



- (51) 국제특허분류:
C12M 1/18 (2006.01) *C12Q 1/02* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/009755
- (22) 국제출원일: 2014년 10월 16일 (16.10.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0139700 2014년 10월 16일 (16.10.2014) KR
- (71) 출원인: 주식회사 퀀타매트릭스 (QUANTA MATRIX CO., LTD.) [KR/KR]; 151-015 서울시 관악구 관악로 1, 서울대학교 반도체공동연구소 104동 213-1호, Seoul (KR). 서울대학교산학협력단 (SNU R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 151-015 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR). 사단법인대한결핵협회 (KOREAN NATIONAL TUBERCULOSIS ASSOCIATION) [KR/KR]; 137-900 서울시 서초구 바우피로 6길 57, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 정용균 (JUNG, Yong-Gyun); 131-853 서울시 중랑구 봉화산로 3길 127-10, Seoul (KR). 김은근 (KIM, Eun Geun); 435-040 경기도 군포시 산본천로 33, 715동 1206호, Gyeonggi-do (KR). 유정현 (YOO,

Jung Heon); 446-717 경기도 용인시 기흥구 동백 2로 37, 4103동 1902호, Gyeonggi-do (KR). 박정옥 (PARK, Kyung-Ock); 426-747 경기도 안산시 상록구 감골 2로 58, 106동 1403호, Gyeonggi-do (KR). 권성훈 (KWON, Sunghoon); 135-836 서울시 강남구 삼성로 151, 3동 502호, Seoul (KR). 최정일 (CHOI, Jungil); 151-848 서울시 관악구 남부순환로 230길 93, 602호, Seoul (KR). 김희진 (KIM, Hee jin); 138-768 서울시 송파구 중대로 24, 209동 1204호, Seoul (KR). 류성원 (RYOO, Sung Weon); 448-514 경기도 용인시 수지구 손곡로 54, 205동 1001호, Gyeonggi-do (KR). 김하은 (KIM, Haeun); 570-774 전라북도 익산시 선화로 69길 59, 104동 1007호, Jeollabuk-do (KR). 정현주 (JEOUNG, Hyeon Ju); 200-180 강원도 춘천시 석사길 10, 102동 402호, Gangwon-do (KR). 이은희 (LEE, Eun Hee); 361-954 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 만수길 45-12, 203, Chungcheongbuk-do (KR). 김혜진 (KIM, Hyejin); 361-954 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명 5로 202, 304동 1001호, Chungcheongbuk-do (KR).

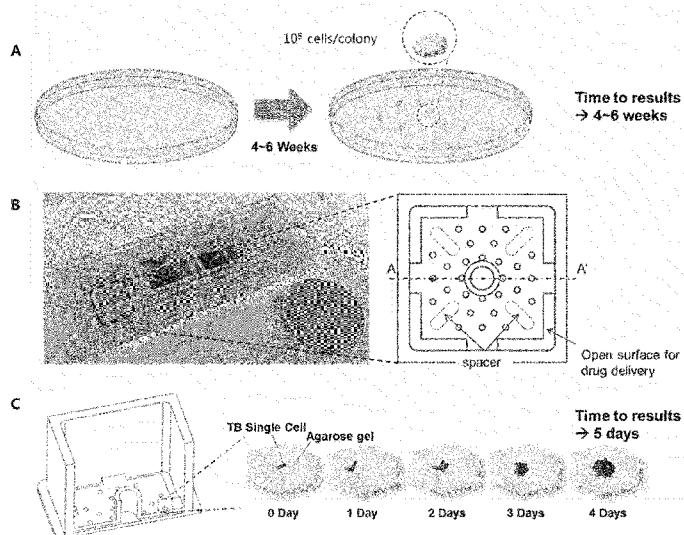
(74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 152-766 서울시 구로구 디지털로 31길 20 (구로동) 601호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: NOVEL BIOLOGICAL ACTIVITY TESTING STRUCTURE FOR TRACKING SINGLE CELL, USING GELLING AGENTS

(54) 발명의 명칭 : 고정화제를 이용한 단일 세포 추적에 위한 신규한 생리 활성 검사용 구조물



(57) Abstract: The present invention relates to: a novel biological activity testing structure for tracking a single cell, using gelling agents; and a biological activity testing system comprising the same. In addition, the present invention relates to a method for testing biological activity, testing drug susceptibility, screening for antibiotics and diagnosis, using the testing structure. The biological activity testing structure, provided by the present invention, can very quickly and simply carry out a drug susceptibility test, drug screening and diagnosis for bacteria, particularly *Mycobacterium tuberculosis*. Particularly, DST and diagnosis are enabled irrespective of inoculation effects, or only by pretreatment without a step of concentrating human sputum, and thus a test can be outstandingly quickly and accurately, and simply carried out compared with a conventionally developed tuberculosis diagnostic or DST system. In addition, the structure according to the present invention allows tuberculosis diagnosis and a drug susceptibility test to be carried out simultaneously, and thus a technique provided by the present invention can effectively replace a conventional technique.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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 제 21 조(3))

(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM,

본 발명은 고정화제를 이용한 단일 세포 추적에 위한 신규한 생리 활성 검사용 구조물 및 이를 포함하는 생리활성 검사 시스템에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 검사용 구조물을 이용한 생리활성 검사, 약물 감수성 검사, 항생제 스크리닝, 및 진단 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 생리 활성 검사용 구조물은 박테리아 특히, 결핵균에 대한 약물 감수성 검사, 약물 스크리닝 및 진단을 매우 빠르고 간편하게 수행 할 수 있다. 특히, 접종효과와 무관하게, 또는 인간의 객담을 농축과정 없이 전처리만으로도 DST 및 진단이 가능한 바, 종래 개발된 결핵 진단 또는 DST 시스템에 비하여 월등히 빠르고 정확하며, 간편하게 검사를 수행할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 상기 구조물은 결핵 진단과 약물 감수성 검사를 동시에 수행할 수 있도록 하는바, 본 발명에서 제공하는 기술은 종래 기술을 효과적으로 대체할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 고정화제를 이용한 단일 세포 추적을 위한 신규한 생리 활성 검사용 구조물

기술분야

- [1] 본 발명은 고정화제를 이용한 단일 세포 추적을 위한 신규한 생리 활성 검사용 구조물 및 이를 포함하는 생리활성 검사 시스템에 관한 것이다.
- [2] 또한, 본 발명은 상기 검사용 구조물을 이용한 생리활성 검사, 약물 감수성 검사, 항생제 스크리닝, 및 진단 방법에 관한 것이다.

[3]

배경기술

- [4] 세계 인구의 3 분의 1의 건강을 위협하는 전염병이 바로 결핵(TB)이다. 항결핵제의 존재에도 불구하고 매년 전세계 인구의 1%가 결핵에 걸리며 1백30만명이 결핵에 의해 사망한다. 또한, MDR-TB (multi-drug resistant TB)와 XDR-TB (extensively drug resistance TB)는 결핵 환자 또는 결핵 의심군의 관리 소홀에 의하여 매해 증가하고 있다. 최근, 완전한 약물 내성 결핵 (TDR-TB, totally drug resistant TB)의 첫번째 경우가 인도에서 발생하였다. TB의 전파를 감소시키고 결핵 환자의 결과를 개선하기 위해 DST (drug susceptibility test) 후 신속하고 정확한 약물치료가 필요하다. 표준 일선(standard first-line)의 항-TB제 사이에 어떠한 약에 내성을 나타내는지를 진단하는 것은 MDR-TB, XDR-TB와 TDR-TB를 확인하고 비효과적인 약물 치료를 방지하는 것에 매우 중요하다.
- [5] DST 일반적인 방법은 고체 및 액체 배지에 세포를 배양하는 것에 기초한다. 고체 배지 배양 방법에 있어서, 결핵균 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)을 항생제를 포함한 고체 배지에 접종하고, 육안으로 콜로니의 형성여부를 관찰한다. MTB는 천천히 성장하기 때문에 (세포분화 기간이 약 24 시간), 기존의 DST 방법은 적어도 4 내지 6주가 소요된다. 액체 배지의 경우, MTB의 성장이 가속되고 DST 시간은 감소 될 수 있다. MGIT 960 시스템으로 불리는 액체 배지를 이용한 DST 플랫폼이 상용화되어 있다. MGIT 시스템은 MTB의 성장 및 산소 소비에 따라 발생하는 형광신호를 나타낸다. 이 시스템의 DST 시간은 약 1주일이나, 이 방법은 MTB 세포 성장을 직접관찰하지 않고 간접적으로 확인하는 바, 오차율의 증가를 야기한다.
- [6] DST 시간을 줄이기 위하여, 직접적인 관찰 방법인, 현미경 관측 약물 감수성 (microscopic-observation drug susceptibility, MODS) 방법이 개발되었다 이 방법에서는, 약물과 함께 객담을 24 웰 플레이트에 접종하였다. 매일 관찰하여 MTB의 성장 여부를 확인하는 것으로 코드 형성이 중요한 역할을 한다. 이 방법을 통해 DST 결과의 도출이 일주일 안에 가능하다. 그러나, MTB의 단일 세포는 액체 배지에서 고정 될 수 없기 때문에 하나의 세포에 대한 추적

불가능한 바, DST 결과를 얻기 위해 전체 웰 영역에 대한 현미경 관찰이 코드 형성을 검출하는 것에 필수적이며, DST 결과를 얻기 위해 장시간 관찰이 불가피하다.

- [7] 단일 세포 추적을 위하여, 칩을 이용한 많은 기술이 개발되었다: 마이크로 스케일 웰을 이용한 어레이 방법, 패시브 마이크로유체 트래핑, 적극적-판막 마이크로 유체 시스템과 액적 마이크로유체 방법이 있다. 마이크로 스케일 웰을 이용한 어레이 방법 및 패시브 마이크로 유체 트래핑에서, 세포는 중력에 의해 아래로 침전되고, 유체 흐름에 따라서, 세포는 위어 (weirs)에 포집된다. 이 경우, 유체 환경의 제어가 어렵기 때문에, 약물 검사를 위한 다중화 분석이 제한적이다. 세포 및 약물 로딩의 개선된 제어를 위하여, 적극적-판막 마이크로 유체 방법은 다양한 제어 요소를 통하여 소량의 액체를 제어하기 위한 컴퓨터 제어, 공압식 트래핑 방법을 이용한다. 그러나, 이 방법은 복잡한 제어에 의존하며, 높은 비용 및 과도한 노력이 필요한 바, 임상적 일상적인 약물 검사에 적합하지 않는다. 액적 미세 유체 방법은 다중 약물 검사를 위한 적은 챔버수를 이용한다. 그러나, 단일 세포 추적에 필요한 액적 내의 박테리아 세포의 고정화는 보장되지 않는다.

- [8] 또한, 접종 효과 (Innoculum effect, IE)는 실험실에서 원치 않는 현상으로서, *in vitro* 저항성에 대한 과대 평가에 의하여 최소 억제 농도 (minimal inhibitory concentration, MIC)의 증가를 야기할 수 있으며, 결국 실험의 재연성을 감소시킬 수 있는 현상이다. 더욱이, MIC는 약리학에서 항생제의 미생물학적 효능을 결정하는 매개 변수이기 때문에, 세포 밀도에 의한 차이는 임상 평가에 제한을 유발할 수 있다.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명자들은 박테리아, 특히 결핵균의 효과적이고 빠른 진단, DST, 및 스크리닝 방법을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 한천 혼합물의 박충을 형성하고, 액체 배양 배지와 약물을 공급하기 위한 얇은 층의 상단에 개구면을 구비한 새로운 챔버를 발명하고 이를 DAC 시스템으로 명명하였다. 또한 이 DAC 시스템이 약물의 DST, 약물 스크리닝 및 결핵 진단에 매우 빠르고 간편하고 효과적임을 확인하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
- [11] 따라서, 본 발명의 일 양상은 새로운 구조의 생리활성 검사용 구조물, 및 이를 포함하는 생리활성 검사 시스템을 제공하는 것이다.
- [12] 또한, 본 발명의 다른 양상은 상기 생리활성 검사용 구조물을 이용하여, 생리활성 검사, 박테리아의 항생제 감수성 검사, 항생제 스크리닝 및, 박테리아의 진단 방법을 제공하는 것이다.

[13]

과제 해결 수단

- [14] 본 발명의 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명의 일 양상은
- [15] 플레이트 본체;
- [16] 상기 플레이트에 하나 이상으로 배열된 배양 유닛 (100); 및
- [17] 고체 박막을 상기 배양 유닛 바닥면에 형성할 수 있는 밀판(110);을 포함하는 생리 활성 검사용 구조물을 제공한다.
- [18] 상기 생리 활성 검사는 약제 감수성, 약제 스크리닝, 또는 세균 배양 진단일 수 있다.
- [19]
- [20] 상기 밀판의 상부에는 수용홈(120)이 추가로 구비될 수 있다.
- [21] 상기 밀판에는 고형화제를 함유한 액상 매질과 생물학적 물질의 혼합 용액을 주입할 수 있는 주입구 (111)가 형성될 수 있다.
- [22] 또한, 상기 밀판(110)은 하나 이상의 연결부재(113)에 의하여 플레이트의 격벽과 연결되며, 상기 연결부재 사이에는 절개홈(114)이 형성될 수 있다.
- [23] 또한 상기 밀판(110)에는 하나 이상의 관통공(112)이 형성될 수 있다.
- [24] 상기 배양 유닛(100)의 폭은 바람직하게는 1 내지 50 mm X 1 내지 50 mm이며, 상기 배양 유닛의 높이는 바람직하게는 1 내지 50 mm일 수 있다.
- [25] 또한, 상기 수용홈(120)의 폭은 바람직하게는 1 내지 5 mm이며, 상기 수용홈의 높이는 바람직하게는 1 내지 3 mm일 수 있다.
- [26] 또한, 고형화제를 함유한 액상 매질과 생물학적 물질의 혼합 용액은 밀판 하부에서 고화되어, 상기 생물학적 물질이 고정된 고체 박막을 형성할 수 있다.
- [27] 상기 박막의 두께는 1 μ m 내지 10mm일 수 있으며, 상기 혼합 용액 내에서의 생물학적 물질의 밀도는 10¹ 내지 10⁸⁰ cfu/ml 일 수 있다.
- [28] 상기 고형화제는 그 종류를 제한하지 않으나, 한천(agar), 아가로즈(agarose), 젤라틴(gelatin), 알지네이트(alginate), 콜라겐(collagen) 또는 피브린(fibrin)일 수 있다.
- [29] 상기 배양 유닛 내부에 상기 생리활성물질을 더 포함할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 상기 생리활성물질은 상기 수용홈에 동결 건조된 형태로 포함될 수 있다.
- [30] 상기 플레이트 본체, 배양 유닛 및 밀판은 투명 또는 반투명한 재질로 이루어진 것일 수 있다.
- [31]
- [32] 또한, 본 발명의 다른 양상은
- [33] 고형화제를 함유한 액상 매질과 생물학적 물질의 혼합 용액을 상기의 생리활성 검사용 구조물의 바닥면에 제공하는 단계;
- [34] 상기 혼합 용액을 고화시켜 상기 생물학적 물질이 고정된 고체 박막을 형성하는 단계;

- [35] 생리활성물질을 상기 고체 박막에 공급하여 상기 생리활성물질이 상기 고체 박막 내부로 확산되도록 하는 단계; 및
- [36] 상기 생리활성물질에 대한 상기 생물학적 물질의 단일 세포들의 개별적인 반응을 관찰하거나, 상기 생물학적 물질의 콜로니의 형성 여부 또는 콜로니 숫자(colony forming unit, CFU)을 관찰하는 단계를 포함하는, 생리활성 검사 방법을 제공한다.
- [37] 상기 방법은 상기 생리활성물질에 대한 상기 생물학적 물질의 단일 세포들의 개별적인 반응, 상기 생물학적 물질의 콜로니의 형성 여부 또는 콜로니 숫자(colony forming unit, CFU)를 이미징하여 얻은 이미지 분석 결과를 수득하는 단계를 더 포함할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 상기 이미지 분석 결과에 기초하여 상기 생리활성물질의 최소억제농도(MIC)를 결정하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [38]
- [39] 또한, 본 발명은
- [40] 고형화제를 함유한 액상 매질과 박테리아의 혼합 용액을 상기의 생리활성 검사용 구조물의 바닥면에 제공하는 단계;
- [41] 상기 혼합 용액을 고화시켜 상기 박테리아가 고정된 고체 박막을 형성하는 단계;
- [42] 항생제를 상기 고체 박막에 공급하여 상기 항생제가 상기 고체 박막 내부로 확산되도록 하는 단계;
- [43] 상기 항생제에 대한 상기 박테리아의 단일 세포들의 개별적인 반응을 관찰하거나, 상기 박테리아의 콜로니의 형성 여부 또는 콜로니 숫자(colony forming unit, CFU)을 관찰하는 단계;를 포함하는, 박테리아의 항생제 감수성 검사 방법을 제공한다.
- [44] 상기 방법은 바람직하게는 상기 단일 세포들의 개별적인 변화 또는 콜로니의 형성 여부 또는 콜로니 숫자(colony forming unit, CFU)를 이미징하여 얻은 이미지 분석결과에 기초하여 상기 항생제의 최소 억제농도(MIC)를 결정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [45] 상기 박테리아는 결핵균 또는 비결핵성 항산균 (NTM, Nontuberculous mycobacteria) 균일 수 있으며, 상기 결핵균은 다제내성 (multi-drug-resistant, MDR) 결핵균, 광범위 약제내성 (extensively drug-resistant, XDR) 결핵균, 완전 약제내성 (totally drug-resistant, TDR) 결핵균 등일 수 있다.
- [46] 상기 박테리아의 항생제 감수성 검사 방법은 접종효과 (inoculum effect)가 없는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [47]
- [48] 또한, 본 발명의 다른 양상은
- [49] 고형화제를 함유한 액상 매질과 박테리아의 혼합 용액을 상기의 생리활성 검사용 구조물의 바닥면에 제공하는 단계;

- [50] 상기 혼합 용액을 고화시켜 상기 박테리아가 고정된 고체 박막을 형성하는 단계;
- [51] 임의의 항생제를 상기 고체 박막에 공급하여 상기 항생제가 상기 고체 박막 내부로 확산되도록 하는 단계;
- [52] 상기 항생제에 대한 상기 박테리아의 단일 세포들의 개별적인 반응을 관찰하거나, 상기 박테리아의 콜로니의 형성 여부 또는 콜로니 숫자(colony forming unit, CFU)을 관찰하는 단계;를 포함하는, 항생제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [53] 상기 방법은 상기 단일 세포들의 개별적인 변화 또는 콜로니의 형성 여부 또는 콜로니 숫자(colony forming unit, CFU)를 이미징하여 얻은 이미지 분석결과에 기초하여 상기 항생제의 최소 억제농도(MIC)를 결정하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [54]
- [55] 또한, 본 발명의 일 양상은
- [56] 고형화제를 함유한 액상 매질과 박테리아의 혼합 용액을 상기의 생리활성 검사용 구조물의 바닥면에 제공하는 단계;
- [57] 상기 혼합 용액을 고화시켜 상기 박테리아가 고정된 고체 박막을 형성하는 단계;
- [58] 상기 박테리아의 배양 배지를 상기 고체 박막에 공급하여 상기 배양 배지가 상기 고체 박막 내부로 확산되도록 하는 단계; 및
- [59] 상기 박테리아의 단일 세포들의 개별적인 반응을 관찰하거나, 상기 박테리아의 콜로니의 형성 여부 또는 콜로니 숫자(colony forming unit, CFU)을 관찰하는 단계;를 포함하는 박테리아의 진단 방법을 제공한다.
- [60] 상기 박테리아의 배양 배지에는 항생제가 추가로 포함될 수 있으며, 상기 진단 방법은 약물 감수성 검사와 동시에 수행될 수 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [61]
- [62] 또한, 본 발명의 다른 양상에서는
- [63] 고형화제를 함유한 액상 매질과 생물학적 물질의 혼합 용액을 고화시켜 만든 박막을 바닥면에 구비하며, 생리활성물질을 배양 유닛에 구비한,상기의 생리활성 검사용 구조물;
- [64] 상기 검사용 구조물을 지지하고 관찰하기 위한 스테이지; 및
- [65] 상기 생리활성물질의 확산에 의한 전달에 따른 상기 생물학적 물질의 단일 세포들의 개별적인 변화 또는 콜로니의 형성 여부 또는 콜로니 숫자(colony forming unit, CFU)을 이미징하여 얻은 이미지 분석결과에 기초하여 상기 생리활성물질의 최소 억제농도(MIC)를 결정하기 위한 측정장치를 포함하는, 생리활성 검사 시스템을 제공한다.
- [66] 상기 측정장치는 이미지화 시스템 및 이미지 처리 시스템을 포함할 수 있다.
- [67]

발명의 효과

- [68] 본 발명에서 제공하는 생리 활성 검사용 구조물은 박테리아 특히, 결핵균에 대한 약물 감수성 검사, 약물 스크리닝 및 진단을 매우 빠르고 간편하게 수행할 수 있다. 특히, 본 발명에 따른 검사용 구조물을 이용하는 경우 접종효과와 무관하게, 또는 인간의 객담을 농축과정 없이 전처리만으로도 DST 및 진단이 가능한 바, 종래 개발된 결핵 진단 또는 DST 시스템에 비하여 월등히 빠르고 정확하며, 간편하게 검사를 수행할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 상기 구조물은 결핵 진단과 약물감수성 검사를 동시에 수행할 수 있도록 하는바, 본 발명에서 제공하는 기술은 종래 기술을 효과적으로 대체할 수 있다.

