(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년08월01일
(11) 등록번호 10-2561368
(24) 등록일자 2023년07월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/37 (2006.01) *G01N 33/579* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/37 (2013.01)
G01N 33/579 (2021.01)
(21) 출원번호 10-2019-7005917
(22) 출원일자(국제) 2017년08월02일
심사청구일자 2020년07월30일
(85) 번역문제출일자 2019년02월27일
(65) 공개번호 10-2019-0037284
(43) 공개일자 2019년04월05일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/045137
(87) 국제공개번호 WO 2018/026941
국제공개일자 2018년02월08일
(30) 우선권주장
62/370,493 2016년08월03일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌
Biochim Biophys Acta, 707(2): 217-225 (1982.10.05.)*
Chem Biol Interact, 249: 19-22 (2016.02.23.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
론자 워커스빌 아이엔씨.
미합중국 21793 메릴랜드주, 워커스빌, 빅스 포드 로드 8830
(72) 발명자
스팀보흐, 캔디스
미국, 펜실베이니아 17201, 체임버즈버그, 마티나 드라이브 336
헙스트, 데이비드, 에스.
미국, 메릴랜드 21702, 프레더릭, 애디론댁 드라이브 7196
니콜스, 케니스, 이.
미국, 웨스트버지니아 25419, 폴링 워터스, 크리스핀 레인 287
(74) 대리인
황이남

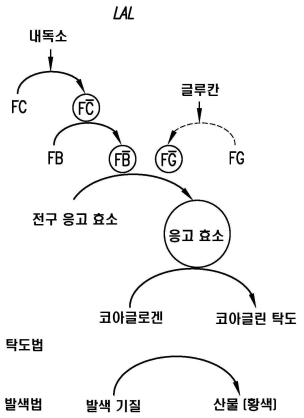
전체 청구항 수 : 총 17 항 심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 **실질적으로 코아굴로겐이 없는 리물루스 아메보사이트 라이세이트를 이용한 내독소 검출방법**

(57) 요 약

본 발명은 발색 분석을 이용하여 샘플에서 내독소를 검출하는 방법에 관한 것으로, 이 방법은: (a) 샘플을 리물루스 아메보사이트 라이세이트 (LAL) 및 발색 기질을 포함하는 시약과 접촉시키는 단계; 및 (b) 샘플에서 내독소의 존재하에 발색 기질의 변화로부터 기인하는 발색 효과를 측정하는 단계를 포함하고, LAL은 실질적으로 코아굴로겐이 없다. 본 발명은 또한 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL을 포함하는 조성물과 키트, 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2337/12 (2013.01)
G01N 2400/50 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

발색 분석을 이용하여 샘플에서 내독소를 검출하는 방법으로서,

a. 상기 샘플을 리물루스 아메보사이트 라이세이트(LAL) 및 발색 기질을 포함하는 시약과 접촉시키는 단계; 및

b. 샘플에서 내독소의 존재하에 발색 기질의 변화로부터 기인하는 발색 효과를 측정하는 단계를 포함하고,

상기 LAL은 단백질 염색을 한 SDS-PAGE에 의해 측정하고 LAL 내의 총 단백질에 대해 5% 미만(wt/wt)의 코아굴로겐을 갖는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 발색 기질의 변화는 효소 반응으로 인해 발생하고, 상기 효소 반응은 폴리펩티드로부터 발색단의 절단인 방법.

청구항 3

제 1항 또는 제2항에 있어서, 상기 시약은 수성 액체인 방법.

청구항 4

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 LAL, 발색기질 또는 둘다는 동결건조된 다음, 샘플과 접촉하기 전에 재구성되는 방법.

청구항 5

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 샘플은 비경구 제형, 백신, 항생제, 치료용 단백질, 치료용 핵산, 치료용 항체 및 생물학적 산물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 6

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 LAL은 단백질 염색을 한 SDS-PAGE에 의해 측정했을 때, LAL 내의 전체 단백질에 대해 2%(wt/wt) 미만, 또는 0.5%(wt/wt) 미만의 코아굴로겐을 포함하는 방법.

청구항 7

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 발색 기질은 Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA인 방법.

청구항 8

발색 분석을 이용하여 생물학적 샘플에서 내독소를 검출하는 방법으로서,

a. 생물학적 샘플을 리물루스 아메보사이트 라이세이트(LAL) 및 Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA를 포함하는 수성 시약과 접촉시키는 단계; 및

b. 샘플에서 내독소의 존재하에 Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA로부터 pNA의 효소적 절단으로 인한 흡광도의 변화를 405nm에서 측정하는 단계를 포함하고,

상기 LAL은 단백질 염색을 한 SDS-PAGE에 의해 측정하고 LAL 내의 총 단백질에 대해 5% 미만(wt/wt)의 코아굴로겐을 갖는 방법.

청구항 9

a. 리물루스 아메보사이트 라이세이트(LAL)로서, 상기 LAL은 단백질 염색을 한 SDS-PAGE에 의해 측정하고 LAL 내의 총 단백질에 대해 5% 미만(wt/wt)의 코아굴로겐을 갖는, LAL;

b. 발색 기질; 및

c. LAL 및 발색 기질을 사용하여 내독소를 검출하기 위한 사용설명서를 포함하는 키트.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 발색 기질은 Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA인 키트.

청구항 11

단백질 염색을 한 SDS-PAGE에 의해 측정하고 LAL 내의 총 단백질에 대해 5% 미만(wt/wt)의 코아굴로겐을 갖는 리물루스 아메보사이트 라이세이트(LAL)를 제조하는 방법으로서,

LAL 및 완충액을 포함하는 조성물을 처리하는 단계에서, 상기 LAL은 코아굴로겐을 포함하고, 20 kDa 내지 50 kDa 필터를 사용하여 접선방향 유동 여과(TFF)를 실시함으로써, 단백질 염색을 한 SDS-PAGE에 의해 측정하고 LAL 내의 총 단백질에 대해 5% 미만(wt/wt)의 코아굴로겐을 갖는 LAL을 단리하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 TFF는 300 ml/분 내지 600 ml/분의 유속으로 수행되는 방법.

청구항 13

제 11항에 있어서, 상기 TFF는 350 ml/분 내지 500 ml/분의 유속으로 수행되는 방법.

청구항 14

제 11항 내지 제 13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 TFF 필터는 개질된 폴리에테르설폰(mPES) 막 필터, 폴리술폰(PS) 막 필터, 또는 폴리에테르술폰(PES) 막 필터인 방법.

청구항 15

제 11항 내지 제 13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 완충액은 트리스 완충액 또는 MES 완충액인 방법.

청구항 16

제 15항에 있어서, 상기 완충액은 6.0 내지 9.0의 pH를 갖는 방법.

청구항 17

제 16항에 있어서, 상기 완충액은 7.0 내지 8.0의 pH를 갖는 방법.

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 ASCII 형식으로 전자적으로 제출되었고, 본원에서 그 전체를 참조로 인용하는 서열목록을 포함한다. 2017년 9월 5일에 만들어진 ASCII 사본은 0132-0023WO1_SL.txt라 명명되고, 크기는 1,055 바이트이다.

본 발명은 발색 분석을 이용하여 샘플에서 내독소(endotoxin)를 검출하는 방법에 관한 것으로, 이 방법은: (a) 샘플을 리물루스 아메보사이트 라이세이트 (LAL) 및 발색 기질을 포함하는 시약과 접촉시키는 단계; 및 (b) 샘플에서 내독소의 존재하에 발색 기질의 변화로부터 기인하는 발색 효과를 측정하는 단계를 포함하고, LAL은 실질적으로 코아굴로겐(coagulogen)이 없다. 또한, 본 발명은 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL을 포함하는 조성물과 키트, 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 그람 음성균 내독소는 정맥 내에 도입될 경우, 열을 유발하는 생물학적 발열원이다. 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS)라고도 공지된 내독소는 살모넬라균, 대장균, 이질균 및 수막구균 같은 그람 음성균의 외막에서 발견된다. 내독소가 촉발하는 독성 메커니즘은 지질다당류의 지질 분획에 의해 유발된다. 예를 들어, 유기체 내에서 세균의 용해가 발생하는 경우, 혈류로 들어가는 지질의 존재하에 반응은 보체계(complement system)의 활성화를 통해 일어날 수 있다. 이 지질 분획은 인터루킨 1 및 8 같은 여러 상이한 사이토킨의 방출을 야기한다. 또한, 종양 괴사 인자의 생성도 활성화될 수 있다. 생성된 감염은 염증 과정과 관련이 있으며, 감염된 유기체에 큰 위험을 초래할 수 있다. 인터루킨 1은 유기체가 면역 반응으로서 염증에 대항하여 방출하는 일련의 사이토킨이다. 이 신호는 감염이 발생한 곳으로 호중구의 이동을 야기하여 주화성을 초래한다. 이것은 식균 작용의 발생을 촉진한다. 그러나, 일부 경우에는, 개인의 면역계 상태와 감염 수준에 따라, 패혈증에 의해 유발되는 위험과 함께, 내독소는 일반화된 패혈증을 야기할 수 있다. 그람 음성균이 고등 포유 동물에서 전신 감염에 의한 다중 장기 부전 및 심지어 사망을 초래한 많은 경우가 있음이 공지되어 있다. 내독소와 관련된 부작용으로 인해, 제약 산업 및 의료계에서는 내독소의 조기에 민감하게 검출하는 것이 중요하다.

[0003] 리물루스 아메보사이트 라이세이트(Limulus amebocyte lysate, LAL) 시험은 내독소 검출 방법으로서 1970년대에 상업적으로 도입되었다. LAL은 투구게 (Limulus Polyphemus)의 혈액 세포, 또는 유주세포에서 유래된다. 원래의 LAL 시험은 추적 수준의 내독소에 의해 촉발되는 세린 프로테아제의 캐스케이드를 구성하였고, 반응 종료시에 젤 응고가 절정에 달했다. 일반적으로 자이모겐(zymogen)으로서 존재하는 인자 C는 이 응고 캐스케이드의 프라이머이다. 생체내에서 인자 C는 투구게에게 그람 음성 침입자의 존재를 알려주는 완벽한 바이오센서다. 지혈 종료점에서는 침입자를 포획하여, 이를 사멸시키고 추가 감염을 제한한다.

