

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

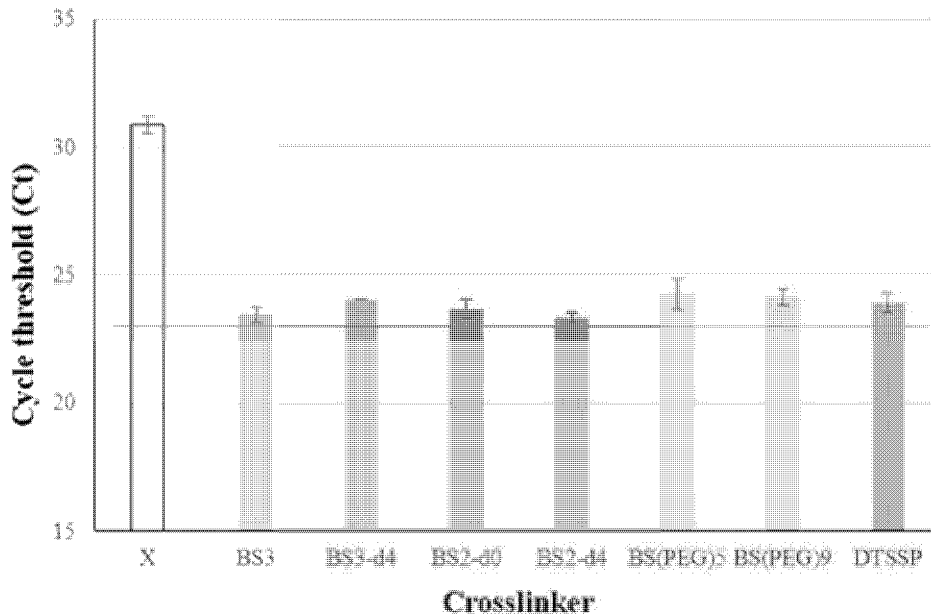
WO 2020/256438 A1

2020년 12월 24일 (24.12.2020) WIPO | PCT

- (51) 국제특허분류: *C12Q 1/24* (2006.01) *C07D 207/46* (2006.01) **Choong Eun**; 16707 경기도 수원시 영통구 청명로 132, 336동 204호, Gyeonggi-do (KR).
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2020/007911 (74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 08506 서울시 금천구 가산디지털1로151 이노플렉스1차 601호, Seoul (KR).
- (22) 국제출원일: 2020년 6월 18일 (18.06.2020)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2019-0072991 2019년 6월 19일 (19.06.2019) KR
- (71) 출원인: 주식회사 인퓨전텍 (INFUSION TECH) [KR/KR]; 14048 경기도 안양시 동안구 시민대로 171, 1412호 (비산동, 금강벤처텔), Gyeonggi-do (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (72) 발명자: 신용 (SHIN, Yong); 05309 서울시 강동구 구천면로52길 9-14, A동 201호, Seoul (KR). 진충은 (JIN,

(54) Title: METHOD FOR CONCENTRATING SUBJECT AND EXTRACTING NUCLEIC ACID USING BIS(SULFOSUCCINIMIDYL) SUBERIC ACID OR DERIVATIVE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 비스술폴숙신이미딜 수베르산 또는 이의 유도체를 이용한 대상체 농축 및 핵산 추출 방법



(57) Abstract: The present invention pertains to a method for concentrating a subject and extracting a nucleic acid using a bis(sulfosuccinimidy) suberic acid or a derivative thereof. The method for concentrating a subject (cell or pathogen) and extracting a nucleic acid using a bis(sulfosuccinimidy) suberic acid or a derivative thereof according to the present invention can quickly extract a small amount of the subject contained in a sample without using special equipment, and can thus be used as an on-site diagnosis method. The present invention can simultaneously concentrate a subject and extract a nucleic acid from a single tube or chip, and thus has the advantage of being more efficient, offering more time and cost savings, and being more convenient to use than conventional methods. In



WO 2020/256438 A1

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

addition, the bis(sulfosuccinimidy)l suberic acid or derivative thereof has excellent storage properties due to being highly water-soluble, and does not exhibit a decrease in efficiency even when used after being stored. Moreover, biomaterials extracted therefrom can be advantageously used for the diagnosis and treatment of diseases.

(57) 요약서: 본 발명은 비스설포숙신이미딜 수베르산 또는 이의 유도체를 이용한 대상체 농축 및 핵산 추출 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, 비스설포숙신이미딜 수베르산 또는 이의 유도체를 이용한 대상체 (세포 또는 병원체) 농축 및 핵산 추출 방법은 시료에 함유되어 있는 적은 양의 대상체를 특별한 장비의 사용 없이 신속하게 추출할 수 있어 현장 진단 방법으로 활용이 가능하며, 하나의 튜브 (tube) 또는 칩 (chip)에서 동시에 대상체 농축 및 핵산 추출이 가능하므로 종래 방법보다 효율성이 높고, 시간 및 비용 절감이 우수하며, 간편하게 사용할 수 있는 이점이 있다. 또한, 상기 비스설포숙신이미딜 수베르산 또는 이의 유도체는 높은 수용성으로 저장성이 우수하고 보관 후 사용하여도 효율이 감소되지 않으며, 이를 이용하여 추출된 생체물질은 질병의 진단 및 치료에 유용하게 활용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 비스설포숙신이미딜 수베르산 또는 이의 유도체를 이용한 대상체 농축 및 핵산 추출 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 비스설포숙신이미딜 수베르산 또는 이의 유도체를 이용한 대상체 농축 및 핵산 추출 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 핵산은 질병 상태를 확인하기 위한 중요한 분석 수단이며, DNA 생체표지자 (biomarker) 예를 들어, 단일염기다형성 (single nucleotide polymorphism; SNP), 돌연변이 또는 DNA 메틸화 (DNA methylation)는 연구자가 암의 원인을 찾도록 돕고, 질병의 초기 단계 동안 질병의 상태를 진단하고 관찰하는 것은 물론 예후와 감시에 대한 큰 기회를 제공하는 데 중요한 실마리를 제공한다.
- [3] DNA와 같은 핵산은 단백질과 같은 다른 성분에 비해 매우 낮은 생리적 농도로 존재하기 때문에 (예를 들어, 전혈 마이크로리터 당 수십 나노그램의 DNA 대 수십 마이크로그램의 단백질), 임상 시료로부터 DNA를 효과적으로 추출하고 예비 농축하는 것은 증폭 및 검출과 같은 이후의 공정에 매우 중요하다.
- [4] 한편, 기존의 미생물 검출을 위한 방법들은 환자 샘플에서 전체 용액을 다 이용하지 못하고, 그 중 일부만을 이용하여 핵산을 추출하고 이를 이용한 검출을 진행해 왔다. 많은 양의 미생물이 존재하는 경우에는 큰 문제가 없지만, 적은 양의 미생물이 존재하는 경우, 정확한 검출이 이루어지지 못해 추가적 감염병에 대한 조절에 문제가 발생할 수 있다. 따라서 샘플에서 최대한 모든 미생물을 농축할 수 있는 방법에 대한 연구가 필요하다.
- [5] 최근 들어 생명공학을 비롯한 진단의학, 약물의학, 대사의학 등 다양한 분야에서 고순도로 정제된 핵산의 사용량이 늘어남에 따라 다양한 생물 시료로부터 보다 신속하고 순수하게 핵산을 분리하고자 하는 노력이 계속되고 있다.
- [6] 그러나 현재까지 핵산의 분리 방법에 있어 가장 크게 발전한 부분은 유전체 DNA, 플라스미드 DNA, 메신저 RNA, 단백질, 세포 잔해 입자 등 세포 용해 용액 내에 포함된 여러 종류의 물질들로부터 특이적으로 핵산만을 흡착시키는 담체에 관한 기술 등 거의 모든 연구의 초점은 핵산을 흡착시키는 물질에 관한 연구와 개발에 집중되어 있는 한계가 있었다.
- [7] 이에, 다양한 생물 시료로부터 보다 신속하고 순수하게 핵산을 분리하기 위하여 무엇보다 세포 잔해 입자와 단백질 변성 응집물, 기타 다양한 세포 분해 물질들로부터 신속하게 원하는 핵산만을 분리할 수 있는 기술의 개발이 절실한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

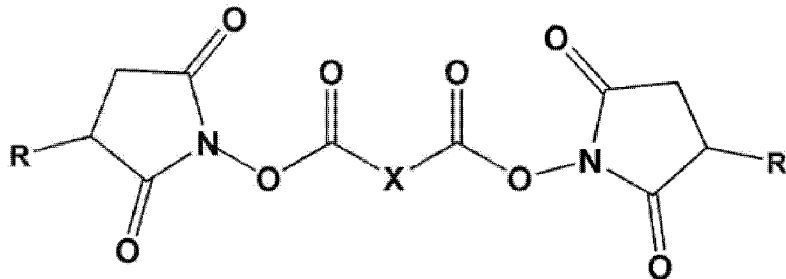
- [8] 본 발명의 목적은 비스설포숙신이미딜 수베르산 또는 이의 유도체를 포함하는 대상체 농축용 조성물, 이를 이용한 대상체 농축 방법, 및 키트; 비스설포숙신이미딜 수베르산 또는 이의 유도체를 포함하는 대상체 농축 및 핵산 추출용 조성물, 이를 이용한 대상체 농축 및 핵산 추출 방법, 및 키트를 제공하는 데에 있다.

