



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년02월15일
 (11) 등록번호 10-1948944
 (24) 등록일자 2019년02월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C12Q 1/56 (2006.01) C12Q 1/04 (2017.01)
 C12Q 1/14 (2006.01) G01N 33/86 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-7009329
 (22) 출원일자(국제) 2013년09월15일
 심사청구일자 2016년09월07일
 (85) 번역문제출일자 2013년04월12일
 (65) 공개번호 10-2013-0107300
 (43) 공개일자 2013년10월01일
 (86) 국제출원번호 PCT/IB2011/054035
 (87) 국제공개번호 WO 2012/035508
 국제공개일자 2012년03월22일
 (30) 우선권주장
 01207/11 2011년07월20일 스위스(CH)
 (뒷면에 계속)
 (56) 선행기술조사문헌
 W02005021799 A2*
 (뒷면에 계속)

(73) 특허권자
데비오팜 인터네셔널 에스 에이
 스위스 로잔느 1002, 까세 포스탈르 5911, 슈맹
 메시도르 5-7, 포럼 아프레-드망
 (72) 발명자
리다 아마르
 스위스 체하-1022 샤반-레넨스 슈맹 드 라 몰랭
 28
메르모드 니콜라스
 스위스 체하-1164 뷔실롱 루트 데 듀 꼬뮌 19
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
제일특허법인(유)

전체 청구항 수 : 총 26 항

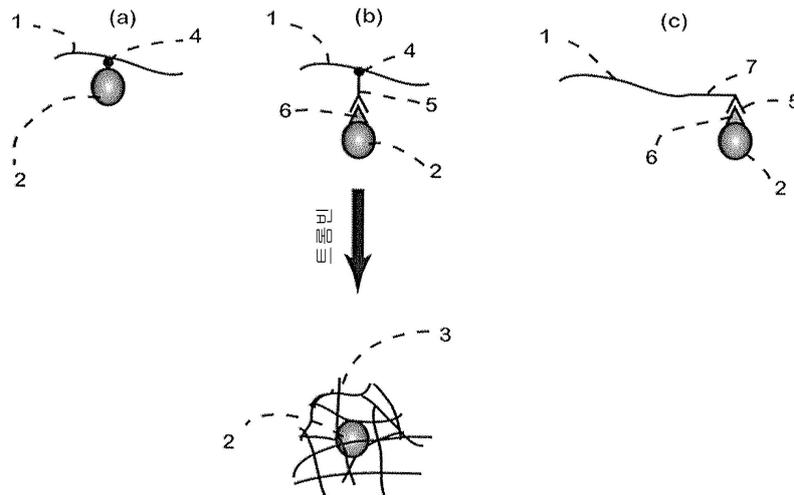
심사관 : 황상필

(54) 발명의 명칭 **혈액 성분을 포함하는 피브리노겐-함유 샘플로부터 표적 분자 또는 입자를 분리하는 방법**

(57) 요약

본 발명은 피브리노겐 함유 샘플로부터 표적 분자 또는 입자를 분리하는 방법에 관한 것으로서, (a) 샘플에 함유된 피브리노겐을 적어도 부분적으로 피브린으로 전환시켜 상기 표적 분자 또는 입자를 피브린 그물망에 포획하는 단계; (b) 상기 피브린 그물망을 수축시켜 피브린 응괴를 형성하는 단계; 및 (c) 상기 피브린 응괴를 주위 샘플 매질로부터 분리하는 단계를 포함한다.

대표도



- (72) 발명자
프랑스와 파트리스
프랑스 에프-74960 크랑-제브리에 알레 데 코르티
스 13
라자레빅 블라디미르
스위스 체하-1020 레넨스 애비뉴 드 프레파울리 38
슈렌젤 자크
스위스 체하-1208 제네바 슈맹 데 툴리피어스 1
- (56) 선행기술조사문헌
US2003068662 A1*
JP2009052166 A*
Journal of Thrombosis and Haemostasis, Vol. 2,
pp. 561-573 (2004.)
US20030068662 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (30) 우선권주장
01478/10 2010년09월15일 스위스(CH)
02041/10 2010년12월07일 스위스(CH)
-

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 현탁액에 피브리노겐을 함유하는 샘플을 외인성 트롬빈 또는 트롬빈-유사 효소에 적용시켜 샘플에 함유된 피브리노겐을 적어도 부분적으로 피브린으로 전환시켜 피브린 그물망을 형성함으로써 피브린 그물망에 표적 분자 또는 입자를 포획하는 단계;

(b) 상기 피브린 그물망을 수축시켜 초기 부피 크기의 1/10 미만의 크기를 갖는 피브린 응괴를 형성하는 단계; 및

(c) 상기 피브린 응괴를 주위 샘플 매질로부터 분리하는 단계

를 포함하는, 현탁액에 피브리노겐을 함유하는 샘플을 처리하여 표적 분자 또는 입자를 상기 샘플로부터 분리하고 농축하는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

샘플내 피브리노겐의 농도가 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상인 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

트롬빈 또는 트롬빈-유사 효소의 농도가 샘플 1 ml 당 0.01 내지 10 IU인 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

샘플이 응고 인자 XIII을 추가로 함유하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

샘플이 칼슘을 추가로 함유하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

샘플이 GDTA, EDTA 및 시트레이트로 이루어진 군에서 선택된 킬레이트화제를 추가로 함유하는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

샘플이 샘플내 혈소판 세포 또는 활성화된 혈소판 세포 용해물을 추가로 포함하는 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

혈소판이 아데노신 다이포스페이트 및 콜라겐으로 이루어진 군에서 선택된 혈소판 작용물질에 의해 활성화되는 방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

단계 (a) 이전에 샘플에 피브리노겐을 첨가하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

제 1 항에 있어서,

피브린 응괴를 용해시켜 표적 분자 또는 입자를 회수하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 13

제 12 항에 있어서,

응괴의 용해 단계가 피브린용해제를 사용하여 수행되는 방법.

청구항 14

제 12 항에 있어서,

용해 단계가 세포용해제, 프로테아제 및 핵산 분해 효소로 이루어진 군에서 선택된 성분을 사용하는 방법.

청구항 15

제 12 항에 있어서,

용해 단계가 세제의 사용을 포함하는 방법.

청구항 16

제 1 항에 있어서,

샘플이 혈액 샘플인 방법.

청구항 17

제 16 항에 있어서,

혈액 샘플이 전혈, 혈소판-풍부 혈장, 혈소판-결핍 혈장 및 혈청으로 이루어진 군에서 선택되는 방법.

청구항 18

제 16 항에 있어서,

혈액 샘플이 혈액 샘플을 피브리노겐-결핍 샘플과 혼합시켜 수득된 인공 조성된 혈액 샘플인 방법.

청구항 19

제 16 항에 있어서,

혈액 샘플이 응고 인자를 피브리노겐-결핍 샘플과 혼합시켜 수득된 인공 조성된 혈액 샘플인 방법.

청구항 20

제 19 항에 있어서,

응고 인자가 피브리노겐인 방법.

청구항 21

제 1 항에 있어서,
 단계 (a)에서의 포획이 피브린 그물망에 표적 입자 또는 분자를 크기 포획함으로써 수행되는 방법.

청구항 22

제 1 항에 있어서,
 단계 (a)에서의 포획이 피브린 그물망에 표적 입자를 친화성 포획함으로써 수행되는 방법.

청구항 23

제 22 항에 있어서,
 화학적 포획이 피브리노겐 또는 피브린에 대한 표적 분자 또는 입자의 천연 친화성에 의해 수행되는 방법.

청구항 24

제 23 항에 있어서,
 화학적 포획이 (i) 피브린/피브리노겐-결합 잔기 및 (ii) 표적 분자 또는 입자를 지향하는 물질-포착 잔기로 이루어진 분자를 포함하는 방법.

청구항 25

제 23 항에 있어서,
 피브리노겐이 표적 분자 또는 입자를 지향하는 포착 잔기 도메인을 갖는 피브리노겐 융합 단백질인 방법.

청구항 26

제 24 항에 있어서,
 피브린/피브리노겐-결합 잔기가 트롬빈, 피브로넥틴, 세균성 피브리노겐-결합 단백질, 조직형 플라스미노겐 활성화인자 및 인테그린으로 이루어진 군 및 상기 군의 임의의 구성원으로부터 유도된 잔기에서 선택되는 방법.

청구항 27

제 24 항에 있어서,
 표적 분자 또는 입자를 지향하는 물질-포착 잔기가 상기 표적 분자 또는 입자를 특이적으로 인식하도록 고안된 항체, 핵산 및 앵타머로 이루어진 군에서 선택되는 방법.

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

제 1 항 내지 제 9 항 및 제 12 항 내지 제 27 항중 어느 한 항에 있어서,

표적 분자 또는 입자가 세균, 바이러스, 효모, 단백질, 펩티드 및 핵산으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 방법.

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 샘플로부터 표적 분자 또는 입자의 분리를 위한 샘플 처리 방법에 관한 것이다. 보다 특히, 본 발명은 표적 분자 또는 입자의 검출 및 분석 전에 피브리노겐 단백질을 함유하는 샘플로부터 표적 분자 또는 입자의 효과적인 분리 및 농축을 가능하게 하는 샘플 제조 절차에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 생체분석(bioassay)에서, 다양한 샘플(즉, 샘플 제제)로부터 표적 분자, 입자 또는 분석물을 추출, 농축 및 정제하는 능력은 중요한 단계를 나타내며, 효과적인 표적 검출 및 분석을 위한 전제가 되는 단계로 시험되고 있다. 샘플 제조 단계는 검출 한계, 재현성 및 상기 입자 또는 분석물의 다른 화합물과의 간섭의 견지에서 생체분석에서 주된 속도-제한 단계이다. 기존의 샘플 제조 절차는 전형적으로 장시간 원심분리 과정을 포함하는 지루한 수동식 또는 복잡한 로봇식 피펫팅 단계를 수반한다. 상기 절차는 느리고, 고비용적이며 노동 소모적일 뿐 아니라, 위험한 화학물질의 고비용적 처리를 담당하는 실험실 스태프에게 건강상 위험을 나타낼 수 있다. 또한, 샘플 제조, 특히 신세대의 분자 표적을 위한 작업흐름은 훨씬 더 복잡해졌으며 여러 해법들이 제공되고 있다. 현재, 샘플 제조를 위한 상이하고 개별적인 해법들이 각각의 샘플 유형 및 표적에 대해 사용되고 있다. 시행하기 쉽고, 자동화 및 시약 통합과 상용가능하고, 최소 실행 시간을 수반하는, 다중 샘플 및 표적에 적용가능한 표준 샘플 제조 작업흐름 해법을 제공하는 것은 여전히 생명 과학 및 진단 환경에서 미해결의 요건으로 남아있다. 또한, 샘플 작업흐름 방법의 표준화는 주로 통제된 진단 환경에서 주요 요건이다.

