

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 7월 20일 (20.07.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/123023 A1

- (51) 국제특허분류:
G01N 33/68 (2006.01) *G01Q 60/24* (2010.01)
G01N 33/92 (2006.01) *G06F 19/00* (2011.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/000422
- (22) 국제출원일: 2017년 1월 12일 (12.01.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0003893 2016년 1월 12일 (12.01.2016) KR
- (71) 출원인: 한밭대학교 산학협력단 (HANBAT NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC CO-OPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 34158 대전시 유성구 동서대로 125, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 신상모 (SHIN, Sang Mo); 34090 대전시 유성구 노은동로 111, 1003 동 206 호, Daejeon (KR). 박정호 (PARK, Jeong Hoh); 30064 세종시 도움 3로 75, 1105 동 1401 호, Sejong (KR). 김동민 (KIM, Dong Min); 34140 대전시 유성구 어은로 57, 138 동 1008 호, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 이은철 (LEE, Un Cheol); 06133 서울시 강남구 테헤란로 123, 11 층 5T 국제특허법률사무소, Seoul (KR).

- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

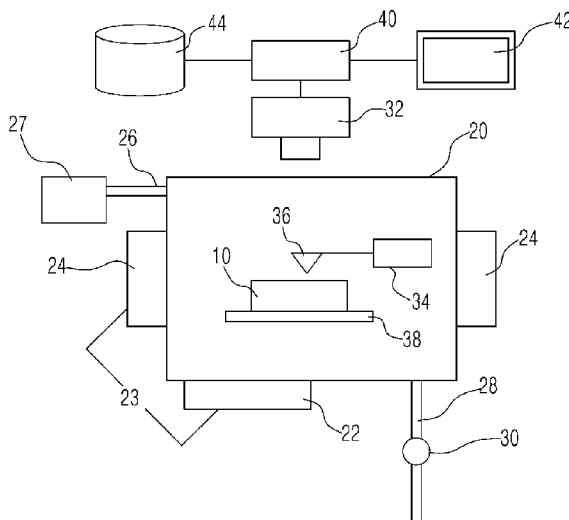
공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

(54) Title: APPARATUS AND METHOD FOR GENERATING THREE-DIMENSIONAL IMAGE OF POLYMER SOLUTE SUBSTANCE WHICH EXISTS IN LIQUID SOLVENT

(54) 발명의 명칭 : 액상 용매 내 존재하는 고분자 용질 물질의 3 차원 이미지를 생성하는 장치 및 방법

[도1]



포함한다.

(57) Abstract: The present invention relates to an apparatus and method for generating a three-dimensional image of a polymer substance. The three-dimensional image generating apparatus of the present invention comprises: a specimen state adjuster for adjusting a temperature or pressure of a solid specimen in order to maintain, in a solid state, the solid specimen including a plurality of polymer substances; an image collector for collecting a partial image of the plurality of polymer substances exposed on a surface of the solid specimen; a low molecule image database for storing an image of an element low molecule substance; and an image processor for generating a three-dimensional image of the polymer substance by matching the collected partial image with an image in the low molecule image database.

(57) 요약서: 본 발명은 고분자 물질의 3 차원 이미지를 생성하는 장치 및 방법에 관한 것이다. 본 발명의 3 차원 이미지 생성 장치는 복수 개의 고분자 물질을 포함하는 고상 시편을 고상으로 유지하기 위해 상기 고상 시편의 온도 또는 압력을 조절하는 시편 상태 조절기와, 상기 고상 시편의 표면에 노출된 상기 복수 개의 고분자 물질의 부분 이미지를 수집하는 이미지 수집기와, 구성요소 저분자 물질에 대한 이미지를 저장하는 저분자 이미지 데이터베이스와, 상기 수집한 부분 이미지를 상기 저분자 이미지 데이터베이스의 이미지에 정합시켜 상기 고분자 물질의 3 차원 이미지를 생성하는 영상 처리기를

명세서

발명의 명칭: 액상 용매 내 존재하는 고분자 용질 물질의 3차원 이미지를 생성하는 장치 및 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 액상 용매 내 존재하는 고분자 용질 물질의 3차원 이미지를 생성하는 장치 및 방법에 관한 것으로서 특히, 세포 내 고분자에 대한 실제적인 이미징을 가능하게 하는 3차원 이미지 생성 장치 및 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 현대 분자 생물학에서 세포와 세포 내 각 기관이 어떤 분자들 또는 구성으로 이루어져 있고, 각 기관에서 어떤 분자들이 만들어지고 어디로 이송되며 어떻게 변하고 분해되는지를 규명하는 것은 매우 중요한 연구 과제이다. 세포의 움직임과 성장은 정상적인 생리학적 과정에 있어서 핵심적인 사항이다. 만약 세포의 움직임과 성장이 제한 받는 경우 종양의 형성과 같은 부정적인 결과가 초래될 수 있다.
- [3] 특히 세포를 구성하는 고분자 또는 그 요소들의 3차원 분포와 그 변화를 아는 것은 세포의 구조와 세포 각 기관의 기능을 이해하는데 매우 중요하다. 세포를 구성하는 고분자 또는 요소들의 3차원 분포를 확인하는 대표적인 방법은 형광 이미징(fluorescence imaging) 기법이다.
- [4] 형광 이미징 기법은 세포 내의 특정 분자에 형광 표지자를 붙이거나 유전자 조작을 통해 분자 그 자체가 형광을 발현하도록 처리한 후 형광 이미지를 통해 대상 분자의 3차원 분포를 확인할 수 있게 한다. 형광 이미징 기법을 적용한 장치로서 공초점 레이저 현미경이 있다. 그러나 형광 이미징 기술은 세포 내에 형광 유전자나 형광 마커와 같은 이물질이 도입되어 세포 그 자체의 자연스런 상태가 아닌 인위적인 상태에서 이미징을 한다는 단점이 있다. 또한, 형광 이미징을 통해 특정 분자를 검출하기 위해서는 소정 농도 이상이 세포 내에 존재하여야 가능하므로, 농도가 낮은 분자들은 마커를 부착하거나 유전자 조작을 하여도 그 3차원 분포를 확인할 수 없다. 또한, 형광 이미지를 보는 것이기 때문에 마커에 대상 분자가 부착되어 있는지 여부를 확인하기 위해서는 추가적인 단계 및 분석이 필요하다.
- [5] 광학적 방법 및 생화학적 방법 이외의 세포 이미징 방법으로서, 전자 주사 현미경(SEM: Scanning Electron Microscope), 투과 전자 현미경(TEM: Transmission Electron Microscope), 원자력간 현미경(AFM: Atomic Force Microscope), 주사형 터널 현미경(STM: Scanning Tunneling Microscope) 등을 이용하여 세포나 소기관의 구조와 구성 분자를 연구하는 방법이 있다.
- [6] 전자 주사 현미경은 전자선이 시료면 위를 주사할 때 시료에서 발생하는 여러 가지 신호 중에서 그 발생 확률이 가장 많은 이차전자(secondary electron) 또는

반사전자(back scattered electron)를 검출하는 것으로 대상 시료를 관찰한다. 그러나 전자 주사 현미경의 경우 분자를 이미징 하기 어렵고, 시편을 동결한 후 원자번호가 높은 금속물질로 코팅해야 하는 단점이 있다.

- [7] 투과 전자 현미경은 평광한 전자선을 사용하여 시료를 투과시킨 전자선을 전자렌즈로 확대하여 관찰한다. 그러나 투과 전자 현미경의 경우 분자를 이미징 할 수는 있지만 이미징과 분석시간이 오래 걸리고, 시편을 동결한 후 얇게 썰어야 하는 단점이 있다.

- [8] 원자력간 현미경은 피라미드 형상의 탐침으로 시료 표면에 접촉하면서 2차원으로 주사하는 현미경이다. 원자력간 현미경의 경우, 무기물이나 금속 시편의 경우 원자 수준의 이미징이 가능하다. 그러나 물이 75-80%를 차지하고 있는 세포 자체 또는 외부에 배양액이 있는 세포의 경우 분해능이 급격히 악화되는 문제점이 있다. 또한, 원자력간 현미경은 분해능이 좋은 대신 이미징 면적이 아주 좁고, 살아있는 세포의 경우 자발적으로 또는 현미경의 탐침의 영향으로 형상이 변하기 때문에 이미지의 신뢰도가 낮을 수 있다. 또한, 원자력간 현미경으로 원자 분해능을 얻기 위해서는, 이미징 대상 분자가 평평한 고상 기판상에 위치하여야 하고, 저온 저압 진공 분위기가 필요하다. 더 나아가, 현재의 원자력간 현미경에 사용되는 탐침으로는 세포 내의 고분자처럼 크기가 크고 높이가 높은 분자를 이미징하기가 불가능하다.

- [9] 주사형 터널 현미경은 주사형 탐침 현미경의 일종으로 터널 전류를 이용하여 시료 표면의 형상을 분석한다. 주사형 터널 현미경의 경우 원자 수준의 이미징이 가능하나 진공에서 작동하고 전도성이 유지되어야 하기 때문에 수분이 다량 포함되어 있는 세포의 경우 이미징이 불가능하다는 문제점이 존재한다.