과제 해결 수단

- [9] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 대상체 농축용 조성물을 제공한다.
- [10] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 대상체 농축용 키트를 제공한다.
- [11] 또한, 본 발명은 대상물에 아민기를 도입하여 개질하는 제 1단계; 및 상기 개질된 대상물 상에 대상체가 함유된 시료와 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 접촉시키는 제 2단계;를 포함하는 대상체 농축 방법을 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 대상체 농축 및 핵산 추출용 조성물을 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 대상체 농축 및 핵산 추출용 키트를 제공한다.
- [14] 또한, 본 발명은 대상물에 아민기를 도입하여 개질하는 제 1단계; 상기 개질된 대상물 상에 대상체가 함유된 시료와 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 접촉시켜 대상체를 농축시키는 제 2단계; 상기 농축된 대상체로부터 핵산을 분리하는 제 3단계; 상기 분리된 핵산과 상기 화합물 간의 복합체를 형성시키는 제 4단계; 및 상기 복합체가 형성된 대상물에 용출 완충액을 처리하여 핵산을 추출하는 제 5단계;를 포함하는 대상체 농축과 동시에 상기 농축된 대상체로부터 핵산을 추출하는 방법을 제공한다.

[15] [화학식 1]

[16]



- [17] 상기 식에서, X는 $(\text{CH}_2)_n$, $\text{CH}_2-(\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2)_m-\text{CH}_2$, $(\text{CH}_2)_p-\text{S}-\text{S}-(\text{CH}_2)_q$ 또는 $\text{C}-(\text{CH}_2)_5-\text{C}$ 이며,
 $\begin{array}{cc} \wedge & \wedge \\ \text{D} & \text{D} \end{array}$

[18] n은 3 내지 6의 정수이고,

[19] m은 5 내지 9의 정수이고,

- [20] p 또는 q는 각각 1 내지 3의 정수이고,
 [21] s는 1 내지 5의 정수이고,
 [22] R 또는 R'는 각각 수소 또는 설포닐염임.

발명의 효과

- [23] 본 발명에 따르면, 비스설포숙신이미딜 수베르산 또는 이의 유도체를 이용한 대상체 (세포 또는 병원체) 농축 및 핵산 추출 방법은 시료에 함유되어 있는 적은 양의 대상체를 특별한 장비의 사용 없이 신속하게 추출할 수 있어 현장 진단 방법으로 활용이 가능하며, 하나의 튜브 (tube) 또는 칩 (chip)에서 동시에 대상체 농축 및 핵산 추출이 가능하므로 종래 방법보다 효율성이 높고, 시간 및 비용 절감이 우수하며, 간편하게 사용할 수 있는 이점이 있다. 또한, 상기 비스설포숙신이미딜 수베르산 또는 이의 유도체는 높은 수용성으로 저장성이 우수하고 보관 후 사용하여도 효율이 감소되지 않으며, 이를 이용하여 추출된 생체물질은 질병의 진단 및 치료에 유용하게 활용될 수 있다.

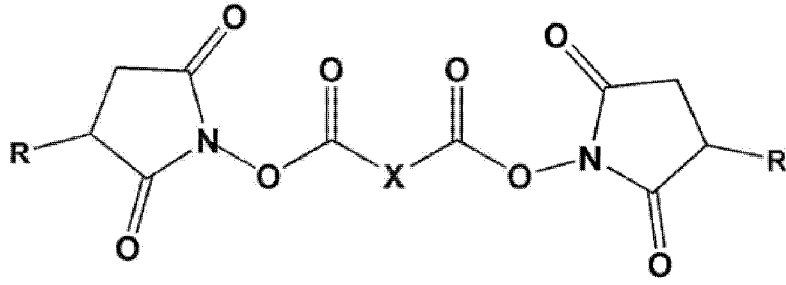
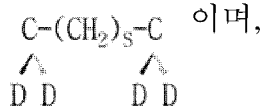
도면의 간단한 설명

- [24] 도 1은 NHS ester 화합물을 이용한 대상체 농축 및 핵산 추출 원리를 나타낸 것이다.
 [25] 도 2 내지 도 4는 sulfo-NHS ester/박막 장치를 이용한 대상체(세포 및 병원체) 농축 및 핵산 추출 효율을 나타낸 것이다.
 [26] 도 5 및 도 6은 비스(설포숙신이미딜)수베르산 또는 이의 유도체에 따른 핵산 추출 효율을 나타낸 것이다.
 [27] 도 7은 NHS 전하 여부에 따른 병원체 농축 효율을 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [28] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
 [29] 본 발명의 발명자들은 시료에 함유되어 있는 적은 양의 병원체 또는 세포를 농축하고, 농축된 병원체 또는 세포로부터 핵산을 추출하는 방법을 개발하였으며, 본 발명의 병원체 또는 세포 농축 및 핵산 추출 방법은 종래 방법에 비해 보다 간편하면서도 저비용으로 동시에 병원체 또는 세포 농축 및 핵산 추출을 가능하며, 대형 장비를 사용하지 않고도 현장 즉시형 진단이 가능함을 밝혀내며 본 발명을 완성하였다.
 [30]
 [31] 이에, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 대상체 농축용 조성물을 제공한다.
 [32] [화학식 1]

[33]

[34] 상기 식에서, X는 $(\text{CH}_2)_n$, $\text{CH}_2-(\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2)_m-\text{CH}_2$, $(\text{CH}_2)_p-\text{S}-\text{S}-(\text{CH}_2)_q$ 또는

[35] n은 3 내지 6의 정수이고,

[36] m은 5 내지 9의 정수이고,

[37] p 또는 q는 각각 1 내지 3의 정수이고,

[38] s는 1 내지 5의 정수이고,

[39] R 또는 R'는 각각 수소 또는 설포닐염임.

[40] 상기 설포닐염은 설포닐기에 나트륨, 포타슘, 리튬 등과 같은 알칼리금속이 결합된 염 형태인 것이 바람직하다.

[41] 상기 대상체는 병원체 또는 세포일 수 있으며, 상기 병원체는 미생물로 바이러스, 세균, 진균, 원충, 리케차 또는 스피로헤타일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[42] 상기 화합물은 비스(설포숙신이미딜)수베르산 [bis(sulfosuccinimidyl)suberate;

BS³], 비스(설포숙신이미딜)2,2,7,7-수베르산-d₄[bis(sulfosuccinimidyl)2,2,7,7-suberate-d₄; BS³-d₄],비스(설포숙신이미딜)글루타르산-d₀ [bis(sulfosuccinimidyl)glutarate-d₀; BS²G-d₀],비스(설포숙신이미딜)2,2,7,7-글루타르산-d₄[bis(sulfosuccinimidyl)2,2,4,4-glutarate-d₄; BS²G-d₄], 비스(NHS)PEG5 [bis(NHS)PEG5; BS(PEG)₅], 비스(NHS)PEG9 [BS(NHS)PEG9; BS(PEG)₉] 및

3,3'-디티오비스(설포숙신이미딜프로피오네이트)

[3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidylpropionate); DTSSP로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[43]

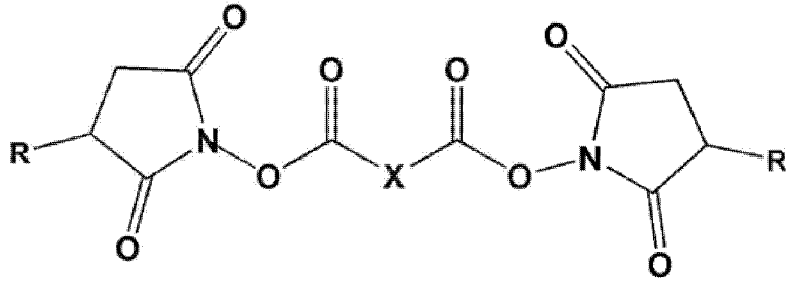
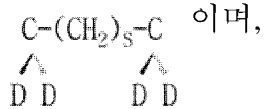
[44] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 대상체 농축용 키트를 제공한다.

[45]

[46] 또한, 본 발명은 대상물에 아민기를 도입하여 개질하는 제 1단계; 및 상기 개질된 대상물 상에 대상체가 함유된 시료와 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 접촉시키는 제 2단계;를 포함하는 대상체 농축 방법을 제공한다.

[47] [화학식 1]

[48]

[49] 상기 식에서, X는 $(\text{CH}_2)_n$, $\text{CH}_2-(\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2)_m-\text{CH}_2$, $(\text{CH}_2)_p-\text{S}-\text{S}-(\text{CH}_2)_q$ 또는

[50] n은 3 내지 6의 정수이고,

[51] m은 5 내지 9의 정수이고,

[52] p 또는 q는 각각 1 내지 3의 정수이고,

[53] s는 1 내지 5의 정수이고,

[54] R 또는 R'는 각각 수소 또는 설포닐염임.

[55] 상기 설포닐염은 설포닐기에 나트륨, 포타슘, 리튬 등과 같은 알칼리금속이 결합된 염 형태인 것이 바람직하다.

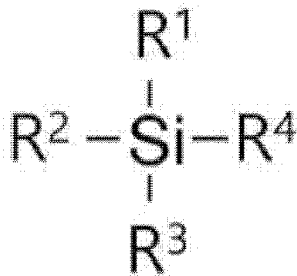
[56] 상기 대상체는 병원체 또는 세포일 수 있으며, 상기 병원체는 미생물로 바이러스, 세균, 진균, 원충, 리케차 또는 스피로헤타일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[57] 상기 제 1단계의 대상물은 고형물 또는 고형지지체일 수 있으며, 예로 박막장치, 자성 비드 (magnetic bead), 링 공진기 (ring resonator) 또는 나노입자 (nanoparticle) 중 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[58] 상기 제 1단계의 대상물은 실란 화합물로 개질될 수 있다. 바람직하게는, 상기 실란 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[59] [화학식 2]

[60]

[61] 상기 식에서, R¹ 내지 R³는 각각 같거나 다를 수 있으며, C1 내지 C4의 알킬 또는 C1 내지 C4의 알콕시 중 어느 하나이고, R⁴는 아미노(C1 내지 C10)알킬, 3-(2-아미노(C1 내지 C4)알킬아미노)(C1 내지 C4)알킬 또는 3-[2-(2-아미노(C1 내지 C4)알킬아미노)(C1 내지 C4)알킬아미노](C1 내지 C4)알킬 중 어느 하나임.

