



(51) 국제특허분류:

A01N 1/02 (2006.01)

A23L 3/3544 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

A23L 3/3526 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2021/003087

(22) 국제출원일:

2021년 3월 12일 (12.03.2021)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2020-0168844 2020년 12월 4일 (04.12.2020) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION)

[KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가), Seoul (KR). 서울대학교산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1 (신림동), Seoul (KR).

(72) 발명자: 안동준 (AHN, Dong June); 06637 서울시 서초구 사임당로19길 10, 102동 802호(서초동, 서초현대아파트), Seoul (KR). 김도연 (KIM, Do Nyun); 06330 서울시 강남구 개포로 516, 602동 1408호(개포동, 주강아파트), Seoul (KR). 이예담 (LEE, Ye Dam); 03505 서울시

은평구 증산로1길 26, 102동 803호(수색동, DMC청구아파트), Seoul (KR). 이찬석 (LEE, Chan Seok); 08089 서울시 양천구 목동서로 340, 902동 1203호(신정동, 목동신시가지아파트9단지), Seoul (KR).

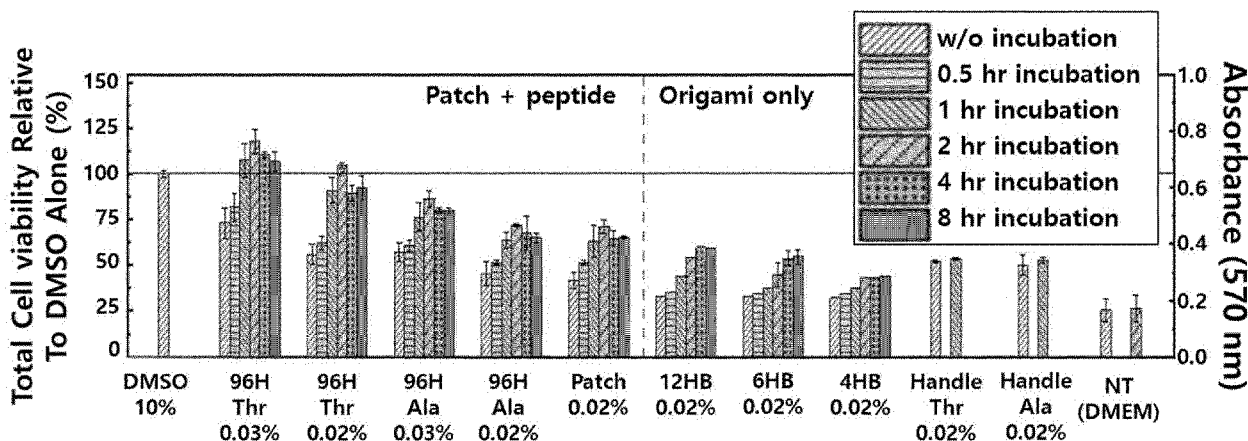
(74) 대리인: 특허법인리채 (LEECHAE INTELLECTUAL PROPERTY); 06236 서울시 강남구 테헤란로26길12, 3층, Seoul (KR).

(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, IT, JO, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 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,

(54) Title: COMPOSITION FOR CRYOPROTECTION INCLUDING DNA NANOSTRUCTURE, AND METHOD FOR USING SAME

(54) 발명의 명칭: DNA 나노구조체를 포함하는 동결 보호용 조성물 및 그 이용방법



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for cryoprotection, the composition comprising: a nucleic acid structure including a scaffold nucleic acid, which folds at predetermined positions and forms a plurality of strands, and a plurality of staple nucleic acids, which form a double strand by binding to at least one of the strands and at least a portion of which have a complementary sequence to the scaffold nucleic acid; a linker bound to at least a portion of the nucleic acid structure; and a peptide bound to at least a portion of the linker, wherein the composition can increase cell viability during the cryopreservation of cells and tissues, and allows the texture of a food to be maintained when used to freeze the food.

(57) 요약서: 본 발명은 기결정된 위치에서 접혀 복수개의 가닥을 이룬 스캐폴드 핵산, 및 적어도 일부가 상기 스캐폴드 핵산과 상보적인 서열을 가져, 상기 가닥 중 적어도 하나에 결합되어 이중 가닥을 형성하는 복수개의 스테이플 핵산을 포함하는 핵산 구조체, 핵산 구조체의 적어도 일부에 결합된 연결자 및 연결자의 적어도 일부에 결합된 펩타이드를 포함함으로써, 동결 보호 효과가 우수하여, 세포 및 조직의 동결 보존 시에 세포의 생존율을 높일 수 있으며, 식품의 동결에 사용시에도 그 식품의 식감을 유지할 수 있도록 하는 동결 보호용 조성물에 관한 것이다.

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 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: DNA 나노구조체를 포함하는 동결 보호용 조성물 및 그 이용방법

기술분야

- [1] 본 발명은 DNA 나노구조체를 포함하는 동결 보호용 조성물 및 그 이용방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 동결 방지 소재는 용액에 존재할 때 0°C 아래의 온도에 노출된 용액에서 얼음 결정 형성을 감소 또는 저해시킬 수 있는 화합물이다. 현재의 동결 방지 소재는 소분자, 합성 폴리머, 및 동결방지제 단백질을 포함한다. 현재 사용하는 소분자의 경우 매우 높은 유효 농도를 요구하여(가령 60% 이상) 조직 독성이 있는 경우가 있다. 또한 자연에 존재하는 단백질의 경우 정제 및 대량생산이 어려워 가격이 매우 높은 한계점을 가진다.
- [4] 극저온의 환경에서 살아가는 생명체에는 체액의 동결을 방지하여 세포 및 조직을 보호하는 동결 방지 단백질(antifreezing protein)이 존재한다. 동결 방지 단백질은 저마다 고유한 구조를 갖고 있으나, 트레오닌(threonine)이라는 펩타이드의 규칙적인 배열이 얼음 결정의 특정 면과 맞물리면서 결정의 성장을 억제하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다.
- [5] DNA 오리가미는 DNA의 고유한 네 가지 염기 사이의 상보적인 자가결합 특성을 이용하여, 통상 7000개 이상의 염기를 가진 스캐폴드(scaffold) DNA라 불리는 매우 긴 단일 DNA 가닥과 이를 특정한 형상으로 접합시키기 위한 다수의 짧은 스테이플DNA(staple DNA)를 사용하여 나노구조물을 만드는 상향식(bottom-up) 제작기법이다.
- [6] DNA 오리가미 기술은 수 나노미터(nm) 이내의 높은 정밀도로 기존의 하향식 제작기법으로 만들 수 없는 복잡한 형상의 2차원/3차원 나노구조물을 제작할 수 있다. 이를 통해 다양한 나노재료들을 원하는 위치에 정밀하게 배열하는 등의 응용이 가능하며, 또한 생체분자를 이용하므로 제작된 나노구조물의 생체적합성이 매우 우수하다.
- [7] 동결보호제는 세포 내부 및 외부에서 복합적으로 작용하는데, 세포 내부에 흡수된 구조체는 세포 내부 얼음 결정의 형성 및 성장을 억제하고, 세포 외부에 있는 구조체는 세포 주위의 얼음 결정의 형성 및 성장을 억제함과 동시에 세포 외부의 얼음 결정이 세포막을 찢어 세포가 손상되는 것을 방지하는 기능을 한다.
- [8] 한편, 상용하는 세포 동결보존제로 널리 사용되는 다이메틸 설펍사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)의 경우 세포배양약과의 혼합비율이 10% (v/v) 정도로 매우 많은 양을 사용하며, 세포 독성을 가진 물질이기 때문에 세포

생존률에 악영향을 주며 해동 이후 빠른 시간 안에 제거해야 하는 문제가 있다.

- [9] 또한 DNA 오리가미 소재가 세포 독성이 발생하지 않는다는 것에 대해서는 선행 연구가 존재하나, 동결 방지 성능을 가진 펩타이드가 결합되어 있는 경우의 세포 독성 여부 및 다양한 세포에 대한 세포독성 여부는 아직 밝혀지지 않은 부분이 있어, 상용화를 위해서는 위 부분에 대한 평가가 추가로 필요하다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 본 발명은 DNA 나노구조체를 포함하는 세포 또는 조직 동결 보호용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [12] 본 발명은 DNA 나노구조체를 포함하는 식품 동결 보호용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [13] 본 발명은 세포 또는 조직의 동결 보호 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [14] 본 발명은 식품의 동결 보호 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[15]

기술적 해결방법

- [16] 1. 기결정된 위치에서 접혀 복수개의 가닥을 이룬 스캐폴드 핵산, 그 서열 중 적어도 일부가 상기 스캐폴드 핵산과 상보적인 서열을 가져, 상기 스캐폴드 핵산의 가닥 중 적어도 하나에 결합되어 이중 가닥을 형성하는 복수개의 제1 스테이플 핵산 및 그 서열 중 적어도 일부는 상기 스캐폴드 핵산과 상보적이고, 적어도 일단은 그렇지 않아, 상기 스캐폴드 핵산의 가닥 중 적어도 하나에 결합되어 이중 가닥 및 말단에 단일 가닥을 형성하는 복수개의 제2 스테이플 핵산을 포함하는 핵산 구조체;
- [17] 상기 핵산 구조체의 단일 가닥 중 적어도 하나에 결합된 연결자; 및
- [18] 상기 연결자 중 적어도 하나에 결합된 동결 방지 펩타이드를 포함하는 동결 보호용 조성물.
- [19] 2. 위 1에 있어서, 상기 연결자는 DNA, RNA, 또는 PNA인, 조성물.
- [20] 3. 위 1에 있어서, 상기 연결자는 길이가 5 뉴클레오티드 내지 20 뉴클레오티드인, 조성물.
- [21] 4. 위 1에 있어서, 상기 펩타이드는 길이가 1 내지 10 아미노산으로 이루어진 것인, 조성물.
- [22] 5. 위 4에 있어서, 상기 아미노산은 알라닌 또는 트레오닌인, 조성물.
- [23] 6. 위 1에 있어서, 상기 핵산 구조체는 2개 이상의 나선 다발을 포함하면서, 얼음 결정과 접촉할 수 있는 면을 포함하는, 조성물.
- [24] 7. 위 1에 있어서, 상기 핵산 구조체는 비틀림을 갖거나 곡선의 나선 다발을 포함하는, 조성물.
- [25] 8. 위 1 내지 7 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 세포 또는 조직 동결 보호용

조성물.

- [26] 9. 위 1 내지 7 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 식품 동결 보호용 조성물.
- [27] 10. 위 8의 조성물 존재 하에 대상 세포 또는 조직을 영하의 온도에 노출시키는 단계를 포함하는, 세포 또는 조직의 동결 보호 방법.
- [28] 11. 위 9의 조성물 존재 하에 대상 식품을 영하의 온도에 노출시키는 단계를 포함하는, 식품의 동결 보호 방법.

[29]

발명의 효과

- [30] 본 발명의 조성물은 세포 및 조직의 동결 보호 효과가 우수하다.
- [31] 본 발명의 조성물을 이용하여 세포 동결 보존 시, 세포의 생존률을 높일 수 있다.
- [32] 본 발명의 조성물은 식품의 동결 보호 효과가 우수하다.
- [33] 본 발명의 조성물을 이용하여 식품 동결 시, 상기 식품의 식감을 유지할 수 있다.

[34]

도면의 간단한 설명

- [35] 도 1은 스캐폴드 핵산과 스테이플 핵산이 결합하여 구조체를 형성하는 경우를 나타낸 도면이다.
- [36] 도 2는 여러 핵산 오리가미 구조체를 도시한 것이다. A는 4 나선 다발 (견고 구조), B는 4 나선 다발(유연구조), C는 24나선 패치 구조, D는 12 나선 다발(견고구조), E는 12 나선 다발(90도 굽은 구조), F는 12 나선 다발(45도 굽은 구조)이다.
- [37] 도 3은 4, 6, 12 나선 다발 견고 구조를 도시한 것이다.
- [38] 도 4는 4 나선 다발 유연구조, 6 나선 다발 유연구조를 도시한 것이다.
- [39] 도 5는 겹을 갖는, 또는 갖지 않는 오리가미 구조체를 도시한 것이다.
- [40] 도 6은 RI 효과 측정 방법을 나타낸 개략도이다.
- [41] 도 7 및 8은 순수한 증류수에 $MgCl_2$ 만 함유된 버퍼 용액에 대한 RI 측정 결과이다.
- [42] 도 9 및 10은 구조화되지 않은 단일 가닥 상태의 DNA가 존재하는 용액에 대한 RI 측정 결과이다.
- [43] 도 11 및 12는 스캐폴드 DNA 시료의 RI 측정 결과이다.
- [44] 도 13은 4헬릭스 번들 견고 구조 및 유연 구조를 나타낸 것이다.
- [45] 도 14는 6헬릭스 번들 견고 구조 및 유연 구조를 나타낸 것이다.
- [46] 도 15는 24헬릭스 패치 구조를 나타낸 것이다.
- [47] 도 16은 12헬릭스 번들 견고 구조 및 굽은 구조를 나타낸 것이다.
- [48] 도 17 내지 20은 DNA 오리가미 구조체의 RI 효과를 나타낸 것이다.
- [49] 도 21은 6헬릭스 번들 견고 구조에 대해, 관찰 시간에 따른 얼음 결정의 성장

과정을 나타낸 것이다.