[69]

도면의 간단한 설명

- [70] 도 1은 본 발명에 따른 DAC의 모식도를 나타낸 도이다.
- [71] 도 2a는 본 발명에 따른 검사용 구조물의 일 구현예의 평면도를, 도 2b는 본 발명에 따른 검사용 구조물의 제1의 일 구현예의 사시도를 나타낸 도이다.
- [72] 도 3a는 본 발명에 따른 검사용 구조물의 일 구현예의 평면도를, 도 3b는 본 발명에 따른 검사용 구조물의 제2의 일 구현예의 사시도를 나타낸 도이다.
- [73] 도 4는 구체적인 DAC 칩 및 이를 이용한 DST의 방법을 나타낸 도이다.
- [74] 도 5는 아가로오스로부터 항생제인 로도민 B가 확산되는 모습을 나타낸 도이다.
- [75] 도 6는 약물감수성 측정시 시간경과 이미지 및 처리된 이미지를 나타낸 도이다.
- [76] 도 7는 도 6의 이미지를 순차 디지털 데이터 (digital date)를 이용하여 처리하여 나타낸 성장 곡선이다.
- [77] 도 8는 DAC 및 MGIT 960 상에서의 NALC-NaOH 방법으로 49 H37Rv 객담 샘플에서 *M. tuberculosis* 성장을 검출하는데 필요한 시간을 비교한 결과이다.
- [78] 도 9는 MGIT 960 및 DAC 상에서의 NALC-NaOH 방법 또는 직접 (농축하지 않은) 접종 방법을 수행 한 결과를 비교한 도이다.
- [79] 도 10는 접종농도 계산을 위하여 7H11 배지에서 콜로니를 개수한 결과이다.
- [80] 도 11는 첫번째 임상균주인 TDR 102 환자 균주의 상기 약물에 대한 MIC를 구하기 위하여 약물의 농도별 균주의 생장을 이미지화한 것이다.
- [81] 도 12는 상기 도 11의 이미지를 수치화하여 그래프화한 것이다.
- [82] 도 13는 첫번째 임상균주인 TDR 103 환자 균주의 상기 약물에 대한 MIC를 구하기 위하여 약물의 농도별 균주의 생장을 이미지화한 것이다.
- [83] 도 14는 상기 도 13의 이미지를 수치화하여 그래프화한 것이다.
- [84]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[85]

- [86] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들

실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[87]

[88] **실시예 1: DAC 시스템의 개발 및 DST의 검증**

[89] **1.1 시료**

[90] 본 발명에서 아가로오스가 MTB의 고정 물질로서 사용되었다. 고온의 아가로오스 용액을 사용하는 경우에는 열충격이 있을 수 있으므로, 아가로스 용액을 TB의 스톱 용액과 혼합 하였다. 열충격을 줄이기 위하여, 0.5 % 농도의 아가로오스를 사용하였으며, 이는 해당 농도의 아가로오스 용액은 37 °C에서 고체화 되지 않기 때문이다. 또한, 배양 배지와 약물의 확산은 아가로오스의 낮은 농도에서 향상된다. DST에 대한 약물은 Sigma-Aldrich 에서 구입 하였다. 액체 배양 배지는 10 % OADC가 포함된 7H9 (BD)를 사용하였다.

[91]

[92] **1.2 염색**

[93] TB, H37Rv, MDR 및 XDR의 표준 균주는 Korean Institute of Tuberculosis로부터 취득하였다. DST 과정을 위하여 다수의 콜로니가 형성될 때까지 TB 균주를 LJ 배지에 선배양 하였다.

[94]

[95] **1.3 칩의 디자인 및 이의 제조**

[96] TB에 대한 시간경과 현미경 이미징을 위하여, 충분한 약물의 전달 및 광 투명도를 위하여 아가로오스에서의 TB의 고정화를 제공하기 위한 테스트 칩이 필요하였다. 이러한 요구 사항을 충족시키기 위해, 신규한 칩을 설계 및 제조하였으며, 이를 DAC (Disc Agarose Channel)로 명명하였다.

[97] DAC의 모식도를 도 1과 같이 나타내었다.

[98] 또한, DAC의 구체적인 사시도 및 평면도를 도 2a, b 및 도 3 a, b와 같이 표시하였다.

[99] DAC 칩은 아가로오스 및 TB 혼합물이 로딩되는 디스크 형 채널(밀판)로 구성되며, 배양 배지와 약물의 확산을 향상시키기 위한 구조, 즉 배양 배지, 약물, 열린 공간, 및 홀을 포함하는 웰로 이루어져있다.

[100] 구체적으로, DAC는 기본적으로 플레이트 본체 상에서, 하나 이상으로 배열된 배양 유닛과 고체 박막을 상기 배양 유닛 바닥면에 형성할 수 있는 밀판으로 구성되며, 추가적으로 상기 디스크형 채널 (밀판) 상부에는 수용홈을 추가로 구비할 수 있다. 또한, 밀판에는 아가로오스 및 TB 혼합물을 주입할 수 있는 주입구 (inlet)가 형성되어 있으며, 상기 밀판은 플레이트의 격벽과 하나 이상의 연결부재에 의하여 연결되며, 연결부재 사이에는 절개홈이 형성되어 있다. 또한, 밀판은 하나 이상의 관통공을 구비할 수 있다. 디스크 형상의 채널의 깊이는 스페이서의 높이에 의해 결정되고, 그 값은 300um이다. TB의 DST를 위해서는 배양에 긴 기간이 필요하며 배양 배지는 TB에 충분히 공급되어야 한다. 배지의

공급을 위한 주사위 펌프의 사용은 불편하며 시스템에 제한이 따른다. 따라서, 각 웰을 24 웰 플레이트의 한 웰의 크기로 설계하였다. 면적에 있어서, 웰의 길이와 높이는 각각 11mm 및 10mm이며, 1 개월 이상의 배양에 적합하도록 배지 1 ml에 대해 포함할 수 있다.

- [101] PDMS를 이용한 칩의 제조는 칩의 크기를 제한하고, 제조 효율이 낮다. 따라서, 사출 성형을 이용하여 DAC 칩을 제조하였다. 3D 설계 도구 (Solidworks)를 이용하여 칩을 설계 한 후, 알루미늄 금형을 가공했다. PMMA (Poly(methyl methacrylate))을 칩의 제작에 이용하였다. 칩을 제작 한 후, 폴리 카보네이트 필름을 용매 접합법을 이용하여 칩의 하부에서 결합시켰다. 챔버는 3D 설계 툴 및 사출 성형 공정을 이용하여 제조 하였다. 또한, 하부 필름, 폴리 카보네이트는 용매 (중량비율 80:20, 에탄올: 1,2-dichloroethane, Sigma-Aldrich)에 의하여 압력에 의하여 접합되었다. 칩의 접합 후, 친수성 처리를 위하여 O₂플라즈마 처리를 행하였다. 살균을 위하여 감마선 처리를 5 시간 동안 수행하였다.

[102]

[103] **1.4 DST 과정**

- [104] DAC 칩에서의 DST를 위하여, 친수성 향상을 위한 O₂ 플라즈마 처리 및 살균을 위한 감마 방사선 처리를 칩에 수행하였다. TB 스톡 용액의 준비를 위하여, LJ 배지내의 콜로니를 멸균 된 루프를 사용하여 수집 하였다. U 자형 바닥 튜브 내로 포집된 콜로니는 2mm 직경의 유리 구슬로 볼텍싱 (vortexing)에 의해 분산되었다. 안전상의 문제로, 볼텍싱된 튜브는 15 분 동안 유지하였다. 안정화 후 10% OADC를 포함하는 7H9 배지를 McFarland 1.5~3.0 를 포함하는 스톡용액을 제조하기 위하여 첨가하였다. 스톡 용액은 볼텍싱을 이용하여 37 °C에서 0.5 % 아가로오스와 혼합하였다. 40uL의 TB 스톡 및 아가로오스 혼합물을 DAC 칩의 입구 (inlet)에 로딩하고, 아가로오스는 1분 뒤 실온에서 고체화되었다. 10 % OADC를 포함하는 7H9로 희석된 1 ml TB 약물을 DAC 칩에 첨가하였다. 배양 배지 중의 약물은 아가로오스로 확산되었다. 이 과정 후에, DAC 칩은 배지의 증발을 방지하기 위하여 공기 투과성 필름으로 밀봉하고, 37 °C에서 온도 조절 배양 챔버내에서 배양하였다. 아가로오스의 가장자리에 하나의 영역을 40X 렌즈의 반전 현미경으로 시간 경과 방법을 사용하여 매일 영상화하였다. 이러한 모든 과정은 클린 벤치에서 처리되었다.

[105]

[106] **1.5 MTB 의 DST 를 위한 3D 배양을 위한 DAC 칩의 이용**

- [107] 본 발명에서, 아가로오스를 MTB의 DST를 위한 3D 배양 매트릭스로서 사용하였다. MTB에 대한 장기간 배양을 위하여, 안정된 3 차원 배양 매트릭스가 필요하다.
- [108] 구체적인 DAC 칩 및 이를 이용한 DST의 방법을 도 4에 나타내었다. 아가로오스 매트릭스의 안정성을 확인하기 위해, 인산염 완충 식염수에서 3:1의 부피비로 0.5 % 아가로오스를 마이크로 비드와 혼합하였다. 혼합물을 DAC 칩의

입구 (inlet)으로 로딩시키고, 7H9 배양 배지는 웰에 첨가하였다. MTB의 DST 조건을 위하여 칩을 37 °C 챔버에서 배양하였다. 아가로오스 매트릭스 내의 비드는 3주 동안 동일한 장소에서 잘 관찰되었으며, 이는 3D 배양 매트릭스가 MTB의 DST에 충분히 안정적임을 나타낸다. 아가로오스 매트릭스 중에 H37Rv를 배양하였을 때, 3 주 동안의 단일 세포 추정 동안 구조 역시 잘 유지되었다. 액체 배양 배지 및 약물의 균일한 공급을 위하여 아가로오스 매트릭스를 적절하게 주형에서 형성하였다. 아가로오스 매트릭스의 형성의 시각화를 위하여, 3:1의 부피비로 0.5 % 아가로오스와 식품 염료의 혼합물을 칩에 코팅하고 시각화 하였다. 아가로오스 매트릭스는 DAT 칩 내에 잘 형성되었다.

[109]

[110] **1.6 DAC 칩에서의 확산 특성**

[111] 아가로오스를 TB의 고정을 위해 사용하였다. 아가로오스 매트릭스에 전달하기 위하여 TB 약물을 액체 배지인 7H9 브로스에 용해시켰다. 본 발명에 있어서, DAC 칩의 이미징 영역의 모서리에 균일 한 약물의 농도는 정확한 DST 결과를 위하여 필요하다. 이미징 영역에서의 소분자 (분자량 200)의 확산에 필요한 시간을 계산하였다. 이미징 영역에서의 분자의 농도는 동일하였다. DAC 칩에서 아가로오스 매트릭스의 확산 특성의 시각화를 위하여, TB 약물 유사한 분자량을 가진 로다민 B (rhodamine B) (분자량: 479.02 g/mol)을 사용하였다. 이들 분자의 다양한 농도에서, 확산 균일도를 측정하기 위해 이미징 영역을 0 분, 10 분, 30 분 및 1 시간에 이미징화하였다. MTB의 세포 분열이 약 20 내지 24시간임을 고려하여, MTB의 DST가 문제없음을 나타내기 위하여 형광 염료를 로딩하였으며, 로딩 후 30분만에 형광신호가 균일화되었다. 또한, MTB의 생장률이 칩의 전체 영역에서 동일함을 나타내었으며, 이는 액체 배양 배지와 약물이 칩에 동일하게 확산됨을 나타내었다.

[112] 도 5은 아가로오스로부터 항생제인 로도민 B가 확산되는 모습을 나타낸 도이다. 구체적으로 A는 로도민 B를 로딩한 직후, B, C, D는 각각 연속적으로 10분 간격으로 촬영한 도이다. 확산 시간은 0.1 초였다.

[113]

[114] **1.7 DAC 칩에서 단일 세포의 추적**

[115] 종래 DST 방법에서는 MTB의 성장은 고체 배지에서 육안에 콜로니 형성을 관찰함으로써, 및 액상 배지에서 산소 소비에 따른 형광 신호의 측정에 따라서 간접적으로 측정하였다.

[116] 본 발명에서 제공하는, 단일 세포 성장 추적 방법은 다양한 약물 조건하에서 MTB 성장의 측정을 위해 사용되었다. DAC 칩 내의 MTB 세포는 수일 동안 매일 추적하였다. 하나의 이미징 영역 (200um*300um)에서, TB는 매우 다양한 크기로 존재하며, 이는 MTB 세포가 고체 배지에서 콜로니 (큰 클러스터 형태)로 준비되기 때문이다.

[117]

[118] **1.8 자동 감수성 측정을 위한 이미지 처리**

[119] 고체 배지 (LJ 배지)상에서의 종래 DST에서는, 육안으로 MTB의 성장 속도를 측정하기 위해 숙련된 의사가 필요하였으며, 이에 따라서 에러가 발생할 수 있었다.

[120] 본 발명에서는 이러한 에러를 극복하기 위하여 MTB의 약물 감수성을 결정하는 데 자동 이미지 처리를 사용하였다. TB 약물 조건하에의 MTB 성장을 디지털화하기 위해 CCD 카메라와 현미경 시간 경과 이미지를 사용하였다. CCD 카메라의 raw 이미지를 바이너리 형식 (binary format)으로 처리하였다. MTB 콜로니의 경계가 명확하지 않으며, 이미징 영역에 이물질 존재에 의하여 모든 백색 영역이 성장하는 MTB 세포를 나타내지는 않더라도, 대부분의 백색영역은 아가로스 매트릭스 내의 MTB의 성장과 관련이 있으며, 이는 MTB 성장과 비례한다.

[121] 도 6은 시간경과 이미지 및 처리된 이미지를 나타낸 도이다.

[122] A) 및 A')는 저항성 케이스이며, B) 및 B')는 감수성 케이스이다. 저항성 케이스에서, 이미징 영역에서 MTB의 많은 콜로니들이 형성된 것을 확인할 수 있다. 이미지 처리 후, 백색영역은 이미지 내에서 성장하는 MTB콜로니를 나타낸다. 감수성 케이스에서는 MTB 성장에 대한 이미지의 차이가 없었다.

[123] 이미지에서 백색 영역은 화소 수를 계수함으로써 계산되었다. 순차 디지털 데이터 (digital date)를 이용하여, 시간에 따른 성장 곡선을 도 7에 표시하였다. 임계 값을 설정함으로써 TB 약물의 다양한 농도 하에서 TB 균주 약물 감수성을 결정 하였다.

[124] 도 7는 저항성 및 감수성 케이스에서의 성장을 정량화한 것이다. 이미지 내의 MTB의 성장 영역을 측정하여 성장 곡선을 구성하였다. 저항성 케이스에서는 이미지가 연속적으로 증가하는 반면, 감수성 케이스에서는 변화가 관찰되지 않았다.

[125]

[126] **1.9 DAC 시스템을 이용한 MTB의 DST**

[127] MTB DST은 성장의 예측 또는 하나의 단일 약물의 '임계 농도'의 존재에서 MTB 균주의 성장 또는 비성장을 측정하는 것에 기초한다. 임계 농도는 해당 농도에서 감수성 TB 균주의 경우 억제되며, 성장하는 경우 임상적으로 저항성이 있는 것으로 판단한다. DAC 시스템에서는, DAC 시스템이 고체 배양 시스템에 비하여 액체 배양 시스템에 더욱 유사할 수 있기 때문에, 각각의 항 결핵 약물의 임계 농도는 MGIT의 임계 농도를 기준으로 결정된다. 각 항 결핵 약물의 임계 농도를 설정 한 후, 결핵균의 최소 억제 농도 (MIC) 및 감수성을 획득하기 위해 DAC 시스템에 의한 DST를 대략적 임계 농도의 순차적 2 배의 농도를 조사하였다.

[128] 항 결핵 약물 농도를 충분한 테스트하여 MIC 값을 수득할 수 있었다. 그 뒤,

MIC 값이 임계 농도 미만인 경우, 실험된 균주는 감수성이 있다. 반면, MIC 값이 임계농도 초과인 경우, 실험된 균주는 저항성을 가지는 것이다. 리팜핀의 경우, DAC 시스템에 의한 DST는 0.25, 0.5, 1.0 및 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 임계 농도까지 수행되었으며, 배양 시간에 따른 각 항결핵 약물의 농도로부터 성장 곡선을 생성하였다. 감수성은 임계 농도의 기준에 따라 MIC 값을 측정함으로써 결정되었다.