- [62] 보다 바람직하게는, 상기 실란 화합물은
 (3-아미노프로필)트리에톡시실란((3-aminopropyl)triethoxysilane; APTES),
 (3-아미노프로필)트리메톡시실란((3-aminopropyl)trimethoxysilane),
 (1-아미노메틸)트리에톡시실란((1-aminomethyl)triethoxysilane),
 (2-아미노에틸)트리에톡시실란((2-aminoethyl)triethoxysilane),
 (4-아미노부틸)트리에톡시실란((4-aminobutyl)triethoxysilane),
 (5-아미노펜틸)트리에톡시실란((5-aminopentyl)triethoxysilane),
 (6-아미노헥실)트리에톡시실란((6-aminohexyl)triethoxysilane),
 3-아미노프로필(디에톡시)메틸실란(3-aminopropyl(diethoxy)methylsilane;
 APDMS),
 N-[3-(트리메톡시실릴)프로필]에틸렌디아민(N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]ethylene
 diamine),
 N-[3-(트리메톡시실릴)프로필]디에틸렌트리아민(N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]die
 thylenetriamine),
 [3-(2-아미노에틸아미노)프로필]트리메톡시실란([3-(2-aminoethylamino)propyl]tri
 methoxysilane; AEAPTMS) 및
 3-[(트리메톡시실릴)프로필]디에틸렌트리아민(3-[(trimethoxysilyl)propyl]diethyle
 netriamine; TMPTA)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나,
 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

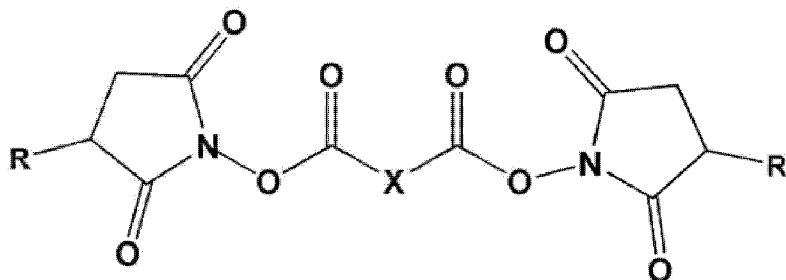
- [63] 상기 대상체가 함유된 시료는 병원체에 감염된 것으로 의심되는 객체의 분변,
 소변, 눈물, 타액, 피부의 외부 분비물, 호흡관의 외부 분비물, 장관의 외부
 분비물, 소화관의 외부 분비물, 혈장, 혈청, 혈액, 척수액, 림프액, 체액 및
 조직으로 이루어진 그룹에서 선택된 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은
 아님을 명시한다.

[64]

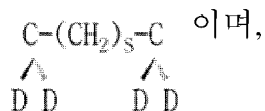
- [65] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 대상체 농축 및
 핵산 추출용 조성물을 제공한다.

[66] [화학식 1]

[67]

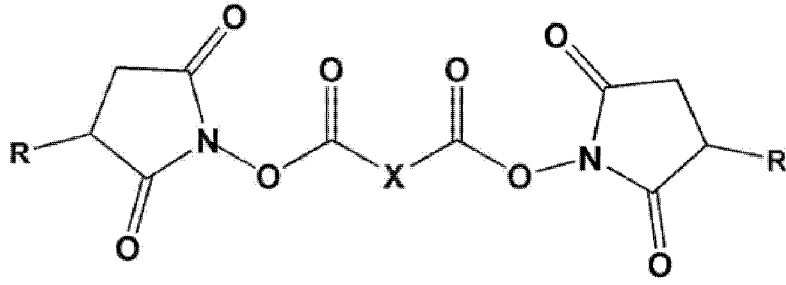
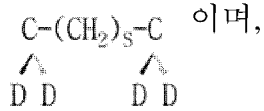


- [68] 상기 식에서, X는 $(\text{CH}_2)_n$, $\text{CH}_2-(\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2)_m-\text{CH}_2$, $(\text{CH}_2)_p-\text{S}-\text{S}-(\text{CH}_2)_q$ 또는



- [69] n은 3 내지 6의 정수이고,
 [70] m은 5 내지 9의 정수이고,
 [71] p 또는 q는 각각 1 내지 3의 정수이고,
 [72] s는 1 내지 5의 정수이고,
 [73] R 또는 R'는 각각 수소 또는 설포닐염임.
 [74] 상기 설포닐염은 설포닐기에 나트륨, 포타슘, 리튬 등과 같은 알칼리금속이 결합된 염 형태인 것이 바람직하다.
 [75] 상기 대상체는 병원체 또는 세포일 수 있으며, 상기 병원체는 미생물로 바이러스, 세균, 진균, 원충, 리케차 또는 스피로헤타일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
 [76] 상기 핵산은 DNA, cfDNA, ctDNA, RNA, mRNA 및 cfRNA로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
 [77] 상기 cfDNA는 세포유리 DNA (cell free DNA)로 혈액에서 순환하며 존재하는 순환 유리 핵산을 의미한다. 상기 순환 유리 핵산은 구체적으로 순환 유리 DNA, 순환 유리 RNA 등을 포함한다. 상기 순환 유리 핵산은 일반적으로 혈장 또는 혈청에 1000 bp 이하 (DNA), 100 nt 이하 (RNA)의 길이를 나타내나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
 [78] 또한, 상기 ctDNA는 순환종양 DNA (circulating tumor DNA)로 암세포로부터 분리되어 혈액을 순환하며 존재하는 핵산을 의미한다. 종양 특이적 돌연변이 및 후성 유전학적 변이를 모두 가지고 있으며, 혈액 내 전체 순환 DNA의 매우 적은 양을 차지한다. 순환 종양 DNA의 크기는 50 bp에서 250 bp로 다양하나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
 [79]
 [80] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 대상체 농축 및 핵산 추출용 키트를 제공한다. 상기 키트는 효과적인 핵산 추출에 필요한 완충액 등이 추가적으로 포함될 수 있다.
 [81]
 [82] 또한, 본 발명은 대상물에 아민기를 도입하여 개질하는 제 1단계; 상기 개질된 대상물 상에 대상체가 함유된 시료와 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 접촉시켜 대상체를 농축시키는 제 2단계; 상기 농축된 대상체로부터 핵산을 분리하는 제 3단계; 상기 분리된 핵산과 상기 화합물 간의 복합체를 형성시키는 제 4단계; 및 상기 복합체가 형성된 대상물에 용출 완충액을 처리하여 핵산을 추출하는 제 5단계;를 포함하는 대상체 농축과 동시에 상기 농축된 대상체로부터 핵산을 추출하는 방법을 제공한다.
 [83] [화학식 1]

[84]

[85] 상기 식에서, X는 $(\text{CH}_2)_n$, $\text{CH}_2-(\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2)_m-\text{CH}_2$, $(\text{CH}_2)_p-\text{S}-\text{S}-(\text{CH}_2)_q$ 또는

[86] n은 3 내지 6의 정수이고,

[87] m은 5 내지 9의 정수이고,

[88] p 또는 q는 각각 1 내지 3의 정수이고,

[89] s는 1 내지 5의 정수이고,

[90] R 또는 R'는 각각 수소 또는 설포닐염임.

[91] 상기 설포닐염은 설포닐기에 나트륨, 포타슘, 리튬 등과 같은 알칼리금속이 결합된 염 형태인 것이 바람직하다.

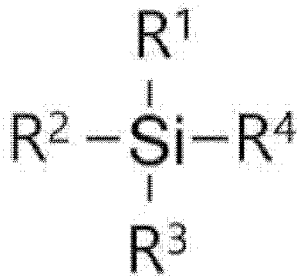
[92] 상기 대상체는 병원체 또는 세포일 수 있으며, 상기 병원체는 미생물로 바이러스, 세균, 진균, 원충, 리케차 또는 스피로헤타일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[93] 상기 제 1단계의 대상물은 박막장치, 자성 비드(magnetic bead), 링 공진기 (ring resonator) 또는 나노입자 (nanoparticle) 중 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[94] 상기 제 1단계의 대상물은 실란 화합물로 개질될 수 있다. 바람직하게는, 상기 실란 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[95] [화학식 2]

[96]

[97] 상기 식에서, R¹ 내지 R³는 각각 같거나 다를 수 있으며, C1 내지 C4의 알킬 또는 C1 내지 C4의 알콕시 중 어느 하나이고, R⁴는 아미노(C1 내지 C10)알킬, 3-(2-아미노(C1 내지 C4)알킬아미노)(C1 내지 C4)알킬 또는 3-[2-(2-아미노(C1 내지 C4)알킬아미노)(C1 내지 C4)알킬아미노](C1 내지 C4)알킬 중 어느 하나임.

- [98] 바람직하게는, 상기 실란 화합물은
 (3-아미노프로필)트리에톡시실란((3-aminopropyl)triethoxysilane; APTES),
 (3-아미노프로필)트리메톡시실란((3-aminopropyl)trimethoxysilane),
 (1-아미노메틸)트리에톡시실란((1-aminomethyl)triethoxysilane),
 (2-아미노에틸)트리에톡시실란((2-aminoethyl)triethoxysilane),
 (4-아미노부틸)트리에톡시실란((4-aminobutyl)triethoxysilane),
 (5-아미노펜틸)트리에톡시실란((5-aminopentyl)triethoxysilane),
 (6-아미노헥실)트리에톡시실란((6-aminohexyl)triethoxysilane),
 3-아미노프로필(디에톡시)메틸실란(3-aminopropyl(diethoxy)methylsilane;
 APDMS),
 N-[3-(트리메톡시실릴)프로필]에틸렌디아민(N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]ethylene
 diamine),
 N-[3-(트리메톡시실릴)프로필]디에틸렌트리아민(N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]die
 thylenetriamine),
 [3-(2-아미노에틸아미노)프로필]트리메톡시실란([3-(2-aminoethylamino)propyl]tri
 methoxysilane; AEAPTMS) 및
 3-[(트리메톡시실릴)프로필]디에틸렌트리아민(3-[(trimethoxysilyl)propyl]diethyle
 netriamine; TMPTA)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나,
 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [99] 상기 대상체가 함유된 시료는 병원체에 감염된 것으로 의심되는 객체의 분변,
 소변, 눈물, 타액, 피부의 외부 분비물, 호흡관의 외부 분비물, 장관의 외부
 분비물, 소화관의 외부 분비물, 혈장, 혈청, 혈액, 척수액, 림프액, 체액 및
 조직으로 이루어진 그룹에서 선택된 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은
 아님을 명시한다.

