



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

(11) 공개번호 10-2014-0092233  
 (43) 공개일자 2014년07월23일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 C12Q 1/04 (2006.01) C12N 1/38 (2006.01)  
 C12N 1/20 (2006.01) C12N 1/00 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-7020168
- (22) 출원일자(국제) 2011년12월22일  
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2013년07월30일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2011/066820
- (87) 국제공개번호 WO 2012/092123  
 국제공개일자 2012년07월05일
- (30) 우선권주장  
 61/428,856 2010년12월31일 미국(US)

- (71) 출원인  
 쓰리엠 이노베이티브 프로퍼티즈 컴파니  
 미국 55133-3427 미네소타주 세인트 폴 피.오.박스 33427 쓰리엠 센터
- (72) 발명자  
 시아 웬셴  
 미국 55133-3427 미네소타주 세인트 폴 포스트 오피스 박스 33427 쓰리엠 센터  
 마흐 패트릭 에이  
 미국 55133-3427 미네소타주 세인트 폴 포스트 오피스 박스 33427 쓰리엠 센터  
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
 김영, 양영준

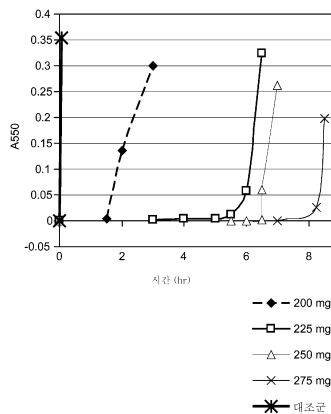
전체 청구항 수 : 총 30 항

**(54) 발명의 명칭 발포성 조성물 및 그 용도**

**(57) 요약**

선발제를 포함하는 잠재적 발포체가 개시된다. 표적 미생물을 선택적으로 풍부화하는 방법에 있어서의 잠재적 발포체의 사용 방법이 또한 개시된다. 본 방법은 샘플, 배양 배지 및 잠재적 발포체를 제공하는 단계를 포함한다. 본 방법은 샘플, 잠재적 발포체 및 배양 배지를 표적 미생물의 성장을 촉진하는 조건 하에 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 본 방법은 잠재적 발포체로부터 선발제를 방출시키는 단계를 추가로 포함한다. 선택적으로, 본 방법은 미생물을 검출하는 단계를 포함한다.

**대표도 - 도2**



(72) 발명자

**보르린 조셉 엠**

미국 55133-3427 미네소타주 세인트 폴 포스트 오피스 박스 33427 쓰리엠 센터

**비요르크 제이슨 더블유**

미국 55133-3427 미네소타주 세인트 폴 포스트 오피스 박스 33427 쓰리엠 센터

**리우 지에 제이**

미국 55133-3427 미네소타주 세인트 폴 포스트 오피스 박스 33427 쓰리엠 센터

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

표적 미생물의 성장을 높이는 방법으로서,

배양 배지, 표적 미생물을 포함할 수 있는 샘플, 및 잠재적 발포체(latent effervescent body)를 제공하는 단계 - 여기서, 잠재적 발포체는 코어 조성물이 내부에 배치된 외부 셸(shell)을 포함하며, 코어 조성물은 2가지 이상의 발포 성분 및 적어도 하나의 다른 미생물의 성장에 비하여 표적 미생물의 성장을 촉진하는 선발제(selective agent)를 포함함 - 와;

샘플, 잠재적 발포체 및 배양 배지를 표적 미생물의 성장을 촉진하는 조건 하에 접촉시키는 단계와;

선발제를 잠재적 발포체로부터 방출시키는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 선발제를 방출시키는 단계는 선발제를 배양 배지 내에 분배하는 것을 추가로 포함하는 방법.

**청구항 3**

제2항에 있어서, 선발제를 분배하는 것은 가스 발포에서 생기는 혼합 공정을 통하여 선발제를 분배하는 것을 추가로 포함하는 방법.

**청구항 4**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 선발제를 방출시키는 단계는 샘플 및 배양 배지를 포함하는 수성 혼합물을 소정의 기간 동안 잠재적 발포체와 유체 접촉 상태로 둔 후 선발제를 방출시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

**청구항 5**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 소정의 시간은 24시간 이하인 방법.

**청구항 6**

제5항에 있어서, 소정의 시간은 약 30분 내지 약 24시간인 방법.

**청구항 7**

제6항에 있어서, 소정의 시간은 약 30분 내지 약 2시간인 방법.

**청구항 8**

제7항에 있어서, 소정의 시간은 약 2 내지 약 6시간인 방법.

**청구항 9**

제5항에 있어서, 소정의 시간은 2시간 미만인 방법.

**청구항 10**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플, 잠재적 발포체 및 배양 배지를 접촉시키는 단계는 샘플을 표적 미생물의 선택적 풍부화를 가능하게 하기에 충분한 시간 동안 유효량의 방출된 선발제와 접촉시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

**청구항 11**

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 미생물을 검출하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 12**

제11항에 있어서, 미생물을 검출하는 단계는 반고체 배양 배지 상에서 또는 반고체 배양 배지 내에서 미생물을 번식시키는 것, 미생물을 현미경으로 관찰하는 것, 미생물의 대사 활성을 검출하는 것, 미생물의 생체분자를 검출하는 것 또는 미생물의 핵산을 검출하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 13**

수성 액체와 접촉될 때 봉해되는 외부 셀과;

외부 셀 내에 배치된 코어 조성물 - 여기서, 코어 조성물은 제1 및 제2 발포 성분과 적어도 하나의 다른 미생물의 성장에 비하여 표적 미생물의 성장을 촉진하는 선발제를 포함함 - 을 포함하는 잠재적 발포체.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 유동제, 완충 성분, 미생물 성장 지시제, 영양소, 결합제, 봉해 보조제, 윤활제, 충전제, 부착 방지제 또는 전술한 것 중 임의의 2가지 이상의 조합을 추가로 포함하는 잠재적 발포체.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 코어 조성물은 봉해 보조제를 포함하는 잠재적 발포체.

**청구항 16**

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 외부 셀은 폴리비닐 알코올, 폴리(메트)아크릴레이트, 셀룰로오스 및 메틸셀룰로오스, 프로필셀룰로오스, 전술한 것 중 임의의 것의 유도체, 또는 전술한 것 중 임의의 것의 혼합물을 포함하는 잠재적 발포체.

**청구항 17**

제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 코어 조성물은 형상화된 조성물을 포함하는 잠재적 발포체.

**청구항 18**

제13항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 외부 셀은 파우치(pouch)를 포함하는 잠재적 발포체.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 외부 셀은 형상화된 조성물의 형상에 부합되는 잠재적 발포체.

**청구항 20**

제13항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 발포 성분은 염기를 포함하며, 제2 발포 성분은 산을 포함하는 잠재적 발포체.

**청구항 21**

제13항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 발포 성분은 탄산나트륨, 중탄산나트륨, 탄산칼륨, 중탄산칼륨, 탄산리튬, 중탄산리튬 또는 전술한 것 중 임의의 2가지 이상의 혼합물을 포함하는 잠재적 발포체.

**청구항 22**

제13항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 발포 성분은 시트르산, 타르타르산, 이타콘산 또는 전술한 것 중 임의의 2가지 이상의 혼합물을 포함하는 잠재적 발포체.

**청구항 23**

제13항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 미생물 성장 지시제는 pH 지시제, 효소 기질 또는 레독스(redox) 지시제를 포함하는 잠재적 발포체.

**청구항 24**

제13항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 선발제는 염, 항생제, 계면활성제, 염료 또는 박테리오신을 포함하는 잠재적 발포제.

**청구항 25**

제24항에 있어서, 선발제는 노보바이오신, 페니실린, 아크리플라빈 HCl, 날라딕식산, 사이클로헥시미드, 암포테리신 B, 세프타지딤 수화물, 스트렙토마이신, 암피실린, 콜리스틴, 니신, 테트라사이클린, 페닐에틸 알코올, 테스옥시콜산나트륨, 도데실황산나트륨, 담즙산염, 황소 담즙, 티오황산나트륨, NaCl, 염화리튬, 탄산리튬, 메틸렌 블루, 브릴리언트 그린(brilliant green) 염료, 크리스탈 바이올렛(crystal violet), 및 말라카이트 그린(Malachite green)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 잠재적 발포제.

**청구항 26**

제13항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 외부 셸은 소정량의 시간 후 코어 조성물을 수성 액체 내로 방출하도록 구성된 잠재적 발포제.

**청구항 27**

제26항에 있어서, 외부 셸은 에틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스 또는 하이드록시프로필셀룰로오스의 혼합물을 포함하는 잠재적 발포제.

**청구항 28**

제27항에 있어서, 에틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스의 혼합물은 약 25 중량% 이상의 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스를 포함하는 잠재적 발포제.

**청구항 29**

제28항에 있어서, 에틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스의 혼합물은 약 33 중량% 이상의 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스를 포함하는 잠재적 발포제.

**청구항 30**

제29항에 있어서, 에틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스의 혼합물은 약 50 중량% 이상의 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스를 포함하는 잠재적 발포제.

**명세서**

**배경 기술**

- [0001] 관련 출원에 대한 상호 참조
- [0002] 본 출원은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함되는, 2010년 12월 31일자로 출원된 미국 가특허 출원 제428,856호의 이익을 주장한다.
- [0003] 샘플 (예를 들어, 식품)에서의 병원체의 신속한 검출 방법은 적어도 하나의 풍부화(enrichment) 단계에 대한 필요성에 의해 제한되었는데, 상기 풍부화 단계는 세균 성장을 검출가능한 수준으로 (예를 들어, ELISA 검출 방법의 경우 약 10<sup>6</sup> 콜로니 형성 단위(colony forming unit; cfu)/mL로) 촉진한다. 현재의 규제 지침에는 1 cfu가 25 g의 식품 샘플에서 검출되어야 함이 명시되어 있다. 이용가능한 기술은 이러한 큰 샘플에서 단일한 세균을 즉각적으로 검출할 수 없다. 그 결과, 전형적으로 풍부화 절차를 사용하여 샘플 중 미생물의 개수를 증가시켜 검출을 용이하게 한다.
- [0004] 전형적으로 병원체는 제품의 가공 동안 손상된다. 즉, 병원체는 가열, 냉동, 화학 첨가제와의 접촉, 또는 기계적 가공 단계 - 이는 병원체를 손상시키거나 또는 약화시킴 - 를 겪었을 수 있다. 따라서, 검출 전에 병원체의 소생이 흔히 필요하다.
- [0005] 스트레스를 받은 미생물은 건강한 미생물은 전형적으로 저해하지 않는 선발제에 의해 저해될 수 있기 때문에, 병원체의 존재에 대한 일반적인 스크리닝 기술은 비선택적 풍부화 배지의 사용으로부터 시작하는 일련의 배지 (즉, 영양액)의 사용, 그리고 그 후 선발 배지의 사용을 포함한다. 일반적으로 비선택적 풍부화 배지는 잠재적

으로 손상된 병원체의 소생에 이용된다. 일단 병원체가 회복되었으면, 소량의 비선택적 풍부화 배지를 그 후에 선발 배지로 옮긴다. 흔히 인간 작업 패턴 및 병원체의 성장 패턴에 의해 규정되는 이러한 기술은 일반적으로 완료하는 데 수일이 걸린다. 수년 간, 전체 분석 시간을 절감하기 위하여 일차 풍부화 단계의 길이를 단축시키려는 많은 시도가 이루어져 왔었다. 일반적으로, 적어도 8 내지 24시간의 비선택적 풍부화가 추가의 검사에 충분한 생존성 병원체의 수득에 필요한 것으로 밝혀졌다.

[0006] 예비 풍부화 및 선택적 풍부화 단계를 포함하는 검출 방법은 힘든 것이며, 그의 복잡성 때문에 결과에 영향을 줄 수 있는 다양한 인적 오류가 가해질 수 있다. 샘플에서, 더욱 많은 양의 표적 미생물 또는 그의 검출가능한 생체분자 성분을 수득하기 위한 더욱 간단한 풍부화 절차에 대한 필요성이 존재한다.

**발명의 내용**

[0007] 일반적으로 본 발명은 비표적 미생물을 함유하거나 또는 함유할 수 있는 샘플에서 표적 미생물을 검출하는 것에 관한 것이다. 본 발명의 방법은 샘플, 수성 성장 매질, 및 발포성 조성물 - 선발제 및 발포성 조성물이 성장 매질과 접촉한 후 소정의 시점에 선발제가 성장 매질 내로 방출되도록 하는 발포성 화합물을 포함함 - 을 포함하는 성분들의 혼합물을 형성하는 방법을 제공한다. 유리하게는, 본 방법은 선발제를 액체 혼합물에 소정의 시점에 별도로 첨가할 필요 없이, 작업자가 샘플을 액체 혼합물 형성 후 소정의 시점에 선발제에 노출시키는 것을 가능하게 한다. 추가로 본 방법은 선발제가 발포성 조성물로부터 방출됨에 따라 선발제가 상기 배지 내로 혼합되게 하고, 이럼으로써 상기 액체 전체에 걸쳐 선발제를 분배하는 추가의 혼합력을 제공할 필요성이 배제되게 하는 수단을 제공한다.

