(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년04월02일
(11) 등록번호 10-2790377
(24) 등록일자 2025년03월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61M 16/08 (2006.01) *A61B 10/00* (2025.01)
A61B 5/08 (2025.01) *A61B 5/097* (2006.01)
A61M 16/04 (2006.01) *A61M 16/10* (2006.01)
A61M 16/16 (2006.01) *A61M 16/20* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61M 16/085 (2015.01)
A61B 10/00 (2025.01)
(21) 출원번호 10-2023-7037537
(22) 출원일자(국제) 2022년03월31일
심사청구일자 2023년11월03일
(85) 번역문제출일자 2023년10월31일
(65) 공개번호 10-2023-0159894
(43) 공개일자 2023년11월22일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/022964
(87) 국제공개번호 WO 2022/212796
국제공개일자 2022년10월06일
(30) 우선권주장
63/169,130 2021년03월31일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
EP02823300 B1
EP03336543 A1
WO2006012205 A2
WO2021041571 A1

(73) 특허권자
제테오 테크, 인코포레이티드
미국 21784 메릴랜드주 사익스빌 워필드 에비뉴 6935
(72) 발명자
첸 다펭
미국 21784 메릴랜드주 사익스빌 워필드 에비뉴 6935
브라이든 웨인 에이
미국 21784 메릴랜드주 사익스빌 워필드 에비뉴 6935
맥러린 마이클
미국 21784 메릴랜드주 사익스빌 워필드 에비뉴 6935
(74) 대리인
이훈, 이두희

전체 청구항 수 : 총 25 항 심사관 : 조상진

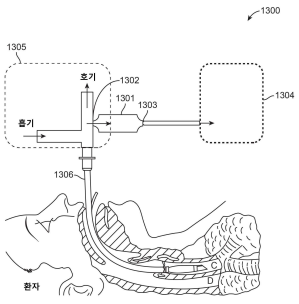
(54) 발명의 명칭 **인공호흡기를 이용하여 호흡하는 환자를 모니터링하기위한 호기 수집 시스템 및 방법**

(57) 요 약

COVID-19와 같은 호흡기 질환을 포함한 여러 질병에 대한 신속하고 저렴한 현장 진료 분석을 가능하게 하기 위해 호흡기 질환의 호기에서 에어로졸 입자를 포착하고 분석하는 방법 및 장치가 개시된다. 개시된 방법 및 시스템은 충전층 컬럼을 사용하여 에어로졸화된 입자를 선택적으로 포착한다. 그런 다음 포착된 입자는 용매를 사용하여

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도9a



용출되고 MALDI-TOFMS를 포함한 분석 장치를 사용하여 분석된다.

(52) CPC특허분류
A61B 5/082 (2013.01)
A61B 5/097 (2013.01)
A61M 16/04 (2013.01)
A61M 16/0808 (2013.01)
A61M 16/1065 (2015.01)
A61M 16/16 (2013.01)
A61M 16/202 (2015.01)
G01N 33/6851 (2013.01)
A61M 2205/07 (2013.01)

(30) 우선권주장
63/249,357 2021년09월28일 미국(US)
63/325,435 2022년03월30일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

호흡기 질환에 감염되고 인공호흡기를 이용하여 호흡하는 환자를 모니터링하기 위한 호기 수집 시스템에 있어서,

상기 인공호흡기를 이용하여 호흡하는 환자에 의하여 생성된 호기 공기 내에서 에어로졸 입자를 포착하도록 각각에 유입구 단부, 유출구 단부 및 충전층 컬럼을 포함하되, 상기 유입구 단부는 상기 인공호흡기의 호기 공기 튜브의 일측 단부에 직접 분리가능하게 연결되며, 상기 호기 공기 튜브의 타측 단부는 상기 환자의 입 또는 코를 통하여 직접 기도 내로 삽입되는, 하나 이상의 샘플 포착 요소; 및

상기 하나 이상의 샘플 포착 요소 내로 에어로졸 입자를 포함한 호기 공기를 흡인하도록 구성된 펌프, 전원 공급 장치 및 컨트롤러 중의 하나 이상을 포함하되, 상기 하나 이상의 샘플 포착 요소의 상기 유출구 단부와 유체 연통하도록 배치되며 상기 하나 이상의 샘플 포착 요소의 작동을 제어하도록 구성된, 서브시스템을

포함하는 것을 특징으로 하는 호기 수집 시스템.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 서브시스템은 하나 이상의 CO_2 센서와, 상기 샘플 포착 요소와 상기 펌프 사이에 배치되는 입자 계수기를 더 포함하고, 상기 입자 계수기는 상기 하나 이상의 샘플 포착 요소에서 충전층의 포화 상태와 충전층 컬럼으로부터 에어로졸화된 입자의 누출을 검출할 수 있도록 구성된 것을 특징으로 하는 호기 수집 시스템.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 서브시스템은 휴대용 인클로저 내에 배치되고, 상기 휴대용 인클로저는 상기 펌프에 의하여 발생된 소음 수준을 45±10%dB 미만으로 줄이도록 구성된 것을 특징으로 하는 호기 수집 시스템.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 샘플 포착 요소와 상기 펌프 사이에 배치되고 상기 하나 이상의 샘플 포착 요소 각각에서 상기 충전층 컬럼을 통과하는 수증기, 휘발성 유기 성분 및 비휘발성 유기 성분 중의 하나 이상을 포함하는 호기 응축물(EBC)을 포착하도록 구성된, 트랩을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 호기 수집 시스템.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 하나 이상의 샘플 포착 요소 각각에서 상기 충전층 컬럼은 수지, 셀룰로오스, 실리카, 아가로스 및 수화 Fe_3O_4 나노입자 중의 하나 이상을 포함하는 고체입자를 포함하는 것을 특징으로 하는 호기 수집 시스템.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 하나 이상의 샘플 포착 요소 각각에서 상기 충전층 컬럼은 표면상에 C18 작용기를 갖는 수지 비드, 표면상에 황산 에스테르 작용기를 갖는 셀룰로오스 비드 및 이들의 혼합물 중에서의 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 호기 수집 시스템.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 수지 비드 및 상기 셀룰로오스 비드는 20±10%㎛ 이상의 공칭 직경을 갖는 것을 특징으로 하는 호기 수집 시스템.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 수지 비드 및 상기 셀룰로오스 비드는 40±10%㎛ 내지 150±10%㎛ 범위의 공칭 직경을 갖는 것을 특징으로 하는 호기 수집 시스템.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 펌프를 사용하여 상기 하나 이상의 샘플 포착 요소 각각에서의 상기 충전층 컬럼을 통해 유입되는 공칭 유량은 200±10%㎖/min 내지 3±10%L/min 범위인 것을 특징으로 하는 호기 수집 시스템.

청구항 10

호흡기 질환에 감염되고 인공호흡기를 이용하여 호흡하는 환자를 모니터링하기 위한 시스템에 있어서,

제1항의 상기 호기 수집 시스템;

상기 하나 이상의 샘플 포착 요소 각각에서의 상기 충전층 컬럼으로부터 상기 에어로졸 입자를 하나 이상의 액체 샘플 내로 추출하기 위한 샘플 추출 시스템; 및

상기 하나 이상의 액체 샘플에서의 상기 에어로졸 입자를 분석하는 분석 장치를

포함하는 것을 특징으로 하는 시스템.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 샘플 추출 시스템은 상기 하나 이상의 샘플 포착 요소 각각에서의 상기 충전층 컬럼을 하나 이상의 용매로 플러싱하고 상기 충전층으로부터 에어로졸 입자를 포함하는 상기 용매를 수집하는 수단을 포함하는 것을 특징으로 하는 시스템.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 하나 이상의 용매는 아세토니트릴(ACN), 메탄올, 트리플루오로 아세트산(TFA) 및 이소프로판올(IPA) 중 하나 이상을 포함하고, 나머지는 물인 것을 특징으로 하는 시스템.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 하나 이상의 용매는 물 중 50±1% 부피% 내지 70±1% 부피% 범위의 아세토니트릴, 물 중 50±1% 부피% 내지 70±1% 부피% 범위의 이소프로판올, 및 물 중 0.05±1% 부피% 범위의 TFA를 포함하는 것을 특징으로 하는 시스템.

청구항 14

제10항에 있어서,

상기 분석 장치는 PCR, ELISA, rt-PCR, 질량 분석기(MS), MALDI-MS, ESI-MS 및 MALDI-TOFMS, 및 LC-MS/MS 중의 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 시스템.

청구항 15

제1항에 있어서,

상기 인공호흡기에 의해 생성된 호기 공기 중의 에어로졸 입자는 미생물, 바이러스, 대사산물 바이오마커, 지질 바이오마커 및 호흡기 질환의 특징을 보이는 단백질 바이오마커 중의 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 호기 수집 시스템.

청구항 16

인공호흡기를 이용하여 호흡하는 환자의 상태를 모니터링하기 위한 방법에 있어서,

샘플 수집 시스템을 이용하여 환자에 의해 생성된 호기 공기 내에 존재하는 에어로졸 입자를 포착하는 단계를 포함하되, 상기 샘플 수집 시스템은

상기 인공호흡기를 이용하여 호흡하는 환자에 의하여 생성된 호기 공기 내에서 에어로졸 입자를 포착하기 위하여 각각에 유입구 단부, 유출구 단부와 충전층 컬럼을 포함하되 상기 유입구 단부는 상기 인공호흡기의 호기 공기 튜브의 일측 단부에 직접 분리가능하게 연결되며 상기 호기 공기 튜브의 타측 단부는 환자의 입 또는 코를 통하여 직접 기도 내에 삽입되는 하나 이상의 샘플 포착 요소와,

상기 하나 이상의 샘플 포착 요소의 유출구 단부와 유체 연통되도록 배치되고 상기 하나 이상의 샘플 포착 요소 내로 에어로졸 입자를 포함한 상기 호기 공기를 흡인하도록 구성된 펌프를 포함하는, 단계;

샘플 추출 시스템에 의해 상기 하나 이상의 샘플 포착 요소에서의 상기 충전층 컬럼으로부터 상기 에어로졸 입자를 하나 이상의 액체 샘플 내로 추출하는 추출 단계; 및

분석 장치에 의해 상기 하나 이상의 액체 샘플 내에서의 에어로졸 입자를 분석하는 분석 단계를

포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 샘플 수집 시스템을 상기 인공호흡기의 상기 호기 공기 튜브에 제거 가능하게 연결하기 이전에 70% ACN, 물 및 0.05% TFA 중의 하나 이상을 사용하여 상기 하나 이상의 샘플 포착 요소의 상기 충전층 컬럼을 세척하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제16항에 있어서,

상기 추출 단계는 상기 하나 이상의 샘플 포착 요소의 상기 충전층 컬럼을 먼저 50±1% 부피% 범위의 ACN으로 플러싱한 다음 70±1% 부피% 범위의 IPA로 플러싱하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제16항에 있어서,

샘플 처리 단계를 더 포함하고, 상기 샘플 처리 단계는

상기 하나 이상의 액체 샘플을 MALDI 매트릭스와 혼합하여 하나 이상의 혼합 샘플을 얻는 단계; 및

상기 하나 이상의 혼합 샘플을 하나 이상의 샘플 플레이트에 도포하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제16항에 있어서,

샘플 처리 단계를 더 포함하고, 상기 샘플 처리 단계는 호흡기 질환의 특징을 보이는 하나 이상의 펩타이드 샘플을 생성하도록 샘플 추출 시스템을 사용하여 추출된 상기 하나 이상의 액체 샘플을 단백질 소화시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제20항에 있어서,

상기 샘플 처리 단계는

상기 하나 이상의 펩타이드 샘플을 MALDI 매트릭스와 혼합하여 하나 이상의 혼합 샘플을 얻는 단계; 및

상기 하나 이상의 혼합 샘플을 하나 이상의 샘플 플레이트에 도포하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제19항에 있어서,

상기 분석 단계는 PCR, ELISA, rt-PCR, 질량 분석기(MS), MALDI-MS, ESI-MS, MALDI-TOFMS 및 LC-MS/MS 중의 하나 이상을 사용하여 상기 하나 이상의 혼합 샘플을 분석하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제21항에 있어서,

상기 분석 단계는 PCR, ELISA, rt-PCR, 질량 분석기(MS), MALDI-MS, ESI-MS, MALDI-TOFMS 및 LC-MS/MS 중 하나 이상을 사용하여 상기 하나 이상의 혼합 샘플을 분석하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

인공호흡기를 이용하여 호흡하는 환자에 의해 생성된 호기 공기 중에서 에어로졸화된 박테리아 및 바이러스를 포착하기 위한 샘플 포착 요소에 있어서,

충전층 컬럼을 포함하되 상기 충전층 컬럼은 펌프를 사용하여 상기 호기 공기가 상기 충전층 컬럼을 통해 흡인됨에 따라 호기 공기 중에서 에어로졸화된 박테리아 및 바이러스 입자를 포착하도록 구성되고,

상기 충전층 컬럼은, 표면상에 C18 작용기를 갖는 수지 비드, 표면상에 황산 에스테르 작용기를 갖는 셀룰로오스 비드 및 이들의 혼합물 중에서 하나 이상을 포함하되, 상기 수지 비드와 셀룰로오스 비드는 샘플 포착을 위하여 사용하기 전에 젖은 상태가 유지되며, 상기 수지 비드와 셀룰로오스 비드는 공칭 직경이 40±10%㎛ 내지 200±10%㎛ 범위이고, 상기 샘플 포착 요소의 입자 포착 효율은 99% 이상인 것을 특징으로 하는 샘플 포착 요소.

청구항 25

제24항에 있어서,

상기 수지 비드와 셀룰로오스 비드는 상기 충전층 컬럼 내의 2개의 다공성 중합체 프릿 디스크 사이에 충전되어 있는 것을 특징으로 하는 샘플 포착 요소.

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 2021년 3월 31일자 미국가출원 제63/169130호 "충전층 시스템 및 방법을 이용한 에어로졸화된 생체재료입자의 포착에 의한 호흡기 질환의 진단", 2021년 9월 28일자 미국가출원 제63/249357호 "충전층 시스템 및 방법을 이용한 에어로졸화된 생체재료입자의 포착에 의한 호흡기 질환의 진단" 및 2022년 3월 30일자 미국가출원 제63/325435호 "충전층 시스템 및 방법을 이용한 에어로졸화된 생체재료입자의 포착에 의한 호흡기 질환의 진단"과 관련되고 이에 대한 혜택을 주장하며, 이들 전체가 참고로 여기에 포함된다.

[0002] 본 발명은 호기(exhaled breath) 및 기타 에어로졸(aerosols)에 포함된 바이러스 및 박테리아 입자와 같은 에어로졸화된 유기 생체물질을 포착하고 분석하여 COVID-19와 같은 호흡기 질환을 포함한 여러 질병에 대한 신속하고 저렴한 현장 진료 분석을 가능하게 하는 방법 및 장치에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 그러나 이에 국한되지는 않고, 본 발명은 MALDI-TOFMS를 포함하는 질량 분석기를 사용하여 COVID-19 및 결핵(tuberculosis)과 같은 호흡기 질환을 검출하기 위해 호기 및 기타 에어로졸 내의 비휘발성 유기물을 분석하는 방법 및 장치에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 코로나바이러스 질병(COVID-19)은 새로 등장한 코로나바이러스 SARS-CoV-2에 의해 발생하는 질병이다. 이러한 신형 코로나바이러스는 호흡기 바이러스로 주로 감염자가 기침이나 재채기를 할 때 나오는 비말이나 콧물이나 타액 비말을 통해 전파된다. 새로운 코로나바이러스는 전염성이 매우 높으며 지속적인 COVID-19 대유행을 일으켰으며, 이는 이 바이러스가 인플루엔자보다 더 빠르게 퍼지고 있음을 시사한다. 완화를 돕기 위해서는 신속한 탐지 도구가 필요하다.

[0004] 더욱이, 결핵(tuberculosis, TB)은 매일 4000명 이상이 사망하는 세계적 살인자로서 HIV/AIDS를 능가했다(Patterson, B., 외, 2018). 발병률 감소율은 보고된 연간 1.5%로 여전히 불충분하며, 치료만으로는 질병 부담을 크게 줄일 수 없을 것 같다. HIV가 널리 퍼진 지역사회에서, 결핵균(*Mycobacterium tuberclusis, Mtb*) 유전자형 연구에 따르면 재활성화보다는 최근 전파가 TB 발병 사례의 대부분(54%)을 차지한다는 사실이 밝혀졌다. TB 전파의 물리적 과정은 아직 제대로 이해되지 않고 있고, 감염성 에어로졸 생성, 방출 및 흡입의 주요 이벤트들을 설명하기 위한 신기술의 적용은 느리다. 공기 중 감염성 입자를 특성화하는 경험적 연구는 드물다. 조사를 괴롭히는 두 가지 주요 어려움은 자연적으로 생성된 *Mtb* 입자의 낮다고 알려진 농도와 공기 중 샘플의 환경 및 환자 유래의 박테리아 및 곰팡이 오염의 합병증이다. 그럼에도, 공기 중 탐지에 대한 많은 시도가 있어 왔다. 우간다에서의 2004년 개념 입증 연구와 후속 타당성 연구에서는 폐결핵 환자에게서 기침으로 생성된 에어로졸을 샘플링했다. 2개의 자립형 캐스케이드 임팩터(viable cascade impactors)가 장착된 샘플링 챔버 내로 직접 기침을 하면 1~6일간의 화학 요법을 받았음에도 불구하고 참가자의 4분의 1 이상이 양성 배양 결과로 나왔다. 동일한 장치를 사용한 후속 작업에서는 에어로졸 세균 부하가 더 높은 참가자가 더 높은 가정 전파율 및 질병 발견의 발전과 관련될 수 있음이 발견되었고, 이는 정량적 공기 중 샘플링이 임상적으로 관련된 감염성 척도가 될 수 있음을 시사한다. 따라서 전파 중단은 TB 발병률에 신속하고 측정 가능한 영향을 미칠 것이다.

[0005] 결핵 전염을 통제하는 가장 좋은 방법은 능동성 TB 사례(active TB case)를 신속하게 확인하고 치료하는 것이다(Wood, R.C., 외, 2015). 폐결핵의 진단은 일반적으로 환자 가래의 미생물학적, 현미경적 또는 분자학적 분석에 의해 수행된다. 대부분의 개발도상국에서 TB 감염에 대한 "최적 표준(gold standard)" 테스트는 가래 샘플을 기

반으로 한 도말 배양이다. 상기 샘플을 배양 플레이트에 문지르고 *Mtb*에 특이적인 염색을 부가하여 상기 염색된 세포를 현미경을 사용하여 카운트한다.만일 상기 도말에서 세포들의 농도가 설정된 임계값보다 크면 상기 샘플은 양성으로 분류된다. 만일 TB 수가 이 임계값 미만이면 음성으로 분류된다. 진단에는 수 시간이 소요될 수 있다. 진단 샘플로서 가래의 필요성은 환자로부터 수집하는 어려움과 복잡한 구성으로 인해 하나의 제한 요소이다. 상기 재료의 점도는 테스트 감도를 제한하고 샘플들 간 이질성을 증가시키며, 테스트와 관련된 비용과 노동력을 증가시킨다. 또한, 가래 생성(기침이 필요함)은 직업상 의료 종사자에게 위험하다. 가래는 샘플 배지로서 몇 가지 단점이 있다. 첫째, 환자의 약 50%만이 양호한 가래 샘플을 제공할 수 있다. 예컨데, 약 8세 미만의 어린이는 요청에 따라 샘플을 생산할 수 없는 경우가 종종 있다. 이는 일반적으로 목구멍 깊은 곳에서 가래를 "기침해내는" 능력이 발달하지 않았기 때문이다. 노인과 병자는 가래를 뱉어낼 힘이 없을 수 있다. 다른 사람들은 단순히 목에 가래가 없을 수 있다. 따라서 객담(가래) 분석을 기반한 진단 방법은 가래 샘플을 제공하는 환자의 최대 50%만큼이나 진단을 제공하지 못할 수 있다. 또한 가래는 더 이상 폐 깊숙한 곳의 잘명 상태를 나타내지 않기 때문에, 항생제 치료를 받은 후 1~2일 후에 채취하는 경우에는 진단용 샘플로 유용하지 않고, 치료 개시 후 며칠 이내에 가래 내의 살아 있는 *Mtb* 수가 크게 감소한다. 소변과 혈액이 TB 감염의 진단을 위한 샘플 배지로 제안된 바 있다. 혈액은 매우 침습적이며 세계 일부 지역에서 많은 TB 환자들이 HIV 동시 감염을 갖고 있기 때문에 종종 HIV 양성인 혈액 샘플을 처리하는 데 더 높은 비용이 수반된다. 또한 능동적 TB 감염 환자는 혈액 내에 순환하는 결핵 세포가 많지 않을 수 있다. 소변 기반의 진단도 제안되었지만, 이들 검사는 살아 있는 TB 간균(bacilli) 이외의 질병의 바이오 마커(biomarker)를 찾는 것이고 광범위한 임상 사용에 대해 검증된 것은 아무것도 없다.

[0006] 샘플이 채취 및 취급이 더 쉽고 안전하며 균일하면, TB 진단이 단순화된다. 호기(exhaled breath)에는 에어로졸(aerosols: "EBA")과 증기가 포함되어 있어 비침습적으로 채취하고 특성을 분석하여 폐 내의 생리학적 및 병리학적 과정을 설명할 수 있다(Hunt, 2002). 분석용의 상기 호기를 포착하기 위해, 호기된 공기는 응축 장치를 통과하여 호기 응축물(exhaled breath condensate: "EBC")이라고 하는 유체 축적물을 생성한다. 주로 수증기에서 유래하지만, EBC는 사이토카인, 지질, 계면활성제, 이온, 산화 생성물, 아데노신, 히스타민, 아세틸콜린 및 세로토닌을 포함한 비휘발성 화합물 내에 용해되었다. 또한 EBC는 암모니아, 과산화수소, 에탄올 및 기타 휘발성 유기 화합물을 포함한 잠재적으로 휘발성인 수용성 화합물을 포착한다. EBC는 pH를 쉽게 측정할 수 있다. EBC는 에어졸화된 기도 내막액과 폐 내에서 진행 중인 생화학적 및 염증성 활동의 비침습적 징후를 제공하는 휘발성 화합물이 포함한다. EBC에 대한 관심이 급속한 증가는 폐질환에서 EBC가 감염된 개인과 건강한 개인을 구별하는 데 사용할 수 있는 측정 가능한 특성을 갖는다는 인식에서 비롯되었다. 이들 분석은 급성 및 만성 천식, 만성 폐쇄성 폐질환, 성인 호흡 곤란 증후군, 직업병 및 낭포성 섬유증에서 기도 및 폐 산화환원 편차(lung redox deviation), 산-염기 상태, 염증의 정도 및 유형에 대한 증거를 제공해왔다. 불확실하고 다양한 희석 정도를 특징으로 하는 EBC는 고유한 기도 내막액 내의 개별 용질 농도에 대한 정확한 평가는 제공하지 않을 수 있다. 그러나, 농도가 건강과 질병 간에 크게 다르거나 샘플 내에서 발견되는 용질의 비율을 기반으로 하는 경우 유용한 정보를 제공할 수 있다.

[0007] Patterson 등(2018)은 환자 유도 호기 에어로졸 샘플링을 최적화하고 단일 환자로부터 호흡 가능한 에어로졸을 분리 및 축적하도록 설계된 새로운 장치인 맞춤형 호흡 에어로졸 샘플링 챔버(respiratory aerosol sampling chamber: RASC)를 사용했다. 환경 샘플링은 챔버 공기에서 일정 기간 존재하는 *Mtb*를 검출한다. 새로 진단된 35명의 GeneXpert(Cepheid, Inc., Sunnyvale, CA) 객담 양성 환자들이 약 1.4㎥의 부피를 갖는 RASC 챔버 내에 1시간 격리되는 동안 모니터링되었다. GeneXpert 유전자 분석은 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction: PCR)을 기반으로 하며 TB 진단을 위한 샘플을 분석하고 TB 샘플 내에 약물 내성 유전자가 있는지 여부를 나타내는 데 사용할 수 있다. TB에 대한 GeneXpert PCR 분석은 가래 샘플을 받아 약 1시간 내에 양성 또는 음성 결과를 제공할 수 있다. 상기 챔버에는 공기역학적 입자 크기 검출, 자립형(viable) 및 비자립형(non-viable) 샘플링 장치, 실시간 CO_2 모니터링 및 기침 소리 녹음이 통합되었다. 미생물 배양 및 ddPCR(droplet digital polymerase chain reaction: 액적 디지털 중합효소 연쇄 반응)을 사용하여 각 바이오 에어로졸 수집 장치에서 *Mtb*를 검출했다. *Mtb*는 77%의 에어로졸 샘플들에서 검출되었고 42%의 샘플들은 미코박테리아 배양에서 양성이었고 92%는 ddPCR에서 양성이었다. 기침률과 배양 가능한 바이오 에어로졸 간에 상관관계가 발견되었다. *Mtb*는 에어로졸 크기 2.0~3.5 ㎛에서 피크로 모든 자립형 캐스케이드 임팩터 단계들에서 검출되었다. 이는 에어로졸 배양 양성에 대한 호기 공기의 0.09 CFU/리터의 중앙값(median)과 호기 미립자 바이오 에어로졸의 4.5×10^7 CFU/㎖의 추정 중앙값 농도를 시사한다. *Mtb*는 상기 RASC 챔버를 사용하여 치료를 받지 않은 대부분의 TB 환자가 호기한 바이오 에어로졸 내에서 검출되었다. 분자 검출은 고체 배지 상의 *Mtb* 배양보다 더 민감한 것으로 밝혀졌

다.

[0008] *Mtb*는 배양, ddPCR, 전자 현미경, 면역분석 및 세포 염색(예컨데, oramine 및 dmn-Tre)을 통해 EBA에서 식별될 수 있다. 이들 중에서 PCR과 면역분석은 종 수준에 따라 신속하고 특이적일 가능성을 갖는다. PCR 및 기타 게놈 기반 기술은 균주 수준에 따라 다를 수 있다. 질량 분석법은 또한 박테리아 감염으로 얻은 배양물의 균주 수준에 특이적인 것으로 나타났다. 예를 들어, Bruker Daltonics(독일)의 Biotyper는 인간에게 감염을 일으키는 최대 15,000종의 박테리아를 식별할 수 있는 것으로 나타났다. 이러한 기술은 EBA로부터 결핵 감염을 식별할 수 있는 것으로 나타났다. 리포아라비노만난(lipoarabinomannan)에 기초한 것과 같은 *Mtb* 검출을 위한 면역분석법도 잘 알려져 있다.

