



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0146614  
(43) 공개일자 2022년11월01일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A01N 1/02 (2006.01) C12N 15/10 (2017.01)
- (52) CPC특허분류  
A01N 1/0221 (2013.01)  
A01N 1/0284 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7033822
- (22) 출원일자(국제) 2021년02월26일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년09월28일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2021/019887
- (87) 국제공개번호 WO 2021/173983  
국제공개일자 2021년09월02일
- (30) 우선권주장  
62/982,856 2020년02월28일 미국(US)

- (71) 출원인  
업카라 인코포레이티드  
미국 48109 미시간주 앤아버 알렘 2390 빌딩 520  
하런 파크웨이 1600
- (72) 발명자  
모한티 프라만수 에스.  
미국 48109 미시간주 앤아버 알렘 2390 빌딩 520  
하런 파크웨이 1600 업카라 인코포레이티드 내  
다스 서브헨두  
미국 48109 미시간주 앤아버 알렘 2390 빌딩 520  
하런 파크웨이 1600 업카라 인코포레이티드 내  
브른사르트 라우라  
미국 48109 미시간주 앤아버 알렘 2390 빌딩 520  
하런 파크웨이 1600 업카라 인코포레이티드 내
- (74) 대리인  
유미특허법인

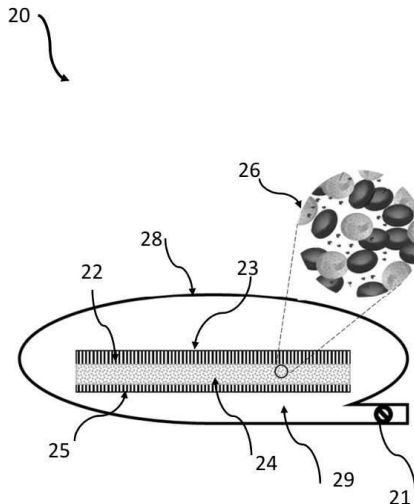
전체 청구항 수 : 총 36 항

(54) 발명의 명칭 모세관 보조 유리화 방법 및 생물학적 시료의 보존을 위한 물질

(57) 요약

생물학적 시료로부터 핵산의 저장을 위한 방법이 개시된다. 상기 방법은 생물학적 시료 안에 핵산을 함유하는 하나 이상의 세포를 포함하는 상기 생물학적 시료를 제공하는 단계; 상기 생물학적 시료를 유리화제(vitrification agent) 및 용해제를 포함하는 유리화 배지와 접촉시켜, 유리화 혼합물을 형성하는 단계; 상기 유리화 혼합물을 유리화시켜, 저장-안정한 시료를 생성하는 단계를 포함한다. 다양한 양태에서, 저장-안정한 시료는 극저온(cryogenic temperature) 초과의 온도, 예컨대 실온에서 20일 이상 동안 저장될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류  
*C12N 15/1003* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

생물학적 시료의 저장 방법으로서,

하나 이상의 세포를 그 안에 포함하는 생물학적 시료를 제공하는 단계;

상기 생물학적 시료를 유리화제(vitrification agent) 및 용해제를 포함하는 유리화 배지와 접촉시켜, 유리화 혼합물을 형성하는 단계;

상기 유리화 혼합물을 유리화시켜, 저장-안정한 시료를 생성하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 저장-안정한 시료를 16℃ 이상 내지 30℃ 이하, 선택적으로 30℃ 초과, 선택적으로 50℃ 초과의 온도에서 저장하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 핵산, 선택적으로 RNA를 포함하는, 방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 전혈, 혈장, 또는 혈청을 포함하는, 방법.

#### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 전혈을 포함하고, 상기 유리화 혼합물은 항응고제를 추가로 포함하는, 방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 유리화 혼합물은 완충제를 추가로 포함하는, 방법.

#### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 유리화제는 디메틸설폭사이드, 글리세롤, 당(sugar), 폴리알코올, 메틸아민, 베타인, 동결방지(antifreeze) 단백질, 합성 핵형성방지제(anti-nucleating agent), 폴리비닐 알코올, 사이클로헥산트리올, 사이클로헥산디올, 무기 염, 유기 염, 이온성 액체, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

#### 청구항 8

제7항에 있어서,

상기 유리화제는 트레할로스를 포함하는, 방법.

**청구항 9**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 용해제는 세제를 포함하는, 방법.

**청구항 10**

제9항에 있어서,  
상기 세제는 소듐 도데실 설페이트(SDS), 2-[4-(2,4,4-트리메틸펜탄-2-일)페녹시]에탄올(예를 들어, Triton X-100), CHAPS(3-[(3-콜아미도프로필)디메틸암모니오]-1-프로판설포네이트), 구아니딘 하이드로클로라이드, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

**청구항 11**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 저장-안정한 시료를 보호용 인클로저(protective enclosure)에 봉입(enclosing)하는 단계, 및 상기 보호용 인클로저를 -196℃ 내지 +60℃의 온도에서 20일 이상의 저장 시간 동안 저장하는 단계를 추가로 포함하고, 상기 인클로저는 물 및 공기에 불침투성(impervious)인, 방법.

**청구항 12**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 유리화 혼합물을 유리화시키는 단계는 유리화 혼합물이 유리질 상태(glassy state)로 진입할 때까지 극저온(cryogenic temperature) 초과에서 유리화 혼합물을 건조시키는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 13**

제12항에 있어서,  
상기 유리화 배지는 하나의 또는 복수의 모세관 채널 내에 존재하는, 방법.

**청구항 14**

제12항에 있어서,  
상기 유리화는 1초 내지 1시간, 선택적으로 10분 이하의 건조 시간 동안 수행되는, 방법.

**청구항 15**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 유리화 혼합물을 유리화 전에 5분 이상 내지 30분 이하 동안 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

**청구항 16**

제15항에 있어서,  
상기 인큐베이션은 18℃ 이상 내지 37℃ 이하의 온도에서 수행되는, 방법.

**청구항 17**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 생물학적 시료는 그 안에 하나 이상의 단리제(isolation agent)를 포함하는 단리 배지와 접촉함으로써 전 처리되는, 방법.

**청구항 18**

제17항에 있어서,

상기 단리제는 만노스 결합 렉틴인, 방법.

**청구항 19**

제17항에 있어서,

상기 단리 배지는 니트로셀룰로스 또는 폴리비닐리덴 디플루오라이드를 포함하는, 방법.

**청구항 20**

극저온 초과에서 조직을 저장하는 방법으로서,

하나 이상의 세포를 포함하는 생물학적 조직을 제공하는 단계;

상기 생물학적 조직을 유리화제 및 지지체(support) 물질, 선택적으로 중합체 지지체 물질을 포함하는 유리화 배지와 접촉시켜, 유리화 혼합물을 형성하는 단계;

상기 유리화 혼합물을 유리화시켜, 저장-안정한 시료를 생성하는 단계

를 포함하는, 방법.

**청구항 21**

제20항에 있어서,

상기 중합체는 하이드로겔을 형성하기에 적합한, 방법.

**청구항 22**

제20항에 있어서,

상기 중합체는 폴리에틸렌 글리콜인, 방법.

**청구항 23**

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 유리화 배지는 하나 이상의 부착제를 추가로 포함하는, 방법.

**청구항 24**

제23항에 있어서,

상기 부착제는 보론산인, 방법.

**청구항 25**

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 지지체 물질은 전환 가능한(switchable) 지지체 물질이고, 상기 방법은 상기 유리화 혼합물을 자극을 받게 하여 상기 전환 가능한 지지체 물질을 겔 상태로 전환시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

**청구항 26**

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 유리화 혼합물은 완충제를 추가로 포함하는, 방법.

**청구항 27**

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 유리화제는 디메틸설폭사이드, 글리세롤, 당, 폴리알코올, 메틸아민, 베타인, 동결방지 단백질, 합성 핵형성방지제, 폴리비닐 알코올, 사이클로헥산트리올, 사이클로헥산디올, 무기 염, 유기 염, 이온성 액체, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

**청구항 28**

제27항에 있어서,  
상기 유리화제는 트레할로스를 포함하는, 방법.

**청구항 29**

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 저장-안정한 시료를 보호용 인클로저에 봉입하는 단계, 및 상기 보호용 인클로저를 -196℃ 내지 +60℃의 온도에서 20일 이상의 저장 시간 동안 저장하는 단계를 추가로 포함하고, 상기 인클로저는 물 및 공기에 불침투성인, 방법.

**청구항 30**

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 유리화 혼합물을 유리화시키는 단계는 유리화 혼합물이 유리질 상태로 진입할 때까지 극저온 초과에서 유리화 혼합물을 건조시키는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 31**

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 유리화 혼합물은 하나의 또는 복수의 모세관 채널 내에 존재하는, 방법.

**청구항 32**

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 유리화는 1초 내지 1시간, 선택적으로 10분 이하의 건조 시간 동안 수행되는, 방법.

**청구항 33**

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 유리화 혼합물을 유리화 전에 5분 이상 내지 30분 이하 동안 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

**청구항 34**

제33항에 있어서,  
상기 인큐베이션은 18℃ 이상 내지 37℃ 이하의 온도에서 수행되는, 방법.

**청구항 35**

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 유리화 혼합물은 용해제를 추가로 포함하는, 방법.

**청구항 36**

제35항에 있어서,  
상기 용해제는 소듐 도데실 설페이트(SDS), 2-[4-(2,4,4-트리메틸펜탄-2-일)페녹시]에탄올(예를 들어, Triton X-100), CHAPS(3-[(3-콜아미도프로필)디메틸암모니오]-1-프로판설포네이트), 구아니딘 하이드로클로라이드, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

**[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조**

**[0002]** 본 출원은 2020년 2월 28일에 출원된 미국 임시 출원 62/982,856호로부터 의존하고 이에 대해 우선권을 주장하며, 이의 전문은 본원에 참조로서 포함된다.

**[0003] 기술분야**

**[0004]** 본 개시내용은 생물학적 시료의 보존, 특히, 혈액, 침샘 또는 조직 시료 또는 일부의 보존을 위한 생물학적 물질의 유리화(vitrification)에 관한 것이다.

**배경 기술**

**[0005]** 유리화는 액체로부터 비정질 유리질 상태로의 직접 이행(transition) 방법이고, 생물학적 물질을 높은 냉각 속도에서 극저온(cryogenic temperature)까지 냉각시킴으로써 상기 생물학적 물질을 보존하는 데 종종 활용된다. 극저온에서, 유리화 기법은 종래의 동결보존 동안 형성되는 것으로 알려진 얼음 결정의 손상 효과를 피한다. 그러나, 냉각 동안 얼음-핵형성(ice-nucleation)을 피하기 위해, 극도로 높고 잠재적으로 독성인 농도(6-8 M)의 동결보호제(CPA: cryoprotectant)가 필요하다. 가장 보편적으로 사용되는 CPA 중에는 디메틸 설폭사이드(DMSO), 글리세롤, 에틸렌 글리콜(EG) 및 1,2-프로판디올(PROH)이 있다. 그 결과, CPA를 세포 내로 로딩(load)하고 언로딩(unload)하기 위해서는 다수의 단계 및 복잡하고 정교한 프로토콜이 필요하다.

**[0006]** 주위 온도에서의 무수 유리화는 생물학적 물질을 보존하기 위한 대안적인 전략일 수 있다. 자연상에서, 광범위하게 다양한 유기체는 많은 경우 세포내 공간에서 다량(이의 건조 중량의 20%)의 유리 형성 당, 예컨대 트레할로스 및 수크로스의 축적과 상관관계가 있는 극도의 탈수에서 생존할 수 있다. 그러나, 건식 보존 완충제는, 유리화 용액이 세포의 공간에서 농축됨에 따라 맞닥뜨리게 되는 점증적인 화학적 스트레스에 의한 생물학적 물질의 분해로 인해 장기간 저장에서 주요 제한을 겪게 된다. 이는 세포 전에 단백질 및 핵산에의 손상을 포함하여 비가역적인 세포 손상을 초래하고, 유리화 용액은 적합하게 낮은 수분 함량에 도달하여 유리질로 될 수 있다. 따라서, 단백질 및 핵산을 보존하는 한편, 신속한 건조에 의해 생물학적 물질을 유리화시키는 개선된 유리화 방법에 대한 필요성이 존재한다.

**발명의 내용**

**[0007]** 하기 요약은 본원에 기재된 다양한 양태의 이해를 용이하게 하기 위해 제공되고 완전한 설명은 아닌 것으로 의도된다. 다양한 양태의 완전한 이해는 전체 명세서, 청구범위, 도면, 및 요약서를 전반적으로 얻어서 수득될 수 있다.

**[0008]** 본원에서 다양한 양태는 유기체의 세포, 혈액, 침샘, 조직 또는 다른 시료 내로부터 그리고 생물학적 시료 내로부터 단백질, 구체적으로 세포내 핵산, 또는 다른 생물학적 물질의 저장 방법을 제공한다. 상기 방법은 생물학적 시료 안에 핵산을 함유하는 하나 이상의 세포를 포함하는 상기 생물학적 시료를 제공하는 단계; 상기 생물학적 시료를 유리화제(vitrification agent) 및 용해제를 포함하는 유리화 배지와 접촉시켜, 유리화 혼합물을 형성하는 단계; 및 상기 유리화 혼합물을 유리화시켜, 저장-안정한 시료를 생성하는 단계를 포함한다. 다양한 양태에서, 저장-안정한 시료는 극저온 초과의 온도, 예컨대 실온 이상에서, 선택적으로 20일 이상 동안 저장될 수 있다.

**[0009]** 또한, 구조적 지지체(structural support)를 제공하고 세포 손상 물질을 도입하지 않아 후속적인 조직학 또는 다른 조직 연구를 위해 세포성 구조를 더 효과적으로 보존하는, 조직 시료를 보존하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 표적 생물학적 조직을 중합체, 유리화제, 및 선택적으로 중합체를 조직 내 세포의 세포의 구조의 하나 이상의 구성요소에 연결하기에 적합한 가교제 및/또는 에너지와 접촉시키는 단계; 상기 조직을 유리화시켜, 유리화된 조직 시료를 형성하는 단계, 및 선택적으로 상기 조직(유리화 전 또는 후)을 조직의 하나 이상의 얇은 스트립(strip)으로 박절(section)하는 단계를 포함한다. 상기 방법은 선택적으로 상기 유리화된 조직을 조직으로부터 중합체를 방출하는 방출제 및/또는 에너지로 재수화시켜, 가시적으로 잘-보존된 조직이 후속적인 분석에 이용 가능하게 되는 단계를 추가로 포함한다.