[0004] LAL 시험은 여러 상이한 방법을 사용하도록 변형하여 내독소에 대한 유주세포의 반응을 측정할 수 있다. 이들 방법은 소위 젤-응고법, 탁도법 및 발색법을 포함한다. 이들 LAL 시험은 국제 약전에서 의약품 생산에 사용된 원료와 최종 산물 모두에서 세균 독소를 검출하는 방법으로서 권장된다. 또한, 이들 시험은 화장품 산업 및 식품 생산에도 유용하며, 현재는 파이로젠 검출을 위해 FDA (식품 의약국)에서 권장하는 방법이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 실질적으로 코아굴로겐이 없는 리물루스 아메보사이트 라이세이트 (LAL)를 포함하는 발색 분석을 이용하여 샘플에서 내독소를 검출하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명의 구현예는 발색 분석을 이용하여 샘플에서 내독소를 검출하는 방법에 관한 것으로, 이 방법은: (a) 샘플을 리물루스 아메보사이트 라이세이트(LAL) 및 발색 기질을 포함하는 시약과 접촉시키는 단계; 및 (b) 샘플에서 내독소의 존재하에 발색 기질의 변화로부터 기인하는 발색 효과를 측정하는 단계를 포함하고, LAL은 실질적으로 코아굴로겐이 없다.

[0007] 일부 구현예에서, 발색 기질은 3개 이상의 아미노산에 공유 결합된 p-니트로아닐린이다. 일부 구현예에서, 발색 기질은 Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA(서열번호: 1)이다. 일부 구현예에서, 발색 기질의 변화는 효소 반응으로 인해 발생한다. 일부 구현예에서, 효소 반응은 폴리펩티드로부터의 발색단의 절단이다. 일부 구현예에서, 발색 효과는 380 nm 내지 420 nm에서 흡광도를 검출함으로써 측정된다. 일부 구현예에서, 발색 효과는 405 nm에서 흡광도를 검출함으로써 측정된다.

[0008] 일부 구현예에서, 시약은 액체이다. 일부 구현예에서, 시약은 수성 액체이다. 일부 구현예에서, 시약은 동결건조된 다음, 샘플과 접촉하기 전에 수성 액체에서 재구성된다.

[0009] 일부 구현예에서, LAL은 동결건조된 다음, 샘플과 접촉하기 전에 재구성된다. 일부 구현예에서, 발색 기질은 동결건조된 다음, 샘플과 접촉하기 전에 재구성된다.

[0010] 일부 구현예에서, 샘플은 생물학적 샘플이다. 일부 구현예에서, 샘플은 비경구 투여 형태, 백신, 항생제, 치료용 단백질, 치료용 핵산, 치료용 항체 및 생물학적 산물로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL은 SDS-PAGE에 의해 측정되고 웨스턴 블롯에 의해 확인했을 때, LAL 내의 전체 단백질에 대해 5% (wt/wt) 미만의 코아굴로겐을 갖는다. 일부 구현예에서, 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL은 LAL 내의 전체 단백질에 대해 2% (wt/wt) 미만의 코아굴로겐을 갖는다. 일부 구현예에서, 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL은 LAL 내의 전체 단백질에 대해 0.5% (wt/wt) 미만의 코아굴로겐을 갖는다. 일부 구현예에서, 발색 분석은 단일 큐벳 분광법, 다중 큐벳 분광법 또는 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 수행한다.

[0011] 일부 구현예에서, 상기 방법은 발색 효과를 표준과 비교하여 샘플에서 내독소의 양을 결정샘플에서 내독소의 양을 결정하는 단계를 추가로 포함한다.

[0012] 일부 구현예에서, 본 발명은 발색 분석을 이용하여 생물학적 샘플에서 내독소를 검출하는 방법에 관한 것으로, 이 방법은: (a) 생물학적 샘플을 리물루스 아메보사이트 라이세이트 (LAL) 및 Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA(서열번호: 1)을 포함하는 수성 시약과 접촉시키는 단계; 및 (b) 샘플에서 내독소의 존재하에 Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA(서열번호: 1)로부터 pNA의 효소적 절단으로 인한 흡광도의 변화를 405nm에서 측정하는 단계를 포함하고, LAL은 실질적으로 코아굴로겐이 없다.

[0013] 일부 구현예에서, 본 발명의 방법은 증가된 감도를 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 0.001 EU/mL 초과의 내독소의 감도를 갖는다.

[0014] 일부 구현예에서, 본 발명의 방법은 리물루스 아메보사이트 라이세이트 (LAL) 및 발색 기질을 포함하고, LAL은 실질적으로 코아굴로겐이 없는 조성물에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 발색 기질은 Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA(서열번호: 1)이다. 일부 구현예에서, LAL 및 발색 기질은 동결건조된다. 일부 구현예에서, LAL 및 발색 기질은 수용액에 존재한다.

[0015] 일부 구현예에서, 본 발명의 방법은 (a) 리물루스 아메보사이트 라이세이트 (LAL)로, LAL은 실질적으로 코아굴로겐이 없는, LAL; (b) 발색 기질; 및 (c) LAL 및 발색 기질을 사용하여 내독소를 검출하기 위한 사용설명서를 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0016] 일부 구현예에서, LAL은 동결건조된다. 일부 구현예에서, LAL은 수용액에 존재한다. 일부 구현예에서, LAL 및 발색 기질은 단일 용기에 존재한다. 일부 구현예에서, 키트는 LAL을 포함하는 멸균 용기를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 멸균 용기는 멸균 바이알이다. 일부 구현예에서, 키트는 대조용 표준 내독소를 추가로 포함한다.

[0017] 일부 구현예에서, 본 발명은 실질적으로 코아굴로겐이 없는 리물루스 아메보사이트 라이세이트 (LAL)를 제조하는 방법에 관한 것으로, 이 방법은: (a) LAL을 포함하는 조성물을 제공하는 단계로, LAL은 코아굴로겐을 포함하는, 단계; (b) 완충액을 조절하는 단계; 및 (c) 20 kDa 내지 50 kDa 필터를 사용하여 (b)의 조성물에 접선방향 유동 여과를 실시함으로써, 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL을 단리하는 단계를 포함한다.

[0018] 일부 구현예에서, TFF는 350 ml/분 내지 500 ml/분의 유속으로 실행된다. 일부 구현예에서, 완충액은 Tris 완충액 또는 MES 완충액이다. 일부 구현예에서, 완충액은 약 7.0 내지 8.0의 pH를 갖는다. 일부 실시예에서, 필터는 접선방향 유동 필터(tangential flow filtration, TFF)이다. 일부 구현예에서, TFF 필터는 개질된 폴리에테르설폰(modified polyethersulfone, mPES) 막 필터이다.

[0019] 본 기술의 전술한 및 기타 특징과 양태는 다음의 실시예에 대한 설명으로부터, 그리고 첨부한 도면에 도시된 바

와 같이, 더 잘 이해할 수 있다. 본 명세서에 통합되어 명세서의 일부를 형성하는 첨부 도면은, 추가로 본 기술의 원리를 나타내는 역할을 한다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 탁도 및 발색 분석점을 포함하는 내독소-관련 캐스케이드를 나타내는 개략도이다.

도 2는 정규 LAL을 포함하는 샘플 대 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL을 포함하는 샘플을 비교하는 표로, 다중 개시 밀리 광학 밀도 (milli optical density, mOD) 값에서 분리의 증가를 도시한다. EU/ml=밀리리터당 내독소 단위.

도 3은 반응 속도에 대한 표준 LAL (L)과 zwittergent (Z) 간 농도의 효과를 비교하는 표다. L과 Z의 농도를 증가시키면, 각 표준의 반응 속도가 증가한다. 반응 속도가 증가함에 따라, 블랭크와 최저 표준 (0.005 EU/mL) 사이에서 분리가 없어진다.

도 4는 반응 속도에 대한 실질적으로 코아굴로겐이 없는LAN (L-co)와 zwittergent (Z) 간 농도의 효과를 비교하는 표다. L-co 및 Z의 농도를 증가시키면, 각 표준의 반응 속도가 증가한다. 모든 제형에 대해 적어도 200 초의 분리가 유지된다. 증가된 zwittergent 로 제형화된 L-co는 허용 가능한 분리에 의해 0.001 EU/ml의 감도를 달성하였다 (데이터는 도시하지 않음).

도 5는 200 mOD (도 5a) 및 50 mOD(도 5b)에서 L-co 및 발색 기질에 대한 다양한 농도의 반응시간을 나타내는 그래프다. 도 5c는 L을 사용하는 분석법에 대해 L-co를 사용하는 분석의 증가된 감도, 반응시간 및 분리를 요약한 표다.

도 6a는 50 mOD (분리 범위: 732 초 내지 211 초)에서 70%의 L-co 제제와 30%의 발색 기질을 사용하는 L-co의 3개의 개별 로트의 반응시간을 나타낸 표다.

도 7a는 접선방향 유동 여과 (TFF) (30 kDa)를 실시한 LAL 샘플 및 환원 조건하에서 3 회 실시한 TFF 산물의 SDS-PAGE 젤 분석을 나타낸다. 세 번째 실행 후, 젤 응고가 관찰되지 않는다. 젤 응고 데이터는 고체 젤 응고의 경우 "+", 젤 응고가 없는 경우 "-", 부드러운 젤 응고의 경우 "-/+"로 표시하였다. 도 7b는 환원 조건하에서 3 회 실행한 접선방향 유동 여과 (30 kDa) 산물의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸다. 항체 희석은: α-코아굴로겐 1:1,000, α-전구 응고 효소 (proclotting enzyme) 1:10,000, α-스시(sushi) 3 1:100이었다.

도 8a는 α-코아굴로겐을 사용한 웨스턴 블롯 분석을 이용하는 코아굴로겐의 정량화를 나타낸다. 도 8b는 표준 곡선으로 나타낸 도 8a의 데이터다. 이 데이터는 총 LAL 단백질의 약 33%가 코아굴로겐임을 시사한다.

도 9는 코아굴로겐의 SDS-PAGE이다. 환원 조건하에서 33회 실행시, 3개의 코아굴로겐 밴드가 존재한다. 단백질의 순차 배열을 통해 3개의 밴드가 코아굴로겐 단편임을 확인하였다. A=코아굴로겐 1: pos 21 GDPNVPTCLC(서열번호: 2); B=코아굴로겐2: pos 39 KVIVSQEKTD(서열번호: 3); C=코아굴로겐 3: pos 67 GFSIFGGHPA(서열 번호: 4).

도 10은 50 mOD에서 10 주에 걸쳐 결정된 L-co의 2개의 개별 로트의 안정성을 나타낸다. 이 데이터는 L-co가 10 주 동안 안정했다는 것을 시사한다.

도 11은 Lonza (론자), Charles River Laboratories International (샤를스 리버 래보러터리 인터내셔널), 및 Associates of Cape Cod (ACC) (어소시에이트스 오브 케이프 코드)사로부터 상업적으로 입수할 수 있는 LAL에서 코아굴로겐의 존재를 나타내는 것으로, 이는 단백질 염색 및 웨스턴 블롯 분석으로 SDS-PAGE를 이용하여 시험하였다. 이것은 3개의 공급 업체 모두로부터의 LAL이 코아굴로겐을 함유하고 있음을 확인하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본원에 도시되고 설명된 특정 구현들은 예시이며, 어떤 식으로든 응용의 범위를 달리 제한하지 않음을 이해해야 한다.

