

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012년 12월 6일 (06.12.2012)



(10) 국제공개번호
WO 2012/165837 A2

- (51) 국제특허분류:
G01N 33/15 (2006.01) G01N 33/52 (2006.01)
G01N 21/65 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/004223
- (22) 국제출원일: 2012년 5월 29일 (29.05.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0050991 2011년 5월 29일 (29.05.2011) KR
10-2012-0056775 2012년 5월 29일 (29.05.2012) KR
- (71) 출원인 (US을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 한국
화학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF
CHEMICAL TECHNOLOGY) [KR/KR]; 대전시 유성
구 장동 100번지, 305-343 Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US에 한하여): 서영덕 (SUH, Yung
Doug) [KR/KR]; 대전시 유성구 도룡동 385-14 더포원
2차 802호, 305-340 Daejeon (KR). 전기석 (JEON, Ki
Seok) [KR/KR]; 대전광역시 대덕구 신탄진동 83-23
1/2, 306-814 Daejeon (KR). 김형민 (KIM, Hyung Min)
[KR/KR]; 대전광역시 유성구 대덕대로 549 8동 303
호, 305-340 Daejeon (KR). 이강택 (LEE, Kang Taek)
[KR/KR]; 대전시 유성구 지족동 열매마을 3단지 307-

402, 305-769 Daejeon (KR). 진승민 (JIN, Seung Min)
[KR/KR]; 충청남도 연기군 남면 나성리 행복도시 A-2
첫마을아파트 306-114, 339-822 Chungcheongnam-do
(KR). 남상환 (NAM, Sang Hwan) [KR/KR]; 대전시 유
성구 신성동 146-6 살롬빌 202호, 305-804 Daejeon
(KR). 배윤미 (BAE, Yun Mi) [KR/KR]; 충청남도 논산
시 연무읍 동산리 903-17 기산아파트 102-1711, 320-
833 Chungcheongnam-do (KR). 이혜미 (LEE, Haemi)
[KR/KR]; 대전시 서구 둔산동 벅스밸리 A-706호,
302-120 Daejeon (KR). 이정희 (LEE, Kyunghee)
[KR/KR]; 서울시 용산구 이태원 2동 227-12, 140-857
Seoul (KR). 박효선 (PARK, Hyo Sun) [KR/KR]; 전라남
도 광양시 금호동 사랑아파트 11동 701호, 545-765
Jeollanam-do (KR). 김필환 (KIM, Phil Hwan) [KR/KR];
대전광역시 유성구 장대동 479 푸르지오아파트 110동
502호, 305-308 Daejeon (KR).

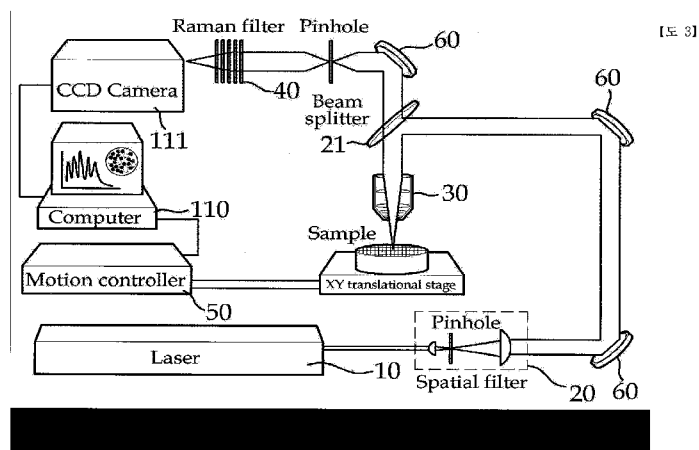
(74) 대리인: 이원희 (LEE, Won Hee); 서울시 강남구 역삼
동 642-16 성지하이츠 2차 8층, 135-080 Seoul (KR).

(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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,
MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: HIGH-SPEED SCREENING APPARATUS FOR A RAMAN ANALYSIS-BASED HIGH-SPEED MULTIPLE DRUG

(54) 발명의 명칭 : 라만 분석 기반 고속 다중 약물 고속 스크리닝 장치



(57) Abstract: The present invention relates to a high-speed screening apparatus for a raman analysis-based high-speed multiple drug. The screening apparatus according to the present invention may easily detect a raman signal using a core-cap-shell nano-particle which amplifies the raman signal by 1012 times and has high reproducibility through raman spectroscopy in which materials do not interfere with each other and a spectrum has a sharp peak to detect the raman signal multiple times. Also, since a CCD camera, not a scanner, may be used as the detector, the screening apparatus may multiply screen the drug at a high speed without movement between molecules within a sample. In addition, since multicolors of 5 colors or more may be coated, the screening apparatus may be usefully used for screening various drugs.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2012/165837 A2



PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

본 발명은 라만 분석 기반 고속 다중 약물 고속 스크리닝 장치에 관한 것으로, 본 발명에 따른 스크리닝 장치는 물질 간에 간섭이 없고 스펙트럼의 피크가 샤프(sharp)하여 다중 검출이 가능한 라만 분광법을 사용하고, 라만 신호를 약 1012 배로 증폭시키고 높은 재현성을 나타내는 코어-셸 나노입자를 이용하여 라만 신호를 용이하게 검출할 수 있으며, 검출기로서 스캐너가 아닌 CCD 카메라를 사용함으로써 시료 내 분자간 이동이 필요 없어 고속으로 다중 스크리닝 할 수 있고, 5 색 이상의 다중 컬러 코딩이 가능하므로, 각종 약물 스크리닝에 유용하게 사용될 수 있다.

【명세서】**【발명의 명칭】**

라만 분석 기반 고속 다중 약물 고속 스크리닝 장치

【기술분야】

본 발명은 라만 분석 기반 고속 다중 약물 고속 스크리닝 장치에 관한 것이다.

【발명의 배경이 되는 기술】

신약개발은 통상적으로 10년 이상의 장기간과 8억불 이상의 엄청난 자본이 투입되는 선진국형의 전략적 개발 과정이다. 게다가 이를 수행하기 위해서는 많은 사회적 인프라가 요구된다.

신약개발과정은 크게 기초연구에 의한 작용점 도출 및 선정, 화합물 스크리닝에 의한 유효물질 및 선도물질 선정, 후보물질의 확정, 전임상/임상1상의 임상화 연구과정, 임상2, 3상의 상품화 과정이 있다.

현재 약 35,000개의 유전자 작용점 중에서 실제로 신약연구의 대상으로 이용되고 있는 것은 약 500종으로 지놈 프로젝트 이후 그 대상이 지속적으로 증가하고 있다. 일단 작용점이 선정되면 가장 적합하고 유효성이 있는 스크리닝 방법이 개발되어야 한다. 스크리닝 방법은 일반적으로 시험관에서 수행하는 in vitro assay 방법과 실제 세포를 대상으로 하는 cell-based assay 방법으로 구분될 수 있다. 이러

한 스크리닝의 대상이 되는 화합물은 거대제약 회사의 경우 작게는 수 만종에서 크게는 수백만 종으로 이것들 모두가 스크리닝 초기과정부터 사용되기도 한다.

이러한 스크리닝 과정은 엄청난 비용이 소요되기 때문에 스크리닝 방법을 효율적으로 설계하고 단시간에 많은 수의 화합물을 스크리닝할 수 있도록 제반 장비와 시약 등을 고속화 및 최소화하려는 노력이 필요하다.

다수의 화합물을 스크리닝하는 과정은 기술적으로 용이하고 재현성이 높아야 한다. 작용점이 효소일 경우 이미 잘 확립된 스크리닝 방법과 시약이 많음으로 비교적 용이한 접근이 가능하다. 그러나 많은 세포 내 과정들이 단백질간의 상호작용에 기인하기 때문에 단백질 상호작용에 기초한 스크리닝은 신약 선도물질 발굴을 위한 분석 방법 중 가장 효율성이 높은 방법이며, 그 중요성이 강조되는 이유는 첫째 생체 내에서 단백질은 다른 단백질과의 결합을 통해 기능을 나타내고, 둘째 유전자 및 단백질발현의 변화, 세포 내 위치의 변화, 번역 후 수식을 통한 구조의 변화는 단백질 결합의 변화를 유도하며, 셋째 이는 궁극적으로 세포 내에서 일어나는 대사 및 신호전달과정의 활성화, 제어의 변화를 초래하고, 넷째 유전자변이 (mutation)에 의한 단백질 상호작용의 이상은 질병과 직결된다는 점이다. 이러한 단백질간의 상호작용을 측정하기 위한 기술로는 FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer), BRET(Bioluminescence Resonance Energy Transfer) 그리고 FP (Fluorescence Polarization) 등의 기법들이 개발되었으며 이를 쉽게 측정할 수 있는 장비들도 많이 개발되었다. 최근에는 자동화된 현미경 장비를 이용한 HCS

(High-content Screening) 기법이 도입되고 있는데 96-웰, 384-웰 플레이트 등에 세포를 배양한 후 화합물을 처리함으로써 세포내 단백질의 양적 변화와 이동과 관련한 많은 현상들을 신속하고 정량적인 방법으로 측정할 수 있게 되었다. 이러한 HCS 기법은 기존의 효소측정방법이나 리포터 시스템이 제공하는 효소활성도, 프로모터의 강도, 단백질의 증감 등의 단순한 정보이상으로 단백질의 상호작용이나 Ca^{++} influx 같은 종래의 방법으로 대규모 스크리닝이 어려웠던 생리적 현상마저도 측정할 수 있게 되어 현재 거대제약회사나 연구소에서 활용중에 있다.

약효 스크리닝의 통상적인 작업과정은 화합물의 분주, 희석, 스크리닝 성분 혼합, 배양 및 검출, 스크리닝 데이터의 분석 및 결과 보고로 구성되며, 이 일련의 과정을 신속하고 효율적으로 처리하기 위해 소형화 및 자동화된 고속 다중 스크리닝 (High Throughput Screening, 이하 HTS) 시스템을 활용하고 있다. 통상 선진제약사의 경우 현재 수 백만종의 화합물 라이브러리를 보유하고 있으며, 신규 작용점 도출시 마다 HTS 시설을 활용하여 전체 화합물에 대한 생물활성 데이터를 확보하고 있다. 향후 도출되는 수천종의 신약 작용점에 대해 보유 라이브러리를 보다 신속하고 효율적으로 스크리닝하기 위해서는 QC기능, 중복된 데이터에 대한 오류 검사, 상대적 활성(% Activity)의 계산 및 IC_{50} , K_i , K_m 와 같은 생화학적 수치를 산출하기 위한 커브-피팅(curve-fitting) 도구를 제공해야 한다. 이를 위해서는 한번의 스크리닝을 통해 많은 데이터를 얻을 수 있는 HTS가 필요한 것이다. 이 신기술의 기본 개념은 전통적인 방식에서 벗어나 실험실 자동화를 통하여 무작위의 합성 화합물을

대량으로, 신속하게 효능을 평가하는 것으로, 신물질 합성 자동화(CCL), 분자설계 및 체계적 정보 관리와 접목되어 신약개발 후보 물질 도출을 위한 소요 시간을 최소한으로 축소시킬 수 있다.

하루에 1만종 이상의 화합물에 대한 스크리닝이 이루어지는 HTS 기술을 위해서는 여러 가지 전제요건이 필요한데 이를 요약하면 다음과 같다.

① 신속성: 신속한 스크리닝은 하루에 스크리닝할 수 있는 화합물의 수를 증가시킴으로써 결과적으로 단시간에 스크리닝 과정을 종료시키고 이로 인해 경비를 절감할 수 있게 된다.

② 스크리닝 경비: 스크리닝에 이용되는 시약은 전체 스크리닝 과정에서 소요되는 경비 중 매우 큰 부분을 차지함으로 좀 더 경제적인 스크리닝 방법을 고안해야 한다.

③ 소형화: 소형화는 시약 경비를 절감시킬 수 있는 가장 좋은 방법일 뿐만 아니라 스크리닝 소요시간을 단축할 수 있는 방법이다. 그리고 실험실의 공간을 줄일 수 있다.

④ 자동화: 자동화는 스크리닝의 속도를 높일 뿐만 아니라 결과의 재현성도 제고시킬 수 있다. 특히 384-웰이나 1536-웰 마이크로플레이트를 이용한 스크리닝 과정에서 실험자의 오류를 줄이기 위해서는 자동화가 필요하다.

⑤ 스크리닝 감도: 검출방법의 감도는 사용될 샘플의 양과 직접적으로 관계된다. 감도가 낮은 샘플을 스크리닝하기 위해서는 더 많은 시간이 요구되므로 검출 감도가 높아야 한다.

⑥ 비방사능 방법: 현재까지 HTS 방법 중 50% 가량이 방사능 물질을 사용한다. 그러나 방사능 물질은 특별한 관리가 요구되는 폐기물을 발생시키며 시간적, 공간적, 비용적인 면에서 비경제적이다.