- [129] MDR, XDR 및 TDR의 감염 환자가 전세계적으로 증가함에 따라서, 신속한 DST는 공중 보건 및 진단을 위하여 시급하게 요구되고 있다. DAC 시스템은 미세 유체 채널의 개념에 따라서 빠른 DST를 가능하게 한다. 신속한 DST를 위한 DAC 시스템의 유효성을 확인하기 위하여, TB의 악성 표준 균주인 H37Rv 및 임상적 MDR 및 XDR 균주를 이용하여 이소니아지드, 리팜피신, 스트렙토마이신 및 에탐부톨 등과 같은 항결핵 약물의 감수성을 확인하기 위해 테스트하였다.
- [130] 기존의 DST인 LJ 배지 DST를 품질 관리를 위하여 조성 대상으로서 사용하였으며, 이는 LJ 배지 DST를 골드 스탠다드로 여기고 있기 때문이다. H37Rv, MDR, 및 XDR에 대한 이소니아지드, 리팜피신, 스트렙토마이신 및 에탐부톨의 MIC 값을 DAT 시스템을 이용하여서 결정하였다.
- [131] 이 MIC 값으로부터, 이소니아지드, 리팜피신, 스트렙토마이신 및 에탐부톨에 대한 H37Rv, MDR, 및 XDR의 감수성을 임계 농도 하에서, 또는 아닌 곳에서 MIC 값을 측정함으로써 결정하였다.
- [132] 실험된 모든 균주의 이미지는 5일간 동일한 위치에서 시간 경과 방법을 이용하여 촬영되었다. 5일간의 매일의 시간 경과 데이터를 이용하여 이미지를 처리하고 그래프를 표시한 후, H37Rv에 대한 4개의 항결핵 약물의 MIC 값을 결정하였다.
- [133] 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.
- [134] 표 1
- [Table 1]

A	Sample#	H37Rv	MDR	XDR
	INH	0.05	>0.2	>0.2
	RFP	0.25	>2.0	>2.0
	SM	2.0	>4.0	>4.0
	EMB	5.0	>10.0	10.0

B	Sample#	H37Rv	MDR	XDR
	INH	S	R	R
	RFP	S	R	R
	SM	R	R	R
	EMB	S	R	R

- [135]
- [136] 상기 표는 DAC 시스템을 이용하여 DST를 측정한 결과이다.
- [137] H37Rv, MDR 및 XDR TB 균주의 4개의 주요 결핵 약물, 이소니아지드 (INH), 리팜피신 (RFP), 스트렙토마이신 (SM) 및 에탐부톨 (EMB)에 대한 감수성을 테스트하였다. 시험 농도는 각 약물의 임계 농도로부터 결정하였다.
- [138] 시간 경과 이미지에서 MIC 결정 후, 그 값은 브레이크 포인트에 의해 검사하고,

약물 감수성을 결정 하였다.

[139] A는 DAC로부터 수득한 DST의 MIC 이다. B는 MIC 데이터와 약물의 임계 농도로부터 감수성을 결정한 것이다.

[140] A에서 확인 된 바와 같이, 이는 각각 이소니아지드 (isoniazid) 0.05 $\mu\text{g/ml}$, 리팜피신 0.25 $\mu\text{g/ml}$, 스트렙토 마이신 2.0 $\mu\text{g/ml}$, 에탐부톨 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 인 것으로 확인되었다. MIC 데이터로부터, H37Rv 균주는 이소니아지드, 리팜피신, 스트렙토 마이신 및 에탐부톨에 민감함을 확인하였으며, LJ 배양 시험에서도 동일한 결과가 나타났다.

[141] 다른 두 시험 균주에서는, MDR 및 XDR 환자 균주는 DAC의 시스템에서 모든 약물에 대하여 저항성을 나타내는 것을 확인하였다. 골드 스탠다드인 LJ 배양 방법을 이용하여 민감성 결과는 입증하였다. DAC 시스템에서의 모든 감수성 결과는 골드 스탠다드 방법의 결과와 일치하였다. 이러한 검증 결과로부터, DAC 시스템은 DST 시간을 감소하고 항 결핵 약물에 대한 감수성 및 내성을 정확히 진단할 수 있음을 입증하였다.

[142]

[143] 실시예 2: 종래 배양진단제품과의 DAC와의 비교

[144] 본 발명에 따른 DAC 시스템과 종래 TM의 배양 진단 방법과 비교하여, DAC 시스템의 유용성을 확인하였다.

[145]

[146] 2.1 회수율 (recovery rate)의 비교

[147] 같은 객담 샘플을 3가지 시스템에 나누어서 실험하여 그 결과를 비교하였다.

[148] 구체적으로 6/25의 smear-positive 양성 폐결핵 환자를 대상으로 실험을 수행하였다. 25개의 임상 객담 샘플에서, 양성율은 3으로 결정되었다 (12.0 %). 양성인 3개의 시료에서, 1개의 시료는 Ogawa s 배지, Middlebrook 7H11 배지, 및 DAC system에서 모두 양성, 1개의 시료를 7H11 배지 및 DAC system에서 양성, 및 1개의 시료는 DAC 시스템에서 양성이었다. Ogawa s medium, Middlebrook 7H11 medium, 및 DAC system에서의 음성률은 각각 23 (92.0%), 22 (88.0%), 및 21 (84.0%)이었다. 모든 방법에서 1 (4.0%)의 오염이 확인되었다.

[149] 세 배양 방법 중 M. tuberculosis의 회수율은 비교결과, DAC system (12.0%)이 Ogawa's 배지 (4.0%) 및 Middlebrook 7H11 배지 (8.0%) 보다 높은 것으로 확인되었다. 3가지 방법에서 오염률은 동일한 것을 확인되었다.

[150] 구체적인 비교결과를 하기 표 2에 나타내었다.

[151] 표 2

[Table 2]

Smear grade	No. (%) of specimens with result determined by:									
	Total no. of specimens (n = 25)	Ogawa's medium (n = 25)			Middlebrook 7H11 medium (n = 25)			DAC system (n = 25)		
		Specimens (n = 25)	Positive samples	Negative samples	Contamination	Positive samples	Negative samples	Contamination	positive samples	negative samples
Negative	19 (76.0)		19 (76.0)			19 (76.0)			19 (76.0)	
Scanty										
1+	3 (12.0)		2 (8.0)	1 (4.0)		2 (8.0)	1 (4.0)		2 (8.0)	1 (4.0)
2+	2 (8.0)		2 (8.0)		1 (4.0)	1 (4.0)		2 (8.0)		
3+	1 (4.0)	1 (4.0)			1 (4.0)			1 (4.0)		
Total	25 (100.0)	1 (4.0)	23 (92.0)	1 (4.0)	2 (8.0)	22 (88.0)	1 (4.0)	3 (12.0)	21 (84.0)	1 (4.0)

[152]

[153] **2.2 종래 기술과의 콜로니 개수 (colony forming unit, CFU) 의 비교**

[154] 49 H37Rv 객담 샘플을 전처리 후, 균 수 (CFU) 확인을 위하여 각각 DAC 시스템과 Middlebrook 7H11 배지에 접종했다. 초기 균수는 $1 \times 10^4/\text{ml}$ 이었다. 객담에서 배양 방법으로 균수를 확인한 결과, DAC 시스템에 형성한 CFU 값과 기존방법으로 Middlebrook 7H11 배지에서 얻은 CFU의 값이 비슷하게 나타나는 것을 확인했다. 그러나, DAC 시스템에서는 CFU 결과가 9일 안에 나왔으며 Middlebrook 7H11 배지에서는 21일 정도에 결과가 나왔다. DAC 시스템에서 균수 평균은 $4.27 \log_{10} \text{CFU/ml}$ ($\text{SD} \pm 0.75$)이고, Middlebrook 7H11 배지에서 균수 평균은 $4.32 \log_{10} \text{CFU/ml}$ ($\text{SD} \pm 0.64$)이었다.

[155]

[156] **2.3 종래 기술과의 배양검출 시간의 비교**

[157] 결핵 배양 진단, 또는 DST에 이용되는 LJ 배지 방법의 경우, 4 내지 6주의 기간이 소요된다. 현재 결핵균을 배양 진단하는 가장 빠른 제품으로서 MGIT 960 (BD BACTEC™)이 존재한다. 본 발명에 따른 DAC 시스템과 상기 종래 기술과의 배양 진단 시간을 비교하였다.

[158] 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[159] 도 8은 DAC 및 MGIT 960 상에서의 NALC-NaOH 방법으로 49 H37Rv 객담 샘플에서 *M. tuberculosis* 성장을 검출하는데 필요한 시간을 비교한 결과이다.

[160] 도 8에서 나타난 바와 같이, TTD은 MGIT 960에서 5 내지 13 일, DAC에서 5 내지 9일 이었다. *M. tuberculosis*의 가장 높은 검출수준은 MGIT 960 및 DAC 시스템에서 7일이었다.

[161]

[162] 접종된 *M. tuberculosis* 농도 별 비교결과를 하기 표 3에 나타내었다.

[163] 표 3

[Table 3]

Sample (n=49)	Predictor	No. (%) of positive samples	Median TTD (day)									
			5	6	7	8	9	10	11	12	13	
MGIT 960 system	No. of H37Rv ($\log_{10}$ cfu/ml)											
	Contamination	4 (8.2)										
	2 - 3	2 (4.1)							1		1	
	3 - 4	7 (14.3)	1	1		5						
	4 - 5	28 (57.1)		1	22	5						
	5 - 6	8 (16.3)		7	1							
	Total	49 (100.0)										
DAC system	Contamination											
	2 - 3	2 (4.1)					2					
	3 - 4	10 (20.4)		2	6		2					
	4 - 5	28 (57.1)	5	10	10		3					
	5 - 6	9 (18.4)			9							
		Total	49 (100.0)									

[164]

[165] 구체적으로, Middlebrook 7H11 배지 중 CFU에 따른 TTD를 결정하기 위하여, 총 49 H37Rv 객담 샘플을 *M. tuberculosis* 검출을 위하여 사용하였다.

[166] DAC 시스템에서 결핵균을 검출하기 위한 시간은 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 21, 28, 35, 42 일 이었다.

[167] Middlebrook 7H11 배지 중의 CFU에 따른 Median TTD는 DAC 시스템에서 7 일(5-6 $\log_{10}$ CFU/ml) 내지 9 일(2-3 $\log_{10}$ CFU/ml)이었다.

[168] Middlebrook 7H11 배지 중의 CFU에 따른 TTD는 MGIT 960에서 6 일(5-6 $\log_{10}$ CFU/ml) 내지 12 일(2-3 $\log_{10}$ CFU/ml)이었다.

[169] *M. tuberculosis* 가 2-3 $\log_{10}$ CFU/ml인 경우, 결핵균의 Median TTD는 MGIT 960에서 12일, DAC 시스템에서는 9일에 나타났다.

[170] *M. tuberculosis* 가 3-4 $\log_{10}$ CFU/ml인 경우, 결핵균의 Median TTD는 MGIT 960에서 8일, DAC 시스템에서 7일에 나타났다.

[171] *M. tuberculosis* 가 4-5 $\log_{10}$ CFU/ml인 경우, 결핵균의 Median TTD는 MGIT 960에서 7일, DAC 시스템에서 6일에 나타났다.

[172] *M. tuberculosis* 가 5-6 $\log_{10}$ CFU/ml인 경우, 결핵균의 Median TTD는 MGIT 960에서 6일, DAC 시스템에서는 7일에 나타났다.

[173] *M. tuberculosis* 가 2-5 $\log_{10}$ CFU/ml인 경우, *M. tuberculosis*의 성장의 검출은 DAC 시스템 (6 내지 9일 범위)이 MGIT 960 (7 내지 12일 범위)에 비하여 더 빨랐다. *M. tuberculosis* 가 5-6 $\log_{10}$ cfu/ml인 경우, *M. tuberculosis* 성장의 검출은 MGIT 960 (6 일)이 DAC 시스템 (7 일)에 비하여 더 빨랐다.

[174] MGIT 960에서 4/49 (8.2%)이 오염된 것으로 확인되었다. 액체 배양물 중 *M. tuberculosis*는 DAC 시스템에 비하여 더높은 위양성률을 보였다.

[175]

[176] **2.4 직접 접종 방법을 이용한 경우 MGIT960과 DAC 시스템의 비교**

[177] 객담에서 오염제거 처리 후, 바로 균을 접종하는 직접 접종 방법 (농축하지 않는)을 이용하여 MGIT960과 DAC 시스템의 효율을 비교하였다.

[178] 그 결과를 도 9에 나타내었다.

- [179] 도 9은 MGIT 960 및 DAC 상에서의 NALC-NaOH (농축하는) 방법 또는 직접 (농축하지 않는) 접종 방법을 수행 한 결과를 비교한 도이다.
- [180] DAC 시스템을 이용한 *M. tuberculosis* 성장의 검출에 필요한 시간은 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 21, 28, 35, 42 일이었다.
- [181] 접종에 앞서, 18 H37Rv 객담샘플을 2 % NALC-NaOH로 오염제거를 하고, 2개의 표본으로 분리하였다. 하나의 표본은 15분간 3,000 g에서 표준 프로토콜 (NALC-NaOH method)에 따라서 원심분리하였으며, 두번째 표본은 직접 (농축하지 않는) 방법에 이용하였다. NALC-NaOH (농축하는) 방법 및 직접 (농축하지 않는) 방법을 이용하여 전처리한 샘플들을 각각 MGIT 960과 DAC에 배양하였다.
- [182] 2가지 전처리 방법 즉, NALC-NaOH (농축하는) 방법 및 직접 (농축하지 않는) 방법을 이용한 DAC system 배양법과 NALC-NaOH (농축하는) 방법을 이용한 MGIT 960 배양방법은 비슷한 배양양상을 가지는 것으로 확인했다
- [183] DAC1 (5 내지 7 일 범위), DAC2 (5 내지 7 일 범위), 및 MGIT1 (6 내지 7 일 범위)에서 Median TTD 날짜는 7일이었다.
- [184] 다만, MGIT2 에서, 샘플로부터 *M. tuberculosis*를 검출하는데 소요된 Median TTD 날짜는 14일이었다 (7 내지 24일 범위).
- [185] 오염률은 DAC 시스템에서는 없는 반면, MGIT 960에서는 각각 MGIT1 (5.6%), MGIT2 (27.8%)가 오염된 것으로 확인되었다.
- [186] 즉, DAC 배양 방법은 객담 전처리에 상관없이, 양성 샘플이 5~7days 사이에 확인되는 반면, MGIT 960 배양 방법은 공급자가 권고하는 NALC-NaOH 방법에 의한 객담 전처리 방법을 사용해야만 6~7days 사이에 확인되었고, 위양성률이 적은 것을 확인할 수 있었다.
- [187]
- [188] **2.5 True negative 결과 도출에 필요한 시간의 비교**
- [189] 액체 배지 기반 MGIT 960의 경우 마이코박테리아의 검출 시간은 6 주이다.
- [190] 본 발명의 DAC를 이용한 True negative 결과 도출에 필요한 시간을 측정하였으며, 그 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

[191] 표 4

[Table 4]

Positive sample (n = 52)	TTD (day)									
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Recovery rates of <i>M. tuberculosis</i> (%)	11.5	34.6	82.7	82.7	96.2	96.2	96.2	96.2	96.2	100.0

[192]

- [193] 상기 표 4은 결핵균의 성장의 검출에 필요한 시간을 나타낸다. DAC에서 마이코박테리아의 회수율에 따라, 3개의 임상 객담 샘플 (25 임상 객담 샘플 중 3개의 양성 샘플) 및 49 H37Rv의 객담샘플에서의 *M. tuberculosis* 성장 검출에

소요되는 시간을 나타낸 도이다. DAC에서 *M. tuberculosis*의 검출에 필요한 시간은 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 21, 28, 35, 42 일 이었다.

- [194] 총 74개의 샘플에서 positive 샘플은 52개, negative 샘플은 22개, 및 contamination 샘플은 없었다. 52개의 양성 샘플 중에서 판단 일자 5days 기준으로 6/52 (11.5%)의 샘플이 negative에서 positive로 바뀌었고, 판단 일자 9days 기준으로 50/52 (96.2%)의 샘플이 negative에서 positive로 바뀌었고, 및 판단 일자 14days 기준으로 모든 샘플이 negative에서 positive로 바뀌었다. 또한 22개의 negative 샘플은 42 days까지 변하지 않았다. 이와 같은 결과는 DAC system에서 9days에 유의성 있는 배양결과가 나오며 ($p < 0.05$), 14 days에 정확한 모든 배양결과를 나타내는 것으로 판단된다. 또한 DAC system는 MGIT 960 보다 약 28 days 빨리 true-negative 판단을 할 수 있는 것으로 보인다.

[195]

- [196] 실시예 3: DAC 시스템에서 접종 효과 (Innoculum effect, IE) 존재 여부의 확인

- [197] 본 발명에서, 발명자들은 TB에 대한 주요 약물인 리팜핀, 이소니아지드, 에탐부톨, 스트렙토 마이신의 세균 활성을 DAC 시스템을 이용하여 평가하였으며, DAC 시스템이 세포 밀도의 변화에 영향을 받을지 여부에 대하여 평가하였다. 이 시스템은 접종 크기와 관계 없이, 재연가능하며 신뢰할 수 있는 약물의 MIC 값을 도출할 수 있다.

[198]

- [199] 3.1 시료 및 성장 조건

- [200] 폐결핵 환자로부터 얻은 결핵 균주 (*M. tuberculosis*)는 KIT(Korean Institute of Tuberculosis)에서 수집 하였다. 134 팬-감수성 (pan-susceptible) 균주 및 59 내성 균주를 포함하는 총 150개의 임상균주에 대하여, L-J를 이용하여 약물 민감성을 미리 확인하고, 본 발명에 이용하였다. 모든 분리물은 사용되기 전 L-J 배지에 신선하게 선배양 하였다.

- [201] 객담 시료는 Kent and Kubica에 개시되어 있는 바와 같이 N-acetyl-L-cysteine-NaOH방법으로 소화 및 정화하였다. 처리된 시료를 MGIT 바이알에 42 일 동안 배양하였다. 검출 일에, 모든 양성 튜브를 ZN 염색법을 사용하여 AFB 유무를 조사하고, 평행 튜브를 약제 감수성 테스트에 수행하였다.

- [202] 세개의 임상 ESBL 대장균 균주 및 하나의 비-ESBL 대장균 ATCC 균주를 락타마아제 기질 분석에 이용하였다. 대장균을 성장, 및 계대 배양 시켜 Mueller-Hinton broth (Difco Laboratories, Detroit, MI)에서 Mueller-Hinton agar (Difco) 상으로 분석 하였다.