[0022] 본원에서 언급하는 공개된 특허, 특허 출원, 웹사이트, 회사명 및 과학문헌은, 각각이 구체적으로 및 개별적으로 참조로서 인용되는 것을 나타낸 바와 동일한 정도로, 본원에서 그 전체를 참조로 인용한다. 본원에서 인용하는 임의의 참조문헌과 본 명세서의 특정 교시 간의 어떤 상충은 후자를 위해 해결되어야 한다. 마찬가지로, 예술적으로 이해되는 단어나 구의 정의와 본 명세서에서 구체적으로 교시하는 단어나 구의 정의 간의 어떤 상충은

후자를 위해 해결되어야 한다.

[0023] 본 명세서에서 사용한 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 내용을 명확하게 달리 지시하지 않는 한, 그들이 지칭하는 용어의 복수 형태도 포함한다. 용어 "약"은 대략적으로, 대강 또는 그 부근을 의미하는 것으로 본원에서 사용된다. 용어 "약"을 수치 범위와 함께 사용하는 경우, 제시된 수치 값의 위와 아래의 경계를 확장함으로써 범위를 수정한다. 일반적으로, 용어 "약"은 본원에서 20%의 편차로 표시된 값의 위와 아래의 값을 수정하는데 사용된다.

[0024] 본원에서 사용한 기술적 및 과학적인 용어는 달리 정의하지 않는 한, 본 출원이 속하는 기술 분야의 통상적인 지식을 가진 자 ('당업자')가 일반적으로 이해하는 의미를 갖는다. 본원에서는 당업자에게 공지된 다양한 방법 및 재료에 대해 지칭한다. 본원에서 인용한 임의 문헌의 개시는, 본원에서 그 전체를 참조로 인용한다.

[0025] 일부 구현예에서, 본 발명은 내독소를 검출하는 방법에 관한 것이다. 용어 "내독소"는 일반적으로, 그람 음성균의 외막과 관련된 지질다당류 복합체를 지칭한다. 용어 "내독소"는 종종, 세포 관련 세균 독소를 지칭하기 위해 사용한다. 내독소는 세포 관련 지질다당류를 지칭하지만, 외독소는 세균에 의해 분비되는 독소를 지칭하며, 주로 자연에서는 폴리펩티드이다.

[0026] 내독소의 생물학적 활성은 지질다당류 (LPS)와 관련이 있다. 지질다당류는 그람 음성균의 세포벽에서 외막의 일부이다. 지질다당류는 유기체가 병원성이든 아니든 그람 음성균과 언제나 관련이 있다. 독성은 지질 성분 (지질 A)과 관련이 있으며, 이는 다당류 성분과 관련이 있다. 그람 음성균의 세포벽 항원 (O 항원)은 LPS의 다당류 성분이다. 또한, LPS는 동물에서 다양한 염증 반응을 유도할 수 있다.

[0027] 동물 내에서 그람 음성균은 성장하는 동안 소량의 내독소를 방출할 수 있다. 이것은 자연 면역의 자극을 가져올 수 있다. 소량의 내독소가 실험실에서 자라나는 어린 배양균에 의해 용해될 수 있는 형태로 방출될 수 있음이 공지되어 있다. 그러나 대부분의 경우, 내독소는 유기체의 분해시까지 세포벽과 관련이 있다. 세균 유기체의 분해는 자가 분해, 보체 및 리소자임에 의해 매개되는 외부 용해 및 세균 세포의 식균성 소화로 인해 발생할 수 있다. 세균 내독소는 인간의 내장에 풍부하다. 내독소의 농도 상승은 일부 대사 증후군 질환을 포함한 다수의 병적 상태와 관련이 있다. 대사 증후군 질병은, 예를 들어 아테롬성 동맥경화증, 인슐린 내성, 진성 당뇨병 및 비만을 포함한다. 또한, 내독소 수준의 증가 역시 지방간 질환 및 크론병과 관련이 있다. 또한, 내독소는 증가된 수준으로 존재하는 경우, 위장관(GI tract) 밖으로 새어 나올 수도 있다. 내독소는 강력한 염증 항원이며, 내독소의 누출은 전신 염증 반응을 가져올 수 있다.

[0028] 전형적인 세균의 외독소와 비교하여, 내독소는 효소적으로 작용하지 않으므로, 내독소는 그들의 작용이 덜 강력하고 덜 특이적이다. 내독소는 내열성이며 (30 분간 끓어도 내독소가 불안정하지 않음), 초산화물, 과산화물 및 차아염소산염 같은 강력한 산화제가 이들을 중화시키는 것으로 보고되었다. 이들은 강력한 산화제이므로, 특히 내독소를 중화시키는 치료용 조성물에 이를 적용할 수 없다.

[0029] 본 발명의 내독소는 그람 음성균에서 유래될 수 있다. 예시적인 그람 음성균은 제한되지 않으나, 에쉐리치아 종(Escherichia spp.), 시겔라 종(Shigella spp.), 살모넬라 종(Salmonella spp.), 캄필로박터 종(Campylobacter spp.), 네이세리아 종(Neisseria spp.), 헤모필루스 종(Haemophilus spp.), 아에로모나스 종(Aeromonas spp.), 프란시셀라 종(Francisella spp.), 예르시니아 종(Yersinia spp.), 크렙시엘라 종(Klebsiella spp.), 보데텔라 종(Bordetella spp.), 레지오넬라 종(Legionella spp.), 코리네박테리아 종 (Corynebacteria spp.), 시트로박터 종 (Citrobacter spp.), 클라미디아 종 (Chlamydia spp.), 브루셀라 종 (Brucella spp.), 슈도모나스 종 (Pseudomonas spp.), 헬리코박터 종(Helicobacter spp.) 및 비브리오 종(Vibrio spp.)을 포함한다. 또한, 그람 음성균은 엔테로박테리세아(Enterobacteriaceae), 슈도모나다세아(Pseudomonadaceae), 나이세리아지아(Neisseriaceae), 베일로네라세아(Veillonellaceae), 박테로이드세아(Bacteroidaceae), 비브리오나세아(Vibrionaceae), 파스테우렐라세아(Pasteurellaceae) 및 푸소박테라아세아(Fusobacteriaceae) 패밀리에 속하는 세균일 수 있다. 일부 구현예에서, 내독소는 살모넬라 또는 에쉐리치아 종에서 유래된다.

[0030] 본원에서 사용한 바와 같이, 용어 "내독소 활성"은 발열성 및 패혈성 쇼크를 포함하는 독성을 유발할 수 있는 그람 음성균의 부분을 지칭한다. 내독소로 인한 독성 작용은 그람 음성균의 외막에 존재하거나 그로부터 유래된 지질다당류 분자의 글리코실화 지질 A 부분과 관련이 있는 것으로 밝혀졌다.

[0031] 용어 "지질다당류 (LPS)"는 공유 결합에 의해 결합된 지질 및 다당류 (글리코포스포릴피드)로 이루어지는 큰 분자를 지칭한다. LPS는 3개의 부분, 즉: 1) O-항원; 2) 코어 올리고당, 및 3) 지질 A을 포함한다. O-항원은 코어 올리고당에 부착된 반복적인 글리칸 폴리머(glycan polymer)이며, LPS 분자의 최외측 도메인을 포함한다. 코어

올리고당은 지질 A에 직접 부착되며, 통상적으로 헵토오스 및 3-데옥시-D-만노옥툴로손산 (KDO, 케토-데옥시옥툴로소네이트로도 공지됨) 같은 당을 함유한다. 지질 A는 다중 지방산에 연결되는 인산화된 글루코사민 이당류이다. 지방산은 LPS를 세균막에 고정시키고, 나머지 LPS는 세포 표면으로부터 돌출된다. LPS가 돌연변이되거나 제거되면, 세균성 사망을 가져올 수 있다.

[0032] 내독소 활성은 LPS의 지질 A 도메인 부분에 있다. 세균 세포가 면역계에 의해 용해되는 경우, 지질 A를 함유하는 막의 단편이 순환계로 방출되어, 발열 (발열성), 설사 및 잠재적으로 치명적인 쇼크 (내독성 또는 패혈성 쇼크라고 부름)를 유발한다. LPS의 독성은 포유류 면역계의 B 세포 및 대식 세포와의 상호 작용을 통해서 지질 A에 의해 발현되며, 숙주에 치명적인 영향을 줄 수 있는 전염증성 사이토킨, 주로 종양 괴사 인자 (tumor necrosis factor, TNF)의 분비를 유도하는 과정이다. 또한, 지질 A는 "시험관내" 인간 T-림프구 (Th-1) 뿐만 아니라, "생체내" 쥐의 CD4+ 및 CD8+ T-세포를 활성화하여, 숙주의 면역계가 LPS의 가변 크기 탄수화물 사슬 (carbohydrate chain)에 대한 특이한 기억촉진 IgG 항체를 마운트할 수 있게 한다. 이러한 기반 위에, LPS는 최근 "생체내" T-세포 의존 항원으로서 인식되었다. 따라서, 일부 구현예에서, 본 발명의 방법은 지질 A의 검출에 관한 것이다.

[0033] 일부 구현예에서, 내독소는 발색 분석을 이용하여 검출된다. 본원에서 사용한 바와 같이, 발색 분석은 내독소의 존재하에 발색 기질 (즉, 색원체)에서 흡광도의 변화를 측정하거나 검출한다. 일부 구현예에서, 발색 기질에서 흡광도의 변화는 효소 활성에 의한 것이다. 일부 구현예에서, 용어 "발색 기질"은 효소 활성 전후의 기질을 지칭한다. 예를 들어, 발색 기질이 효소에 의해 절단되어 펩티드와 발색단을 가져오는 펩티드-발색단인 경우, 용어 "발색 기질"은 펩티드-발색단, 절단된 펩티드 및 방출 발색단을 지칭한다. 일부 구현예에서, 합성 색소를 사용할 수 있다. 일부 구현예에서, 자연적으로 생성된 색원체를 사용할 수 있다. 일부 구현예에서, 발색 기질은 합성 펩티드다. 일부 구현예에서, 기질들은 매우 민감하며, 즉 이들은 매우 낮은 효소 활성을 검출할 수 있다.

