の特徴付けに従って、例えば、薬剤の型 (レクチン、抗体など) に従って、サンプル炭水化物ポリマーに対するその薬剤の効果 (結合、切断など) に従って、可溶化された糖結合因子に対する標識の型に従って、構築される。

20

**【0209】**

次に、工程2において、この木は、例えば、根の節 (root node) として木の各アドレスを使用することによってか、あるいは、木の各節からその木の他の節へと移動することによって再帰的に調べられて、マップまたはマップのフラグメントを確立し得る。この方法の利点は、この木が、生物学的に有用なカテゴリーおよび/またはパラメーター 30 に従って構築される場合、この木の節から構築されるマップは、内的に整合するはずである。このプロセスは、必要に応じて、何回も繰り返され、大きなマップを構築し得る。

30

**【0210】**

このような木を構築および調べるための手順の例は、必要に応じて、そして好ましくは、以下のように実施される。レクチンは、必要に応じて、実験アッセイ (例えば、図4に関して記載されるアッセイ) のための糖結合剤として使用され得る。好ましくは、このようなレクチンは、レクチンの対として使用される：炭水化物ポリマーが最初に結合して複合体を形成する、固体支持体の表面上に固定された第1のレクチン；および、複合体への結合のための、第2の可溶化されたレクチン。第2のレクチンは、好ましくは、標識を特徴とし、複合体の存在が検出されることを可能にする。レクチンのこれらの対は、必要に応じて、クラスタアルゴリズムを用いて 40 関連付けられ得、その結果、レクチン対についての結果の間の「関連性」または距離が、炭水化物ポリマーに対するそれらの結合挙動から決定され得る。次いで、このような相互関係は、必要に応じて、木を形成するために使用され得、その結果、この木の各節は、相対的な距離に従って、他の節に対して関連付けられる。あるいは、この相互関係は、必要に応じて、標準的な既知の炭水化物ポリマーに関するレクチンの挙動に従って、木の節を構築するために使用され得る。

40

**【0211】**

レクチンが木において系統付けられ得る測定の一つの例は、以前に記載された、Hamming 距離、または Jaccard 類似性測定である。non-zero ベクトルである  $v_1$  と  $v_2$  との間の Jaccard 類似性測定は、以下：

50

Jaccard 測定 =  $a_{11} / (a_{11} + a_{01} + a_{10})$

のように規定され、ここで、 $a_{ij}$  は、 $v_1$  が値  $i$  を有し、 $v_2$  が値  $j$  を有する次元の数である。この類似性測定は、レクチン対間の結果の類似性、ならびに異なるフィンガープリント間の結果の類似性を決定するための使用され得る。例えば、木は、必要に応じて、既知の炭水化物ポリマーについての異なるフィンガープリントから構築され得、これは次いで、サンプル炭水化物ポリマーについての結果に対して、その類似性について調べられる。

#### 【0212】

好ましくは、多数の型のフィンガープリントデータが、これらのマップに取り込まれ、必要に応じて、このアッセイが実施される前にサンプル炭水化物ポリマーの改変を含むフィンガープリントデータも含む。例えば、ポリマーは、必要に応じて、分子を切断するためのグリコシダーゼ；還元末端の排除；および必要に応じて標識を有する1つ以上の糖をサンプル炭水化物ポリマーに対して付加するためのグリコシルトランスフェラーゼを用いて、改変され得る。標識を有する糖での改変が、「二重標識」実験に対して特に好ましく、ここで、図4のアッセイの第2の糖結合剤は、第2の標識を有する。従って、2つの標識のマップは、サンプル炭水化物ポリマーの構造に関するさらなる情報を提供する。

10

#### 【0213】

これら異なる型の実験データが、必要に応じて、サンプル炭水化物ポリマーについての単一フィンガープリントに取り込まれ得るが、このような取り込みは必要とは限らないことに留意すべきである。

20

#### 【0214】

あるいは、異なる型のデータが、そのポリマーについてのマップを作製するためにフィンガープリントの補助として使用され得る。いかなる場合においても、これら異なる型の実験データは、少なくとも類似の条件を用いて少なくとも類似の実験材料に対して実施された実験アッセイから得られるべきである。より好ましくは、この実験材料および条件は、特に異なるポリマーの間（例えば、標準の既知の炭水化物ポリマーとサンプル炭水化物ポリマーとの間）の比較について、同一である。

#### 【0215】

必要に応じて、そしてより好ましくは、マップは、例えば、QSAR（定量的構造 - 活性関係）アルゴリズムにおける使用のために、プロパティベクトル、またはプロパティデスクリプターに変換される。各適切なベクトルは、サンプル炭水化物ポリマーの構造的プロパティおよび/またはフィーチャーの定量的な描写である。ベクトル中の各数値は、好ましくはプロパティまたはフィーチャー（例えば、シアル酸含有量レベル、その炭水化物配列中の特定のモノマーまたはダイマーの存在または非存在など）に対応する。このようなプロパティベクトルはまた、必要に応じて、より定性的なプロパティを記載するためのデータを特徴とし得る。

30

#### 【0216】

変換プロセスは、好ましくは、マップを構築するためにフィンガープリントの多数の数値を関連付けることによって実施される。このような相関は、必要に応じて、フィンガープリントデータを「テンプレート」と比較し、プロパティまたはフィーチャーが存在するか否かを決定することによって実行される。あるいは、プロパティベクトル中の値は、必要に応じて、以下の図7に関してより詳細に記載されるように、他の型の実験からの結果を統合することによって獲得され得る。例えば、プロパティベクトル中の値は、必要に応じて、サンプル炭水化物ポリマーの糖含有量から誘導され得る。

40

#### 【0217】

このようなさらなる情報によって、多数の局面でのデータの解釈が高められ得る。第1に、必要に応じてこれを使用して、異なる型の実験アッセイ由来の可能性のある部位であると同定された部位から、不可能な認識部位または少なくとも非常に可能性が低い認識部位を排除し得る。例えば、レクチンが糖結合剤として使用されるアッセイについて、多くのレクチンがグルコース（Glc）およびマンノース（Man）の両方に特異的に結合する

50

が、多くのグリカンは、Glcを含まない。従って、これらのレクチンへの結合の存在は、Manのみの存在を示す。

【0218】

さらに、このような情報は、必要に応じて、データ解釈における多義性を示唆し得、そのデータ中に存在しない情報を付加し得る。後者の機能の例は、Kdo（これは、LPS（リポポリ多糖）中の単糖である）の存在の検出であるが、これは、レクチン結合データに従って検出することはできない。このような情報はまた、特定の仮説を確認/却下するための強力な手がかりを示し得る。

【0219】

しかし、このような情報は、単糖組成物に限定されるべきではない。なぜなら、この単糖組成物は、単に非限定的な例示の例として意図されるからである。その代わりに、この情報は、必要に応じて、実験アッセイからのデータ；構造情報（例えば、どれくらいの長さの種が、ポリマーの特定の切断によって作製されるか）；医薬情報および起源の情報（なぜなら、例えば、哺乳動物炭水化物ポリマーは、植物炭水化物ポリマーよりも単糖組成物により限定され、そして両方とも、細菌炭水化物ポリマーよりも限定されるからである）を含み得る。

10

【0220】

図7は、外部データベースからのデータを統合することによってフィンガープリントデータを拡張するための、本発明に従う例示的な方法のフローチャートである。「外部データベース」とは、そのデータが、同じ材料に対して実施されていない実験から得られることを意味し、その結果、同じ実験条件がデータセットの両方に対して適切される必要はない。このような情報は、糖の組成、その供給源、および可能性のある他の情報も同様に、関連し得る。

20

【0221】

例えば、この情報は、サンプル炭水化物が糖タンパク質の一部であるか否か、炭水化物結合剤の他の型（例えば、サイトカイン）の使用などを含み得る。このようなデータの導入は、好ましくは、少なくとも部分的に、例えば、標準の参照炭水化物ポリマーとしての既知の炭水化物ポリマー（例えば、EPO）からの情報を用いて実行される。

【0222】

図7に関して示されるように、工程1において、データは、外部データベースから読み出され、そしてデータのフォーマットが分析される。工程2において、データのフォーマットがそのポリマーの特定の局面を特徴付ける1つ以上の数値を含む場合、これらの値は、必要に応じて、サンプル炭水化物ポリマーについての「フィンガープリント」を作製するために使用される。例えば、アッセイがサンプル炭水化物ポリマーを用いて実施されて、糖含有量を決定する場合、相対量および異なる型の糖の同定が、このようなデータのフィンガープリントに明確に変換される。

30

【0223】

あるいは、工程3において、データのフォーマットが生の実験結果を含む場合（例えば、グリコシダーゼを用いた炭水化物ポリマーの切断後の、PAGE（ポリアクリルアミドゲル電気泳動）ゲル上のバンドのマップなど）、そのデータは、好ましくは、1つ以上の数値に変換される。例えば、バンドのマップは、特定の分子量でのバンドの存在または非存在を決定し、次いで各分子量において二値（正/負）を用いて「フィンガープリント」を作製することによって、必要に応じて変換され得る。あるいは、フィンガープリントは、必要に応じて、一連の数値としてバンドの一連の分子量を含み得る。PAGEゲルアッセイが、単に非限定的な例として意図され、そして他の型のアッセイデータ（例えば、カラムクロマトグラフィーデータ）もまた、必要に応じて組み込まれ得ることに留意すべきである。

40

【0224】

データの形式はまた、必要に応じて、2つの異なる型の実験結果を含み得、これらはその後好ましくは相関付けられて、フィンガープリントを形成する。例えば、PAGEゲルア

50

ッセイは、種々の型のグリコシルトランスフェラーゼを用いた末端標識または他の末端標識機構の付加によって実施され得る。そしてこのゲルは、2つの型のデータを含む：特定の分子量でのバンドの存在；および特異的な標識バンドの存在。次いで、フィンガープリントは、必要に応じて、数値として（例えば、標識の効果を示すための二値（正/負）を用いたバンドの分子量として）両方の型のデータを示すように作製され得る。

#### 【0225】

好ましくは、これらの外部「フィンガープリント」はまた、サンプル炭水化物ポリマーについてのデータ比較のための参照として、標準的な既知の炭水化物ポリマーについて作製される。このような外部「フィンガープリント」は、必要に応じて、標準的な炭水化物ポリマーに対する特別な実験アッセイの性能によって誘導され得るか、あるいは、既存のデータをフィンガープリント形式に変換することによって誘導され得る。

10

#### 【0226】

工程4において、これらのフィンガープリントは、好ましくは、サンプル炭水化物ポリマーについて、図6中の以前のレベルから誘導されたマップに対して比較される。これらのマップのいずれかは、さらなるフィンガープリントデータと整合し、これらは必要に応じてかつ好ましくは、除外される。例えば、レクチン結合情報は、単糖Fuc（フコース）が存在しない可能性を示し得る。他方で、このような可能性は、炭水化物ポリマーの単糖組成物（これは、Fucの存在を示し得る）によって直接否定され得る。このような状況において、後者のデータの付加は、必要に応じて、Fucを含まないマップが好ましくはさらなるデータと矛盾するとして除外されるべきであることを示し得る。

20

#### 【0227】

工程5において、必要に応じてかつより好ましくは、さらなるフィンガープリントデータを使用して、新規マップを作製する。これらの新規マップは、最も好ましくは、図6の方法に従って作製され、この方法は、実験データの供給源にかかわらず、この形式のフィンガープリントデータを用いた使用に適している。

#### 【0228】

新規マップの任意の作製または既存するマップの任意の除外の両方が、炭水化物ポリマーについての確率空間の試験例である。以下に記載される方法とは異なり、これらのマップはなお、必要に応じて、フィンガープリントまたは他の実験データと直接関連し得る。しかし、この確率空間は、他の型の生物学的ポリマー（例えば、DNAなど）についてよりも検索がより困難である。なぜなら、実験データの再現性に対する要求のみで精度に対する要求がないからである。従って、確率空間または組み合わせ空間は、他の型の生物学的ポリマーについて検索することよりもはるかに増大する。

30

#### 【0229】

図8は、サンプル炭水化物ポリマー内に目的のフィーチャーを配置するための、本発明に従う例示的な方法のフローチャートである。この点において、このマップは、本来の生のデータに対するいかなる参照をももはや含むべきではなく、代わりに配列エレメントを含むべきである。いくつかの生のデータは、いかなる有用な情報も生じ得ない。配列エレメントは、ここで、3次元データベース（これは、3次元（構造）情報の断片を保存している）と比較され得る。

40

#### 【0230】

このプロセスは、実際に、組み合わせ検索、すなわち、組み合わせ空間における検索である。なぜなら、マップの各々が、炭水化物ポリマーの配列、構造、機能、またはこれらのいくつかの組み合わせを記載する関連するエレメントの可能性のある組み合わせを表すからである。これらのマップは、次に、炭水化物ポリマーの異なるより高いレベルのフィーチャー（これは、そのポリマー内の目的の特定の配列、構造、および/または機能に関連する）について検索するために使用され得る。

#### 【0231】

図8に関して示されるように、工程1において、残ったマップは、必要である場合（この工程は、必要に応じて、マップを作製するプロセスの一部として既に実行されているかも

50

しれない)、高いレベルのフィーチャーに最初に変換される。例えば、このマップは、好ましくは種々の機能的エピトープおよび/または配列ベースのフィーチャーに適合するように変換され、そしてフィーチャーを特徴付ける。この工程は、特に、標準的な参照炭水化物ポリマーに対する先の比較からのデータの存在によって補助される。なぜなら、このような比較は、機能的フィーチャーを配置するために特に有用であるからである。

#### 【0232】

これらの目的のフィーチャーは、必要に応じて、より大きいポリマー配列内の短い配列または単糖配列の一部であり得る。このようなフィーチャーの非常に簡単な例は、グルコシダーゼ認識部位である。このようなフィーチャーはまた、必要に応じて、これらが炭水化物ポリマーの配列の少なくとも一部によって特徴付けられるという点で、「配列ベース」のフィーチャーとして記載され得る。このようなフィーチャーは、単なる再現性よりも、実験データの完全な精度を必要とするという不利な点を有する。しかし、これらは、以前に記載された外部データベースから得られるデータを介して、広範な種々の異なる公知の炭水化物ポリマーに対して比較可能であるという利点を有する。

10

#### 【0233】

あるいは、および/またはさらに、そして好ましくは、目的のこれらのフィーチャーは、目的の生物学的機能を有する機能的エピトープおよび/または配列ベースのエピトープに関する。「機能的」エピトープとは、炭水化物ポリマーの実際の配列にかかわらず、特定の機能および/または機能の型と関連するようである、炭水化物ポリマーの少なくとも一部を意味する。このような機能的エピトープは、必要に応じて、完全な精度よりも、再現性のみを必要としながら、複数の炭水化物ポリマーに対する同じアッセイの性能を介して位置付けられ得る。当然、この機能的エピトープはまた、必要に応じて、配列によって特徴付けられ得、その結果、同じエピトープが、必要に応じて、配列ベースのエピトープおよび機能的エピトープの両方であり得る。

20

#### 【0234】

さらにあるいは、および/またはさらに、そして好ましくは、目的のこれらのフィーチャーは、「特徴付け」フィーチャーに関する。これらのフィーチャーは、炭水化物ポリマーの分離した部分である必要はないが、むしろ、ポリマー全体の分類、機能もしくは性質、またはこれらの組み合わせを示す。例えば、このような特徴付けフィーチャーは、炭水化物ポリマーが「EPO様」であることを決定されることを可能にし得る。この決定は、ポリマー内の特定の機能的エピトープの位置をすぐに生じる必要はないが、例えば、その炭水化物ポリマーが、このような機能的エピトープが存在する可能性についてさらに調べられるべきであることの指標を提供し得る。

30

#### 【0235】

工程2において、これらのより高いレベルの特徴は、内部整合性について比較される。任意の2つのこのような特徴が矛盾するか、または相互排他的である場合、どちらが正しいかを決定することは不可能であるので、必要に応じて、そして好ましくは、このような特徴は両方とも、さらなる考察から除去される。しかし、さらなるデータが利用可能になる場合、例えば前記のように、このデータに従って、これらの特徴の2つに1つが保持され得る。

40

#### 【0236】

工程3において、これらのより高いレベルの特徴は、このような特徴のデータベースと比較され、このデータベースは、好ましくは、炭水化物ポリマーの構造的要素および/または機能的要素を含む三次元データベースとして実施される。例えば、このような特徴は、目的のエピトープを位置付けるために、必要に応じて用いられ得、次いでこのエピトープは、サンプル炭水化物ポリマーの型または機能に関する情報を提供し得る。

#### 【0237】

本発明は、以下の実施例においてさらに例示され、これらの実施例は、添付の特許請求の範囲を限定しない。

#### 【0238】

50

(実施例 1)

(第 1 および第 2 の配列特異性因子として抗体を用いる糖分子分析)

この実施例は、本発明に従う糖分子分析技術をさらに例示する。第 1 および第 2 の配列特異性因子として、抗体を用いる。以下の表は、例示目的で示される 2 つの異なる糖類 (HS および NS) での反応結果を列挙する。

【0239】

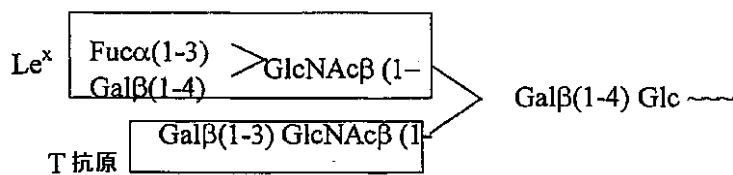
糖類の構造は以下の通りである：

【0240】

【化 1】

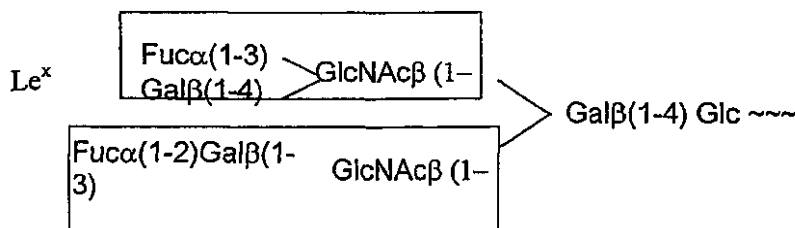
MFLNH-II (HS):

10



20

NS:



30

Le<sup>b</sup> >

表 2 は、糖類と、本質的に配列特異的な第 1 および第 2 の因子との、反応結果を列挙し、これらの因子は T 抗原、Lewis<sup>x</sup> (Le<sup>x</sup>)、または Lewis<sup>b</sup> 抗原 (Le<sup>b</sup>) に対する抗体である。本質的に配列特異的な第 1 の因子をマトリクス (好ましくは、固相微小粒子) に固定する。本質的に配列特異的な第 2 の因子を、蛍光因子 (すなわち、ニール (nil e) 赤色または緑色) で標識する。さらに、本質的に配列特異的な第 2 の因子に対するマーカーとして作用する、ニール赤色標識または緑色標識と明確に識別可能な標識を用いて、糖類の還元末端を標識する。表 2 は糖類 HS に対する反応を列挙し、それに対し表 3 は、糖類 NS に対する反応を列挙する。

40

【0241】

【表 2】

表 2

マトリクス上	抗 T 抗原	抗 Le <sup>x</sup>	抗 Le <sup>b</sup>
結合された糖	HS	HS	
第 2 の mAb	ナイル赤色 抗 Le <sup>x</sup>		
シグナル	ナイル赤色、還元末端	還元末端	なし

【 0 2 4 2 】

【 表 3 】

表 3

マトリクス上	抗 T 抗原	抗 Le <sup>x</sup>	抗 Le <sup>b</sup>
結合された糖		NS	NS
第 2 の mAb		緑色 抗 Le <sup>b</sup>	ナイル赤色 抗 Le <sup>x</sup>
シグナル		緑色、還元末端	ナイル赤色、還元末端

10

まとめると、本質的に配列特異的な第 1 の因子として示される抗体（列）を用いる場合、糖類 HS または NS（行）の反応において、ここで以下のシグナルが検出可能である：

20

【 0 2 4 3 】

【 表 4 】

表 4

マトリクス上	抗 T 抗原	抗 Le <sup>x</sup>	抗 Le <sup>b</sup>
HS	ナイル赤色、還元末端	還元末端	
NS		緑色、還元末端	ナイル赤色、還元末端
NS		緑色、還元末端	ナイル赤色、還元末端

30

この標識を検出し、各反応についての結果を記録した後、本質的に配列特異的な第 3 の因子を添加する。この実施例において、本質的に配列特異的な第 3 の因子での 2 つの独立した反応を用いる。ここで、糖分子を保有する固相を、1 - 2 フコシダーゼまたはエキソガラクトシダーゼ（本質的に配列特異的な第 3 の因子）のどちらかでの反応のために、アリコートに有利に分割し得る。あるいは、本質的に配列特異的な第 1 および第 2 の因子での 3 組の反応を、実行し得る。

40

【 0 2 4 4 】

【 表 5 】

表 5

α1-3,4フコシダーゼ適用後の反応：

マトリクス上	抗 T 抗原	抗 Le <sup>x</sup>	抗 Le <sup>b</sup>
HS	還元末端		
NS			

【 0 2 4 5 】

【 表 6 】

表6

D. pneumoniae由来のエキソβガラクトシダーゼ適用後の反応

(Boehringer Mannheim, 68298 Mannheim, GermanyからのEC 3.2.1.23カタログ番号1088718)

マトリクス上	抗T抗原	抗Le <sup>x</sup>	抗Le <sup>b</sup>
HS	ナイル赤色		
NS		緑色	ナイル赤色

【0246】

【表7】

表7

α1-2フコシダーゼ適用後の反応：

(表7の続き)

マトリクス上	抗T抗原	抗Le <sup>x</sup>	抗Le <sup>b</sup>
HS	ナイル赤色、還元末端	還元末端	
NS		還元末端	

ここで、上に示したように収集されたデータから、糖分子同一性(GMID)カードを作成し得る。このような情報の例を、糖類HSについて表8に、そして糖類NSについて表9に列挙する。

【0247】

【表8】

表8

マトリクス上	抗T抗原	抗Le <sup>x</sup>	抗Le <sup>b</sup>
0	ナイル赤色、還元末端	還元末端	
1	還元末端	-	-
2	ナイル赤色		
3	ナイル赤色、還元末端	還元末端	

【0248】

【表9】

表9

マトリクス上	抗T抗原	抗Le <sup>x</sup>	抗Le <sup>b</sup>
0		緑色、還元末端	ナイル赤色、還元末端
1	-	-	-
2		緑色	ナイル赤色
3		還元末端	

本質的に配列特異的な第2および第3の因子の同一性は、このようなデータリストで開示される必要はない。比較目的のために、特定のコード番号(上記の表の1、2または3)が常に試薬の特定の組み合わせを同定することは、十分である。

【0249】

(実施例2)

(還元末端を連続的に標識するためのスキーム)

上記の説明および実施例において示しているように、本発明の方法は、研究される糖の還元末端での標識化を有利に用いる。しかし、この標識化技術は、糖内部の部位に及び得、

10

20

30

40

50

従って、さらなる情報を提供することによって、本発明の方法に寄与し得る。エンドグリコシダーゼを用いる切断に続く、還元末端の標識化によって、鎖内の糖を標識することが可能であるので、従って、糖鎖内に標識された還元末端を得ることが可能である。この還元末端は、本来の還元末端と比較した場合、第1、第2および第3の、本質的に配列特異的な因子に対する結合部位と本質的により近いので、内部に作製された標識還元末端の使用は、さらなる情報を提供する。さらに、以下にさらに記載される方法に従う、還元末端の連続的な標識によって、研究される糖の鎖上において連続的な順序にある、異なるグリコシダーゼに対する部位を、同定することが可能である。

#### 【0250】

ここで、還元末端の連続的な標識の方法を、以下の工程においてより詳細に記載する。

10

#### 【0251】

##### (1. ブロッキング)

還元末端を有する多糖を、 $\text{NaBH}_4$  /  $\text{NaOH}$ を含むpH 11.5の溶液中で、インキュベートする。

#### 【0252】

この処理は、還元末端をブロックし、それによってこの多糖はここで、還元末端(RE)を欠く。

#### 【0253】

##### (2. 露出)

工程1の多糖を、エンドグリコシダーゼで処理する。このエンドグリコシダーゼに対する認識部位が多糖内に存在する場合、多糖の切断によって、新しい還元末端が作製される。ここで、この溶液は2つの糖を含む：エンドグリコシダーゼ部位に、新しく露出されたREを有するフラグメント、および、REがブロックされている第2のフラグメント。

20

#### 【0254】

##### (3: 還元末端の標識化)

この反応は、例えば、2-アミノベンズアミド(Oxford Glycosystems Inc.によって、糖を標識するためのキットの形態で市販されている(1994年カタログ、62頁))を用いて行われ得る。高い水素濃度および高い温度(H+/T)の条件下での反応に続き、還元が完了した後、この混合物は、2つのフラグメント(このうち一方は還元末端において標識されているが、他方は、還元末端がブロックされているという事実に起因して、標識されないままに残る)を含む。

30

#### 【0255】

還元末端を標識する別の方法は、還元アミノ化である。アリアルアミン基を含む蛍光化合物を、還元末端のアルデヒド官能基で反応させる。次いで、得られた $\text{CH}=\text{N}$ 二重結合を、例えば水素化ホウ素ナトリウムを用いて、 $\text{CH}_2-\text{N}$ 単結合へと還元する。この技術は、例えばGlyko, Inc.カタログの8~13頁(これは、本明細書中に参考として援用される)に記載されるような、Glyko Inc.、Novato、CA、USAから入手可能なFACE(蛍光団補助炭水化物電気泳動)キットの一部である。

#### 【0256】

##### (4. 第2のエンドグリコシダーゼとの反応)

ここで、第2のエンドグリコシダーゼを、糖混合物と反応させ得る。この新しい反応混合物は、ここで3つのフラグメント(インタクトな還元末端を有する1つのフラグメント、2-アミノベンズイミドによって標識された還元末端を有する第2のフラグメント、およびブロックされた還元末端を有する第3のフラグメント)を有する。

40

#### 【0257】

##### (実施例3)

(本質的に配列特異的な因子での一連の反応からの構造的情報の誘導)

この実施例は、本発明の方法をさらに例証する(すなわち、上にさらに記載される一連の反応を用いることによる、糖の構造に関連するデータの生成)。この実施例は、さらに、この一連の反応から配列情報が推論され得ることを実証する。

50

## 【0258】

いくつかの場合において、用いられる試薬は、公開されたデータ（例えば、カタログから取り出されたデータ）から予測されるとおり、厳密に反応しなくてもよい。例えば、以下にさらに記載されるレクチン *Datura stramonium* 凝集素は、GlcNacに結合するとしてSigmaカタログに挙げられる。しかし、以下でさらに詳述される反応において、DSAは、クマリン120誘導Glc(Glc-AMC)に結合することが示される。これらの化合物の間の、構造的な類似性に起因して、Glc-AMCが全ての目的のためにGlcNacと同様に作用することは明白である。さらに、以下の結果から明白なように、用いられたエンドガラクトシダーゼは、ガラクトース残基でだけではなく、Glc-AMC基を残りの糖と結合させている結合をも、切断する。

10

## 【0259】

本発明の実施において用いられる、本質的に配列特異的な因子が、いくつかの場合、公開されている材料（例えば、カタログ）に与えられるこれらの因子の特異性と異なる、優れた特異性を有し得ることは、明白である。このような反応を、公知の構造の糖を用いる本発明の方法を使用することによって、迅速に同定し得る。次いで、見出した結果を、予測した結果と比較し得、そしてその差異は、用いた本質的に配列特異的な因子の、異なる特異性の同定を可能にする。次いで、本質的に配列特異的な因子の優れた特異性における、公表されたデータからのこのような変動を、これらの因子を使用する、未知の糖構造の将来の解析のために保存し得る。

## 【0260】

以下に、本発明の方法を、末端を標識された五糖ならびに種々のレクチンおよびグリコシダーゼを用いて、例示する。この五糖は、構造Gal-(1,4)-[Fuc-(1,3)]-GlcNAc-(1,3)-Gal(1,4)-Glcを有する。この五糖は、それぞれ3位および4位でこの五糖に結合する、フコースおよびガラクトースを有する、GlcNAc位で分枝される。この五糖を、その還元末端(Glc)にて、クマリン-120(7-アミノ-4-メチルクマリン、例えば、Sigma(カタログ番号A9891)から入手可能)で標識する。アリアルアミン官能基を用いることによる還元末端の標識のために、上記のようにカップリング反応を行い得る。クマリン-120は、312nmで励起される際、青色の蛍光を発する。第1および第2の、本質的に配列特異的な因子として、エンド-ガラクトシダーゼ(EG、Boehringer Mannheim)およびエキソ-1,3-フコシダーゼ(FD、New England Biolabs)を用いる。両方の試薬に対する反応条件は、エキソ-1,3-フコシダーゼのためのNEBカタログに記載される通りである。

20

30

## 【0261】

3つの反応を行った。第1の反応は、フコシダーゼ(FD)およびエンドガラクトシダーゼ(EG)を含み、第2の反応はFDのみを含み、そして第3の反応物はEGのみを含んだ。酵素を欠く第4の反応は、コントロールとして役立った。

## 【0262】

酵素が糖を消化したことを確認するために、薄層クロマトグラフィー(TLC)を用いて、種々の反応系をサイズ分離した。

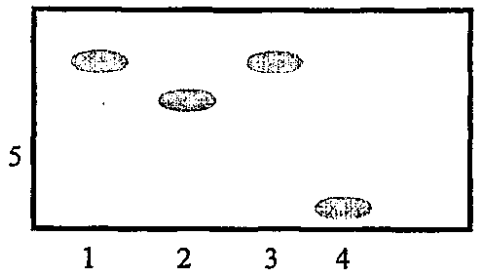
40

## 【0263】

分離の後、TLCプレート上の糖を、このプレートを紫外線に露光することによって、検出し得る。この結果を、以下の図に示す。

## 【0264】

## 【化2】



反応4において、グリコシダーゼを添加しなかったため、糖はインタクトであって、そしてプレート上の短い距離しか移動しない。反応2のフラグメントは、2番目の分子量であり、それに対して反応1および反応3のフラグメントは、等分子量であるようである。これらのデータから、糖におけるグリコシダーゼ部位の配列が、FD-EG-還元末端(クマリン標識)であることが結論され得る。