[203]

- [204] 3.2 항생제

- [205] 모든 약물은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)에서 구입 하였다. 제조업사에서 권장하는 바와 같이, 분말을 데시케이터 (desiccator)에 보관하였다. 이소니아지드 (INH), 에탐부톨 (EMB), 스트렙토 마이신 (SM) 및 세페핌 (Cefepime)은 탈이온수

(DW)에, 리팜피신 (RIF)은 DMSO에 용해시켰다. 모든 스톡 용액은 0.22 μm 공극의 Millex-GS filter units (Millipore, Bedford, MA)을 통한 막 여과를 이용하여 멸균하였다. 각 항생제의 스톡 용액은 적은 분취량 (aliquots)으로 -80 °C에서 보관하였다. 동결한 약물 용액은 해동 후 즉시 사용하고, 나머지는 버리고 다시 냉동실에 저장하지 않았다. 작업 용액은 스톡 용액으로부터 새로 제조하고, 원하는 농도를 달성하기 위해 순차적으로 희석하였다.

[206]

[207] **3.3 DAC 시스템을 이용한 DST**

[208] ZN 염색으로 결핵균인 것이 확인된, L-J 슬로프 (slope) 또는 MGIT 튜브로부터 성장한 균주로 DST를 수행하였다. LJ 배양물로부터의 접종의 준비를 위해, 14일이 지나지 않은 콜로니를 성장 배양물로부터 추출하였다. 콜로니를 유리 비드와 함께 진탕하여 큰 덩어리를 분쇄하였다. 높은 밀도를 만들기 위하여 (~ 5×10^9 CFU/ml), 현탁액을 3000 g에서 10 분간 원심분리하고, 펠렛을 멸균 PBS에 재현탁하였다. 이어서, 현탁액을 액체 아가로오스에 첨가하여, 박테리아-아가로오스 혼합물에서 10^1 내지 5×10^8 CFU/ml의 범위 내로 접종하고, 메인 채널에 로딩하였다. 고체화 후, 각 항생제를 포함하는 7H9 브로스를 챔버에 적용하였다. 모든 세균 세포를 반전된 광학 현미경 (IS71, Olympus)로 이미지화하였다.

[209]

[210] **3.4 L-J 비레 방법 및 MGIT 960에 의한 DST**

[211] LJ 비레 방법을 본 발명의 참조로서 사용하였다. 접종의 범위가 10^1 내지 5×10^8 CFU/ml로 설정하는 것을 제외하고는, RIF 40 $\mu\text{g/ml}$, INH 0.1 $\mu\text{g/ml}$, EMB 2.0 $\mu\text{g/ml}$, SM 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 L-J 배지 상에서 표준 절차에 따라 모든 균주를 테스트하였다. MGIT 960를 사용하는 DST에서도 마찬가지로 접종의 크기를 제외하고 제조업체의 권고에 따라서 수행하였다.

[212] 검출 일에 접종물의 제조를 위하여, 모든 양성 튜브를 ZN 염색법을 사용하여 AFB 유무를 조사하고, 양성 반응 후 0, 3, 10, 15 일 후에 MGIT 960 및 DAC 시스템에서의 약물 감수성 테스트를 평행 튜브로 수행하였다.

[213]

[214] **3.5 극소희석 (microdilution) 방법에 의한 DST**

[215] 대장균에 대한 세페팜의 MIC를 박테리아 농도를 제외하고 표준 CLSI 지침을 사용하여 결정하였다. 브로스 극소희석 웰을 37 °C에서 16시간 배양후 확인하였다.

[216]

[217] **3.6 β -락타마아제 활성 분석**

[218] 대장균의 배양물은 초기 대수기 ($\text{OD}_{600}=0.4$)까지 성장시킨 후, 상청액으로부터 박테리아를 분리하기 위하여 3,000 g에서 10 분간 원심 분리하였다. 상청액을 0.45-mm 필터를 통해 여과하고, 배양여액으로서 보유하였다.

펠렛을 멸균 PBS로 두 번 세척하고, 얼음 상에서 6분 이상 60 %의 출력으로 30-s 펄스로 초음파처리하여 용해시켰다. 조용해물을 4 °C 및 20,000 g에서 30 분간 원심 분리하고, 펠렛을 동일한 부피의 PBS에 재현탁하였다. 10⁷ 세균에 상응하는 각 분획의 부피를 분석을 위하여 96-웰 플레이트에 분주하였다. Fluorocillin Green (Invitrogen)을 각 웰에 4.5 µM으로 첨가하고, 플레이트를 실온에서 5 분 동안 부드럽게 진탕하고 37 °C에서 30 분 내지 20시간 동안에서 배양하였다. 형광의 변화는 485nm에서의 여기 및 530 nm에서의 방출로 측정하였다.

[219]

[220] **3.7 배양 배지에서 항생제의 효과적인 잔류 농도 분석**

[221] 높은 또는 낮은 두 밀도에서의 세균 배양물에 대하여 액체 배양물 내의 각 항생제를 처리하였다.

[222] 각 시점에서, 배양 배지를 여과하여 세포를 제거하고, 이들 배지는 항생제의 잔류 효능을 측정하기 위해 다른 DST 세트에 첨가하였다. 전술 한 바와 같이 브로스 미량 분석 및 DAC 프로토콜 모두 동일한 방식으로 수행 하였다.

[223]

[224] **3.8 표준 균주인 H37Rv 에 대한 DAC 시스템에서의 접종 효과의 비발생 및 LJ 시스템과 MGIT 시스템과의 비교**[225] DAC 시스템에는 IE가 없음을 확인하기 위하여, 표준 균주 H37Rv에 대한 DST를 다양한 접종 농도 DAC 시스템 상에서 수행 하였다. 동시에, DST를 LJ와 MGIT 시스템에도 는 DAC와 동일한 농도로 수행하였다. TB의 농도는 10배씩 10³ 내지 10⁷였다. 접종 크기는, 각각 DAC의 경우, 아가로오스 내의 TB 농도이며, LJ의 경우, TB 스톱 농도이고, MGIT의 경우 배양 보틀에서의 TB의 최종 농도를 의미한다. 리팜피신, 이소니아지드 (isoniazid), 에탐부톨과 스트렙토 마이신과 같은 네 가지 주요 약물을 DST를 위하여 사용하였다.

[226] DAC에서, 다양한 접종 농도에서 MIC 값은 동일 하거나, 2배 정도의 차이가 있었다 (표 1).

[227] MGIT에서는 10⁵CFU/ml 이하에서는 모두 감수성이 있는 것으로 확인되었으나, DST는 10⁶ 및 10⁷에서는 측정이 불가능하였으며, 이는 최소 접종 농도가 너무 높으며, 이에 따라서 MGIT 시스템에서는 오류로 간주되었다. LJ 시스템 (MKIT)에서는, 10⁶이하의 경우에는 모두 감수성이 있는 것으로 나타났으나, 10⁷에서는 저항성인 것으로 변화하였다.[228] 따라서, DAC 시스템 만이 10³ 내지 10⁷ 접종 크기에서 동일한 DST 결과를 나타냄을 확인하였다.

[229] 표 5

[Table 5]

	Methods	10 ⁷ /mL	10 ⁶ /mL	10 ⁵ /mL	10 ⁴ /mL	10 ³ /mL
INH	DAC (10 ³ ,10 ⁴ ,10 ⁵), MAC2(10 ⁶ , 10 ⁷)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
	MGIT(0.1)	error	error	S	S	S
	LJ (Mkit)	R	S	S	S	S
RIF	DAC (10 ³ ,10 ⁴ ,10 ⁵), MAC2(10 ⁶ , 10 ⁷)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	MGIT(1.0)	error	error	S	S	S
	LJ (Mkit)	R	S	S	S	S
SM	DAC (10 ³ ,10 ⁴ ,10 ⁵), MAC2(10 ⁶ , 10 ⁷)	>2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
	MGIT(1.0)	error	error	S	S	S
	LJ (Mkit)	R	S	S	S	S
EMB	DAC (10 ³ ,10 ⁴ ,10 ⁵), MAC2(10 ⁶ , 10 ⁷)	2.5	2.5	1.25	1.25	2.5
	MGIT(5.0)	error	error	S	S	S
	LJ (Mkit)	R	S	S	S	S

[230] 표준 균주 H37Rv에 대한 접종 효과 테스트의 결과 비교

[231]

[232] 3.9 임상 균주에 대한 DAC 시스템에서의 접종 효과의 부존재 확인

[233] 표준 균주 H37Rv는 4 개의 결핵 약물에 대하여 모두 감수성을 나타낸다. 임상 균주에서는, 특히 약물 감수성에 대한 다양한 표현형이 존재한다. 다양한 약물 감수성 균주에 대하여 DAC가 접종 효과를 나타내지 않는 것을 확인하기 위하여, KIT으로부터 수득한 5개의 임상 균주를 표준 균주 테스트에서 유효한 것으로 판명된 범위인 10³ 내지 10⁷ CFU/mL의 다양한 접종 농도로 테스트하였다. 실험 약물은 리팜피신, 이소니아지드 (isoniazid), 스트렙토 마이신 및 에탐부톨이었다. 임상 균주 실제 CFU를 표 2에 나타내었다. 131 균주의 경우에는 가장 높은 농도는 1.3*10⁹이었다

[234] 10³ ~ 10⁷ CFU/mL에서의 5개의 임상 균주의 DST 결과를 표 3에 나타내었다.

3개의 균주인 KHS, CMS 및 CUD는 3개의 주요 약물에 감수성을 나타내었다.

DST 결과는 10³~10⁷에서 서로 동일하거나 2배 정도의 차이에 불과하였다.

따라서, 감수성의 결정은 접종 농도의 변화에 의하여 영향을 받지 않으며, 모두 감수성이 있는 것으로 확인하였다. 1088 및 131 균주의 경우, 그들은 4 개의 주요 약물에 내성이 있었다. 접종 농도에 관계 없이, MIC 값은 모두 동일하였다.

전반적으로, DAC 시스템에서는 다양한 약물 감수성에 대하여 접종 효과가 전혀 없는 것으로 나타났다.

[235]

[236] 표 6

[Table 6]

MSH	Methods	10 ⁷ /mL	10 ⁶ /mL	10 ⁵ /mL	10 ⁴ /mL	
INH	DAC (10 ³ ,10 ⁴ ,10 ⁵), MAC2(10 ⁶ , 10 ⁷)	0.025	0.025	0.025	0.025	
RIF	DAC (10 ³ ,10 ⁴ ,10 ⁵), MAC2(10 ⁶ , 10 ⁷)	0.5	0.25	0.25	0.25	
SM	DAC (10 ³ ,10 ⁴ ,10 ⁵), MAC2(10 ⁶ , 10 ⁷)	0.5	1.0	0.25	0.25	
EMB	DAC (10 ³ ,10 ⁴ ,10 ⁵), MAC2(10 ⁶ , 10 ⁷)	1.25	2.5	2.5	1.25	
KHS	Methods	10 ⁷ /mL	10 ⁶ /mL	10 ⁵ /mL	10 ⁴ /mL	
INH	DAC (10 ³ ,10 ⁴ ,10 ⁵), MAC2(10 ⁶ , 10 ⁷)	0.025	0.025	0.025	0.05	
RIF	DAC (10 ³ ,10 ⁴ ,10 ⁵), MAC2(10 ⁶ , 10 ⁷)	0.5	0.25	0.25	0.25	
SM	DAC (10 ³ ,10 ⁴ ,10 ⁵), MAC2(10 ⁶ , 10 ⁷)	1.0	0.5	0.25	0.5	
EMB	DAC (10 ³ ,10 ⁴ ,10 ⁵), MAC2(10 ⁶ , 10 ⁷)	2.5	2.5	1.25	2.5	
CMS	Methods	10 ⁷ /mL	10 ⁶ /mL	10 ⁵ /mL	10 ⁴ /mL	
INH	DAC (10 ³ ,10 ⁴ ,10 ⁵), MAC2(10 ⁶ , 10 ⁷)	0.05	0.025	0.025	0.05	
RIF	DAC (10 ³ ,10 ⁴ ,10 ⁵), MAC2(10 ⁶ , 10 ⁷)	0.5	0.5	0.25	0.25	
SM	DAC (10 ³ ,10 ⁴ ,10 ⁵), MAC2(10 ⁶ , 10 ⁷)	1.0	1.0	0.5	0.5	
EMB	DAC (10 ³ ,10 ⁴ ,10 ⁵), MAC2(10 ⁶ , 10 ⁷)	2.5	2.5	1.25	1.25	
CYD	Methods	10 ⁷ /mL	10 ⁶ /mL	10 ⁵ /mL	10 ⁴ /mL	
INH	DAC (10 ³ ,10 ⁴ ,10 ⁵), MAC2(10 ⁶ , 10 ⁷)	0.025	0.025	0.025	0.05	
RIF	DAC (10 ³ ,10 ⁴ ,10 ⁵), MAC2(10 ⁶ , 10 ⁷)	0.5	0.25	0.25	0.25	
SM	DAC (10 ³ ,10 ⁴ ,10 ⁵), MAC2(10 ⁶ , 10 ⁷)	1.0	0.5	0.25	0.5	
EMB	DAC (10 ³ ,10 ⁴ ,10 ⁵), MAC2(10 ⁶ , 10 ⁷)	5.0	2.5	2.5	2.5	
1088	Methods	10 ⁷ /mL	10 ⁶ /mL	10 ⁵ /mL	10 ⁴ /mL	10 ³ /mL
INH	DAC (10 ³ ,10 ⁴ ,10 ⁵), MAC2(10 ⁶ , 10 ⁷)	≥0.2	≥0.2	0.2	0.2	≥0.2
RIF	DAC (10 ³ ,10 ⁴ ,10 ⁵), MAC2(10 ⁶ , 10 ⁷)	≥2.0	≥2.0	≥2.0	≥2.0	≥2.0
SM	DAC (10 ³ ,10 ⁴ ,10 ⁵), MAC2(10 ⁶ , 10 ⁷)	≥4.0	≥4.0	≥4.0	≥4.0	≥4.0
EMB	DAC (10 ³ ,10 ⁴ ,10 ⁵), MAC2(10 ⁶ , 10 ⁷)	≥10.0	≥10.0	10.0	10.0	10.0
131	Methods	10 ⁷ /mL	10 ⁶ /mL	10 ⁵ /mL	10 ⁴ /mL	10 ³ /mL
INH	DAC (10 ³ ,10 ⁴ ,10 ⁵), MAC2(10 ⁶ , 10 ⁷)	>0.2	>0.2	>0.2	>0.2	0.2
RIF	DAC (10 ³ ,10 ⁴ ,10 ⁵), MAC2(10 ⁶ , 10 ⁷)	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0
SM	DAC (10 ³ ,10 ⁴ ,10 ⁵), MAC2(10 ⁶ , 10 ⁷)	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0
EMB	DAC (10 ³ ,10 ⁴ ,10 ⁵), MAC2(10 ⁶ , 10 ⁷)	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0

[237] DAC 시스템 상에서 임상 균주에 대한 접종 효과 확인 결과

[238]

[239] **3.10 DAC를 사용한 접종 크기의 조정이 필요 없는 정확한 DST**

[240] LJ (Mkit) 시스템에서의 정확한 DST 및 자동화 액체 배지 기반 DST인 MGIT에서는 정확한 접종량이 필요하다. 따라서 접종 농도를 조절하기 위해 어려운 절차가 수행되어야 한다.

[241] 이전의 결과로부터, DAC 시스템에서는 접종량의 조정이 불필요한 것을 증명했다. 본 실시예에서는 이 실험에서 접종 농도를 조정하는 과정은 생략하고, 준비된 원액으로부터 DAC 시스템에 직접 DST를 수행 하였다. 따라서, 접종량은 다양한 범위였다. 도 10에 도시 한 바와 같이 실제의 접종 농도를 7H11 배지에서의 콜로니 개수에 의하여 수득하였다. 접종 농도는 10⁵ 내지 10⁸ CFU/ml였다. DAC 시스템에서 DST를 수행 한 후, 결과를 LJ (Mkit) 시스템에서의

DST와 비교하였으며, 에러율을 도출하였다. 테스트 균주의 총 수는 117이고, 테스트 케이스는 총 516개였다.

- [242] 모두에 감수성을 나타낸, PanS 균주의 경우, 불일치하는 경우는 없었다. MDR의 경우, LJ 시스템에서는 민감한 것으로 확인된 ME (major error)가 8 케이스, LJ 시스템에서는 저항성인 것으로 확인된 VME (very major error)가 4 케이스였다. 516번의 테스트에서 오류율은 단지 6.2% 였다.

- [243] 표 7

[Table 7]

LJ (Mkit) 및 DAC를 이용한 DST 및 오류율의 비교

	PanS	MDR	XDR	Total
Total Sample	26	50	41	117
Total Tests	108	216	192	516
ME	0	8	15	23
VME	0	4	2	6
NG	4	16	28	48
Error Rate	0.0%	6.0%	10.4%	6.2%

- [244]

- [245] 3.11 아가로오스를 이용함에 따른 박테리아의 랩핑에 의한 접종 효과의 부존재
[246] 접종 효과에는 두 가지의 주된 이유가 있다.

- [247] 첫번째는, 높은 접종량에서 박테리아로부터 발생되는 항생제 분해 단백질이 항생제를 파괴하고 MIC 값이 증가 될 수 있다는 것이다. 다른 이유로는, 더 높은 접종량에서, 박테리아의 단일 세포에 대한 항생제 분자의 수가 감소하며 MIC가 증가 될 수 있다는 것이다. DAC에서 접종 효과가 없음에 대한 이유를 확인하기 위하여, 항생제 분해 단백질을 분비하는 박테리아 균주로 잘 알려진, ESBL 음성 대장균 (ATCC 35218), ESBL 양성 대장균 (ATCC 25922) 및 임상적으로 수득한 대장균 균주를 5×10^7 , 5×10^6 , 5×10^5 CFU/ml의 접종 농도로 테스트 하였다. 상기 농도는 DAC에서의 아가로오스 중의 박테리아 농도 및 MDT에서의 액체에서의 박테리아 농도를 의미한다.

- [248] 접종 효과를 확인하기 위하여 테스트 된 항생제는 세팔로스포린 (cephalosporin) 항생제 4 세대인 세페핌 (cefepime)이었다. ESBL 음성 대장균, ESBL 양성 대장균의 MIC 범위는 0.015에서 0.12 ug/ml이었다.

- [249]

- [250] 표 8

[Table 8]

다양한 접종 농도에 따른 DAC 및 MDT으로부터의 AST 결과 비교

DAC	ESBL+	ESBL-	#5
5×10^5	0.03	0.06	<16
5×10^6	0.03	0.06	<16
5×10^7	0.03	0.06	<16

MDT	ESBL+	ESBL-	#5 strain
5×10^5	All growth	All growth	All growth
5×10^6	4	0.03	64
5×10^7	0.03	0.03	16

[251]

[252] DAC 시스템에서는, 다양한 크기의 접종량에서 접종효과가 전혀 나타나지 않았다. 그러나, MDT 시스템에서, ESBL+ 및 #5 균주에서 접종 크기에 따라 MIC의 점진적인 증가를 보였다. 이 결과는 접종효과가 MDT 시스템에서 나타난 것과는 다르게 DAC에서는 전혀 효과가 없음을 나타내는 것이다.