[0009] 결핵(TB)의 경우, TB 감염자는 개인이 진료소에 내원할 때 수동적 사례 발견을 통해 진단되는 경우가 많다. 능동적 환자 발견 방식(active case finding: "ACF")은 일반적으로 일차 의료 시스템 외부에서 TB 감염이 의심되는 사람들에게 연락하는 다른 방법을 포함하는 것으로 고려된다. WHO에 따르면, ACF는 "신속하게 적용할 수 있는 검사, 시험 또는 기타 절차를 사용하여 능동적인 결핵이 의심되는 사람을 체계적으로 식별하는 것"이다. ACF의 목표는 감염된 사람들을 조기에 치료하여 평균 감염 기간을 줄임으로써 질병의 확산을 감소시키는 것이다. TB의 경우, 개인이 도움을 받기 위해 진료소에 갈 때쯤에는, 그 사람은 약 10명 내지 약 115명의 다른 사람들에게 TB 감염을 전파했었을 수가 있다. ACF는 심각한 TB 전파를 줄이거나 예방하는 데 도움이 될 수 있다. 객담(가래) 분석 및 혈액 분석과 같은 진단 시스템과 방법은 자동화되지도 않았고 자율적으로 운영되지도 않으며 신속하지도 않다. 많은 사람들이 각 분석에 소모되는 값비싼 분석법을 사용하므로, 특히 개발도상국 및 저개발 국가에서는 상기 능동적 환자 발견 방식을 위한 일반적인 유틸리티가 없다. 앞서 기술했듯이, EBA 분석은 값비싼 분석 및 소모품이 필요 없기 때문에 신속한 분석과 휴대성 및 저렴한 비용을 제공하는 TB 검출용의 강력한 진단 도구로 보인다. McDevitt 등(2013)은 인플루엔자 진단을 위한 EBA 분석 장치 및 방법을 보고했다. 임팩터는 호기에서 큰 입자(>4㎛)를 제거하는 데 사용되며, 그 다음에는 더 작은 입자(<4㎛)에 대한 습식 필름 수집기가 사용된다. 수집된 입자들의 두 가지 사이즈 빈(bin)은 게놈 기반 방법인 역전사효소 중합효소 연쇄 반응(reverse transcriptase polymerase chain reaction: rt-PCR)을 사용하여 인플루엔자 바이러스에 대해 분석되었다. PCR 기술은 효소를 포함한 다른 생체 분자와 결합된 생체 분자 프로브를 사용하여 DNA의 특정 서열이 샘플에 존재하는 경우 상기 특정 서열을 증폭한다. 표적 서열은 확인되는 질병에 특이적인 것으로 여겨진다. McDevitt 등은 EBA 샘플이 인플루엔자 진단에 사용될 수 있음을 보여주었다. 상기 개시된 장치 및 방법은 실용적인 관점에서는 몇 가지 단점이 있다. 첫째, 호흡 에어로졸 샘플은 부피가 수 밀리리터인 개별 샘플로 수집되므로, 상기 샘플을 농축하는 데 상당한 노력이 필요하다. 또한, 진단 장치가 샘플 수집기에 연결되거나 통합되지 않으며 ACF 도구로 잘 사용할 수 없다. TB 분석용의 자율적 진단 도구를 만들기 위해 RNA 분석을 자동화하는 기능은 명확하지 않다. 특정 환자에 의한 충분한 양의 기침이나 호흡 에어로졸이 발생했는지 여부를 확인하는 방법은 설명되어있지 않다. 그 결과, 샘플이 인플루엔자에 대해 음성으로 밝혀지는 경우, 이는 부적절한 샘플 수집으로 인한 위음성 때문일 수 있다. 다양한 호흡 기동 도중에 생성되는 에어로졸화된 폐액의 양과 관련하여 인간들 간에 큰 변동성이 있다는 점이 잘 알려져 있다.

[0010] GeneXpert Ultra는 PCR 기술을 사용하는 첨단 게놈학 기반의 현장 진료 진단 장치이다. 결핵(TB) 및 기타 호흡기 질환의 ACF를 수행하도록 EBA 샘플 수집 방법과 통합될 수 있지만 상기 샘플 수집 시간이 너무 길어 실용적이지 않다. Patterson 등은 20 내지 200 TB의 간균이 일반적으로 EBA에서 생산되며 1시간의 샘플링 기간에 걸쳐 수집될 수 있음을 보여주었다. GeneXpert Ultra를 진단 분석으로 사용하려면 최소 1시간의 샘플링이 필요하다. GeneXpert는 공기 중 병원체에 대한 공기 샘플을 분석하기 위해 공기를 샘플링하는 시스템과 통합될 수 있다. 상기 BDS 시스템(Northup Grumman, Edgewood, MD)은 우편물이 유통 센터를 통과할 때 탄저병을 유발하는 박테리아 포자에 대해 US Postal Service 우편물을 검사하는 데 사용된다. 습식 벽 사이클론을 GeneXpert PCR 시스템에 결합하여 자동으로 공기를 샘플링하고 병원체 존재 여부를 보고한다. 그러나, 상기 GeneXpert Ultra 분석은 테스트당 비용이 상대적으로 높으며 분석을 완료하고 결과를 제공하는 데 약 1시간이 걸린다. 일반적으로, PCR 기반 진단은 샘플링 및 분석에 필요한 시간이 길고 테스트당 비용이 상대적으로 높아 ACF 적용을 위한 TB 스크리닝에는 적합하지 않다.

[0011] 진단 분석에 연관된 시간은 현장 테스트 또는 "현장 진료" 테스트의 중요한 매개변수이다. ACF는 정의에 따라 의료 시스템 외부에서 발생하기 때문에 현장 진단 분석의 한 예이다. 미국에서 현장 진료 테스트는 20분 이내에 답을 제공해야 한다. 그렇지 않으면, 테스트가 너무 느리고 짧은 환자 대기 시간을 달성하기에 적합하지 않은 것으로 간주된다. 개발 도상국, 특히 TB 유병률이 있는 국가에서는 GeneXpert를 사용하여 약 1시간 내에 진단을 제공할 수 있다. 전술한 대로, 이 분석은 "테스트당 비용"을 기준으로 구현하는 데 비용이 많이 들기 때문에 아

직 널리 배포되지는 않았다. 높은 비용으로 인해, 건강해 보이지만(무증상) TB 감염 가능성이 있는 환자를 선별하는 데 사용되지는 않고, 차라리 다른 검사나 요인에 의해 강력하게 의심되는 진단을 확인하는 데 사용된다.

[0012] Fennelly 등(2004)은 기침 에어로졸과, 능동적인 환자(active patient)를 갖는 것으로 알려진 개인들을 이용하는 2개의 Anderson 캐스케이드 임팩터가 수용된 수집 챔버를 사용한 TB 분석을 기술하였다. 개인들은 5분 동안 2번의 강렬한 기침을 하도록 요구되었다. 임팩트 받은 샘플을 배양하는 데는 30~60일이 걸렸으므로, 이러한 접근 방식은 자동화에 부합하지 않는다. 임상 샘플로서 EBA의 어려운 측면은 호흡에서 수집할 수 있는 호기 미립자의 상대적으로 작은 샘플이다. 또한, 상기 수집된 질량의 상당 부분은 물이다. 진단정보를 포함하는 분자("바이오마커(biomarker)")는 나노리터 또는 피코그램의 양으로 존재한다. 결과적으로, 상기 에어로졸 수집 방법은 호기(exhaled breath)에서 바이오매스(biomass)의 많은 부분을 포착하는 데 효과적이어야 한다. 호기에는 들숨, 심호흡, 기침, 재채기를 포함한 여러 동작을 통해 폐에서 내쉬는 공기가 포함된다. 강제 폐활량(forced vital capacity: FVC)과 같은 심호흡 기동의 특정 유형은 호기의 량을 최대화하기 위해 가능한 한 많이 숨을 들이쉬고 최대한 멀리(또는 깊게) 내쉼으로써 폐활량의 최대 부피를 측정하는 데 사용할 수 있다. 강제 호기량(forced expiratory volume: FEV)은 강제 호흡 중에 한 사람이 내쉴 수 있는 공기의 양을 측정한다. 호기된 공기의 양은 상기 강제 호흡의 제1초(FEV1), 제2초(FEV2) 및/또는 제3초(FEV3) 동안 측정될 수 있다. 강제 폐활량(forced vital capacity: FVC)은 FEV 테스트 동안 내쉬는 총 공기량이다. 강제 호기량 및 강제 폐활량은 폐활량 측정 중에 측정되는 폐 기능 검사이다. 강제 호기량은 폐 기능의 중요한 측정이다.

[0013] 호흡 에어로졸과 호흡 응축물로 호흡기 질환을 검출할 수 있다는 연구 결과가 있지만, 결핵, 인플루엔자, 폐렴과 같은 감염 또는 질병에 대한 현대 임상 검사는 가래, 혈액 또는 비강 면봉을 계속 사용한다. 호기 분석 도구는 호기 내에 존재하는 미량의 분석 물질을 효율적으로 수집 및 농축하는 방법 및 장치가 부족하여 상용화되지 않았다. 또한, 특정 진단을 위해 호기가 얼마나 충분한지를 평가하는 표준이나 방법론이 없다. 개시된 예시적 장치 및 방법은 호기 에어로졸 및 호흡 응축물을 고 유량 및 고 효율로 그리고 비교적 농축된 샘플로 수집함으로써 이러한 한계를 극복한다. 또한, 에어로졸의 크기 분류를 통합하여 분석 물질을 수집하기 이전에 특정 분석 물질에 대한 신호 대 잡음비를 증가시킬 수 있다. 그 다음, 농축된 샘플은 여러 방법으로 분석할 수 있지만, 관심있는 분석 물질에 민감하고 신속하며 매우 특이적인 방법을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 분석은 신속하고 실시간에 가까운 것이 보다 바람직하다. 질량분석기, 실시간 PCR 및 면역분석은 민감하고 특이적이고 거의 실시간에 가까운 잠재력을 지닌다.

[0014] 신속 및 민감하고 특이적이고 바람직하게는 테스트 당 저렴한 비용을 특징으로 하는 진단 분석을 제공하기 위해서는, 객담 분석보다 더 빠르고 신뢰할 수 있고 혈액 분석보다 덜 침습적인 질량 분석법(mass spectrometry: "MS")과 같은 빠른 진단 도구와 결합될 수 있는 샘플 수집 방법이 필요하다. 이러한 시스템은 TB 및 기타 폐 또는 호흡기 질환의 능동적 환자 발견 방식(ACF)에 사용될 수 있다. ACF용 시스템이 효과적이려면 "진단 당(per diagnosis)" 기준으로 신속하고 저렴해야 한다. 낮은 검사 당 비용은 실제로 TB 감염된 소수를 검색하도록 TB 전파를 사전에 방지하기 위해 다수의 개인을 선별하기 위한 요구 사항이다. "일반 감기"에 감염되었을 가능성이 있는 환자가 리노바이러스에 감염되었을 수 있기 때문에, 인플루엔자 및 기타 병원성 바이러스의 현장 진단을 위해서는 저렴한 장치 및 방법 또한 필요하다. 일부 경우, 호흡기 감염이 박테리아나 곰팡이 미생물에 의해 유발되며 항생제로 치료할 수 있다. 다른 경우에는 상기 미생물이 항생제에 내성을 가질 수 있어 항생제에 대한 미생물 내성을 확인할 수 있는 진단 방법이 바람직하다. 기도의 바이러스 감염과 세균 감염 간을 구별하기 위한 신속한 EBA 방법이 요구되면서도, 불충분한 샘플 볼륨으로 인한 위음성의 발생을 최소화해야 한다. 질량분석법, PCR을 포함한 게놈학 방법 및 면역분석법이 민감하고 특이적일 가능성이 가장 높다. 질량 분석기, 특히 MALDI 비행시간 질량 분석기(MALDI time-of-flight mass spectrometry: MALDI-TOFMS)는 민감하고 특이적이며 거의 실시간임이 입증되었으므로 EBA 및 EBC 샘플 분석에 선호되는 진단 도구이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명은 호흡기 질환에 감염된 환자를 모니터링하고 감염된 환자의 호흡을 보조하기 위한 인공호흡기에 연결되는 호기 수집 시스템을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명은 호흡기 질환에 감염된 환자를 모니터링하고 감염된 환자의 호흡을 보조하기 위한 인공호흡기에 연결

되는 예시적인 호기 수집 시스템에 관한 것으로, 본 발명의 이 시스템은 환자에 의하여 생성된 호기(exhaled breath) 내에서 에어로졸화된 입자를 선택적으로 수집하기 위하여 각각 충전층 컬럼(packed bed column)을 포함하고 인공호흡기의 호기 공기튜브에 분리가능하게 연결되는 하나 이상의 샘플 포착 요소(sample capture epements)와; 펌프, 전원 공급 장치 및 컨트롤러 중 하나 이상을 포함하고 샘플 포착 요소와 유체적으로 연통하도록 배치되어 있으며 샘플 포착 요소를 제어할 수 있도록 구성되고 펌프는 호기 에어로졸을 샘플 포착 요소로 흡인하도록 구성된 서브시스템(subsystem)을 포함한다. 이 시스템은 하나 이상의 CO_2 센서와, 샘플 포착 요소와 펌프 사이에 배치되는 입자 계수기(particle counter)를 더 포함한다. 서브시스템은 휴대용 인클로저(portable enclosure) 내에 배치될 수 있다. 이 시스템은 샘플 포착 요소와 펌프 사이에 배치되고, 충전층을 통과하는 수증기, 휘발성 유기 성분 및 비휘발성 유기 성분 중 하나 이상을 포함하는 호기 응축물(EBC)을 포착하도록 구성된 트랩을 더 포함할 수 있다. 충전층 컬럼은 수지, 셀룰로오스, 실리카, 아가로스 및 수화된 Fe_3O_4 나노입자 중의 하나 이상을 포함하는 고체입자를 포함할 수 있다. 충전층 컬럼은 표면에 C18 작용기를 갖는 수지 비드(resin beads), 표면에 황산 에스테르 작용기를 갖는 셀룰로오스 비드 및 이들의 혼합물 중의 하나 이상을 포함할 수 있다. 수지 비드 및 셀룰로오스 비드는 약 20㎛ 이상의 공칭 직경을 가질 수 있다. 수지 비드 및 셀룰로오스 비드는 약 40 마이크론 내지 약 150 마이크론의 공칭 직경을 가질 수 있다. 비드는 두 개의 다공성 중합체 프릿 디스크(porous polymeric frit discs) 사이에 충전될 수 있다. 펌프를 사용하여 충전층을 통해 유입되는 공칭 유량은 약 200㎖/min과 약 3L/min 사이일 수 있다.

[0017] 전술한 바와 같은 예시적인 호기 수집 시스템, 충전층 컬럼으로부터 호흡기 질환의 특징을 보이는 포착된 에어로졸 입자를 하나 이상의 액체 샘플로 추출하기 위한 샘플 추출 시스템과, 하나 이상의 액체 샘플에서 에어로졸 입자를 분석하는 분석 장치를 포함하는, 호흡기 질환에 감염된 환자를 모니터링하기 위한 예시가 개시된다. 추출 시스템은 충전층 칼럼을 하나 이상의 용매로 플러싱(flushing)하고 충전층으로부터 에어로졸 입자를 포함하는 용매를 수집하는 수단을 포함할 수 있다. 하나 이상의 용매는 아세토니트릴, 메탄올, 트리플루오로 아세트산(TFA), 이소프로판올(IPA) 중 하나 이상을 포함할 수 있고, 나머지는 물이다. 하나 이상의 용매는 물 중 약 50 부피% 내지 약 70 부피% 사이의 아세토니트릴, 물 중 약 50 부피% 내지 약 70 부피% 사이의 이소프로판올, 및 물 중 약 0.05 부피% 사이의 TFA를 포함할 수 있다. 분석 장치는 PCR, ELISA, rt-PCR, 질량 분석기(MS), MALDI-MS, ESI-MS 및 MALDI-TOFMS, 및 LC-MS/MS 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 호기 중의 에어로졸 입자는 미생물, 바이러스, 대사산물 바이오마커, 지질 바이오마커 및 호흡기 질환의 특징을 보이는 단백질 바이오마커 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0018] 호흡기 질환에 감염된 환자의 상태를 모니터링하고 감염된 환자의 호흡을 보조하기 위해 인공호흡기에 연결되는 예시적인 방법이 개시되며, 이 방법은 감염된 환자의 호흡을 돕기 위해 제공된 인공호흡기의 호기 공기 튜브에 제거 가능하게 연결된 샘플 수집 시스템을 제공하는 단계를 포함하고; 이 시스템은 환자에 의해 생성된 호기 내에 존재하고 호흡기 질환의 특성을 갖는 에어로졸 입자를 선택적으로 포착하기 위한 충전층 컬럼을 포함하는 하나 이상의 샘플 포착 요소와, 샘플 포착 요소와 유체적으로 연결되고 호기 에어로졸을 샘플 포착 요소로 흡인할 수 있도록 구성된 펌프를 포함하며; 충전층 컬럼으로부터 포착된 에어로졸 입자를 하나 이상의 액체 샘플로 추출하는 추출 단계와; 호흡기 질환의 유무를 확인하기 위한 하나 이상의 액체 샘플에서 에어로졸 입자를 분석하는 분석 단계를 포함한다. 예시적인 방법은 샘플 수집 시스템을 인공호흡기의 호기 공기 튜브에 제거 가능하게 연결하기 전에 70% ACN, 물 및 0.05% TFA 중 하나 이상을 사용하여 컬럼을 세척하는 단계를 더 포함할 수 있다. 추출 단계는 충전층 컬럼을 약 50 부피% ACN으로 플러싱(flushing)한 다음 약 70 부피% IPA로 플러싱하는 것을 포함할 수 있다.

[0019] 예시적인 방법은 하나 이상의 샘플을 MALDI 매트릭스와 혼합하고, 하나 이상의 혼합 샘플 및 MALDI 매트릭스를 하나 이상의 샘플 플레이트에 도포하는 단계를 포함하는 샘플 처리 단계를 더 포함할 수 있다.

[0020] 예시적인 방법은 호흡기 질환의 특징을 보이는 펩타이드 샘플을 생성하기 위해 샘플 추출 시스템으로부터 추출된 하나 이상의 액체 샘플을 단백질 소화시키는 단계를 포함하는 샘플 처리 단계를 더 포함할 수 있다.

[0021] 샘플 처리 단계는 펩타이드 샘플을 MALDI 매트릭스와 혼합하는 단계와 혼합된 샘플과 MALDI 매트릭스를 샘플 플레이트에 도포하는 단계를 포함하는 더 포함할 수 있다. 분석 단계는 PCR, ELISA, rt-PCR, 질량 분석기(MS), MALDI-MS, ESI-MS, MALDI-TOFMS 및 LC-MS/MS 중 하나 이상을 사용하여 샘플 플레이트를 분석하는 단계를 포함할 수 있다.

[0022] 호흡기 질환의 존재 여부를 확인하기 위해 밀폐된 공간에서 주변 공기를 샘플링하고 주변 공기에서 에어로졸 입자를 포착하기 위한 예시적인 시스템이 개시되고 있는바, 이 시스템은 각각 주변 공기에 존재하는 에어로졸 입

자를 선택적으로 포착하기 위한 충전층 컬럼과, 하나 이상의 샘플 포착 요소로 진입하기 전에 주변 공기를 가습하기 위한 분무기(nebulizer)를 포함하는 샘플 수집 모듈과; 워터 펌프, 전원 공급 장치, 컨트롤러, 하나 이상의 샘플 포착 요소를 통하여 주변 공기를 흡인하는 에어 펌프와, 분무기와 워터 펌프에 유체적으로 연통하는 물 용기를 포함하는 유체 모듈을 포함하고; 유체 모듈이 샘플 수집 요소의 작동을 제어하도록 구성되어 있다. 유체 모듈은 샘플 포착 요소와 펌프 사이에 배치된 CO_2 센서 및 입자 계수기 중 하나 이상을 더 포함할 수 있다. 샘플 수집 모듈과 유체 모듈은 각각 휴대용 인클로저에 배치될 수 있다. 샘플 수집 모듈과 유체 모듈은 적절한 기계적 및 전기적 접촉을 감지하고 일측 인클로저에 배치된 그래픽 사용자 인터페이스와 가청 경보 중의 하나를 통하여 사용자에게 경고할 수 있게 구성된 신속 연결/분리 커플링(quick connect/disconnect coupling)을 사용하여 서로 유체적 및 전기적으로 연결되도록 구성될 수 있다. 샘플 수집 모듈과 유체 모듈은 동일한 휴대용 인클로저에 배치될 수도 있다. 충전층 컬럼은 표면에 C18 작용기를 갖는 수지 비드, 표면에 황산 에스테르 작용기를 갖는 셀룰로오스 비드 및 이들의 혼합물 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 수지 비드 및 셀룰로오스 비드는 약 20㎛ 이상의 공칭 직경을 가질 수 있다. 수지 비드 및 셀룰로오스 비드는 약 40 마이크론 내지 약 200 마이크론의 공칭 직경을 가질 수 있다. 각 포착 요소를 통해 펌프를 사용하여 흡인하는 공칭 유량은 약 20L/min 이상일 수 있다. 샘플 수집 모듈에는 물 펌프와 물 용기 중 하나 이상과 유체적으로 연통하도록 배치된 물 저장조가 추가로 포함될 수 있으며, 여기서 분무기는 물에 잠기고 저장조의 출구 근처에 배치된다. 분무기는 초음파 미스트 분무기일 수 있다.

[0023] 전술한 바와 같이 주변 공기 중 에어로졸 입자를 샘플링하고 포착하기 위한 시스템, 각 충전층으로부터 호흡기 질환의 특성을 보이는 포착된 에어로졸 입자를 추출하기 위한 샘플 추출 시스템과, 하나 이상의 액체 샘플에 대한 충전층 컬럼 및 하나 이상의 액체 샘플에 있는 에어로졸 입자를 분석하는 분석 장치을 포함하는, 주변 공기 중 호흡기 병원체(disease agents)를 검출하기 위한 예시적인 시스템이 개시된다. 추출 시스템은 각 충전층 컬럼을 하나 이상의 용매로 플러싱하고 각 충전층으로부터 에어로졸 입자를 포함하는 용매를 수집하는 수단을 포함할 수 있다. 하나 이상의 용매는 아세토니트릴, 메탄올, 이소프로판올(IPA) 중 하나 이상을 포함할 수 있고, 나머지는 물이다. 하나 이상의 용매는 물 중 약 50부피% 내지 약 70부피% 사이의 아세토니트릴, 및 물 중 약 50부피% 내지 약 70부피% 사이의 이소프로판올을 포함할 수 있다. 분석 장치는 PCR, ELISA, rt-PCR, 질량 분석기(MS), MALDI-MS, ESI-MS, MALDI-TOFMS 및 LC-MS/MS 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0024] 밀폐된 공간에서 주변 공기 중의 호흡기 병원체를 검출하기 위한 예시적인 방법이 개시되며, 이 방법은 주변 공기가 하나 이상의 샘플 포착 요소로 진입하기 전에 가습되고 에어 펌프를 이용하여 하나 이상의 샘플 포착 요소 측으로 흡인하는 충전층 컬럼을 포함하는 하나 이상의 샘플 포착 요소를 이용하여 주변 공기 중 호기로부터 에어로졸화된 입자를 선택적으로 포착하는 단계, 각 충전층 컬럼으로부터 호흡기 질병의 특징을 보이는 포착된 에어로졸 입자를 하나 이상의 액체 샘플로 추출하는 단계와, 하나 이상의 액체 샘플에서 에어로졸 입자를 분석하는 단계를 포함한다. 충전층 컬럼은 표면에 C18 작용기를 갖는 수지 비드, 표면에 황산 에스테르 작용기를 갖는 셀룰로오스 비드 및 이들의 혼합물 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 추출 단계는 충전층 컬럼을 아세토니트릴, 메탄올, 이소프로판올(IPA), 나머지 물 중 하나 이상으로 플러싱하는 단계를 포함할 수 있다. 예시적인 방법은 하나 이상의 샘플을 MALDI 매트릭스와 혼합하는 단계와, 하나 이상의 혼합된 샘플과 MALDI 매트릭스를 하나 이상의 샘플 플레이트에 도포하는 단계를 포함하는 샘플 처리 단계를 더 포함할 수 있다. 예시적인 방법은 호흡기 질환의 특징을 보이는 펩티드 샘플을 생성하기 위해 샘플 추출 시스템으로부터 추출된 하나 이상의 액체 샘플을 단백질 소화시키는 단계를 포함하는 샘플 처리 단계를 더 포함할 수 있다. 샘플 처리 단계는 펩타이드 샘플을 MALDI 매트릭스와 혼합하는 단계와 혼합된 샘플과 MALDI 매트릭스를 샘플 플레이트에 도포하는 단계를 더 포함할 수 있다. 분석 장치는 PCR, ELISA, rt-PCR, 질량 분석기(MS), MALDI-MS, ESI-MS, MALDI-TOFMS 및 LC-MS/MS 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0025] 펌프를 사용하여 충전층 컬럼을 통해 흡인된 주변 공기 및 호기 중 하나 이상에서 에어로졸화된 박테리아 및 바이러스 입자를 선택적으로 포착하기 위한 충전층 컬럼을 포함하는 에어로졸화된 박테리아 및 바이러스를 포착하기 위한 예시적인 샘플 포착 요소가 개시되고, 여기에서 충전층 컬럼은 표면에 C18 작용기를 갖는 수지 비드, 표면에 황산 에스테르 작용기를 갖는 셀룰로오스 비드, 및 이들의 혼합물 중 하나 이상을 포함하며, 수지 비드와 셀룰로오스 비드는 공칭 직경이 약 40 마이크론 내지 약 200 마이크론이다. 비드는 충전층 컬럼의 두 개의 다공성 중합체 프릿 디스크(porous polymer frit discs) 사이에 충전될 수 있다.

[0026] 본 개시내용의 다른 특징 및 이점은 부분적으로 다음의 발명의 상세한 설명 및 첨부 도면에 설명될 것이며, 여기서 본 개시내용의 바람직한 측면이 설명되고 도시되고 부분적으로는 첨부된 도면과 함께 취해진 하기의 상세한 설명을 검토함으로써 통상의 기술자에게 명백해지거나 또는 본 개시내용의 실시에 의해 학습될 수 있다. 본

개시내용의 이점은 특허청구범위에서 특히 지적된 수단들 및 조합들에 의해 실현되고 달성될 수 있다.

발명의 효과

[0027] 이와 같이, 본 발명은 호흡기 질환에 감염된 환자를 모니터링하고 감염된 환자의 호흡을 보조하기 위한 인공호흡기에 연결되는 새로운 호기 수집 시스템과, 호흡기 질환에 감염된 환자를 모니터링하기 위한 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0028] 본 개시내용의 전술한 측면들과 많은 부수적인 이점들은 첨부 도면들과 함께 하기의 상세한 설명을 참조함으로써 더 잘 이해되면서 더욱 쉽게 인식될 것이다.

도 1은 충전층 컬럼을 포함하는 예시적인 호기 샘플 수집 시스템의 개략도이다.

도 2는 샘플 수집 시스템을 포함하는 예시적인 호흡기 질환의 진단시스템의 개략도이다.

도 3은 충전층 컬럼을 포함하는 시스템을 이용하는 예시적인 진단방법의 개략도이다.

도 4는 충전층 컬럼을 포함하는 예시적인 호기 샘플 수집 시스템의 개략도이다.

도 5는 충전층 컬럼을 포함하는 예시적인 주변 공기 중 에어로졸 샘플 수집 시스템의 개략도이다.

도 6a~6b는 대조 샘플(A)의 MS2 캡시드 단백질과 포착된 에어로졸 샘플(B)의 MS2 캡시드 단백질의 이온 강도를 보여주는 직접 주입 질량 분석 결과 도표이다.

도 8a~8c는 C18 비드 크기(A), 비드 수량(B) 및 입구 중합체 프릿 기공 크기(C)가 예시적인 샘플 포착 요소를 통한 유량에 미치는 영향을 보인 도표이다.

도 9a~9b는 중환자실에서 COVID-19로 진단받은 환자에게 연결된 인공호흡기와 함께 사용하기 위한 예시적인 호기 에어로졸 수집 시스템의 개략도(도 9a) 및 환기장치에 연결된 에어로졸 수집 시스템을 작동하도록 구성된 예시적인 휴대용 액세서리 및 제어 시스템의 개략도(도 9b)이다.

도 10은 주변 공기 샘플링을 위한 예시적인 에어로졸 수집 시스템의 개략도이다.

도 11a~11c는 14명의 피험자로부터 수집한 호흡 샘플과 블랭크(blanks) 사이의 지질 및 대사산물 바이오마커의 분리를 보여주는 PCA 및 PLS-DA 분석(도 11a), 호기 호흡 에어로졸 샘플에서 지질 및 대사산물 바이오마커 모두에 대한 데이터 여과 유무에 따른 동적 범위 분포(도 11b), 및 CO_2 정규화가 있거나 없는 지질 및 대사산물 바이오마커의 이온 강도(도 11c)를 보인 도표이다.

도 12a~12d는 유체 모듈 및 샘플 수집 모듈(도 12a), 유체 모듈(도 12c~12c) 및 유체 모듈을 사용하는 미스트 생성의 개략적으로 보여주는 주변 공기 샘플링을 위한 예시적인 에어로졸 샘플 수집 시스템의 사시도(도 12d)이다.

도 13a~13b는 4개의 주변 공기 샘플(도 13a)과 4개의 공기 샘플(도 13b)에 있는 Keratin-9 수준의 상향식 단백질체학 분석을 사용하여 식별된 단백질 수를 보인 도표이다.

도 14는 예시적인 C18 충전층 컬럼 샘플 포착 요소 및 버튼 샘플러(button sampler)를 사용하여 포착된 에어로졸화된 BSA 단백질의 단백질 블루 염색 결과를 보인 도표이다.