**도면의 간단한 설명**

**[0010]** 도면은 반드시 척도(scale)대로인 것은 아니며; 일부 특질은 특정 구성요소의 세부사항을 보여주기 위해 과장되거나 최소화될 수 있다. 따라서, 본원에 개시된 특정 구조적 및 기능적 세부사항은 제한적인 것으로 해석되어서는 안되며, 당업자가 본 발명을 다양하게 이용하기 위한 대표적인 기초로서 해석되어야 한다. 예시적인 양태

는 상세한 설명 및 첨부된 도면으로부터 더 완전히 이해되게 될 것이며, 도면에서:

도 1은 본원에 제시되고 기재된 하나 이상의 양태에 따라 사용될 수 있는 유리화 방법의 일례를 도식적으로 예시하며;

도 2는 본원에 제시되고 기재된 하나 이상의 양태에 따라 유리화용 막 내에서 유리화 배지 및 혈액 세포의 생물학적 시료를 예시하는 또 다른 예시적인 유리화 방법을 도식적으로 예시하고;

도 3은 본원에 제시되고 기재된 하나 이상의 양태에 따라 생성되는 저장-안정한 시료로부터 RNA를 추출하는 예시적인 방법을 도식적으로 예시하며;

도 4는 오염물질, 예컨대 박테리아 또는 다른 바람직하지 못한 유기체로부터 원하는 물질의 단리 및 선택적인 분리를 위한 예시적인 시스템을 예시하고;

도 5는 종래의 핵산 저장 기법을 사용하여 비교예 A 내지 C로부터 추출된, 그리고 본원에 제시되고 기재된 하나 이상의 양태에 따라 핵산을 저장하는 방법을 사용하여 실시예 1에 대해 추출된 RNA의 분해를 보여주는 전기영동 겔의 이미지이며;

도 6a는 본원에 제시되고 기재된 하나 이상의 양태에 따라 비교예 D와 E 및 실시예 B에 대해 GAPDH에 대한 주기역치 값을 보여주는 그래프이고;

도 6b는 본원에 제시되고 기재된 하나 이상의 양태에 따라 비교예 D와 E 및 실시예 B에 대해 GAPDH에 대한 주기역치 값 배수 변화를 보여주는 그래프이며;

도 6c는 본원에 제시되고 기재된 하나 이상의 양태에 따라 비교예 D와 E 및 실시예 B에 대해 VEGF mRNA에 대한 배수 변화를 보여주는 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 본원에 기재된 다양한 양태는 유리화제 및 선택적인 용해제를 포함하는 유리화 배지를 사용하여 세포, 조직, 또는 세포성 물질, 예컨대 단백질(예시적으로 항체 또는 다른 단백질 물질), 핵산 또는 다른 것들을 제조하고 저장하는 방법을 제공한다. 다양한 양태에서, 생물학적 시료 안에 함유된 핵산을 갖는 하나 이상의 세포를 포함하는 상기 생물학적 시료는 유리화 배지와 접촉되고 유리화되어, 저장-안정한 시료를 생성할 수 있다. 특히, 다양한 양태는 극저온 초과 온도, 더 구체적으로 실온 이상에서 핵산의 보존 및 저장을 가능하게 하고, 강력한, 잘-보존된 생물학적 물질을 유지시킨다. 이러한 양태는 예를 들어, 냉장 또는 동결에 대한 필요성을 제거함으로써 저장 비용을 유의하게 감소시킬 수 있고, 핵산(예를 들어, DNA 및/또는 RNA)의 품질에 악영향을 미치지 않으면서 저장용 시료의 제조를 단순화시킬 수 있다. 이에, 재구성 시, 고품질의 조직, 세포, 단백질, RNA 및 DNA를 포함한 핵산은 이후에 사용될 수 있다.
- [0012] 더욱이, 본원에 기재된 다양한 양태는 침샘, 혈액, 조직, 또는 다른 생물학적 시료가 최소 수준의 전가공(pre-processing)으로 공정되고 저장되게 할 수 있으며, 이는 시료가 저장 후 임의의 광범위하게 다양한 목적을 위해 사용되게 할 수 있다. 예를 들어, 종양의 조직 시료는 연장된 기간 동안 저장되고 예컨대 이후의 RNA 맵핑 분석에 사용하기 위해 이후에 적절한 프로토콜에 따라 가공될 수 있다. 또 다른 예로서, 전혈 시료는 우선 혈장을 적혈구 및 백혈구 세포로부터 분리하지 않으면서 저장되어, 저장된 시료의 구성요소 중 임의의 하나 이상이 이후에 사용되게 할 수 있다.
- [0013] 본원에 사용된 하기 용어 또는 어구는 적어도 하나의 양태와 함께 아래에 나열된 예시적인 의미를 갖는다:
- [0014] "비정질" 또는 "유리"는 0.3 이하의 차수 파라미터(order parameter)를 참조하여 원자 위치의 장거리 차수가 없는 비(非)-결정질 물질을 지칭한다. 유리전이온도  $T_g$ 에서 액체가 유리질(vitreous) 고체로 변환되는 현상이 발생한다. 일부 양태에서, 유리화 배지는 비정질 물질이거나 이를 형성할 수 있다. 다른 양태에서, 생물학적 물질은 비정질 물질일 수 있다.
- [0015] "유리 전이 온도"는 이 온도 초과에서는 물질이 액체처럼 거동하고 이 온도 미만에서는 물질이 고체상과 유사한 방식으로 거동하고 비정질/유리질 상태로 진입하는 온도를 의미한다. 이는 온도에서 고정점이 아니지만, 대신에 사용되는 측정의 시간척도(timescale)에 따라 가변적이다. 일부 양태에서, 유리질 상태는 생물학적 조성물이 이의 유리 전이 온도 미만으로 하락 시 진입하는 상태를 지칭할 수 있다. 다른 양태에서, 유리질 상태는 유리화 혼합물의 상태를 지칭할 수 있고/있거나 유리화제는 이의 유리 전이 온도 미만으로 하락 시 진입한다. 더

육 다른 양태에서, 유리질 상태는 결정 또는 겔의 기계적 강성(rigidity)을 가질 수 있으나, 액체를 특징화하는 분자의 무작위하게 무질서한 배열을 가질 수 있다.

- [0016] "결정"은 하나의 특정하게 정돈된 기하학적 어레이, 주기적으로 반복되고 명명되는 격자(lattice) 또는 단위 세포로 구성된 3-차원 원자, 이온, 또는 분자 구조를 의미한다.
- [0017] "결정질"은 유리질 또는 비정질과 대조적으로 원자 수준에서 정돈된 구조로 배열된 구성분으로 이루어진 성분의 형태를 의미한다. 결정질 고체의 고체화는 결정화 온도  $T_c$ 에서 발생한다.
- [0018] 본원에 사용되는 바와 같이, "유리화"는 물질을 비정질 물질로 전환시키는 방법이다. 비정질 고체는 임의의 결정질 구조가 없을 수 있다.
- [0019] 본원에 사용되는 바와 같이, "유리화 혼합물"은 생물학적 물질(들) 및 하나 이상의 유리화제를 함유하는 유리화 배지, 선택적으로 용해제, 및 선택적으로 다른 물질의 불균질한 혼합물을 의미한다.
- [0020] 본원에 사용되는 바와 같이, "생물학적 물질" 또는 "생물학적 시료"는 살아 있는 유기체(들)로부터 단리되거나 유래될 수 있는 물질을 지칭한다. 생물학적 물질의 예는 단백질, 세포, 조직, 기관, 세포-기초 작제물, 혈액 또는 이의 분획, 핵산, 또는 이들의 조합을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 일부 양태에서, 생물학적 물질은 포유류 세포를 지칭할 수 있다. 다른 양태에서, 생물학적 물질은 인간 중간엽 줄기세포, 무린 섬유아세포 세포, 백혈구 세포, 적혈구 세포, 혈액 혈소판, 박테리아, 바이러스, 포유류 세포, 리포솜, 효소, 조직(예를 들어 장, 간, 신경, 또는 다른 것들), 또는 이들의 조합을 지칭할 수 있다. 다른 양태에서, 생물학적 물질은 정자 세포, 정모세포, 난모세포, 난자, 배아, 난핵포(germinal vesicle), 또는 이들의 조합을 포함한 생식세포를 지칭할 수 있다. 다른 양태에서, 생물학적 물질은 전혈, 적혈구 세포, 백혈구 세포, 혈소판, 혈액 혈장, 혈액 혈청, 조류(algae), 진균류(fungi), 또는 이들의 조합을 지칭할 수 있다.
- [0021] 본원에 사용되는 바와 같이, "유리화제"는 유리화제와 다른 물질(들)의 혼합물이 냉각되거나 건조함에 따라 비정질 구조를 형성하거나, 다른 물질(들)에서 결정의 형성을 억제시키는 물질이다. 유리화제(들)는 또한 삼투압 보호(osmotic protection)를 제공하거나 다르게는 탈수 동안 세포 생존을 가능하게 할 수 있다. 일부 양태에서, 유리화제(들)는 생물학적 물질의 저장을 위한 적합한 비정질 구조를 산출하는 임의의 수용액일 수 있다. 다른 양태에서, 유리화제는 세포, 조직, 또는 기관 내에 흡수될 수 있다.
- [0022] 본원에 사용되는 바와 같이, "저장 가능한," "저장," 또는 "저장-안정한"은 생물학적 물질의 보존되고 이후의 사용을 위해 생존한 채로 남아 있는 능력을 지칭한다.
- [0023] 본원에 사용되는 바와 같이, "극저온 초과"는  $-80^{\circ}\text{C}$  초과의 온도를 지칭한다. 본원에 사용되는 바와 같이, 이는  $18^{\circ}\text{C}$  이상 내지  $37^{\circ}\text{C}$  이하 범위의 온도를 지칭한다.
- [0024] 본원에 사용되는 바와 같이, "친수성"은 물 분자를 우선적으로 끌어당기거나 이와 회합함을 의미한다. 물에 대해 특수한 친화도를 갖는 친수성 물질은 물과의 접촉을 최대화하고 물과 더 작은 접촉각을 갖는다.
- [0025] 본원에 사용되는 바와 같이, "소수성"은 물에 대한 친화도가 결여됨을 의미한다. 소수성인 물질은 천연적으로 물을 반발시켜, 액적으로 형성하고, 물과 작은 접촉각을 갖는다.
- [0026] 본원에 사용되는 바와 같이, "주위 온도"는 약  $16^{\circ}\text{C}$  이상 내지 약  $30^{\circ}\text{C}$  이하의 온도를 지칭한다.
- [0027] 본원에 기재된 다양한 양태는 생물학적 시료로부터 생물학적 물질의 저장 방법을 제공한다. 다양한 양태에 따르면, 생물학적 시료 안에 하나 이상의 세포를 포함하는 상기 생물학적 시료는 유리화 배지와 접촉되어 유리화 혼합물을 형성한다. 아래 더 상세히 기재될 바와 같이, 유리화 배지는 적어도 하나의 유리화제 및 선택적인 용해제를 포함한다. 유리화 혼합물은 유리화되어, 추가 사용 시까지 저장될 수 있는 저장-안정한 시료를 생성한다. 저장-안정한 시료는 이후에 재수화되고 가공되어, 생물학적 시료 또는 이의 일부를 추출하거나 특징화할 수 있고, 이는 그 후에 정량적, 정성적, 및/또는 임상적 분석에 사용될 수 있다.
- [0028] 다양한 양태에서, 유리화 배지는 적어도 하나의 유리화제 및 용해제를 포함한다. 유리화제의 예시적인 예는 디메틸설폭사이드, 글리세롤, 당(예를 들어 트레할로스 등), 폴리알코올, 메틸아민, 베타인, 동결방지 단백질, 합성 핵형성방지제, 폴리비닐 알코올, 사이클로헥산트리올, 사이클로헥산디올, 무기 염, 유기 염, 이온성 액체, 또는 이들의 조합을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 양태에서, 1, 2, 3, 4개 이상의 유리화제가 유리화 배지에 포함된다.
- [0029] 유리화제는 이러한 유리화제의 정체성(identity)에 의존하는 농도에서 유리화 배지에 포함된다. 일부

양태에서, 유리화제의 농도는 유리화되는 생물학적 시료에 독성이 될 농도 미만이다. 본원에 사용되는 바와 같이, "독성"은 후속적인 시료 사용 시 기능적 또는 생물학적 생존력(viability)이 달성되지 않거나, 생물학적 시료가 후속적인 분석에 적합하지 않음을 의미한다. 다양한 양태에서, 유리화제의 농도는 500 마이크로몰( $\mu\text{M}$ ) 이상 내지 6 몰(M) 이하, 또는 그 사이의 임의의 값 또는 범위이다. 일례로, 트레할로스는 다양한 양태에서 1 밀리몰(mM) 이상 내지 6 M 이하, 선택적으로 150 mM 이상 내지 6 M 이하의 농도로 포함된다. 일부 양태에서, 조합될 때 모든 유리화제의 총 농도는 1 mM 이상 내지 6 M 이하, 선택적으로 1 mM 이상 내지 6 M 이하이다.