- [10] 이에 따라 본 발명자들은 세포 내 고분자에 대한 실제적인 이미징을 가능하게 하면서 표면을 순차적으로 제거하는 과정이 불필요하거나 최소화한 3차원 세포 이미징 방법 및 장치를 개발하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 본 발명은 액상 용매 내 존재하는 고분자 용질 물질에 대한 실제적인 3차원 이미징을 생성하는 것을 일 목적으로 한다.
- [12] 또한, 본 발명은 고분자의 표면을 순차적으로 제거하는 과정이 없이도 고분자의 3차원 이미지를 생성하는 것을 다른 목적으로 한다.
- [13] 또한, 본 발명은 고분자를 구성하는 저분자의 부분 이미지로부터 세포 내의 고분자의 3차원 이미지를 얻는 것을 또 다른 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [14] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 액상 용매 내 존재하는 고분자 용질 물질의 3차원 이미지를 생성하는 장치에 있어서, 복수 개의 고분자 물질을 포함하는 액상 시편을 고상화시킨 고상 시편을 고상으로 유지하기 위해 상기

고상 시편의 온도 또는 압력을 조절하는 시편 상태 조절기와, 상기 고상 시편의 표면에 노출된 상기 복수 개의 고분자 물질의 부분 이미지를 수집하는 이미지 수집기와, 구성요소 저분자 물질에 대한 이미지를 저장하는 저분자 이미지 데이터베이스와, 상기 수집한 부분 이미지를 상기 저분자 이미지 데이터베이스의 이미지에 정합시켜 상기 고분자 물질의 3차원 이미지를 생성하는 영상 처리기를 포함하는 것을 일 측면으로 한다.

- [15] 바람직하게는, 상기 복수 개의 고분자 물질을 포함하는 액상 시편을 냉동하여 고상 시편을 제조하는 고상 시편 제조기를 더 포함한다. 상기 고상 시편 제조기는 상기 액체를 급속 냉동한다. 또한, 상기 고상 시편에서의 상기 고분자 물질의 위치를 찾는 현미경을 더 포함한다.
- [16] 바람직하게는, 상기 이미지 수집기는 탐침이 장착된 SPM (Scanning Probe Microscope)이다. 상기 시편 상태 조절기는 이미지 정합에 필요한 수의 고분자 물질이 상기 고상 시편의 표면에 노출되도록 상기 고상 시편의 표면으로부터 승화를 수행한다.
- [17] 또한, 본 발명은 고분자 물질의 3차원 이미지를 생성하는 방법에 있어서, 복수 개의 고분자 물질을 포함하는 고상 시편을 고상으로 유지하기 위해 상기 고상 시편의 온도 또는 압력을 조절하는 단계와, 상기 고상 시편의 표면에 노출된 상기 복수 개의 고분자 물질의 부분 이미지를 수집하는 이미지 수집 단계와, 상기 수집한 부분 이미지를 구성요소 저분자 물질의 이미지에 정합시켜 상기 고분자 물질의 3차원 이미지를 생성하는 단계를 포함하는 것을 다른 측면으로 한다.
- [18] 바람직하게는, 상기 이미지 생성 단계는 상기 수집한 고분자 물질의 부분 이미지를 상기 저분자 이미지 데이터베이스의 제1 이미지와 비교하는 과정과, 상기 비교 결과 이미지가 정합되면 상기 제1 이미지에 해당하는 저분자 물질의 3차원 구조를 받아 상기 고분자 물질의 3차원 이미지를 구성하는 과정과, 상기 비교 결과 이미지가 정합되지 않으면 상기 부분 이미지와 상기 저분자 이미지 데이터베이스의 제2 이미지와 비교하는 과정을 포함한다.
- [19] 바람직하게는, 상기 복수 개의 고분자 물질을 포함하는 액체를 냉동하여 고상 시편을 제조하는 단계를 더 포함한다. 또한, 상기 고상 시편에서의 상기 고분자 물질의 위치를 찾는 단계를 더 포함한다. 또한, 상기 고상 시편의 표면을 승화시켜 상기 고분자 물질이 노출되도록 하는 단계를 더 포함한다.

발명의 효과

- [20] 본 발명에 따르면, 용매 용액 내 존재하는 용질 분자(예:세포 내 고분자)에 대한 정합된 전체 이미지에서 각 부분 단위체가 무엇인지 파악되므로 생체분자의 서열이 파악되어 생체분자의 부분 단위체를 확정할 수 있을 뿐만 아니라 서열 정보 및 화학적 변형 여부(인산화, 메틸화, 아세틸화, 산화 및 환원 등)도 판별이 가능한 효과가 있다. 또한, 고속 동결 과정에서 서로 상호작용하는 두 분자가

샘플에 존재한다면, 다양한 상황의 순간 모습이 이미징 되므로, 같은 분자들의 여러 이미지들을 모아보면 두 분자 간의 상호작용하는 과정(reaction process)을 모니터링 하는 것이 가능하다. 또한, 상기 정보들이 파악되면 신약의 타겟팅 정보 획득이 정확해지고, 신약 디자인이 수월해지며, 신약이 타겟에 잘 작용하고 있는지도 시각화하여 확인할 수 있기 때문에 신약 개발의 획기적인 발전에 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [21] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 3차원 이미징 장치에 대한 모식도이다.
- [22] 도 2는 도 1의 장치에 적용되는 고상 시편을 설명하는 도면이다.
- [23] 도 3은 본 발명의 실시예에 따른 고분자 물질에 대한 3차원 분자 이미징 방법의 순서도이다.
- [24] 도 4는 본 발명의 실시예에 따른 고분자 물질에 대한 3차원 분자 이미징 방법을 설명하기 위한 도면이다.
- [25] 도 5는 본 발명의 실시예에 따라 전체 고분자 물질의 3차원 이미지를 결정하는 과정을 설명하는 도면이다.
- [26] 도 6은 본 발명의 실시예에 따른 영상정합 알고리즘의 개념도이다.
- [27] 도 7은 본 발명의 실시예에 따른 3차원 이미징 장치의 구조를 구체화한 도면이다.
- [28] 도 8은 본 발명에 따라 고분자 물질의 2차원적인 부분 이미지를 획득하여 전체 아미노산 서열을 얻는 방법에 대한 개념도이다.
- [29] 도 9는 본 발명에 따라 고분자 물질의 2차원적인 부분 이미지를 다량 획득하여 효소의 저해제 내지 촉진제와 결합하였을 때의 3차원 구조 변화를 알아내는 방법에 대한 개념도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [30] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명한다.
- [31] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 3차원 이미징 장치에 대한 모식도이다. 도 2는 도 1의 장치에 적용되는 고상 시편(10)을 설명하는 도면이다.
- [32] 고상 시편(10)은 복수 개의 고분자 물질을 포함하는 액체를 냉동, 특히 급속 냉동하여 제조한다. 급속 냉동 장치는 고분자 물질 또는 바이러스의 내부, 외부 또는 표면에 있는 물을 비결정질 얼음으로 변환시킨다. 고분자 물질(12)만을 냉동시키는 것이 가능하면 고분자 물질만을 냉동시키면 되나, 실질적으로는 고분자 물질(12)을 포함한 생체액 또는 배양액을 급속 냉동시키는 경우가 더 많을 것이다.
- [33] 액상의 물을 급속 냉동하는 경우 결정성 얼음이 되지 않고 유리화 얼음(vitrified ice) 또는 비정질 얼음이 되기 때문에 고분자 물질(12)의 자연 상태(natural form)에 대한 변형이 발생하지 않는다. 이에 따라 자연 상태의 고분자 물질(12)에 대한 관찰이 가능해진다. 고분자 물질(12)을 포함한 생체액 또는 배양액을 급속

냉동시킬 때, 상기 생체액 또는 배양액을 페트리디쉬와 같은 형상의 작은 부피의 용기 혹은 트레이에 담아 급속 냉동시키는 것을 고려할 수 있다.

- [34] 고상 시편(10)은 관찰 챔버(20)로 이동된다. 관찰 챔버(20)의 내부는 액체 질소, 액체 헬륨 등을 사용하여 빙점 이하의 초저온으로 유지되어 고상 시편(10)의 해동이 방지된다. 또한, 관찰 챔버(20)의 내부에 수증기가 존재하는 경우 수증기가 관찰 챔버(20)의 내부 또는 이미징을 위한 기기에 동결 부착될 수 있으므로, 관찰 챔버(20)의 내부는 수증기가 제거된 상태, 예컨대 질소 분위기로 유지되는 것이 바람직하다.
- [35] 관찰 챔버(20)의 상부에는 광학 현미경(32)이 구비될 수 있다. 광학 현미경(32)은 시편(10)의 광학적 이미지를 취득하는 기능을 수행한다. 광학 현미경(32) 대신에 전자 현미경이 구비될 수 있다. 광학 현미경(32)은 고상 시편(10)의 원자 수준의 상부 이미지를 취득하는 기능을 수행한다. 광학 현미경(32)을 구비하는 이유는 고상 시편(10)에 대한 이미지를 확인하여 실제 관찰하고자 하는 복수 개의 고분자 물질 또는 바이러스의 고상 시편(10) 상에서의 대략적 위치와 상대적 위치를 파악하기 위해서이다.
- [36] 비정질 얼음은 고체 상태이기 때문에 원자력간 현미경(AFM)이나 주사형 터널 현미경(STM)을 이용하여 분자나 원자 수준까지 이미징이 가능하다. 따라서 바람직하게는 고상 시편(10)의 상부 표면을 측정하고 이에 따른 이미지를 생성하기 위한 표면 측정기(34)가 관찰 챔버(20) 내에 구비된다. 표면 측정기(34)는 고상 시편(10)의 표면을 원자 단위까지 측정할 수 있는 주사 프로브 현미경(SPM: Scanning Probe Microscope)이 사용될 수 있으며, 그 중에서도 각기 다른 모드의 원자력간 현미경(AFM)이 사용될 수 있다. 원자력간 현미경은 고상 시편(10)과 탐침(36)의 접촉 유무에 따라, 접촉 모드와 비접촉 모드로 나뉜다. 접촉 모드의 경우 고상 시편(10)의 표면과 굴곡을 측정하기 위해 탐침(36) 사이의 인력(반데르발스 힘)을, 비접촉 모드의 경우 척력을 측정함으로써 고상 시편(10)의 표면에 대한 정보를 얻는다. 접촉 모드는 검출 방식의 특성상 고상 시편(10)에 손상을 남길 수 있는데, 이러한 단점을 극복한 방식으로 태핑 모드 원자력간 현미경(Tapping Mode AFM)이 사용될 수 있다. 또한, 표면 측정기(34)는 주사형 터널 현미경(STM)일 수 있다.
- [37] 위와 같이 급속 냉동된 시편(10)에 대하여 원자력간 현미경 또는 주사형 터널 현미경과 같은 표면 측정기(34)를 이용하여 이미징을 하는 경우, 미소한 고분자 분자를 이미징 할 수 있다. 또한, 혈액 속에 극소량 존재하여 기존의 기술로 검출할 수 없었던 암 마커(cancer marker) 분자 등을 이미징 하는 것도 가능하다. 또한, 원자력간 현미경이나 주사형 터널 현미경 등을 이용하여 시편 표면을 측정하는 경우, 미소한 3차원 형상을 이미징 하는 것도 가능하다.
- [38] 다만, 이상의 과정에서 얻어진 고상 시편(10)의 표면에 대한 부분 이미지는 실질적으로는 고분자에 대한 3차원 이미지가 아닌 3차원 정보를 가지는 2차원 이미지라고 할 수 있다. 고분자 분자에 대한 3차원 이미지를 얻기 위해서는, 액체

