



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년09월29일
(11) 등록번호 10-2306192
(24) 등록일자 2021년09월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 21/64 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 21/6408 (2013.01)
G01N 2021/6421 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7025573(분할)
(22) 출원일자(국제) 2014년03월17일
심사청구일자 2020년10월05일
(85) 번역문제출일자 2020년09월04일
(65) 공개번호 10-2020-0106229
(43) 공개일자 2020년09월11일
(62) 원출원 특허 10-2015-7027317
원출원일자(국제) 2014년03월17일
심사청구일자 2019년03월15일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/030610
(87) 국제공개번호 WO 2014/145786
국제공개일자 2014년09월18일
(30) 우선권주장
61/794,741 2013년03월15일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20100067003 A1*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
세다르스-신나이 메디칼 센터
미합중국 씨에이 90048-1865 로스엔젤레스 8700베
버리 불레매드
(72) 발명자
뷰트 프라모드
미국 캘리포니아 90048 로스엔젤레스 사우쓰 윌라
만 드라이브 321 #305
랍착 폴
미국 캘리포니아 92129 샌디에고 래그워드 코트
8898
키틀 데이비드 스콧
미국 캘리포니아 92324 콜턴 모하비 드라이브
1252
(74) 대리인
리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 15 항

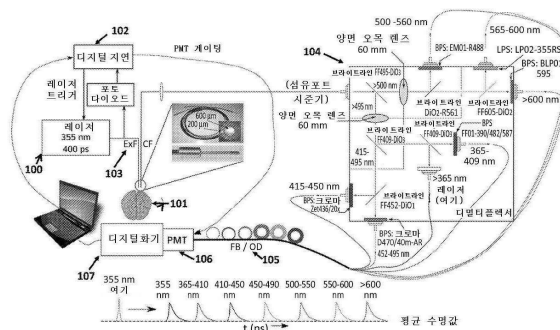
심사관 : 박준영

(54) 발명의 명칭 시간 분해 레이저 유기 형광 분광 시스템 및 그 용도

(57) 요약

본 발명은, 여기 시 생물학적 샘플로부터의 형광 방출을 분석함으로써 생물학적 샘플을 특성 규명하기 위한 시스템 및 이를 이용하는 방법을 제공한다. 시스템은, 레이저 소스, 집광 섬유, 디멀티플렉서, 및 광 지연 디바이스를 포함한다. 본 명세서에서 인용하는 모든 문헌들은, 전문이 설명되는 것처럼 참고로 원용된다. 달리 정의하지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 기술적 용어와 과학적 용어는, 본 발명의 통상의 기술자가 공통적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다.

대표도



(52) CPC특허분류

G01N 2021/6484 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

W02006086382 A2*

Y. Sun 등, 'Simultaneous time-and wavelength-resolved fluorescence spectroscopy for near real-time tissue diagnosis' , Optics Letters (2008), 33(6), 630~632

US05701902 A

W01990006718 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

여기 시 생물학적 샘플로부터의 형광 방출을 분석함으로써 상기 생물학적 샘플을 특성 규명하기 위한 시스템으로서,

(a) 여기 섬유들(ExF)을 통해 생물학적 샘플에 연결되는 레이저 소스로서, 상기 레이저 소스는 상기 생물학적 샘플이 응답 형광 신호를 생성하게끔 소정의 파장의 레이저 펄스에 의해 상기 생물학적 샘플을 조사(irradiating)하도록 구성된, 상기 레이저 소스;

(b) 상기 생물학적 샘플로부터의 상기 응답 형광 신호를 집광하여 다수의 필터들에 중계하는 집광 섬유들(CF); 및

(c) 소정의 파장에서 상기 신호를 분할하여 스펙트럼 대역들을 얻도록 구성되는 상기 다수의 필터들을 포함하며,

제1 스펙트럼 대역은 365nm-410nm 범위 내의 파장들을 포함하며, 제2 스펙트럼 대역은 410nm-450nm 범위 내의 파장들을 포함하고, 제3 스펙트럼 대역은 450nm-480nm 범위 내의 파장들을 포함하고, 제4 스펙트럼 대역은 500nm-560nm 범위 내의 파장들을 포함하고, 제5 스펙트럼 대역은 600nm보다 큰 파장들을 포함하는, 시스템.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 응답 형광 신호를 검출하도록 구성된 포토멀티플라이어 튜브를 더 포함하는, 시스템.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

제6 스펙트럼 대역은 365nm 보다 작은 파장들을 포함하는, 시스템.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 다수의 필터들은 적어도 3 개의 필터들을 포함하는, 시스템.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 다수의 필터들은 디멀티플렉서를 형성하는, 시스템.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

광 지연 디바이스를 더 포함하는, 시스템.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

상기 광 지연 디바이스는 (i) 상기 스펙트럼 대역들이 상기 광 지연 디바이스를 통해 이동할 수 있게 하고, (ii) 단일 샷으로 다중 파장을 캡처하게끔 상기 스펙트럼 대역이 상기 광 지연 디바이스를 통과할 때 피제어 시간 지연(controlled time delay)을 도입하도록 구성되는, 시스템.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 집광 섬유들은 단일 다발(single bundle)을 형성하는, 시스템.

청구항 9

여기 시 생물학적 샘플로부터의 형광 신호의 방출을 분석함으로써 생물학적 샘플을 특성 규명하기 위한 방법으로서,

(a) 소정의 파장의 레이저 펄스로 상기 생물학적 샘플을 방사하여 상기 생물학적 샘플이 응답 형광 신호를 생성하게 하는 단계;

(b) 상기 생물학적 샘플로부터 상기 응답 형광 신호를 집광하는 단계; 및

(c) 다수의 필터들을 이용하여 상기 응답 형광 신호를 분할하는 단계로서, 상기 다수의 필터들 각각은 상기 응답 형광 신호를 소정의 파장들로 분할하여 스펙트럼 대역들을 얻도록 구성되는, 단계를 포함하며,

제1 스펙트럼 대역은 365nm-410nm 범위 내의 파장들을 포함하며, 제2 스펙트럼 대역은 410nm-450nm 범위 내의 파장들을 포함하고, 제3 스펙트럼 대역은 450nm-480nm 범위 내의 파장들을 포함하고, 제4 스펙트럼 대역은 500nm-560nm 범위 내의 파장들을 포함하고, 제5 스펙트럼 대역은 600 nm보다 큰 파장들을 포함하는, 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서,

(d) 상기 스펙트럼 대역들이 시간-지연 메커니즘을 통과하게 하는 단계;

(e) 시간-지연된 상기 스펙트럼 대역들을 얻는 단계; 및

(f) 상기 시간-지연된 스펙트럼 대역들을 처리하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 11

청구항 9에 있어서,

상기 응답 형광 신호는 생체분자에 의해 방출되는, 방법.

청구항 12

청구항 11에 있어서,

상기 생체분자는, PLP-GAD(피리독살-5'-포스페이트(PLP) 글루타민산 데카복실라제(GAD)), 결합 NADH, 유리(free) NADH, 플라빈 모노뉴클레오타이드(FMN) 리보플라빈, 플라빈 아데닌 다이뉴클레오타이드(FAD) 리보플라빈, 지방색소, 내재성 포르피린, 또는 이들의 조합 중 임의의 하나 이상인, 방법.

청구항 13

청구항 9에 따른 방법에 의해 조직의 생체분자들로부터의 응답 형광 신호들의 방출을 분석하는 단계를 포함하는 조직 생존성을 결정하기 위한 방법으로서,

정상적인 샘플에 대한 생물학적 샘플의 상기 생체분자의 응답 형광 신호들의 증가는 불량한 조직 생존성을 나타내는, 방법.

청구항 14

청구항 9에 따른 방법에 의해 응답 형광 신호의 방출을 분석하는 단계를 포함하는, 세포 대사를 연속적으로 감시하기 위한 방법.

청구항 15

청구항 9에 따른 방법에 의해 생체분자로부터의 응답 형광 신호의 방출을 분석하는 단계를 포함하는, 혈장 내의

약물 또는 대산 산물의 수준을 결정하기 위한 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 정부 권리

[0002] 본 발명은 미 국립 신경 질환 뇌졸중 연구소가 부여한 승인 번호 NS060685의 정부 지원 하에 이루어졌다. 정부는 본 발명에 대하여 소정의 권리를 갖는다.

[0003] 발명의 기술분야

[0004] 본 발명은, 일반적으로, 표식 또는 미표식 생체분자로부터의 레이저 유기 광 방출을 분석함으로써 생물학적 물질을 특성 규명하기 위한 기술에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 본 명세서에서 언급하는 모든 문헌은, 그 전문이 모두 설명되는 것처럼 참고로 인용된다. 달리 정의하지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 기술 용어와 과학 용어는, 본 발명이 속하는 통상의 기술자가 공통적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 문헌들[Allen *et al*, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* 22nd ed., Pharmaceutical Press (September 15, 2012); Hornyak *et al*, *Introduction to Nanoscience and Nanotechnology*, CRC Press (2008); Singleton and Sainsbury, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* 3rd ed., revised ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2006); Smith, *March's Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure* 7th ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2013); Singleton, *Dictionary of DNA and Genome Technology* 3rd ed., Wiley-Blackwell (November 28, 2012); 및 Green and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2012)]은, 본 출원에서 사용되는 많은 용어들에 대한 전반적인 가이드를 통상의 기술자에게 제공한다. 항체를 어떻게 제조하는지에 대해서는, 문헌들[Greenfield, *Antibodies A Laboratory Manual* 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor NY, 2013); Koehler and Milstein, *Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion*, Eur. J. Immunol. 1976 Jul, 6(7):511-9; Queen and Selick, *Humanized immunoglobulins*, 미국 특허 제5,585,089호(1996년 12월); 및 Riechmann *et al*, *Reshaping human antibodies for therapy*, Nature 1988 Mar 24, 332(6162):323-7]을 참조하기 바란다.

[0006] 레이저 유기 형광 분광법(LIFS)은, 종양이나 죽상경화반 등의 질병을 진단하고 유기물의 화학적 조성이나 생화학적 조성을 분석하도록 복잡한 생물 시스템들에 광범위하게 적용되어 왔다. LIFS의 장점은, 생체내 생물 시스템의 정량 정보와 정성 정보 모두를 얻는 비침습성 방안을 포함한다는 것이다. LIFS의 추가 장점은, 파장 가변 특성, 협대역 여기, 지향성, 및 단 펄스 여기를 포함한다. 게다가, LIFS는, 유기물의 형광체를 선택적으로 효율적으로 여기할 수 있고, 형광 선택성과 검출성을 크게 개선할 수 있다.

[0007] 시간 분해 기술은 레이저 유기 방출의 실시간 진화가 직접 기록될 수 있게 하며, 이는 단(나노 초) 및 초단(피코 초) 펄스 레이저의 가용성 및 고속 전자 장치의 발전에 의해 가능해진 것이다. 광 방출 프로세스는 시뮬레이팅 이벤트 후에 매우 짧은 기간에 발생하기 때문에(예를 들어, 형광 감쇠 시간은 대략 나노 초임), 시간 분해 측정은 샘플의 단백질 구조와 분자 중에 관한 정보를 제공할 수 있다. 예를 들어, 시간 분해 기술은, "선"(early) 프로세스(통상적으로, 단기간 상태의 직접적인 여기 또는 매우 급속한 후속 반응) 및 (통상적으로, 초기 전자 프로세스를 따르는 반응에 의해 또는 전자 파퓰레이션(electron population)을 지속함에 의해 장기간 상태 지연 여기로부터의) "후"(late) 프로세스를 측정된 데이터에 있어서 "분리"할 수 있다.

[0008] 시간 분해 측정은, 넓은 범위의 파장으로부터 통합적 효과만을 얻으며, 샘플의 추가 특징을 밝히기 위한 레이저 유기 방출의 스펙트럼 정보에 의해 보완될 수 있다. 시간 분해 측정을 여전히 수행할 수 있으면서 레이저 유기 방출을 성분 파장들로 분해하기 위해, 기존의 일부 LIFS 기술들은, 스캐닝 모노크로메이터를 사용하여 광대역 방출로부터의 파장들을 한번에 하나씩 선택하고 선택한 파장 성분을 광검출기로 향하게 한다. 그러나, 방출 스펙트럼으로부터 다른 파장을 분해하기 위해서는, 새로운 파장을 선택하도록 모노크로메이터를 조정하는 한편 샘플

플을 다시 여기해서 다른 재방출을 생성해야 한다.

[0009]

기존의 이러한 기술들에서는, 광대역 광 방출로부터 다중 스펙트럼 성분들을 분해하는 데 상당한 시간이 걸릴 수 있다. 각 파장 성분은 실시간으로 기록될 수 있지만, 다른 파장을 선택하도록 모노크로메이터를 사용하는 것이 시간은 수 초까지 될 수 있으며, 이는 실시간 측정을 수행하는 데 있어서 한정적 요인으로 된다. 게다가, 전체 측정시에는, 샘플 상의 많은 자극 위치를 측정해야 하는 경우 상당한 시간이 걸릴 수 있다. 따라서, 샘플의 단일 여기에 의해 야기되는 광 방출로부터의 시간 분해 정보와 파장 분해 정보 모두의 근실시간 기록을 용이하게 하는 시스템과 방법이 필요하다.