⑦ 단순화: 여과, 분리, 세척, 소멸, 고체상태를 요구하는 방법은 추가적인 경비와 공정을 필요로 하기 때문에 스크리닝 과정은 액체상태에서 최대한 단순화되어야 한다.

제약회사들은 그동안 화합물 화학적 접근법과 기존의 HTS 기술에 막대한 투자를 해왔으며, 결과적으로 신약후보물질의 수가 급격히 증가하였고, 이렇게 발굴된 후보물질은 1차 스크리닝 과정(표적 발굴 및 검증, 후보물질 발굴)보다 수율이 낮은 2차 스크리닝 과정(후보물질 최적화)을 거쳐야 한다. 1차와 2차 스크리닝 과정의 효율 차이는 신약개발 과정에서 심각한 병목 현상을 초래하게 된다. 따라서 경제적인 비용 지출을 통해 2차 스크리닝에서 발생시키는 데이터의 품질을 일정 수준 이상으로 유지하면서도 효율을 높여서 1차 스크리닝 과정과의 조화를 맞추는 것이 신약개발 과정에서 주요한 도전 과제가 되었다.

하이컨텐츠 스크리닝(HCS)은 "살아있는 세포 내의 다양한 표적을 시간적, 공간적으로 분해능이 높은 고감도 형광 영상을 기반으로 해서 복잡적이고 기능적으로 스크리닝하는 기술"로 정의할 수 있다. HCS의 근간이 되는 기술은 세포를 기반으로 하는 분석법, 시간 및 공간적으로 고분해능을 지니는 형광측정을 통한 실시간 생체 세포 이미징, 고속 및 하이컨텐츠 자동화 분석법 등의 세부기술로 이루어지며, 이

러한 HCS 분석 장비로는 대표적으로 도 1의 Perik-Elmer사의 Opera 시스템을 들 수 있다.

상기 Opera라는 장비로 얻을 수 있는 전형적인 세포분석 데이터는 도 2에 나타난 바와 같다. 우선 한 필드(field) 안에서 수십 개의 군집된 세포군을 이미지로 얻고, 그 중에서 세포핵, 세포벽 등의 부분을 구분해낸다. 그 과정에서 일부분의 세포들은 프로그램상의 이미지에서 제거하여 유의한 세포이미지만을 남겨 둔 후 최종적으로 도 2에 나타난 바와 같이 2 컬러 이미지를 얻게 된다.

그러나, 지금까지 하이컨텐츠 스크리닝 방법은 형광 분석을 기반으로 하였는데, 상기 형광 분석에 사용되는 형광 표지물질들은 시간이 지나면서 형광 세기가 약해지며(photobleaching), 활성을 시키는 빛의 파장이 매우 좁고 발광되는 빛의 파장이 매우 넓어 서로 다른 형광 물질 간에 간섭이 있는 단점을 가지고 있다. 또한, 사용할 수 있는 형광물질의 수가 극히 제한되어 있다.

따라서, 효과적인 고속 약물 스크리닝을 위하여, 물질 간에 간섭이 없고, 스펙트럼의 피크가 샤프(sharp)하여 다중 검출이 가능한 새로운 방법이 요구되고 있다.

한편, 최근에는 라만 분광학이 관심을 받고 있다.

그 중에서도, 표면 증강 라만 산란법(Surface Enhanced Raman Scattering, SERS)는 금, 은 등의 금속 나노구조의 거친(roughened) 표면에 분자가 흡착될 때

라만 산란의 세기가 $10^6 \sim 10^8$ 배 이상 급격히 증가되는 현상을 이용한 분광법이다. 빛을 유형 매질에 통과시키는 경우 어느 정도의 양은 고유 방향에서 벗어나는데, 이러한 현상은 라만 산란으로 알려져 있다. 산란된 광 중 일부가 광의 흡수 및 전자의 높은 에너지 준위로 여기함에 따라 고유의 자극된 광과 진동수가 상이하며, 라만 방출 스펙트럼의 파장은 샘플 내의 광 흡수 분자의 화학 조성 및 구조 특성을 나타내므로, 라만 분광법은 현재 아주 빠른 속도로 발전하고 있는 나노 기술과 결합하여 단 하나의 분자를 직접 측정할 수 있는 고감도의 기술로 발전가능하며, 특히 메디컬 센서로서 긴요하게 쓰일 수 있을 것으로 많은 기대를 받고 있다. 이 표면 증강 라만 분광법(SERS) 효과는 플라스몬 공명의 현상과 관련되며, 여기서 금속 나노입자는 금속 내 전도 전자의 집단 커플링으로 인해 입사 전자기 방사선에 응답하여 뚜렷한 광학적 공명을 나타내므로, 본질적으로 금, 은, 구리 및 다른 특정 금속의 나노입자들은 전자기 방사선의 집중화 효과를 향상시키는 소형 안테나로서 작용할 수 있다. 이러한 입자 부근에 위치한 분자는 라만 분광법 분석에 대해 훨씬 큰 감도를 나타낸다.

따라서, SERS 센서를 이용하여 다양한 질병과 관련된 유전자, 단백질(바이오마커)의 조기 진단을 수행하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 라만 분광법은 다른 분석법(적외선 분광법) 방법과는 달리 여러 가지 장점을 가지고 있다. 적외선 분광법은 분자의 쌍극자 모멘트의 변화가 있는 분자의 경우 강한 신호를 얻을 수 있는 반면, 라만 분광법은 분자의 유도 편극률 변화가 있는 비극성 분자의 경우에도 강한 신호를 얻을 수 있으므로, 거의 모든 유기 분자들이 고유의 라만 시프트

(Raman Shift, cm^{-1})를 가지고 있다. 또한 물 분자에 의한 간섭의 영향을 받지 않으므로, 단백질, 유전자 등의 생체분자(biomolecules)의 검출에 더욱 적합하다. 하지만 낮은 신호 세기로 인하여 오랜 연구 기간에도 불구하고 실용화되는 수준에 이르지 못하였다.

이에, 본 발명자들은 상기 라만 분광학을 이용한 고속 다중 약물 고속 스크리닝 장치를 개발하기 위하여 연구하던 중, 라만 신호 증폭의 효과를 나타낼 뿐만 아니라, 높은 재현성으로 인하여 상용화의 매우 중요한 전제 조건인 신호의 재현성과 정량성 문제를 극복할 수 있는, 코어와 셸을 포함하고 코어와 셸 사이에 나노갭이 형성되어 있는 나노입자를 제조하고, 상기 나노입자의 셸의 표면에 검출하고자 하는 분석물을 인식할 수 있는 바이오분자를 기능화하여 하나 이상의 분석물을 포함하는 샘플에 노출시킨 후, 레이저 여기(excitation) 및 다중 라만 필터와 검출기를 이용하여 단수 또는 복수의 라만 피크를 얻어 그에 상응하는 컬러코딩을 수행함으로써 고속으로 다중 스크리닝할 수 있는 장치를 개발하여, 본 발명을 완성하였다.

【발명의 내용】

【해결하고자 하는 과제】

본 발명의 목적은 단수 또는 복수의 다중 컬러 코딩이 가능한, 라만 분광학을 이용한 다중 약물 고속 스크리닝 장치를 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 상기 다중 약물 고속 스크리닝 장치를 이용한 다중 약물 고속 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

【과제의 해결 수단】

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

광원을 현미경으로 유도하는 렌즈(lens), 미러(mirror), 핀홀(pinhole)로 구성된 여기 모듈;

시료의 위치변화를 제어하는 모션 컨트롤러(motion controller), 상기 광원으로부터 시료를 여기하고 상기 시료로부터 산란된 빛에서 라만 파장의 빛을 필터링하는 단수 또는 복수의 라만 필터, 및 상기 라만 필터를 통과한 빛을 순차적으로 받아서 검출하는 검출기를 포함하는, 시료의 상을 획득하는 현미경 모듈; 및

상기 모션 컨트롤러에 의해 위치한 포인트에서 획득된 단수 또는 복수의 상을 컬러 코딩하여 세포 또는 생체 조직의 영상으로 변환시키고 변환된 영상을 표시하는 영상처리 모듈을 포함하는 표면증강라만산란을 이용한 다중 약물 고속 스크리닝 장치를 제공한다. 이때, 상기 다중 약물 고속 스크리닝 장치는 코어-갭-셸 나노입자가 저장된 저장 챔버를 더 포함할 수 있다.

또한 본 발명은,

코어-갭-셸 나노입자를 검출하고자 하는 시료에 첨가하는 단계(단계 1);

레이저빔을 시료에 조사하여 상기 시료에 결합된 코어-갭-셸 나노입자로부터

얻어지는 특정 라만 산란광을 단수 또는 복수의 라만 필터를 통해 검출기로 검출하여 단수 또는 복수의 시료의 상을 획득하는 단계(단계 2); 및

상기 단계 2에서 얻은 단수 또는 복수의 시료의 상을 컴퓨터 프로그램으로 컬러 코딩하여 세포 또는 생체 조직의 영상으로 변환시키고 변환된 영상을 표시하는 단계(단계 3);를 포함하는 표면증강라만산란을 이용한 다중 약물 고속 스크리닝 방법을 제공한다.

【발명의 효과】

본 발명에 따른 스크리닝 장치 및 방법은 자기발광을 측정하는 것이 아니라, 코어-셍-웰 나노입자로부터 발생하는 라만 신호를 측정하므로 물질 간에 간섭이 없고, 표면증강라만산란 효과가 극대화된 코어-셍-웰 나노입자를 사용하므로 라만 신호를 약 10^{12} 배로 증폭시키고 높은 재현성을 나타내며, 검출기로서 스캐너가 아닌 CCD 카메라를 사용함으로써 시료를 담은 웰 플레이트의 각각의 웰을 개별적으로 한번에 촬영하고, 모션 컨트롤러의 제어를 통하여 다른 웰로 이동하여 다시 바로 촬영하므로 고속으로 다중 약물을 스크리닝할 수 있고, 다중 컬러 코딩이 가능하므로, 각종 약물 스크리닝에 유용하게 사용될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 종래 형광 기반의 세포분석용 약물검색기를 나타내는 사진이다.

도 2는 종래 형광 기반의 세포분석용 약물검색기에서 얻은 2 컬러의 세포 이

미지이다.

도 3은 본 발명에 의한 라만 분광법 기반 고속 다중 약물 고속 스크리닝 장치의 개념도이다.

도 4는 본 발명에 의한 라만 분광법 기반 고속 다중 약물 고속 스크리닝 방법에 사용되는 일례의 코어-셍-셍 나노입자를 나타낸다.

도 5는 제조예 1-3에서 제조한 나노입자를 이용하여 본 발명의 장치로 표면 증강라만산란 스펙트럼을 측정한 그래프이다.

도 6은 제조예 1-3에서 제조한 나노입자에서 산란되는 라만광을 선택적으로 투과시키는 협대역필터(narrow band pass filter)의 파장 영역을 나타낸 그래프이다.

도 7은 제조예 1-3에서 제조한 나노입자에서 산란되는 라만광을 선택적으로 투과시키는 각각의 협대역필터를 사용할 경우 선택적으로 이미징됨을 나타내는 사진이다.

도 8은 제조예 1-3에서 제조한 나노입자에서 산란되는 라만광을 선택적으로 투과시키는 각각의 협대역필터를 사용하여 얻은 각각의 이미지를 합쳐서 나타낸 사진이다.

도 9는 제조예 4-6에서 제조한 PEG 코팅된 나노입자의 이미지이다.

도 10은 세포에 나노입자를 첨가하지 않은 대조군(a)과 제조예 5에서 제조한 PEG 코팅된 나노입자를 첨가한 실험군(b)을 본 발명의 장치로 측정한 이미지로, 2가지 협대역필터("Filter 1" 및 "Filter 2")를 이용하여 각각 측정한 이미지이다.

도 11은 제조예 4에서 제조한 PEG 코팅된 나노입자를 첨가한 실험군에서 3부분을 지정하여 그 영역에서 발견되는 세포들을 본 발명의 장치로 측정된 이미지로, 2가지 협대역필터("Filter 1" 및 "Filter 2")를 이용하여 각각 측정된 이미지이다.