속에서 자유로운 방향으로 열 운동을 하다가 표면에 해당 고분자의 다양한 모습이 노출되는 개별 2차원 이미지들을, 영상정합 알고리즘을 이용하여 조합함으로써 3차원 이미지를 획득한다.

- [39] 만약 표면에 노출된 고분자 분자의 개수가 영상정합 알고리즘을 이용할 정도로 충분한 샘플 숫자에 이르지 못하면, 이미 이미징이 완료된 층을 고상 시편(10)에서 승화 등의 방법으로 제거한 후 다음 층에 대한 이미지를 획득할 수 있다. 이 때 승화 전 표면에서 이미지를 얻은 고분자에서는 탐침(36)의 길이가 부족하므로 이미지 재획득이 어렵고, 대신 승화로 인해 새롭게 노출된 고분자에서 이미지를 획득하게 된다.
- [40] 고상 시편(10)의 표면을 제거하는 방법으로서, 관찰 챔버(20)의 내부의 온도 및/또는 압력을 조절하여 고상 시편(10) 표면의 비정질 얼음을 승화시켜 제거하는 것을 고려할 수 있다. 물의 상평형도에서 삼중점 이하의 온도나 압력에서는 고체 얼음과 기체 수증기만이 존재한다. 따라서 삼중점 이하에서 압력을 일정하게 유지하면서 온도를 상승시키면 고체 상태의 얼음은 기체 상태의 수증기로 승화한다. 또는 3중점 이하의 온도에서 압력을 낮추면 고체 상태의 얼음은 기체 상태의 수증기로 승화한다. 물론 3중점 이하에서 온도와 압력을 함께 조절하여 고체 상태의 얼음을 수증기로 승화시키는 것도 가능하다. 이러한 방식으로 온도와 압력을 조절하여 냉동된 시편(10)의 표면을 제거할 수 있다. 온도 조절을 위해서는 관찰 챔버(20)에 히터(22) 및 냉각기(24)를 부착한다.
- [41] 또한, 압력 조절을 위하여 관찰 챔버(20)의 내부와 연결된 진공 펌프(30)를 구비한다. 한편, 승화된 수증기를 포함한 관찰 챔버(20) 내의 가스를 제거하고 수증기를 포함하지 않은 가스를 공급하기 위하여, 관찰 챔버(20)에는 가스 배출구(28)가 구비되고 질소와 같은 가스를 공급하기 위한 가스 공급구(26)가 구비된다. 일 실시 형태로서, 가스 배출구(28)는 진공 펌프(30)와 연결될 수 있다.
- [42] 도 2(b)는 위와 같은 방법으로 고상 시편(10)의 표면층을 미소한 두께로 제거한 상태를 나타낸다. 도시된 바와 같이 고상 시편(10)의 표면(14)을 미소 두께로 제거한 후 광학 현미경(32) 및/또는 표면 측정기(34)를 이용하여 생체분자를 구성하는 요소들의 부분 이미지를 획득한다.
- [43] 고상화 수단, 온도/압력 조절수단 및 표면 측정수단은 다양한 방식으로 배치될 수 있다. 예를 들어, 고상화 수단은 다른 수단들과 동일 챔버에 배치되거나 다른 챔버에 배치될 수 있다. 온도/압력 조절수단은 표면 측정수단과 동일 챔버에 배치되거나 다른 챔버에 배치될 수 있다. 바람직하게는, 온도/압력 조절수단 및 표면 측정수단은 도 7과 같이 고상화 수단(예컨대, 냉동 장치)과는 별도로 하나의 챔버 즉, 관찰 챔버(20)에 배치된다. 관찰 챔버(20)는 급속 냉동된 생체 고분자의 고상 시편(10)을 수용한다. 이러한 관찰 챔버(20)는 수증기가 제거된 분위기를 유지하기 위하여 제습된 공기 또는 질소 분위기로 유지시키기 위한 제습 가스 공급부(27)와 연동된 가스 공급구(26)가 일 측에 구비된다. 또한, 관찰 챔버(20) 내부의 가스를 외부로 배출하기 위한 가스 배출구(28)가 관찰 챔버(20)의 저부에

구비된다. 또한, 관찰 챔버(20)의 중앙부에 고상 시편(10)을 위치시키기 위한 시편 테이블(38)이 구비된다.

- [44] 한편, 관찰 챔버(20)의 온도를 조절하기 위한 온도 조절수단(23)이 관찰 챔버(20)에 구비되는데, 온도 조절수단(23)은 히터(22), 냉각기(24) 등으로 구성되며, 관찰 챔버(20) 내부의 온도를 높이거나 낮춘다. 또한, 관찰 챔버(20)에는 압력 조절수단(30)이 연결되어 관찰 챔버(20)의 압력을 조절한다. 압력 조절수단(30)은 진공 펌프로 구성될 수 있다. 온도 조절수단(23), 압력 조절수단(30)은 고상 시편(10)의 상태(phase)을 조절하는 시편 상태 조절기를 구성한다.
- [45] 이러한 구성에 의하여 관찰 챔버(20)의 내부에 고상 시편(10)을 위치시킨 상태에서, 관찰 챔버(20)의 온도 및/또는 압력을 조절하여 고상 시편(10)의 해빙을 조절할 수 있다. 특히, 관찰 챔버(20)의 온도와 압력이 3중점 이하로 유지된 상태에서 온도 또는 압력을 조절하여 고상 시편(10)의 상부 표면의 얼음을 수증기로 승화시켜 제거할 수 있다. 승화된 수증기를 포함한 관찰 챔버(20)의 내부 가스는 가스 배출구(28)를 통해 배출되고, 가스 공급구(26)를 통해 제공된 가스를 다시 관찰 챔버(20)의 내부로 공급한다.
- [46] 관찰 챔버(20)에는 표면 측정기(34)가 구비되는데, 표면 측정기(34)는 원자력간 현미경 또는 주사형 터널 현미경일 수 있다. 원자력간 현미경 또는 주사형 터널 현미경의 탐침(36)은 관찰 챔버(20)의 내부에 위치하며 고상 시편(10) 상부의 표면을 측정한다. 한편, 탐침(36)은 고상 시편(10) 상부의 표면을 측정하는 외에, 필요시에는 고상 시편(10) 상부의 세포 구조물을 제거하는 용도로 사용되는 것도 가능하다. 표면 측정기(34), 탐침(36) 등은 고상 시편(10)의 표면에 노출된 복수 개의 고분자 물질의 부분 이미지를 수집하는 이미지 수집기를 구성한다.
- [47] 영상 처리기(40)는 표면 측정기(34)의 탐침(26)에 의해 측정된 고상 시편(10)의 표면 정보를 처리하여 고상 시편(10)의 표면에 대한 2차원 이미지를 생성한다. 바람직하게는 영상 처리기(40)는 시각 디스플레이 장치(42)와 연결되어 처리된 2차원 이미지를 디스플레이 한다.
- [48] 상술한 바와 같이, 본 실시예에서 고상 시편(10)의 표면에 노출된 생체 고분자의 여러 각도의 다양한 2차원 이미지를 획득할 수 있다. 이렇게 다양하게 얻은 고상 시편(10)에 대한 복수의 부분 이미지를 구성요소인 저분자의 이미지를 저장하고 있는 저분자 이미지 데이터베이스(44) 내의 이미지와 영상 정합하여 영상 처리기(40)는 생체 고분자의 3차원 이미지를 형성할 수 있다.
- [49] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 고분자 물질의 3차원 분자 이미징 방법에 대한 순서도이다. 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 고분자 물질의 3차원 분자 이미징 방법을 개념적으로 설명하기 위한 도면이다. 도 4(a)는 3차원 이미징 대상인 고분자 물질이 액체에 녹아 있는 상태를 나타내고, 도 4(b)는 급속 냉동 과정을 통해 고분자 물질이 자연 상태 그대로 얼려져 있는 상태를 나타내며, 도 4(c)는 액체의 승화를 통해 이미징 대상인 고분자 물질이 표면에 노출되는 과정을

나타내고, 도 4(d)는 탐침이 장착된 SPM 등을 이용해 표면의 이미지를 수집하는 과정을 나타낸다. 도 5는 3차원 이미징 대상인 고분자 물질의 구성요소인 저분자 부분 이미지(502)를 수집하여 시편 이미지 데이터베이스(504)에 모으고, 저분자 이미지 데이터베이스(44)의 이미지와의 영상정합 알고리즘을 통해 전체 고분자 물질의 3차원 이미지(508)를 결정하는 과정을 나타낸 개념도이다.