발명의 내용

[0010]

본 발명은, 여기 신호에 응답하는 생물학적 샘플로부터의 광 방출을 분석함으로써 생물학적 샘플을 특성 규명하는 시스템을 제공한다. 시스템은, 먼저, 생물학적 샘플을 레이저 임펄스로 방사하여 생물학적 샘플이 응답 광 방출을 생성하게 한다. 이어서, 시스템은 파장 분할 디바이스를 이용하여 응답 광 방출을 중심 파장들이 서로 다른 스펙트럼 대역들의 세트로 분할한다. 이어서, 각 스펙트럼 대역이 광 검출기에 서로 다른 시간에 도달하도록 시간적 지연을 스펙트럼 대역들의 세트에 적용하고, 이에 따라, 광 검출기가 개별적으로 각 스펙트럼 대역에 대한 응답 광 방출을 시간적으로 분해할 수 있다. 이어서, 지연된 스펙트럼 대역은, 광 검출기의 단일 검출 범위 내에서 시스템에 의해 캡처된다. 캡처된 스펙트럼 대역은 후속 처리된다.

도면의 간단한 설명

[0011]

본 발명의 다양한 실시형태에 따라, 도 1의 (A)는, 다중 여기 시간 분해 레이저 유기 형광 분광학의 개략도를 도시하고, BS는 빔 분할기, FB는 섬유 다발, OD는 광 밀도, LPFW는 롱 패스 필터 휠, ExF는 여기 섬유, CF는 집광 섬유, PMT는 광 멀티플라이어 튜브를 가리키고, 도 1의 (B)는 트리거 동기화를 도시하는 도면.

도 2는 본 발명의 다양한 실시형태에 따라 예시적인 디멀티플렉서 설계를 도시하는 개략도.

도 3은 본 발명의 다양한 실시형태에 따라 프로브를 도시하는 개략도.

도 4는 본 발명의 다양한 실시형태에 따라 예시적인 다양한 생체분자의 형광 방출을 도시하는 도면.

도 5는 본 발명의 다양한 실시형태에 따라 체외 뇌 샘플을 연속 NADH 감시하는 용도를 도시하는 개략도.

도 6은, 본 발명의 다양한 실시형태에 따라, NADH-의존성 ATP 생성에 간섭하는 화합물인 로테논(Rotenone)에 세포들이 노출되는 동안 NADH 수준을 연속 감시하는 TRLIFS 장치의 데이터 입증 능력을 도시하는 도면.

본 발명의 다양한 실시형태에 따라, 도 7의 (A)는, TRLIFS 시스템에 의해 관찰되는 영역, 도 7의 (B)는 (A)로부터의 샘플이 TTC에 의한 처리 후 중첩된 것, 도 7의 (C)는 각 영역(스팟)마다 플롯팅되는 형광 강도를 도시하는 도면.

도 8은, 본 발명의 다양한 실시형태에 따라, 메토크세이트의 농도가 가변적인 우무 배지/겔을 도시하는 도면.

본 발명의 다양한 실시형태에 따라, 도 9(A)는 350nm 파장의 광에 20분 동안 노출된 후의 가변적 농도의 MTX의 형광, 도 9(B)는 활성 형광 품의 형성으로 인해 MTX의 형광 증가를 나타내는 20분에 걸친 형광 시간 경과의 플롯을 도시하는 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012]

본 명세서에서 언급하는 모든 문헌은, 그 전문이 모두 설명되는 것처럼 참고로 인용된다. 달리 정의하지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 기술 용어와 과학 용어는, 본 발명이 속하는 통상의 기술자가 공통적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 문헌들[Allen *et al*, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* 22nd ed., Pharmaceutical Press (September 15, 2012); Hornyak *et al*, *Introduction to Nanoscience and Nanotechnology*, CRC Press (2008); Singleton and Sainsbury, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* 3rd ed., revised ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2006); Smith, *March's Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure* 7th ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2013); Singleton, *Dictionary of DNA and Genome Technology* 3rd ed., Wiley-Blackwell (November 28, 2012); 및 Green and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold

Spring Harbor, NY 2012)]은, 본 출원에서 사용되는 많은 용어들에 대한 전반적인 가이드를 통상의 기술자에게 제공한다. 항체를 어떻게 제조하는지에 대해서는, 문헌들[Greenfield, *Antibodies A Laboratory Manual* 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor NY, 2013); Koehler and Milstein, *Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion*, Eur. J. Immunol. 1976 Jul, 6(7):511-9; Queen and Selick, *Humanized immunoglobulins*, 미국 특허 제5,585,089호(1996년 12월); 및 Riechmann *et al*, *Reshaping human antibodies for therapy*, Nature 1988 Mar 24, 332(6162):323-7]을 참조하기 바란다.

[0013] 다음에 따르는 설명은, 통상의 기술자가 본 발명을 실시하고 이용할 수 있도록 제시되는 것이며, 특정한 응용분야와 요건의 관점에서 제공된 것이다. 개시된 실시형태들에 대한 다양한 수정은 통상의 기술자에게 자명할 것이며, 본 명세서에서 정의하는 전반적인 원리는 본 발명의 사상과 범위로부터 벗어나지 않고서 다른 실시형태와 응용분야에 적용될 수 있다. 따라서, 본 발명은, 도시한 실시형태들로 한정되는 것이 아니라, 청구범위에 부합하는 가장 넓은 범위에 따라야 한다.

[0014] 본 발명은, (표식 또는 미표식) 생체분자로부터의 레이저 유기 광 방출을 분석함으로써 생물학적 물질을 특성 규명하기 위한 기술에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은, 생물학적 물질로부터의 레이저 유기 형광 방출에 대하여 시간 분해 및 파장 분해 분석을 수행함으로써 생물학적 물질을 특성 규명하기 위한 방법 및 장치에 관한 것이다.

[0015] 본 명세서에서 설명하는 시스템은, 손상 후 조직 생존성 평가, 종양과 종양 마진 검출, 세포 대사의 연속 감시, 약물 요법을 최적화하기 위한 혈장 감시를 포함한 다양한 생리학적 상태 및 질병 상태를 특성 규명하도록 사용될 수 있지만, 이러한 예로 한정되지는 않는다. 시스템은, 분석평가(assay)되는 기재/마커에 따라 다양한 응용분야/용도에 적합할 수 있다.

[0016] 시스템

[0017] 여기 소스는 펄스 레이저(100)이다. 펄스 레이저로부터의 출력 펄스는, 생물학적 샘플을 손상시키지 않고서 생물학적 샘플(101)을 여기시키는 데 적절한 전력 수준과 소정의 파장에서 생물학적 샘플을 방사한다. 펄스 레이저는, 각 레이저 임펄스 출력에 정밀한 타이밍을 제공하는 내부 또는 외부 펄스 제어기 디바이스 또는 디지털 지연 디바이스 또는 트리거 디바이스(102)에 의해 제어된다. 이러한 정밀한 타이밍은, 포토다이오드를 사용하여 매 펄스마다 체크되며, 아날로그 대 디지털 변환기 디바이스, 예를 들어, NI PCIe-6220을 사용하여 갱신된다. 일 실시형태에서, 펄스 레이저는 생물학적 샘플을 여기시키도록 자외선(UV) 광 펄스를 방출한다. 다른 일 실시형태에서, 펄스 레이저는 생물학적 샘플을 여기시키도록 가시광 또는 근적외선 광 펄스를 방출한다.

[0018] 펄스 레이저로부터의 레이저 방출은, 광 섬유에 결합/포커싱될 수 있고, 광 섬유(103)(도 3) 또는 렌즈 시스템을 통해 생물학적 샘플 상의 특정 위치로 유도될 수 있다. 레이저 임펄스 여기에 의해, 생물학적 샘플이 형광 방출 등의 응답 광 방출을 생성하며, 이는 통상적으로 많은 파장을 포함하는 넓은 스펙트럼을 갖는다. 이어서, 이러한 레이저 유기 광 방출은 하나 이상의 집광 섬유 또는 렌즈에 의해 집광된다. 본 발명의 일 실시형태에서, 집광 섬유는 다중 모드 섬유들(103)의 다발이다. 다른 일 실시형태에서, 집광은 대물 렌즈를 사용하여 달성된다.

[0019] 이어서, 집광 섬유는 광대역 방출 광을 파장 분할 디바이스(104)(도 2)로 향하게 하며, 이 디바이스는 하나 이상의 파장 분할 스테이지를 포함할 수 있다. 광대역 방출 광은, 광대역 신호가 각각이 개별적인 중심 파장을 갖는 다수의 스펙트럼 협대역으로 분해될 수 있도록 일련의 파장 분할 프로세스를 거치게 된다. 파장 분해된 스펙트럼 대역은 대응하는 지연 디바이스(105)에 결합되며, 이 디바이스는, 각 스펙트럼 대역이 광검출기(106)를 향하여 이동할 때 소정의 시간적 지연을 각 스펙트럼 대역에 적용한다. 지연 디바이스로부터 출력되는 시간적 지연된 스펙트럼 대역들은, 레이저 광을 포함하는 각 파장 분해된 스펙트럼 대역의 형광 감쇠 프로파일이 개별적으로 기록되고 시간적으로 분해될 수 있도록 빠른 응답 포토멀티플라이어 튜브 상에 배열된다. 이러한 스펙트럼 대역에 적용되는 지연은, 각 광 신호가 서로 다른 시간에 다중 채널 판 포토멀티플라이어 튜브(MCP-PMT)에 도달할 수 있게 하며, 이는 각 스펙트럼 대역의 감쇠 프로파일을 레이저 광과 함께 MCP-PMT에 의해 개별적으로 검출될 수 있게 한다. 일 실시형태에서, MCP-PMT로부터의 출력은 고속 디지털화기(107)를 사용하여 기록 및 표시될 수 있다. 다른 일 실시형태에서, MCP-PMT로부터의 출력은 오실로스코프를 사용하여 기록 및 표시될 수 있다. 일 실시형태에서, MCP-PMT는, 게이트 제어 회로에 의해 제어되는 게이트형 MCP-PMT이며, 이에 따라 MCP-PMT는, MCP-PMT가 개방된 경우 좁은 검출 범위의 광 신호에만 응답한다. 일 실시형태에서, 게이트 제어 회로와 펄스 제어는, 단일 레이저 유기 여기에 연관된 모든 형광 감쇠 프로파일이 단일 MCP-PMT 검출 범위 내에서 기록될 수

있도록 동기화된다. 일 실시형태에서, MCP-PMT 게이트 개방의 타이밍은, 이전 감쇠에 기초한 보정을 이용하여 레이저 트리거와 MCP-PMT 게이트 간의 지연을 변경함으로써 레이저 펄스에 동기화된다. 레이저의 트리거 지연(트리거 신호와 레이저 광의 실제 점화 간의 지연)은 포토다이오드를 사용하여 기록된다. 측정된 트리거 지연은 레이저 트리거링과 MCP-PMT 게이트 간의 동기화를 보정하는 데 사용된다. MCP-PMT 대신에 또는 MCP-PMT에 더하여 애벌런치 포토다이오드(APD), 실리콘 PMT를 포함한 기타 포토다이오드를 사용할 수 있지만, 이러한 예로 한정되지는 않는다. MCP-PMT의 이득은 자동 제어될 수 있다. 본 발명의 일 실시형태에서, MCP-PMT 전압은 형광 신호에 기초하여 동적 변경될 수 있다. 본 발명의 일 실시형태에서, 전압 변경은, 형광 신호를 분석하고 형광 신호를 기록하기 전에 변경량을 결정함으로써 결정된다.

[0020] 펄스 레이저(103)는, 유닛이 외부에서 트리거된 후 고유의 지연 발생 레이저 광을 갖는다. 예시적인 실시형태에서, 외부 지연 후 레이저 광을 발생하는 데 있어서 지연은 최대 85마이크로 초일 수 있지만, 이러한 예로 한정되지는 않는다. 이후, "트리거 지연"이라 칭하는, 신호를 트리거하는 데 있어서의 지연은 레이저의 각 펄스 간에 가변적일 수 있다. 레이저 광을 PMT 게이트의 개방과 동기화하도록, 발명자들은, 포토다이오드를 사용하여 레이저 펄스의 타이밍을 검출하고, 이를 외부 트리거와 비교한 후 최종 트리거 지연에 기초하여 다음 트리거의 타이밍을 보정한다(도 1b). 도 1b에서, t0은 레이저가 트리거되는 때이고, t1은 레이저가 점화하는 때이고, t2는 PMT가 트리거되는 때이고, t3은 PMT 게이트가 턴온되는 때이다. 이러한 피드백 기반 트리거 동기화를 활성화함으로써, 형광 신호가 MCP-PMT에 도달할 때 MCP-PMT 상의 전압 이득이 "온"으로 되는 것을 보장하도록 t2가 동적으로 설정된다. 디지털화기는, 더욱 작은 데이터 크기를 보장하도록 제2포토다이오드를 사용하여 트리거 "온"된다.