- [50] 도 22는 DNA-PNA-펩타이드 패치의 설계도를 나타낸다.
- [51] 도 23은 완성된 DNA-PNA-펩타이드 패치의 아가로스 젤 전기영동 결과를 나타낸다.
- [52] 도 24는 실험에 사용된 DNA 오리가미 구조체의 실제 모습을 원자힘현미경(AFM) 이미지로 관찰한 결과이다.
- [53] 도 25는 인산완충생리식염수(PBS) 및 세포배양액(DMEM) 속에서 구조체(펩타이드 없는 패치 구조)의 안정성 테스트를 한 아가로스 젤 전기영동 실험 결과이다.
- [54] 도 26은 PBS 및 세포배양액 속에서 구조체(펩타이드 없는 패치 구조)의 안정성 테스트 후 아가로스 젤 전기영동 실험을 한 결과이다.
- [55] 도 27은 HSC-3 세포 내부에 흡수되었거나 외부에 흡착된 구조체 분포를 나타낸다(보라색: 펩타이드 패치, 파란색: 세포핵).
- [56] 도 28은 DNA 패치 또는 대조군(PBS 버퍼)를 포함하는 경우에 동결 후 해동시 세포 보호 성능을 관찰한 결과이다.
- [57] 도 29는 DMSO 10% 대비, 각 오리가미 나노구조체의 인큐베이션 시간에 따른 세포생존율(동결보존 시간은 24시간으로 동일)을 나타낸 그래프이다.
- [58] 도 30은 2시간 동안 인큐베이션 및 한 달 동안 동결 보존 후 세포생존율을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [59] 도 31은 DNA 오리가미의 동결 보호 효과를 In-situ 에서 확인한 결과이다.
- [60]

발명의 실시를 위한 형태

- [61] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [62]
- [63] 본 발명은 DNA 나노구조체를 포함하는 동결 보호용 조성물에 관한 것이다.
- [64] 본 발명에서 동결 보호란 세포, 조직 및 식품 등의 동결 보존시에 일어날 수 있는 동결 손상으로부터 상기 세포, 조직 및 식품 등을 보호하는 것을 말한다.
- [65] 본 발명에서 동결 손상이란 세포, 조직 및 식품 등이 동결되는 경우, 상기 세포, 조직 및 식품 등에 발생할 수 있는 손상을 말한다. 예를 들어, 물의 얼음 결정화에 의한 세포막의 손상이 일어날 수 있다. 또한, 비침투성 동결보호제를 사용하는 경우 오직 세포외 염분 농도만이 영향받으므로, 이에 따른 높은 용질 농도는 세포막에 삼투성 스트레스(osmotic stress)를 야기할 수 있다. 그리고 유리화 과정에 필요한 고농도의 동결보호 체제가 낮은 물 화학 퍼텐셜 또는 화학 독성에 의한 손상을 야기할 수도 있다. 다만, 이에 제한되지 않는다.
- [66] 본 발명에서 동결 보호는 DNA 나노구조체 등이 세포 및 조직의 내부 및 외부에서 복합적으로 작용하여 나타날 수 있다. 예를 들어, 세포 내부에 흡수된 구조체는 세포 내부 얼음 결정의 형성 및 성장을 억제하고, 세포 외부에 있는

구조체는 세포 주위의 얼음 결정의 형성 및 성장을 억제함과 동시에 세포 외부의 얼음 결정이 세포막을 찢어 세포가 손상되는 것을 방지하는 것을 말한다. 다만, 이에 제한되지 않는다.

- [67] 본 발명에서 동결 보호용 조성물은 생체 조직, 세포 또는 유기체 및 식품을 동결 손상으로부터 보호하기 위해 사용되는 물질일 수 있다.
- [68] 본 발명의 일 실시예에서, 동결 보호용 조성물은 얼음 결정의 형성 또는 성장을 억제할 수 있다.
- [69] 얼음 결정은 얼음 재결정화를 통해 성장할 수 있는데, 이는 작은 얼음 결정으로부터 더 큰 얼음 결정으로 성장하는 과정을 의미하고, 이 성장은 오스왈드 숙성(Ostwald ripening) 메커니즘을 따라 일어난다. 오스왈드 숙성(Ostwald ripening)은 상온 및 결정 사이 표면 에너지 차이로 인한 압력으로 인해 용해-확산-재동결 또는 승화-확산-응축 메커니즘으로 진행될 수 있다. 다시 말하자면, 얼음 결정의 성장은 얼음끼리 붙어서 성장하는 것이 아니라, 작은 얼음 결정이 결정 사이에서 용해되어 큰 얼음 결정 쪽으로 확산된 후 큰 얼음 결정의 일부가 되어 재동결되면서 일어나게 된다.
- [70] 얼음 결정의 성장 억제는 얼음이 형성되지 않도록 하거나 얼음 형성 속도를 늦추거나, 얼음의 재결정화가 되지 않도록 하거나, 얼음 재결정화 속도를 늦추거나, 얼음 결정의 크기를 작게 유지하는 작용을 의미한다.
- [71] 본 발명의 동결 보호용 조성물은 세포 또는 조직의 동결을 방지할 수 있다. 또한, 세포의 동결 보존 후 해동시에 세포의 생존률을 향상시킬 수 있다.
- [72] 상기 조성물에 포함된 DNA 나노구조체를 구성하는 염기의 종류, 구조 등에 따른 얼음친화적(icephilic) 성질의 정도에 따라 세포 또는 조직의 동결을 방지 및 억제하는 효과가 달라질 수 있다.
- [73] 본 발명의 동결 보호용 조성물은 핵산 구조체를 포함한다.
- [74] 핵산 구조체는 핵산 오리가미 구조체일 수 있다.
- [75] 핵산은 DNA, RNA 또는 PNA일 수 있다. 다만, 이에 제한되지 않는다.
- [76] 핵산 오리가미 구조체는 도 1에 예시된 바와 같이, 스캐폴드 핵산이 복수개의 스테이플 핵산과 결합하면서, 스캐폴드 핵산의 소정 부분이 접혀 형성되는 구조체이다.
- [77] 스캐폴드 핵산은 단일가닥의 핵산으로서 그 길이는 형성하고자 하는 구조체의 길이, 크기, 모양 등에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 통상적으로 7000 내지 8000 뉴클레오티드(nt) 정도의 길이를 가진 종류를 사용할 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 7,249nt 길이의 M13mp18 DNA를 사용하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다. M13mp18 스캐폴드 DNA를 사용하여 DNA 구조체를 제작한 경우, 만들어진 구조체 하나의 분자량은 약 5 메가달톤이며, 이는 약 10^{-10} kg에 상응하나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [78] 스테이플 핵산은 그 서열 중 적어도 일부가 상기 스캐폴드 핵산과 상보적인 서열을 가져, 스캐폴드 핵산이 특정 위치에서 접히거나 고정되도록 할 수 있다.

- [79] 본 발명에서 스테이플 핵산은 상기 스캐폴드 핵산의 가닥 중 적어도 하나에 결합되어 이중 가닥을 형성하는 복수개의 스테이플 핵산(이하 '제1 스테이플 핵산') 일 수 있다. 또한, 스테이플 핵산은 그 서열 중 적어도 일부는 상기 스캐폴드 핵산과 상보적이고, 적어도 일단은 그렇지 않아, 상기 스캐폴드 핵산의 가닥 중 적어도 하나에 결합되어 이중 가닥 및 말단에 단일 가닥을 형성하는 복수개의 스테이플 핵산(이하 '제2 스테이플 핵산') 일 수 있다.
- [80] 제1 스테이플 핵산은 스캐폴드 핵산과 상보적인 서열을 가져, 스캐폴드 핵산과 결합하여 이중 가닥을 형성할 수 있다.
- [81] 제2 스테이플 핵산은 스캐폴드 핵산과 상보적인 서열을 갖는 부분 및 적어도 한 쪽 말단(일단)이 스캐폴드 핵산과 상보적이지 않은 부분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일단이 스캐폴드 핵산과 상보적이지 않을 수 있고, 양단이 스캐폴드 핵산과 상보적이지 않을 수 있다. 다만, 이에 제한되지 않는다.
- [82] 본 발명에서 스테이플 핵산은 복수개의 제1 스테이플 핵산 단독, 복수개의 제2 스테이플 핵산 단독, 또는 복수개의 제1 및 제2 스테이플 핵산을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [83] 스테이플 핵산은 그 길이는 형성하고자 하는 구조체의 길이, 크기, 모양 등에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 예를 들면 20 내지 50nt일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [84] 본 발명에서 상기 제2 스테이플 핵산에서 스캐폴드 핵산과 상보적이지 않은 적어도 일단 부분은 스테이플 핵산의 염기서열의 설계시에 일부의 길이를 늘려, 스테이플 핵산의 염기서열 중 스캐폴드 핵산의 염기서열과 적어도 일단이 상보적인 결합을 하지 않도록 설계된 부위일 수 있다. 제2 스테이플 핵산이 스캐폴드 핵산과 결합하면 상기 적어도 일단은 핵산 오리가미 한쪽 면에 노출될 수 있다. 이하 이를 핸들이라 칭한다. 핵산 오리가미 구조체는 스테이플 핵산이 스캐폴드 핵산의 특정 위치에 결합하여 스테이플 핵산이 특정 위치에서 접혀 특정의 구조체를 형성하는 것으로서, 스테이플 핵산은 스캐폴드 핵산이 그러한 특정 구조체를 갖도록 설계된다.
- [85] 스테이플 핵산의 설계는 통상적인 방법에 따라 수행될 수 있으며, 예를 들면 caDNAno 등의 디자인 프로그램을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [86] 핵산 오리가미 구조체는 통상의 열풀림(thermal annealing) 기법을 사용하여 제조될 수 있다.
- [87] 이는 원재료인 스캐폴드 핵산과 스테이플 핵산을 고온(예를 들어 80~95°C)으로 가열하여 모든 핵산 가닥이 단일가닥 상태로 있도록 만들어 주는 것으로 시작한다. 핵산 가닥은 염기서열에 따라 녹는점(melting temperature)이 존재하며 이 온도 이상이면 주로 단일가닥, 이하일 경우 주로 이중가닥으로 존재하게 된다. 이후 반응 용액의 온도를 천천히 낮춰주게 되면, 핵산 가닥이 상보적으로 결합하면서 이중가닥으로 존재하기 시작하며, 핵산 오리가미에서는 200개

정도의 스테이플 핵산이 협력적으로 결합하면서 설계했던 위치에 결합, 원하는 형상의 구조체가 생성된다.

- [88] 스테이플 핵산마다 염기서열이 다르므로 결합 시점은 조금씩 다르지만 통상의 열풀림 기법은 충분한 시간(수 시간 이상)에 걸쳐 서서히 온도를 낮추기 때문에 모든 스테이플 핵산이 결합하기 충분한 조건이며, 따라서 구성하는 스테이플 핵산의 염기서열과 무관하게 원하는 형상을 갖도록 제작할 수 있다.
- [89] 스캐폴드 핵산은 기결정된 위치에서 접혀 복수개의 가닥을 이루고, 스테이플 핵산은 스캐폴드 핵산이 기결정된 위치에서 접히도록 설계된 서열들을 갖는 것으로서, 상기 방법으로 스캐폴드 핵산에 결합하면서 스캐폴드 핵산이 소정의 구조를 형성하도록 한다.
- [90] 스캐폴드 핵산 가닥과 스테이플 핵산이 결합하여 이중 가닥(이중 나선)을 이룰 수 있는데, 핵산 오리가미 구조체는 예를 들면 2 내지 50, 2 내지 45, 2 내지 40, 2 내지 35, 2 내지 30, 2 내지 25 또는 2 내지 20, 2 내지 12, 4 내지 12 나선 다발(helix bundle)을 가질 수 있고, 구체적으로는 4 나선 다발 내지 12 나선 다발을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 도 2 및 4에는 여러 개의 나선 다발을 갖는 핵산 오리가미 구조체가 예시되어 있다.
- [91] 연결자는 핵산 구조체의 단일 가닥 중 적어도 하나에 결합될 수 있다. 구체적으로 연결자는 핵산 구조체를 이루는 제 2 스테이플 핵산의 말단에 존재하는 단일 가닥 중 적어도 하나에 결합될 수 있다. 다만, 이에 제한되지 않는다.
- [92] 연결자는 예를 들면 적어도 일부가 상기 핸들에 상보적인 염기 서열을 갖는 핵산일 수 있고, 예를 들면, DNA, RNA, PNA 등의 핵산 가닥일 수 있다. 연결자는 그 말단에 형광물질, 펩타이드 등의 기능성 물질이 추가로 부착되어 있는 가닥일 수 있다. 다만, 이에 제한되지 않는다.
- [93] 연결자는 상기 핸들 중 적어도 하나에 결합되는 것으로서, 하나 또는 복수개 또는 모든 핸들에 다 결합될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [94] 상기 연결자의 길이는 상기 핸들의 길이 및 염기 구성, 형성하고자 하는 구조체의 길이, 크기, 모양 등에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 예를 들면, 5 뉴클레오티드 내지 50 뉴클레오티드, 구체적으로 5 뉴클레오티드 내지 30 뉴클레오티드 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [95] 본 발명에서 동결 방지 펩타이드는 상기 연결자 중 적어도 하나에 결합된 펩타이드일 수 있다.
- [96] 상기 동결 방지 펩타이드는 연결자의 적어도 일부에 결합할 수 있다. 상기 연결자의 적어도 일부란, 핵산 구조체의 단일 가닥 중 하나 또는 복수개에 결합된 경우, 또는 상기 연결자 중 하나의 전체 염기서열 중 전체 또는 일부에 결합된 경우일 수 있다. 예를 들어, 상기 펩타이드는 연결자 일단에 결합할 수 있으며, 또는 상기 연결자의 양단에 결합할 수 있다. 상기 연결자와 동결 방지 펩타이드 간의 결합은 수소 결합, 공유 결합, 펩타이드 결합 등으로 이루어질 수