[0008] 일 태양에서, 본 발명은 표적 미생물의 성장을 높이는 방법을 제공한다. 본 방법은 배양 배지, 샘플 및 잠재적 발포체(latent effervescent body)를 제공하는 단계를 포함할 수 있다. 잠재적 발포체는 코어 조성물이 내부에 배치된 외부 셸(shell)을 포함할 수 있다. 코어 조성물은 2가지 이상의 발포 성분 및 적어도 하나의 다른 미생물의 성장에 비하여 표적 미생물의 성장을 촉진하는 선발제를 포함할 수 있다. 본 방법은 샘플, 잠재적 발포체 및 배양 배지를 표적 미생물의 성장을 촉진하는 조건 하에 접촉시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 본 방법은 추가로 잠재적 발포체로부터 선발제를 방출시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0009] 실시 형태들 중 임의의 것에서, 선발제를 방출시키는 단계는 선발제를 배양 배지 내에 분배하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 상기 실시 형태들 중 임의의 것에서, 선발제를 분배하는 것은 가스 발포에서 생기는 혼합 공정을 통하여 선발제를 분배하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 상기 실시 형태들 중 임의의 것에서, 선발제를 방출시키는 단계는 샘플 및 배양 배지를 포함하는 수성 혼합물을 소정의 기간 동안 잠재적 발포체와 유체 접촉 상태로 둔 후 선발제를 방출시키는 것을 추가로 포함할 수 있다. 상기 실시 형태들 중 임의의 것에서, 샘플, 잠재적 발포체 및 배양 배지를 접촉시키는 단계는 샘플을 표적 미생물의 선택적 풍부화를 가능하게 하기에 충분한 시간 동안 유효량의 방출된 선발제와 접촉시키는 것을 추가로 포함할 수 있다. 상기 실시 형태들 중 임의의 것에서, 본 방법은 미생물을 검출하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 실시 형태들 중 임의의 것에서, 미생물을 검출하는 단계는 반고체 배양 배지 상에서 또는 반고체 배양 배지 내에서 미생물을 번식시키는 것, 미생물을 현미경으로 관찰하는 것, 미생물의 대사 활성을 검출하는 것, 미생물의 생체분자를 검출하는 것 또는 미생물의 핵산을 검출하는 것을 포함할 수 있다.

[0010] 다른 태양에서, 본 발명은 잠재적 발포체를 제공한다. 잠재적 발포체는 수성 액체와 접촉할 때 붕해되는 외부 셸 및 외부 셸 내에 배치된 코어 조성물을 포함할 수 있다. 코어 조성물은 제1 및 제2 발포 성분과 적어도 하나의 다른 미생물의 성장에 비하여 표적 미생물의 성장을 촉진하는 선발제를 포함할 수 있다. 실시 형태들 중 임의의 것에서, 잠재적 발포체는 유동제, 완충 성분, 미생물 성장 지시제, 영양소, 결합제 붕해 보조제, 윤활제, 충전제, 부착 방지제 또는 전술한 것 중 임의의 2가지 이상의 조합을 추가로 포함할 수 있다. 잠재적 발포체의 상기 실시 형태들 중 임의의 것에서, 외부 셸은 폴리비닐 알코올, 폴리(메트)아크릴레이트, 셀룰로오스 및 메틸셀룰로오스, 전술한 것 중 임의의 것의 유도체, 또는 전술한 것 중 임의의 것의 혼합물을 포함할 수 있다. 잠재적 발포체의 상기 실시 형태들 중 임의의 것에서, 코어 조성물은 형상화된 조성물을 포함할 수 있다. 잠재적 발포체의 상기 실시 형태들 중 임의의 것에서, 외부 셸은 파우치(pouch)를 포함할 수 있다. 잠재적 발포체의 상기 실시 형태들 중 임의의 것에서, 제1 발포 성분은 염기를 포함할 수 있으며, 제2 발포 성분은 산을 포함할 수 있다. 잠재적 발포체의 상기 실시 형태들 중 임의의 것에서, 선발제는 염, 항생제, 계면활성제, 염료 또는 박테리오파지를 포함할 수 있다. 잠재적 발포체의 상기 실시 형태들 중 임의의 것에서, 외부 셸은 소정량의 시간 후 코어 조성물을 수성 액체 내로 방출하도록 구성될 수 있다. 잠재적 발포체의 상기 실시 형태들 중 임의의 것에서, 외부 셸은 에틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스의 혼합물을 포함할

수 있다. 일부 실시 형태에서, 에틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스의 혼합물은 약 25 중량% 이상의 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스를 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 에틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스의 혼합물은 약 33 중량% 이상의 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스를 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 에틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스의 혼합물은 약 50 중량% 이상의 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스를 포함할 수 있다.

[0011] 단어 "바람직한" 및 "바람직하게는"은 소정의 환경 하에서 소정의 이득을 제공할 수 있는 본 발명의 실시 형태를 말한다. 그러나, 동일한 또는 다른 상황 하에서 다른 실시예가 또한 바람직할 수 있다. 또한, 하나 이상의 바람직한 실시 형태의 언급은 다른 실시 형태가 유용하지 않다는 것을 의미하지 않으며, 본 발명의 범주로부터 다른 실시 형태를 배제하고자 하는 것은 아니다.

[0012] 용어 "포함하는" 및 그 변이형은 이들 용어가 발명의 상세한 설명 및 특허청구범위에서 나타날 경우 제한적 의미를 갖지 않는다.

[0013] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 단수형 용어("a," "an," "the"), "적어도 하나" 및 "하나 이상"은 서로 바꾸어서 사용될 수 있다. 따라서, 예를 들어 미생물은 "하나 이상의" 미생물을 의미하는 것으로 해석될 수 있다.

[0014] "및/또는"이라는 용어는 열거된 요소 중 하나 또는 전부, 또는 열거된 요소의 임의의 둘 이상의 조합을 의미한다.

[0015] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "선발제"는 민감한 미생물과 유체 접촉 상태로 있을 때 선발제의 부재 하에 유사한 조건 하에서의 민감한 미생물의 성장에 비하여 민감한 미생물의 성장을 지연시키거나 방지하는 화학적 또는 생물학적 화합물 또는 분자를 말한다. 민감성은 상대적인 상태이며, 미생물 (예를 들어, 표적 미생물)은, 선발제에 대하여 약간 민감한 한편, 선발제에 대하여 다른 미생물 (예를 들어, 비표적 미생물)보다는 덜 민감할 수 있다고 인식된다.

[0016] 또한, 본 명세서에서 종점(endpoint)에 의한 수치 범위의 설명은 그 범위 이내에 포함된 모든 수를 포함한다 (예를 들어, 1 내지 5는 1, 1.5, 2, 2.75, 3, 3.80, 4, 5 등을 포함함).

[0017] 본 발명의 상기의 개요는 본 발명의 각각의 개시된 실시 형태 또는 모든 구현 형태를 설명하고자 하는 것은 아니다. 이하의 기재는 더 구체적으로 예시적인 실시 형태를 예증한다. 본 출원 전체에 걸쳐 여러 곳에서, 예들의 목록을 통하여 지침이 제공되며, 상기 예들은 다양한 조합으로 사용될 수 있다. 각각의 경우에, 열거된 목록은 단지 대표적인 군으로서의 역할을 하며, 배타적인 목록으로 해석되어서는 안된다.

[0018] 이들 실시 형태 및 다른 실시 형태의 추가의 상세 사항이 하기 설명에 기술되어 있다. 다른 특징, 목적 및 이점들은 설명 및 특허청구범위로부터 명확하게 될 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0019] <도 1>

도 1은 본 발명에 따라 미생물을 풍부화하는 방법의 일 실시 형태의 블록 다이어그램이다.

<도 2>

도 2는 본 발명의 발포성 조성물의 상이한 실시 형태들이 첨가된 개별 수성 용액에서의, 소정의 기간에 걸친 가시광의 흡광도 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명은 샘플에서 표적 미생물을 검출하는 것에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 비표적 미생물을 포함할 수 있는 샘플에서 표적 미생물을 검출하는 것에 관한 것인데, 상기 비표적 미생물은 일부 상황에서는 표적 미생물보다 유의하게 더 많은 수로 샘플에 존재할 수 있다. 부가적으로, 본 발명은 비표적 미생물을 포함하는 샘플에 존재할 수 있는, 스트레스를 받은 미생물을 검출하는 것에 관한 것이다.

[0021] 본 발명은 병원성 미생물을 검출하기 위한 전통적인 선택적 풍부화 방법의 하나의 문제점이, 스트레스를 받거나 또는 손상된 미생물을 검출하기 위하여 2가지 유형의 배양 배지, 즉 비선발 영양 배지 (손상된 표적 미생물의 소생을 가능하게 하기 위한 것임) 및 선발 영양 배지 (비표적 미생물을 사멸시키거나 비표적 미생물의 성장을 저해하기 위한 것임)가 사용되어야 한다는 것임을 인식하고 있다. 부가적으로, 이러한 접근법은 전형적으로 1)

하나 이상의 외래 선발제를 배치 인리치먼트(batch enrichment) (예를 들어, 식품 샘플, 풍부화 브로쓰 및 미생물의 혼합물)에 첨가하기 위하여 또는 2) 미생물의 일부분을 포함하는 배치 인리치먼트의 분취물을 추가의 인큐베이션을 위하여 비선발 배지로부터 선발 배지로 옮기기 위하여 소정 시점에 인간의 개입을 필요로 한다. 어느 하나의 경우에, 최종 풍부화 배양은 샘플을 효과적으로 분배하기 위하여 그리고 풍부화된 식품 샘플의 적당함 대표성(adequate representation)을 보증하기 위하여 기계적 혼합을 필요로 한다.

[0022] 본 발명은 표적 미생물의 풍부화 방법에서 사용하기 위한 잠재적 발포체를 제공한다. 잠재적 발포체가 본 발명의 방법에서 사용되며, 이는 작업자가 단일한 영양 배지를 사용하여 소생 단계 및 선발 단계 둘 모두를 달성하는 것을 가능하게 하고 이럼으로써 상기에 언급된, 긴급한 그리고 노동 집약적인 개입에 대한 필요성이 배제된다. 본 발명의 잠재적 발포체는 작업자가 고도로 선발적인 선발제를 비선발적 영양 배지에 첨가하는 것을 가능하게 하며, 여기서, 선발제는 소정의 기간 동안 상기 배지에 존재하는 미생물에는 그의 효과를 발휘하지 못한다. 본 발명의 잠재적 발포체는 인간 또는 외부의 기계적 개입 없이 선발제의 성분들을 영양 배지 내로 즉각적으로 혼합하여 넣는 수단을 추가로 제공한다. 본 잠재적 발포체 및 방법은 표적 미생물을 검출하는 방법에서 사용될 수 있다.

[0023] 본 발명은 잠재적 발포체를 제공한다. 본 발명에 따르면, 잠재적 발포체는 외부 셀 및 외부 셀 내에 배치된 코어 조성물을 포함한다. 본 발명에 따르면, 코어 조성물은 소정의 표적 미생물의 성장을 적어도 하나의 다른 미생물에 비하여 촉진하는 선발제와, 2가지 이상의 발포성 성분을 포함한다.

[0024] 코어 조성물에서 사용되는 선발제는, 선발제가 잠재적 발포체의 외부 셀의 기능을 사실상 간섭하지 않는다면 (예를 들어, 외부 셀의 봉해를 사실상 촉진하지 않거나 또는 사실상 저해하지 않는다면), 표적 미생물을 선택적으로 풍부화하는 데 유용한 것으로 당업계에 공지되어 있는 임의의 선발제일 수 있다. 외부 셀을 간섭하는 것은 예를 들어 선발제를 이용하여 그리고 선발제를 이용하지 않고서 만들어진 잠재적 발포체의 봉해를 모니터링함으로써 (예를 들어, 시각적으로 관찰함으로써) 및/또는 측정함으로써 (예를 들어, 실시예 4에 기재된 바와 같이 분광법에 의해 유색 시약의 방출을 측정함으로써) 용이하게 검출될 수 있다. 바람직하게는, 선발제는 발포성 성분들의 안정성 및/또는 기능을 사실상 간섭하지 않는다. 발포성 성분들을 간섭하는 것은 예를 들어 선발제를 이용하여 그리고 선발제를 이용하지 않고서 만들어진 잠재적 발포체에 의해 방출되는 발포를 모니터링함으로써 (예를 들어, 시각적으로 모니터링함으로써) 모니터링될 수 있다. 선발제 부류의 비제한적인 예에는 항생제 (예를 들어, 아크리플라빈), 살생제, 염 (예를 들어, LiCl), 계면활성제 (예를 들어, 담즙산염), 염료, 박테리오파지, 및 박테리오파지가 포함된다. 선발제 (예를 들어, 아크리플라빈, LiCl)는 풍부화 배양물 내로 유효 농도 (예를 들어, 0.6 µg/mL의 아크리플라빈, 3 mg/mL의 LiCl)의 선발제를 전달하는 데 사용될 수 있는 양으로 잠재적 발포체 중에 배합될 수 있으며, 이는 첨부된 실시예에 나타난 바와 같다. 다른 적합한 선발제의 예에는 노보바이오신, 페니실린, 아크리플라빈, 날라딕산, 사이클로헥시미드, 암포테리신 B, 스트렙토마이신, 세프타지딤 수화물, 암피실린, 콜리스틴, 니신, 테트라사이클린, 페닐에틸 알코올, 데속시콜레이트, 담즙산염, 황소담즙, 티오황산나트륨, NaCl, 메틸렌 블루, 브릴리언트 그린(brilliant green) 염료, 크리스탈 바이올렛(crystal violet), 및 말라카이트 그린(Malachite green)이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다.