[0034] 낮은 효소 농도를 검출하는 발색 기질을 포함하는 시약의 능력은 예를 들어, 연구 또는 품질 관리 과정에서, 내독소와 관련된 특정 효소 활성의 존재를 탐색하는 것을 유용하게 만드는 것이다. 때때로 특정 효소 제제에 대한 그들의 반응에서 천연 (즉, 효소에 대한 천연 기질)과 합성 발색 기질 간의 일치성이 부족하다. 일부 구현예에서, 발색 기질은 덜 선택적이며, 즉 천연 기질과 비교하여 관련 효소에 대한 그의 반응성에서 식별력이 적다.

[0035] 용어 "발색 기질"은 내독소의 존재하에 그의 흡광도 스펙트럼을 변화시키는, 가령 색의 변화 분석에서, 기질, 가령 화합물 또는 폴리펩티드를 지칭한다. 발색 기질은 (i) 특정 파장에서 흡수 및/또는 (ii) 흡수하지 않는 기질을 지칭한다. 따라서, 가령, 본 발명에 따르면, 발색 기질은 본질적으로 특정 파장에서 흡수하지 않을 (가령, 시각적 파장에서 흡수하지 않을) 수 있고, 이어서 내독소의 존재하에 특정 파장 (가령, 시각적 파장)에서 흡수하기 시작할 수 있다. 대안적으로, 가령, 발색 기질은 특정 파장에서 원래 흡수(가령, 시각적 파장에서 흡수)한 다음, 내독소의 존재하에 특정 파장에서 흡수하지 않을(가령, 시각적 파장에서 흡수하지 않을) 수 있다. 일부 구현예에서, 발색 기질은 내독소의 부재하에 주어진 파장에서 흡수한 다음, 내독소의 존재하에 상이한 파장에서 흡수할 수 있다. 하나 이상의 특정 파장에서, 흡광도 특성, 즉 발색 효과의 변화는 내독소의 존재와 상호 관련이 있을 수 있다.

[0036] 일부 구현예에서, 발색 기질은 발색성 펩티드 기질이다. 일부 구현예에서, 발색성 펩티드 기질은 초기에 무색이다. 일부 구현예에서, 발색성 펩티드 기질은 초기에 색, 가령 시각적 스펙트럼 (약 390 내지 700 nm)에서 색을 갖는다. 일부 구현예에서, 발색성 펩티드 기질이 효소에 의해 절단되는 경우, 색 변화가 발생, 즉 발색단이 방출되어, 생성된 산물에서 색 변화를 유발할 수 있다. 일부 구현예에서, 절단은, 비절단 기질의 광학 특성과는 다르며, 분광 광도계로 측정할 수 있는 산물의 광학 특성을 변화시킨다. 펩티드 기질에 결합될 수 있는 발색성기의 비제한적인 예로는, 파라-니트로아닐린 (para-nitroaniline, pNA), 5-아미노-2-니트로벤조산 (5-amino-2-nitrobenzoic acid, ANBA), 7-아미노-4-메톡시쿠마린 (7-amino-4-methoxycoumarin, ANC), 퀴노닐아미드 (quinonylamide, QUA), 디메틸 5-아미노이소프탈레이트 (dimethyl 5-aminoisophthalate, DPA) 및 그의 유도체가 있다. 형광성 기질은, 제한없이, Z-Gly-Pro-Arg-AMC [Z=벤질옥시카보닐; AMC=7-아미노-4-메틸쿠마린], 호모바닐린산, 4-하이드록시-3-메톡시페닐 아세트산, 환원된 페녹사진, 환원된 벤조티아진, 앰플렉스®(Amplex®), 레조르핀 β-D-갈락토피라노사이드, 플루오레세인 디갈락토사이드 (fluorescein digalactoside, FDG), 플루오레세인 디글루쿠로니드 및 그들의 구조적 변이체 (본원에서 참조로 인용하는 미국 특허 제 5,208,148호; 제 5,242,805호; 제 5,362,628호; 제 5,576,424호 및 제 5,773,236호), 4-메틸움벨리페릴 β-D-갈락토피라노사이드, 카복시움벨리페릴 β-D-갈락토피라노사이드 및 플루오르화 쿠마린 β-D-갈락토피라노사이드가 있다 (본원에서 참조로 인용하는 미국 특허 제 5, 830, 912호).

[0037] 비제한적인 발색 분석은 인자 C/인자 B 캐스케이드를 기반으로 하는 효소 활성 분석이다. 캐스케이드의 제 1성분인 인자 C는 내독소 결합으로 활성화되는 프로테아제 자이모겐 (protease zymogen)이다. 일부 구현예에서, 발색 분석은 인자 C (rFC)의 재조합 형태를 사용한다. 이 경로에서, 인자 B는 인자 C에 의해 활성화된다. 인자 B는 전구 응고 효소를 응고 효소로 활성화시킨다. 일부 구현예에서, 전구 응고 효소는 발색 기질에서 발색 변화를 가져온다. 일부 구현예에서, 발색 분석은 LAL 분석, 가령 Lonza 의 종결점 발색 (Endpoint Chromogenic) LAL 분석이다.

[0038] 일부 구현예에서, 발색 분석은 LAL 분석으로, LAL 내독소 반응의 초기 부분은 전구 응고 효소를 활성화시키고, 이어서 합성 기질로부터 p-니트로아닐린 (pNA)을 효소적으로 절단하여 황색을 만든다.

[0039] 전구효소 + 내독소 → 효소

[0040] 기질 + H_2O + 효소 → 펩티드 + pNA (황색)

[0041] 일부 구현예에서, 그람 음성균 내독소는 LAL에서 전구효소의 활성화를 간접적으로 촉진할 수 있다. 존재하는 내독소의 농도에 의해 활성의 초기 속도를 결정할 수 있다.

[0042] 일부 구현예에서, 발색 기질의 변화는 효소 반응으로 인해 발생한다. 일부 구현예에서, 효소 반응은 펩티드 결합의 절단을 가져옴으로써, 폴리펩티드로부터 발색단 치환체 (가령, p-NA)를 절단한다. 예를 들어, 활성화된 효소는 무색 펩티드 기질, 가령 Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA(서열번호: 1)로부터 pNA의 방출을 촉진할 수 있다. 일부 구현예에서, 펩티드 기질은 3개 이상의 아미노산에 공유 결합된 p-니트로아닐린이다. 일부 구현예에서, 발색 기질은 Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA(서열번호: 1)이다. 일부 구현예에서, 발색 분석은 유리 pNA를 측정한다. 일부 구현예에서, 발색 분석은 380 nm 내지 410 nm, 가령 400 nm 내지 410 nm, 또는 405 nm의 흡광도에서 유리 pNA를 광도계로 측정한다. 흡광도를 측정하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 일부 구현예에서, 발색 분석은 단일 큐벳 분광법, 다중 큐벳 분광법, 또는 흡광도를 측정하는 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 수행된다.

[0043] 반응을 정지 시약으로 정지시킨 후, 유리 pNA는 380 nm 내지 410 nm, 가령 405 nm에서 광도계로 측정할 수 있다. 샘플에서 내독소의 농도는 알려진 양의 내독소 표준을 함유한 용액의 흡광도 값의 표준 곡선으로부터 계산된다.

[0044] 내독소를 검출하는 한가지 표준 발색 분석은 샘플을 시약과 접촉시키는 단계를 포함하는데, 시약은 리물루스 아메보사이트 라이세이트 (LAL)를 포함한다. 일부 구현예에서, 시약은 액체, 가령 수성 액체이다. 대안적으로, 시약은 동결건조된 다음, 샘플과 접촉하기 전에 수성 액체, 가령 멸균수 또는 완충 용액에서 재구성될 수 있다. 일부 구현예에서, 시약은 액체이다. 일부 구현예에서, 시약은 수성 액체이다. 일부 구현예에서, 시약은 동결건조된 다음, 샘플과 접촉하기 전에 수성 액체에서 재구성된다. 일부 구현예에서, LAL은 동결건조된 다음, 샘플과 접촉하기 전에 수성 액체에서 재구성된다. 일부 구현예에서, 발색 기질은 동결건조된 다음, 샘플과 접촉하기 전에 수성 액체에서 재구성된다. 일부 구현예에서, 동결건조는 발색 분석에서 시약, LAL 및/또는 발색 기질의 보다 긴 및/또는 보다 견고한 보관을 가능케 한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 발색 분석에서 동결건조되지 않은 시약, LAL 및/또는 발색 기질에 비해, 동결건조된 시약, LAL 및/또는 발색 기질은 20% 초과, 30% 초과, 40% 초과, 50% 초과, 60% 초과, 70% 초과, 80% 초과, 90% 초과 또는 100% 초과의 경시 안정성의 증가를 가능케 한다. 이 문맥에서 사용한 바와 같이, "안정성"은 의도한 목적을 위해, 즉 동일한 속도 및 감도로 내독소를 검출하기 위해 기능하는 분석을 지칭한다. 예를 들어, 동결건조되지 않은 시약이 3 주 동안 안정한 경우, 6 주 동안 안정한 동결건조된 시약은 경시 안정성이 "100% 증가"하게 된다.

[0045] 본 발명은 샘플에서 내독소를 검출하기 위한 개선된 방법을 제공한다. 용어 "샘플"은 기질, 화합물, 도구 또는 기구를 포함할 수 있다. 그러나, 실제로, 샘플은 생물학적 유기체, 가령 포유 동물, 인간, 가축 또는 동물원의 동물과 접촉하는 기질, 화합물, 도구 또는 기구를 포함할 수 있다. 용어 "샘플"은 (원료부터 제조 공정의 종료를 통해 수령까지) 내독소의 발생원이 샘플을 뇌척수액 또는 심혈관계와의 접촉에 적절하지 않게 만들 수 있는 의료 기기, 제약 및 생명공학 산물을 지칭할 수 있다. 일부 구현예에서, 샘플이란 용어는 생체내에서 뇌척수액 또는 심혈관계, 가령 인간과 접촉하는 의료 기기를 지칭한다. 일부 구현예에서, 샘플이란 용어는 생물학적 샘플을 지칭한다. 일부 구현예에서, 샘플은 비경구 투여 형태, 백신, 항생제, 치료용 단백질, 치료용 핵산, 치료용 항체 및 생물학적 산물로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0046] 용어 "리물루스 아메보사이트 라이세이트"(LAL)는 투구게 (Limulus Polyphemus)에서 나온 혈액세포 (변형세포)를 지칭한다. 투구게에서 얻은 혈액 세포의 수성 추출물은 침입자를 고정함으로써 이들의 확산을 저해하는 혈액

림프의 젤 형성 단백질인 코아굴로겐을 포함한다. 가령, Iwanaga S, *et al.*의 *J. Biochem. 98*:305-318 (1985) 및 Iwanaga S, *et al.*의 *J. Biochem. 95 (6)*: 1793-1801 (1984)]를 참조한다.