- 있다. 다만, 이에 제한되지 않는다.
- [97] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 핸들 부위의 염기서열과 상보적인 염기를 갖는 연결자(예를 들어, 펩타이드 핵산 가닥(PNA))를 설계하고, 상기 연결자 중 적어도 하나에 펩타이드를 결합시킬 수 있다(이하 ‘프로브’). 상기 프로브는 수용액 상에서 핵산 오리가미 구조체가 만들어지는 과정에서 설계된 부위인 핸들에 결합할 수 있다(도 24 참조).
- [98] 본 발명에서 펩타이드는 동결 방지 효과를 나타내는 펩타이드를 말한다. 상기 펩타이드의 종류에 따른 얼음친화적(icephilic) 성질의 정도 및 상기 펩타이드 배열의 밀도에 따라 얼음 결정의 성장을 억제하는 효과가 달라질 수 있다.
- [99] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 펩타이드는 단일 또는 복합 종류의 아미노산 중합체 일 수 있다. 상기 아미노산은 동결 방지 효과를 가지는 것 일 수 있다. 예를 들어, 상기 아미노산은 알라닌(alanine) 또는 트레오닌(threonine) 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [100] 상기 아미노산 중합체의 길이는 상기 연결자의 길이 및 염기 구성, 상기 노출된 단일 가닥의 길이 및 염기 구성, 형성하고자 하는 구조체의 길이, 크기, 모양 등에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 예를 들면 1개 내지 20개 아미노산, 1개 내지 10개 아미노산, 2개 내지 10개 아미노산 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [101] 본 발명에서 핵산 오리가미 구조체에는 일정한 간격으로 동결 방지 펩타이드가 배열되어 있을 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 핵산 오리가미 시트 구조의 한쪽 면에 동결 방지 펩타이드의 배열이 생성될 수 있다.
- [102] 본 발명에서 오리가미 구조체가 더 많은 핸들 개수를 가질수록, 상기 핸들에 부착되는 동결 방지 펩타이드의 수가 증가하여, 동결 방지 효율이 더 높을 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 핵산 오리가미 시트 구조의 한쪽 면에 횡 방향으로 16 뉴클레오티드 간격으로 96개의 동결 방지 펩타이드 배열을 가진 오리가미 구조체(도 22의 모든 핸들 위치 부분에 동결 방지 펩타이드가 배열된 구조체)의 경우, 횡 방향으로 32 뉴클레오티드 간격으로 48개의 동결 방지 펩타이드 배열을 가진 오리가미 구조체에 비해 세포생존율이 더 높았다(도 29 참조).
- [103] 본 발명의 구조체는 세포 내부에 흡수되거나, 세포 외벽에 달라붙는 형태로 세포를 감쌀 수 있다. 세포 내부에 흡수된 소재는 세포의 냉/해동 과정에서 내부에서 발생하는 얼음 결정의 형성 및 성장을 억제할 수 있다. 또한, 세포 내부에 흡수된 소재는 세포 및 조직의 동결을 방지 및 억제할 수 있다. 또한, 세포의 동결 보존 후 해동시에 세포의 생존률을 향상시킬 수 있다.
- [104] 세포 외부에 붙은 구조체는 세포 주위에서 발생하는 얼음 결정의 형성 및 성장을 억제하고, 얼음 결정의 세포 내부로의 침투를 억제하고, 세포막의 손상을 보호할 수 있다. 또한, 세포 외부에 붙은 구조체는 세포 및 조직의 동결을 방지 및 억제하고, 손상을 방지할 수 있다. 또한, 세포의 동결 보존 후 해동시에 세포의 생존률을 향상시킬 수 있다.

- [105] 본 발명에서 사용된 구조체는 수용액 상에서 약 0.001% 내지 0.03%, 세포 배양액 상에서 0.001% 내지 0.003%의 무게/부피비(weight/volume percent)를 가질 수 있다.
- [106] 기존의 조직 보존 과정에서 사용되는 침투성 소분자가 수십 퍼센트에 이르는 높은 무게/부피비(weight/volume percent)를 요구하는 것에 비해, 본 발명의 핵산 오리가미 구조체는 월등히 낮은 무게비에서도 얼음 결정 성장 억제 효과를 가질 수 있으며, 세포 또는 조직의 동결 방지 효과를 가질 수 있다. 또한, 세포의 동결 보존 후 해동시에 세포의 생존률을 향상시킬 수 있다.
- [107]
- [108] 본 발명에 따른 핵산 오리가미 구조체는 비틀림을 가지거나 곡선인 나선 다발을 포함할 수 있다.
- [109] 예를 들면 나선 다발의 비틀리는 방향은 염기의 삽입 또는 결실로 조절될 수 있는 것으로, 나선에 염기가 삽입되어 다발이 오른쪽 방향으로 뒤틀리거나, 염기가 결실되어 왼쪽 방향으로 뒤틀릴 수 있다. 뒤틀리는 정도는 염기의 개수로 조절될 수 있다. 삽입 또는 결실되는 염기의 수는 나선이 두 번 회전하는 때 21염기 길이당 1개 또는 2개일 수 있고, 그 이상인 경우라도 구조가 유지되는 데에 문제가 없다면 특별히 제한되지 않는다.
- [110] 또한, 예를 들면 복수개의 나선 중 일측의 나선에는 염기를 삽입하고, 타측의 나선에는 염기를 삽입하지 않거나, 염기를 결실시켜, 나선 간 길이 차이가 나도록 하여 나선 다발이 곡선이 되도록 할 수 있다.
- [111] 또한, 핵산 오리가미 구조체는 얼음 결정 생성 또는 성장 억제 측면에서 얼음 결정 성장면과 접촉할 수 있는 면을 포함할 수 있다. 선의 형태가 아닌, 면의 형태로 넓은 면적으로 얼음 결정 성장면과 접촉하여 얼음 결정 생성 또는 성장 억제 효과를 극대화할 수 있다. 또한, 면의 형태로 넓은 면적을 가져 세포 또는 조직의 동결 방지 효과를 극대화할 수 있다.
- [112]
- [113] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 세포 또는 조직 동결 보호용 조성물에 관한 것이다.
- [114] 세포 또는 조직의 동결 보존하면, 이후 사용하고자 할 때 동결된 세포 또는 조직을 녹이는 과정에서 얼음 재결정화는 세포막을 손상시키고 세포 탈수를 진행시킴으로 인해 세포 및 조직에 손상을 입힌다. 저온 환경에 사는 유기체들은 얼음 재결정화로 인해 더 쉽게 손상을 받을 수 있다.
- [115] 본 발명의 조성물에 포함된 나노구조체는 세포 및 조직의 내부에 흡수되거나, 세포 및 조직 외벽에 달라붙는 형태로 식품을 감쌀 수 있다. 세포 및 조직 내부에 흡수된 소재는 세포 및 조직의 냉/해동 과정에서 내부에서 발생하는 얼음 결정의 형성 및 성장을 억제할 수 있다. 또한, 세포 및 조직 내부에 흡수된 소재는 식품의 동결을 방지 및 억제할 수 있다. 또한, 세포 및 조직 외부에 붙은 구조체는 세포 및 조직의 동결을 방지 및 억제하고, 손상을 방지할 수 있다.

- [116] 본 발명의 조성물은 통상 보존을 위해 동결하여 사용하는 모든 세포가 그 적용대상이 될 수 있으며, 예를 들면 원핵 세포; 진핵 세포; 미생물; 동물 세포; 암 세포, 정자; 난자; 성체 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 역분화 줄기 세포를 포함하는 줄기 세포; 제대혈, 백혈구, 적혈구, 및 혈소판을 포함하는 혈액 세포; 신장 세포, 간 세포, 및 근육 세포를 포함하는 조직 세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [117] 또한 조직으로는 마찬가지로 보존을 위해 동결하여 사용하는 모든 조직이 그 적용대상이 될 수 있으며, 예를 들면, 각막, 신장, 심장, 소장, 췌장, 폐, 간 등 모든 조직이 제한 없이 사용될 수 있다.
- [118] 본 발명의 조성물은 세포, 조직 동결 보존을 위한 보존액을 포함할 수 있다. 보존액은 물, 식염수, PBS (phosphate buffered saline), 각종 세포배양액 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [119] 본 발명의 조성물은 핵산 구조체를 0.001 내지 0.5%(w/v), 구체적으로 0.001 내지 0.03%(w/v)로 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [120] 현재 조직 보존 과정에서 사용되는 침투성 소분자가 최대 수십 퍼센트에 이르는 높은 무게비를 요구하는 것에 비해, 본 발명의 핵산 오리가미 구조체는 월등히 낮은 함량에서도 얼음 결정 성장 억제 효과를 가질 수 있어 세포 및 조직의 동결시, 보존에 보다 유리할 수 있다. 또한, 세포의 동결 보존 후 해동시에 세포의 생존률을 향상시킬 수 있다.
- [121]
- [122] 또한, 본 발명은 상기 조성물 존재 하에 대상 세포 또는 조직을 영하의 온도에 노출시키는 단계를 포함하는 세포 또는 조직의 동결 보호 방법에 관한 것이다.
- [123] 상기 조성물 존재 하에 대상 세포 또는 조직을 동결시키는 경우에, 이후 해동시에 얼음 재결정을 저해하여 세포 또는 조직이 손상되는 것을 방지할 수 있다. 또한, 세포의 동결 보존 후 해동시에 세포의 생존률을 향상시킬 수 있다.
- [124]
- [125] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 식품 동결 보호용 조성물, 그리고 상기 조성물 존재 하에 식품을 영하의 온도에 노출시키는 단계를 포함하는 식품의 동결 보호 방법에 관한 것이다.
- [126] 본 발명의 조성물은 모든 냉동 식품에 적용될 수 있으며, 이를 사용하면 해동시에 그 음식의 식감이 저감되는 것을 최소화 할 수 있다.
- [127] 예를 들어, 본 발명의 구조체는 식품 내부에 흡수되거나, 식품 외벽에 달라붙는 형태로 식품을 감쌀 수 있다. 식품 내부에 흡수된 소재는 식품의 냉/해동 과정에서 내부에서 발생하는 얼음 결정의 형성 및 성장을 억제할 수 있다. 또한, 식품 내부에 흡수된 소재는 식품의 동결을 방지 및 억제할 수 있다. 또한, 식품 외부에 붙은 구조체는 식품의 동결을 방지 및 억제하고, 손상을 방지할 수 있다.
- [128]
- [129] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[130]

[131] 실시예[132] **1. 실험을 통한 양이온 및 DNA 구조체에 의한 얼음 결정 성장 억제 효과 확인**[133] **1.1. 얼음 결정 성장 실험 방법**

[134] RI 효과 측정을 위해서 통상적으로 알려진 스플랫 쿨링(splat cooling) 실험 기법을 이용하였다(도 6 참조). 우선 액체질소로 미리 냉각된 금속 판 위에 커버글라스를 올리고(커버글라스 표면온도 약 -150°C), 약 1.5 m의 높이에서 RI 효과를 측정하고자 하는 소재가 분산된 용액을 $20\ \mu\text{l}$ 떨어뜨린다. 용액은 커버글라스 위에 닿자마자 급속 냉각되면서 얇게 퍼지며 얼어붙게 되고, 급격한 냉각으로 인해 매우 작은 얼음 결정이 다수 생성된다. 이후 커버글라스를 구멍이 뚫려 있어 광학 현미경으로 관찰이 가능한 콜드 스테이지(cold stage)로 옮긴다. 콜드 스테이지는 -6°C 로 유지되며, 30분간 작은 결정들이 점차 합쳐지면서 얼음 결정(ice grain)이 성장하는 모습을 관측한다. 이후 얼음 결정의 크기를 측정하여 대조군(동결 방지 소재 없이 용액만 있는 샘플)과 비교해 얼마나 얼음 결정이 덜 성장하였는지를 비교한다.

[135]

[136] **1.2. 양이온이 포함된 수용액 및 구조화되지 않은 DNA 시료의 RI 효과 관측**

[137] 우선, 순수한 증류수에 MgCl_2 만 함유된 버퍼 용액에 대한 RI 측정 실험을 진행하였으며, 이온 농도가 증가함에 따라 얼음 결정 성장이 억제되는 것을 확인하였다(도 7 및 8 참조). 본 실험 결과를 바탕으로, 이후 실험에서의 기준(reference) 버퍼 용액의 MgCl_2 농도는 5 밀리몰(mM)로 하였다. 시료의 RI 성능은 기준 버퍼 대비 시료의 상대적인 RI 성능 비교를 통해 측정되었으며, 값이 작을수록 높은 RI 성능을 의미한다.

[138] 다음으로는, 구조화되지 않은 단일 가닥 상태의 DNA가 존재하는 용액에 대한 RI 측정 실험을 진행하였다. 실험에서 사용한 DNA의 농도는 통상의 제조 공정을 통해 만들어진 DNA 구조체의 농도와 유사한 50 내지 $200\text{ng}/\mu\text{L}$ 로 하였다. 6헬릭스 번들 견고 구조를 구성하는 169종류의 스테이플 DNA가 단일가닥 상태로 섞인 시료의 RI 성능을 측정한 결과 0.87에서 1.0 사이로, 버퍼 대비 거의 얼음 결정 성장 억제 효과가 없음이 관찰되었다(도 9 및 10 참조). 즉, DNA 가닥이 Mg^{2+} 이온을 결집시키는 효과가 있다고 하나, 수용액 속에서 일정한 형상 및 강성을 갖는 구조체를 이루고 있지 않으면 Mg^{2+} 이온을 붙잡아둘 수 없기 때문에 거시적으로는 RI 효과가 거의 발생하지 않는 것을 실험적으로 확인하였다.