[0003] 샘플 제조의 복잡성의 전형적인 실례는 복합 혈액 매질로부터 표적 분자 또는 입자의 검출이다. 저검출 수준에서 혈액으로부터 감염원(세균, 진균)의 검출이 특히 복잡하다. 임상적 수준에서, 혈액 감염(즉, 패혈증)의 검출은 상기 패혈증이 혈중 미생물 감염에 대한 염증 반응에 의해 유도된 심각한 질병의 원인이기 때문에 특히 중요하다. 패혈증은 실제로 집중 치료실에서 사망의 가장 보편적인 원인을 나타낸다. 또한, 혈액으로부터 미생물의 저조한 검출, 감염원의 누락되거나 지연된 확인 및/또는 부재하거나 지연된 항생물질 감수성 시험으로 인해, 많은 항생물질 치료 양상이 적절한 진단 적용범위 없이 실험적으로만 개시되고 있다. 조기 검출을 위한 패혈증 진단, 신속한 미생물 동정 및 항생물질 감수성 시험, 및 적절한 환자 관리에서의 의료적 요구가 매우 충족되지 않고 있다. 미생물(예를 들면, 원내(nosocomial) 미생물)의 내성 발생이 증가하는 시점에서, 신속하고 정확한 패혈증 진단을 위한 새로운 방법은 이환율 및 사망률을 감소시키는데 결정적이다. 최종적으로, 패혈증 감염의 또 다른 원인은 수혈이다. 혈액, 혈액 성분 및 혈액 유도체로부터 미생물의 효과적인 검출은 오염 방지에 매우 중요하다.

[0004] 혈액 병 배양이든 혈액 한천 배양이든, 혈액 배양의 사용은 여전히 균혈증 및 패혈증을 갖는 환자에서 감염원을 검출하고 확인하기 위해 통상적으로 선택되는 방법(황금 표준(gold standard))이다.

[0005] 혈중 세균 세포의 검출에서 주요 문제는 1 ml 당 1 CFU(Colony Forming Units, 콜로니 형성 단위)만큼 낮은 세포수를 검출하는 능력이다. 이와 관련하여, 상기 자릿수의 검출 수준에서 처리되어야 하는 혈액 부피는 따라서 수 ml(5 내지 10 ml)의 혈액 시편으로 이루어져야 한다. "건초더미에서 바늘 찾기", 혈액 감염 진단에서 큰 과제는 생존 미생물 또는 그의 핵산 유전자 내용물로부터 특정 감염 바이오마커의 추출 및 정제를 가능하게 하는 효과적이고 시행하기 용이한 기술의 이용가능성을 기초로 할 것이다.

[0006] 예를 들어, 국제 특허 공개 제 95/15397 호 및 제 2009/015484 호에 보고된 바와 같이, 다중-원심분리 또는 여과 방법을 혈액 샘플 및 체액으로부터 표적 미생물을 농축하기 위한 특정 세포벽/막 용해 단계와 함께 사용한다. 낮은 농축 효율 다음으로, 상기 원심분리 방법의 또 다른 한계는 통상적인 자동화 실험실 분석 작업 흐름과의 비-상용성이다. 원심분리의 처리 한계를 해결하기 위해, 표적 미생물에 대해 유도된 친화성 기로 코팅된 자기 입자가 도입되었다. 자기력을 사용함으로써, 입자들은 그 표면상에서 표적을 포착하여 혈액으로부터 표적의 용이한 분리를 야기한다. 그러나, 생존 세균을 포착하기 위한 자기 비드상의 친화성 기의 광범위한 적용에는 일부 주요 단점들이 존재한다. 첫째, 병원성 미생물의 스펙트럼은 그람-음성균, 그람-양성균 및 많은

진균 종들의 긴 목록으로 이루어지며, 모든 부류의 미생물을 포함하는 유용한 포괄적인 친화성 기는 없다. 또한, 많은 상기 미생물들은 혈액중에서 그의 생존 및 배치를 촉진하는 현상으로 캡슐화된다. 둘째, 미생물들은 혈류중에 항상 자유롭게 부유하기보다는 오히려 일부 혈액 세포 및 혈소판에 결합하거나 이로부터 격리되는 것으로 나타났다. 예를 들어, 스타필로코커스 오레우스(*Staphylococcus aureus*)의 경우, 상호작용 혈소판 및 혈소판에 의한 세균의 추가의 격리는 세균이 숙주의 방어 체계를 벗어나게 하는 중요한 독력 요인이다.

[0007] 혈액 샘플로부터 생존 미생물의 직접적 농축에 대한 대안은 분자 바이오마커(특정 핵산 유전자 서열) 및 즉각적인 후속 핵산 증폭 기술, 예를 들면, PCR(폴리머라제 연쇄 반응)의 사용으로 이루어진다. 상기 방법은 보다 신속한 결과를 제공하는 새로운 가능성을 열었다. 그러나, 검출 수준(민감성)은 종종 배양-기초 방법보다 낮다. 분자 방법의 제한된 민감성은 주로 혈액 샘플중 진핵 세포(백혈구)로부터의 고 배경 DNA와 관련된다. PCR-기초 방법의 민감성의 증가는 혈액 샘플로부터 진핵 핵산을 추출하거나 미생물(원핵) DNA를 특이적으로 농축시킴으로써 달성될 수 있다. 상기 관점에서, 유럽 특허 공개 제 1,400,589 호는 원핵성 DNA와 하나 이상의 단백질 또는 폴리펩티드의 특이적 결합 후 상기와 같이 생성된 복합체의 분리 단계를 포함하는, 혈액 용해물로부터 원핵성 DNA를 분리하는 방법을 개시하고 있다. 동일 범주내에서, 유럽 특허 공개 제 1,861,495 호는 추가로 보다 많은 진핵 세포를 포함하는 혼합 샘플에 제공된 미생물 세포로부터 핵산을 특이적으로 분리하는 방법을 기술하고 있다. 상기 발명은 전혈중 하나 또는 여러개의 카오트로픽제(chaotropic agent) 및/또는 하나 또는 여러개의 계면활성제의 존재하에 핵산을 분해하기 위해 뉴클레아제, 특히 DNA-분해 뉴클레아제를 사용하여, 혈액 용해물로부터 진핵성 핵산을 추출하는 것을 개시하고 있다. 두 방법 모두 복잡한 프로토콜 및 시간적 처리 단계, 즉 정제된 세균 핵산을 수득하기까지 반나절이 걸리는 처리 단계에 의해 제한된다. 또한, 상기 방법들은, 정의상, 고려된 10 ml 부피중 1 CFU인 혈액 배양 방법의 민감성보다 여전히 상당히 더 낮은 100 CFU/ml의 검출 한계를 나타낸다.

[0008] 최신 핵산 검출 방법의 언급한 한계들 이외에, 세균 및 진균을 검출하기 위한 분자 방법의 적합성은 일반적으로 의심스럽다. 사실상, 혈액중 순환 DNA를 검출하는 것은 생존 미생물을 검출하는 혈액 배양 방법과 반드시 상관되지는 않는다. 상기 상관관계를 "유지"하기 위해, 일부 접근방법은 양성 혈액 배양물로부터 출발하는 분자 기초 방법을 사용한 감염원의 확인을 제안하고 있다. 그러나, 상기 접근방법의 임상적 적합성은 시간-소모적 배양 방법이 여전히 필요하기 때문에 여전히 제한받는다. 상기 문제는, 분자 방법이 매우 다양한 경우에서 세균의 항균제 감수성 스펙트럼에 대한 정보를 제공하는데 실패하기 때문에 훨씬 더 중요하며, 상기 항균제 감수성 스펙트럼에 대한 정보를 제공하는 것은 여전히 전통적인 배양 접근방법을 의존한다.

[0009] 이러한 단점들을 인지할 때, 혈액중 신속하고 믿을 수 있는 미생물 검출 및 확인을 가능케 하는 새로운 방법의 개발은 매우 타당한 문제로 남아 있다. 또한, 본원에 제공된 혈액중 감염원의 검출은 일반적으로 생체분석 및 특히 의료 진단에서 샘플 분리 절차의 복잡성 및 그의 주된 중요성을 예시하는 전형적인 예이다. 식품, 임상, 환경 및 실험 샘플을 포함한 다양한 샘플에서 표적 분자 또는 입자의 존재를 검출하기 위한 분석은 중요성이 증가하고 있다.

발명의 내용

[0010] 본 발명은 주위의 복합 액체 매질로부터 표적 분자 또는 입자의 효과적인 분리를 제공하는 샘플 제조 및 처리 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 또한, 바람직하게는 초기 샘플 부피의 1/10 이상의 부피에서, 조절 완충 매질중에 고도로 농축된 상기 표적을 회수하게 한다. 또한, 개시된 방법의 이점은 초기 샘플 부피의 1/100 내지 1/1000의 농축률에 도달하는 능력이다. 상기와 같이 농축된 표적은 그 다음에 추가의 정제 단계를 통해 매우 용이하게 진행되고/되거나 최신 방법을 이용하여 직접 분석될 수 있다.

[0011] 개시된 샘플 제조 방법은 다양한 샘플 공급원 및 광범위한 부피 크기에 사용되기에 특히 적합하다. 또한, 본 발명에 따른 분리는 크기 및/또는 친화성 선택을 사용하여 복잡한 샘플 부피로부터 표적 입자 또는 분자를 특이적으로 또는 비-특이적으로 분리시킨다.

[0012] 따라서, 본 발명은 실질적으로 임의 유형의 샘플 및 표적에 보편적으로 사용되는 이점을 제공하는 샘플 제조 방법을 개시한다.

[0013] 개시된 방법을 기초로, 본 발명은 또한 매우 용이하게 수동으로 사용되거나 최신 자동화 시스템과 통합되어 상기 샘플 제조 방법이 통상적인 실험실 작업흐름에 용이하게 통합되게 할 수 있는 샘플 수집 장치를 개시한다.