[0021] TRLIFS 시스템의 개략도는 도 1에 도시되어 있다. 다양한 실시형태에서, 시스템은, (i) 여기 섬유(ExF), (ii) 집광 섬유(CF), (iii) 형광 신호의 수명에 관한 마이크로 측정(즉, 형광 신호의 지수적 감쇠)을 제공하는 파장 분할 디바이스인 디멀티플렉서(demuxer), (iv) 포토멀티플라이어 튜브(MCP-PMT, 예를 들어, Photek(210) 등의, 고 이득(10^6), 저 잡음 및 고속 상승 시간 검출기(~80ps), (v) 신호가 포토멀티플라이어 튜브를 통과한 후 디지털화되기 전에 추가 이득을 제공하는, 선택 사항인 전치증폭기, (vi) 데이터 분석을 수행하도록 포토멀티플라이어 튜브(예를 들어, 6.4G 샘플/초)로부터 수신되는 신호를 디지털화하는 디지털화기(예를 들어, SP 디바이스: 108ADQ Tiger), 및 (vii) 신호를 처리 및 표시하는 컴퓨터 시스템을 포함한다.

[0022] 생물학적 조직으로부터의 형광 신호는 생물학적 시스템의 형광체에 기초하여 매우 강하거나 약할 수 있다. 형광체는, 샘플 유형(예를 들어, 조직, 혈액, 혈장) 등의 소정의 조건들로 인해 차단될 수 있는 여기 광의 흡수 및/또는 양자 효율에 기초하여 형광 방출 강도를 방출한다. 형광 스펙트럼을 적절히 기록하기 위해서는, 증가된 형광 방출이 신호 포화를 야기하지 않고 낮은 형광 방출로 인해 매우 낮은 신호대 잡음 비로 이어지지 않도록 PMT 이득을 조절할 필요가 있다. 이는, 이전에 기록된 데이터에 기초하여 MCP-PMT에 걸친 전압을 급속히 변경함으로써 달성될 수 있다. 일 실시형태에서는, 레이저의 두 개의 펄스로부터의 형광은 (예를 들어, 소프트웨어를 사용하여) 평균화하고 분석하여 형광 신호가 매우 강한지 또는 매우 약한지 여부를 결정하고, 이후, (PMT의 이득 제어를 담당하는) MCP-PMT에 걸친 전압은 고 전압 전원과 컴퓨터 간의 통신을 통해 변경된다. 신호대 잡음 비의 보정량을 달성할 때까지 형광 방출이 매우 높은 경우에는 전압이 감소되고 형광 방출이 매우 낮은 경우에는 전압이 증가된다. 참(true) 신호는, 정확한 SNR이 달성된 후에만 세이프 및 분석된다.

[0023] 일부 실시형태들에서, 여기 섬유(예를 들어, 0.12NA를 갖는 직경 600 μ m, UV급 실리카 코어 섬유)는 원하는 파장에서 샘플을 여기시키도록 레이저 소스를 샘플에 연결한다. 집광 섬유들(예를 들어, 0.22NA를 갖는 직경 200 μ m, UV급 실리카 코어 섬유 12개)은 단일 다발 내에 패키징되며, 이 다발은 디멀티플렉서(도 3)로 향한다. 12개 섬유는, 다중 모드 섬유들을 단일 섬유로 결합하는 기술을 이용하여 단일 섬유로 결합될 수 있다(<http://www.ofsoptics.com/>). 소정의 파장의 레이저로 샘플을 여기시키면, 집광 섬유들은 샘플로부터 형광 신호를 집광하고, 신호를 디멀티플렉서로 중계한다. 디멀티플렉서의 다양한 파장 분할 필터는 필터나 프리즘 등의 빔 분할 디바이스의 파장에 기초하여 인입 신호를 분할하지만, 이러한 예로 한정되지는 않는다. (펄스 여기 후의) 형광 신호 펄스는, 포토멀티플라이어 튜브, 전치증폭기, 및 디지털화기를 통해 컴퓨터 시스템으로 중계되며, 이 시스템에서, 기록된 형광 펄스로부터 (이전에 기록된) 레이저 펄스를 디콘볼루션(deconvolve)함으로써 형광 감쇠를 산출한다.

[0024] 파장 분할 디바이스

[0025] 도 2는, 파장 분할 디바이스(디멀티플렉서, demuxer)의 개략도이다. 생물학적 샘플로부터의 (넓은 범위의 파장들을 포함하는) 레이저 여기 광 방출 신호는, 집광 섬유에 의해 집광되고, 이러한 집광 섬유는 방출된 신호가

파장 분할 디바이스를 향하게 한다.

- [0026] 본 발명의 예시적인 실시형태에서, 생물학적 샘플은 약 337 내지 350nm의 파장에서 여기된다. 일 실시형태에서, 도 1과 도 2에 도시한 파장 분할 디바이스(디멀티플렉서)는, 인입 신호를, 365nm 미만 파장(여기 파장), 365 내지 410nm 파장, 410 내지 450nm 파장, 450 내지 480nm 파장, 500 내지 550nm 파장, 550 내지 600nm 파장, 및 600nm 초과 파장으로 분할한다. 도 1에 도시한 바와 같이, 인입 광 신호는 파장 분할 디바이스의 제1빔 분할 디바이스로 향하며, 이 디바이스는 인입 신호를 약 495nm 초과 파장 및 약 495nm 미만의 파장으로 분할한다. 제1빔 분할 디바이스를 통과한 후, 495nm 초과 파장을 갖는 신호는 초점 길이 60mm의 양면 오목 렌즈를 사용하여 포커싱된 후 신호를 500 내지 560nm 파장 및 560nm 초과 파장으로 분할하는 제2빔 분할 디바이스를 통과하고, 마지막으로 제3빔 분할기가 광을 560 내지 600nm 파장 및 600nm 초과 파장으로 분할한다. 495nm 미만 파장의 신호도, 495nm 광 신호를 약 410 내지 480nm 파장 및 410nm 미만 파장으로 분할하는 제4빔 분할 디바이스를 통과하기 전에 초점 길이 60mm의 양면 오목 렌즈를 통과하여 포커싱된다. 410 내지 450nm 파장의 광 신호는, 신호를 약 415 내지 450nm 파장 및 450 내지 495nm 파장으로 분할하는 제5빔 분할 디바이스를 통과한다. 410nm 미만 파장의 광 신호는 제6빔 분할기를 통과하여 365 내지 410nm 파장, 및 레이저 여기 신호를 포함하는 365nm 미만 파장으로 분할된다. 레이저를 형광과 함께 동시에 기록함으로써, 정밀한 디콘볼루션을 보장할 수 있다. 이 디멀티플렉서 설계는, 플라빈 모노뉴클레오타이드(FMN) 리보플라빈, 플라빈 아데닌 다이뉴클레오타이드(FAD) 리보플라빈, 지방색소, 내재성 포르피린, 및 인입 신호의 NADH와 PLP-GAD 등의 분자의 형광을 포함하는 생체분자들의 검출을 가능하게 하지만, 이러한 예들로 한정되지는 않는다. 본 명세서에서 설명하는 빔 분할 디바이스는, 다이크로익 필터, 프리즘, 및 회절 격자일 수 있지만, 이러한 예들로 한정되지는 않는다.
- [0027] 본 발명의 예시적인 다른 일 실시형태에서, 생물학적 샘플은 약 337 내지 350nm 파장에서 여기된다. 이 실시형태에서, 파장 분할 디바이스는, 인입 신호를 400nm 미만 파장, 415 내지 450nm 파장, 455 내지 480nm 파장, 400 내지 600nm 파장, 및 500nm 초과 파장으로 분할한다. 집광 섬유로부터 출광되어 파장 분할 디바이스에 입광되기 전에, 방출된 광은 우선 시준(collimating) 렌즈를 사용하여 시준된다. 시준 렌즈는 그라디언 인덱스(GRIN) 렌즈, 또는 비구면 렌즈를 포함할 수 있지만, 이에 한정되지는 않는다. 시준된 광 빔은, 인입 신호를 약 400nm 초과 파장 및 약 400nm 미만 파장으로 분할하는 파장 분할 디바이스의 제1빔 분할 디바이스로 향한다. 제1빔 분할 디바이스를 통과한 후, 400nm 초과 파장의 신호는, 신호를 400 내지 500nm 파장 및 500nm 초과 파장으로 분할하는 제2빔 분할 디바이스를 통과한다. 400 내지 500nm 파장 범위의 신호는, 신호를 약 450nm 초과 파장 및 450nm 미만 파장으로 분할하는 제3빔 분할 디바이스를 통과한다. 다양한 실시형태에서는, 생체분자의 활동성을 위해 450nm 미만 파장의 신호를 분석한다. 이러한 파장들은 NADH, PLP-GAD, 또는 이들의 조합의 유리(free) 형태와 결합 형태를 포함한 생체분자를 측정하는 데 있어서 중요하지만, 이러한 예들로 한정되지는 않는다.
- [0028] 빔 분할 디바이스의 구성을 변경함으로써, 다양한 파장의 스펙트럼 대역을 검출할 수 있다. 다른 파장 대역들은 필터들의 서로 다른 세트들을 사용함으로써 달성될 수 있으며, 이는 통상의 기술자에게 자명할 것이다.
- [0029] 시간적 지연 광 디바이스
- [0030] 도 1에 도시한 바와 같이, 파장 분할 디바이스로부터의 각각의 분해된 파장 성분은 대응하는 지연 디바이스에 결합되고 후속하여 그 대응하는 지연 디바이스에서 소정량의 지연을 거치게 된다. 다양한 실시형태에서, 지연 디바이스들은, 서로 다른 길이 L1, L2, L3, L4 등을 갖는 광 섬유들이다. 특정한 실시형태에서, 광 섬유들의 길이는 약 5ft, 55ft, 115ft, 165ft, 215ft, 265ft, 및 315ft일 수 있다. 광 섬유들의 다른 길이는 필요로 하는 지연에 기초하여 선택될 수 있으며, 이는 통상의 기술자에게 자명할 것이다. 동일한 광 검출기에서 파장 성분들의 각각을 시간적으로 분리하도록, 각 파장 성분은 광 섬유의 서로 다른 길이를 통해 이동하며, 이에 따라 서로 다른 지연량을 겪게 된다. 결국, 파장 성분들의 각각은 서로 다른 시간에 광 검출기에 도달하며, 이는 각 성분을 개별적으로 검출할 수 있게 한다.
- [0031] 광 섬유의 길이에 더하여, 광 섬유의 굴절률을 포함한 광 섬유의 다른 물성들도 광 섬유의 길이를 결정하여 특정량의 지연을 달성하는 데 사용될 수 있지만, 이러한 물성의 예로 한정되지는 않는다. 시간 도메인에서는, 각 스펙트럼 성분이 특정량의 시간(예를 들어, 수십 나노초) 동안 지속되는 감쇠 프로파일을 가지므로, 두 개의 감쇠 프로파일을 시간적으로 분리하도록 두 개의 인접하는 스펙트럼 성분 사이의 시간적 지연을 충분히 길게 설계할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 일 실시형태에서, 광 검출기는, 게이트 제어 회로에 의해 제어되는 짧은 검출 범위 내의 인입 광 신호에만 응답하는 게이트형 MCP-MCP-PMT이다. 이 게이트형 범위는, 분해되고 시간적으로 분리된 모든 파장 성분들이 게이트형 범위 내에서 MCP-PMT에 도달하도록 충분히 길게 설계될 수 있다. 따라서, 게이트형 MCP-PMT는,

하나의 검출 범위 내의 단일 레이저 유기 방출에 의해 야기되는 모든 파장 성분들을 캡처할 수 있다. 분해된 스펙트럼 대역들을 시간적으로 분리하는 데 사용되는 지연 디바이스는 광 섬유로 한정되지 않으며, 일반적으로 임의의 지연 디바이스를 사용할 수 있다.