도 12는 제조예 5에서 제조한 PEG 코팅된 나노입자를 첨가한 실험군에서 3부분을 지정하여 그 영역에서 발견되는 세포들을 본 발명의 장치로 측정된 이미지로, 2가지 협대역필터("Filter 1" 및 "Filter 2")를 이용하여 각각 측정된 이미지이다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은

광원을 현미경으로 유도하는 렌즈(lens), 미러(mirror), 핀홀(pinhole)로 구성된 여기 모듈;

시료의 위치변화를 제어하는 모션 컨트롤러(motion controller), 상기 광원으로부터 시료를 여기하고 상기 시료로부터 산란된 빛에서 라만 파장의 빛을 필터링하는 단수 또는 복수의 라만 필터, 및 상기 라만 필터를 통과한 빛을 순차적으로 받아서 검출하는 검출기를 포함하는, 시료의 상을 획득하는 현미경 모듈; 및

상기 모션 컨트롤러에 의해 위치한 포인트에서 획득된 단수 또는 복수의 상

을 컬러 코딩하여 세포 또는 생체 조직의 영상으로 변환시키고 변환된 영상을 표시하는 영상처리 모듈을 포함하는 표면증강라만산란을 이용한 다중 약물 고속 스크리닝 장치를 제공한다.

이하, 첨부된 도 3을 참조하여 본 발명의 실시예를 상세히 설명한다.

우선, 도면들 중 동일한 구성요소 또는 부품들은 가능한 한 동일한 참조부호를 나타내고 있음에 유의해야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지기능 혹은 구성에 대한 구체적인 설명은 본 발명의 요지를 모호하게 하지 않게 위해 생략한다.

도 3은 본 발명에 따른 라만 분광법 기반 고속 다중 약물 고속 스크리닝 장치의 개념도이다.

본 발명에 따른 고속 다중 약물 고속 스크리닝 장치는 여기 모듈, 현미경 모듈 및 영상처리 모듈로 구분될 수 있다. 이와 같은 역할 모듈의 구분은 설명을 위한 구분일 뿐이며 상호 배타적이고 독립적인 것이 아닐 수 있으며, 상호 일정 영역에서 겹치거나 하나의 영역에서 둘 이상의 역할 모듈이 중복될 수 있음을 밝힌다.

여기 모듈

본 발명에 따른 장치에 있어서, 여기 모듈은 광원(LS)(10)에서 발생하는 레이저빔을 현미경 내부로 유도하는 역할을 한다.

이때, 상기 광원(LS)(10)은 근적외선(NIR) 레이저 또는 가시광선 레이저일

수 있다. 상기 가시 광선은 400 내지 700 nm의 파장을 가지는 것일 수 있는데 일 실시예로 상기 가시광선은 514.5 nm의 파장인 것일 수 있다. 바이오 분야에서 가시광선의 광원을 사용한 경우 자기 형광 autofluorescence이 발생하고, 자기 형광은 라만 신호의 감소를 가져오기 때문에 주로 근적외선 광원을 사용한 라만 이미지 실험이 이루어져 왔다. 그런데 라만 신호는 광원의 파장의 4제곱에 반비례하므로 가시광선의 광원을 이용할 경우에 라만 신호의 세기를 증가시킬 수 있다. 그래서 자기형광을 감소시킬 수만 있다면 근적외선보다 가시광선의 경우에 광학장치들이 더 발달 되어 있기 때문에 가시광선의 광원을 사용하는 경우가 광학계를 최적화하는데 유리하다.

광원(LS)(10)에서 발생하는 레이저빔은 스페이셜 필터(20)를 통과하여 빔 직경 (beam diameter)가 증가하고 다수의 렌즈, 미러와 핀홀을 통해 약 10mm의 빔 직경으로 집광되어 현미경 모듈에 진입할 수 있다.

현미경 모듈

본 발명에 따른 장치에 있어서, 현미경 모듈은 시료의 위치변화를 제어하는 모션 컨트롤러(motion controller)(50), 상기 레이저빔을 사용하여 시료를 여기하고 상기 시료로부터 산란된 빛에서 라만 파장의 빛을 필터링하는 단수 또는 복수의 라만 필터(40), 및 상기 라만 필터(40)를 통과한 빛을 순차적으로 받는 검출기(111)를 포함한다.

현미경에 진입한 레이저빔은 광분리장치(21)에 의해 반사되어 대물 렌즈(MO;

microscope objective)(30)로 진행한다. 이때, 상기 광분리장치(21)로는 광분리 거울(beamsplitter), 이파장 거울(dichroic mirror), 탈부착 가능한 거울(detachable mirror) 등을 사용할 수 있다.

상기 라만 파장의 빛을 필터링하는 단수 또는 복수의 라만 필터(40)의 수는 1 이상 20 이하이고, 5 이상 20 이하인 것이 바람직하다.

또한, 상기 라만 필터로는 대역필터(Band pass filter)를 사용할 수 있고, 협대역필터(Narrow band pass filter)를 사용하는 것이 바람직하나, 이에 제한하지 않는다.

상기 검출기(111)는 스캔 방식 또는 무스캔 방식으로 작동하는 검출기이면 제한없이 사용될 수 있으며, 예를 들면, 스캔 방식 검출기로는 PMT(Photomultiplier tube)류 검출기 또는 APD(Avalanche photodiode)류 검출기를 사용할 수 있고, 무스캔 방식 검출기로는 CCD(Charge-coupled device) 카메라를 사용할 수 있다.

시료는 분석물을 포함하는 세포일 수 있으며, 상기 분석물은 예를 들면, 아미노산, 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, 글리코프로테인, 리포프로테인, 뉴클레오시드, 뉴클레오티드, 올리고뉴클레오타이드, 핵산, 당, 탄수화물, 올리고사카라이드, 폴리사카라이드, 지방산, 지질, 호르몬, 대사산물, 사이토카인, 케모카인, 수용체, 신경전달물질, 항원, 알레르겐, 항체, 기질, 대사산물, 보조인자, 억제제, 약물, 약학물, 영양물, 프리온, 독소, 독물, 폭발물, 살충제, 화학무기제, 생체유해성 제제, 방사선동위원소, 비타민, 헤테로사이클릭 방향족 화합물, 발암물질, 돌

연변이유발요인, 마취제, 암페타민, 바르비투레이트, 환각제, 폐기물 또는 오염물 일 수 있다. 또한, 분석물이 핵산일 경우 상기 핵산은 유전자, 바이러스 RNA 및 DNA, 박테리아 DNA, 곰팡이 DNA, 포유동물 DNA, cDNA, mRNA, RNA 및 DNA 단편, 올리고뉴클레오타이드, 합성 올리고뉴클레오타이드, 개질된 올리고뉴클레오타이드, 단일 가닥 및 이중 가닥 핵산, 자연적 및 합성핵산을 들 수 있다. 상기 시료는 장치 외부에서 라만 신호를 증폭하기 위해 도 4에 나타난 코어-갭-셸 나노입자와 결합되거나, 장치 내에서 저장 챔버(미도시)에 저장된 코어-갭-셸 나노입자가 시료에 노출됨으로써 결합될 수 있다.

상기 코어-갭-셸 나노입자는 셸의 표면에 검출하고자 하는 분석물을 인식할 수 있는 바이오분자가 기능화되어 있어, 시료에 노출시키게 되면 시료 중 해당 분석물과 선택적으로 결합하여 분석물의 형태를 이미징하게 된다.

이때, 상기 나노입자에 기능화하는 바이오 분자의 예로는, 항체, 항체 단편, 유전조작 항체, 단일 쇄항체, 수용체 단백질, 결합 단백질, 효소, 억제제 단백질, 렉틴, 세포 유착 단백질, 올리고뉴클레오타이드, 폴리뉴클레오타이드, 핵산 또는 압타머를 들 수 있다. 기능화는 나노입자 표면에 바이오 분자를 정전기적 인력으로 부착시키거나, 직접 결합시키거나 또는 링커를 통하여 작용기화 할 수 있으며, 이러한 기능화 방법은 특별히 제한되지 않는다.

본 발명에 있어서, 상기 코어-갭-셸 나노입자는 코어(core) 및 상기 코어를 둘러싼 셸(shell)을 포함하고, 상기 코어와 셸 사이에 나노갭이 형성되며, 상기 코

어와 셀은 나노브릿지로 연결되거나 또는 연결되어 있지 않은 나노입자이되, 상기 나노겍에는 광학 활성분자가 포함된다.

이때, 상기 광학 활성 분자는 C, H, O, N, S 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 원자로 구성된 분자라면 제한되지 않으며, 또한 금속이온, 금속이온의 킬레이트, 또는 금속 나노 입자를 사용할 수도 있다. 구체적으로, 본 발명에서 사용되는 신호물질은 형광유기분자, 비형광유기분자, 무기나노입자, 라만활성분자를 포괄하는 광의의 개념으로, 발색이 가능한 표지물질을 제한없이 포함할 수 있으며, 바람직하게는 라만 활성분자이다. 본 발명에서 사용되는 용어 "라만 활성분자"는, 본 발명의 나노입자가 하나 이상의 분석물에 부착되었을 때 라만 검출 장치에 의한 분석물의 검출 및 측정을 용이하게 하는 물질을 의미한다. 라만 분광법에 사용될 수 있는 라만 활성분자는 유기 원자, 분자 또는 무기 원자, 분자들을 포함한다. 구체적으로, 라만 활성분자의 예로서, FAM, Dabcyl, TAMRA, TRITC(테트라메틸 로다민-5-아이소티오시아네이트), MGITC(말라키트 그린 아이소티오시아네이트), XRITC(X-로다민-5-아이소티오시아네이트), DTDC(3,3-디에틸티아디카보시아닌 아이오다이드), TRIT(테트라메틸 로다민아이소티올), NBD(7-니트로벤즈-2-1,3-다이아졸), 프탈산, 테레프탈산, 아이소프탈산, 파라-아미노벤조산, 에리트로신, 비오틴, 다이곡시게닌(digoxigenin), 5-카복시-4',5'-다이클로로-2',7'-다이에톡시, 플루오레세인, 5-카복시-2',4',5',7'-테트라클로로플루오레세인, 5-카복시플루오레세인, 5-카복시로다민, 6-카복시로다민, 6-카복시테트라메틸 아미노 프탈로시아닌, 아조메틴, 시아닌(Cy3, Cy3.5, Cy5), 크산틴, 석신일플루오레세인, 아미노아크리

딘, 양자점, 탄소동소체, 시아나이드, 티올, 클로린, 브롬, 메틸, 인 또는 황 등이 있으나 이에 제한되지 않고, 사용된 라만 활성분자가 뚜렷한 라만 스펙트럼을 나타내어야 하고 서로 다른 유형의 분석물과 특히 결합하거나 연관될 수 있어야 한다. 바람직하게는 라만 분석 시 사용하는 여기 레이저 파장과 공명하여 더욱 높은 라만 신호 세기를 나타내는 분자들이다.

상기 광학 활성 분자는 나노 갭에 포함될 수 있는데, 상기 나노입자에 기능화하는 바이오 분자에 공유결합 또는 정전기적 인력으로 개질되어 내부-나노갭에 위치하거나, 또는 바이오 분자와는 별개로 코어 입자의 표면에 광학 활성 분자를 공유결합, 또는 정전기적 인력으로 결합시킬 수 있다. 바이오 분자에 광학 활성 분자를 개질시킬 경우, 광학 활성 분자의 위치를 조절할 수 있다는 특징이 있다. 즉, 코어에 개질되는 바이오 분자 말단에 가까운 위치에 광학 활성 분자를 개질할 경우, 나노입자에서 광학 활성 분자는 코어에 가깝게 위치할 수 있으며, 이를 조절하여 광학 활성 분자를 나노갭에 위치시키는 것이 가능하다. 예컨대, 광학 활성 분자의 위치에 따라 라만신호가 달라질 수 있으며, 내부-갭에 위치할 경우, 라만 신호가 가장 강하게 검출될 수 있고, 높은 균일성과 재현성 있는 신호를 발생시킬 수 있다.

여기서, 상기 코어-갭-셸 나노입자의 나노갭에 포함되는 광학 활성분자의 종류에 따라서 특정 라만 피크가 발생하게 되고, 상기 특정 라만 피크는 이에 상응하

는 라만 필터를 통해 CCD 카메라와 같은 검출기로 검출하여 시료(세포)의 상을 획득하게 되고, 상기 시료(세포)의 상은 컴퓨터 프로그램을 통해 컬러 코딩되어 시료(세포)의 영상으로 변환되어 영상으로 표시된다.

본 발명에서 사용되는 용어 "코어(core)"는, 표면 플라즈몬 공명을 나타내는 금속으로 이루어지고, 지름이 1 내지 900 nm인 구형 또는 구형과 유사한 형태의 입자를 의미한다. 표면 플라즈몬 공명을 나타내는 금속으로 금, 은 또는 구리를 사용할 수 있다.

본 발명에서 사용되는 용어 "셸"은, 상기 코어를 둘러싸고 있는 표면 플라즈몬 공명을 나타내는 금속으로 이루어진 코팅층을 의미한다. 상기 셸의 두께는 0.1 내지 900 nm이며, 바람직하게는 1 nm 내지 100 nm이다. 상기 셸과 코어 사이에는 나노갭이 형성되어 있기 때문에, 코어와 셸 사이에는 공간이 형성되어 있는 특징이 있다. 표면 플라즈몬 공명을 나타내는 금속으로 금, 은 또는 구리를 사용할 수 있다.