- [0014] 개시된 샘플 제조 방법의 기술적 토대는, 신속하게 수축되어 혈액 용기내에 소(小) 펠릿을 형성할 피브린 그물망에 표적 입자를 포획하기 위해 트롬빈 효소를 사용하여 혈액 샘플을 제어 응고시킴을 통해, 제어되고 표준화된 방식으로, 피브리노겐을 피브린으로 전환시킴으로써 전형적으로 혈액 샘플로부터 세균 또는 진균 입자와 같은 표적 미생물을 효과적으로 분리하는 가능성에 대한 본 발명자들의 관찰을 기초로 한다. 펠릿이 형성될 때, 주위 혈액 샘플은 경사분리되어 상기 소 펠릿내에 포획된 표적들의 분리를 유도할 수 있다. 두 번째 단계로, 펠릿을 용해시켜 소 부피의 조절 완충액내에 그의 피브린 포획물로부터 표적을 회수할 수 있다. 상기 과정에 의해, 펠릿의 최소 크기가 개시된 방법의 농축물을 결정할 때 제어되어야 하는 핵심 인자이다.
- [0015] 따라서, 혈액 샘플이란 전혈, 혈소판-풍부 혈장 및 혈소판-결핍 혈장 또는 혈청을 말한다. 본 발명에 따른 혈액은 또한 명백하게 혈액 성분, 혈액 첨가제 또는 혈액 기능을 모방하는 임의의 다른 성분들로 이루어진 혈액 대체물 또는 인공적으로 조성된 샘플을 말할 수 있다. 수혈에 통상적으로 사용되는 상기 혈액 성분의 전형적인 예로는 혈소판 농축물, 적혈구(헤모글로빈) 농축물, 혈청 또는 혈장 대체물(혈장 증량제로도 알려져 있음)이 포함된다. 상기 혈액 샘플이, 예를 들면, 패혈증 샘플, 조성된 혈액 샘플 또는 혈액 대체물과 같은 일부 임상 경우에서처럼 응고 인자(주로 피브리노겐)가 결핍되는 경우, 상기 결핍은, 피브리노겐을 포함하는 응고 인자를 본 발명에 따라 표적 입자 또는 분자를 분리할 수 있는 필수 성분으로서 상기 혈액 샘플에 첨가함으로써 상쇄될 수 있다.
- [0016] 본 발명은 바람직하게는 혈액 샘플로부터 미생물 또는 감염성 분자 또는 입자의 분리 방법을 개시하고 있지만, 당해 분야에 숙련된 자라면 본원의 혈액 샘플이 또한 전술한 바와 같은 제어된 응고 과정내에 유입되는 혈액 구성성분을 포함하는 조성된 샘플을 말할 수 있음을 인지할 것이다.
- [0017] 따라서, 일반적으로 본 발명은, 제 1 단계로 샘플에 함유된 피브리노겐을 적어도 부분적으로 피브린으로 전환시켜 피브린 그물망을 형성함으로써 표적 분자 또는 입자를 피브린 그물망에 포획시켜 피브리노겐 단백질 함유하는 샘플로부터 상기 표적 입자 또는 분자를 분리 및 농축하는 방법을 개시한다. 제 2 단계로, 피브린 응괴를 생성하기 위해 상기와 같이 형성된 피브린 그물망은 주위 샘플 매질로부터 분리될 것이다.
- [0018] 한 태양에서, 본 발명에 따른 분리는 상기 표적 입자를 포획함으로써 크기 선택에 의해 달성된다. 그러므로, 상기 포획 과정에서 피브린 그물망 기공의 크기는 특히 중요하다. 보다 작은 기공 크기는 실제로 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*)(2 μm) 또는 클라미디아(*Chlamydia*)(0.3 μm) 또는 심지어 바이러스와 같은 작은 감염성 미생물들의 보다 효과적인 포획을 제공한다. 이와 관련하여, 포획 피브린 그물망의 조절은 샘플 pH, 이온 강도 및 상기 샘플내 칼슘, 피브리노겐, 트롬빈의 농도와 같은 파라미터를 조정함으로써 달성될 수 있다.
- [0019] 한 태양에서, 본 발명에 따른 분리는 피브린 그물망중 상기 표적 입자를 친화성 포획함으로써 달성된다. 본 발명자들의 관찰은 스타필로코커스 오레우스와 같은 세균 입자들이 피브리노겐/피브린 분자에 대해 강한 친화성을 가져, 본 발명의 방법에 따른 그의 분리 및 농축을 더 촉진(증대)시킨다는 것이다. 세균 입자들의 친화성 상호작용을 모방함으로써, 본 발명은 피브리노겐 함유 샘플로부터 표적을 분리하기 위해 천연 및 유도된 친화성 상호작용을 이용하는 것을 개시한다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 태양에 따른 유도된 친화성 분리는 상기 표적 분자 또는 입자에 대해 유도된 포착 잔기 영역을 포함하는 피브리노겐 융합 단백질로 이루어진 피브리노겐 재조합 단백질을 사용하여 달성된다. 또 다른 태양에서, 화학적 포획은 피브린/피브리노겐-결합 잔기, 예를 들면, 스타필로코커스 오레우스 피브리노겐 결합 단백질 및 물질-포착 잔기, 예를 들면, 상기 표적 분자 또는 입자에 대해 유도된 항체에 의해 달성된다.
- [0021] 따라서, 피브린 그물망내 크기 포획 및 특이적 친화성 결합 반응은 생물 샘플중 광범위한 표적 물질의 측정 또는 분리를 위해 사용될 수 있다. 표적 물질의 예는 세포, 세포 성분, 세포 하위집단(cell subpopulation)(진핵 및 원핵 둘 다), 세균, 바이러스, 기생충, 항원, 특이 항체, 독소, 단백질, 핵산 서열 등이다.
- [0022] 그러므로, 본원에 언급된 바와 같은 피브리노겐은, 예를 들면, 일반적으로 인간 혈액 또는 척추동물 혈액과 같은 임의의 혈액 공급원으로부터 수득된 천연 피브리노겐일 수 있다. 본 발명에 따른 피브리노겐은 또한, 예를 들면, 새로운 친화성 작용기를 갖는 새로운 분자를 수득하는 방식으로 천연 피브리노겐을 임의의 다른 분자와 결합시킴으로써 수득된 합성 조성 분자일 수 있다. 바람직한 태양에서, 상기와 같이 결합된 분자는 피브리노겐 분자를 또 다른 분자에 공유 결합시켜 수득된다. 또 다른 태양에서, 상기와 같이 결합된 분자는 최신 재조합 단백질 합성 기술에 의해 생성된 융합 단백질이다.
- [0023] 본원에 언급된 바와 같은 피브리노겐은 또한 전체 피브리노겐 결정 구조를 갖도록 개질된 합성 피브리노겐 분자일 수 있다. 바람직한 태양에서, 합성 피브리노겐 분자는 상이한 구조, 크기, 조성 및 친화성 활성을 갖도록

개질된 분자이다. 보다 특히, 본 발명에 따른 피브리노젠은 트롬빈에 의한 분할(중합) 활성을 나타내고 표적 입자 또는 분자에 대해 한정된 친화성 결합 반응을 가질 수 있는 단순 구조 분자(복잡한 대형 천연 피브리노젠 분자 대신)인 것이 바람직하다.

[0024] 그러므로, 본 발명은 표적 입자 또는 분자를 포착 또는 포획하기 위한 비히클로서 피브리노젠 또는 피브리노젠 개질된 단백질의 사용을 개시한다. 상기 피브리노젠 또는 피브리노젠 개질 단백질이 트롬빈에 노출되면 피브리노젠 분자가 분할되어 피브린으로 전환된다. 그 다음 피브린 입자는 자기-중합되어 표적이 포획되는 소 응괴를 형성하여 샘플 액체 부피로부터 표적의 분리를 야기한다. 제안된 방법은, 예를 들면, 자기 입자와 같은 최신 기술 또는 임의의 다른 "고체 표면" 기초 기술과 비교할 때 큰 이점을 제공한다. 분자 수준에서 일어나기 때문에, 표적과 피브리노젠 비히클 사이의 반응은 매우 빠르고 효과적이며, 표면 기초 분석에 따른 비-특이적 결합 문제가 배제될 것이다.

[0025] 상기를 기초로, 특정 용도에서, 본 발명은 감염된 혈액 샘플로부터 미손상(intact) 미생물을 효과적으로 분리하고 농축시키는 해법을 제공하는 방법을 제공한다. 상기 방법의 달성가능한 목표는 대량의 혈액으로부터 미량의 미생물을 분리한 후 추가의 처리 단계와 상용가능한 소량의 완충액중에 그를 농축시키는 것이다. 본 발명의 또 다른 달성가능한 목표는 당해 분야에 인지된 특정 기술에 의해 이어서 검출되고 분석될 수 있는 혈액 샘플로부터 미손상 미생물의 분리이다. 달성될 때, 대신, 상기 방법은 빠른 배양 방법을 이용하여 혈류 감염의 신속하고 효과적인 검출 및 진단 뿐 아니라 신속하고 보다 민감한 분자 기초 분석에 많은 가능성을 연다.

[0026] 그러므로, 상기 설명으로부터 본 발명에 따른 피브리노젠은 샘플(즉, 전혈 샘플)에 대해 천연일 수 있거나 상기 샘플에 인공적으로 첨가될 수 있음이 명백해진다.

[0027] 상기를 기초로, 특정 용도에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 조성된 샘플로부터 표적 분자 또는 입자를 분리하는 방법을 제공한다:

- [0028] (a) 피브리노젠을 상기 샘플에 첨가하는 단계;
- [0029] (b) 상기 샘플에 첨가된 피브리노젠을 피브린으로 전환시켜 피브린 그물망을 형성함으로써 상기 표적 분자 또는 입자를 피브린 그물망에 포획하는 단계;
- [0030] (c) 상기 피브린 그물망을 수축시켜 피브린 응괴를 형성하는 단계; 및
- [0031] (d) 상기 피브린 응괴를 주위 샘플 매질로부터 분리하는 단계

[0032] 본 발명에 따른 조성 샘플은 혈액, 혈액 유도체 또는 혈액 성분 샘플을 포함할 수 있으나, 또한 예를 들면, 임상(예를 들어, 뇨, 담 및 면봉), 식품 및 환경 샘플과 같은(이로 한정되지는 않는다) 임의의 피브리노젠 비함유 샘플을 말할 수 있다.

[0033] 따라서, 본 발명은 또한 (i) 식별 코드; (ii) 샘플을 함유하기 위한 용기; 및 (iii) 용기내 피브리노젠-함유 샘플을 포함하는, 샘플로부터 표적 분자 또는 입자를 분리하기 위한 샘플 수집 장치를 개시하며, 상기 장치는 상기 샘플을 장치내 트롬빈 또는 트롬빈-유사 효소에 노출시 상기 표적 분자 또는 입자를 분리가 가능한 방식으로 포획하는 피브린 응괴를 형성하도록 작동가능하다.

[0034] 본 발명에 따른 장치는 그후에, 예를 들면, 병원성 입자(세균, 바이러스 등) 또는 표적 분자(DNA, RNA 또는 단백질 등)와 같은 표적 입자 또는 분자의 존재에 대해 검사되어야 하는 유체 샘플을 수용하도록 고안된 표준 반응 튜브 또는 수용기일 수 있다. 본 발명의 장치는 또한 본원에서 전술한 바와 같이 피브린 응괴 형성 및 표적 분리를 야기할 안정한 시약 배합물을 포함할 것이다. 바람직하게, 상기 장치는 피브리노젠 분자와 같은 응고 인자 및 트롬빈 효소와 같은 응고 촉진제를 포함하는 그의 저장된 안정한 시약 배합물을 함유하는 반응 대역을 포함한다. 상기 장치는, 임의의 복잡한 생물 샘플로부터 매우 낮은 복제수에서, 시험 키트에서 감염원, 독소, 핵산 및 단백질과 같은 표적의 정량적 분리 및 검출을 가능케 할 것이다. 개시된 장치가 샘플을 수집하는 동시에 상기 샘플로부터 표적 입자 또는 분자를 효과적으로 분리 및 농축할 수 있게 한다는 사실은 필요한 샘플 처리 단계를 상당히 단순화시키며, 또한 잠재적인 감염 위험성 및 오염 위험성의 감소를 가져올 것이다.

[0035] 따라서, 본 발명의 주요 양태는 독립 청구항 제 1 항에 따라 달성되는, 피브리노젠 함유 샘플로부터 표적 분자 또는 입자를 분리하는 방법에 관한 것이다.

[0036] 따라서, 본 발명의 주요 양태는 독립 청구항 제 28 항에 따라 달성되는, 샘플로부터 표적 분자 또는 입자를 분리하기 위한 샘플 수집 장치에 관한 것이다.

[0037] 상이한 태양들을 종속 청구항들에 나타내었다. 특허청구범위의 주제 및 모든 청구된 조합들은 본 설명에 참고로 인용되며, 청구항이 포기되는 경우에도 개시내용의 일부를 유지한다.

도면의 간단한 설명

[0038] 본 발명의 목적 및 특징은 특히 첨부된 특허청구범위에 나타나 있다. 본 발명은, 다른 목적 및 이점과 함께, 그의 구성 및 시행 방식 둘 다에 관하여 첨부한 도면들과 관련한 하기의 설명을 참조하여 가장 잘 이해될 수 있다.

도 1은 본 발명의 주 목적을 달성하기 위해 이용될 수 있는 피브리노겐의 피브린으로의 전환을 나타내는 응고 과정을 도식적으로 나타낸 것이다(참조. <http://en.wikipedia.org/wick/Coagulation>).

도 2는 트롬빈에 피브리노겐(1) 함유 샘플의 노출시 피브린 그물망(3)에 표적 분자 또는 입자(2)의 포획 메카니즘을 도식적으로 나타낸 것이다.