[50] (1) 고상 시편의 준비

[51] 먼저, 본 실시예에서는 1종류의 복수 개의 고분자 물질을 포함하는 액체를 냉동하여 고상 시편을 준비한다(S110). 도 4(a)와 도 4(b)는 이 단계를 설명한다.

[52] 고분자 물질을 포함하는 액체는 고분자의 분리와 추출에 이용되는 배지, 완충 용액 또는 생체액을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[53] 본 실시예는 단백질, 지질, 다당류, 핵산 및 다양한 생체 고분자에 대해 적용할 수 있으며, 고상 시편은 이러한 다양한 생체 고분자 및 이를 포함하는 액체를 이용하여 준비한다. 본 실시예는 생체 고분자로 이루어진 바이러스의 이미징도 가능한데, 이미징 대상이 되는 바이러스는 동물 바이러스, 식물 바이러스 및 박테리오파아지를 포함한다. 예를 들어, HBV(hepatitis B virus), HCV(hepatitis C virus), HAV(hepatitis A virus), HIV(human immunodeficiency virus), reovirus, Sendai virus, myxovirus, coronavirus, encephalomyelitis virus, rotavirus, cytomegalovirus, measles virus, vaccinia virus, rabies virus, Epstein-Barr virus, rhinovirus, polio virus, herpes virus 등을 이미징 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[54] 고상 시편을 얻기 위한 냉동은 당업계에 공지된 다양한 냉동 방법에 따라 실시할 수 있다. 예를 들어, 상기 냉동은 -200°C 내지 -15°C의 온도범위, -180°C 내지 -20°C의 온도범위, -150°C 내지 -35°C의 온도범위, -200°C 내지 -55°C의 온도범위에서 실시할 수 있다.

[55] 예를 들어, 상기 냉동은 고상의 이산화탄소와 알코올의 혼합물 또는 액체 질소에 대상 고분자 또는 고분자가 용해되어 있는 용액을 담고 있는 용기를 함침시켜 실시할 수 있다. 상기 고상의 이산화탄소와 알코올의 혼합물 또는 액체 질소는 컨테이너에 담겨 있을 수 있다. 상기 컨테이너는 냉동기(freezer)에 직접적으로 위치할 수 있으며, 상기 냉동기는 원하는 온도(예컨대, -35°C 이하)에 세팅될 수 있다. 냉동기는 프로그램화된 냉동기 또는 속도조절 냉동기일 수 있다. 상기 고상 시편은 재결정이 발생하는 온도 이하의 온도, 예컨대 순수한 물의 유리전이온도 이하의 온도(예컨대, 135°C)에서 보관할 수 있다.

[56] 바람직하게는, 상기 냉동은 액체질소를 사용한 급속 냉동으로 실시한다. 본 명세서에서 "급속 냉동"은 일반적으로 최대 빙결정 생성대(예컨대, -5°C 내지 -1°C, 빙결율 80% 이상)를 단시간(예컨대, 30-35분 이내)에 통과하여 빙결정의 크기를 작게 하거나 또는 비결정질 얼음(또는 유리질 얼음)이 생성되도록 하는 것을 의미한다. 급속 냉동은 유리화(vitrification) 동결 방법이다.

[57] 고상 시편은 고체이기 때문에, 적합한 이미징 기기 예컨대, AFM 또는 STM을 사용하여 원자/분자 수준까지 세포 이미징이 가능하다. 상온에서는 비정질

얼음이 녹기 때문에 빙점 이하의 저온에서 이미징을 하는 것이 바람직하다. 또한, 상압저온에서 이미징을 할 경우, 공기 중의 습기가 이미징 기기의 저온부에서 동결될 수 있으므로, 습기가 제거된 환경(예컨대, 질소 분위기)에서 이미징을 하는 것이 바람직하다.

[58] (2) 고상 시편의 표면 제거에 의한 새로운 표면의 형성

[59] 고상 시편에 대해 표면의 2차원 이미지를 수집하기 위해, 고상 시편의 표면을 제거하고 새로운 표면을 형성시킨다(S120). 도 4(c)가 이 단계를 설명한다.

[60] 본 실시예에서 고상 시편의 표면 제거는 고상 시편의 표면에 있는 얼음을 승화시켜 실시한다. 물은 생체 환경(예컨대, 세포, 조직, 체액 및 혈액)의 80% 이상을 차지한다. 고상 시편의 제작 과정에서 형성된 얼음, 바람직하게는 비정질 얼음은 고분자 등의 시편에 손상을 최소화 하면서 제거되어야 한다. 이를 위하여, 본 실시예에서는 독특하게 고상 시편의 표면에 있는 얼음을 승화시킨다.

[61] 승화는 삼중점(triple point) 아래의 등온에서 압력을 조절하여 실시할 수 있다. 압력 조절은 진공펌프 또는 콜드 트랩을 이용하여 실시할 수 있다. 택일적으로, 승화는 삼중점 아래의 등압에서 온도를 조절하여 실시할 수 있다. 승화를 위한 온도 조절은 예컨대, 히터 또는 냉각기를 이용할 수도 있고 표면 이미지 획득에 사용되는 SPM 탐침에 열을 가하여 부분적으로 온도를 조절하여 실시할 수 있다.

[62] 물의 상평형도에서, 삼중점 이하의 온도나 압력에서는 고체 얼음 및 기체 수증기만 존재한다. 이때 삼중점 이하에서 압력을 일정하게 유지하면서 온도를 상승하면 고체 상태에서 기체 상태로 액체를 거치지 않고 승화한다. 또한, 삼중점 이하 온도에서 압력을 낮추면 고체 상태에서 기체 상태로 액체를 거치지 않고 승화한다. 이러한 방식으로 고상 시편 표면의 얼음을 승화시켜 제거함으로써, 고상 시편의 표면을 제거하고 표면정보 수집의 대상이 되는 1종류의 복수 개의 고분자들이 노출된 새로운 표면을 형성시킨다. 이때 1종류의 복수 개의 고분자들은 열 운동에 의해 다양한 상대적 위치를 가지므로, 표면에 노출된 부위는 다양하게 된다.

[63] 고상 시편의 표면을 제거할 때 얼음은 승화로 제거되고, 분자량이 큰 고분자들은 승화되지 않고 잔존한다. 이와 같이 잔존하는 고분자들을 이미징 하면 고분자를 구성하는 저분자들의 개별적이고 부분적인 이미지들을 얻을 수 있다.

[64] 상기 (1)과 (2) 단계는, 고분자 물질을 포함하는 액체의 부피를 최소화하여 냉동 단계에서 복수 개의 고분자 물질이 처음부터 고상 시편인 얼음 표면에 노출되도록 하는 방법을 이용하는 것도 가능하다.

[65] (3) 표면 정보인 부분 이미지 수집

[66] 고분자를 포함하는 액체를 고상화 하여 준비된 고상 시편에 대하여 표면 정보를 수집한다(S130). 도 4(d)는 이 단계를 설명한다.

[67] 고상 시편의 표면에 대한 정보 수집은 탐침을 이용하는 SPM(Scanning probe microscope)을 이용하여 실시하는 것이 바람직하다. SPM은 마이크로미터

빛/또는 나노미터 스케일로 분석대상의 물리적 특성을 측정하는 도구이다. SPM은 탐침(probe)를 이용하며, 이 탐침은 분석대상의 표면에 매우 근접하여 위치한다. 탐침은 몇백 마이크로미터 길이 및 0.5-5 마이크로미터의 두께를 가지는 칸틸레버 상에 마운팅 될 수 있다. SPM 방법은 Wang et al., Amer. Chem. Soc. Lett., 12:1697-98, 1996; Kim et al., Appl. Surface Sci. 130, 230, 340-132:602-609, 1998; Kobayashi et al., Appl. Surface Sci. 157:228-32, 2000; Hirahara et al., Phys. Rev. Lett. 85:5384-87, 2000; Klein et al., Applied Phys. Lett. 78:2396-98, 2001; Huang et al., Science 291:630-33, 2001; Ando et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 124:68-72, 2001에 개시되어 있다.

- [68] 바람직하게는, 본 실시예에서 표면 정보 수집에 이용되는 SPM은 AFM(atomic force microscope), STM(scanning tunneling microscope), BEEM(ballistic electron emission microscope), CFM(chemical force microscope), C-AFM, (conductive atomic force microscope), EFM(electrostatic force microscopy), ESTM(electrochemical scanning tunneling microscope), FMM(force modulation microscope), KPFM(kelvin probe force microscope), MFM(magnetic force microscope), MRFM(magnetic resonance force microscope), NSOM(near-field scanning optical microscope), SNOM(scanning near-field optical microscope), PFM(Piezoresponse Force Microscope), PSTM(photon scanning tunneling microscope), PTMS(photothermal microscope), SECM(scanning electrochemical microscope), SCM(scanning capacitance microscope), SGM(scanning gate microscope), SICM(scanning ion-conductance microscope), SPSM(spin polarized scanning tunneling microscope), SSRM(scanning spreading resistance microscope), SThM(scanning thermal microscope), SVM(scanning voltage microscope), STP(scanning tunneling potentiometry), SHPM(scanning Hall probe microscope), 또는 SXSTM(synchrotron x-ray scanning tunneling microscope)이고, 보다 바람직하게는 AFM 또는 STM이고, 가장 바람직하게는 AFM이다.