#### 【0265】

ここで、上記の五糖を、さらに上に記載されるような一連の反応によって、試験し得る。第1および第2の、本質的に配列特異的な因子として、レクチンを用いた。レクチン(Anguilla Anguilla凝集素(AAA)(カタログ番号L4141)、Arachis Hypogaea凝集素(PNA)(カタログ番号L0881)、Ricinus communis凝集素(RCAI)(カタログ番号L9138)、Lens Culinaris凝集素(LCA)(カタログ番号L9267)、Arbus Precatorius凝集素(APA)(カタログ番号L9758))は、Sigmaから入手可能である。レクチンはまた、他の企業からも入手可能である。例えば、RCAIはPierce(カタログ番号39913)から得られ得る。レクチンを、ニトロセルロースフィルター上へのプロットングによって固定する。

#### 【0266】

反応緩衝液は、1mMのCaClおよび1mMのMgClを含む、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)である。レクチンの結合の後、このフィルターを、反応緩衝液中において1%のBSAでブロックした。コントロールとして、レクチンを含まず、かつ固定されたタンパク質として10μgのBSAを含む、反応物を用いた。

#### 【0267】

この反応の結果を、表10に示す。プラスは、312nm蛍光の存在を示し、この蛍光は、クマリン標識還元末端の存在を示す。この表中の数字1~4は、上で定義されたとおりの反応を示す。

#### 【0268】

#### 【表10】

表10

	AAA	PNA	LCA	DSA	RCAI
1				++	
2		++		++	++
3				++	
4	++	++		++	++

表10に挙げられた結果(反応物4-コントロール)から、レクチンAAA、PNA、DSAおよびRCA-Iが糖に結合することは、明白である。従って、フコース、Gal(1-3)GlcNAc、GlcNAc、およびガラクトース/GalNAcは、それぞれAAA、PNA、DSAおよびRCA-Iに認識される糖構造であるので、この糖中に存在するはずである。上記のグリコシダーゼ(フコシダーゼおよびエンド-ガラクトシダーゼ)が、この糖中の切断配列を認識することはさらに明白である。これらの配列は、それぞれ、Fuc(1-3/1-4)GlcNAcおよびGlcNAc(1-3)Gal(1-3/4)Glc/GlcNAcである。

10

20

30

40

50



性 ( a - b - c および c - b - a ) を考慮しなければならない。例示の目的のために、用語「第 1 の本質的に配列特異的な因子の認識部位」は、以下で「第 1 認識部位」と表され、用語「第 2 の本質的に配列特異的な因子の認識部位」は、「第 2 認識部位」と表され、そして用語「グリコシダーゼに対する認識部位」は、「グリコシダーゼ」と表される。

【 0 2 7 5 】

ここで、上記の型の認識部位のトリプレットの第 2 のリストを作成することが、可能である ( 1 型のトリプレット ) :

( 第 1 の認識部位 ) - ( グリコシダーゼ ) - ( 第 2 の認識部位 ) 。

【 0 2 7 6 】

同様に、ここで、全てのシグナルがグリコシダーゼの添加後に残る ( 必要に応じて仮想的な ) アレイ位置に関連する第 3 のリストを、作成し得る ( 2 型のトリプレット ) :

( グリコシダーゼ ) - ( 第 1 認識部位 ) - ( 第 2 認識部位 ) 。

【 0 2 7 7 】

明らかに、十分な数のトリプレットが、分子をその配列で規定し、すなわち、見出された全てのトリプレットを含む 1 つの糖配列のみが存在し得る。分子の長さについての情報が有用可能である場合、より少ない数のトリプレットが、必要とされ得る。必要なトリプレットの数は、その分子の総糖含有量が既知である場合、さらになお小さくなり得る。糖類の分子量および総単糖類含有量の両方は、当業者に周知の先行技術から導かれ得る。

【 0 2 7 8 】

配列情報を得る工程 ( すなわち、認識部位のマッピングトリプレットを崩壊する ( c o l l a p s i n g ) 工程 ) が、以下に記載される。

【 0 2 7 9 】

トリプレット認識部位の第 2 および第 3 のリストは、同一性 ( 3 つの認識部位のうち 3 つが同一である )、高い類似性 ( 3 つの認識部位のうち 2 つが同一である )、および低い類似性 ( 3 つの認識部位のうち 1 つが同一である ) で評価される。例示の目的で、ここでは、多糖類が、例えば、グリカンヘパリンの糖部分のような直鎖の多糖類であると仮定する。

【 0 2 8 0 】

次いで、上記の第 2 のリストおよび第 3 のリストは、それから一セットのトリプレットのリストを作成するのに使用され、ここでこのリストのセット中の各リストは、同じグリコシダーゼ認識配列を共有するトリプレットを含有する。第 2 のグリコシダーゼ認識配列を含有する全てのトリプレットと、特定のグリコシダーゼ認識配列を含む全てのトリプレットを比較することで、分子の第 1 の末端からグリコシダーゼ 1 まで ( フラグメント a )、グリコシダーゼ 1 からグリコシダーゼ 2 まで ( フラグメント b )、グリコシダーゼ 2 から分子の第 2 の末端まで ( フラグメント c ) の範囲にわたる、4 つの領域に多糖類配列を分割することが可能である :

< 第 1 の末端 > < グリコシダーゼ 1 > < グリコシダーゼ 2 > < 第 2 の末端 > 。

【 0 2 8 1 】

異なるグリコシダーゼ部位を有する、2 型のトリプレット内における同一の認識部位であって、これらの認識部位が、それぞれのグリコシダーゼ部位に対して、同じ方向に位置決めされる、同一の認識部位は、その位置に依存して、領域 a または c のいずれかに位置決めされる候補である。異なるグリコシダーゼ部位を有する 2 型のトリプレット内における同一の認識部位であって、これらの認識部位が、異なる方向 ( 例えば、還元末端の方向と、他のトリプレットと、非還元末端の方向と ) に位置決めされる、同一の認識部位は、領域 b ( すなわち、2 つのグリコシダーゼ部位の間 ) に位置決めされる候補である。

【 0 2 8 2 】

異なるグリコシダーゼ部位を有する 1 型のトリプレット内の同一の認識部位は、領域 a ( または c ) における第 1 の認識部位または第 2 の認識部位のうち一方を位置決めするための候補であり、そしてその第 1 の認識部位または第 2 の認識部位のうちの他方が、領域 c ( または a ) に位置決めされる。つまり、第 1 の認識部位または第 2 の認識部位のうち

の一方が領域 a に位置決めされる場合、その第 1 の認識部位または第 2 の認識部位の他方が、領域 b に位置決めされるべきであり、その逆もあり得る。第 1 の認識部位または第 2 の認識部位のいずれも、領域 b に位置決めされないかもしれない。

【0283】

異なるグリコシダーゼ部位を有する 1 型のトリプレット内の同一の認識部位であって、所定の認識部位が、これらのトリプレットのうちの一方において、還元末端の方向に位置決めされ、そしてこれらのトリプレットの他方において、非還元の方向に位置決めされる、同一の認識部位は、領域 b 内に認識部位を位置決めするための候補である。

【0284】

トリプレット内の多くの認識部位に対する上記の位置関係を確立して、ここで、全ての認識配列は、論理的な推論を用いて特定の順で配列され得る。この段階は、配列マップとして言及される。十分な数の認識配列が配列される場合、糖類の全配列は、そこから導かれ得る。その方法が、糖類の分子量を決定しないので、その鎖長は知られない。従って、様々な認識部位間の重複の程度が不十分である場合、その配列中に、さらなる糖単位が存在し得る領域が存在し得る。そのような糖単位は、これらが、使用された本質的に配列特異性の薬剤のいずれかの認識部位に当てはまらない場合、検出されないかもしれない。しかしながら、この場合、全体的な配列情報はまた、最初に、糖の分子量（これは鎖長を示す）を得、第 2 に、その総単糖含有量を得ることによって得られ得る。

【0285】

配列マップにおけるギャップを閉じる別の可能性は、実施例 2 の方法であり、ここで、グリコシダーゼによる連続的な分解が、配列情報を誘導するために使用される。

【0286】

糖類における分枝点の存在は、上記の概要のように、この方法を複雑化し得る。その 1 つの対策としては、グリコシダーゼを使用して分子の画分を調製し、これらの部分的な構造を分析することが挙げられる。そのような部分構造における分枝の程度は、全体の分子における分枝の程度に比べて明らかに低いものである。加えて、分枝点を特異的に認識する試薬が、使用され得る。そのような試薬の例としては、例えば、上記の実施例 1 において使用された抗体が挙げられる。これらの各抗体は、少なくとも 1 つの分枝点を含む糖配列に結合する。さらに、分枝糖構造を認識する特定の酵素およびレクチンが、利用可能である。例えば、酵素 プラナーゼ (EC 3.2.1.41) が、分枝構造を認識する。加えて、抗体は、分枝した糖構造を抗原として使用することによって産生され得る。さらに、分枝構造を含む、特定の糖構造に結合するペプチドを産生することが可能である（例えば、Deng S J, Mac Kenzie C R, Sadowska J, Michniewicz J, Young N M, Bundle D R, Narang; Selection of antibody single-chain variable fragments with improved carbohydrate binding by phage display. J. Biol. Chem. 239, 9533-38, 1994、参照）。

【0287】

加えて、多くの場合において、既存の糖質の構造の知識は、分枝点の存在を正確に予測する。例えば、N 結合型グリカンは、oxford Glycosystems catalog の 6 ページに列挙されたように、限定された数の構造を有する。これらの構造は、1 アンテナ型から 5 アンテナ型の範囲にある。より複雑化された構造は、さらなる糖残基が付加された、より単純な構造に類似する。従って、1 つのアンテナ構造が同定された場合、さらなる残基を同定し、そしてこれらのデータを N 結合型グリカン構造のライブラリーと比較することによって、より複雑化された構造における分枝点の全てを簡単に予測することが可能である。

【0288】

さらに、本発明の方法に従って集められたデータを分析することによって、分枝点の存在および位置を論理的に推論することが、しばしば可能である。例えば、a および b で示さ

10

20

30

40

50

れる2つの認識部位が、異なる枝に位置決めされる場合、その部位が還元末端と分枝点との間に位置決めされるグリコシダーゼでの消化は、還元末端マーカの損失を生じる。しかしながら、認識部位 a と b の両方に対するマーカは、残る。分枝点と認識部位 a との間に位置決めされたグリコシダーゼが使用される場合、認識部位 b に対するマーカ、および還元末端マーカが、切断される。分枝点の可能性を考慮に入れないとすると、認識部位 b が、認識部位 a と還元末端との間に位置決めされることを示す。しかしながら、認識部位 b と分枝点との間に位置決めされたグリコシダーゼが使用される場合、還元末端マーカおよび認識部位 a は、切断される。再び、分枝の可能性を考慮に入れないとすると、これは、認識部位 a が、還元末端と認識部位 b との間に位置決めされることを示す。これらの推論は、明らかに互いに不適合であり、そして認識部位 a および b が2つの異なる分枝に位置決めされることが想定される場合にのみ、解決され得る。その分枝点は、認識部位 a および b と、第1の上記グリコシダーゼとの間に位置決めされる。使用される他方の上記グリコシダーゼは、各分枝上に、分枝点とそれぞれの認識部位 ( a または b ) との間に位置決めされる。

#### 【0289】

従って、本質的に配列特異的な薬剤として、本発明の方法において分枝構造を認識する薬剤を使用する場合、糖分子における分枝点の存在および位置の情報を誘導することは、可能である。次いで、この情報は、その構造の各分枝の配列マップを作成し、分枝構造全体の配列マップを得るために使用され得る。次いで、このような構造におけるギャップは、本発明に従って ( すなわち、さらなる反応の使用によって、グリコシダーゼでの消化によって ( それにより、ギャップの存在する分子の領域は、本発明の方法に従うさらなる分析のために特異的に単離される )、および上にさらに記載するような連続的なグリコシダーゼ消化によって、非分枝糖類の場合のように閉じられ得る。

#### 【0290】

要約すると、本発明に従って糖類の配列を決定する方法および/または糖類の構造をマッピングするための方法は、以下の工程：

- 1 . 1 型および2型のトリプレットの回収
- 2 . 類似性に従うトリプレットの分類
- 3 . 異なるグリコシダーゼ認識部位を有するトリプレットの比較
- 4 . 糖類上への発生の順でのトリプレットの配列
- 5 . グリコシダーゼ認識部位の配列
- 6 . トリプレットに対する適合性のチェック
- 7 . 単一のファイル順序 ( `single file order` ) でのグリコシダーゼの認識配列ならびに第1および第2の本質的に配列特異的な薬剤の認識配列
- 8 . 多糖配列への認識配列 ( 部位 ) の翻訳
- 9 . 「重複」問題の補正
- 10 . 配列の出力
- 11 . 全ての有効データに対するチェック

を包含する。

#### 【0291】

上記の工程5が実施された後、グリコシダーゼ部位の予備的な順番がたてられる。工程6において、ここで、これらに基づいた予測がその順番と一致するか否かを各トリプレットに対してチェックする。次いで、そのデータにおける矛盾に基づいて、トリプレットのデータに合う新しいモデルが、作成される。次いで、このモデルが、全てのトリプレットのデータに対して試験される。さらに、そのトリプレットを含有する認識部位に関するさらなる方向的な情報を抽出するために、さらなる反応が実施され得る。

#### 【0292】

上記の工程8 ( ここで、連続的に配列された認識部位が、実際の単糖単位の配列に翻訳される ) の後、この糖配列のモデルが示され得る。そのモデルを試験するために、多くの質問に答える必要がある。第1の質問は、同一の配列マップをなお有する最小配列はどれか

、ということである。この段階において、分子量および単糖組成の情報（利用可能である場合）は、考慮されない。このアプローチは、単に、できる限り少ない矛盾で利用可能なデータの全てを援用する、配列の作成に役立つのみである。この観点において、答えるべき第2の質問は、その最小配列が、この点において全ての利用可能なデータ（任意の分子量および単糖成分データを除く）になお一致するか、ということである。答えるべき第3の質問は、確立されたような配列マップに適合する他の配列が存在するか、ということである。肯定する場合、次いで、そのさらなる配列が、以下の質問を使用して試験され得る：各配列モデルが、このトリプレット情報およびさらなる任意のデータ（例えば、分子量、単糖組成、および生物学からの公知の糖構造モデル）とどのように一致するか。

【0293】

最後に、上記の工程1～10に従って最良であると見出された配列モデルは、次いで、全てのトリプレット、単糖組成、その糖類の分子量および構造組成における先行知識、および生物学的に存在する類似の構造からの予測に対して試験される。このような繰り返し試験によって、利用可能なデータと配列モデルとの間の矛盾が同定され、可能な場合、その配列モデルが、データをより良く示すように適合される。

【0294】

（実施例5）

（乳サンプルの糖分子同定（GMID）分析）

この実施例の目的は、乳サンプルの分析および比較に対するGMID技術の適用を実証することである。

【0295】

A．膜および第一層のレクチン：

本明細書中、以下に記載される実験において使用した支持表面は、ニトロセルロース膜である。この膜を以下のように調製した：

1．ニトロセルロース膜を切り出し、それらの表面を9×6の四角（各四角は、3mm<sup>2</sup>）の配列に区画した。次いで、その膜を吸い取り紙に置き、それぞれの膜の左上の四角をペンでマークした。

2．凍結乾燥されたレクチンを水に再懸濁し、最終濃度を1mg/mlとした。その再懸濁されたレクチン（およびコントロール溶液：5%ウシ血清アルブミン）をボルテックスで攪拌し、そして1μlの各溶液を、以下の典型的なプロットの例示に影をつけることによって示されるように、このプロット上の28個の四角のうちの1つに加えた。

【0296】

【表11】


本実験に使用したレクチンは、表11に列挙される。

【0297】

（表11）

【0298】

【表12】

10

20

30

40

レクチン	製造会社	カタログ番号
WGA	Vector	MK2000
SBA	Vector	MK2000
PNA	Vector	MK2000
DBA	Vector	MK2000
UEA I	Vector	MK2000
CON A	Vector	MK2000
RCA I	Vector	MK2000
BSL I	Vector	MK3000
SJA	Vector	MK3000
LCA	Vector	MK3000
Swga	Vector	MK3000
PHA-L	Vector	MK3000
PSA	Vector	MK3000
AAA	-	-
PHA-E	Vector	MK3000
PNA	Leuven	LE-408
LCA	Sigma	L9267
DSA	Sigma	L2766
APA		-
WGA	Leuven	LE-429
Jacalin	Leuven	LE-435
5% BSA	Savyon	M121-033

10

20

30

3. 調製されたプロットを90mmのペトリ皿に置いた。

4. そのプロットを、各ペトリ皿に当業者に周知の任意の適切なブロック溶液10ml (例えば、5%のウシ血清アルブミン)を加えることによってブロックした。

5. ブロック溶液中のプロットを含有する皿を、室温で2時間、回転台(50rpm)上で回転させることによって穏やかに攪拌させた(または回転させずに4で一晩おく)。

6. 次いで、そのプロットを、10mlの洗浄溶液を各ペトリ皿に加えることによって洗浄した。任意の通常利用される緩衝溶液(例えば、リン酸緩衝化生理食塩水)をこの洗浄工程を実施するのに使用し得る。この皿を5分間、穏やかに回転させる(50rpm)ことによって洗浄した。この手順を、古い洗浄溶液を廃棄し、その都度新しい溶液に置き換えて、計3度実施した。

40

【0299】

B: 乳サンプルの添加:

使用した乳サンプルは以下のとおりであった:

1. Ramat haGolan dairies (Israel)製のウシUHTのロングライフ(日持ちする)乳(脂肪分3%)(ロット番号522104);

2. Mechek dairies (Israel)製の低温殺菌されたヤギの乳(ロット番号1および2);

3. 2と同じであるが、低温殺菌されていないヤギの乳(ロット番号3および4)

これらの乳サンプルを10%(v/v)に溶解し、約5mlの各サンプルを、別々のプロ

50

ットに適用した。

【0300】

二連のプロットを、前記の乳サンプルの各々に対して調製した。さらに、さらなるプロット対を、糖を加えずに調製した（ネガティブコントロール）。

【0301】

次いで、そのプロットを1時間攪拌しながら、室温でインキュベートした。

【0302】

C. 着色レクチン：

試験される乳の単糖類成分の先行知識から、そして本明細書中下記の実施例7に記載されるアルゴリズムに基づいたコンピュータプログラムの適用によって、以下の着色レクチンを選択した：Con A、VVA。

10

【0303】

これらの2つのレクチンの混合物を、各着色レクチンの濃度が2 mg / ml であるように、洗浄溶液中で調製した。

【0304】

500 μl の各レクチン混合物を、上記のように調製されたプロット上でインキュベートした。各プロットを、520 nmでのフルオレセインの蛍光を測定すること、そしてビオチン標識されたレクチンの場合には、HRP-ストレプトアビジン溶液とのビオチンの反応後に生成されたTMBの青色のシグナルを測定することの両方によって読み取った。

【0305】

FITC標識されたレクチンおよびビオチン標識されたレクチンについて得られた結果を、それぞれ表12および表13に示す。これらの表に示される結果は、0~3のスケールで測定され、ここで、0は、ノイズレベル以下であるシグナルを示し、1~3の結果は、糖無しのコントロールで得られた結果を差し引いて後のポジティブシグナル（ノイズより上の）を示す。

20

【0306】

低温殺菌されたヤギの乳（ロット番号1および2）、低温殺菌されていないヤギの乳（ロット番号3および4）およびウシの乳に対するこれらの結果から得られた糖分子同定（GMID）カードを、図1のA~Eそれぞれに示す。レクチン1~24の位置は、それぞれのカード1の上部に左から右へ1列に示される。

30

【0307】

D. 結果の解釈：

得られたウシの乳サンプルは、サンプル中の多糖類が、以下に特異的なレクチンに対して陽性の結果を与える糖類を含有することを示すGMIDをもたらした：

- a. グルコース/マンノース（Con A、PSAおよびLCA）；
- b. GluNac（WGAおよびDSA）。

【0308】

低温殺菌されたヤギの乳サンプルは、以下に対して陽性の結果を生じた：

- a. グルコース/マンノース（Con A、PSAおよびLCA）；
- b. GluNac（DSA）。

40

【0309】

試験されたこれらのロットの間にはレクチンの反応性の差異がないことが観察された。

【0310】

低温殺菌されていないヤギの乳サンプルは、以下に対して陽性反応を示した：

- a. グルコース/マンノース（Con A、PSAおよびLCA）；
- b. GluNac（DSA）。

【0311】

要約すると、ウシの乳は、ウシの乳のみが、WGAと反応したという点でヤギの乳と異なった。低温殺菌されたサンプルにおいてシグナル強度が有意に低いことを除けば、本質的には、低温殺菌されたヤギの乳サンプルと低温殺菌されていないヤギの乳サンプルとの間

50

に差異はなかった。

【0312】

(実施例6)

(リポ多糖類の糖分子同定(GMID)分析)

GMID分析を、Sigma Chemical Co. から入手した5つの異なる細菌性リポ多糖類(St. Louis, Missouri, USA)(LPS#1、7、10、15および16)に対して、本質的に上記の実施例5に記載されたような方法を使用して実施した。使用した着色レクチンは、ECL、WGA、VVAおよびSBAであった。

【0313】

サンプルLPS#1、7、10、15および16について得られたGMIDカードを、図2のA~Eにそれぞれ示す。この図より、このGMIDカードは、異なるリポ多糖類のそれぞれに固有の「フィンガープリント」を提供し、そして、細菌またはこれらの産物の混合物を含有するサンプル中でこれらの化合物の存在を同定するのに使用され得ることが理解され得る。 10

【0314】

(実施例7)

(着色レクチンを選択する方法)

多くの因子が、実施例5および6に例示される多糖類分析の方法に使用される着色レクチンを選択する場合に考慮されるべきである。これらの考慮の中でもとりわけ、選択されたレクチンのそれぞれが、識別可能な色または他の検出可能なマーカーを有することが必要であり、そしてレクチン間の相互作用を減少することが必要である。着色マーカー選択に使用するためのアルゴリズムを示したフローチャートを、図3に示す。図3に示されるこのアルゴリズムは、n個の着色レクチン(または他の検出可能なマーカー)の選択101で始まり、この初期選択は、分析される糖類の部分的な単糖組成または完全な単糖組成に関して得られた情報に従って作成される。 20

【0315】

次の工程102において、選択されたレクチンの色を、選択された色の同一性/非同一性に関してチェックするために試験する。選択した群に同一の色が存在する場合、次いで、そのプロセスは工程103に進み、そうでなければ、工程104に進む。工程103において、非固有の色を有することを見出されたレクチンの1つは、同じ結合カテゴリーに属する(すなわち、同じ単糖への結合特異性を有する)別のレクチンに置き換えられ; 工程102に進む。 30

【0316】

工程104において、このn個の選択されたレクチンは、互いとの、および本明細書中の実施例5に記載された方法の第1の段階で使用された着色されていないレクチンとの、任意の交差反応を検出するために試験される。交差反応が検出された場合、次いでそのプロセスは工程105に進み、そうでなければ工程106に進み、ここで、このアルゴリズムが終了する。

【0317】

工程105において、別のレクチンとの交差反応を検出されたレクチンの1つは、交差反応のないレクチンに置きかえられ、次いで、102に進む。このアルゴリズムは、工程106で終了する。 40

【0318】

強調される点は、小さいnの値について、そして単純な単糖組成を有する糖類について、上記のアルゴリズムは、操作者自身が選択手順の各工程を通して手動で操作することによって適用され得るということである。あるいは(特にnが大きい数であるかまたは単糖組成がより複雑である場合)、本明細書中の上記のアルゴリズムプロセスは、このプロセスを実行するように設計されたコンピュータプログラムによって実施され得る。

【0319】

上記の実施例は、本明細書中に記載される方法の有用性を立証した。しかしながら、それ 50

らは例示のみの目的で加えられている。当業者には、多くの変更が、使用される本質的に配列特異的な薬剤において、反応条件において、固定化の技術において、ならびに配列の標識、反応工程、および検出工程において、全てが、本発明の範囲から逸脱することなくなされ得ることが、明らかである。

【0320】

(他の実施形態)

本発明は、その詳細な説明と関連して記載されるが、前述の説明は、例示を目的とし、そして添付の特許請求の範囲により定義される、本発明の範囲を限定することを意図されないことが理解される。他の局面、利点、および改変は、上記の特許請求の範囲内にある。

【図面の簡単な説明】

10

【図1】

図1は、均質化されたヤギの乳(AおよびB)、均質化されていないヤギの乳(CおよびD)ならびにウシの乳(E)について得られる糖分子同一性カード(GMID)の例示である。

【図2】

図2は、種々のリポ多糖類サンプルについて得られるGMIDカードの複製物である。カードA~Eは、LPS#1、7、10、15、および16にそれぞれ対応する。

【図3】

図3は、1セットの着色したレクチンを選択するためのアルゴリズムを例示する高レベルの論理フローチャートである。

20

【図4】

図4は、本発明について目的の炭水化物ポリマーについてのフィンガープリントを決定するための生データを得るための例示的な実験系を示す。

【図5】

図5は、サンプルの炭水化物ポリマーのフィンガープリントを、少なくとも1つの他のフィンガープリントと比較するための本発明に従う例示的な方法のフローチャートである。

【図6】

図6は、フィンガープリントのデータを伸長するために、サンプルの炭水化物ポリマーのフィンガープリントを内部的に分析するための本発明に従う例示的な方法のフローチャートである。

30

【図7】

図7は、外部のデータベースからのデータの統合によって、フィンガープリントのデータを伸長するための本発明に従う例示的な方法のフローチャートである。

【図8】

図8は、目的の特徴を、サンプルの炭水化物ポリマー内に位置するための本発明に従う例示的な方法のフローチャートである。

【 図 2 】

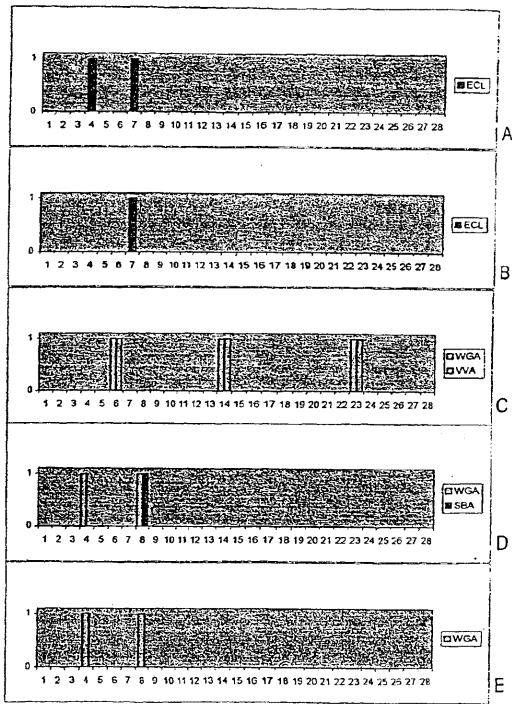


Fig. 2

【 図 3 】

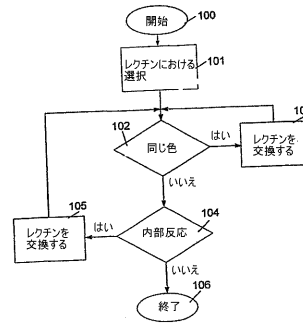
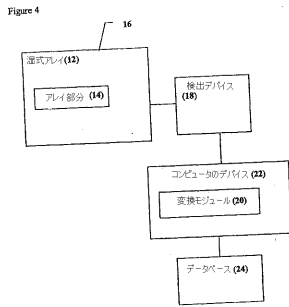
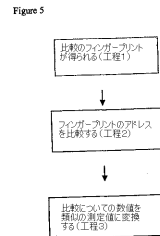


Fig. 3

【 図 4 】



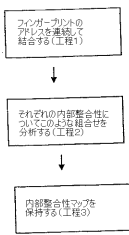
【 図 5 】



【 図 6 】

【 図 6 】

Figure 6



【 図 7 】

Figure 7



【 図 8 】

Figure 8



## 【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
10 May 2002 (10.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/37106 A2(51) International Patent Classification: G01N 33/53,  
C12Q 1/34

(21) International Application Number: PCT/US01/47064

(22) International Filing Date:  
5 November 2001 (05.11.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/246,006 3 November 2000 (03.11.2000) US  
60/246,009 3 November 2000 (03.11.2000) US  
60/245,887 3 November 2000 (03.11.2000) US  
60/245,817 3 November 2000 (03.11.2000) US(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part  
(CIP) to earlier applications:  
US 60/245,887 (CIP)  
Filed on 3 November 2000 (03.11.2000)  
US 60/246,009 (CIP)  
Filed on 3 November 2000 (03.11.2000)  
US 60/245,817 (CIP)  
Filed on 3 November 2000 (03.11.2000)  
US 60/246,006 (CIP)  
Filed on 3 November 2000 (03.11.2000)(71) Applicant (for all designated States except US): GLYCO-  
DATA, LTD. [IL/LI]; 3 Habosem Street, 77610 Ashdod  
(IL).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): MARKMAN, Ofer

[IL/LI]; 3 Habosem Street, 77610 Ashdod (IL). ROTH-  
MAN, Chana [IL/LI]; 3 Habosem Street, 77610 Ashdod  
(IL). AMOR, Yehudi [IL/LI]; 3 Habosem Street, 77610  
Ashdod (IL). ORAN, Assaf [US/LI]; 3 Habosem Street,  
77610 Ashdod (IL). OR, Einat [IL/LI]; 3 Habosem Street,  
77610 Ashdod (IL).(74) Agent: JOHNSON, David, E., Mintz, Levin, Cohn, Fer-  
ris, Glovsky and Popeo PC, One Financial Center, Boston,  
MA 02111 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,  
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, ME, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,  
ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian  
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European  
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,  
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF,  
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,  
TG).Published:  
— without international search report and to be republished  
upon receipt of that reportFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-  
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-  
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/37106 A2

(54) Title: METHODS FOR COMPARITIVE ANALYSIS OF CARBOHYDRATE POLYMERS AND CARBOHYDRATE POLY-  
MERS IDENTIFIED USING SAME(57) Abstract: Disclosed is a method for characterizing a carbohydrate polymer by identifying at least two binding agents that bind  
to the carbohydrate polymer. Binding is preferably determined by contacting the carbohydrate polymer with substrate that contains a  
plurality of first saccharide-binding agents affixed at predetermined locations on the substrate. The carbohydrate polymer is allowed  
to contact the substrate under conditions that allow for formation of a first complex between the first saccharide-binding agent and the  
carbohydrate polymer. A second saccharide-binding agent, which preferably includes a label, is also contacted with the carbohydrate  
polymer under conditions that allow for formation of a second complex between the second binding agent and the first complex.  
Identification of the first and second binding agent allows for characterization of the polysaccharide.