[0030] 본원에 제공된 바와 같은 유리화 배지는 선택적으로 용해제를 포함한다. 용해제는 유리화 배지에 포함되어 세포막 및 선택적으로 핵을 부분적으로 또는 완전히 천공하거나 더 다공성으로 만들어 세포 내로의 유리화제의 수송 및 세포 외부로의 수분의 수송을 용이하게 하여 빠른 유리화를 가능하게 한다. 용해제는 예를 들어 비제한적으로, 세제일 수 있다. 사용하기에 적합한 세제는 소듐 도데실 설페이트(SDS), 2-[4-(2,4,4-트리메틸펜탄-2-일)페녹시]에탄올(예를 들어, Triton X-100), CHAPS(3-[(3-콜아미도프로필)디메틸암모니오]-1-프로판설포네이트), 구아니딘 하이드로클로라이드, 다른 유사한 제제, 및 이들의 조합을 포함할 수 있다. 다른 용해제가 가능하며, 단, 이들 용해제는 유리화 방법을 방해하지 않거나 원하는 생물학적 물질에 독성이 아니다. 다양한 양태에서, 용해제는 유리화 배지에 0.01 중량 퍼센트(중량%) 내지 5 중량% 이상의 양으로 존재한다. 용해제의 특정 양은 특정 양태, 더 구체적으로 원하는 세포막 투과 수준에 따라 다양할 수 있다. 예를 들어, 일부 양태에서 용해제는 세포를 완전히 용해시킬 수 있는 한편, 다른 양태에서 용해제는 단순히 세포막을 관통하거나 뚫어서 막을 가로질러 유리화제의 개선된 전달을 용이하게 할 수 있다.

[0031] 일부 양태에서, 유리화 배지는 다른 구성요소, 예컨대 비제한적으로 물 또는 다른 용매, 완충제, 하나 이상의 염, RNase 또는 DNase 저해제, 또는 이들의 조합을 추가로 포함할 수 있는 것으로 여겨진다. 완충제는 25°C에서 6 내지 8.5의  $K_a$ 를 갖는 임의의 제제이다. 완충제의 예시적인 예는 특히 콜린, 베타인, HEPES, TRIS, PIPES, MOPS를 포함한다. 일부 양태에서, 완충제는 콜린, 베타인, 또는 HEPES와 같이 큰 유기 이온(120 kDa 초과)을 함유하는 완충제이다. 완충제를 포함하는 양태에서, 완충제는 유리화 배지의 pH를 원하는 수준으로 안정화시키기에 적합한 농도로 제공된다.

[0032] 염은 예를 들어 비제한적으로, 나트륨염, 칼륨염, 칼로라이드염, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 유리화 배지에 포함될 때, 염은 1 밀리몰(mM) 이상 내지 500 mM 이하의 농도로 제공될 수 있다. 예를 들어, 염은 1 mM 이상 내지 500 mM 이하, 1 mM 이상 내지 400 mM 이하, 1 mM 이상 내지 300 mM 이하, 1 mM 이상 내지 250 mM 이하, 1 mM 이상 내지 200 mM 이하, 1 mM 이상 내지 150 mM 이하, 1 mM 이상 내지 100 mM 이하, 1 mM 이상 내지 75 mM 이하, 1 mM 이상 내지 50 mM 이하, 1 mM 이상 내지 25 mM 이하, 25 mM 이상 내지 500 mM 이하, 25 mM 이상 내지 400 mM 이하, 25 mM 이상 내지 300 mM 이하, 25 mM 이상 내지 250 mM 이하, 25 mM 이상 내지 200 mM 이하, 25 mM 이상 내지 150 mM 이하, 25 mM 이상 내지 100 mM 이하, 25 mM 이상 내지 75 mM 이하, 25 mM 이상 내지 50 mM 이하, 50 mM 이상 내지 500 mM 이하, 50 mM 이상 내지 400 mM 이하, 50 mM 이상 내지 300 mM 이하, 50 mM 이상 내지 250 mM 이하, 50 mM 이상 내지 200 mM 이하, 50 mM 이상 내지 150 mM 이하, 50 mM 이상 내지 100 mM 이하, 50 mM 이상 내지 75 mM 이하, 또는 그 안에 포함된 임의의 그리고 모든 범위 또는 하위범위의 농도로 존재할 수 있다.

[0033] RNase 및/또는 DNase 저해제는 일부 양태에서 핵산의 분해를 방지하기 위해 유리화 배지에 포함될 수 있다. 당 업계에 알려지고 사용되는 임의의 기지의 RNase 및/또는 DNase 저해제가 사용될 수 있으며, 단, 이들 저해제는 유리화를 방해하지 않는다. 그러나, 다양한 양태에서, RNase 및/또는 DNase 저해제는 핵산을 보존하는 데 필요하지 않을 수 있음을 이해해야 한다.

[0034] 일부 양태에서, 예컨대 유리화 배지가 혈액 시료와 함께 사용될 때, 유리화 배지는 적어도 하나의 항응고제를 추가로 포함할 수 있다. 대안적으로, 혈액 시료는 하나 이상의 항응고제 내로 수집된 다음, 후속적으로 유리화 배지와 접촉될 수 있다. 적합한 항응고제는 예를 들어 비제한적으로, 에틸렌 디-아민 테트라 아세트산(EDTA), 이중 옥살레이트, 헤파린, 소듐 시트레이트, 소듐 플루오라이드, 및 이들의 조합을 포함할 수 있다. 항응고제가 포함될 때, 이는 0.1 mg/mL 내지 5 mg/mL의 양으로 유리화 배지에 존재하거나 다르게는 사용된다. 양태에서, 항응고제의 양은 선택된 특정 항응고제에 따라 다양하다. 예를 들어, EDTA는 혈액의 1-2 mg/mL의 양으로 포함될 수 있으며, 헤파린은 혈액의 0.2 mg/mL의 양으로 포함될 수 있고, 옥살레이트는 혈액의 1-2 mg/mL의 양으로 포함될 수 있으며, 소듐 플루오라이드는 혈액의 2 mg/mL의 양으로 포함될 수 있다. 또 다른 예로서, 소듐 시트레이트는 1:9의 비(ratio)로 포함될 수 있으며, 여기서 9 부(part)는 혈액이고 1 부는 소듐 시트레이트이다. 당업자가 이해하게 될 바와 같이, 항응고제는 혈액 시료의 응고를 방지하기 위해 다른 양으로 존재할

수 있는 것으로 여겨진다.

- [0035] 다양한 양태에 따르면, 생물학적 시료 안에 하나 이상의 생물학적 물질을 포함하는 상기 생물학적 시료는 유리화 배지와 접촉되어 유리화 혼합물을 형성한다. 일부 양태에서, 유리화 혼합물은 유리화 전에 인큐베이션된다. 예를 들어, 유리화 혼합물은 5분 이상 내지 60분 이하, 5분 이상 내지 45분 이하, 5분 이상 내지 30분 이하, 또는 5분 이상 내지 20분 이하 동안 인큐베이션될 수 있다. 인큐베이션은 임의의 적합한 온도에서 수행될 수 있고, 다양한 양태에서 실온(즉, 18°C 이상 내지 37°C 이하, 선택적으로 약 25°C)이다. 인큐베이션 후, 생물학적 시료 및 유리화 배지를 포함하는 유리화 혼합물은 유리화되어 저장-안정한 시료를 생성한다. 유리화는 임의의 기지의 유리화 방법에 따라 수행될 수 있다.
- [0036] 유리화된 물질은 종종 액체 물질을 급속 냉각시키거나 소량의 생물학적 물질을 액체 질소 내로 직접 침지시킴으로써 제조된다. 냉각은 물질의 분자가 더 열역학적으로 선호적인 결정질 상태로 패킹될 수 있기 전에 이의 이동성을 감소시킨다. 1차 구성분의 결정화 능력을 방해하는 첨가제는 비정질/유리화된 물질을 생산할 수 있다. 적절한 유리 형성제의 존재 하에, 생물학적 물질을 유리화된 매트릭스 극저온 초과에서 저장하는 것이 가능하고 유리화는 탈수에 의해 달성될 수 있다.
- [0037] 일부 동물 및 수많은 식물은 완전 탈수에서 생존할 수 있다. 건조 상태에서 생존하는 이러한 능력(탈수가사(anhydrobiosis))은 몇몇 복잡한 세포내 생리화학적 및 유전적 기전에 의존한다. 이들 기전 중에는 건조 동안 보호제로서 작용하는 당(예를 들어, 당류(saccharide), 이당류, 올리고당류)의 세포내 축적이고, 트레할로스는 건조 내성 유기체에서 천연적으로 생산되는 이당류의 일례이다.
- [0038] 트레할로스와 같은 당은 몇몇 상이한 방식으로 건조 내성 유기체에 보호를 제공할 수 있다. 트레할로스 분자는 트레할로스 분자 상의 하이드록실기의 독특한 배치로 인해 구조적 기하학 및 접힘(folding)을 변화시키지 않으면서 접힌 단백질의 표면으로부터 수소-결합된 물 분자를 효과적으로 대체할 수 있다. 당 분자는 또한 지질 이중층의 인지질 헤드와 결합함으로써 재수화 동안 세포질 누출을 방지할 수 있다. 또한, 많은 당은 높은 유리전이 온도를 가지므로 낮은 수분 함량에서 극저온 초과 또는 실온 유리를 형성할 수 있다. 고점도의 '유리질' 상태는 분자 이동성을 감소시켜, 세포 기능 저하 및 사멸, 뿐만 아니라 단백질 및 핵산의 분해를 유발하는 분해생화학 반응을 방지한다.
- [0039] 일부 양태에서, 생물학적 시료의 유리화는 N Chakraborty, et al., *Biopreservation and Biobanking*, 2010, 8(2), 107-114에 개시되었던 것과 같이 당 트레할로스를 형성하는 유리의 존재 하에 탈수를 포함한다. 도 1을 참조하여, 시스템(10)은 생물학적 물질을 탈수시키는 가장 일반적인 접근법이다. 고착 액적(sessile droplet)(11)은 기관(12) 위에 놓여지고 습도가 낮은 환경(13)을 갖는 인클로저(16)에서 증발 건조된다. 인클로저 내부의 습도, 압력 및 온도는 제어 장치(17)에 의해 작동 가능하게 제어될 수 있다. 그러나, 시스템(10)의 고착 액적의 증발 건조를 사용한 건조는 본질적으로 느리고 본래 불균일하다. 생물학적 물질이 유리 형성 배지에서 건조될 때 시료의 액체/증기 계면(14)에서 유리질 피부가 형성된다. 이러한 유리질 피부는 소정 수준의 건조도를 초과하는 시료의 추가 건조를 늦추고 궁극적으로 방지하고 시료에 걸쳐 수분 함량의 상당한 공간적 불균일성을 유도한다. 그 결과, 유리질 피부 아래의 부분적으로 건조된 시료에 갇힌 세포는 높은 분자 이동성으로 인해 유리화되지 않고 분해될 수 있다.
- [0040] 다른 양태에서, 생물학적 시료의 유리화는 미국 특허 제10,433,540호에 개시된 바와 같이 모세관 보조 건조를 사용하여 유리 형성 당 트레할로스의 존재 하에서의 탈수를 포함한다. 이러한 방법을 수행하기 위한 예시적인 장치는 도 2에 도시되어 있다.
- [0041] 유리화 방법은 막 내부에 하나 이상의 모세관 채널, 선택적으로 연속적인 모세관 채널을 포함할 수 있는 막 상의 또는 막 내의 유리화에 의해 수행될 수 있다. 모세관은 빠른 증발을 위한 계면(interface)을 제공할 수 있다. 막은 복수의 모세관 채널, 선택적으로 복수의 인접한 모세관 채널로 형성될 수 있다. 막과 같은 다공성 물질로 형성된 모세관 네트워크는 독성이 없고 생체물질 또는 생물학적 시료에 반응하지 않으며 유리화 배지와 화학적 또는 물리적으로 반응하지 않는 물질로 만들어질 수 있다. 막은 친수성이거나 친수성으로 변형된 물질로 만들어질 수 있다. 일부 양태에서, 선택적으로 아래에 논의된 바와 같은 지지 구조를 사용하여, 막은 부분적으로 용해될 수 있거나 유리화 혼합물 또는 재구성 용액에서 시간/자극 의존적 용해도를 가질 수 있다. 막 물질은 적절한 중합체, 금속, 세라믹, 유리 또는 이들의 조합일 수 있다. 일부 양태에서, 인접 모세관 네트워크는 특히 폴리디메틸실록산(PDMS), 폴리카르보네이트, 폴리우레탄, 폴리에테르설폰(PES), 폴리에스테르(예를 들어 폴리에틸렌 테레프탈레이트)의 물질로부터 형성된다. 본원에 제공된 장치 및 방법에서 표면으로서 적합한 막을 함유하는 모세관 채널의 예시적인 예는 미국 매사추세츠주 빌레리카 소재의 EMD Millipore에서 판매하는

것과 같은 친수성 여과 막을 포함한다. 소정의 양태에서, 다공성 물질은 생물학적 시료 및/또는 유리화 배지의 구성요소와 실질적으로 결합하거나, 변경시키거나 화학적 또는 물리적 회합을 생성하지 않는다. 다공성 물질은 선택적으로 유도체화되지 않는다. 선택적으로, 모세관 채널은 PDMS 형성 기법, 레이저 드릴링 또는 당업계에 알려진 다른 보어(bore) 형성 기법에 의해 원하는 물질 및 두께의 기관(예를 들어 건조 챔버 벽)에 형성될 수 있다.

[0042] 일부 양태에서, 다공성 물질에 의해 제공되는 모세관 네트워크는 약 100  $\mu\text{m}$  이하, 선택적으로 20  $\mu\text{m}$  이하의 단면 치수를 갖는 공극(pore)을 포함하며, 따라서 상기 공극은 유리화에 일조하는 기저(underlying) 모세관을 제공한다. 모세관 네트워크가 조직을 유리화시키는 데 사용되고 있을 때, 더 큰 공극 크기, 예컨대 약 100  $\mu\text{m}$  이하의 단면 치수가 선택적으로 사용될 수 있다. 일부 양태에서 세포성 시료(조직이 아님)가 사용될 때, 약 20  $\mu\text{m}$  이하의 단면 치수가 사용될 수 있다. 일부 양태에서, 공극은 약 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1.0, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 및 0.2  $\mu\text{m}$ 를 포함하여 약 100  $\mu\text{m}$  내지 약 0.1  $\mu\text{m}$ 의 평균 개구(average opening)일 수 있다. 모세관 채널은 선택적으로 채널을 형성하는 기관의 두께에 의해 또는 하나의 또는 복수의 개별 채널 자체에 의해 정의되는 길이를 가질 수 있다. 모세관 채널 길이는 선택적으로 약 1 밀리미터 이하이지만, 이러한 치수로 제한되는 것으로 해석되지 않아야 한다. 선택적으로, 모세관 채널 길이는 약 0.1 미크론 내지 약 1000 미크론, 또는 그 사이의 임의의 값 또는 범위이다. 선택적으로, 모세관 채널 길이는 약 5 내지 약 100 미크론, 선택적으로 약 1 내지 약 200 미크론, 및/또는 선택적으로 약 1 내지 약 100 미크론이다. 모세관 채널 길이는 선택적으로 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, or 100 미크론이다. 일부 양태에서, 모세관 채널 길이는 복수의 모세관 채널 전반에 걸쳐 선택적으로 불균일한 변화로 다양하다.