- [69] AFM은 U.S. Pat. No. 5,497,656; Moller et al., Biophys. J., 77:1150-8, 1999; Thundat [0056] et al., Scanning Microsc. 6:911-8, 1992; Hansma et al., Nucleic Acids Res., 21:505-12, 1993; Murray et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:3811-4, 1993에 개시되어 있다.

- [70] 표면 정보의 수집은 고상 시편의 표면과 탐침 사이에 작용하는 힘(바람직하게는, 반데르발스 힘)을 측정하여 실시한다. 표면 정보 수집에 의해 분석 대상 고분자의 표면 상태, 구성 저분자들에 대한 정보(예컨대, 3차원 이미지)를 얻을 수 있다.

- [71] 고분자 물질의 3차원 이미지를 얻기 위해 필요한 일정한 숫자의 부분 이미지(표면 정보를 의미함)를 얻지 못하는 경우(S140)는 단계 (2)와 (3)를 반복하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.

- [72] (4) 영상 정합을 통한 고분자 3차원 이미지 획득

- [73] 3차원 이미징 대상인 고분자 물질의 구성요소인 저분자의 부분 이미지를 고분자 이미지 획득과 동일한 과정 혹은 기존 SPM 측정 과정을 통해 수집한 후, 도 5와 같이 시편 이미지 데이터베이스(504)에 모으고, 저분자 이미지 데이터베이스(44)를 참고하는 영상정합 알고리즘을 통해 전체 고분자 물질의 3차원 이미지(508)를 결정한다(S150).
- [74] 실제로 고상 시편에는 최소 수천 개 이상의 고분자가 포함될 것이므로 각각으로부터 얻어진 부분 이미지 정보를 종합하면 세포 내에 포함된 물을 제외한 세포 구조물의 3차원 이미지를 획득하고, 각 세포 구조물 사이의 관계를 확인할 수 있다.
- [75] 저분자 이미지 데이터베이스(44)로는, 기존의 아미노산 데이터베이스, 지질의 지방산 데이터베이스, 단당류 데이터베이스, 핵산 데이터베이스를 이용할 수도 있으며, 저분자 물질을 포함하는 고상 시편을 준비하고, 저분자 물질에 대한 이미지를 수집한 후, 저분자 물질에 대한 이미지 데이터베이스를 구축한 것을 사용할 수 있다.
- [76] 도 6은 저분자 부분 이미지(시료 스캔데이터)와 물리 시뮬레이션을 통해, 3차원 이미지 형태로 고분자 물질을 시각화하는 영상정합 알고리즘의 흐름도이다.
- [77] 먼저, AFM 영상을 취득하고 물리적으로 시뮬레이션을 하는 것으로 기본적인 구조를 만들고(S602), 생체 고분자 시료에 대한 스캔데이터(앞 단계에서 획득한 부분 이미지)를 이용해 보완한다(S604). AFM으로 초기 데이터(raw data)를 얻으면 바로 원자 이미지로 보이지 않기 때문에 밀도범함수 이론(density functional theory: DFT)에 의거 시뮬레이션을 하여 우리가 익숙한 원자 이미지를 얻을 수 있다. 다음에는 저분자 이미지 데이터베이스(44)를 참고하여, 다각의 표면 토폴로지 영상 처리를 수행한다(S606). 이 단계에서 앞에서 얻은 원자 이미지를 X/Y/Z 축을 기준으로 회전하면서 각 각도에서 영상 처리를 수행한다. 다음에는 이 결과로 얻은 영상으로부터 압축 센싱 기반으로 3차원 영상을 재구성한다(S608). 다음에는 블록 최적화 기법을 이용한 최적화 과정(S610)을 수행하여 생체 고분자에 대한 3차원 이미지를 얻고 시각화한다(S612).
- [78] 본 발명은 세포막 표면의 수용체, 채널, 세포막 단백질, 세포막 표면 탄수화물, 세포 표면 마커, 세포 내부의 세포 소기관, 염색체, 단백질(예컨대, 효소, 항체, 항원, 구조 단백질, 호르몬, 성장인자, 혈청 단백질), 핵산분자(예컨대, DNA, RNA, mRNA, rRNA, tRNA, miRNA, siRNA), 탄수화물 및 지질 등 다양한 고분자 물질에 대한 3차원 이미지를 제공할 수 있다. 또한, 본 발명은 구성이 단백질, 핵산, 지질 등의 고분자로 이루어진 바이러스의 내부 및 표면에 대한 이미지(특히, 3차원 이미지)를 제공할 수 있다.
- [79] 도 7은 본 발명의 다른 실시예에 따른 고분자 물질의 표면 원자구조 3차원 이미징 장치의 구성을 설명하는 개념도이다.
- [80] 프리 챔버(pre-chamber)(702)는 고상 시편을 제조하는 기능을 수행한다. 프리 챔버(702)에서는 어타마이저(atomizer)(706)에 의해 고분자 용액이 분사되어

단위 부피가 작은 미세시료 용기(nano-well plate)(708)에 놓이면서 급속 냉각된다. 미세시료 용기(708)는 콜드 스테이지(cold stage)(710) 위에 배치한다. 프리 챔버(702)에서 고상화된 시편은 로더(loader)(712)에 의해 관찰 챔버(704)로 이동한다. 관찰 챔버(704)에는 AFM 장비인 AFM 칸틸레버(cantilever)(716)와 피에조 스캐너(piezo-scanner)(714)가 위치하여 고분자의 표면 이미징을 수행한다.

- [81] 본 발명을 이용하면 실제 세포의 표면 및 세포 내에 존재하는 다양한 생체 고분자, 더 나아가 그 표면의 원자 구조에 대한 정보를 얻을 수 있다. 또한, 생체분자 사이의 상호작용에 대한 정보 및 세포 소기관 사이의 유기적 관계를 효율적으로 파악할 수 있다.
- [82] 예를 들어, 도 8에 도시된 바와 같이, 특정 단백질의 표면 원자 구조를 확인하기 위해 부분 이미지를 확보한 후에는, 해당 부분 이미지로부터 특정 단백질의 일 측면에 노출된 아미노산 잔기의 서열을 알 수 있고, 이를 조합하면 전체 단백질의 아미노산 서열을 높은 확률로 파악할 수 있다.
- [83] 단백질과 아미노산 서열 사례 외에도, 생체분자의 서열이 파악되어 생체분자의 부분 단위체를 확정할 수 있을 뿐만 아니라, 서열 정보 및 구성 요소의 화학적 변형여부 (인산화, 메틸화, 아세틸화, 산화 및 환원 등)도 판별이 가능하다.
- [84] 또한, 고속 동결 과정에서 서로 상호작용하는 두 분자가 샘플에 존재한다면, 다양한 상황의 순간 모습이 이미징 되므로, 같은 분자들의 여러 이미지들을 모아서 보면 두 분자 간의 상호작용하는 과정 (reaction process)를 모니터링하는 것이 가능하다.
- [85] 도 9는 본 발명에 따라 고분자 물질의 2차원적인 부분 이미지를 다량 획득하여 효소의 저해제 내지 촉진제와 결합하였을 때의 3차원 구조 변화를 알아내는 방법에 대한 개념도이다.
- [86] 도 9(a)에 도시된 바와 같이 고분자 물질의 2차원적인 부분 이미지를 다양하게 획득하여, 도 9(b)에 도시된 바와 같이 효소 같은 고분자 물질이 저해제 내지 촉진제와 결합하였을 때의 순차적인 3차원 구조 변화를 알아낼 수 있다. 서로 상호작용하는 두 분자가 액체 샘플에서 유래한 고상 시편에 존재한다면, 다양한 상황의 순간 모습 수십 개, 수백 개가 부분 이미징 되므로, 같은 분자들의 여러 이미지들을 모아보면 두 분자간의 상호작용하는 과정을 모니터링 할 수 있는 것이다.
- [87] 이러한 정보들이 파악되면 신약의 타겟팅 정보 획득이 정확해지고, 신약 디자인이 수월해지며, 신약이 타겟(생체분자가 여기에 해당)에 잘 작용하고 있는지도 확인할 수 있기 때문에 신약개발의 획기적인 발전에 기여할 수 있다.
- [88] 본 발명은 상기한 예 이외에도, 세포 내 고분자에 대한 기초 연구, 병균이 생산하는 고분자 물질과 세포 내 물질의 상호 작용, 약품이나 화학 물질이 세포에 미치는 영향, 세포의 분화나 복제와 관련된 고분자 등의 연구 등에 광범위하게 사용될 수 있다.