WO 02/37106

PCT/US01/47064

**METHODS FOR COMPARITIVE ANALYSIS OF CARBOHYDRATE  
POLYMERS AND CARBOHYDRATE POLYMERS IDENTIFIED  
USING SAME**

5

**Field of the Invention**

The invention relates generally to a method for analyzing molecules containing polysaccharides and more particularly to a method for analyzing polysaccharides based using saccharide-binding agents such as lectins.

10

**Background of the Invention**

Polysaccharides are polymers that include monosaccharide (sugar) units connected to each other via glycosidic bonds. These polymers have a structure that can be described in terms of the linear sequence of the monosaccharide subunits, which is known as the two-dimensional structure of the polysaccharide. Polysaccharides can also be described in terms of the structures formed in space by their component monosaccharide subunits.

15

A chain of monosaccharides that form a polysaccharide has two dissimilar ends. One end contains an aldehyde group and is known as the reducing end. The other end is known as the non-reducing end. A polysaccharide chain may also be connected to any of the C1, C2, C3, C4, or C6 atom if the sugar unit it is connected to is a hexose. In addition, a given monosaccharide may be linked to more than two different monosaccharides. Moreover, the connection to the C1 atom may be in either the  $\alpha$  or  $\beta$  configuration. Thus, both the two-dimensional and three-dimensional structure of the carbohydrate polymer can be highly complex.

20

The structural determination of polysaccharides is of fundamental importance for the development of glycobiology. Research in glycobiology relates to subjects as diverse as the identification and characterization of antibiotic agents that affect bacterial cell wall synthesis, blood glycans, growth factor and cell surface receptor structures involved in viral disease, and autoimmune diseases such as insulin dependent diabetes, rheumatoid arthritis, and abnormal cell growth, such as that which occurs in cancer.

25

30

Polysaccharides have also been used in the development of biomaterials for contact lenses, artificial skin, and prosthetic devices. Furthermore, polysaccharides are used in a number of non-medical fields, such as the paper industry. Additionally, of course, the food and drug industry uses large amounts of various polysaccharides and oligosaccharides.

WO 02/37106

PCT/US01/47064

In all of the above fields, there is a need for improved saccharide analysis technologies. Saccharide analysis information is useful in, *e.g.*, for quality control, structure determination in research, and for conducting structure-function analyses.

The structural complexity of polysaccharides has hindered their analysis. For example, saccharides are believed to be synthesized in a template-independent mechanism. In the absence of structural information, the researcher must therefore assume that the building units are selected from any of the saccharide units known today. In addition, these units may have been modified, during synthesis, *e.g.*, by the addition of sulfate groups.

Second, saccharide can be connected at any of the carbon moieties, *e.g.*, at the C1, C2, C3, C4, or C6 atom if the sugar unit it is connected to is a hexose. Moreover, the connection to the C1 atom may be in either  $\alpha$  or  $\beta$  configuration.

Third, saccharides may be branched, which further complicates their structure and the number of possible structures that have an identical number and kind of sugar units.

A fourth difficulty is presented by the fact that the difference in structure between many sugars is minute, as a sugar unit may differ from another merely by the position of the hydroxyl groups (epimers).

The use of a plurality of such saccharide-binding agents, whether fixed to the substrate and/or employed as the second (soluble) saccharide-binding agent, characterizes the carbohydrate polymer of interest by providing a "fingerprint" of the saccharide. Such a fingerprint can then be analyzed in order to obtain more information about the carbohydrate polymer. Unfortunately, the process of characterization and interpretation of the data for carbohydrate polymer fingerprints is far more complex than for other biological polymers, such as DNA for example. Unlike binding DNA probes to a sample of DNA for the purpose of characterization, the carbohydrate polymer fingerprint is not necessarily a direct indication of the components of the carbohydrate polymer itself. DNA probe binding provides relatively direct information about the sequence of the DNA sample itself, since under the proper conditions, recognition and binding of a probe to DNA is a fairly straightforward process. Thus, a DNA "fingerprint" which is obtained from probe binding can yield direct information about the actual sequence of DNA in the sample.

By contrast, binding of agents to carbohydrate polymers is not nearly so straightforward. As previously described, even the two-dimensional structure (sequence) of carbohydrate polymers is more complex than that of DNA, since carbohydrate polymers can be branched. These branches clearly affect the three-dimensional structure of the polymer, and hence the structure of the recognition site for the binding agent. In addition, recognition

WO 02/37106

PCT/US01/47064

of binding epitopes on carbohydrate polymers by the binding agents may be affected by the "neighborhood" of the portion of the molecule which is surrounding the epitope. Thus, the analysis of such "fingerprint" data for the binding of agents to the carbohydrate polymer of interest is clearly more difficult than for DNA probe binding, for example.

5 A useful solution to this problem would enable the fingerprint data to be analyzed in order to characterize the carbohydrate polymer. Such an analysis would need to transform the raw data, obtained from the previously described process of incubating saccharide-binding agents with the carbohydrate polymer, into a fingerprint, which would itself contain information. The fingerprint would also need to be standardized for comparison across  
10 different sets of experimental conditions and for different types of saccharide-binding agents. Unfortunately, such a solution is not currently available.

In spite of these difficulties, a number of methods for the structural analysis of saccharides have been developed. For example, PCT Application No. WO 93/24503 discloses a method wherein monosaccharide units are sequentially removed from the  
15 reducing end of an oligosaccharide by converting the monosaccharide at the reducing end to its keto- or aldehyde form, and then cleaving the glycosidic bond between the monosaccharide and the next monosaccharide in the oligosaccharide chain by using hydrazine. The free monosaccharides are separated from the oligosaccharide chain and identified by chromatographic methods. The process is then repeated until all  
20 monosaccharides have been cleaved.

PCT Application No. WO 93/22678 discloses a method of sequencing an unknown oligosaccharide by making assumptions upon the basic structure thereof, and then choosing from a number of sequencing tools (such as glycosidases) one which is predicted to give the highest amount of structural information. This method requires some basic information as to  
25 the oligosaccharide structure (usually the monosaccharide composition). The method also illustrates the fact that reactions with sequencing reagents are expensive and time-consuming, and therefore there is a need for a method that reduces these expenses.

PCT Application No. WO 93/22678 discloses a method for detecting molecules by probing a monolithic array of probes, such as oligodeoxynucleotides, immobilized on a VLSI  
30 chip. This publication teaches that a large number of probes can be bound to an immobilized surface, and the reaction thereof with an analyte detected by a variety of methods, using logic circuitry on the VLSI chip.

European Patent Application No. EP 421,972 discloses a method for sequencing oligosaccharides by labeling one end thereof, dividing the labeled oligosaccharide into

WO 02/37106

PCT/US01/47064

aliquots, and treating each aliquot with a different reagent mix (e.g. of glycosidases), pooling the different reaction mixes, and then analyzing the reaction products, using chromatographic methods. This method is useful for N-linked glycans only, as they have a common structure at the point where the saccharide chain is linked to the protein. O-linked glycans are more varied, and the method has as yet not been adapted for such oligosaccharides with greater variability in their basic structure.

There is therefore a need for a system and method for characterizing polysaccharides using an accurate, high throughput method for identifying agents that bind to the polysaccharide.

10

#### Summary of the Invention

The invention is based in part on the discovery of a method for quickly and accurately identifying agents that bind a given carbohydrate polymer. Also provided by the invention is a method for generating a fingerprint of a carbohydrate polymer that is based on its pattern of binding to saccharide-binding agents.

In one aspect, the invention features a method for determining the relatedness of a first carbohydrate polymer and a second carbohydrate polymer, e.g., a first glycoprotein and a second glycoprotein or a first polysaccharide and a second polysaccharide. The method includes providing a first fingerprint of a first carbohydrate polymer, wherein the first fingerprint comprises binding information for at least a first saccharide-binding agent and information for a second saccharide-binding agent for the first carbohydrate polymer. A second fingerprint of a second carbohydrate polymer is also provided. The second fingerprint includes binding information for at least the first saccharide-binding agent and the second saccharide-binding agent for the second carbohydrate polymer.

The first fingerprint and the second fingerprint are compared by determining whether the first glycoprotein and the second glycoprotein bind to the first saccharide binding agent, and whether the first glycoprotein and the second glycoprotein bind to the second saccharide binding agent. The similarity between the first and second fingerprint indicate the relatedness of the first glycoprotein and second glycoprotein.

In a further aspect the invention features a method of identifying a carbohydrate polymer, e.g., a glycoprotein, polysaccharide, or glycolipid, by providing a first fingerprint of a test carbohydrate polymer, wherein the first fingerprint comprises binding information for at least a first saccharide-binding agent and information for a second saccharide-binding agent for the first carbohydrate polymer. The first fingerprint is compared to at least one

WO 02/37106

PCT/US01/47064

reference fingerprint, wherein the reference carbohydrate polymer fingerprint includes binding information for at least the first saccharide-binding agent and the second saccharide-binding agent for at least one reference carbohydrate polymer. A similar, *e.g.*, identical fingerprint between the first fingerprint and the reference fingerprint indicates that the test carbohydrate polymer is similar, *e.g.*, identical to the reference carbohydrate polymer.

5 In a still further aspect, the invention includes a method of modifying a carbohydrate polymer, *e.g.*, a glycoprotein, polysaccharide, or glycolipid, by providing a first fingerprint of a test carbohydrate polymer. The first fingerprint comprises binding information for at least a first saccharide-binding agent and binding information for at least a second saccharide-

10 binding agent for the first carbohydrate polymer.

The first fingerprint is compared to at least one reference fingerprint. The reference fingerprint can include binding information for at least the first saccharide-binding agent and information for the second saccharide-binding agent for the reference carbohydrate polymer. Differences between the first fingerprint and the reference fingerprint are identified. The test carbohydrate polymer is then modified so that its fingerprint is increased or decreased, as

15 desired, with respect to the fingerprint of the reference carbohydrate polymer.

Also included in the invention is a method of synthesizing a carbohydrate polymer-containing compound, *e.g.*, a glycoprotein. For example, in one embodiment the invention includes making a glycoprotein by providing a polypeptide and or attaching carbohydrate

20 polymers to the polypeptide to produce the desired modified glycoprotein.

In a further aspect, the invention features a method for characterizing a carbohydrate polymer. The carbohydrate polymer is contacted with a surface that includes at least one first saccharide-binding agent attached to a predetermined location on the surface under conditions allowing for the formation of a first complex between the first saccharide-binding

25 agent and the carbohydrate polymer. The surface is then contacted with at least one second saccharide-binding agent under conditions allowing for formation of a second complex between the first complex and the second saccharide-binding agent. The first saccharide-binding agent and second saccharide-binding agent are then identified, thereby characterizing the carbohydrate polymer.

Also provided by the invention is a method of generating a fingerprint of a carbohydrate polymer by contacting a carbohydrate polymer with a first saccharide-binding agent, determining whether the carbohydrate polymer binds to the saccharide-binding reagent, contacting the carbohydrate polymer with a second saccharide-binding agent, and determining whether the carbohydrate polymer binds to the second saccharide-binding

30

WO 02/37106

PCT/US01/47064

reagent. Identification of the first and second saccharide-binding agent is used to generate a fingerprint of the carbohydrate polymer.

In preferred embodiments, the fingerprints used in the methods described herein are identified by method that includes providing the carbohydrate polymer and contacting the carbohydrate polymer with the first saccharide-binding agent. A determination is then made as to whether the carbohydrate polymer binds to the first saccharide-binding agent.

The carbohydrate polymer is also contacted with the second saccharide-binding agent, which preferably includes a detectable label. A determination is also made as to whether the carbohydrate polymer binds to the second saccharide-binding agent. The information gathered about the binding of the first saccharide-binding agent and second binding agent is compiled to generate a fingerprint of the carbohydrate polymer.

In more preferred embodiments, binding of the first and second saccharide-agent is determined by providing a surface comprising at least one first saccharide-binding agent attached to a predetermined location on the surface, and contacting the surface with a carbohydrate polymer under conditions allowing for the formation of a first complex between the first saccharide-binding agent and the carbohydrate polymer. The surface is also contacted with at least one second saccharide-binding agent under conditions allowing for formation of a second complex between the first complex and the second saccharide-binding agent. Identification of the second binding agent at a particular location on the surface also allows for the identification of the corresponding first saccharide binding agent attached at that location of the surface.

In another aspect, the invention provides a method of identifying an agent that modulates the structure of a carbohydrate polymer by contacting a biological sample including the with a test agent, and identifying a carbohydrate polymer fingerprint of one or more carbohydrate polymers in the sample. The carbohydrate polymer fingerprint is compared to a carbohydrate polymer fingerprint of the carbohydrate polymers in a sample that is not contacted with the agent. Differences in the carbohydrate fingerprint profiles, if present, are identified in the test and reference fingerprints. A difference in fingerprint profiles indicates the test agent modulates the structure of a carbohydrate polymer.

Also featured by the invention is a method of identifying a candidate therapeutic agent for a pathophysiology associated with a carbohydrate polymer. The method includes providing a test biological sample that includes the carbohydrate polymer and contacting the test biological sample with a test agent. A carbohydrate polymer fingerprint of one or more carbohydrate polymers in the biological sample is identified and compared to a carbohydrate

WO 02/37106

PCT/US01/47064

polymer fingerprint of the of one or more carbohydrate polymers in a reference biological sample whose pathophysiological status is known. Differences in the carbohydrate finger profiles, if present, in the test biological sample and reference biological sample, thereby identifying a therapeutic agent for a pathophysiology associated with the carbohydrate  
5 polymer.

In a further aspect, the invention features a method of identifying an individualized therapeutic agent suitable for treating a pathophysiology associated with a carbohydrate polymer in a subject by providing from the subject a biological sample that includes the carbohydrate polymer and contacting the test biological sample with a test agent. A  
10 carbohydrate polymer fingerprint of one or more carbohydrate polymers in the biological sample is identified and compared to a carbohydrate polymer fingerprint of the one or more carbohydrate polymers in a reference biological sample whose pathophysiological status is known; and identifying a difference in the carbohydrate finger profiles, if present, in the test biological sample and reference biological sample.

Also within the invention is a method of assessing the efficacy of a treatment of  
15 pathophysiology associated with a carbohydrate polymer. The method includes providing from the subject a test biological sample including the carbohydrate polymer and determining a carbohydrate fingerprint of the carbohydrate polymer. The carbohydrate fingerprint is compared to a reference carbohydrate polymer fingerprint, wherein the  
20 reference carbohydrate polymer fingerprint is derived from a carbohydrate polymer whose pathophysiological status is known, thereby assessing the efficacy of treatment of the pathophysiology in the subject.

Also within the invention is a method of treating a pathophysiology associated with a carbohydrate polymer mediated pathway in a subject, the method comprising administering  
25 to the subject an agent that modulates a carbohydrate polymer in the patient, wherein the modulation alters a carbohydrate polymer fingerprint in the patient. The patient is preferably a human patient.

Also within the invention is method of identifying an agent that modulates the structure of a carbohydrate polymer. The method includes providing a biological sample that  
30 includes the carbohydrate polymer and contacting the sample with a test agent. A carbohydrate polymer fingerprint of one or more carbohydrate polymers in the sample is identified and compared to a carbohydrate polymer fingerprint of the one or more carbohydrate polymers in a sample that is not contacted with the agent. A difference in carbohydrate fingerprint profiles is identified, if present, in the test and reference

WO 02/37106

PCT/US01/47064

fingerprints, thereby identifying an agent that modulates the structure of a carbohydrate polymer.

5 The invention also provides a method of identifying a candidate therapeutic agent for a pathophysiology associated with a carbohydrate polymer by providing a test biological sample comprising a cell capable of expressing the carbohydrate polymer; contacting the test biological sample with a test agent; identifying a carbohydrate polymer fingerprint of one or more carbohydrate polymers in the biological sample; comparing the carbohydrate polymer fingerprint to a carbohydrate polymer fingerprint of one or more carbohydrate polymers in a reference biological sample comprising at least one cell whose pathophysiological status is known; and identifying a difference in the carbohydrate finger profiles, if present, in the test biological sample and reference biological sample, thereby identifying a therapeutic agent for a pathophysiology associated with the carbohydrate polymer.

10 Also provided herein is a method of identifying an individualized therapeutic agent suitable for treating a pathophysiology associated with a carbohydrate polymer in a subject. The method includes providing from the subject a biological sample comprising the carbohydrate polymer; contacting the test biological sample with a test agent; identifying a carbohydrate polymer fingerprint of one or more carbohydrate polymers in the biological sample; comparing the carbohydrate polymer fingerprint to a carbohydrate polymer fingerprint of the one or more carbohydrate polymers in a reference biological sample whose pathophysiological status is known; and identifying a difference in the carbohydrate finger profiles, if present, in the test biological sample and reference biological sample, thereby identifying an individualized therapeutic agent for the subject.

15 In a further aspect the invention includes a method of assessing the efficacy of a treatment of pathophysiology associated with a carbohydrate polymer. The method includes providing from the subject a test biological sample comprising the carbohydrate polymer; determining a carbohydrate fingerprint of the carbohydrate polymer; and comparing the carbohydrate fingerprint of the polymer with a reference carbohydrate polymer fingerprint, wherein the reference carbohydrate polymer fingerprint is derived from a carbohydrate polymer whose pathophysiological status is known, thereby assessing the efficacy of treatment of the pathophysiology in the subject.

20 In a further aspect, the invention includes method of treating a pathophysiology associated with a carbohydrate polymer mediated pathway in a subject by administering to the

WO 02/37106

PCT/US01/47064

subject an agent that modulates activity or levels of a carbohydrate polymer in the patient, wherein the modulation alters a carbohydrate polymer fingerprint in the patient

In preferred embodiments, at least one of the fingerprints identified or utilized in the herein described methods features a plurality of addresses, each address containing a numeric value related to binding of a saccharide-binding agent to the carbohydrate polymer, and the fingerprint is analyzed by a method comprising the steps of: (a) connecting a first address to at least one other address of the fingerprint to form a map; (b) if the first address is consistent with the at least one other address, determining the map to be internally consistent; (c) repeating steps (a) and (b) at least once to form at least one additional map; (d) comparing the map to the at least one additional map to determine if the maps are mutually consistent; and (e) eliminating any mutually inconsistent maps. In preferred embodiments, the method additionally includes the steps of (f) receiving experimental data from a second assay; (g) converting the experimental data to form a second fingerprint; (h) performing steps (a) and (b) with the second fingerprint to form a second fingerprint map; (i) comparing the map to the second fingerprint map to determine if the maps are mutually consistent; and (j) eliminating any mutually inconsistent maps.

If desired, step (g) further may further include (i) analyzing a format of the experimental data; (ii) if the format is not a numerical value format, converting the experimental data to at least one numerical value; and (iii) creating the second fingerprint from the at least one numerical value.

In some embodiments, experimental data for the second assay is obtained by contacting the saccharide-binding agent to a known carbohydrate polymer having at least one of a known function, a known sequence or a combination thereof.

In some embodiments, the second assay is performed under identical experimental conditions as for the carbohydrate polymer.

In some embodiments, the second assay is performed on specific carbohydrate polymer material for the carbohydrate polymer, the specific carbohydrate polymer material being identical as for binding the saccharide-binding agent to the carbohydrate polymer.

In some embodiments, comparing includes integrating external data to the sample carbohydrate polymer fingerprint, the fingerprint featuring a plurality of addresses, each address containing a numeric value related to binding of a saccharide-binding agent to the sample carbohydrate polymer, the method comprising the steps of: (a) converting the external data to form an external fingerprint, the external data including at least one assay being performed on a carbohydrate polymer; (b) comparing the external fingerprint to the

WO 02/37106

PCT/US01/47064

fingerprint for the sample carbohydrate polymer; and (c) determining if the external fingerprint is consistent with the fingerprint for the sample carbohydrate polymer.

In some embodiments, step (a) further comprises the steps of: (i) analyzing a format of the external data; (ii) if the format is not a numerical value format, converting the external data to at least one numerical value; and (iii) creating the external fingerprint from the at least one numerical value.

Alternatively, if the format is a numerical value format, the external fingerprint may be created directly from the external data.

In some embodiments, the method further comprises constructing a map for characterizing the carbohydrate polymer by: (a) characterizing the carbohydrate polymer with a fingerprint, the fingerprint featuring a plurality of addresses, each address containing a value obtained from assay data from an experimental assay performed on the carbohydrate polymer;

(b) constructing a plurality of maps according to the fingerprint; (c) obtaining additional data for characterizing the carbohydrate polymer; (d) determining if each map is consistent with the additional data; and (e) if the map is not consistent with the additional data, rejecting the map. Preferably, each map includes a plurality of elements, each element including at least one feature of the carbohydrate polymer being selected from the group consisting of a function of at least a portion of the carbohydrate polymer, a sequence of at least a portion of the carbohydrate polymer, a structure of at least a portion of the carbohydrate polymer, and a combination thereof.

In some embodiments, the carbohydrate polymer features a sequence having a plurality of monosaccharides and step (b) is performed according to sequence information for at least a portion of the sequence, such that the map features at least the portion of the sequence.

In some embodiments, step (b) is performed according to at least one functional epitope of the carbohydrate polymer, the at least one functional epitope being at least a portion of the carbohydrate polymer having a function, such that the map features the functional epitope.

In some embodiments, the carbohydrate polymer features a sequence having a plurality of monosaccharides and step (b) is also performed according to sequence information for at least a portion of the sequence, such that the map features both the functional epitope and at least the portion of the sequence.

WO 02/37106

PCT/US01/47064

Preferably, step (c) is performed with assay data from at least one additional experimental assay performed on the carbohydrate polymer.

In some embodiments, at least one assay is for determining binding of a saccharide-binding agent to the carbohydrate polymer, such that the assay data is obtained from detection of whether binding of the saccharide-binding agent to the carbohydrate polymer occurred.

In some embodiments, the experimental assay is performed on specific carbohydrate polymer material for the carbohydrate polymer, and at least one additional different assay is also performed on the specific carbohydrate polymer material for step (c) for direct comparison of the additional data to the fingerprint.

In preferred embodiments, the carbohydrate polymer features a sequence having a plurality of monosaccharides and wherein step (c) is performed on a known carbohydrate polymer having at least one of a known function, a known sequence or a combination thereof.

In preferred embodiments, the experimental assay is performed on specific carbohydrate polymer material for the carbohydrate polymer, and the experimental assay is also performed on the known carbohydrate polymer for step (c) for direct comparison of the additional data to the fingerprint. In some embodiments, the map is related to an overall characteristic of the carbohydrate polymer.

Preferably, the identifying step further comprises constructing a map for the carbohydrate polymer, the method comprising the steps of: (a) characterizing the carbohydrate polymer according to assay data obtained from at least one experimental assay performed on the carbohydrate polymer; (b) decomposing the assay data into a plurality of addresses, each address featuring a value of the assay data; (c) forming a plurality of maps by connecting each address to at least one other address; and (d) transforming each map into a property vector by correlating the value at each address to a feature of the carbohydrate polymer being selected from the group consisting of a function of at least a portion of the carbohydrate polymer, a sequence of at least a portion of the carbohydrate polymer, a structure of at least a portion of the carbohydrate polymer, and a combination thereof.

In preferred embodiments, step (c) is performed exhaustively to determine all combinations of addresses for maps. Alternatively, or in addition, step (c) is performed recursively.

In preferred embodiments, step (c) is performed by comparing the assay data to at least one template for the property vector, to determine if the feature exists.

WO 02/37106

PCT/US01/47064

The method may further include constructing a map for a carbohydrate polymer by a method that includes the steps of: (a) providing characterizing data for the carbohydrate polymer; (b) deriving a plurality of maps from the characterizing data; (c) obtaining additional data for characterizing the carbohydrate polymer; (d) determining if the additional data is consistent with each of the plurality of maps; (e) if the additional data is not consistent with a map, eliminating the map; and (f) adding an additional map only if the additional map is consistent with the additional data and with each remaining map.

The method may further include characterizing a sample carbohydrate polymer according to a known carbohydrate polymer having at least one of a known function, a known sequence or a combination thereof. The method includes the steps of: (a) performing at least one experimental assay for the sample carbohydrate polymer to obtain assay data; (b) performing an identical experimental assay for the known carbohydrate polymer to obtain comparison assay data; and (c) characterizing the sample carbohydrate polymer according to the known carbohydrate polymer by comparing the assay data to the comparison assay data.

Preferably, at least one experimental assay is performed under identical assay conditions as the identical experimental assay.

In certain preferred embodiments, at least one experimental assay includes at least one assay for determining binding of a saccharide-binding agent to the carbohydrate polymer and to the known carbohydrate polymer.

In preferred embodiments, the carbohydrate polymer fingerprint is identified by a method comprising: providing a first carbohydrate polymer; contacting the first carbohydrate polymer with a first saccharide-binding agent; determining whether the first carbohydrate polymer binds to the first saccharide-binding agent; contacting the carbohydrate polymer with a second saccharide-binding agent, wherein the second saccharide-binding agent comprises a detectable label; and determining whether the first carbohydrate polymer binds to the second saccharide-binding reagent, thereby generating a fingerprint of the carbohydrate polymer.

As disclosed herein, the method may further include contacting the carbohydrate polymer with at least five saccharide-binding agents, and determining whether the carbohydrate polymer binds to each of the at least five saccharide-binding reagents.

In some embodiments, the fingerprints are identified and compared using a system and method for characterizing carbohydrate polymers according to maps obtained from experimental data. Preferably, the data is obtained from a plurality of different types of experimental assays for characterizing the carbohydrate polymer. More preferably, at least

WO 02/37106

PCT/US01/47064

one such assay involves binding a saccharide-binding agent to the carbohydrate polymer. One or more features of the carbohydrate polymer is then preferably characterized.

These features are preferably derived from maps of the data obtained from assays involving the sample carbohydrate polymer. These maps are more preferably analyzed at a plurality of levels, with each level providing more abstract biological information. Most preferably, new types of experimental data are introduced to the process of analysis at each level, in order to support more complex analyses of the data. Optionally and most preferably, maps are eliminated at each level as being inconsistent with the experimental data. New maps are most preferably added at a higher level only if they are derived from the new experimental data which has been introduced at that level, in order to prevent a combinatorial explosion at successive levels of data analysis.

According to the present invention, there is provided a method for analyzing a fingerprint for a carbohydrate polymer, the fingerprint featuring a plurality of addresses, each address containing a numeric value related to binding of a saccharide-binding agent to the carbohydrate polymer, the method comprising the steps of: (a) connecting a first address to at least one other address of the fingerprint to form a map; (b) if a value for the first address does not contradict a value for the at least one other address, determining the map to be internally coherent; (c) repeating steps (a) and (b) at least once to form at least one additional map; (d) comparing the map to the at least one additional map to determine if the maps are mutually coherent; and (e) eliminating any mutually inconsistent maps.

Preferably, the method further comprises the steps of: (f) receiving experimental data from a second assay; (g) converting the experimental data to form a second fingerprint; (h) performing steps (a) and (b) with the second fingerprint to form a second fingerprint map; (i) comparing the map to the second fingerprint map to determine if the maps are mutually coherent; and (j) eliminating any mutually inconsistent maps.

More preferably, step (g) further comprises the steps of: (i) analyzing a format of the experimental data; (ii) if the format is not a numerical value format, converting the experimental data to at least one numerical value; and (iii) creating the second fingerprint from the at least one numerical value.

According to another embodiment of the present invention, there is provided a method for integrating external data to a fingerprint for a sample carbohydrate polymer, the fingerprint featuring a plurality of addresses, each address containing a numeric value related to binding of a saccharide-binding agent to the sample carbohydrate polymer, the method comprising the steps of: (a) converting the external data to form an external fingerprint, the

WO 02/37106

PCT/US01/47064

external data including at least one assay being performed on a carbohydrate polymer; (b) comparing the external fingerprint to the fingerprint for the sample carbohydrate polymer; and (c) determining if the external fingerprint is consistent with the fingerprint for the sample carbohydrate polymer;

- 5 (d) incorporating the external data with the data in the fingerprint to a newly determined fingerprint or "structure vector".

Hereinafter, the term "glycomolecule" includes any molecule with a polysaccharide component. Examples include polysaccharide, a glycoprotein, and glycolipid.

- 10 Hereinafter, the term "saccharide-binding agent" refers to any entity which is capable of binding to a saccharide, whether monosaccharide, oligosaccharide, polysaccharide or a combination thereof, including but not limited to, a lectin, an antibody, another protein which binds to or otherwise recognizes a saccharide, and a polysaccharide-cleaving or modifying enzyme.