[139] 또한 같은 방식으로 수행한 스캐폴드 DNA 시료의 RI 값은 최대 0.7 정도로 측정되었다(도 11 및 12 참조). 스캐폴드 DNA가 스테이플 DNA에 비해 약간의 RI 성능을 갖는 이유는 길이가 긴 스캐폴드 DNA의 특성 상, 전 영역이 단일가닥 상태로 존재하는 것이 아니라, 일부분이 서로 상보성을 갖고 이중가닥으로 결합하는 세컨더리 스트럭처(secondary structure)를 형성하고 있기 때문인 것으로

추정된다.

[140]

[141] **1.3. 구조화된 DNA 오리가미 설계**

[142] 이제 DNA 가닥끼리 밀집하게 연결되어 일정한 단면 형상 및 강성을 지니는 DNA 구조체에 대한 실험을 진행하였다. DNA 오리가미 기법의 예시로 설계된 9종의 구조체는 (1) 4헬릭스 번들 견고 구조, (2) 4헬릭스 번들 유연 구조 (갭 5nt), (3) 6헬릭스 번들 견고 구조, (4) 6헬릭스 번들 유연 구조 (갭 3nt), (5) 6헬릭스 번들 유연 구조 (갭 5nt), (6) 24헬릭스 패치, (7) 12헬릭스 번들 견고 구조, (8) 12헬릭스 번들 굽은 구조 (90°), (9) 12헬릭스 번들 굽은 구조 (45°)이다.

[143] 각각의 구조체에 대한 설계 방법은 아래와 같다.

[144] (1) 4헬릭스 번들 견고 구조 및 (2) 4헬릭스 번들 유연(갭 5nt) 구조

[145] (1)번 및 (2)번 구조체는 단면이 네 개의 이중가닥 DNA로 구성되어 있으며, 한 변이 약 4.5 nm인 정사각형 모양으로 패킹(packaging)되어 있다 (도 13). 약 192nt 길이를 기본으로 하여 같은 형태의 연결이 반복되는 구조를 지니며, 구조체의 총 길이는 약 600 nm이다. (1)번의 견고 구조체는 구조에 존재하는 모든 스테이플 DNA의 양 말단이 직접 맞닿게 설계되었으며, (2)번의 유연 구조체는 150개의 인접한 스테이플 DNA의 양 말단 사이가 5nt의 ssDNA로 구성되어 있다.

[146] (3) 6헬릭스 번들 견고 구조, (4) 6헬릭스 번들 유연 구조 (갭 3nt) 및 (5) 6헬릭스 번들 유연 구조 (갭 5nt)

[147] (3), (4), (5)번 구조체는 단면이 여섯 개의 이중가닥 DNA로 구성되어 있으며, 육각형 모양으로 패킹(packaging)되어 있다 (도 14 참조). 약 168nt 길이를 기본으로 하여 같은 형태의 연결이 반복되는 구조를 지니며, 구조체의 총 길이는 약 400 nm이다. (3)번의 견고 구조체는 구조에 존재하는 모든 스테이플 DNA의 양 말단이 직접 맞닿게 설계되었으며, (4), (5)번의 유연 구조체는 169개의 인접한 스테이플 DNA의 양 말단 사이가 각각 3nt 및 5nt의 ssDNA로 구성되어 있다.

[148] (6) 24헬릭스 패치

[149] (6)번 구조체는 단면이 스물 네 개의 이중가닥 DNA로 구성되어 있으며, 일직선으로 배열되어 시트 형태를 이룬다 (도 15 참조). 구조체의 길이는 256nt로 약 90nm이며, 폭은 약 55nm이다. 구조에 존재하는 192개의 스테이플 DNA의 모든 말단은 직접 맞닿게 설계되었다.

[150] (7) 12헬릭스 번들 견고 구조, (8) 12헬릭스 번들 굽은 구조 (90°), (9) 12헬릭스 번들 굽은 구조 (45°)

[151] (7), (8), (9)번 구조체는 단면이 열두 개의 이중가닥 DNA로 구성되어 있으며, 육각형 격자 모양으로 패킹(packaging)되어 있다(도 16 참조). (7)번 견고 구조체는 180개의 스테이플 DNA의 모든 말단이 직접 맞닿게 설계되었다. (8)번 및 (9)번 구조체는 구조체 중간에 존재하는 스테이플 DNA 11개를 제거하여 42nt 길이의 유연부위를 만들었으며, 구조물 양 끝을 연결하는 DNA의 길이를 각각 357nt 및 189nt로 짧게 하여 구조 가운데를 90도 및 45도로 굽은 모양을 제작하였다.

[152]

[153] **1.4. DNA 오리가미의 제작 및 RI 효과 관측**

[154] 이제 일정한 단면 형상 및 크기를 갖도록 구조화된 DNA 구조체의 얼음 결정 성장 억제 효과를 확인하였다. DNA 오리가미 구조체의 제작 과정은 원재료 및 버퍼를 한데 섞어 80°C로 가열한 후, 65°C까지 1시간에 걸쳐 온도를 낮추고, 이후 25까지 1°C시간 당 1°C씩 온도를 낮추는 열폴림 기법을 이용하였다. 열폴림 기법으로 만들어진 구조체를 따로 분리하기 위해 Amicon사의 원심분리 정제 필터를 이용하여 반응하지 않은 여분의 재료를 걸러내었다. 정제 이후 구조체의 농도는 260nm 파장에서의 흡광도를 이용하여 측정하였으며, 버퍼를 통해 희석시키는 방식으로 목표 농도를 맞추었다.

[155] 상기 설계에 따라 만들어진 구조체의 형상은 원자힘현미경을 통해 측정되었다(도 17, 18 및 19의 첫 번째 열 이미지 참조). 적어도 두 종류의 서로 다른 밀도를 가진 상기 아홉 가지 DNA 구조체에 대하여 30분 동안 영하 6°C에서 얼음 결정 성장 과정을 관찰한 RI 실험을 수행한 결과, 최대 0.53의 RI값이 측정되었다(도 20 참조). 단면의 면적이 가장 좁은 4헬릭스 번들(1,2번 샘플)에 비해 나머지 샘플이 더 높은 RI성능을 보였으며, 구조체의 농도가 높을수록 전반적으로 RI성능이 향상되는 경향을 보였다. 이는 단면 넓이가 일정 수준이 되어야 RI성능이 발휘될 만큼 Mg^{2+} 이온을 충분히 결집시킬 수 있고, 수용액 상에서 구조체의 개수가 많을수록 얼음 결정 성장을 억제할 수 있는 영역이 증가하기 때문인 것으로 보인다. 6헬릭스 번들 견고 구조에 대하여 30분 이후 얼음 결정 성장 과정을 관찰한 결과, 2시간 정도 경과 시 소재가 포함되어 있지 않은 버퍼의 얼음 결정과 비슷한 크기로 성장하는 것을 관측하였다(도 21 참조).

[156] 일련의 실험을 통해 양이온이 결집된 DNA 구조체를 포함한 조성물은 구조체를 형성하고 있지 않은 DNA와 대비하여 더 높은 얼음 결정 성장 억제 효과를 발휘할 수 있음을 실증하였다.

[157]

[158] **2. DNA-PNA-펩타이드 오리가미 구조체 제작**[159] **2.1. DNA-PNA-펩타이드 오리가미 구조체 설계**

[160] DNA-PNA-펩타이드 구조체를 스캐폴드 DNA, 스테이플 DNA, handle, Cy3 dye 및 PNA-펩타이드 결합 부위를 가지도록 하여 설계하였다(도 22 참조).

[161]

[162] **2.2. DNA-PNA-펩타이드 오리가미 구조체 제작(도 23 참조)**

[163] PNA-peptide 프로브가 부착된 구조체를 만들기 위해서는 구조체를 구성하는 모든 핵산 재료인 스캐폴드 DNA, 핸들이 포함된 스테이플 DNA와 PNA-펩타이드를 동시에 혼합하였다. 이후 DNA 오리가미 구조체의 제작과정과 동일한 열폴림 과정을 거쳐 DNA 오리가미의 핸들 부위에 PNA-peptide 프로브가 부착된 DNA-PNA-펩타이드 구조를 형성하였다. 상기 형성된 DNA-PNA-펩타이드 구조체의 정제 과정 역시 DNA 오리가미 구조체와

동일하게 진행되었다.

[164]

[165] **3. 각 DNA 구조체에 의한 세포보호 성능 확인**

[166] **3.1. 실험 재료 및 조건**

[167] 본 발명의 실시예는 암세포인 HSC-3 세포를 이용하여 실시되었다. 실험에서 사용한 핵산 오리가미 구조체의 농도는 100ng/uL 및 200ng/uL로 하였으며, 펩타이드 프로브를 부착시킨 경우 최대 300ng/uL로 하였다. 세포 배양액과 상기 동결보호 소재를 9:1의 부피비로 혼합하여, 세포 실험에 쓰인 최종 소재의 농도는 10ng/uL에서 30ng/uL로 하였다.

[168] 먼저 핵산 오리가미 구조체에 대해 펩타이드 프로브 없이 구조 자체만의 동결보호 효과를 측정하였으며, 이후 동결 방지 펩타이드인 알라닌(alanine) 및 트레오닌(threonine)이 붙은 PNA 프로브를 이용하여 DNA-펩타이드 복합 소재에 대한 동결보호 성능측정 실험을 진행하였다.

[169] 세포보호 성능 확인에 사용된 핵산 오리가미의 모양은 (1) 4헬릭스 번들 구조, (2) 6헬릭스 번들 구조, (3) 12헬릭스 번들 구조, (4) 24헬릭스 패치 구조를 이용하였으며, 상기 설계에 따라 만들어진 구조체의 형상은 원자힘현미경을 통해 측정되었다(도 24 참조).

[170]

[171] **3.2. 식염수 및 세포배양액 조건에서 구조 안정성 확인**

[172] DNA 오리가미 구조체가 세포와 상호작용하는 기간 동안 구조를 유지할 수 있는지 확인하기 위해, 10% 인산완충생리식염수(PBS) 및 DMEM 세포배양액에 DNA 구조체를 9:1의 비율로 혼합하여 최대 8시간 동안 37°C에서 인큐베이션 하였다.

[173] 0, 1, 2, 4, 및 8시간째에 인큐베이션을 완료하고 원자힘현미경(AFM) 및 아가로스 젤 전기영동을 통해 DNA 구조체의 모습을 관찰하여 구조적 안정성을 확인하였다(도 25, 26 참조).

[174]

[175] **3.3. 세포 흡수 여부 확인**

[176] 제작된 패치 구조가 세포의 내/외부에 흡수 및 부착되는지 여부를 공초점 형광현미경을 통해 확인하였다(도 27 참조).

[177] 형광 표지로 세포핵 염색에는 Hoechst 33258, DNA 오리가미 소재에는 Cy3를 이용하였다. 핵은 파란색으로, 오리가미가 위치하는 곳은 마젠타색으로 표시되었다.

[178] DNA-PNA-펩타이드 패치가 포함된 용액을 세포 배양액의 10% 비율로 섞어 인큐베이션 하고, 인큐베이션 직후, 1시간 경과 이후, 2시간 경과 이후 각각 관찰한 결과, 인큐베이션 시간이 지남에 따라 점차 세포 내/외부에 존재하는 패치의 양이 증가하는 것을 확인하였다.

[179]

[180] **3.4. 세포 생존율 확인**[181] **3.4.1. 동결 직후 해동 시 현미경을 통한 세포 생존률 변화 확인**

[182] 먼저 일반 DNA 패치 구조의 동결보호 성능을 현미경을 통해 확인하였다. 세포를 PBS 10% 및 DNA 패치 구조와 섞어 인큐베이션 시킨 후, RI 실험과 유사하게 냉동 후 해동 과정을 거치며 세포의 생존 여부를 이미지를 통해 확인하였다. 실험 결과 PBS 상태에서는 거의 모든 세포가 파괴된 반면, DNA 패치 구조와 혼합된 경우 상당 수의 세포가 생존하는 것을 확인하였다(도 28 참조).

[183]

[184] **3.4.2. 24시간 동결 보존 후 해동시 MTT assay를 통한 세포 생존율 확인**

[185] 각 DNA 구조체 및 이와 결합한 각 PNA-펩타이드를 포함하는 세포배양액에서 세포를 37°C에서 인큐베이션 하였을 때, 시간에 따른 세포 생존률을 확인하였다(도 29 참조).

[186] 패치(PNA-펩타이드 프로브)를 포함하는 샘플들의 경우, 2시간 인큐베이션하는 경우에 제일 높은 세포 생존율을 보였다. 이 중, 트레오닌 5개(Thr x5) 프로브가 달린 300 mg/ul 농도의 DNA 구조체를 2시간 액체질소 온도에서 인큐베이션 하고, 24시간 동결보존 후 해동하였을 때, 전체 샘플 중 가장 높은 세포 생존율을 보였다.

[187] 반면, 번들 형태의 구조체의 경우, 인큐베이션 시간에 따라 세포 생존율이 증가하는 경향을 보였다.