- [89] 이상, 본 발명의 특정 부분을 상세히 기술하였으나, 이러한 기술은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

청구범위

- [청구항 1] 액상 용매 내 존재하는 고분자 용질 물질의 3차원 이미지를 생성하는 장치에 있어서,
복수 개의 고분자 물질을 포함하는 고상 시편을 고상으로 유지하기 위해 상기 고상 시편의 온도 또는 압력을 조절하는 시편 상태 조절기와,
상기 고상 시편의 표면에 노출된 상기 복수 개의 고분자 물질의 부분 이미지를 수집하는 이미지 수집기와,
구성요소 저분자 물질에 대한 이미지를 저장하는 저분자 이미지 데이터베이스와,
상기 수집한 부분 이미지를 상기 저분자 이미지 데이터베이스의 이미지에 정합시켜 상기 고분자 물질의 3차원 이미지를 생성하는 영상 처리기를
포함하는 것을 특징으로 하는 3차원 이미지 생성 장치.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 복수 개의 고분자 물질을 포함하는 액체를 냉동하여 고상 시편을 제조하는 고상 시편 제조기를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 3차원 이미지 생성 장치.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 고상 시편 제조기는 상기 액체를 급속 냉동하는 것을 특징으로 하는 3차원 이미지 생성 장치.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 이미지 수집기는 탐침이 장착된 SPM (Scanning Probe Microscope)인 것을 특징으로 하는 3차원 이미지 생성 장치.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 고상 시편에서의 상기 고분자 물질의 위치를 찾는 현미경을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 3차원 이미지 생성 장치.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 시편 상태 조절기는 상기 고상 시편의 표면을 승화시켜 상기 고분자 물질이 노출되도록 하는 것을 특징으로 하는 3차원 이미지 생성 장치.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 시편 상태 조절기는 이미지 정합에 필요한 수의 고분자 물질이 상기 고상 시편의 표면에 노출되지 않은 경우 상기 고상 시편에 대한 추가적인 승화를 수행하는 것을 특징으로 하는 3차원 이미지 생성 장치.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 영상 처리기는
상기 수집한 고분자 물질의 부분 이미지를 상기 저분자 이미지 데이터베이스의 제1 이미지와 비교하는 단계와,
상기 비교 결과 이미지가 정합되면 상기 제1 이미지에 해당하는 저분자

물질의 3차원 구조를 받아 상기 고분자 물질의 3차원 이미지를 구성하는 단계와,

상기 비교 결과 이미지가 정합되지 않으면 상기 부분 이미지와 상기 저분자 이미지 데이터베이스의 제2 이미지와 비교하는 단계를 수행하는 것을 특징으로 하는 3차원 이미지 생성 장치.

[청구항 9] 액상 용매 내 존재하는 고분자 용질 물질의 3차원 이미지를 생성하는 방법에 있어서,
복수 개의 고분자 물질을 포함하는 고상 시편을 고상으로 유지하기 위해 상기 고상 시편의 온도 또는 압력을 조절하는 단계와,
상기 고상 시편의 표면에 노출된 상기 복수 개의 고분자 물질의 부분 이미지를 수집하는 이미지 수집 단계와,
상기 수집한 부분 이미지를 구성요소 저분자 물질의 이미지에 정합시켜 상기 고분자 물질의 3차원 이미지를 생성하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 3차원 이미지 생성 방법.

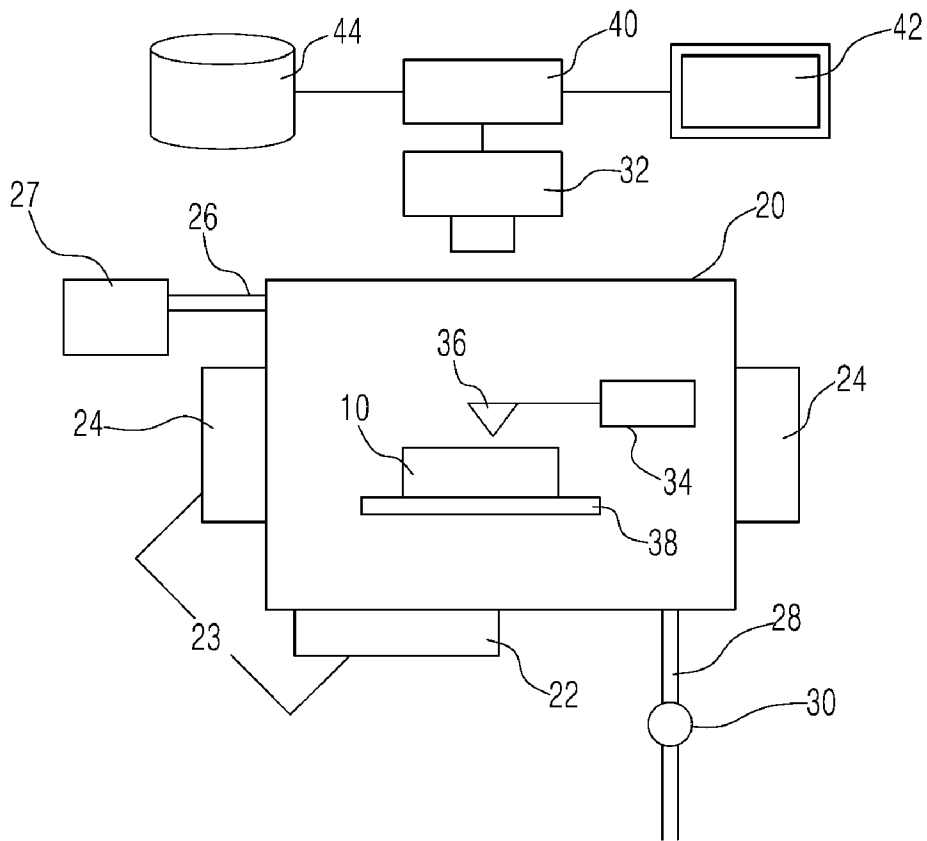
[청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 이미지 생성 단계는
상기 수집한 고분자 물질의 부분 이미지를 상기 저분자 이미지 데이터베이스의 제1 이미지와 비교하는 과정과,
상기 비교 결과 이미지가 정합되면 상기 제1 이미지에 해당하는 저분자 물질의 3차원 구조를 받아 상기 고분자 물질의 3차원 이미지를 구성하는 과정과,
상기 비교 결과 이미지가 정합되지 않으면 상기 부분 이미지와 상기 저분자 이미지 데이터베이스의 제2 이미지와 비교하는 과정을 포함하는 것을 특징으로 하는 3차원 이미지 생성 방법.

[청구항 11] 제9항에 있어서,
상기 복수 개의 고분자 물질을 포함하는 액체를 냉동하여 고상 시편을 제조하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 3차원 이미지 생성 방법.

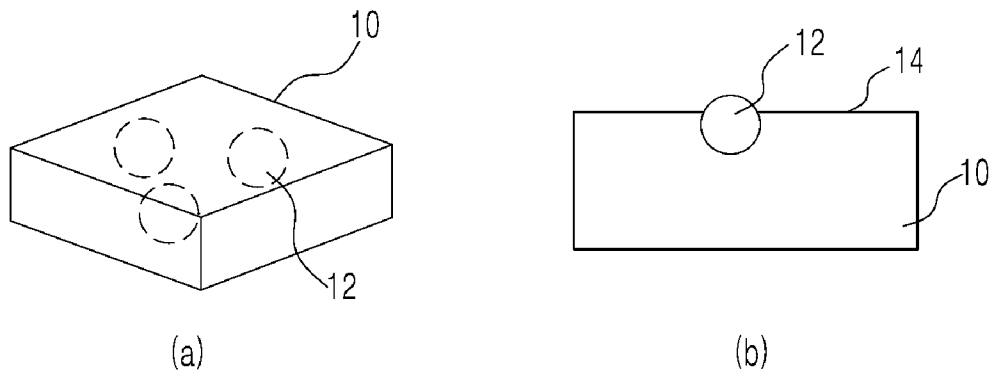
[청구항 12] 제9항에 있어서,
상기 고상 시편에서의 상기 고분자 물질의 위치를 찾는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 3차원 이미지 생성 방법.

[청구항 13] 제1항에 있어서,
상기 고상 시편의 표면을 승화시켜 상기 고분자 물질이 노출되도록 하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 3차원 이미지 생성 방법.