- 15 Hereinafter, the term "carbohydrate polymer" refers to any polysaccharide or oligosaccharide, or other structure containing a plurality of connected monosaccharide units.

Hereinafter, the term "sample carbohydrate polymer" refers to the carbohydrate polymer under test, for which experimental data is derived for the purposes of further analysis.

- 20 Hereinafter, the term "comparison carbohydrate polymer" refers to the carbohydrate polymer for which data is obtained for comparison to the sample carbohydrate polymer. The comparison carbohydrate polymer may optionally be a standard known carbohydrate polymer, for which the structure is known.

- Hereinafter, the term "computational device" includes, but is not limited to, personal computers (PC) having an operating system such as DOS, Windows™, OS/2™ or Linux; 25 Macintosh™ computers; computers having JAVA™-OS as the operating system; graphical workstations such as the computers of Sun Microsystems™ and Silicon Graphics™, and other computers having some version of the UNIX operating system such as AIX™ or SOLARIS™ of Sun Microsystems™; or any other known and available operating system, or any device, including but not limited to: laptops, hand-held computers, enhanced cellular telephones 30 such as WAP-enabled cellular telephones, wearable computers of any sort, which can be connected to a network as previously defined and which has an operating system.

Hereinafter, the term "Windows™" includes but is not limited to Windows95™, Windows

WO 02/37106

PCT/US01/47064

NT™, Windows98™, Windows CE™, Windows2000™, and any upgraded versions of these operating systems by Microsoft Corp. (USA).

For the present invention, a software application could be written in substantially any suitable programming language, which could easily be selected by one of ordinary skill in the art. The programming language chosen should be compatible with the computational device according to which the software application is executed. Examples of suitable programming languages include, but are not limited to, C, C++ and Java.

In addition, the present invention could be implemented as software, firmware or hardware, or as a combination thereof. For any of these implementations, the functional steps performed by the method could be described as a plurality of instructions performed by a data processor.

Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, suitable methods and materials are described below. All publications, patent applications, patents, and other references mentioned herein are incorporated by reference in their entirety. In case of conflict, the present specification, including definitions, will control. In addition, the materials, methods, and examples are illustrative only and not intended to be limiting.

Other features and advantages of the invention will be apparent from the following detailed description and claims.

#### Brief Description of the Drawings

FIG. 1 is an illustration of the glycomolecule identity (GMID) cards obtained for pasteurized goat's milk (A and B), non-pasteurized goat's milk (C and D) and bovine milk (E).

FIG. 2 is a reproduction of the GMID cards obtained for various lipopolysaccharide samples. Cards A to E correspond to LPS# 1, 7, 10, 15 and 16 respectively.

FIG. 3 is a high-level logic flowchart that illustrates an algorithm for choosing a set of colored lectins.

WO 02/37106

PCT/US01/47064

FIG. 4 shows an exemplary experimental system for obtaining the raw data for determining a fingerprint for a carbohydrate polymer of interest for the present invention.

FIG. 5 is a flowchart of an exemplary method according to the present invention for comparing the fingerprint of the sample carbohydrate polymer to at least one other fingerprint.

FIG. 6 is a flowchart of an exemplary method according to the present invention for internally analyzing the fingerprint of the sample carbohydrate polymer in order to extend the fingerprint data.

FIG. 7 is a flowchart of an exemplary method according to the present invention for extending the fingerprint data by integration of data from external databases.

FIG. 8 is a flowchart of an exemplary method according to the present invention for locating features of interest within the sample carbohydrate polymer

#### Detailed Description of the Invention

Provided by the invention are methods for identifying and modifying carbohydrate polymers using information that describes the binding status of the carbohydrate polymers with respect to saccharide-binding agents. The carbohydrate polymer used in the herein describe methods can be any molecule that includes a polysaccharide moiety. Thus, the carbohydrate can be a polysaccharide as well as a molecule to which a polysaccharide is linked (*e.g.*, by a covalent bond) to a second molecule. The second molecule can be, *e.g.*, a sulfate, or a polymer. The carbohydrate polymer can be, *e.g.*, a glycoprotein or a glycolipid. Examples of glycoproteins include growth factors such as erythropoietin (EPO), interferons (including interferon alpha, interferon beta, and interferon gamma), human chronic gonadotropin (hCG), GCSF, antithrombin III, an interleukin, (*e.g.*, IL-2) and hCG.

Examples of polysaccharides include, *e.g.*, glycogen, starch cellulose, heparin, heparin sulfate, fragments of heparin sulfate, and cell wall components such as bacterial lipopolysaccharides or glucans found in yeast cell walls.

#### General Method for Analysis of Carbohydrate Polymers

In preferred embodiments, the carbohydrate polymers identified, modified, or used in

WO 02/37106

PCT/US01/47064

the herein describe methods may be variant forms of a polysaccharide such as, e.g., heparin, or heparin sulfate. For example, variant forms of carbohydrate polymers can be chosen based on desired structural or functional properties of the carbohydrate polymer. For example, variant forms of heparin or heparin sulfate, or fragments of these molecules (such as those produced following cleavage by heparanase) may be selected based on their enhanced ability of the variant form to modulate detachment of the extracellular matrix, to promote cell migration, to bind polypeptides such as chemokines or growth factors, to modulate inflammation, angiogenesis, tumor metastasis, restenosis, or cell proliferation, or to modulate the activity of heparanase.

10 In one aspect, the invention provides a method for determining the relatedness of a first carbohydrate polymer and a second carbohydrate polymer, e.g., two or more glycoproteins. To determine the relatedness of two or more glycoproteins, a first fingerprint of a first glycoprotein is compared to a second fingerprint of a second glycoprotein. The first fingerprint comprises binding information for at least a first saccharide-binding agent and a second saccharide-binding agent for the first glycoprotein. The second fingerprint comprises binding information for at least the first saccharide-binding agent and the second saccharide-binding agent for the second glycoprotein.

20 The first fingerprint and the second fingerprint are compared by determining whether the first glycoprotein and the second glycoprotein bind to the first saccharide binding agent, and whether the first glycoprotein and the second glycoprotein bind to the second saccharide binding agent. The degree to which the first and second glycoprotein share the same binding status *i.e.*, binding or non-binding, with respect to the first and second saccharide-binding agents indicates the relatedness of the first glycoprotein and second glycoprotein.

25 To determine the relatedness of polysaccharides, a first fingerprint of a first polysaccharide is provided. The first fingerprint includes binding information for at least a first saccharide-binding agent and a second saccharide-binding agent for the first polysaccharide. The first fingerprint is compared to a second fingerprint of a second polysaccharide, wherein the second fingerprint comprises binding information for at least the first saccharide-binding agent and the second saccharide-binding agent for the second polysaccharide. The comparing includes determining whether the first polysaccharide and the second polysaccharide bind to the first saccharide binding agent, and whether the first polysaccharide and the second polysaccharide bind to the second saccharide binding agent

30 Also provided by the invention is a method for identifying a carbohydrate polymer using carbohydrate polymer fingerprint information. For example, in one embodiment, a first

WO 02/37106

PCT/US01/47064

fingerprint of a test glycoprotein is provided. The first fingerprint includes binding information for at least a first saccharide-binding agent and a second saccharide-binding agent for the first glycoprotein. The first fingerprint is compared to at least one reference fingerprint, wherein the reference glycoprotein fingerprint comprises binding information for at least the first saccharide-binding agent and the second saccharide-binding agent for at least one reference glycoprotein.

A similarity in fingerprint patterns between the test fingerprint and the reference fingerprint indicates the test glycoprotein and reference glycoprotein are related. For example, identical patterns indicate the test glycoprotein is identical to the reference glycoprotein.

Fingerprint analysis information can also be used to modify glycoproteins to contain, or lack, a desired property. To make a modified glycoprotein, a first fingerprint that includes binding information for at least a first saccharide-binding agent and a second saccharide-binding agent for the first glycoprotein is compared to at least one reference fingerprint. The reference fingerprint includes binding information for at least the first saccharide-binding agent and the second saccharide-binding agent for at least one reference glycoprotein. The status of the reference glycoprotein with respect to the property of interest is preferably known. Differences in the first fingerprint and the reference fingerprint are detected, and this information is used to alter the carbohydrate polymer content of the test glycoprotein to decrease or increase the differences in the first fingerprint and reference fingerprint.

In some embodiments, a fingerprint of the altered test glycoprotein is generated and compared to the reference fingerprint.

Also provided by the invention is a method of synthesizing a glycoprotein by providing a polypeptide that includes the desired amino acid sequence of the glycoprotein and attaching carbohydrate polymers to the polypeptide to produce the desired modified glycoprotein. The polypeptide can be synthesized chemically if desired. Alternatively, the peptide can be recombinantly expressed.

Also within the invention is a carbohydrate polymer produced made by one of the methods described herein. The carbohydrate polymer can be purified using information about its saccharide agent-binding properties. For example, a carbohydrate known to bind to three distinct saccharide agents can be purified using affinity columns that include these agent

The invention also includes a method of diagnosing a pathology associated with a carbohydrate polymer in a subject. To diagnose the pathology, a test fingerprint of a

WO 02/37106

PCT/US01/47064

carbohydrate polymer from a subject suspected of having the pathology is compared to a reference fingerprint. The test fingerprint is from a carbohydrate polymer in a reference sample whose pathological state is known. A correspondence between the test fingerprint and the reference fingerprint indicates the subject and the reference sample have the same  
5 pathological state. For example, if the reference sample is from a subject (or population of subjects) that does not have the pathology, then a similarity in the fingerprint between the test subject and the reference fingerprint indicates the test subject does not have the pathological state. The reference sample can be drawn from a database.

Also within the invention is a method of identifying a function associated with a  
10 carbohydrate polymer by providing a test fingerprint of a carbohydrate polymer from a test sample and comparing the test fingerprint with a reference fingerprint. The test fingerprint is from a carbohydrate polymer whose functional status is known. A correspondence between the test fingerprint and the reference fingerprint indicates the subject and the reference sample have the same functional status.

15

#### Identifying Carbohydrate Polymer Fingerprints

A fingerprint can also be used to identify a carbohydrate polymer by comparing a test fingerprint from an unknown carbohydrate polymer sample with a reference fingerprint, which is from carbohydrate polymer whose identity is known. A correspondence between  
20 the test fingerprint and the reference fingerprint indicates the subject and the reference carbohydrate sample are the same.

As used herein, a fingerprint of a carbohydrate polymer is a compilation of information about the binding status of the carbohydrate polymer and a plurality of scattered-binding agents. In some embodiments, the fingerprint is a numeric representation of the  
25 detection of the presence of binding by the saccharide-binding agents to the carbohydrate polymer.

The fingerprint of the carbohydrate polymer can be generated by contacting the carbohydrate polymer with a first saccharide-binding agent and determining whether the carbohydrate polymer binds to the saccharide-binding reagent. The carbohydrate polymer is  
30 also contacted with a second saccharide-binding agent, and a determination is made as to whether the second binding-agent binds to the carbohydrate polymer.

The carbohydrate polymer is preferably contacted with at least five saccharide-binding agents, and a determination is made as to whether the carbohydrate polymer binds to each of the at least five saccharide-binding reagents. In preferred embodiments, the binding

WO 02/37106

PCT/US01/47064

of the carbohydrate polymer to at least 10, 15, 20, or 25 or more agents is determined.

In preferred embodiments, binding of the first and second saccharide-agent is determined by providing a surface comprising at least one first saccharide-binding agent attached to a predetermined location on the surface and contacting the surface with a carbohydrate polymer under conditions allowing for the formation of a first complex between the first saccharide-binding agent and the carbohydrate polymer. Unbound polymer is removed if desired, and the surface is contacted with at least one second saccharide-binding agent under conditions allowing for formation of a second complex between the first complex and the second saccharide-binding agent. The first and second saccharide-binding agent are then identified, and the information generated provides a fingerprint for the carbohydrate polymer. By including a plurality of first and/or second saccharide-binding agents, it is possible to generate a detailed fingerprint of the carbohydrate polymer. Of course, it will be apparent to one of ordinary skill in the art that the absence of binding of a first or second saccharide-agent to a carbohydrate polymer will also contribute to the fingerprint generated for the polysaccharide.

The second saccharide agent preferably contains a detectable label. When the second saccharide-binding agent is labeled, the identity of the second label determines the identity of the second saccharide-binding agent. The position of the second label on the substrate in turn reveals the identity of the first saccharide-binding agent.

To assess binding status, the carbohydrate polymer is added to a surface that includes at least one saccharide-binding agent attached to a predetermined location on the surface. The carbohydrate polymer is incubated with the surface under conditions allowing for the formation of a complex between the first saccharide-binding agent and the carbohydrate polymer. The surface can then be washed if desired to remove unbound carbohydrate polymer. The surface is then contacted with a second saccharide-binding agent under conditions allowing for formation of a second complex between the first complex and the second saccharide-binding agent. The second agent preferably carries a detectable label to allow for detection of the second complex. Detection of the second complex at a location on the substrate corresponding to the location of a predetermined binding-agent allows for the identification of the first and second binding agents as agents that bind to the carbohydrate polymer. Detecting the first and second-binding agents provides structural information about the carbohydrate polymer.

While the method has been described by first contacting the carbohydrate polymer with the surface and then adding a detectable label, it is understood that this order is not

WO 02/37106

PCT/US01/47064

obligatory. Thus, in some embodiments, the second agent is mixed with the carbohydrate polymer, and this complex is added to the surface.

In some embodiments, a plurality of saccharide-binding agents are attached to the surface. Similarly, a plurality of second detectable saccharide-binding agents may be used.

5 In preferred embodiments, a plurality of both first and second saccharide-binding agents are used.

Thus, in various embodiments, at least, 5, 10, 15, 25, 30, or 50 or more first saccharide-binding agents are attached to the surface. Preferably, each the first saccharide-binding agents are attached at spatially distinct regions of the substrate. In other  
10 embodiments, at least 5, 10, 15, 25, 30, or 50 of more second-saccharide binding agents are used. Preferably, each of the second-saccharide have attached thereto distinguishable labels, *i.e.*, labels that distinguish one-second saccharide-binding agent from another second saccharide-binding agent.

As used herein, a "carbohydrate polymer" includes any molecule with a  
15 polysaccharide component. Examples include polysaccharide, a glycoprotein, and glycolipid. While a carbohydrate polymer includes any saccharide molecule containing two or more linked monosaccharide residues, it is understood that in most embodiments, the carbohydrate polymer will include 10, 25, 50, 1000, or 10,000 or more monosaccharide units. If desired, the carbohydrate polymer can be added to the surface after digestion with a saccharide-  
20 cleaving agent. Alternatively, the carbohydrate polymer can be added to the surface, allowed to bind to a first saccharide-binding agent attached to the surface, and then digested with a saccharide-cleaving agent.

In general, any agent that binds to a polysaccharide can be used as the first or second saccharide-binding agent. As is known in the art, a number of agents that bind to saccharides  
25 have been described. One class of agents is the lectins. Many of these proteins bind specifically to a certain short oligosaccharide sequence. A second class of agents is an antibody that that specifically recognize saccharide structures. A third class of saccharide-binding agent are proteins that bind to carbohydrate residues. For example, glycosidases are enzymes that cleave glycosidic bonds within the saccharide chain. Some glycosidases may  
30 recognize certain oligosaccharide sequences specifically. Another class of enzymes are glycosyltransferases, which cleave the saccharide chain, but further transfer a sugar unit to one of the newly created ends.

For the purpose of this application, the term "lectin" also encompasses saccharide-binding proteins from animal species (e.g. "mammalian lectins"). Thus, carbohydrate

WO 02/37106

PCT/US01/47064

polymers, like DNA or proteins, clearly have an important biological function which should be studied in greater detail.

A saccharide-binding agent is preferably an essentially sequence-specific agent. As used herein, "Essentially sequence-specific agent" means an agent capable of binding to a saccharide. The binding is usually sequence-specific, *i.e.*, the agent will bind a certain sequence of monosaccharide units only. However, this sequence specificity may not be absolute, as the agent may bind other related sequences (such as monosaccharide sequences wherein one or more of the saccharides have been deleted, changed or inserted). The agent may also bind, in addition to a given sequence of monosaccharides, one or more unrelated sequences, or monosaccharides.

The essentially sequence-specific agent is usually a protein, such as a lectin, a saccharide-specific antibody or a glycosidase or glycosyltransferase.

Examples of saccharide-binding agents lectins include lectins isolated from the following plants: *Conavalia ensiformis*, *Anguilla anguilla*, *Triticum vulgare*, *Datura stramonium*, *Galanthus nivalis*, *Maackia amurensis*, *Arachis hypogaea*, *Sambucus nigra*, *Erythrina cristagalli*, *Lens culinaris*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Allomyrina dichotoma*, *Dolichos biflorus*, *Lotus tetragonolobus*, *Ulex europaeus*, and *Ricinus communis*.

Other biologically active carbohydrate-binding compounds include cytokines, chemokines and growth factors. These compounds are also considered to be lectins for this patent application.

Examples of glycosidases include  $\alpha$ -Galactosidase,  $\beta$ -Galactosidase, N-acetylhexosaminidase,  $\alpha$ -Mannosidase,  $\beta$ -Mannosidase,  $\alpha$ -Fucosidase, and the like. Some of these enzymes may, depending upon the source of isolation thereof, have a different specificity. The above enzymes are commercially available, e.g., from Oxford Glycosystems Ltd., Abingdon, OX14 1RG, UK, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA, or Pierce, P.O. Box 117, Rockford, 61105 USA.

The saccharide-binding agent can also be a cleaving agent. A "cleaving agent" is an essentially sequence-specific agent that cleaves the saccharide chain at its recognition sequence. Typical cleaving agents are glycosidases, including exo- and endoglycosidases, and glycosyltransferases. However, also chemical reagents capable of cleaving a glycosidic bond may serve as cleaving agents, as long as they are essentially sequence-specific. The term "cleaving agent" or "cleavage agent" is within the context of this specification synonymous with the term "essentially sequence-specific agent capable of cleaving".

WO 02/37106

PCT/US01/47064

The cleaving agent may act at a recognition sequence. A "recognition sequence" as used herein is the sequence of monosaccharides recognized by an essentially sequence-specific agent. Recognition sequences usually comprise 2-4 monosaccharide units. An example of a recognition sequence is Gal $\beta$ 1-3 GalNAc, which is recognized by a lectin purified from *Arachis hypogaea*. Single monosaccharides, when specifically recognized by an essentially sequence-specific agent, may, for the purpose of this disclosure, be defined as recognition sequences.

The reaction conditions for the various essentially sequence-specific agents are known in the art. Alternatively, the skilled person may easily perform a series of tests with each essentially sequence-specific agent, measuring the binding activity thereof, under various reaction conditions. Advantageously, knowledge of reaction conditions under which a certain essentially sequence-specific agent will react, and of conditions under which it remain inactive, may be used to control reactions in which several essentially sequence-specific reagents are present. For example, the second and third sequence-specific reagents may be added to the reaction simultaneously, but via a change in reaction conditions, only the second essentially sequence-specific agent may be allowed to be active. A further change in reaction conditions may then be selected in order to inactivate the second essentially sequence-specific agent and activate the third essentially sequence-specific agent. Some illustrative examples of reaction conditions are listed in the Table 1 below. In addition to the pH and temperature data listed in Table 1, other factor, e.g. the presence of metals such as Zn, or salts of cations such as Mn, Ca, Na, such as sodium chloride salt, may be investigated to find optimum reaction conditions or conditions under which certain essentially sequence-specific agent will be active, while others are inactive.

25

**Table 1:****Reaction conditions for some essentially sequence-specific agents**

codes for condition sets	Condition serial number	pH	Temp (°C)	Enzyme(s)
* ♥	1	3.5	30	Jackbean $\beta$ -galactosidase
♥	2	5.0	37	Endo a-N Acetyl galactosidase $\alpha$ 1,2 Fucosidase $\beta$ 1,2 galactosidase
* ♠	3	5.0	25	Bovine kidney $\alpha$ Fucosidase
♥ ♠	4	7.2	25	Coffee bean $\alpha$ galactosidase

WO 02/37106

PCT/US01/47064

♣ ♥ ▲	5	5.8	55	<i>B. Fragilis</i> Endo $\beta$ -galactosidase
	6	6.2	25	Chicken egg lysozyme
	7	4.3	37	Bovine testes $\beta$ 1-3,4,6, Galactosidase
	From Biodiversa	2-9.5	50	Gly 001-02
	From Biodiversa	3.0-8.0	50	Gly 001-04
	From Biodiversa	2-11	50	Gly 001-06

- Symbols represent enzyme groups which are separable by external conditions.
  - Diversa Corp. produces Thermophilic Endo/Exo glycosidases with a wide variety of activity in various pH and Temperatures
- 5 • also possible conditions could be metals and others Zn, Mn, Ca, NaCl

The first saccharide-binding agent may be immobilized using any art-recognized method. For example, immobilization may utilize functional groups of the protein, such as amino, carboxy, hydroxyl, or thiol groups. For instance, a glass support may be functionalized with an epoxide group by reaction with epoxy silane, as described in the above PCT publication. The epoxide group reacts with amino groups such as the free  $\epsilon$ -amino groups of lysine residues. Another mechanism consists in covering a surface with electropositive materials such as gold, as also described in the PCT publication. As such materials form stable conjugates with thiol groups, a protein may be linked to such materials directly by free thiol groups of cysteine residues. Alternatively, thiol groups may be introduced into the protein by conventional chemistry, or by reaction with a molecule that contains one or more thiol groups and a group reacting with free amino groups, such as the N-hydroxyl succinimidyl ester of cysteine. Also thiol-cleavable cross-linkers, such as dithiobis(succinimidyl propionate) may be reacted with amino groups of a protein. A reduction with sulfhydryl agent will then expose free thiol groups of the cross-linker.

For some applications, it is preferable to design a substrate that contains a plurality of saccharide-binding agents known to bind, or suspected of binding, to a particular carbohydrate polymer of interest. For example, heparin, heparin sulfate, or fragments (such as those produced by heparanase digestion), as well as variant forms of these polysaccharides can be screened for their ability to bind to one or more proteins such as, e.g., aFGF, bFGF, PDGF, VEGF, VEGF-R, HGF, EGF, TGF-beta, MCP-1, -2 and -3, IL-1, -2, -3, -6, -7, -8, -

WO 02/37106

PCT/US01/47064

10, and -12, annexin IV, V, and VI, MIP-1 alpha, MIP-1 beta, ecotaxin, thrombospondin, PF-4, IP-10, interferon alpha, interferon gamma, slectin L and selectin P, antithrombin, plasminogen activator, vitronectin, CD44, SOD, lipoprotein lipase, ApoE, fibronectin, and laminin. These putative agents can be attached to a surface (*i.e.*, can be first saccharide  
5 binding agents).

In other embodiments, saccharide-binding agents known to or suspect of binding, to a particular carbohydrate polymer can be provided as a second saccharide-binding agent.

The label attached to the second saccharide-binding agent can be any label that is detected, or is capable of being detected. Examples of suitable labels include, *e.g.*,  
10 chromogenic label, a radiolabel, a fluorescent label, and a biotinylated label. Thus, the label can be, *e.g.*, colored lectins, fluorescent lectins, biotin-labeled lectins, fluorescent labels, fluorescent antibodies, biotin-labeled antibodies, and enzyme-labeled antibodies. In preferred embodiments, the label is a chromogenic label. The term "chromogenic binding agent" as used herein includes all agents that bind to saccharides and which have a distinct color or  
15 otherwise detectable marker, such that following binding to a saccharide, the saccharide acquires the color or other marker. In addition to chemical structures having intrinsic, readily-observable colors in the visible range, other markers used include fluorescent groups, biotin tags, enzymes (that may be used in a reaction that results in the formation of a colored product), magnetic and isotopic markers, and so on. The foregoing list of detectable markers  
20 is for illustrative purposes only, and is in no way intended to be limiting or exhaustive. In a similar vein, the term "color" as used herein (*e.g.* in the context of step (e) of the above described method) also includes any detectable marker.

The label may be attached to the second saccharide-binding agent using methods known in the art. Labels include any detectable group attached to the saccharide or  
25 essentially sequence-specific agent that does not interfere with its function. Labels may be enzymes, such as peroxidase and phosphatase. In principle, also enzymes such as glucose oxidase and  $\beta$ -galactosidase could be used. It must then be taken into account that the saccharide may be modified if it contains the monosaccharide units that react with such enzymes. Further labels that may be used include fluorescent labels, such as Fluorescein,  
30 Texas Red, Lucifer Yellow, Rhodamine, Nile-red, tetramethyl-rhodamine-5-isothiocyanate, 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene, cis-Parinaric acid, Phycocerythrin, Allophycocyanin, 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI), Hoechst 33258, 2-aminobenzamide, and the like. Further labels include electron dense metals, such as gold, ligands, haptens, such as biotin, radioactive labels.

WO 02/37106

PCT/US01/47064

The second saccharide-binding agent can be detected using enzymatic labels. The detection of enzymatic labels is well known in the art of ELISA and other techniques where enzymatic detection is routinely used. The enzymes are available commercially, e.g., from companies such as Pierce.

5 In some embodiments, the label is detected using fluorescent labels. Fluorescent labels require an excitation at a certain wavelength and detection at a different wavelength. The methods for fluorescent detection are well known in the art and have been published in many articles and textbooks. A selection of publications on this topic can be found at p. O-124 to O-126 in the 1994 catalog of Pierce. Fluorescent labels are commercially available

10 from Companies such as SIGMA, or the above-noted Pierce catalog.

The second saccharide-binding agent may itself contain a carbohydrate moiety and/or protein. Coupling labels to proteins and sugars are techniques well known in the art. For instance, commercial kits for labeling saccharides with fluorescent or radioactive labels are available from Oxford Glycosystems, Abingdon, UK. Reagents and instructions for their use

15 for labeling proteins are available from the above-noted Pierce catalog.

Coupling is usually carried out by using functional groups, such as hydroxyl, aldehyde, keto, amino, sulfhydryl, carboxylic acid, or the like groups. A number of labels, such as fluorescent labels, are commercially available that react with these groups. In addition, bifunctional cross-linkers that react with the label on one side and with the protein

20 or saccharide on the other may be employed. The use of cross-linkers may be advantageous in order to avoid loss of function of the protein or saccharide.

The label can be detected using methods known in the art. Some detection methods are described in the above-noted WO 93/22678, the disclosure of which is incorporated herein in its entirety. Particularly suitable for the method of the present invention is the CCD

25 detector method, described in the publication. This method may be used in combination with labels that absorb light at certain frequencies, and so block the path of a test light source to the VLSI surface, so that the CCD sensors detect a diminished light quantity in the area where the labeled agent has bound. The method may also be used with fluorescent labels, making use of the fact that such labels absorb light at the excitation frequency. Alternatively,

30 the CCD sensors may be used to detect the emission of the fluorescent label, after excitation. Separation of the emission signal from the excitation light may be achieved either by using sensors with different sensitivities for the different wavelengths, or by temporal resolution, or a combination of both.

WO 02/37106

PCT/US01/47064

In some embodiments, the method further includes acquiring one or more images of the first saccharide-binding agent and the saccharide-binding agent. The information can be stored, *e.g.*, as a photograph or digitized image. Alternatively, the information provided by the first and second binding image can be stored in a database.

5 The invention also includes a substrate that includes a plurality of complexes. Each complex includes a first saccharide-binding agent bound to a predetermined location on the substrate. The substrate can also optionally include a saccharide bound to the first saccharide-binding agent and/or a detectable second saccharide-binding agent. In some  
10 embodiments, the substrate is provided in the form of a solid support that includes in a pre-defined order a plurality of visual or otherwise detectable markers representative of a saccharide or saccharide sequence or fragment. A preferred substrate is nitrocellulose.

If desired, a substrate containing a plurality of first saccharide-binding agents can be provided in the form of a kit. Diagnostic procedures using the methods of this invention may be performed by diagnostic laboratories, experimental laboratories, practitioners, or private  
15 individuals. This invention provides diagnostic kits which can be used in these settings. The presence or absence of a particular carbohydrate polymer, as revealed by its pattern of reacting with saccharide binding agent, may be manifest in a provide sample. The sample can be, *e.g.*, clinical sample obtained from that an individual or other sample.

Each kit preferably includes saccharide-binding agent or agents which renders the  
20 procedure specific. The reagent is preferably supplied in a solid form or liquid buffer that is suitable for inventory storage, and later for exchange or addition into the reaction medium when the test is performed. Suitable packaging is provided. The kit may optionally provide additional components that are useful in the procedure. These optional components include buffers, capture reagents, developing reagents, labels, reacting surfaces, means for detection,  
25 control samples, instructions, and interpretive information.

The kit may optionally include a detectable second saccharide-binding agent and, if desired, reagents of detecting the second binding agent. The plurality of first saccharide-binding agents is preferably attached at predetermined location on the substrate and a detectable second saccharide-binding agent. In other embodiments, the kit is provided with a  
30 substrate and first saccharide-binding agents that can be attached to the substrate, as well as second saccharide-binding agents.

The information provided in the fingerprints described herein can also be used to purify carbohydrate polymers of interest. For example, a carbohydrate polymer can be purified by designing purification schemes based on the saccharide-binding agents to which it

WO 02/37106

PCT/US01/47064

binds. In one embodiment, the saccharide-binding agents are provided in column or columns, and a solution containing the carbohydrate polymer is introduced to the column or columns.

The carbohydrate polymer of interest is retained on the column or columns. The carbohydrate polymer of interest can then be eluted from the column or columns. In one

5 embodiment, the carbohydrate polymer of interest is using by adding an additional saccharide-binding agent to the column, which binds to, and removes the carbohydrate polymer of interest from the column or columns.

Also within the invention is a method of making a plurality, or library, of carbohydrate polymers that share at least one common function or structural feature, or both.

10 In some embodiments, the carbohydrate polymers are provided as a plurality. If desired, they can be provided on a substrate.