[0047] 투구게 (Limulus)의 응고 캐스케이드계는 지혈과 숙주 방어 모두에 관여한다. 캐스케이드는 가용성 단백질인 코아굴로겐을 불용성 코아글린 젤로 전환시킨다. 응고 효소는 코아굴로겐으로부터 단편 펩티드 C를 절단하여 단량체의 응집을 일으킨다.

[0048] 용어 "코아굴로겐"은 Iwanaga (1984)와 Iwanaga (1985)에서 보는 바와 같이, 폴리펩티드 쇄를 지칭한다. 이는 단일 175-잔기 폴리펩티드 쇄이며, Arg-18 및 Arg-46 이후에 혈구에 함유되고 세균 내독소 (지질다당류)에 의해 활성화되는 응고 효소에 의해 절단된다. 절단에 의해 펩티드 C와 함께 2개의 이황화물 결합에 의해 연결된 코아글린 A 및 B의 2개의 쇄가 방출된다. 젤의 형성은 코아글린 분자의 상호연결에서 기인한다. 2 차 구조 예측은, 코아굴로겐이 코아글린 젤로 단백질 가수분해 전환되는 동안 방출되는 C 펩티드가 알파-나선을 형성하는 것을 시사한다. 분자에서 발견되는 베타-시트 구조 및 16개의 반-시스틴(half-cystines)은 산과 열에 안정한 컴팩트한 단백질을 생산하는 것으로 보이다.

[0049] 코아굴로겐이 젤 형성 (가령, 응고 분석)에 중요하지만, 본 발명에서는 발색 분석에서 이것이 필수적이지 않음을 발견했다. 본 발명에서는 자연적으로 발생하는 코아굴로겐의 양을 갖는 LAL을 포함하는 발색 분석에 비해, 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL을 포함하는 발색 분석이 증가된 수준의 속도, 감도 및 분리를 달성하는 것을 발견하였다. 따라서, 일부 구현예에서, 본 발명은 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL을 포함하는 발색 분석에 관한 것이다.

[0050] 일부 구현예에서, LAL은 실질적으로 코아굴로겐이 없다. 본 발명을 읽는 경우, 당업자라면 다양한 양의 코아굴로겐에서의 감소가 발색 분석, 가령 LAL 분석에서 속도, 감도 및/또는 분리 수준의 증가를 가져오게 되는 것을 이해할 것이다. 일부 구현예에서, 용어 "실질적으로 없는"은 단백질 염색을 한 SDS-PAGE에 의해 측정하고 웨스턴 블롯으로 확인했을 때, LAL내의 총 단백질에 대해 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 2% 미만, 1% 미만 또는 0.5% (wt/wt) 미만의 코아굴로겐을 갖는 LAL을 지칭한다. 일부 구현예에서, 용어 "실질적으로 없는"은 단백질 염색을 한 SDS-PAGE에 의해 측정하고 웨스턴 블롯으로 확인했을 때, LAL내의 총 단백질에 대해 10% 미만 또는 5% 미만 (wt/wt)의 코아굴로겐을 갖는 LAL을 지칭한다.

[0051] 일부 구현예에서, 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL이란 용어는 코아굴로겐이 제거되지 않은 LAL에서 코아굴로겐의 양에 대해 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 적어도 99.5% (wt/wt)의 코아굴로겐이 제거된 LAL을 지칭한다.

[0052] 일부 구현예에서, 발색 분석은 샘플에서 내독소의 존재 또는 부재를 결정한다. 다른 구현예에서, 발색 분석은 샘플에서 내독소의 양을 정량화할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 샘플에서 내독소의 발색 효과를 공지된 내독소 표준과 비교하여 샘플에서 내독소의 양을 결정하는 단계를 추가로 포함한다.

[0053] 일부 구현예에서, 본 발명은 발색 분석을 이용하여 생물학적 샘플에서 내독소를 검출하는 방법에 관한 것으로, 이 방법은: (a) 생물학적 샘플을 리물루스 아메보사이트 라이세이트 (LAL) 및 Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA(서열번호: 1)을 포함하는 수성 시약과 접촉시키는 단계; 및 (b) 샘플에서 내독소의 존재하에 Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA(서열번호: 1)로부터 pNA의 효소적 절단으로 인한 흡광도의 변화를 405nm에서 측정하는 단계를 포함하고, LAL은 실질적으로 코아굴로겐이 없다.

[0054] LAL로부터 코아굴로겐을 제거함으로써, 발색 분석은 감도를 증가시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 방법은 증가된 감도를 갖는다. 일부 실시예에서, 상기 방법은 0.05 EU/mL 미만, 0.03 EU/mL 미만, 0.01 EU/mL 미만, 0.008 EU/mL 미만, 0.006 EU/mL 미만, 0.005 EU/mL 미만, 0.004 EU/mL 미만, 0.003 EU/mL 미만, 0.002 EU/mL 미만, 또는 0.001 EU/mL 미만의 감도를 갖는다.

[0055] 본 발명은 추가로, (1) 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL 및 (2) 발색 기질을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 조성물 내의 발색 기질은 pNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물 내의 발색 기질은 Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA(서열번호: 1)이다. 일부 구현예에서, 조성물은 실질적으로 60% 내지 80%의 코아굴로겐이 없는 LAL, 및 20% 내지 40%의 발색 기질 (wt/wt)을 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 약 6% 내지 약 25%의 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL을 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 70%의 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL 및 30%의 발색 기질 (wt/wt)을 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 70%의 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL 및 30%의 Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA(서열번호: 1) (wt/wt)를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같이 조성물은 단일 용기, 예를 들어 단일 바이알에 존재한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 조성물은

동결건조된다. 예를 들어, 본원은 구체적으로 70%의 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL 및 30%의 Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA(서열번호: 1) (wt/wt)을 포함하는 동결건조 조성물을 설명한다.

[0056] 일부 구현예에서, 본 발명은 발색 분석 키트에 관한 것이다. 키트는 LAL 및 발색 기질을 포함하는 시약을 비롯하여, LAL 발색 분석과 통상적으로 관련된 하나 이상의 성분을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 방법은 (a) 리물루스 아메보사이트 라이세이트 (LAL)로, LAL은 실질적으로 코아굴로겐이 없는, LAL; (b) 발색 기질; 및 (c) LAL 및 발색 기질을 사용하여 내독소를 검출하기 위한 사용설명서를 포함하는 키트에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 키트는 다양한 시약을 포함하고, 각 시약은 상이한 양의 코아굴로겐이 제거된 LAL을 갖는다.

[0057] 키트는 하나 이상의 용기를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, LAL 및 발색 기질은 단일 용기에 존재한다. 일부 구현예에서, LAL 및 발색 기질은 2개의 다른 용기에 존재한다. 일부 구현예에서, 키트는 LAL을 함유하는 멸균 용기를 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 분석에 사용하기 위해 LAL 및/또는 발색 기질을 재구성할 수 있는 재구성 완충액을 포함한다. 일부 구현예에서, 멸균 용기는 멸균 바이알이다. 일부 구현예에서, 키트는 양성 내독소 대조군으로서 사용할 수 있거나 표준에서 내독소의 양을 정량화하는데 사용할 수 있는 대조용 표준 내독소를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 한가지 이상의 농도에서 1 종 이상의 대조용 표준 내독소를 포함한다.

[0058] 당업자는 여러 상이한 방법을 이용하여 LAL로부터 코아굴로겐을 제거할 수 있음을 이해할 수 있다. 이들 방법은 각각 효율, 정제 속도, 비용 및 노력이 다를 수 있지만, 숙련된 기술자의 지식 안에 있다. 본 발명은 접선방향 유동 여과를 사용하여 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL을 제조하는 개선된 방법을 포함한다. 접선방향 유동 여과 (TFF)는 대부분의 공급 유동이 필터가 아닌 필터 표면을 가로질러 접선 방향으로 이동하는 교차 유동 여과를 지칭한다. 본 발명에서는 TFF를 사용함으로써, 여과 공정 동안 (필터를 오염시킬 수 있는) 대부분의 LAL 단백질을 포함하는 잔류물(retentate)이 실질적으로 세척되고, 코아굴로겐이 투과물로 여과되는 것을 발견하였다. 일부 구현예에서, TFF는 배치식 데드 엔드(batch-wise dead-end) 여과와 달리, 연속적인 공정이다.

[0059] 일부 구현예에서, 본 발명은 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL을 제조하는 방법에 관한 것이고, 이어서 이 방법은 LAL에 TFF를 실시하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 다음에 LAL은 TFF 전에 완충액에 넣는다. 일부 구현예에서, 완충액은 Tris 완충액 또는 MES 완충액이다. 일부 구현예에서, 완충액은 약 6.0 내지 약 9.0, 또는 약 7.0 내지 약 8.0의 pH를 갖는다.

[0060] TFF에는 다양한 막을 사용할 수 있다. 일부 구현예에서, 막은 10 내지 80 kDa 필터 또는 20 내지 50 kDa 필터이다. 따라서, 일부 구현예에서, 본 발명은 실질적으로 코아굴로겐이 없는 리물루스 아메보사이트 라이세이트 (LAL)를 제조하는 방법에 관한 것으로, 이 방법은: (a) LAL을 포함하는 조성물을 제공하는 단계로, LAL은 코아굴로겐을 포함하는, 단계; (b) 완충액을 조절하는 단계; 및 (c) 20 kDa 내지 50 kDa 필터를 사용하여 (b)의 조성물에 접선방향 유동 여과를 실시하고, 잔류물을 수집함으로써, 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL을 단리하는 단계를 포함하는 방법.

[0061] 본원에 개시된 방법에서 사용하는 막은, 제한되지 않으나, 개질된 폴리에테르설폰(mPES), 폴리설폰(Polysulfone, PS) 및 폴리에테르설폰(Polyethersulphone, PES)을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL을 제조하는 방법은 개질된 폴리에테르설폰(mPES) 막 필터를 사용한 TFF를 이용하여 실행된다. 막을 가로지르는 LAL의 유동 속도는 LAL로부터 코아굴로겐의 제거를 최적화하도록 조절할 수 있다. 일부 구현 양태에서, TFF는 200 ml/분 내지 800 ml/분, 300 ml/분 내지 600 ml/분, 또는 350 ml/분 내지 500 ml/분의 유속으로 실행된다.