[0025] 코어 조성물에서 사용되는 발포성 성분들은, 수성 용액과 조합될 때, 가스 생성물 (예를 들어, 이산화탄소)을 형성하도록 반응하는 2가지 이상의 성분을 포함한다. 바람직하게는, 코어 조성물에서 사용되는 발포성 성분들은 건조 시약 (예를 들어, 대략 주위 수분 이하의 수분을 함유하는 과립 또는 분말)이다. 코어 조성물 중의 발포성 성분들 중 적어도 하나는 산을 포함하며, 코어 조성물 중의 발포성 성분들 중 적어도 하나는 염기를 포함한다. 적합한 발포성 산 성분의 비제한적인 예에는 시트르산, 타르타르산, 이타콘산, 및 발포성 염기 성분과 반응하지만 표적 미생물의 성장을 사실상 저해하지 않는 임의의 다른 유기 산이 포함된다. 적합한 발포성 염기 성분의 비제한적인 예에는 탄산나트륨, 중탄산나트륨, 탄산칼륨, 중탄산칼륨, 탄산리튬, 중탄산리튬, 및 발포성 산 성분과 반응하며 표적 미생물의 성장을 사실상 저해하지 않는 임의의 다른 금속 탄산염 또는 금속 중탄산염 화합물이 포함된다. 바람직하게는, 발포성 성분들은 선발제의 안정성 및/또는 기능을 사실상 간섭하지 않는다.

[0026] 선발제 및 발포성 성분에 더하여, 코어 조성물은 선택적으로 예를 들어 유동제, 완충 성분, 미생물 성장 지시제, 영양소, 결합제, 봉해 보조제, 유허제, 충전제, 부착 방지제, 또는 진술한 것 중 임의의 2가지 이상의 조합과 같은 다른 시약을 추가로 포함할 수 있다.

[0027] 유동제는, 예를 들어 코어 조성물의 성분들의 혼합 및 상기 혼합물의 정제 주형 내로의 분배를 돕기 위하여 코어 조성물에 첨가될 수 있다. 적합한 유동제의 비제한적인 예에는 L-류신 및 친수성 (예를 들어, 용해되는) 및/또는 소수성 실리카 입자 (나노입자, 예를 들어 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된, 본 출원과 공개류 중

인 미국 특허 출원 제61/384574호의 실시예 1에 개시된 바와 같이 아이소옥틸트라이메톡시실란 및 메틸트라이메톡시실란으로 개질된 나노입자를 포함함)가 포함된다.) 완충 성분은 표적 미생물의 성장을 지원하도록 배양 배지를 최적 pH로 유지할 수 있는 완충제를 포함한다. 적합한 완충 성분의 비제한적인 예에는 탄산나트륨, 인산이나트륨, 인산수소나트륨, 인산이칼륨, 인산수소칼륨, MOPS, 트리스(Tris), 및 HEPES가 포함된다. 미생물 성장 지시제는 예를 들어 pH 지시제 (예를 들어, 뉴트럴 레드(neutral red), 클로로페놀 레드, 브롬크레졸 퍼플(bromocresol purple)) 또는 효소 기질 (예를 들어, 발색 효소 기질, 예를 들어 오르토니트로페닐- $\alpha$ -D-글루코피라노시드 또는 파라니트로페닐- $\beta$ -D-갈락토피라노시드 등)을 포함한다. 운할제는 정제 형성 동안 마찰을 감소시키기 위하여 그리고 정제 형성 다이 공동으로부터의 조성물의 배출 동안 마찰을 감소시키기 위하여 코어 조성물에 첨가될 수 있다. 운할제는 수용성 또는 수불용성일 수 있다. 적합한 수용성 운할제의 비제한적인 예에는 붕산, 올레산나트륨 및 아세트산나트륨이 포함된다. 적합한 수불용성 운할제의 비제한적인 예에는 활석, 스테아르산마그네슘, 스테아르산칼슘, 스테아르산나트륨, 왁스 및 소듐 스테아릴 푸메레이트가 포함된다. 충전제는 예를 들어 코어 조성물을 포함하는 혼합물의 취급을 도울 벌크를 제공하기 위하여 코어 조성물에 첨가될 수 있다. 적합한 충전제의 비제한적인 예에는 락토스, 소르비톨, 만니톨, 셀룰로오스 및 수크로스가 포함된다. 결합제는 가공 동안 그리고 가공 후 (예를 들어, 정제와 같은 형상화된 조성물을 형성하는 공정 동안 그리고 상기 공정 후) 코어 조성물의 성분들의 응집을 촉진하기 위하여 첨가될 수 있다. 적합한 결합제의 비제한적인 예에는 폴리비닐 피롤리돈, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 6000, 하이드록시프로필 메틸 셀룰로오스(HPMC), 및 하이드록시프로필 셀룰로오스(HPC)가 포함된다.

[0028] 봉해 보조제는 잠재적 발포체의 신속한 봉해를 촉진할 수 있다. 유리하게는, 이는 부분적으로 봉해된 외부 셀을 수성 배양 매질이 관통하는 것을 촉진함으로써 배양 배지 전체에 걸친 선발체의 신속한 분배를 가능하게 할 수 있다. 이론에 의해 구애되지 않고서, 수성 배양 매질에 의한 외부 셀의 처음 붕괴시에, 상기 액체는 봉해 보조제와 접촉하여 봉해 보조제가 상기 액체를 흡수하여 팽윤되게 한다고 생각된다. 봉해 보조제의 팽윤은 약해진 외부 셀 상에 추가의 압력(즉, 가스 발포로부터의 압력 이외의 것)을 주어서, 이러한 추가 압력의 부재 하에서 외부 셀이 분할되는 것보다 더 빨리 외부 셀이 분할되게 한다. 적합한 봉해 보조제의 비제한적인 예에는 예를 들어 수팽윤성 중합체, 예를 들어 카르복시메틸셀룰로오스 (예를 들어, 미국 펜실베이니아주 필라델피아 소재의 에프엠씨 바이오폴리머(FMC Biopolymer)로부터 입수가 가능한 AC-DI-SOL 크로스카르멜로스 소듐(Croscarmellose sodium)), 가교결합된 폴리비닐피롤리돈 (예를 들어, 미국 뉴저지주 웨인 소재의 인터내셔널 스페셜티 프로덕츠(International Specialty Products)로부터 입수가 가능한 폴리플라스돈(POLYPLASDONE) XL-10), 및 소듐 전분 글리콜레이트 (예를 들어, 미국 뉴저지주 프린스턴 소재의 디엠비-폰테라 엑시피언츠(DMV-Fonterra Excipients)로부터 입수가 가능한 프리모젤(PRIMOJEL) 소듐 전분 글리콜레이트)가 포함된다.

[0029] 일부 실시 형태에서, 코어 조성물의 성분들을 사용하여 형상화된 조성물 (예를 들어, 정제)을 만들 수 있다. 일반적으로 균일한 크기 및 형상을 갖는 조성물의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 타정 펀치 다이 (예를 들어, 단일 헤드형 펀치 다이)를 포함한다. 펀치 다이는 각각의 정제의 균일한 압축을 얻기 위하여 기계적 프레스와 함께 사용될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 코어 조성물의 성분들은 성분들의 균질한 혼합물을 수득하기 위하여, 형상화된 조성물의 형성 이전에 밀링될 수 있다.

[0030] 잠재적 발포체의 외부 셀은 소정량의 시간 후 코어 조성물을 수성 액체 (예를 들어, 물, 수성 완충제, 배양 배지) 내로 방출하도록 구성된다. 즉, 외부 셀은 수성 액체의 관통에 대하여 부분적으로 내성인 그러나 완전히 내성인 것은 아닌 물질 (예를 들어, 중합체 물질)을 포함한다. 그러나, 소정의 기간 후, 수성 액체는 외부 셀을 완전히 관통하여 코어 조성물과 반응할 수 있다.

[0031] 일부 실시 형태에서, 외부 셀의 내수성은 물에 의한 관통 및/또는 봉해에 대하여 소정의 민감성을 갖는 물질로부터 외부 셀을 제작함으로써 제어될 수 있다. 예를 들어 폴리비닐알코올("PVA")은 예를 들어 쿠라레이 아메리카(Kuraray America; 미국 텍사스주 휴스턴 소재)로부터, 물 중 용해 속도가 상대적으로 느리거나 또는 상대적으로 빠른 몇몇 등급으로 입수가 가능하다 (예를 들어, 각각 쿠라레이 등급 28-99 및 30-92). 이들 실시 형태에서, 중합체는 물에 용해되고, 캐리어 (예를 들어, 플라스틱 필름) 상에 캐스팅되고, 건조될 수 있으며, 건조된 PVA 필름은 캐리어로부터 제거될 수 있다. 건조된 필름은 코어 조성물 (이는 형상화된 조성물의 형태일 수 있음)의 성분들을 제1 PVA 필름의 중심부 상에 침적시키고, 상기 제1 PVA 필름 (코어 조성물이 그 위에 있음)에 제2 PVA 필름을 오버레이(overlay)하고, 상기 필름들을 함께 밀봉(예를 들어, 접착 밀봉 또는 열 밀봉)하여 코어 조성물을 포함하는 파우치를 형성함으로써 잠재적 발포체를 만드는 데 사용될 수 있다. 열 밀봉 공정 동안 가능한 한 많은 공기를 파우치로부터 제거하도록 주의하고, 이럼으로써 코어 조성물과 PVA 외부 셀 사이에 최적의 접촉을 제공할 수 있다. 잠재적 발포체의 파우치 구성을 형성하는 데 사용되는 건조된 필름은 2

가지 이상의 별개의 중합체를 포함하는 블렌드로부터 형성될 수 있음이 고려된다. 잠재적 발포체의 파우치 구성을 형성하는 데 사용될 수 있는 중합체 필름도 구매될 수 있다. 이러한 필름의 예에는 예를 들어 솔루블론(SOLUBLON) 등급 EF-30, BP-26, 및 KA-40이 포함되며, 이들 전부는 아이첼로 케미칼 컴퍼니(Aicello Chemical Co.; 일본 아이치 소재)로부터 입수가 가능하다.

[0032] 일부 실시 형태에서, 외부 셀의 내수성은 2가지 이상의 물질의 혼합물로부터 외부 셀을 제작함으로써 제어될 수 있는데, 제1 물질은 사실상 내수성이며 제2 물질은 상대적으로 내수성이 더 적다. 외부 셀 중 상기 2가지 이상의 물질의 비율 조정함으로써 및/또는 외부 셀의 두께를 조정함으로써, 작업자는 코어 조성물을 수성 액체 내로 방출하도록 구성된 잠재적 발포체를 제작할 수 있다. 일반적으로, 혼합물 중 제1 물질이 더 많을수록 수성 용액이 외부 셀을 관통하는 데 걸리는 시간이 더 길어진다. 일부 실시 형태에서, 제1 및 제2 물질은 중합체 물질이다. 임의의 실시 형태에서, 제1 물질은 예를 들어 에틸셀룰로오스 - 이하, "ETC" - (예를 들어, 10 cp, 48% 에톡실화 에틸셀룰로오스; 미국 미주리주 세인트루이스 소재의 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)로부터 입수가 가능함) 또는 유드라기트(Eudragit) RS/RO (미국 델라웨어주 뉴어크 소재의 에보니크 테구사 인터내셔널(Evonik Degussa International)로부터 입수가 가능한 폴리아크릴레이트 중합체)일 수 있다. 임의의 실시 형태에서, 제2 물질은 예를 들어 하이드록시프로필셀룰로오스 - 이하, "HPC" - (예를 들어, 미분화 클루셀(Klucel) EXF 하이드록시프로필셀룰로오스; 미국 델라웨어주 윌밍턴 소재의 헤라클레스 인크.(Hercules Inc.)로부터 입수가 가능함), 하이드록시프로필메틸셀룰로오스 (미국 델라웨어주 뉴어크 소재의 다우 케미칼 컴퍼니(Dow Chemical Company)로부터 입수가 가능함), 또는 메타크릴산 및 메틸 메타크릴레이트의 음이온성 공중합체 (예를 들어, 미국 델라웨어주 뉴어크 소재의 에보니크 테구사 인터내셔널로부터 입수가 가능한 유드라기트 L-100)일 수 있다. 제1 및 제2 물질 (예를 들어, 각각 ETC 및 HPC)은 약 75 중량% 이하의 ETC, 약 67 중량% 이하의 ETC, 약 50 중량% 이하의 ETC를 포함하는 혼합물에서 조합될 수 있다. 잠재적 발포체의 붕해에 대한 제1 및 제2 물질의 다양한 비의 영향 및 붕해 속도를 측정하는 간단한 방법이 도 2에 도시되어 있으며 하기 실시예 4에 기재되어 있다. 2가지 이상의 외부 셀 물질의 혼합물은 용해되고, 필름으로 캐스팅되고, 잠재적 발포체의 파우치 구성을 만드는 데 사용될 수 있으며, 이는 상기에 기재된 바와 같다. 부가적으로, 2가지 이상의 중합체의 혼합물은 하기에 기재된 대안적인 외부 셀-형성 공정에서 사용될 수 있다.

[0033] 대안적으로, 외부 셀은 형상화된 코어 조성물의 형성에 사용되는 공정과 유사한 공정을 이용하여 코어 조성물 주위에 형성될 수 있다. 이러한 대안적인 방법에서, 코어 조성물의 성분들은 예를 들어 상기에 기재된 바와 같이 제1 타정 펀치 다이를 사용하여 형상화된 조성물을 형성하는 데 사용된다. 외부 셀 물질(들)의 제1 부분 (예를 들어, 약 50%)은 더욱 큰 제2 펀치 다이 공동 내에 들어간다. 제1 펀치 다이로부터의 형상화된 조성물은 예를 들어 제2 펀치 다이 공동의 대략적으로 중심부에, 외부 셀 물질의 상부 상에 들어간다. 외부 셀 물질(들)의 나머지는 제2 펀치 다이 내의 형상화된 조성물의 상부 상에 침적되며, 적절한 압력 (예를 들어, 약 13.3 킬로뉴턴 (1360 kg))이 펀치 다이에 가해지는데, 이는 코어 조성물 및 외부 셀을 갖는 잠재적 발포체의 경우에 그러하다.