- [0033] 다양한 실시형태에서, 샘플은 고체, 반도체, 또는 액체 생물학적 샘플이다. 다양한 실시형태에서, 샘플은, 혈액, 혈장, 소변, 조직, 미생물, 기생충, 가래, 토사물, 뇌척수액 중 임의의 하나 이상 또는 화학적 서명이 검출될 수 있는 다른 임의의 생물학적 샘플이다.
- [0034] 다양한 실시형태에서, 조직은, 전립선, 폐, 신장, 뇌, 점막, 피부, 간, GI 트랙트, 결장, 방광, 근육, 유방, 및/또는 자궁경관 중 임의의 하나 이상일 수 있다.
- [0035] 본 명세서에서 설명하는 시스템은 검출가능(예를 들어, 방출된) 서명을 갖는 임의의 분자를 검출하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시형태들에서, 방출된 서명은 형광 방출이다. 일부 실시형태들에서, 서명은 형광 방출 감쇠이다.
- [0036] 본 명세서에서 설명하는 디멀티플렉서 설계는, 예를 들어, (표식된 또는 미표식된) 치료제, (표식된 또는 미표식된) 항체, (표식된 또는 미표식된) 독소, (표식된 또는 미표식된) 내독소, (표식된 또는 미표식된) 외독소, 종양 마커, 및/또는 이들의 조합의 검출을 가능하게 한다. 다양한 실시형태에서, 미표식 생체분자들은 고유 형광을 갖는다.
- [0037] 본 명세서에서 설명하는 시스템은, 플라빈 모노뉴클레오타이드(FMN) 리보플라빈, 플라빈 아데닌 다이뉴클레오타이드(FAD) 리보플라빈, 지방색소, 내재성 포르피린, 및 인입 신호의 NADH와 PLP-GAD 등의 분자의 형광을 포함하는 생체분자들의 검출을 가능하게 하지만, 이러한 예들로 한정되지는 않는다.
- [0038] 다양한 실시형태에서, 치료제는 화학요법제를 포함한다. 화학요법제의 예는, 알부민 결합 파클리탁셀(나브-파클리탁셀), 악티노마이신, 알리트레티노인, 올-트랜스 레티노산, 아자시티딘, 아자티오프린, 베바시주맵, 벡사토텐, 블레오마이신, 보르테조미, 카르보플라틴, 카페시타빈, 세특시맵, 시스플라틴, 클로람부실, 시클로포스파미드, 시타라빈, 다우노루비신, 도세탁셀, 독시플루리딘, 독소루비신, 에피루비신, 에포티론, 에트로티닙, 에토포시드, 플루오로우라실, 게피티닙, 겐시타빈, 히드록시우레아, 이다루비신, 이마티닙, 이필리무맵, 이리노테칸, 메클로레타민, 멜팔란, 머캅토프린, 메토크세이트, 미톡산트론, 오크렐리주맵, 오파투무맵, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 파니투맵, 페메트렉세드, 리툽시맵, 타플루포시드, 테니포시드, 티오구아닌, 토포테칸, 트레티노인, 발루비신, 베무라페닙, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신, 비노렐빈, 브리노스타트, 로미넵신, 5-플루오로우라실(5-FU), 6-머캅토프린(6-MP), 클라드리빈, 플로파라빈, 플록수리딘, 플루다라빈, 펜토스타틴, 미토마이신, 역사 베필론, 에스트라무스틴, 또는 이들의 조합을 포함하지만, 이러한 예들로 한정되지 않는다. 본 명세서에서 사용하는 바와 같이, 화학요법제는 표식 또는 미표식될 수 있다(예를 들어, 내재 형광을 갖는 화학물질). 일부 실시형태들에서, 표식은 형광 표식이다. 치료제를 표식하도록 본 명세서에서 설명하는 시스템, 장치, 및 방법과 함께 사용될 수 있는 형광 표식의 예는, 인도시아닌 그린(ICG), 쿠르쿠민, 로다민(예컨대, 로다민 B, 로다민 123, 로다민 6G, 또는 그 변형예), 녹색 형광 단백질(GFP), 루시페린, 플루오레세인, 양자 도트, 또는 이들의 조합을 포함하지만, 이러한 예들로 한정되지 않는다.
- [0039] 다양한 실시형태에서, 치료용 항제를 포함한 항체는, 3F8, 8H9, 아바고보맵, 암식시맵, 악록수맵, 아달리무맵, 아데카투무맵, 아두카누맵, 아펠리모맵, 아푸투주맵, 알락시주맵 페골, ALD518, 알렘투주맵, 알리로쿠맵, 알투모맵 펜테테이트, 아마툽시맵, 아나투모맵, 마페나톡스, 아니프롤루맵, 안루킨주맵, 아폴리주맵, 아르시투모맵, 아셀리주맵, 아티누맵, 아틀리주맵, 아토롤리무맵, 바피네우주맵, 바실릭시맵, 바비톡시맵, 벡투모맵, 벨리무맵, 벤랄리주맵, 베르틸리무맵, 베실레소맵, 베바시주맵, 베즈로토수맵, 비시로맵, 비마그루맵, 비바투주맵 메르탄신, 블리나투모맵, 블로소주맵, 브렌톡시맵 베도틴, 브리아키누맵, 브로달루맵, 카나키누맵, 칸투주맵 메르탄신, 칸투주맵 라브탄신, 카플라시주맵, 카프로맵 펜테티드, 카를루맵, 카투막소맵, cBR96-독소루비신 면역결합체, 세딜리주맵, 세르톨리주맵 페골, 세특시맵, 시타투주맵 보가톡스, 식수투무맵, 클라자키주맵, 클레놀릭시맵, 클리바투주맵 테트라세탄, 코나투무맵, 콘시주맵, 크레네주맵, 다세투주맵, 다클리주맵, 달로투주맵, 다라투무맵, 템시주맵, 데노수맵, 데투모맵, 도를리모맵 아리톡스, 드로지투맵, 돌리고투맵, 두필루맵, 두시기투맵, 에크로멕시맵, 에쿨리주맵, 에도바코맵, 에드레콜로맵, 에팔리주맵, 에폰구맵, 엘렐루맵, 엘로투주맵, 엘실리모맵, 에나바투주맵, 엔리모맵 페골, 에노키주맵, 에노티쿠맵, 엔시톡시맵, 에피투모맵 시특세탄, 에프라투주맵, 에를리주맵, 에르투막소맵, 에타라시주맵, 에트올리주맵, 에볼로쿠맵, 엑스비리루맵, 파놀레소맵, 파탈리모맵, 파를레투주맵, 파시누맵, FBTA05, 펠비주맵, 페자키누맵, 피클라투주맵, 피기투무맵, 플란보투맵, 폰톨리주맵, 포랄루맵, 포라비루맵, 프레솔리루맵, 플라누맵, 푸톡시맵, 갈릭시맵, 가니투맵, 간테네루맵,

가빌리모맵, 겐투주맵, 오조가미신, 게보키주맵, 기렌톡시맵, 글렘바투무맵 베도틴, 골리무맵, 고밀릭시맵, 구셀쿠맵, 이발리주맵, 이브리투모맵 티옥세탄, 이크루쿠맵, 이고보맵, IMAB362, 임시로맵, 임가투주맵, 인클라쿠맵, 인다톡시맵 라브탄신, 인플릭시맵, 이놀리모맵, 이노투주맵 오조가미신, 인테투무맵, 이필리무맵, 이라투무맵, 이톨리주맵, 익세키주맵, 켈릭시맵, 라베투주맵, 람브롤리주맵, 람팔리주맵, 베브리키주맵, 레말레소맵, 레르텔리무맵, 렉사투무맵, 리비비루맵, 리젤리주맵, 린투주맵, 리틸무맵, 로델시주맵, 로르보투주맵 메르탄신, 루카투무맵, 루밀릭시맵, 마파투무맵, 마르게톡시맵, 마스리모맵, 마투주맵, 마브릴리무맵, 메폴리주맵, 메텔리무맵, 밀라투주맵, 민레투모맵, 미투모맵, 모가물리주맵, 모롤리무맵, 모타비주맵, 목세투모맵, 파수도톡스, 무로모넵-CD3, 나콜로맵 타페나톡스, 나밀루맵, 남투모맵 에스타페나톡스, 나르나투맵, 나탈리주맵, 네바쿠맵, 넥시투무맵, 네렐리모맵, 네스바쿠맵, 니모투주맵, 니볼루맵, 노페투모맵 메르펜탄, 오카라투주맵, 오크렐리주맵, 오둘리모맵, 오파투무맵, 올라라투맵, 올로키주맵, 오말리주맵, 오나르투주맵, 온톡시주맵, 오포르투주맵 모나톡스, 오레고보맵, 오르티쿠맵, 오텔릭시주맵, 오프레르투주맵, 옥셀루맵, 오자네주맵, 오조랄리주맵, 파기박시맵, 팔리비주맵, 파니투무맵, 판코맵, 파노바쿠맵, 파르사투주맵, 파스콜리주맵, 파테클리주맵, 파트리투맵, 펜투모맵, 페라키주맵, 페르투주맵, 펙셀리주맵, 피딜리주맵, 피나투주맵 베도틴, 핀투모맵, 플라쿨루맵, 플라투주맵 베도틴, 포네주맵, 프틸릭시맵, 프리톡삭시맵, 프리투무맵, PRO 140, 켈리주맵, 라코투모맵, 라드레투맵, 라피비루맵, 라무시루맵, 라니비주맵, 락시바쿠맵, 레가비루맵, 레슬리주맵, 킬로투무맵, 리톡시맵, 로바투무맵, 룰레투맵, 로모소주맵, 론탈리주맵, 로벨리주맵, 루폴리주맵, 사말리주맵, 사릴루맵, 사투모맵 펜테티드, 쿠키키누맵, 세리반투맵, 세톡삭시맵, 세비루맵, SGN-CD19A, SGN-CD33A, 시브로투주맵, 시팔리무맵, 신탁시맵, 심투주맵, 시폴리주맵, 시루쿠맵, 솔라네주맵, 솔리토맵, 소네프시주맵, 손투주맵, 스타물루맵, 솔레소맵, 수비주맵, 타발루맵, 타카투주맵 테트락세탄, 타도시주맵, 탈리주맵, 타네주맵, 타폴리투모맵 팜톡스, 테피바주맵, 텔리모맵 아리톡스, 테나투모맵, 테넬릭시맵, 테폴리주맵, 테프로투무맵, TGN1412, 티실리무맵(트레멜리무맵), 티가투주맵, 틸드라키주맵, TNX-650, 토실리주맵(아트리주맵), 토랄리주맵, 토시투모맵, 토베투맵, 트랄로키누맵, 트라스투주맵, TRBS07, 트레갈리주맵, 트레멜리무맵, 투코투주맵 셀모루킨, 투비루맵, 우블리톡시맵, 우렐루맵, 우르톡사주맵, 우스테키누맵, 반틱쿠맵, 바팔릭시맵, 바텔리주맵, 베돌리주맵, 벨투주맵, 베팔리모맵, 베센쿠맵, 비실리주맵, 볼로식시맵, 보르세투주맵 마포도틴, 보투무맵, 잘루투무맵, 자놀리무맵, 자톡시맵, 지랄리무맵, 줄리모맵 아리톡스를 포함하지만, 이러한 예들로 한정되지 않는다. 본 명세서에서 설명하는 바와 같이, 항체는 표식 또는 미표식될 수 있다. 일부 실시형태들에서, 표식은 형광 표식이다. 치료제를 표식하도록 본 명세서에서 설명하는 시스템, 장치, 및 방법과 함께 사용될 수 있는 형광 표식의 예는, 인도시아닌 그린(ICG), 쿠르쿠민, 로다민(예컨대, 로다민 B, 로다민 123, 로다민 6G, 또는 그 변형예), 녹색 형광 단백질(GFP), 루시페린, 플루오레세인, 양자 도트, 또는 이들의 조합을 포함하지만, 이러한 예들로 한정되지 않는다.

[0040] 다양한 실시형태에서, 독소는, 알파 독소, 안트락스 독소, 박테리아 독소, 디프테리아 독소, 외독소, 페르투스 독소, 시가(shiga) 독소, 시가형 독소, 열 안정성 장독소, 채널 형성 독소, 진균독, 콜레라 독소, 전갈 독, 콜로로톡신, 및/또는 파상풍 독소를 포함하지만, 이러한 예들로 한정되지 않는다. 본 명세서에서 설명하는 바와 같이, 독소는 표식 또는 미표식될 수 있다. 일부 실시형태들에서, 표식은 형광 표식이다. 치료제를 표식하도록 본 명세서에서 설명하는 시스템, 장치, 및 방법과 함께 사용될 수 있는 형광 표식의 예는, 인도시아닌 그린(ICG), 쿠르쿠민, 로다민(예컨대, 로다민 B, 로다민 123, 로다민 6G, 또는 그 변형예), 녹색 형광 단백질(GFP), 루시페린, 플루오레세인, 양자 도트, 또는 이들의 조합을 포함하지만, 이러한 예들로 한정되지 않는다.