도 15a~15e는 예시적인 샘플 포착 요소로 처리되지 않은 SARS-CoV-2 바이러스 샘플의 배양 배지 내 고온의 산 소화 펩타이드의 MALDI TOF 질량 스펙트럼(도 15a), 예시적인 샘플 포착 요소에서 추출된 SARS-CoV-2 바이러스 입자의 고온의 산 소화 펩타이드의 피크 지정이 있는 MALDI TOF 질량 스펙트럼(도 15b), 예시적인 샘플 포착 요소에서 추출된 SARS-CoV-2 바이러스 입자의 상향식 단백질체학 분석을 사용하여 구성된 펩타이드 이온 강도 분포(도 15c), 예시적인 샘플 캡처 요소에서 추출된 2개의 바이러스 입자SARS-CoV-2 샘플의 상향식 단백질체학 분석을 사용하여 구성된 펩타이드 이온 강도의 분포(도 15d), 및 서로 다른 허용 누락 부위 절단 번호를 이용한 Mascot 데이터베이스 검색을 사용하여 예시적인 샘플 포착 요소에서 추출된 SARS-CoV-2 바이러스 입자의 펩타이드 질량 지문(도 15e)을 보인 도표이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 상기 도면들에서 참조를 위한 모든 도면부호, 지시선 및 설명선은 여기 상세히 설명된 것처럼 이러한 참조에 의해 통합된다. 도면의 일 요소에 부호를 매기지 않는다고 해서 권리를 포기하는 것은 아니다. 부호가 없는 참조는 도면과 청구항에서 문자로 식별할 수도 있다.

[0030] 하기의 상세한 설명은 발명의 상세한 설명의 일부를 형성하는 첨부 도면들에 대한 참조를 포함한다. 도면들은 예시로서 개시된 시스템 및 방법이 실시될 수 있는 특정 실시예들을 도시한다. "예시(example)" 또는 "선택(option)"으로서 이해되어야 하는 이들 실시예는 본 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 본 발명을 실시할 수 있도록 충분히 상세하게 설명된다. 본 발명의 범위를 벗어나지 않으면서, 실시예들이 결합될 수 있고, 다른 실시예들이 활용될 수 있거나, 구조적 또는 논리적인 변경이 이루어질 수 있다. 따라서, 하기의 상세한 설명은 제한적인 의미로 받아들여서는 안 되며 본 발명의 범위는 특허청구범위 및 그의 법적 등가물에 의해 정의된다.

[0031] 본 개시내용에서, 에어로졸은 일반적으로 공기 중 또는 기체 중에 분산된 입자의 현탁액(suspension)을 의미한다. "자율적(autonomous)" 진단 시스템 및 방법은 "의료 전문가의 개입없이 또는 최소한의 개입없이" 진단 테스트 결과를 생성하는 것을 의미한다. 미국 FDA는 의료 장치와 관련된 위험과 장치의 안전성과 유효성을 합리적으로 보장하는 규제의 양을 평가하여 의료 장치를 분류한다. 장치는 클래스 I, 클래스 II 또는 클래스 III의 3가지 규제 클래스 중의 하나로 분류된다. 클래스 I에는 가장 낮은 위험도가 있는 장치가 포함되고 클래스 III에는 가장 높은 위험도가 있는 장치가 포함된다. 모든 클래스의 장치들은 일반 통제(General Control) 대상이다. 일반 통제(General Control)는 모든 의료 장치에 적용되는 식품, 의약품 및 화장품 법(the Food, Drug and Cosmetic (FD&C) Act))의 기본 요건이다. 체외(in vitro) 진단 제품은 질병 또는 그 후유증을 치유(cure), 경감(mitigate), 치료(treat) 또는 예방(prevent)하기 위해 건강 상태 결정을 포함하여 질병 또는 기타 증상의 진단에 사용하기 위한 시약, 도구 및 시스템이다. 이러한 제품은 인체에서 채취한 표본의 수집, 준비 및 검사에 사용하기 위한 것이다. 여기에 공개된 예시적인 장치는 자율적으로 작동하고 높은 신뢰도의 결과를 생성할 수 있으며 결과적으로 클래스 I 장치로서 규제될 가능성이 있다. 결핵(TB) 감염률이 높은 일부 지역에서는 의료 훈련을 받은 직원에 대한 접근은 매우 제한적이다. 자율적 진단 시스템은 자율적이지 않은 시스템보다 선호된다.

[0032] 용어 "a" 또는 "an"은 하나 이상을 포함하는 데 사용되며, 용어 "또는"은 달리 표시되지 않는 한 비배타적인 "또는"을 나타내는 데 사용된다. 또한, 본 명세서에 사용된 어구 또는 용어는 달리 정의되지 않은 한 단지 설명을 위한 것이며 제한을 위한 것이 아님을 이해해야 한다. 본 개시에서 달리 명시되지 않는 한, 용어 "약"의 범위를 해석함에 있어서, 개시된 값(치수, 작동 조건 등)과 관련된 오차 범위는 본 개시내용에서 지시된 값의 ±10%이다. 백분율로 개시된 값과 관련된 오류 범위는 표시된 백분율의 ±1%이다. 특정 단어 앞에 사용되는 "실질적으로"라는 단어에는 "특정된 범위에서 상당한 수준" 및 "대부분이 특정되나 전체가 특정되는 것이 아닌"의 의미가 포함된다. 달리 명시하지 않는 한, 백분율로 표시된 화학물질, 용매 등의 농도는 부피-%를 의미한다.

[0033] 호흡 에어로졸 입자는 대사산물, 지질 및 단백질과 같은 다양한 비휘발성 유기 생체분자를 함유한다. 또한, 비휘발성 분자는 서브 마이크론 크기(sub-micron size)에서 약 10 마이크론 크기 범위의 넓은 입자 크기 분포를 갖는다. 호기로부터 다양한 입자 크기의 다양한 유형의 비휘발성 분자를 효율적으로 포착할 수 있는 호흡 수집 및 질병 진단 시스템과 방법이 필요하다. 본 발명의 특정 측면은 개시된 방법 및 시스템의 구성, 원리 및 작동을 설명하기 위한 목적으로 아래에 매우 상세하게 설명되어 있다. 그러나, 다양한 변형이 이루어질 수 있으며, 본 발명의 범위는 설명된 예시적인 측면에 제한되지 않는다.

[0034] 호기 분석("EBA")에 기반한 예시적인 진단 시스템(2000)(도 2)은 샘플 추출 시스템(2002) 및 분석 시스템(2003)과 유체적으로 연통되도록 배치된 호흡 샘플 수집 시스템(1000)을 포함할 수 있다.

[0035] 예시적인 호기 샘플 수집 시스템(1000)(도 1)은 매우 효율적인 흡착물질 상에 박테리아 및 바이러스를 포함하되 이에 국한되지 않는 비휘발성 유기체와, 작은 분자, 지질, 단백질을 포함하는 분자를 포함하는 호흡 에어로졸을 선택적으로 포착하기 위한 충전층 컬럼(packed bed column)을 포함하는 샘플 포착 요소(1001)를 포함할 수 있다. 트랩(1003)은 튜브(1002)을 사용하여 컬럼(1001)과 유체적으로 연통된다. 트랩(1003)은 유리 또는 플라스틱 재료로 만들어질 수 있다. 트랩(1003)은 아이스 배스(ice bath) 또는 기타 적절한 수단을 사용하여 주변 온도 이하로 냉각될 수 있다. 트랩(1003)은 호기 응축물(EBC)로서 수집 컬럼을 통과할 수 있는 수증기, 기타 휘발성(check) 및 비휘발성 분자를 수집하는 데 사용될 수 있다. 인공호흡기를 사용하여 환자의 호흡을 분석하는 동안 샘플 포착 요소(1001)는 인공호흡기의 인공호흡기 튜브에 있는 카프노그래피 포트(capnography port)에 제거 가능하게 연결되어 배출구 근처 또는 환자 폐의 배출구에 배치될 수 있다. 정상적으로 호흡하는 사람의 호흡 분석 동안, 요소(1001)는 환자에게 이전에 개시된 호흡 조작을 실행하거나 호흡하도록 지시하는 마우스피스(도시되지 않음)에 제거 가능하게 연결될 수 있다. 예를 들어, 포착 요소(1001)는 호흡 분석시에 환자가 착용하는 응

급 처치 CPR 구조용 마스크(예를 들어, Dixie USA EMS Supply Co.에서 공급하는 모델 번호)와 같은 호흡 수집 요소(1007)(도 1)의 하류측(출구측)에 제거 가능하게 연결될 수 있다. 호기의 제1 부분이 포착 요소(1001)로 향하고 제2 부분이 HEPA 필터(1009)를 향하도록 호기의 흐름을 분할하기 위해 호흡 수집 요소(1007)와 포착 요소(1001) 사이에 흐름 분할기(1008)가 배치될 수 있다. 흐름 분할기(1008)는 수집 요소(1007)에 일체로 구성될 수 있다. 또한, 호기 흐름이 포착 요소(1001)에 들어가기 전에 호기 흐름에서 큰 입자의 호흡 응축물(약 10㎛ 초과)를 제거하기 위해 포착 요소(1001)의 상류측에 대형 입자 트랩(1012)이 배치될 수 있다. 펌프(1006)가 포착 요소(1001)의 충전층 컬럼 측으로 호기를 흡인하는 데 사용될 수 있다. 예시적인 펌프(1006)는 휴대용 다이어프램 펌프(예를 들어, Parker Hannifin Corp., 부품 번호: D737-23-01)이다. 펌프(1006)로부터의 유량은 원하는 유량을 얻기 위해 니들 밸브(1005)를 사용하여 조정될 수 있다. 체크 밸브(일방 흐름 밸브)(1011)는 펌프(1006)와 포착 요소(1001) 사이에 배치될 수 있고, 펌프(1006)가 충전층 컬럼을 통해 호기를 흡인할 때만 개방 위치에 있도록 구성된다. 흐름이 없을 때, 밸브(1011)는 폐쇄 위치에 놓인다. 약 200㎖/min에서 600㎖/min 사이의 공칭 유량이 사용될 수 있다. 또한, 여러 개의 포착 요소(1001)를 병렬로 사용하여 유량을 최대 12L/min까지 증가시킬 수 있다. 또한, 하나 이상의 포착 요소가 수집 모드에 있을 때, 일부는 용출(溶出) 모드에 있을 수 있고, 일부는 대기 모드에 있을 수 있다. 호기 샘플량이 적절한지 결정하기 위해, CO_2 센서와 입자 계수기(도시되지 않음)가 호흡 수집 요소(1007)와 샘플 포착 요소(1001) 사이에 배치될 수 있다. CO_2 모니터링 및 입자 계수는 호기 공기량의 대략적인 비율을 허용한다. HEPA 필터는 또한 트랩(1003)의 하류측에 배치될 수 있다. 포착 요소(1001)는 비휘발성 유기물 입자의 수집 효율을 증가시키기 위해 주위 온도 이하로 온도를 낮추는 냉각 재킷 또는 다른 수단을 사용하여 냉각될 수 있다. 호흡 샘플 수집 시스템은 호기를 가습하고 충전층 컬럼의 습도를 높이기 위해 포착 요소 입구의 상류측에 배치되는 가습기(1010)를 추가로 포함할 수 있다.

[0036] 호흡 수집 요소(1007)는 개인의 얼굴에 씌우도록 구성된 밀착형 마스크를 포함할 수 있으며 스트랩 등을 사용하여 환자/개인의 얼굴/머리에 제거 가능하게 부착될 수 있다. 개인은 선택적인 격리 부스에 앉아 환자의 EBA를 검사실이나 구역의 주변 공기로부터 격리될 수 있다. 요소(1007)는 요소(1007)의 벽에 에어로졸 입자를 침착시키지 않고 전술한 바와 같이 펌프(1006)를 사용하여 환자의 입과 코를 통해 방출되는 호흡 에어로졸 입자를 수집하여 포착 요소(1001)로 보내는 데 사용될 수 있다. 요소(1007)는 이전 환자가 방출한 병원체에 환자가 오염되거나 감염될 위험을 막기 위하여 일회용으로 사용될 수 있다. 대안적으로, 요소(1007)는 재사용 가능할 수 있으며, 이 경우 멸균처리될 수 있다.

[0037] 포착 요소(1001)의 예시적인 충전층 컬럼은 Sigma Aldrich 및 기타 판매자가 공급하는 Hamilton PRP-C18 수지 비드를 포함할 수 있다. 이러한 충전층은 프릿 디스크(frit discs)와 같은 두 개의 다공성 필터 플레이트 사이에 고정될 수 있다. 예를 들어, 평균 기공 크기가 35㎛를 초과하는 폴리에틸렌 디스크는 충전층의 상류측에 배치될 수 있고, 평균 기공 크기가 10㎛인 폴리에틸렌 디스크(Boca Scientific, Dedham, MA)는 충전층의 하류측에 배치될 수 있다. 35㎛ 프릿 디스크는 더 빠른 공기 흐름 속도를 허용하는 반면 더 작은 10㎛ 프릿 디스크는 모든 C18 수지를 잘 포착한다. 예시적인 요소(1001)에서, 충전층은 약 12㎛ 내지 약 20㎛의 공칭 직경을 갖는 약 25㎎의 C18 수지 비드를 포함할 수 있다. 호기된 호흡의 비휘발성 유기 성분은 비드의 C18 작용기와 제거 가능하게 상호 작용하여 갇혀 있게 된다. 물, 휘발성 물질 및 기타 친수성 분자는 충전층을 통과하여 유리 트랩(1003)에 갇힐 수 있다.

[0038] C18 작용기 외에, 비휘발성 분자에 친화성을 나타내는 다른 작용기는 수지 비드와 같은 고체상 비드에 고정된 컬럼의 흡착제로 사용될 수 있다. 고체상 비드는 수지, 셀룰로오스, 실리카, 아가로스 및 수화된 Fe_3O_4 나노입자와 같은 폴리머 및 입자로 만들어질 수 있다. 흡착제 재료는 고체상 비드 상에 배치되는 옥타데실, 옥틸, 에틸, 사이클로헥실, 페닐, 시아노프로필, 아미노프로필, 2,3-다이하이드록시프로폭시프로필, 트라이메틸-아미노프로필, 카복시프로필, 벤젠설폰산 및 프로필설폰산을 포함하지만 이에 국한되지 않는 다른 작용기를 포함할 수 있다. 작용기는 또한 이온 교환 상, 중합체 상, 항체, 글리칸, 지질, DNA 및 RNA 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0039] 예시적인 진단 시스템(2000)(도 2)은 샘플 추출 시스템(2002) 및 분석 시스템(2003)과 유체적으로 연통되도록 배치된 호흡 샘플 수집 시스템(2001)을 포함할 수 있다. 샘플 수집 시스템(2001)은 앞서 언급된 예시적인 샘플 수집 시스템(1000)(도 1)을 포함할 수 있다. 샘플 추출 시스템(2002)은 시스템(1000)의 충전층 컬럼으로부터 포착된 비휘발성 유기물을 추출하는 데 사용될 수 있으며 시스템(2000)에서 인라인 또는 오프라인으로 배치될 수 있다. 시스템(2002)이 오프라인으로 배치될 때, 결론적으로 호기 샘플 수집의 경우, 포착 요소(1001)는 시스템(1000)에서 제거되고 추출 시스템(2002)에서 유기 용매로 용출되어 충전층 컬럼에서 비휘발성 유기물을 제거할 수 있다. 예시적인 유기 용매는 충전층 컬럼으로부터 포착된 비휘발성 유기물(강극성 비휘발성 유기 분자, 단백

질 등)을 추출하기 위해 물 중 약 50~70% 아세토니트릴을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 추출은 충전층으로부터 낮은 극성의 지질 분자를 추출하기 위해 물 중 50~70% 이소프로판올을 포함하지만 이에 국한되지 않는 동일하거나 다른 용매를 사용하여 반복될 수 있다. 다른 유기 용매에는 물 중 약 50% 내지 약 70%의 메탄올과 약 50% 클로로포름에 약 50%의 메탄올이 포함된다. 시스템(2002)이 인라인으로 배치될 때, CO_2 센서 및 입자 계수기 중 하나 이상이 추출 시스템(2002)의 상류측에 배치될 수 있다. 시스템(2002)은 용매 용기, 용매를 용매로부터 충전층 컬럼으로 전달하기 위한 펌프 및 비휘발성 바이오마커를 포함하는 용매를 다른 용기 또는 컵에 수집하기 위한 용기를 포함할 수 있다. 대안적으로, 시스템(2002)은 충전층 컬럼에 용매를 주입하고 비휘발성 유기물 및 바이오마커를 포함하는 추출 액체를 적합한 컵 또는 용기, 또는 작은 부피를 갖는 다른 실험실 튜브에 수집하기 위한 인젝터를 포함할 수 있다. 용매에 포착된 샘플은 분석 시스템(2003)에서 추가로 처리 및 분석될 수 있다.

[0040] 분석 시스템(2003)은 샘플 처리 시스템(2004)과 하나 이상의 진단 장치(2005)를 포함할 수 있다. 샘플 처리 시스템(2004)은 다음 단계 중 하나 이상을 수행하는 데 필요한 요소를 포함할 수 있다.

[0041] (a) 컵, 바이알 및 샘플 플레이트 중 하나 이상에 샘플을 배치하는 단계. 예를 들어, 시리즈 110A 스팟 시료 샘플러(Aerosol Devices)는 원형 웰 형상(75 μL 웰 부피) 또는 눈물방울 웰 형상(120 μL 웰 부피)의 32개 웰 플레이트(well plates)를 사용한다. 이 플레이트는 샘플을 농축하기 위해 가열되어 샘플 내 용매와 과잉 유체/액체를 증발시킨다;

[0042] (b) 샘플을 농축시켜 용매를 증발시키도록 샘플을 컵에 넣고 진공 소스 또는 동결 건조 장치에 노출시키는 단계; 그리고,

[0043] (c) 단백질 및 바이러스 입자를 고온 분해하는 단계.

[0044] 샘플을 원심분리하여 화학적 오염 입자를 제거할 수 있다. 게놈 기반 분석(예: PCR, rt-PCR 및 전체 게놈 서열분석), 바이오마커 인식 분석(예: ELISA)과, 질량 분석법(MS)과 같은 스펙트럼 분석을 포함하지만 이에 국한되지 않는 많은 진단 장치가 분석 시스템(2003)에서 사용하도록 적용될 수 있다. 이러한 진단 장치 중, MS는 분석 속도 때문에 선호되고 있다. 바이오마커 인식 분석용으로 선호되는 MS 기술은 전기분무 이온화(ESI) 및 매트릭스 보조 레이저 탈착 이온화(MALDI) 비행시간(time of flight) MS(TOFMS)이다. ESI는 고해상도 질량 분석기와 결합될 수 있다. MALDI-TOFMS 장치는 작고 가벼우며 100와트 미만의 전력을 소비하고 15분 이내에 샘플 분석을 제공할 수 있다. MALDI-TOFMS는 ACF에 적합한 현장 진단에 선호되는 진단 장치이다. 샘플은 MS의 진공 챔버에 삽입되고 자외선 레이저의 레이저 펄스를 받기 전에 건조되어야 한다. 샘플과 레이저 사이의 이러한 상호 작용은 생물학적 물질의 특징인 크고 유익한 생물학적 이온 클러스터를 생성한다. 농축된 샘플이 미량의 물 또는 물에 있는 아세토니트릴, 메탄올 및 이소프로판올 중 하나의 50% ~ 70%와 같은 미량 수준의 유기 용매로만 구성된 샘플 처리 시스템(2004)에 의해 제공되는 경우, MS를 사용한 샘플 분석은 물을 증발시키는 데 더 적은 시간이 필요하기 때문에 5분 미만(샘플 준비 포함)이 소요될 수 있다.

[0045] MALDI-TOFMS는 *B. anthracis* 포자(다중 균주), *Y. pestis*, *F. tularensis*, 베네수엘라 말 뇌염 바이러스(VEE), 서부 말 뇌척수염 바이러스(WEE), 동부 말 뇌염 바이러스(EEE), 보툴리눔 신경독소(BoNT), 포도상구균 장독소(SEA), 포도구균 장독소 B(SEB), 리신, 아브린, 에볼라 자이르 균주, 아플라톡신, 삭시톡신, 코노톡신, 장내세균 파지 T2(T2), HT-2 독소(HT2), 코브라 독소, *B. globigii* 포자, *B. cereus* 포자, *B. thuringiensis Al Hakam* 포자, *B. anthracis Sterne* 포자, *Y. enterocolitica, E. coli*를 포함한 생물위협 모의약물, MS2 바이러스, T2 바이러스, 아데노바이러스 및 NGA(비휘발성), 브래디키닌, 옥시토신, 물질 P, 앤지오텐신, 디아제팜, 코카인, 헤로인 및 펜타닐을 포함한 비휘발성 생화학적 위협물을 포함하는 생/활성제를 식별하는 데 사용될 수 있다. 또한, 본문에 개시된 예시적인 시스템과 방법은 인간의 호흡 샘플에서 SARS-CoV-2를 정확하게 검출하고 식별하는 데 사용될 수 있다.

[0046] "매트릭스 보조 레이저 탈착 이온화"(matrix assisted laser desorption ionization: MALDI)에서, 표적 입자(분석물)는 레이저로부터 빛(종종 자외선 파장)을 우선적으로 흡수하는 매트릭스 화학물질로 코팅된다. 매트릭스가 없으면 생물학적 분자는 질량 분석기에서 레이저 빔에 노출될 때 열분해로 분해된다. 매트릭스 화학 물질은 또한 기화된 분자에 전하를 전달하여 이온을 생성하고 이 이온은 전기장에 의해 비행 튜브(flight tube) 아래로 가속된다. 미생물학 및 단백질체학은 질량 분석법의 주요 응용 분야가 되었다. 예로는 박테리아 식별, 화학 구조 발견, 단백질 기능 도출 등이 있다. MALDI-MS는 조류의 지질 프로파일링에도 사용되었다. MALDI-MS 중에 일반적으로 트리플루오로아세트산(TFA)과 같은 산과 알파-시아노-4-하이드록시신남산과 같은 MALDI 매트릭스 화학 물질로 구성된 액체가 용매에 용해되어 샘플에 첨가된다. 용매는 아세토니트릴, 물, 에탄올, 아세톤을 포

함한다. TFA는 일반적으로 샘플의 질량 스펙트럼에 대한 염 불순물의 영향을 억제하기 위해 첨가된다. 물은 친수성 단백질을 용해시키고, 아세토니트릴은 소수성 단백질을 용해시킨다. MALDI 매트릭스 용액을 MALDI 플레이트의 시료에 점적하여 시료에 MALDI 매트릭스 물질의 균일하고 균질한 층을 생성한다. 용매는 기화되어 재결정화된 매트릭스만 남고 시료는 매트릭스 결정을 통해 확산된다. 산은 샘플의 세포막을 부분적으로 분해하여 단백질을 MS에서 이온화 및 분석할 수 있도록 한다. 기타 MALDI 매트릭스 물질은, 미국 특허 제8,409,870호에 기술된 바와 같이, 3,5-디메톡시-4-하이드록시신남산(시나핀산), α-시아노-4-하이드록시신남산(α-시아노 또는 α-매트릭스) 및 2,5-디하이드록시벤조산(DHB)이 포함한다.

[0047] 또한, 트랩(1003)(도 1)에 수집된 휘발성 유기 화합물은 히터를 사용하여 가열되어 휘발성 화합물을 GC-MS, GC-IMS, 휘발성 이온 크로마토그래피, 또는 휘발성 유기 화합물 분석에 적합한 기타 유형의 분석 방법을 이용하는 진단 장치 측으로 보낼 수 있다.

[0048] 바이러스(예: SARS-CoV-2) 검출은 바이러스 단백질 검출에 중점을 두고 있으며 이는 어려운 과제이다. 바이러스 검출을 위한 예시적인 방법은 배경 매트릭스(예를 들어, 다른 비바이러스 생체분자, 오염 물질)로부터 표적 바이러스를 유도하기 위한 글리칸 기반 포착 매트릭스(비드)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 샘플 수집 시스템(1000)을 사용하여 수집된 바이러스를 포함할 수 있고 다른 배경 오염 물질도 포함할 수 있는 샘플의 분취량은 포착 프로브(capture probe)를 갖는 비드에 적용될 수 있다. 글리칸, 헤파린 및 탄수화물 중 하나 이상은 수지 비드 또는 다른 유형의 비드에 결합된 포착 물질 또는 프로브로서 사용될 수 있다. 선택적인 세척 단계를 사용하여 비표적 바이러스 오염 물질을 제거할 수 있다. 농축되고 정제된 바이러스는 적합한 용매를 사용하여 포름산 또는 아세트산을 포함할 수 있는 유기산이 들어 있는 밀봉된 가열 챔버로 비드에서 용출될 수 있으며 약 10분 동안 120℃로 가열되어 단백질성 독소를 특정 펩타이드 단편으로 분해할 수 있다. 이 고온의 산성 단백질 분해 프로토콜은 아스파라긴산 잔기에서 단백질을 절단하여 재현성이 높은 펩타이드 패턴을 생성한다. 언급된 포착 및 소화 과정은 각각 항체와 효소를 사용하여 수행될 수 있다. MALDI-TOFMS에 대한 이러한 예시적인 샘플 처리를 이용하여 깨끗한 완충액에서 100ng/mL(S/N 약 50:1)보다 우수한 리신 바이오톡신에 대한 감도를 얻었다. 3:1의 S/N(신호 대 잡음비)에서 <10ng/mL의 검출 한계(limits of detection: LOD)를 달성할 수 있다. MALDI-TOFMS 분석 시스템에 사용되는 1μL 샘플의 경우 약 10ng/mL LOD는 프로브의 총 질량 약 10pg(10^{-12}g)에 해당하며 이는 약 20,000개의 바이러스 입자에 해당한다. 위에 개시된 방법을 구현하기 위한 예시적인 미세유체 샘플 처리 시스템은 공기 또는 비강 면봉과 같은 다른 소스로부터 수집된 샘플을 분석하도록 구성될 수 있다. 글리칸 기반의 포착 컬럼 및 기타 미세유체 구성요소는 재사용이 가능할 수 있다. 완충액, 약산 및 알코올을 포함하는 대형 유체 저장조를 사용하면 시스템의 한 채널에서 수백 개의 샘플을 측정할 수 있는 충분한 용량을 제공할 수 있다. 여러 시스템을 병렬로 실행하여 여러 샘플을 동시에 처리할 수 있다. 깨지기 쉽고 값비싼 생체분자 시약이 필요하지 않기 때문에 시스템은 비용 효율적이다.

[0049] 고온의 산 소화는 아스파르트산 잔기에서 단백질을 재생가능하게 절단하여 알려진 질량을 갖는 알려진 펩타이드 서열을 생성한다. 이러한 펩타이드 질량 분포는 전구 단백질의 특징이다. 따라서 관심 있는 단백질이 배경 물질로부터 크게 분리되는 경우 소화는 탁월한 특이성을 제공한다. 또한, 펩타이드 질량 분포는 번역 후 변형(post-translational modifications)을 고려하여 게놈에 의해 직접 결정된다. 새로운 바이러스가 분리되자마자 신속하게 서열이 이루어진다. SARS-CoV-2 바이러스의 RNA 서열은 현대 생물정보학 도구(ExPASy 생물정보학 포털)를 사용하여 단백질 서열을 정확하게 예측하는 데 사용될 수 있다. 그런 다음 이러한 단백질은 생물정보학 도구를 사용하여 실리코에서(*in silico*) "소화"되어 이론적인 펩타이드 지도를 생성할 수 있다. 따라서 SARS-COV-2 소화에서 발생하는 펩타이드를 예측하고 실험 데이터와 비교하여 유기체의 특정 MALDI TOFMS 시그니처를 생성할 수 있다. 보고서에 따르면 SARS-CoV의 주요 단백질은 약 46kDa 뉴클레오캡시드 단백질과 139kDa 스파이크 단백질이 특징이다. 합리적으로 풍부한 다른 단백질로는 E, M 및 N 단백질이 있다.