In preferred embodiments the carbohydrate polymers are provided in the form of a focus library, *e.g.*, the members of the focus library are chosen because they bind to a common ligand, or share another common functional or structural property.

15 For example, in various embodiments, the library of carbohydrate polymers may include variant forms of a polysaccharide such as laminarin, laminarin sulfate, heparin, or heparin sulfate. Members a library based on variant forms of heparin or heparin sulfate polysaccharides can be selected based on the ability of the candidate forms to demonstrate altered properties associated with heparin. For example, the variants may be selected based  
20 on their enhanced ability to modulate detachment of the extracellular matrix, to promote cell migration, to bind polypeptides such as chemokines or growth factors, to modulate inflammation, angiogenesis, tumor metastasis, restenosis, or cell proliferation, or to modulate the activity of heparanase. Alternatively, the library may include variant forms of a the carbohydrate polymer moiety of a glycoprotein.

25 The libraries are constructed by providing a population of carbohydrate polymers. In some embodiments, the population of carbohydrate polymers can be constructed using techniques known in the art for combinatorial chemistry. A carbohydrate fingerprint is generated for one or more members of the population. The member or members of the population are also assayed to determine the degree to which it demonstrates a function or  
30 structure of interest. Members of the population containing the desired property are selected for further characterization or modification, if desired. In addition, additional variant carbohydrate polymers can be designed based on the acquired information to result in a population of modified carbohydrate polymers, or a focused library, that have the desired properties.

WO 02/37106

PCT/US01/47064

Fingerprint data generated for the herein described methods may in addition be analyzed using procedures described in USSN 60/246,009, filed November 3, 2000; and USSN 60/258,887, filed November 3, 2000, the contents of which are incorporated by reference in their entireties and which are summarized below:

5 For example, a fingerprint featuring a plurality of addresses, each address containing a numeric value related to binding of a saccharide-binding agent to the carbohydrate polymer, can be analyzed by connecting a first address to at least one other address of the fingerprint to form a map (if the first address is consistent with the at least one other address), determining the map to be internally consistent; and repeating the connecting and determining at least  
10 once to form at least one additional map; comparing the map to the at least one additional map to determine if the maps are mutually consistent; and eliminating any mutually inconsistent maps.

Alternatively, or in addition, fingerprint data analysis can be performed using a method for integrating external data to a fingerprint for a sample carbohydrate polymer with  
15 the fingerprint featuring a plurality of addresses. Each address contains a numeric value related to binding of a saccharide-binding agent to the sample carbohydrate polymer by converting the external data to form an external fingerprint, and the external data includes at least one assay being performed on a carbohydrate polymer. The external fingerprint is compared to the fingerprint for the sample carbohydrate polymer; and a determination is  
20 made for whether the external fingerprint is consistent with the fingerprint for the sample carbohydrate polymer.

Fingerprints for the methods described herein can also be constructed by characterizing the carbohydrate polymer with a fingerprint. The fingerprint may feature a plurality of addresses, each address containing a value obtained from assay data from an  
25 experimental assay performed on the carbohydrate polymer. The characterization can include constructing a plurality of maps according to the fingerprint; obtaining additional data for characterizing the carbohydrate polymer; determining if each map is consistent with the additional data; and if the map is not consistent with the additional data, rejecting the map.

In another preferred embodiment, the fingerprints used in the methods described  
30 herein can be analyzed by constructing a map for a carbohydrate polymer, where the map includes: characterizing the carbohydrate polymer according to assay data obtained from at least one experimental assay performed on the carbohydrate polymer; decomposing the assay data into a plurality of addresses, each address featuring a value of the assay data; forming a plurality of maps by connecting each address to at least one other address; and transforming

WO 02/37106

PCT/US01/47064

each map into a property vector by correlating the value at each address to a feature of the carbohydrate polymer being selected from the group consisting of a function of at least a portion of the carbohydrate polymer, a sequence of at least a portion of the carbohydrate polymer, a structure of at least a portion of the carbohydrate polymer, and a combination thereof.

5  
10  
15  
20  
25  
In another preferred embodiment, the fingerprints used in the methods described herein can be analyzed by constructing a map with a method that includes: providing characterizing data for the carbohydrate polymer; deriving a plurality of maps from the characterizing data; obtaining additional data for characterizing the carbohydrate polymer; determining if the additional data is consistent with each of the plurality of maps; if the additional data is not consistent with a map, eliminating the map; and adding an additional map only if the additional map is consistent with the additional data and with each remaining map.

15  
20  
25  
In another preferred embodiment, the carbohydrate polymers can be characterized with respect to characterizing a sample carbohydrate polymer according to a known carbohydrate polymer having at least one of a known function, a known sequence or a combination thereof. The method includes: performing at least one experimental assay for the sample carbohydrate polymer to obtain assay data; performing an identical experimental assay for the known carbohydrate polymer to obtain comparison assay data; and characterizing the sample carbohydrate polymer according to the known carbohydrate polymer by comparing the assay data to the comparison assay data.

25  
30  
35  
In another preferred embodiment, fingerprints used in the herein described methods are constructed by: providing an experimental assay for determining binding of a saccharide-binding agent to the carbohydrate polymer; detecting whether binding of the saccharide-binding agent to the carbohydrate polymer occurred as raw data; converting the raw data to a numeric value; and placing the numeric value as an address of the fingerprint to form the fingerprint.

30  
35  
40  
45  
In another preferred embodiment, the fingerprints used in the herein described methods are compared using a method for comparing a plurality of fingerprints for at least a first and a second carbohydrate polymer, each fingerprint featuring a plurality of addresses, each address featuring a numeric value related to binding of a saccharide-binding agent to the carbohydrate polymer. The method includes: comparing the numeric value for at least one address of the fingerprint for the first carbohydrate polymer to the numeric value for the corresponding address of the fingerprint for the second carbohydrate polymer; and

WO 02/37106

PCT/US01/47064

determining similarity between the first and second carbohydrate polymers according to the comparison between the numeric values for the addresses.

In another preferred embodiment, the fingerprints are compared using a method for searching through a database of fingerprint data with a fingerprint of a sample carbohydrate polymer, the database containing fingerprint data for a plurality of comparison carbohydrate polymers. The method includes: constructing the database according to an addressing system, the addressing system being at least partially obtained from fingerprint data for the plurality of comparison carbohydrate polymers; converting the fingerprint of the sample carbohydrate polymer to a key; searching through the addressing system with the key; and  
5  
10 retrieving fingerprint data from at least one comparison carbohydrate polymer.

In another preferred embodiment, fingerprints are internally analyzed using a method for internally analyzing a fingerprint for extending fingerprint data for a carbohydrate polymer, the fingerprint featuring a plurality of addresses, each address containing a numeric value related to binding of a saccharide-binding agent to the carbohydrate polymer. The  
15 method includes: connecting a first address to at least one other address of the fingerprint to form a pattern; if a value for the first address does not contradict a value for the at least one other address, determining the pattern to be internally coherent; and adding each internally coherent pattern to the fingerprint as extended fingerprint data.

In another preferred embodiment, the fingerprints are provided by a system for  
20 constructing a fingerprint for a sample carbohydrate polymer. The system includes: (a) a wet array, comprising a substrate with a plurality of attached saccharide-binding agents, each saccharide binding agent being located at a predetermined array portion of the wet array, such that the sample carbohydrate polymer is incubated with the wet array to form a complex with a saccharide-binding agent; (b) a detection device for detecting the complex to form  
25 raw data; and (c) a conversion module for converting the raw data of each array portion to an address of the fingerprint.

In some preferred embodiments, the fingerprint is generated using a method for constructing a fingerprint for a carbohydrate polymer in a system for constructing a fingerprint for a sample carbohydrate polymer, the system featuring a wet array, the wet array  
30 including a substrate with a plurality of attached saccharide-binding agents, each attached saccharide-binding agent being located at a predetermined array portion of the wet array and a detection device. The method includes: incubating the carbohydrate polymer with the wet array under conditions for permitting binding of the carbohydrate polymer to the saccharide-binding agent to occur; detecting whether binding of the saccharide-binding agent to the

WO 02/37106

PCT/US01/47064

carbohydrate polymer occurred by the detection device; and adding an address to the fingerprint according to whether binding occurred.

In another preferred embodiment, the fingerprints are analyzed in a method for analyzing a sample containing at least one carbohydrate-containing material. The method includes defining a candidate space for determining at least one characteristic of a carbohydrate-containing material in the sample.

#### General Screening and Diagnostic Methods

Several of the herein disclosed methods relate to comparing carbohydrate polymer fingerprints in cells from a test and reference biological sample. Thus, in its various aspects and embodiments, the invention includes providing a test biological sample which includes at least biological sample that contains, or is suspected of containing, one or more carbohydrate polymers of interest.

Carbohydrate fingerprints for polymers of interest are identified by determining the binding status for one or more saccharide-binding agents for a carbohydrate polymer. Carbohydrate fingerprints of one or more of the carbohydrate polymers in the test biological sample is then compared to carbohydrate fingerprints of carbohydrate polymers from one or more reference biological samples. In various embodiments, the expression of 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 28, 30, 35, 40, or all of saccharide-binding agents is determined.

The reference biological sample includes one or more carbohydrate polymers from a cell or tissue sample for which the status of the compared parameter is known. The manner in which the carbohydrate fingerprint in the test biological sample reveals the presence, or degree, of the measured parameter depends on the composition of the reference biological sample. For example, if the reference biological sample is derived from cells known to have the parameter of interest, a similar carbohydrate fingerprint in the test biological sample and a reference biological sample indicates the test biological sample has the parameter of interest.

In various embodiments, a carbohydrate polymer in a test biological sample is considered altered if it varies from the corresponding fingerprint in the reference biological sample by more than 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, or 25 saccharide-binding agents.

In some embodiments, the carbohydrate fingerprint of the test biological sample is compared to carbohydrate fingerprints from multiple reference biological samples. The comparison can be made with respect to fingerprints for individual carbohydrate polymers, or to a composite fingerprint that is based on information compiled for multiple polymers.

WO 02/37106

PCT/US01/47064

The test biological sample that is exposed to, *i.e.*, contacted with, the test ligand can be isolated from any number of cells or tissues, *i.e.*, one or more cells, and can be provided *in vitro*, *in vivo*, or *ex vivo*. In various embodiments, the biological sample may be derived from a biological fluid such as, *e.g.*, blood, blood fractions (*e.g.*, serum or plasma), urine, saliva, milk, ductal fluid, tears and semen. Purification of polysaccharides can be performed using methods known in the art.

If desired, the test biological sample can be divided into two or more subpopulations. The subpopulations can be created by dividing a first population of cells, cell extracts, or other carbohydrate-polymer containing fraction, to create subpopulations that are as identical as possible. This will be suitable, in, for example, *in vitro* or *ex vivo* screening methods. In some embodiments, various sub-populations can be exposed to a control agent, and/or a test agent, multiple test agents, or, *e.g.*, varying dosages of one or multiple test agents administered together, or in various combinations.

Preferably, the reference biological sample is derived from a tissue type as similar as possible to the test biological sample. In some embodiments, the control biological sample is derived from the same subject as the test sample, *e.g.*, from a distinct region of the subject, or from the same subject taken at a different time (for example, samples can be removed from the subject prior to and after beginning therapy). In other embodiments, the reference biological sample is derived from a plurality of cells. For example, the reference biological sample can be a database of expression patterns from previously tested cells for which one of the herein-described parameters or conditions (*e.g.*, screening, diagnostic, or therapeutic applications) is known.

The subject is preferably a mammal. The mammal can be, *e.g.*, a human, non-human primate, mouse, rat, dog, cat, horse, or cow.

#### Identifying a Candidate Therapeutic Agent for Treating or Preventing a Pathophysiology Associated with a Carbohydrate Polymer

The methods disclosed herein can also be used to identify candidate therapeutic agents for pathophysiologies associated with a particular carbohydrate polymer fingerprint. The method is based on screening a candidate therapeutic agent to determine if it induces a carbohydrate fingerprint profile in a test biological sample that is characteristic of the carbohydrate fingerprint profile associated with a therapeutic or prophylactic response to the pathophysiology.

WO 02/37106

PCT/US01/47064

In the method, a test biological sample is exposed to a test agent or a combination of test agents (sequentially or consecutively), and the carbohydrate fingerprint of one or more test agents is determined. The carbohydrate fingerprint in the test biological sample is compared to the carbohydrate fingerprint in a reference biological sample. Induction of a carbohydrate fingerprint profile indicative of a therapeutic or prophylactic response to the pathophysiology.

The test agent can be a compound not previously described or can be a previously known compound. An agent effective in effecting a carbohydrate fingerprint of interest, or in suppressing the appearance of a carbohydrate polymer-containing compound, can be further tested for its ability to prevent or ameliorate the pathophysiology, and as a potential therapeutic useful for the treatment of such pathophysiology. Further evaluation of the clinical usefulness of such a compound can be performed using standard methods of evaluating toxicity and clinical effectiveness of therapeutic agents.

#### 15 **Selecting a Carbohydrate Polymer Therapeutic Agent Appropriate for a Particular Subject**

Differences in the genetic makeup of individuals can result in differences in their relative abilities to metabolize various drugs. An agent that is metabolized in a subject to act as a carbohydrate polymer therapeutic agent can manifest itself by inducing a change in a carbohydrate fingerprint pattern from that characteristic of a pathophysiologic state to a gene expression pattern characteristic of a non-pathophysiologic state. Accordingly, the carbohydrate fingerprints disclosed herein allow for a putative therapeutic or prophylactic agent suitable for a particular subject to be selected.

To identify an agent that is appropriate for a specific subject, a test biological sample from the subject is exposed to a therapeutic agent, and the carbohydrate fingerprint of one or more carbohydrate polymers is determined. In some embodiments, the test biological sample contains a particular cell type, *e.g.*, a hepatocyte or an adipocyte. In other embodiments, the agent is first mixed with a cell extract, *e.g.*, an adipose cell extract, which contains enzymes that metabolize drugs into an active form. The activated form of the therapeutic agent can then be mixed with the test biological sample and gene expression measured. Preferably, the biological sample is contacted *ex vivo* with the agent or activated form of the agent.

The carbohydrate fingerprint in the test biological sample is then compared to the carbohydrate fingerprint of the carbohydrate polymer in a reference biological sample. The reference biological sample is isolated from a cell population or tissue whose pathological

WO 02/37106

PCT/US01/47064

status is known. If the reference biological sample is not associated with the pathology, a similar carbohydrate fingerprint profile between the test biological sample and the reference biological sample indicates the agent is suitable for treating the pathophysiology in the subject. In contrast, a difference in expression between sequences in the test biological sample and those in the reference biological sample indicates that the agent is not suitable for treating the pathophysiology in the subject.

If the reference cell is associated with the pathology, a similarity in carbohydrate polymer fingerprint patterns between the test biological sample and the reference biological sample indicates the agent is not suitable for treating the pathophysiology in the subject. A dissimilar gene expression pattern in this instance indicates the agent will be suitable for treating the subject.

#### **Methods and Compositions for Treating Pathophysiology Associated with Variants in a Carbohydrate Polymer in a Subject**

Also included in the invention is a method of treating, *e.g.*, inhibiting, preventing or delaying the onset of a pathophysiology associated with a carbohydrate polymer in a subject by administering to the subject an agent which modulates the expression or activity of one or variant of the carbohydrate polymer associated with the pathophysiology. The term "modulates" is meant to include increase or decrease expression or activity of the carbohydrate polymer. Preferably, modulation results in alteration alter the expression or activity of a carbohydrate polymer in a subject to a level similar or identical to a subject not suffering from the pathophysiology. The subject can be, *e.g.*, a human, a rodent such as a mouse or rat, or a dog or cat.

In some embodiments, the agent is an efficacious form of the carbohydrate polymer. These agents, as well as other polypeptides, antibodies, agonists, and antagonists when used therapeutically are referred to herein as "Therapeutics". Methods of administration of Therapeutics include, but are not limited to, intradermal, intramuscular, intraperitoneal, intravenous, subcutaneous, intranasal, epidural, and oral routes. The Therapeutics of the present invention may be administered by any convenient route, for example by infusion or bolus injection, by absorption through epithelial or mucocutaneous linings (*e.g.*, oral mucosa, rectal and intestinal mucosa, etc.) and may be administered together with other biologically-active agents. Administration can be systemic or local. In addition, it may be advantageous to administer the Therapeutic into the central nervous system by any suitable route, including intraventricular and intrathecal injection.

WO 02/37106

PCT/US01/47064

Intraventricular injection may be facilitated by an intraventricular catheter attached to a reservoir (e.g., an Ommaya reservoir). Pulmonary administration may also be employed by use of an inhaler or nebulizer, and formulation with an aerosolizing agent. It may also be desirable to administer the Therapeutic locally to the area in need of treatment; this may be achieved by, for example, and not by way of limitation, local infusion during surgery, topical application, by injection, by means of a catheter, by means of a suppository, or by means of an implant. In a specific embodiment, administration may be by direct injection at the site (or former site) of a malignant tumor or neoplastic or pre-neoplastic tissue.

Various delivery systems are known and can be used to administer a Therapeutic of the present invention including, e.g.: (i) encapsulation in liposomes, microparticles, microcapsules; (ii) recombinant cells capable of expressing the Therapeutic; (iii) receptor-mediated endocytosis (See, e.g., Wu and Wu, 1987. *J Biol Chem* 262:4429-4432); (iv) construction of a Therapeutic nucleic acid as part of a retroviral or other vector, and the like. In one embodiment of the present invention, the Therapeutic may be delivered in a vesicle, in particular a liposome. In a liposome, the protein of the present invention is combined, in addition to other pharmaceutically acceptable carriers, with amphipathic agents such as lipids which exist in aggregated form as micelles, insoluble monolayers, liquid crystals, or lamellar layers in aqueous solution. Suitable lipids for liposomal formulation include, without limitation, monoglycerides, diglycerides, sulfatides, lysolecithin, phospholipids, saponin, bile acids, and the like. Preparation of such liposomal formulations is within the level of skill in the art, as disclosed, for example, in U.S. Pat. No. 4,837,028; and U.S. Pat. No. 4,737,323, all of which are incorporated herein by reference. In yet another embodiment, the Therapeutic can be delivered in a controlled release system including, e.g.: a delivery pump (See, e.g., Saudek, et al., 1989. *New Engl J Med* 321:574 and a semi-permeable polymeric material (See, e.g., Howard, et al., 1989. *J Neurosurg* 71:105). Additionally, the controlled release system can be placed in proximity of the therapeutic target (e.g., the brain), thus requiring only a fraction of the systemic dose. See, e.g., Goodson, In: *Medical Applications of Controlled Release* 1984. (CRC Press, Boca Raton, FL).

As used herein, the term "therapeutically effective amount" means the total amount of each active component of the pharmaceutical composition or method that is sufficient to show a meaningful patient benefit, i.e., treatment, healing, prevention or amelioration of the relevant medical condition, or an increase in rate of treatment, healing, prevention or amelioration of such conditions. When applied to an individual active ingredient, administered alone, the term refers to that ingredient alone. When applied to a combination,

WO 02/37106

PCT/US01/47064

the term refers to combined amounts of the active ingredients that result in the therapeutic effect, whether administered in combination, serially or simultaneously.

The amount of the Therapeutic of the invention which will be effective in the treatment of a particular disorder or condition will depend on the nature of the disorder or condition, and may be determined by standard clinical techniques by those of average skill within the art. In addition, *in vitro* assays may optionally be employed to help identify optimal dosage ranges. The precise dose to be employed in the formulation will also depend on the route of administration, and the overall seriousness of the disease or disorder, and should be decided according to the judgment of the practitioner and each patient's circumstances. Ultimately, the attending physician will decide the amount of protein of the present invention with which to treat each individual patient. Initially, the attending physician will administer low doses of protein of the present invention and observe the patient's response. Larger doses of protein of the present invention may be administered until the optimal therapeutic effect is obtained for the patient, and at that point the dosage is not increased further. However, suitable dosage ranges for intravenous administration of the Therapeutics of the present invention are generally about 20-500 micrograms ( $\mu\text{g}$ ) of active compound per kilogram (Kg) body weight. Suitable dosage ranges for intranasal administration are generally about 0.01 pg/kg body weight to 1 mg/kg body weight. Effective doses may be extrapolated from dose-response curves derived from *in vitro* or animal model test systems. Suppositories generally contain active ingredient in the range of 0.5% to 10% by weight; oral formulations preferably contain 10% to 95% active ingredient.

The duration of intravenous therapy using the pharmaceutical composition of the present invention will vary, depending on the severity of the disease being treated and the condition and potential idiosyncratic response of each individual patient. It is contemplated that the duration of each application of the protein of the present invention will be in the range of 12 to 24 hours of continuous intravenous administration. Ultimately the attending physician will decide on the appropriate duration of intravenous therapy using the pharmaceutical composition of the present invention.

Cells may also be cultured *ex vivo* in the presence of therapeutic agents or proteins of the present invention in order to proliferate or to produce a desired effect on or activity in such cells. Treated cells can then be introduced *in vivo* for therapeutic purposes.

**Assessing Efficacy of Treatment of a Pathophysiology  
Associated with a Carbohydrate Polymer**

WO 02/37106

PCT/US01/47064

Identification of differential fingerprints as described herein also allows for monitoring of the course of treatment of a pathophysiology associated with the carbohydrate polymer. In this method, a test biological sample is provided from a subject undergoing treatment for a pathophysiology associated with the carbohydrate polymer. If desired, test biological samples can be taken from the subject at various time points before, during, or after treatment. One or more carbohydrate fingerprints for one or more carbohydrate polymer is determined. The fingerprints are compared to fingerprints from a reference biological sample which includes cells whose pathophysiologic state is known.

If the reference biological sample is derived from cells that lack the pathophysiology a similarity in the carbohydrate fingerprint between the test biological sample and the reference biological sample indicates that the treatment is efficacious. However, a difference in carbohydrate fingerprints in the test population and this reference biological sample indicates the treatment is not efficacious.

By "efficacious" is meant that the treatment leads to a decrease in the pathophysiology in a subject. When treatment is applied prophylactically, "efficacious" means that the treatment retards or prevents a pathophysiology. Efficaciousness can be determined in association with any known method for treating the particular pathophysiology.

#### Fingerprint Maps

If desired, fingerprints can be identified and compared using systems and method for characterizing carbohydrate polymers according to maps obtained from experimental data. Preferably, the data is obtained from a plurality of different types of experimental assays for characterizing the carbohydrate polymer. More preferably, at least one such assay involves binding a saccharide-binding agent to the carbohydrate polymer. The map of binding by a plurality of agents is then analyzed in order to at least partially characterize the carbohydrate polymer. The map of binding is used to form a fingerprint, which also incorporates data from other types of assays, for at least a partial characterization of one or more features of the carbohydrate polymer.

These features are preferably derived from maps of the data obtained from assays involving the sample carbohydrate polymer. These maps are more preferably analyzed at a plurality of levels, with each level providing more abstract biological information. Most preferably, new types of experimental data are introduced to the process of analysis at each level, in order to support more complex analyses of the data. Optionally and most preferably, maps are eliminated at each level as being inconsistent with the experimental data. New

WO 02/37106

PCT/US01/47064

maps are most preferably added at a higher level only if they are derived from the new experimental data which has been introduced at that level, in order to prevent a combinatorial explosion at successive levels of data analysis.

At a basic level, the analyzed binding data is used to determine a fingerprint for the carbohydrate polymer. This fingerprint is actually a numeric representation of the detection of the presence of binding by the saccharide-binding agents to the carbohydrate polymer. The fingerprint itself thus characterizes the carbohydrate polymer at some level.

Next, the fingerprint is optionally internally analyzed in order to obtain various possible maps which fit the experimental data. For example, certain maps of lectin binding, particularly with sets of model saccharide-binding agents, may be indicative of the presence of a particular type or class of the carbohydrate polymer. Another such map may indicate the presence of a false negative or "hole", for a lectin or other saccharide-binding agent which should have bound at a particular location, but which did not in fact bind. The presence of a false negative may indicate the presence of a particular type of saccharide "neighborhood", which affects the binding of the saccharide-binding agent, such that even if a particular sequence is present, binding of the agent itself to the sequence is blocked.

At this level of analysis, optionally many different, mutually contradictory maps may be considered. Preferably, the cut-off or probabilistic threshold for these maps is low, in order to permit as many maps as possible to be considered. These maps are then preferably examined and optionally eliminated in subsequent levels of analysis, as described in greater detail below.

At the next level of analysis, preferably information from other types of assays is incorporated. These assays are optionally and preferably performed with the same or similar experimental material as for the fingerprint data, in order to reduce or even eliminate experimental artifacts. In addition, the use of at least similar experimental material enables results for the sample carbohydrate polymer to be compared to standard, known carbohydrate polymers, without requiring absolute accuracy of the experimental assay, but only reproducibility. For example, the assay could optionally include the use of glycosidases, elimination of reducing ends, and other modifications of the sample carbohydrate polymer. More preferably, previously obtained maps are eliminated at this level as being inconsistent with the experimental data.

The next level preferably enables data to be incorporated from external databases, such that optionally data is used from different experimental materials. Such information could be related to the composition of the saccharide, its source, and possibly other

WO 02/37106

PCT/US01/47064

information as well. For example this information could include whether the sample carbohydrate is part of a glycoprotein, the use of other types of carbohydrate binding agents such as cytokines, and so forth. For example, if maps of data obtained from previous stages are definitely incompatible with the source or the composition of the saccharide, then they should be eliminated. The introduction of such data is preferably performed at least partially with information from known carbohydrate-polymers. For example, an unknown saccharide could be classified as "EPO-like", which could help to guide future experiments.

As further level of analysis, the maps of data should be transformed, such that any reference to the original raw data is eliminated. Such a transformation is preferably performed by locating features of interest within the sample carbohydrate polymer. These features of interest may optionally be short sequences or portions of sequences of monosaccharides within the larger polymer sequence. A very simple example of such a feature is a glycosidase recognition site. Such features may also optionally be described as "sequence-based" features, in that they are characterized by at least a portion of the sequence of the carbohydrate polymer. Such features have the disadvantage of requiring absolute accuracy of the experimental data, rather than mere reproducibility. However, they have the advantage of being comparable over a wide variety of different known carbohydrate polymers, through data obtained from external databases as previously described.

Alternatively and/or additionally and preferably, these features of interest concern functional epitopes and/or sequence-based epitopes having a biological function of interest. By "functional" epitope, it is meant that at least a portion of the carbohydrate polymer appears to be associated with a particular function and/or type of function, regardless of the actual sequence of the carbohydrate polymer. Such a functional epitope may optionally be located through the performance of the same assay on a plurality of carbohydrate polymers, with only the requirement of reproducibility, rather than absolute accuracy. Of course, the functional epitope may also optionally be characterized by a sequence, such that the same epitope may optionally be both a sequence-based epitope and a functional epitope.

Also alternatively and/or additionally and preferably, these features of interest concern "characterization" features. These features are not necessarily discrete portions of the carbohydrate polymer, but rather are indicative of the classification, function or nature of the overall polymer, or some combination thereof. For example, such a characterization feature may enable the carbohydrate polymer to be determined to be "EPO-like". This determination would not necessarily immediately result in the location of specific functional epitopes within the polymer, for example, but may provide an indication that the

WO 02/37106

PCT/US01/47064

carbohydrate polymer should be further examined for the possibility of such functional epitopes being present.

The principles and operation of the present invention may be better understood with reference to the drawings and the accompanying description.

5 Referring now to the drawings, FIG. 4 shows an exemplary experimental system according to previously incorporated PCT Application No. PCT/IL00/00256 for obtaining the raw data for determining a fingerprint for a carbohydrate polymer of interest. As shown, a system 10 features a wet array 12, in which the actual assay is performed with a plurality of immobilized saccharide-binding agents. Each such immobilized agent is located at a  
10 predetermined array portion 14, which is a predetermined location on a substrate 16. Preferably, each array portion 14 features a different immobilized saccharide-binding agent. The plurality of array portions 14 which are shown compose the entirety of wet array 12. Thus, each array portion 14 is an address on wet array 12; the data obtained from this address forms a part of the fingerprint for the carbohydrate polymer of interest, as described in greater  
15 detail below.

The carbohydrate polymer is then incubated with wet array 12, under conditions which permit specific binding of the carbohydrate polymer to one or more immobilized saccharide-binding agents. Such specific binding should result in the formation of a complex between the carbohydrate polymer and the immobilized saccharide-binding agent at a  
20 particular array portion 14.

The presence of the complex is then detected by incubating a second, solubilized saccharide-binding agent with wet array 12. The second solubilized agent features a label for detection. Therefore, if the solubilized agent binds to the complex at any particular array  
25 portion 14, the presence of such a complex can be detected by detecting the label. A detection device 18 is then used to detect the presence of the label, such that the selection of any particular detection device 18 depends upon the nature of the label. For example, a chromogenic label, such as a dye which becomes excited and fluoresces, can optionally be detected with a camera or other imaging device for detection device 18. Detection device 18  
30 should be able to distinguish between signals from the label from each array portion 14.

Once the signal from each array portion 14 has been collected by detection device 18 and converted to electronic (digital) data, the resultant raw data is preferably transformed to a numeric value for the fingerprint, such that a numeric value for each address of the fingerprint corresponds to an address for wet array 12. The process of transformation is optionally and preferably performed by a conversion module 20, which may be optionally

WO 02/37106

PCT/US01/47064

implemented as a software module for operation by a computational device 22. The fingerprint data is then preferably stored in a database 24 which is more preferably also controlled by computational device 22. Of course, a distributed implementation across a network of computational devices is also possible within the scope of the present invention  
5 (not shown).

According to preferred embodiments of the present invention, sets of model saccharide-binding agents are used for this assay. The model agents are preferably preselected in order to provide a particular characterization of the sample carbohydrate polymer. For example, the model saccharide-binding agents may optionally be selected in  
10 order to be "EPO-like", for the characterization of the sample carbohydrate polymer according to results which had been previously obtained from EPO. In particular, such model sets of agents should be selected in order to provide data which is particularly indicative of such a characterization. The agents are optionally and more preferably selected by performing experiments with different saccharide-binding agents on known, standard  
15 carbohydrate polymers, and then selecting those agents which provide the most useful data for characterization of the sample carbohydrate polymer.