본 발명에서 사용되는 용어 "나노갭"은, 상기 코어와 셸 사이에 형성되어 있는 공간을 의미한다. 나노갭의 두께는 0.01 nm 내지 100 nm인 것이 바람직하다. 상기 나노갭 공간에 의하여 코어와 셸이 구분될 수 있으며, 상기 나노갭에 의하여 코어와 셸이 완전히 접촉되지 않을 수도 있으며, 일부 영역에서는 코어와 셸이 나노브릿지에 의하여 접촉되어 있을 수 있다. 따라서, 본 발명에서 사용되는 "나노갭"이 반드시 코어와 셸 사이를 완전하게 분리하는 공간을 의미하는 것은 아니다.

본 발명에서 사용되는 용어 “나노브릿지”는, 직경이 0.5 내지 20 nm인 상기 코어와 셸을 연결하는 나노갭에 존재하는 브릿지를 의미한다. 본 발명의 나노입자는 코어와 셸 사이에 “나노브릿지된 나노갭” 또는 “나노브릿지가 없는 나노갭”을 포함할 수 있다.

본 발명에서 사용되는 용어 “광학 활성 분자”는 여기 광원에 의해 라만 산란 광을 내는 분자를 의미한다. 상기 광학 활성 분자는 표면 플라즈몬 공명을 갖는 코어 및 셸 사이의 나노갭에 위치하여 표면증강라만산란 효과가 극대화된다.

따라서, 바람직한 양태로서 상기 코어-갭-셸 나노입자는 i) 금 코어 및 은 셸로 이루어지고 금 코어와 은 셸 사이에 나노갭이 형성되어 있는 나노입자, ii) 은 코어 및 금 셸로 이루어지고 은 코어와 금 셸 사이에 나노갭이 형성되어 있는 나노입자, iii) 금 코어 및 금 셸로 이루어지고 금 코어와 금 셸 사이에 나노갭이 형성되어 있는 나노입자, iv) 은 코어 및 은 셸로 이루어지고 은 코어와 은 셸 사이에 나노갭이 형성되어 있는 나노입자로 구성되는 군으로부터 선택되는 나노입자일 수 있으며, 가장 바람직하게, 상기 코어-갭-셸 나노입자는 금 코어 및 금 셸로 이루어지고 금 코어와 금 셸 사이에 나노갭이 형성되어 있는 나노입자일 수 있다. 또한 코어를 이루는 입자의 모양에 제한을 받지 않는다.

특히, 상기 코어와 셸이 일부 영역에서 접촉되어 있는 경우에는, 나노브릿지를 통하여 접촉된다. 즉, 코어 상에 셸이 형성될 경우 코어 표면 전체로부터 셸 사이에 나노갭이 형성되나, 일부 영역에서 셸을 형성하는 물질 일부가 내부로 나노브릿지를 형성하여 코어와 접촉되는 구조를 가질 수 있다. 이는 도 4에 나타난 바와

같이, 셸이 형성되는 과정에서 일부가 코어 쪽으로 형성될 수 있으며, 이에 의하여 나노브릿지가 형성될 수 있다. 나노브릿지의 개수는 하나 이상부터 나노갭을 형성할 수 있는 한도 내에서 제한을 받지 않는다. 직경이 0.5 nm 내지 20 nm인 것이 바람직하다. 나노브릿지는 코어와 셸의 구조를 더욱 안정적으로 유지할 수 있도록 하며, SERS의 신호를 더욱 증가시키는 한 요소가 될 수 있다.

상기 나노갭에 의하여 코어와 셸 사이에 공간이 형성되어 있고, 이러한 나노갭에 위치하는 광학 활성 분자는 표면 플라즈몬 공명을 갖는 상기 코어 및 셸에 의하여 표면증강라만산란(surface-enhanced Raman scattering, SERS) 효과가 극대화되어 라만 신호가 증폭된다. 특히, 나노갭의 재현성이 매우 높을 뿐만 아니라, 신호의 정량성, 결과의 재현성, 합성의 편이성 및 간편성, 비용, 프로브의 안정성 등이 획기적으로 개선될 수 있다.

시료로부터 방출되는 빛은 광분리장치(21)를 통과하고 라만 필터(40)를 통과함으로써 필터링되어 특정 라만 파장만이 검출기(111)를 통해 검출된다.

상기 라만 필터(40)는 특정 라만 파장만이 통과될 수 있는 단수 또는 복수의 라만 필터를, 바람직하게는 1 이상 20 이하, 더욱 바람직하게는 5 이상 20 이하로 구비할 수 있다. 시료로부터 방출되는 빛을 서로 다른 라만 파장의 필터에 순차적으로 통과시키고, 통과된 특정 라만 파장을 검출기를 통해 검출함으로써 1 이상 20 개 이하의 다중 상을 얻을 수 있다.

상술한 바와 같이, 상기 라만 필터로는 대역필터를 사용할 수 있고, 협대역 필터를 사용하는 것이 바람직하다.

상기 검출기(111), 예를 들면 무스캔 방식의 CCD 카메라는 앞에 줌렌즈를 설치하여 배율의 조절을 할 수 있다. 이는 광학 이미지를 구현하는 광학 현미경의 기능을 강화하여 광학 이미지를 더욱 자세하게 관찰할 수 있게 한다.

상기 모션 컨트롤러(Motion controller)(50)는 상기 시료의 포인트 위치를 x축 또는 y축으로 변환시키는 역할을 한다. 웰 상에서 시료의 한 포인트(웰)에서 라만 필터 개수에 따라 다수의 라만 영상이 얻어지면 모션 컨트롤러(50)의 제어를 통하여 시료의 다른 포인트(웰)로 이동하여 이 포인트의 라만 영상을 측정한다. 본 발명에 따른 장치에서 검출기로서 예를 들면, 무스캔 방식의 CCD(Charge-coupled device) 카메라를 사용할 경우, 시료를 담은 웰 플레이트의 각각의 웰을 개별적으로 한번에 촬영하고, 모션 컨트롤러의 제어를 통하여 다른 웰로 이동하여 다시 촬영하므로, 고속 스크리닝이 가능하다.

추가로, 상기 현미경 모듈은 시료가 위치하는 외부 챔버 내부의 분위기를 유지시킬 수 있는 분위기 유지부(미도시)를 설치할 수 있는데, 상기 분위기 유지부는 상기 챔버 내측의 온도, 습도, pH 등을 제어할 수 있다.

영상처리 모듈

상기 영상처리 모듈은 모션 컨트롤러에 의해 위치한 포인트에서 획득된 단수 또는 복수의 상을 컬러 코딩하여 세포 또는 생체 조직의 영상으로 변환시키고 변환된 영상을 표시하는 역할을 한다.

상기 영상처리 모듈은 컴퓨터인 것이 바람직하다. 상기 CCD 카메라에서 얻은

데이터는 프로세서에 의해 처리되고 데이터는 주 기억장치에 저장될 수 있다. 표준 분석물에 대한 방출 프로파일 상의 데이터는 또한 주기억 장치 또는 ROM에 저장될 수 있다. 프로세서는 라만 활성 기관에서의 분석물로부터의 방출 스펙트럼을 비교하여 샘플의 분석물 유형을 확인할 수 있다. 프로세서는 검출 장치로부터의 데이터를 분석하여 여러 분석물의 정체 및/또는 농도를 측정할 수 있다. 서로 다르게 구비된 컴퓨터는 특정 이행에 사용될 수 있다. 따라서, 시스템의 구조는 본 발명의 상이한 실시양태에서 다를 수 있다. 데이터 수집작업 이후, 전형적으로 데이터는 데이터 분석 작업으로 보내질 것이다. 분석 작업을 용이하게 하기 위해, 검출 장치에 의해 수득된 데이터는 상기한 바와 같이 디지털 컴퓨터를 사용하여 전형적으로 분석할 것이다. 전형적으로, 컴퓨터는 검출 장치로부터의 데이터 수용 및 저장 뿐만 아니라 수집된 데이터의 분석 및 보고를 위해 적절히 프로그래밍될 수 있다.

하나 이상의 라만 필터를 통해 분석된 하나 이상의 라만 피크는 소프트웨어를 통해 각각의 피크에 서로다른 색깔의 이미지를 입력하면 컬러 코딩되어 해당하는 색을 가진 이미지를 통해 세포 또는 생체 조직의 영상으로 변환시키고 변환된 영상을 모니터를 통해 표시하게 된다.

따라서, 본 발명에 따른 장치는 시료에 존재하는 하나 이상의 분석물질(특정 세포)에 선택적으로 결합되는 하나 이상의 코어-셍-셍 나노입자를 첨가함으로써, 고해상도의 표면증강라만산란 스펙트럼을 얻을 수 있고, 특히 무스켄 방식의 CCD(Charge-coupled device) 카메라를 사용하여 시료를 담은 셍 플레이트의 각각의 셍을 개별적으로 한번에 촬영하고, 모션 컨트롤러의 제어를 통하여 다른 셍로 이동

하여 다시 촬영함으로써, 다중 약물을 고속으로 스크리닝할 수 있다.

이상과 같이 본 발명에 따른 장치를 예시한 도면을 참조로 하여 설명하였으나, 본 명세서에 개시된 도면에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 기술사상 범위내에서 당업자에 의해 다양한 변형이 이루어질 수 있음은 물론이다.

또한 본 발명은,

상기 코어-갭-셸 나노입자를 검출하고자 하는 시료에 첨가하는 단계(단계 1);

레이저빔을 시료에 조사하여 상기 시료에 결합된 코어-갭-셸 나노입자로부터 얻어지는 특정 라만 산란광을 단수 또는 복수의 라만 필터를 통해 검출기로 검출하여 단수 또는 복수의 시료의 상을 획득하는 단계(단계 2); 및

상기 단계 2에서 얻은 단수 또는 복수의 시료의 상을 컴퓨터 프로그램으로 컬러 코딩하여 세포 또는 생체 조직의 영상으로 변환시키고 변환된 영상을 표시하는 단계(단계 3);를 포함하는 표면증강라만산란을 이용한 다중 약물 고속 스크리닝 방법을 제공한다.

먼저, 단계 1은 코어-갭-셸 나노입자가 포함된 시약을 검출하고자 하는 세포를 포함하는 시료에 첨가하는 단계이다.

상기 단계 1에서, 상기 코어-갭-셸 나노입자는 셸의 표면에 검출하고자 하는 분석물(세포)을 인식할 수 있는 바이오분자가 기능화되어 있어, 시료에 노출시키게

되면 시료 중 해당 분석물과 결합함으로써, 광학 활성 분자가 포함되어 있는 나노입자의 라만 신호로 그 형태를 이미징할 수 있게 된다.

이때, 상기 코어-갭-셸 나노입자는 상술한 바와 같이, i) 금 코어 및 은 셸로 이루어지고 금 코어와 은 셸 사이에 나노갭이 형성되어 있는 나노입자, ii) 은 코어 및 금 셸로 이루어지고 은 코어와 금 셸 사이에 나노갭이 형성되어 있는 나노입자, iii) 금 코어 및 금 셸로 이루어지고 금 코어와 금 셸 사이에 나노갭이 형성되어 있는 나노입자, iv) 은 코어 및 은 셸로 이루어지고 은 코어와 은 셸 사이에 나노갭이 형성되어 있는 나노입자로 구성되는 군으로부터 선택되는 나노입자일 수 있으며, 가장 바람직하게, 상기 코어-갭-셸 나노입자는 금 코어 및 금 셸로 이루어지고 금 코어와 금 셸 사이에 나노갭이 형성되어 있는 나노입자일 수 있다.

상기 단계 1의 상기 코어-갭-셸 나노입자의 분석물 상에 노출은 본 발명에 따른 스크리닝 장치 외부에서 수행되거나, 본 발명에 따른 스크리닝 장치 내부에서 수행될 수 있다.

다음으로, 단계 2는 레이저빔을 시료에 조사하여 상기 시료로부터 얻어지는 특정 라만 산란광을 단수 또는 복수의 라만 필터를 통해 검출기로, 예를 들면 CCD 카메라로 검출하여 단수 또는 복수의 시료의 상을 획득하는 단계이다.

본 발명에 따른 스크리닝 장치는 특정 라만 파장만이 통과될 수 있는 단수 또는 복수의 라만 필터, 바람직하게는 1 이상 20 이하, 더욱 바람직하게는 5 이상 20 이하로 구비할 수 있으므로, 시료로부터 방출되는 빛을 서로 다른 라만 파장의

필터에 순차적으로 통과시키고, 통과된 특정 라만 파장을 검출기를 통해 검출함으로써 1 이상 20 이하의 다중 상을 얻을 수 있다.

상술한 바와 같이, 상기 라만 필터로는 대역필터를 사용할 수 있고, 협대역 필터를 사용하는 것이 바람직하다.