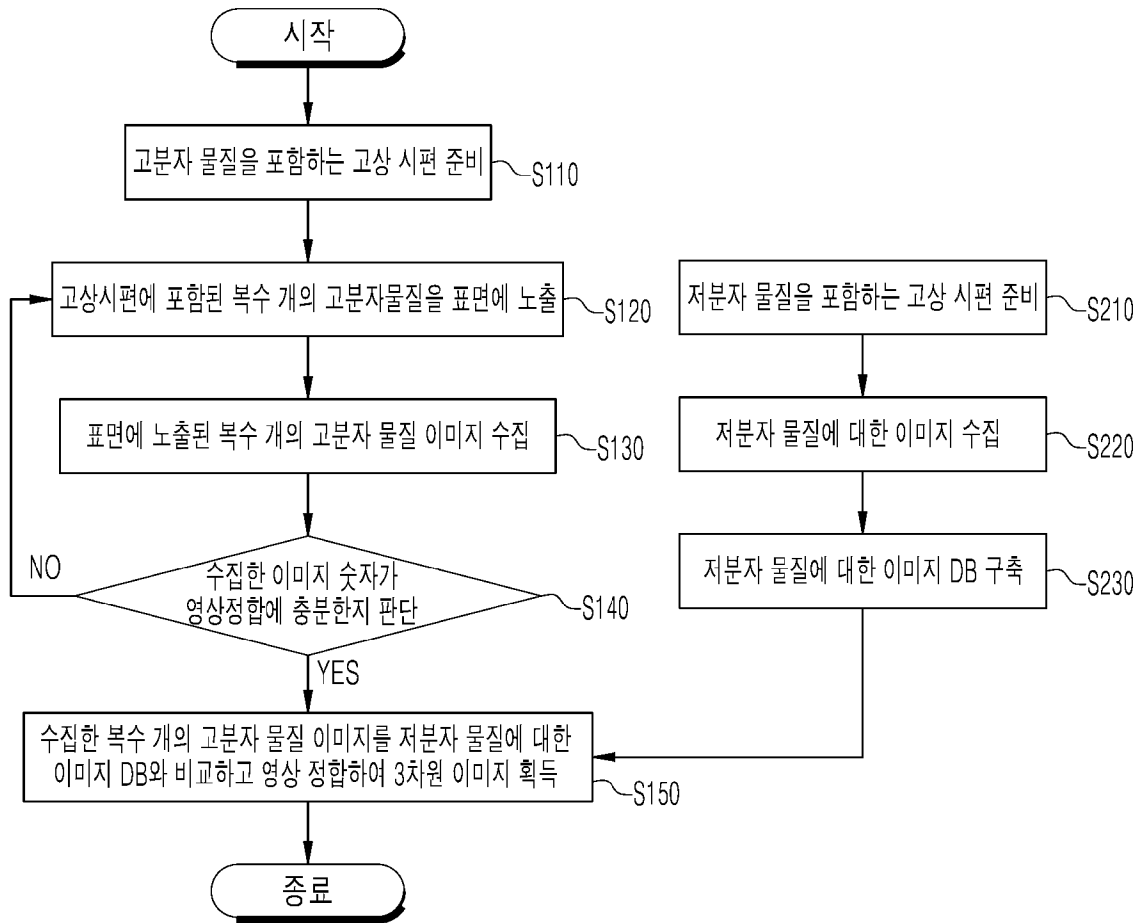
[도1]



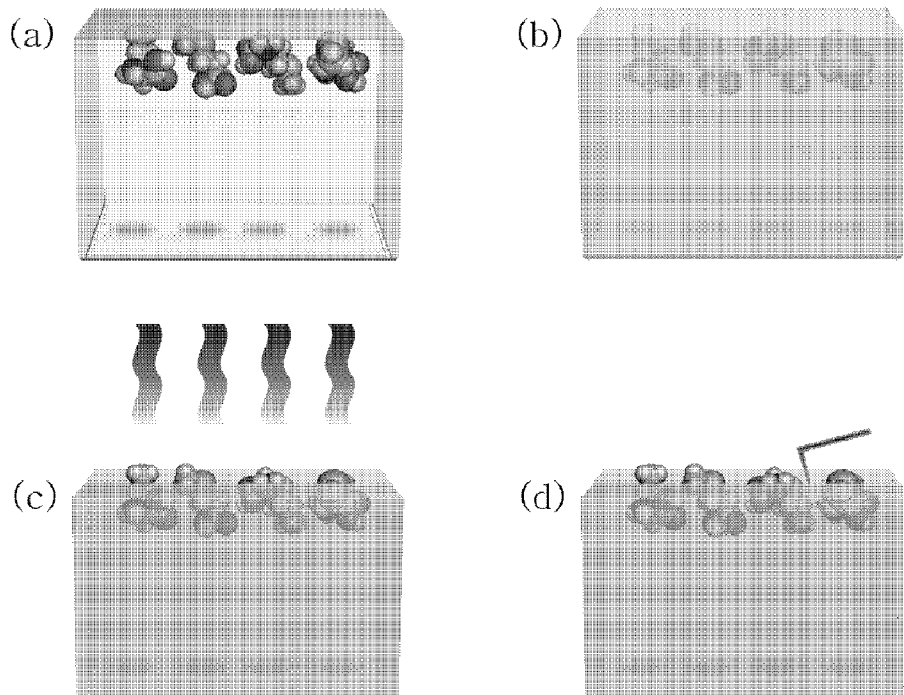
[도2]



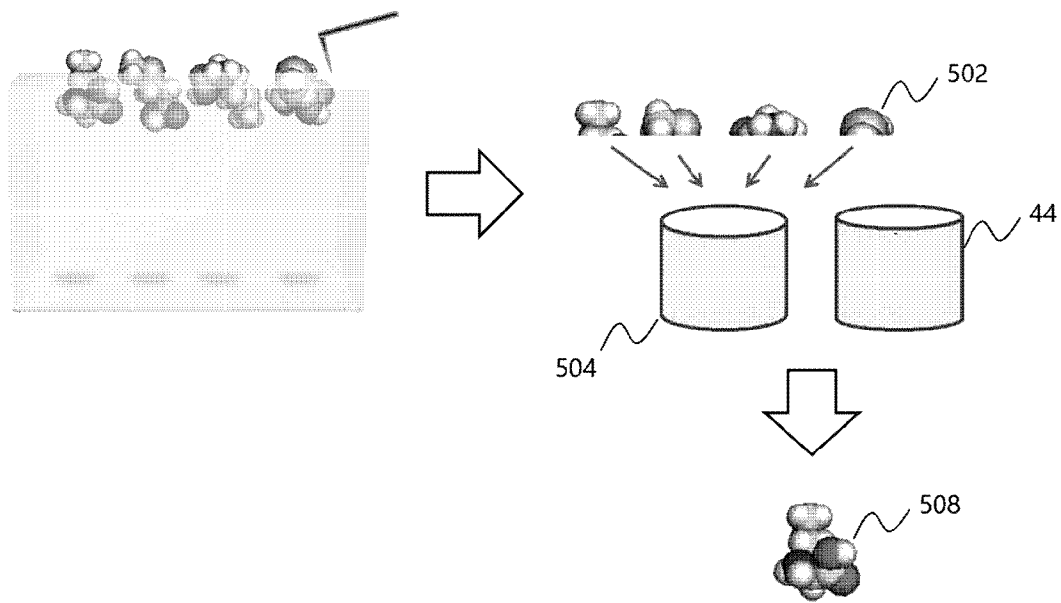
[도3]



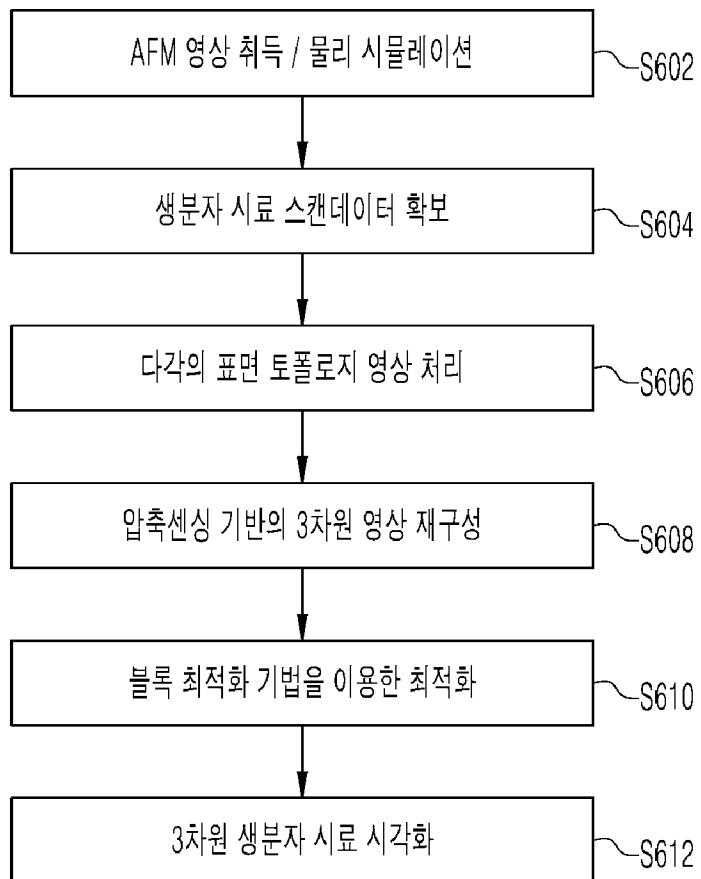
[도4]



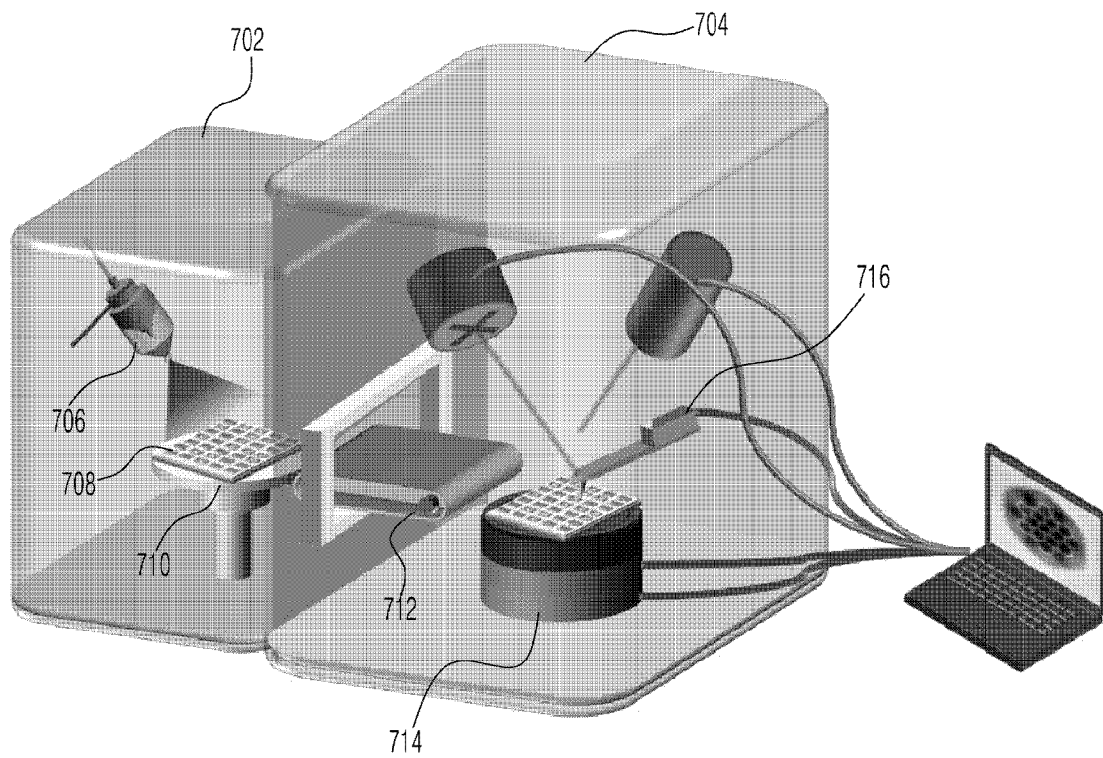
[도5]