[0034] 대안적으로, 외부 셀은 코팅 공정을 이용하여 코어 조성물 주위에 형성될 수 있다. 이러한 대안적인 방법에서, 코어 조성물의 성분들은 예를 들어 상기에 기재된 바와 같이 제1 타정 펀치 다이를 사용하여 형상화된 조성물을 형성하는 데 사용된다. 그 후, 형상화된 조성물은 외부 셀을 형성하는 물질 (예를 들어, 메타크릴산 및 메틸 메타크릴레이트의 음이온성 공중합체, 에틸셀룰로오스, 하이드록시프로필셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스, 폴리비닐 알코올 등 또는 그 조합)을 함유하는 액체 용액으로 코팅될 수 있다. 형상화된 조성물은 예를 들어 딥 코팅, 커튼 코팅 또는 스프레이 코팅과 같은 당업계에 공지된 임의의 액체 코팅 공정을 이용하여 코팅될 수 있다. 코팅의 두께뿐만 아니라 코팅의 조성도 수성 액체가 외부 셀을 관통하고/하거나 외부 셀을 붕해시키고 코어 조성물을 방출시키는 데 걸리는 시간의 양을 제어할 것이다. 따라서, 더욱 오랜 기간 동안 코어 조성물의 방출을 지연시키기 위하여, 코팅의 몇 개의 층 (예를 들어, 2개의 층, 3개의 층, 4개의 층, 5개의 층)이 적용될 수 있음이 고려된다. 코어 조성물의 방출을 제어하기 위하여 다층 외부 셀의 각각의 층은 동일한 물질들을 포함할 수 있거나 또는 이는 상이한 물질들을 포함할 수 있음이 또한 고려된다.

[0035] 대안적으로, 일부 실시 형태에서, 본 발명의 잠재적 발포체는 예를 들어 의약의 캡슐화에 사용되는 유형의 캡슐과 같은 사전 형성된 캡슐 내로 코어 조성물을 로딩함으로써 생성될 수 있다. 전 형성된 캡슐은 셀룰로오스 기재의 물질로부터 형성될 수 있으며 2개의 장방형 반부들로 제공될 수 있는데, 상기 반부들은 제약 산업에서 분말형 의약품이 로딩된 캡슐에 있어서 일반적인 바와 같이 마찰 접합(friction-fit)에 의해 반부들이 연결될 수 있게 하는 상보적 개구들을 일 단부에 갖는다. 발포성 성분 (예를 들어, 중탄산나트륨 및 시트르산), 선발제 (예를 들어, 아크리플라빈 HCl), 및 유동제 (예를 들어, 용해된 실리카 입자)의 분말을 포함하는 코어 조성물은

캡슐의 하나의 반부 내에 로딩될 수 있으며, 로딩된 반부는 마찰 접합에 의해 캡슐의 다른 하나의 반부에 연결될 수 있다. 선택적으로, 충전되고 조립된 캡슐의 에지는 액체 용액 (예를 들어 하이드록시프로필메틸셀룰로오스의 용액), 퀄리캡스 그룹(Qualicaps Group)에서 만들어진 캡슐 밴드(Capsule Band)-밀봉 장비에서와 같은 용액으로 밀봉될 수 있으며, 코팅 용액 (예를 들어, 에틸셀룰로오스 및 HPMC의 혼합물, 또는 유드라기트 S100 또는 L100 - 에탄올 또는 아이소프로판올 중)이 캡슐 상에 스프레이 코팅될 수 있고, 이는 본 명세서에 기재된 바와 같다. 코팅의 두께는 중량 증가(weight gain)에 의해 측정될 수 있으며, 코어 조성물의 방출에 있어서의 소정의 지연 시간이 성취될 수 있다.

[0036] 스프레이 코팅은 정제에 있어서 바람직한 액체 코팅 방법이다. 전형적으로, 600 g 이상의 정제들 (각각 대략 250 mg)의 배치를 회전 코팅 팬 내에 넣는다. 수성 용매 또는 유기 용매 중 어느 하나의 용매 중의 코팅 용액을 노즐을 통하여 스프레이하여 코팅 팬 근처에서 분무된 박무를 생성하는데, 상기 팬은 코팅된 정제를 건조시키기 위하여 환기 시스템 하에서 승온에서 유지된다. 정제의 중량의 약 2-20%인 건조 코팅 중량은 코팅된 정제의 코어 조성물에 유용한 지연 방출 시간을 제공한다. 예시적인 코팅기로는 미국 아이오와주 매리언 소재의 벡터 코포레이션(Vector Corporation)으로부터 입수가 가능한 하이-코터(Hi-coater) 코팅기가 있다.

[0037] 본 발명은 표적 미생물을 선택적으로 풍부화하는 방법을 제공한다. 표적 미생물은 소정의 미생물(즉, 본 방법을 수행하고 있는 작업자에 의해 사전 결정됨)이며 본 방법의 많은 측면 (예를 들어, 배양 배지 또는 매체의 유형, 제형 및 공급자, 인큐베이션 시간 및 온도)은 작업자에 의해 선택되고/되거나 기존 방법에 의해 규정되어 주어진 샘플 물질로부터의 특정 표적 미생물의 풍부화가 촉진되게 함을 이해하여야 한다. 도 1은 본 발명에 따라 미생물을 선택적으로 풍부화하는 방법의 일 실시 형태의 블록 다이어그램을 나타낸다. 본 방법은 샘플, 배양 배지 및 잠재적 발포체를 제공하는 단계(120)를 포함한다.

[0038] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "선택적 풍부화"는 선발제를 샘플에 첨가하는 것을 포함하는, 소정의 표적 미생물의 성장을 촉진하는 조건을 샘플에 가하는 공정을 말한다. 이들 조건은 표적 미생물의 성장을 촉진하기에 충분한 수분 활성(water activity)을 갖는 영양 환경, 표적 미생물의 성장을 지원하는 온도, 및 표적 미생물의 성장을 적어도 하나의 비표적 미생물에 비하여 향상시키도록 선택된 선발제를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0039] 샘플은 선택적으로 풍부화할 표적 미생물을 함유할 수 있는 임의의 샘플일 수 있다. 적합한 샘플의 비제한적 예에는 환경 샘플 (예를 들어, 표면 먼봉/스펀지, 토양, 침강물, 매개물), 식품 (예를 들어, 원료, 공정 중(in-process) 샘플, 및 완제품 샘플), 중간 배양물(starter culture), 음료, 임상/수의학적 샘플 (예를 들어, 혈액, 혈청, 혈장, 소변, 객담, 조직, 점액, 대변, 창상 삼출물, 고름, 뇌척수액), 및 물 (예를 들어, 표면수, 음용수, 공정수)이 포함된다.

[0040] 일부 실시 형태에서, 표적 미생물은 다양한 식품, 음료, 또는 식품- 또는 음료-가공 환경 공급원으로부터 유래된 샘플을 사용하여 풍부화할 수 있다. 식품 공급원의 비제한적 예에는 생고기 또는 가공된 고기, 생과일 또는 생야채 또는 가공된 과일 또는 야채, 비-유체 유제품 (예를 들어, 치즈, 버터 및 아이스크림), 중간 배양물, 건과류, 향신료, 재료 및 시럽이 포함된다. 음료 공급원의 비제한적 예에는 식용수, 과일 또는 야채 주스, 우유 및 발효 음료가 포함된다. 저온 살균(pasteurized) 식품 또는 음료가 또한 적합한 공급원일 수 있다. 식품- 또는 음료 가공 환경 샘플의 비제한적 예에는 식품취급 표면 샘플 (예를 들어, 컨베이어 벨트, 블레이드, 절단 표면, 혼합 설비 표면, 필터, 보관 용기), 실(room) 샘플 (예를 들어, 벽, 바닥, 배수구, 환기 설비), 및 세정 설비 (예를 들어, 호스, 세정 도구)가 포함된다.

[0041] 일부 실시 형태에서, 표적 미생물은 다양한 인간 또는 동물 공급원, 예를 들어 생리학적 유체, 예를 들어 혈액, 타액, 수정체의 액, 활액, 뇌척수액, 고름, 땀, 삼출물, 소변, 점액, 수유기 모유 등으로부터 유래된 샘플을 사용하여 풍부화할 수 있다. 또한, 시험 샘플은 신체 부위, 예를 들어 창상, 피부, 비공, 두피, 손발톱 등으로부터 유래될 수 있다.

[0042] 인간 또는 동물 공급원 유래의 특히 관심있는 샘플은 대변 샘플과, 점액-함유 샘플 및 점막 조직, 외이, 중이, 구강, 직장, 질 또는 기타 유사 조직으로부터 유래된 샘플을 포함한다. 특정 점막 조직의 예에는 협측(buccal), 잇몸(gingival), 코, 눈, 기관, 기관지, 위장, 직장, 요도, 요관, 질, 자궁 경부, 및 자궁 점막이 포함된다.

[0043] 생리학적 유체 외에도, 기타 시험 샘플은 액체 매질에 용해되는 고형물(들)뿐만 아니라 다른 액체도 포함할 수 있다. 관심대상의 샘플은 공정 스트림, 물, 토양, 식물 또는 기타 초목, 공기, 표면(예를 들어, 오염된 표면)

등을 포함할 수 있다. 샘플은 배양된 세포를 또한 포함할 수 있다. 또한 샘플은 세포, 포자, 또는 효소를 포함하는 장치 (예를 들어, 생물학적 지지 장치) 상의 또는 상기 장치 내의 샘플을 포함할 수 있다.

[0044] 본 발명의 방법에 적합한 샘플은 소정의 고체 샘플을 포함할 수 있다. 고체 샘플은 (예를 들어, 블렌딩, 초음파 처리, 균질화에 의해) 분해될 수 있으며, 액체 (예를 들어 물, 완충제, 브로쓰)에 현탁될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 샘플 물질을 함유하는 샘플-수집 기구 (예를 들어, 면봉, 스펀지)가 본 방법에서 사용될 수 있다. 대안적으로, 샘플 물질은 본 방법에서 샘플 물질을 사용하기 전에 샘플-수집 기구로부터 용출될 (예를 들어, 행구어질, 긁어내어질, 짜내어질) 수 있다. 일부 실시 형태에서, 액체 또는 고체 샘플은 액체 (예를 들어, 물, 완충제, 브로쓰)에 희석될 수 있다.

[0045] 특히 관심있는 표적 미생물은 원핵생물 및 진핵생물 유기체, 특히 그램(Gram) 양성균, 그램 음성균, 진균류, 마이코플라스마(*Mycoplasma*) 및 효모를 포함한다. 특히 관련된 유기체는 장내세균과, 또는 구균과(*family Micrococcaceae*) 또는 스태필로코커스(*Staphylococcus*) spp. 속, 스트렙토코커스(*Streptococcus*) spp. 속, 슈도모나스(*Pseudomonas*) spp. 속, 엔테로코커스(*Enterococcus*) spp. 속, 살모넬라 spp. 속, 레지오넬라(*Legionella*) spp. 속, 시겔라(*Shigella*) spp. 속, 예시니아(*Yersinia*) spp. 속, 엔테로박터(*Enterobacter*) spp. 속, 에스케리키아 spp. 속, 바실러스(*Bacillus*) spp. 속, 리스테리아 spp. 속, 비브리오(*Vibrio*) spp. 속, 코리네박테리아(*Corynebacteria*) spp. 속의 구성원과, 헤르페스(herpes) 바이러스, 아스페르길루스(*Aspergillus*) spp. 속, 푸사륨(*Fusarium*) spp. 속, 및 칸디다(*Candida* spp.) 속의 구성원을 포함한다. 특히 전염성이 강한 유기체는 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) (내성 주, 예를 들어 메티실린 내성 스태필로코커스 아우레우스(Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA)를 포함함), 에스. 에피더미디스(*S. epidermidis*), 스트렙토코커스 뉴모니에(*Streptococcus pneumoniae*), 에스. 아갈락티에(*S. agalactiae*), 에스. 피오게네스(*S. pyogenes*), 엔테로코커스 파에칼리스(*Enterococcus faecalis*), 반코마이신 내성 엔테로코커스(Vancomycin Resistant *Enterococcus*; VRE), 반코마이신 내성 스태필로코커스 아우레우스(VRSA), 반코마이신 중간체-내성 스태필로코커스 아우레우스(Vancomycin Intermediate-resistant *Staphylococcus aureus*; VISA), 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 에스케리키아 콜라이, 아스페르길루스 니게르(*Aspergillus niger*), 에이. 푸미가투스(*A. fumigatus*), 에이. 클라바투스(*A. clavatus*), 푸사륨 솔라니(*Fusarium solani*), 에프. 옥시스포룸(*F. oxysporum*), 에프. 클라마이도스포룸(*F. chlamydosporum*), 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*), 리스테리아 이바노비이(*Listeria ivanovii*), 비브리오 콜레라(*Vibrio cholera*), 브이. 파라헤모라이티쿠스(*V. parahemolyticus*), 살모넬라 콜레라수이스(*Salmonella cholerasuis*), 에스. 타이피(*S. typhi*), 에스. 타이피무름(*S. typhimurium*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 씨. 글라브라타(*C. glabrata*), 씨. 크루세이(*C. krusei*), 크로노박터 사카자키이(*Cronobacter sakazakii*), 이. 콜라이 0157 및 다중 약제 내성 그램 음성 막대균(multiple drug resistant Gram negative rod; MDR)을 포함한다.

[0046] 그램 양성균 및 그램 음성균이 특히 관심있다. 그램 양성균, 예를 들어 리스테리아 모노사이토게네스가 특히 관심있다. 또한, MRSA, VRSA, VISA, VRE, 및 MDR 미생물을 포함하는 항생제 내성 미생물이 특히 관심있다.