[0043] 모세관 채널(들)의 단면적은 약 8000  $\mu\text{m}^2$  이하, 선택적으로 2000  $\mu\text{m}^2$  이하일 수 있다. 선택적으로 단면적은 약 0.01  $\mu\text{m}^2$  내지 약 8000  $\mu\text{m}^2$ , 선택적으로 약 100  $\mu\text{m}^2$  내지 약 2000  $\mu\text{m}^2$ , 또는 그 사이의 임의의 값 또는 범위이다. 선택적으로, 모세관 채널(들)의 단면적은 약 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000  $\mu\text{m}^2$  이하이다.

[0044] 도 2에 도시된 바와 같이, 모세관 보조 유리화 장치(20)는 인클로저(28) 내에 위치한 모세관 판/막(22)을 포함한다. 생물학적 시료는 막의 공극 내에 예시되어 있다. 선택적으로 일부 양태에서, 모세관 막은 복수의 잘-정의된 채널을 갖지 않는 다른 막 또는 몇몇 필터 층에 의해 대체될 수 있다. 다른 양태에서, 복수의 막은 상기 막 사이에 개재된(sandwiched) 생물학적 시료와 함께 사용되거나 다르게는 함께 적층될 때 생물학적 시료의 유리화에 적합한 유리화 막을 형성하는 복수의 막 내에 수용될 수 있다. 판/막(22)은 선택적으로 복수의 모세관 채널, 선택적으로 실질적으로 평행한 모세관 채널을 포함하며, 각각은 제1 개구(23) 및 제2 개구(25)를 갖는다. 유리화 혼합물(24)은 제1 개구(23) 상에 놓이고, 이는 모세관 채널 내로 가는 길을 찾아서, 유리화 혼합물(24)의 표면을 제2 개구(25)를 통해 주변 분위기(29)에 추가로 노출시킨다. 다양한 양태에서, 주변 분위기(29)는 유리화 혼합물의 습도보다 낮은 습도를 갖는다. 유리화는 유리화 혼합물이 유리질 상태로 될 때까지 모세관 작용에 의해 유리화 혼합물을 건조시켜 달성된다. 인클로저(28) 내부의 화학적 성질, 습도, 압력 및 온도는 하나 이상의 제어 기전(21)을 통해 제어된다.

[0045] 제어 기전(21)은 단지 예시를 위해 단순화되고, 건조 및 유리화에 가장 선호할 만한 조건을 달성하기 위해 다수의 시스템 및 기전을 가질 수 있다. 일부 양태에서, 유리화 혼합물(24)은 이러한 유리화 혼합물(24)의 상부 및 하부 표면에서 모세관 보조 건조 방법의 이점을 얻기 위해 22와 유사한 2개의 판/막 사이에 선택적으로 개재된다.

[0046] 일부 양태에서, 저습도 가스(상대 습도 30% 미만)의 흐름이 모세관 판/막의 제2 개구(25)를 가로질러 제공되거나, 유리화 배지로서 막의 반대쪽에 제공되어 모세관 효과를 증강시킨다. 질소, 아르곤, 크세논 등과 같은 불활성 또는 비교적 불활성인 가스가 저습도 가스로서 사용될 수 있다. 일부 양태에서, 감소된 압력 또는 진공이 인클로저(28) 내부에서 유지된다. 일부 양태에서, 증가된 건조 속도를 달성하기 위해 흡입력/압력이 제2 개구(25)를 가로질러 제공된다. 건조가 수행된 후 재수화를 방지하기 위해 낮은 습도 주변(선택적으로 상대 습도 5% 이하)을 유지하는 것이 필수적임을 알아야 한다. 모세관 보조 건조에 대한 추가 세부사항은 미국 특허 제 10,433,540호에서 찾을 수 있다.

[0047] 유리화 방법은 -80°C 내지 +60°C의 온도에서 수행될 수 있다. 온도 범위는 선택적으로 시료 내 물 분자의 이동

성이 높고 온도가 생물학적 물질의 건강 및 생존력에 유해하지 않는 범위이다. 이는 물질에 따라, 그리고 유리화 배지의 조성에 따라 다양할 것이다. 일부 양태에서, 유리화 온도는 0.1°C 내지 40°C이다. 선택적으로, 유리화 온도는 4°C 내지 26°C이다. 선택적으로, 유리화 온도는 약 25°C이다.

- [0048] 유리화 방법은 건조 분위기 또는 환경에서 수행될 수 있다. 건조 환경은 포화 미만의 습도 수준을 갖는 환경이다. 일부 양태에서, 환경, 예컨대 모세관의 제2 면(side)의 환경의 습도 수준은 30% 상대 습도 이하, 선택적으로 20% 이하, 선택적으로 10% 이하, 선택적으로 5% 이하이다. 건조 환경은 선택적으로 1% 내지 30% 또는 그 사이의 임의의 값 또는 범위, 선택적으로 1% 내지 5%의 습도를 갖는다.
- [0049] 유리화 방법은 저압 환경(1 atm(760 mmHg) 미만)에서 수행될 수 있다. 저압 환경은 유리화의 속도에 선호할 만한 영향을 가질 것이다. 환경 압력은 선택적으로 100 mmHg 또는 0.1 atm이다. 선택적으로, 환경 압력은 10 mmHg 내지 760 mmHg, 또는 그 사이의 임의의 값 또는 범위이다. 선택적으로, 환경 압력은 10 mmHg 내지 200 mmHg이다.
- [0050] 유리화 방법은 건조 시간 동안 수행될 수 있다. 건조 시간은 적합한 건조를 촉진하여 유리화 배지를 유리화시키기에 충분한 시간이다. 건조 시간은 선택적으로 1초 내지 1시간이다. 선택적으로, 건조 시간은 1초 내지 50분, 선택적으로 5초 내지 60분이다. 건조 시간은 시료 유형 또는 모세관 채널의 물리적 특징 및 특정 사항에 따라 다양할 수 있다.
- [0051] 더욱 다른 양태에서, 유리화는 막 또는 필터지(들) 상에서 또는 그 사이에서 수행될 수 있다. 다른 유리화 방법은 특정 양태에 따라 사용될 수 있다.
- [0052] 유리화 후, 시료는 저장-안정하고, 생존 가능한 채로 남아 있으면서 이후의 사용을 위해 실질적으로 분해하지 않는 한편 극저온 초과의 온도에서 저장될 수 있다. 일부 양태에서, 유리화 후, 유리화 혼합물은 물 및 공기에 불침투성인 보호용 인클로저에 유리 상태로 봉입되고 저장될 수 있다. 일부 양태에서, 저장-안정한 시료는 -196°C 이상 내지 +60°C 이하, 16°C 이상 내지 60°C 이상, 또는 18°C 이상 내지 60°C 이상의 온도에서 이것이 사용되기 전에 소정의 기간 동안 저장될 수 있다. 일부 양태에서, 저장 시간은 1일 이상, 5일 이상, 10일 이상, 20일 이상, 30일 이상, 45일 이상, 60일 이상 등이다.
- [0053] 다양한 양태에서, 저장-안정한 시료가 사용할 준비가 될 때, 시료가 사용되는 특정 프로토콜에 따라 재수화(또는 재구성)되고 처리된다. 일부 양태에서, 저장-안정한 시료는 단백질 또는 하나 이상의 유형의 핵산을 침전시키는 데 사용되는 재수화 용액을 사용하여 재수화될 수 있다. 양태에서, 저장-안정한 시료는 저장-안정한 시료를 처리하는 데 사용되는 추출 및/또는 정제 키트에서 세포 물질을 완전히 용해시키기 위해 포함될 수 있는 것과 같은 용해 완충제를 사용하여 재구성된다.
- [0054] 시료가 다양한 프로토콜에서 사용될 수 있지만, 일부 양태에서 시료는 DNA 및/또는 RNA와 같은 핵산을 추출하도록 처리된다. 예를 들어, 재수화 후, DNA 및/또는 RNA는 이용된 특정 추출 방법에 따라 펠렛화, 결합, 세척, 용리, 건조 및/또는 용해될 수 있다.
- [0055] 일부 양태에서, RNA는 GITC-기초 방법에 따라 추출된다. 따라서, 저장-안정한 시료는 재수화되고, 상 분리가 허용되고, 프로판올이 상층액에 첨가된다. 그 후에, 혼합물은 원심분리되어 RNA를 포함하는 펠렛을 형성한다. 다음으로 RNA 펠렛은 분석을 위해 세척, 건조 및 용해된다.
- [0056] 일부 양태에서, RNA는 TRIspin 방법에 따라 추출된다. 이에, 저장-안정한 시료는 재수화되고, 상 분리가 허용되며, 에탄올이 상층액에 첨가된다. RNA는 결합, 세척 및 용리된 다음, 분석에 사용될 수 있다.
- [0057] 일부 양태에서, RNA는 컬럼-기초 방법을 사용하여 추출된다. 이 양태에서, 저장-안정한 시료는 재수화되고 에탄올이 첨가된다. RNA는 결합, 세척 및 용리된 다음, 분석에 사용될 수 있다.
- [0058] 추출을 위한 다른 방법이 고려된다. 이에, 이용된 특정 추출 방법에 관계없이, 일부 양태에서, 전형적으로 임의의 이러한 추출 방법의 제1 단계인 세포 용해 단계는 상기 기재된 바와 같이 유리화 방법 동안 수행될 수 있고, 나머지 단계는 재수화 후 수행될 수 있다. 따라서, 본원에 기재된 양태는 저장 후 다양한 방법 중 임의의 하나에서 사용될 수 있는 저장-안정한 시료를 제공하면서 더 빠른 유리화를 가능하게 할 수 있다.
- [0059] 일부 양태에서, DNA 또는 RNA는 유리화된 세포로부터 추출될 수 있다. 예를 들어, 상업적으로 입수 가능한 많은 DNA 또는 RNA 추출 키트 또는 유사한 방법 중 임의의 하나가 사용되어, 저장-안정한 시료로부터 DNA 또는 RNA를 추출할 수 있다. 다양한 양태에서, 추출 키트에 사용된 용해 완충제는 시료를 재구성하는 데 사용될 수

있다.

- [0060] 더욱이, 본원에 기재된 다양한 양태는 전혈 또는 이의 일부가 극저온 초과에서 보존 및 저장되게 할 수 있다. 예를 들어, 전혈, 혈청, 혈장, 적혈구, 혈소판 및/또는 림프구는 튜브(선택적으로 항응고제와 함께) 또는 막에 수집되고, 유리화 배지와 접촉되고, 주위 온도에서 5-20분 동안 인큐베이션되고, 유리화될 수 있다. 시료는 사용할 때까지 주위 온도에서 저장될 수 있다. DNA, RNA 및/또는 단백질의 추출은 시료를 트리졸로 처리하여 수행될 수 있다. 이에, 저장 비용이 절감될 수 있고, 보존된 혈액 시료는 저장 후 다양한 방법 중 임의의 하나에 사용될 수 있어서, 시료에 더 큰 가요성(flexibility)을 제공할 수 있다. 예를 들어, 저장-안정한 시료는 재수화될 수 있고 백혈구-용해물은 용해 완충제에서 추출될 수 있다. 용해물은 에탄올과 함께 스핀 컬럼으로 옮겨지고 세척 완충제로 세척될 수 있다. 그 후에, 총 RNA는 RNase-무함유 물로 용리될 수 있으며, RNA는 정량적, 정성적 및 임상적 분석에 사용될 수 있다.
- [0061] 일부 양태에서, 전혈이 수집되고, 원심분리될 수 있고, 하나 이상의 층(예를 들어, 혈장 층, 버피 코트, 또는 적혈구 층)이 유리화 배지의 매트릭스로 옮겨지고 유리화를 받을 수 있다. 저장 후, 시료는 희석제(예컨대 프로테아제 저해제가 있거나 없는 PBS 액체)로 재구성되고 정성적 및/또는 정량적 분석을 받을 수 있다.
- [0062] 전혈 형태의 생물학적 시료의 사용과 관련하여 다양한 양태가 본원에 기재되었지만, 본원에서 일반적으로 기재된 바와 같이 다른 유형의 생물학적 시료가 사용될 수도 있다는 것이 추가로 고려된다. 일부 양태에서, 생물학적 시료는 조직 형태일 수 있다. 일부 이러한 양태에서, 조직은 용해 용액을 사용하여 균질화되거나, 분쇄되거나, 효소 소화를 받을 수 있다. 대안적인 양태에서, 조직은 다양한 양태에 따라 사용될 수 있는 동결절단 방법을 받을 수 있다.
- [0063] 일부 양태에서, 생물학적 시료는 불균질하다. 불균질 시료는 생물학적 시료와 동시에 저장될 수 있고 시료의 다운스트림 분석 결과를 오염시킬 수 있는 핵산도 포함하는 하나 이상의 외래(대상체에서 유래되지 않는) 유기체를 함유하는 시료이다. 이와 같이, 원하지 않는 오염 물질에 비해 원하는 생물학적 시료 구성요소를 선택적으로 단리하기 위해 추가 제조 단계가 바람직할 수 있다. 비제한적인 예로서, 생물학적 시료는 타액일 수 있다. 타액은 숙주 유기체뿐만 아니라 오염된 박테리아 또는 바이러스의 세포도 포함하는 것으로 알려져 있다.
- [0064] 불균질 시료는 시료에서 외래 유기체(선택적으로 박테리아, 바이러스, 효모 또는 다른 것)의 양을 제거하거나 감소시키기 위한 전처리 단계를 받을 수 있다. 전처리 단계는 유리화 단계와 조합될 수 있지만, 일부 양태에서 전처리 단계는 실제 유리화 전에 발생한다. 전처리 단계는 생물학적 시료를 하나 이상의 외래 유기체, 선택적으로 박테리아, 바이러스, 효모 및/또는 다른 비-생물체에 대해 선택적인 분자를 함유하거나 이에 결합된 단리배지, 선택적으로 미립자 또는 막 형태와 접촉시키는 것일 수 있다. 일부 양태에서, 시료는 선택적으로 NCBI 기준 서열: NP\_000233의 서열과 함께 하나 이상의 비-대상 유기체, 선택적으로 만노스-결합 렉틴(MBL)에 특이적인 단리제를 포함하는 단리 배지의 표면과 접촉하게 배치된다. MBL은 박테리아, 효모 및 일부 기생충과 바이러스의 N-아세틸글루코사민 잔기 및 만노스에 결합하는 C형 렉틴이다. 생물학적 시료를 MBL을 포함하는 표면과 접촉시킴으로써, 비-대상 유기체는 대상 세포로부터 선택적으로 격리될 수 있고, 이로써 생물학적 시료에서 대상 세포를 선택적으로 단리하고 선택적으로 유리화하는 방법의 능력을 개선할 수 있다.
- [0065] 이제 도 4를 참조하면, 일부 양태에서, 시료는 적어도 하나의 단리막(32)이 외부 유기체를 제거하는 데 사용되는 막 시스템을 받는다. 도 4는 표면에 결합된 단리제를 포함하는 복수의 입자(36)를 예시한다. 입자는 유리화 혼합물 및/또는 생물학적 시료와 함께 인큐베이션될 수 있다. 입자는 하나 이상의 단리제, 선택적으로 만노스-결합 렉틴(MBL)이 결합된 외래 유기체에 선택적으로 결합한다. 입자가 있는 시료는 표면에 입자를 유지하면서 생물학적 시료의 통과를 허용하기에 충분한 공극 크기를 갖는 단리막(32)에 배치된다.
- [0066] 대안적으로 또는 이에 더하여, 단리막 자체는 이에 결합된 하나 이상의 단리제를 포함하여, 생물학적 시료 또는 유리화 혼합물은 단리막에 접촉하여 외래 유기체가 단리막에 결합되고 한편 생물학적 시료 내 원하는 물질은 단리막을 통과하여 생물학적 시료의 후속적인 유리화를 위해 유리화 막에 접촉한다. 단리막은 세포 물질이 그 안에 또는 그 위에 있는 단리제에 의해 결합되지 않은 상태로 막을 통과할 수 있도록 실질적으로 다공성인 임의의 막 시스템일 수 있다.
- [0067] 단리 매질은 적합한 중합체(예를 들어 폴리비닐리덴 디플루오라이드(PVDF) 등), 금속, 세라믹, 유리, 또는 이들의 조합일 수 있다. 일부 양태에서, 단리 매질은 PVDF, 셀룰로스 에스테르, 니트로셀룰로스, 또는 다른 원하는 물질로 만들어질 수 있다. 하나 이상의 단리제가 적절한 단리 매질에 결합되거나 다르게는 이와 회합될 수 있다. 그 후에, 생물학적 시료가 단리 매질과 접촉될 때, 외래 세포/유기체가 단리제에 선택적으로 결합될 수 있다.