[188] 각 DNA 오리가미 구조체 샘플들과 동결보존제 DMSO 10%의 세포생존율을 대비하여 확인하였다(도 29 참조).

[189] 단층 형태의 패치 구조가 가장 뛰어난 세포 보호 성능을 보였으며, 이는 소재의 부피 대비 단면적이 가장 넓고 구조가 유연하기 때문에 세포막과 효율적으로 상호작용하여 동결보호 성능을 보이기 때문인 것으로 파악되었다.

[190] 패치 구조에 알라닌 및 트레오닌 펩타이드를 부착한 소재의 경우, 훨씬 높은 동결보호 성능을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 동결보호 성능이 있는 펩타이드가 세포 내부 및 주위에서 우수한 얼음결정 형성 및 성장 억제 성능을 발휘하는 것을 확인하였다. 96개의 프로브를 이용하여 트레오닌을 부착한 소재의 경우 상용 동결보호제인 DMSO 10%보다 뛰어난 성능을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

[191] **3.4.2. 장기간 동결 보존 후 해동시 세포 생존율 확인**

[192] 제일 높은 세포생존율을 보였던 2시간 인큐베이션 하는 실험 조건을 기본으로, 24시간 보다 더 장시간 동결 보존 시의 결 세포생존율 확인을 위해 액체질소 온도에서 한달 간 동결 보존 후 해동하여 세포생존율을 측정하였다(도 30 참조).

[193] 그 결과, 24시간 동결 보존한 결과와 마찬가지로 Thr x5 프로브가 달린 DNA 구조체의 세포생존율이 제일 높았으며, 200ng/ul 및 300ng/ul의 농도에서 DMSO 10%의 대조군에 비해 여전히 더 높은 성능을 유지하고 있음을 확인하였다. 이를

통해 오리가미 구조체를 이용한 동결보존제가 장기간 동결 보관에도 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[194]

[195] **3.5. In-situ 에서의 RI 및 세포 상태 확인**

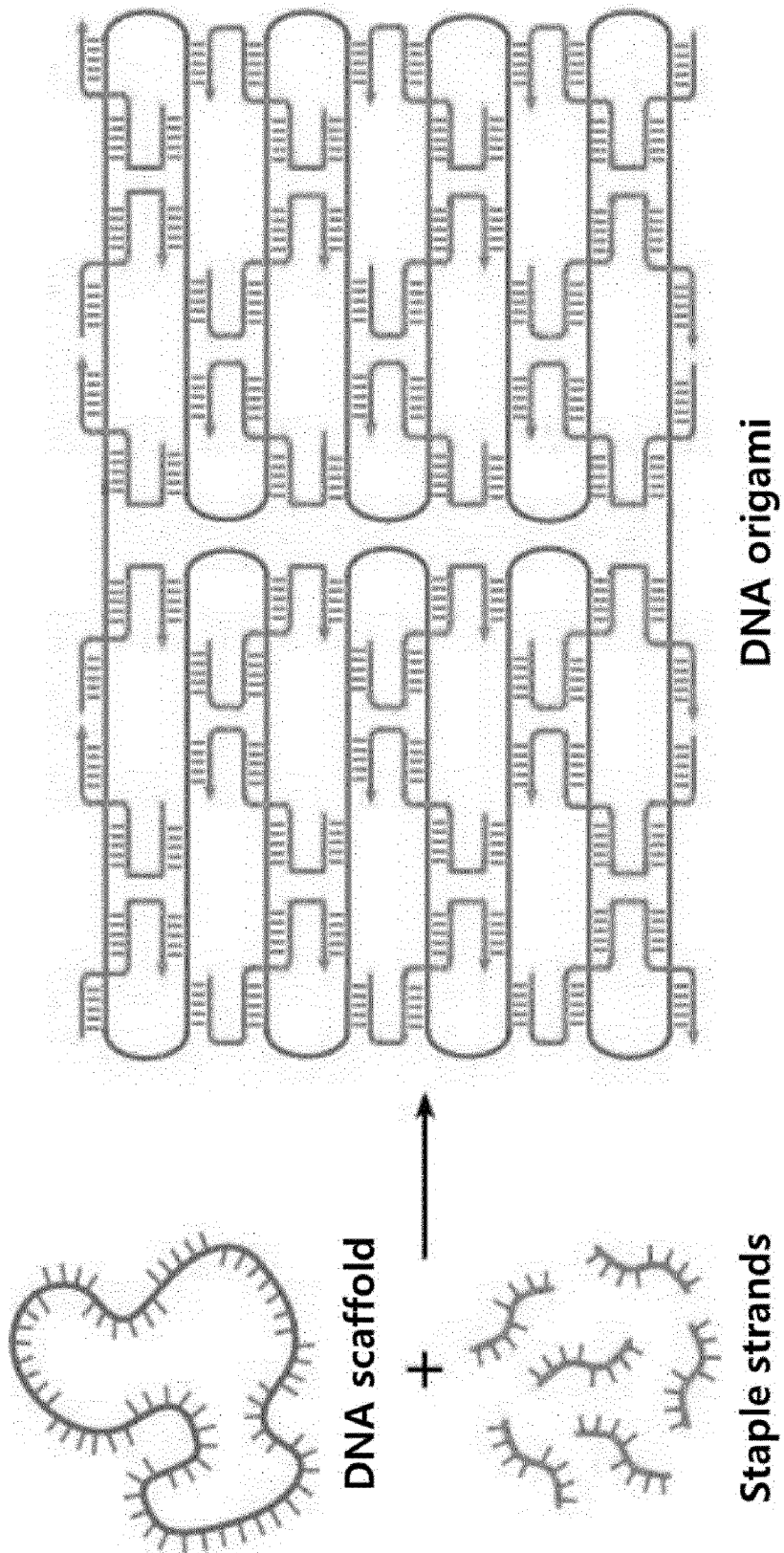
[196] 실시예 1.1에서의 실험 방법과 유사하게, -6 °C에서 30분 동안 세포 내부에서의 소재의 RI 성능 측정 실험을 진행하였다. 세포의 세포핵 부분(파란색 염색), 세포질 부분(녹색), 세포막 부분(적색)을 각각 염색한 후 형광현미경을 통해 온도 변화에 따른 특성을 관찰하였다. 대조군(PBS 버퍼)의 경우, 저온 동결을 거친 세포의 핵은 손상이 일어나 모양이 일정하지 않아 핵을 확인하기 어려웠다. 세포질의 경우 RI 측정 과정에서 세포 내부의 얼음 결정의 크기가 급격히 증가하여 해동 이후 거의 남아 있지 않아, 세포 손상으로 인해 세포질의 대부분이 사라졌음을 확인할 수 있었다. 또한, 세포막은 초기에 찌그러진 상태를 보이다가 파괴되는 것을 확인할 수 있었다(도 31 참조).

[197] 패치 구조를 10% 농도로 세포배양액과 혼합한 실험군의 경우, 저온 동결을 거친 세포의 핵은 초기와 유사하게 유지되는 것을 확인하였다. 세포질을 통해 관찰한 세포 내 얼음 결정의 크기 역시 대조군에 비해 훨씬 작은 것을 통해, 소재가 세포 내부에서도 얼음 결정의 성장을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다. 또한 동결 이후 해동한 상태에서도 세포질의 밝기가 유지되는 것을 통해 세포의 손상이 매우 적음을 확인할 수 있었으며, 세포막 형광 이미지에서도 동결 및 해동 이후 비슷한 형태를 유지하고 있는 것을 통해 소재의 세포 동결보호 효과를 관측하였다.

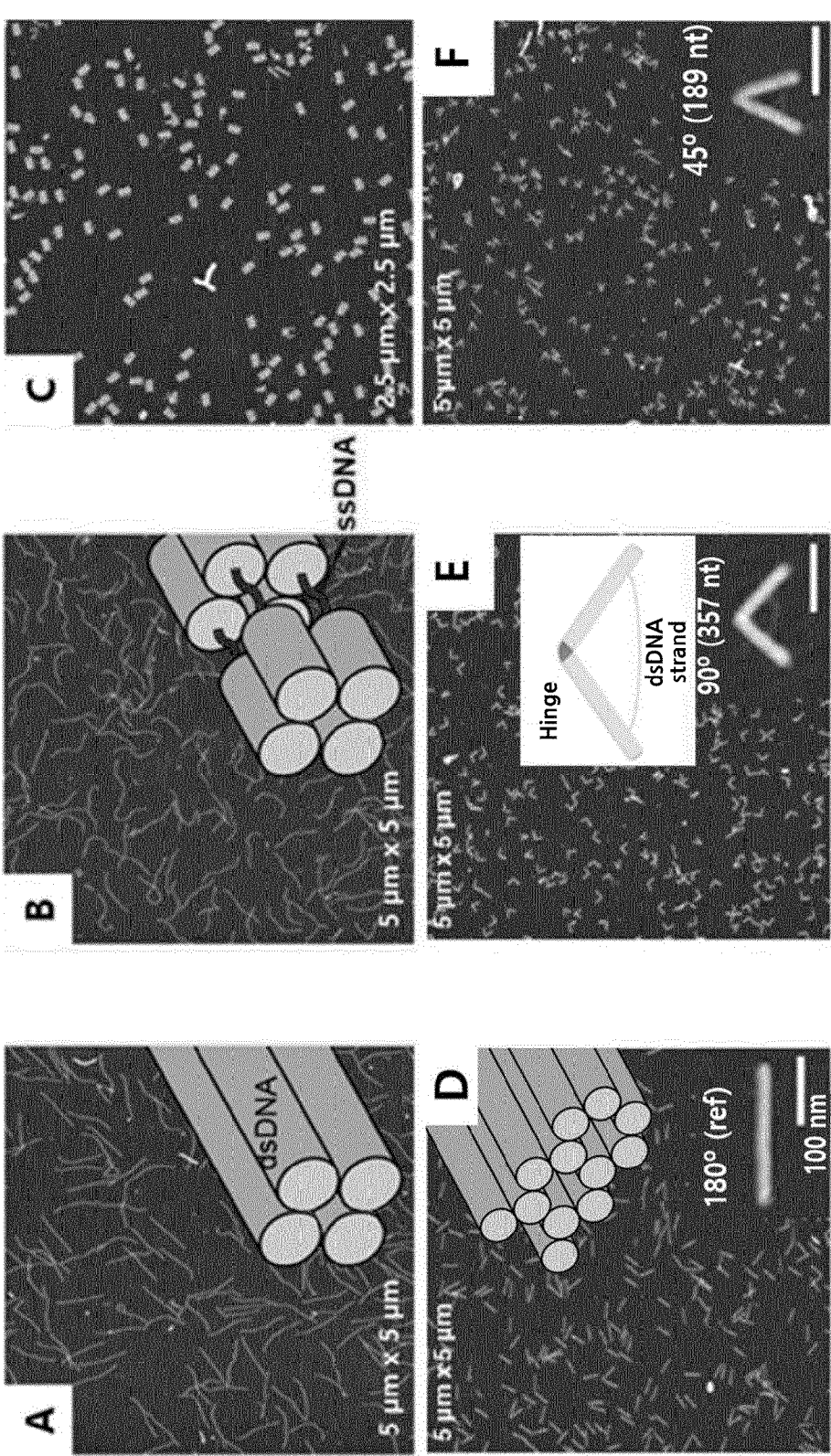
청구범위

- [청구항 1] 기결정된 위치에서 접혀 복수개의 가닥을 이룬 스캐폴드 핵산, 그 서열 중 적어도 일부가 상기 스캐폴드 핵산과 상보적인 서열을 가져, 상기 스캐폴드 핵산의 가닥 중 적어도 하나에 결합되어 이중 가닥을 형성하는 복수개의 제1 스테이플 핵산 및 그 서열 중 적어도 일부는 상기 스캐폴드 핵산과 상보적이고, 적어도 일단은 그렇지 않아, 상기 스캐폴드 핵산의 가닥 중 적어도 하나에 결합되어 이중 가닥 및 말단에 단일 가닥을 형성하는 복수개의 제2 스테이플 핵산을 포함하는 핵산 구조체; 상기 핵산 구조체의 단일 가닥 중 적어도 하나에 결합된 연결자; 및 상기 연결자 중 적어도 하나에 결합된 동결 방지 펩타이드를 포함하는 동결 보호용 조성물.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 연결자는 DNA, RNA, 또는 PNA인, 조성물.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 연결자는 길이가 5 뉴클레오티드 내지 20 뉴클레오티드인, 조성물.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서, 상기 펩타이드는 길이가 1 내지 10 아미노산으로 이루어진 것인, 조성물.
- [청구항 5] 청구항 4에 있어서, 상기 아미노산은 알라닌 또는 트레오닌인, 조성물.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서, 상기 핵산 구조체는 2개 이상의 나선 다발을 포함하면서, 얼음 결정과 접촉할 수 있는 면을 포함하는, 조성물.
- [청구항 7] 청구항 1에 있어서, 상기 핵산 구조체는 비틀림을 갖거나 곡선의 나선 다발을 포함하는, 조성물.
- [청구항 8] 청구항 1 내지 7 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 세포 또는 조직 동결 보호용 조성물.
- [청구항 9] 청구항 1 내지 7 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 식품 동결 보호용 조성물.
- [청구항 10] 청구항 8의 조성물 존재 하에 대상 세포 또는 조직을 영하의 온도에 노출시키는 단계를 포함하는, 세포 또는 조직의 동결 보호 방법.
- [청구항 11] 청구항 9의 조성물 존재 하에 대상 식품을 영하의 온도에 노출시키는 단계를 포함하는, 식품의 동결 보호 방법.