[253] 본 발명자는 DAC에서 접종효과나 나타나지 않는 이유로서, 박테리아로부터 방출되는 단백질이 아가로 오스에 포획되어 브로스 배양 조건처럼 항생제를 분해할 수 없기 때문인 것으로 가설을 세웠다. 이 효과의 가설을 확인하기 위하여, ESBL 양성 대장균을 사용하여 다른 테스트를 수행하였다. 접종농도는 5×10^7 , 5×10^6 및 5×10^5 CFU/ml 였다. 상기 농도는 DAC에서 전체 웰 내의 박테리아 농도 및 액체 내 박테리아 농도를 의미한다. 따라서, 최종 DAC 및 MAC 박테리아의 최종 농도는 동일하였다. 세폐품을 이 실험에 사용하였다. 밤새 배양한 후에, DAC 및 MDT의 웰 내의 항생제 용액을 추출하고, 순수한 항생제를 얻기 위하여 여과하였다. 그리고 항생제를 사용하여, ESBL 양성 대장균을 이용한 MDT를 수행하였다. 그 결과를 표 9에 나타내었다.

[254]

[255] 표 9

[Table 9]

MIC(ug/ml)	MDT	DAC
5×10^7	0.25	0.06
5×10^6	0.125	0.06
5×10^5	0.03	0.06

[256] 항생제 용액에서 밤새 배양에 따른 DAC 및 MDT를 이용한 AST 결과 비교

[257]

[258] DAC에서는 다양한 접종량에서 MIC 값에 차이가 없었으며 이는 분해율이 접종량과 유사함을 나타낸다. 그러나, MDT에서는 접종량이 증가함에 따라, MIC 값이 증가하였으며, 이는 항생제의 분해가 증가함을 나타낸다. 이러한 결과는 DAC 시스템에서의 항생제의 분해의 감소가 아가로스에서 박테리아가 포획됨에 기인하는 것을 의미한다.

[259] 즉, 본 발명의 DAC 시스템은 세포의 밀도가 증가하는 경우의 박테리아에 대한 약물의 과도한 결합 및 그 결과물에 의하여 발생하는, 분자의 상호 작용 및 세균 박테리아 집단 역동 (bacterial population dynamics)을 모두 제어할 수 있으며, 이는 매트릭스 내에 박테리아 집단이 정착되어 있으며, 각 약물을 포함하는 배지가 챔버내로 구배로써 공급되기 때문이다.

[260] 이 장치는 마이코 박테리아에 대한 접종을 엄격하게 제한할 필요 없이, DST를 손쉽게 수행할 수 있는데, 이는 IE가 ML 당 10^7 마이코박테리아보다 높은 접종에서는 관찰되지 않기 때문이다. 따라서 DAC 시스템은 예상된 항 결핵 약물에 대한 미생물학적 효능의 정확한 예측을 가능하게 하며, 이는 기존의 방법을 효과적으로 대체할 수 있을 것으로 기대한다.

[261]

[262] **실시예 4: 항생제 스크리닝에의 DAC 시스템의 활용**

[263] 본 발명에서 개발한 DAC 시스템을 항생제 스크리닝에 활용하였다.

구체적으로, 협력사에서 개발중인 결핵용 약물 Q203에 대하여, TDR 임상 균주의 감수성을 확인하기 위하여, 상기 결핵용 약물의 MIC를 측정하였다.

[264] 첫번째 임상균주인 TDR 102 환자 균주의 상기 약물에 대한 MIC를 구하기 위하여, 본 발명의 DAC 시스템 상에서 상기 Q203를 각각 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250, 500, 1000 ng/ml를 TDR 102 환자 균주에 처리하였다. DAC 시스템에서의 이미지를 도 11에 나타내었으며, 이를 수치화하여 그래프화 한 것을 도 12에 나타내었다.

[265] 또한, 두번째 임상균주인 TDR 103 환자 균주의 상기 약물에 대한 MIC를 구하기 위하여 상기와 동일한 방법으로 Q203를 TDR 103 환자 균주에

처리하였다. DAC 시스템에서의 이미지를 도 13에 나타내었으며, 이를 수치화하여 그래프화 한 것을 도 14에 나타내었다.

[266]

[267]

발명의 실시를 위한 형태

[268] 이하, 첨부한 도면들을 참조하여, 본 발명의 구현예들을 보다 상세하게 설명하고자 한다. 그러나 본 발명은 여기서 설명되는 구현예들에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 단지, 여기서 소개되는 구현예들은 개시된 내용이 철저하고 완전해질 수 있도록 그리고 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다. 도면에서 각 장치의 구성요소를 명확하게 표현하기 위하여 상기 구성요소의 폭이나 두께 등의 크기를 다소 확대하여 나타내었다. 전체적으로 도면 설명시 관찰자 시점에서 설명하였고, 일 요소가 다른 요소 위에 위치하는 것으로 언급되는 경우, 이는 상기 일 요소가 다른 요소 위에 바로 위치하거나 또는 이들 요소들 사이에 추가적인 요소가 개재될 수 있다는 의미를 모두 포함한다. 또한, 해당 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명의 사상을 다양한 다른 형태로 구현할 수 있을 것이다. 그리고, 복수의 도면들 상에서 동일 부호는 실질적으로 서로 동일한 요소를 지칭한다.

[269]

[270] 플레이트 본체;

[271] 상기 플레이트에 하나 이상으로 배열된 배양 유닛 (100); 및

[272] 및 고체 박막을 상기 배양 유닛 바닥면에 형성할 수 있는 밀판(110);을 포함하는 생리 활성 검사용 구조물을 제공한다. 도 2a는 본 발명에 따른 검사용 구조물의 제1의 일 구현예의 평면도가, 도 2b는 본 발명에 따른 검사용 구조물의 제1의 일 구현예의 사시도를 나타낸다.

[273] 도 2a 및 도 2b를 참조하여 볼 때, 상기 밀판(110)에는 고형화제를 함유한 액상 매질과 생물학적 물질의 혼합 용액을 주입할 수 있는 주입구 (111)를 구비할 수 있다. 또한, 상기 밀판(110)은 하나 이상의 연결부재(113)에 의하여 플레이트의 격벽과 연결되며, 상기 연결부재 사이에는 절개홈(114)이 형성될 수 있으며, 상기 밀판(110)에는 하나 이상의 관통공(112)이 형성될 수 있다. 상기 절개홈 및 관통공으로부터 생물학적 활성물질이 고체 박막에 균일하게 확산될 수 있다.

[274] 상기 고체 박막의 두께와 너비는 상기 수용부의 깊이와 너비에 따라 정해진다. 본 명세서에서 "박막"이라 함은 상기 생물학적 물질을 고정하여 단일 세포 단위로 관찰할 수 있을 정도면 두께가 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어 1 μ m 내지 5mm, 또는 1 μ m 내지 3mm, 또는 1 μ m 내지 2mm, 또는 1 μ m 내지 1.5mm, 또는 1 μ m 내지 1mm, 또는 1 μ m 내지 800 μ m, 또는 1 μ m 내지 500 μ m, 1 μ m 내지 100 μ m, 또는 10 μ m 내지 3mm, 또는 10 μ m 내지 1mm, 또는 100 μ m 내지 1mm, 또는 200 μ m 내지

1mm, 또는 500 μ m 내지 1mm 중 어느 하나의 범위를 갖는 얇은 층을 의미한다. 여기서 고체 박막의 두께는 관찰하고자 하는 고체 박막 면에 대한 수직방향의 크기에 해당할 수 있다. 고체 박막은 상술한 범위의 두께를 가지므로 내부에 고정된 생화학적 물질을 개별 세포(single cell) 단위로 관찰하거나, 콜로니 형성을 효과적으로 개수할 수 있다.

- [275] 상기 배양 유닛의 폭 (너비)는 제한이 없으며, 생물학적 물질의 종류 및 특성에 따라서 달라질 수 있으며, 바람직하게는 1 내지 50 mm X 1 내지 50 mm, 1 내지 30 mm X 1 내지 30 mm, 5 내지 50 mm X 5 내지 50 mm, 5 내지 30 mm X 5 내지 30 mm, 10 내지 50 mm X 10 내지 50 mm, 10 내지 30 mm X 10 내지 30 mm, 1 내지 20 mm X 1 내지 20 mm일 수 있다. 가장 바람직하게는 12mm X 12 mm일 수 있다.
- [276] 또한, 상기 배양 유닛의 높이 역시 제한이 없으며, 생물학적 물질 및 생물활성물질의 종류 및 특성에 따라서 달라질 수 있으며, 예를 들면, 1 내지 50 mm, 1 내지 30 mm, 5 내지 30 mm, 5 내지 15 mm 일 수 있다.
- [277] 또한, 상기 관통공(112)의 크기는 제한하지 않으며, 일반적으로 1mm 이하의 지름을 가질 수 있다. 상기 관통공의 지름은 예를 들면, 0.99mm 이하, 0.90 mm 이하, 0.85 mm 이하, 0.80 mm 이하, 0.75 mm 이하, 0.70 mm 이하, 0.65 mm 이하, 0.60 mm 이하, 0.55 mm 이하, 0.50 mm 이하, 0.45 mm 이하, 0.40 mm 이하, 0.35 mm 이하, 0.30 mm 이하, 0.25 mm 이하일 수 있다.
- [278] 본 발명의 일 양상에서, 고형화제를 함유한 액상 매질과 생물학적 물질의 혼합 용액은 밀판 하부에서 고화되어, 상기 생물학적 물질이 고정된 고체 박막을 형성할 수 있다.
- [279] 액상 매질은 약 80% 이상의 물 또는 완충액을 포함할 수 있으며 고형화제의 존재에 의해 고체화될 수 있다. 고형화제의 예로 한천(agar), 아가로스(agarose), 젤라틴(gelatin), 알기네이트(alginate), 콜라겐(collagen), 피브린(fibrin) 등을 들 수 있다. 바람직하게는 한천 또는 아가로스가 사용될 수 있다. 일 예로 액상 매질 내에는 한천이 0.5 내지 5 중량%가 사용될 수 있다. 통상적으로 액상 매질은 영양성분을 필요로 하지 않지만, 몇몇 예에 있어 영양성분을 포함할 수도 있다.
- [280] 상기 생물학적 물질은 바이러스, 박테리아, 균류, 조류, 원생동물, 기생 병원균, 사람 또는 포유류의 세포 및 바이오필름 등을 포함한다. 상기 생물학적 물질은 액상 또는 고상의 배지 내에서 성장할 수 있고 외부 생리활성 물질의 종류 및 농도에 따라 성장에 영향을 받을 수 있다.
- [281] 상기 혼합 용액 내에서의 상기 생물학적 물질의 밀도는 제한되지 않는다. 특히, 본 발명의 특징은 생물학적 물질의 밀도와 DST 또는 진단 결과가 무관하다는 것이다. 즉 본 발명에 따른 DAC 시스템은 접종효과 (inoculum effect)가 없다. 따라서, 상기 생물학적 물질의 밀도는 10^1 내지 10^{80} cfu/ml의 범위일 수 있으며, 예를 들어, 10^{70} cfu/ml 이하, 10^{60} cfu/ml 이하, 10^{50} cfu/ml 이하, 10^{40} cfu/ml 이하, 10^{30} cfu/ml 이하, 10^{20} cfu/ml 이하, 10^{10} cfu/ml 이하, 10^9 cfu/ml 이하, 10^8 cfu/ml 이하, 10^7 cfu/ml 이하, 10^6 cfu/ml 이하, 10^5 cfu/ml 이하, 또는 10^4 cfu/ml 이하 일 수 있다.

- [282] 상기 고형화제를 함유한 액상 매질과 생물학적 물질의 혼합 용액은 상기 배양 유닛의 밀판 상부에서 고화되어 생물학적 물질이 고정된 고체 박막을 형성한다. 높은 온도의 액상 매질의 온도가 내려감에 따라 매질이 고화됨으로써 상기 생물학적 물질의 움직임이 저하된다. 상기 고정에 의하여 운동성이 있는 상기 생물학적 물질을 계속해서 용이하게 관찰할 수 있다.
- [283]
- [284] 도 3a는 본 발명에 따른 검사용 구조물의 제2의 일 구현예의 평면도가, 도 3b는 본 발명에 따른 검사용 구조물의 제2의 일 구현예의 사시도를 나타낸다.
- [285] 도 3a, b를 참조하여 볼 때, 상기 밀판의 상부에는 수용홈(120)이 추가로 구비될 수 있다.
- [286] 또한, 상기 수용홈(120)의 폭은 제한하지 않으며, 바람직하게는 1 내지 5 mm일 수 있고, 예를 들면, 1 내지 4.5 mm, 1 내지 4.0 mm, 1 내지 3.5 mm일 수 있다. 상기 수용홈의 높이는 바람직하게는 1 내지 3 mm일 수 있으며, 예를 들면, 1 내지 2.5 mm일 수 있다.
- [287]
- [288] 상기 배양 유닛 내부에 생리활성물질을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에서 상기 생리활성물질은 생물학적 물질에 생리적 영향을 미칠 수 있는 것으로, 항생제, 항암제, 면역억제제와 같은 약물, 영양성분, 세포분비물, 신호전달물질, 바이러스, 세포, micro RNA, 단백질, 항원, 항체, DNA 등 중 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [289] 상기 생리활성물질은 배양 유닛에 액상 매질 또는 액체 배지와 함께 혼합하여 제공될 수 있으며, 상기 수용홈 (120) 내에 제공될 수 있다. 상기 생리활성물질은 특히, 상기 수용홈 (120) 내에 제공되는 경우 동결건조되어 있는 형태일 수 있다. 동결건조의 경우, 운반, 보존 등을 용이하게 한다.
- [290] 상기 플레이트 본체, 배양 유닛, 밀판의 전체 또는 일부는 투명 또는 반투명한 재질일 수 있으며, 바람직하게는 광학 이미징을 위해 투광성 기판일 수 있다. 상기 구조물은 액상 매질이 도포되어 박막이 형성되기에 적합한 표면 특성을 가지면 특별히 제한되지 않는다.
- [291]
- [292] 또한, 본 발명의 다른 양상은
- [293] 고형화제를 함유한 액상 매질과 생물학적 물질의 혼합 용액을 청구항 1 내지 14 중 어느 한 항의 생리활성 검사용 구조물의 바닥면에 제공하는 단계;
- [294] 상기 혼합 용액을 고화시켜 상기 생물학적 물질이 고정된 고체 박막을 형성하는 단계;
- [295] 생리활성물질을 상기 고체 박막에 공급하여 상기 생리활성물질이 상기 고체 박막 내부로 확산되도록 하는 단계; 및
- [296] 상기 생리활성물질에 대한 상기 생물학적 물질의 단일 세포들의 개별적인 반응을 관찰하거나, 상기 생물학적 물질의 콜로니의 형성 여부 또는 콜로니

숫자(colony forming unit, CFU)을 관찰하는 단계를 포함하는, 생리활성 검사 방법을 제공한다.

- [297] 상기 방법은 상기 생리활성물질에 대한 상기 생물학적 물질의 단일 세포들의 개별적인 반응 또는 콜로니의 형성 여부 또는 콜로니 숫자(colony forming unit, CFU)를 이미징하여 얻은 이미지 분석 결과를 수득하는 단계를 더 포함할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 상기 이미지 분석 결과에 기초하여 상기 생리활성물질의 최소억제농도(MIC)를 결정하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [298] 관찰을 위해 광학 측정장치가 사용될 수 있다. 상기 광학 측정장치는 CCD 또는 CMOS 카메라와 같은 이미지화 시스템을 포함할 수 있다. 상기 광학 측정장치는 또한 초점을 맞추고 빛을 이미지화하는 데 필요한 렌즈, 조명 및 빛 가이드 등을 포함할 수 있다. 또한 상기 광학 측정장치는 카메라에 의해 관찰된 이미지 데이터를 가공 및 분석하기 위한 이미지 처리 시스템을 포함할 수 있다. 상기 광학 측정장치는 검사 과정에 나타난 생물학적 물질의 성장변화를 빠른 속도로 기록하고 분석하여 검사 결과를 얻는다.
- [299]
- [300] 상기 생리활성 검사 방법은 다양한 용도로 활용될 수 있다. 박테리아의 항생제 감수성 검사 방법, 항생제 스크리닝 방법, 및 박테리아의 진단 방법에 이용될 수 있다.
- [301] 즉, 본 발명의 다른 양상은
- [302] 고형화제를 함유한 액상 매질과 박테리아의 혼합 용액을 청구항 1 내지 14 중 어느 한 항의 생리활성 검사용 구조물의 바닥면에 제공하는 단계;
- [303] 상기 혼합 용액을 고화시켜 상기 박테리아가 고정된 고체 박막을 형성하는 단계;
- [304] 임의의 항생제를 상기 고체 박막에 공급하여 상기 항생제가 상기 고체 박막 내부로 확산되도록 하는 단계;
- [305] 상기 항생제에 대한 상기 박테리아의 단일 세포들의 개별적인 반응을 관찰하거나, 상기 박테리아의 콜로니의 형성 여부 또는 콜로니 숫자(colony forming unit, CFU)을 관찰하는 단계;를 포함하는, 항생제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [306] 상기 방법은 상기 단일 세포들의 개별적인 변화 또는 콜로니의 형성 여부 또는 콜로니 숫자(colony forming unit, CFU)를 이미징하여 얻은 이미지 분석결과에 기초하여 상기 항생제의 최소 억제농도(MIC)를 결정하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [307]
- [308] 또한, 본 발명의 일 양상은
- [309] 고형화제를 함유한 액상 매질과 박테리아의 혼합 용액을 청구항 1 내지 14 중 어느 한 항의 생리활성 검사용 구조물의 바닥면에 제공하는 단계;
- [310] 상기 혼합 용액을 고화시켜 상기 박테리아가 고정된 고체 박막을 형성하는

단계;

[311] 상기 박테리아의 배양 배지를 상기 고체 박막에 공급하여 상기 배양 배지가 상기 고체 박막 내부로 확산되도록 하는 단계; 및

[312] 상기 박테리아의 단일 세포들의 개별적인 반응을 관찰하거나, 상기 박테리아의 콜로니의 형성 여부 또는 콜로니 숫자(colony forming unit, CFU)을 관찰하는 단계;를 포함하는 박테리아의 진단 방법을 제공한다.

[313] 상기 박테리아의 배양 배지에는 항생제가 추가로 포함될 수 있으며, 상기 진단 방법은 약물 감수성 검사와 동시에 수행될 수 있는 것을 특징으로 할 수 있다.

[314]

[315] 상기 생리 활성 검사는 약제 감수성, 약제 스크리닝, 또는 세균 배양 진단일 수 있다.

[316]

[317] 상기 박테리아의 종류는 제한하지 않는다. 가장 바람직하게는 상기 박테리아는 결핵균 또는 비결핵성 항산균 (NTM, Nontuberculous mycobacteria) 균일 수 있으며, 상기 결핵균은 다제내성 (multi-drug-resistant, MDR) 결핵균, 광범위 약제내성 (extensively drug-resistant, XDR) 결핵균, 완전 약제내성 (totally drug-resistant, TDR) 결핵균 등일 수 있다.