[0050] 표적 바이러스의 검출 특이성은 특히 배경에 다른 단백질이 포함되어 있는 경우 일정 수준의 배경 제거를 요구한다. 다량의 외인성 단백질이 존재하는 경우, 펩타이드 지도는 비표적 펩타이드에 의해 지배될 수 있다. 이전에 설명된 바와 같이, 글리칸으로 장식된 아가로스 비드를 기반으로 하는 바이러스 독소에 대한 친화력 포착 프로브를 사용하면 배경 단백질 및 기타 생체분자가 과량인 경우에도 독소를 쉽게 제거할 수 있다. SARS-CoV-2와 같은 바이러스 표적에 대한 호기를 분석할 때 호흡 내 다른 인간 단백질이 검출 특이성을 방해할 수 있다. 최고의 특이성을 보장하려면 샘플의 친화도 기반 정리가 필요하다. 바이러스 검출에는 앞서 설명한 글리칸 장식 비드에 비해 더 선택적 친화력을 제공하는 비드 재료가 필요할 수 있다. 예를 들어, 덱스트란 기반 흡착제는 코로나바이러스를 포함한 바이러스를 정제하는 데 사용될 수 있지만 이 수지의 표적 바이러스에 대한 친화력은 만족스럽지 않을 수 있다. 대안적으로, 탄수화물은 SARS-CoV 및 SARS-CoV-2와 같은 표적 바이러스를 포함한 바이러

스 및 단백질 정제에 사용될 수 있다. 추가로 헤파린 및 헤파란 설페이트가 수지 비드에 결합된 결합제로 사용될 수 있다. 세파로스 비드(GE Healthcare Life Sciences, Heparin Sepharose 6 Fast Flow 친화성 수지 제품 # 17099801)에 공유 결합된 헤파린을 글리칸 캡처 비드 대신 사용할 수 있다. 이 수지는 비드 기반 포착 친화성 포착 시스템이 호기에서 바이러스 입자를 수집할 수 있도록 한다. 예시적인 진단 시스템에서, 호기 샘플은 샘플 수집 시스템(1000)의 포착 베드(capture bed)를 통해 흡인되어 호흡에서 입자를 수집할 수 있다. 수지 비드(베드)를 세척하여 배경 물질을 제거할 수 있다. 이어서, 비드에 흡착된 바이러스 입자는 특징적인 펩타이드를 생성하기 위하여 약 12.5% 아세트산, 약 5% TFA, 약 5% 포름산 및 약 10% HCl 중 하나 이상과 같은 고농도의 산 용액을 사용하여 고온의 산 소화 챔버로 용출될 것이다. 펩타이드 샘플은 MALDI 매트릭스와 혼합되어 MALDI TOFMS 분석에 적합한 기질로 증착될 수 있다. 샘플은 MALDI 매트릭스로 사전 코팅된 적절한 기판이나 디스크에 증착될 수도 있다.

[0051] 도 3은 예시적인 시스템(2000)을 사용하는 예시적인 진단 방법(3000)의 개략도이다. 예시적인 방법(3000)은 호기에 기초하여 자율 현장 진단을 수행하는 데 사용될 수 있다. 단계 3001에서, 개인(또는 환자)에게 앉도록 지시할 수 있으며; 의자는 선택적으로 격리 부스에 위치할 수 있다. 단계 3002에서, 호흡 샘플 수집 요소(1007)는 개인의 머리에 제거 가능하게 장착될 수 있다. 그 다음, 개인은 미리 설정된 반복 횟수를 포함할 수 있는 하나 이상의 미리 결정된 조작(3003)을 수행하거나 호흡하도록 지시받는다. 호흡 중의 비휘발성 유기물은 시스템(1000)을 사용하여 포착되고 단계 3004에서 시스템(2002)을 사용하여 추출되며 적합한 용매를 사용하여 용출된다. 샘플을 수집하는 동안 사람의 호기는 흡인 펌프에 의해 흡인된 미리 정해진 유량으로 컬럼을 통과한다. 호기 내에 포함된 비휘발성 분자는 포착 요소(1001)의 기능화된 비드(예: 수지 비드에 고정된 C18 작용기)와 상호작용하기 때문에 이러한 분자는 요소(1001)의 컬럼 베드(column bed)에 갇히는 반면, 친수성 분자는 대부분 물과 컬럼을 통과하는 호흡내의 수성 전해질로 구성된다. 인간의 호흡에 존재하는 비휘발성 유기 분자는 수소 결합 및 비공유 상호 작용을 포함한 분자간 힘을 통해 알킬 사슬에 대한 강한 친화력을 보여준다. 컬럼 베드로부터의 비휘발성 분자의 용출은 전술한 바와 같이 아세토니트릴, 메탄올 및 이소프로판올을 포함하지만 이에 제한되지 않는 유기 용매를 사용하여 달성될 수 있다. 샘플은 구성요소(2004)를 사용하여 단계 3005에서 추가로 처리될 수 있다. 샘플 처리 유형은 진단 장치의 유형 및 관심 있는 비휘발성 분석물 입자에 따라 달라진다. 앞서 설명한 대로, 바이러스 샘플을 고온의 산 분해 챔버에 보내어 특징적인 펩타이드를 생성토록 할 수 있다. 펩타이드 샘플은 MALDI 매트릭스와 혼합되어 MALDI TOFMS 분석에 적합한 기질로 증착될 수 있다. 샘플은 MALDI 매트릭스로 사전 코팅된 적절한 기판이나 디스크에 증착될 수도 있다. 그런 다음 샘플은 단계 3006에서 진단 장치에 의해 분석된다. 진단 장치가 MALDI-TOFMS인 경우, 샘플 처리에는 샘플을 MALDI-TOFMS 샘플 디스크에 도포하는 단계, 디스크를 가열하여 샘플을 농축하는 단계, 그리고 디스크를 건조하는 단계를 포함한다. 그런 다음 샘플 디스크는 MALDI-TOFMS를 사용하여 분석된다. TOFMS 검출기는 이온 게이트와 반사체를 통합하여 MALDI-TOF/MS 중에 단편화되는 COVID-19 유형 바이러스 펩타이드를 분석하고 서열화할 수 있도록 수정될 수 있다. 얻은 스펙트럼은 특정 호흡기 감염에 대해 양성으로 알려진 샘플의 스펙트럼, 알려진 데이터베이스의 스펙트럼 및 건강한 것으로 알려진 환자의 샘플 스펙트럼과 비교되어 환자에 대한 진단이 이루어진다. 그 결과는 임상의나 환자에게 전달될 수 있다.

[0052] 호흡 수집 요소(1007)가 환자에게 부착되고 샘플 추출이 시작되면, 예시적인 시스템 및 방법은 바람직하게는 자율적일 수 있으며(필요한 조작을 수행한 후 환자에게 의자에서 일어나도록 요청하는 것을 제외하고) 진단의 테스트 결과를 생성한다. SARS-CoV-2와 같은 바이러스 입자의 경우 입자의 직경은 약 0.1 마이크론이고 민감도는 약 10^3~10^4개 바이러스 입자 사이일 수 있다.

[0053] 보고서에 따르면 인플루엔자 환자와 COVID-19 환자의 코와 목 면봉을 분석한 결과 약 10^3~10^{10}개의 바이러스 입자 범위의 바이러스 개수가 나타났다. 환자의 호흡에 포함된 바이러스 입자 수에 대해서는 알려진 바가 적다. 다른 보고서에 따르면 인플루엔자 환자는 약 30분 동안 호흡을 통해 10^4개 초과의 입자를 내뿜었다. SARS-CoV-2의 출력이 인플루엔자와 유사한 경우, 입자 수집 효율이 >99.9%인 호기 내 10^3~10^4개의 입자 출력이면 여기에 개시된 예시적인 방법 및 시스템을 사용하여 호기 내 표적 바이러스 입자를 식별하는 데 충분해야 한다. 예시적인 시스템과 방법을 사용한 탐지 시간은 샘플 추출(호흡 조작), 샘플 수집, 샘플 처리(소화) 및 MALDI TOF-MS를 사용한 분석 단계를 포함하여 약 10분에서 20분 사이일 수 있다. 이 탐지 시간은 기존 탐지 시스템에 비해 상당히 빠르다.

[0054] 예시적인 샘플 처리 구성 요소는 충전층 컬럼(1001)에서 샘플을 자동으로 추출하고, 샘플 세척을 수행하며, 고온 산 분해가 이루어지도록 하고, MALDI-TOFS 샘플 기판 또는 디스크에 플레이팅할 준비가 된 샘플을 제공하기

위한 고온의 산 분해 모듈 또는 카트리지를 포함할 수 있다. 카트리지는 사용하는 중간중간에 카트리지를 세척하는 기능을 추가하여 재사용이 가능하도록 설계될 수 있다.

[0055] 다른 예시적인 샘플 수집 시스템(7000)(도 4)에 개시되어 있다. 예시적인 샘플 포착 요소(7001)는 C18-결합 수지 비드를 포함하는 충전층 컬럼을 포함할 수 있다. 이 수지 비드는 표면에 고정된 C18 작용기를 갖는다. 캡처 요소(7001)는 약간의 수정을 통해 응급 처치 CPR 구조 마스크(7007)에 연결되거나 제거 가능하게 설치될 수 있다. 일반적으로 소생 백(resuscitation bag)에 연결되는 마스크(7007)의 스템(7008)은 HEPA 필터(7009)에 제거 가능하게 연결되도록 수정될 수 있다. HEPA 필터는 주변 공기의 오염물질에 의한 호기의 오염을 방지한다. 마스크의 산소 유입구(7010)는 일반적으로 스템 아래에 위치하며 인간 대상이 마스크를 착용할 때 대상의 턱에 근접하도록 구성되어 캡처 요소(7001)에 제거 가능하게 연결되도록 수정될 수 있다. 요소(7001)는 유입구(7010)을 통하여 제거 가능하게 삽입되거나 마스크(7007)로 실질적으로 누출되지 않게 밀착이 이루어지도록 마스크(7007)에 제거 가능하게 연결되거나 삽입될 수 있다. 마스크(7007)는 이러한 마스크를 환자의 얼굴에 밀봉되게 밀착되도록 환자의 머리 뒤로 감아 고정할 수 있는 탄성 밴드 또는 타이를 포함할 수 있다. 상기 언급된 바와 같이 구성된 마스크(7007)는 환자의 입과 요소(7001)의 컬럼 유입구 사이의 직접적인 접촉을 방지하고 타액에 의한 컬럼 유입구의 오염을 최소화 또는 제거하며 또한 호기로부터 비휘발성 유기 입자 수집을 최대화한다. 얼음물에 잠긴 트랩(7003)은 포착 요소(7001)의 뒤(하류측)에 설치될 수 있다. 펌프(7006)를 사용하는 유량(공기 흡입량)은 니들 밸브(7005)를 사용하여 약 600mL/min으로 흡인할 수 있도록 제어될 수 있다. 약 200㎖/min에서 600㎖/min 사이의 공칭 유량이 사용될 수 있다. 선택적인 HEPA 필터(7011)는 트랩(7003)과 니들 밸브(7005) 사이에 설치될 수 있다. 체크 밸브(도 1 참조)와 같은 다른 유체 구성 요소는 요소(7001)의 컬럼 베드 측으로 역류하는 것을 방지하기 위해 시스템(7000)에 설치될 수 있다. 호기 중의 CO_2 는 요소(7001)의 컬럼 베드를 통과한다. 호기 샘플량 및/또는 호흡 조작이 적절한지 결정하기 위해, CO_2 센서가 호흡 포착 요소(7001)의 유출구와 트랩(7003) 사이에 배치될 수 있다. CO_2 모니터링은 호기량의 비율의 근사치를 허용한다. 또한 입자 계수기는 요소(7001)의 유출구와 트랩(7003) 사이에 설치되어 컬럼 베드에서 나가는 입자의 크기와 수를 감지할 수 있으며, 이는 또한 베드의 포화 및 컬럼 베드에서 비휘발성 유기 분자의 누출을 감지하는 데 사용될 수도 있다. 예시적인 시스템(7000)은 또한 요소(7001)의 컬럼 베드로 경유하기 전에 호흡량의 표준화를 가능하게 하는 포착 요소(7001) 우회 라인(도시되지 않음)을 포함할 수 있다. CO_2 센서 및 입자 계수기도 우회 라인에 유체적으로 연결될 수 있다. 비휘발성 유기 분자를 포착하기 위해 포착 요소(7001)의 컬럼 베드에 작용기로 고정된 고체 비드의 용량은 약 0.05㎎(비휘발성 유기물)/㎎ 비드 내지 약 0.5㎎/㎎일 수 있다. 예시적인 포착 요소의 컬럼 베드 내 C18-결합 수지 비드의 용량은 약 0.1㎎/㎎일 수 있다. 즉, 25㎎의 C18 비드가 있는 컬럼 베드는 약 2.5㎎의 비휘발성 유기 분자를 포착하거나 흡착할 수 있는 능력을 갖는다.

[0056] C18 작용기 외에, 비휘발성 분자에 친화성을 나타내는 다른 작용기는 수지 비드와 같은 고체상 비드에 고정된 컬럼의 흡착제로 사용될 수 있다. 고체상 비드는 수지, 셀룰로오스, 실리카, 아가로스 및 수화된 Fe_3O_4 나노입자와 같은 폴리머 및 입자로 만들어질 수 있다. 흡착제 재료는 고체상 비드상에 배치되는 옥타데실, 옥틸, 에틸, 사이클로헥실, 페닐, 시아노프로필, 아미노프로필, 2,3-다이하이드록시프로폭시프로필, 트라이메틸-아미노프로필, 카복시프로필, 벤젠설폰산 및 프로필설폰산을 포함하지만 이에 국한되지 않는 다른 작용기를 포함할 수 있다. 작용기는 또한 이온 교환 상, 중합체 상, 항체, 글리칸, 지질, DNA 및 RNA 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0057] 본 명세서에 설명된 예시적인 시스템 및 방법은 진단 능력이 호흡기 감염에 반드시 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 폐암은 또한 바이오마커를 말초 폐액으로 방출할 수 있으며, 이러한 바이오마커는 개시된 시스템 및 방법에 의해 쉽게 검출될 것이다. 더욱이, 혈액은 폐의 폐포 내벽과 밀접하게 접촉하기 때문에 신체의 다른 부위(폐 이외)의 감염 및 암에 대한 바이오마커가 폐포 내벽을 가로질러 말초 폐액으로 옮겨질 수 있고, EBA 분석을 통해 검출할 수 있다. 결과적으로, 본 발명의 범위는 호흡기 질환의 검출 및 진단에 국한되지 않는다. 예시적인 시스템 및 방법은 리신(ricin)과 같은 에어로졸 화학 입자를 포착하고 입자를 분석하여 화학적 공격 위협을 방지하는 데 사용될 수 있다.

[0058] 본 명세서에 기술된 예시적인 시스템 및 방법에서, 샘플 포착 요소(1001)의 충전층 컬럼 길이(L)는 약 3㎜이다. 튜브의 공칭 내부 직경은 약 7㎜(D)이다. 약 12㎛ 내지 20㎛의 공칭 입자 직경(Dp)을 갖는 약 25㎎의 C18 수지 비드를 포함하는 예시적인 충전층은 약 350~580의 D/D_p 비율에서 약 150과 250 사이의 L/D_p 비율을 생성한다. 이들 컬럼 매개변수는 실질적으로 모든 수지 비드가 베드를 통과하는 에어로졸 흐름에 노출되는 것을 보장하기 위해 베드에서 바람직하지 않은 국부적인 흐름 분포를 방지하는 것으로 밝혀졌다.

[0059] 하나 이상의 호흡기 질환의 진단을 위해 주변 에어로졸 입자를 포착(또는 수집)하기 위한 예시적인 시스템 및 방법이 개시되어 있다. 예시적인 에어로졸 수집 시스템(900)(도 5)은 주변 에어로졸 방출 챔버(901), 바람직하게는 방출 챔버에 직접 유체적으로 제거 가능하게 연결된 샘플 포착 요소(902)를 포함할 수 있다. 포착 요소(902)는 에어로졸 내의 박테리아 및 바이러스 입자와 같은 비휘발성 유기 성분을 선택적으로 포착하기 위한 충전층을 포함한다. 펌프(903)는 샘플 포착 요소와 유체적으로 연통하도록 배치되고 샘플 포착 요소를 통해 에어로졸 흐름을 흡인하도록 구성되어 있다. 수집 시스템(900)의 입자 포집 효율은 주변 공기 중 대부분의 유기 입자 범위를 포괄하는 약 0.3㎛ ~ 약 10㎛ 범위의 입자 크기에 대해 약 99% 이상일 수 있다. 순수 바이러스 입자의 크기는 종종 100nm 정도로 매우 작지만, 주변 공기에서 수집된 바이러스 입자(예: COVID-19를 유발하는 SARS-CoV-2 바이러스)를 구성할 수 있는 호기 입자(호기 에어로졸, EBA)의 크기는 종종 약 100nm에서 약 5㎛ 정도 범위의 크기로 측정되었다. 또한, 에어로졸 질량의 상당 부분은 직경이 약 2㎛보다 큰 입자로 구성된다. 바이러스 입자는 일반적으로 물, 계면활성제, 단백질, 염분 및 기타 화학 물질을 포함하는 방수 폐액(aqueous lung fluids)에 부유된다. 입자 생성은 말할 때나 심호흡을 유발하는 기타 활동 중에 가장 높다. 이러한 입자는 숨을 내쉬면 일반적으로 수분 손실로 인해 수축된다. 이어서 예시적인 주변 에어로졸 수집 시스템(900)을 사용하여 포착할 때, 대부분의 EBA 덩어리는 약 1㎛ 내지 약 5㎛ 크기의 입자로 구성될 것으로 예상된다. 사용하기 전에, 충전층 컬럼은 약 70% 아세토니트릴(ACN)에 이어 약 0.05% 트리플루오로아세트산(TFA)으로 세척(또는 세정)될 수 있다. 약 400 μL의 70% 아세토니트릴 및 약 400 μL의 0.05% 트리플루오로아세트산(TFA)을 사용하여 약 25mg의 C18 비드를 포함하는 예시적인 컬럼을 세척할 수 있다. 추가로, 예시적인 컬럼은 70% ACN으로 1회 세척되고 0.05% TFA로 3회 세척될 수 있다. 예시적인 컬럼은 사용 전 촉촉한 상태 또는 젖은 상태로 유지된다. 약 25mg의 C18 비드를 포함하는 충전층 컬럼의 경우, 세척 단계 후 비드를 채우기 위해 약 100 μL의 0.05% TFA를 사용할 수 있으며 컬럼의 양쪽 끝은 바람직하게는 캡을 닫고 동결을 방지하기 위해 약 4℃에서 보관할 수 있다.

[0060] 또 다른 예시적인 측면에서, 복수의 충전층 컬럼은 컬럼 묶음으로, 예를 들어 샘플 수집 카트리지로 구성될 수 있다. 카트리지는 흐름이 펌프를 사용하여 카트리지를 통해 흡인될 때 에어로졸 샘플을 실질적으로 균일한 방식으로 복수의 충전층 컬럼으로 분배하기 위해 에어로졸 샘플 흐름과 유체적으로 연통하도록 배치된 적합한 유입구 분배 요소를 포함할 수 있다. 카트리지는 복수의 충전층 컬럼을 통해 에어로졸 샘플을 흡인하기 위해 펌프와 유체적으로 연통하도록 배치된 적합한 유출구 분배 요소를 포함할 수 있다. 예시적인 샘플 수집 카트리지는 실내 공기에 존재하는 호기 에어로졸의 높은 공기 유량(예: 약 200L/min 내지 약 500L/min)을 위한 방법 및 장치를 사용하여 에어로졸 샘플을 포착하는 데 사용될 수 있다. 이러한 방법과 장치는 일반적으로 소유된 미국 가특허출원 제17/586679호 "신속한 현장 분석을 위한 고유량 에어로졸 포착을 이용하는 호흡기 질환 감시 시스템 및 방법"(이의 개시내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에서 언급한 바와 같이 MALDI-TOFMS와 결합될 수 있으며, 주변 공기 샘플로부터 COVID-19와 같은 질병의 활성 사례 찾기(Active Case Finding; ACF)에 적합한 고감도 및 특정 현장 게놈 분석과 결합될 수 있다. 대안적으로, 하나 이상의 충전층 컬럼 또는 포착 요소를 포함하는 예시적인 샘플 수집 시스템은 호흡 에어로졸 내의 비휘발성 입자를 각각의 컬럼 또는 포착 요소로 선택적으로 포착하기 위해 서로 평행하게 배치될 수 있다. 각각의 충전층 컬럼은 약 200mg의 C18 수지 비드를 포함할 수 있다. 각각의 충전층 컬럼을 통해 필요한 유량을 제공하기 위해 포착 요소의 하류측에 위치하는 하나 이상의 적합한 펌프를 선택할 수 있다. 약 20L/분의 예시적 유량으로 에어로졸 샘플을 각 컬럼을 통해 흡인하여 각 베드에서 약 10wt.-%(20mg 비휘발성 입자/200mg의 C18 비드)의 포착 용량을 실현할 수 있다. 서로 평행하게 배열된 4개의 베드를 포함하는 샘플 포착 요소는 4개의 베드를 통해 약 80L/min의 총 유량을 제공할 수 있다. 샘플 포착 요소를 통과하는 원하는 에어로졸 샘플의 유량을 실현하기 위해 베드의 수를 확장하거나 축소할 수 있다. 예를 들어, 10개의 예시적인 충전층 컬럼은 번들 또는 카트리지에서 서로 평행하게 배치되어 카트리지를 통해 약 200L/min의 에어로졸 샘플을 처리할 수 있다. 각 베드의 C18 비드 양을 줄여 베드 길이를 줄이고 각 베드를 통한 압력 강하를 줄임으로써 각 베드를 통한 유량을 높일 수 있다.

[0061] 앞서 설명된 바와 같이, 호흡 중의 비휘발성 유기 에어로졸 입자를 포함하는 에어로졸 샘플의 공급원은 개인의 얼굴을 수용하도록 구성된 CPAP 마스크와 같은 호흡 수집 요소를 사용하여 수집된 호기 샘플을 포함할 수 있다. 호기 내 에어로졸 입자는 비휘발성 호기 입자를 포착하기 위해 C18 비드를 포함하는 충전층 컬럼을 통해 당겨질 수 있다. 충전층 컬럼을 포함하는 예시적인 샘플 포착 요소는 또한 표적 지역의 주변 공기에서 발견된 호기로부터, 예를 들어 병원 대기실 또는 대기실의 주변 공기 중의 호기로부터 비휘발성 유기 입자를 포착하는데 사용될 수 있다. 진료소, 구급차, 수술실, 중환자실 등. 예를 들어 병원 수술실과 같은 실내에 존재하는 주변 공기 중의 비휘발성 유기 입자를 수집하기 위한 예시적인 에어로졸 수집 시스템(1400)(도 10)이 개시되어 있다. 비휘발성 입자는 주위 공기에 분산된 호흡 에어로졸 입자를 포함할 수 있고 호흡기 질환의 특징인 미생물, 바이러스, 대사산물 바이오마커, 지질 바이오마커 및 단백질체 바이오마커 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 시스템(1400)

은 주변 공기가 적합한 펌프(1406)를 사용하여 하나 이상의 요소(1407)를 통해 흡인(또는 끌어당겨질)될 때 비휘발성 입자를 선택적으로 포착하기 위해 C18 수지 비드의 충전층 컬럼을 포함하는 하나 이상의 샘플 포착 요소(1407)를 포함할 수 있다. 포착 요소(1407)는 유입구 단부(1408) 및 유출구 단부(1409)에서 빠른 연결/분리 커플링 또는 피팅(fittings)을 사용하여 엔클로저(1401)에 제거 가능하게 배치될 수 있다. 예시적인 빠른 연결/분리 커플링은 McMaster-Carr(Cleveland, OH)에 의해 공급되는 플러그 및 소켓 피팅(래치 잠금 소켓, 트위스트 잠금 소켓, 등)을 포함한다. 펌프(1406)는 인클로저(1401) 내부에 배치될 수 있고 전원 공급 장치(1402)로부터의 전력을 사용하여 구동될 수 있다. 인클로저(1401)의 커플링 및 매칭 피팅은 적절한 기계적 및 전기적 연결/접촉을 감지하고 예를 들어 인클로저(1401)에 배치된 그래픽 사용자 인터페이스나 청각적 경보 등을 통해 사용자에게 경고하기 위한 전기 접점을 포함할 수 있다. 대안적으로, 펌프(1406)는 인클로저(1401) 외부에 배치될 수 있고 외부 전원에 의해 구동되는 병실 흡입 기계 또는 펌프를 포함할 수 있다. 에어로졸 수집 시스템(1400)은 충전층 컬럼의 습도를 약 95% RH로 증가시키기 위해 포착 요소(1407)에 들어가기 전에 주위 공기를 가습하는 분무기 요소(1404)를 추가로 포함할 수 있으며, 이는 결과적으로 요소(1407)의 입자 포착 효율을 증가시킬 수 있다. 분무기(1404)는 물을 미세한 스프레이 또는 미스트로 변환하는 분무기 또는 가습기의 형태일 수 있다. 용기(1405)에 저장된 물은 펌프(1403)를 사용하여 요소(1404)에 공급될 수 있다. 전원 공급 장치(1402)는 작동 펌프(1403) 및 분무기(1404)에 전력을 공급할 수 있다. 예시적인 분무기는 Aeroneb lab 마이크로펌프 분무기 및 제어 모듈(Aerogen, Ireland)이다. 예시적인 펌프에는 다이어프램 펌프와 연동 펌프가 포함된다. 포착 요소(1407)의 직경은 약 10㎜ 내지 약 20㎜일 수 있다. 포착 요소(1407)의 내부 직경은 약 16㎜일 수 있다. 충전층은 약 75㎛ 내지 약 150㎛의 공칭 입자 직경을 갖는 C18 수지 비드를 포함할 수 있다. 각각의 포착 요소의 베드 중량은 약 200㎎일 수 있고 베드 길이는 약 3㎜ 내지 약 5㎜일 수 있다. C18 입자는 상류측의 다공성 중합체 프릿 디스크와 하류측의 다공성 중합체 프릿 디스크 사이에 채워질 수 있다. 상류 및 하류 디스크의 기공 크기는 각각 약 90㎛ 및 35㎛일 수 있다. 예시적인 인클로저(1401)의 치수는 약 11인치×11인치×5인치(L×H×D)일 수 있다. 실시예 8에 설명되는 바와 같이, 시스템(1400)의 포착 요소(1407)를 사용하여 주변 공기 입자의 99.8% 이상이 포집되었으며, 이는 시간당 약 $2x10^6$의 높은 가스 시간당 공간 속도에서도 입자 포착 효율이 99% 이상임을 시사한다. 대안적으로, 물 펌프(1403), 펌프(1406), 전원 공급 장치(1402), 분무기(1404) 및 물 용기(1405)는 인클로저(1401)의 외부, 예를 들어 인클로저(1401)의 크기를 줄이기 위해 별도의 인클로저 또는 서브시스템에 배치될 수 있는바, 이는 인클로저(1401)가 본질적으로 소음이 없도록 할 것이다. 이 예시적인 측면에서, 인클로저(1401)는 하나 이상의 샘플 포착 요소(1407)를 포함할 수 있고 병원 수술실에서 환자 근처에 배치될 수 있다.

[0062] 실내에 존재하는 주변 공기 중의 비휘발성 유기 입자를 수집하기 위한 또 다른 예시적인 에어로졸 수집 시스템(1400A)(도 12a~12d)에서, 물 펌프(1403), 물 용기(1405), 전력 모듈(1402) 및 공기 펌프(1406)(미도시)는 유체 모듈(1410)에 배치된다. 물 용기(1405)는 약 1.3 리터의 물 용량을 가질 수 있다. 모듈(1410)은 펠리컨 케이스(pelican case) 또는 휴대 가능하거나 쉽게 이동할 수 있는 기타 적절한 인클로저일 수 있다. 입력 전원은 케이블(1411)을 통해 공급될 수 있으며, 케이블은 벽 전기 콘센트(120 VAC)에 제거 가능하게 연결될 수 있다. 모듈(1410)은 또한 온/오프 전원 스위치(1412)를 포함할 수 있다. 모듈(1410)은 적합한 유연한 튜브를 사용하여 샘플 수집 모듈(1413)과 유체적으로 연통하도록 구성된다. 모듈(1410, 1413)은 서로 가까이 배치될 수도 있고, 서로 떨어져 배치될 수도 있다. 예를 들어, 모듈(1413)은 병원의 수술실(OR) 내부에 배치될 수 있는 반면, 유체 모듈은 모듈(1410) 내부의 펌프에 의해 발생되는 소음을 최소화하기 위해 수술실 외부에 또는 일정 거리에 배치될 수 있다. 용기(1405) 내의 물은 펌프(1403)를 사용하여 저장조(1414)로 이송될 수 있다. 저장조(1414)는 미리 결정된 양의 물을 보유하도록 구성될 수 있으며, 과잉 물은 용기(1405) 측으로 다시 넘어간다. 분무기(1404)는 저장조(1414)의 출구 근처에 배치될 수 있다. 분무기(1404)는 3.7-12 VDC 전원 공급 장치 또는 배터리로 구동되는 초음파 미스트 분무기(예: DHTS 제조)일 수 있다. 분무기는 수집 모듈(1413)에 배치된 전원 공급 장치에 의해 에너지를 공급받을 수 있다. 분무기(1404)는 직경이 20㎜일 수 있으며 약 113㎑에서 작동할 수 있다. 분무기(1404)에 의해 생성된 물 미스트(water mist)는 도관(1415)을 통해 매니폴드(1416)로 보내질 수 있다. 매니폴드(1416)는 제2 매니폴드(1419)의 공기 샘플 유입구 포트(1418)에 근접하게 배치된 복수의 유출구 포트(1417)를 포함할 수 있다. 매니폴드(1419)는 유입구 포트(1418)와 유체적으로 연통하는 복수의 샘플 포착 요소(1407)을 지원할 수 있다. 예시적인 샘플 요소(1407)에 관련된 세부사항은 이전에 설명되었다. 샘플 수집 동안, 물 미스트가 지속적으로 생성되어 포트(1417)을 통해 배출되어 공기 펌프(1406)를 사용하여 포트(1418)를 통해 수집 요소(1407)로 유입된 주변 공기를 가습한다(도 10). 수집 모듈(1413)의 미스트로부터 응축된 임의의 물(샘플 포착 요소에서 나오는 응축수)은 수집 모듈(1413) 아래에 적절하게 배치된 저장조(1420)로 수집된다.