도 3은 트롬빈에 피브리노겐 함유 샘플의 노출시 피브린 그물망에 표적 분자 또는 입자의 친화성 포획에 대한 상이한 태양들을 도식적으로 나타낸 것이다: (a) 피브리노겐/피브린(1)에 대한 결합 잔기(4)를 갖는 표적(2)의 천연 친화성; (b) 상기 표적(2)을 지향하고 피브린/피브리노겐(1)-결합 잔기(4)를 갖는 물질-포착 잔기(5)를 통한 친화성 포착; (c) 표적(1)을 지향하는 포착 잔기 도메인(7)을 갖는 피브리노겐 융합(1) 단백질을 통한 친화성 포착.

도 4는 도 3(b)의 친화성 포획의 변형을 도식적으로 나타낸 것으로, 여기서 친화성 포획은 상기 표적(2)에 대해 유도되고 피브린(3) 결합 잔기(4')를 갖는 물질-포착 잔기(5)를 통해 수행된다. 바람직한 태양에서, 피브린에 대한 잔기(4')의 친화성은 트롬빈에 대한 샘플의 노출 단계후에만 활성 형태(4)로 전환될 것이다.

도 5는 표적 분리로부터 검출까지의 전체 분석 과정을 도식적으로 나타낸 것으로, 여기서 피브리노겐(1) 함유 샘플내 표적(2)은 피브린/피브리노겐-결합 잔기(4)를 포함하는 물질-포착 잔기(5) 및 검출 표지(9)를 포함하는 물질-표지 잔기(8)에 노출된다. 트롬빈에 노출시 복합체 "표적/물질-포착 잔기/물질-표지 잔기"는 축소된 피브린 응괴내에서 분리될 것이다. 표적의 검출은 응괴 농축물에 직접 수행될 것이다.

도 6은 샘플 수집 장치 운전을 도식적으로 나타낸 것이다. 본 발명에 따르면, 상기 장치는 상기 장치내에서 트롬빈 또는 트롬빈-유사 효소에 상기 샘플의 노출시 상기 표적 분자 또는 입자를 분리가능한 방식으로 포획하는 피브린 응괴를 형성하도록 작동될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 본 발명의 한 태양에 따라서, 혈액 샘플로부터 표적 분자 또는 입자를 분리하는 방법은 다음을 포함한다:

[0040] (a) 상기 샘플에 함유된 피브리노겐을 적어도 부분적으로 피브린으로 전환시켜 피브린 그물망을 형성함으로써 피브린 그물망에 상기 표적 분자 또는 입자를 포획하는 단계;

[0041] (b) 상기 피브린 그물망을 수축시켜 피브린 응괴를 형성하는 단계; 및

[0042] (c) 상기 피브린 응괴를 주위 샘플 매질로부터 분리하는 단계.

[0043] 따라서, 혈액 샘플이란 전혈, 혈소판-풍부 혈장 및 혈소판-결핍 혈장을 말한다. 혈액 샘플은 또한 혈청을 말할 수 있으며, 이때 상기 조건에서 본 발명에 따른 분리 메카니즘 작업을 가능하게 하기 위해 피브리노겐이 상기 샘플에 첨가되어야 한다. 본 발명에 따른 혈액은 또한 명백하게 혈액 성분, 혈액 첨가제 또는 혈액 기능을 모방하는 임의의 다른 성분들로 이루어진 혈액 대체물 또는 인공적으로 조성된 샘플을 말할 수 있다. 수혈에 통상적으로 사용되는 상기 혈액 성분의 전형적인 예로는 혈소판 농축물, 적혈구(헤모글로빈) 농축물, 혈청 또는 혈장 대체물(혈장 증량제로도 알려져 있음)이 포함된다. 상기 혈액 샘플이, 예를 들면, 패혈증 샘플, 조성된 혈액 샘플 또는 혈액 대체물과 같은 일부 임상 경우에서처럼 응고 인자(주로 피브리노겐)가 결핍되는 경우, 상기 결핍은 피브리노겐을 포함하는 응고 인자를 본 발명에 따라 표적 입자 또는 분자를 분리할 수 있는 필수 성분으로서 상기 혈액 샘플에 첨가함으로써 상쇄될 수 있다.

[0044] 그러므로, 같은 의도 안에서, 본 발명에 따른 혈액 샘플은 또한 혈액 샘플을 피브리노겐 결핍 샘플과 혼합하여 수득된 인공적으로 조성된 혈액 샘플을 말할 수 있다. 상기 피브리노겐 결핍 샘플은, 예를 들면, 생물, 임상,

식품 및 환경 샘플과 같은 임의의 공급원으로부터의 샘플을 포함할 수 있다. 보다 특히, 본 발명에 따른 혈액 샘플이란 용어는 적어도 피브리노겐을 포함하는 응고 인자를 피브리노겐 결핍 샘플과 혼합함으로써 인공적으로 조성된 혈액 샘플을 포함한다.

- [0045] 본원에서 일반적으로 사용된 바와 같은 "피브린 그물망"은 피브리노겐이 트롬빈 효소에 노출시 분할되어 피브린으로 전환되는 과정의 산물을 의미한다. 일단 피브리노겐이 피브린으로 전환되면, 피브린 단량체가 합쳐져서 비-공유적으로 가교결합된 3차원 중합체 그물망을 형성하는 자가-중합 단계가 일어난다. 또한, 응고 인자 XIII의 존재하에서, 피브린 그물망은 인자 XIII의 트롬빈에 의해 활성화된 트랜스글루타미나제인 인자 XIIIa에 의해 가교결합될 것이다. 다른 트랜스글루타미나제도 존재하며, 또한 공유 가교결합 및 피브린 그물망으로의 그래프팅에 포함될 수 있다.
- [0046] 본원에서 일반적으로 사용된 바와 같은 "응괴 형성 및 수축"은 특정 시간후 응괴를 형성하는 피브린 매트릭스의 관찰된 인입(pull-in)을 의미한다. 상기 응괴의 크기는, 특정 조건하에서 응괴로부터 물을 흡인시킴으로써 시간이 지남에 따라 감소(즉, 응괴 수축)될 수 있다. 자연적으로, 응괴 수축은 응괴의 피브린 메시에 포획된 활성화된 혈소판으로부터 다중 응고 인자들의 방출에 의해 유도된다.
- [0047] 피브린 그물망의 형성에 있어, 피브리노겐 용액 및/또는 트롬빈 용액의 농도는 형성된 그물망의 밀도, 응괴 형성, 최종 피브린 매트릭스의 가교결합 및 속도에 상당한 영향을 미친다. 전형적으로, 트롬빈 및 피브리노겐의 양의 감소는 가교결합 과정을 지연시켜 덜 치밀한 그물망을 갖는 피브린 응괴를 형성하게 한다. 따라서, 트롬빈 및 피브리노겐의 양의 비를 조절하여 피브린 그물망 밀도 및 최종 응괴의 크기의 제어된 제조를 이끈다. 또한, 트롬빈 대 피브리노겐의 양의 비는 표적 포착에 더 적합한 덜 치밀한 그물망을 갖는 최종 매트릭스를 제공한다. 또한, 트롬빈 대 피브리노겐의 양의 비는 보다 작은 크기를 갖는 수축된 피브린 응괴를 제공하여 분리된 표적 입자 또는 분자의 높은 농축률을 달성시킨다.
- [0048] 본 발명의 기초가 되는 메카니즘은 피브리노겐을 피브린으로 전환시켜 표적 입자 또는 분자를 포착하는 그물망의 역할을 하는 피브린 그물망의 형성을 유도하는 것이다. 목적하는 효과를 달성하기 위해, 상기 피브린 그물망 형성의 제어가 특히 중요하다. 이와 관련하여, 핵심 응고 인자로서 트롬빈 및 피브리노겐의 농도가 피브린 포획 그물망의 형성 및 결과적으로 본 발명에 따른 응괴 생성 및 분리에 있어 중요하다. 사실상, 고농도의 트롬빈 및 피브리노겐은 바람직하지 않은 매우 치밀한 피브린 그물망 및 대형 응괴 크기를 야기한다. 그러나, 결론은 보다 저농도의 트롬빈 및 피브리노겐이 샘플 그릇 또는 용기에서 소 펠릿 형성으로 신속하게 수축되는 이완된 피브린 그물망의 형성을 야기한다는 것이다. 상기 수축시에, 피브린 그물망은 샘플 부피로부터 표적 입자 또는 분자를 포획함으로써, 상기 샘플로부터 그의 농축 및 분리를 야기한다.
- [0049] 피브리노겐을 함유하는 샘플로부터 표적 입자 또는 분자를 효과적으로 포획 및 분리하는데 있어 목적하는 효과를 달성하기 위해, 샘플중 상기 피브리노겐의 농도는 바람직하게는 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상이다. 바람직한 태양에서, 샘플중 피브리노겐의 농도는 10 mg/ml 내지 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이다. 본원에 언급된 범위를 훨씬 초과하는 보다 고농도를 사용하는 것도 또한 이용될 수 있지만, 보다 높은 피브린 매트릭스 밀도 및 수축된 응괴 크기를 야기한다. 표적 입자를 분리하는 경우에, 비교적 고농도의 피브리노겐을 사용하여 크기 선택 또는 크기 포획을 이용하는 것이 특히 적합하다. 표적 입자의 크기가 작을수록, 필요한 피브리노겐 농도가 더 높다. 그러나, 보다 고농도의 피브리노겐을 사용하는 것의 불리한 점은 보다 큰 응괴 크기를 형성하여 표적 입자의 보다 낮은 농축률을 야기하는 것이다. 그러므로, 사실상 크기 선택 또는 크기 포획의 경우에, 피브리노겐의 농도는 최대 포착 효율 및 동시에 보다 작은 응괴 크기를 달성하도록 하는 방식으로 최적화되어야 한다.
- [0050] 상기 설명으로부터 본 발명에 따른 피브리노겐은 샘플(즉, 혈액 샘플)에 천연적이거나 상기 샘플에 인공적으로 첨가될 수 있음이 잘 인지된다. 바람직한 태양에서, 피브리노겐은, 예를 들면, 전혈의 경우에서와 같이, 상기 샘플이 천연 피브리노겐을 가질지라도 샘플에 첨가될 것이다. 이것은, 예를 들면, 상기 샘플에서 일어날 수 있는 임의의 피브리노겐 결핍 또는 천연 피브리노겐 농도의 변화를 상쇄시키는데 유리할 것이다. 또 다른 바람직한 태양에서, 혈액 샘플에 첨가된 피브리노겐(천연 피브리노겐 농도가 목적하는 농도일지라도)은 고려중인 샘플과 다른 종의 혈액 공급원으로부터 비롯될 것이다. 예를 들면, 인간 전혈 샘플이 사용되는 경우, 상기 태양에 따르면 소, 양, 주머니쥐 또는 닭과 같은 또 다른 척추동물로부터 비롯된 피브리노겐을 상기 인간 샘플에 첨가할 수 있다. 피브리노겐/트롬빈 반응이 종 특이적일 수 있다는 사실을 이용하여, 천연 피브리노겐을 갖는 샘플에 첨가제로서 상이한 피브리노겐 공급원을 이용하여 추구하는 한가지 효과는 분리 과정중 천연 피브리노겐의 방해 배제(최소화)시키면서 표적 분리를 달성하기 위해 첨가된 피브리노겐(바람직하게는 관련 종 트롬빈으로 활성화된)을 특이적으로 이용하는 것이다. 이것은 표적의 분리 과정의 보다 효과적인 제어를 허용하고 천연 피

브리노겐 변화에 의존하는 것을 배제하기 때문에 특히 유리할 수 있다. 같은 의도 안에서, 또 다른 태양으로, 첨가된 피브리노겐은 사용중인 혈액 샘플의 내인성 트롬빈에 의해 분할될 수 없도록 특이적으로 고안된 제조합 피브리노겐 단백질일 것이다.