발명의 실시를 위한 형태

- [100] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들
 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의
 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은
 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[101]

[102] 실시예 1: 박막 장치 제작 및 전처리

[103] 1) 박막 장치 제작

[104] CO₂ 레이저 절단기 (VLS3.50 (610 x 305 mm); Universal Laser Systems,
 Scottsdale, AZ)를 이용하여 마이크로 유체 장치 (패쇄형 장치)로 사용하기 위한
 저비용 박막 장치를 제작하였다. 상기 박막 장치는 상부 박막과 하부 박막,
 그리고 상부 박막과 하부 박막 사이에 삽입된 마이크로 유체 챔버로 구성되며,
 상기 박막 장치는 대상체 (세포, 병원체 등) 농축을 위해, 동형2기능성 술폰화

N-하이드록시석신이미드 (sulfo-NHS ester) 화합물과 결합된 단일 마이크로 채널의 마이크로 유체 챔버로 구성된다.

- [105] Qiagen 키트 (개방형 장치)와는 대조적으로, 상기 장치의 마이크로 유체 챔버는 개방형 장치에 의해 야기되는 오염을 방지하기 위하여, 폐쇄형 장치를 기반으로 한다. 세정 및 용출 단계 동안, 반응 시료는 밀폐된 장치의 마이크로 유체 챔버에 남아있어 오염을 줄일 수 있다. 유동 단면적에서 반복되는 급격한 팽창 및 수축은 액체 시료 주입에 있어서 미세와류 (microvortices)를 생성할 수 있다.
- [106] 시료로부터 대상체 (세포, 병원체 등)를 농축하기 위해, 챔버의 36개 슬롯-형 마이크로 웰 (well)을 각각 1:56 및 56:1의 팽창 및 수축 비율로 연결하였다. 마이크로 유체 칩은 AutoCAD (Autodesk, Inc, San Rafael, CA)를 이용하여 설계하였고, 저렴한 비용, 단순성 및 신속성의 이점을 가지는 프로토타이핑 (prototyping) 장치 제작에 사용되는 레이저 절단기로 인쇄하였다.
- [107] 세 개의 층 (three layers)으로 구성되는 3D 일회용 칩을 제작하기 위해, 레이저 절단기 (10 W 내지 50 W의 전력 범위의 10.6 μ CO₂ 레이저 소스)를 이용하여 내부 층으로 300 μ m 두께의 양면 테이프 (Adhesive 300LSE-9495LE, 3M, USA) 및 외부 층으로 100 μ m 두께의 얇은 막 (Kemafoil hydrophilic film, HNW-100, COVEME, Italy) 2개로 구성되는 세 개의 층을 제작하였다. 외부 층은 대용량 시료 처리를 위한 3D 일회용 칩을 생성하기 위해, 내부 층의 상부 및 하부의 영구 접착면에 부착하였다. 마이크로 유체 챔버의 높이는 약 600 μ m이며, 전체 부피는 700 μ l로 설정하였다.
- [108] 마이크로 채널에서 시료 흐름을 제어하기 위해, 튜빙 어댑터는 3 mm 두께를 갖는 캐스트 아크릴 시트 (cast acrylic sheet, MARGA CIPTA, Indonesia)를 양면 테이프 한쪽 면에 부착하였고, 레이저 절단기로 절단 및 천공하여 제조하였다. 제작된 어댑터는 3D 일회용 칩의 유입구 (inlet) 및 배출구 (outlet)에 각각 부착하였다. 이후, 미리 절단된 타이곤 튜빙 (Tygon® tubing, AAC02548; Cole-Parmer, Vernon Hills, IL)을 어댑터 구멍에 위치시킨 후, 120°C에서 열적으로 안정한 에폭시를 사용하여 밀봉하였다.
- [109]
- [110] 2) 박막 장치 전처리
- [111] 핵산 추출을 위한 박막 장치의 사용을 용이하게 하기 위해, 레이저 절단기를 이용하여 플라스틱 카트리지 (plastic cartridge)를 제작하였다. 플라스틱 카트리지 (위 및 아래 부분)는 분석 중 3D 일회용 칩을 잡는 역할을 한다; 길이 105 mm, 폭 60 mm, 높이 10 mm. 각 플라스틱 구성요소의 레이아웃은 AutoCAD를 이용하여 설계하였다. 밀링 (milling) 기기를 이용하여 투명 아크릴로니트릴 부타디엔 스티렌 (acrylonitrile butadiene styrene; ABS) 시트에 구조를 패터닝하였다. 하부 플라스틱 부분에 칩을 장착한 후, 4개의 렌치 볼트 (wrench bolt)를 사용하여 상부 플라스틱 부분과 조립하여 장치를 구축하였다.
- [112] 마지막으로 대상체 (세포, 병원체 등) 농축을 위한 박막 장치와 비-카오토로픽

(nonchaotropic) 시약으로 sulfo-NHS ester 화합물을 사용하기 위해, 표면 개질 프로토콜을 수행하였다. 간략하게, 3D 일회용 칩의 내부 표면에 아민기를 생성시키기 위해, 내부 표면을 먼저 산소 플라즈마 (Covance Model, Femtoscience)로 10분 동안 처리하여 내부 표면의 특성을 소수성에서 친수성으로 변화시켰으며, 상기 플라즈마 처리된 박막 장치를 65°C에서 60분 동안 2% 3-아미노프로필디에톡시메틸실란 (3-aminopropyl diethoxymethylsilane; APDMS, Sigma-Aldrich) 수용액에 침지시킨 후, 탈이온수로 완전히 세정하였다. 세정 후, 박막 장치를 경화시키기 위해, 상기 세정된 박막 장치를 신속하게 질소 기류 하에서 건조시켜 박막 장치를 아민으로 개질하였다.

[113] Drop Shape Analyzer (DSA100, KRUSS, Germany)를 이용한 아민-개질된 박막 장치의 물 접촉각 측정을 통해 온도 및 배양시간에 따라 박막 장치의 친수성이 상당히 변화하였음을 알 수 있었다. 65°C에서 60분 동안 상기 박막 장치를 APDMS로 실란화 (silanization) 시킨 후, 상기 박막 표면의 친수성이 증가하는 것을 확인하였다 (약 30 내지 40°C). 상기 장치는 사용하기 전까지 상온에서 보관이 가능하다.

[114]

[115] 실시예 2: sulfo-NHS ester/박막 시료 분석

[116] 본 발명의 박막 장치를 이용하여 대상체 (세포, 병원체 등)를 농축하고 핵산을 추출하기 위한 분석 조건 및 반응을 최적화하였다. sulfo-NHS ester 화합물은 박막 표면에 대상체와 복합체 형성하고 핵산을 포획할 수 있다. 실험에 사용된 sulfo-NHS ester 화합물은 비스(설포숙신이미딜)수베르산 [bis(sulfosuccinimidyl)suberate; BS³], 비스(설포숙신이미딜)2,2,7,7-수베르산-d₄ [bis(sulfosuccinimidyl)2,2,7,7-suberate-d₄, BS³-d₄], 비스(설포숙신이미딜)글루타르산-d₀ [bis(sulfosuccinimidyl)glutarate-d₀; BS²G-d₀], 비스(설포숙신이미딜)2,2,7,7-글루타르산-d₄ [bis(sulfosuccinimidyl)2,2,4,4-glutarate-d₄; BS²G-d₄], 비스(NHS)PEG5 [bis(NHS)PEG₅; BS(PEG)₅], 비스(NHS)PEG9 [BS(NHS)PEG₉; BS(PEG)₉], 3,3'-디티오비스(설포숙신이미딜프로피오네이트) [3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidylpropionate); DTSSP]이며, 상기 sulfo-NHS ester 화합물들은 Sigma-Aldrich (St Louis, MO)에서 구입하였다.

[117]

[118] 박막 장치를 이용한 세포 농축 및 핵산 추출 여부를 확인하기 위해, HCT116 세포주 (ATCC_CCL-247)(1 x 10⁵ 세포 ml⁻¹) 100 μl를 각각의 sulfo-NHS ester 용액 (100 mg ml⁻¹) 100 μl, 프로테아제 K (proteinase K) 10 μl, 자체 용해 완충액 (100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM 에틸렌디아민테트라아세트산, 1% 로릴 황산 나트륨, 10% Triton X-100) 100 μl와 혼합한 다음 펌프 (KD Scientific, MA) 주사기를 이용하여 100 μl/분의 속도로 장치에 주입하였으며, 시료로부터 핵산을 포획하기 위해 DNA의 경우, 56°C에서 10분 또는 상온에서 10분, RNA의

경우, 상온에서 20분 동안 장치를 방치하였다. 이후 시료의 잔해물을 제거하기 위해 PBS로 장치를 세척한 다음, 용출 완충액 (elution buffer; 10 mM 중탄산나트륨, pH < 10.6, 유속: 50 μ l/분)을 이용하여 sulfo-NHS ester 용액에 의해 농축된 핵산을 수 분 안에 추출하였다. sulfo-NHS ester 용액으로 스페이서 암 (spacer arm)에 디설파이드 (disulfide) 결합을 갖는 DTSSP를 사용한 경우, 용출 완충액으로 중탄산나트륨 대신 환원제로 반응하는 50 mM 트리스(2-클로로에틸) 포스페이트 [tris(2-chloroethyl) phosphate; TCEP] 용액 (pH 7.0)을 사용하였다.