[0062] 실시예

[0063] 실시예 1

[0064] 접선방향 유동 여과를 이용한 LAL의 정제

[0065] 투구게의 혈액세포 (변형세포)에서 추출한 리물루스 아메보사이트 라이세이트 (LAL)는 Lonza (스위스 바젤)에서 구입했다. LAL에 접선방향 유동 여과 (TFF)용 중공 섬유 개질된 폴리에테르설폰(mPES) 막 필터 (Spectrum Labs)로 여과를 실시하여 코아굴로겐을 제거하였다. 30 kDa MWCO mPES 필터, 콜 파머 마스터플렉스 펌프 튜빙(Cole Parmer Masterflex Pump Tubing)과 적절한 펌프 및 배압 밸브를 사용하여 TFF 시스템을 설치하였다. LAL 시약수(LAL reagent water, LRW)로 시스템을 플러싱한 다음, 실온에서 1 시간 동안 1N NaOH를 사용하여 발열원을 제거했다. 발열원을 제거한 후, LRW를 사용하여 시스템을 세정한 다음, TFF 완충액을 사용하여 시스템을 평형화시

켰다.

[0066] 430 ml/분의 유속으로 필터에 공급하기 전에, 총 체적의 90%가 투과물에 수집될 때까지 5 내지 8psi의 막간 차압(transmembrane pressure, TMP)을 유지하면서, TFF 완충액 (실온에서 pH 7.4 내지 7.5의 77mM NaCl을 갖는 50 mM Tris)으로 1:10 내지 1:8의 비율로 LAL을 희석시켰다. 다음에, 잔류물을 TFF 완충액으로 1:10 내지 1:8의 비율로 추가로 희석한 다음, 필터로 공급하였다. 반복해서 잔류물을 희석하고, 잔류물의 체적이 LAL의 초기 체적과 같아질 때까지 LAL을 처리하였다. 코아굴로겐이 투과물에 수집되는 반면, 나머지 단백질은 잔류물에 유지되었다. 투과물 및 잔류물의 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯 분석은 잔류물에서 코아굴로겐이 실질적으로 감소되었음을 보였다.

[0067] TFF 최적화 공정 동안, pH 6.2에서 77mM NaCl을 갖는 50 mM MES를 포함하는 완충액도 사용하였다. 그러나, LAL로부터 제거된 가장 높은 비율의 전체 단백질이 Tris 완충액에서 관찰되었다.

[0068] 모든 완충액은 TFF에서 사용하기 전에 Lonza의 표준 KQCL 키트를 사용하여 내독소에 대해 시험하였다.

[0069] 실시예 2

[0070] 코아굴로겐의 정량화

[0071] LAL 잔류물에서 SDS-PAGE/단백질 젤 염색을 실행하고, 원래의 LAL에서 20kD 코아굴로겐 밴드의 밴드 밀도를, 존재하는 경우, TFF 잔류물에서 코아굴로겐 밴드와 비교함으로써, LAL에 남아있는 코아굴로겐의 세미 정량 평가를 수행하였다. 가령, 도 7a를 참조한다.

[0072] 추가로, α-코아굴로겐 항체를 사용하여 웨스턴 블롯을 실행한 다음, 20kD 코아굴로겐 밴드의 밴드 밀도를 비교하였다. 가령, 도 7b를 참조한다.

[0073] SDS-PAGE 젤 상에서 환원 조건하에 (코아굴로겐을 함유하는) LAL 투과물을 이동시킨 다음, 3개의 밴드를 순차 배열함으로써 코아굴로겐의 동일성을 확인하였다. 도 9를 참조한다. 3개의 밴드는 각각, 단백질의 순차 배열에 의해 코아굴로겐 단편으로서 확인되었다.

[0074] 두가지 정량 방법 모두 본 발명에 의해 LAL로부터 상당량의 코아굴로겐이 제거된 것을 확인하였다.

[0075] 웨스턴 블롯 분석을 이용하여 LAL에서 코아굴로겐의 양을 결정하였다 (도 8a). 웨스턴 블롯 분석의 결과는 표준 곡선과 맞았다 (도 8b). 결과는 약 662ng/2000ng, 즉 LAL의 전체 단백질의 약 33%가 코아굴로겐임을 나타냈다.

[0076] 실시예 3

[0077] 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL의 안정성

[0078] 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL의 안정성을 조사하였다. 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL 샘플을 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10 주 동안 보관하였다. 표시된 시간의 종료시, 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL 샘플을 96-웰 플레이트에서 LAL 발색 시약과 혼합하고, 405 nm에서 흡광도를 측정하는 배양용 플레이트 판독기에 놓았다. 시간의 경과에 따라 반응이 자동으로 모니터되었다 (황색 외관).

[0079] 내독소의 존재하에, 용해물은 발색 기질을 절단하여 용액을 황색으로 만들게 된다. 변화에 필요한 시간은 존재하는 내독소의 양에 반비례한다. 각각의 샘플에 대해 50 mOD에 도달하는데 필요한 시간이 도 10에 도시되어 있다. 데이터는 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL이 10 주 이상 안정한 것을 시사한다.

[0080] 실시예 4

[0081] 코아굴로겐 제거에 의한 분리 향상

[0082] LAL로부터 코아굴로겐을 제거하는 것이 다중 개시 mOD에서의 분리에 미치는 영향에 관한 연구를 수행하였다. 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL을 사용하는 경우, 정규 LAL 대 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL 의 비교를 통해, 각 개시 mOD에서 분리가 증가하는 것으로 나타냈다. 분리를 증가시키기 위해 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL을 사용함으로써, 분석의 목표 감도는 더 낮은 개시 mOD 설정에서 보다 짧은 시간에 달성될 수 있다. 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL을 사용하여 제형을 제조하는 경우, 368 초의 분리로 26 분에 0.005 EU/ml의 목표 감도를 달성할 수 있다. 정규 LAL을 사용하는 경우, 32 분에 0.005 EU/ml의 감도가 달성되지만, 50 mOD에서는 단지 67 초로 달성된다.

[0083] 데이터는 LAL로부터의 코아굴로겐 제거가 분리를 향상시키는 것을 시사한다.

[0084] 실시예 5

[0085] LAL 제형 및 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL 제형의 발색 검출

[0086] 0.005 EU/ml, 0.05 EU/ml, 0.5 EU/ml, 5 EU/ml 및 50 EU/ml의 표준에 대해 LAL 제제에서 20%, 30%, 40% 및 50%의 농도로 LAL 및 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL 모두의 샘플을 시험하였다. 추가로, zwittergent의 다양한 농도 역시 시험하였다 (도 3 및 도 4). 데이터는 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL 및 zwittergent 의 농도를 증가시키면, LAL 제형 및 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL 제형 모두에 대한 각 표준에 관한 반응 속도가 증가하는 것을 시시한다. 그러나, 반응 속도가 LAL 제형에 따라 증가하므로, 블랭크와 최저 표준 (0.005 EU/mL) 사이에서 분리가 없어지는 반면, 실질적으로 코아굴로겐이 없는 모든 LAL 제형에 대해 적어도 200 초의 분리가 유지된다. 증가된 zwittergent로 제형화된 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL은 허용 가능한 분리에 의해 0.001 EU/ml의 감도를 달성하였다 (데이터는 도시하지 않음).

[0087] 실시예 6

[0088] 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL과 발색 기질의 비율

[0089] 실질적으로 코아굴로겐이 없는 LAL과 발색 기질의 최적의 비율을 200 mOD 및 50 mOD에서 조사하였다 (도 5a 및 도 5b). 데이터는 70%의 LAL 제제와 30%의 발색 기질의 비율이 가장 빠른 반응시간을 가져 왔음을 나타낸다. 이 관찰은 실질적으로 코아굴로겐이 없는 3개의 개별 로트에서 보았을 때 확인되었다 (도 6a).

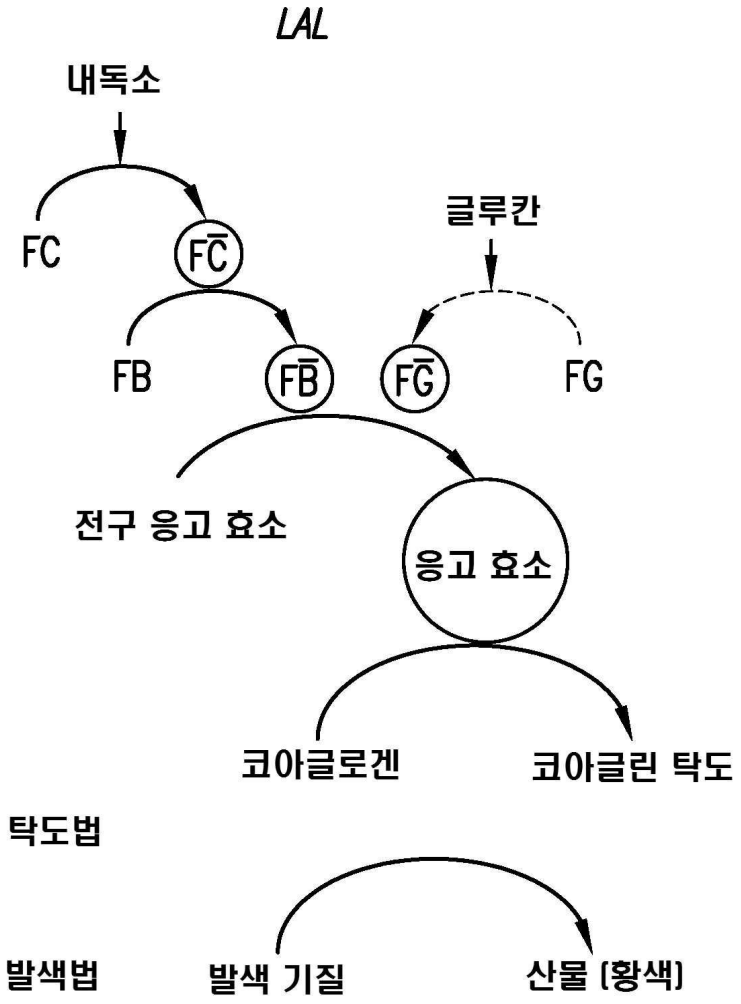
[0090] 임의의 실시예의 범위를 벗어나지 않고 본원에 기재된 방법 및 응용에 대한 다른 적절한 수정 및 적응이 이루어질 수 있음이 관련 기술분야의 당업자에게는 쉽게 명백해질 것이다. 상기 실시예는 본원에 예시의 목적으로만 포함되며, 제한하려는 것은 아니다.

[0091] 본원에서 특정 구현예를 도시하고 설명하였지만, 설명하고 도시한 부분의 특정 형태나 배열로 특허 청구범위가 제한되지 않음을 이해해야 한다. 본 명세서에서, 예시적인 실시예를 개시하였으며, 특정 용어를 사용하였지만, 이들은 제한적인 목적이 아닌 일반적이고 설명적인 의미로만 사용된다. 상기 교시에 비추어 실시예의 수정 및 변형이 가능하다. 따라서, 구현예는 구체적으로 기술한 바와 다르게 실시할 수 있음을 이해해야 한다.