상기 검출기, 예를 들면 CCD 카메라는 앞에 줌렌즈를 설치하여 배율의 조절을 할 수 있다. 이는 광학 이미지를 더욱 자세하게 관찰할 수 있게 한다.

다음으로, 단계 3은 상기 단계 2에서 얻은 단수 또는 복수의 시료의 상을 컴퓨터 프로그램으로 컬러 코딩하여 세포 또는 생체 조직의 영상으로 변환시키고 변환된 영상을 표시하는 단계이다.

상기 단계 3에서는 단계 2에서 얻은 단수 또는 복수의 시료의 상을 라만 피크에 따라 컴퓨터를 통하여 특정 색깔로 컬러 코딩함으로써 1 컬러 이상 20 컬러 이하의 다중도를 갖는 영상을 표시할 수 있다.

본 발명에 따른 스크리닝 장치 및 방법은 자기발광을 측정하는 것이 아니라, 코어-셍-셍 나노입자로부터 발생하는 라만 신호를 측정하므로 물질 간에 간섭이 없고, 표면증강라만산란 효과가 극대화된 코어-셍-셍 나노입자를 사용하므로 라만 신호를 약 10^{12} 배로 증폭시키고 높은 재현성을 나타내며, 검출기로서 스캐너가 아닌 CCD 카메라를 사용함으로써 시료를 담은 셍 플레이트의 각각의 셍을 개별적으로 한 번에 촬영하고, 모션 컨트롤러의 제어를 통하여 다른 셍로 이동하여 다시 바로 촬

영하므로 고속으로 다중 약물을 스크리닝할 수 있고, 다중 컬러 코딩이 가능하므로, 각종 약물 스크리닝에 유용하게 사용될 수 있다.

이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<제조예 1-3> 코어-캡-셸 나노입자의 제조

매우 정확한 위치 조절 능력을 가진 라만-염료 개질 플랫폼(Raman-dye modification platform)으로 DNA 스트랜드(strand)를 사용하여, 내부-나노캡을 가진 단일 NNP 나노입자를 하기 방법으로 제조하였다.

전형적인 제조방법으로서, DNA가 개질된 금 나노입자(20 nm 입자; DNA 서열: 제조예 1 [3'-HS-(CH₂)₃-(Dabcyl)-A₁₀-PEG₁₈-AAACTCTTTGCGCAC-5'], 제조예 2 [3'-HS-(CH₂)₃-(Cy3)-A₁₀-PEG₁₈-AAACTCTTTGCGCAC-5'] 및 제조예 3 [3'-HS-(CH₂)₃-(TAMRA)-A₁₀-PEG₁₈-AAACTCTTTGCGCAC-5'])를 'S. J. Hurst, A. K. R. Lytton-Jean, C. A. Mirkin, Anal. Chem. 78, 8313 (2006)'의 문헌에 따라 제조하였다. 상기 DNA가 개질된 금 나노입자의 코어를 둘러싼 셸(Au)을 형성하기 위하여, 상기 DNA가 개질된 금 나노입자를 금 전구체(gold precursor; HAuCl₄), 환원제(NH₂OH-HCl) 및 1% 폴리-N-비닐-2-피롤리돈(poly-N-vinyl-2-pyrrolidone; PVP; MW 40,000)과 포스페이트-버퍼 용액(phosphate-buffered solution; 0.3 M NaCl; 10 mM

PB; pH 7.4)에서 반응시키고, 상온에서 30분간 부드럽게 볼텍싱(vortexing)하였다. 셀의 형성과정에 따른 나노 입자의 형태변화를 확인하기 위하여, 시드(seeds; DNA가 개질된 금 나노입자, 1 nM)의 양을 기준으로 하여, 금 전구체(gold precursor; HAuCl_4), 환원제($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$)의 양을 조절하였다.

구체적으로, DNA가 개질된 금 나노입자 용액($100\ \mu\text{L}$; 0.3M PBS에서 $1\ \text{nM}$ 농도)은, $50\ \mu\text{L}$ 의 1% PVP 용액과 혼합하였다. 상기 용액을 각각 $1.5\ \mu\text{L}$, $5.2\ \mu\text{L}$, $10.3\ \mu\text{L}$ 또는 $30.4\ \mu\text{L}$ 의 하이드록시아민 하이드로클로라이드 용액(hydroxylamine hydrochloride solution; $10\ \text{mM}$)과 혼합시킨 후, 각각 $1.5\ \mu\text{L}$, $5.2\ \mu\text{L}$, $10.3\ \mu\text{L}$ 또는 $30.4\ \mu\text{L}$ 의 클로로아우릭 산 용액(chloroauric acid solution; $5\ \text{mM}$)과 혼합시켰다. 반응물의 양에 따라, 다양한 나노구조가 형성되었다.

<제조예 4-6> PEG 코팅된 코어-셸 나노입자의 제조

상기 제조예 1-3에서 제조한 각각의 나노입자의 셀 표면에 세포 실험에 적합하며 배양액에서 나노입자를 잘 분산시키는 PEG 코팅된 금-은 코어-셸 나노입자를 제조하였다("Dabcyl"(제조예 4), "Cy3"(제조예 5), "TAMRA"(제조예 6); 도 9 참조).

구체적으로, PEG를 코팅하는 방법으로는 금 나노 입자에 일반적으로 사용되고 있는 프로토콜을 도입하여 제작하였습니다. 나노 입자의 셀 표면 코팅에 mPEG-SH(MW ~5 kDa)를 사용하였으며 주로 'W. Peter Wuelfing, Stephen M. Gross, Deon T. Miles, and Royce W. Murray, *J. Am. Chem. Soc.* 120, 12696 (1998)' 의

문헌을 참조하여 제조예 4-6을 제작하였다.

<실험예 1> 표면증강라만산란 스펙트럼 평가

제조예 1-3에서 제조한 나노입자를 이용하여 본 발명의 장치로 표면증강라만산란(SERS) 스펙트럼을 측정하였다. 표면증강라만산란(SERS) 스펙트럼은 자체적으로 제작하여 보유하고 있는 나노-라만 분광기(nano-Raman spectroscopy; Axiovert 200, Zeiss)를 통하여 측정하였다.

먼저, 제조예 1-3에서 제조한 나노입자를 포함하는 각 용액에서 20 μ l 를 커버 글래스(cover slip)에 스핀코팅 하여 스펙트럼 측정용 샘플을 제작하였다. 660 nm의 여기 레이저를 광원으로 사용하여 50 nW에서 1 mW의 여기 레이저 빔을 현미경 대물렌즈(oil-immersion microscope objective ($\times 100$, 1.3 numerical aperture; $\times 50$, 0.5 numerical aperture; Zeiss)에 집중되고 이를 통해 나타나는 라만 신호가 액화질소로 냉동된 (-125°C) CCD (charge-coupled device)를 통해 수집되었다. 모든 데이터는 배경신호를 제거하여 정정(baseline-correction)하여 표면증강라만산란 스펙트럼이 얻어졌으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

도 5는 제조예 1-3에서 제조한 나노입자를 이용하여 본 발명의 장치로 표면증강라만산란 스펙트럼을 측정한 그래프이다.

도 5에 나타난 바와 같이, 제조예 1-3에서 제조한 나노입자를 이용하여 본 발명의 장치로 표면증강라만산란 스펙트럼을 측정한 결과, 각각의 나노입자가 서로 다른 고유의 피크를 나타내는 것을 알 수 있었다.

또한, 제조예 1-3에서 제조한 나노입자를 포함하는 각각의 용액에서 산란되는 라만광을 선택적으로 투과시키는 협대역필터(narrow band pass filter)를 찾기 위해서 660 nm의 여기 레이저를 광원으로 사용하여 얻어지는 파장으로 스펙트럼의 X축을 nm 단위의 파장으로 전환하여 제조예 1-3의 나노입자들의 라만 스펙트럼으로부터 선택되어진 피크 영역과 각각의 시그널을 선택적으로 필터링하기 위한 협대역 필터의 상세 스펙을 찾아내었고, 그 결과를 하기에 나타내었다.

제조예 1의 나노입자에 최적화된 "Filter 1": center=707 nm, FWHM=1.5 nm

제조예 2의 나노입자에 최적화된 "Filter 2": center=715 nm, FWHM=1.5 nm

제조예 3의 나노입자에 최적화된 "Filter 3": center=740 nm, FWHM=1.5 nm

도 6은 제조예 1-3에서 제조한 나노입자에서 산란되는 라만광을 선택적으로 투과시키는 협대역필터(narrow band pass filter)의 파장 영역을 나타낸 그래프이다.

도 6에 나타난 바와 같이, 제조예 1-3에서 제조한 나노입자들 각각의 라만 산란광 고유의 파장대가 있음을 알 수 있었고, 이를 통해 각각의 나노입자에 최적화된 협대역필터를 설정할 수 있었다.

나아가, 제조예 1-3에서 제조한 나노입자들이 특정 협대역필터에서만 선택적으로 이미징됨을 알아보기 위하여, 제조예 1-3에서 제조한 나노입자를 포함하는 용액에 660 nm의 여기 레이저를 광원으로 조사하고, 상기에서 찾은 협대역필터

("Filter 1", "Filter 2" 및 "Filter 3")를 차례로 사용해 보았고, 그 결과를 도 7에 나타내었다. 또한, 상기와 같이 제조예 1-3에서 제조한 나노입자를 포함하는 용액들 각각을 그들에 최적화된 헤파역필터를 사용하여 얻은 이미지들을 합친 것을 도 8에 나타내었다.

도 7은 제조예 1-3에서 제조한 나노입자에서 산란되는 라만광을 선택적으로 투과시키는 각각의 헤파역필터를 사용할 경우 선택적으로 이미징됨을 나타내는 사진이다.

도 8은 제조예 1-3에서 제조한 나노입자에서 산란되는 라만광을 선택적으로 투과시키는 각각의 헤파역필터를 사용하여 얻은 각각의 이미지를 합쳐서 나타낸 사진이다.

도 7-8에 나타난 바와 같이, 제조예 1-3에서 제조한 나노입자들 각각은 이들에 최적화된 헤파역필터를 사용할 경우에만 선택적으로 이미징됨을 알 수 있었다. 또한, 제조예 1-3에서 제조한 나노입자로부터 얻어지는 라만 산란광을 합쳐서도 얻을 수 있는 것을 알 수 있었다.

<실험예 2> 다중 컬러 세포 이미징 평가

제조예 4-5에서 제조한 나노입자를 이용하여 본 발명의 장치로 다중 컬러 세포 이미징을 측정하였다.

구체적으로, 96 웰-플레이트에 HeLa 세포(자궁경부 암세포)를 well당 2만개씩 시딩(seeding)하고, 20 ~ 24 시간 인큐베이터 안에서 배양하였다. 배양된 세포

는 PBS 버퍼로 세척 후, 제조예 4-5 에서 제조한 나노입자가 포함된 세포 배양액을 넣고 다시 인큐베이터 안에서 6시간 배양한다. 배양된 세포는 PBS 버퍼로 세척하고 차가운 고정 버퍼(fixation buffer)(BD cytofix™) 넣고 15 분간 세포를 고정한다. 세포 고정 후, 고정 버퍼는 제거하고 PBS 버퍼로 2번 세척 후, 다시 PBS 버퍼를 넣고 냉장 보관하며 준비한다. 이와 같이 준비된 샘플에 660 nm의 여기 레이저를 조사하여 얻어지는 라만 산란광을 상기 실험예 1에서 찾아낸 협대역필터("Filter 1" 및 "Filter 2")를 사용하여 이미징하였다. 그 결과를 도 10-12에 나타내었다.

도 10은 세포에 나노입자를 첨가하지 않은 대조군(a)과 제조예 5에서 제조한 PEG 코팅된 나노입자를 첨가한 실험군(b)을 본 발명의 장치로 측정된 이미지로, 2가지 협대역필터("Filter 1" 및 "Filter 2")를 이용하여 각각 측정된 이미지이다.

도 11은 제조예 4에서 제조한 PEG 코팅된 나노입자를 첨가한 실험군에서 3부분을 지정하여 그 영역에서 발견되는 세포들을 본 발명의 장치로 측정된 이미지로, 2가지 협대역필터("Filter 1" 및 "Filter 2")를 이용하여 각각 측정된 이미지이다.

도 12는 제조예 5에서 제조한 PEG 코팅된 나노입자를 첨가한 실험군에서 3부분을 지정하여 그 영역에서 발견되는 세포들을 본 발명의 장치로 측정된 이미지로, 2가지 협대역필터("Filter 1" 및 "Filter 2")를 이용하여 각각 측정된 이미지이다.