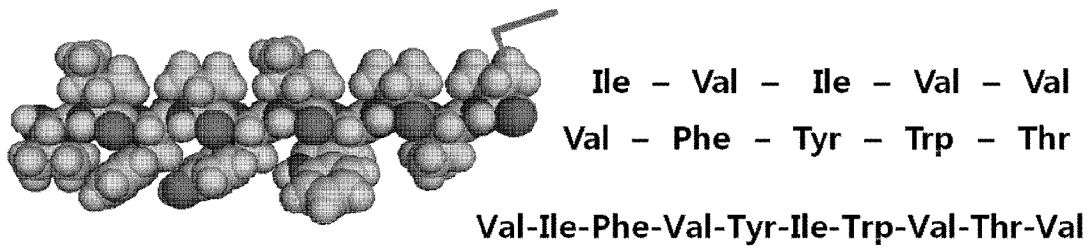
[도6]



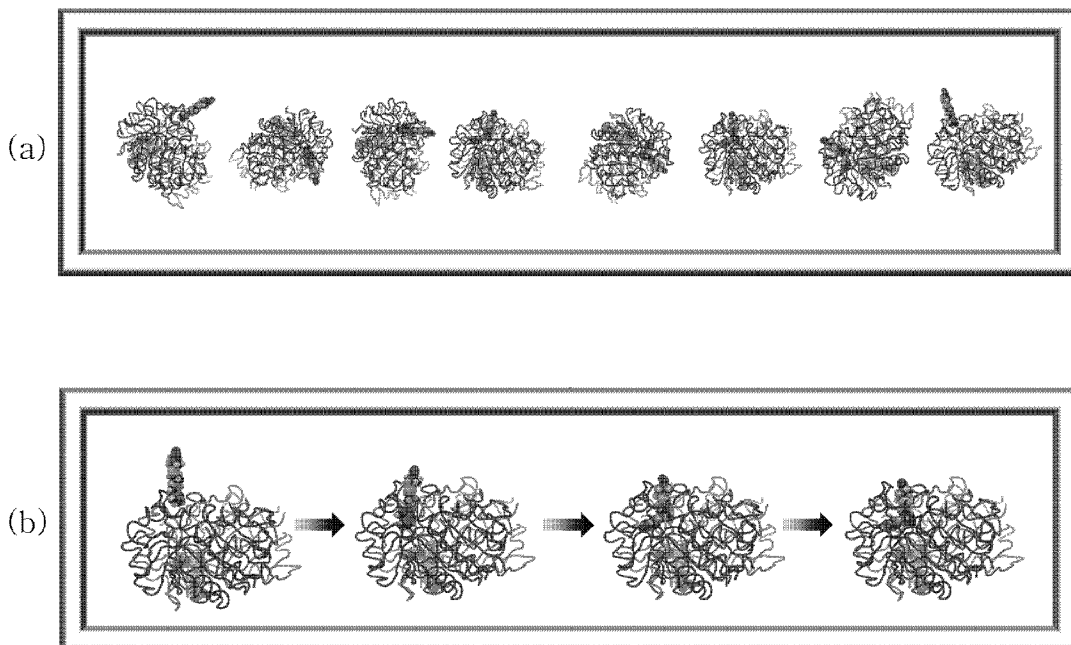
[도7]



[도8]



[도9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/000422

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/92(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, G01Q 60/24(2010.01)i, G06F 19/00(2011.01)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)

G01N 33/68; C12Q 1/00; G01N 1/30; G01B 11/24; G01N 21/53; G06K 9/00; G01N 25/12; G01N 33/92; C12Q 1/68; G01Q 60/24; G06F 19/00

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: 3D image, solid specimen, sublimation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2014-0005620 A (GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 15 January 2014 See paragraphs [0045], [0086], [0099]-[0104], [0119]-[0124], [0144]; and claims 1-7, 12, 15-19.	1-13
A	HEYMANN et al., "Site-Specific 3D Imaging of Cells and Tissues with a Dual Beam Microscope", Journal of Structural Biology, 2006, vol. 155, pages 63-73 See page 66.	1-13
A	US 2009-0220130 A1 (SLINGERLAND) 03 September 2009 See paragraphs [0052]-[0053]; and claim 1.	1-13
A	US 2011-0090500 A1 (HU et al.) 21 April 2011 See abstract; and claims 1, 15.	1-13
A	US 2015-0063406 A1 (PHYSICAL SCIENCES, INC.) 05 March 2015 See abstract; and claims 1, 13.	1-13



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

02 MAY 2017 (02.05.2017)

Date of mailing of the international search report

08 MAY 2017 (08.05.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/000422

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2014-0005620 A	15/01/2014	EP 2871242 A1	13/05/2015
		EP 2871242 A4	02/03/2016
		KR 10-1440571 B1	17/09/2014
		US 2015-0160114 A1	11/06/2015
		WO 2014-007585 A1	09/01/2014
US 2009-0220130 A1	03/09/2009	CN 101427138 A	06/05/2009
		CN 101427138 B	04/07/2012
		EP 1801593 A1	27/06/2007
		EP 1963863 A2	03/09/2008
		JP 2009-523227 A	18/06/2009
		US 8306291 B2	06/11/2012
		WO 2008-045115 A2	17/04/2008
		WO 2008-045115 A3	22/05/2008
US 2011-0090500 A1	21/04/2011	CN 102037343 A	27/04/2011
		CN 102037343 B	02/10/2013
		EP 2300800 A2	30/03/2011
		US 9013692 B2	21/04/2015
		WO 2009-151610 A2	17/12/2009
		WO 2009-151610 A3	11/03/2010
US 2015-0063406 A1	05/03/2015	GB 2505374 A	26/02/2014
		US 2012-0294328 A1	22/11/2012
		US 8911144 B2	16/12/2014
		WO 2012-158319 A1	22/11/2012

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/92(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, G01Q 60/24(2010.01)i, G06F 19/00(2011.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 33/68; C12Q 1/00; G01N 1/30; G01B 11/24; G01N 21/53; G06K 9/00; G01N 25/12; G01N 33/92; C12Q 1/68; G01Q 60/24; G06F 19/00

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: 3차원 이미지, 고상 시편, 승화

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2014-0005620 A (광주과학기술원) 2014.01.15 단락 [0045], [0086], [0099]-[0104], [0119]-[0124], [0144]; 및 청구항 1-7, 12, 15-19 참조.	1-13
A	HEYMANN 등, 'Site-Specific 3D Imaging of Cells and Tissues with a Dual Beam Microscope', Journal of Structural Biology, 2006, 155권, 페이지 63-73 페이지 66 참조.	1-13
A	US 2009-0220130 A1 (SLINGERLAND) 2009.09.03 단락 [0052]-[0053]; 및 청구항 1 참조.	1-13
A	US 2011-0090500 A1 (HU 등) 2011.04.21 요약; 및 청구항 1, 15 참조.	1-13
A	US 2015-0063406 A1 (PHYSICAL SCIENCES, INC.) 2015.03.05 요약; 및 청구항 1, 13 참조.	1-13

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

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 05월 02일 (02.05.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 05월 08일 (08.05.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김승범

전화번호 +82-42-481-3371



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2014-0005620 A	2014/01/15	EP 2871242 A1 EP 2871242 A4 KR 10-1440571 B1 US 2015-0160114 A1 WO 2014-007585 A1	2015/05/13 2016/03/02 2014/09/17 2015/06/11 2014/01/09
US 2009-0220130 A1	2009/09/03	CN 101427138 A CN 101427138 B EP 1801593 A1 EP 1963863 A2 JP 2009-523227 A US 8306291 B2 WO 2008-045115 A2 WO 2008-045115 A3	2009/05/06 2012/07/04 2007/06/27 2008/09/03 2009/06/18 2012/11/06 2008/04/17 2008/05/22
US 2011-0090500 A1	2011/04/21	CN 102037343 A CN 102037343 B EP 2300800 A2 US 9013692 B2 WO 2009-151610 A2 WO 2009-151610 A3	2011/04/27 2013/10/02 2011/03/30 2015/04/21 2009/12/17 2010/03/11
US 2015-0063406 A1	2015/03/05	GB 2505374 A US 2012-0294328 A1 US 8911144 B2 WO 2012-158319 A1	2014/02/26 2012/11/22 2014/12/16 2012/11/22