[0092] 다양한 구현예를 위에서 설명하였지만, 이들은 단지 본 발명의 예시 및 예로서 제시한 것이며, 제한하려는 것이 아님을 이해해야 한다. 본 기술의 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서, 형태 및 세부사항에 다양한 변화가 이루어질 수 있음이 관련 기술 분야의 당업자에게는 명백할 것이다. 따라서, 본 기술의 폭과 범위는 상술한 실시예들 중 어느 것에 의해서도 제한되어서는 안되며, 첨부한 특허 청구범위 및 그 등가물에 따라서만 규정되어야 한다. 본원에서 논의한 각 실시예의 각 특징 및 본원에서 인용한 각 참고문헌의 각 특징은 임의의 다른 실시예의 특징과 조합하여 사용할 수 있는 것도 이해할 것이다. 본 명세서에서 논의한 모든 특허 및 공보는 본원에서 그 전체를 참조로 인용한다.

도면

도면1


LAL
내독소
FC
FC̄
글루칸
FB
FB̄
FḠ
FG
전구 응고 효소
응고 효소
코아글로겐
코아글린 탁도
탁도법
발색법
발색 기질
산물 (황색)

도면2

	200mOD		100mOD		50mOD	
	Lystate	Lystate-Coag.	Lystate	Lystate-Coag.	Lystate	Lystate-Coag.
Endo. Stds.	Rxn. Time	Rxn. Time	Rxn. Time	Rxn. Time	Rxn. Time	Rxn. Time
0EU/ml	2557	2847	2272	2318	2010	1915
0.001 EU/ml*	2644	2710	2295	2231	2044	1811
0.005 EU/ml	2552	2429	2198	1962	1943	1547
0.05 EU/ml	1972	1524	1743	1201	1525	943
0.5 EU/ml	1018	781	900	622	779	496
5 EU/ml	544	425	473	324	406	249
50 EU/ml	276	195	205	****	169	****
Corr. Coeff.	-0.991	-0.998	-0.985	-0.998	-0.984	-0.997
Slope	-0.249	-0.275	-0.263	-0.263	-0.270	-0.266
Blank to 0.005EU/ml Separation (Secs.)	5	418	74	356	67	368
0.005EU/ml Reaction Time (Mins.)	43	40	37	33	32	26
Blank to 0.001EU/ml Separation (Secs.)	-87	137	-23	87	-34	104
0.001EU/ml Reaction Time (Mins.)	44	45	38	37	34	30

*0.001EU/ml reaction time not included in calculation of line

도면3

현재 최저 표준

Lowest Std.	Separation
<3600sec	>200sec

	Formulation	0EU/ml	0.005EU/ml	0.05EU/ml	0.5EU/ml	5EU/ml	50EU/ml	Sepa. 0–0.005EU/ml
1	20%L, 0.004%Z	6301	4918	2559	1415	828	495	1383
2	20%L, 0.008%Z	5322	3980	2030	1139	697	441	1342
3	20%L, 0.012%Z	4895	3683	1872	1069	666	433	1212
4	20%L, 0.016%Z	5151	3946	2016	1142	724	453	1205
5	20%L, 0.020%Z	4428	3246	1723	997	631	423	1182
6	30%L, 0.004%Z	4594	3788	2209	1220	677	373	806
7	30%L, 0.008%Z	4522	3915	2163	1182	656	364	607
8	30%L, 0.012%Z	3864	3473	2016	1104	639	362	391
9	30%L, 0.016%Z	3981	3481	2008	1097	653	382	500
10	30%L, 0.020%Z	3896	3379	1940	1057	626	385	517
11	40%L, 0.004%Z	3716	3469	2275	1247	695	365	247
12	40%L, 0.008%Z	3648	3616	2175	1201	682	357	32
13	40%L, 0.012%Z	3405	3328	2129	1127	630	344	77
14	40%L, 0.016%Z	3443	3310	1988	1086	621	352	133
15	40%L, 0.020%Z	3401	3174	2029	1069	604	341	227
16	50%L, 0.004%Z	3282	3154	2197	1177	627	314	128
17	50%L, 0.008%Z	3238	3264	2120	1136	610	313	−26
18	50%L, 0.012%Z	3141	2993	2098	1084	595	308	148
19	50%L, 0.016%Z	3058	2946	1981	1047	585	305	112
20	50%L, 0.020%Z	3064	2973	2027	1053	582	306	91
21	CONT 22%L, 0.004%Z	4432	3718	2035	1129	691	429	714

도면4

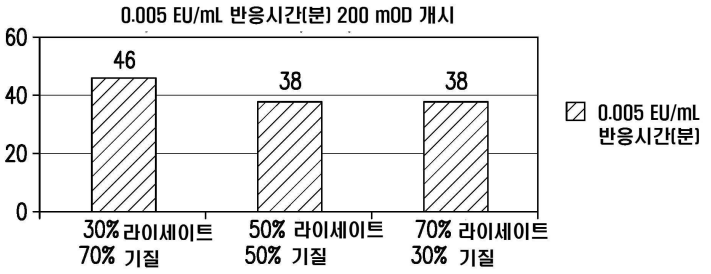
현재 최저 표준

Lowest Std. <3600sec | Separation >200sec

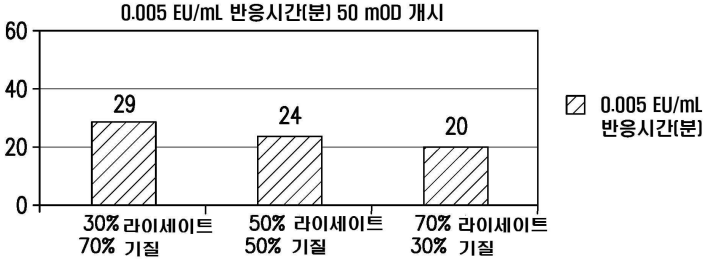
	Formulation	0EU/ml	0.005EU/ml	0.05EU/ml	0.5EU/ml	5EU/ml	50EU/ml	Sepa. 0-0.005EU/ml
1	20%L-co., 0.004%Z	8147	6176	2959	1463	818	430	1971
2	20%L-co., 0.008%Z	7781	5901	2693	1346	762	396	1880
3	20%L-co., 0.012%Z	7323	4878	2339	1191	668	365	2445
4	20%L-co., 0.016%Z	7252	4938	2215	1132	642	360	2314
5	20%L-co., 0.020%Z	7070	4698	2129	1076	613	341	2372
6	30%L-co., 0.004%Z	5709	4767	2633	1340	823	478	942
7	30%L-co., 0.008%Z	6273	4889	2341	1245	766	455	1384
8	30%L-co., 0.012%Z	5630	4126	2081	1116	693	408	1504
9	30%L-co., 0.016%Z	5207	3792	1982	1054	654	376	1415
10	30%L-co., 0.020%Z	5152	3662	1854	1002	607	366	1490
11	40%L-co., 0.004%Z	5094	4211	2504	1302	783	412	883
12	40%L-co., 0.008%Z	4762	4222	2410	1231	741	404	540
13	40%L-co., 0.012%Z	4572	3698	1960	1033	631	353	874
14	40%L-co., 0.016%Z	4517	3515	1879	1001	625	331	1002
15	40%L-co., 0.020%Z	4355	3350	1683	906	556	315	1005
16	50%L-co., 0.004%Z	4090	3348	2233	1126	681	335	742
17	50%L-co., 0.008%Z	3956	3451	2051	1038	632	318	505
18	50%L-co., 0.012%Z	3734	3308	1811	948	585	293	426
19	50%L-co., 0.016%Z	3629	3003	1659	880	569	290	626
20	50%L-co., 0.020%Z	3644	2881	1550	816	494	272	763
21	CONT 22%L, 0.004%Z	4432	3718	2035	1129	691	429	714

0.005EU/ml reacted in less than 1hr for with passing separation (rows 14–20)

도면5



5A



5B

	현재	신규	현재	신규
감도	0.005EU/ml	0.005EU/ml	0.001 EU/ml	0.001 EU/ml
반응시간	60 분	20 분	NA	27 to 45 mins
분리	≤300 초	충분	NA	충분

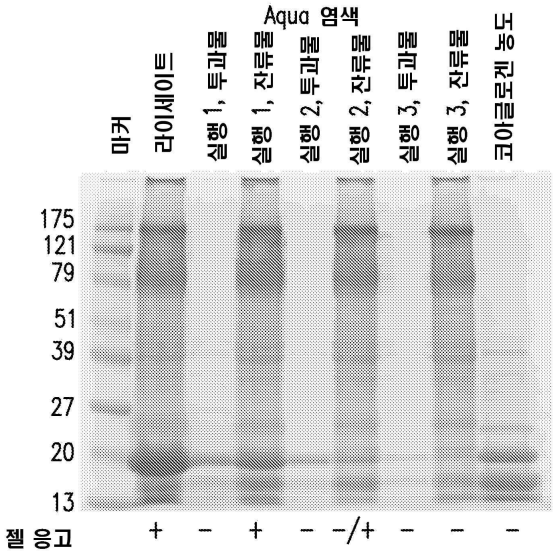
5C

도면6a

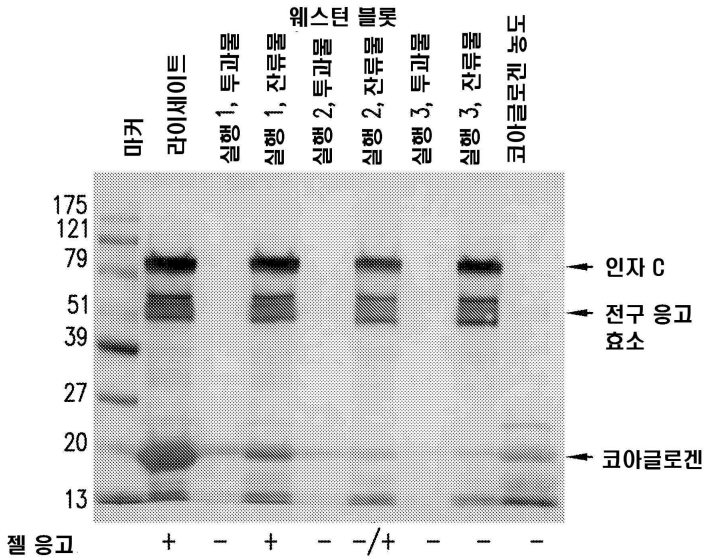
Lot	0.005 EU/mL 반응시간(분)	0.001 EU/mL 반응시간(분)
1	20	21
2	24	31
3	17	20