[119]

[120] 또한, 박막 장치를 이용한 병원체 농축 및 핵산 추출 여부를 확인하기 위해, 대장균 (*Escherichia coli*, ATCC 25922) 배양 시료를 이용하여 상기 장치의 기본 특성을 분석하였다. 대장균의 콜로니 형성 단위 (colony formation unit; CFU)는 표준 한천 배지 (plate count agar, PCA; BD difco)를 이용하여 계산하였고, 대장균 시료 (10^4 CFU ml^{-1}) 1 ml를 사용하여 상기와 같은 방법으로 핵산을 추출하였다.

[121]

[122] 본 발명의 박막 장치의 효율을 비교하기 위해, QIAamp® DNA mini kit 또는 QIAamp® viral RNA mini kit (Qiagen, Germany)로 핵산을 추출하였으며, 제조사에서 제공한 프로토콜에 따라 실험을 수행하였다.

[123]

[124] 추출된 핵산의 양 및 순도는 Nano Drop (Thermo Fisher Scientific, USA)을 이용하여 260 nm 및 280 nm에서 시료의 광학 밀도의 비율을 측정하여 분석하였다.

[125]

[126] **실시예 3: 실시간 PCR**

[127] 본 발명의 박막 장치 또는 Qiagen 키트를 이용하여 추출된 HCT116 및 대장균의 핵산을 실시간 PCR로 증폭시켰다. 간략하게, DNA 5 μ l, 2X Brilliant III SYBR Green QPCR master mix 10 μ l, 각 프라이머 25 pmol 및 탈 이온수를 첨가하여 총 부피를 20 μ l로 맞추었다. PCR 조건은 95°C에서 10분의 초기 변성 단계; 95°C에서 10초, 58°C (대장균의 *rodA* 유전자) 또는 60°C (HCT116의 β -액틴 유전자)에서 20초, 72°C에서 20초, 40 사이클의 신장 단계; 40°C에서 30초의 냉각 단계로 이루어진다.

[128]

또한, 실시간 PCR은 AriaMx real-time PCR 기기 프로토콜 (Agilent technologies)을 참조하여 수행하였다. RNA 5 μ l, 2X Brilliant III SYBR Green QRT-PCR master mix 10 μ l, 각 프라이머 25 pmol, RT mix, DTT 및 RNase-Free water를 첨가하여 총 부피를 20 μ l로 맞추었다. PCR 조건은 50°C에서 20분의 초기 변성 단계; 95°C에서 10분; 95°C에서 10초, 60°C (HCT116의 18s rRNA)에서 20초, 72°C에서 20초, 40 사이클의 신장 단계; 40°C에서 30초의 냉각 단계로 이루어진다.

[129]

전기영동을 이용하여 브로민화 에티듐 (ethidium bromide; EtBr)이 함유된 2%

아가로즈 겔 상에서 PCR 산물을 분리하고, GelDoc 시스템 (Clinx Science Instruments, Shanghai, China)을 사용하여 겔을 시각화 하였다.

[130] 프라이머 세트의 상세한 서열은 하기 표 1에 나타내었다.

[131] [표1]

Samples	Targets	Sequence (5' → 3')
<i>E. coli</i>	<i>rodA</i>	F: GCA AAC CAC CTT TGG TCG
		R: CTG TGG GTG TGG ATT GAC AT
HCT116	<i>β-actin</i>	F: ATG GTG GGC ATG GGT CAG A
	(for DNA)	R: ACA TGA TCT GCG TCA TCT TCT C
	18S rRNA	F: GCT TAA TTT GAC TCA ACA CGG GA
	(for RNA)	R: AGC TAT CAATCT GTC AAT CCT CTC

[132]

[133] 실험 예 1: sulfo-NHS ester/박막 장치를 이용한 세포 농축 및 핵산 추출 효율
 [134] 본 발명의 박막 장치를 이용한 세포 농축 및 핵산 추출 여부를 확인하기 위해, HCT116 세포주와 sulfo-NHS ester 용액을 장치에 주입하고, 이로부터 획득한 핵산을 이용하여 실시간 PCR을 수행하였다.

[135] 도 2와 같이, β -액틴의 발현 수준을 비교한 결과, BS³를 이용하는 경우, 기존 Qiagen 키트 방법과 유사한 효율로 HCT116 세포주에서 DNA가 추출되는 것을 확인하였으며, 시료로부터 DNA를 포획할 때, 56°C보다 상온에서 10분간 장치를 방치하는 경우 Ct 값이 감소하여 검출 민감도가 향상되는 것을 확인하였다.

[136] 또한, 도 3과 같이, 18S rRNA의 발현 수준을 비교한 결과에서도 BS³를 이용하는 경우, 기존 Qiagen 키트 방법과 유사한 효율로 HCT116 세포주에서 RNA가 추출되는 것을 확인할 수 있었다.

[137]

[138] 실험 예 2: sulfo-NHS ester/박막 장치를 이용한 병원체 농축 및 핵산 추출 효율
 [139] 본 발명의 박막 장치를 이용한 대장균 농축 및 핵산 추출 여부를 확인하기 위해, 대장균과 다양한 농도 (10, 25, 50, 100 mg/mL)의 sulfo-NHS ester 용액을 장치에 주입하고, 이로부터 획득한 핵산을 이용하여 실시간 PCR을 수행하였다.

[140] 도 4와 같이, *rodA*의 발현 수준을 비교한 결과, BS³를 이용하는 경우, 농도를 100 또는 50 mg/mL로 설정하였을 때, Ct 값이 감소하여 검출 민감도가 향상되는 것을 확인하였고, 기존 Qiagen 키트 방법과 유사한 효율로 대장균에서 DNA가 추출되는 것을 확인할 수 있었다.

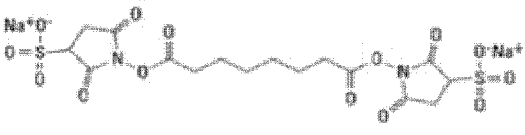
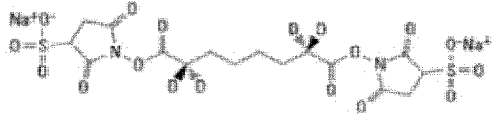
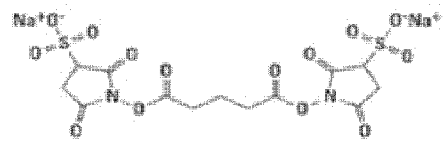
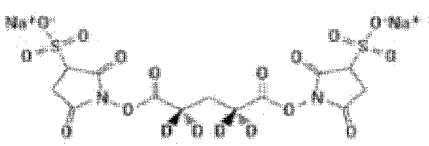
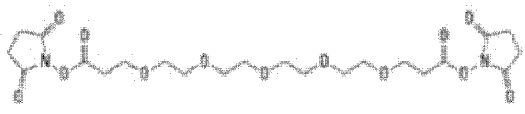
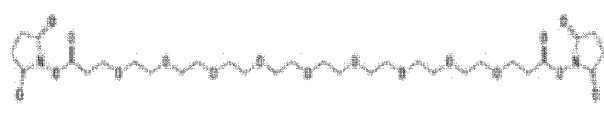
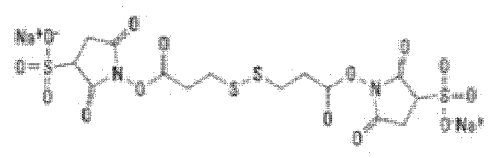
[141]

[142] 실험 예 3: 비스(설폰숙신이미딜)수베르산 패밀리에 따른 핵산 추출 효율 비교
 [143] 다양한 종류의 비스(설폰숙신이미딜)수베르산 패밀리 (BS³, BS³-d₄, BS²G-d₀, BS

²G-d₄, BS(PEG)₅, BS(PEG)₉, DTSSP)에 따른 핵산 추출 효율을 분석하기 위해, HCT116 세포주와 sulfo-NHS ester 용액을 장치에 주입하고, 이로부터 획득한 핵산을 이용하여 β-액틴의 발현 수준을 비교하였다.

[144] 그 결과, 하기 표 2 및 도 5와 같이, 기존 Qiagen 키트 방법과 유사한 효율로 HCT116 세포주에서 핵산이 추출되어 유사한 Ct 값을 나타내는 것을 확인하였다.

[145] [표2]

Method		Ct	
Qiagen		23.64	
1	-	31.01	30.65
		31.09	
		30.47	
2	 BS ³	23.53	23.46
		23.10	
		23.75	
3	 BS ³ -d ₄	24.04	24.05
		24.06	
		24.05	
4	 BS ² G-d ₀	23.32	23.66
		24.05	
		23.61	
5	 BS ² G-d ₄	23.29	23.33
		23.53	
		23.16	
6	 BS(PEG) ₆	23.60	24.26
		24.77	
		24.40	
7	 BS(PEG) ₉	24.47	24.14
		24.11	
		23.87	
8	 DTSSP	23.77	23.92
		23.67	
		24.34	
Negative		35.0	

[146]

[147] 한편, 도 6과와 같이 DTSSP는 스페이서 암 (spacer arm)에 디설파이드 결합을 가지는 바, 중탄산나트륨을 이용한 용출 완충액 대신 환원제로 반응하는 50 mM TCEP 용액 (pH 7.0)을 사용하였다. TCEP 등의 환원제는 디설파이드 결합 부위에 클리비지 사이트(cleavage site)를 만들어 결합이 끊어지게 유도하며, TCEP, DTT 등의 환원제의 사용은 pH를 이용한 용출 완충액을 이용하였을 때 생기는 검출 저해제들에 의한 문제점들을 해결할 수 있다.