[0047] 샘플을 제공하는 것에 더하여, 본 방법은 배양 배지를 제공하는 단계를 포함한다. 배양 배지는 표적 미생물의 성장을 촉진하도록 선택된다. 본 명세서에서 "성장"은 그의 가장 넓은 의미로 사용되며, 예를 들어 단백질 합성, 핵산 합성, 세포막 합성, 세포벽 합성, 세포 분열 또는 전술한 세포 활성들 중 2가지 이상의 임의의 조합을 포함하는 동화(anabolic) 세포 활성을 말한다. 일반적으로, 배양 배지는 표적 미생물의 성장을 지원하기 위한 영양소, 필수 미네랄 및 물을 포함한다. 특정 배양 배지는 풍부화할 표적 미생물에 기초하여 선택될 수 있으며, 적절한 배양 배지의 선택은 완전히 당업자의 범위 이내이다.

[0048] 다시 도 1을 참조하면, 본 발명의 방법은 샘플, 잠재적 발포체, 및 배양 배지를 표적 미생물의 성장을 촉진하는 조건 하에 접촉시키는 단계(122)를 추가로 포함한다. 전형적으로, 배양 배지는 수성 액체이다. 일부 실시 형태에서, 배양 배지는 용기, 예를 들어 플라스크, 비커, 백, 튜브, 페트리 디쉬(Petri dish), 다중웰 플레이트 등에 수용된다. 바람직하게는, 용기는 배양 배지를 그 내부에 넣기 전에 살균되거나 또는 용기는 배양 배지와 함께 원위치에서 살균된다. 샘플 및 배양 배지는 배양 배지를 샘플이 담긴 용기에 전달함으로써 또는 샘플을 배양 배지가 담긴 용기에 전달함으로써 접촉시킬 수 있다. 일부 실시 형태에서, 샘플 및 배양 배지는 제1 용기 (예를 들어, 블렌더 병(jar), 샘플 백 또는 스토마커(stomacher) 백)에서 상호 접촉시킬 수 있으며, 후속적으로, 전부의 또는 일부분의 샘플/배양 배지 혼합물을 인큐베이션을 위하여 제2 용기 (예를 들어, 튜브 또는 플라스크)로 전달할 수 있다. 잠재적 발포체를 다양한 방식으로 샘플 및 배양 배지와 접촉시킬 수 있다. 잠재적 발포체는 빈 용기 내에 침적시킬 수 있으며, 여기에 배양 배지 및 샘플을 순차적으로 (임의의 순서로),

동시에 또는 혼합물로서 첨가할 수 있다. 대안적으로, 잠재적 발포체는 샘플, 배양 배지, 또는 배양 배지와 샘플이 담긴 용기에 전달될 수 있으며; 이때 다른 성분 (샘플 또는 배양 배지)은, 이미 존재하는 것이 아닐 경우, 후속적으로 첨가된다. 바람직한 실시 형태에서, 샘플 및 배양 배지를 용기 내에서 접촉시키고, 그 직후 잠재적 발포체를 용기에 전달한다. 일부 실시 형태에서, 배양 배지를 샘플과 접촉시킬 수 있으며, 생성된 복합 혼합물을, 잠재적 발포체가 상기 혼합물과 접촉하기 전에 소정의 기간 동안 인큐베이션할 수 있다.

[0049] 표적 미생물의 성장을 촉진하는 조건은 당업자에 의해 인식되며, 이는 배양 배지의 영양소 조성, 배양 배지의 pH, 배양 배지의 이온 강도, 배양 배지의 광에의 노출, 배양 배지의 산소 장력, 및 인큐베이션 시기 동안의 (예를 들어, 인큐베이터 내의) 배양 배지의 온도를 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 이들 조건 중 일부 (예를 들어, pH, 온도)는 잠재적 발포체가 붕해되는 데 걸리는 시간의 양에 또한 영향을 줄 수 있음이 인식될 것이다. 이는 실시예 4에 기재된 간단한 절차에 따라 (유사한 pH 조건 및 온도 조건 하에서) 외부 셸 물질을 스크리닝함으로써 결정될 수 있다.

[0050] 본 발명의 방법은 잠재적 발포체로부터 선발제를 방출시키는 단계(124)를 추가로 포함한다. 바람직하게는, 선발제는 샘플 및 배양 배지를 포함하는 수성 혼합물을 소정의 기간 동안 잠재적 발포체와 유체 접촉 상태로 둔 후 방출된다. 잠재적 발포체와 수성 유체 사이의 접촉에 의해 외부 셸의 붕해 과정이 개시되며, 이는 궁극적으로 코어 조성물의 방출로 이어진다. 유리하게는, 소정의 기간 동안 선발제의 방출을 지연시킴으로써, 원래 샘플 중의 임의의 손상된 또는 스트레스를 받은 표적 미생물은 선발제가 방출되기 전에 배양 배지에서 사실상 소생하고 성장하는 시간을 가질 것이다. 일부 실시 형태에서, 소정의 시간은 샘플, 배양 배지 및 잠재적 발포체 사이의 접촉 후 약 24시간 이하인 시간이다. 일부 실시 형태에서, 소정의 시간은 샘플, 배양 배지 및 잠재적 발포체 사이의 접촉 후, 약 30분 이상, 그러나 약 24시간 미만인 시간이다. 일부 실시 형태에서, 소정의 시간은 샘플, 배양 배지 및 잠재적 발포체 사이의 접촉 후, 약 30분 이상, 그러나 약 2시간 이하인 시간이다. 일부 실시 형태에서, 소정의 시간은 샘플, 배양 배지 및 잠재적 발포체 사이의 접촉 후, 약 2시간 이상, 그러나 약 6시간 이하인 시간이다. 일부 실시 형태에서, 소정의 시간은 샘플, 배양 배지 및 잠재적 발포체 사이의 접촉 후 약 2시간 미만인 시간이다. 일부 실시 형태에서, 소정의 시간은 샘플, 배양 배지 및 잠재적 발포체 사이의 접촉 후, 약 2시간 이상, 그러나 약 12시간 이하인 시간이다.

[0051] 전형적으로, 잠재적 발포성 조성물로부터의 선발제의 방출 후, 샘플, 배양 배지 및 선발제를 포함하는 혼합물은 소정의 기간 동안 접촉된다 (예를 들어, 인큐베이션된다). 이러한 추가의 접촉 시간은 유효량의 선발제가 잠재적 발포체로부터 방출되고 이럼으로써 적어도 하나의 비표적 미생물의 성장을 저해하거나 또는 방지하는 것을 가능하게 한다. 추가의 접촉 시간은 또한 배양 배지 중의, 표적 미생물 또는 그의 생체 분자 (예를 들어, 핵산 분자, 단백질, 다당류, 지질, 효소, 항원)의 개수의 증가를 가능하게 할 수 있다.

[0052] 본 발명의 방법은 미생물을 검출하는 선택적 단계(126)를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 미생물을 검출하는 단계는 표적 미생물을 검출하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 미생물을 검출하는 단계는 비표적 미생물을 검출하는 것을 포함할 수 있다. 미생물은, 광학적 검출법 (예를 들어, 현미경법, 유세포 분석법), 도말 기술 (예를 들어, 한천 배양 배지 또는 계수화성 건조 필름-기재 배양 장치 등을 사용함), 면역분석 기술 (예를 들어, ELISA, 응결, 측면 유동 면역분석법), 효소 분석법, 분자 유전학 기술 (예를 들어, 등온적 핵산 증폭 방법, PCR, LCR, NASBA, PFGE), 및 박테리오파지 형결정(typing)을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 당업계에 공지된 임의의 미생물 검출 수단에 의해 검출될 수 있다.

[0053] 실시 형태

[0054] 실시 형태 1은 표적 미생물의 성장을 높이는 방법으로서,

[0055] 배양 배지, 표적 미생물을 포함할 수 있는 샘플, 및 잠재적 발포체를 제공하는 단계 - 여기서, 잠재적 발포체는 코어 조성물이 내부에 배치된 외부 셸(shell)을 포함하며, 코어 조성물은 2가지 이상의 발포 성분 및 적어도 하나의 다른 미생물의 성장에 비하여 표적 미생물의 성장을 촉진하는 선발제(selective agent)를 포함함 - 와;

[0056] 샘플, 잠재적 발포체 및 배양 배지를 표적 미생물의 성장을 촉진하는 조건 하에 접촉시키는 단계와;

[0057] 선발제를 잠재적 발포체로부터 방출시키는 단계를 포함하는 방법이다.

[0058] 실시 형태 2는 선발제를 방출시키는 단계가 선발제를 배양 배지 내에 분배하는 것을 추가로 포함하는 실시 형태 1의 방법이다.

[0059] 실시 형태 3은 선발제를 분배하는 것이 가스 발포에서 생기는 혼합 공정을 통하여 선발제를 분배하는 것을 추가

로 포함하는 실시 형태 2의 방법이다.

- [0060] 실시 형태 4는 선발제를 방출시키는 단계가 샘플 및 배양 배지를 포함하는 수성 혼합물을 소정의 기간 동안 잠재적 발포체와 유체 접촉 상태로 둔 후 선발제를 방출시키는 것을 추가로 포함하는, 실시 형태 1 내지 3 중 어느 하나의 방법이다.
- [0061] 실시 형태 5는 소정의 시간이 24시간 이하인, 상기 전 실시 형태들 중 어느 하나의 방법이다.
- [0062] 실시 형태 6은 소정의 시간이 약 30분 내지 약 24시간인 실시 형태 5의 방법이다.
- [0063] 실시 형태 7은 소정의 시간이 약 30분 내지 약 2시간인 실시 형태 6의 방법이다.
- [0064] 실시 형태 8은 소정의 시간이 약 2 내지 약 6시간인 실시 형태 6의 방법이다.
- [0065] 실시 형태 9는 소정의 시간이 2시간 미만인 실시 형태 5의 방법이다.
- [0066] 실시 형태 10은 샘플, 잠재적 발포체 및 배양 배지를 접촉시키는 단계가 샘플을 표적 미생물의 선택적 풍부화를 가능하게 하기에 충분한 시간 동안 유효량의 방출된 선발제와 접촉시키는 것을 추가로 포함하는, 상기 전 실시 형태들 중 어느 하나의 방법이다.
- [0067] 실시 형태 11은 미생물을 검출하는 단계를 추가로 포함하는, 상기 전 실시 형태들 중 어느 하나의 방법이다.
- [0068] 실시 형태 12는 미생물을 검출하는 단계가 반고체 배양 배지 상에서 또는 반고체 배양 배지 내에서 미생물을 번식시키는 것, 미생물을 현미경으로 관찰하는 것, 미생물의 대사 활성을 검출하는 것, 미생물의 생체분자를 검출하는 것 또는 미생물의 핵산을 검출하는 것을 포함하는 실시 형태 11의 방법이다.
- [0069] 실시 형태 13은 잠재적 발포체로서,
- [0070] 수성 액체와 접촉될 때 붕해되는 외부 셀과;
- [0071] 외부 셀 내에 배치된 코어 조성물 - 여기서, 코어 조성물은 제1 및 제2 발포 성분과 적어도 하나의 다른 미생물의 성장에 비하여 표적 미생물의 성장을 촉진하는 선발제를 포함함 - 을 포함하는 잠재적 발포체이다.
- [0072] 실시 형태 14는 유동제, 완충 성분, 미생물 성장 지시제, 영양소, 결합제, 붕해 보조제, 운활제, 충전제, 부착 방지제 또는 전술한 것 중 임의의 2가지 이상의 조합을 추가로 포함하는 실시 형태 12의 잠재적 발포체이다.
- [0073] 실시 형태 15는 코어 조성물이 붕해 보조제를 포함하는 실시 형태 12의 잠재적 발포체이다.
- [0074] 실시 형태 16은 외부 셀이 폴리비닐 알코올, 폴리(메트)아크릴레이트, 셀룰로오스 및 메틸셀룰로오스, 프로필셀룰로오스, 전술한 것 중 임의의 것의 유도제, 또는 전술한 것 중 임의의 것의 혼합물을 포함하는, 실시 형태 12 내지 14 중 어느 하나의 잠재적 발포체이다.
- [0075] 실시 형태 17은 코어 조성물이 형상화된 조성물을 포함하는, 실시 형태 12 내지 15 중 어느 하나의 잠재적 발포체이다.
- [0076] 실시 형태 18은 외부 셀이 파우치를 포함하는, 실시 형태 12 내지 16 중 어느 하나의 잠재적 발포체이다.
- [0077] 실시 형태 19는 외부 셀이 형상화된 조성물의 형상에 부합되는 실시 형태 17의 잠재적 발포체이다.
- [0078] 실시 형태 20은 제1 발포 성분이 염기를 포함하며, 제2 발포 성분이 산을 포함하는, 실시 형태 12 내지 18 중 어느 하나의 잠재적 발포체이다.
- [0079] 실시 형태 21은 제1 발포 성분이 탄산나트륨, 중탄산나트륨, 탄산칼륨, 중탄산칼륨, 탄산리튬, 중탄산리튬 또는 전술한 것 중 임의의 2가지 이상의 혼합물을 포함하는, 실시 형태 12 내지 19 중 어느 하나의 잠재적 발포체이다.
- [0080] 실시 형태 22는 제2 발포 성분이 시트르산, 타르타르산, 이타콘산 또는 전술한 것 중 임의의 2가지 이상의 혼합물을 포함하는, 실시 형태 12 내지 20 중 어느 하나의 잠재적 발포체이다.
- [0081] 실시 형태 23은 미생물 성장 지시제가 pH 지시제, 효소 기질 또는 레독스(redox) 지시제를 포함하는, 실시 형태 13 내지 22 중 어느 하나의 잠재적 발포체이다.
- [0082] 실시 형태 24는 선발제가 염, 항생제, 계면활성제, 염료 또는 박테리오파지를 포함하는, 실시 형태 12 내지 23 중 어느 하나의 잠재적 발포체이다.