One example of these different types of sets of model agents is a focus library. The members of the focus library are chosen because they bind to a common ligand, or share another common functional or structural property. Examples of the latter include variant  
20 forms of glycoproteins such as EPO, interferon alpha, CGSF, and HCG.

Next, optionally and preferably, a comparison method is performed for comparing the fingerprint of the sample carbohydrate polymer to at least one other fingerprint. More preferably, the fingerprint for comparison is obtained from a standard, known carbohydrate polymer, although alternatively, the other fingerprint could also optionally be obtained from  
25 another sample carbohydrate polymer. An example of such a method is described with regard to FIG. 5.

In step 1, the comparison fingerprint is obtained. As previously described, the comparison fingerprint is preferably obtained from a standard known carbohydrate polymer. Regardless of the source of the fingerprint data, however, preferably the comparison  
30 fingerprint data includes information about the experimental conditions, including at least the set of saccharide-binding agents which were used to obtain the data, and more preferably including such information as washing conditions, stringency of the incubation conditions, the type of label on the solubilized saccharide-binding agent, and so forth.

WO 02/37106

PCT/US01/47064

In step 2, the actual address(es) of the fingerprints are compared. Optionally, the comparison is performed address by address, with at least a positive result of the comparison being given a positive numerical value. More preferably, a negative result of the comparison is given a negative numerical value. Step 2 is then preferably repeated for all addresses  
5 which are to be compared.

In step 3, the total numerical values for the address-by-address comparison are preferably converted to a similarity factor according to some function. The function is optionally simple, for example by adding all of the positive and negative values from the address-by-address comparison process. Alternatively and preferably, the results can be  
10 weighted. More preferably, the results are weighted according to the previously described interpretive information from the experimental conditions, such that a greater weight could optionally be given to the result of a comparison between two addresses of the fingerprints in which more certainty can be assigned to the experimental result, for example.

An example of a quantitative tool for comparing two fingerprints optionally and more  
15 preferably employs phylogenetic analysis, which has the advantage of returning a distance between two or more fingerprints, as opposed to a simple numeric measurement of similarity/dissimilarity. Originally used for examining evolutionary relationships between biological sequences, such as protein or DNA sequences for example, phylogenetic analysis provides a quantitative measure of the distance, or the degree of difference between two or  
20 more sequences. The use of phylogenetic analysis is particularly preferred for the optional but preferred embodiment of the present invention, in which the fingerprint of the sample carbohydrate polymer is compared to a database containing a plurality of such fingerprints. More preferably, the fingerprint data is for standard carbohydrate polymers. In any case, for this preferred embodiment of the present invention, step 3 is replaced by a different function,  
25 which optionally requires step 2 to be repeated for each fingerprint in the database.

Since phylogenetic analysis has been investigated for many years, and is a well-known topic in the art, many different methods are known in the art. In addition, a variety of companies offer a variety of products and utilities for analyzing phylogenetic information.

According to the present invention, optionally and more preferably, the following  
30 function is used for calculating phylogenetic information, in which the information of the fingerprints is expressed as a matrix of distances. These distances are optionally obtained according to some known function, such as a Hamming function, for example. According to a preferred embodiment of the invention, the distances are obtained as follows:

WO 02/37106

PCT/US01/47064

$$(4) \quad D = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^C V_i$$

Where:

*D* is the expression for the distance;

*N* is the number of addresses in fingerprint1 and fingerprint2;

5 *C* is the maximum number of colors that can be distinguished in address *i* of the fingerprints;

*V<sub>i</sub>* is 1 if a color that found in address *i* of fingerprint1 exists in the same address *i* in fingerprint2, otherwise *V<sub>i</sub>* is zero.

10 The previous two Figures described some basic tools for obtaining experimental fingerprint data, and for comparing fingerprint data between two or more carbohydrate polymers. The next Figures describe methods for deriving higher level information from the fingerprint data, such as maps which characterize the sample carbohydrate polymer, for example. The method of each subsequent Figure enables increasing higher levels of information to be obtained, and also optionally allows maps or other characterizations of the sample carbohydrate polymer which do not fit the experimental data to be eliminated.

15 Preferably, at each higher level, additional experimental data and analyses are incorporated into the process for obtaining and examining the maps, in order to characterize the sample carbohydrate polymer as much as possible, and also in order to extend the useful information which can be derived from individual experiments.

20 According to preferred embodiments of the present invention, the fingerprint of the sample carbohydrate polymer is itself internally analyzed in order to extend the fingerprint data, as described with regard to the method of FIG. 6. According to this exemplary method, the fingerprint addresses are first recursively analyzed in order to find simple maps, or map fragments. Next, these map fragments are assembled to larger maps, again preferably through a recursive analysis. Optionally and more preferably, the maps are transformed into property vectors, or property descriptors, for use in QSAR (quantitative structure-activity relationship) algorithms. This translates the fingerprint data into a set of numbers directly describing structural properties (*i.e.*, the level of sialic acid content, the existence or absence of certain monomers or dimers, and so forth). QSAR can in turn optionally be used for activity prediction in molecular drug design.

25

30

WO 02/37106

PCT/US01/47064

As shown with regard to FIG. 6, in the first stage of the method, a first set of maps which characterize the sample carbohydrate is preferably created, optionally through recursive analysis of the fingerprint data. Such a recursive analysis may optionally simply take the form of sequentially combining each address of the fingerprint with a sequence of one or more other addresses in step 1. Next, in step 2, each such combination is analyzed in order to determine if the map (or map fragment) is internally coherent. In step 3, those maps or map fragments which have been shown to be internally coherent are retained for the next level of analysis.

As an example for this type of analysis, a map may be obtained from an experiment in which the sample carbohydrate polymer is first digested with a cleaving agent, and in subsequent steps reacted with binding agents. Such an assay is described in more detail with regard to PCT Application No. PCT/IL00/00256. However, as a brief example, a sample carbohydrate polymer which is labeled at the reducing end is reacted with a first saccharide-binding agent, which may optionally be a glycosidase with the recognition sequence *a*. In a control reaction, the labeled sample carbohydrate polymer is left untreated. The reactions are then independently further reacted with an immobilized saccharide-binding agent, which may optionally be a lectin with the recognition sequence *b*. After washing off unbound sample carbohydrate polymer, a detection step is carried out. The presence of the label indicates that site *b* is present in the sample carbohydrate polymer.

By comparing reactions where the first saccharide-binding agent is present, with independent control reactions where the first saccharide-binding agent is absent, the effect of the glycosidase on the presence of the label can be determined. For instance, if the label is detected in the control reaction after binding to the lectin with recognition sequence *b*, but not in a reaction where the first saccharide-binding agent is a glycosidase with the recognition sequence *a*, the sequence of recognition sites is *b- $\alpha$ -reducing end*. On the other hand, if the label is present in both control and glycosidase reactions, this indicates that the sequence of recognition sites is *a-b-reducing end*. The recognition site *a* may not be located inside the sample carbohydrate polymer, *i.e.*, may not exist in the saccharide sequence.

According to preferred embodiments of the present invention, step 1 is performed by first placing each address of the fingerprint as a node on a hierarchical tree. Depending upon the type of data that is represented by the fingerprint address, the address may optionally appear on more than one node. Preferably, the hierarchy of the tree is constructed according to a plurality of categories of data. For example, part of the tree may optionally represent simple binding of the saccharide-binding agent to the sample carbohydrate polymer. This

WO 02/37106

PCT/US01/47064

part of the tree would then be preferably structured according to characterization of each saccharide-binding agent, for example according to the type of agent (lectins, antibodies, etc.), the effect of the agent on the sample carbohydrate polymer (binding, cleavage, etc.), the type of label for the solubilized saccharide-binding agent.

5 Next, in step 2, the tree can be recursively examined by using each address of the tree as the root node, for example, or alternatively by traveling from each node of the tree to the other nodes of the tree to establish the map or map fragments. The advantage of this method is that if the tree is constructed according to biologically useful categories and/or parameters, the maps which are constructed from the nodes of the tree should be internally coherent. This  
10 process may optionally be repeated a number of times in order to construct larger maps.

An example of a procedure for constructing and examining such trees is optionally and preferably performed as follows. Lectins can optionally be used as the saccharide-binding agents for the experimental assay, such as the assay described with regard to FIG. 4. Preferably, such lectins are used as pairs of lectins: a first lectin for being immobilized to the  
15 surface of the solid support, to which the carbohydrate polymer initially binds to form a complex; and a second solubilized lectin for binding to the complex. The second lectin preferably features a label in order to permit the presence of the complex to be detected. These pairs of lectins can optionally be correlated with a clustering algorithm, such that the "relatedness" or distance between results for pairs of lectins can be determined from their  
20 binding behavior to the carbohydrate polymer. Such correlations can then optionally be used to form the tree, such that each node of the tree is related to other nodes according to the relative distance. Alternatively, the correlation can optionally be used in order to structure the nodes of the tree according to the behavior of the lectins with regard to a standard, known carbohydrate polymer.

25 One example of a measurement according to which the lectins could be organized in the tree is the Hamming distance, as previously described, or the Jaccard similarity measure. The Jaccard similarity measure between non-zero vectors  $v_1$  and  $v_2$  is defined as follows:

$$\text{Jaccard measure} = a_{11}/(a_{11} + a_{01} + a_{10})$$

where  $a_{ij}$  is the number of dimensions in which  $v_1$  has the value  $i$  and  $v_2$  has the value  $j$ . This  
30 similarity measure can be used to determine the similarity of results between pairs of lectins, as well as the similarity of results between different fingerprints. For example, the tree could optionally be constructed from different fingerprints for known carbohydrate polymers, which would then be examined for their similarity to the results for the sample carbohydrate polymer.

WO 02/37106

PCT/US01/47064

Preferably, multiple types of fingerprint data are incorporated into these maps, optionally also including fingerprint data which involves the modification of the sample carbohydrate polymer before the assay is performed. For example, the polymer could optionally be modified with glycosidases for cleaving the molecule; elimination of reducing  
5 ends; and with glycosyltransferases for adding one or more saccharides, optionally with a label, to the sample carbohydrate polymer. Modification with saccharide(s) having a label is particularly preferred for "double-label" experiments, in which the second saccharide-binding agent of the assay of FIG. 4 would have the second label. The map of the two labels would thus provide additional information concerning the structure of the sample carbohydrate  
10 polymer.

It should be noted that these different types of experimental data may optionally be incorporated into a single fingerprint for the sample carbohydrate polymer, although such incorporation is not necessary. Alternatively, the different types of data may be used as an adjunct to the fingerprint for creating the maps for the polymer. In any case, these different  
15 types of experimental data should be obtained from experimental assays performed on at least similar experimental material, with at least similar conditions. More preferably, the experimental material and conditions are identical, particularly for comparisons between different polymers, such as between a standard, known carbohydrate polymer and the sample carbohydrate polymer.

Optionally and more preferably, the maps are transformed into property vectors, or property descriptors, for use in QSAR (quantitative structure-activity relationship) algorithms, for example. Each property vector is a quantitative description of structural properties and/or features of the sample carbohydrate polymer. Each numeric value in the vector preferably corresponds to a particular property or feature, such as the level of sialic  
25 acid content, the existence or absence of certain monomers or dimers in the carbohydrate sequence, and so forth). Such a property vector could also optionally feature data for describing more qualitative properties.

The process of translation is preferably performed by correlating a plurality of numeric values of the fingerprint in order to build the map. Such a correlation is optionally  
30 performed by comparing the fingerprint data to a "template", in order to determine if the property or feature exists. Alternatively, the value in the property vector could optionally be obtained by integrating results from other types of experiments, as described in greater detail with regard to FIG. 7 below. For example, the value in the property vector could optionally be derived from the saccharide content of the sample carbohydrate polymer.

WO 02/37106

PCT/US01/47064

Such additional information may enhance the data interpretation in a number of respects. First, it can optionally be used to eliminate impossible or at least highly improbable recognition sites from those sites which have determined to be possible sites from the different types of experimental assays. For example, for assays in which lectins are used as a saccharide-binding agent, many lectins specifically bind to both glucose (Glc) and mannose (Man), yet many glycans do not contain Glc. Thus, the presence of binding to these lectins indicates the presence of Man alone.

In addition, such information can optionally suggest ambiguities in data interpretation, and add information that is not present in the data. An example of the latter function would be the detection of the presence of Kdo, which is a monosaccharide in LPS (lipopolysaccharides), yet may not be detected according to lectin binding data. Such information may also present a strong clue to confirm/reject certain hypotheses.

Such information should not be limited to monosaccharide composition, however, as this is only intended as a non-limiting illustrative example. Instead, this information may optionally include data from experimental assays; structural information, such as how many length species are created by a certain cleavage of a polymer; medical and origin information, since for example mammalian carbohydrate polymers are more limited in monosaccharide composition than plant carbohydrate polymers, and both are more limited than bacterial carbohydrate polymers.

FIG. 7 is a flowchart of an exemplary method according to the present invention for extending the fingerprint data by integration of data from external databases. By "external databases", it is meant that the data is obtained from experiments which are not performed on the same material, such that the same experimental conditions do not necessarily apply to both sets of data. Such information could be related to the composition of the saccharide, its source, and possibly other information as well.

For example, this information could include whether the sample carbohydrate is part of a glycoprotein, the use of other types of carbohydrate binding agents such as cytokines, and so forth. The introduction of such data is preferably performed at least partially with information from known carbohydrate polymers, such as EPO, for example, as a standard, reference carbohydrate polymer.

As shown with regard to FIG. 7, in step 1, the data is read from the external database, and the format of the data is analyzed. In step 2, if the format of the data includes one or more numerical values which characterize specific aspects of the polymer, then these values are optionally used to create a "fingerprint" for the sample carbohydrate polymer. For

WO 02/37106

PCT/US01/47064

example, if an assay has been performed with the sample carbohydrate polymer to determine the saccharide content, then the relative amounts and identity of the different types of saccharides are clearly convertible to a fingerprint of such data.

Alternatively, in step 3, if the format of the data includes raw experimental results, such as a map of bands on a PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) gel after cleavage of the carbohydrate polymer with a glycosidase for example, then the data is preferably converted to one or more numeric values. For example, the map of bands could optionally be converted by determining the presence or absence of a band at a particular molecular weight, and then creating a "fingerprint" with binary values (positive/negative) at each molecular weight. Alternatively, the fingerprint could optionally include the series of molecular weights for the bands as a sequence of numerical values. It should be noted that PAGE gel assays are intended only as a non-limiting example, and that other types of assay data could also optionally be incorporated, such as column chromatographic data for example.

The format of the data may also optionally include two different types of experimental results, which would then preferably be correlated in order to form the fingerprint. For example, the PAGE gel assay could be performed with the addition of end-labeling with various types of glycosyltransferases or other end-labeling mechanisms. The gel would then contain two types of data: the presence of bands at specific molecular weights; and the presence of specific labeled bands. The fingerprint could then optionally be created to indicate both types of data as numeric values, for example as the molecular weight of the bands with binary (positive/negative) values for indicating the effect of labeling.

Preferably these external "fingerprints" are also created for standard known carbohydrate polymers as references for comparison to the data for the sample carbohydrate polymer. Such external "fingerprints" could optionally be derived by the performance of specific experimental assays on the standard carbohydrate polymer, or alternatively could be derived by converting existing data to the fingerprint format.

In step 4, these fingerprints are preferably compared to the maps which were derived for the sample carbohydrate polymer from the previous level in FIG. 6. If any of these maps are inconsistent with the additional fingerprint data, they are optionally and preferably eliminated. For example, lectin binding information may indicate the possibility that the monosaccharide Fuc (fucose) is absent. On the other hand, such a possibility may be directly contradicted by the monosaccharide composition of the carbohydrate polymer, which may indicate the presence of Fuc. In such a situation, the addition of the latter data may optionally

WO 02/37106

PCT/US01/47064

indicate that a map which does not include Fuc should preferably be eliminated as being inconsistent with the additional data.

In step 5, optionally and more preferably, the additional fingerprint data is used to create new maps. These new maps are most preferably created according to the method of FIG. 6, which is suitable for use with fingerprint data of this format, regardless of the source of the experimental data.

Both the optional creation of new maps and the optional elimination of existing maps are examples of the examination of the probability space for the carbohydrate polymer.

Unlike for the method described below, these maps may still optionally be directly related to the fingerprint or other experimental data. However, the probability space is more difficult to search than for other types of biological polymers, such as DNA for example, since there is no requirement for accuracy of the experimental data, but only for reproducibility. Thus, the probability or combinatorial space is increased even beyond that which is searched for other types of biological polymers.

FIG. 8 is a flowchart of an exemplary method according to the present invention for locating features of interest within the sample carbohydrate polymer. By this point, the maps should no longer include any reference to the original raw data, but instead should be composed of sequences of elements. Some raw data may not yield any useful information. The sequences of elements can now be compared to a three-dimensional database, which stores pieces of three-dimensional (structural) information.

This process is actually a combinatorial search, or a search in combinatorial space, since each of the maps represents a possible combination of related elements for describing the sequence, structure, function, or some combination thereof, of the carbohydrate polymer. These maps can in turn be used to search for different higher level features of the carbohydrate polymer, which are related to particular sequences, structures and/or functions of interest within the polymer.

As shown with regard to FIG. 8, in step 1, the remaining maps are first converted to higher level features, if necessary (this step may optionally have already been performed as part of the process of creating the maps). For example, the maps are preferably converted to conform to various functional epitopes and/or sequence-based features, as well as to characterization features. This step is particularly aided by the presence of data from previous comparisons to standard reference carbohydrate polymers, since such comparisons are particularly useful for locating functional features.

WO 02/37106

PCT/US01/47064

These features of interest may optionally be short sequences or portions of sequences of monosaccharides within the larger polymer sequence. A very simple example of such a feature is a glycosidase recognition site. Such features may also optionally be described as "sequence-based" features, in that they are characterized by at least a portion of the sequence of the carbohydrate polymer. Such features have the disadvantage of requiring absolute accuracy of the experimental data, rather than mere reproducibility. However, they have the advantage of being comparable over a wide variety of different known carbohydrate polymers, through data obtained from external databases as previously described.

Alternatively and/or additionally and preferably, these features of interest concern functional epitopes and/or sequence-based epitopes having a biological function of interest. By "functional" epitope, it is meant that at least a portion of the carbohydrate polymer appears to be associated with a particular function and/or type of function, regardless of the actual sequence of the carbohydrate polymer. Such a functional epitope may optionally be located through the performance of the same assay on a plurality of carbohydrate polymers, with only the requirement of reproducibility, rather than absolute accuracy. Of course, the functional epitope may also optionally be characterized by a sequence, such that the same epitope may optionally be both a sequence-based epitope and a functional epitope.

Also alternatively and/or additionally and preferably, these features of interest concern "characterization" features. These features are not necessarily discrete portions of the carbohydrate polymer, but rather are indicative of the classification, function or nature of the overall polymer, or some combination thereof. For example, such a characterization feature may enable the carbohydrate polymer to be determined to be "EPO-like". This determination would not necessarily immediately result in the location of specific functional epitopes within the polymer, for example, but may provide an indication that the carbohydrate polymer should be further examined for the possibility of such functional epitopes being present.

In step 2, these higher level features are compared for internal consistency. If any two such features are inconsistent or mutually exclusive, then optionally and preferably, both such features are removed from further consideration, as it is not possible to determine which is correct. However, if further data becomes available, then alternatively one of the features could be retained, according to the data, for example as previously described.

In step 3, the higher level features are compared to a database of such features, which is preferably embodied as a three-dimensional database containing structural and/or functional components of carbohydrate polymers. For example, such a feature could

WO 02/37106

PCT/US01/47064

optionally be used to locate an epitope of interest, which could then provide information concerning the type or function of the sample carbohydrate polymer.

The invention will be further illustrated in the following examples, which do not limit the scope of the appended claims.

5

**Example 1**

**Glycomolecule analysis using antibodies as first and second sequence-specific agents**

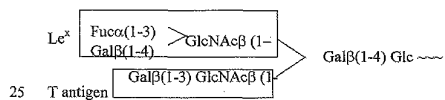
This example further illustrates the technique of analyzing glycomolecules according to the invention. As a first and second sequence-specific agent, antibodies are used. The following tables lists the results of reactions with two different saccharides denoted for purposes of illustration, HS and NS.

15

The structure of the sugars is as follows:

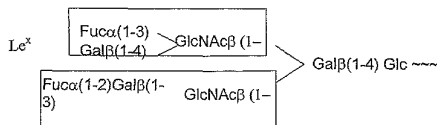
MFLNH-II (HS):

20



NS:

30



WO 02/37106

PCT/US01/47064

Le<sup>b</sup> >

Table 2 lists the results of the reaction between the saccharide and the first and second essentially sequence-specific agents, which are antibodies against T-antigen, Lewis<sup>x</sup> (Le<sup>x</sup>), or Lewis<sup>b</sup> antigen (Le<sup>b</sup>). The first essentially sequence-specific agent is immobilized on a matrix, preferably a solid phase microparticle. The second essentially sequence-specific agent is labeled with a fluorescent agent, *i.e.*, Nile-red or green color. In addition, the reducing end of the saccharide is labeled, using a label clearly distinguishable from the Nile-red or green color label which act as markers for the second essentially sequence-specific agents. Table 2 lists the reactions for the saccharide HS, while table 3 lists the reactions for the saccharide NS.

15

Table 2

On the matrix	anti T-antigen	anti -Le <sup>x</sup>	anti -Le <sup>b</sup>
Saccharide bound	HS	HS	
Second mAb	Nile-red anti - Le <sup>x</sup>		
Signal	Nile-red, reducing end	Reducing end	none

20

Table 3

On the matrix	anti T-antigen	anti -Le <sup>x</sup>	anti -Le <sup>b</sup>
Saccharide bound		NS	NS
Second mAb		Green anti-Le <sup>b</sup>	Nile-red anti - Le <sup>x</sup>
Signal		Green, reducing end	Nile-red, reducing end

In summary, the following signals are now detectable in the reactions of the saccharide HS or NS (rows) when using the indicated antibodies as first essentially sequence-specific agent (columns):

25

WO 02/37106

PCT/US01/47064

Table 4

On the matrix	anti T-antigen	anti -Le <sup>x</sup>	anti -Le <sup>b</sup>
HS	nile-red, reducing end	Reducing end	
NS		Green, reducing end	nile-red, reducing end
NS		Green, reducing end	nile red, reducing end

- 5 After the label has been detected and the result recorded for each reaction, a third essentially sequence-specific agent is added. In this example, two independent reactions with a third essentially sequence-specific agent are used. The solid phase carrying the sugar molecule may now be advantageously divided into aliquots, for reaction with either  $\alpha$ -1-2 Fucosidase or Exo  $\beta$  galactosidase (third essentially sequence-specific agents). Alternatively,
- 10 three sets of reactions with a first and second essentially sequence-specific agent may be carried out.

Table 5

reactions after applying  $\alpha$ -1-3,4 Fucosidase:

On the matrix	anti T-antigen	anti -Le <sup>x</sup>	anti -Le <sup>b</sup>
HS	reducing end		
NS			

15

Table 6

reaction after applying Exo  $\beta$  galactosidase from *D. pneumoniae* (EC 3.2.1.23 catalog number 1088718 from Boehringer Mannheim, 68298 Mannheim, Germany)

On the matrix	anti T-antigen	anti -Le <sup>x</sup>	anti -Le <sup>b</sup>
HS	nile-red		
NS		Green	nile-red

20

Table 7

reactions after applying  $\alpha$ -1-2 Fucosidase:

WO 02/37106

PCT/US01/47064

On the matrix	anti T-antigen	anti -Le <sup>a</sup>	anti -Le <sup>b</sup>
HS	nile-red, reducing end	Reducing end	
NS		Reducing end	

From the data gathered as explained above, a glycomolecule identity (GMID) card can now be created. An example for such information is listed in Table 8 for saccharide HS and in Table 9 for saccharide NS.

5

Table 8

On the matrix	anti T-antigen	anti -Le <sup>a</sup>	Anti -Le <sup>b</sup>
0	nile-red, reducing end	Reducing end	
1	reducing end	-	-
2	nile-red		
3	nile-red, reducing end	Reducing end	

10

Table 9

On the matrix	anti T-antigen	anti -Le <sup>a</sup>	anti -Le <sup>b</sup>
0		Green, reducing end	nile red, reducing end
1	-	-	-
2		Green	nile red
3		Reducing end	

15

The identity of the second and third essentially sequence-specific agents need not be disclosed in such a data list. For the purpose of comparison, it is sufficient that a certain code number (1, 2 or 3 in the above tables) always identifies a certain combination of reagents.

20

WO 02/37106

PCT/US01/47064

Example 2A scheme for the sequential labeling of reducing ends

5 invention advantageously uses labeling of the saccharide to be investigated at its reducing  
end. However, this labeling technique may be extended to sites within the saccharide, and  
thus contribute to the method of the invention, by providing more information. As it is  
possible to label the saccharide within the chain, by cleavage using an endoglycosidase  
10 followed by labeling of the reducing end, it is therefore possible to obtain a labeled reducing  
end within the saccharide chain. As that reducing end is necessarily closer to the binding sites  
for the first, second and third essentially sequence-specific agents, compared to the original  
reducing end, the use of an internally created labeled reducing end provides additional  
information. Moreover, it is possible, by sequentially labeling of reducing ends according to  
15 the method described further below, to identify the sites for distinct glycosidases in sequential  
order on the chain of the saccharide to be investigated.

The method of sequential labeling of reducing ends is now described in more detail in  
the following steps:

1. Blocking:

20 A polysaccharide having a reducing end is incubated in a solution containing  $\text{NaBH}_4$  /  
NaOH at pH 11.5.

This treatment blocks the reducing end, so that the polysaccharide is now devoid of a  
reducing end (RE).

25 2. Exposing:

The polysaccharide of step 1 is treated with an endoglycosidase. If the recognition site  
for that endoglycosidase is present within the polysaccharide, a new reducing end will be  
created by cleavage of the polysaccharide. The solution now contains two saccharides: the  
fragment with the newly exposed RE in the endoglycosidase site, and the second fragment  
30 whose RE is blocked.

WO 02/37106

PCT/US01/47064

### 3: Labeling of the reducing end

This reaction may be carried out using *e.g.*, 2-aminobenzamide (commercially available in kit form for labeling saccharides by Oxford Glycosystems Inc., 1994 catalog, p. 62). After the reaction under conditions of high concentrations of hydrogen and in high temperature (H<sup>+</sup>/T), followed by reduction, has been completed, the mixture contains two fragments, one of which is labeled at its reducing end, while the other remains unlabeled due to the fact that its reducing end is blocked.

Another way to label reducing ends is by reductive amination. Fluorescent compounds containing arylamine groups are reacted with the aldehyde functionality of the reducing end. The resulting CH=N double bond is then reduced to a CH<sub>2</sub>-N single bond, *e.g.*, using sodium borohydride. This technology is part of the FACE (Fluorophore assisted Carbohydrate Electrophoresis) kit available from Glyko Inc., Novato, CA, USA, as detailed *e.g.*, in the Glyko, Inc. catalog, p. 8-13, which is incorporated herein by reference.

### 4. Reaction with a second endoglycosidase

A second endoglycosidase may now be reacted with the saccharide mixture. The new reaction mixture has now three fragments, one with an intact reducing end, a second with a reducing end labeled by 2-aminobenzamide, and a third with a blocked reducing end.

20

### Example 3

#### Derivation of structural information from a series of reactions with essentially sequence-specific agents

This example further illustrates the method of the invention, *i.e.*, the generation of data related to the structure of the saccharide by using a set of reactions as described further above. The example further demonstrates that sequence information can be deduced from the set of reactions.

In some cases, the reagents used may not react exactly as predicted from published data, *e.g.* taken from catalogs. For instance, the lectin *Datura stramonium* agglutinin as described further below is listed in the Sigma catalog as binding GlcNac. However, in the reactions detailed further below, DSA is shown to bind to Coumarin 120-derivatized Glc (Glc-AMC). It appears that Glc-AMC acts like GlcNac for all purposes, because of the

WO 02/37106

PCT/US01/47064

structural similarity between these compounds. Further, as apparent from the results below, the endogalactosidase used cleaves not only at galactose residues, but also the bond connecting the Glc-AMC group to the rest of the saccharide.

5 It is apparent that the essentially sequence-specific agents used in the practice of the invention may in some cases have fine specificities that vary from the specificity of these agents given in published material, *e.g.*, catalogs. Such reactions can quickly be identified by using the method of the invention with saccharides of known structure. The results found may then be compared with expected results, and the differences will allow the identification of variant specificities of the essentially sequence-specific agents used. Such variation from  
10 published data in fine specificities of essentially sequence-specific agents may then be stored for future analysis of unknown saccharides structures using these agents.

In the following, the method of the invention is illustrated using an end-labeled pentasaccharide and various lectins and glycosidases. The pentasaccharide has the structure Gal- $\beta$ (1,4)[Fuc- $\alpha$ (1,3)]-GlcNAc- $\beta$ (1,3)-Gal $\beta$ (1,4)-Glc. The pentasaccharide is branched at  
15 The GlcNAc position having fucose and galactose bound to it in positions 3 and 4 respectively. The pentasaccharide is labeled at its reducing end (Glc) with Coumarin-120 (7-amino-4-methyl coumarin, available, *e.g.*, from Sigma, catalog No. A 9891). The coupling reaction may be carried out as described above for the labeling of reducing ends by using arylamine functionalities. Coumarin-120, when excited at 312 nm emits blue fluorescence.  
20 As first and second essentially sequence-specific agents, Endo- $\beta$ -Galactosidase (EG, Boehringer Mannheim) and Exo-1,3-Fucosidase (FD, New England Biolabs) are used. The reaction conditions for both reagents are as described in the NEB catalogue for Exo-1,3-Fucosidase.