도 10-12에 나타난 바와 같이, 제조예 5에서 제조한 PEG 코팅된 나노입자의 시그널을 선택적으로 통과시키는 "Filter 2"에서만 세포 이미지가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 이 이미지는 세포의 자기형광(autofluorescence)이 아닌 제조예 5에서 제조한 PEG 코팅된 나노입자가 세포에 흡착하여 나타내는 이미지만을 선택적으로 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

【부호의 설명】

10: 광원

20: 스페이셜 필터

21: 광분리장치

30: 대물 렌즈

40: 라만 필터

50: 모션 컨트롤러

60: 미러

110: 컴퓨터

111: 검출기(CCD 카메라)

【특허청구범위】**【청구항 1】**

광원을 현미경으로 유도하는 렌즈(lens), 미러(mirror), 핀홀(pinhole)로 구성된 여기 모듈;

시료의 위치변화를 제어하는 모션 컨트롤러(motion controller), 상기 광원으로부터 시료를 여기하고 상기 시료로부터 산란된 빛에서 라만 파장의 빛을 필터링하는 단수 또는 복수의 라만 필터, 및 상기 라만 필터를 통과한 빛을 순차적으로 받아서 검출하는 검출기를 포함하는, 시료의 상을 획득하는 현미경 모듈; 및

상기 모션 컨트롤러에 의해 위치한 포인트에서 획득된 단수 또는 복수의 상을 컬러 코딩하여 세포 또는 생체 조직의 영상으로 변환시키고 변환된 영상을 표시하는 영상처리 모듈을 포함하는 표면증강라만산란을 이용한 다중 약물 고속 스크리닝 장치.

【청구항 2】

제1항에 있어서,

상기 다중 약물 고속 스크리닝 장치는 코어-셍-셍 나노입자가 저장된 저장 챔버를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 표면증강라만산란을 이용한 다중 약물 고속 스크리닝 장치.

【청구항 3】

제1항에 있어서,

상기 광원은 400 내지 700 nm의 파장을 가지는 것을 특징으로 하는 표면증강 라만산란을 이용한 다중 약물 고속 스크리닝 장치.

【청구항 4】

제1항에 있어서,

상기 라만 필터의 수는 1 이상 20 이하인 것을 특징으로 하는 표면증강라만 산란을 이용한 다중 약물 고속 스크리닝 장치.

【청구항 5】

제1항에 있어서,

상기 검출기는 스캔 방식 또는 무스캔 방식으로 라만 필터를 통과한 빛을 검출하는 검출기인 것을 특징으로 하는 표면증강라만산란을 이용한 다중 약물 고속 스크리닝 장치.

【청구항 6】

제5항에 있어서,

상기 스캔 방식의 검출기는 PMT(Photomultiplier tube) 또는 APD(Avalanche photodiode)이고, 상기 무스캔 방식의 검출기는 CCD(Charge-coupled device) 카메라인 것을 특징으로 하는 표면증강라만산란을 이용한 다중 약물 고속 스크리닝 장치.

【청구항 7】

제1항에 있어서,

상기 컬러 코딩을 위해 획득되는 상의 수는 1 이상 20 이하인 것을 특징으로 하는 표면증강라만산란을 이용한 다중 약물 고속 스크리닝 장치.

【청구항 8】

제1항에 있어서,

상기 시료는 세포인 것을 특징으로 하는 표면증강라만산란을 이용한 다중 약물 고속 스크리닝 장치.

【청구항 9】

제8항에 있어서,

상기 세포는 코어-갭-셸 나노입자와 선택적으로 결합되어 이미징되는 것을 특징으로 하는 표면증강라만산란을 이용한 다중 약물 고속 스크리닝 장치.

【청구항 10】

제9항에 있어서,

상기 코어-갭-셸 나노입자는 코어(core) 및 상기 코어를 둘러싼 셸(shell)을 포함하고, 상기 코어와 셸 사이에 나노갭이 형성되며, 상기 코어와 셸은 나노브릿지로 연결되거나 또는 연결되어 있지 않은 나노입자이되,

상기 나노갭에는 광학 활성분자가 포함되는 것을 특징으로 하는 표면증강라

만산란을 이용한 다중 약물 고속 스크리닝 장치.

【청구항 11】

제10항에 있어서,

상기 광학 활성 분자는 C, H, O, N, S 및 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 원자로 구성된 분자인 것을 특징으로 하는 표면증강라만산란을 이용한 다중 약물 고속 스크리닝 장치.

【청구항 12】

제1항에 있어서,

상기 검출기가 무스캔 방식의 CCD(Charge-coupled device)일 경우, 시료를 담은 웰 플레이트의 각각의 웰을 개별적으로 한번에 촬영하고, 모션 컨트롤러의 제어 통하여 다른 웰로 이동하는 것을 특징으로 하는 다중 약물 고속 스크리닝 장치.

【청구항 13】

제10항의 코어-갭-웰 나노입자를 검출하고자 하는 시료에 첨가하는 단계(단계 1);

레이저빔을 시료에 조사하여 상기 시료에 결합된 코어-갭-웰 나노입자로부터 얻어지는 특정 라만 산란광을 단수 또는 복수의 라만 필터를 통해 검출기로 검출하여 단수 또는 복수의 시료의 상을 획득하는 단계(단계 2); 및

상기 단계 2에서 얻은 단수 또는 복수의 시료의 상을 컴퓨터 프로그램으로 컬러 코딩하여 세포 또는 생체 조직의 영상으로 변환시키고 변환된 영상을 표시하는 단계(단계 3);를 포함하는 표면증강라만산란을 이용한 다중 약물 고속 스크리닝 방법.

【청구항 14】

제13항에 있어서,

상기 라만 필터의 수는 1 이상 20 이하인 것을 특징으로 하는 표면증강라만산란을 이용한 다중 약물 고속 스크리닝 방법.

【청구항 15】

제13항에 있어서,

상기 검출기는 스캔 방식 또는 무스캔 방식으로 라만 필터를 통과한 빛을 검출하는 검출기인 것을 특징으로 하는 표면증강라만산란을 이용한 다중 약물 고속 스크리닝 방법.

【청구항 16】

제15항에 있어서,

상기 스캔 방식의 검출기는 PMT(Photomultiplier tube) 또는 APD(Avalanche photodiode)이고, 상기 무스캔 방식의 검출기는 CCD(Charge-coupled device) 카메라인 것을 특징으로 하는 표면증강라만산란을 이용한 다중 약물 고속 스크리닝 방

법.

【청구항 17】

제13항에 있어서,

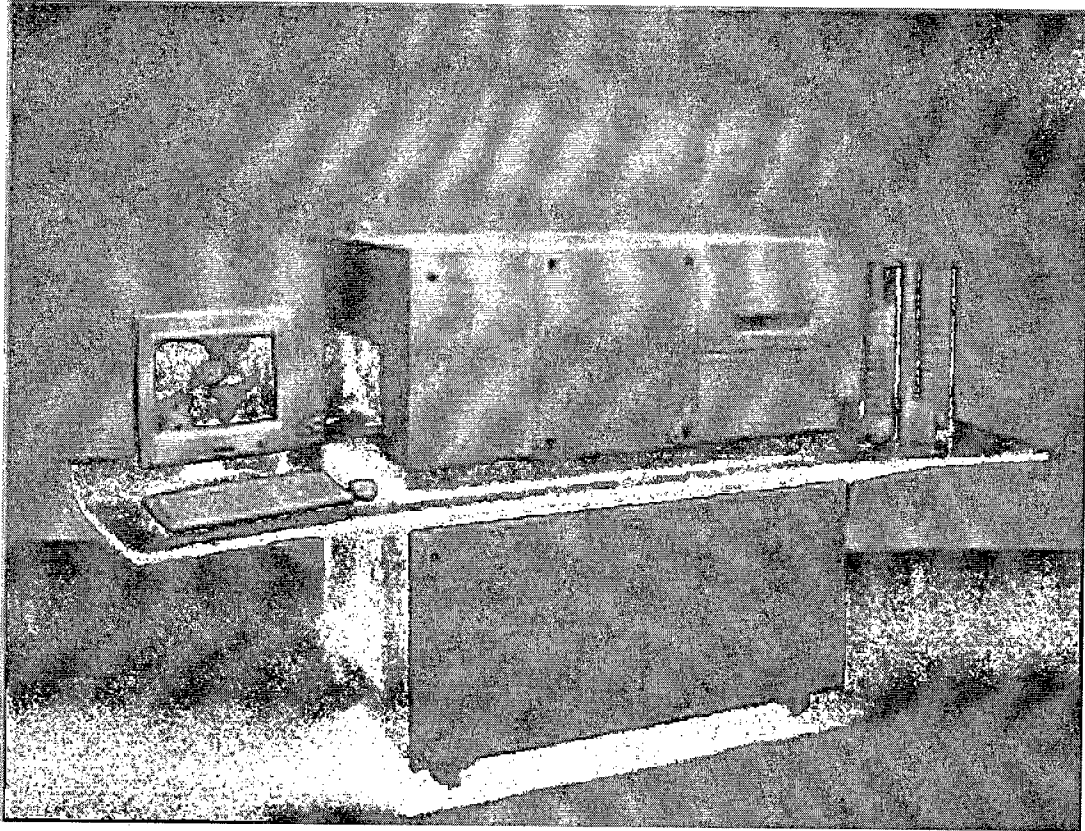
상기 검출기가 무스캔 방식의 CCD(Charge-coupled device)일 경우, 시료를 담은 웰 플레이트의 각각의 웰을 개별적으로 한번에 촬영하고, 모션 컨트롤러의 제어를 통하여 다른 웰로 이동하는 것을 특징으로 하는 표면증강라만산란을 이용한 다중 약물 고속 스크리닝 방법.

【청구항 18】

제13항에 있어서,

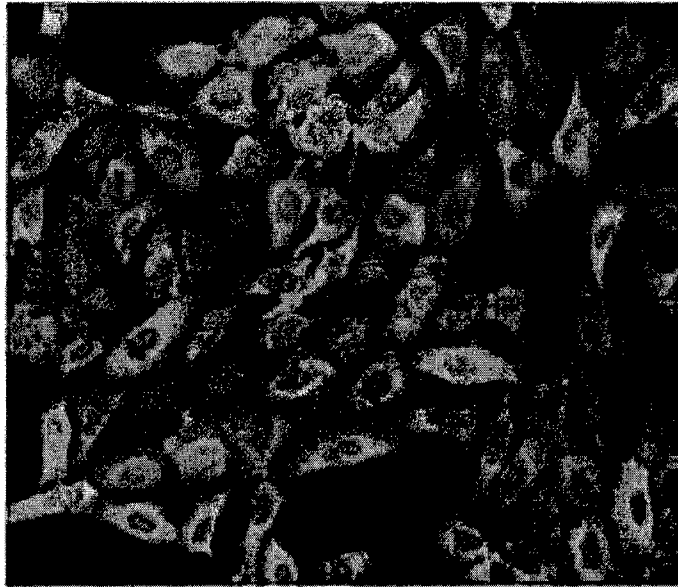
상기 단계 3에서는 상기 단계 2에서 얻은 시료의 상을 라만 피크에 따라 컴퓨터를 통하여 특정 색깔로 컬러 코딩함으로써 1 컬러 이상 20 컬러 이하의 다중도를 갖는 영상을 표시하는 것을 특징으로 하는 표면증강라만산란을 이용한 다중 약물 고속 스크리닝 방법.