[0051] 따라서, 피브리노겐을 함유하는 샘플로부터 표적 입자 또는 분자를 효과적으로 포획하고 분리하는 목적 효과는 상기 샘플을 트롬빈 또는 트롬빈-유사 효소에 적용시킴으로써 달성될 수 있다. 이와 관련하여, 상기 트롬빈은 외인성(상기 샘플에 인공적으로 첨가된) 또는 내인성(이미 상기 샘플의 일부) 트롬빈 또는 트롬빈-유사 효소일 수 있다. 따라서, 트롬빈은 활성형으로 존재할 수 있거나 도 1에 도시된 바와 같은 인자 X와 같은 응고 인자의 활성화를 통해 생성될 수 있다. 상기 트롬빈 및/또는 응고 인자의 기원은 인간, 동물 또는 곤충 공급원으로부터일 수 있다. 따라서, 트롬빈-유사 효소란 외부 혈액 공급원으로부터 취득되고 피브리노겐을 피브린으로 전환시키는 능력을 갖는 세린 프로테아제 부류를 말한다. 상기 효소는 당해 분야에 공지되어 있으며, 통상적으로 뱀독으로부터 취득되거나 제조합 형태로 생산된다.

[0052] 바람직한 태양에서, 트롬빈 농도는 0.01 내지 10 IU/ml, 바람직하게는 0.1 내지 2 IU/ml 샘플의 범위 이내이다. 실제, 트롬빈 또는 트롬빈 유사 효소의 양은 오히려, 목적하는 피브린 그물망 구조 및 응괴 크기를 취득하기 위한 장치내 피브리노겐 농도에 상응하여 조정되어야 한다. 이와 관련하여, 트롬빈 양은 바람직하게는 피브리노겐 1 mg 당 20 IU 미만의 트롬빈, 바람직하게는 피브리노겐 1 mg 당 0.01 내지 10 IU의 트롬빈, 보다 바람직하게는 피브리노겐 1 mg 당 0.1 내지 1 IU 트롬빈의 범위이다.

[0053] 샘플로부터 표적 분자 또는 입자를 포획하기 위해 피브린 그물망 구조를 제어하기 위한 바람직한 태양에서, 칼슘의 농도도 또한 조정될 수 있다. 실제, 이것은 검사하는 샘플에 칼슘 이온 공급원을 첨가하여 달성될 수 있다. 칼슘 이온 공급원을 바람직하게는 샘플 부피 1 ml 당 1 내지 10 mg, 보다 바람직하게는 샘플 부피 1 ml 당 4 내지 7 mg, 가장 바람직하게는 샘플 부피 1 ml 당 5 내지 6 mg의 농도 범위의 염화칼슘(CaCl₂)이 바람직하다. 혈액 샘플중, 예를 들면, 칼슘은 천연적으로 존재하며, 칼슘 농도 조정은 GDTA, EDTA 및 시트레이트의 군에서 선택된 칼슘 킬레이트화제를 더 첨가함으로써 달성될 수 있다.

[0054] 샘플로부터 표적 분자 또는 입자를 포획하기 위해 피브린 그물망 구조를 제어하기 위한 바람직한 태양에서, 상기 방법은 응고 인자 XIII을 상기 샘플에 첨가하는 단계를 포함할 수 있다. 응고 인자 XIII은 트롬빈에 의해 활성화된 후 피브린 매트릭스 가교결합 형성을 촉진할 수 있는 효소이다. 상기 인자는 피브린 그물망 구조를 안정화시키고, 응괴 수축을 촉진하고, 피브린 다공성을 적정하는데 기여하는 것을 더 조장할 것이다. 그의 불활성 또는 활성(XIIIa) 형태의 상기 인자 XIII은 샘플 부피 1 ml 당 0.5 내지 100 IU, 보다 바람직하게는 샘플 부피 1 ml 당 1 내지 60 IU, 가장 바람직하게는 샘플 부피 1 ml 당 1 내지 10 IU의 농도 범위의 피브리노겐 첨가제와 함께 첨가되거나 조정될 수 있다.

[0055] 상기 설명으로부터, 본 발명에 따른 방법의 주된 달성가능한 목적은 검사하는 샘플로부터 표적 입자 또는 분자를 효과적으로 농축시키는 것이다. 농축 계수 또는 농축률은 사실상 응괴 크기에 의해 결정된다. 그러므로, 바람직한 태양에서, 형성된 응괴의 크기는 초기 샘플 크기의 1/3 이상이며, 바람직하게 상기 응괴 크기는 초기 샘플 부피의 1/10 미만이다. 또한, 본 발명에 따른 바람직한 태양에서는, 응괴가 수축되어 초기 샘플 부피의 1/50 내지 1/1000의 값에 이를 수 있는 크기를 갖는 소 펠릿을 추가로 형성한다.

[0056] 더 높은 수축률을 달성하기 위해, 상기 전술한 바와 같이, 피브리노겐 및 트롬빈의 농도가 두드러진 요인들이다. 칼슘 농도, 및 응고 인자 XIII과 같은 첨가제와 같은 다른 파라미터도 응괴 크기에 영향을 미칠 수 있다. 그러나, 실제로 응괴는 상기 샘플내 활성화된 혈소판 세포 또는 활성화된 혈소판 세포 용해물의 존재 하에 더 수축될 수 있다. 혈액 샘플에 천연적으로 존재하거나 혈액 조성 샘플중에 첨가제로서, 혈소판의 활성화는 아데노신 다이포스페이트(ADP) 및 콜라겐의 군에서 선택된 혈소판 작용물질에 의해 달성될 수 있다.

[0057] 따라서, 본 발명은 활성화된 혈소판 세포 또는 혈소판 세포 용해물에 상기 샘플을 적용시키는 단계를 포함하는, 피브리노겐 함유 샘플로부터 표적 분자 또는 입자를 분리하는 방법을 개시한다. 바람직한 태양에서, 상기 활성화된 혈소판 세포 또는 혈소판 세포 용해물은 상기 샘플에 천연적으로 존재하거나 상기 샘플에 인공적으로 첨가될 수 있다. 혈소판 활성화는 바람직하게는 1 mM 내지 1 μM, 바람직하게는 100 μM 내지 10 μM 농도의 ADP에 의해 달성된다.

[0058] 더 높은 수축률을 달성하기 위해, 바람직한 태양에서, 피브린 그물망에 포획된 자기 입자를, 압착하여 응괴 크기를 감소시키는 수축 수단으로 사용할 수 있다. 사실상 실제로 자기 입자는 피브린 응괴를 수축시키는데 있어 혈소판이 천연적으로 담당하던 역할을 모방하기 위해 사용될 것이다. 상기 수축은 피브린 응괴내에 포획된 자

기 입자를 외부 자기력에 적용시킴으로써 달성될 수 있다. 따라서, 상기 자기 입자는 피브린 그물망 다공성에 비해 그의 더 큰 크기로 인해 피브린 응괴내에 포획된다. 바람직한 태양에서, 자기 입자는 상기 입자들이 피브리노겐/피브린을 가질 수 있는 친화성 상호작용에 의해 피브린 응괴내에 포획된다. 이것은 트롬빈, 응고 인자 XIII, 세균 피브리노겐 결합 단백질 및 조직 플라스미노겐 활성화인자(t-PA)의 군에서 선택될 수 있는 피브리노겐/피브린 결합 잔기로 코팅된 자기 입자를 사용하여 달성될 수 있다.

[0059] 표적 분자 또는 입자를 더 농축하기 위해, 본 발명은 또한 피브린 그물망에 상기 표적을 포착하기 위한 친화성 포획의 사용을 개시한다. 친화성 포획을 사용하는 이점은 두배이다: (1) 피브린 그물망에 크기 포획에 의해 포착되기 곤란하거나 포착될 수 없는 작은 표적을 포착하고; (2) 친화성 포획을 사용하여 효과적인 포착 수율을 달성하기 위해 보다 낮은 피브리노겐 농도가 필요하기 때문에 표적의 높은 수준의 농축(즉, 매우 작은 응괴 또는 펠렛)을 가능하게 한다. 사실상, 친화성 포획에 의해, 초기 샘플 부피의 1/50 미만, 바람직하게는 초기 샘플 부피의 1/100 내지 1/1000의 농축물을 달성할 것을 기대할 수 있다. 더 큰 샘플 부피(예를 들면, 3 내지 10 ml)의 경우, 농축물은 초기 샘플 부피의 1/1000보다 훨씬 작을 수 있다.

[0060] 도 3(a)에 예시된 바와 같이, 바람직한 첫 번째 태양에서, 친화성 포획은 피브리노겐/피브린(1)에 대한 결합 잔기(4)를 갖는 표적(2)의 천연 친화성에 의해 달성될 수 있다. 상기 친화성 포획의 전형적인 예는 그의 표면 피브리노겐 결합 단백질 응집(clumping) 인자 A(C1fA)를 통한 피브리노겐/피브린에 대한 효과적인 친화성을 갖는 것으로 알려진 스태필로코커스 오레우스의 포착이다. 보다 일반적으로, 국제 특허 공개 제 2011/007,004 호에 상세히 기술된 바와 같이, 스태필로코커스(*Staphylococcus*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 및 엔테로코커스(*Enterococcus*)는 피브리노겐을 포함하는 단백질에 결합함으로써 감염을 매개할 수 있는 어드헤진(adhesin)으로 불리는 단백질을 갖는다. 혈액의 경우, 본 발명에 따른 방법의 또 다른 이점은, 적혈구를 실질적으로 현탁액중에 유지하면서 피브린 소 펠렛내에 백혈구 및 혈소판 세포를 더 침전시키기 위해 혈액 세포의 천연 친화성의 이용이다. 이것은, 미생물이 항상 혈액 샘플중에서 자유롭게 부유하는 것이 아니라 백혈구 및 혈소판에서 결합되거나 격리되기 때문에 특히 중요하다. 예를 들면, 스태필로코커스 오레우스의 경우에, 혈소판내에 생존하는 세균의 상호작용 및 이어지는 격리는 세균으로 하여금 숙주 방어계를 벗어나게 하기 때문에 독력에 기여한다. 천연 친화성 포착은 또한 전하 상호작용으로 인해 피브린에 강하게 결합되는 핵산과 같은 소 분자를 포착하기 위해 사용될 수 있다. 세균 입자의 경우, 천연 친화성은 소 단백질 분자가 피브리노겐/피브린에 대한 직접적 상호작용 친화성을 갖는 순간 상기 소 단백질 분자로 확장될 수 있다.

[0061] 바람직한 태양에서, 천연 친화성 분리 과정은 상이한 종들로부터의 피브리노겐을 사용함으로써 변형될 수 있다. 예를 들면, 인간 피브리노겐 대신 양의 피브리노겐을 사용하면 스태필로코커스 오레우스의 포착물을 저하시킬 것이다. 이것은 양의 피브리노겐이 스태필로코커스 오레우스 세균에 대해 낮은 결합 친화성을 나타낸다는 사실에 기인한다. 동일한 방향안에서, 샘플내 사용중인 피브리노겐은 정의된 표적 또는 표적 기에 대한 피브리노겐의 천연 친화성 포착을 증대시키거나 억제하도록 고안된 재조합 또는 변형 피브리노겐일 수 있다.