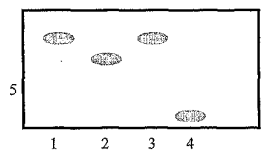
Three reactions were carried out. The first included Fucosidase (FD) and Endo-  
25 Galactosidase (EG), the second, FD only, and the third, EG only. A fourth reaction devoid of enzyme served as control.

In order to ascertain that the enzymes had digested the saccharide, the various reactions are size-separated using thin-layer chromatography (TLC).

After separation, the saccharides on the TLC plate may be detected by exposing the plate  
30 to ultraviolet light. The results are shown in the following illustration.

WO 02/37106

PCT/US01/47064



10 In reaction 4, no glycosidase was added, so the saccharide is intact and moves only a small distance on the plate. The fragment of reaction 2 is second in molecular weight, while the fragments of reactions 1 and 3 appear to be equal. From these data, it can be concluded that the sequence of the glycosidase sites on the saccharide is FD-EG-reducing end (coumarin-label).

15 The above pentasaccharide is now tested by a set of reactions as described further above. As first and second essentially sequence-specific agents, lectins were used. The lectins (Anguilla Anguilla agglutinin (AAA), catalog No. L4141, Arachis Hypogaea agglutinin (PNA), catalog No. L0881, Ricinus communis agglutinin (RCA I) catalog No. L9138, Lens Culinaris agglutinin (LCA) catalog No. L9267, Arbus Precatorius agglutinin, (APA), catalog  
20 No. L9758) are available from Sigma. Lectins are also available from other companies. For instance, RCA I may be obtained from Pierce, catalog No. 39913. Lectins are immobilized by blotting onto nitrocellulose filters.

The reaction buffer is phosphate-buffered saline (PBS) with 1mM CaCl and 1mM MgCl. After binding of the lectins, the filter was blocked with 1% BSA in reaction buffer. As  
25 controls, reactions without lectin and with 10  $\mu$ g BSA as immobilized protein were used.

The results of the reactions are indicated in Table 10. A plus indicates the presence of 312 nm fluorescence, which indicates the presence of the coumarin-labeled reducing end. The numerals 1-4 in the table indicate reactions as defined above.

WO 02/37106

PCT/US01/47064

Table 10

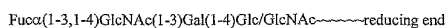
	AAA	PNA	LCA	DSA	RCA I
1				++	
2		++		++	++
3				++	
4	++	++		++	++

From the results as listed in Table 10 (reaction 4-control) it is evident that lectins AAA, PNA, DSA and RCA-I bind the saccharide. Therefore, Fucose, Gal(1-3)GlcNAc, GlcNAc, and Galactose/GalNAc must be present in the saccharide, as these are the respective saccharide structures that are recognized by AAA, PNA, DSA and RCA-I. It is further evident that the above described glycosidases Fucosidase and Endo- $\beta$ -Galactosidase recognize cleavage sequences in the saccharide. These sequences are Fuc (1-3/1-4) GlcNAc and GlcNAc $\beta$ (1-3)Gal $\beta$ (1-3/4)Glc/GlcNAc, respectively.

It can further be deduced that both glycosidase sites are located between the fucose sugar and the reducing end, as the end is cleaved by either glycosidase when AAA (which binds to fucose) is used as immobilized lectin. The reaction with DSA, on the other hand, allows the deduction that either the GlcNAc monosaccharide is located between the glycosidase sites and the reducing end, or that Glc is directly bound to the coumarin, as neither glycosidase cleaves off the reducing end when DSA is used as immobilized agent.

Moreover, the reaction with PNA as immobilized agent shows that the reducing end is cleaved only if Endo- $\beta$ -Galactosidase is used (reactions 1 and 3). This indicates that the Endo- $\beta$ -Galactosidase site is located between the site for PNA and the reducing end. On the other hand, the Fucosidase site must be located between the PNA site and the other end of the saccharide.

When taking into account the above data, it is now possible to propose a sequence of the saccharide as follows:



The above experiment clearly demonstrates that the method of the invention can yield a variety of data, including sequence information, based upon relatively few reactions. Some details in the sequence information may not be complete, such as the (1-3) or (1-4) connection between Fucose and GlcNAc in the above saccharide. Had the monosaccharide composition of the pentasaccharide been known, then the above analysis would have yielded

WO 02/37106

PCT/US01/47064

all of the details of the pentasaccharide. Nevertheless, the information gained even in the absence of the monosaccharide composition data is very precise compared to prior art methods.

5

**Example 4****Derivation of partial or complete sequence information**

The method of the invention is suitable for automation. Thus, the steps described above, for example, in examples 1 to 3, may be carried out using an automated system for mixing, aliquoting, reacting, and detection. The data obtained by such an automated process may then be further processed in order to "collapse" the mapping information to partial or complete sequence information. The method for such data processing is described in further detail below.

After all data have been collected, a comparison is made between detection signals obtained from reactions prior to the addition of glycosidase, to signals obtained after the addition (and reaction with) of glycosidase. Those signals that disappear after reaction with glycosidase are marked. This may advantageously be done by preparing a list of those signals, referred to hereinafter as a first list. The identity of two sites on the polysaccharide may now be established for each such data entry. The position in the (optionally virtual) array indicates the first essentially sequence-specific agent. If a signal has been detected before reaction with the glycosidase, the recognition site for that agent must exist in the polysaccharide. The disappearance of a signal, for instance, of the signal associated with the second essentially sequence-specific agent, now indicates that the glycosidase cleaves between the recognition sites of the first and second essentially sequence-specific agents. The sequence of recognition sites is therefore (first essentially sequence-specific agent)-(glycosidase)-(second essentially sequence-specific agent). If the signal for the reducing end is still present after digestion with the glycosidase, then the relative order of the recognition sequences with respect to the reducing end can be established; otherwise, both possibilities (a-b-c and c-b-a) must be taken into account. For the purpose of illustration, the term "recognition site of the first essentially sequence-specific agent" shall be denoted in the following "first recognition site", the term "recognition site for the second essentially sequence-specific agent" shall be denoted "second recognition site", and the term "recognition site for glycosidase" shall be denoted "glycosidase".

WO 02/37106

PCT/US01/47064

It is now possible to create a second list of triplets of recognition sites of the above type (type 1 triplets):

(first recognition site)-(glycosidase)-(second recognition site).

5

Similarly, a third list can now be created relating to (optionally virtual) array locations where all signals remain after addition of glycosidase (type 2 triplets):

(glycosidase)-(first recognition site)-(second recognition site)

10

Obviously, a sufficient number of triplets defines a molecule in terms of its sequence, *i.e.*, there can only be one sequence of saccharides that will contain all of the triplets found. A lower number of triplets may be required when information on the length of the molecule is available. The number of required triplets may be even lower if the total sugar content of the molecule is known. Both saccharide molecular weight and total monosaccharide content may

15

be derived from prior art methods well known to the skilled person. The process of obtaining sequence information, *i.e.*, of collapsing the triplets into a map of recognition sites, is described below.

20

The second and third lists of triplet recognition sites are evaluated for identity (three out of three recognition sites identical), high similarity (two out of three recognition sites identical), and low similarity (one out of three recognition sites identical). For the purposes of illustration, it is now assumed that the polysaccharide is a linear polysaccharide, such as, for example, the saccharide portion of the glycan heparin.

25

The above second and third lists are then used to prepare therefrom a set of lists of triplets wherein each list in the set of lists contains triplets that share the same glycosidase recognition sequence. By comparing all triplets containing a certain glycosidase recognition sequence with all triplets containing a second glycosidase recognition sequence, it is now possible to divide the polysaccharide sequence into four areas, ranging from the first end of the molecule to glycosidase 1 (fragment a), from glycosidase 1 to glycosidase 2 (fragment b), and from glycosidase 2 to the second end of the molecule (fragment c):

30

<first end> <glycosidase 1> <glycosidase2> <second end>

WO 02/37106

PCT/US01/47064

Identical recognition sites within triplets of type 2 with different glycosidase sites, wherein the recognition sites are located in the same direction in relation to the respective glycosidase site, are candidates for the location within either the area a or c, depending on the location. Identical recognition sites within triplets of type 2 with different glycosidase sites, wherein the recognition sites are located in different directions (e.g., one in the direction of the reducing end, in the other triplet, in the direction of the non-reducing end), are candidates for the location within the area b, i.e., between the two glycosidase sites.

Identical recognition sites within triplets of type 1 with different glycosidase sites are candidates for the location of one of the first or second recognition sites in area a (or c), and the other of the first or second recognition sites being located in the area c (or a). That is, if one of the first or second recognition sites is located in area a, then the other of the first or second recognition sites must be located in area b, and vice versa. None of the first or second recognition sites may be located in area b.

Identical recognition sites within triplets of type 1 with different glycosidase sites, wherein a given recognition site is located in one of the triplets, in the direction of the reducing end and in the other triplet, in the direction of the non-reducing, are candidates for the location of the recognition site within area b.

Having established the above positional relationships for a number of recognition sites within the triplets, the total of the recognition sequences can now be arranged in a certain order using logical reasoning. This stage is referred to as a sequence map. If a sufficient number of recognition sequences are arranged, the full sequence of the saccharide may be derived therefrom. As the method does not determine the molecular weight of the saccharide, the chain length is unknown. Therefore, if the degree of overlap between the various recognition sites is insufficient, there may be regions in the sequence where additional saccharide units may be present. Such saccharide units may be undetected if they do not fall within a recognition site of any of the essentially sequence-specific agents used. However, the entire sequence information may also be obtained in this case, by first obtaining the molecular weight of the saccharide, which indicates its chain length, and secondly its total monosaccharide content.

Another possibility of closing gaps in the sequence map is the method of example 2, wherein sequential degradation by glycosidase is employed to derive sequence information.

The existence of branching points in the saccharide may complicate the method as outlined above. One remedy to that is to use glycosidases to prepare fractions of the molecule, and analyze these partial structures. The extent of branching in such partial structures is

WO 02/37106

PCT/US01/47064

obviously lower than in the entire molecule. In addition, reagents may be employed that specifically recognize branching points. Examples for such reagents are *e.g.*, the antibodies employed in example 1 above. Each of these antibodies binds a saccharide sequence that contains at least one branching point. Moreover, certain enzymes and lectins are available that recognize branched saccharide structures. For instance, the enzyme pullanase (EC 3.2.1.41) recognizes a branched structure. In addition, antibodies may be generated by using branched saccharide structures as antigens. Moreover, it is possible to generate peptides that bind certain saccharide structures, including branched structures (see *e.g.*, Deng SJ, MacKenzie CR, Sadowska J, Michniewicz J, Young NM, Bundle DR, Narang; Selection of antibody single-chain variable fragments with improved carbohydrate binding by phage display. *J. Biol. Chem.* 269, 9533-38, 1994).

In addition, knowledge of the structure of existing carbohydrates will in many cases predict accurately the existence of branching points. For instance, N-linked glycans possess a limited number of structures, as listed at p. 6 of the oxford Glycosystems catalog. These structures range from monoantennary to pentaantennary. The more complicated structures resemble simpler structures with additional saccharide residues added. Therefore, if monoantennary structure is identified, it is possible to predict all of the branching points in a more complicated structure, simply by identifying the additional residues and comparing these data with a library of N-linked glycan structures.

Moreover, it will often be possible by analyzing data gathered according to the method of the invention, to deduce the existence and location of branching points logically. For instance, if two recognition sites, denoted *a* and *b*, are located on different branches, then digesting with a glycosidase whose site is located between the reducing end and the branching point will result in loss of the reducing end marker. The markers for both recognition sites *a* and *b*, however, will remain. If a glycosidase located between the branching point and recognition site *a* is used, then the marker for recognition site *b* and the reducing end marker will be cleaved off. Not taking into account the possibility of branching points, this would indicate that the recognition site *b* is located between the recognition site *a* and the reducing end. However, if a glycosidase located between the recognition site *b* and the branching point is used, the reducing end marker and recognition site *a* will be cleaved off. Again, not taking into account the possibility of branching, this would indicate that recognition site *a* is located between the reducing end and recognition site *b*. These deductions are obviously incompatible with one another, and can only be resolved if one assumes that recognition sites *a* and *b* are located on two different branches. The branching

WO 02/37106

PCT/US01/47064

point is located between the recognition sites *a* and *b* and the first of the above glycosidases. The other above glycosidases used are located on a branch each, between the branching point and the respective recognition site (*a* or *b*).

Therefore, when using agents that recognize branched structures in the method of the invention, as essentially sequence-specific agents, it is possible to derive information on the existence and location of branching points in the saccharide molecule. This information can then be used to construct sequence maps of each branch of the structure, yielding a sequence map of the entire branched structure. The gaps in such a structure may then be closed as in the case of unbranched saccharides, according to the invention, *i.e.*, by using additional reactions, by digestion with glycosidases, whereby the regions of the molecule where gaps exist are specifically isolated for further analysis according to the method of the invention, and by sequential glycosidase digestion as described further above.

In summary, a method for determining the sequence of a saccharide and/or for mapping the structure of the saccharide according to the invention comprises the steps of:

15

1. collecting triplets of type 1 and type 2

2. sorting the triplets according to similarity

20

3. comparing triplets with different glycosidase recognition sites

4. arranging the triplets in the order of occurrence on the saccharide

25

5. arranging the glycosidase recognition sites

25

6. checking the compatibility to the triplets

30

7. arranging recognition sequences of glycosidases and of first and second essentially sequence-specific agents in a single file order

30

8. translating the recognition sequences (sites) into polysaccharide sequence

9. correcting "overlap" problems

WO 02/37106

PCT/US01/47064

10. outputting a sequence

11. checking against all available data

5 After the above step 5 has been carried out, a preliminary order of glycosidase sites has been established. In step 6, it is now checked for each triplet whether predictions based thereon are in agreement with that order. Then, based on contradiction in the data, a new model is generated that fits the data of the triplet. This model is then tested against the data of all triplets. Furthermore, additional reactions may be carried out, in order to extract additional vectorial information regarding the recognition sites that involve the triplet.

10 After the above step 8, wherein the sequentially arranged recognition sites are translated into a sequence of actual monosaccharide units, a model of the saccharide sequence can be suggested. In order to test the model, a number of questions needs to be answered. The first of these is, what is the minimum sequence that would still have the same sequence map? At this stage, information on molecular weight and monosaccharide composition, if available,  
15 is not taken into account. This approach merely serves the creation of a sequence which incorporates all of the available data with as few as possible contradictions. In that respect, the second question to be answered is, does the minimum sequence still agree with all of the data available at that point (excluding optional molecular weight and monosaccharide composition data)? The third question to be answered is, do other sequences exist that would  
20 fit the sequence map as established? In the affirmative, the additional sequences may then be tested using the question: How does each sequence model agree with the triplet information, and with additional optional data, such as information on the molecular weight, monosaccharide composition, and model saccharide structures known from biology.

Finally, the sequence model that has been found to be best according to the steps 1-10  
25 described above, will then be tested against all triplets, monosaccharide composition, prior knowledge on the molecular weight and structural composition of the saccharide, and predictions from biologically existent similar structures. By such repeated testing, the contradictions between the available data and the sequence model are identified, and if possible, the sequence model is adapted to better represent the data.

WO 02/37106

PCT/US01/47064

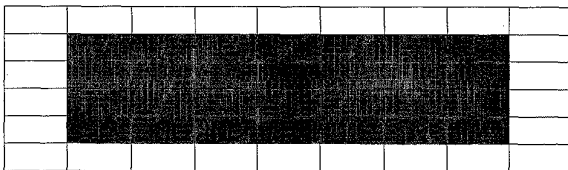
**Example 5****Glycomolecule identiv (GMID) analysis of milk samples**

The aim of this example is to demonstrate the application of the GMID technique to the analysis and comparison of milk samples.

**A. Membranes and 1<sup>st</sup> layer lectins:**

The supporting surface used in the experiments described hereinbelow is a nitrocellulose membrane. The membranes were prepared as follows:

1. Nitrocellulose membranes were cut out and their top surface marked out into an array of 9x6 squares (3mm<sup>2</sup> each square). The membranes were then placed on absorbent paper and the top left square of each one marked with a pen.
2. Lyophilized lectins were resuspended in water to a final concentration of 1mg/ml. The resuspended lectins (and a control solution: 5% bovine serum albumin) were vortex mixed and 1 µl of each solution is added to one of the 28 squares on the blot, indicated by shading in the following illustrative representation of a typical blot:



The lectins used in this experiment are listed in Table 11.

20

WO 02/37106

PCT/US01/47064

Table 11

Lectin	Manufacturer	Cat. No.
WGA	Vector	MK2000
SBA	Vector	MK2000
PNA	Vector	MK2000
DBA	Vector	MK2000
UEA I	Vector	MK2000
CON A	Vector	MK2000
RCA I	Vector	MK2000
BSL I	Vector	MK3000
SJA	Vector	MK3000
LCA	Vector	MK3000
Swga	Vector	MK3000
PHA-L	Vector	MK3000
PSA	Vector	MK3000
AAA	-	-
PHA-E	Vector	MK3000
PNA	Leuven	LE-408
LCA	Sigma	L9267
DSA	Sigma	L2766
APA		-
WGA	Leuven	LE-429
Jacalin	Leuven	LE-435
5% BSA	Savyon	MI21-033

3. The prepared blots were placed in 90 mm petri dishes.
4. The blots were blocked by adding to each petri dish 10 ml of any suitable blocking solution well known to the skilled artisan (e.g. 5% bovine serine albumin).
5. The dishes containing the blots in the blocking solution were agitated gently by rotation on a rotating table (50 rpm) for 2 hours at room temperature (or overnight at 4° C, without rotation).
6. The blots were then washed by addition of 10 ml washing solution to each petri dish.
- 10 Any commonly available buffered solution (e.g. phosphate buffered saline) may be used for

WO 02/37106

PCT/US01/47064

performing the washing steps. The dishes were washed by rotating gently (50 rpm) for 5 minutes. The procedure was performed a total of three times, discarding the old washing solution and replacing with fresh solution each time.

B: Addition of milk samples:

5 The milk samples used were as follows:

1. Bovine UHT long-life milk (3% fat) obtained from Ramat haGolan dairies, Israel (lot 522104);
2. Pasteurized goat's milk, obtained from Mechek dairies, Israel (lots 1 and 2);
3. Non-pasteurized goat's milk obtained as in 2. (lots 3 and 4).

10

The milk samples were diluted to 10 % v/v and approximately 5ml of each sample applied to separate blots.

Duplicate blots were prepared for each of the aforementioned milk samples. In addition a further pair of blots were prepared without the addition of saccharides (negative control).

15

The blots were then incubated at room temperature with agitation for one hour.

C. Colored lectins:

From prior knowledge of the monosaccharide composition of the milks tested, and by application of a computer program based on the algorithm described hereinbelow in Example 7, the following colored lectins were chosen: Con A, VVA.

20

A mixture of these two lectins was prepared in washing solution, such that the concentration of each colored lectin was 2 mg/ml.

500  $\mu$ l of each lectin mix was incubated on the blots prepared as described above.

Each blot was read both by measuring the fluorescence of fluorescein at 520 nm, and, in the case of the biotinylated lectin, measuring the signal of the TMB blue color produced following reaction of biotin with an HRP-streptavidin solution

25

The results obtained for the FITC-labeled and biotin-labeled lectins are given in Tables 12 and 13, respectively. The results presented in these tables are measured on a 0 to 3 scale, wherein 0 represents a signal that is below the noise level, and wherein results of 1-3 represent positive signals (above noise) following subtraction of the results obtained in the no-saccharide control.

30

Glycomolecule identity (GMID) cards obtained from these results for pasteurized goat's milk (lots 1 and 2), non-pasteurized goat's milk (lots 3 and 4) and bovine milk are shown in FIG. 1 (A to E, respectively). The positions of lectins 1 to 24 are shown in one row

WO 02/37106

PCT/US01/47064

from left to right at the top of each card 1.

D. Interpretation of results:

The bovine milk sample yielded a GMID indicating that the polysaccharide in the sample contains saccharides that yield positive results for lectins specific for:

- 5 a. glucose/mannose (ConA, PSA and LCA);  
b. GlcNac (WGA and DSA).

The pasteurized goat milk samples yielded positive results for:

- a. glucose/mannose (conA, PSA and LCA);  
b. GlcNac (DSA).

- 10 No difference in lectin reactivity between the lots tested was observed.

The non-pasteurized goat milk sample gave a positive reaction for:

- a. glucose/mannose (ConA, PSA and LCA);  
b. GlcNac (DSA).

- 15 In summary, the bovine milk differed from the goat's milk in that only the former reacted with WGA. There was essentially no difference between the pasteurized and non-pasteurized goat's milk samples, with the exception that the signal intensity was significantly lower in the pasteurized samples.

#### Example 6

##### Glycomolecule identity (GMID) analysis of lipopolysaccharides

20

A GMID analysis was performed on five different bacterial lipopolysaccharides obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, USA)(LPS#1, 7, 10, 15 and 16), essentially using the method as described in Example 5, above. The colored lectins used were ECL, WGA, VVA and SBA.

25

The GMID cards obtained for samples LPS# 1, 7, 10, 15 and 16 are shown in FIG. 2 (A to E, respectively). It may be seen from this figure that the GMID cards provide unique "fingerprints" for each of the different lipopolysaccharides, and may be used for identifying the presence of these compounds in samples containing bacteria or mixtures of their products.

**Example 7****Method for selecting colored lectins**

5 A number of factors must be taken into consideration when selecting colored lectins for use in the method of polysaccharide analysis illustrated in Examples 5 and 6. Among these considerations are the need for each of the chosen lectins to have a distinguishable color or other detectable marker, and for the need to reduce interactions between lectins. A flow chart illustrating an algorithm for use in colored marker selection is shown in FIG. 3. The  
10 algorithm shown in FIG. 3 begins with the selection of  $n$  colored lectins (or other detectable markers) 101, the initial selection being made in accordance with information obtained about the partial or full monosaccharide composition of the saccharide to be analyzed.

In the next step 102, the colors of the selected lectins are examined in order to check for identity/non-identity of the colors selected. If there are identical colors in the selected  
15 group, then the process proceeds to step 103, otherwise the flow proceeds with step 104. In step 103, one of the lectins that has been found to have a non-unique color is replaced by another lectin that belongs to the same binding category (that is, one that has the same monosaccharide binding specificity); the flow proceeds to step 102.

In step 104, the  $n$  selected lectins are tested in order to detect any cross-reactivity with  
20 each other, and with the non-colored lectins used in the first stage of the method described hereinabove in Example 5. If cross-reactivity is found, then the process continues to step 105, otherwise the flow proceeds to step 106, where the algorithm ends.

In step 105, one of the lectins determined to cross-react with another lectin is replaced  
25 by a lectin which does not cross-react; the flow then proceeds to 102. The algorithm ends with step 106.

It is to be emphasized that while for values of  $n$  which are small, and for saccharides with a simple monosaccharide composition, the above-described algorithm may be applied by the operator himself/herself manually working through each step of the selection procedure. Alternatively (and especially for cases where  $n$  is a larger number or the monosaccharide  
30 composition is more complex), the algorithmic processes described hereinabove may be performed by a computer program designed to execute the processes.

WO 02/37106

PCT/US01/47064

The above examples have demonstrated the usefulness of the method described herein. However, they have been added for the purpose of illustration only. It is clear to the skilled person that many variations in the essentially sequence-specific agents used, in the reaction conditions therefor, in the technique of immobilization, and in the sequence of  
5 labeling, reaction and detection steps may be effected, all without exceeding the scope of the invention.

#### Other Embodiments

10 It is to be understood that while the invention has been described in conjunction with the detailed description thereof, the foregoing description is intended to illustrate and not limit the scope of the invention, which is defined by the scope of the appended claims. Other aspects, advantages, and modifications are within the scope of the following claims.

WO 02/37106

PCT/US01/47064

**CLAIMS**

What is claimed is:

1. A method for determining the relatedness of a first glycoprotein and a second glycoprotein, the method comprising:
  - 5 providing a first fingerprint of a first glycoprotein, wherein the first fingerprint comprises binding information for at least a first saccharide-binding agent and a second saccharide-binding agent for the first glycoprotein;
  - providing a second fingerprint of a second glycoprotein, wherein the second fingerprint comprises binding information for at least the first saccharide-binding agent and  
10 the second saccharide-binding agent for the second glycoprotein;
  - comparing the first fingerprint and the second fingerprint, wherein said comparing comprises determining whether the first glycoprotein and the second glycoprotein bind to the first saccharide binding agent, and whether the first glycoprotein and the second glycoprotein  
15 bind to the second saccharide binding agent,
  - thereby determining the relatedness of the first glycoprotein and second glycoprotein.
  
2. The method of claim 1, wherein the first fingerprint is identified by a method comprising
  - 20 providing a first glycoprotein comprising a first carbohydrate polymer,
  - contacting the first carbohydrate polymer with the first saccharide-binding agent;
  - determining whether the first carbohydrate polymer binds to the first saccharide-binding agent;
  - contacting said carbohydrate polymer with the second saccharide-binding agent, wherein the second saccharide-binding agent comprises a detectable label; and  
25 determining whether the first carbohydrate polymer binds to the second saccharide-binding reagent,
  - thereby generating a fingerprint of the first glycoprotein.
  
3. The method of claim 2, wherein the second fingerprint is identified by a method  
30 comprising
  - providing a second glycoprotein comprising a second carbohydrate polymer,
  - contacting said carbohydrate polymer with the first saccharide-binding agent;
  - determining whether the second carbohydrate polymer binds to said saccharide-binding agent;

WO 02/37106

PCT/US01/47064

contacting the second carbohydrate polymer with the second saccharide-binding agent, wherein the second saccharide-binding agent comprises a detectable label; and determining whether said carbohydrate polymer binds to the second saccharide-binding reagent,

5 thereby generating a fingerprint of the second glycoprotein.

4. The method of claim 2, further comprising contacting the first carbohydrate polymer with at least five saccharide-binding agents, and determining whether said carbohydrate polymer binds to each of said at least five saccharide-binding reagents.

10

5, The method of claim 2, wherein binding of the first and second saccharide-agent is determined by

a) providing a surface comprising at least one first saccharide-binding agent attached to a predetermined location on said surface;

15

b) contacting said surface with a carbohydrate polymer under conditions allowing for the formation of a first complex between the first saccharide-binding agent and said carbohydrate polymer;

20

c) contacting said surface with at least one second saccharide-binding agent under conditions allowing for formation of a second complex between the first complex and the second saccharide-binding agent; and

20

d) identifying the first saccharide-binding agent and second saccharide-binding agent in the second complex.

25

6. The method of claim 2, wherein the second saccharide-binding agent further comprises a detectable label and the second saccharide binding agent is identified by detecting said label and the first saccharide binding agent is identified by determining the location of the detected label on the substrate.

30

7. The method of claim 6, wherein said detectable label is selected from the group consisting of a chromogenic label, a radiolabel, a fluorescent label, and a biotinylated label.

8. The method of claim 6, wherein said surface comprises at least five saccharide-binding agents affixed to said surface.

WO 02/37106

PCT/US01/47064

9. The method of claim 6, wherein said surface is contacted with at least five second saccharide-binding agents.

10. The method of claim 6, wherein said surface is contacted with at least five second  
5 saccharide-binding agents.

11. The method of claim 6, wherein the first saccharide binding agent is selected from the group consisting of a lectin, a saccharide-cleaving enzyme, and an antibody to a  
10 saccharide.

12. The method of claim 6, wherein the second saccharide binding agent is selected from the group consisting of a lectin, a polysaccharide-cleaving or modifying enzyme, and an antibody to a saccharide.  
15

13. The method of claim 6, wherein said carbohydrate polymer is provided after digestion with a saccharide-cleaving agent.

14. The method of claim 6, wherein said carbohydrate polymer is digested with a  
20 saccharide-cleaving agent prior to contacting said saccharide with the second saccharide-binding agent.

15. The method of claim 1, wherein the first fingerprint and second fingerprint comprise information for at least five saccharide-binding agents.  
25

16. The method of claim 1, wherein the test glycoprotein is present in a biological fluid.

17. The method of claim 16, wherein the biological fluid is selected from the  
30 group consisting of blood, serum, urine, saliva, milk, ductal fluid, tears and semen.

18. A method for identifying a glycoprotein, the method comprising:  
providing a first fingerprint of a test glycoprotein, wherein the first fingerprint  
comprises binding information for at least a first saccharide-binding agent and a second  
35

WO 02/37106

PCT/US01/47064

saccharide-binding agent for the first glycoprotein;  
comparing the first fingerprint to at least one reference fingerprint, wherein the  
reference glycoprotein fingerprint comprises binding information for at least the first  
saccharide-binding agent and the second saccharide-binding agent for at least one reference  
5 glycoprotein,  
thereby identifying the test glycoprotein.

19. The method of claim 18, wherein the first fingerprint and reference fingerprint  
comprise information for at least five saccharide-binding agents.

10

20. The method of claim 18, wherein the first fingerprint is identified by a method  
comprising

providing a first glycoprotein comprising a first carbohydrate polymer,  
contacting the first carbohydrate polymer with the first saccharide-binding agent;  
15 determining whether the first carbohydrate polymer binds to the first saccharide-  
binding agent;  
contacting said carbohydrate polymer with the second saccharide-binding agent,  
wherein the second saccharide-binding agent comprises a detectable label; and  
determining whether the first carbohydrate polymer binds to the second saccharide-  
20 binding reagent,  
thereby generating a fingerprint of the first glycoprotein.

21. The method of claim 18, wherein the reference fingerprint is identified by a  
method comprising

25 providing a second glycoprotein comprising a second carbohydrate polymer,  
contacting said carbohydrate polymer with the first saccharide-binding agent;  
determining whether the second carbohydrate polymer binds to said saccharide-  
binding agent;  
contacting the second carbohydrate polymer with the second saccharide-binding  
30 agent, wherein the second saccharide-binding agent comprises a detectable label; and  
determining whether said carbohydrate polymer binds to the second saccharide-  
binding reagent,  
thereby generating a fingerprint of the second glycoprotein.