[0041] 일부 실시형태들에서, 단백질(예를 들어, 세포 표면 단백질)은 본 명세서에서 설명하는 시스템을 이용하여 검출될 수 있다. 일부 실시형태들에서, 단백질은, 세포 표면 마커에 결합되는 항체(예를 들어, 표식된 또는 미표식된 항체)를 이용하여 검출될 수 있다. 일부 실시형태들에서, 단백질은, 관심 대상인 단백질에 결합되는 siRNA(예를 들어, 표식된 또는 미표식된 siRNA)를 이용하여 검출될 수 있다. 본 명세서에서 설명하는 시스템을 이용하여 검출될 수 있는 단백질의 예는, 4-1BB, 5T4, 아테노카르시노마 항원, 알파-페토단백질, 안넥신(예를 들어, 안넥신 A1, A2, A5), BAFF, B-림포마 세포, C242 항원, CA-125, 탄산 탈수 효소 9(CA-IX), C-MET, CCR4, CD152, CD19, CD20, CD200, CD22, CD221, CD23(IgE 수용체), CD28, CD30(TNFRSF8), CD33, CD4, CD40, CD44 v6, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CEA, CNT0888, CTLA-4, DR5, EGFR, EpCAM, CD3, FAP, 피브로넥틴 엑스트라 도메인-B, 엽산 수용체 1, GD2, GD3 강글리오시드, 당단백질 75, GPNMB, HER2/neu, HGF, 인간 산란 인자 수용체 키나제, IGF-1 수용체, IGF-I, IgG1, L1-CAM, IL-13, IL-6, 인슐린 유사 성장 I 인자, 인테그린 $\alpha 5\beta 1$, 인테그린 $\alpha v\beta 3$, MORAb-009, MS4A1, MUC1, 무신 CanAg, N-글리코틸뉴라미닉산, NPC-1C, PDGF-R α , PDL192, 포스포티딜세린, 전립선암 세포, RANKL, RON, ROR1, SCH 900105, SDC1, SLAMF7, TAG-72, 테나신 C, TGF beta 2, TGF- β , TRAIL-R1, TRAIL-R2, 종양 항원 CTAA16.88, VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR2 또는 비멘틴을 포함하지만, 이러한 예들로 한정되지 않는다. 추가 예는, AOC3(VAP-1), CAM-3001, CCL11(에오타신-1), CD125,

CD147(바시긴), CD154(CD40L), CD2, CD20, CD23(IgE 수용체), CD25(IL-2 수용체의 α 체인), CD3, CD4, CD5, IFN- α , IFN- γ , IgE, IgE Fc 영역, IL-1, IL-12, IL-23, IL-13, IL-17, IL-17A, IL-22, IL-4, IL-5, IL-6, IL-6 수용체, 인테그린 $\alpha 4$, 인테그린 $\alpha 4\beta 7$, 라마 글라마, LFA-1(CD11a), MEDI-528, 미요스타틴, OX-40, rhuMab $\beta 7$, 스크레로신, SOST, TGF 베타 1, TNF- α , VEGF-A, 베타 아미로이드, MABT5102A, L-1 β , CD3, C5, 카르디악 미요신, CD41(인테그린 알파-IIb), 피브리 II, 베타 체인, ITGB2(CD18), 스핀고신-1-포스페이트, 탄저균 독소, CCR5, CD4, 클럼핑 인자 A, 시토메갈로바이러스, 시토메갈로바이러스 당단백질 B, 내독소, 대장균 단백질, 헤파티티스 B 표면 항원, 헤파티티스 B 바이러스, HIV-1, Hsp90, 인플루엔자 A 혈구응집소, 리포테이코산, 슈도모나스 녹농균, 광견병 바이러스 당단백질, 호흡기 합포체 바이러스, TNF- α , 루이스 Y 및 CEA 항원, Tag72, 엽산 결합 단백질, 또는 이들의 조합을 포함하지만, 이러한 예들로 한정되지 않는다. 일부 실시형태들에서, 단백질은 표식된다. 일부 실시형태들에서, 표식은 형광 표식이다. 치료제를 표식하도록 본 명세서에서 설명하는 시스템, 장치, 및 방법과 함께 사용될 수 있는 형광 표식의 예는, 인도시아닌 그린(ICG), 쿠르쿠민, 로다민(예컨대, 로다민 B, 로다민 123, 로다민 6G, 또는 그 변형예), 녹색 형광 단백질(GFP), 루시페린, 플루오레세인, 양자 도트, 또는 이들의 조합을 포함하지만, 이러한 예들로 한정되지 않는다.

[0042] 방법

[0043] 디멀티플렉서의 파장 분할 빔 분할 디바이스와 여기 파장의 조합에 기초하여, 다양한 분자의 형광을 분석평가할 수 있다(도 4). 예를 들어, 디멀티플렉서의 적절한 파장 분할 빔 분할 디바이스들과 파장 350nm로 샘플을 여기 시킴으로써, PLG-GAD(피리독살-5'-포스페이트(PLP) 글루타민산 데카복실라제(GAD)), 결합 NADH 및 유리 NADH를 포함한 생체분자들의 형광을, 분석평가할 수 있지만, 이러한 예로 한정되지 않는다. 또는, 디멀티플렉서의 적절한 파장 분할 빔 분할 디바이스들과 파장 440nm로 샘플을 여기시킴으로써, FAD(플라빈 아데닌 다이뉴클레오타이드), FMN(플라빈 모노뉴클레오타이드), 및 프로피린 등의 생체분자들의 형광을 분석평가할 수 있다.

[0044] 본 발명은, 본 명세서에서 설명하는 TRLIFS 시스템을 이용하여, 조직 생존성을 필요로 하는 대상의 손상 후 조직 생존성을 결정하기 위한 방법을 제공한다. 이 방법은, 본 명세서에서 설명하는 시스템을 이용하여 생체분자로부터 방출되는 형광(예를 들어, NADH 산화환원 상태)을 측정하는 단계를 포함하며, 형광 신호의 변화가 조직 생존성을 나타낸다. 일부 실시형태들에서, 생체분자의 형광 신호의 변화는, (정상적인) 대조 대상에 대한 대상의 생체분자로부터의 형광 신호의 증가이다. 일부 실시형태들에서, 생체분자의 형광 신호의 변화는, (정상적인) 대조 대상에 대한 대상의 생체분자로부터의 형광 신호의 감소이다. 일 실시형태에서, NADH 산화환원 상태의 변화는 조직 생존성을 나타낸다. 일 실시형태에서, 대상의 NADH 형광의 증가는 NADH 축적 및 불량한 조직 생존성을 나타낸다.

[0045] 본 발명은, 또한, 본 명세서에서 설명하는 시스템을 이용하여 세포 대사를 필요로 하는 대상의 세포 대사를 감시하기 위한 방법을 제공한다. 이 방법은, 본 명세서에서 설명하는 TRLIFS 시스템을 이용하여 생체분자로부터 방출되는 형광(예를 들어, NADH 산화환원 상태)을 측정하는 단계를 포함하고, 형광 신호의 변화는 세포 대사를 나타낸다. 일부 실시형태들에서, 생체분자의 형광 신호의 변화는 (정상적인) 대조 대상에 대한 대상의 생체분자로부터의 형광 신호의 증가이다. 일부 실시형태들에서, 생체분자의 형광 신호의 변화는 (정상적인) 대조 대상에 대한 대상의 생체분자로부터의 형광 신호의 감소이다. 일 실시형태에서, NADH 형광은 세포 대사를 감시하는 데 사용될 수 있다. 세포 대사는 연속적으로 또는 주기적으로 감시될 수 있다. 다양한 실시형태에서, 세포 대사의 연속 감시에 의해, 예를 들어, 세포의 생존성과 취약성, 세포 대사에 대한 (예를 들어, 약 개발 동안 또는 치료 범위를 최적화하기 위한) 약의 영향, 및/또는 세포의 대사 상태를 결정하기 위한 pH와 산소 수준의 동시 감시를 평가할 수 있다.

[0046] 본 명세서에서 설명하는 바와 같이, 본 발명은, 또한, 본 명세서에서 설명하는 TRLIFS 시스템을 이용하여 종양을 검출하기 위한 방법을 제공한다.

[0047] 실시예

[0048] 실시예 1

[0049] 세포 대사의 연속 감시

[0050] 본 명세서에서 설명하는 시스템은, 산소 결핍, 신경 보호 약의 영향 등에 응답한 대사 상태의 변화를 결정하도록 매우 미세한 스케일로 NADH 수준의 변화를 연속 감시할 수 있다(도 1 및 도 5).

[0051] 니코틴아미드 아데노신 다이뉴클레오타이드(NADH)는 산소 호흡시 ATP 생성을 위한 산화환원 반응에 관여된다. NADH는 글리콜리시스 및 시트릭산(TCA) 사이클 동안 미토콘드리아에서 생성된다. NADH는 미토콘드리아 막에서

NAD⁺로 산화되어 프로세스에서 ATP를 생성한다. 이 프로세스는 뇌졸중으로 인한 국소 빈혈을 포함한 상태시 방해받지만, 이러한 상태로 한정되지 않는다. 저 산소 상태에서, NADH는 세포에 축적되며, 반복되는 산소 결핍으로 인해 세포사가 발생할 수 있어서, NADH가 완전히 파괴될 수 있다. 이러한 NADH 수준의 변화에 의해, 허혈 상태의 생존성과 취약성을 평가할 수 있다. NADH 수준의 변동은 NADH로부터의 형광 방출을 측정함으로써 평가될 수 있다. NAD⁺ 및 NADH 모두는 UV 스펙트럼에서 강한 흡수성을 갖지만, 형광 특징은 서로 다르다. NADH는, (시토크롬에 대한) 결합 상태 대 유리 상태에 따라 440/460nm 파장 근처의 보라색/파란색 대역에서 강한 형광을 입증한다. 이 형광을 실시간으로 측정함으로써, NADH 수준의 변화를 감시할 수 있고, NADH의 대사 상태를 평가할 수 있어서, 세포 대사를 감시할 수 있다.

[0052] 조직을 여기시키도록, 350nm 파장을 방출하는 Q-스위칭 Nd:YAG 레이저를 사용하여, 400ps의 펄스 폭(FWHM)을 갖고서 1KHz에서 작동시켰다(Teem Photonics PNV02510). 펄스당 총 에너지 5 μ J를 초과하지 않았으며, 이는 NADH의 광 표백을 방지하였다. 주문형 세갈래형 광학 프로브를 사용하여 여기 광을 조직으로 전달하였다. 프로브는, 형광을 집광하도록 12개의 200마이크로미터 섬유로 둘러싼, 여기 광을 전달하기 위한 중심 600마이크로미터 섬유로 이루어졌다(도 3). 12개의 집광 섬유들을 하나 걸러 함께 묶어 두 개의 채널을 형성하였다. 한 개의 집광 채널/다발을 분광계(Ocean Optics, Maya)에 연결하였으며, 이 분광계에 의해 형광 스펙트럼을 100ms마다 측정하였고, 나머지 한 개의 채널/다발을 빔 분할기(디멀티플렉서)에 연결하였다. 파장 452nm에서 빔 분할기가 유리 형광과 결합 형광을 명확하게 분리하였으며, 이를 MCP-PMT와 분광계 모두에 의해 기록하였다.

[0053] OR에서 동물을 희생하여 토끼 뇌를 제거한 후 냉 산소 풍부 크랩-링거(Kreb-Ringer) 용액 내에 두어 연구실로 이송하였다. 피질을 분리하여, 조직을 살아 있는 상태로 유지하도록 95% O₂와 5% CO₂ 혼합물이 계속 버블링하고 있는 크랩-링거 용액에 두었다. 도 5에 도시한 바와 같이 형광을 기록하도록 조직에 대한 프로브를 조절하였다. 조직으로부터의 형광이 평형화되고 안정화될 때까지 베이스라인 NADH(결합 및 유리)를 기록하였다. 약 30분 후에, 미토콘드리아의 시토크롬에 대한 NADH의 결합을 방지하는 50nM 로테논의 도즈를 첨가하였다. 로테논의 추가 농도를 10분마다 첨가하였다.

[0054] 토끼 뇌 조직에 대한 로테논의 다양한 농도의 영향을 기록하였다(도 6). 그 결과에서는, 유리 및 결합 NADH 모두의 농도가 실시간으로(~100ms마다) 매핑될 수 있음을 나타내었으며 외부 자극에 대한 응답을 기록하였다. 도 6은, 2시간 초과 기간에 걸친 NADH 형광 수준의 연속 플롯을 도시한다. 50nM 농도의 로테논을 용액을 첨가했을 때, 예상한 바와 같이 NADH 소모 및 후속 축적의 차단에 의해 NADH 수준의 증가를 관찰하였다. 로테논의 농도가 증가함에 따라, 예상한 바와 같이 NADH 형광이 증가하였다. 80분 때, 액체를 통해 연속적으로 버블링하고 있었던 가스를 중단한 후 재개하여, 조직의 NADH의 축적에 대한 저산소증의 영향 및 산소 공급이 복구되었을 때의 후속 소모를 평가할 수 있었다. 이는, 대사 상태를 실시간으로 감시하는 본 명세서에서 설명하는 TRLIFS 시스템의 능력을 입증하였다.

[0055] 실시예 2

[0056] 손상 후 조직 생존성 결정

[0057] 허혈성 뇌졸중 후의 뇌의 대면적에 걸쳐 NADH 수준을 기록함으로써, 산소 부족으로 인해 충격 상태에 있을 수 있지만 세포 자멸을 겪지 않았으며 따라서 구조될 수 있는 생존 세포의 개수를 평가할 수 있다. 이러한 세포는, 반영(penumbra)이라고 알려져 있는 영역의 벌크를 형성하며, 뇌졸중 치료의 중요한 목적은 가능한 많은 신경 세포를 구조하면서 반영의 크기를 감소시키는 것이다. 전체 반영 영역에 걸쳐 NADH를 감시함으로써, 이를 위해 설계된 다양한 중재의 효과를 평가할 수 있다.

[0058] 조직을 여기시키도록, 350nm 파장을 방출하는 Q-스위칭 Nd:YAG 레이저를 사용하여, 400ps의 펄스 폭(FWHM)을 갖고서 1KHz에서 작동시켰다(Teem Photonics PNV02510). 펄스당 총 에너지 5 μ J를 초과하지 않았으며, 이는 NADH의 광 표백을 방지하였다. 주문형 세갈래형 광학 프로브를 사용하여 여기 광을 조직으로 전달하였다. 프로브는, 형광을 집광하도록 12개의 200마이크로미터 섬유로 둘러싼, 여기 광을 전달하기 위한 중심 600마이크로미터 섬유로 이루어졌다. 12개의 집광 섬유들을 하나 걸러 함께 묶어 두 개의 채널을 형성하였다. 한 개의 집광 채널/다발을 분광계(Ocean Optics, Maya)에 연결하였으며, 이 분광계에 의해 형광 스펙트럼을 100ms마다 측정하였고, 나머지 한 개의 채널/다발을 빔 분할기(디멀티플렉서)에 연결하였다.