- [0083] 실시 형태 25는 선발제가 노보바이오신, 페니실린, 아크리플라빈 HCl, 날라딕식산, 사이클로헥시미드, 암포테리신 B, 세프타지딴 수화물, 스트렙토마이신, 암피실린, 콜리스틴, 니신, 테트라사이클린, 페닐에틸 알코올, 데스옥시콜산나트륨, 도데실황산나트륨, 담즙산염, 황소 담즙, 티오황산나트륨, NaCl, 염화리튬, 탄산리튬, 메틸렌블루, 브릴리언트 그린 염료, 크리스탈 바이올렛, 및 말라카이트 그린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 실시 형태 24의 잠재적 발포체이다.
- [0084] 실시 형태 26은 외부 셸이 소정량의 시간 후 코어 조성물을 수성 액체 내로 방출하도록 구성된, 실시 형태 13 내지 25 중 어느 하나의 잠재적 발포체이다.
- [0085] 실시 형태 27은 외부 셸이 에틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스 또는 하이드록시프로필셀룰로오스의 혼합물을 포함하는 실시 형태 26의 잠재적 발포체이다.
- [0086] 실시 형태 28은 에틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스의 혼합물이 약 25 중량% 이상의 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스를 포함하는 실시 형태 27의 잠재적 발포체이다.
- [0087] 실시 형태 29는 에틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스의 혼합물이 약 33 중량% 이상의 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스를 포함하는 실시 형태 28의 잠재적 발포체이다.
- [0088] 실시 형태 30은 에틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스의 혼합물이 약 50 중량% 이상의 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스를 포함하는 실시 형태 29의 잠재적 발포체이다.
- [0089] 실시에
- [0090] 달리 기술되지 않으면, 모든 백분율 및 부는 중량 기준이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 봉해 보조제는 또한 봉해제로 칭해질 수 있다.
- [0091] 사용한 재료
- [0092] · SIL1 - 캡-오-실(CAB-O-SIL) TS-530.표면 개질 건식 실리카; 캐보트 코퍼레이션(Cabot Corporation); 미국 매사추세츠주 보스턴 소재
- [0093] · SIL2 - 에어로실(AEROSIL) 200 건식 실리카; 에보니크 데구사 코퍼레이션(Evonik DeGussa Corporation); 미국 뉴저지주 파시파니 소재
- [0094] · 실리카 나노입자 - 본 출원과 공개류 중인 미국 특허 출원 제61/384574호의 실시에 1에 개시된, 아이소옥틸 트라이메톡시실란 및 메틸트라이메톡시실란으로 개질된 나노입자
- [0095] · 카르복실 기 대 에스테르 기의 비가 1:1인 메타크릴산-메틸 메타크릴레이트 공중합체 - 유드라기트™ L100 중합체 (에보니크 코퍼레이션(Evonik Corporation); 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재)
- [0096] · 스테아르산마그네슘 NF (이엠 사이언스(EM Science); 미국 뉴저지주 깁스타운 소재)
- [0097] · 탄산리튬 분말 (제이.티. 베이커(J.T. Baker); 미국 뉴저지주 필립스버그 소재)
- [0098] · 봉해 보조제 - 크로스카르멜로스 소듐 타입 A (Ac-다이-졸(Ac-Di-Sol™) 중합체; 에프엠씨 바이오폴리머(FMC BioPolymer); 미국 펜실베이니아주 필라델피아 소재)
- [0099] · (시그마-알드리치; 미국 미주리주 세인트루이스 소재)
- [0100] · ETC1 - 에틸셀룰로오스 (10 cp, 48% 에톡실; 시그마-알드리치; 미국 미주리주 세인트루이스 소재)
- [0101] · ETC2 - 에틸셀룰로오스 (에토셀(Ethocel) P10; 다우 케미칼 컴퍼니; 미국 펜실베이니아주 필라델피아 소재)
- [0102] · HPC - 하이드록시프로필셀룰로오스, 미분화됨 (클루셀 EXF; 헤라클레스 인크.; 미국 델라웨어주 월밍턴 소재)
- [0103] · HPMC - 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스 (메토셀(Methocel) E5; 다우 케미칼 컴퍼니; 미국 펜실베이니아주 필라델피아 소재)
- [0104] · 미국 미주리주 세인트루이스 소재의 시그마 알드리치로부터 획득한 시약들:
- [0105] ○ 아크리플라빈 HCl
- [0106] ○ PBS 완충제 - 인산염 완충 염수 용액

- [0107] · 미국 캘리포니아주 가드나 소재의 스펙트럼 레보라토리즈(Spectrum Laboratories)로부터 획득한 시약들:
- [0108] ○ PVP - 폴리비닐피롤리돈 (PVP K30)
- [0109] ○ 소듐 스테아릴 푸마레이트 NF
- [0110] ○ 탄산나트륨 분말
- [0111] ○ 중탄산나트륨 분말
- [0112] ○ 소르비톨
- [0113] ○ 시트르산 분말
- [0114] ○ 락토스
- [0115] · 리스테리아 모노사이토게네스(ATCC 11994)의 세균 스톡 배양물 - 미국 버지니아주 매너서스 소재의 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection). SBA 플레이트를 상기 스톡 배양물로 희석도말하고, 35 °C에서 하룻밤 인큐베이션함으로써 희석 플레이트를 준비함.
- [0116] · 트립신 처리 대두 한천 플레이트 - 미국 메릴랜드주 스팅스 소재의 벡톤 디킨슨(Becton Dickinson)으로부터 획득한 디프코(Difco™) 트립틱 소이 아가(Tryptic Soy Agar), 미국 메릴랜드주 스팅스 소재의 벡톤 디킨슨의 디프코™ 트립틱 소이 브로쓰를 사용하여 제조업자의 지시에 따라 3 중량% (wt%)로 제조함
- [0117] · 버터필드 인산염 희석제(Butterfield's Phosphate diluent) (버터필드 완충제로도 칭해짐) - 쓰리엠 컴퍼니(3M Company); 미국 미네소타주 세인트 폴 소재
- [0118] · 트립신 처리 대두 브로쓰 - 쓰리엠 컴퍼니; 미국 미네소타주 세인트 폴 소재
- [0119] · 미국 캘리포니아주 산타 마리아 소재의 하디 다이아그노스틱스(Hardy Diagnostics)로부터 획득한 배지들;
- [0120] ○ MOX 플레이트 - 옥스포드 메디움(Oxford Medium), 리스테리아용으로 개질됨, 한천-기체의 성장 배지
- [0121] · 혈액 한천 배지 - 5%의 양의 피를 포함하는 트립신 처리 대두 한천;
- [0122] 실시예 1. 봉해 보조제를 함유하는 코팅된 정제의 제조.
- [0123] 실시예 1에 대하여 표 1에 열거한 재료들을 10 mL 볼밀(ball-mill) 튜브에 첨가함으로써 정제 조성물을 제조하였다. 배치의 총량은 2.04 그램이었다. 튜브에 1.25 cm 직경의 볼을 구비하고, 조성물을 믹서 밀 (모델 MM300 믹서 밀; 렛슈 인크.(Retsch Inc.); 미국 펜실베이니아주 뉴타운 소재)에서 16<sup>-s</sup>의 진동수로 60초 동안 프로세싱하였다. 대략 20 mg의 밀링된 조성물을 타정 펀치 다이 내의 6개의 3 mm 직경의 둥근 공동 내에 넣었다. 각각의 공동에 상응하는 푸시 로드(push rod)를 갖는 메이팅 다이(mating die)를 공동 위에 위치시키고, 핸드 프레스(hand press)로 압착시켜 정제를 형성하였다. 각각의 정제는 약 19 mg으로 칭량되었다. 이러한 방식으로 제조한 10개의 정제를 10 mL의 탈이온수에 넣었다. 상기 정제 전부는 10-20분 후에 완전히 용해되었다.
- [0124] 7.5%의 유드라기트 L100 중합체 및 3.25%의 ETC1을 에탄올에 용해시킴으로써 코팅 용액을 제조하였다. 정제의 일면을 딥코팅하고, 이를 60°C의 고온 공기 중에서 건조시키고, 그 후 다른 일면을 침지시키고 건조시켜, 전체 정제를 조심스럽게 코팅하였다. 이 공정을 2회 반복하여 정제 상에 3개의 층의 코팅을 제공하였다. 약 20 mL의 탈이온수에 넣은 10개의 코팅된 정제는 약 3시간 후에 완전히 용해되었다.
- [0125] 실시예 2. 발포성 정제의 제조
- [0126] 실시예 2에 대하여 표 1에 나타난 재료들을 갖는 정제 조성물을 실시예 1에 설명한 절차에 따라 제조하였다. 정제들은 각각 약 18 mg으로 칭량되었으며, 이는 각각의 정제 내에 약 4.5 mg 아크리플라빈을 함유하였다. 10개의 정제를 10 mL의 탈이온수에 넣었을 때 기포가 발생되었다. 정제들은 1-2분 후에 용해되었으며, 기포가 없어진 후 균질한 용액이 생성되었다.

[0127] [표 1]

재료	정제 조성물 - 중량%	
	실시에 1	실시에 2
캡-오-실 TS-530	0.25	0.25
류신	5.00	5.00
PVP	5.00	5.00
붕해 보조제	1.00	
락토스	55.42	
소르비톨		55.00
중탄산나트륨		5.53
시트르산		4.22
아크리플라빈 HCl	33.33	25.00

[0128]

[0129] 실시에 3. 다양한 코팅 두께를 갖는 정제의 제조

[0130] 실시예 3에 대하여 표 2에 열거한 양의 재료들을 200 mL 유리병에 첨가하고 2분 동안 와동시킴으로써 코어 정제 조성물을 제조하였다. 배치 크기는 20 그램이었다. 직경이 0.7938 cm (0.3125 인치)인 타정 펀치 다이를 250 mg의 조성물로 충전시키고, 반자동 프레스 (카버 인크.(Carver Inc.); 미국 인디애나주 와바시 소재)에서 13.3 킬로뉴턴 (3,000 파운드)의 힘으로 압착시켜 250 mg의 정제를 형성하였다.

[0131] 직경이 1.3 cm (0.5 인치)인 제2 타정 펀치 다이를 사용하여 코팅된 정제들을 제조하였다. 1:2, 1:1, 및 2:1의 비의 ETC1 및 HPMC 분말의 혼합물을 함께 교반하였다. 코어 정제를 각각의 혼합물로, 그리고 ETC1만으로 코팅하였다. 각각의 정제에 있어서, 120 mg의 분말을 다이 공동에 넣고, 눌러서 평평하게 하였다. 코어 정제를 상기 분말의 중심에 두고, 추가의 120 mg의 혼합물을 첨가하여 정제를 덮었다. 다이를 13.3 킬로뉴턴 (3000 파운드)의 힘으로 압착시켜 코팅된 정제를 형성하였다.

[0132] 상기 절차를 분말들 각각에 대하여 반복하였다. 코팅된 정제를 40 mL의 PBS 완충제에 넣고, 용해에 대하여 모니터링하였다. 2:1의 비를 갖는 정제는 6시간 초과인 시간 동안 용해되었으며, 1:2 및 1:1의 비를 갖는 정제는 약 3시간 후에 용해되었다.

[0133] [표 2]

재료	정제 조성물 - 중량%	
	실시에 3	실시에 4
실리카 나노입자	1.00	1.00
류신	5.00	5.00
PVP	10.00	10.00
중탄산나트륨	31.00	31.00
시트르산	23.65	23.65
소르비톨	29.25	24.25
페놀 레드	0.10	0.10
붕해 보조제	0	5.00

[0134]

[0135] 실시에 4. 붕해 보조제를 포함하는 코팅된 정제의 제조.

[0136] 코어 정제를 실시예 4에 대한 표 2의 재료들을 사용하여 제조하고, 2:1의 비의 ETC1 대 HPMC 분말의 혼합물로 코팅하였으며, 이는 실시예 3에 설명한 절차에 따른 것이었다. 공동에 200 mg의 분말로 충전시키고, 눌러서 평평하게 하였으며, 정제를 공동 내에 중심에 두었으며, 추가의 200 mg의 분말을 첨가하여 정제를 덮고, 압착시켰다. 각각 225 mg, 250 mg, 및 275 mg인 정제들을 공동의 기저부에 둔 상태로 상기 공정을 반복하였으며, 동일한 양으로 정제를 덮었다.

[0137] 비코팅된 것을 포함하는 각각의 정제를 비커 내의 40 mL의 TSB에 첨가하였다. 완충제의 샘플 300 µL를 다양한 시점에 제거하고, 정제 주위에서의 기포의 출현 후 더 많은 샘플을 취하였는데, 상기 기포 출현은 정제가 그의 폭발점(bursting point) 가까이에 있음을 나타낸다. 각각의 완충제 샘플의 흡광도를 550 nm에서, 스펙트라맥스 (SpectraMax) 190 분광계 (미국 캘리포니아주 서니벨 소재의 몰레큘러 디바이시즈(Molecular Devices))에서

측정하였다. 비코팅된 정제는 5분 내에 완전히 용해되었다. 일단 코어가 완전히 용해되었으면, 발포성 혼합에 의해 균질한 용액이 생성되었다. 코팅된 정제의 완전한 용해에 있어서의 파열 시간은 정제로부터의 기포의 계속되는 스트림의 출현으로부터 20-30분 이내였다. 이는 코어 내의 붕해 보조제와 발포성 재료에 의해 생성된 기포 사이에 정제로부터의 재료들을 방출함에 있어서 상승 효과를 나타낸다. 도 2는 550 nm에서의 흡광도를 모니터링함에 의한, TSB 중 코팅의 양이 상이한 정제들의 정량적 파열 방출 프로파일을 나타낸다. 각각의 면에 약 225 mg 또는 250 mg의 코팅을 갖는 정제는 풍부화 배지에 유용할 수 있는 반면 - 여기서, 리스테리아와 같은 일부 유기체에 대하여 5.5 - 6.6시간의 지연이 요구됨 - , 더욱 적은 코팅 중량이 더 짧은 성장 시간을 필요로 하는 유기체를 위한 풍부화 배지에 유용할 수 있다.