[0063] 주변 공기가 약 20L/min의 유량으로 펌프(1406)를 사용하여 각 포착 요소로 흡입됨에 따라 각 포착 요소(1407)의 충전층은 샘플 수집 중에 촉촉하게 유지된다. 펌프(1403)는 약 1.3㎖/min의 유량으로 저장조(1414)에 물을

공급할 수 있다. 물의 유량은 약 1㎖/min와 약 2㎖/min 사이일 수 있다. 이 유량에서 약 1.3 리터의 시작 물의 양을 이용하여 유체 모듈(1410)은 약 16시간 동안 포착 요소(1407)에 물 미스트를 공급할 수 있다. 샘플 수집 후, 포착 요소는 수집 모듈(1413)에서 제거되고 적합한 유기 용매를 사용하여 에어로졸 입자 추출을 위해 제거된다. 유기 용매는 아세토니트릴(ACN), 메탄올 및 이소프로판올(IPA) 중 하나 이상을 포함할 수 있고, 나머지는 물이다. 용매는 작은 대사물질 및 단백질과 같은 극성 입자를 베드로부터 용출시키기 위해 물에 약 50부피% 내지 약 70부피%의 아세토니트릴을 포함할 수 있다. 또 다른 용매는 베드로부터 지질과 같은 비극성 입자를 용출시키기 위해 물에 약 50부피% 내지 약 70부피%의 이소프로판올을 포함할 수 있다. 포착 요소(1407)의 직경은 약 10㎜ 내지 약 20㎜일 수 있다. 포착 요소(1407)의 내부 직경은 약 16㎜일 수 있다. 충전층은 약 75㎛ 내지 약 150㎛의 공칭 입자 직경을 갖는 C18 수지 비드를 포함할 수 있다. 각각의 포착 요소의 베드 중량은 약 200㎎일 수 있고 베드 길이는 약 3㎜ 내지 약 5㎜일 수 있다. C18 입자는 상류측 다공성 중합체 프릿 디스크와 하류측 다공성 중합체 프릿 디스크 사이에 채워질 수 있다. 상류측 및 하류측 디스크의 기공 크기는 각각 약 90㎛ 및 35㎛일 수 있다. 에어로졸화된 바이러스 입자를 포착하기 위해, 예시적인 샘플 포착 요소(1001, 7001, 1301, 902, 1407)는 황산 에스테르 고정화된 셀룰로스 비드를 포함할 수 있다. 대안적으로, 샘플 수집 모듈(1413)에서, 하나 이상의 포착 요소는 C18 비드의 충전층을 포함할 수 있고, 하나 이상의 포착 요소(1407)는 황산 에스테르 고정화 셀룰로오스 비드의 충전층을 포함할 수 있다. 대안적으로, 샘플 수집 모듈(1413)에서, 하나 이상의 포착 요소는 C18 비드와 황산 에스테르 고정화 셀룰로오스 비드의 혼합물로 구성된 충전층을 포함할 수 있다. 예시적인 설페이트 비드는 셀루파인 설페이트 비드(JKC Corp., Japan)를 포함할 수 있다. 입자 직경은 약 40㎛와 약 130㎛ 사이일 수 있다. 예시적인 샘플 포착 요소는 충전층 컬럼으로 배치된 약 100 ㎎의 황산 에스테르 고정화 셀룰로스 비드를 포함할 수 있다. 예시적인 샘플 포착 요소는 약 6.8㎜의 내부 직경과 약 30㎜의 길이를 가질 수 있다.

[0064] 시스템(1400 또는 1400A)을 사용하는 예시적인 에어로졸 샘플 수집 방법에서, 샘플 포착 요소(1407)는 수집 모듈(1413)의 포트(1421)에 삽입된다. 물 펌프(1403) 및 분무기(1404)는 전원이 공급되어 포트(1418)를 통해 각 샘플 포착 요소(1407)로 유입되는 주변 공기를 가습하기 위해 물 미스트를 생성한다. 이어서, 미리 결정된 샘플링 시간 동안 펌프(1406)를 사용하여 주변 공기 샘플을 각 샘플 포착 요소(1407)로 흡인한다. 샘플링 시간은 병원 수술실에서의 수술 기간을 포괄하도록 다양할 수 있다. 경우에 따라 샘플링 시간은 약 8시간이 될 수 있다. 이어서, 각각의 포착 요소(1407)는 인클로저(1401)로부터 제거되고 유기 용매로 세척되어 각 요소(1407)의 충전층으로부터 포착된 비휘발성 유기물을 용출시킨다. 이전에 기술된 바와 같이, 유기 용매는 아세토니트릴(ACN), 메탄올, 이소프로판올(IPA), 나머지는 물이다. 용매는 작은 대사물질 및 단백질과 같은 극성 입자를 베드로부터 용출시키기 위해 물에 약 50부피% 내지 약 70부피%의 아세토니트릴을 포함할 수 있다. 또 다른 용매는 베드로부터 지질과 같은 비극성 입자를 용출시키기 위해 물에 약 50부피% 내지 약 70부피%의 이소프로판올을 포함할 수 있다. 베드는 먼저 물에 녹인 ACN으로 세척한 다음 물에 녹인 IPA로 세척할 수 있다. 이어서, 입자는 동결건조를 사용하여 농축되고 PCR, ELISA, rt-PCR, 질량 분석기(MS), MALDI-MS, ESI-MS 및 MALDI-TOFMS 중 적어도 하나를 포함하는 진단 장치를 사용하여 분석될 수 있다. 추출된 입자는 예를 들어 바이러스 입자로부터 특징적인 펩타이드를 생성하기 위해 고온 소화 단계를 거칠 수도 있다.

[0065] 인공호흡기(1305)와 유체적으로 연통하는 충전층 컬럼을 포함하는 예시적인 샘플 포착 요소(1301)를 배치함으로써 호기 에어로졸을 포착하기 위한 예시적인 시스템(1300)(도 9A) 및 방법이 개시되어 있다. 인공호흡기(1305)는 생명 유지 기계이고 스스로 숨을 쉴 수 없는 환자를 위한 집중 치료 장치에 사용된다. 예를 들어, COVID-19의 심각한 증상이 있는 환자는 호흡을 위해 인공호흡기의 도움이 필요할 수 있다. 튜브(1306)가 환자의 입이나 코를 통해 기관으로 직접 삽입된다. 인공호흡기는 이 튜브를 통해 공기를 폐로 밀어넣고 환자가 숨을 들이마시도록 한다. 인공호흡기는 일반적으로 1초 동안 공기를 흡입하고 환자가 동일한 튜브를 통해 숨을 내쉴 수 있도록 약 3초 동안 멈춘 다음 이 주기를 반복한다. 포착 요소(1301)의 유입구 단부(1302)는 제거 가능하게 연결되고 바람직하게는 인공호흡기의 호기 공기 튜브에 직접 연결되어 입자 손실을 최소화한다. 유출구 단부(1303)는 약 200 ㎖/min 내지 약 2.5 L/min의 유량으로 요소(1301)의 충전층 컬럼을 통해 호기된 공기를 흡인하기 위해 튜브를 사용하여 펌프(1304)에 제거 가능하게 연결된다. 시스템(7000)(도 7)에서와 같이, 시스템(1300)은 임의의 응축물을 수집하기 위해 단부(1303)와 펌프(1304) 사이에 배치되는 트랩을 포함할 수 있다. 트랩은 주변 온도보다 낮은 온도로 냉각될 수 있다. 선택적인 HEPA 필터와 니들 밸브 또는 유량계를 트랩과 펌프 사이에 설치할 수 있다. 내쉬는 숨 속의 CO_2는 충전층 컬럼을 통과한다. 호기 샘플량이 적절한지 결정하기 위해 CO_2 센서가 유출구 단부(1303)와 트랩 사이에 배치될 수 있다. CO_2 모니터링을 통해 호기된 공기량을 대략적으로 계산할 수 있다. 입자 계수기는 또한 충전층 컬럼에서 나가는 입자의 크기와 수를 감지하기 위해 유출구 단부(1303)와

트랩 사이에 설치될 수 있으며, 이는 또한 베드의 포화와 컬럼 베드로부터 비휘발성 유기 분자(박테리아 및 바이러스 입자)의 누출을 감지하는 데 사용될 수도 있다. 컬럼 베드에서, 비휘발성 유기 분자를 포착하는 요소(1301)의 C18 비드의 용량은 약 0.05㎎(비휘발성 유기물)/㎎ 비드와 약 0.5㎎/㎎ 사이일 수 있다. 예시적인 포착 요소의 컬럼 베드 내 C18-결합 수지 비드의 용량은 약 0.1㎎/㎎일 수 있다. 즉, 25㎎의 C18 비드를 갖는 컬럼 베드는 약 2.5㎎의 비휘발성 유기 분자를 포착하거나 흡착하는 능력을 특징으로 할 것으로 예상된다. 펌프(1304)는 다이어프램 펌프일 수 있다. CO_2 센서의 데이터는 휴대용 기기에 일반적으로 사용되는 SD 카드와 같은 비휘발성 메모리 카드에 기록될 수 있다. C18 충전층 컬럼을 통한 유량을 모니터링하기 위해 유량 센서를 설치할 수 있다. 대안적으로, 충전층 컬럼을 통한 일관된 유량, 예를 들어 500 mL/min의 유량을 달성하기 위해 흐름 제어기를 사용할 수 있다. 예시적인 포착 요소(1301)를 사용하여 병원 집중 치료실에 배치된 인공호흡기로부터 호기 에어로졸 샘플링을 가능하게 하기 위해, 펌프(1304)는 CO_2 센서(1311), 관련 전원 공급 장치(1307), 시스템 제어 구성 요소와, 필요한 유체 구성 요소(튜브, 신속 연결/분리 커플링 등)와 함께 휴대용 시스템(1313)에 패키지 형태로 일괄구성될 수 있다(도 9b). 포착 요소(1301)는 신속 연결/분리 커플링을 포함할 수 있는 포트(1314)를 통해 시스템(1313)(도 9b)과 유체적으로 연통하도록 배치될 수 있다. 펌프(1304)를 사용하여 포착 요소(1301)에서 나가는 호기 공기의 일부는 CO_2 센서(1311)와 유체적으로 연결되는 저장조(1312)로 보내질 수 있다. 저장조(1312)는 잘 밀봉된 용기일 수 있으며 CO_2 센서로부터의 공기 누출을 방지하는 데 사용된다. 시스템(1313)은 요소(1301)를 사용하여 호기의 샘플링을 시작하고 중지하기 위한 사용자 인터페이스 및 온-오프 스위치를 포함할 수 있다. 추가적으로, 흐름 제어기 및 흐름 제한기(1309)와 같은 구성요소도 휴대용 시스템(1313)에 패키지 형태로 일괄구성될 수 있다. 펌프(1304)는 다이어프램 펌프일 수 있다. 휴대용 시스템(1313)은 11인치×7.5인치×5.5인치(L×D×H)일 수 있으며 펌프로 인해 발생하는 소음 수준을 45dB 미만으로 줄이기 위해 폼 패드(foam pads)와 같은 소음 제거 재료를 포함할 수 있다. 미리 결정된 샘플 수집 기간 후, 샘플 포착 요소(1301)는 시스템(1300)에서 제거될 수 있다. 그런 다음 요소(1301)는 포착된 에어로졸 입자를 추출하기 전에 요소(1301)를 소독하기 위해 약 10분 동안 110℃에서 고압멸균될 수 있다. 포착된 비휘발성 에어로졸 입자는 70% 아세토니트릴(ACN), 약 50% 내지 약 70% 메탄올과, 약 50% 내지 약 70% 이소프로필 알코올(IPA) 중 하나 이상을 포함하는 약 200㎕ 내지 약 400㎕의 용매로 컬럼을 세정(또는 세척)함으로써 추출될 수 있다. 예를 들어, 50% ACN 플러시(flush)를 사용하여 1단계 플러시에서 대사산물과 단백질을 용출한 다음 70% IPA 플러시를 사용하여 충전층 컬럼에서 지질을 용출할 수 있다. 포착된 바이오에어로졸 입자를 보존하기 위해 필요한 경우 하룻밤 동안 동결건조에 의해 충전층 컬럼으로부터 유기 용매를 제거할 수 있다. 유기 용매는 약 70℃에서 약 30분 동안 히팅 블록(heating block) 위에서 배양하여 제거할 수도 있다. 마지막으로, 베드는 약 0.05% TFA로 세척될 수 있다. 대사산물, 단백질 및 지질 분석을 위한 분석 방법에는 단백질 프로파일링을 위한 은 염색(silver staining), 단백질 함량에 대한 단백질 분석, 상향식 단백질체학 및 대사체학 및 지질-오믹스를 위한 LC-MS/MS, 분자 프로파일링을 d위한 MALDI-TOF 질량 분석법이 포함될 수 있다. 예시적인 테스트에서, 폐렴에 감염된 환자로부터 호기 에어로졸이 인공호흡기에 연결된 포착 요소(1301)를 사용하여 수집되었다. 후속 분석에서 단백질 분석을 사용하여 측정된 단백질 함량과 MALDI-TOF MS를 사용하여 측정된 분자 프로파일링은 수집된 총 호기 공기량, 호기 공기 중 CO_2 함량, 단백질 함량, MALDI-TOF 총 이온 강도 및 MALDI-TOF MS 단일 피크(4820m/z) 강도의 변수를 포함하는 피어슨 상관 히트맵(Pearson's correlation heatmap)에 의해 밝혀진 바와 같이 환자의 폐렴 감염에 대한 좋은 지표인 것으로 나타났다.

[0066] 본 명세서에서 이전에 설명된 바와 같이, 샘플 포착 요소(902)(도 5)의 충전층 컬럼은 Sigma Aldrich 및 기타 판매자가 공급하는 Hamilton PRP-C18 수지 비드를 포함할 수 있다. 수지 비드는 약 12㎛와 약 20㎛ 사이의 공칭 직경을 갖는 것이 특징이다. C18 비드의 공칭 직경은 약 20㎛인 것이 바람직하다. 충전층은 프릿 디스크와 같은 두 개의 다공성 필터 플레이트 사이에 고정될 수 있다. 예를 들어, 평균 기공 크기가 35㎛를 초과하는 폴리에틸렌 디스크를 베드 상류측에 배치할 수 있고, 평균 기공 크기가 10㎛인 폴리에틸렌 디스크(Boca Scientific, Dedham, MA)를 베드 하류측에 배치할 수 있다. 35㎛ 프릿 디스크는 베드를 통과하는 더 높은 공기 유량을 허용하고 베드를 통한 바람직하지 않은 압력 강하를 최소화하는 반면, 더 작은 10㎛ 프릿 디스크는 C18 수지 비드가 컬럼에서 빠져나가는 것을 막아준다. 충전층은 약 25㎎의 C18 수지 비드를 포함할 수 있다. 호기 내 박테리아 및 바이러스 입자를 포함한 비휘발성 유기 성분은 비드의 C18 작용기와 제거 가능하게 상호 작용하여 갇히게 된다. 물, 휘발성 유기 분자 및 기타 친수성 분자는 베드를 통과하여 샘플 포착 요소(902)와 펌프(903) 사이에 배치된 적절한 트랩(904)에 갇힐 수 있다. 트랩(904)은 주변 온도 미만으로 냉각될 수 있다. 샘플 포착 요소(902)는 주변 온도 또는 주변 온도 이하의 온도로 냉각될 수 있다. 휴대용 레이저 입자 계수기(MetOne Instruments, Grants Pass, OR)(905)는 포착 요소(902)에 의해 포착되지 않은 임의의 입자의 입자 수 및 입자

크기를 측정하기 위해 포착 요소(902)의 하류측에 설치될 수 있다. 입자 수 및 입자 크기 데이터는 입자 크기의 함수로서 요소(902)의 포착 효율을 추정하는 데 사용된다. C18 수지 비드는 비드의 탄소 사슬과 바이러스 및 미생물 표면에 존재하는 유기 분자 사이에 표면 친화성을 제공한다. 예를 들어, 박테리아의 세포 표면은 다양한 구조의 글리칸으로 구성되고, 또한 왁스 같은 마이콜산은 *M. tuberculosis*의 표면을 코팅한다. 이러한 유기 분자는 일반적으로 소수성이며 충전층에 있는 C18 비드의 알킬 사슬에 상당한 친화성을 나타낸다. 또한 화학적 특성에 있어서 충전층 컬럼의 입자 크기와 층 길이도 물리적 흡착에 의한 입자 포착이 이루어지도록 신중하게 선택된다. 용액 내 에어로졸화된 바이러스 입자 및 바이러스 입자를 포착하기 위해, 예시적인 샘플 포착 요소(1001, 7001, 1301, 902, 1407)는 황산 에스테르 고정화된 셀룰로스 비드를 포함할 수 있다. 예시적인 설페이트 비드는 셀루파인 설페이트 비드(JKC Corp., Japan)를 포함할 수 있다. 입자 직경은 약 40㎛와 약 130㎛ 사이일 수 있다. 예시적인 샘플 포착 요소는 충전층 컬럼으로 배치된 약 100㎎의 황산 에스테르 고정화 셀룰로스 비드를 포함할 수 있다. 예시적인 샘플 포착 요소는 약 6.8㎜의 내부 직경과 약 30㎜의 길이를 가질 수 있다. 실시예 8에 나타난 바와 같이 황산 에스테르 고정 비드의 충전층 컬럼을 사용하여 추출된 SARS-CoV-2 바이러스 입자의 고온 분해, MALDI TOFMS를 사용한 분석 및 펩타이드 지문 프로토콜을 사용한 처리 스펙트럼을 통해 핵단백질(N)과 SARS-CoV-2의 신속한 식별에 대한 펩타이드 지문 매칭이 가능할 수 있다.

[0067] 이어서, 샘플 포착 요소(902)의 충전층 컬럼으로부터 포착된 에어로졸 입자는 분석을 위해 적합한 용매를 사용하여 추출될 수 있다. 적합한 추출 시스템은 충전층 컬럼을 용매로 플러싱하고 비휘발성 유기물을 포함하는 용매를 충전층으로부터 제거하기 위한 수단을 포함할 수 있다. 용매는 아세토니트릴, 메탄올, 산, 이소프로판올 중 하나 이상을 포함할 수 있고, 나머지는 물이다. 용매는 물 중 약 50부피% 내지 약 70부피%의 아세토니트릴을 포함할 수 있다. 용매는 물 중 약 50부피% 내지 약 70부피%의 이소프로판올을 포함할 수 있다. 용매는 물 중 약 50 부피% 내지 약 70 부피%의 메탄올을 포함할 수 있다. 용매는 약 12.5 부피% 아세트산, 약 5 부피% TFA, 약 5 부피% 포름산 및 약 10 부피% HCl 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 충전층은 수용성 무기 오염 입자를 제거하기 위해 용매 추출 전에 적어도 한 번 물로 세척될 수 있다. 수집된 샘플은 PCR, ELISA, rt-PCR, 질량 분석기(MS), MALDI-MS, ESI-MS 및 MALDI-TOFMS 중 하나 이상을 포함하는 진단 장치를 사용하여 분석될 수 있다. 대안적으로, 수집 단계 후, C18 비드는 70% 이소프로판올과 같은 적합한 추출 용매를 포함하는 뚜껑이 닫힌 튜브로 옮겨지고, 손으로 흔들거나 원심분리되어 포착된 에어로졸을 용매로 추출할 수 있다. 본 명세서에 개시된 예시적인 시스템 및 방법에서, C18 비드 및/또는 컬럼은 비드를 먼저 유기 용매로 세척한 후 이어서 물 및 PBS 완충액과 같은 무기 용매로 세척한 후 재사용될 수 있다. MALDI-TOFMS와 같은 하향식 단백질체학분석을 가능하게 하는 진단 장치를 사용할 수 있다. 하향식 단백질체학 분석에서는 MS 분석을 위해 손상되지 않은 단백질 이온이나 박테리아 및 바이러스의 큰 단백질 조각을 기체상 조각화(gas-phase fragmentation)한다.

[0068] 개시된 예시적인 시스템 및 방법은 호기에서 단백질, 대사산물 및 지질 특징의 기준선을 확립하는 데 사용될 수 있으며, 이는 이후 다양한 호흡기 질환이 있는 환자의 호기 호흡을 구별하고 호기 내 비휘발성 에어로졸 분석을 기반으로 질병을 탐지하기 위한 강력한 진단 도구를 제공하는 데 사용될 수 있다.

[0069]

[0070] 실시예

[0071] 실시예 1. 예시적인 충전층 컬럼(900) 및 MALDI TOF-MS를 사용한 에어로졸화된 박테리아 및 바이러스 입자의 포착 및 분석.

[0072] 에어로졸화된 *E. coli* K12 균주, 박테리오파지 MS2, *Pseudomonas fluorescens* 1013 및 *Yersinia rohdei* CDC 3022-85의 포착 및 분석을 조사하였다. 약 20 μL의 바이러스 또는 박테리아로 구성된 물 샘플의 에어로졸 입자는 Sono-Tek 초음파 노즐(Milton, NY)을 사용하여 생성되었다. 노즐은 크기가 약 0.3㎛에서 약 10㎛이고 중간 입자 크기가 약 2㎛인 에어로졸 입자를 생성하도록 조정되었다. 입자를 공칭 부피가 약 50㎖인 방출 챔버(901)(50㎖ 원추형 튜브)로 유도하고 약 10분 동안 약 500㎖/min의 유량으로 충전층 컬럼을 통해 흡인하였다. 포착 요소(902)의 충전층 컬럼은 크기가 약 20㎛인 C18 수지 비드 약 25㎎으로 구성되었다. 비드를 70% 아세토니트릴로 1회, 0.05% 트리플루오로아세트산으로 3회 세척하였다. 세척 후, 사용하기 전에 비즈를 젖은 상태로 유지하였다. 이러한 목적으로, 컬럼(902)은 양쪽 끝을 폐쇄하고 사용 전에 비드가 건조되는 것을 방지하기 위하여 냉장고에 보관하였다. 컬럼 베드는 길이가 약 3㎜이고 직경이 약 7㎜이었다. 베드 부피는 약 0.115cc였다. 따라서 500㎖/min의 유량에서 가스 시간당 공간 속도(GHSV, 유량 대 베드 부피의 비율)는 시간당 약 260,000으로 계산되었다. 포착 요소(902)는 50㎖ 원뿔형 튜브의 바닥 근처에 제거 가능하게 설치되었다. 휴대용 레이저 입자 계수기(MetOne Instruments, Grants Pass, OR) 905를 사용하여 포착 요소(902)의 상류측 및 하류측에서

약 0.3~10㎛ 범위의 입자 크기를 측정하였다. 얼음물에서 냉각된 실험실 유리 저장조로 구성된 트랩(904)이 컬럼을 통과하는 에어로졸 응축물(예: 수증기)을 수집하기 위해 요소(902)의 하류측에 배치되었다. 박테리오파지 MS2에 대한 포착 요소(902)의 상류 및 하류의 입자 수를 표 1에 나타내었다.

[0073] 표 1. 에어로졸화된 MS2 포착을 위한 예시적인 포착 요소(902)의 입자 포착 효율.

표 1

[0074]

입자 크기(㎛)	포착요소(902)의 상류측에서 측정된 입자 수	포착요소(902)의 하류측에서 측정된 입자 수
0.3	3,921	12
0.5	4,236	10
1	15,232	52
2	17,892	7
5	1,250	2
10	365	0
합계	42,896	83

[0075] 표 1에 보인 입자 수에 기초하여, MS2 입자의 약 99.8%가 포착 요소(902)의 충전층 컬럼에서 포착되었으며, 이는 입자 포착 효율이 약 시간당 260,000의 가스 시간당 공간 속도에서 99% 이상임을 시사한다. 충전층 컬럼 치수(길이, 직경) 및 베드를 통과하는 유량은 시간당 최소 250,000의 가스 시간당 공간 속도를 실현하기 위해 변경될 수 있다. 특정 이론에 구애됨이 없이, 시간당 약 250,000 내지 시간당 약 3,000,000 사이의 가스 시간당 공간 속도에서 99% 이상의 입자 포집 효율이 측정될 수 있습니다. 에어로졸화된 대장균(*E. coli*) 입자에 대해서도 최소 99%의 포착 효율이 측정되었다. 따라서 약 3mm 길이의 예시적인 충전층 컬럼은 약 0.3㎛만큼 작은 입자를 포함하여 훨씬 더 높은 입자 포집 효율을 얻었고 두께가 약 0.05mm와 약 0.15mm 사이인 일렉트릿(electret) 및 테플론 필터(Teflon filters)와 같은 필터 기판을 사용한 포착 효율을 초과하였다. 이전에 설명된 바와 같이, 충전층의 L/Dp는 약 150과 250 사이이며, 이는 베드를 통한 국부적인 흐름을 방지하고 바이오 에어로졸 입자를 포착(화학적 흡착 또는 물리적 흡착)하기 위해 실질적으로 모든 비드와 표면 영역을 노출시킨다. 약 10분 동안 입자를 포착한 후, 충전층 컬럼을 약 400μL의 물로 3회 세척한 후, 포착된 생체 물질을 200μL의 70% 이소프로판올로 용출시켰다. 세척 및 용출 단계 동안 수집된 샘플을 질량 분석법을 사용하여 분석하였다.

[0076] 샘플의 MALDI-TOF 질량 스펙트럼은 1000 내지 15000 m/z의 선형 모드에서 작동되는 Shimadzu Axima CFR-plus 질량 분석기를 사용하여 획득되었다. 직접 주입 및 nanoflow-LC 질량 분석법에는 EASY-nLC 1000 시스템과 결합된 LTQ Orbitrap 시스템이 사용되었다(Thermo Fisher Scientific). 직접 주입의 유량은 약 3μL/min이었다. LC-MS 분석을 위해 샘플을 마이크로플로우 C18 컬럼(Acclaim™ PepMap™ 100, 75 μm x 2 ㎛ x 25 cm, Thermo Fisher Scientific)에 주입하고 단백질이 용매 B(99% 아세토니트릴, 0.1% 포름산)을 90분 안에 5%에서 65%로 증가시킴으로서 분리되었다. 이온 단편화는 CID(Collision-Induced Dissociation) 방법을 사용하여 수행되었다. 이온 단편화 범위를 개선하기 위해 단계적 CID 접근 방식이 사용되었으며 각각 0%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% 및 35%의 충돌 에너지를 사용하여 하향식 질량 스펙트럼을 획득하였다. 하향식 질량 분석 데이터 분석 중에 Xcalibur 소프트웨어(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 단일동위원소 질량을 분리하고 ProSight Lite(Northwestern University)를 사용하여 단편화 이온을 검사하고 식별하였다.