[0059] 대뇌동맥에 응고물을 주입함으로써 토끼 뇌에 뇌졸중을 야기한 토끼 뇌 뇌졸중 모델을 사용하였다. 신경 손상을 위한 테스트 후 토끼를 희생시켰다. 뇌를 제거하고 냉 O₂ 포화 크랩-링거 용액에 두어 연구실로 이송하였다. 연구실에서는, 경색 피질을 뇌의 나머지에서 분리하여, 95% O₂와 5% CO₂ 혼합물이 계속 버블링하고 있는 크랩-링

거 용액에 두었다. 도 7에 도시한 바와 같이 피질의 에지로부터 단일 판독을 기록하고 피질의 표면에 걸쳐 프로브를 이동시켰다. 조직 샘플로부터 형광 강도를 기록하였다. 조직 샘플을, 생존 세포들이 차지하는 경우 세포를 적색으로 변하게 하는 TTC 용액(2,3,5-트리페닐 테트라졸륨)에 침수시켰다. TTC는, 현재, 세포의 생존성을 테스트하기 위한 최적의 표준이다. TTC로 염색된 조직을 기록된 형광 강도와 비교하였다.

[0060] 건강한 조직(도 7의 적색으로 염색된 영역)으로부터 죽은 조직(도 7의 염색되지 않은 영역)으로의 NADH 자동-형광의 매끄러운 구배를 관찰하였다. 또한, 본 발명자들은, TTC 염색으로 알 수 있는 바와 같이 생존 뇌 조직으로부터 죽은 뇌 조직으로의 갑작스런 변화 대신에, 형광 강도(도 7)가 점진적으로 변화였으며, 이는 죽은 것으로 표시된 영역에서의 생존 세포들의 존재를 나타낸다는 점에 주목하였다.

[0061] 실시예 3

[0062] 혈장의 대사 물질/약의 수준을 결정하도록 형광을 이용

[0063] 일부 항암 약들은, 많은 복용량의 경우 독성이 있으며, 적은 복용량에서는 효능을 잃는다. 약이 가장 효과적인 이러한 약의 최적의 혈장 농도(치료 범위)는, 키, 몸무게, 대사, 및 민족성의 변동으로 인해 환자들 간에 가변된다. 이러한 변동에도 불구하고, 현재, 약 복용량은, 표준화된 약동학적 프로파일과 환자의 몸무게에 기초하여 산출된다. 혈장 약 수준을 결정하기 위한 빠르고도 저가의 방법은 개별적인 환자에 대한 복용량의 최적화를 가능하게 한다. 약의 혈장 수준은 형광 분광을 이용하여 검출될 수 있다. 메토틀렉세이트 등의 항암 약들 중 일부는 형광성을 갖는 것으로 알려져 있다. 여기서, 출원인은, 본 명세서에서 설명하는 TRLIFS 시스템을 이용하여 우무 배지의 메토틀렉세이트(MTX)의 농도를 가변함으로써(도 8), MTX의 대응하는 변화가 발생하였음을 제시한다.

[0064] 우무 배지 겔을 여기시키도록, 350nm 파장을 방출하는 Q-스위칭 Nd:YAG 레이저를 사용하여, 400ps의 펄스 폭(FWHM)을 갖고서 1KHz에서 작동시켰다(Teem Photonics PNM02510). 펄스당 총 에너지 5μJ를 초과하지 않았으며, 이는 NADH의 광 표백을 방지하였다. 주분형 세갈래형 광학 프로브를 사용하여 여기 광을 겔로 전달하였다. 프로브는, 형광을 집광하도록 12개의 200마이크로미터 섬유로 둘러싼, 여기 광을 전달하기 위한 중심 600마이크로미터 섬유로 이루어졌다. 12개의 집광 섬유들을 하나 걸러 함께 묶어 두 개의 채널을 형성하였다. 한 개의 집광 채널/다발을 분광계(Ocean Optics, Maya)에 연결하였으며, 이 분광계에 의해 형광 스펙트럼을 100ms마다 측정하였고, 나머지 한 개의 채널/다발을 빔 분할기(디멀티플렉서)에 연결하였다.

[0065] 아가 배지 겔에 MTX(25μg/ml 내지 25ng/ml)의 계열 희석물을 제조하였다. MTX는, UV 광에 노출되면, 더욱 형광성 형태로 변환된다. 형광물을 UV 광에 노출시킴으로써 축적물이 형성된다. 형광성 형태를 검출하도록, 포화 수준에 도달할 때까지 저 형광성 형태로부터 형광성 형태로 변환을 행하였다. 최종 형광 강도를 기록하고 농도와 비교하였다. 20분 동안의 UV 광 노출 후의 MTX의 형광 강도는, 도 9에 도시한 바와 같이 우무 배지 겔의 MTX의 농도의 양호한 표시자이다.

[0066] 실시예 4

[0067] 종양 검출

[0068] 광 유기 형광 분광(LIFS)은 생체내 진단을 위한 유력하고도 새로운 부속 기술을 나타낸다. 형광 분광은, 조직 내의 내인성 형광체(표식 없음)를 여기시키고 방출을 기록하는 것을 포함한다. 형광 분광은, 두 가지 방식, 즉, 안정 상태(steady-state) 또는 시간 분해 형광 분광으로 채택될 수 있다. 시간 분해 측정은, 수명 면에서 형광 강도 감쇠를 분해하고, 따라서, 형광 강도 감쇠의 기저 역학에 대한 추가 정보를 제공한다. 시간 분해 측정은, 또한, 조직 내인성 형광체(예를 들어, 혈액)에 의한 흡수, 광 표백, 또는 형광 강도에 영향을 끼칠 수 있는 다른 임의의 조건 등의 인자들과는 독립적이다. 개별적인 형광 분자들의 완화 역학의 차이를 반영하는 형광 감쇠 특징을 측정함으로써, 시간 분해 측정은, 중첩되는 스펙트럼을 분해하고 형광 측정의 특이성을 개선하는 능력을 갖는다.

[0069] 출원인은, 환자에 있어서, 본 명세서에서 설명하는 TR-LIFS 시스템이 주변의 정상적인 뇌 조직으로부터 신경교종 종양(고급 및 저급 모두)을 수술 중에 판별할 수 있음을 제시한다. 이러한 기능은, 외과 수술 동안 신경외과의-신경 병리학자 팀이 종양과 정상적인 뇌를 빠르게 판별하는 능력을 향상시키는 TR-LIFS 잠재력을 확립하는 것이다.

[0070] 기기: 스펙트럼 분해 형광 수명 측정을 가능하게 하는 기기 설정에 의해 실험을 행하였다. 장치의 광학적 및 전자적 레이아웃의 개략도가 도 1에 도시되어 있다. 간략하게, 이 장치는, 여기 소스로서 사용된 a) 펄스형 Q-스

위치 Nd:YAG 레이저(Teem Photonics, model Teem Photonics PNVM02510, $\lambda = 350\text{nm}$, 펄스 폭 = 400ps FWHM, 펄스 레이트 = 1KHz), b) 주문형 세갈래형 살균가능 광섬유 프로브(Fiberguide, 뉴저지주에 소재), c) 선택 사항인 고속 전치증폭기(Photek, 영국 소재, 모델 PA200-10, 2GHz)를 갖는 게이트형 다채널 판 포토-멀티플라이어 튜브(MCP-PMT Photek, UK, 모델 210, 상승 시간=80ps), e) 디지털화기(ADQ-108, SPDevices, 스웨덴 소재, 7Gsamples/sec), f) 컴퓨터 랩탑, 및 g) 도 1에 도시한 바와 같은 주문형 디멀티플렉서와 주변 전자 장치들로 이루어졌다. 기기는, 개별적인 디바이스들을 수용하도록 내부적으로 개량된 표준 내시경 카트($70 \times 70 \times 150\text{cm}^3$) 내에 포함되었기에 이동이 가능하였다. 고 전압 전원 및 전치증폭기 전원 등으로서 사용되는 전자 장치들로부터의 매우 낮은 잡음 수준을 보장하도록, 의료용 분리 변압기(토로이드(Toroid)(등록상표) ISB-170A)를 사용하여 메인 전원으로부터 모든 기기들을 차폐한다.

[0071] 전달 카테터: 주문형 세갈래형 살균가능 프로브를 이용하여 광 전달 및 집광을 구현하였다. 프로브는, 개구수 (NA) 0.11의 태양광 비노출(non-solarizing) 실리카/실리카 단차 인덱스 섬유들(Fiberguide, 뉴저지주 뉴저지주에 소재)로 이루어졌다. 이 프로브는, 코어 직경이 $200\mu\text{m}$ 인 12개의 섬유의 집광 링에 의해 둘러싸인, 코어 직경이 $600\mu\text{m}$ 인 중심 여기 섬유를 가졌다. 모든 집광 섬유들을 함께 묶어 단일 $600\mu\text{m}$ 섬유로 결합하였다. 여기 섬유와 집광 섬유 사이의 중심 간 분리 거리는 $480\mu\text{m}$ 이었다. 프로브는, 강성 스테인리스 스틸 튜브로 이루어진 7cm 원위 부분을 제외하고는 전체 길이(3미터)에 걸쳐 유연하였다. 이는 프로브의 장착과 현미조작을 용이하게 하였다. 두 개의 슬릿이 서로 반대측에 있는 스페이서를 프로브의 원단 앞에 추가하였다. 이는, 프로브가 조직 으로부터 고정된 거리를 유지하면서 조직과 접촉할 수 있게 하였다. 스페이서 상의 두 개의 슬릿에 의해, 외과의 가 부위를 깨끗하게 유지하도록 흡입 튜브를 부착할 수 있었다. 레이저 광을 표준 SMA 커넥터를 갖는 프로브의 조명 채널에 결합하는 한편, 분광기에 대한 결합을 용이하게 하도록 집광 채널의 원단을 직선으로 형성하였다. 조직 여기 후에, 제1다발에 의해, 방출된 형광을 집광하여 디멀티플렉서의 진입 슬릿으로 향하게 하고, 제2다발에 의해 분광계로 향하게 하였다. 이어서, 신호를, MCP-PMT에 의해 검출하고, 고속 전치증폭기에 의해 증폭하고, 마지막으로 디지털 오실로스코프에 의해 8비트 분해능으로 디지털화하였다. 시스템의 전체 시간 분해능은 약 150ps였다.

[0072] 이전에 보고된 바와 같이 프로브 집광 효율을 최적화하고 조직에 대하여 프로브를 안정화하도록, 스페이서에 의해, 노출된 너 조직 표본 위의 3mm에 광섬유 프로브를 위치시켰다. 7개의 개별적인 파장 대역($355(<365\text{nm})$), 365 내지 410nm, 415 내지 450nm, 450 내지 490nm, 500 내지 560nm, 560 내지 600nm, 및 $>600\text{nm}$) 스펙트럼 범위에서 각 샘플의 시간 분해 방출을 기록하였다. 샘플 여기를 위한 (섬유의 팀에서의) 레이저의 에너지 출력을 $5.0\mu\text{J}/\text{펄스}$ 로 조절하였다. 분광 분석 후에, 정확한 사이트에서 조직 검사를 행하여 병리학적 조사를 위해 전달 하였다.

[0073] 각 조직 검사 샘플을 10% 완충 포르말린 내에 고정하였다. 조직 샘플들을 슬라이드 상에 고정하고 H&E로 염색하였다. 모든 조직 검사 표본들을 병리학자가 연구하였으며, 초기 형광 분광 특정 결과와 상관지었다. 조직학적으로, 신경아교종들을, WHO 등급에 기초하여, 저급인 희소돌기아교세포종, 희소돌기별아교세포종, 광범위 별아교세포종(WHO II 등급), 중급인 역형성 별아교세포종(WHO III 등급), 및 고급인 역형성 희소돌기아교세포종, 역형성 희소돌기교세포종, 및 다형성아교모세포종(III-IV 등급)으로 분류하였다. 본 연구의 분광 분류를 위해, 신경교종을 저급 신경교종(I&II 등급)과 고급 신경교종(III&IV 등급)으로 그룹화하였다.