[148]

[149] **실험예 4: NHS 전하 여부에 따른 병원체 농축 효율 비교**

[150] 화합물 양측 말단에 존재하는 NHS에 전하(charge)가 있는 BS³와 전하가 없는 BS(PEG)₅를 이용하여 전하 여부에 따른 병원체 농축 효율을 분석하기 위해, 대장균과 sulfo-NHS ester 용액(BS³ 또는 BS(PEG)₅)을 장치에 주입하고, 이로부터 획득한 핵산을 이용하여 rodA의 발현 수준을 비교하였다.

[151] 그 결과, 도 7과 같이 BS(PEG)₅보다 BS³를 이용하는 경우 병원체 농축 효율이 더 우수하여 더 많은 핵산을 추출함으로써 Ct 값이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

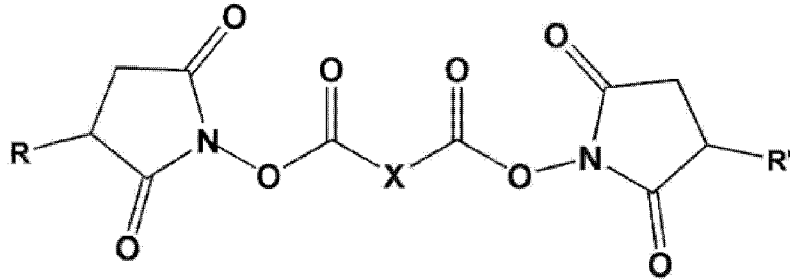
[152]

[153] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

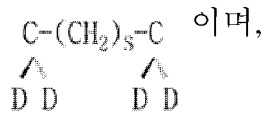
[154] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 대상체 농축용 조성물:
[화학식 1]



상기 식에서, X는 $(\text{CH}_2)_n$, $\text{CH}_2-(\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2)_m-\text{CH}_2$, $(\text{CH}_2)_p-\text{S}-\text{S}-(\text{CH}_2)_q$ 또는



n은 3 내지 6의 정수이고,

m은 5 내지 9의 정수이고,

p 또는 q는 각각 1 내지 3의 정수이고,

s는 1 내지 5의 정수이고,

R 또는 R'는 각각 수소 또는 설포닐염임.

[청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 대상체는 병원체 또는 세포인 것을 특징으로 하는 대상체 농축용 조성물.

[청구항 3] 제 2항에 있어서, 상기 병원체는 미생물인 것을 특징으로 하는 대상체 농축용 조성물.

[청구항 4] 제 3항에 있어서, 상기 미생물은 바이러스, 세균, 진균, 원충, 리케차 또는 스피로헤타인 것을 특징으로 하는 대상체 농축용 조성물.

[청구항 5] 제 1항에 있어서, 상기 화합물은 비스(설포숙신이미딜)수베르산

[bis(sulfosuccinimidyl)suberate; BS³],

비스(설포숙신이미딜)2,2,7,7-수베르산-d₄

[bis(sulfosuccinimidyl)2,2,7,7-suberate-d₄; BS³-d₄],

비스(설포숙신이미딜)글루타르산-d₀ [bis(sulfosuccinimidyl)glutarate-d₀; BS

²G-d₀], 비스(설포숙신이미딜)2,2,7,7-글루타르산-d₄

[bis(sulfosuccinimidyl)2,2,4,4-glutarate-d₄; BS²G-d₄], 비스(NHS)PEG5

[bis(NHS)PEG₅; BS(PEG)₅], 비스(NHS)PEG9 [BS(NHS)PEG9; BS(PEG)₉] 및

3,3'-디티오비스(설포숙신이미딜프로피오네이트)

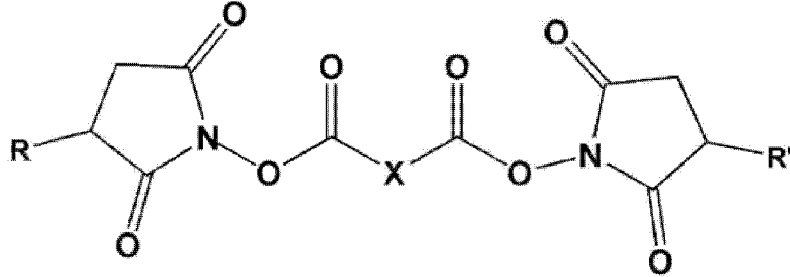
[3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidylpropionate); DTSSP로 이루어진 군에서

선택된 것을 특징으로 하는 대상체 농축용 조성물.

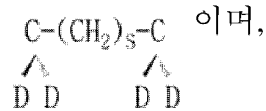
[청구항 6] 제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 대상체 농축용 키트.

- [청구항 7] 대상물에 아민기를 도입하여 개질하는 제 1단계; 및
 상기 개질된 대상물 상에 대상체가 함유된 시료와 하기 화학식 1로
 표시되는 화합물을 접촉시키는 제 2단계;
 를 포함하는 대상체 농축 방법:

[화학식 1]



상기 식에서, X는 $(\text{CH}_2)_n$, $\text{CH}_2-(\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2)_m-\text{CH}_2$, $(\text{CH}_2)_p-\text{S}-\text{S}-(\text{CH}_2)_q$ 또는



n은 3 내지 6의 정수이고,

m은 5 내지 9의 정수이고,

p 또는 q는 각각 1 내지 3의 정수이고,

s는 1 내지 5의 정수이고,

R 또는 R'는 각각 수소 또는 설포닐염임.

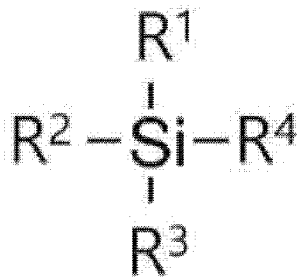
- [청구항 8] 제 7항에 있어서, 상기 대상체는 병원체 또는 세포인 것을 특징으로 하는 대상체 농축 방법.

- [청구항 9] 제 7항에 있어서, 상기 제 1단계의 대상물은 박막장치, 자성 비드 (magnetic bead), 링 공진기 (ring resonator) 또는 나노입자 (nanoparticle) 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 대상체 농축 방법.

- [청구항 10] 제 7항에 있어서, 상기 제 1단계의 대상물은 실란 화합물로 개질된 것을 특징으로 하는 대상체 농축 방법.

- [청구항 11] 제 10항에 있어서, 상기 실란 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 대상체 농축 방법:

[화학식 2]



상기 식에서, R¹ 내지 R³는 각각 같거나 다를 수 있으며, C1 내지 C4의

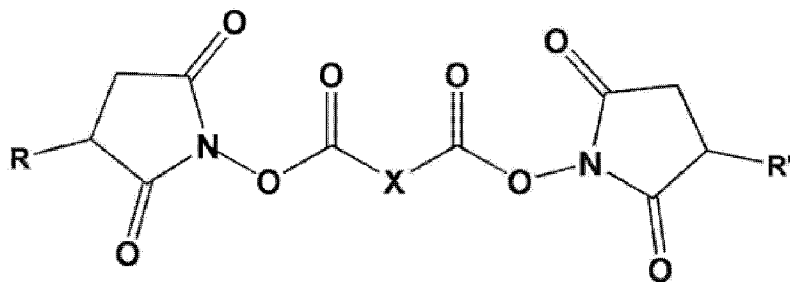
알킬 또는 C1 내지 C4의 알콕시 중 어느 하나이고, R⁴는 아미노(C1 내지 C10)알킬, 3-(2-아미노(C1 내지 C4)알킬아미노)(C1 내지 C4)알킬 또는 3-[2-(2-아미노(C1 내지 C4)알킬아미노)(C1 내지 C4)알킬아미노](C1 내지 C4)알킬 중 어느 하나임.

- [청구항 12] 제 11항에 있어서, 상기 실란 화합물은
 (3-아미노프로필)트리에톡시실란((3-aminopropyl)triethoxysilane; APTES),
 (3-아미노프로필)트리메톡시실란((3-aminopropyl)trimethoxysilane),
 (1-아미노메틸)트리에톡시실란((1-aminomethyl)triethoxysilane),
 (2-아미노에틸)트리에톡시실란((2-aminoethyl)triethoxysilane),
 (4-아미노부틸)트리에톡시실란((4-aminobutyl)triethoxysilane),
 (5-아미노펜틸)트리에톡시실란((5-aminopentyl)triethoxysilane),
 (6-아미노헥실)트리에톡시실란((6-aminohexyl)triethoxysilane),
 3-아미노프로필(디에톡시)메틸실란(3-aminopropyl(diethoxy)methylsilane; APDMS),
 N-[3-트리메톡시실릴]프로필]에틸렌디아민(N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine),
 N-[3-(트리메톡시실릴)프로필]디에틸렌트리아민(N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]diethylenetriamine),
 [3-(2-아미노에틸아미노)프로필]트리메톡시실란([3-(2-aminoethylamino)propyl]trimethoxysilane; AEAPTMS) 및
 3-[(트리메톡시실릴)프로필]디에틸렌트리아민(3-[(trimethoxysilyl)propyl]diethylenetriamine; TMPTA)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 대상체 농축 방법.

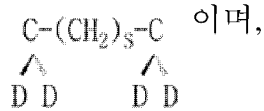
- [청구항 13] 제 7항에 있어서, 상기 대상체가 함유된 시료는 병원체에 감염된 것으로 의심되는 객체의 분변, 소변, 눈물, 타액, 피부의 외부 분비물, 호흡관의 외부 분비물, 장관의 외부 분비물, 소화관의 외부 분비물, 혈장, 혈청, 혈액, 척수액, 림프액, 체액 및 조직으로 이루어진 그룹에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 대상체 농축 방법.