[0062] 친화성 포착의 두 번째 태양은 도 3(b)에 예시되어 있다. 따라서, 친화성은 상기 표적(2)을 지향하고 따라서 피브린/피브리노겐(1)-결합 잔기(4)를 갖는 물질-포착 잔기(5)를 이용하여 달성된다. 표적을 표지화하기 위한 중간 수단으로서 물질-포착 잔기의 사용은 표적이 피브리노겐/피브린에 대해 천연 친화성을 갖지 않는 경우에 바람직하다. 그 전형적인 예는 대부분의 경우에서 피브리노겐/피브린에 대한 천연 친화성이 결여된 그람-음성 중의 포착이다. 이것은, 예를 들면, 피브리노겐 결합 잔기를 갖는 그람-음성 중 항체를 사용하여 달성될 수 있다. 또한, 간접적 친화성 포착은 실질적으로 표적 세포, 세포 성분, 세포 하위집단(진핵 및 원핵 둘 다), 세균, 바이러스, 기생충, 항원, 특이 항체, 독소, 단백질, 핵산 서열 등을 포함할 수 있으나 이로 한정되지는 않는 임의의 표적 입자 또는 분자로 확장될 수 있다. 이를 달성하기 위해, 상기 표적 분자 또는 입자에 대해 유도된 물질-포착 잔기는 상기 표적 분자 또는 입자를 특이적으로 인식하도록 고안된 항체, 핵산 및 앵타머(aptamer)를 포함하는 군에서 선택된다. 또한, 상기 물질-포착 잔기는 트롬빈, 피브로넥틴, 세균성 피브리노겐 결합 단백질, 조직-형 플라스미노겐 활성화인자, 인테그린 및 상기 군의 임의의 구성원으로부터 유도된 잔기를 포함하는 군에서 선택된 피브린/피브리노겐-결합 잔기와 커플링되거나 결합될 수 있다. 바람직한 태양에서, 상기 피브린/피브리노겐-결합 잔기 및 상기 물질-포착 잔기는 공유 결합된다.

[0063] 친화성 포착의 세 번째 태양은 도 3(c)에 예시되어 있다. 따라서, 친화성은 표적(1)에 대해 유도된 포착 잔기 영역(7)을 갖는 피브리노겐 융합(1) 단백질을 사용하여 이루어진다. 융합 피브리노겐 단백질의 사용은 친화성 포착의 선택성을 피브리노겐 분자와 직접 결부시키는 이점을 제공한다. 상기 관점에서, 피브리노겐 분자는 표적의 하나의 기 또는 특정 기를 특이적으로 포착한 후 분리하도록 특별 제작되거나 특수하게 설계될 수 있다. 또한, 피브리노겐 재조합 또는 변형 단백질은 천연 상호작용을 피하고/피하거나 특정 샘플 유형내 분자 또는 입

자들에 대한 특이적 상호작용을 증대시키도록 설계될 수 있다. 또한, 또 다른 태양으로, 피브리노겐 융합 단백질은 분해 부위를 추가로 포함한다. 이것은 뒤에서 기술하는 바와 같이, 용해 단계 동안 피브린 그물망으로부터 결합된 표적 분자 또는 입자를 회수하는데 특히 유용할 것이다. 바람직한 태양에서, 분해 부위는 효소적 또는 가수분해성 분해 부위이다. 가장 바람직한 태양에서, 분해 부위는 플라스민 및 매트릭스 메탈로프로테이나제로 이루어진 군에서 선택된 효소에 의해 절단되는 효소적 분해 부위이다.

[0064] 바람직한 태양에서, 도 4에 예시된 바와 같이, 친화성 포착은, 상기 표적(2)에 대해 유도되고, 피브린 결합 잔기로서 조직-형 플라스미노겐 활성화인자를 사용하는 것과 같이, 피브리노겐에 대한 임의의 친화성 없이 특이적 피브린(3) 결합 잔기(4')를 갖는 물질-포착 잔기(5)를 통해 수행된다. 바람직한 태양에서, 피브린에 대한 잔기(4')의 친화성은 피브린 결합 잔기로서 인자 XIII을 사용하는 경우에서와 같이 트롬빈에 샘플의 노출 단계 후에만 활성 형태(4)로 전환될 것이다.

[0065] 이용시, 본 발명은 표적 분자 또는 입자를 분리 및 농축하는 방법을 포함할 뿐 아니라, 도 5에 예시된 바와 같이 상기 표적을 검출하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 이와 관련하여, 분석 과정은 피브린 응괴내에서 표적 포착 및 분리 단계후에 응괴 농축물내에서 직접 상기 표적을 검출하는 단계를 포함한다. 이것은, 예를 들면, 피브리노겐(1) 함유 샘플을 피브린/피브리노겐-결합 잔기(4)를 포함하는 물질 포착 잔기(5) 및 검출 표지(9)를 포함하는 물질-표지 잔기(8)에 노출시킴으로써 달성될 수 있다. 이에 의해 "표적/물질-포착 잔기/물질-표지 잔기"가 형성된다. 트롬빈에 노출시, 복합체 "표적/물질-포착 잔기/물질-표지 잔기"는 수축된 피브린 응괴(4)내에서 분리될 것이다. 표적의 검출은, 예를 들면, 피브린 응괴를 표지(8) 여기 공급원(10)에 노출시켜 검출 신호(11)의 방출을 야기함으로써 응괴 농축물상에서 직접 수행될 것이다. 일반적으로, 검출 방법은 사용된 표지에 따라 달라질 것이며, 따라서 형광, 발광, SERS(Surface Enhanced Raman Spectroscopy, 표면 강화 라만 분광법) 및 라만 분광법과 같이 공지된 검출 방법이 적합할 수 있다.

[0066] 펠릿 형성 및 표적 분리 후에, 바람직한 태양에서, 피브린 응괴 또는 펠릿을 조절 완충액에 현탁시킨 다음 응괴를 붓고(즉, 용해)시켜 분리된 표적을 피브린 응괴로부터 회수할 수 있다. 조절 완충액의 전형적인 예는 저장성 완충액, 즉 플라스민과 같은 피브린용해제 및/또는 프로테이나제 K, 프로나제 및 메탈로프로테이나제와 같은 단백질가수분해제와 함께 세제를 함유하는 완충액이다. 상기 용해 단계는 플라스미노겐 또는 플라스미노겐 활성화인자와 같은 응괴 용해 증강제를 추가로 첨가함으로써 개선될 수 있다. 바람직한 태양에서, 용해 단계는 핵산 분해 효소의 사용을 추가로 포함할 수 있다.

[0067] 본 발명의 실제 실행시, 본 발명의 두 번째 양태는 (i) 식별 코드; (ii) 샘플을 수용하는 튜브의 형태일 수 있는, 상기 샘플을 함유하기 위한 용기; 및 (iii) 용기내 피브리노겐-함유 샘플을 포함하는, 샘플로부터 표적 분자 또는 입자를 분리하기 위한 샘플 수집 장치에 관한 것으로, 상기 장치는 상기 샘플을 장치내 트롬빈 또는 트롬빈-유사 효소에 노출시 상기 표적 분자 또는 입자를 분리가능한 방식으로 포획하는 피브린 응괴를 형성하도록 작동가능하다.

[0068] 따라서, 상기 샘플 용기의 부피는 0.1 내지 100 ml, 바람직하게는 0.1 내지 10 ml이다. 샘플중 상기 피브리노겐의 농도는 바람직하게는 0.1 µg/ml 이상이다. 바람직한 태양에서, 샘플중 피브리노겐의 농도는 0.1 내지 100 mg/ml, 가장 바람직하게는 10 mg/ml 내지 10 µg/ml이다.

[0069] 따라서, 상기 장치는 첨가제로서 트롬빈 또는 트롬빈-유사 효소를 추가로 포함한다. 이와 관련하여, 트롬빈 농도는 0.01 내지 10 IU/ml, 바람직하게는 0.1 내지 2 IU/ml 샘플의 범위 이내이다. 실제로, 트롬빈 또는 트롬빈-유사 효소의 양은 목적하는 피브린 그물망 구조 및 응괴 크기를 획득하기 위한 장치내 피브리노겐 농도에 상응하여 조정되어야 한다. 이와 관련하여, 트롬빈의 양은 바람직하게는 피브리노겐 1 mg 당 트롬빈 20 IU 미만, 바람직하게는 피브리노겐 1 mg 당 트롬빈 0.01 내지 10 IU의 범위, 보다 바람직하게는 피브리노겐 1 mg 당 트롬빈 0.1 내지 1 IU이다.

[0070] 예를 들어, 전혈과 같은 혈액 샘플의 경우, 본 발명에 따른 샘플 수집 장치는 또한 샘플내 내인성 트롬빈의 생성을 촉진하는 응고제를 포함한다. 상기 촉진제는, 예를 들면, 분말상 또는 섬유상 실리케이트 화합물, 예를 들어, 카올린, 셀라이트, 규조토 및 유리 섬유, 탄산칼슘 및 황산칼슘과 같은 칼슘 화합물의 미분, 뱀독으로부터 유도된 트롬빈-유사 물질, 및 혈액 응고 인자를 활성화시켜 응고를 촉진할 수 있는 폴리페놀을 포함하는 군에서 선택될 수 있다. 또한, 상기 응고 촉진제는, 예를 들면, 개별적으로 또는 함께 샘플내에 첨가되거나 샘플 용기의 벽 내부에 코팅될 수 있다. 상기 내인성 트롬빈 촉진제의 양 및 그 과정은 응고 과정을 제어하고 작은 피브린 응괴 크기를 획득하는 방식으로 조정되어야 한다.