[도1]

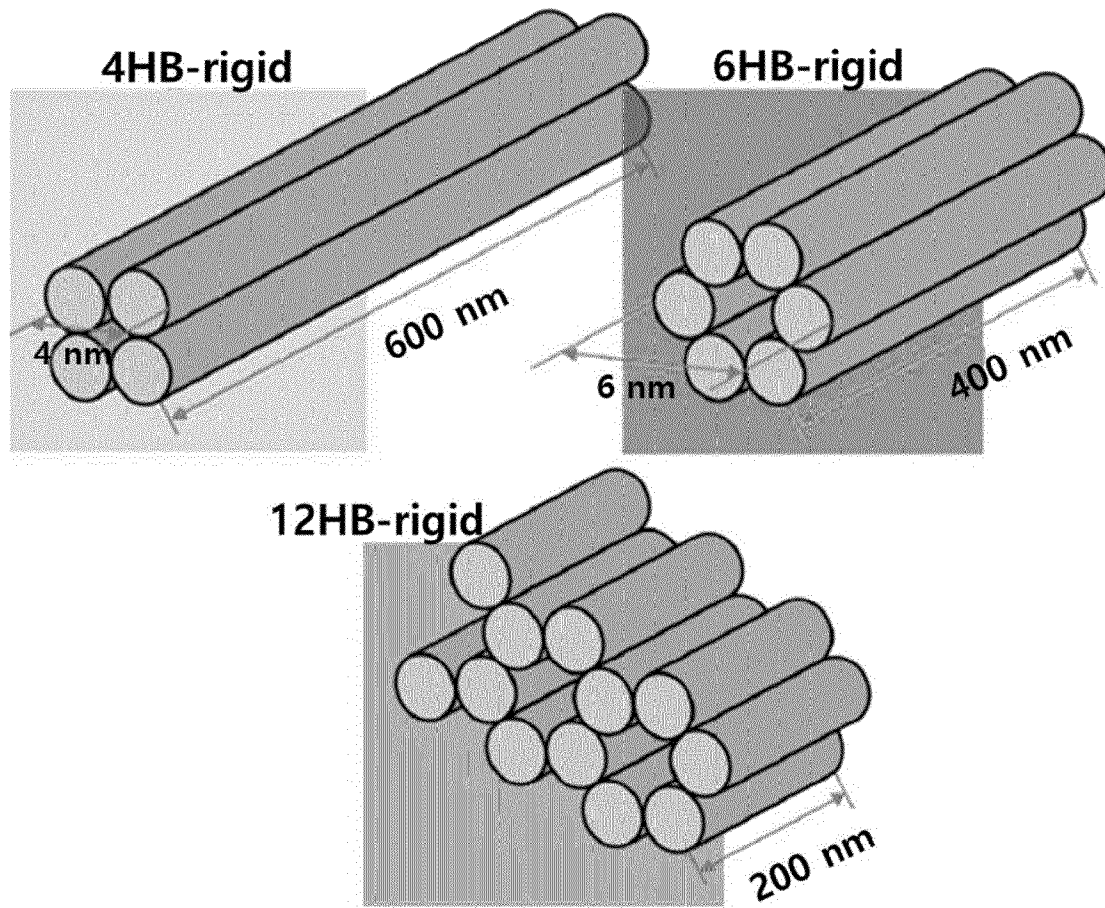


[도2]

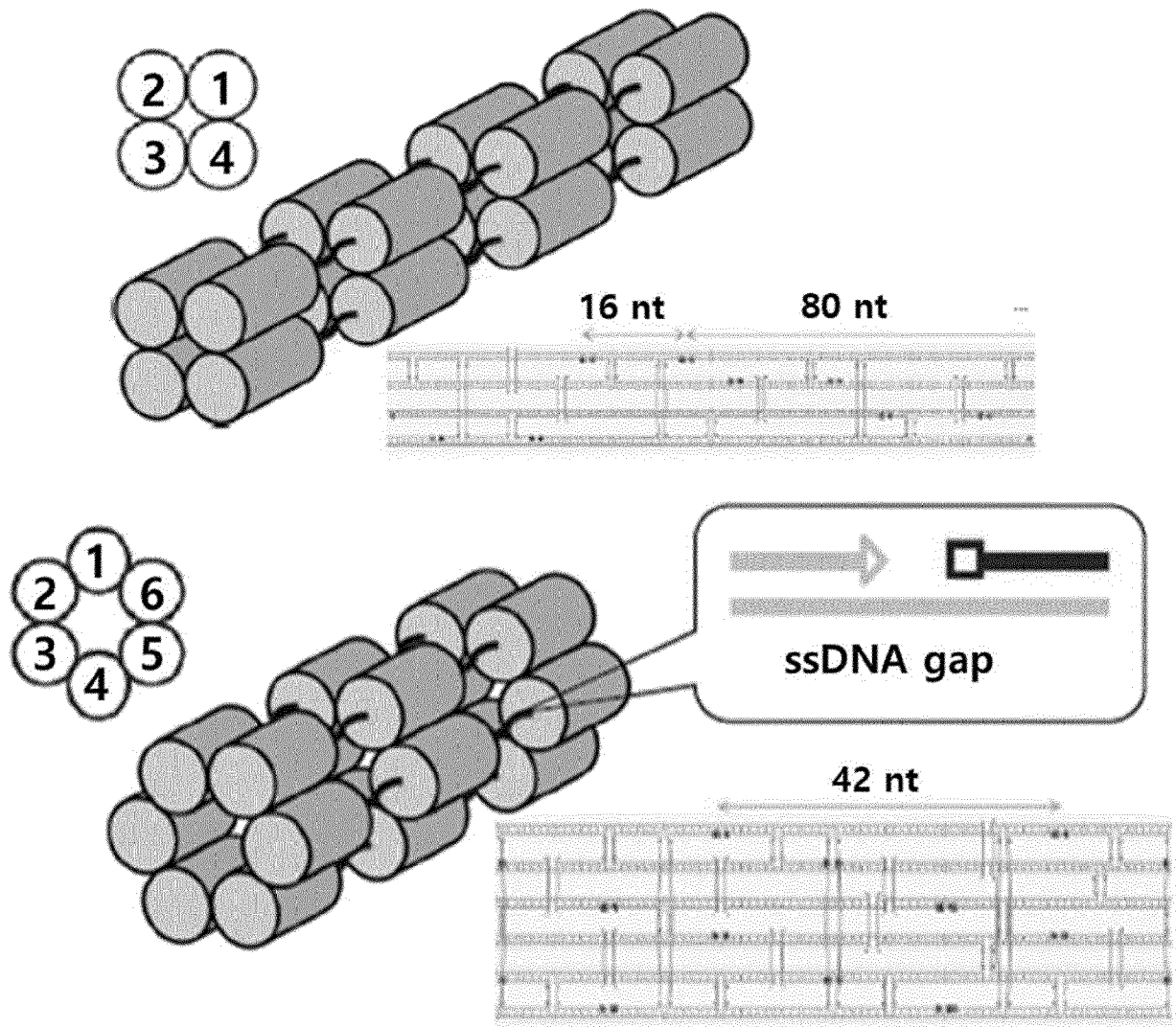


A. 4 Helix Bundle-rigid
B. 4 Helix Bundle-flex (ssDNA gap: 5nt)
C. Rothemund square
D. 12 Helix Bundle-rigid
E. 12 Helix Bundle-bent (90°)
F. 12 Helix Bundle-bent (45°)

[도3]

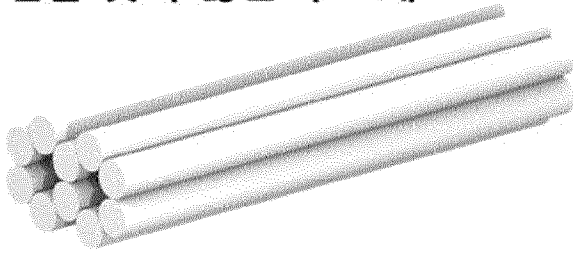


[도4]

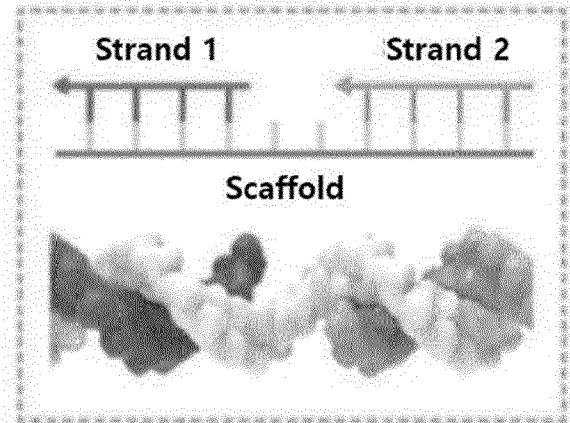
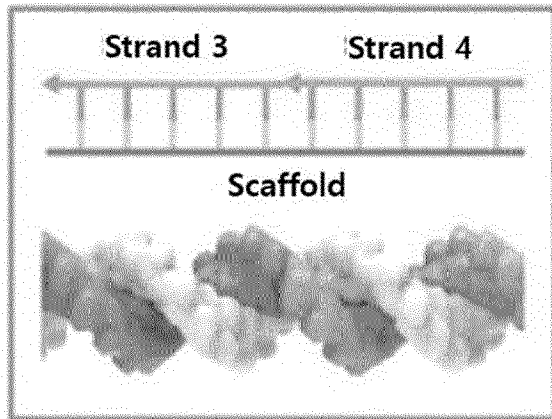


[도5]