[0138] 실시예 5. 선발제 및 6시간 지연 방출성을 갖는 코팅된 정제.

[0139] 코어 정제 조성물을 표 3의 조성을 이용하여 제조하였다. 리스테리아 모노사이토게네스를 위한 선발제로서 작용하는 리튬 이온이 제공되도록 탄산리튬을 첨가하였다. 재료들을 30 메시 스크린에 통과시키고, 그 후 혼합하고, 정제로 압착하였으며, 이는 실시예 3에서 설명한 절차에 따른 것이었다. 조성물을 1.3 cm (0.5 인치) 둥근 공동을 갖는 타정 펀치 다이에서 압착시켰다. 대략 1 g으로 칭량되는 코어 정제는 약 0.3 g의 탄산리튬을 함유하였다. 정제의 경도는 정제 경도 시험기 (닥터 슬뤼니게르(Dr. Schleuniger) 8M; 미국 뉴햄프셔주 맨체스터 소재의 팜트론 인크.(Pharmtron Inc.) 에 의해 결정할 때 약 7이었다.

[0140] 200 mL 유리병에서 2분 동안 표 3의 코팅 조성물을 수동으로 와동시킴으로써 코팅 조성물을 제조하였다. 코팅된 정제는, 타정 펀치 다이가 0.6875 직경 공동을 가지며, 약 0.60 g의 코팅 조성물을 공동의 기저부에 넣고, 약 0.95 g의 상기 조성물로 코어 정제를 덮은 것을 제외하고는, 실시예 3에 설명한 절차에 따라 제조하였다. 22.2 킬로뉴턴 (5,000 파운드)의 힘을 사용하여 정제를 압착시켰다. 정제는 40 mL의 TSB에 약 6시간 후에 용해되었다.

[0141] [표 3]

재료	실시예 5에 있어서의 조성물 - 중량%	
	정제	코팅
실리카 나노입자	0.5	
스테아르산마그네슘	1.25	0.1
HPC	5	4.00
탄산리튬	30	--
시트르산	52	--
소르비톨	11.25	--
ETC2	100	66
HPMC		29.90

[0142] 실시예 6. 아크리플라빈 및 6시간 지연 방출성을 갖는 코팅된 정제

[0144] 실시예 5의 절차에 따라 표 4의 정제 조성물을 사용하여 코어 정제를 제조하였다. 각각의 정제는 약 1 g으로 칭량되었으며, 이는 약 0.6 mg의 아크리플라빈 하이드로클로라이드를 포함하였다. 정제의 경도는 약 7이었다. 대략 0.45 g의 코팅 조성물을 하층용으로 사용하고, 약 0.70 g을 이용하여 정제를 덮은 것을 제외하고는 실시예 5의 절차 및 조성물로 정제를 코팅하였다. 코팅된 정제는 실온에서 40 mL의 TSB에 약 6시간 후에 용해되었다.

[0145] [표 4]

재료	정제 조성물 - 실시예 6 - 중량% VII
실리카 나노입자	0.5
스테아르산마그네슘	1.25
HPC	5
중탄산나트륨 분말	31
탄산나트륨 분말	9
시트르산 분말	34.51
소르비톨	18.683
아크리플라빈 HCl	0.06

[0146]

[0147] 실시예 7 - 아크리플라빈 및 리튬과 6시간 지연 방출성을 갖는 코팅된 정제

[0148] 리스테리아 모노사이토게네스를 위한 2가지의 선발제 및 2가지의 발포성 시약 (탄산리튬 및 시트르산)을 이용하여 표 5의 조성물을 사용하여 실시예 5의 절차에 따라 코어 정제를 제조하였다. 각각의 정제는 약 1 g으로 칭량되었으며, 이는 0.26 g의 탄산리튬 및 0.6 mg의 아크리플라빈 하이드로클로라이드를 함유하였다. 정제의 경도는 약 7이었다. 표 3으로 나타낸 오버코팅 층(코팅)을 나톨리 엔지니어링(Natoli Engineering)(미국 미주리주 세인트 루이스 소재)을 통하여 제조된 1.5939 cm (0.6275 인치) 펀치 다이에서 코어 정제에 적용하였다. 상부 및 하부 둘 모두를 위한 0.38 g의 코팅 분말을 실시예 5에서 설명한 바와 같이 적용하고, 14.2 킬로뉴턴 (3200 파운드)으로 프레스하였다. 정제는 35°C에서 40 mL의 브로쓰에 약 6시간 후에 용해되었다.

[0149] [표 5]

성분	정제 조성물 (실시예 7) 중량%
SIL2	1
소듐 스테아릴 푸마레이트	1.25
클루셀 EXF	5
탄산리튬	26.2
시트르산	45.41
탄산나트륨	16.00
아크리플라빈 클로라이드	0.066
소르비톨	4.82

[0150]

[0151] 실시예 8 - 리스테리아 모노사이토게네스의 검출

[0152] 획선 플레이트 배양물로부터의 엘. 모노사이토게네스(ATCC 11994)의 콜로니를 트립신 처리 대두 브로쓰 내에 접종하고, 35°C에서 20-24시간 동안 인큐베이션한다. 하룻밤 배양물을 버터필드 인산염 희석제에 희석시켜서 약 5000 cfu/mL(콜로니 형성 단위/mL)을 갖는 세균 현탁물을 제공한다.

[0153] 동네 슈퍼마켓으로부터 구매한, 분쇄된 생 칠면조 부분 120 g을 플라스틱 백에 넣고, 2000 cfu의 엘. 모노사이토게네스를 함유하는 세균 현탁물 약 0.4 mL을 접종한다. 칠면조를 약 5분 동안 수동으로 니딩하여(kneaded) 접종물을 혼합한다. 접종된 칠면조를 약 -18°C에서 약 36시간 동안 냉동시키고, 그 후 2 - 8°C에서 12시간 동안 해동시킨다. 접종하지 않은, 그러나 냉동시키고 해동시킨 동일 패키지로부터의 칠면조 부분 20 g을 대조군 용으로 사용한다.

[0154] 선발제, 즉 염화리튬 및 아크리플라빈 HCl을 이용하지 않고서, 표 6에 나타낸 조성과 같은 프레이저(Fraser) 브로쓰와 유사한 조성을 갖는 브로쓰 배지를 제조한다. 브로쓰 배지를 스팀 살균한다.

[0155] 100 밀리리터의 살균 브로쓰 배지 및 10 g의 해동된, 접종된 칠면조를 필터를 갖춘 스토마처 백 (쓰리엠™ 호모게나이저 백(Homogenizer Bag) - 6469; 미국 미네소타주 세인트 폴 소재의 쓰리엠 컴퍼니)에 첨가함으로써 샘플을 제조한다. 상기 백 내의 샘플을 스토마처 (스토마처 400 서큘레이터(Circulator); 영국 웨스트 서식스 소재의 세워드(Seward))에서 230 rpm에서 30초 동안 균질화한다. 인큐베이션 직전에, 실시예 7로부터의 정제를 샘플 1용의 백에 첨가한다. 4개의 다른 샘플들은, 시약들을 하기와 같이 첨가하여 동일한 방식으로 제조한다: 샘플

플 1의 듀플리케이트(duplicate)인 샘플 2 및 3의 경우 2개의 백 각각에 실시예 7로부터의 정제를 첨가하고; 샘플 4는 액체 시약들 (6 mg/mL의 아크리플라빈 HCl의 용액 (역삼투수 중에 제조) 0.1 mL 및 300 mg/mL의 LiCl의 용액 (역삼투수 중에 제조) 0.5 mL)을 백에 즉시 첨가함으로써 (t=0) 제조한다. 샘플 5는 동일한 양의 액체 시약들을 6시간 (t=6)의 인큐베이션 후 백에 첨가함으로써 제조한다. 활성제를 전혀 첨가하지 않은 것을 제외하고는 동일한 방식으로 샘플 6을 제조한다. 샘플 7은 단지 브로쓰 배지 및 접종되지 않은 칠면조를 이용하여 제조한 음성 대조 샘플이다.

[0156] 모든 샘플을 35°C 인큐베이터 내에 넣는다. 35°C에서의 6시간의 인큐베이션 후, 샘플 5를 인큐베이터로부터 꺼내고, 아크리플라빈 용액 및 LiCl 용액을 첨가한다. 샘플들을 인큐베이터로 되돌려 놓고, 각각 18, 20, 22 및 24시간 후, 5 mL의 여과액 샘플들을 꺼내고, 살균 폴리프로필렌 시험관 내에 넣고, 후속적인 샘플 제조를 위하여 -18°C에서 냉동시킨다. 각각의 샘플을 꺼낸 후 백들을 인큐베이터로 되돌려 놓는다.

[0157] 샘플 준비 키트 (PrepSEQ™ 스핀 샘플 준비 키트(Spin Sample Preparation Kit), 제품 번호: N 4409735; 미국 캘리포니아주 포스터 시티 소재의 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems)를 사용하여 PCR 분석용으로 샘플들을 준비하였다. 600 마이크로리터 부피의 각각의 수집된 듀플리케이트 샘플을 마이크로원심분리 스핀 컬럼 내로 피펫팅하고, 제조업자의 지시에 따라 DNA를 준비한다. 샘플들을 듀플리케이트로 준비한다.

[0158] 엘. 모노사이토게네스의 하룻밤 배양물 (ATCC 11994-상기에 설명한 바와 같이 준비함)을 10 밀리몰 인산염 완충제 중에 연속 10배로 순차적으로 희석하여 약  $10^8$  내지 약  $10^1$  cfu/mL (하룻밤 배양물은 약  $10^9$  cfu/mL를 갖는 것으로 가정함)를 갖는 세균 현탁물을 생성한다. 각각 약  $10^2$  및  $10^1$  cfu/mL를 갖는 희석된 현탁물을 정확한 cfu 결정을 위하여 배양 장치 (예를 들어, 쓰리엠™ 페트리필름(Petriefilm)™ 에어로빅 카운트 플레이트 (Aerobic Count Plate); (미국 미네소타주 세인트 폴 소재의 쓰리엠 컴퍼니) 상에 도달한다. 각각 약  $10^6$  내지 약  $10^2$  cfu/mL를 갖는 세균 희석물들의 600  $\mu$ l-분취물을 칠면조 샘플의 프로세싱과 유사한 방식으로 PCR 분석용으로 또한 프로세싱하며, 이는 하기에 기재된 바와 같다.

[0159] 600  $\mu$ l의 샘플을 마이크로원심분리 튜브 상의 프리필터 컬럼(prefilter column)에 로딩하고, 14,000 rpm에서 4분 동안 원심분리하고, 튜브 프리필터 컬럼을 버리고, 각각의 샘플로부터의 상청액을 흡인하여 버린다. 키트로부터의 50 마이크로리터 부피의 용해 완충제를 상기 튜브에 첨가하고, 그 후 10 마이크로리터의 프로테이나아제 K 용액 (20 mg/mL의 프로테이나아제 K 용액, 분자 생물학 등급; 미국 미주리주 세인트루이스 소재의 시그마 알드리치)을 첨가한다. 샘플들을 55°C에서 30분 동안 인큐베이션하고, 그 후 100°C에서 10분 동안 비등시킨다. 대략 실온으로 냉각시킨 후, 260 마이크로리터의 무DNAase 물 (미국 캘리포니아주 칼사베드 소재의 인비트로젠 (Invitrogen)을 각각의 마이크로원심분리 튜브에 첨가하고, 14,000 rpm으로 1분 동안 원심분리한다. 각각의 스핀 컬럼으로부터의 투명 상청액을 실시간 PCR 측정용으로 사용한다.

[0160] 실시간 PCR 시험은 제조업자가 제안한 프로토콜에 따라 탁맨(TaqMan)(등록상표) 리스테리아 모노사이토게네스 검출 키트 (PN 4366102; 미국 캘리포니아주 포스터 시티 소재의 어플라이드 바이오시스템즈)를 사용하여 수행하며, 즉, 각각의 비등시킨 샘플로부터의 12 마이크로리터 및 18  $\mu$ l의 PCR 프리믹스(premix)를 96웰 PCR 플레이트 (마이크로앰프(MicroAmp) 플레이트; 미국 캘리포니아주 포스터 시티 소재의 어플라이드 바이오시스템즈) 내로 피펫팅한다. PCR 플레이트를 투명 테이프로 밀봉하고, 와동에 의해 부드럽게 혼합한다. 실시간 PCR 측정을 데이터 분석 소프트웨어(MxPro)를 갖춘 스트라타진(Stratagene) Mx3005P QPCR 시스템 (미국 캘리포니아주 산타 클라라 소재의 애질런트 테크놀로지스(Agilent Technologies)에서 실시하여 Ct 값을 결정한다.

[0161] 실시예 9: 열 스트레스를 받은 세포를 성장시키기 위한 제어 방출성 선발제

[0162] 리스테리아 모노사이토게네스 (ATCC 19111)의 콜로니를 SBA 확산 플레이트로부터 수득하고, 5 mL의 살균 TSBYE (6 g/L의 효모 추출물을 포함하는 트립티카아제 대두 브로쓰, 이들 둘 모두 미국 메릴랜드주 스팅스 소재의 벡톤 디킨슨으로부터 획득하며, 제조업자의 지시에 따라 제조함) 내로 접종한다. 접종된 브로쓰 배양물을 35°C에서 18시간 동안 인큐베이션한다. 팔콘(Falcon) 튜브 내의 4.5 ml 부피의 TSBYE를 55°C에서 30분 동안 유지한 수조에서 가열한다. 0.5 mL 부피의 브로쓰 배양물을 상기 튜브에 첨가하고, 3-5초 동안 격렬하게 와동시킨다. 스트레스를 받은 세포 배양물은, 희석된 배양물을 55°C 수조에서 정확하게 10분 동안 인큐베이션함으로써 준비하고, 그 후 즉시 빙조 내에 30분 동안 두었다.