[0077] 세척 샘플 및 용출 샘플(충전층 컬럼 추출 후)을 MALDI-TOFMS를 사용하여 분석하였다. 결과는 박테리아 특징이 용출 샘플에서 잘 표현되었음을 보여주었는데, 이는 본원에 개시된 에어로졸 포착 및 용출 방법 및 시스템이 완전하거나 원래의(전체 세포) 생물학적 물질의 분석을 제공한다는 것을 시사한다. 또한, 대조 샘플과 용출 샘플 간의 신호 대 잡음비는 구별할 수 없었는데, 이는 충전층 컬럼을 사용한 포착과 추출이 매우 효과적이었음을 시사한다. 실제로 용출 샘플을 빠르게 원심분리한 후 박테리아 물질이 튜브 바닥에 창백한 알갱이로 시각화되었으며 이는 수집 시스템의 포착 능력이 지나치게 강력함을 나타낸다.

[0078] 대부분의 바이러스는 단백질 껍질을 가지고 있다. MS2는 개시된 예시적인 시스템 및 방법의 바이러스 포착 능력을 평가하기 위한 대표적인 바이러스 모델로 사용되었다. MALDI-TOF 질량분석법 분석에 따르면 MS2의 역사적 바이오마커인 캡시드 단백질이 용출 샘플에서 관찰되었다. MS2 캡시드 단백질(13729 Da, MH+)의 정체는 인실리코(*in silico*) 단백질 단편화 패턴에 대해 실험적 단편화 이온을 일치시킬 때 높은 신뢰도의 통계 점수가 구성되는 하향식 질량 분석법을 사용하여 확인되었다. 따라서 MALDI-TOFMS 전체 세포 특성화 및 하향식 단백질 식별을 사용하여 개시된 에어로졸 포착 시스템 및 방법이 에어로졸화된 바이러스 입자를 포착하는 데 사용될 수 있음을

확인하였다. 하향식 질량분석법을 사용하여 관찰한 결과를 추가로 확인하기 위해 직접 주입 질량분석법과 나노플로우 LC 질량분석법을 정량 분석에 사용하였다. 직접 주입 질량 분석 분석은 레퍼리 인슐린(referee insukin)의 신호 강도가 약 3.6E+6인 것으로 나타났다(도 6a~6b). MS2 캡시드 단백질의 신호 강도는 대조 샘플과 포착 샘플(충전층 컬럼에서 에어로졸을 추출하여 얻은 샘플) 모두에서 약 1.1E+5였으며, 이는 예시적인 에어로졸 포착 시스템 및 방법과 MALDI-TOFMS 분석를 사용하여 명백한 샘플 손실이 관찰되지 않았음을 시사한다. 이러한 관찰은 분자 정량 분석을 위한 최적의 표준인 나노플로우 LC 질량 분석기를 사용하여 추가로 확인되었다. LC 질량분석 결과(도 7a~7b)는 MS2 캡시드 단백질의 피크 면적과 이온 강도가 대조 샘플과 포착 샘플 모두에서 실질적으로 동일하다는 것을 보여주었으며, 이는 예시적인 에어로졸 포착 시스템 및 방법이 높은 생화학적 포착 효율을 보존했음을 시사한다.

[0079] 임의의 특정 이론에 얽매이지 않고, 몇 가지 요인은, 달리 제한없이, 바이러스 및 박테리아 입자와 같은 생체재료를 위한 C18 수지 비드의 높은 보유능력, 사용전 충전층의 준비, 에어로졸 입자의 소스에 에어로졸 방출 챔버(901)와 같은 포착요소의 직접배치와, 에어로졸화된 입자를 위하여 사용된 독특한 충전층 컬럼 매개변수를 포함하는, 베드를 통한 시간당 가스 공간 속도에서도 개시된 에어로졸 포집 방법의 우수한 포집 효율에 기여한다. 이전에 설명한 대로 충전층 컬럼의 크기는 약 500㎖/min의 유량에서 충분한 체류 시간을 제공하고 수지 비드의 탄소 사슬과 바이러스 표면의 유기 분자 사이의 우수한 접촉을 보장한다. 또한 C18 비드에는 바이러스와 미생물로 구성된 에어로졸 입자가 직접 노출되어 "벽 손실(wall-losses)"이 최소화됐다. 벽 손실은 일반적으로 입자가 장치의 측면이나 벽에 쌓이는 다른 에어로졸 수집 방법에 존재한다. MS2 캡시드 단백질의 정량 분석은 개시된 에어로졸 수집 시스템 및 방법의 우수한 포착 효율을 입증하였다. 또한, 진공 펌프가 사용되지 않기 때문에, 개시된 시스템 및 방법은 다른 미생물 배양 연구에 필요한 전세포 바이러스, 박테리아 및 기타 미생물의 생존성을 보존하므로 "소프트 수집 기술"로 취급될 수 있다.

[0080]

[0081] 실시예 2. 예시적인 충전층 컬럼의 특징

[0082] 막 기반 에어로졸 수집 장치의 상업적 사용은 에어로졸 수집 동안 물방울 및 기타 환경 입자의 축적으로 인해 발생하는 폐색 및 압력 강하 문제로 인해 어려움을 겪고 있다. 이를 위해서는 큰 멤브레인 표면적이 필요한바, 이로 인해 비용이 증가하고 높은 기생 전력과 소음이 나는 공기 펌프가 필요하다. 에어로졸 포착 테스트는 공칭 직경 약 10㎛ 및 약 20㎛의 C18 비드를 사용하여 수행되었다. 비드는 중합체 프릿 디스크 사이에 채워졌다. 상류측 디스크와 하류측 디스크의 평균 기공 크기는 각각 약 35㎛와 10㎛이었다. HPLC 등급 물 및 *E. coli*(대장균)영양 세포를 챔버(901) 내로 에어로졸화하고 바람직하게는 다이아프램 펌프인 펌프(903)를 사용하여 예시적인 충전층 컬럼(902)을 통해 흡인하였다. *E. coli*는 길이가 약 1㎛~약 2㎛이고 직경이 약 1㎛인 막대 모양의 박테리아이다. 펌프 유량은 2.5L/min으로 설정하고 베드를 통과하는 실제 유량은 유량계를 사용하여 측정하였다(도 5 참조). C18 비드의 충전층 컬럼을 사용하여 테스트를 수행하였다. 도 8a에 도시된 바와 같이, 약 25㎎, 20㎛ C18 비드를 포함하는 베드를 통해 측정된 유량은 베드(길이 약 3㎜)가 HPLC 등급 물 에어로졸에 노출되었을 때 약 750㎖/min이었고, 베드는 포착 시간 30분 이상 대장균 에어로졸에 노출되었다. 이 결과는 약 20㎛의 25㎎ 베드, C18 비드가 이러한 테스트 동안 포화되지 않았음을 시사하며 이는 베드 내 비드의 양이 감소할 수 있음을 나타낸다. 또는 25㎎ 베드를 사용하여 포착 시간을 늘릴 수 있다. 대조적으로, 베드가 10㎛ C18 비드로 구성된 경우, 베드가 HPLC 등급 물 에어로졸에 노출되었을 때 유량은 약 30분 만에 약 200㎖/min에서 약 50㎖/min으로 감소하였다. 또한, 베드가 대장균 에어로졸에 노출되었을 때 유량은 약 100㎖/min에서 약 3㎖/min으로 감소했는데, 이는 10㎛ 비드를 포함하는 베드를 통한 상당한 압력 강하를 나타낸다. 이러한 결과는 입자 크기가 약 20㎛ 이상인 포착 요소(902)의 충전층 컬럼에 있는 C18 비드가 바람직함을 시사한다.

[0083] 또한, 충전층 컬럼 내 C18 비드의 양과 베드 유입구 단부에 배치된 중합체 프릿 디스크의 기공 크기를 변화시켜 베드 전반에 걸친 압력 강하 증가로 인한 유량 감소에 대한 영향을 조사하였다. 펌프 유량은 2.5L/min으로 설정되었고 베드를 통과하는 실제 유량은 유량계를 사용하여 측정되었다. 공칭 직경이 약 20㎛인 C18 비드의 양은 충전층 컬럼에서 약 25㎎에서 약 40㎎으로 증가하였다. 상류측 디스크와 하류측 디스크의 평균 기공 크기는 각각 약 35㎛와 10㎛이었다. 베드의 양을 약 25㎎에서 약 40㎎으로 증가시키면 베드 길이가 약 3㎜에서 약 5㎜로 증가된다. 각각의 경우, 에어로졸화된 HPLC 등급 물 에어로졸에 베드를 노출시킨 후 베드를 통과하는 유량을 모니터링하였다. 결과(도 8b)는 베드 내 C18 비드의 양을 약 25㎎에서 약 40㎎으로 증가시키면 유량은 수집 시간 30분 후 약 700㎖/min에서 약 150㎖/min으로 감소하는 결과를 보였다. 또한, 별도의 테스트 세트에서 유입구 고분자 프릿 디스크의 기공 크기가 35㎛에서 약 10㎛로 변경되었다. 대장균(영양 세포)의 에어로졸에 노출되는 동

안 유량은 30분 동안 약 600㎖/min에서 약 250㎖/min으로 감소하였다(도 8c).

[0084]

[0085] 실시예 3. 인공호흡기에 연결된 예시적인 충전층 컬럼을 사용하여 COVID-19로 진단된 환자의 호기 에어로졸의 포착과 분석.

[0086] 예시적인 시스템(1300)(도 9a)은 COVID-19 질환으로 진단된 환자 치료 전용 병원 집중 치료실(ICU)에서 평가되었다. 샘플 포착 요소(1301) 내 약 25㎎의 C18 비드(20㎛ 공칭 직경)를 포함하는 충전층 컬럼을 통한 유량은 500㎖/min으로 설정되었다. 시스템(1300)에 설치하기 전에 포착 요소를 70% 아세토니트릴로 한 번 세척한 다음 0.05% TFA로 세 번 세척하였다. 충전층의 C18 비드가 건조되는 것을 방지하기 위해 포착 요소를 사용하기 전에 4℃에 보관하였다. 호기 에어로졸은 각 환자로부터 약 4시간 동안 500 ㎖/min의 유량으로 수집되었다. 수집 기간이 지나면 충전층 컬럼이 수집 시스템에서 제거되었다. 컬럼을 약 200㎕ 내지 약 400㎕의 70% ACN 또는 70% IPA로 세척하였다. 하룻밤 동결건조에 의해 충전층 컬럼으로부터 유기 용매를 제거하였다. 유기 용매는 약 30분 동안 약 70℃C의 히팅 블록 위에 요소(1301)를 배치하여 제거될 수도 있다. 포착된 에어로졸 입자는 약 40㎕~100㎕의 0.05% TFA를 사용하여 추출되거나 분리되었다. 그런 다음 샘플을 SDS-PAGE 전기영동 및 은 염색, MALDI-TOFMS(전체 세포 하향식 단백질체학 분석) 및 상향식 단백질체학 분석을 이용하여 분석하였다.

[0087] Criterion Tris-HCl Gel 시스템(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)을 사용하여 수행된 SDS-PAGE 전기영동을 위해 수집된 총 샘플 약 5㎕를 사용하였다. SDS-PAGE 전기영동 후, 단백질 밴드의 시각화를 위해 은 염색 키트(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 SDS-PAGE 젤을 준비하였다. 소 혈청 알부민을 내부 양성 대조군으로 사용하였다. 3명의 환자 샘플 모두에서 단백질 밴드가 관찰되었다. BSA 대조 샘플을 기준으로 3개 샘플의 단백질 함량은 최소 100ng 이상인 것으로 추정되었다.

[0088] 전체 세포 MALDI-TOFMS 분석을 위해, 0.2 ㎕의 분석물을 70% ACN에서 제조된 0.2 ㎕의 α-시아노-4-하이드록시신남산 MALDI 매트릭스(CHCA)와 혼합하였다. 혼합물을 MALDI 샘플 캡 위에 놓고 질량 스펙트럼을 전체 내용이 참조로 본문에 포함되는 공동 소유의 특허출원 PCT/US20/48042 "에어로졸 입자의 신속하고 자동적인 탐지를 위한 시스템 및 방법"에 개시된 예시적인 MALDI-TOF 질량 분석 시스템을 사용하여 수집하였다. MALDI-TOF 스펙트럼은 환자 #3과 #4의 샘플에서 수집되었다. 두 샘플 모두에서 질량 피크가 관찰되었다. MALDI-TOF MS에서 생성된 피크 패턴은 검출 및 분류를 위한 패턴 인식 알고리즘을 사용하여 검사되었다.

[0089] 상향식 단백질체학 분석을 위해 각 샘플 5㎕를 사용하였다. 50mM 암모니아 중탄산염(pH 8.5) 약 50㎕를 각 샘플에 첨가하였다. 단백질 감소는 디티오트레이톨(dithiothreitol)을 최종 농도 5mM로 첨가하고 37℃에서 30분 동안 배양하여 수행되었다. 환원 후, 요오도아세트아미드(iodoacetamide)를 최종 농도 15 mM로 첨가하고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션함으로써 단백질 알킬화를 수행하였다. 하룻밤 단백질 분해를 위해 트립신(Thermo Fisher Scientific)을 사용하였다. 소화 후, C18-충전팁(Glygen, Columbia, MD)을 사용하여 펩타이드를 청소하였다. 그런 다음 MALDI-TOF 질량 분석법을 포함한 질량 분석법 분석을 위해 20㎕의 0.1% 포름산에 담긴 펩타이드 샘플을 준비하였다. 샘플은 LTQ Quadrupole-Orbitrap 질량 분석기(Thermo Fisher Scientific)에 연결된 EASY-nLC 1000 시스템(Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 처리되었다. 탠덤(tandem) 질량 분석법 분석을 위해 펩타이드를 Acclaim PepMap 100 C18 트랩 컬럼(0.2mm×20mm, Thermo Fisher Scientific)에 5㎕/min의 유량으로 로딩하고 EASY-Spray HPLC 컬럼(75㎛×150mm, Thermo Fisher Scientific)에서 분리하였다. HPLC 변화는 5%~55%의 이동상(75% 아세토니트릴 및 0.1% 포름산)을 사용하여 60분 동안 300nl/min의 유량으로 유도되었다. 질량 분석 데이터 수집은 데이터 종속 수집 모드에서 수행되었다. 전구체 스캐닝 분해능은 30,000으로 설정되고, 생성 이온 스캐닝 분해능은 15,000으로 설정되었다. 생성 이온 단편화는 총 에너지 30%의 고에너지 충돌 유도 해리를 사용하여 달성되었다. 상향식 단백질체학 분석의 원시 데이터 파일은 표준 권장 사항 및 지침에 따라 "인간" 및 "SARS-COV-2" 단백질 데이터베이스(uniprot.org)에 대해 MaxQuant Andromeda 소프트웨어(maxQuant.org)를 사용하여 처리되었다. 인간 단백질 데이터베이스에는 검토된 단백질 20,395개가 포함되었으며 SARS-COV-2 단백질 데이터베이스에는 검토된 단백질 13개가 포함되어 있다. 소화된 펩타이드로부터 생성된 액체 크로마토그래피 프로파일과 펩타이드 지문은 3명의 환자 샘플 모두에서 LC-MS 및 MALDI-TOF MS를 사용하여 확인되었다. 세 환자 샘플 모두에서 총 222개의 단백질이 확인되었다. 대부분의 단백질은 인간의 혈액에서 유래한 것으로 밝혀졌으며 이는 폐와 혈액 사이의 활발한 상호 작용을 나타낸다. 표 2에 나타난 바와 같이, 대표적인 폐 단백질과 SARS-COV-2 단백질이 확인되었다.

[0090] 표 2. COVID-19로 진단받은 환자로부터 수집한 호기 에어로졸에서 확인된 단백질.

표 2

단백질 식별리스트	몰 중량 [kDa]
sp|P0DTD1|R1AB_SARS2 Replicase polyprotein 1ab OS=Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 OX=2697049 GN=rep PE=1 SV=1	794.05
sp|Q9HC84|MUC5B_HUMAN Mucin-5B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MUC5B PE=1 SV=3	596.33
sp|P02671|FIBA_HUMAN Fibrinogen alpha chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FGA PE=1 SV=2	94.972
sp|P02768|ALBU_HUMAN Serum albumin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALB PE=1 SV=2;	69.366
sp|P02675|FIBB_HUMAN Fibrinogen beta chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FGB PE=1 SV=2	55.928
sp|Q8TDL5|BPIB1_HUMAN BPI fold-containing family B member 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BPIFB1 PE=1 SV=1	52.441
sp|P63261|ACTG_HUMAN Actin, cytoplasmic 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTG1 PE=1 SV=1;sp|P60709|ACTB_HUMAN Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTB PE=1 SV=1	41.792
sp|P35247|SFTPD_HUMAN Pulmonary surfactant-associated protein D OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SFTPD PE=1 SV=3	37.728
sp|P02647|APOA1_HUMAN Apolipoprotein A-I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOA1 PE=1 SV=1	30.777
sp|Q8IWL2|SFTA1_HUMAN Pulmonary surfactant-associated protein A1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SFTPA1 PE=1 SV=2;sp|Q8IWL1|SFPA2_HUMAN Pulmonary surfactant-associated protein A2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SFTPA2 PE=1 SV=1	26.242
sp|P68871|HBB_HUMAN Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBB PE=1 SV=2	15.998
sp|P69905|HBA_HUMAN Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBA1 PE=1 SV=2	15.257
sp|Q99879|H2B1M_HUMAN Histone H2B type 1-M OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H2BC14 PE=1 SV=3;sp|Q99877|H2B1N_HUMAN Histone H2B type 1-N OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H2BC15 PE=1 SV=3;sp|Q93079|H2B1H_HUMAN Histone H2B type 1-H OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HIST1H2BH PE	13.989
sp|P0DJI8|SAA1_HUMAN Serum amyloid A-1 protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SAA1 PE=1 SV=1	13.532
sp|P06702|S10A9_HUMAN Protein S100-A9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=S100A9 PE=1 SV=1	13.242
sp|P02656|APOC3_HUMAN Apolipoprotein C-III OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOC3 PE=1 SV=1	10.852
sp|P11684|UTER_HUMAN Uteroglobin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SCGB1A1 PE=1 SV=1	9.9937

[0091]

[0092]

[0093] 실시예 4. 예시적인 수집 시스템(1400)을 사용한 주변 공기 에어로졸 입자의 포착.

[0094] 주변 공기 중 입자의 포착은 4개의 포착 요소(1407)를 포함하는 예시적인 시스템(1400)을 사용하여 조사되었다. 각 요소(1407)는 내부 직경이 약 16㎜인 중합체 튜브 내의 2개의 다공성 프릿 디스크 사이에 충전된 약 75㎛ 내지 150㎛ 사이의 공칭 직경을 갖는 약 200㎎의 C18 비드를 포함하였다. 충전층 길이는 약 3㎜였으며, 베드 부피는 약 0.6cc이었다. 펌프(1406)를 사용하여 약 20L/분의 유량으로 각 컬럼을 통해 공기를 흡인하였다. 샘플을 포착하기 전에 충전층을 물로 적셨다. Met One Instruments 입자 계수기를 사용하여 입자 크기 및 개수를 측정하였다. 포착 요소(1407)의 상류측 및 하류측의 입자 수는 표 3에 보인 바와 같다.

[0095] 표 3. 예시적인 수집 시스템(1400)을 사용한 입자 포착 효율

표 3

[0096]

입자크기 ㎛	주변 공기 중 입자수	시간=0에서 시스템(1400)의 하류측에서 측정된 입자수	시간=60분에서 시스템(1400)의 하류측에서 측정된 입자수
0.3	101,000	116	125
0.5	7,000	10	0
0.7	651	52	0
1	294	7	0
2	163	2	0
5	10	0	0
합계	109,118	116	125

[0097] 표 3에 표시된 입자수에 기초하여, 시스템(1400)의 포착 요소(1407)를 사용하여 주변 공기 입자의 99.8% 이상이 포착되었으며, 이는 입자 포착 효율이 약 시간당 2x106의 가스 시간당 공간 속도에서도 적어도 99%임을 시사한다. 단백질, 지질, 대사산물 바이오마커 및 전체 병원체와 같은 비휘발성 유기 에어로졸을 포착하는 데 사용되는 경우, 베드의 포착 용량은 약 10 중량%일 수 있다.

[0098]

[0099] 실시예 5. 호기의 대사산물과 지질의 기준선을 설정하기 위해 건강한 인간 피험자로부터 수집한 호기의 분석

[0100] 예시적인 시스템(7000)에서, 요소(7001)의 컬럼은 약 55㎛ 내지 105㎛의 공칭 직경을 갖는 약 35㎎의 C18 비드로 구성되었다. C18 비드의 충전층은 기공 크기가 약 90㎛인 상류측 다공성 프릿과 기공 크기가 약 35㎛인 하류측 프릿 사이에 배치되었다. 요소(7001)의 직경은 약 6㎜이고 베드 길이는 약 3㎜이었다. 약 0.09cc의 베드 부피 및 약 3L/분의 베드를 통해 흡인되는 유량에서, 베드를 통과하는 가스 시간당 공간 속도(GHSV)는 시간당 약 2×10^6으로 높았으며, 이는 베드를 통한 유량을 증가시키거나 베드 부피를 감소시키는 유연성을 허용한다. 이후 설명하는 바와 같이, 이러한 높은 공간 속도에서도 대사산물 및 지질과 같은 비휘발성 유기물 입자의 효율적인 포착이 이루어지는 것이 입증되었다. 각 인간 피험자로부터 호기 에어로졸을 시간에 따라 순차적으로, 제1 컬럼에 10분, 그 후 제2 컬럼에 10분, 그 후 제3 컬럼 열에 10분간 포착하기 위해 3개의 포착 요소(7001)(컬럼)이 사용되었다. 제1 컬럼은 ACN을 사용하여 세척하여 대사산물을 용출하였다. 제2 컬럼은 300㎕의 70% IPA로 세척하여 지질을 용출하였다. 제3 컬럼은 대조군으로 사용되었으며 HEPA로 필터링된 공기만 수집되었다. 샘플 수집 중에 CO_2 센서를 사용하여 각 개인의 호기에서 CO_2 수준을 감지하고 기록하였다. CO_2 센서는 컬럼 유출구와 펌프 사이에 배치되었다.

[0101] 용출된 대사산물과 지질 샘플을 하룻밤 동결건조하였다. 건조된 샘플은 LC-MS/MS 분석을 위해 용액으로 준비되었다. LC-MS 분석의 총 이온 크로마토그래피(TIC)는 피크 정렬 및 강도 표준화를 위해 사용되었다. 대사산물 및 지질 식별은 오픈 소스 소프트웨어 MS-DIAL(일본 RIKEN Metabolomics의 PRIMe 플랫폼)을 사용한 정확한 질량 측정 및 MS/MS 스펙트럼 매칭을 기반으로 하였다. 작은 피크를 제거하기 위해 데이터를 다음과 같이 필터링(데이터 필터링)하였다: 낮은 이온 강도 피크는 무시했으며, 또한 한 대상에서만 피크가 식별된 경우 이러한 피크는 잡음(artifact)으로 처리되어 무시되었다. 제3 컬럼으로부터의 샘플(HEPA로 필터링된 공기)에서 이온 피크는 기준 필터로서 사용되었으며 이러한 피크는 모든 호흡 샘플에서 제외되었다. 각 피험자로부터 샘플을 수집하는 동안 측정된 개인 CO_2 농도는 개인 호흡 샘플의 이온 강도 정규화에 사용되었다. 즉, 이온 강도 값을 개인 CO_2 농도로 나누었다. 개인 CO_2 농도(ppm)는 제1 컬럼(샘플 포착 요소)을 사용하여 샘플을 수집하는 동안 최소 약 6850ppm에서 최대 약 12799ppm 사이였다. 제1 컬럼을 사용하여 샘플을 수집하는 동안 CO_2 농도는 4925ppm에서 16453ppm 사이로 떨어졌다. 이 연구를 통해 구축된 최종 인간 호흡 샘플 데이터베이스에는 분자 식별, 보유 시간, 전체 질량 및 이온 단편화 정보(MS/MS)가 포함되었다.

[0102] 데이터 과학 소프트웨어 RStudio를 사용하여 주성분 분석(PCA)과 부분 최소 제곱 판별 분석(PLS-DA)을 사용하여 호흡 및 블랭크 샘플을 시각화하였다. 도 11a에 도시된 바와 같이, 인간 호흡 내 대사산물 및 지질 모두에 대해 호흡 샘플과 HEPA 여과 공기(블랭크) 샘플 사이의 뚜렷한 분리가 관찰되었다. 건강한 인간 피험자와 호흡기 질환에 감염된 인간 피험자의 호흡 샘플을 분석하는 동안에도 유사한 분리가 예상된다. 또한, 도 11b에 도시된 바와 같이, 약 1804개의 대사산물과 1150개의 지질이 호흡 샘플에서 확인되었으며 HEPA로 필터링된 공기(블랭크)

샘플에서는 확인되지 않았다. 상대 표준 편차(RSD, 0-300%)는 지질이 100% RSD 미만인 더 많은 수의 식별을 특징으로 한다는 것을 보여주었다. 이는 14명의 피험자의 호흡 수집 샘플과 관련된 지질의 평균 표준 편차가 매우 작음을 시사한다. 예시적인 시스템과 방법을 사용하여 수집 및 용출된 호기 에어로졸의 지질 바이오마커가 건강한 환자와 호흡기 질환에 감염된 환자를 구별하는 데 사용될 수 있다는 더 큰 확신을 제공한다. 마지막으로, 각 개인 포착 샘플(14명 대상)의 이온 강도는 샘플 수집 중에 측정된 CO_2 농도를 사용하여 정규화되었다. 도 11C에 도시된 바와 같이, 이 정규화 프로토콜은 특정 피험자에 대한 지질 및 대사산물 바이오마커 둘 다에 대한 이온 강도(각 경우 상위 5개 이온 강도)의 특정 변화를 강조하고 건강한 개인의 대사산물 및 지질 바이오마커 특성을 더 잘 이해하는 데 사용될 수 있으며, 이는 실질적으로 감염된 환자로부터 수집된 데이터를 해석하는 동안에 사용될 수 있다.

[0103]

[0104] 실시예 6. 예시적인 수집 시스템(1400A)을 사용한 주변 공기 에어로졸 입자의 포착 및 상향식 주변 공기 에어로졸 입자의 포착 및 상향식 단백질체학 분석.

[0105] 주변 공기 중 입자의 포착은 4개의 포착 요소(1407)를 포함하는 예시적인 시스템(1400A)을 사용하여 검사되었다. 각 요소(1407)는 직경이 약 16mm 인 중합체 튜브에 있는 2개의 다공성 프릿 디스크 사이에 충전된 약 75㎛ 내지 150㎛의 공칭 직경을 갖는 약 200mg의 C18 비드를 포함한다. 충전층 길이는 약 3mm이었으며, 베드 부피는 약 0.6cc이었다. 펌프(1406)를 사용하여 약 20L/분의 유량으로 각 컬럼을 통해 공기를 흡인하고 샘플 포착 요소에 들어가기 전에 가습되었다. 4개의 샘플이 수집되었습니다. 즉, (1) 8시간 동안 공기 샘플링을 수행한 1인실(1인) 사무실에서, (2) 8명이 2시간 동안 공기 샘플링을 수행한 식당에서, (3) 사람이 없고 7시간 동안 공기 샘플링을 하는 병원의 통행량이 적은 수술실에서 2개의 샘플을 수집하였다. 샘플 수집 후, 각 충전층 컬럼의 에어로졸 입자를 2mL의 10-80% 유기 용매를 사용하여 용출시킨 후 하룻밤 동결건조하여 유기 용매를 제거하였다. 각 샘플에 대해 잔여 단백질을 단백질 은 염색 및 상향식 단백질체학 분석으로 평가하였다.

[0106] 사무실 공기 샘플에서 60개의 단백질이 식별되었고, 식당 공기 샘플에서 72개의 단백질이 식별되었으며, 통행량이 적은 수술실(OR) 공기 샘플 #1에서 84개의 단백질이 식별되었고, 통행량이 적은 수술실 공기 샘플 #2(도 13a)에서 38개의 단백질이 식별되었다. 전형적인 단백질이 확인되었으며 4개 샘플 모두에서 케라틴을 포함하고 있었으며(표 4), 이는 인간 활동에서 나온 단백질의 증거였다. 케라틴-9의 수준을 평가한 결과, 1인실에서 채취한 사무실 샘플이 케라틴-9를 가장 많이 함유하고 있는 것으로 나타났다(도 13b).

[0107] 표 4. 예시적인 시스템(1400A)을 사용하여 수집된 4개의 공기 샘플에서 단백질 조직 기원을 보여주는 단백질 리스트.