[0074] TR-LIFS 데이터 분석: TR-LIFS의 문맥에서 볼 때, 내재 형광 임펄스 응답 함수(IRF)($h(n)$)은 형광 감쇠의 실제 동역학을 설명한다. 측정된 형광 천이 응답으로부터 측정된 입력 레이저 펄스를 수치적으로 디콘볼루션함으로써 IRF를 복구하였다. 디콘볼루션을 위해 라게르 확장 기술을 사용하였다. 한 세트의 이유 때문에 더욱 많은 종래의 다지수 곡선 맞춤에 대하여 라게르 확장 기술을 선택하였다. 이 기술은 형광 IR을 더욱 빠르게 디콘볼루션할 수 있다. 라게르는 정규직교에 기초하므로, 감쇠 함수의 고유하고 완전한 확장을 제공한다. 이것은, 또한, 비모수(non-parametric)이어서, 감쇠의 함수 형태의 선제 가정을 필요로 하지 않는다. 결국, 이것은, 생물학적 조직의 역학 등의 미지의 복잡한 완화 역학에 의한 형광 시스템의 근사화를 가능하게 한다. 이 방법은, 실험 입력-출력 데이터로부터 동적 시스템의 내재 특성의 직접적인 복구를 가능하게 한다. 이 기술은, 직교 정규 라게르 함수를 이용하여 IRF를 확장하고 라게르 확장 계수(LEC)를 추정한다. 이산 강도 값들을 피크 방출시의 강도 값으로 나눔으로써, 정규화된 형광 스펙트럼을 얻었다. 또한, 형광 감쇠의 시간적 역학을 특성 규명하도록, 파라미터들의 두 개 세트를 사용하였는데, 1) IRF가 최대 값으로 감쇠되는 보간된 시간으로서 산출된 평균 수명(τ_λ) 및 2) 대응하는 LEC들의 정규화된 값이다. 따라서, 방출 파장 λ_E 의 함수로서 각 샘플로부터의 형광의 완전한 설명을, 개별적인 파장에서의 스펙트럼 파라미터들의 세트의 변형(방출 강도 - I_λ , 형광 방출의 평균

수명 $\tau_{f\lambda}$, 및 라게르 계수 LEC_f)에 의해 제공하였다. 형광 감쇠를 특성 규명하기 위한 이러한 분석 방안은, 출원인의 연구 그룹에 의해 최근에 개발되었으며 다른 부분에서 상세히 설명되어 있다. 출원인은, 수명과 라게르 함수 값들을 복구할 수 있었다.

[0075] 전술한 다양한 방법과 기술은 본 출원을 실시하기 위한 많은 방식을 제공한다. 물론, 본 명세서에서 설명하는 임의의 특정한 실시형태에 따라 전술한 목적이나 장점을 모두 달성할 필요는 없다는 점을 이해하기 바란다. 따라서, 예를 들어, 통상의 기술자는, 본 명세서에서 교시하는 바와 같은 다른 목적들이나 장점들을 반드시 달성하지 않고서 본 명세서에서 교시하는 바와 같은 한 장점 또는 장점들의 그룹을 달성하거나 최적화하는 방식으로 방법들이 수행될 수 있다는 점을 인식할 것이다. 본 명세서에서는 다양한 대체예도 설명하였다. 일부 바람직한 실시형태들은, 구체적으로, 하나의 특징, 다른 하나의 특징, 또는 여러 특징을 포함하는 한편, 다른 실시형태들은, 구체적으로, 하나의 특징, 다른 하나의 특징, 또는 여러 특징을 배제하는 한편, 또 다른 실시형태들은 하나의 특징, 다른 하나의 특징, 또는 여러 유리한 특징들을 포함함으로써 특정한 특징을 완화한다는 점을 이해하기 바란다.

[0076] 게다가, 통상의 기술자는 서로 다른 실시형태들로부터 다양한 특징부의 적용가능성을 인식할 것이다. 마찬가지로, 전술한 다양한 요소, 특징부 및 단계, 및 이러한 요소, 특징, 또는 단계에 대하여 알려져 있는 다른 균등물은, 본 명세서에서 설명하는 원리에 따라 방법들을 수행하도록 통상의 기술자에 의해 다양한 조합으로 채택될 수 있다. 다양한 요소, 특징부 및 단계 중에서, 다양한 실시형태에 있어서, 일부는 특정하게 포함되며, 다른 일부는 특정하게 배제된다.

[0077] 소정의 실시형태들과 예들의 문맥으로 본 출원을 개시하였지만, 통상의 기술자라면 본 출원의 실시형태들이 특정하게 개시된 실시형태들을 벗어나 다른 대체 실시형태들 및/또는 용도 및 수정예 및 그 균등물로 연장된다는 점을 이해할 것이다.

[0078] 일부 실시형태들에서, 본 출원의 특정한 실시형태를 설명하는 문맥에서 (특히 다음에 따르는 청구항들 중 일부의 문맥에서) 사용되는 "한", "하나", "그", 및 유사한 참조 용어들은 단수와 복수 모두를 포함하는 것으로 해석될 수 있다. 본 명세서에서 값들의 범위를 언급하는 것은, 그 범위 내에 속하는 각각의 별도의 값을 개별적으로 언급하는 약칭 방법으로서 기능할 뿐이다. 본 명세서에서 달리 언급하지 않는 한, 각각의 개별적인 값은 본 명세서에서 개별적으로 언급되는 것처럼 명세서 내에 포함된다. 본 명세서에서 설명하는 모든 방법들은, 본 명세서에서 달리 언급하지 않는 한 또는 문맥상 명백하게 모순되지 않는 한 임의의 적절한 순서로 수행될 수 있다. 본 명세서의 소정의 실시형태들에 관하여 제공되는 임의의 모든 예들 또는 예시적인 언어(예를 들어, "등의")를 사용하는 것은, 본 출원을 더욱 양호하게 예시하려는 것일 뿐이며, 본 출원의 범위를 제한하려는 것이 아니다. 명세서의 어떠한 언어도 본 출원의 실시예 필수적인 임의의 비청구(non-claimed) 요소를 가리키는 것으로 해석해서는 안 된다.

[0079] 본 출원을 실시하도록 발명자들에게 알려져 있는 최상의 모드를 포함한 본 출원의 바람직한 실시형태들을 설명하였다. 그러한 바람직한 실시형태들의 변형예들은, 전술한 설명을 읽는 통상의 기술자에게 자명할 것이다. 통상의 기술자가 이러한 변형예를 적절히 채택할 수 있고, 본 명세서에서 특정하게 설명한 바와 다르게 본 출원을 실시할 수 있다. 이에 따라, 본 출원의 많은 실시형태들은, 적용가능한 법에 의해 허용되는 바와 같이 첨부된 청구범위에서 언급되는 청구 대상의 모든 수정예 및 균등물을 포함한다. 또한, 모든 가능한 변형예에서의 전술한 요소들의 임의의 조합은, 본 명세서에서 달리 언급하지 않는 한 또는 문맥상 명백하게 모순되지 않는 한 본 출원에 포함된다.

[0080] 본 명세서에서 언급되는 모든 특허, 특허 출원, 특허출원 공개공보, 및 기타 자료, 예컨대, 물품, 책, 명세, 출판물, 문헌, 사물 및/또는 기타는, 이러한 것들과 연관된 임의의 수속 이행(prosecution) 파일 이력, 이러한 것들 중 본 명세서와 일치하지 않거나 충돌하는 임의의 것, 또는 이러한 것들 중 본 명세서에 현재 연관되거나 추후에 연관될 청구범위의 가장 넓은 범위에 대하여 제한적으로 영향을 끼칠 수 있는 임의의 것을 제외하고는, 모든 면에서 그 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다. 예를 들어, 인용된 자료 및 본 명세서에 연관된 것 중 임의의 것에 연관된 용어의 설명, 정의, 및/또는 사용 간에 임의의 불일치나 충돌이 있는 경우, 본 명세서에서의 용어의 설명, 정의, 및/또는 사용이 우선한다.

[0081] 본 명세서에서 개시하는 출원의 실시형태들은 본 출원의 실시형태들의 원리를 예시하는 것이라는 점을 이해하기 바란다. 채택될 수 있는 다른 수정예들은 본 출원의 범위 내에 있을 수 있다. 따라서, 제한적이지 않은 예를 들면, 본 명세서의 교시에 따라 출원의 실시형태들의 대체 구성을 이용할 수 있다. 이에 따라, 본 출원의 실시형

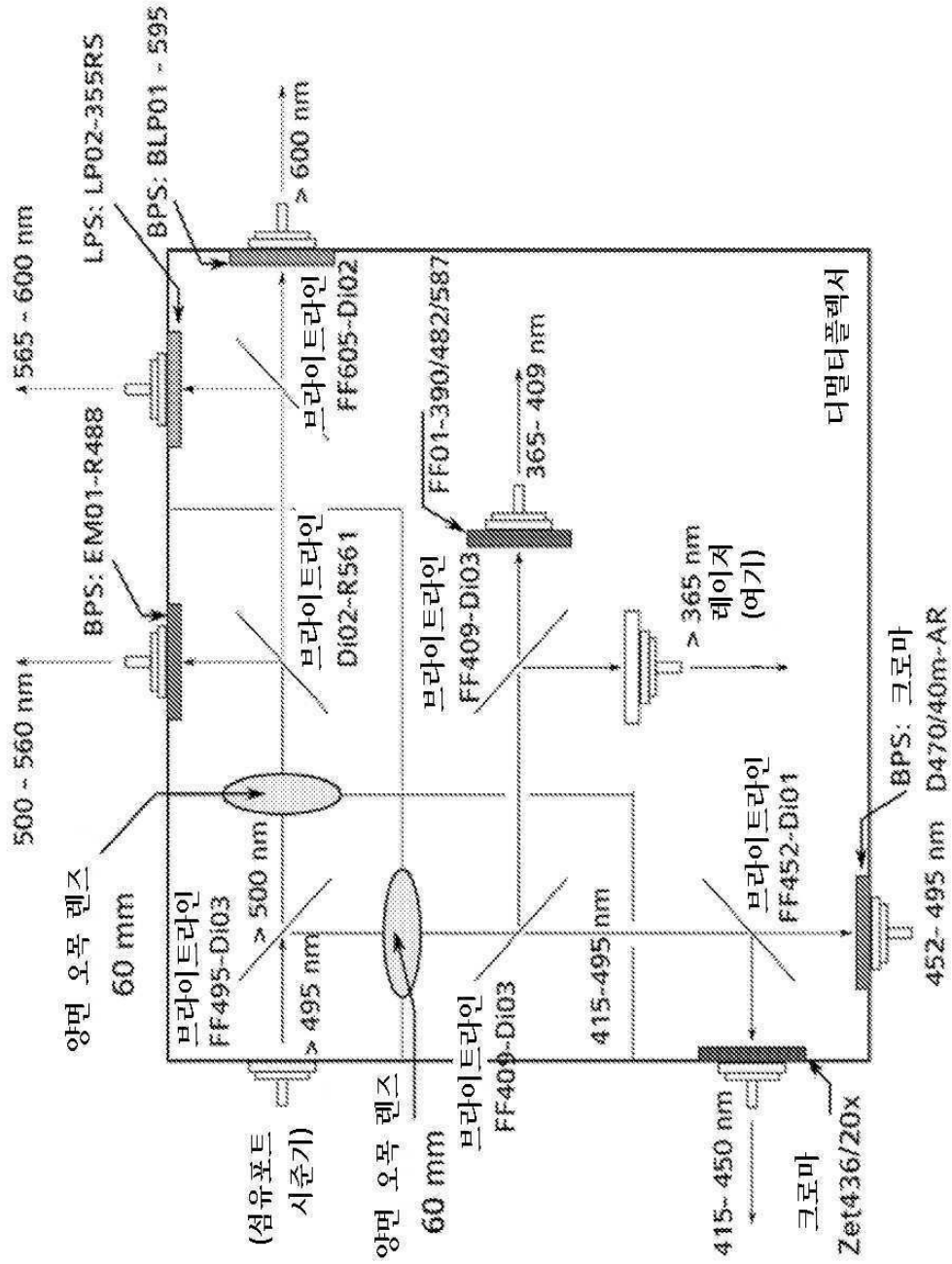
태들은 정확하게 도시하고 설명한 바로 한정되지 않는다.