도면7

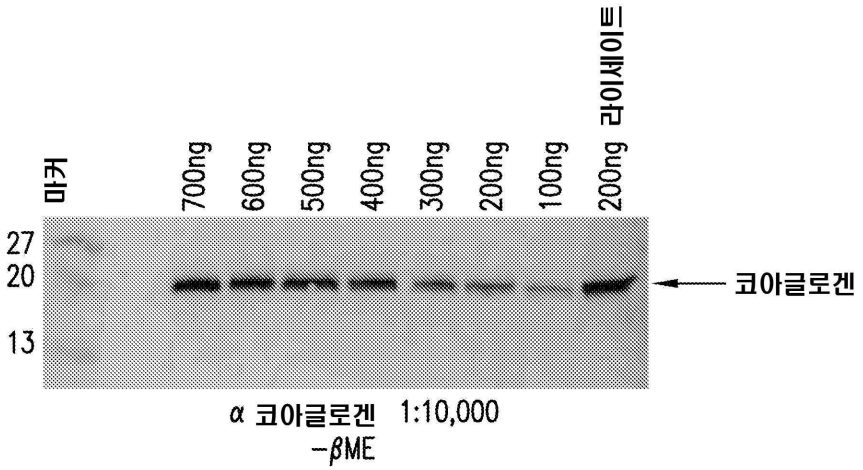
7A


Aqua 염색
마커
라이세이트
실행 1, 투과물
실행 1, 잔류물
실행 2, 투과물
실행 2, 잔류물
실행 3, 투과물
실행 3, 잔류물
코아글로겐 농도
175
121
79
51
39
27
20
13
젤 응고
+ − + − −/+ − − −

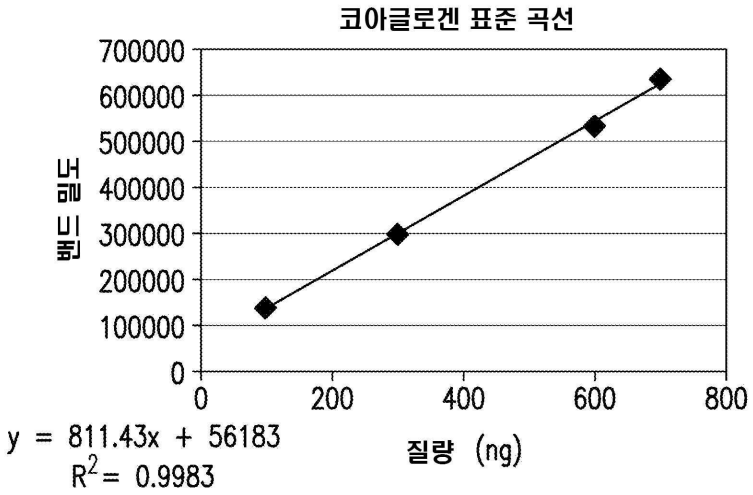
7B


웨스턴 블롯
마커
라이세이트
실행 1, 투과물
실행 1, 잔류물
실행 2, 투과물
실행 2, 잔류물
실행 3, 투과물
실행 3, 잔류물
코아글로겐 농도
175
121
79
51
39
27
20
13
인자 C
전구 응고 효소
코아글로겐
젤 응고
+ − + − −/+ − − −

도면8

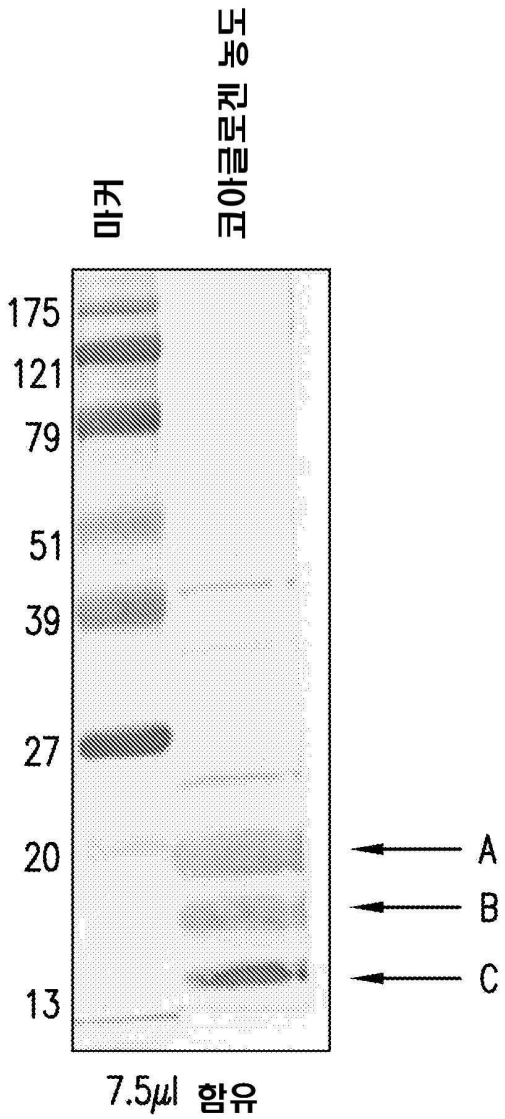

마커
700ng
600ng
500ng
400ng
300ng
200ng
100ng
200ng 라이세이트
27
20
13
코아글로겐
α 코아글로겐 1:10,000
−βME

8A

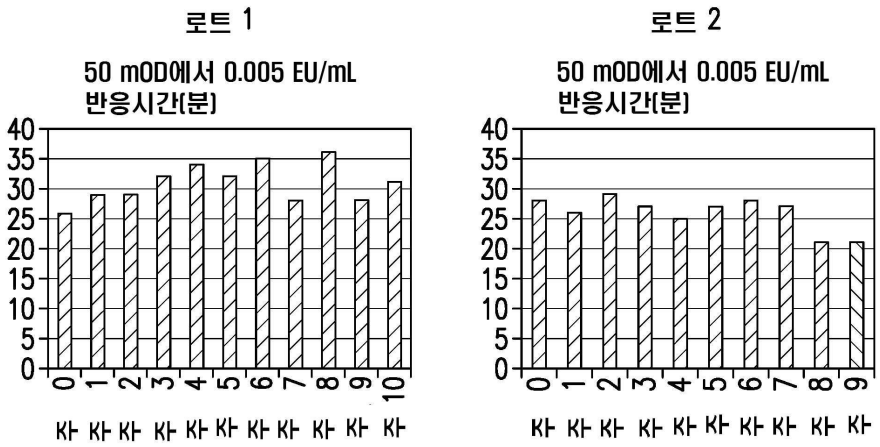

코아글로겐 표준 곡선
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
밴드 밀도
0
200
400
600
800
질량 (ng)
y = 811.43x + 56183
R2 = 0.9983

8B

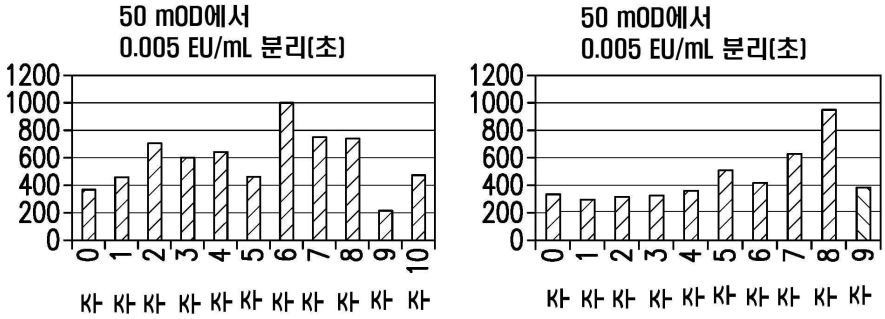
도면9



도면10

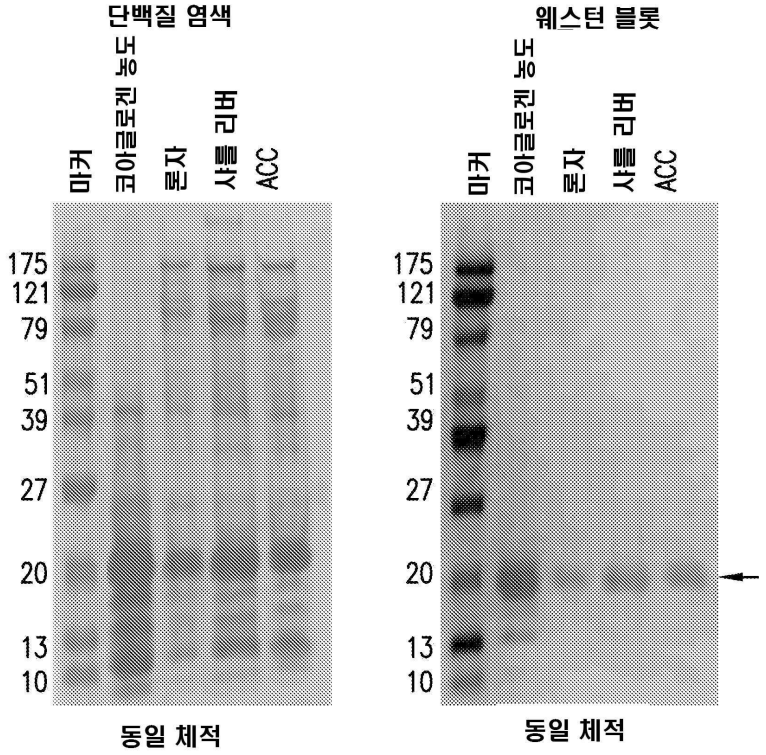

로트 1
50 mOD에서 0.005 EU/mL
반응시간(분)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
KF KF KF KF KF KF KF KF KF KF KF
로트 2
50 mOD에서 0.005 EU/mL
반응시간(분)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
KF KF KF KF KF KF KF KF KF KF

10A


50 mOD에서
0.005 EU/mL 분리(초)
1200
1000
800
600
400
200
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
KF KF KF KF KF KF KF KF KF KF KF
50 mOD에서
0.005 EU/mL 분리(초)
1200
1000
800
600
400
200
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
KF KF KF KF KF KF KF KF KF KF

10B

도면11



11A

제조업체	단백질 농도 (mg/ml)
론자	2.9
샤틀 리버	5.8
ACC	8.7

11B

서 열 목 록

<110> LONZA WALKERSVILLE, INC.

<120> METHOD OF DETECTING AN ENDOTOXIN USING LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE

<130> PI-19K1006US

<150> US 62/370,493

<151> 2016-08-03

<160> 4

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide; N-term Ac;

C-term pNA

<400> 1

Ile Glu Ala Arg

1

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Limulus polyphemus

<400> 2

Gly Asp Pro Asn Val Pro Thr Cys Leu Cys

1 5 10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Limulus polyphemus

<400> 3

Lys Val Ile Val Ser Gln Glu Lys Thr Asp

1 5 10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Limulus polyphemus

<400> 4

Gly Phe Ser Ile Phe Gly Gly His Pro Ala

1 5 10