- [0071] 또한, 본 발명에 따른 장치는 칼슘, 킬레이트화제, 활성화된 혈소판 세포 또는 활성화된 혈소판 세포 용해물 및 인자 XIII의 군에서 선택된 첨가제를 포함할 수 있다. 따라서, 샘플 수집 장치는 첨가제로서 자기 입자를 또한 포함할 수 있다. 바람직한 태양에서, 장치내 상기 자기 입자는 트롬빈, 피브로넥틴, 세균성 피브리노겐 결합 단백질, 조직-형 플라스미노겐 활성화인자 및 인테그린으로 이루어진 군, 및 상기 군의 임의의 구성원으로부터 유도된 잔기에서 선택된 피브리노겐/피브린-결합 잔기로 코팅된다. 바람직한 태양에서, 상기 피브린/피브리노겐-결합 잔기 및 상기 자기 입자는 공유 결합된다.
- [0072] 또한, 본 발명에 따른 장치는 (I) 피브린/피브리노겐-결합 잔기, 및 (II) 상기 표적 분자 또는 입자에 대해 유도된 물질-포착 잔기를 갖는 분자를 포함하는 첨가제를 포함할 수 있다. 따라서, 상기 표적 분자 또는 입자에 대해 유도된 상기 물질-포착 잔기는 상기 표적 분자 또는 입자를 특이적으로 인식하도록 고안된 항체, 핵산 및 앵타머를 포함하는 군에서 선택될 수 있다. 또한, 상기 물질-포착 잔기는 트롬빈, 피브로넥틴, 세균성 피브리노겐 결합 단백질, 조직-형 플라스미노겐 활성화인자 및 인테그린으로 이루어진 군, 및 상기 군의 임의의 구성원으로부터 유도된 잔기에서 선택된 피브린/피브리노겐-결합 잔기와 커플링되거나 결합될 수 있다. 바람직한 태양에서, 상기 피브린/피브리노겐-결합 잔기 및 상기 물질-포착 잔기는 공유 결합된다.
- [0073] 또한, 본 발명에 따른 장치는 피브리노겐 재조합 또는 변형 단백질을 포함하는 첨가제를 포함할 수 있다. 상기 재조합 또는 변형 피브리노겐 단백질은 장치내 사용중인 샘플에 함유된 특정 표적 분자 또는 입자와 상기 재조합 피브리노겐 단백질의 친화성 상호작용을 증대시키거나 억제하도록 특수하게 설계될 수 있다. 바람직한 태양에서, 장치내 사용중인 상기 재조합 단백질은 상기 표적 분자 또는 입자에 대해 유도된 포착 잔기 영역을 갖는 피브리노겐 융합 단백질이다. 또 다른 태양에서, 피브리노겐 융합 단백질은 또한 분해 부위를 포함한다. 이것은 뒤에서 기술하는 바와 같이, 용해 단계 동안 피브린 그물망으로부터 결합된 표적 분자 또는 입자를 회수하는데 특히 유용할 것이다. 바람직한 태양에서, 분해 부위는 효소적 또는 가수분해성 분해 부위이다. 가장 바람직한 태양에서, 분해 부위는 플라스민 및 매트릭스 메탈로프로테이나제로 이루어진 군에서 선택된 효소에 의해 절단되는 효소적 분해 부위이다.
- [0074] 사실상, 전술한 첨가제는 모두 샘플 수집 후에 샘플에 첨가되거나 장치내에 이미 통합될 수 있다. 후자의 경우에, 첨가제는 수성 완충액에 통합 가용화될 수 있다. 바람직하게, 상기 완충액은 물, 바람직하게는 40 mM 농도의 염화칼슘, 및 바람직하게는 75 mM 농도의 염화나트륨을 포함하며, 바람직하게는 7.3의 pH를 갖는다. 바람직한 태양에서, 상기 첨가제는 장치 사용 직전에 또는 장치내 샘플 도입시에 가용화될 수 있는 동결건조 형태로 장치내에 포함될 수 있다.
- [0075] 상기 개시된 샘플 수집용 장치는 작동시 표적 입자 또는 분자가 포획된 소 피브린 응괴의 형성을 야기할 것이다. 농축 계수 또는 농축률은 실제로 응괴 크기에 의해 결정된다. 그러므로, 상기 장치 구성 및 디자인은 초기 샘플 크기의 1/3 이상인 크기를 갖는 응괴의 생성을 야기하도록 하는 것이며, 바람직하게 상기 응괴 크기는 초기 샘플 부피의 1/10 이상이다. 또한, 본 발명에 따른 바람직한 태양에서는, 응괴가 수축되어 초기 샘플 부피의 1/50 내지 1/1000의 값에 이를 수 있는 크기를 갖는 소 펠릿을 더 형성한다.
- [0076] 본 발명에 따른 샘플 수집 장치는 표적 세포, 세포 성분, 세포 하위집단(진핵 및 원핵 둘 다), 세균, 바이러스, 기생충, 항원, 특이 항체, 독소, 단백질, 핵산 서열 등을 포함하는 군에서 선택될 수 있는 표적 분자 또는 입자를 분리 및 농축하기 위해 사용될 수 있다.
- [0077] 본 발명에 따른 샘플 수집 장치는 이미 정의된 바와 같은 다양한 샘플로부터 표적 분자 또는 입자를 분리 및 농축하기 위해 사용될 수 있다. 일반적으로, 여기에는 전혈, 혈액 유도체, 혈액 성분, 응고 인자 첨가제를 갖는 조성 샘플이 포함된다. 이와 관련하여, 본원에서 샘플은 식품, 임상, 환경 및 실험 샘플을 포함하여 검사되어야 하는 임의의 샘플 유형을 말할 수 있다.
- [0078] 실제로, 장치내 식별 코드는, 예를 들면, 장치의 코드 바, 색상, 크기 및 형태일 수 있다. 상기 식별 코드는 장치의 의도한 용도 및 적용의 참조 또는 지침으로 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 장치는, 사실상, 그의 조성, 장치가 사용될 샘플 유형, 및/또는 분리되어야 하는 표적에 따라 구별될 수 있다.
- [0079] 도 6은 본 발명에 따른 장치를 사용하는 샘플 처리의 한 예를 나타낸 것이다. 장치는 폐쇄 캡 및 식별 코드를 갖는 표준 반응 튜브일 수 있다. 상기 장치는, 예를 들면, 병원성 입자(세균, 바이러스 등) 또는 표적 분자(DNA, RNA 또는 단백질 등)와 같은 표적 입자 또는 분자의 존재에 대해 검사되어야 하는 유체 샘플을 수용하도록 설계된다. 본 발명의 장치는 또한 피브린 응괴 형성 및 표적 분리를 야기할 안정적인 시약 배합물을 포함할 것이다. 장치내 샘플 수집시, 피브리노겐 분자는 먼저 튜브 내부의 표적과 반응할 것이다. 두 번째 단계로,

피브리노겐은 피브린으로 전환되어, 중합 및 피브린 그물망내 상기 표적의 포획을 유도할 것이다. 세 번째 단계에서 피브린 그물망은 수축되어 혈액 용기내에 소 펠릿을 형성할 것이다. 펠릿이 형성될 때, 주위 샘플은 경사분리되어 상기 소 펠릿내에 포획된 표적들의 분리를 유도할 것이다. 최종 단계에서, 펠릿은 용해되어 소 부피의 조절 완충액내의 그의 피브린 포획물로부터 표적을 회수할 수 있다. 표적 포획/펠릿 형성 단계가, 예를 들면, 샘플 수송시 폐쇄 튜브에서 수행되는 동안, 펠릿 분리 및 용해는 최신 액체 처리 자동화 시스템을 이용하여 용이하게 수행될 수 있다. 상기 과정을 이용하여, 개시된 장치는 샘플을 수집하는 동시에 상기 샘플로부터 표적 입자 또는 분자를 효과적으로 분리 및 농축시켜, 필요한 샘플 처리 단계를 상당히 단순화시키고 또한 잠재적인 감염 위험성 및 오염 위험성의 감소를 가져올 것이다.

[0080] **실시예 1.** 혈액 성분 샘플: 혈소판-풍부 혈장(PRP) 샘플로부터 스타필로코커스 오레우스(SA) 세균의 포착. 500 μ l의 시트레이트화 PRP의 샘플을 100 CFU의 SA 세균과 혼합하였다. 10 UI/ml의 농도에서 5 μ l의 트롬빈을 첨가하고 배양하여, 소 펠릿(10 내지 20 μ l 크기)이 형성되었다. 상기와 같이 형성된 펠릿을 100 μ l 용해 완충액(0.01% 사포닌, 0.05% 트윈 및 0.05% 트리톤 X) 및 5 μ l의 프로테이나제 K(10 UI/ml)를 사용하여 용해시켜 용해 완충액중의 초기 혼합된 SA 세균 90 내지 100%를 회수하였다.

[0081] **실시예 2.** 혈액 성분 샘플: 혈소판-결핍 혈장(PPP) 샘플로부터 스타필로코커스 오레우스(SA) 세균의 포착. 500 μ l의 시트레이트화 PPP의 샘플을 100 CFU의 SA 세균과 혼합하고 실시예 1에서와 동일한 프로토콜을 사용하여 처리하였다. 동일한 회수 성능이 달성되었다. 그러나, 피브린 응괴의 크기는 PRP 경우와 비교할 때 더 컸다. 상기 차이는 PPP 샘플의 경우에 피브린 응괴의 낮은 수축에 기인하였다. 상기 수축은 대신 PRP 샘플내에 존재하는 혈소판 세포에 의해 이루어졌다.

[0082] **실시예 3.** 혈액 성분 샘플: 혈청 샘플로부터 스타필로코커스 오레우스(SA) 세균의 포착. 500 μ l의 시트레이트화 혈청의 샘플을 100 CFU의 SA 세균과 혼합하고 실시예 1에서와 동일한 프로토콜을 사용하여 처리하였다. 이 경우, 혈청 샘플내 피브리노겐의 결여로 인해 응괴/펠릿이 형성되지 않았다. 1.25 mg의 인간 피브리노겐을 혈청 샘플에 첨가함으로써, 피브린 응괴를 형성할 수 있었으며 이로써 혈청 샘플로부터 SA 세균을 분리할 수 있었다.

[0083] **실시예 4.** 전혈로부터 그람-양성균 및 진균의 포착. 100 CFU의 미생물과 혼합된 4 ml의 전혈로부터의 회수:

[0084] 미생물 균주/종	수율
[0085] 스트렙토코커스 피오게네스(<i>Streptococcus pyogenes</i>) M57	85%
[0086] 캔디다 알비칸스(<i>Candida albicans</i>)	92%
[0087] MRSE	83%
[0088] 엔테로코커스 페칼리스(<i>Enterococcus faecalis</i>)	70%

[0089] **실시예 5.** 조성 샘플로부터 세균의 특이적 포착. 1 ml의 조성 PBS 샘플을 샘플내 피브리노겐의 상이한 농도에서 스타필로코커스 오레우스(SA)(1000 CFU/ml) 또는 시트로박터 프로인디(*Citrobacter Freundi*)(18000 CFU/ml)와 혼합하였다:

피브리노겐(mg/ml)	2.5	1.25	0.625	0.312	0.156	0.08
펠릿 부피 (농축률)	~200 μ l (1/5)	→	→	→	→	<1 μ l (1/1000)
수율 MRSA MW2(%) (1000 cfu/ml)	100	100	100	100	100	100
시트로박터 프로인디(%) (1800 cfu/ml)	48	44	34.7	7.6	0	0

[0090]

[0091] 피브리노겐 농도를 감소시킴으로써, 펠릿 크기(즉, 농축률)를 감소시켰으며, 그로써 피브린 그물망 다공성 크기를 감소시켰다. 상기 조건에서, SA 포착률은 여전히 매우 효율적인 반면, 시트로박터 프로인디 포착률은 상당히 감소하였다. 상기 포착 효율의 차이는 SA 세균이 피브리노겐에 대해 강한 천연 친화성(그의 ClfA 표면 단백질을 통해)을 갖는 반면, 시트로박터 프로인디는 상기 친화성이 결여된다는 사실에 기인한다.