[318]

[319] 또한, 본 발명의 다른 양상에서는

[320] 고형화제를 함유한 액상 매질과 생물학적 물질의 혼합 용액을 고화시켜 만든 박막을 바닥면에 구비하며, 생리활성물질을 배양 유닛에 구비한, 청구항 1 내지 14 중 어느 한 항의 생리활성 검사용 구조물;

[321] 상기 검사용 구조물을 지지하고 관찰하기 위한 스테이지; 및

[322] 상기 생리활성물질의 확산에 의한 전달에 따른 상기 생물학적 물질의 단일 세포들의 개별적인 변화 또는 콜로니의 형성 여부 또는 콜로니 숫자(colony forming unit, CFU)을 이미징하여 얻은 이미지 분석결과에 기초하여 상기 생리활성물질의 최소 억제농도(MIC)를 결정하기 위한 측정장치를 포함하는, 생리활성 검사 시스템을 제공한다.

[323] 상기 측정장치는 이미지화 시스템 및 이미지 처리 시스템을 포함할 수 있다.

상기 측정장치는 관찰한 이미지를 생성하는 CCD 또는 CMOS 카메라와 같은 이미지화 시스템을 포함한다. 또한 광학 측정장치는 생성된 이미지를 처리 및 분석하는 이미지 처리 시스템을 포함할 수 있다.

[324]

[325] 부호의 설명

[326] 100: 배양 유닛 120: 수용홈

[327] 110: 밀판

[328] 111: 주입구

[329] 112: 관통공

- [330] 113: 연결부재
- [331] 114: 절개홈

청구범위

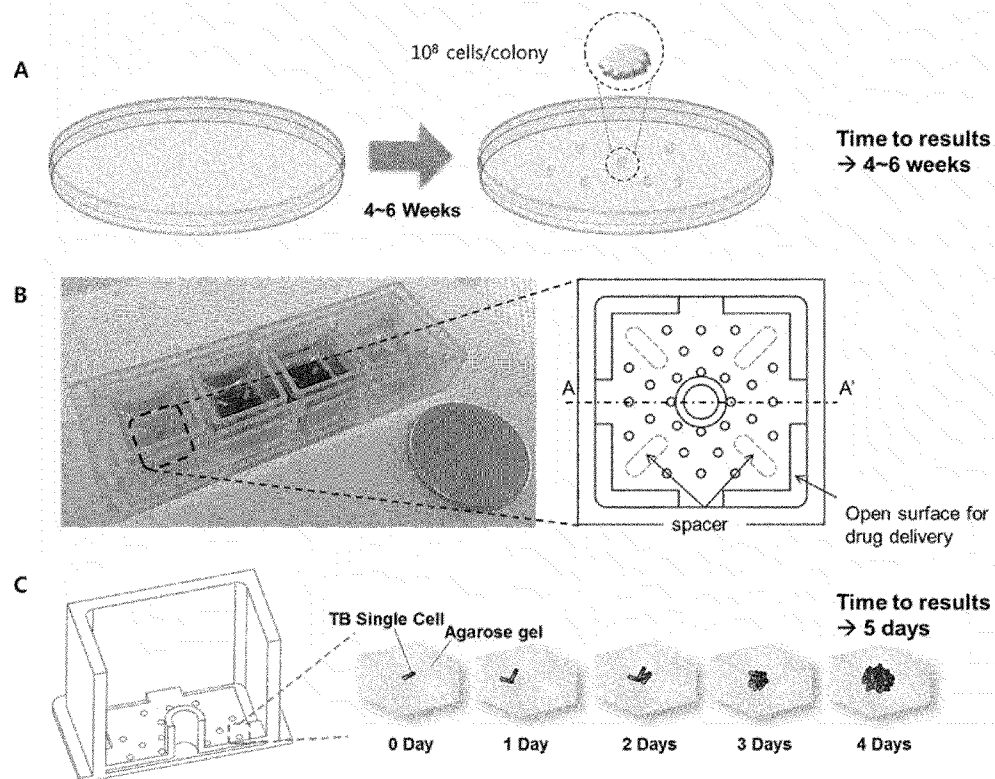
- [청구항 1] 플레이트 본체;
상기 플레이트에 하나 이상으로 배열된 배양 유닛; 및
및 고체 박막을 상기 배양 유닛 바닥면에 형성할 수 있는 밀판;을
포함하는 생리 활성 검사용 구조물.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서,
상기 생리 활성 검사는 약제 감수성, 약제 스크리닝, 또는 세균
배양 진단인 것을 특징으로 하는, 생리 활성 검사용 구조물.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서
상기 밀판의 상부에는 수용홈이 추가로 구비된 것을 특징으로
하는, 생리 활성 검사용 구조물.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서,
상기 밀판에는 고형화제를 함유한 액상 매질과 생물학적 물질의
혼합 용액을 주입할 수 있는 주입구가 형성된 것을 특징으로 하는,
생리 활성 검사용 구조물.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서,
상기 밀판은 하나 이상의 연결부재에 의하여 플레이트의 격벽과
연결되며,
상기 연결부재 사이에는 절개홈이 형성된 것을 특징으로 하는,
생리 활성 검사용 구조물.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서,
상기 밀판에는 하나 이상의 관통공이 형성된 것을 특징으로 하는,
생리 활성 검사용 구조물.
- [청구항 7] 청구항 1에 있어서, 상기 배양 유닛의 폭은 1 내지 50 mm X 1 내지
50 mm이며,
상기 배양 유닛의 높이는 1 내지 50 mm인 것을 특징으로 하는,
생리 활성 검사용 구조물.
- [청구항 8] 청구항 3에 있어서, 상기 수용홈의 폭은 1 내지 5 mm이며,
상기 수용홈의 높이는 1 내지 3 mm인 것을 특징으로 하는,
생리 활성 검사용 구조물.
- [청구항 9] 청구항 4에 있어서,
상기 고형화제를 함유한 액상 매질과 생물학적 물질의 혼합
용액은 밀판 하부에서 고화되어, 상기 생물학적 물질이 고정된
고체 박막을 형성하는 것을 특징으로 하는, 생리 활성 검사용
구조물.
- [청구항 10] 청구항 1에 있어서, 상기 박막의 두께는 1 μ m 내지 10mm인 것인,
생리 활성 검사용 구조물.

- [청구항 11] 청구항 4에 있어서,
상기 혼합 용액 내에서의 생물학적 물질의 밀도는
10¹ 내지 10⁸⁰ cfu/ml 인 것인, 생리 활성 검사용 구조물.
- [청구항 12] 청구항 4에 있어서,
상기 고형화제는 한천(agar), 아가로즈(agarose), 젤라틴(gelatin),
알지네이트(alginate), 콜라겐(collagen) 및 피브린(fibrin)으로
이루어진 군 중에서 선택되는 하나 이상의 고형화제인 것인,
생리활성 검사용 구조물.
- [청구항 13] 청구항 1에 있어서, 상기 배양 유닛 내부에 생리활성물질을 더
포함하는 것인, 생리활성 검사용 구조물.
- [청구항 14] 청구항 3에 있어서, 생리활성물질은 상기 수용함에 동결 건조된
형태로 포함되어 있는 것을 특징으로 하는, 생리활성 검사용
구조물.
- [청구항 15] 청구항 1에 있어서, 상기 플레이트 본체, 배양 유닛 및 밀판은 투명
또는 반투명한 재질로 이루어진 것인, 생리활성 검사용 구조물.
- [청구항 16] 고형화제를 함유한 액상 매질과 생물학적 물질의 혼합 용액을
청구항 1 내지 14 중 어느 한 항의 생리활성 검사용 구조물의
바닥면에 제공하는 단계;
상기 혼합 용액을 고화시켜 상기 생물학적 물질이 고정된 고체
박막을 형성하는 단계;
생리활성물질을 상기 고체 박막에 공급하여 상기 생리활성물질이
상기 고체 박막 내부로 확산되도록 하는 단계; 및
상기 생리활성물질에 대한 상기 생물학적 물질의 단일 세포들의
개별적인 반응을 관찰하거나, 상기 생물학적 물질의 콜로니의
형성 여부 또는 콜로니 숫자(colony forming unit, CFU)를 관찰하는
단계를 포함하는, 생리활성 검사 방법.
- [청구항 17] 청구항 15에 있어서,
상기 생리활성물질에 대한 상기 생물학적 물질의 단일 세포들의
개별적인 반응, 콜로니 형성 여부, 또는 콜로니 숫자 (colony
forming unit, CFU)를 이미징하여 얻은 이미지 분석 결과를
수득하는 단계를 더 포함하는 것인, 생리활성 검사 방법.
- [청구항 18] 청구항 17에 있어서,
상기 이미지 분석 결과에 기초하여 상기 생리활성물질의
최소억제농도(MIC)를 결정하는 단계를 더 포함하는 것인,
생리활성 검사 방법.
- [청구항 19] 고형화제를 함유한 액상 매질과 박테리아의 혼합 용액을 청구항 1
내지 14 중 어느 한 항의 생리활성 검사용 구조물의 바닥면에
제공하는 단계;

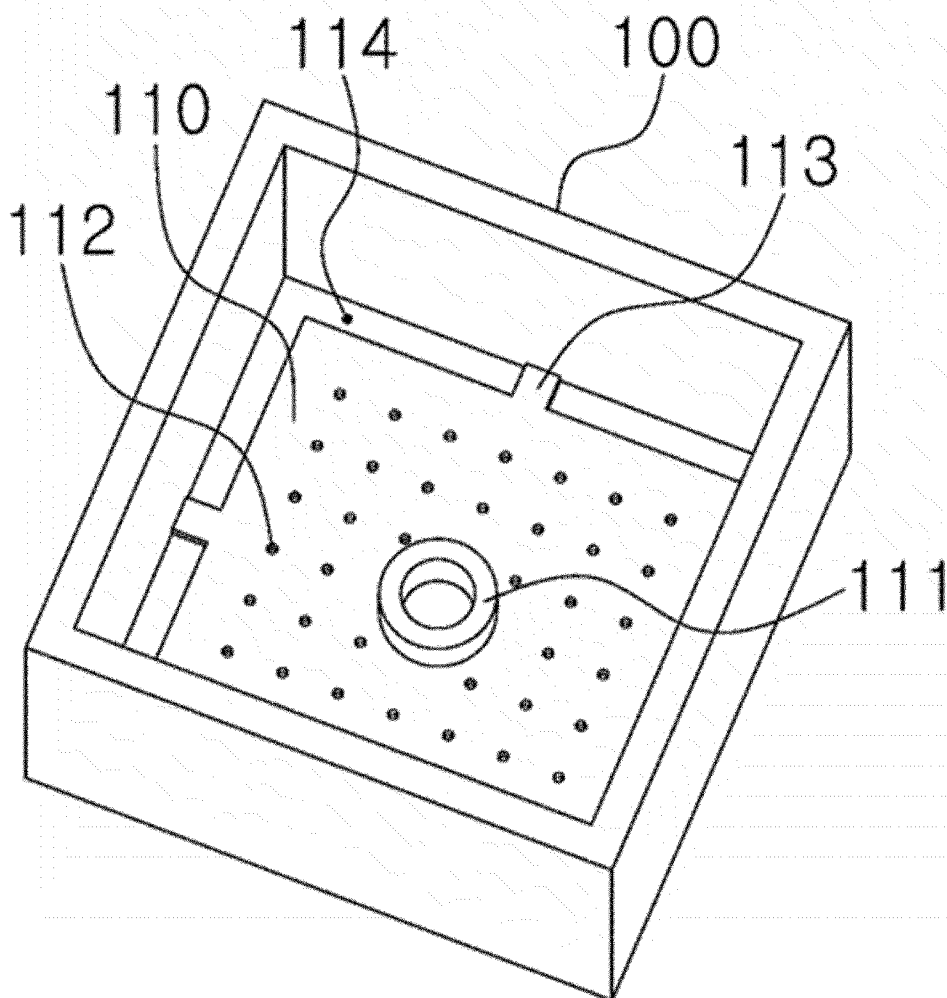
- 상기 혼합 용액을 고화시켜 상기 박테리아가 고정된 고체 박막을 형성하는 단계;
- 항생제를 상기 고체 박막에 공급하여 상기 항생제가 상기 고체 박막 내부로 확산되도록 하는 단계;
- 상기 항생제에 대한 상기 박테리아의 단일 세포들의 개별적인 반응을 관찰하거나, 상기 박테리아의 콜로니의 형성 여부 또는 콜로니 숫자(colony forming unit, CFU)을 관찰하는 단계;를 포함하는, 박테리아의 항생제 감수성 검사 방법.
- [청구항 20] 청구항 19에 있어서,
상기 단일 세포들의 개별적인 변화, 콜로니의 형성 여부 또는 콜로니 숫자(colony forming unit, CFU)를 이미징하여 얻은 이미지 분석결과에 기초하여 상기 항생제의 최소 억제농도(MIC)를 결정하는 단계를 포함하는, 박테리아의 항생제 감수성 검사 방법.
- [청구항 21] 청구항 19에 있어서, 상기 박테리아는 결핵균 또는 비결핵성 항산균 (NTM, Nontuberculous mycobacteria) 균인 것을 특징으로 하는, 박테리아의 항생제 감수성 검사 방법.
- [청구항 22] 청구항 21에 있어서, 상기 결핵균은 다제내성 (multi-drug-resistant, MDR) 결핵균, 광범위 약제내성 (extensively drug-resistant, XDR) 결핵균, 또는 완전 약제내성 (totally drug-resistant, TDR) 결핵균인 것인, 박테리아의 항생제 감수성 검사 방법.
- [청구항 23] 청구항 19에 있어서, 상기 박테리아의 항생제 감수성 검사 방법은 접종효과 (inoculum effect)가 없는 것을 특징으로 하는, 박테리아의 항생제 감수성 검사 방법.
- [청구항 24] 고형화제를 함유한 액상 매질과 박테리아의 혼합 용액을 청구항 1 내지 14 중 어느 한 항의 생리활성 검사용 구조물의 바닥면에 제공하는 단계;
상기 혼합 용액을 고화시켜 상기 박테리아가 고정된 고체 박막을 형성하는 단계;
임의의 항생제를 상기 고체 박막에 공급하여 상기 항생제가 상기 고체 박막 내부로 확산되도록 하는 단계;
상기 항생제에 대한 상기 박테리아의 단일 세포들의 개별적인 반응을 관찰하거나, 상기 박테리아의 콜로니의 형성 여부 또는 콜로니 숫자(colony forming unit, CFU)을 관찰하는 단계;를 포함하는, 항생제 스크리닝 방법.
- [청구항 25] 청구항 24에 있어서,
상기 단일 세포들의 개별적인 변화, 콜로니의 형성 여부 또는 콜로니 숫자(colony forming unit, CFU)를 이미징하여 얻은 이미지 분석결과에 기초하여 상기 항생제의 최소 억제농도(MIC)를

- 결정하는 단계를 더 포함하는, 항생제 스크리닝 방법.
- [청구항 26] 고형화제를 함유한 액상 매질과 박테리아의 혼합 용액을 청구항 1 내지 14 중 어느 한 항의 생리활성 검사용 구조물의 바닥면에 제공하는 단계;
상기 혼합 용액을 고화시켜 상기 박테리아가 고정된 고체 박막을 형성하는 단계;
상기 박테리아의 배양 배지를 상기 고체 박막에 공급하여 상기 배양 배지가 상기 고체 박막 내부로 확산되도록 하는 단계; 및
상기 박테리아의 단일 세포들의 개별적인 반응을 관찰하거나, 상기 박테리아의 콜로니의 형성 여부 또는 콜로니 숫자(colony forming unit, CFU)을 관찰하는 단계;를 포함하는 박테리아의 진단 방법.
- [청구항 27] 청구항 26에 있어서,
상기 박테리아의 배양 배지에 항생제가 추가로 포함된 것을 특징으로 하는, 박테리아의 진단 방법.
- [청구항 28] 청구항 26에 있어서,
상기 진단 방법은 약물 감수성 검사와 동시에 수행될 수 있는 것을 특징으로 하는, 박테리아의 진단 방법.
- [청구항 29] 고형화제를 함유한 액상 매질과 생물학적 물질의 혼합 용액을 고화시켜 만든 박막을 바닥면에 구비하며, 생리활성물질을 배양 유닛에 구비한, 청구항 1 내지 14 중 어느 한 항의 생리활성 검사용 구조물;
상기 검사용 구조물을 지지하고 관찰하기 위한 스테이지; 및
상기 생리활성물질의 확산에 의한 전달에 따른 상기 생물학적 물질의 단일 세포들의 개별적인 변화, 콜로니의 형성 여부 또는 콜로니 숫자(colony forming unit, CFU)을 이미징하여 얻은 이미지 분석결과에 기초하여 상기 생리활성물질의 최소 억제농도(MIC)를 결정하기 위한 측정장치를 포함하는, 생리활성 검사 시스템.
- [청구항 30] 청구항 29에 있어서, 상기 측정장치는 이미징화 시스템 및 이미지 처리 시스템을 포함하는 생리활성 검사 시스템.