갭을 갖지 않는 구조체

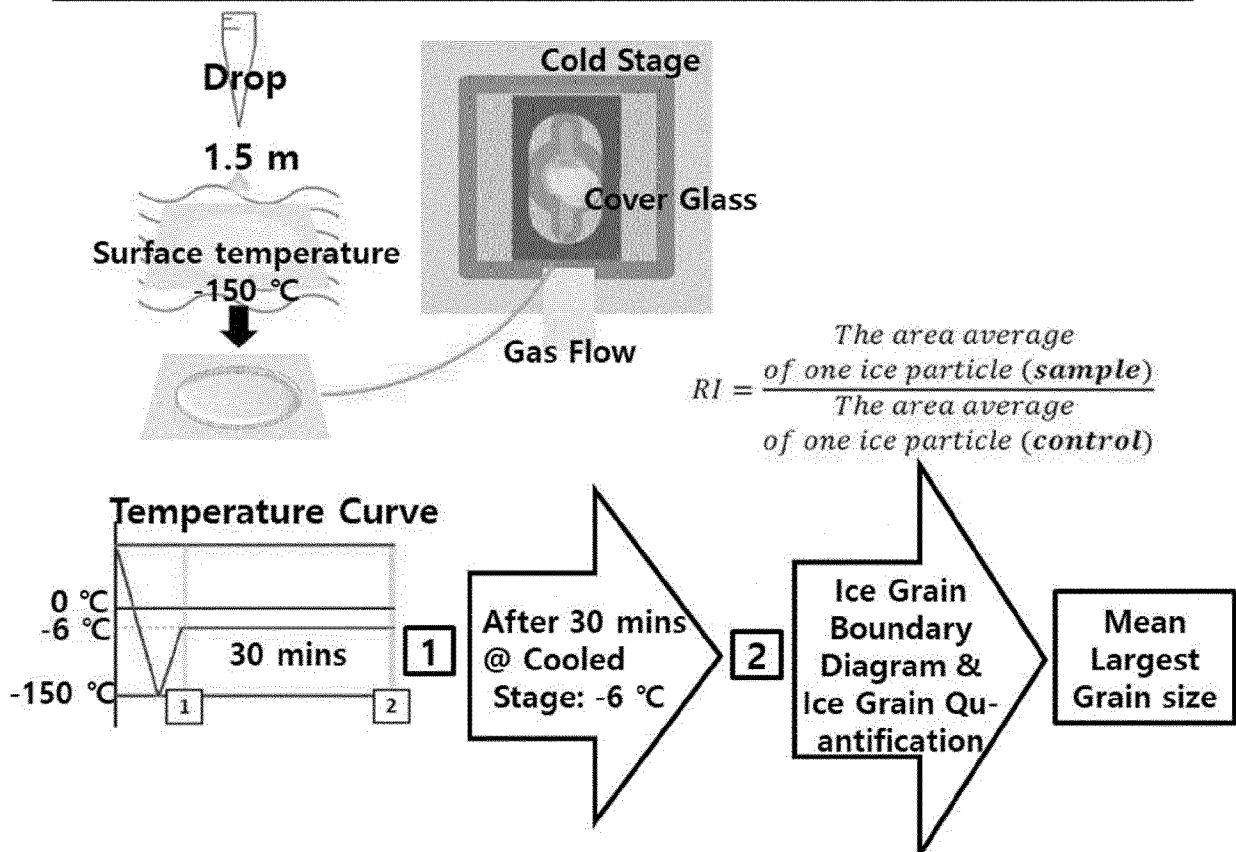


갭을 갖는 구조체

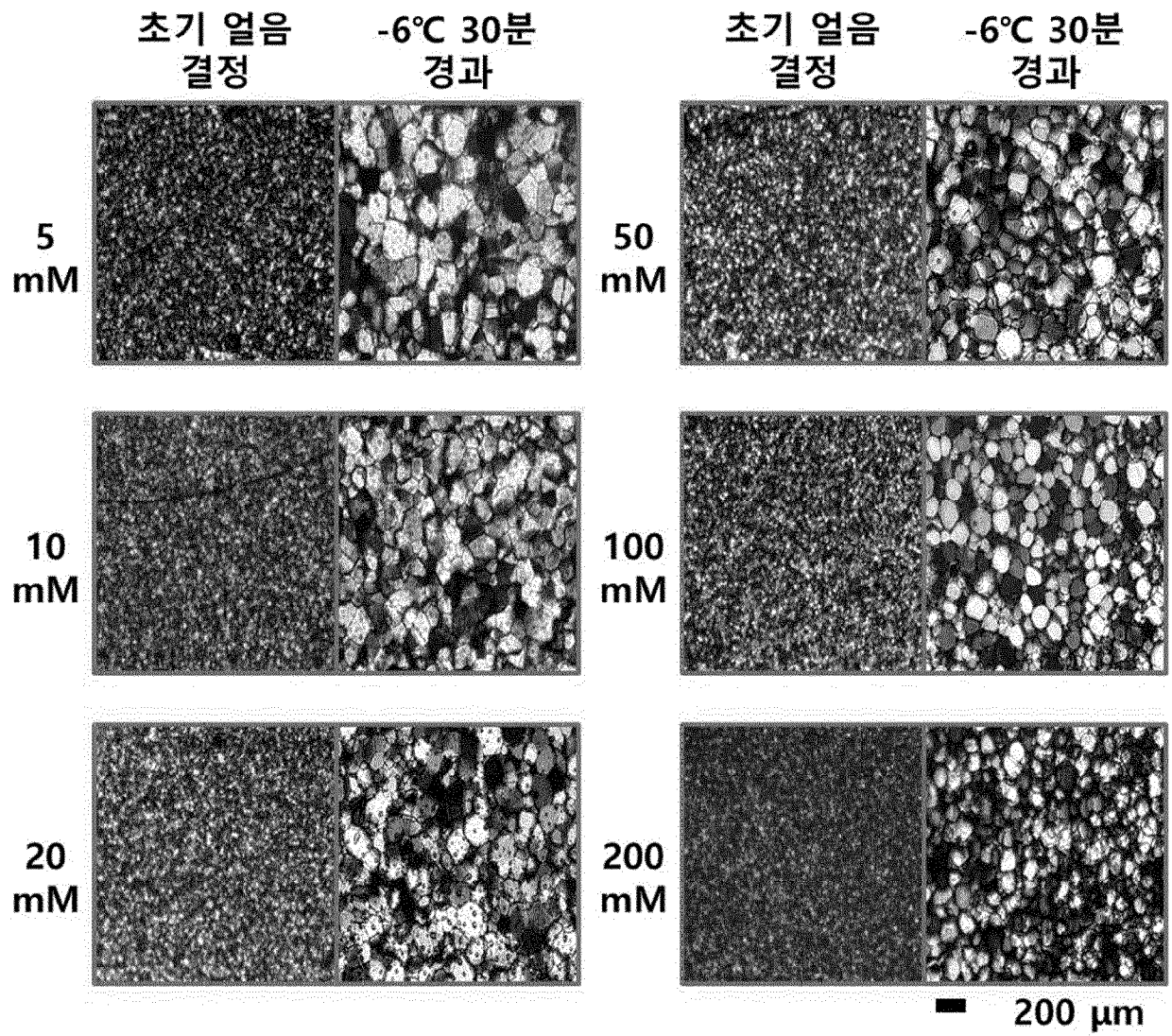


[도6]

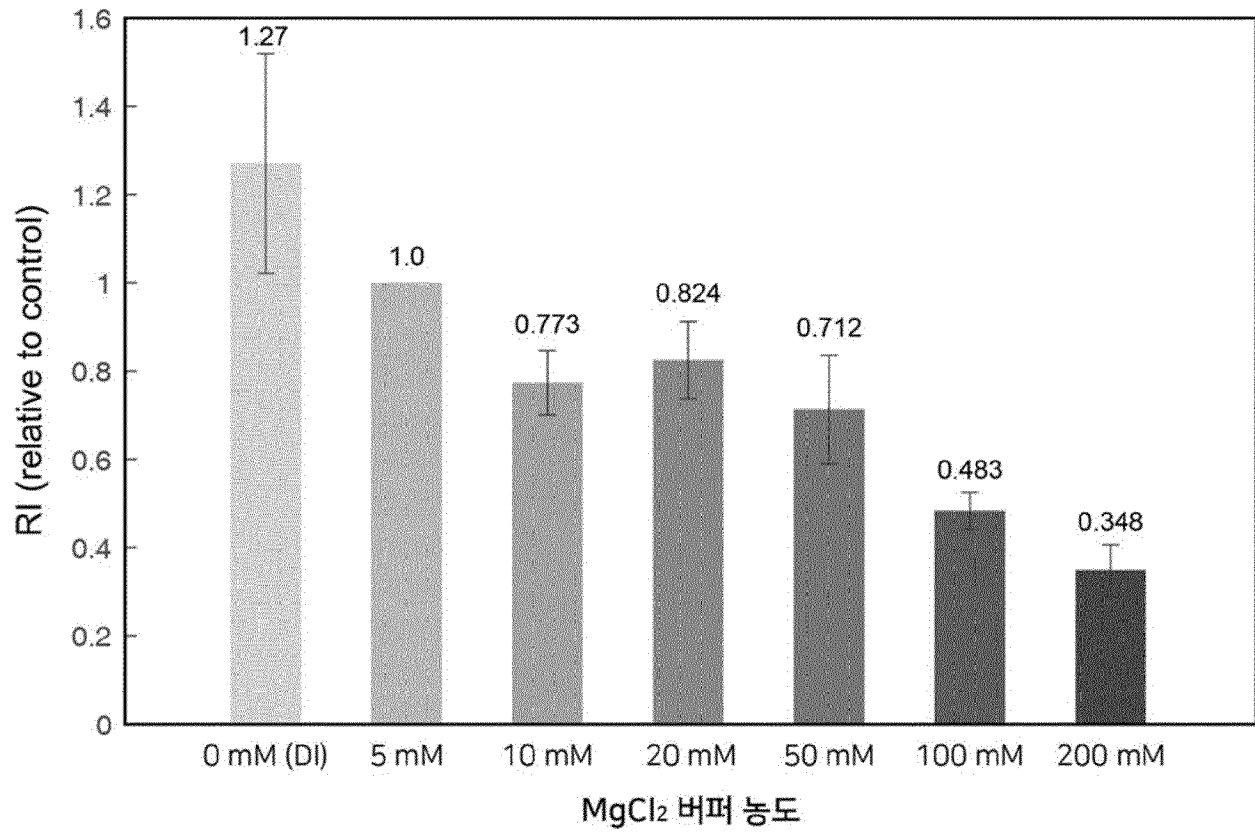
1. Liquid N₂를 이용한 급속 냉동 직후 (-6°C에서 0 min)
2. 1을 -6°C에서 30 mins 관찰 후 (이 때의 Cold box temp: 10°C)
3. ImageJ를 이용한 ice grain 상위 10개 정량화



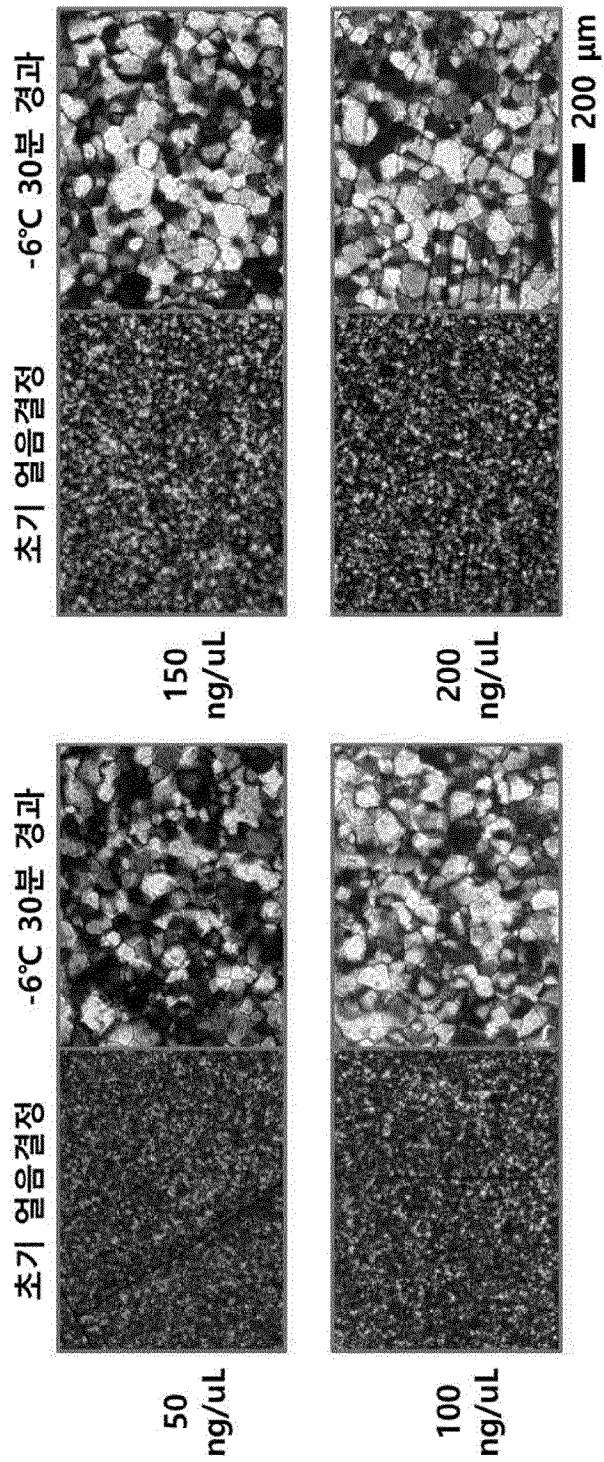
[도7]



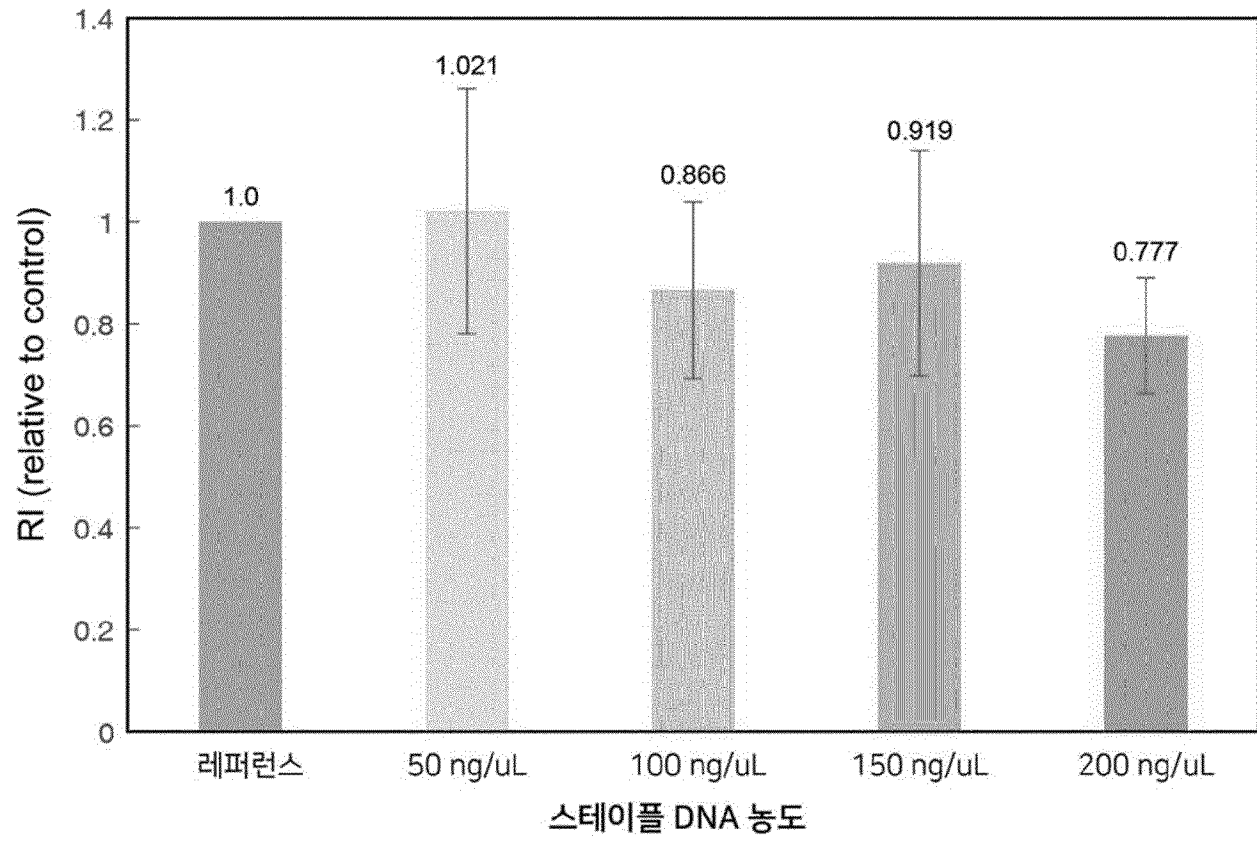
[도8]