표 4

[0108]

단백질 ID	단백질	기원
사무실		
P81605	덤시딘	피부, 상부기도 및 하부기도
P35527	케라틴, 타입 I 세포골격 9	피부
P35247	폐 계면활성제 관련 단백질 D	하부기도
Q9NZT1	칼모듈린 유사 단백질 5	피부
식당		
Q9UMD9	콜라겐 알파-1(XVII) 사슬	피부
P04264	케라틴, 타입 II 세포골격 1	피부
Q9BSE2	막관통 단백질 79	피부
P01040	시스타틴-A	하부기도
P35527	케라틴, 타입 I 세포골격 9	피부
저-통행량 OR 01		
P28289	트로포모듈린-1	근육
P04264	케라틴, 타입 II 세포골격 1	피부
P63361	액틴, 감마-장 평활근	상부기도
P35527	케라틴, 타입 I 세포골격 9	피부
Q7Z5P9	뮤신-19	상부기도 및 하부기도
저-통행량 OR 02		
P35527	케라틴, 타입 I 세포골격 9	피부

[0109]

[0110] 실시예 7. C18 충전층 컬럼 및 상용 버튼 샘플러를 갖춘 예시적인 샘플 캡처 요소를 사용한 에어로졸화된 단백질의 포착.

[0111] 예시적인 샘플 포착 요소는 약 45㎛에서 120㎛ 사이의 공칭 직경을 갖는 C18 비드의 충전층 컬럼으로 구성된다. 컬럼 내 C18 비드의 양은 약 200mg이었고 베드 길이는 약 3mm이었다. 포착 요소의 길이와 직경(ID)은 각각 약 60mm와 약 15.9mm였다. 버튼 샘플러(Button Sampler; SKC Ltd, 영국)는 총 미생물 수에 대한 바이오에어로졸포함하는 흡입가능한 먼지(공기역학적 직경 100㎛)의 포착 특성을 개선하도록 설계된 다공성 곡면 유입구를 갖춘 필터 샘플러(기공 크기가 1㎛보다 큰 25mm 필터)로 구성된다.

[0112] BSA 농도가 약 2mg/mℓ인 인공 타액(NCZ-APS-0012) 배경 용액에 BSA 단백질을 포함하는 단백질 용액을 존스 홉킨스 대학교(Johns Hopkins University)의 응용 물리학 연구소의 동적 농도 에어로졸 발생기를 사용하여 에어로졸화하였다. 예시적인 샘플 포착 요소의 경우, 기계식 펌프를 사용하여 에어로졸을 약 10L/분의 속도로 충전층 컬럼을 통해 흡인하였다. 샘플 수집 후, C18 비드 충전층 컬럼을 2mL의 70% CAN으로 용출시키고 하룻밤 동결건조하여 유기 용매를 제거하였다. 샘플을 50 μL의 물에 현탁시키고 SDS-PAGE 전기영동, 청색 염색 및 상향식 단백질체학 분석에 사용하였다.

[0113] 도 14는 예시적인 C18 충전층 컬럼 및 버튼 샘플러를 사용하여 수집된 샘플의 단백질 블루 염색을 보여준다. 도시된 바와 같이, 예시적인 C18 충전층 컬럼의 단백질 포착 효율은 버튼 샘플러를 사용하여 얻은 것보다 훨씬 더 뛰어났다. 또한, 실버염색의 경우 버튼샘플러로 채취한 시료에서는 BSA 단백질 밴드(약 66 kDa)가 보이지 않았다. 대조적으로, BSA 단백질 밴드는 예시적인 C18 충전층 컬럼으로 수집된 모든 샘플에서 나타났다. 온전한 BSA 단백질 외에도, 이의 디머 형태(dimmer form)(약 140kDa) 및 트리머 형태(trimmer form)(약 200kDa)가 C18 충전층 컬럼으로 수집된 모든 샘플에서 나타났다.

[0114]

[0115] 실시예 8. 황산에스테르 작용기를 이용한 SARS-CoV-2 바이러스 포착 및 분석.

[0116] SARS-CoV-2 남아프리카 균주가 Vero E6 TMPR332 세포주를 사용하여 배양되었다. 0.3 mL의 바이러스를 PBS 완충액과 혼합하여 최종 부피 4.7mL를 만들었다. 성장 배지를 조직 배양 용기에서 따라내고 20mL의 PBS로 3회 부드럽게 세척하였다. 희석된 바이러스 5mL를 용기에 피펫팅하고(pipetted) 37℃에서 15분간 배양하였다. 보충되지 않은 배지 20mL를 각 용기에 첨가하고 CPE가 약 80%에 도달할 때까지 2일 동안 배양하였다. 수확 당시 CPE는 90%였다. TCID50은 2.32 e+7로 농축되었다(Reed & Muench 방법으로 계산). 정제 단계에서 바이러스를 100,000g에서 60분간 초원심분리하고 상층액을 따라낸 후 펠렛(pellet)을 물 1mL에 재현탁시켰다. 그런 다음 바이러스를 70℃에서 30분 동안 가열불활성화하였다(heat inactivated).

[0117] 샘플 포착 요소는 황산 에스테르 고정화 셀룰로오스 비드(Cellufine® Sulfate)로 구성되었다. 충전층 컬럼은 약 40mm 내지 약 130mm 직경의 비드로 구성되었다. 충전층 컬럼(30mm 길이×6.8mm ID)은 약 100mg의 비드로 구성되었다. 컬럼을 1 mL의 세척 용액(1 x PBS 중 0.2 M NaCl)으로 1회 세척하였다. 900 μL의 SAR-CoV-2 바이러스 샘플을 100 μL의 10× PBS에 준비하여 1× PBS 용액의 최종 용액을 만들었다. 바이러스가 포함된 전체 샘플 용액을 주사기를 사용하여 컬럼에 넣고 컬럼을 통해 밀어내었다. 컬럼에서 나오는 샘플을 수집하고 컬럼을 통해 5회 더 밀어 넣어 베드에서 바이러스 포착을 최대화하였다. 비결합 단백질을 완전히 제거하기 위해 1× PBS 세척 용액에 용해된 0.2 M NaCl 2mL를 컬럼을 통해 3회 밀어 넣었다. 그 후, 세척 용액이 컬럼에 남아 있는지 확인하기 위해 컬럼을 통해 공기를 밀어 넣었다. 그런 다음 포착된 바이러스 입자를 1 x PBS 용출 용액 중 900 μL의 1.5M NaCl을 사용하여 용출하였다.

[0118] 용출된 샘플을 두 개의 샘플로 나누고 각 샘플을 고온 산 분해하였다. 이 단계에 앞서 용출된 샘플을 원심분리기에서 여과하였다. 용출된 바이러스 200 μL를 HPLC 물 250 μL와 혼합하여 3k(3kDa MWCO) 필터 컬럼에 주입하였다. 샘플을 미세원심분리기에서 14,000g의 속도로 25분 동안 회전시켰다. 3k 컬럼에 450 μL의 HPLC 물을 채우고 다시 회전시켰다. 이 과정은 세 번 반복되었다. 컬럼을 새로운 고정 튜브에서 거꾸로 뒤집고 10,000g에서 10분간 원심분리하였다. 이 샘플은 고온 산 분해에 사용되었다. 3k 여과를 통해 생성된 샘플에 약 50.5 μL의 물을 채워 최종 샘플 부피를 87.5 μL로 만들었다. 12.5 μL의 아세트산을 첨가하여 12.5% 산성 용액을 만들었다(총 100 μL). 샘플은 약 15분 동안 약 140℃에서 고온 산 분해하였다.

[0119] 그런 다음 MALDI-TOF 질량 분석기를 사용하여 샘플을 분석하였다. CHCA 매트릭스는 약 9 ㎎/mL 농도의 70% 아세토니트릴에서 제조되었다. 약 1㎕의 고온 산 샘플을 MALDI 플레이트에 배치하였다. 샘플이 부분적으로 건조되면 약 1 ㎕의 CHCA 용액을 위에 침전시키고 위아래로 피펫팅하여 혼합하였다. 샘플은 상업용 Bruker Daltonics microflex LRF MALDI-TOF 질량 분석기를 사용하여 분석되었다. MALDI-TOF 질량 스펙트럼은 양의 선형 모드(positive linear mode)에서 얻어졌으며 모든 스펙트럼에 대해 700~21,000m/z의 질량 범위에서 평균 600개의 프로파일이 수집되었다. 온라인 프로그램 MASCOT Peptide Mass Fingerprint(Matrix Science, Boston, MA)를 사용하여 펩타이드 질량 지문을 식별하였다. S/N>10인 질량 피크를 분석을 위해 "질량 값"으로 추출하였다. "SwissProt" 단백질 데이터베이스가 사용되었으며 분류를 위해 "모든 항목(All entries)"이 선택되었다. 효소는 "Formic_acid"로 정의되었으며, 누락된 절단 번호 0~9가 허용되었다. 펩타이드 내성은 0.5Da로 설정되었고 단일 동위원소 유형이 선택되었다.

[0120] 도 15a~15b는 황산 에스테르 충전층 컬럼에서 추출된 바이러스 샘플로부터의 고온 산 분해된 펩티드의 MALDI TOF 질량 스펙트럼이 황산 에스테르 충전층 컬럼으로 처리되지 않은 샘플의 스펙트럼과 비교하여 더 뚜렷한 프로파일을 나타냄을 보여준다. 펩타이드 식별을 위해 상향식 단백질체학 분석(Bottom-up proteomics)을 사용하였고, 황산 에스테르 충전층 컬럼으로 처리하지 않은 샘플에서 Vero E6 세포 단백질의 펩타이드가 가장 풍부하다는 것을 보여주었다(도 15c). 대조적으로, 황산 에스테르 충전층 컬럼에서 추출된 샘플은 SARS-CoV-2 단백질의 펩타이드가 가장 풍부한 것으로 나타났다(도 15d~15e). 바이러스성 펩타이드는 또한 황산 에스테르 충전층 컬럼에서 추출된 샘플에서 상당히 높은 이온 강도를 특징으로 한다(도 15d). 이러한 결과는 황산 에스테르 고정화된 셀룰로오스 비드가 에어로졸화된 바이러스 입자의 포착에 사용될 수 있음을 보여준다. 또한, 상향식 단백질체학 분석은 확인된 펩타이드가 SARS-CoV-2의 N 단백질 특성에 해당한다는 것을 보여준다. 상향식 단백질체학 분석의 펩타이드 식별 정보를 사용하여 SARS-CoV-2의 특징인 MALDI-TOF MS 스펙트럼(도 15b)에서 6개의 질량 피크가 확인되었다. 고온의 산을 이용한 가수분해에서 전형적인 질량 이동 시그니처인 +115.1이 이러한 피크 할당에서 관찰되었다.

[0121] 농축 후 확인된 대부분의 펩타이드는 N 단백질에 해당하므로, 예시적인 포착 요소에서 추출된 샘플의 MALDI-TOF MS 질량 피크는 펩타이드 질량 지문 채취 및 SARS-CoV-2 검출을 사용하여 N 단백질을 식별하는 데 사용될 수 있다. 신호 대 잡음비가 10보다 큰 37개의 질량 피크를 선택하고 MASCOT Peptide Mass Fingerprint 프로그램으로 처리하였다. 고온의 산을 이용한 단백질 가수분해는 절단 누락을 유발하기 때문에 허용된 절단 누락이 식별 점수에 미치는 영향을 평가하였다. 결과는 누락된 절단이 0보다 큰 경우 MALDI-TOF 질량 스펙트럼 프로파일을 사용하여 N 단백질을 확실하게 식별할 수 있음을 보여주었다(도 15e). 식별 결과 중 허용된 3개의 누락된 절단 부위가 가장 좋은 점수를 얻었으며 더 큰 누락된 절단 수가 사용된 경우 점수는 크게 변하지 않았다. 결과는 신속한 MALDI-TOF MS와 펩타이드 질량 지문 채취의 조합이 SARS-CoV-2 검출에 사용될 수 있음을 보여주었다.

[0122] 예시적인 황산 에스테르 충전층 컬럼과 시료 추출, 처리 및 분석 방법을 사용하여 다른 바이러스 입자를 포착하고 식별할 수도 있다. MALDI-TOF MS와 Mascot 데이터베이스 검색을 사용하여 식별된 펩타이드는 SARS-CoV-2 바이러스의 다양한 변종을 구별하는 데에도 사용될 수 있다. 예를 들어 Eta/B.1.525. 균주는 참조 데이터베이스 UniProtKB - P0DTC9(NCAP_SARS2)의 천연 변종의 아미노산 위치 2 및 3에서 SD>Y 전이를 갖는다. Alpha/B.1.1.7. 천연 변이체의 아미노산 위치 3에서 D>L 전이가 있다. Eta/B.1.525. 자연 변종의 아미노산 위치 12에서 A>G 전이가 있다. Omicron/B.1.1.529. 자연 변종의 아미노산 위치 13에 P>L 전이가 있다. Omicron/B.1.1.529에는 자연 변종에서 아미노산 위치 31~33이 없다. Delta/B.1.617.2. 자연 변종의 아미노산 위치 63에서 D>G 전이가 있다. Gamma/P.1. 자연 변종의 아미노산 위치 80에서 P>R 전이가 있다. Delta/B.1.617.2 및 Kappa/B.1.617.1. 자연 변종의 아미노산 위치 377에서 D>Y 전이가 있다.

[0123] 요약서는 37 C.F.R. §1.72(b)에 따라 독자로 하여금 피상적인 검토로부터 기술 개시내용의 본질과 요지를 신속하게 결정할 수 있도록 한다. 이는 특허청구범위의 범위나 의미를 해석하거나 제한하는 데 사용되어서는 안 된다.

[0124] 본 개시내용이 이를 실시하는 바람직한 형태와 관련하여 설명되었지만, 통상의 기술자는 본 개시의 정신을 벗어남이 없이 많은 변형이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 본 개시내용의 범위가 위의 설명에 의해 어떤 방식으로든 제한되는 것으로 의도되지 않는 것이다.

[0125] 또한, 본 개시내용의 본질을 벗어남이 없이 다양한 변경이 이루어질 수 있음을 이해해야 한다. 이러한 변경들도 본 발명의 상세한 설명에 암시적으로 포함되는 것이다. 이것들은 여전히 본 개시내용의 범위에 속한다. 본 개시내용은 독립적으로 그리고 전체 시스템으로서, 그리고 방법 유형 및 장치 유형 모두에서, 본 개시내용의 다양한

측면을 포괄하는 특허를 산출하도록 의도된 것으로 이해되어야 한다.

[0126] 또한, 본 개시내용 및 특허청구범위의 다양한 요소들 각각은 또한 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 본 개시내용은 임의의 장치 구현, 방법 구현 또는 프로세스 구현의 구현의 변형이든 간에, 또는 심지어 이들 중 단지 임의의 요소의 변형이든 간에, 이러한 각각의 변형을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0127] 특히, 각 요소에 대한 단어는 기능 또는 결과만 동일하더라도 등가의 장치 용어 또는 방법 용어로 표현될 수 있음을 이해해야 한다. 이와 같은 동등하거나 더 광범위하거나 훨씬 더 일반적인 용어는 각 요소 또는 작용의 설명에 포함되는 것으로 간주되어야 한다. 이러한 용어는 본 개시내용의 권리가 주어지는 묵시적으로 광범위한 범위를 명시하기 위해 원하는 경우 대체될 수 있다. 모든 작용은 그 작용을 취하기 위한 수단으로 또는 그 작용을 유발하는 요소로 표현될 수 있음을 이해해야 한다. 유사하게, 개시된 각각의 물리적 요소는 그 물리적 요소가 용이하게 하는 작용의 개시를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0128] 또한, 사용된 각 용어와 관련하여, 본 출원에서의 그 활용이 그러한 해석과 불일치하지 않는 한, 일반적인 사전적 정의는, 장인들에 의해 인정된 최신 기술사전들 중의 적어도 하나에 포함되어 있는 바와 같은, 각 용어 및 모든 정의, 대체 용어와 동의어에 대해 통합된 것으로 이해되어야 하고, Random House Webster의 Unabridged Dictionary 최신판이 참조로 여기에 포함된다.

[0129] 또한, 전환부 "포함하는(comprising)"의 사용은 전통적인 청구항 해석에 따라 여기서는 "개방형" 청구항을 유지하는 데 사용된다. 따라서, 문맥에서 달리 요구하지 않는 한, "포함하다(comprises)" 또는 "포함하는(comprising)"과 같은 변형은 명시된 요소나 단계, 또는 요소들 또는 단계들의 그룹을 포함하는 것을 의미하지만 다른 요소나 단계, 또는 요소들 또는 단계들의 그룹을 배제하지 않도록 의도된 것임이 이해되어야 한다. 이러한 용어는 법적으로 허용되는 가장 광범위한 범위를 본 출원인에게 제공하도록 가장 광범위한 형태로 해석되어야 한다.

[0130]

[0131] 참조문헌

[0132] 1. Fennelly K.P., Martyny J.W., Fulton K.E., Orme I.M., Cave D.M., et al. (2004) Cough-generated aerosols of Mycobacterium tuberculosis: a new method to study infectiousness. Am J Respir Crit Care Med 169: 604-609.

[0133] 2. Hunt, J., “Exhaled breath condensate: An evolving tool for noninvasive evaluation of lung disease,” J. Allergy Clin. Immunol. 2002; 110:28-34.

[0134] 3. Benjamin Patterson, Carl Morrow, Vinayak Singh, Atica Moosa, Melitta Gqada, Jeremy Woodward, Valerie Mizrahi, Wayne Bryden, Charles Call, Shwetak Patel, Digby Warner, Robin Wood, “Detection of *Mycobacterium tuberculosis* bacilli in bio-aerosols from untreated TB patients,” Gates Open Research 2018, 1:11.

[0135] 4. Wood R., Morrow C., Barry C.E., III, Bryden W.A., Call C.J., Hickey A.J., et al.: Real-Time Investigation of Tuberculosis Transmission: Developing the Respiratory Aerosol Sampling Chamber (RASC). PLoS One. 2016; 11(1): e0146658.

[0136] 5. Rachel C. Wood, Angelique K. Luabeya, Kris M. Weigel, Alicia K. Wilbur, Lisa Jones-Engel, Mark Hatherill, and Gerard A. Cangelosi, “Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA on the oral mucosa of tuberculosis patients,” Sci. Rep. 5, 8668 (2015).

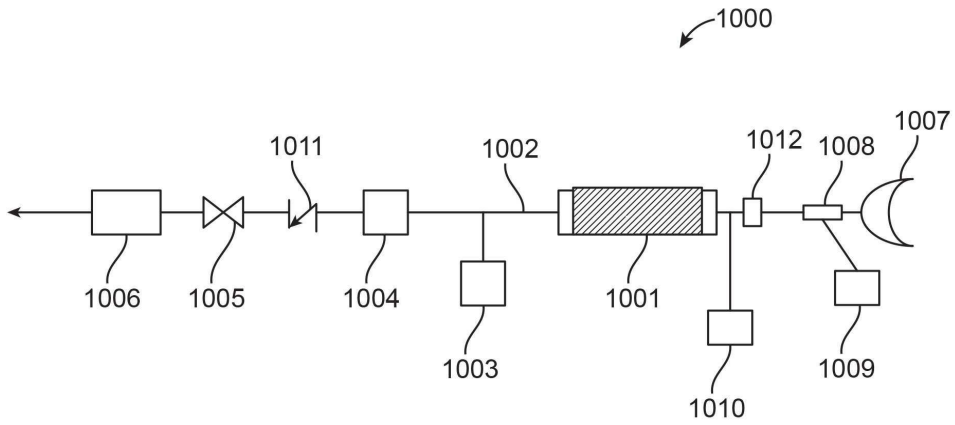
부호의 설명

[0137] 900: 에어로졸 수집 시스템, 901: 주면 에어로졸 방출 챔버, 902: 샘플 포착 요소, 903: 펌프, 904: 트랩, 905: 휴대용 레이저 입자 계수기, 1000: 호기 샘플 수집 시스템, 1001: 샘플 포착 쵸소, 1002: 튜브 1003: 트랩, 1005: 니들 밸브, 1006: 펌프, 1007: 호흡 수집 요소, 1008: 흐름 분할기, 1009: HEPA 필터, 1010: 가습기, 1011: 체크 밸브, 1012: 대형 입자 트랩, 1300: 예시적인 시스템, 1301: 샘플 포착 요소, 1302: 유입구 단부, 1303: 유출구 단부, 1304: 펌프, 1307: 전원 공급 장치, 1309 흐름 제한기, 1311: CO_2 센서, 1312: 저장조, 1313: 휴대용 시스템, 1314: 포트, 1400, 1400A: 에어로졸 수집 시스템, 1401: 인클로저, 1402: 전원 공급 장치, 1404: 분무기, 1405: 물 용기, 1406: 펌프, 1407: 포착 요소, 1408: 유입구 단부, 1409: 유출구 단부,

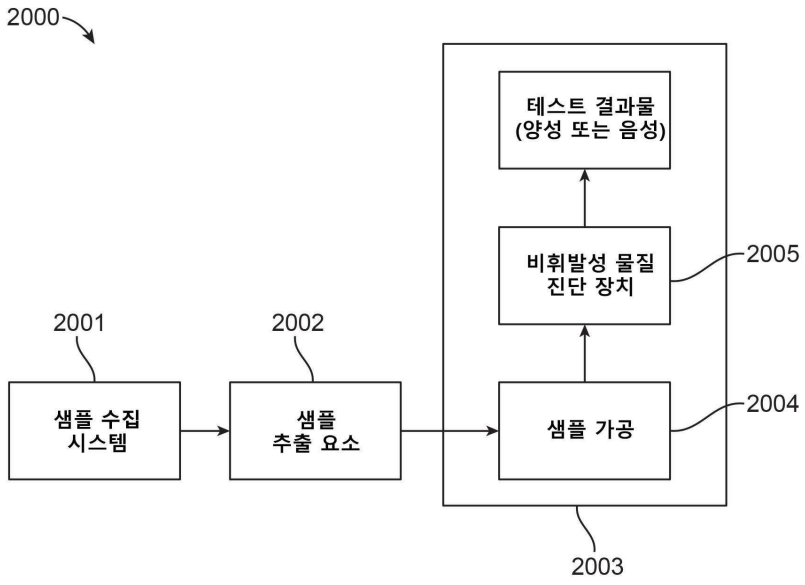
1410: 유체 모듈, 1411: 케이블, 1412: 온/오프 전원 스위치, 1413: 모듈, 1414: 저장조, 1415: 도관, 1416: 매니폴드, 1417: 유출구 포트, 1418: 유입구 포트, 1419: 매니폴드, 1420: 저장조, 1421: 포트, 2000: 진단 시스템, 2001: 호흡 샘플 수집 시스템, 2002: 샘플 추출 시스템, 2003: 분석 시스템, 2004: 샘플 처리 시스템, 2005: 진단 장치, 3000: 진단 방법, 3001, 3002, 3004, 3005, 3006: 단계, 7000: 샘플 수집 시스템, 7001: 샘플 포착 요소, 7003: 트랩, 7005: 니들 폼프, 7007: CPR 구조 마스크, 7008: 스템, 7009: HEPA 필터, 7010: 산소 유입구.

도면

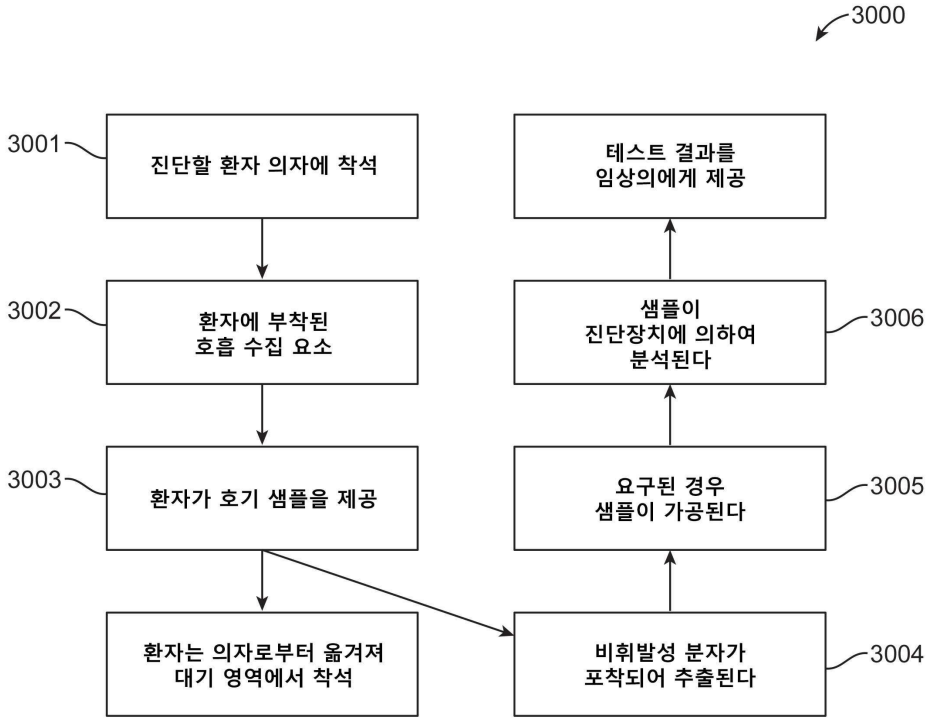
도면1



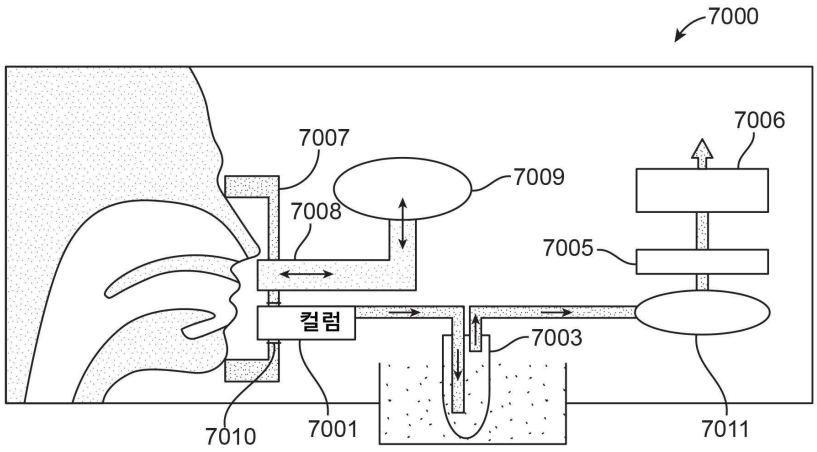
도면2



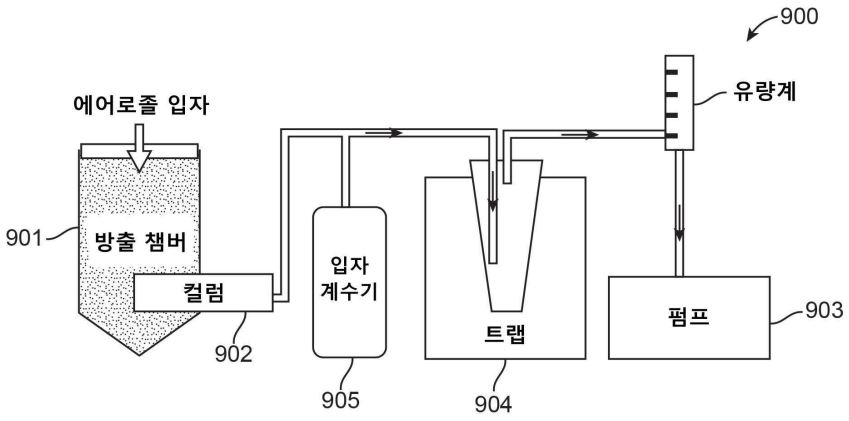
도면3


3000
3001
진단할 환자 의자에 착석
3002
환자에 부착된
호흡 수집 요소
3003
환자가 호기 샘플을 제공
환자는 의자로부터 옮겨져
대기 영역에서 착석
테스트 결과를
임상의에게 제공
3006
샘플이
진단장치에 의하여
분석된다
3005
요구된 경우
샘플이 가공된다
3004
비휘발성 분자가
포착되어 추출된다