으며, 이로써 대상 세포는 다르게는 본원에 제공된 바와 같이 포획 또는 수집 및 후속적인 유리화를 위해 시스템을 통과할 수 있다.

[0068] 선택적으로 단리제가 포함된 단리막은 다르게는 본원에 제공된 바와 같이 생물학적 시료의 유리화에 적합한 유리화막 위에 적층될 수 있다. 유리화 막은 모세관 네트워크를 포함하거나 정의하는 임의의 물질일 수 있다. 선택적으로, 이러한 다공성 물질 막은 독성이 없고 생체물질 또는 생물학적 시료에 반응하지 않으며 유리화 배지와 화학적으로 또는 물리적으로 반응하지 않는 물질로 만들어질 수 있다. 물질은 적합한 중합체, 금속, 세라믹, 유리 또는 이들의 조합일 수 있다. 일부 양태에서, 인접 모세관 네트워크는 특히 폴리디메틸실록산(PDMS), 폴리카르보네이트, 폴리우레탄, 폴리에테르설폰(PES), 폴리에스테르(예를 들어 폴리에틸렌 테레프탈레이트)의 물질로부터 형성된다. 본원에 제공된 장치 및 방법에서 표면으로 적합한 막을 함유하는 모세관 채널의 예시적인 예는 미국 매세추세츠주 빌레리카 소재의 EMD Millipore에서 판매하는 것과 같은 친수성 여과 막을 포함한다. 소정의 양태에서, 다공성 물질은 생물학적 시료 및/또는 유리화 배지의 구성요소와 실질적으로 결합하거나, 변경시키거나 화학적 또는 물리적 회합을 생성하지 않는다. 다공성 물질은 선택적으로 유도체화되지 않는다. 선택적으로, 모세관 채널은 PDMS 형성 기법, 레이저 드릴링 또는 당업계에 알려진 다른 보어 형성 기법에 의해 원하는 물질 및 두께의 기관(예를 들어 건조 챔버 벽)에 형성될 수 있다.

[0069] 생물학적 시료가 비-대상 세포 물질을 단리하거나 제거하기 위해 단리제가 있는 단리막을 통과한 후, 후속적인 유리화 및 선택적 저장을 위해 나머지 세포 물질은 막 내부 또는 위에 수집된다. 단리막은 유리화 막 상부에 적층될 수 있다. 생물학적 시료와의 접촉 후, 단리막은 분석을 위해 제거되거나 폐기될 수 있으며 나머지 생물학적 시료는 본원에 기재된 방법에 의해 유리화 막 위 또는 내부에서 유리화될 수 있다. 대안적으로, 단리막은 유리화 막 및 본원에 제공된 바와 같이 유리화를 받는 전체 막 시스템과 회합된 채로 남아 있을 수 있다. 그 후에, 단리막은 그 안의 생물학적 물질을 재구성하기 전에 유리화 막으로부터 박리되거나 다르게는 제거될 수 있다. 전처리 단계의 결과는 비-대상 세포 물질을 실질적으로 제거함으로써 대상 생물학적 시료 물질의 단리 및 저장을 개선하는 것이다.

[0070] 선택적으로, 단리제는 비드 또는 입자에 결합될 수 있다. 일부 양태에서, 단리제가 결합된 비드는 유리화 혼합물을 막 시스템에 붓기 전에 생물학적 시료 및 유리화 혼합물과 혼합할 수 있다. 이러한 단계는 원하는 오염 병원체를 포획하기 위해 비드와 유리화 혼합물 사이에 충분한 접촉 시간을 제공할 것이라는 것이 이해될 것이다. 이제 도 4를 참조하여, 유리화 혼합물을 막 시스템에 부으면, 포획된 병원체가 있는 비드가 유리화 혼합물로부터 단리되어 막 시스템의 상부 표면에 남을 것이다. 이를 실현시키기 위해, 막 시스템의 공극 크기가 비드 크기보다 작고 유리화막으로 통과해야 하는 세포 크기보다 커야 한다. 비드의 크기는 6 미크론 내지 500 미크론, 선택적으로 10 미크론 내지 500 미크론일 수 있다. 비드는 단리제에 결합하도록 작용화된 마그네타이트( $Fe_3O_4$ )와 같은 폴리스티렌 또는 산화철과 같은 중합체로 만들어질 수 있다.

[0071] 본원에 또한 제공된 다양한 양태에서, 생물학적 시료는 유기체의 조직 또는 다른 부분일 수 있다. 비-극저온 조건에서 조직 시료를 저장하는 것은 일반적으로 어렵다. 조직 시료의 단순한 유리화는 고르지 않은 건조 또는 조직 구조의 유지 결여로 인해 조직 물질의 적절한 안정성을 유발하지 않는다. 이와 같이 조직의 분자 물질을 보존할 뿐만 아니라 전체 조직 자체의 구조 및 다른 특징을 유지하여 후속적인 조직 분석을 수행하는 유효성 및 능력을 크게 개선하는 조직 유리화 방법이 제공된다. 본원에 제공된 방법에서 생물학적 시료로서 사용될 수 있는 조직은 신경, 간, 심장, 신장, 혈관, 신장, 폐, 후두, 위, 식도, 췌장, 갑상선, 근육, 상피, 모발 또는 임의의 다른 인식된 생물학적 조직 유형인 공급원으로부터의 조직을 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

[0072] 본원에 제공된 바와 같은 유리화 방법에서, 조직 시료는 유리화제(선택적으로 당)로 침투될 수 있고 중합체 또는 중합체 형성제(예를 들어 PEG 하이드로겔)와 접촉될 수 있다. 예를 들어, 조직에 트레할로스-PEG 하이드로겔 전구체, 및 조직 또는 이의 일부를 공유적으로, 이온적으로, 또는 다르게 중합체와 회합시키기에 적합한 부착제가 주입될 수 있다.

[0073] 중합체는 조직을 극저온 초과에서 저장하기에 적합한 중합체로서 사용되거나 이를 생성하는 데 사용될 수 있는 임의의 분자일 수 있으며, 하기를 포함하지만 이로 제한되지 않는다: 폴리알킬 알코올 및 글리콜, 예컨대 폴리옥시에틸렌 또는 폴리옥시에틸렌 유도체; 네오펜일 글리콜 디아크릴레이트(NPGDA), 폴리에틸렌 옥사이드(PEO), 폴리아크릴아미드(PAAm), 폴리하이드록시에틸 메타아크릴레이트(PHEMA), 폴리아크릴산(PAA), 폴리비닐 알코올(PVA), 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)(PNIPAM), 폴리비닐피롤리돈(PVP), 폴리락트산(PLA), 폴리글리콜산(PGA), 폴리카프로락톤(PCL), 젤라틴, 알기네이트, 카라기난, 키토산, 하이드록시알킬셀룰로스, 알킬셀룰로스, 실리콘, 고무, 한천, 카르복시비닐 공중합체, 폴리디옥솔란, 폴리아크릴 아세테이트, 폴리비닐클로라이드, 말레

산 무수물, 스티렌 및 스티렌 중합체; 텍스트란; 헤파린 및 헤파린의 중합체; 글루타메이트, 아스파르테이트의 폴리펩타이드, 또는 이들의 조합.

- [0074] 중합체는 선택적으로 선형, 분지형, 라이어블(liable), 또는 이들의 조합이다. 중합체는 선택적으로 동형체성(homomeric) 또는 이형체성이다. 중합체성 모이어티의 예시적인 예는 탄수화물 또는 폴리옥시에틸렌(다르게는 폴리에틸렌 글리콜 또는 "PEG"로 알려져 있음)의 하나 이상의 분자를 포함한다.
- [0075] 중합체는 선택적으로 폴리에틸렌 글리콜이다. 폴리에틸렌 글리콜은 선택적으로 2 내지 20000개의 에틸렌 글리콜 단위를 포함한다. 선택적으로, 에틸렌 글리콜 단위의 수는 2 내지 10000, 선택적으로 2 내지 5000, 선택적으로 2 내지 2000이다. 다양한 양태에서, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)은 폴리에틸렌 글리콜-비닐설포를 포함하지만 이로 제한되지 않는 폴리에틸렌 글리콜의 유도체이다. PEG는 선형 또는 분지형 PEG 분자일 수 있다. 선택적으로, 분지형 PEG는 2, 4, 6, 8, 또는 다른 아암(arm) PEG 분자일 수 있다.
- [0076] 일부 양태에서, 방법은 가교제를 중합체 형성제와 함께 첨가하는 단계를 추가로 포함한다. 가교제는 2개 이상의 단량체/중합체를 함께 연결하기에 적합한 임의의 제제이다. 가교제는 선택적으로 하나 이상의 아크릴레이트 또는 메트아크릴레이트 작용기를 갖는다. 예시적인 가교제는 2-하이드록시에틸 메트아크릴레이트(HEMA), 아크릴산, 및 메트아크릴산, 아디프산 하이드라진 디아미드 아크릴레이트, 아크릴아미드, 메트아크릴아미드, 알킬-(메트) 아크릴아미드, N-모노 (메트) 아크릴아미드, N, N-디-C1-C4 알킬-(메트) 아크릴아미드(N, N-디-C1-C4 알킬-(메트) 아크릴아미드), N-부틸 (메트) 아크릴레이트, N-부틸 (메트) 아크릴레이트, 메틸 (메트) 아크릴레이트, 에틸 (메트) 아크릴레이트, 키즈(kids) 이소보르닐 (메트) 아크릴레이트, 사이클로헥실 (메트) 아크릴레이트, 하이드록시에틸 아크릴레이트, 하이드록시에틸 메트아크릴레이트, 하이드록시프로필 아크릴레이트, 하이드록시프로필 메트아크릴레이트, 하이드록시부틸 아크릴레이트, N-(2-하이드록시에틸) 아크릴아미드 [N-(2-하이드록시에틸) 아크릴아미드], N-메틸 아크릴-아미드, N-부톡시메틸 아크릴아미드, N-메톡시메틸 아크릴아미드, N-메톡시메틸 메트아크릴아미드, 2-아크릴아미도글리콜산 및 2-카르복시에틸 2-카르복시에틸 아크릴레이트, 2-하이드록시-5-메톡시아세트페논, 2-하이드록시에틸 셀룰로스 및 2-하이드록시에틸 디설파이드 등, 또는 이들의 조합을 포함하지만 이로 제한되지 않는다..
- [0077] 방법은 선택적으로 유리화 혼합물 내에 존재하는 하나 이상의 부착제를 추가로 포함한다. 선택적으로, 부착제는 보론산이다. 하나의 특정 이론에 제한되지 않고, 보론산은 중합체를 조직 세포의 막 단백질에 공유 결합할 수 있다고 믿어진다. 따라서, 하이드로겔은 조직의 세포 사이에 형성되고 유리화 및 박절(sectioning) 동안 수축 또는 붕괴를 방지하기 위해 세포 및 조직에 지지를 제공한다. 하이드로겔이 형성된 후, 조직은 유리화될 수 있다. 그 후에, 유리화된 시료는 원하는 경우 효과적으로 박절될(sectioned) 수 있다. 조직이 박절되면, 포도당과 물의 혼합물이 첨가되어 보론산을 분리하여, 하이드로겔이 막 단백질로부터 분리되도록 할 수 있다. 그 후에, 붕소산 및 하이드로겔은 세척되어, 유리화 방법에 의해 보존된 원래 구조를 포함한 조직 시료를 남길 수 있다.
- [0078] 이러한 양태는 시료의 조직학적 분석을 가능하게 할 수 있다. 조직학을 위한 종래의 조직 처리는 조직 시료를 박절하기 전에 시료를 동결시키거나 유리화하기 전에 조직에 저융점 파라핀 또는 아가로스를 주입하는 단계를 포함한다. 파라핀이 세포 구조를 유지하는 데 필요한 강성을 제공하긴 하지만, 이는 조직 오염을 초래한다. 아가로스는 RNA 추출에 영향을 미치고, 조직 벽에 달라붙는다. 이에, 트레할로스-PEG 하이드로겔(본원에 제공된 일례로서)의 사용은, 하이드로겔이 포도당-물 세척 단계를 통해 분리되고 세척될 수 있기 때문에 다운스트림 가공을 오염시키거나 악영향을 미치지 않으면서 세포 구조에 대한 지지를 제공하는 한편 조직의 유리화를 가능하게 할 수 있다. 다른 이점은 당업자에게 명백할 것이다.
- [0079] 선택적으로, 유리화 배지는 2개의 상이한 자극에 의해 유발되는 상대적으로 높은 점성 상태와 낮은 점성 상태 사이를 전환할 수 있는 능력을 가진 전환 가능한 지지체 물질을 포함한다. 자극을 적용하기 전에, 전환 가능한 물질은 유동성이 우수한 저점도 액체로서 거동하여, 본원에 제공된 방법에 의해 조직 매트릭스로의 *제자리* 관류에 사용하는 것을 가능하게 할 것이다. 일단 제1 자극이 적용되면, 물질은 저점도 액체(줄 상태)로부터 항복-응력 유체(겔 상태)로 전환되어, 유리화 동안 조직 및/또는 막 구조 구성을 실질적으로 유지시키기에 충분한 강성과 지지를 제공할 것이다. 제2 자극이 적용될 때, 지지체 물질은 강성 물질로부터 다시 저점도 액체로 전환되어 용이한 제거를 가능하게 할 것이다.
- [0080] 일부 양태에서, 다양한 파장의 광이 자극으로서 사용될 수 있다. 선택적으로 자외선(UV)과 가시광선이 전환 자극으로서 사용될 것이다. 일부 양태에서, 광-전환성 하이드로겔 지지체는 가시광선 하에 강성을 나타낼 것이지만, UV 방사선 하에 용액 상태로 완전히 해리될 수 있을 것이다. 예시적인 광-전환성 물질은 아조벤젠(azo) 및