WO 02/37106

PCT/US01/47064

22. The method of claim 21, further comprising contacting the first carbohydrate polymer with at least five saccharide-binding agents, and determining whether said carbohydrate polymer binds to each of said at least five saccharide-binding reagents.

5

23. The method of claim 22, wherein binding of the first and second saccharide-agent is determined by

a) providing a surface comprising at least one first saccharide-binding agent attached to a predetermined location on said surface;

10 b) contacting said surface with a carbohydrate polymer under conditions allowing for the formation of a first complex between the first saccharide-binding agent and said carbohydrate polymer;

c) contacting said surface with at least one second saccharide-binding agent under conditions allowing for formation of a second complex between the first complex and the  
15 second saccharide-binding agent; and

d) identifying the first saccharide-binding agent and second saccharide-binding agent in the second complex.

24. The method of claim 23, wherein the second saccharide-binding agent further  
20 comprises a detectable label and the second saccharide binding agent is identified by detecting said label and the first saccharide binding agent is identified by determining the location of the detected label on the substrate.

25. The method of claim 24, wherein said detectable label is selected from the group  
25 consisting of a chromogenic label, a radiolabel, a fluorescent label, and a biotinylated label.

26. The method of claim 23, wherein said surface comprises at least five saccharide-binding agents affixed to said surface.

30 27. The method of claim 23, wherein said surface is contacted with at least 5 second saccharide-binding agents.

28. The method of claim 26, wherein said surface is contacted with at least five second saccharide-binding agents.

WO 02/37106

PCT/US01/47064

29. The method of claim 23, wherein the first saccharide binding agent is selected from the group consisting of a lectin, a saccharide-cleaving enzyme, and an antibody to a saccharide.

5

30. The method of claim 23, wherein the second saccharide binding agent is selected from the group consisting of a lectin, a polysaccharide-cleaving or modifying enzyme, and an antibody to a saccharide.

10

31. The method of claim 23, wherein said carbohydrate polymer is provided after digestion with a saccharide-cleaving agent.

15

32. The method of claim 25, wherein said carbohydrate polymer is digested with a saccharide-cleaving agent prior to contacting said saccharide with the second saccharide-binding agent.

20

33. A method of modifying a glycoprotein, the method comprising:  
providing a first fingerprint of a test glycoprotein, wherein the first fingerprint comprises binding information for at least a first saccharide-binding agent and a second saccharide-binding agent for the first glycoprotein;  
comparing the first fingerprint to at least one reference fingerprint, wherein the reference fingerprint comprises binding information for at least the first saccharide-binding agent and the second saccharide-binding agent for at least one reference glycoprotein;  
identifying differences in the first fingerprint and the reference fingerprint; and  
altering the test glycoprotein to decrease or increase the differences in the first fingerprint and reference fingerprint, thereby modifying said glycoprotein.

25

34. The method of claim 33, wherein said altering decreases the difference between the first fingerprint and reference fingerprint.

30

35. The method of claim 33, wherein said altering increases the difference between the first fingerprint and reference fingerprint.

36. The method of claim 33, wherein said altering comprises generating a fingerprint

WO 02/37106

PCT/US01/47064

of said altered test glycoprotein and comparing the fingerprint of said altered test glycoprotein to the reference fingerprint.

37. A method for determining the relatedness of a first polysaccharide and a second polysaccharide, the method comprising:

5 providing a first fingerprint of a first polysaccharide, wherein the first fingerprint comprises binding information for at least a first saccharide-binding agent and a second saccharide-binding agent for the first polysaccharide;

10 providing a second fingerprint of a second polysaccharide, wherein the second fingerprint comprises binding information for at least the first saccharide-binding agent and the second saccharide-binding agent for the second polysaccharide;

15 comparing the first fingerprint and the second fingerprint, wherein said comparing comprises determining whether the first polysaccharide and the second polysaccharide bind to the first saccharide binding agent, and whether the first polysaccharide and the second polysaccharide bind to the second saccharide binding agent, thereby determining the relatedness of the first and second polysaccharide.

38. The method of claim 37, wherein said first polysaccharide is provided as a fragment of a larger polysaccharide.

20

39. The method of claim 37, wherein the second polysaccharide is associated with a known biological property.

40. The method of claim 37, wherein the first fingerprint and second fingerprint 25 comprise information for at least five saccharide-binding agents.

41. The method of claim 37, wherein the first fingerprint is identified by a method comprising

30 providing said first polysaccharide,  
contacting the first polysaccharide with the first saccharide-binding agent;  
determining whether the first polysaccharide binds to the first saccharide-binding agent;

contacting said first polysaccharide with the second saccharide-binding agent, wherein the second saccharide-binding agent comprises a detectable label; and

WO 02/37106

PCT/US01/47064

determining whether the first polysaccharide binds to the second saccharide-binding reagent,  
thereby generating a fingerprint of the first polysaccharide.

- 5 42. The method of claim 41, wherein the second fingerprint is identified by a method comprising
- providing a second polysaccharide comprising a second carbohydrate polymer,  
contacting said carbohydrate polymer with the first saccharide-binding agent;  
determining whether the second carbohydrate polymer binds to said saccharide-  
10 binding agent;  
contacting the second carbohydrate polymer with the second saccharide-binding agent, wherein the second saccharide-binding agent comprises a detectable label; and  
determining whether said carbohydrate polymer binds to the second saccharide-binding reagent,  
15 thereby generating a fingerprint of the second polysaccharide.

43. The method of claim 41, further comprising contacting the first carbohydrate polymer with at least five saccharide-binding agents, and determining whether said carbohydrate polymer binds to each of said at least five saccharide-binding reagents.

20

44. The method of claim 41, wherein binding of the first and second saccharide-agent is determined by

- a) providing a surface comprising at least one first saccharide-binding agent attached to a predetermined location on said surface;  
25 b) contacting said surface with a carbohydrate polymer under conditions allowing for the formation of a first complex between the first saccharide-binding agent and said carbohydrate polymer;  
c) contacting said surface with at least one second saccharide-binding agent under conditions allowing for formation of a second complex between the first complex and the  
30 second saccharide-binding agent; and  
d) identifying the first saccharide-binding agent and second saccharide-binding agent in the second complex.

45. The method of claim 44, wherein the second saccharide-binding agent further

WO 02/37106

PCT/US01/47064

comprises a detectable label and the second saccharide binding agent is identified by detecting said label and the first saccharide binding agent is identified by determining the location of the detected label on the substrate.

5           46. The method of claim 45, wherein said detectable label is selected from the group consisting of a chromogenic label, a radiolabel, a fluorescent label, and a biotinylated label.

          47. The method of claim 44, wherein said surface comprises at least five saccharide-binding agents affixed to said surface.

10

          48. The method of claim 44, wherein said surface is contacted with at least 5 second saccharide-binding agents.

          49. The method of claim 44, wherein said surface is contacted with at least five  
15 second saccharide-binding agents.

          50. The method of claim 44, wherein the first saccharide binding agent is selected from the group consisting of a lectin, a saccharide-cleaving enzyme, and an antibody to a saccharide.

20

          51. The method of claim 44, wherein the second saccharide binding agent is selected from the group consisting of a lectin, a polysaccharide-cleaving or modifying enzyme, and an antibody to a saccharide.

25           52. The method of claim 44, wherein the first polysaccharide is provided after digestion with a saccharide-cleaving agent.

          53. The method of claim 44, wherein the first polysaccharide is digested with a saccharide-cleaving agent prior to contacting said first polysaccharide with the second  
30 saccharide-binding agent.

          54. A method for modifying a polysaccharide, the method comprising:  
          providing a first fingerprint of a test polysaccharide, wherein the first fingerprint  
          comprises binding information for at least a first saccharide-binding agent and a second

WO 02/37106

PCT/US01/47064

saccharide-binding agent for the first polysaccharide;  
comparing the first fingerprint to at least one reference fingerprint, wherein the  
reference fingerprint comprises binding information for at least the first saccharide-binding  
agent and the second saccharide-binding agent for at least one reference polysaccharide;  
5 identifying differences in the first fingerprint and the reference fingerprint; and  
altering the test polysaccharide to decrease or increase the differences in the first  
fingerprint and reference fingerprint, thereby modifying said polysaccharide.

55. The method of claim 54, wherein said altering comprises generating a  
10 fingerprint of said altered test polysaccharide and comparing the fingerprint of said altered  
test polysaccharide to the reference fingerprint.

56. A polysaccharide produced by the method of 54.

15 57. A plurality of polysaccharides comprising the polysaccharide of claim 56.

58. A substrate comprising the plurality of claim 57.

59. A method of diagnosing a pathology associated with a carbohydrate polymer in a  
20 subject, the method comprising:

providing a test fingerprint of a carbohydrate polymer from a subject suspected of  
having said pathology; and

25 comparing the test fingerprint with a reference fingerprint, wherein the test fingerprint  
is from a carbohydrate polymer in a reference sample whose pathology state is known,  
wherein a correspondence between the test fingerprint and the reference fingerprint indicates  
the subject and the reference sample have the same pathology state.

60. The method of claim 59, wherein the reference sample comprises a database.

30 61. The method of claim 59, wherein said carbohydrate polymer is a glycoprotein, a  
polysaccharide, or a glycolipid.

62. The method of claim 59, wherein the subject is a human.

WO 02/37106

PCT/US01/47064

63. A method of identifying a function associated with a carbohydrate polymer, the method comprising:  
providing a test fingerprint of a carbohydrate polymer from a test sample; and  
comparing the test fingerprint with a reference fingerprint, wherein the test fingerprint  
5 is from a carbohydrate polymer whose functional status is known,  
wherein a correspondence between the test fingerprint and the reference fingerprint  
indicates the subject and the reference sample have the same functional status.
64. The method of claim 63, wherein the carbohydrate polymer is a glycoprotein,  
10 polysaccharide, or a glycolipid.
65. The method of claim 63, wherein said carbohydrate polymer is a glycoprotein.
66. A method of identifying a carbohydrate polymer, the method comprising  
15 providing a test fingerprint of a carbohydrate polymer; and  
comparing the test fingerprint with a reference fingerprint, wherein the test fingerprint  
is from a reference carbohydrate polymer whose identity is known,  
wherein a correspondence between the test fingerprint and the reference fingerprint  
indicates the subject and the reference carbohydrate sample are the same.  
20
67. A method of identifying an agent that modulates the structure of a carbohydrate  
polymer, the method comprising:  
providing a biological sample comprising said carbohydrate polymer;  
contacting the sample with a test agent;  
25 identifying a carbohydrate polymer fingerprint of one or more carbohydrate  
polymers in said sample;  
comparing the carbohydrate polymer fingerprint to a carbohydrate polymer  
fingerprint of said one or more carbohydrate polymers in a sample that is not  
contacted with said agent;  
30 identifying a difference in the carbohydrate fingerprint profiles, if present, in  
the test and reference fingerprints,  
thereby identifying an agent that modulates the structure of a carbohydrate polymer.

WO 02/37106

PCT/US01/47064

68. A method of identifying a candidate therapeutic agent for a pathophysiology associated with a carbohydrate polymer, the method comprising
- 5 providing a test biological sample comprising a cell capable of expressing said carbohydrate polymer;
- contacting the test biological sample with a test agent;
- 10 identifying a carbohydrate polymer fingerprint of one or more carbohydrate polymers in said biological sample;
- comparing the carbohydrate polymer fingerprint to a carbohydrate polymer fingerprint of one or more carbohydrate polymers in a reference biological sample comprising at least one cell whose pathophysiological status is known; and
- 15 identifying a difference in the carbohydrate finger profiles, if present, in the test biological sample and reference biological sample,
- thereby identifying a therapeutic agent for a pathophysiology associated with the carbohydrate polymer.
69. A method of identifying an individualized therapeutic agent suitable for treating a pathophysiology associated with a carbohydrate polymer in a subject, the method comprising:
- 20 providing from said subject a biological sample comprising said carbohydrate polymer;
- contacting the test biological sample with a test agent;
- identifying a carbohydrate polymer fingerprint of one or more carbohydrate polymers in said biological sample;
- 25 comparing the carbohydrate polymer fingerprint to a carbohydrate polymer fingerprint of said one or more carbohydrate polymers in a reference biological sample whose pathophysiological status is known; and
- identifying a difference in the carbohydrate finger profiles, if present, in the test biological sample and reference biological sample,
- 30 thereby identifying an individualized therapeutic agent for said subject.
70. A method of assessing the efficacy of a treatment of pathophysiology associated with a carbohydrate polymer, the method comprising:
- providing from the subject a test biological sample comprising said carbohydrate polymer;

WO 02/37106

PCT/US01/47064

- determining a carbohydrate fingerprint of said carbohydrate polymer; and  
comparing the carbohydrate fingerprint of said polymer with a reference  
carbohydrate polymer fingerprint, wherein the reference carbohydrate polymer  
fingerprint is derived from a carbohydrate polymer whose pathophysiological status is  
5 known;  
thereby assessing the efficacy of treatment of the pathophysiology in the  
subject.
71. A method of treating a pathophysiology associated with a carbohydrate  
10 polymer mediated pathway in a subject, the method comprising administering to the subject  
an agent that modulates a carbohydrate polymer in said patient, wherein said modulation  
alters a carbohydrate polymer fingerprint in said patient.

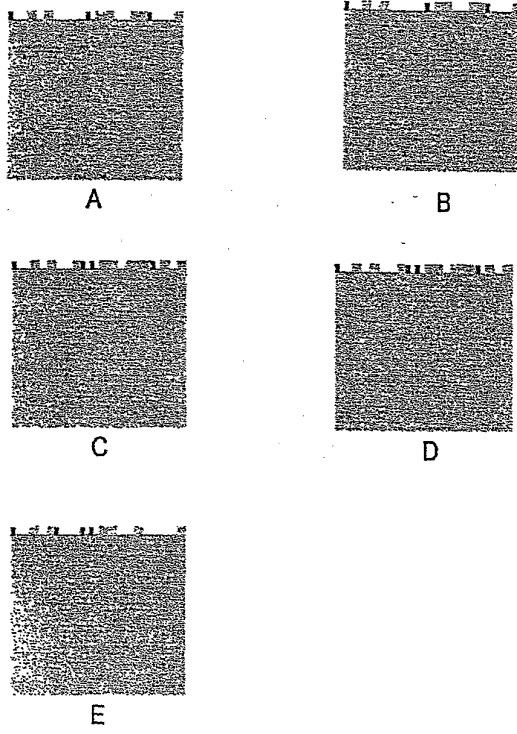
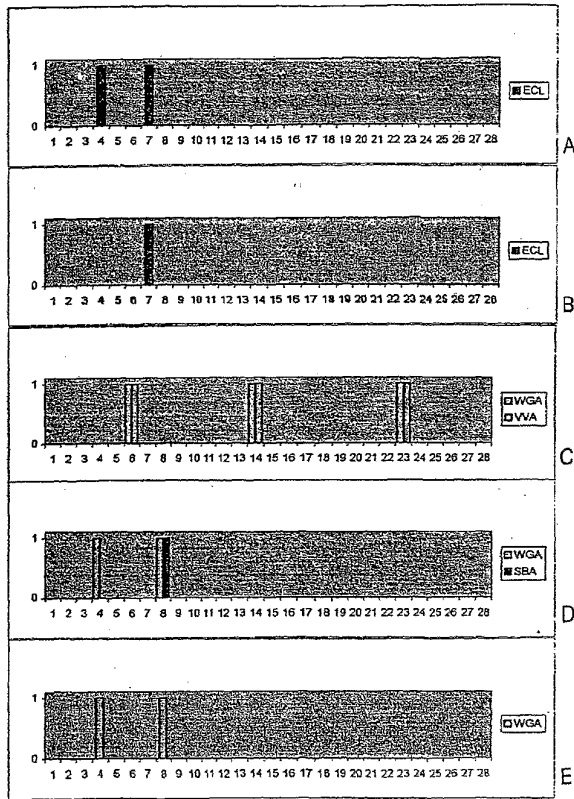


Fig. 1



Lectin#

Fig. 2

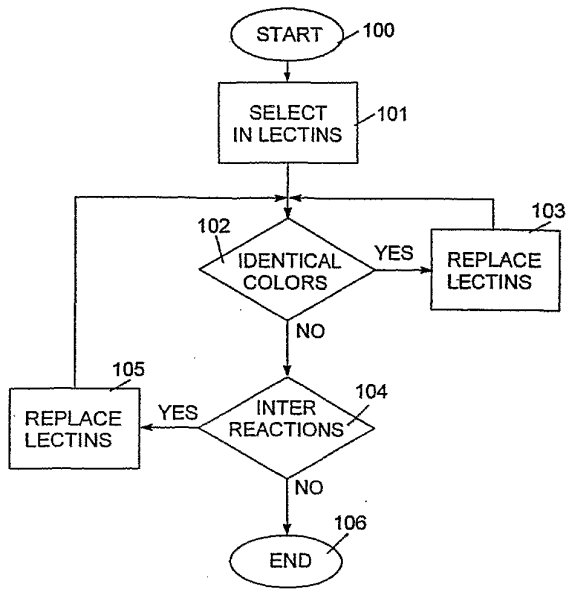


Fig. 3

WO 02/37106

4/8

PCT/US01/47064

Figure 4

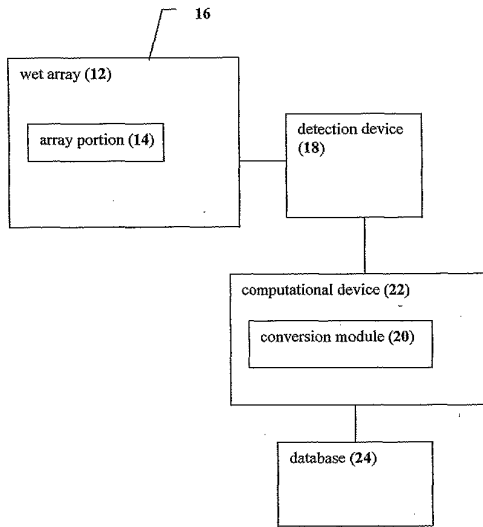


Figure 5

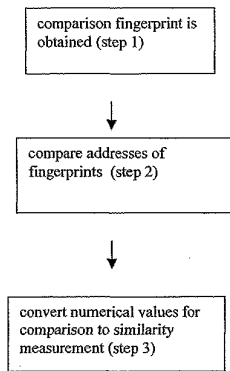


Figure 6

5

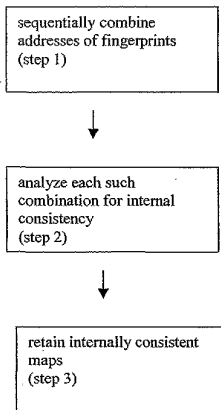


Figure 7

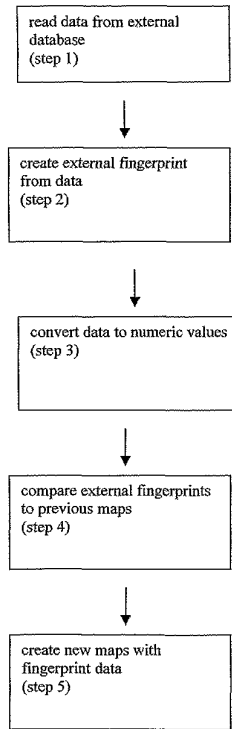
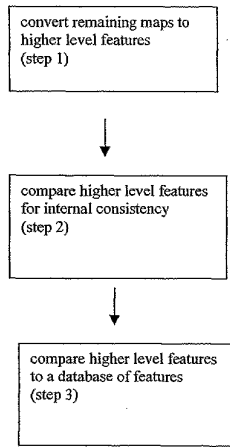


Figure 8



【国際公開パンフレット(コレクション)】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
10 May 2002 (10.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/037106 A3

(51) International Patent Classification: G01N 33/53, C12Q 1/34 (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier applications:  
 US 60/246,009 (CIP)  
 Filed on 3 November 2000 (03.11.2000)  
 US 60/245,887 (CIP)  
 Filed on 3 November 2000 (03.11.2000)  
 US 60/245,817 (CIP)  
 Filed on 3 November 2000 (03.11.2000)  
 US 60/246,006 (CIP)  
 Filed on 3 November 2000 (03.11.2000)

(21) International Application Number: PCT/US01/47064

(22) International Filing Date: 5 November 2001 (05.11.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
 60/246,006 3 November 2000 (03.11.2000) US  
 60/246,009 3 November 2000 (03.11.2000) US  
 60/245,887 3 November 2000 (03.11.2000) US  
 60/245,817 3 November 2000 (03.11.2000) US

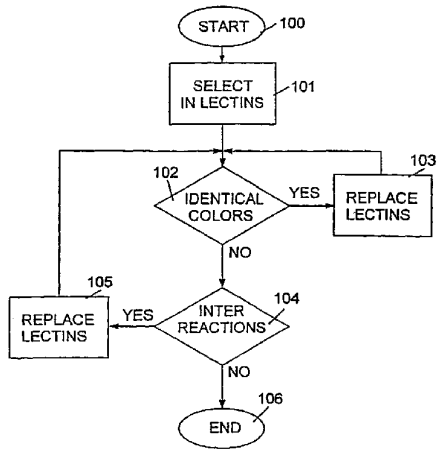
(71) Applicant (for all designated States except US): GLYCO-DATA, LTD. [IL/IL]; 3 Habosem Street, 77610 Ashdod (IL).

(72) Inventors; and  
 (75) Inventors/Applicants (for US only): MARKMAN, Ofer [IL/IL]; 3 Habosem Street, 77610 Ashdod (IL). ROTHMAN, Chana [IL/IL]; 3 Habosem Street, 77610 Ashdod

[Continued on next page]

(54) Title: METHODS FOR COMPARATIVE ANALYSIS OF CARBOHYDRATE POLYMERS

WO 02/037106 A3



(57) Abstract: Disclosed is a method for characterizing a carbohydrate polymer by identifying at least two binding agents that bind to the carbohydrate polymer. Binding is preferably determined by contacting the carbohydrate polymer with substrate that contains a plurality of first saccharide-binding agents affixed at predetermined locations on the substrate. The carbohydrate polymer is allowed to contact the substrate under conditions that allow for formation of a first complex between the first saccharide-binding agent and the carbohydrate polymer. A second saccharide-binding agent, which preferably includes a label, is also contacted with the carbohydrate polymer under conditions that allow for formation of a second complex between the second binding agent and the first complex. Identification of the first and second binding agent allows for characterization of the polysaccharide.

WO 02/037106 A3 

(IL). **AMOR, Yehudit** [IL/IL]; 3 Habosem Street, 77610 Ashdod (IL). **ORON, Assaf** [US/IL]; 3 Habosem Street, 77610 Ashdod (IL). **OR, Einat** [IL/IL]; 3 Habosem Street, 77610 Ashdod (IL).

(74) **Agent: JOHNSON, David, E.**; Mintz, Levin, Cohn, Ferris, Glovsky and Popeo PC, One Financial Center, Boston, MA 02111 (US).

(81) **Designated States (national):** AI, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) **Designated States (regional):** ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Published:**  
with international search report

(88) **Date of publication of the international search report:**  
21 November 2002

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/JP02/47064
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/53 C12Q1/34		
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) IPC 7 G01N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, MEDLINE, PAJ, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 31267 A (SEPRACOR INC) 24 June 1999 (1999-06-24) cited in the application the whole document	1-70
X	---	71
A	EP 0 421 972 A (MONSANTO CO) 10 April 1991 (1991-04-10) cited in the application the whole document	1-70
A	WO 93 22678 A (BAYLOR COLLEGE MEDICINE HOUSTON ADVANCED RES CENTER (US); MASSACH) 11 November 1993 (1993-11-11) the whole document	1-55, 59-69
A	EP 0 166 623 A (ORTHO DIAGNOSTIC SYSTEMS INC) 2 January 1986 (1986-01-02) the whole document	1-55, 59-69
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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 (see specification) *C* 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. *S* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 2 August 2002		Date of mailing of the international search report 09/08/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P. B. 5018 Patentbus 2 NL - 2200 LH The Hague Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl. Fac. (+31-70) 340-3016		Authorized officer: Döpfer, K-P

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2002)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/47064
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 00 68688 A (HEALTHCARE TECHNOLOGIES LTD ; MARKMAN OFER (IL)) 16 November 2000 (2000-11-16) the whole document	1-70
E	WO 01 84147 A (ORON ASSAF PERETZ ; GLYCODATA LTD (IL); ROTHMAN CHANA (IL); MARKMAN) 8 November 2001 (2001-11-08) the whole document	1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 01/47064**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: \_\_\_\_\_  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2.  Claims Nos.: \_\_\_\_\_  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.: \_\_\_\_\_  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

**Remark on Protest**

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

International Application No. PCT/JP 01 A7064

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 70 (partially - step 1) and 71 are directed to a diagnostic method/mehtod of treatment practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.1

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by surgery  
Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
Information on patent family membersInventor's Application No  
PCT/US 01/47064

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9931267	A	24-06-1999	AU 1925699 A	05-07-1999
			AU 1927899 A	05-07-1999
			AU 2201999 A	05-07-1999
			AU 2449399 A	05-07-1999
			CA 2314422 A1	24-06-1999
			CA 2314431 A1	24-06-1999
			CA 2314889 A1	24-06-1999
			CA 2314890 A1	24-06-1999
			CN 1285003 T	21-02-2001
			CN 1285001 T	21-02-2001
			EP 1049796 A1	08-11-2000
			EP 1038037 A1	27-09-2000
			EP 1062840 A1	27-12-2000
			EP 1060639 A1	20-12-2000
			JP 2002508507 T	19-03-2002
			JP 2002508193 T	19-03-2002
			US 6022311 A	08-02-2000
			WO 9931267 A1	24-06-1999
			WO 9931280 A1	24-06-1999
			WO 9931934 A1	24-06-1999
WO 9931935 A1	24-06-1999			
US 6254526 B1	03-07-2001			
US 6228020 B1	08-05-2001			
US 6354990 B1	12-03-2002			
EP 0421972	A	10-04-1991	US 5100778 A	31-03-1992
			CA 2026685 A1	04-04-1991
			EP 0421972 A2	10-04-1991
			JP 3228698 A	09-10-1991
			US RE35417 E	31-12-1996
WO 9322678	A	11-11-1993	US 5846708 A	08-12-1998
			EP 1143014 A2	10-10-2001
			EP 1143015 A2	10-10-2001
			EP 1143016 A2	10-10-2001
			EP 0638173 A1	15-02-1995
			JP 7508831 T	28-09-1995
			WO 9322678 A2	11-11-1993
			US 5653939 A	05-08-1997
EP 0166623	A	02-01-1986	EP 0166623 A2	02-01-1986
			FI 852545 A	30-12-1985
			JP 61020867 A	29-01-1986
WO 0068688	A	16-11-2000	AU 4310700 A	21-11-2000
			EP 1179177 A1	13-02-2002
			WO 0068688 A1	16-11-2000
WO 0184147	A	08-11-2001	AU 1756901 A	12-11-2001
			AU 4310700 A	21-11-2000
			EP 1179177 A1	13-02-2002
			WO 0184147 A1	08-11-2001

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup> F I テーマコード(参考)  
 G 0 1 N 33/58 G 0 1 N 33/58 Z

(31)優先権主張番号 60/245,817  
 (32)優先日 平成12年11月3日(2000.11.3)  
 (33)優先権主張国 米国(US)

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

L i n u x

(72)発明者 ローズマン, チャナ  
 イスラエル国 7 7 6 1 0 アシュドッド, ハボセン ストリート 3  
 (72)発明者 アムール, イェフビット  
 イスラエル国 7 7 6 1 0 アシュドッド, ハボセン ストリート 3  
 (72)発明者 オラン, アサフ  
 イスラエル国 7 7 6 1 0 アシュドッド, ハボセン ストリート 3  
 (72)発明者 オル, エイナット  
 イスラエル国 7 7 6 1 0 アシュドッド, ハボセン ストリート 3  
 Fターム(参考) 2G045 AA40 BB14 BB51 CB30 DA44 FA11 FB07 FB12 GC15  
 4B063 QA01 QA18 QQ03 QQ67 QR43 QR48 QR77 QR84 QS12 QS36  
 QX02

专利名称(译)	碳水化合物聚合物的比较分析方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004533599A</a>	公开(公告)日	2004-11-04
申请号	JP2002539810	申请日	2001-11-05
[标]申请(专利权)人(译)	专业Koguni的有限		
申请(专利权)人(译)	Purokogunia有限公司		
[标]发明人	マークマンオファー ローズマンチャナ アムールイエフビット オランアサフ オルエイナット		
发明人	マークマン, オファー ローズマン, チャナ アムール, イエフビット オラン, アサフ オル, エイナット		
IPC分类号	C12Q1/02 C12Q1/34 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/58		
CPC分类号	G01N33/5308 C12Q1/34		
FI分类号	G01N33/53.V C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/566 G01N33/58.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB14 2G045/BB51 2G045/CB30 2G045/DA44 2G045/FA11 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/GC15 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ67 4B063/QR43 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QR84 4B063/QS12 4B063/QS36 4B063/QX02		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/246006 2000-11-03 US 60/246009 2000-11-03 US 60/245887 2000-11-03 US 60/245817 2000-11-03 US		
其他公开文献	JP4176467B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

公开了通过鉴定至少两种结合碳水化合物聚合物的结合剂来表征碳水化合物聚合物的方法。优选通过使包含碳水化合物聚合物的基质与附着在基质上的预定位置的多个第一糖结合因子接触来确定结合。使碳水化合物聚合物在允许在第一糖结合剂和碳水化合物聚合物之间形成第一复合物的条件下与基质接触。第二糖类结合剂(优选包括标记物)还在允许在第二结合剂和第一复合物之间形成第二复合物的条件下与碳水化合物聚合物接触。第一结合剂和第二结合因子的鉴定允许表征多糖。