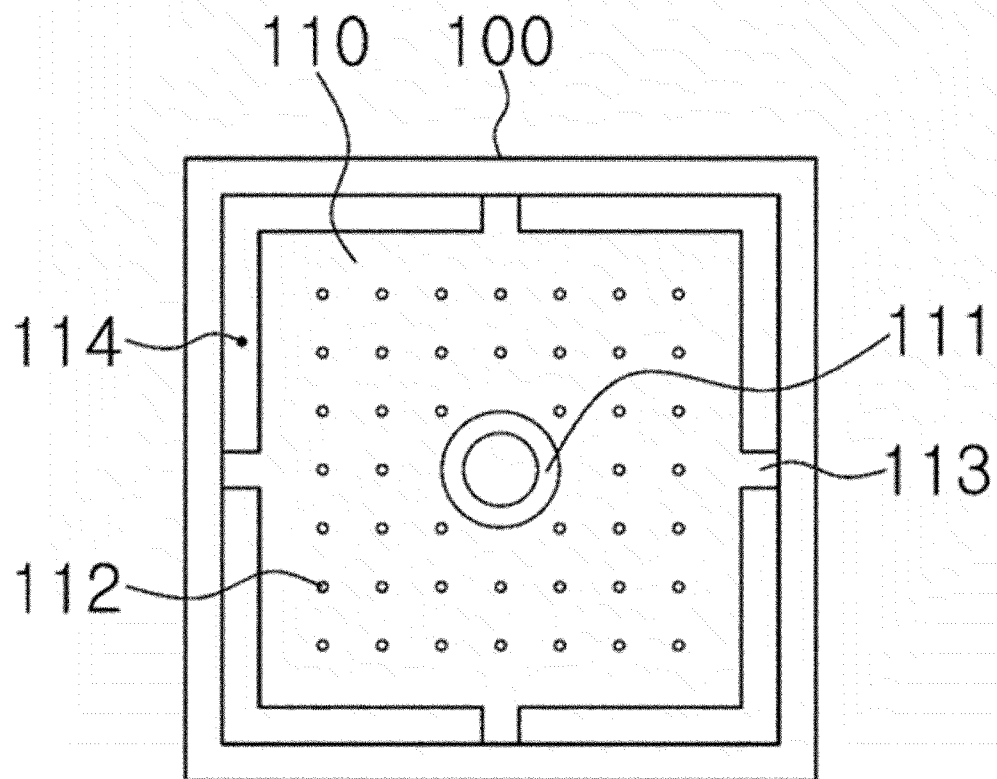
[Fig. 1]



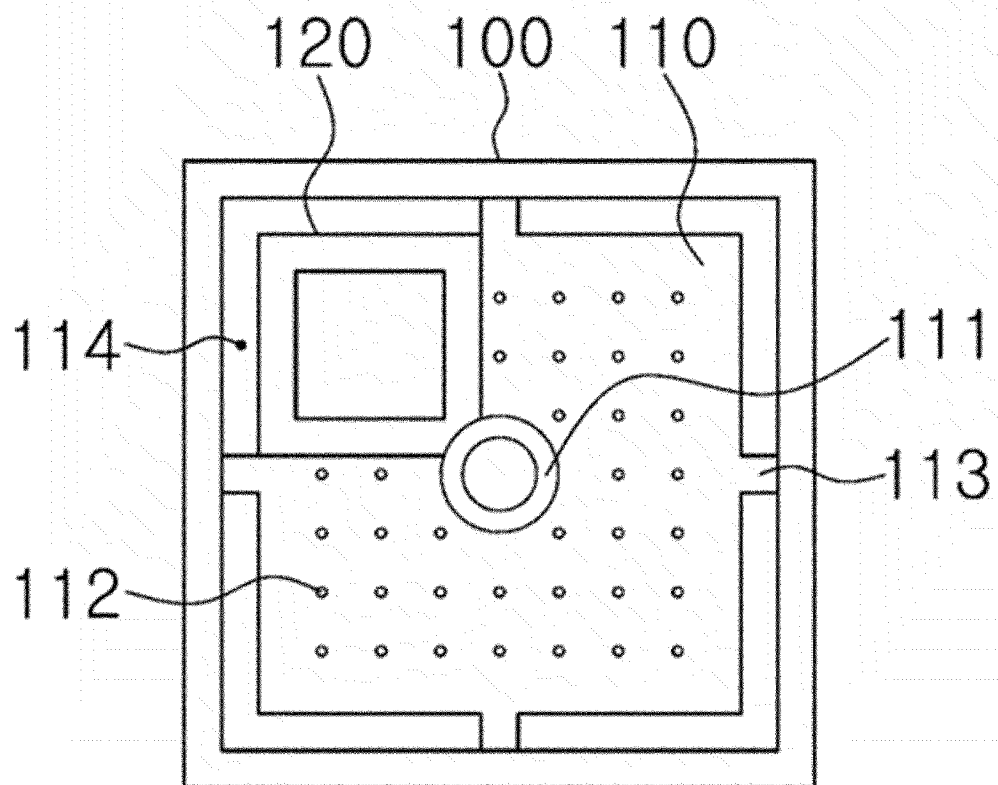
[Fig. 2a]



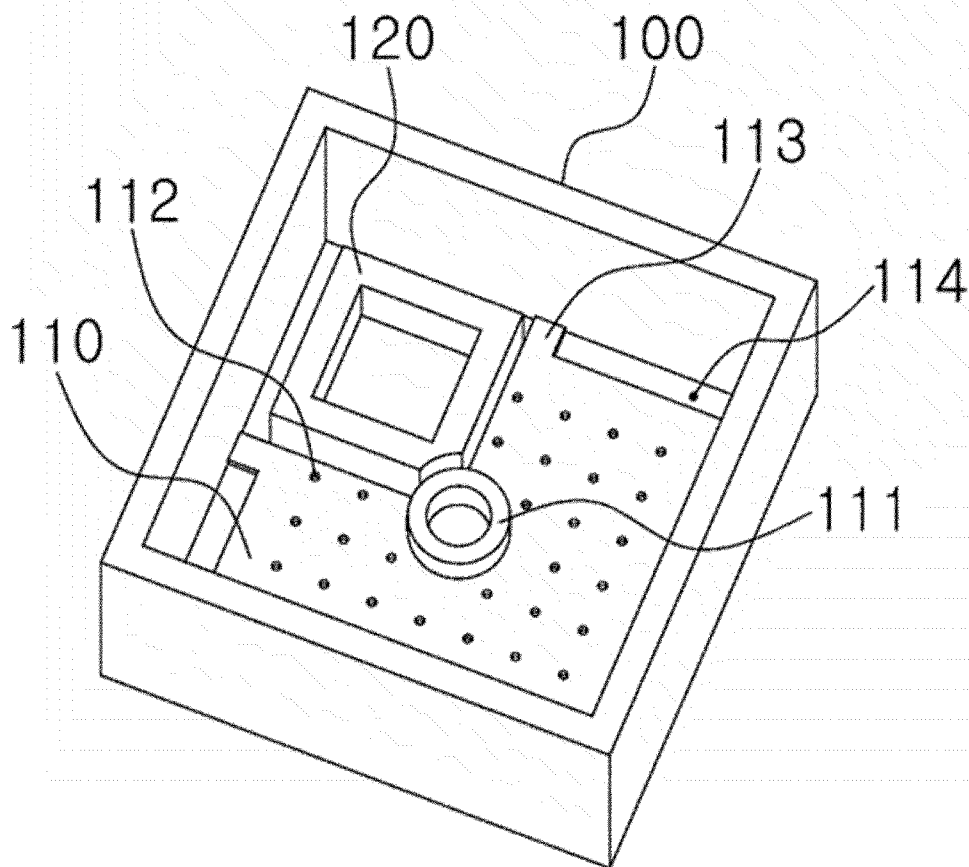
[Fig. 2b]



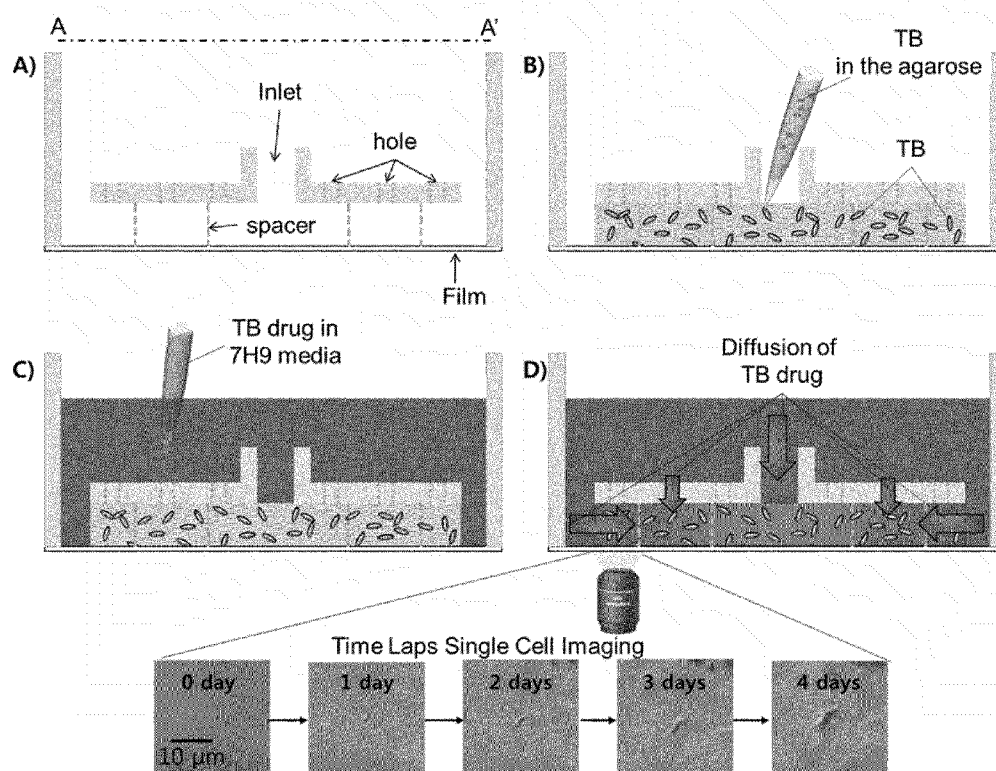
[Fig. 3a]



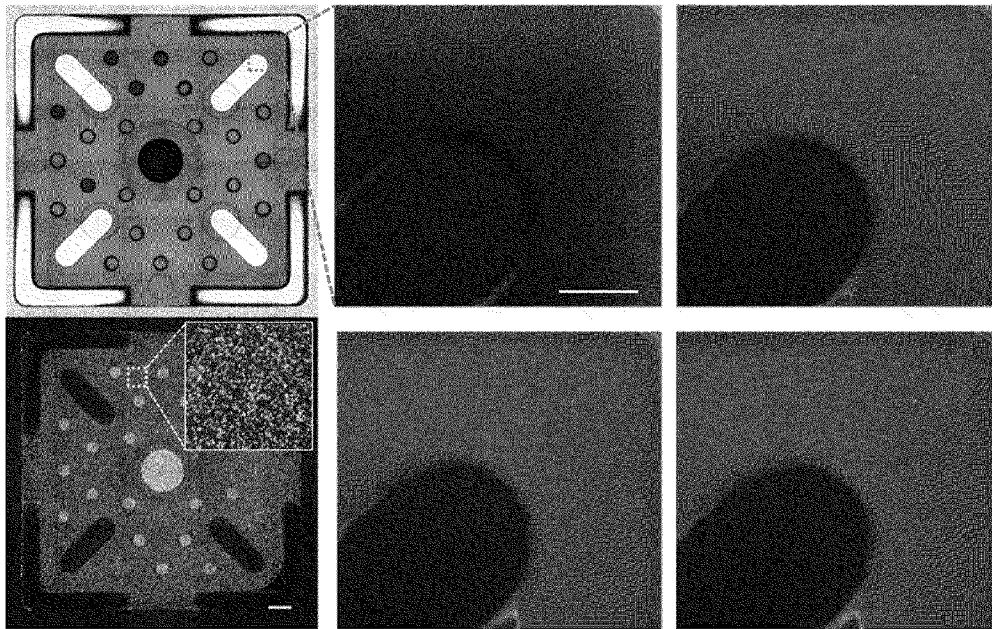
[Fig. 3b]



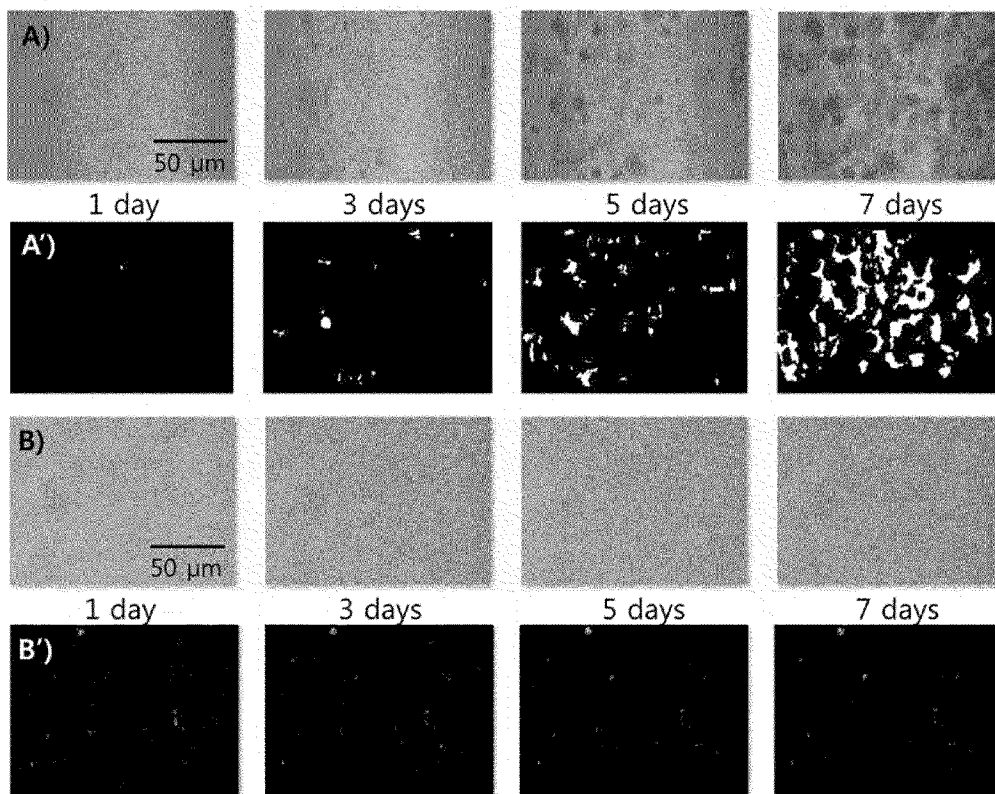
[Fig. 4]



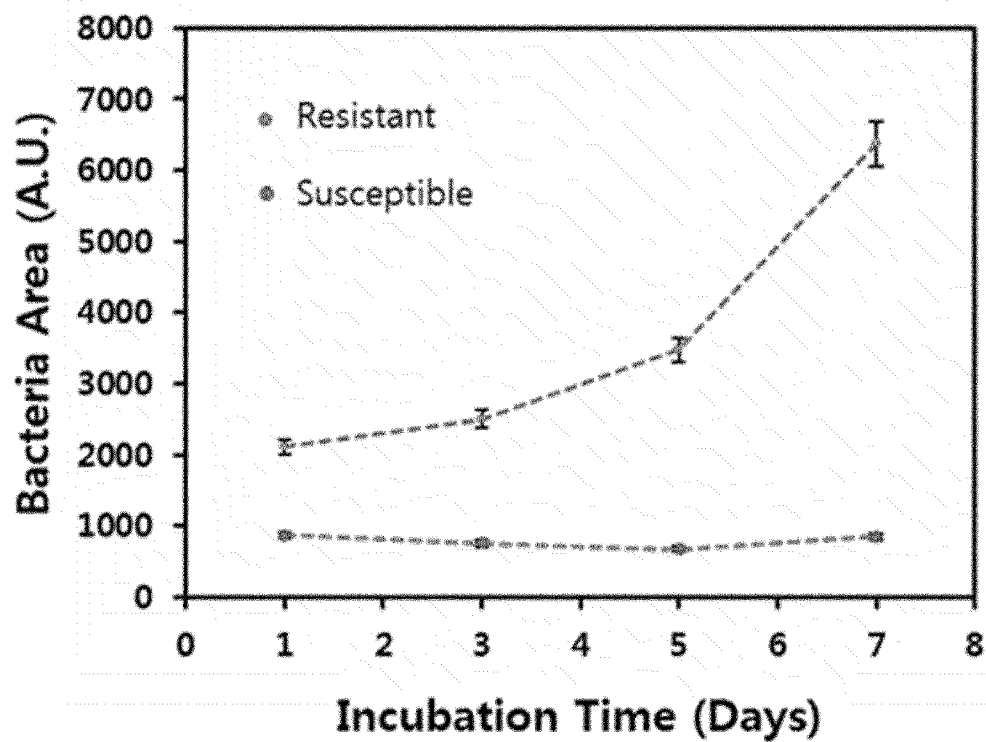
[Fig. 5]



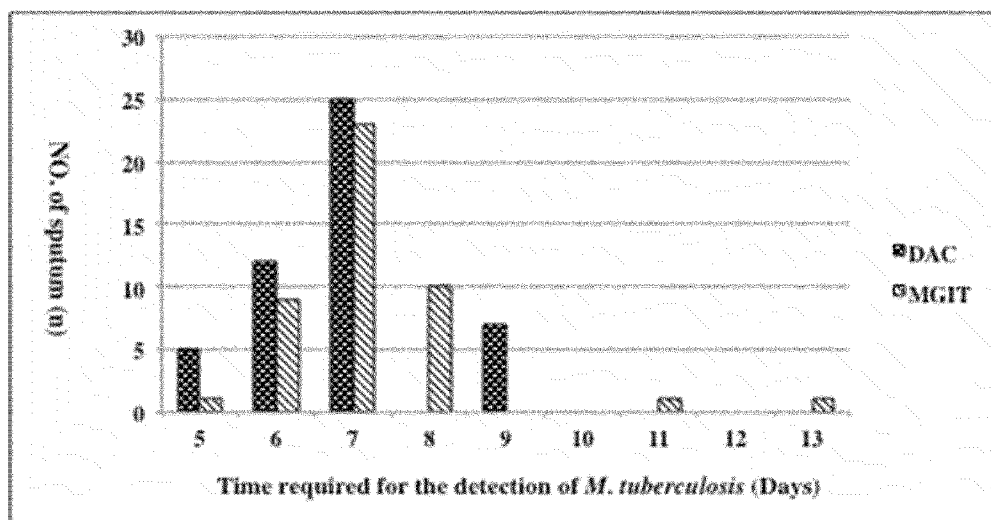
[Fig. 6]



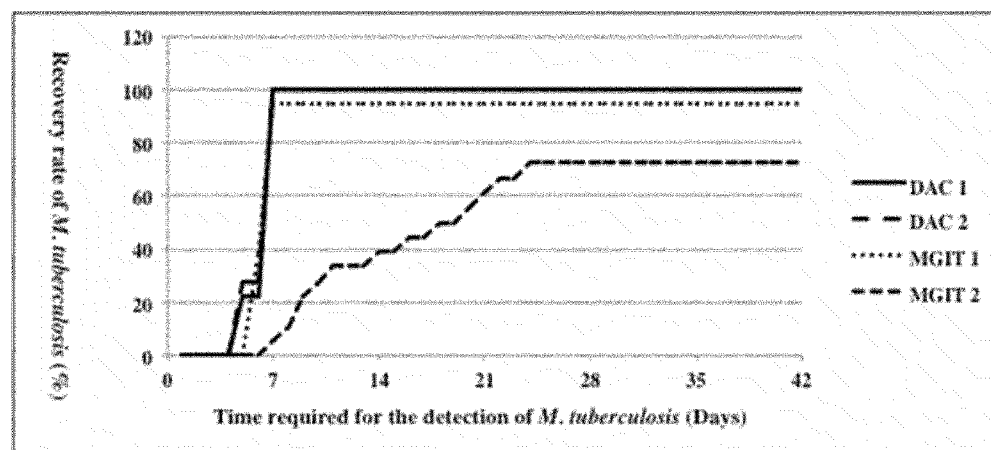
[Fig. 7]