사이클로덱스트린(CD) 호스트-게스트 복합체에 의해 형성된 초분자 하이드로겔이며, 이는 선택적으로 Vapaavuori, et al., *J. Mat. Chem. C.*, 2018; 6:2168-2188 또는 Rosales, et al., *Bioconjugate Chem.*, 2018; 29: 905-913에 기재된 바와 같다. 상이한 공동(cavity) 크기를 갖는 3개의 주요 유형의 사이클로덱스트린이 존재한다:  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD 및  $\gamma$ -CD. 이들은 각각 6, 7, 8개의 연결된 글루코피라노스 하위단위를 포함하여 원뿔 구조를 형성한다. 하이드록실기는 원뿔 외부에 위치하여 이를 친수성으로 만든다. 그러나, 원뿔 내부는 소수성이므로, 수용액에서 아조벤젠과 같은 소수성 분자를 호스트하여 호스트-게스트 복합체를 형성할 수 있다. 아조벤젠(아조)은 잘-알려진 광-반응성 분자이다. 가시광선(약 520 nm) 하에, 이는 열역학적으로 안정한 전이상태로 존재한다. UV(약 375 nm)로 조사될 때, 이는 cis-이성질체로 광-이성질화한다. Trans-아조는 수용액에서 소수성 상호작용에 의해 구동되는 CD의 공동으로 들어가 호스트-게스트 복합체를 형성할 수 있는 기하학적 구조를 갖는다. 이것이 cis-아조로 광-이성질화될 때, 이의 기하학적 구조는 더 이상 CD 원뿔에 맞지 않아, 복합체의 해리를 유발한다. 광가역성 아조-CD 복합체를 가교제로서 사용하여, 가시광선 하에 겔화되지만 UV 방사선 하에 액체(졸)로 쉽게 해리되는 광-전환성 하이드로겔이 제조될 수 있다. 이러한 졸-겔 전환은 가역적이며 2분 이내에 완료될 수 있다. 전환 가능한 지지체 물질을 형성하기 위한 다른 방법 및 물질은 Koopmans and Ritter, *Macromolecules*, 2008; 41:7418-7422에서 찾을 수 있다.

[0081] 본원에 제공된 방법은 선택적으로 유리화 배지 내에 전환 가능한 지지체 물질을 추가로 포함하고, 선택적으로 전환 가능한 지지체 물질을 점성 상태로 덮도록 자극을 적용하고 뒤이어 유리화 배지를 본원에 제공된 바와 같은 진공 유리화 방법을 받게 하여, 생물학적 시료의 다른 물리적 및/또는 화학적 특징을 유지하기에 충분한 지지체와 함께 조직 또는 다른 세포 물질을 유리화된 상태로 저장한다.

[0082] 실시예

[0083] 하기 실시예는 다양한 양태를 예시하기 위해 제공되지만, 청구범위의 범위를 제한하려는 것은 아니다. 대략적인 특성, 특징, 파라미터 등은 다양한 작업예, 비교예, 및 작업예와 비교예에 사용된 물질에 관하여 아래 제공된다.

[0084] 실시예 1

[0085] 세포 배양: LINTERNA Jurkat T-세포(G418 내성 유전자와 함께 tGFP를 안정하게 발현함)를 스페인 소재의 Innoprot로부터 획득하였다. 세포를 RPMI 1640(Gibco), 10% 열 불활성화된 우태 혈청(Hyclone), 1X 글루타맥스(Gibco) 및 G418(Gibco) 내에서 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 배양물을 37°C에서 25-cm<sup>2</sup> T-플라스크(Corning Incorporated, NY)에서 유지시키고 10% CO<sub>2</sub>-90% 공기로 평형화시켰다. 신선한 배양 배지를 3일마다 교환하여, 세포를 유지시켰다.

[0086] 실시예 A의 경우, 5 X 10<sup>6</sup> Jurkat T-세포의 시료를 600 mM 트레할로스, 5% 글리세롤, 0.01% Triton X-100을 함유하는 250  $\mu$ l 유리화 배지에서 10-15분 동안 인큐베이션하였다. 그 후에, 시료를 1.2 마이크로미터 공극 크기를 갖는 2개의 PES 막 스케폴드 사이에 개재하고 -29 mmHg의 진공 하에 약 6분 동안 유리화하여, 0.01의 수분 잔류비(MRR)를 달성하였다. 그 후에, 시료를 25°C 또는 55°C에서 3일 동안 저장한 후, RNA 추출을 수행하였다.

[0087] PureLink RNA Mini Kit(Invitrogen)를 사용하여 RNA를 추출하였다. 유리화된 세포를, 1% 2-머캅토에탄올을 함유하는 0.6 ml의 용해 완충제로 재수화시키고 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 용해물을 21-게이지 주사기 바늘을 통해 10회 통과시킴으로써 상기 용해물을 균질화시켰다. 동일 부피의 70% 에탄올을 용해물에 첨가하였다. 그 후에, 용해물/상층액을 원심분리(실온 및 12,000 x g에서 15초 동안)에 의해 추출하고, 실온 및 12,000 x g에서 15초 동안 원심분리에 의해 RNA 결합 스핀 컬럼에 통과시켰다. 다음, 컬럼(PureLink DNase Set, Invitrogen) 상에서의 DNase 소화에 의해 DNA 오염을 제거하고, 뒤이어 700  $\mu$ l의 세척 완충제-I 및 500  $\mu$ l의 세척 완충제-II와 에탄올을 이용한 2 단계 세척(12,000 x g에서 15초 동안 원심분리)에 의해 오염물 및 저해제를 제거하였다. 결합된 RNA를 갖는 스핀 컬럼을 2분 동안 건조하고, 50  $\mu$ l의 RNase-무함유 물을 스핀 컬럼에 첨가하고 2분 동안 인큐베이션하였다. 순수한 RNA를 실온 및 12,000 x g에서 새로운 튜브에서 원심분리에 의해 용리하였다.

[0088] 대조군으로서, RNA를 유리화된 세포와 동일한 기법을 사용하여 동일한 수의 신선한 세포의 시료로부터 추출하였다(비교예 A).

[0089] 비교예 B의 경우, 동일한 수의 세포를 함유하는 시료를 극저온 동결시키고 -80°C에서 2시간 동안 저장하였다.

세포를 해동시키고, RNA를 실시예 A에서 사용된 것과 동일한 RNA 추출 방법에 따라 추출하였다.

[0090] 비교예 C의 경우,  $5 \times 10^6$  Jurkat T-세포를 600 mM 트레할로스 및 5% 글리세롤을 함유하는 250  $\mu$ L 유리화 배지에서 10-15분 동안 인큐베이션하였고, 유리화 배지는 Triton X-100을 배제하였다. 시료를 약 6분 동안 유리화시켜, 0.01의 MRR을 달성하였다. 그 후에, 시료를 실온에서 3일 동안 저장하였다. 그 후에, 시료를 용해 완충제에서 재수화시키고, RNA를 유리화된 세포와 동일한 기법에 따라 추출하였다.

[0091] 실시예 A 및 비교예 C에 대해 동일한 유리화 프로토콜을 수행하고, 세포를 25°C 또는 55°C에서 3일 동안 저장하고, 뒤이어 RNA를 추출하였다.

[0092] 모든 시료에 대해, 5  $\mu$ g의 RNA를 1.2% 아가로스 겔(Native Sybr-safe) 상에서 웰당 로딩하고, 전기영동시켜, 분리를 가능하게 하였다. 겔의 이미지를 도 5로서 제공한다. 변성 겔 상에서 진행된 무손상 총 RNA는 날카로운 28S 및 18S rRNA 밴드(진핵생물 시료)를 가질 것이다. 28S rRNA 밴드는 18S rRNA 밴드보다 대략 2배 더 강해야 한다. 이러한 2:1 비(28S:18S)는 RNA가 무손상이라는 양호한 지표(indication)이다. 부분적으로 분해된 RNA는 비교예 A(레인 1) 및 비교예 C(레인 3)에 대해 제시될 수 있는 바와 같이 얼룩진 외양을 가질 것이거나, 날카로운 rRNA 밴드가 결여될 것이거나, 2:1 비를 나타내지 않을 것이다. 완전히 분해된 RNA는 매우 낮은 분자량의 얼룩(smear)으로서 나타날 것이다(비교예 B; 레인 2). 도 5a에서 알 수 있듯이, 본원에 기재된 다양한 양태에 따라 유리화되고 저장된 55°C에서 1주일 동안 저장된 실시예 A(레인 4)는 양호한 강도비(intensity ratio)와 함께 날카로운 28S 및 18S rRNA 밴드를 가지며, 이는 RNA가 실온에서 유리화 및 저장 후 무손상임을 나타낸다.

[0093] 유사한 결과는 RNA 정량화에 의해 획득된다. 각각의 시료에 대해 상기와 같이 제조된 RNA를 분광광도적으로 정량화하고 결과를 표 1에 예시하였다.

**표 1**

[0094]

시료	명칭	260/280	ng/ $\mu$ L
비교예 A	신선한 Jurkat 세포	2.07	378.353
비교예 B	Jurkat 세포[1-2h@-80°C]	1.889	22.833
비교예 C	세포+VM 유리화됨	2.111	122.273
실시예 A	세포+VM+TRITON 유리화됨	2.113	202.033

[0095] 용해제 Triton-X100의 존재 하에 유리화는 용해제의 부재 하에 유리화된 세포에 비해 무손상 RNA에서 분명한 개선을 보여주었다. 비교예 B는 거의 전체적으로 분해되었다. 개선된 RNA 품질은 25°C 또는 55°C의 승온에서 3일 동안의 저장과 독립적으로 유리화 배지가 용해제를 포함하였을 때 관찰되었으며, 이는 본원에 기재된 바와 같이 제조된 세포성 시료를 저장하는 강력한 능력을 예시한다.

[0096] 실시예 2

[0097] LINTERNA Jurkat T-세포를 실시예 1에서와 같이 획득하고 배양하였다.

[0098] 시료  $5 \times 10^6$  Jurkat T-세포를, 600 mM 트레할로스, 5% 글리세롤, 0.01% Triton X-100을 함유하는 250  $\mu$ l 유리화 배지에서 10-15분 동안 인큐베이션하였다. 그 후에, 시료를 약 6분 동안 유리화시켜, 0.01의 MRR을 달성하였다. 그 후에, 시료를 25°C 또는 55°C에서 3일 동안 저장한 후, RNA를 추출하였다. RNA 추출을 실시예 1에서와 같이 수행하였다.

[0099] 비교인자로서, RNA를 유리화된 세포에 따라 RNA 추출 및 분석을 하기 전에 4°C에서 저장된 신선한 세포의 시료로부터 추출하였다.