[0092] **실시예 6.** 조성 샘플로부터 세균의 특이적 포착. 스타필로코커스 ClfA 단백질로 표지된 그람-음성균 지질-A 표면 단백질에 대해 유도된 항체를 샘플에 추가로 첨가하는 변형하여 샘플로서 1 ml 조성 PBS내에 시트로박터

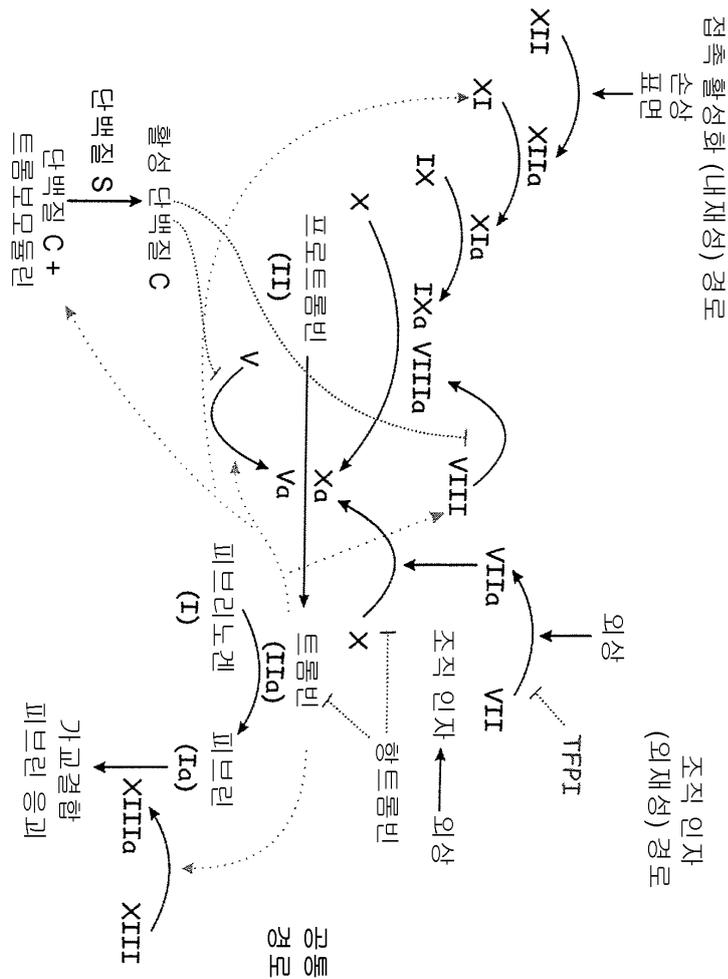
프로인디를 사용하여 실시예 5에서와 동일한 조건. 상기 조건에서, 도 3(b)에 도시된 바와 같이, 항체는 시트로박터 프로인디와 결합하여 피브리노겐에 대한 그의 효과적 결합 및 이어서 피브린 펠릿내에 그의 효과적인 분리(거의 100% 수율)를 가능하게 하였다.

[0093]

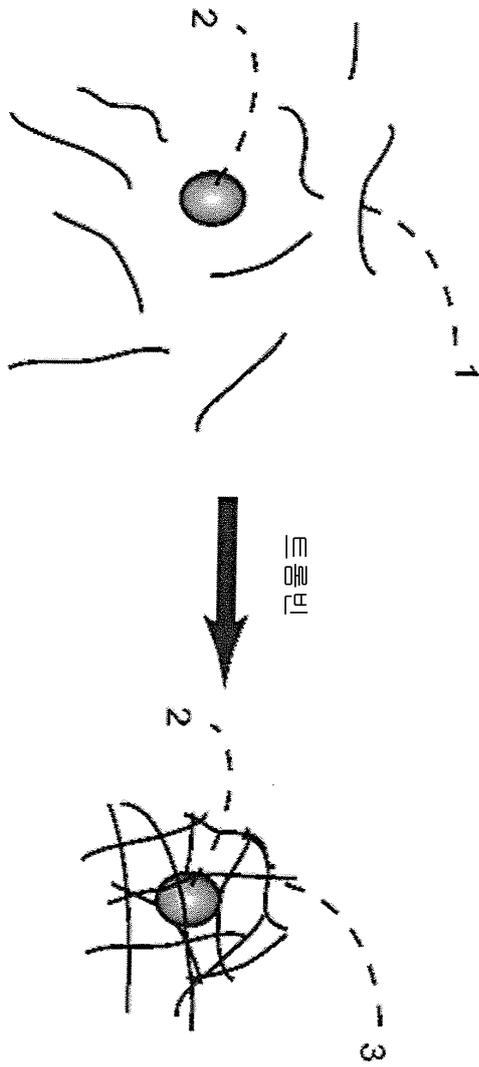
당해 분야에 숙련된 자라면 본 발명의 범위 및 진의로부터 벗어나지 않고 상기 기술한 바람직한 태양들의 다양한 변형 및 수정이 구성될 수 있음을 인지할 것이다. 그러므로, 첨부한 특허청구범위의 범주내에서, 본 발명은 본원에 특별히 기술된 바와 달리 실행될 수 있음을 이해해야 한다.

도면

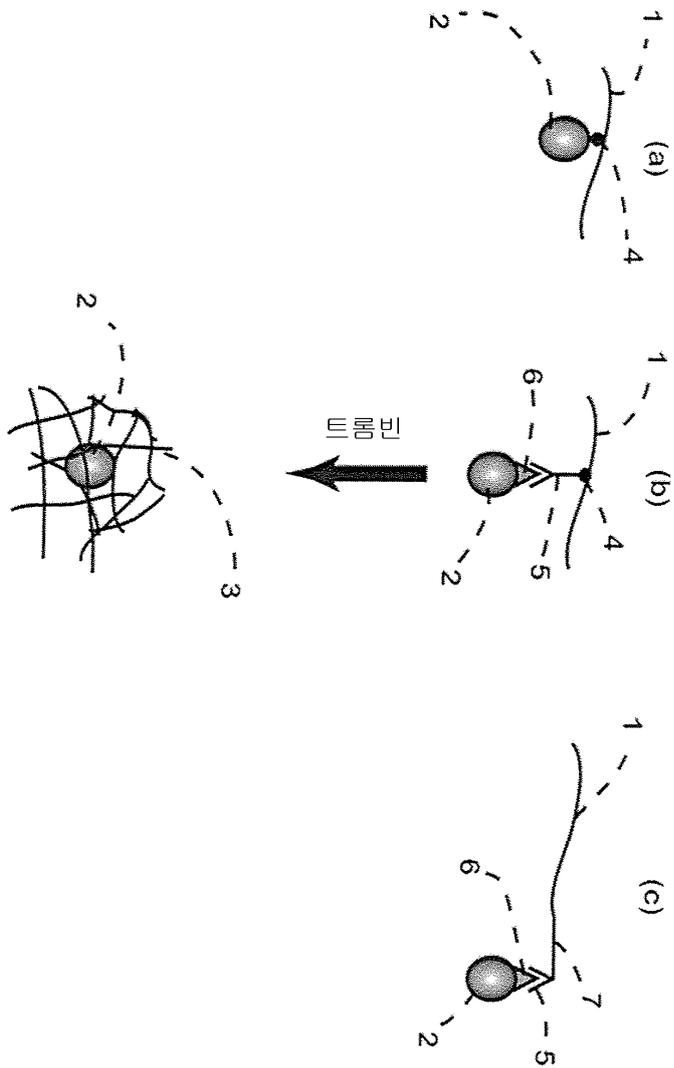
도면1



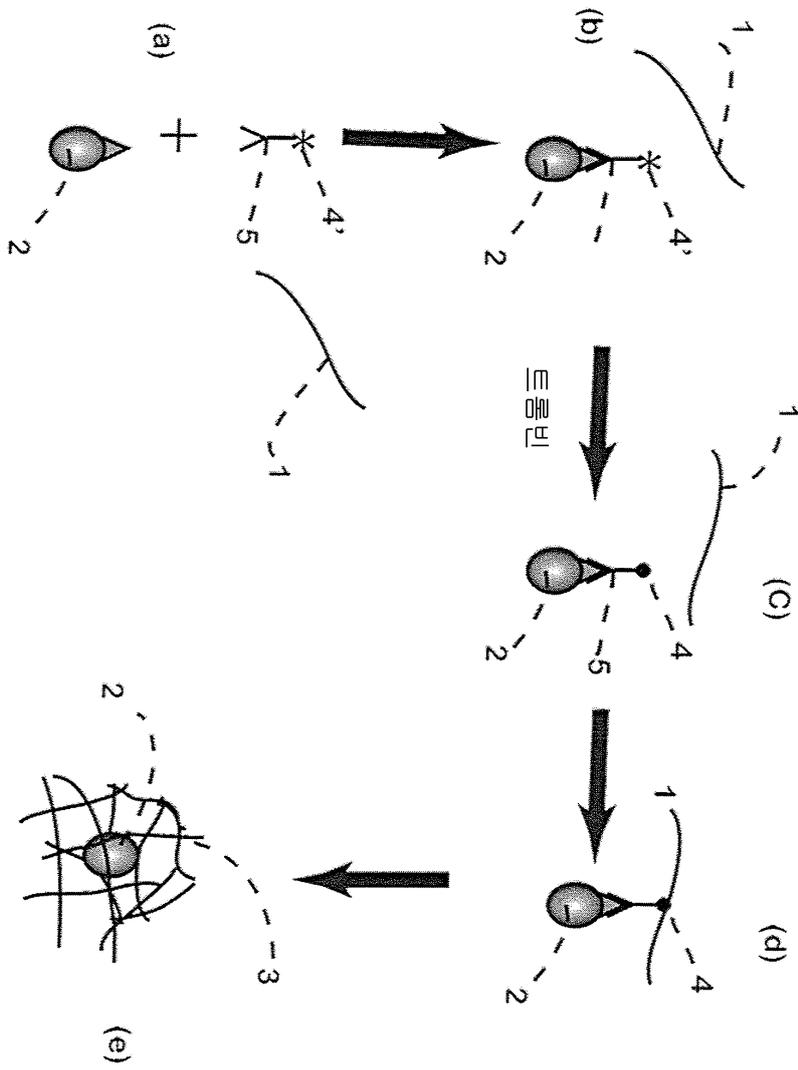
도면2



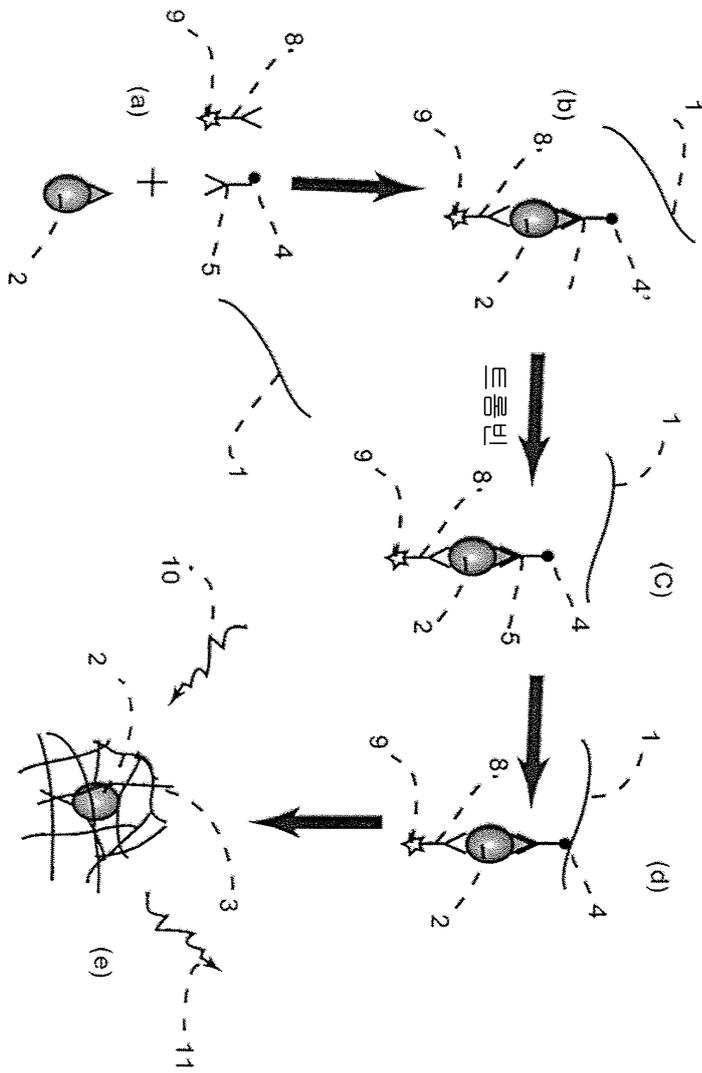
도면3



도면4



도면5



도면6