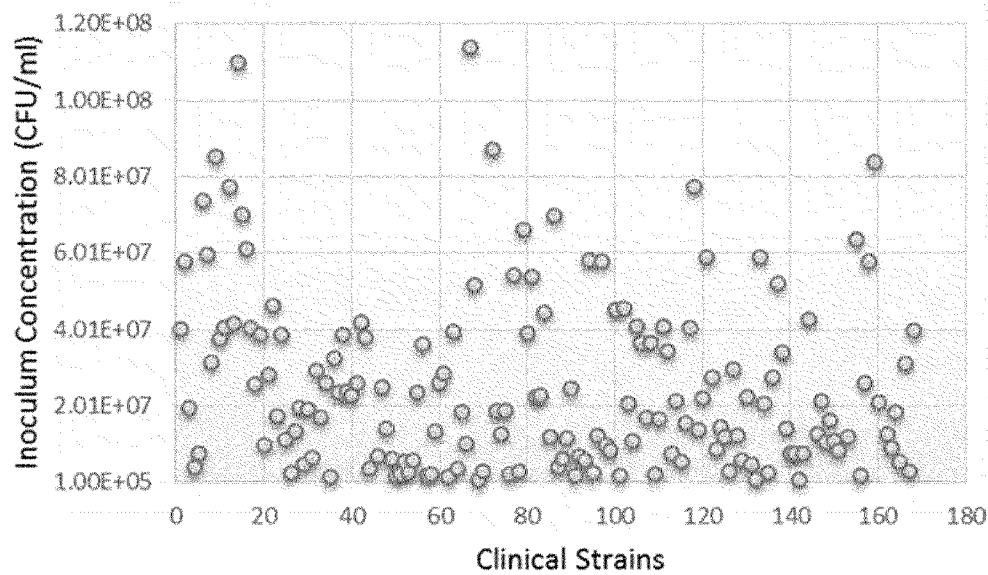
[Fig. 8]



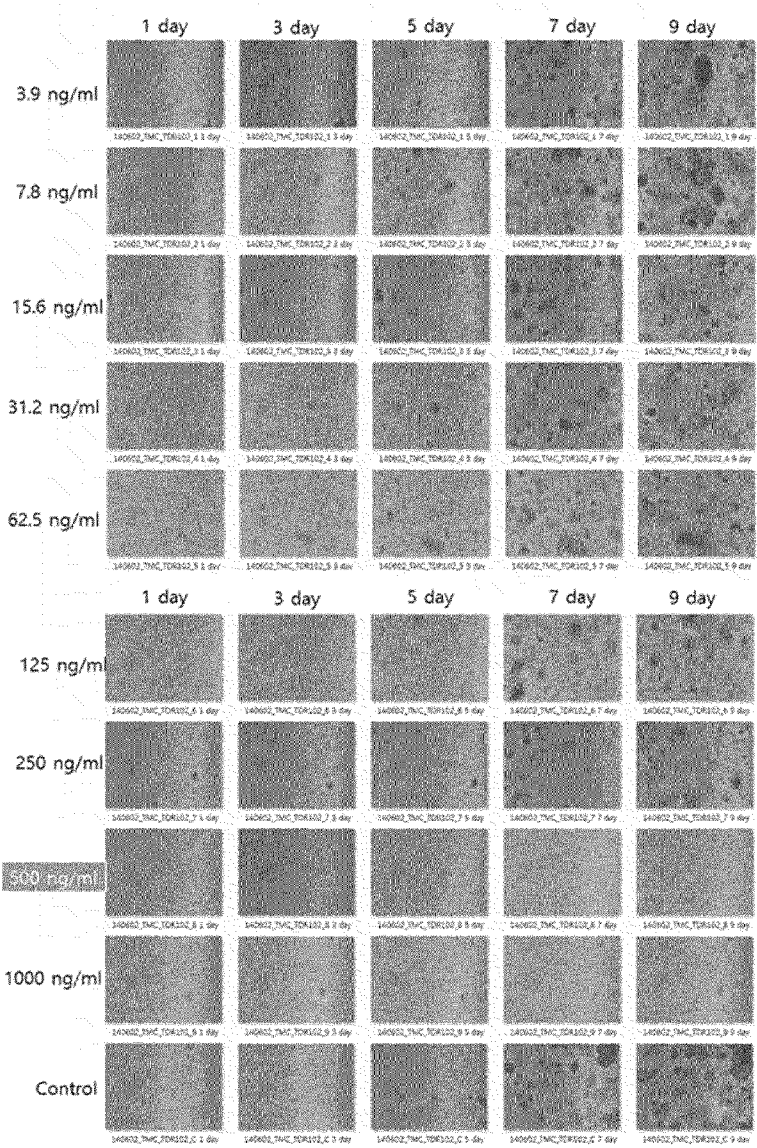
[Fig. 9]



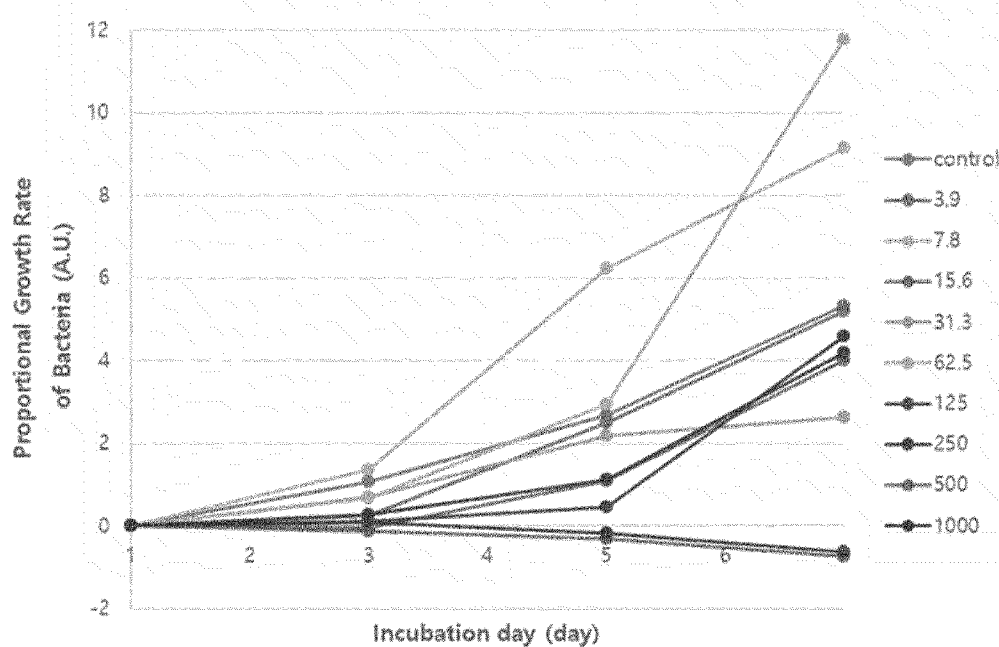
[Fig. 10]



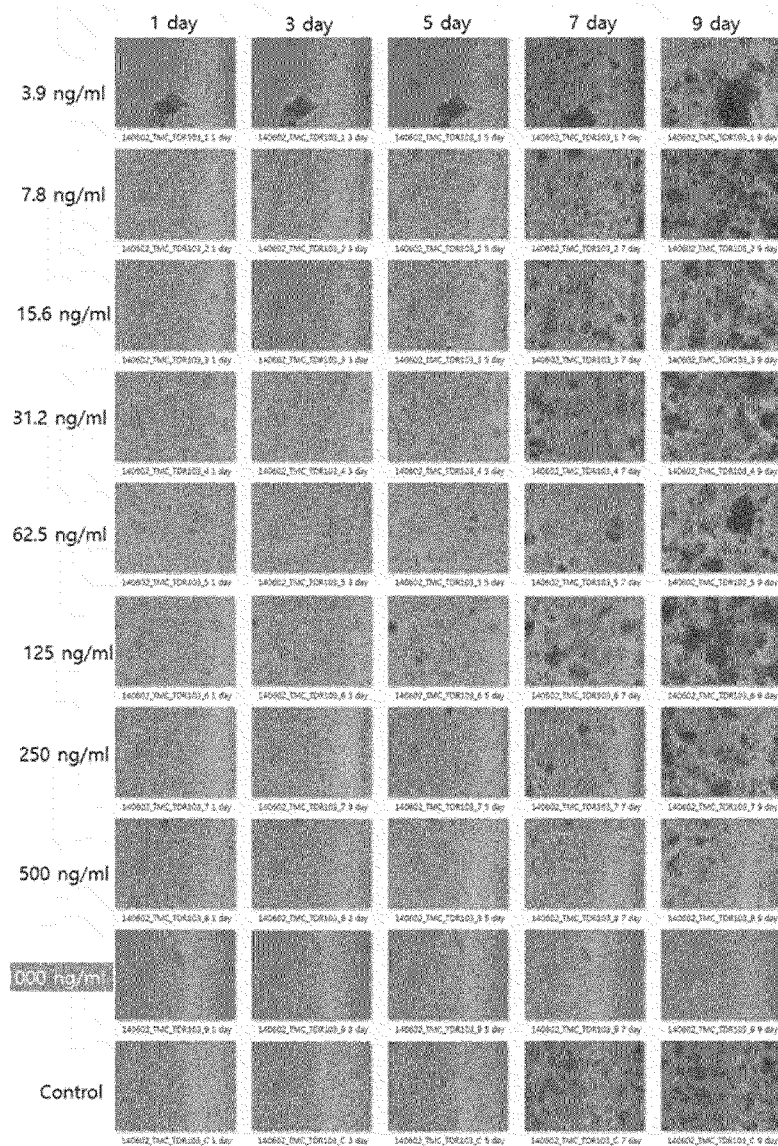
[Fig. 11]



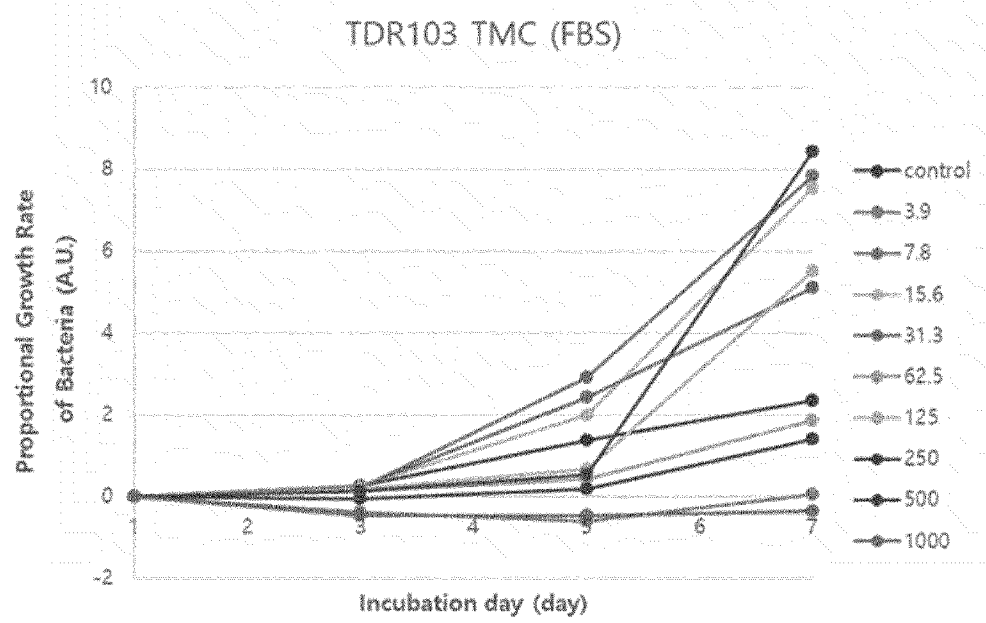
[Fig. 12]



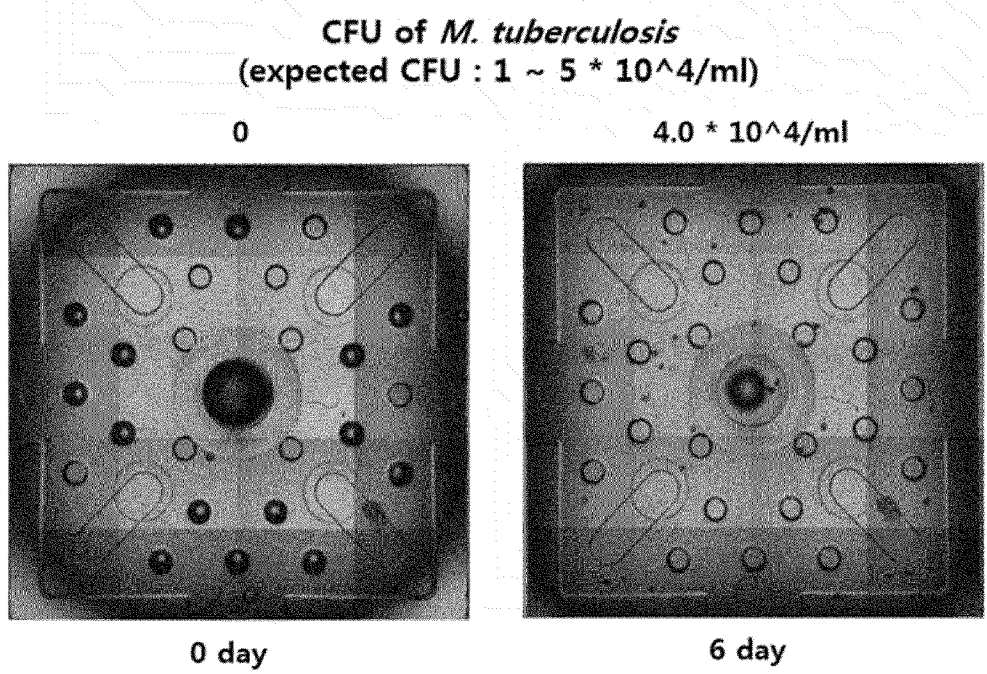
[Fig. 13]



[Fig. 14]



[Fig. 15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/009755**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12M 1/18(2006.01)i, C12Q 1/02(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)

C12M 1/18; C12Q 1/00; G01N 33/15; G01N 33/48; C12M 3/00; C12M 1/34; C12Q 1/02

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) & Keywords: solid thin film, biological activity and lower plate

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2013-0089619 A (QUANTA MATRIX CO., LTD. et al.) 12 August 2013 See abstract; paragraphs [0011], [0023]-[0024], [0092]; figures 4-7; the claims	1,2,4,9-12,15
Y		3,5-8,13-14,16-30
Y	KR 10-1446526 B1 (QUANTA MATRIX CO., LTD. et al.) 08 October 2014 See abstract; figures 3-5; the claims	3,5-8,13-14,16-30
A		1-2,4,9-12,15
A	KR 10-2007-0033685 A (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 27 March 2007 See abstract; the claims	1-30
A	JP 2009-513160 A (LEE, Moo - Yeal et al.) 02 April 2009 See abstract; the claims	1-30



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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

“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

13 JULY 2015 (13.07.2015)

Date of mailing of the international search report

14 JULY 2015 (14.07.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/009755

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2013-0089619 A	12/08/2013	KR 10-1290648 B1 US 2013-0196364 A1	29/07/2013 01/08/2013
KR 10-1446526 B1	08/10/2014	WO 2014-178692 A1	06/11/2014
KR 10-2007-0033685 A	27/03/2007	NONE	
JP 2009-513160 A	02/04/2009	CA 2628219 A1 CA 2628219 C EP 1943330 A2 EP 1943330 A4 JP 04-959710 B2 JP 2009-513160 T US 2009-0221441 A1 WO 2007-053561 A2 WO 2007-053561 A3	10/05/2007 27/11/2012 16/07/2008 09/12/2009 27/06/2012 02/04/2009 03/09/2009 10/05/2007 07/05/2009

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12M 1/18(2006.01)i, C12Q 1/02(2006.01)i																							
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12M 1/18; C12Q 1/00; G01N 33/15; G01N 33/48; C12M 3/00; C12M 1/34; C12Q 1/02 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 내부 검색시스템) & 키워드: 고체 박막, 생리 활성 및 밀판																							
C. 관련 문헌 <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">카테고리*</th> <th style="width: 70%;">인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th style="width: 20%;">관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>KR 10-2013-0089619 A (주식회사 쿼타메트릭스 등) 2013.08.12 요약; 단락 [0011],[0023]-[0024],[0092]; 도면 4-7; 청구항 참조</td> <td>1, 2, 4, 9-12, 15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>3, 5-8, 13-14, 16-30</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>KR 10-1446526 B1 (주식회사 쿼타메트릭스 등) 2014.10.08 요약; 도면 3-5; 청구항 참조</td> <td>3, 5-8, 13-14, 16-30</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>1-2, 4, 9-12, 15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2007-0033685 A (한국과학기술원) 2007.03.27 요약; 청구항 참조</td> <td>1-30</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 2009-513160 A (Lee, Moo-Yeal 등) 2009.04.02 요약; 청구항 참조</td> <td>1-30</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	X	KR 10-2013-0089619 A (주식회사 쿼타메트릭스 등) 2013.08.12 요약; 단락 [0011],[0023]-[0024],[0092]; 도면 4-7; 청구항 참조	1, 2, 4, 9-12, 15	Y		3, 5-8, 13-14, 16-30	Y	KR 10-1446526 B1 (주식회사 쿼타메트릭스 등) 2014.10.08 요약; 도면 3-5; 청구항 참조	3, 5-8, 13-14, 16-30	A		1-2, 4, 9-12, 15	A	KR 10-2007-0033685 A (한국과학기술원) 2007.03.27 요약; 청구항 참조	1-30	A	JP 2009-513160 A (Lee, Moo-Yeal 등) 2009.04.02 요약; 청구항 참조	1-30
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																					
X	KR 10-2013-0089619 A (주식회사 쿼타메트릭스 등) 2013.08.12 요약; 단락 [0011],[0023]-[0024],[0092]; 도면 4-7; 청구항 참조	1, 2, 4, 9-12, 15																					
Y		3, 5-8, 13-14, 16-30																					
Y	KR 10-1446526 B1 (주식회사 쿼타메트릭스 등) 2014.10.08 요약; 도면 3-5; 청구항 참조	3, 5-8, 13-14, 16-30																					
A		1-2, 4, 9-12, 15																					
A	KR 10-2007-0033685 A (한국과학기술원) 2007.03.27 요약; 청구항 참조	1-30																					
A	JP 2009-513160 A (Lee, Moo-Yeal 등) 2009.04.02 요약; 청구항 참조	1-30																					
☐ 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 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																							
국제조사의 실제 완료일 2015년 07월 13일 (13.07.2015)	국제조사보고서 발송일 2015년 07월 14일 (14.07.2015)																						
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140	심사관 박정웅 전화번호 +82-42-481-3355 																						

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2014/009755

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2013-0089619 A	2013/08/12	KR 10-1290648 B1 US 2013-0196364 A1	2013/07/29 2013/08/01
KR 10-1446526 B1	2014/10/08	WO 2014-178692 A1	2014/11/06
KR 10-2007-0033685 A	2007/03/27	없음	
JP 2009-513160 A	2009/04/02	CA 2628219 A1 CA 2628219 C EP 1943330 A2 EP 1943330 A4 JP 04-959710 B2 JP 2009-513160 T US 2009-0221441 A1 WO 2007-053561 A2 WO 2007-053561 A3	2007/05/10 2012/11/27 2008/07/16 2009/12/09 2012/06/27 2009/04/02 2009/09/03 2007/05/10 2009/05/07