【도 1】



【도 2】

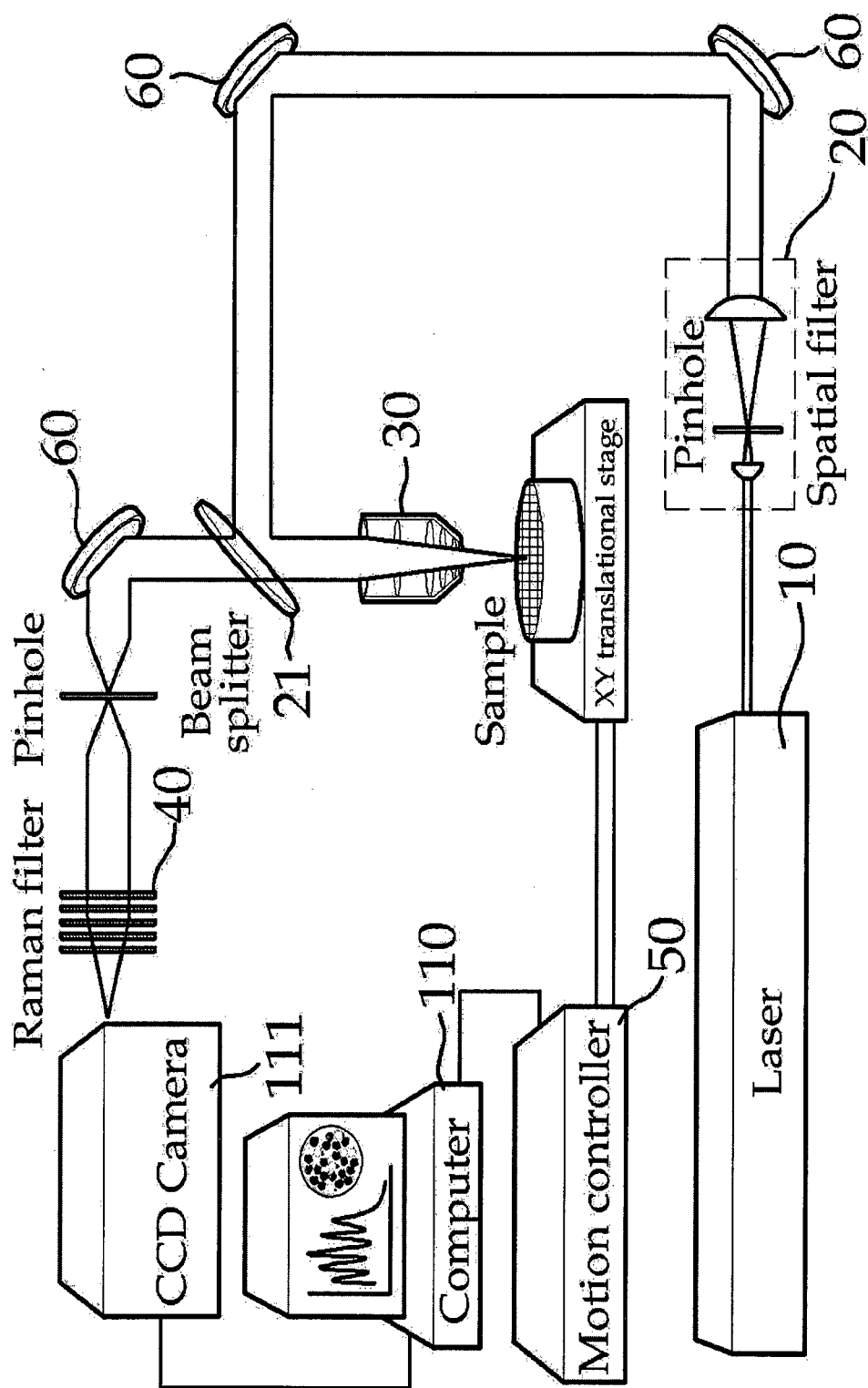
Image of EvoTec Opera



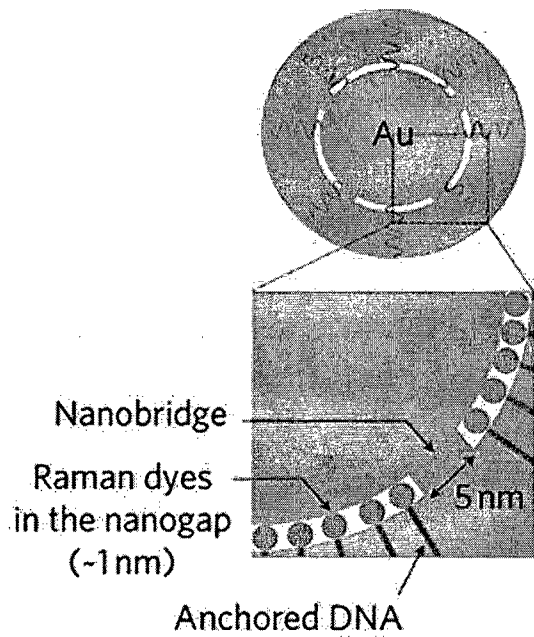
Cytosol: CFP

Nucleus: SYTO59

【도 3】

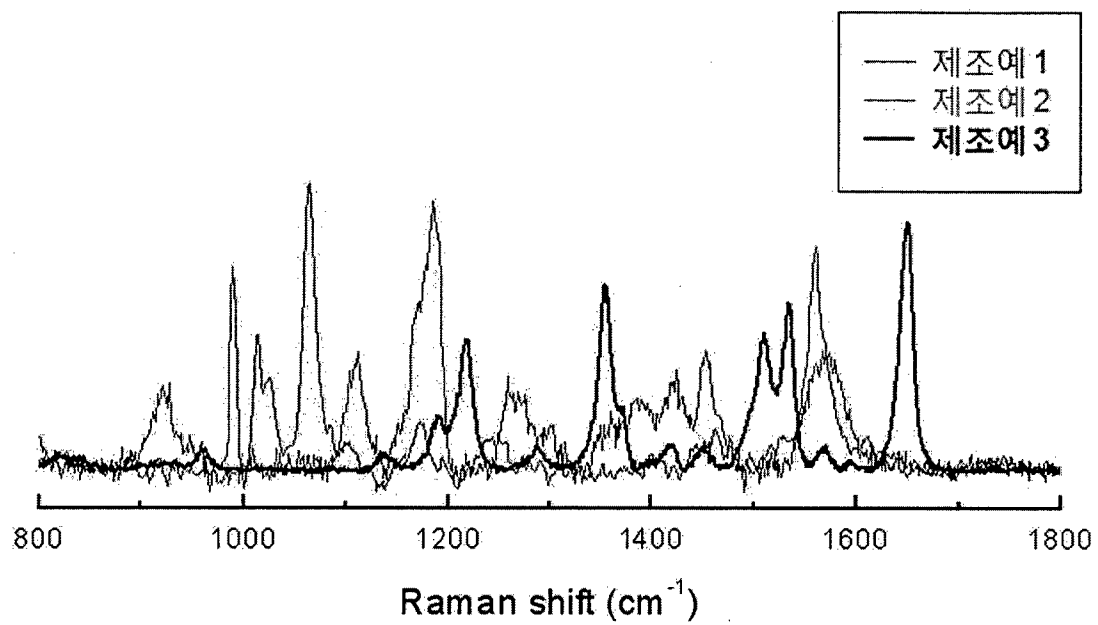


【도 4】

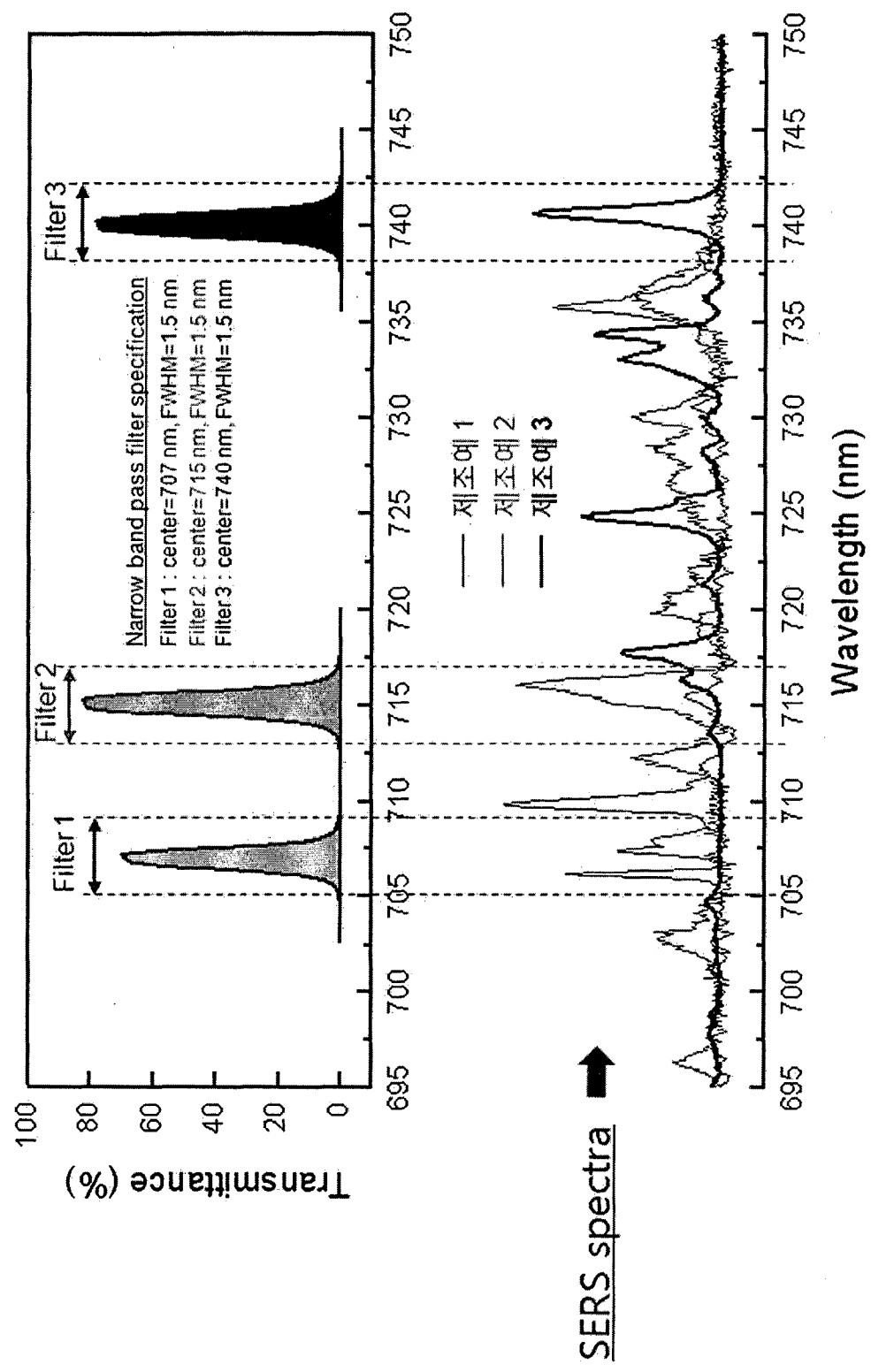


- 제조예 1: Au-NNP(Dabcyl)_n
- 제조예 2: Au-NNP(Cy3)_n