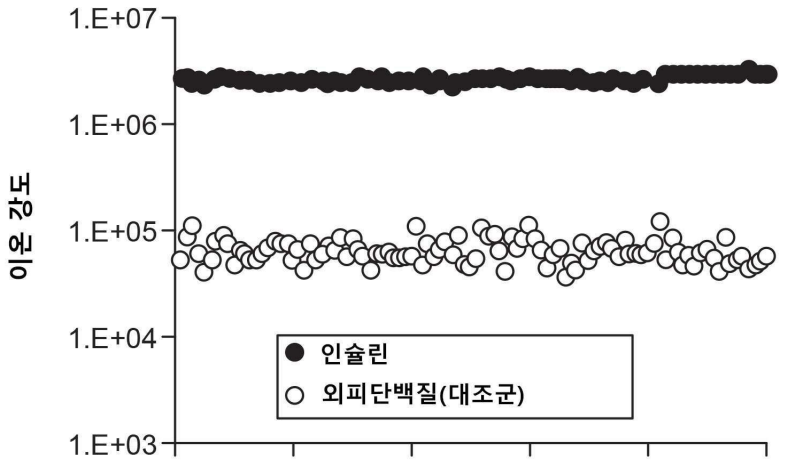
도면4


7000
7007
7009
7006
7008
7005
컬럼
7003
7010
7001
7011

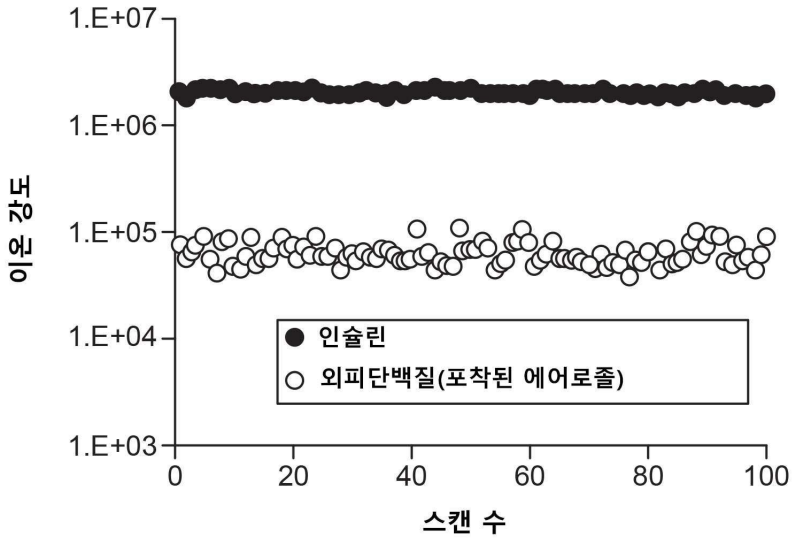
도면5



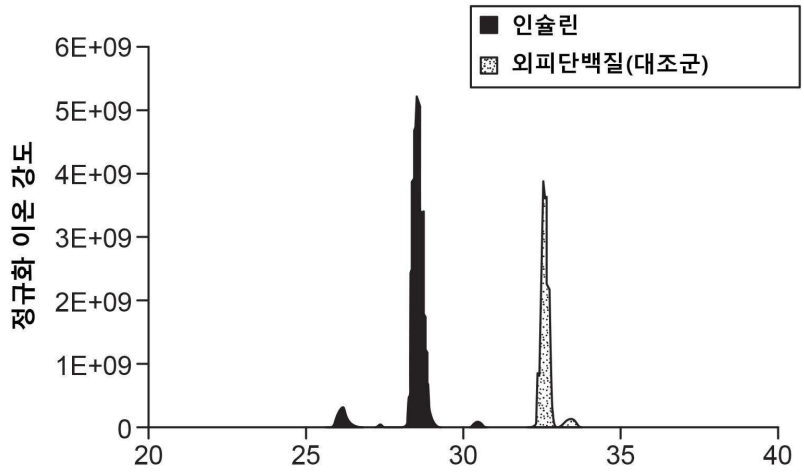
도면6a



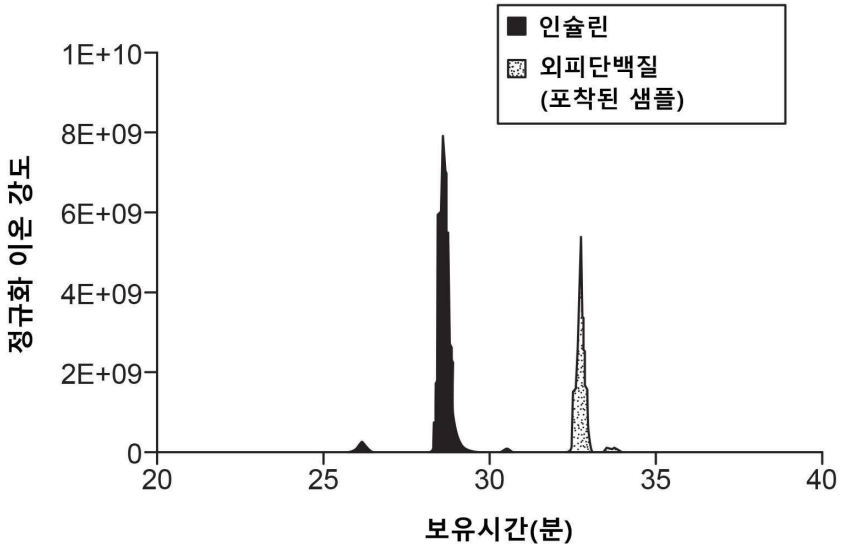
도면6b



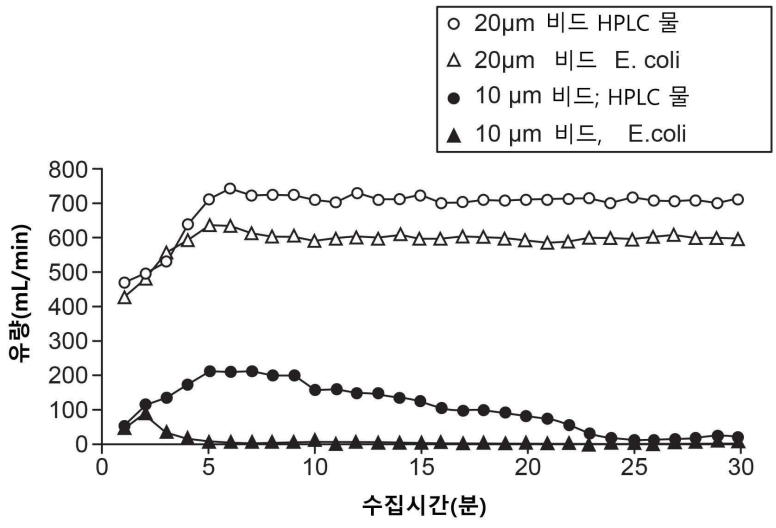
도면7a



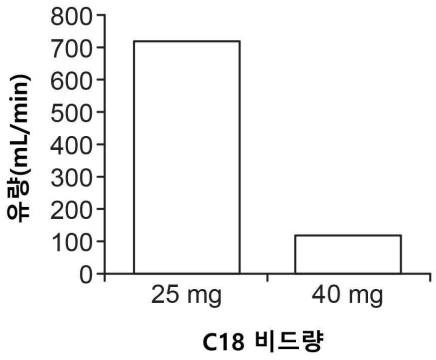
도면7b



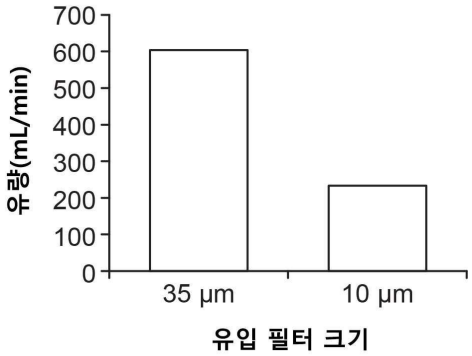
도면8a



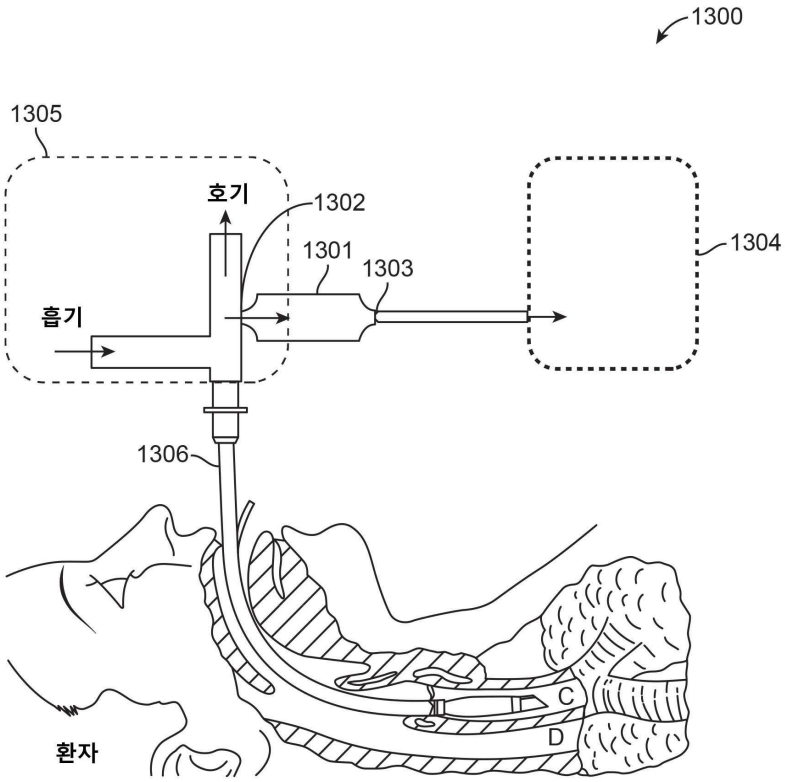
도면8b



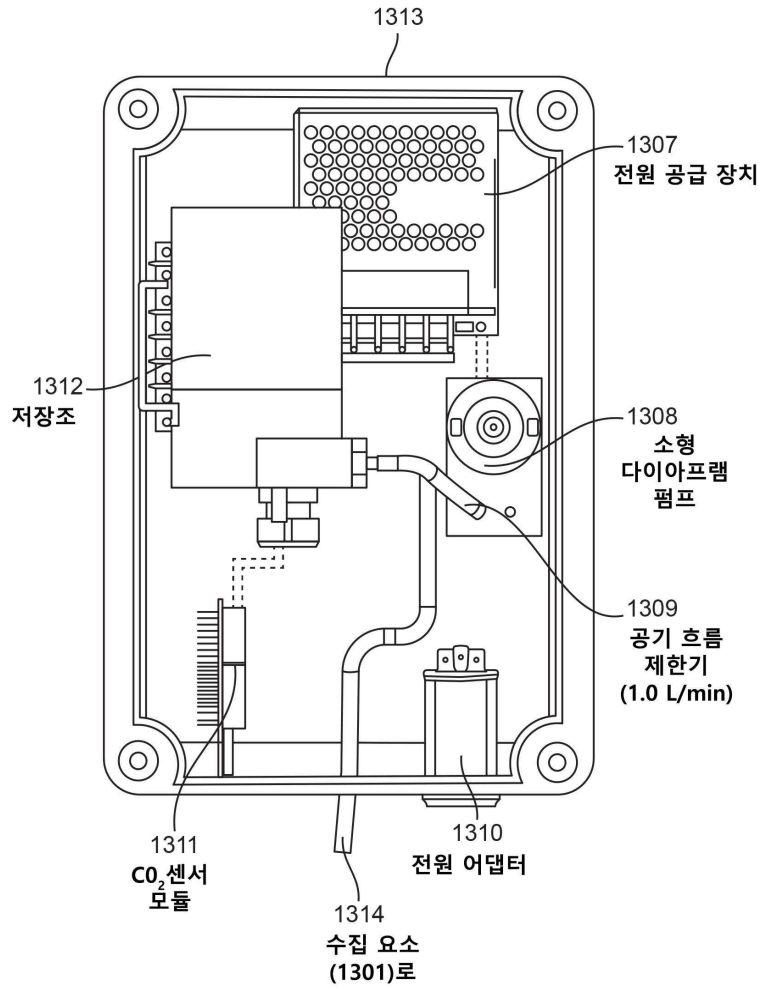
도면8c



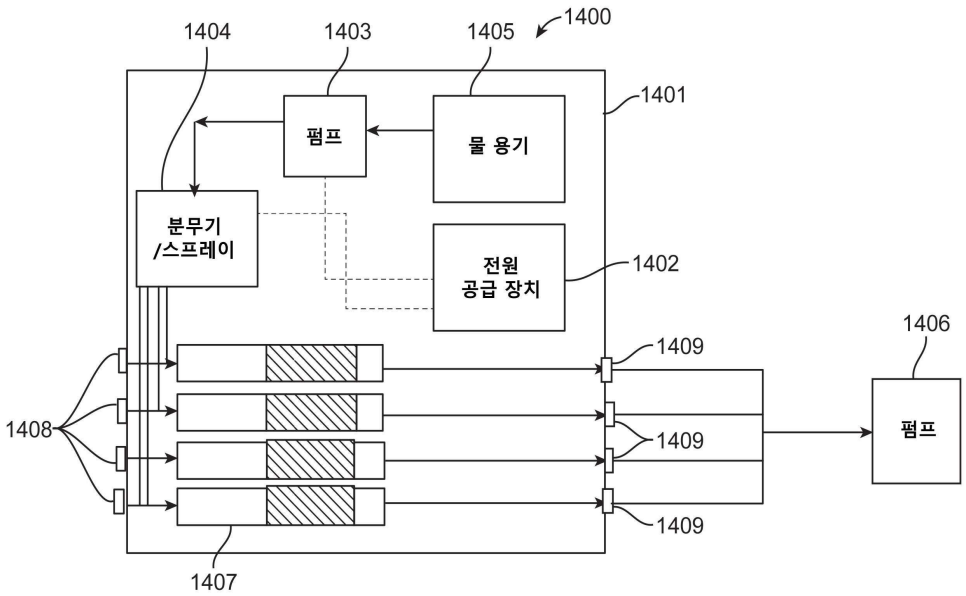
도면9a



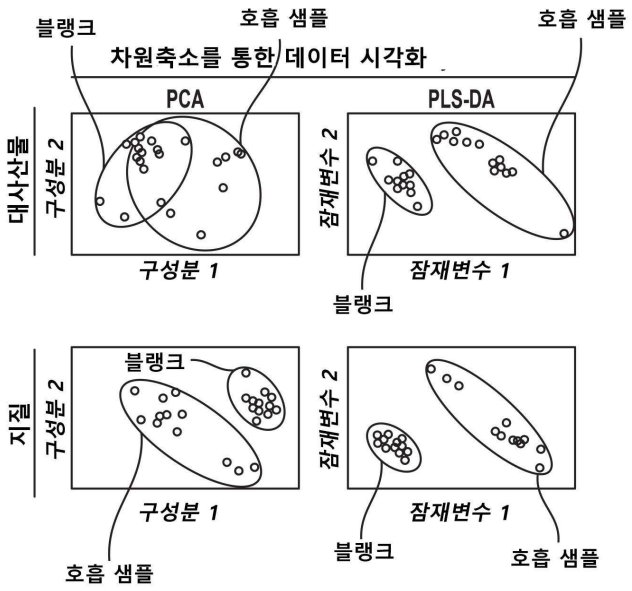
도면9b


1313
1307
전원 공급 장치
1312
저장조
1308
소형
다이아프램
펌프
1309
공기 흐름
제한기
(1.0 L/min)
1311
$C0_2$센서
모듈
1310
전원 어댑터
1314
수집 요소
(1301)로

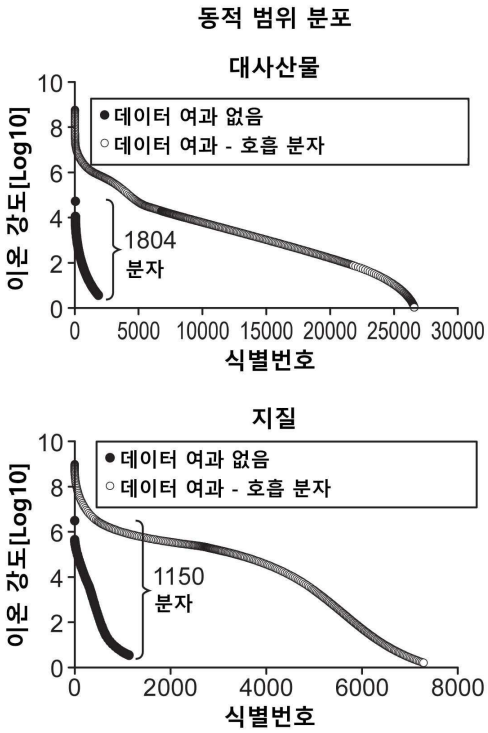
도면10


1404
1403
1405
1400
1401
펌프
물 용기
분무기
/스프레이
전원
공급 장치
1402
1406
1409
1408
1409
펌프
1409
1407

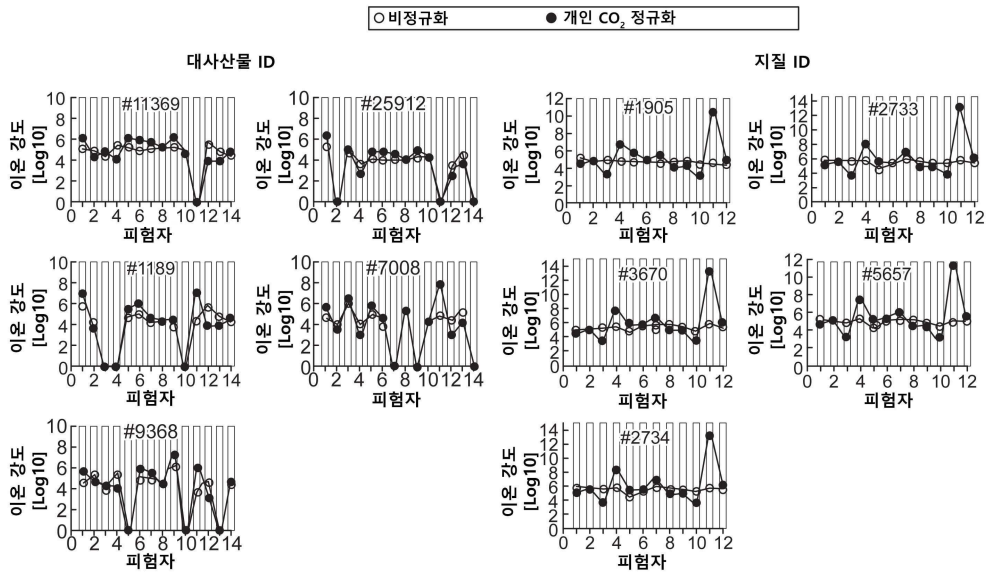
도면11a


블랭크
호흡 샘플
호흡 샘플
차원축소를 통한 데이터 시각화
PCA
PLS-DA
대사산물
구성분 2
구성분 1
잠재변수 2
잠재변수 1
블랭크
지질
구성분 2
구성분 1
블랭크
호흡 샘플
잠재변수 2
잠재변수 1
블랭크
호흡 샘플

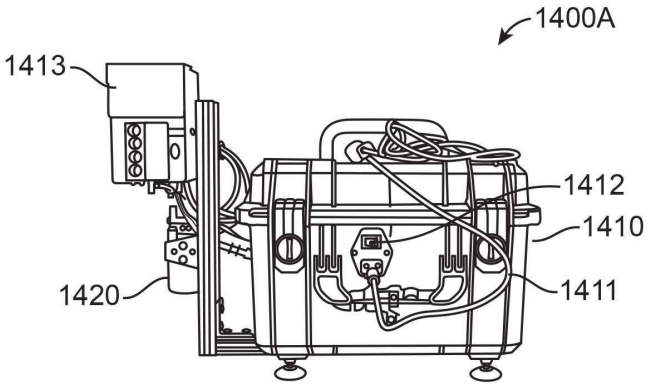
도면11b


동적 범위 분포
대사산물
데이터 여과 없음
데이터 여과 - 호흡 분자
이온 강도[Log10]
1804
분자
식별번호
지질
데이터 여과 없음
데이터 여과 - 호흡 분자
이온 강도[Log10]
1150
분자
식별번호

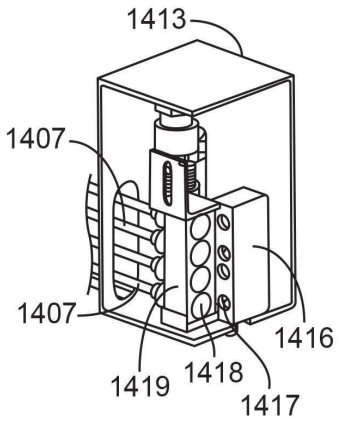
도면11c



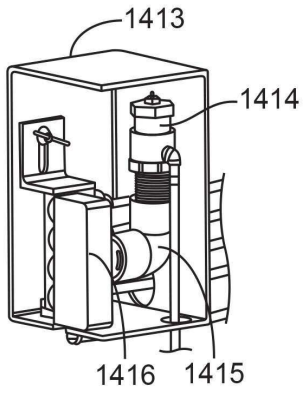
도면12a



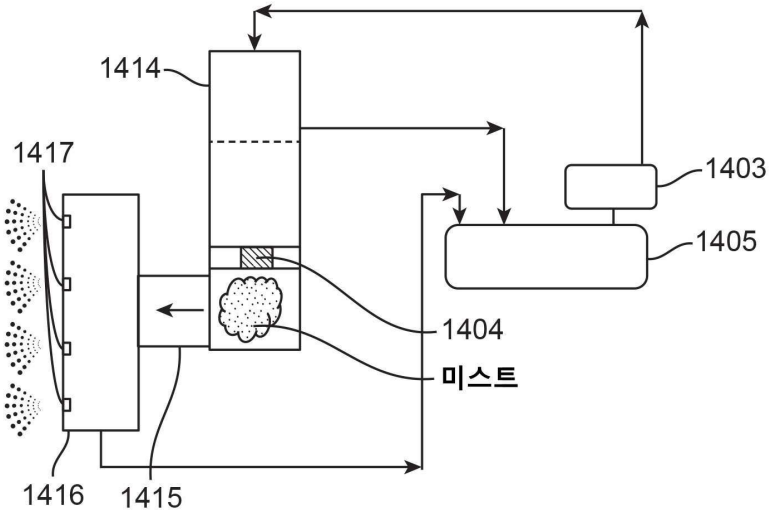
도면12b



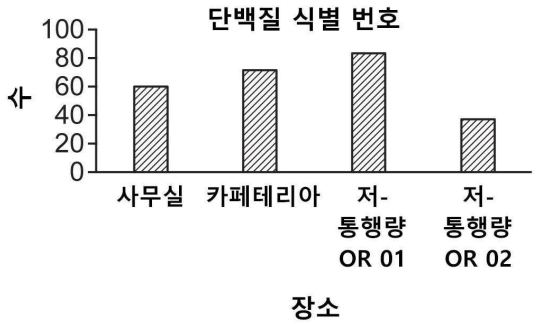
도면12c



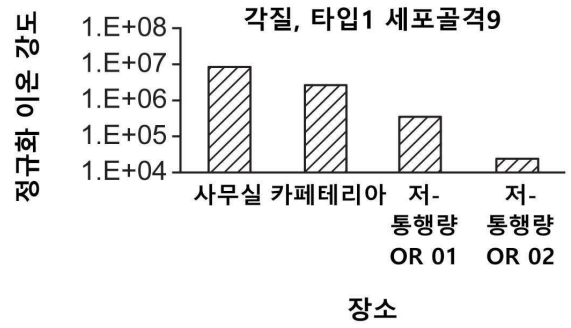
도면12d



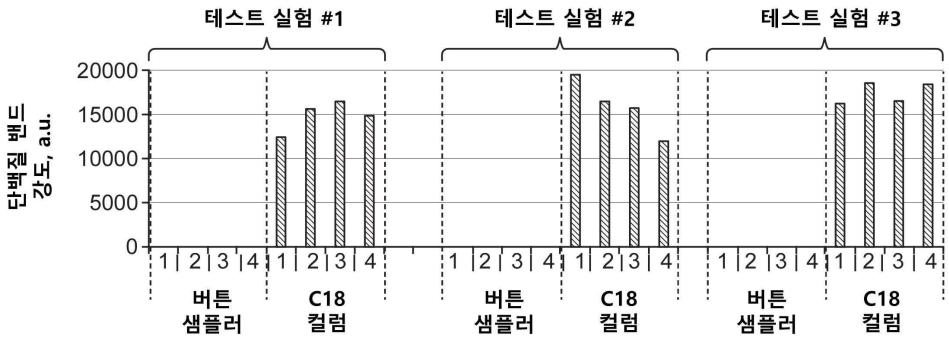
도면13a



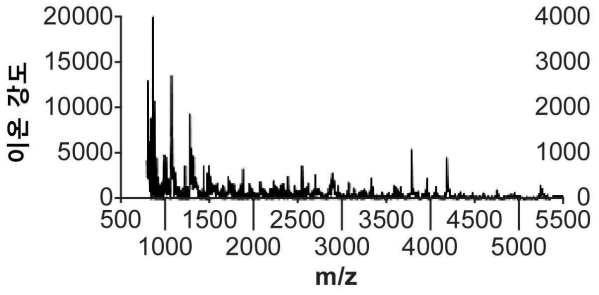
도면13b



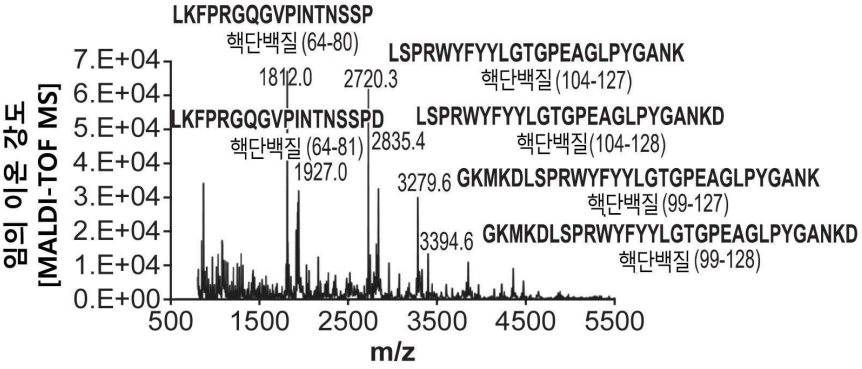
도면14



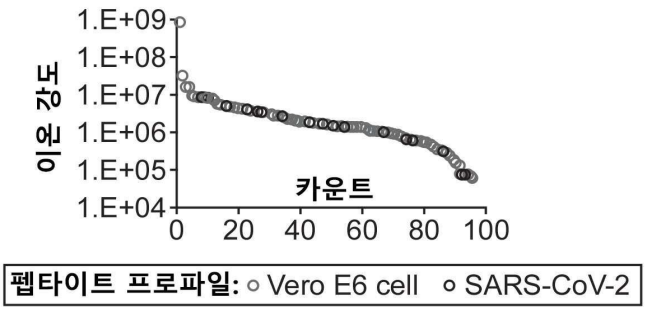
도면15a



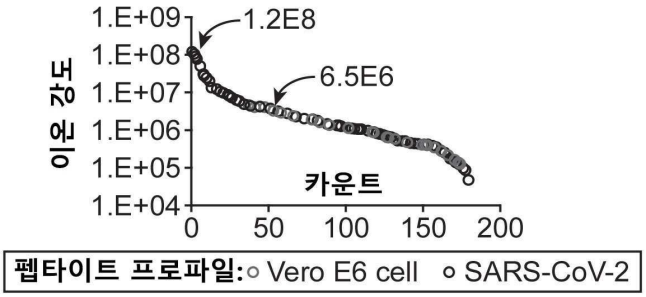
도면15b



도면15c



도면15d



도면15e

허용 누락 절단 번호	유기체 식별	단백질	점수	예상	매치
0	핵단백질 OS=중증급성 호흡기 증후군 코로나 바이러스 2 OX=2697049 GN=N PE=1 SV=1	NCAP_SARS2	59	0.78	6
1			126	1.40E-07	15
2			211	4.50E-16	24
3			250	5.70E-20	28
4			230	5.70E-18	28
5			236	1.40E-18	29
6			232	3.60E-18	29
7			231	4.50E-18	29
8			230	5.70E-18	29
9			230	5.70E-18	29