[0163] 열처리하지 않은 브로쓰 배양물의 유사하게 처리한 희석물을 또한 빙조 내에 둔다. 둘 모두의 배양물을 연속적으로 희석하고 (10배 희석; 0.1 mL을 0.9 mL의 버터필드 인산염 완충제 내에 넣음), 0.1 mL의 희석물을 MOx 한

천 플레이트 상에, 그리고 또한 SBA 플레이트 상에 도말하고, 각각의 듀플리케이트를 또한 도말한다. 플레이트들을 35°C에서 48시간 동안 인큐베이션하고, 그 후 계수하여 콜로니 카운트 및 스트레스를 받은 세포의 %를 결정한다.

[0164] 선발제, 즉 염화리튬 및 아크리플라빈 HCl을 이용하지 않고서, 표 6에 나타낸 조성과 같은 프레이저 브로쓰와 유사한 조성을 갖는 브로쓰 배지를 제조한다. 브로쓰 배지를 스팀 살균한다.

[0165] [표 6]

재료	최종 농도 - (g/L)
카제인의 체장 소화물	5
프로테오스 펩톤(Proteose Peptone) 3 번	5
소고기 추출물	5
효모 추출물	5
염화나트륨	20
인산이나트륨	9.6
인산일칼륨	1.35
에스쿨린(Esculin)	1.0
날리딕식산, 나트륨 염	0.02

[0166]

[0167] 열 스트레스를 받은 세포 배양물을 준비하고, 버터필드 인산염 회석제에서 2회의 연속 10배 희석을 가하고, 0.05 ml의 마지막 연속 희석물을 스토마치 필터 백 (호모게나이저 백, 파트 번호: 6469; 미국 미네소타주 세인트폴 소재의 쓰리엠 컴퍼니) 내의 100 mL의 브로쓰 배지에 첨가한다. 각각의 백에서의 최종 농도는 브로쓰 배지 1 mL당 약 20 cfu이다. 상기 백들을 밀봉하고, 스토마치 (스토마치 400 서클레이터; 영국 웨스트 서식스 소재의 세워드)에서 230 rpm의 설정치에서 30초 동안 프로세싱한다.

[0168] 35°C에서의 인큐베이션 직후 (t=0), 또는 6시간의 인큐베이션 후 (t=6) 각각의 스토마치 백들 각각에 표 7에 나타낸 선발제들을 첨가한다. 인큐베이션 동안, 5 mL의 샘플을 19시간, 21시간 및 24시간 후 각각의 백으로부터 꺼낸다. 각각의 샘플을 취한 후 백들을 인큐베이터로 되돌려 놓는다.

[0169] 각각의 샘플로부터의 생존성 세포를 하기와 같이 MOx 한천 플레이트에서 계수한다: 5 밀리리터의 분취물은 버터필드 인산염 회석제에서 6회의 연속 10배 희석을 가하고, 그 후 각각의 희석물의 듀플리케이트 0.1 mL 부분을 MOx 한천 플레이트 상에 스프레딩하고(spread), 35°C에서 48시간 동안 인큐베이션한다. 각각의 플레이트 상의 콜로니를 계수하고, 각각의 세트의 듀플리케이트 플레이트에 있어서 평균 로그 cfu로 기록한다.

[0170] [표 7]

백	첨가한 시약
1	없음
2	*Li/ACF 액체를 즉시 첨가
3	*Li/ACF 액체를 6시간의 인큐베이션 후 첨가
4	**코팅된 정제 1을 즉시 첨가
5	**코팅된 정제 2를 즉시 첨가
6	**코팅된 정제 3을 즉시 첨가

\*Li/ACF - 6 µg/mL의 아크리플라빈 0.1 mL 및 600 mg/mL의 LiCl 0.5 mL\*\* 실시예 7에 따라 제조한 코팅된 정제.

[0171]

[0172] 실시예 10 내지 실시예 12. 활성제의 제어된 방출을 위한 파우치

[0173] 표 8에 나타낸 바와 같은 실시예 10 내지 실시예 12를 위한 등급 및 두께를 갖는 폴리비닐 알코올 필름을 일본 토요하시 소재의 아이첼로 케미칼 컴퍼니로부터 상표명 솔루블롱으로 획득하였다. 약 5 cm (2 인치) x 약 7.5 cm (3 인치)로 측정되는 조각들을 절단하고, 세 변을 열 밀봉하여 파우치를 형성한다. 약 0.1%의 페놀 레드를 포함하는 1:1의 비의 중탄산나트륨 및 시트르산의 혼합물을 제조하였으며, 약 2 g을 파우치 각각에 첨가하였고, 마지막 변을 열 밀봉하였다.

[0174] 파우치 각각을 실온에서 200 mL의 물에 침지시키고, 파우치의 파열 시간을 기록하였으며, 이를 표 8에

나타낸다. 과열 직전에, 기포가 파우치 주위에서 발생되었으며, 여기서 파우치는 용해되기 시작하였다. 수초 이내에, 파우치는 과열되며, 발포성 재료는 물 중 염료와 급속하게 혼합된다.

[0175] [표 8]

실시에	필름 등급	필름 두께	용해도	과열되는 데 걸리는 시간
10	EF-30	30 마이크로미터	고온수	약 5분
11	BP-26	26 마이크로미터	온수	약 1분
12	KA-40	40 마이크로미터	냉수	약 30초

[0176]

[0177] 실시예 13 및 실시예 14. 활성제의 제어된 방출을 위한 캡슐

[0178] 탄산나트륨 및 시트르산의 2:1 혼합물 100 g을 0.1% 페놀 레드와 혼합하고, 이 혼합물을 20 g의 소르비톨과 함께 분쇄시킴으로써 균질한 분말을 제조하였다. 크기 4의 HPMC 캡슐을 상기 혼합물로 수동으로 충전시켰으며, 각각의 캡슐은 대략 215 mg으로 칭량되었다. 그 후, 실시예 13에 있어서, 폐쇄된 캡슐을 10% 유드라기트 S100 중합체 및 5% 트라이에틸 시트레이트의 에탄올 용액 내로 디코팅하였다. 실시예 14에 있어서, 제2 층을 제1 층에 오버코팅하였다. 상기 캡슐들을 각각 15 mL의 PBS 완충제에 넣었다. 코팅이 없는 캡슐은 수분 내에 용해되었다. 단일 코팅은 방출 시간을 1.5시간으로 지연시켰으며, 2층 코팅은 약 3.5시간 지연된 방출 시간으로 방출을 지연시켰다.

[0179] 실시예 15. 정제 형태로 전달된 선발제를 이용한 세균의 성장

[0180] 실시예 3의 절차에 따라 표 9에 나타난 조성물을 이용하여 정제를 제조하였다. 정제는 명목상 100 밀리그램/정제(mg/정제)로 칭량되었으며, 각각의 직경은 0.716 cm (0.2817 인치)였고, 볼록한 형상을 가졌다. 정제를 4.4 킬로뉴턴 (1000 파운드)으로 프레스하였다.

[0181] [표 9]

성분	정제 1	정제 2
	Mg /100 mg 정제	Mg/100 mg 정제
Sil2	1.0	1.00
루트롤(Lutrol)(등록상 표) 마이크로 127*	6.0	6.00
HPC	5.0	5.00
탄산나트륨	35.0	0
중탄산나트륨	0	35.00
시트르산	28.0	26.68
세프타지딤 수화물	10	10.00
소르비톨	14.81	16.32
총계	100.00	100.00

\*루트롤 마이크로 127 - 옥시란을 포함하는 메틸-옥시란 중합체; 미국 뉴저지주 플로라 파크 소재의 바스프 코포레이션(BASF Corporation)

[0182]

[0183] 성장 배지의 샘플들은 1 리터의 회복 배지 (리스테리아 회복용 변형 브로쓰(modified Listeria Recovery Broth; MLRB), 미국 미네소타주 세인트 폴 소재의 쓰리엠 컴퍼니로부터 입수가 가능함)에 각각의 조성의 정제들을 용해시킴으로써 제조하였다. 정제들은 4.5분 내에 용해되었다. 대조군으로서의 성장 배지의 샘플은 10 mg의 세프타지딤 수화물 분말 (제품 번호: C3809-5G; 미국 미주리주 세인트루이스 소재의 시그마 알드리치로부터 입수가 가능함)을 1 리터의 MLRB에 용해시킴으로써 제조하였다. 6회 희석한 성장 배지들을 제조하여 표 9에 나타난 농도의 세프타지딤 수화물(CDH)을 수득하였다.

[0184] 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) (ATCC 31483; 미국 버지니아주 머내서스 소재의 ATCC로부터 획득함)의 순수 배양물을 트립신 처리 대두 브로쓰 (BD™ 트립틱 소이 브로쓰; 미국 메릴랜드주 소재의 백톤 디킨슨) 내에 접종하고, 37°C에서 인큐베이션함으로써 세균 현탁물을 제조하였다. 상기 현탁물을 SMB (표준 방법 완충제

(Standard Methods Buffer; 미국 미네소타주 세인트 폴 소재의 쓰리엠 컴퍼니) 중에 1:1,000으로 희석시켰다. 희석된 현탁물을 표 10에 나타난 세프타지딤 농도를 함유하는 SMB 성장 배지에서 추가로 희석시켜 1:10,000으로 희석시켰다. 각각의 샘플의 4개의 듀플리케이트를 하기와 같이 96웰 플레이트 내로 피펫팅하였다: 세프타지딤 수화물을 포함하지 않는 성장 대조군; 세균 현탁물 1 마이크로리터당 10 마이크로그램의 세프타지딤 수화물을 포함하는 희석되지 않은 대조군; 및 표 10에 나타난 농도의 세프타지딤 수화물을 함유하는 접종된 배지의 각각의 희석물. 96웰 플레이트를 37°C에서 하룻밤 인큐베이션하고, 세균 성장에 대하여 시각적으로 조사하였다. 웰에서의 탁함은 성장을 나타냈다.

[0185] [표 10]

샘플	정제 1	정제 2	분말 대조군
성장 대조군 - 항생제 없음	+	+	+
희석되지 않은 대조군 - 10 mcg CDH/마이크로리터*	-	-	-
8.75 mcg CDH/마이크로리터	-	-	-
7.5 mcg CDH/마이크로리터	-	-	-
6.25 mcg CDH/마이크로리터	-	-	-
5.0 mcg CDH/마이크로리터	-	-	-
3.75 mcg CDH/마이크로리터	+	+	+
2.5 mcg CDH/마이크로리터	+	+	+

\* mcg CDH/마이크로리터 = 샘플 1 마이크로리터당 세프타지딤 수화물의 마이크로그램  
 "+"는 성장을 나타내고; "-"는 성장이 없음을 나타냄

[0186]

[0187] 표 10의 데이터는 정제 형태의 선발제의 전달이 분말 형태의 선발제의 전달과 비견되며, 성장을 나타내지 않는 세프타지딤 수화물의 최저 농도는 샘플 1 마이크로리터당 5 mcg였음을 나타낸다.

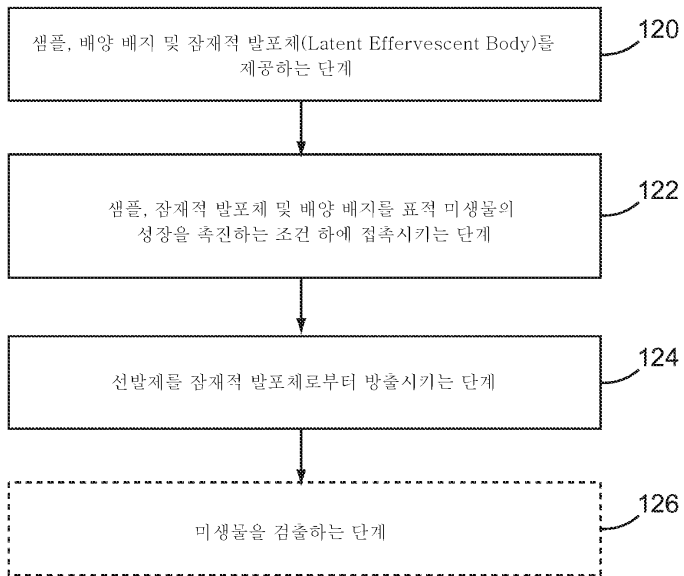
[0188] 모든 특허, 특허 출원, 및 공보, 그리고 전자적으로 입수가능한 본 명세서에서 언급된 자료의 완전한 개시가 참고로 포함되었다. 본 출원의 개시 내용과 본 명세서에 참고로 포함된 임의의 문서의 개시 내용(들) 사이에 임의의 모순이 존재하는 경우, 본 출원의 개시 내용이 좌우할 것이다. 상기 상세한 설명 및 예들은 단지 명확한 이해를 위해 주어졌다. 이로부터 어떠한 불필요한 제한 사항도 이해되지 않을 것이다. 당업자에게 자명한 변화가 특허청구범위에 의해 한정되는 본 발명의 범주 내에 포함될 것이므로, 본 발명은 도시되고 설명된 정확한 상세 사항으로 제한되지 않는다.

[0189] 모든 표제는 독자의 편리함을 위한 것이며, 그렇게 특정되지 않는 한 표제 이후의 본문의 의미를 한정하기 위하여 사용되어서는 안된다.

[0190] 본 발명의 사상 및 범주로부터 벗어남이 없이 다양한 변경이 이루어질 수 있다. 이들 및 다른 실시 형태가 이하의 특허청구범위의 범주 내에 속한다.

도면

도면1



도면2