- [청구항 14] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 대상체 농축 및 핵산 추출용 조성물:

[화학식 1]



상기 식에서, X는 $(\text{CH}_2)_n$, $\text{CH}_2-(\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2)_m-\text{CH}_2$, $(\text{CH}_2)_p-\text{S}-\text{S}-(\text{CH}_2)_q$ 또는



n은 3 내지 6의 정수이고,

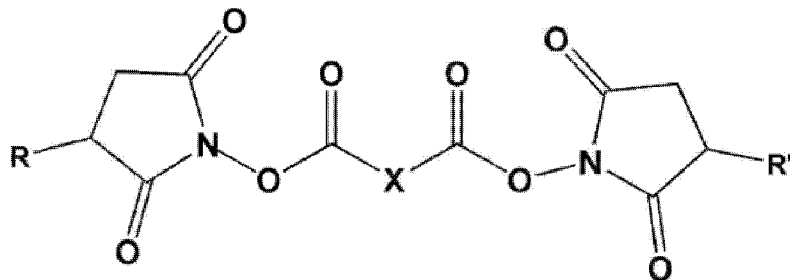
m은 5 내지 9의 정수이고,

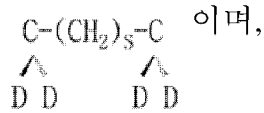
p 또는 q는 각각 1 내지 3의 정수이고,

s는 1 내지 5의 정수이고,

R 또는 R'는 각각 수소 또는 설포닐염임.

- [청구항 15] 제 14항에 있어서, 상기 대상체는 병원체 또는 세포인 것을 특징으로 하는 대상체 농축 및 핵산 추출용 조성물.
- [청구항 16] 제 15항에 있어서, 상기 병원체는 미생물인 것을 특징으로 하는 대상체 농축 및 핵산 추출용 조성물.
- [청구항 17] 제 16항에 있어서, 상기 미생물은 바이러스, 세균, 진균, 원충, 리케차 또는 스피로헤타인 것을 특징으로 하는 대상체 농축 및 핵산 추출용 조성물.
- [청구항 18] 제 14항에 있어서, 상기 핵산은 DNA, cfDNA, ctDNA, RNA, mRNA 및 cfRNA로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 대상체 농축 및 핵산 추출용 조성물.
- [청구항 19] 제 14항 내지 제 18항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 대상체 농축 및 핵산 추출용 키트.
- [청구항 20] 대상물에 아민기를 도입하여 개질하는 제 1단계;
상기 개질된 대상물 상에 대상체가 함유된 시료와 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 접촉시켜 대상체를 농축시키는 제 2단계;
상기 농축된 대상체로부터 핵산을 분리하는 제 3단계;
상기 분리된 핵산과 상기 화합물 간의 복합체를 형성시키는 제 4단계; 및
상기 복합체가 형성된 대상물에 용출 완충액을 처리하여 핵산을 추출하는 제 5단계;
를 포함하는 대상체 농축과 동시에 상기 농축된 대상체로부터 핵산을 추출하는 방법:
[화학식 1]





n은 3 내지 6의 정수이고,

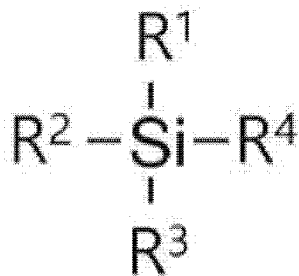
m은 5 내지 9의 정수이고,

p 또는 q는 각각 1 내지 3의 정수이고,

s는 1 내지 5의 정수이고,

R 또는 R'는 각각 수소 또는 설포닐염임.

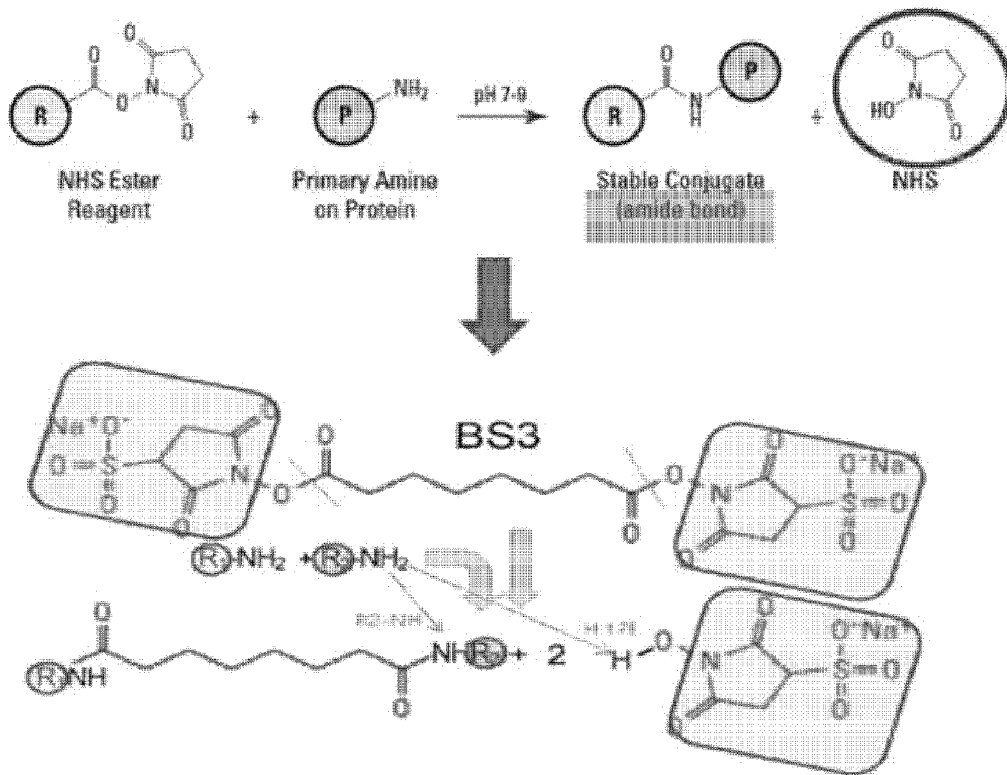
- [청구항 21] 제 20항에 있어서, 상기 대상체는 병원체 또는 세포인 것을 특징으로 하는 대상체 농축과 동시에 농축된 대상체로부터 핵산을 추출하는 방법.
- [청구항 22] 제 21항에 있어서, 상기 병원체는 미생물인 것을 특징으로 하는 대상체 농축과 동시에 상기 농축된 대상체로부터 핵산을 추출하는 방법.
- [청구항 23] 제 22항에 있어서, 상기 미생물은 바이러스, 세균, 진균, 원충, 리케차 또는 스피로헤타인 것을 특징으로 하는 대상체 농축과 동시에 상기 농축된 대상체로부터 핵산을 추출하는 방법.
- [청구항 24] 제 20항에 있어서, 상기 제 1단계의 대상물은 박막장치, 자성 비드(magnetic bead), 링 공진기 (ring resonator) 또는 나노입자 (nanoparticle) 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 대상체 농축과 동시에 상기 농축된 대상체로부터 핵산을 추출하는 방법.
- [청구항 25] 제 20항에 있어서, 상기 제 1단계의 대상물은 실란 화합물로 개질된 것을 특징으로 하는 대상체 농축과 동시에 상기 농축된 대상체로부터 핵산을 추출하는 방법.
- [청구항 26] 제 25항에 있어서, 상기 실란 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 대상체 농축과 동시에 상기 농축된 대상체로부터 핵산을 추출하는 방법:
- [화학식 2]



상기 식에서, R¹ 내지 R³는 각각 같거나 다를 수 있으며, C₁ 내지 C₄의 알킬 또는 C₁ 내지 C₄의 알콕시 중 어느 하나이고, R⁴는 아미노(C₁ 내지 C₁₀)알킬, 3-(2-아미노(C₁ 내지 C₄)알킬아미노)(C₁ 내지 C₄)알킬 또는 3-[2-(2-아미노(C₁ 내지 C₄)알킬아미노)(C₁ 내지 C₄)알킬아미노](C₁ 내지 C₄)알킬 중 어느 하나임.

- [청구항 27] 제 26항에 있어서, 상기 실란 화합물은
 (3-아미노프로필)트리에톡시실란((3-aminopropyl)triethoxysilane; APTES),
 (3-아미노프로필)트리메톡시실란((3-aminopropyl)trimethoxysilane),
 (1-아미노메틸)트리에톡시실란((1-aminomethyl)triethoxysilane),
 (2-아미노에틸)트리에톡시실란((2-aminoethyl)triethoxysilane),
 (4-아미노부틸)트리에톡시실란((4-aminobutyl)triethoxysilane),
 (5-아미노펜틸)트리에톡시실란((5-aminopentyl)triethoxysilane),
 (6-아미노헥실)트리에톡시실란((6-aminohexyl)triethoxysilane),
 3-아미노프로필(디에톡시)메틸실란(3-aminopropyl(diethoxy)methylsilane;
 APDMS),
 N-[3-(트리메톡시실릴)프로필]에틸렌디아민(N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]et
 hylenediamine),
 N-[3-(트리메톡시실릴)프로필]디에틸렌트리아민(N-[3-(trimethoxysilyl)pro
 pyl]diethylenetriamine),
 [3-(2-아미노에틸아미노)프로필]트리메톡시실란([3-(2-aminoethylamino)pr
 opyl]trimethoxysilane; AEAPTMS) 및
 3-[(트리메톡시실릴)프로필]디에틸렌트리아민(3-[(trimethoxysilyl)propyl]d
 iethylenetriamine; TMPTA)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인
 것을 특징으로 하는 대상체 농축과 동시에 상기 농축된 대상체로부터
 핵산을 추출하는 방법.
- [청구항 28] 제 20항에 있어서, 상기 대상체가 함유된 시료는 병원체에 감염된 것으로
 의심되는 객체의 분변, 소변, 눈물, 타액, 피부의 외부 분비물, 호흡관의
 외부 분비물, 장관의 외부 분비물, 소화관의 외부 분비물, 혈장, 혈청,
 혈액, 척수액, 림프액, 체액 및 조직으로 이루어진 그룹에서 선택된 어느
 하나인 것을 특징으로 하는 대상체 농축과 동시에 상기 농축된
 대상체로부터 핵산을 추출하는 방법.