[0100] 그 후에, 각각의 시료로부터 추출된 RNA를, VEGF(PDGF/VEGF 성장 인자 계열의 구성원) 또는 GAPDH에 대한 RNA 주형을 사용하여 RT-PCR을 받게 하였다. 도 6a는 다양한 제조 및 저장 기법으로부터 세포로부터의 GAPDH mRNA의 주기 역치(Ct) 값을 도시한다. 도 6b는 다양한 제조 및 저장 기법으로부터 세포로부터의 GAPDH mRNA의 Ct 값 배수 변화 값을 도시한다. 도 6c는 다양한 제조 및 저장 기법으로부터 세포로부터의 VEGF mRNA 배수 변화를 도시한다. 도 6a 및 도 6b에 제시된 바와 같이, GAPDH 유전자에 대한 저장 온도 둘 다에서의 신선한 세포 및 유리화된 세포에 대한 Ct 값 사이에 어떠한 유의한 변화도 존재하지 않았다. 이에 더하여, 강력한 VEGF mRNA가 관찰되었다(도 6c). 이에, 본원에 기재된 유리화 방법은 VEGF mRNA를 분해시키지 않으면서 세포를 유리화시키

고 저장하는 데 사용될 수 있는 것으로 결론내려졌다.

[0101] 실시예 3:

[0102] 다양한 동물 조직을 수득하고, 유리화를 받게 하였다. 마우스 장 및 간의 시료를 승인된 동물 프로토콜에 의해 인간적으로 수집하였다. 조직을 작은 절편(약 1 mm 두께, 중량 15 mg)으로 절단하고, 600 mM 트레할로스, 5 중량% 글리세롤, 0.5 중량% Triton X-100을 포함하는 유리화 배지에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 시료를 실시예 1에 따라 5분 동안 유리화시켜, 0.01의 MRR을 달성하고, 25°C 또는 55°C에서 1주일 동안 저장하였다.

[0103] 제2 세트의 시료를, 트레할로스 중합체를 추가로 포함하는 동일한 유리화 배지에서 유리화한다. 디메틸포름아미드(DMF)(2.31 mL)와 H<sub>2</sub>O(4.61 mL)의 혼합물에 아조비스이소부티로니트릴(AIBN)(5.28 mg, 3.22x10<sup>-2</sup> mmol) 및 스티레닐 에테르 트레할로스 단량체(634 mg, 1.38 mmol)를 용해시킴으로써 트레할로스 중합체를 합성한다. 산소를 동결-펌프-해동의 3개 주기에 의해 제거하고, 중합을 75°C에서 개시한다. 바이얼을 액체 질소 내로 침지시킴으로써 8.5시간 후에 중합을 중단시킨다.

[0104] 제3 세트의 시료를 상기에 따라 600 mM 트레할로스, 5 중량% 글리세롤, 0.5 중량% Triton X-100을 포함할 뿐만 아니라 보론산에 결합된 8-아암 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 유리화 배지에서 유리화시킨다. 8-아암 PEG 아민(400 mg, 10 kDa, 4 x 10<sup>-2</sup> mmol) 및 4-포르밀페닐보론산(96 mg, 6.40 x 10<sup>-1</sup> mmol)을 2.8 ml의 MeOH에 용해시킴으로써 중합체를 합성한다. NaBH<sub>3</sub>CN(37.7 mg, 6.00 x 10<sup>-1</sup> mmol)을 첨가하고 25°C에서 교반한다. 나머지 유리화 및 저장 프로토콜은 동일하다.

[0105] 저장 후, 조직 시료를 용해 완충제에서 재구성하고, mRNA를 실시예 1에서와 같이 단리한다. Synergy H1 Hybrid MF, BioTek Instrument의 Take3 플레이트를 사용한 분광법에 의해 RNA를 정량화하고 분석한다. 간략하게는, 2 µl/웰의 각각의 시료를 Take3에 첨가하고, 초순수 RNase 무함유 물을 블랭크로서 사용하였다. 총 RNA 농도를, Gen5 소프트웨어(1.0은 약 40 µg/ml ssRNA와 동등함)를 사용하여 A260 판독에 기초하여 계산하고, A260/A280 비를 RNA 품질에 대해 사용한다(1.8 내지 2.1+의 A260/A280 비는 고도로 정제된 RNA를 나타냄). 무손상 mRNA의 강력한 수율을 실증하는 결과를 표 2에 예시한다.

표 2

[0106]

시료	260/280 비	ng/마이크로리터	총 수율 (ng)
간	2.168	97.12	6318
장	2.099	108.48	7051

[0107] 보론산에 결합된 폴리에틸렌 글리콜 또는 트레할로스 중합체와 함께 인큐베이션된 시료를 사용하면 더 강력한 결과가 예상된다.

[0108] 실시예 4:

[0109] 비-멸균 환경으로부터 수득된 생물학적 시료를 저장할 때, 비-공여자 유기체 공급원으로부터의 오염 확률은 항상 확률이다. 이를 해결하기 위해, 유기체 시료를 선택적으로 단리하고 원하지 않는 박테리아 오염을 배제하기 위해 프로토콜을 개발하였다. 만노스 결합 단백질(MBL)에 결합되거나 공급된 대로 사용되는 8 마이크로미터 니트로셀룰로스 막의 2개 층으로 3-층 시스템을 조립하였고, 둘 다 실시예 1에서와 같은 유리화에 사용된 PES 막의 상부 상에 존재하였다.

[0110] 조립된 시스템이 박테리아 핵산보다 원하는 핵산을 선택적으로 단리하는 능력을 시험하기 위해, 다양한 박테리아 균주의 3개 시료를 형성하였다. *이. 콜라이(E. coli)*, *스타필로코쿠스 에피테르미디스(Staphylococcus epidermidis)*, 및 *슈도모나스 애루기노사(Pseudomonas aeruginosa)*를 시험하였다. 각각의 박테리아를 배지에서 10<sup>4</sup>개 콜로니 형성 단위(CFU)로 희석시켰다. 10<sup>6</sup>개의 각각의 박테리아를 함유하는 펠렛에 100 마이크로리터의 박테리아 물질을 첨가하고, 박테리아 펠렛을 재현탁시켰다. 그 후에, 재현탁액을 조립된 3-층 막 시스템의 니트로셀룰로스 막 표면에 첨가하고, 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 후에, 3개의 막을 분리하고 PBS로 세척하였다. 그 후에, 세척 용액을 세포 카운팅을 받게 하고, 한천 플레이트 상에 평판배양하고, 뒤이어 37°C에서 2일 동안 배양하였다. *이. 콜라이*에 대해 각각 3별로 수행된 2개의 실험으로부터의 평균으로서 결과는 표 3에 예시한다.

표 3

[0111]

시료	% CFU	StDev	SEM
MBL 코트	35.69	11.47	8.11
음성 대조군	93.08	2.34	1.66
필터 없음	100	0	0

[0112]

에스. 에피테르미디스에 대해 각각 3별로 수행된 2개의 실험으로부터의 평균으로서 결과는 표 4에 예시한다.

표 4

[0113]

시료	% CFU	StDev	SEM
MBL 코트	21.57	7.22	5.11
음성 대조군	48.89	27.42	19.39
필터 없음	100	0	0

[0114]

결과는, MBL 결합된 필터가 시료로부터의 박테리아에 선택적으로 그리고 강력하게 결합하였음을 나타내고, 이는 시스템이 mRNA 함유 시료로부터 박테리아 오염을 선택적으로 제거할 수 있음을 실증한다.

[0115]

PES 막에서의 세포 카운트를 또한 분석하였다. PES 막을 PBS에 세척하고, 세포를 세포 카운팅을 받게 하였다. 각각 3별로 수행된 2개 실험으로부터의 평균으로서 제시된 결과를 표 5에 예시한다.

표 5

[0116]

시료	막	세포 (*10 <sup>5</sup> /ml)	StDev	SEM	회수율 %
Jurkat + 박테리아	MBL	8.45	4.45	3.15	84.5
	Ct1	8.8	2.55	1.8	88
Jurkat 단독	MBL	8.85	0.21	0.15	88.5
	Ct1	9	0	0	90

[0117]

모든 경우, PES 막은 원래 로딩된 세포의 84% 초과 회수율을 포함하고, Jurkat 세포의 양은 니트로셀룰로스 층 상의 MBL의 존재 또는 부재에 독립적이었다. 이들 결과는, 박테리아 세포에 선택적이고 유기체 세포의 선택적 저장에 이용될 수 있는 강력한 여과 시스템을 실증한다.

[0118]

추가예

[0119]

1. 생물학적 시료의 저장 방법으로서,

[0120]

생물학적 시료 안에 하나 이상의 세포를 포함하는 상기 생물학적 시료를 제공하는 단계;

[0121]

상기 생물학적 시료를 유리화제(vitrification agent) 및 용해제를 포함하는 유리화 배지와 접촉시켜, 유리화 혼합물을 형성하는 단계;

[0122]

상기 유리화 혼합물을 유리화시켜, 저장-안정한 시료를 생성하는 단계

[0123]

를 포함하는, 방법.

[0124]

2. 추가예 1에 있어서, 상기 저장-안정한 시료를 16°C 이상 내지 30°C 이하, 선택적으로 30°C 초과, 선택적으로 50°C 초과 온도에서 저장하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

[0125]

3. 추가예 1 또는 2에 있어서, 상기 생물학적 시료는 핵산, 선택적으로 RNA를 포함하는, 방법.

[0126]

4. 추가예 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 상기 생물학적 시료는 전혈, 혈장, 또는 혈청을 포함하는, 방법.

[0127]

5. 추가예 4에 있어서, 상기 생물학적 시료는 전혈, 혈청, 또는 혈장을 포함하고, 상기 유리화 혼합물은 항응고제를 추가로 포함하는, 방법.

[0128]

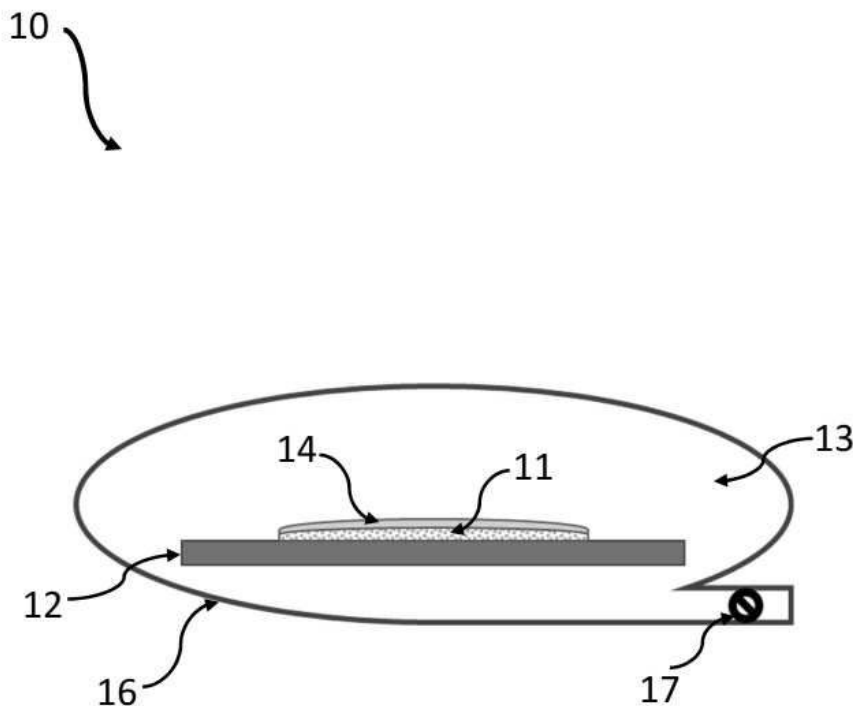
6. 추가예 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 상기 유리화 혼합물은 완충제를 추가로 포함하는, 방법.

- [0129] 7. 추가에 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, 상기 유리화제는 디메틸설폭사이드, 글리세롤, 당(sugar), 폴리알코올, 메틸아민, 베타인, 동결방지(antifreeze) 단백질, 합성 핵형성방지제(anti-nucleating agent), 폴리비닐알코올, 사이클로헥산트리올, 사이클로헥산디올, 무기 염, 유기 염, 이온성 액체, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.
- [0130] 8. 추가에 7에 있어서, 상기 유리화제는 트레할로스를 포함하는, 방법.
- [0131] 9. 추가에 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 상기 용해제는 세제를 포함하는, 방법.
- [0132] 10. 추가에 9에 있어서, 상기 세제는 소듐 도데실 설페이트(SDS), 2-[4-(2,4,4-트리메틸펜탄-2-일)페녹시]에탄올(예를 들어, Triton X-100), CHAPS(3-[(3-콜아미도프로필)디메틸암모니오]-1-프로판설포네이트), 구아니딘 하이드로클로라이드, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.
- [0133] 11. 추가에 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 상기 저장-안정한 시료를 보호용 인클로저(protective enclosure)에 봉입(enclosing)하는 단계, 및 상기 보호용 인클로저를 -196℃ 내지 +60℃의 온도에서 20일 이상의 저장 시간 동안 저장하는 단계를 추가로 포함하고, 상기 인클로저는 물 및 공기에 불침투성(impervious)인, 방법.
- [0134] 12. 추가에 1 내지 11 중 어느 하나에 있어서, 상기 유리화 혼합물을 유리화시키는 단계는 유리화 혼합물이 유리질 상태로 진입할 때까지 극저온(cryogenic temperature) 초과에서 유리화 혼합물을 건조시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0135] 13. 추가에 12에 있어서, 상기 유리화 배지는 하나의 또는 복수의 모세관 채널 내에 존재하는, 방법.
- [0136] 14. 추가에 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 상기 유리화는 1초 내지 1시간, 선택적으로 10분 이하의 건조 시간 동안 수행되는, 방법.
- [0137] 15. 추가에 1 내지 14 중 어느 하나에 있어서, 상기 유리화 혼합물을 유리화 전에 5분 이상 내지 30분 이하 동안 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [0138] 16. 추가에 15에 있어서, 상기 인큐베이션은 18℃ 이상 내지 37℃ 이하의 온도에서 수행되는, 방법.
- [0139] 17. 추가에 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 상기 생물학적 시료는 그 안에 하나 이상의 단리제(isolation agent)를 포함하는 단리 배지와 접촉함으로써 전처리되는, 방법.
- [0140] 18. 추가에 17에 있어서, 상기 단리제는 만노스 결합 렉틴인, 방법.
- [0141] 19. 추가에 17에 있어서, 상기 단리 배지는 니트로셀룰로스 또는 폴리비닐리덴 디플루오라이드를 포함하는, 방법.
- [0142] 20. 추가에 1 내지 19 중 어느 하나에 있어서, 상기 생물학적 시료는 조직을 포함하고, 상기 유리화 혼합물은 지지체(support) 물질, 선택적으로 중합체 지지체 물질을 추가로 포함하는, 방법.
- [0143] 21. 추가에 20에 있어서, 상기 중합체는 하이드로겔을 형성하기에 적합한, 방법.
- [0144] 22. 추가에 20에 있어서, 상기 중합체는 폴리에틸렌 글리콜인, 방법.
- [0145] 23. 추가에 20 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 상기 유리화 배지는 하나 이상의 부착제를 추가로 포함하는, 방법.
- [0146] 24. 추가에 23에 있어서, 상기 부착제는 보론산인, 방법.
- [0147] 25. 추가에 20 내지 24 중 어느 하나에 있어서, 상기 지지체 물질은 전환 가능한(switchable) 지지체 물질이고, 상기 방법은 상기 유리화 혼합물을 자극을 받게 하여 상기 전환 가능한 지지체 물질을 겔 상태로 전환시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [0148] 다양한 양태가 본원에 개시된다; 그러나, 개시된 양태는 다양하고 대안적인 형태로 구현될 수 있는 본 발명의 예시일 뿐이라는 것이 이해되어야 한다. 따라서, 본원에 개시된 특정 세부사항은 제한하는 것으로 해석되어서는 안 되며, 단지 본 발명의 임의의 양태에 대한 대표적인 기초로서 그리고/또는 본원에 개시된 교시를 다양하게 이용하도록 당업자를 교시하기 위한 대표적인 기초로서 해석되어야 한다. 더욱이, 본원에 사용된 용어는 본 발명의 특정 양태를 설명하기 위해 사용된 것으로, 어떠한 방식으로든 제한하려는 의도가 아니다.