[0082] 참조 문헌

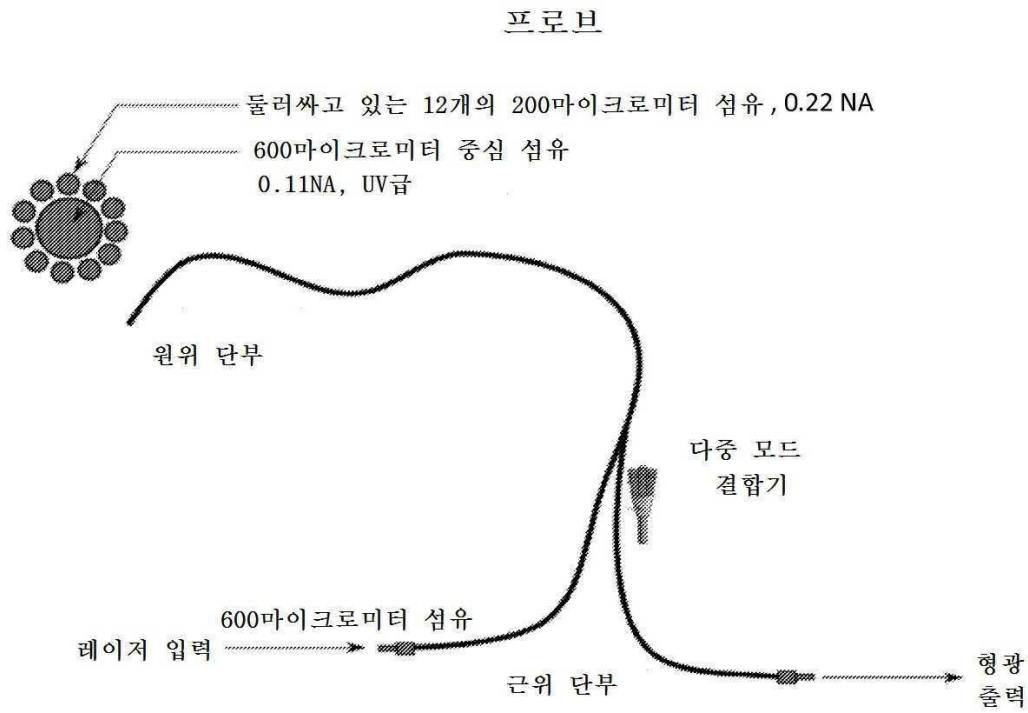
- Butte, P. V, Fang, Q., Jo, J. A., Yong, W. H., Pikul, B. K., Black, K. L., & Marcu, L. (n.d.). Intraoperative delineation of primary brain tumors using time-resolved fluorescence spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 15(2), 027008. doi:10.1117/1.3374049
- Butte, P. V, Pikul, B. K., Hever, A., Yong, W. H., Black, K. L., & Marcu, L. (2005). Diagnosis of meningioma by time-resolved fluorescence spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 10(6), 064026. doi:10.1117/1.2141624
- Butte, P. V., Mamelak, A. N., Nuno, M., Bannykh, S. I., Black, K. L., & Marcu, L. (2010). Fluorescence lifetime spectroscopy for guided therapy of brain tumors. *NeuroImage*, 54 S125–S135. doi:10.1016/j.neuroimage.2010.11.001
- Marcu, L., Jo, J. a, Butte, P. V, Yong, W. H., Pikul, B. K., Black, K. L., & Thompson, R. C. (2004). Fluorescence lifetime spectroscopy of glioblastoma multiforme. *Photochemistry and Photobiology*, 80, 98–103. doi:10.1562/2003-12-09-RA-023.1
- Yong, W. H., Butte, P. V, Pikul, B. K., Jo, J. A., Fang, Q., Papaioannou, T., ... Marcu, L. (2006). Distinction of brain tissue, low grade and high grade glioma with time-resolved fluorescence spectroscopy. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 11(4), 1255–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16368511>
- Jo, J. a, Fang, Q., Papaioannou, T., & Marcu, L. (2004). Fast model-free deconvolution of fluorescence decay for analysis of biological systems. *Journal of Biomedical Optics*, 9(4), 743–52. doi:10.1117/1.1752919

- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy* (3rd ed., p. xxvi, 954 p.). New York: Springer. Retrieved from <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0824/2006920796-b.html>
- Pogue, B. W., Pitts, J. D., Mycek, M. a, Sloboda, R. D., Wilmot, C. M., Brandsema, J. F., & O'Hara, J. a. (2001). In vivo NADH fluorescence monitoring as an assay for cellular damage in photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 74(6), 817–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11783938>
- Schneckenburger, H. (1992). Fluorescence decay kinetics and imaging of NAD(P)H and flavins as metabolic indicators. *Optical Engineering*, 31(7), 1447. doi:10.1117/12.57704
- Sun, Y., Phipps, J., Elson, D. S., Stoy, H., Tinling, S., Meier, J., ... Marcu, L. (2009). Fluorescence lifetime imaging microscopy: in vivo application to diagnosis of oral carcinoma. *Opt Lett*, 34(13), 2081–2083. doi:183277 [pii]

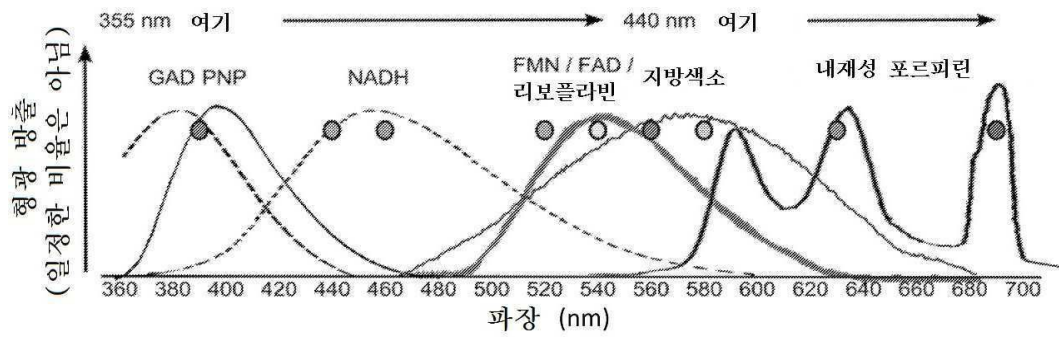
도면2



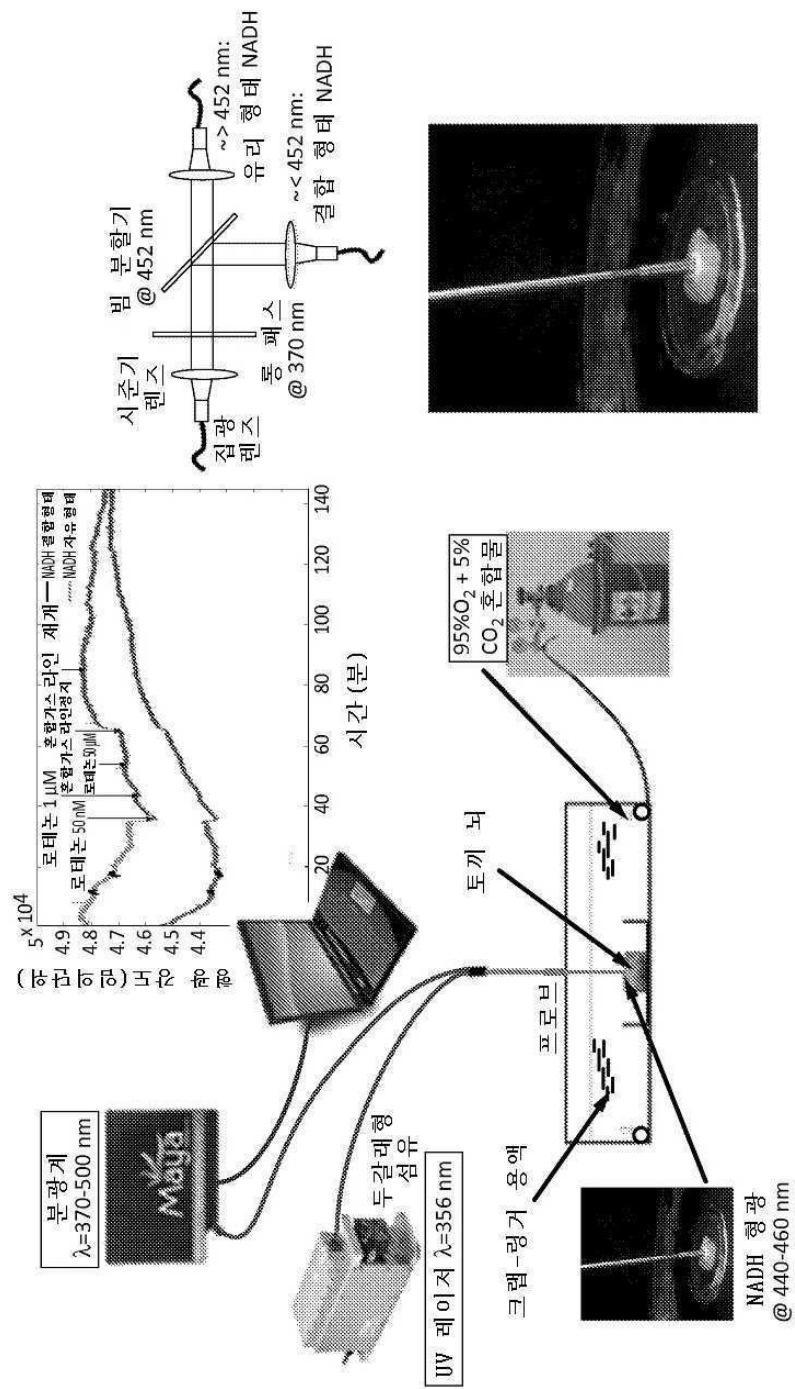
도면3



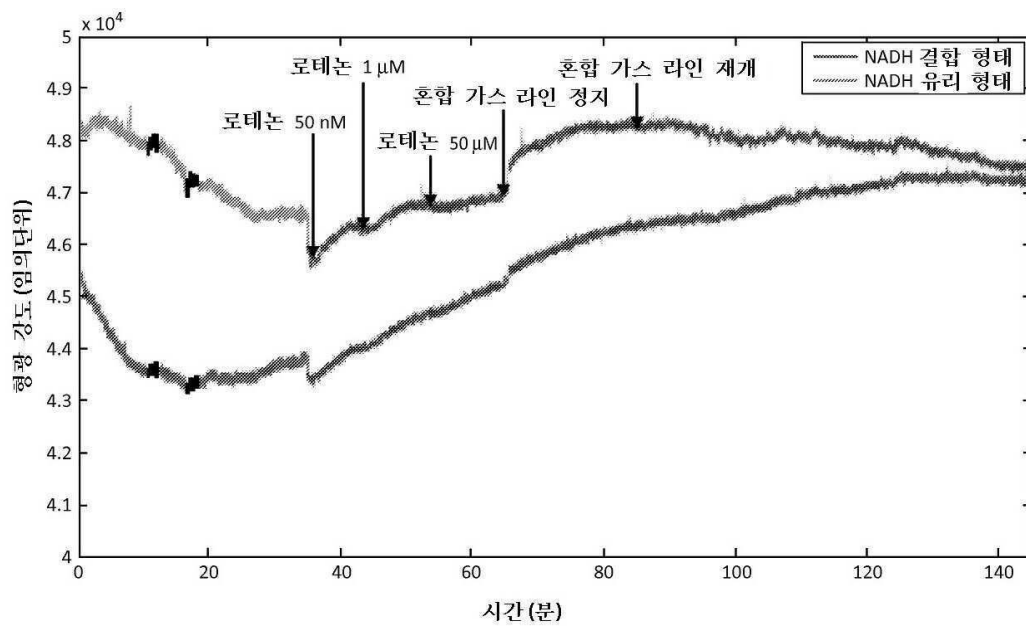
도면4



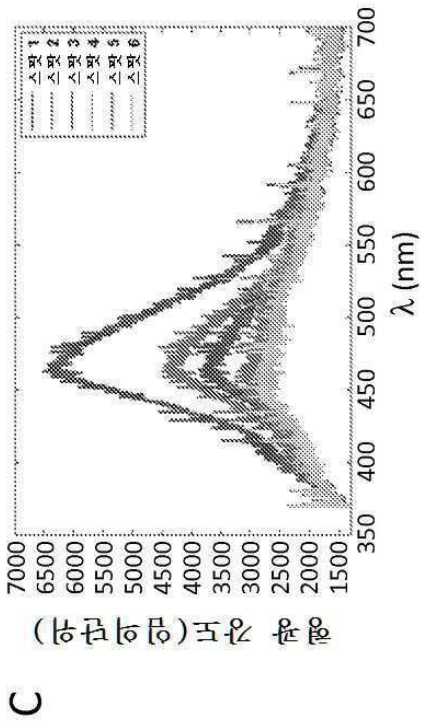
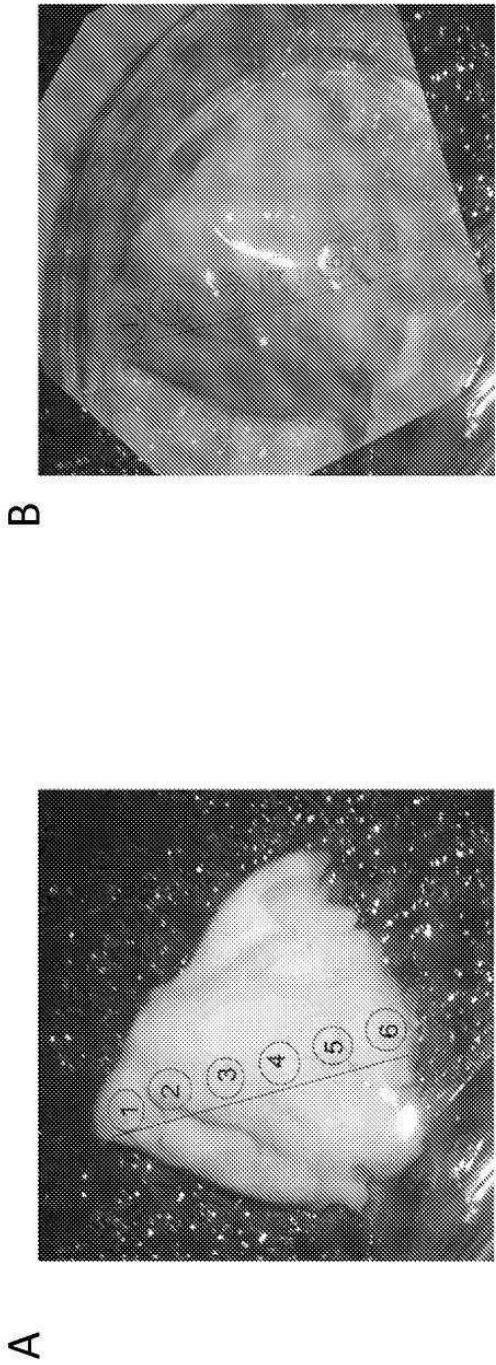
도면5



도면6



도면7



도면8