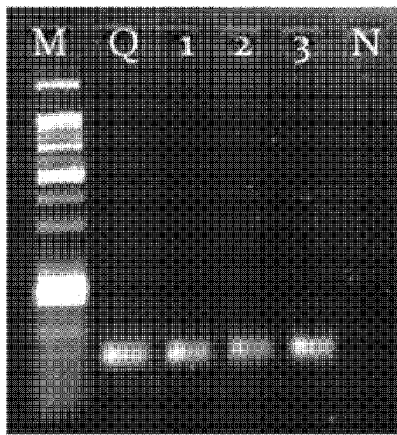
[도1]



[도2]

Method (Incubation temp.)		Ct	Tm	
Qiagen		23.4	84.0	
1	56 °C	25.08	84	
		25.35	25.22	84
		25.22		84
		23.66		84
2	RT	23.89	23.88	84
		24.09		84
		Negative		No Ct

[도3]



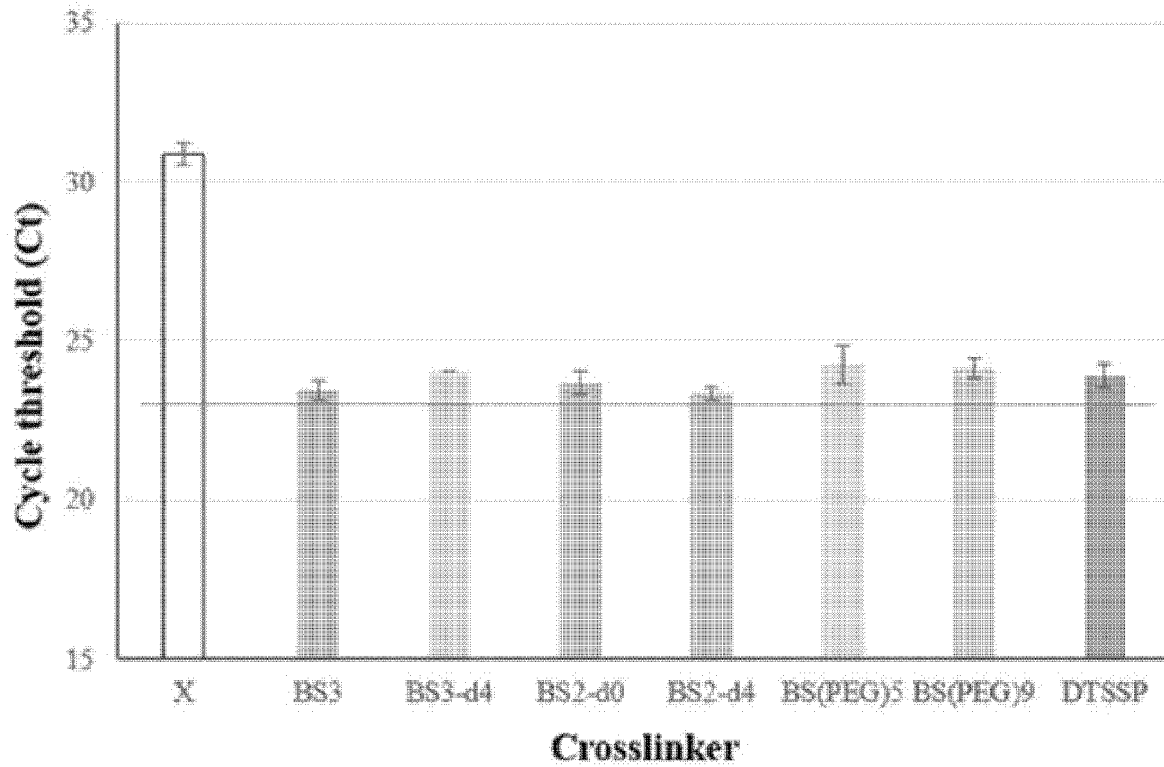
#Q : Qiagen extraction
 #1~#3: BS³ extraction
 #N : Negative control

Method		Ct		Tm
Qiagen		30.07		76.5
1	BS ³	31.06		76.5
		32.01	31.49	76.5
		31.45		76
Negative		No Ct		78

[도4]

Conc. (BS ³ concentration/ml)		Ct		Tm
Qiagen		24.95		81.5
1	100	24.58		81
		24.35	24.47	81
2	50	24.73		81
		24.91	24.82	81
3	25	28.45		81.5
		31.28	29.87	81
4	10	38.87		80.5
		37.58	38.23	80.5
Negative		-		95

[도5]



[도6]

Sample (Elution buffer)		Ct		Tm
Qiagen		22.01		84
DTSSP	NaHCO ₃ (pH10.6)	23.77		84
		23.67	23.93	84
		24.34		84
	TCEP (pH 7)	23.98		84
		23.63	24.11	84
		24.72		84
Negative		38.14		-

[도7]

Method		Ct		Tm
Qiagen 10 ⁶ /100ul		22.31		82.0
1	X	35.24	37.01	82.5
		38.77		83
2	BS ³	23.20	22.91	82.5
		22.61		82
3	BS(PEG) ₅	26.96	27.07	82.5
		27.18		82.5
Qiagen 10 ⁵ /100ul		25.07		82.5
Negative		38.77		-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/007911

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q 1/24(2006.01)i; C07D 207/46(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q 1/24; C12N 7/02; C12Q 1/68; C07D 207/46		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal), STN (Registry, Caplus), Google & keywords: 비스설포숙신이미딜 수베르산 (bissulfosuccinimidyl suberic acid), 농축 (concentration), 추출 (extraction)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 3085774 A1 (QIAGEN GMBH.) 26 October 2016. See paragraph [0051]; examples 1 and 2; and claims 1-15.	1-6,14-19
Y		7-13,20-28
Y	KR 10-2018-0022615 A (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION et al.) 06 March 2018. See claims 1-26.	7-13,20-28
Y	KR 10-2017-0129591 A (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION et al.) 27 November 2017. See claims 1-21.	7-13,20-28
X	SUBRAMANIAN PARIMALAM, S. et al. Electrical lysis and RNA extraction from single cells fixed by dithiobis (succinimidyl propionate). Analytical Chemistry. 2018, vol. 90, pp. 12512-12518. See abstract; and page 12513.	1-6,14-19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 08 October 2020		Date of mailing of the international search report 08 October 2020
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon, Republic of Korea 35208		Authorized officer
Facsimile No. +82-42-481-8578		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/007911

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
EP 3085774 A1	26 October 2016	None	
KR 10-2018-0022615 A	06 March 2018	CN 109996875 A	09 July 2019
		EP 3505628 A1	03 July 2019
		JP 2019-524148 A	05 September 2019
		WO 2018-038549 A1	01 March 2018
KR 10-2017-0129591 A	27 November 2017	CN 109804078 A	24 May 2019
		EP 3460072 A1	27 March 2019
		JP 2019-516380 A	20 June 2019
		JP 6691978 B2	13 May 2020
		US 2019-0270979 A1	05 September 2019
		WO 2017-200249 A1	23 November 2017

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
C12Q 1/24(2006.01)i, C07D 207/46(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12Q 1/24; C12N 7/02; C12Q 1/68; C07D 207/46

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부검색 시스템), STN (Registry, Caplus), Google & 키워드: 비스설포숙신이미딜 수베르산 (bissulfosuccinimidyl suberic acid), 농축 (concentration), 추출 (extraction)

C. 관련 문헌

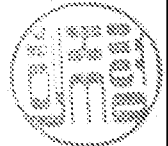
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	EP 3085774 A1 (QIAGEN GMBH) 2016.10.26 단락 [0051]; 실시예 1, 2; 청구항 1-15	1-6,14-19
Y		7-13,20-28
Y	KR 10-2018-0022615 A (울산대학교 산학협력단 등) 2018.03.06 청구항 1-26	7-13,20-28
Y	KR 10-2017-0129591 A (울산대학교 산학협력단 등) 2017.11.27 청구항 1-21	7-13,20-28
X	SUBRAMANIAN PARIMALAM, S. 등, "Electrical lysis and RNA extraction from single cells fixed by dithiobis (succinimidyl propionate)", Analytical Chemistry, 2018, 90권, 페이지 12512-12518 초록; 페이지 12513	1-6,14-19
X	XIANG, C. C. 등, "Using DSP, a reversible cross-linker, to fix tissue sections for immunostaining, microdissection and expression profiling", Nucleic Acids Research, 2004, 32권, 22호, e185, 내부 페이지 1-8 초록; 내부 페이지 1	1-6,14-19

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:
 "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 " & " 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일 2020년 10월 08일 (08.10.2020)	국제조사보고서 발송일 2020년 10월 08일 (08.10.2020)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150
---	------------------------------------



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
EP 3085774 A1	2016/10/26	없음	
KR 10-2018-0022615 A	2018/03/06	CN 109996875 A EP 3505628 A1 JP 2019-524148 A WO 2018-038549 A1	2019/07/09 2019/07/03 2019/09/05 2018/03/01
KR 10-2017-0129591 A	2017/11/27	CN 109804078 A EP 3460072 A1 JP 2019-516380 A JP 6691978 B2 US 2019-0270979 A1 WO 2017-200249 A1	2019/05/24 2019/03/27 2019/06/20 2020/05/13 2019/09/05 2017/11/23