- 제조예 3: Au-NNP(TAMRA)_n

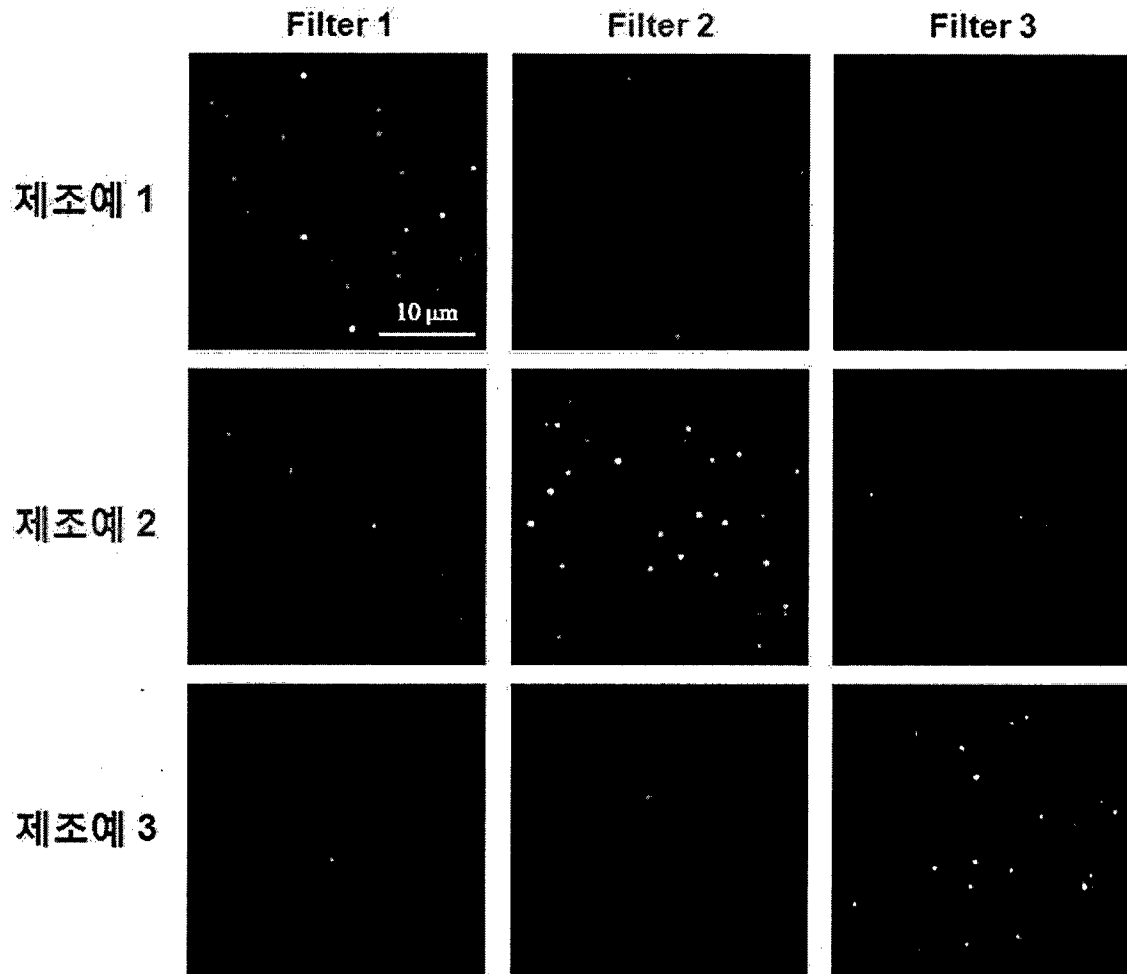
【도 5】



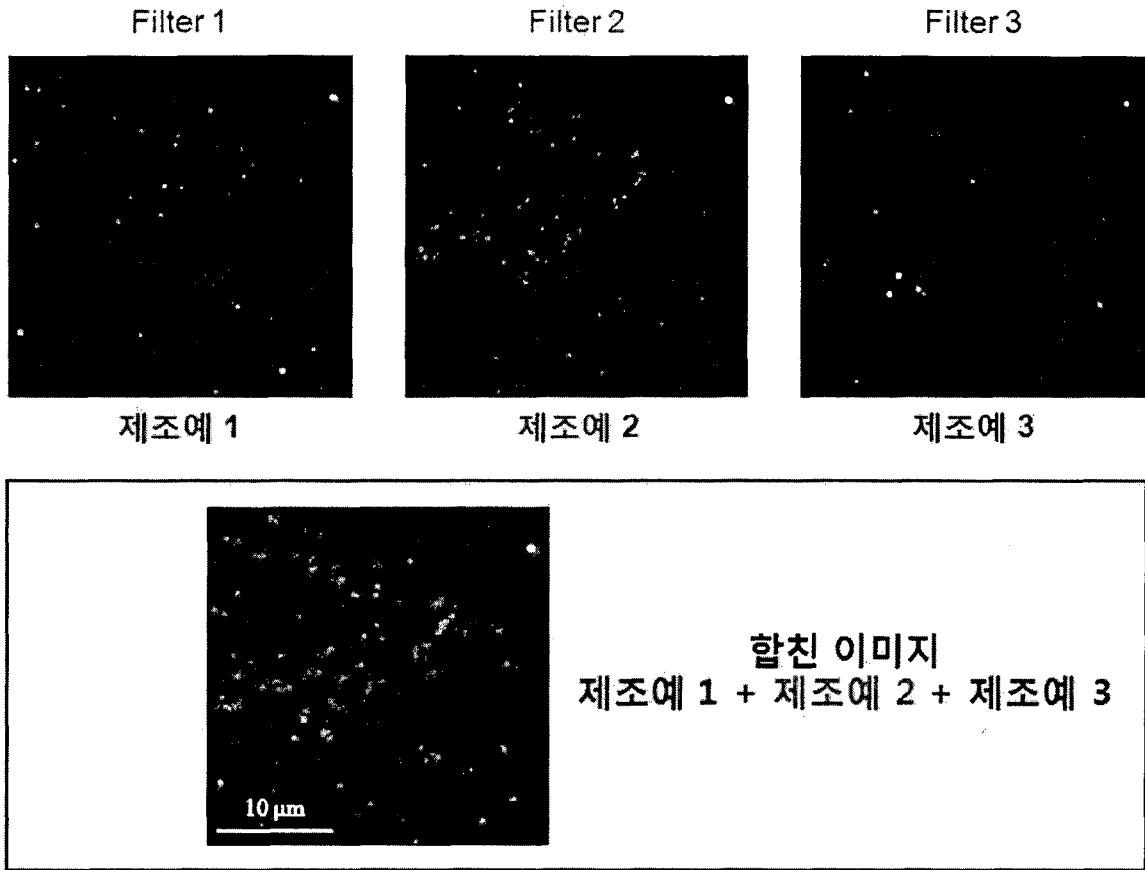
【도 6】



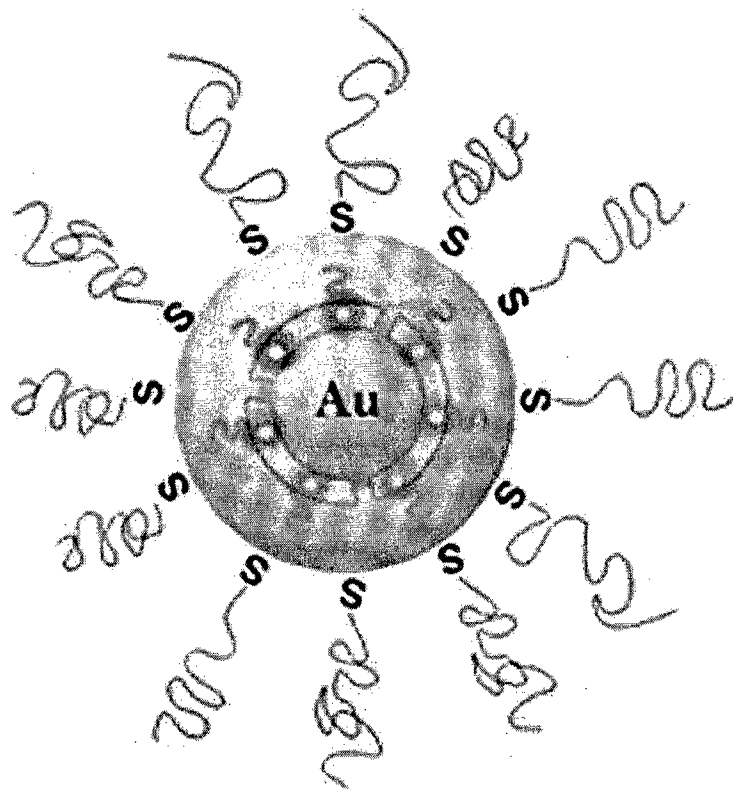
【도 7】



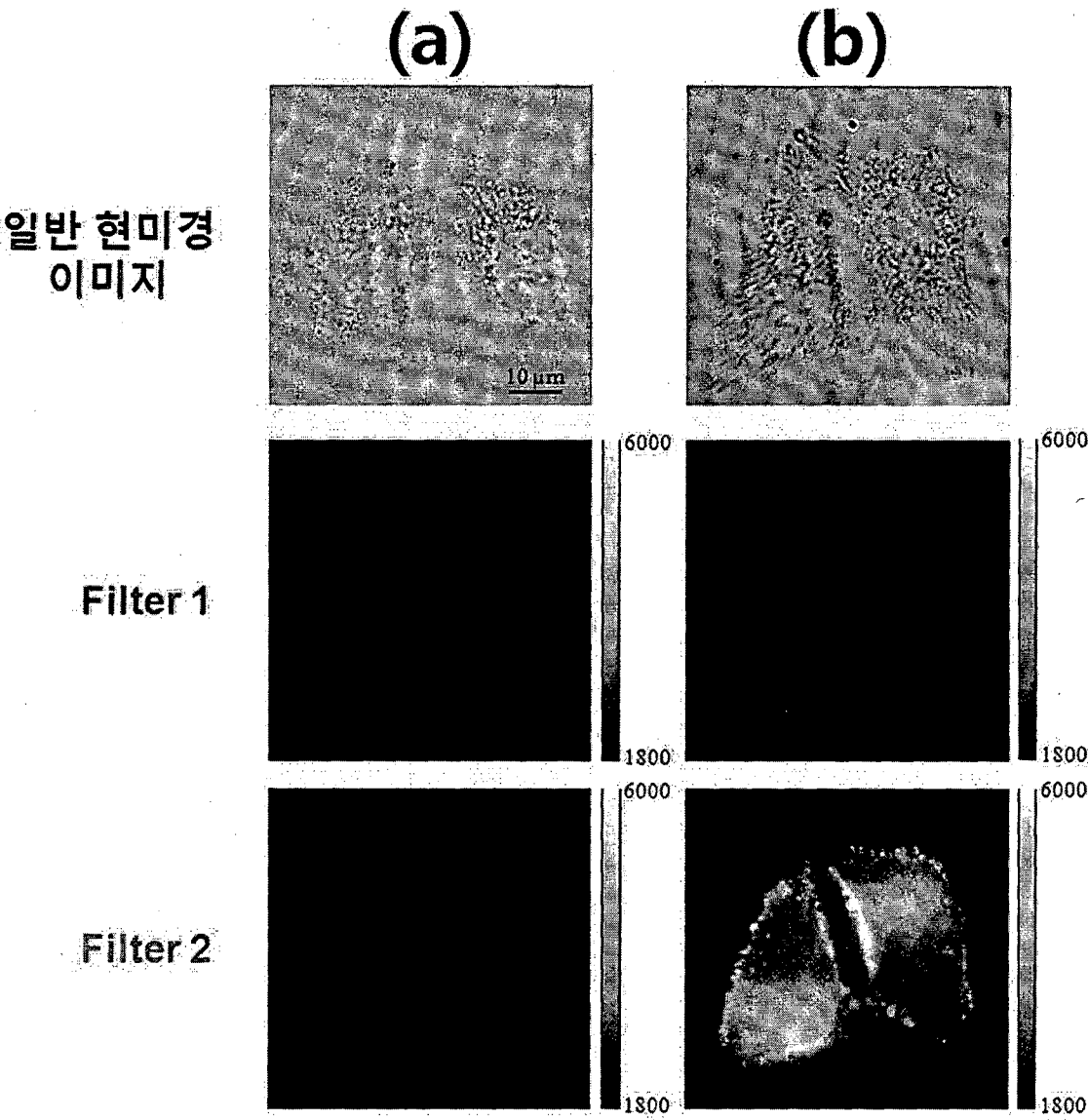
【도 8】



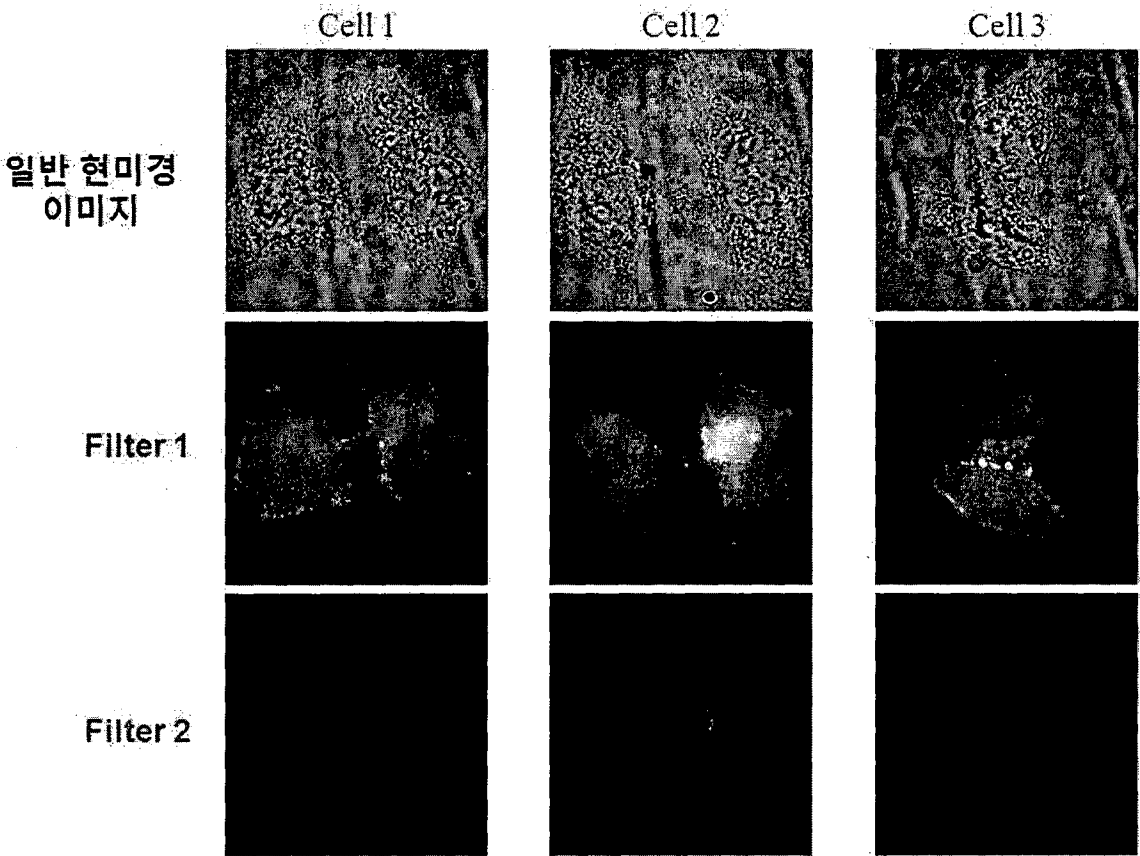
【도 9】

**PEG 코팅된 나노입자**

【도 10】



【도 11】



【도 12】