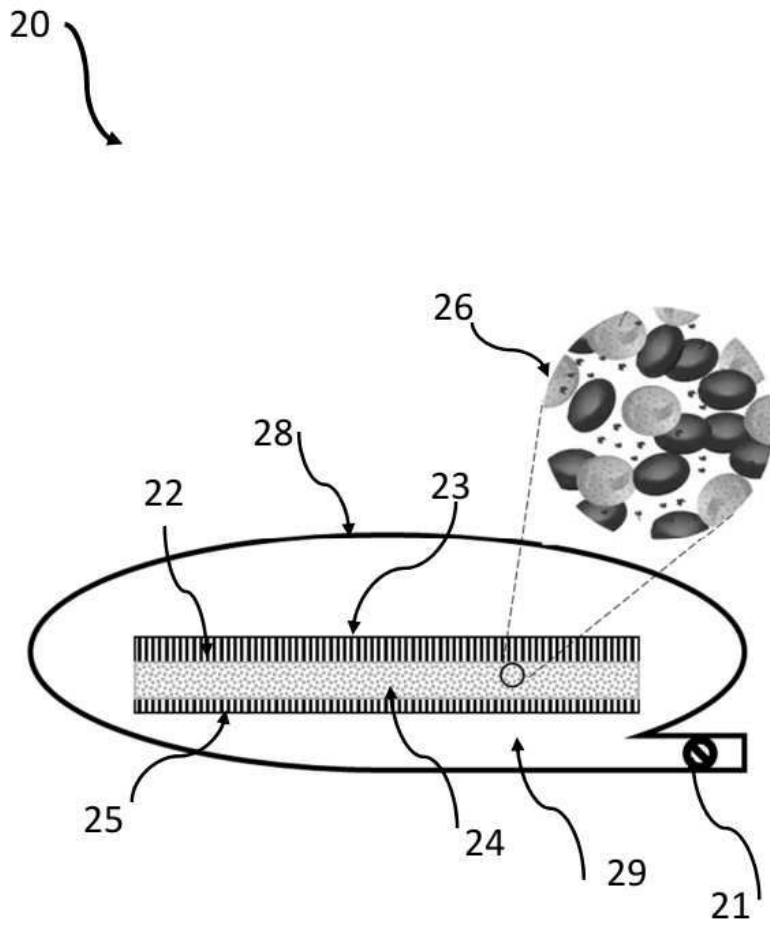
- [0149] 용어 "제1", "제2", "제3" 등이 본원에서 다양한 요소, 구성요소, 영역, 층 및/또는 절편을 기재하기 위해 사용될 수 있지만, 이러한 요소, 구성요소, 영역, 층 및/또는 절편은 이러한 용어로 제한되어서는 안된다. 이러한 용어는 하나의 요소, 구성요소, 영역, 층 또는 절편을 또 다른 요소, 구성요소, 영역, 층 또는 절편과 구별하는 데만 사용된다. 따라서, 이하에서 논의되는 "제1 요소", "구성요소", "영역", "층" 또는 "절편"은 본원의 교시로부터 벗어나지 않으면서 제2(또는 다른) 요소, 구성요소, 영역, 층 또는 절편으로 지칭될 수 있을 것이다.
- [0150] 본원에 사용된 바와 같은 용어는 단지 특정한 양태를 설명하기 위해 사용된 것으로 제한하려는 의도가 아니다. 본원에 사용된 바와 같이, 단수형("a", "an" 및 "the")은 내용이 달리 명시하지 않는 한 "적어도 하나"를 포함하는 복수형을 포함하는 것으로 의도된다. "또는"은 "및/또는"을 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "및/또는"은 관련된 나열된 항목 중 하나 이상의 모든 조합을 포함한다. 본 명세서에 사용될 때 용어 "포함한다(comprises)" 및/또는 "포함하는", 또는 "포함한다(includes)" 및/또는 "포함하는"은 언급된 특질, 영역, 정수, 단계, 작동, 요소, 및/또는 구성요소의 존재를 명시하지만, 하나 이상의 다른 특질, 영역, 정수, 단계, 작동, 요소, 구성요소 및/또는 이들의 기의 존재 또는 첨가를 배제하지 않는 것으로 추가로 이해될 것이다. 용어 "또는 이들의 조합"은 전술한 구성요소 중 적어도 하나를 포함하는 조합을 의미한다.
- [0151] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용되는 모든 용어(기술 용어 및 과학 용어 포함)는 본 개시내용이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 보편적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 또한, 일반적으로 사용되는 사전에 정의된 것과 같은 용어는 관련 기술 및 본 개시내용의 맥락에서 이의 의미와 일치하는 의미를 갖는 것으로 해석되어야 하며, 이상화되거나 본원에 명시적으로 정의되지 않는 한 지나치게 형식적인 의미로 해석되지 않을 것이다.
- [0152] 본 출원 전반에 걸쳐, 간행물이 참조되는 경우, 이들 간행물의 개시내용은 본 개시내용이 속하는 당업계를 더 완전히 설명하기 위해 본 출원에 참조로서 포함된다.
- [0153] 본 발명의 양태가 예시되고 설명되었지만, 이러한 양태는 본 발명의 모든 가능한 형태를 예시하고 설명하는 것으로 의도되지는 않는다. 그보다는, 본 명세서에 사용된 용어는 제한보다는 설명의 용어이며, 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않는 한 다양한 변형 및 치환이 가능할 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

**도면**

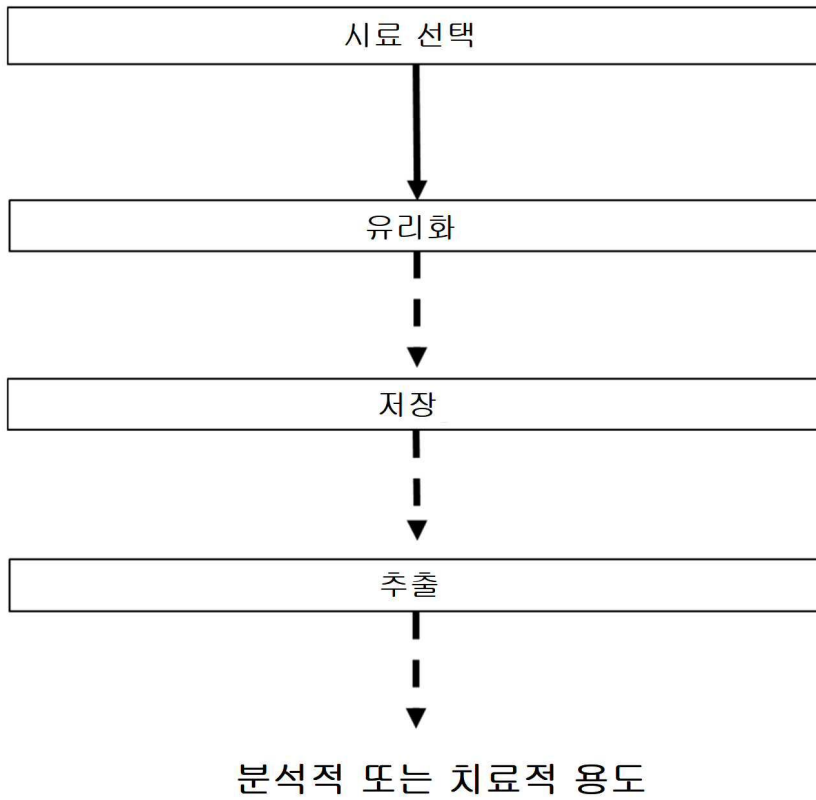
**도면1**



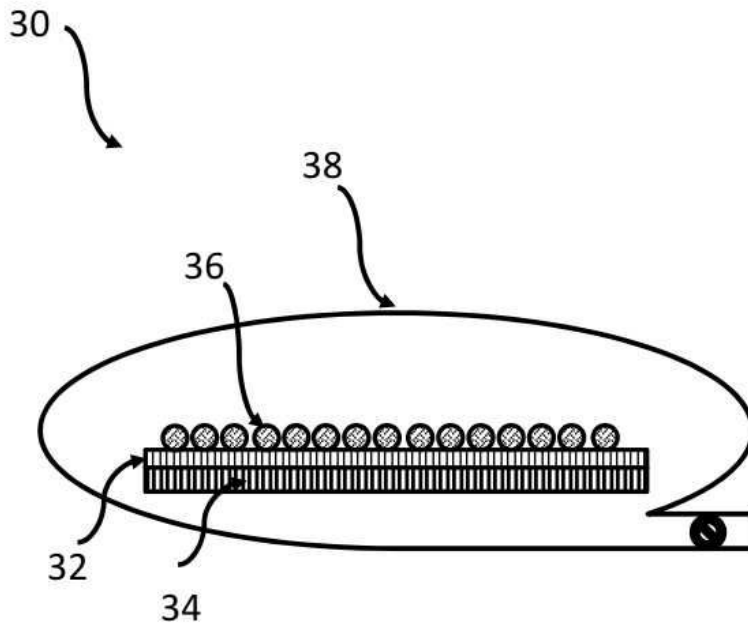
도면2



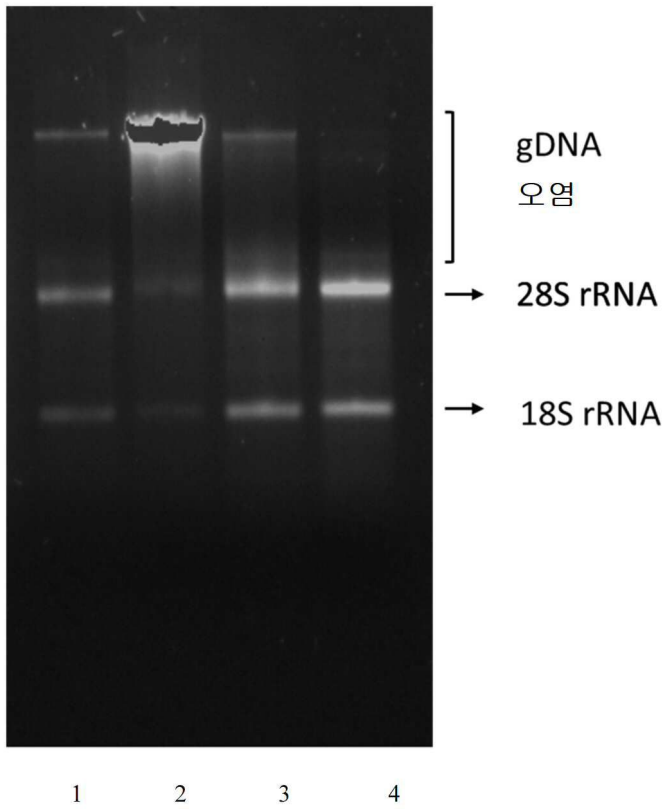
도면3



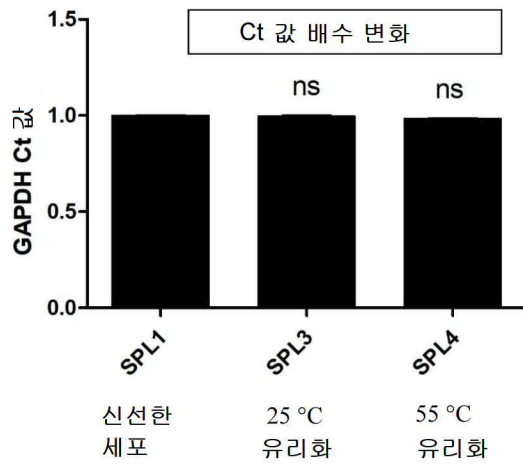
도면4



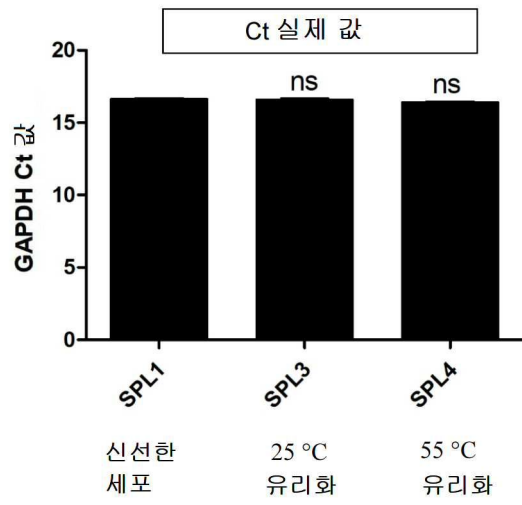
도면5



도면6a



도면6b



도면6c