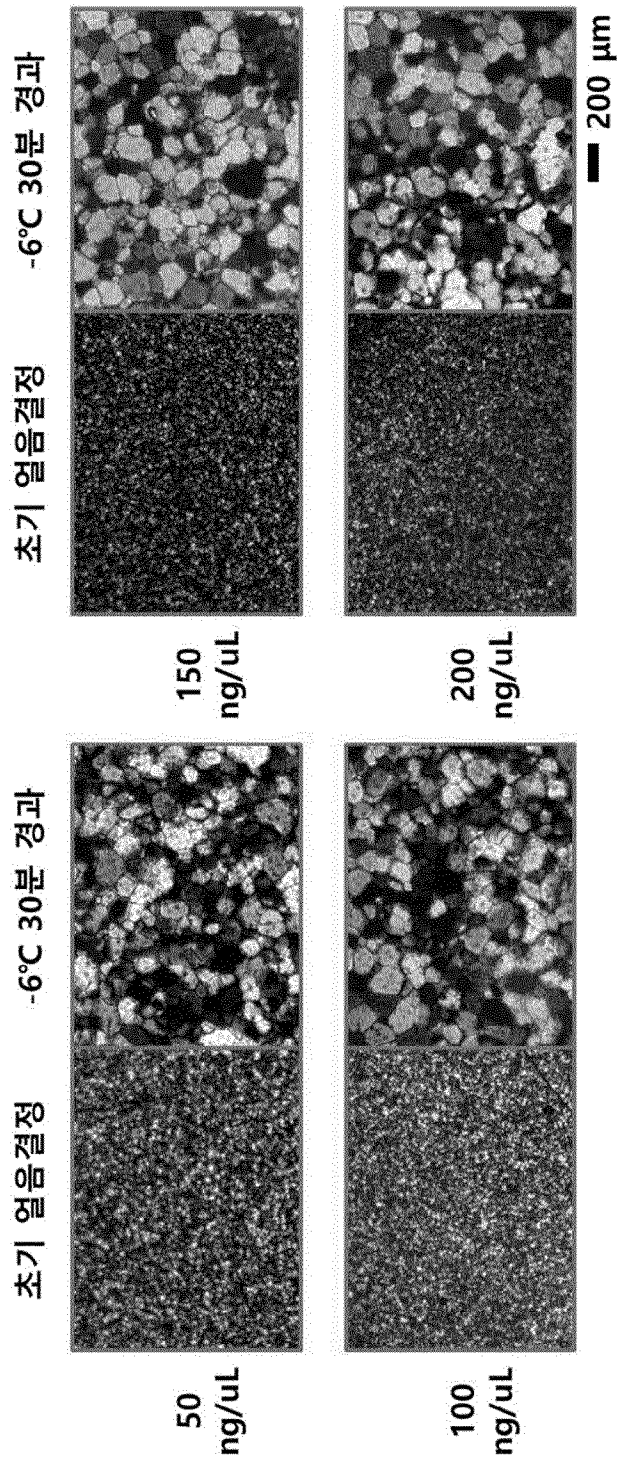
[도9]



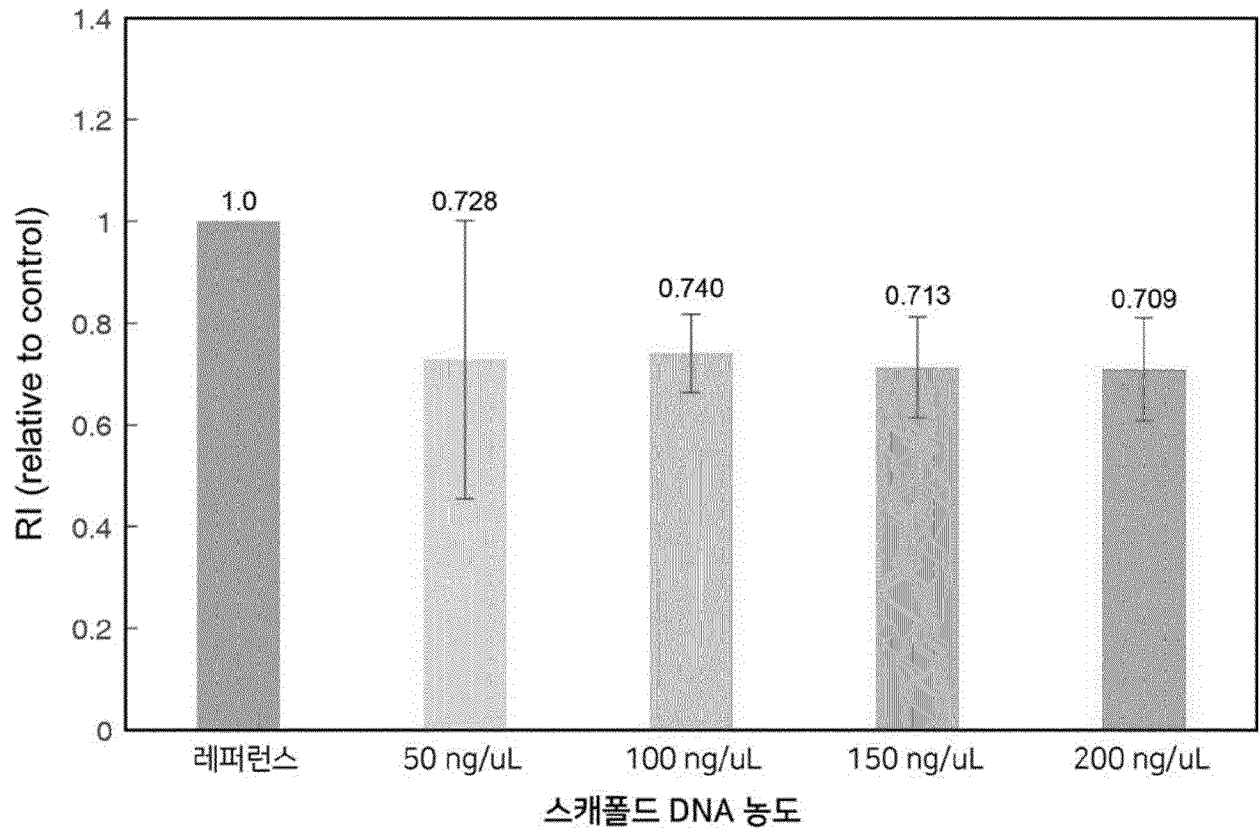
[도10]



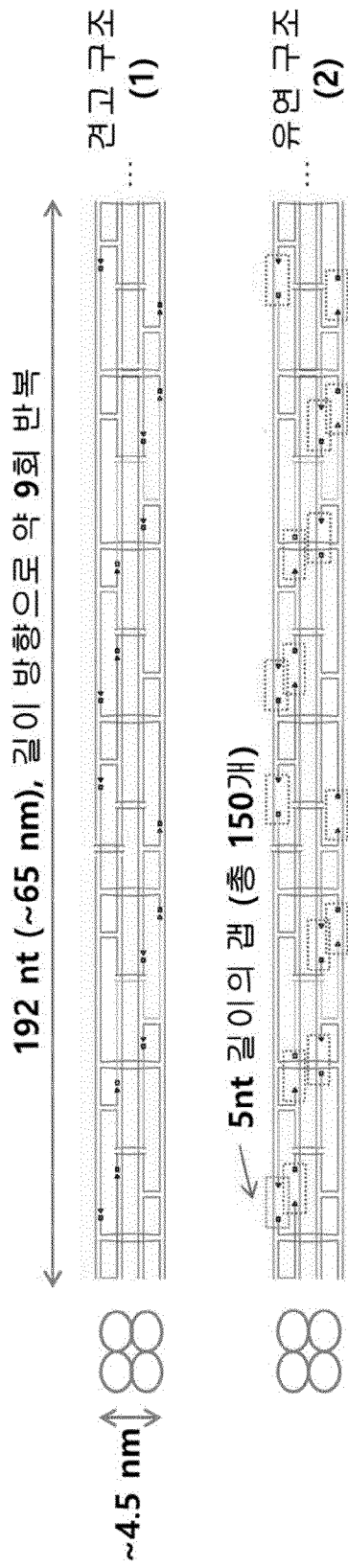
[도 11]



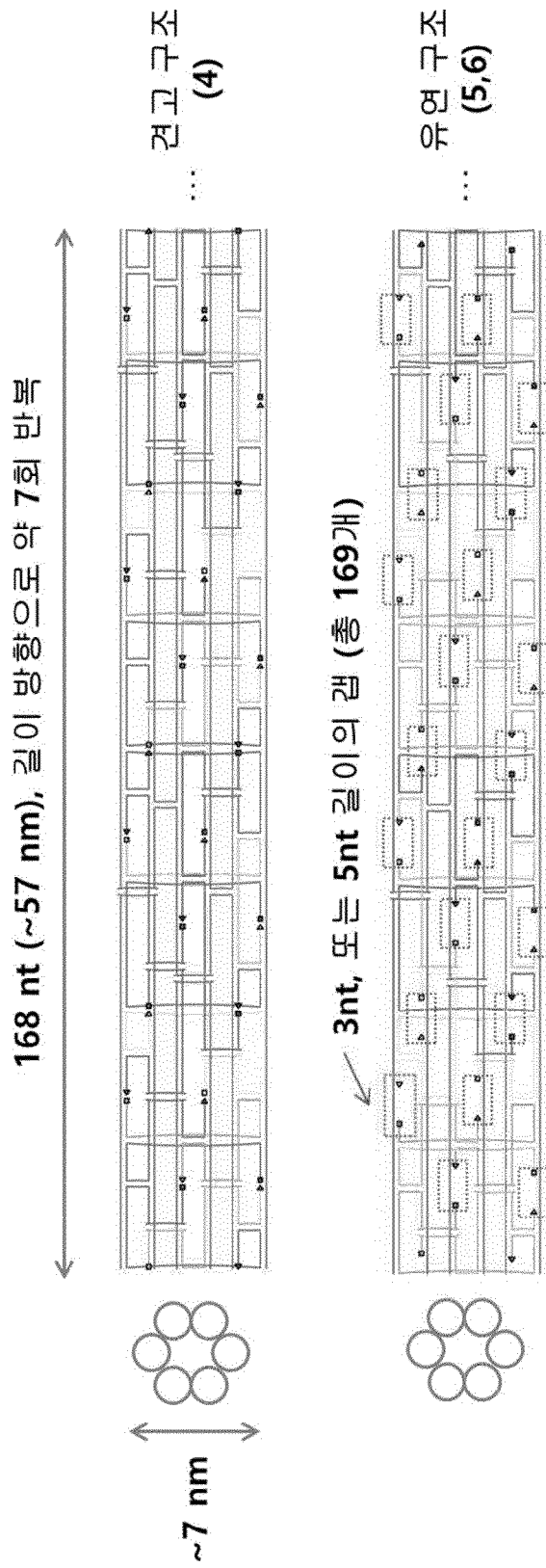
[도12]

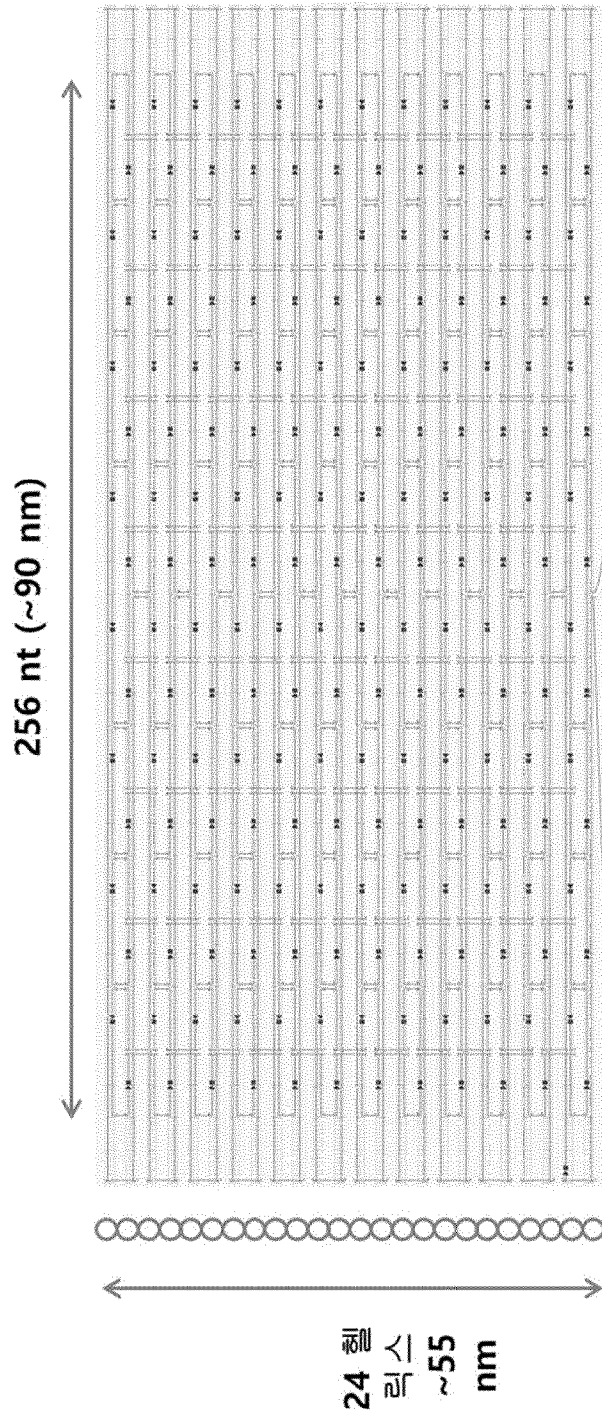


[도13]

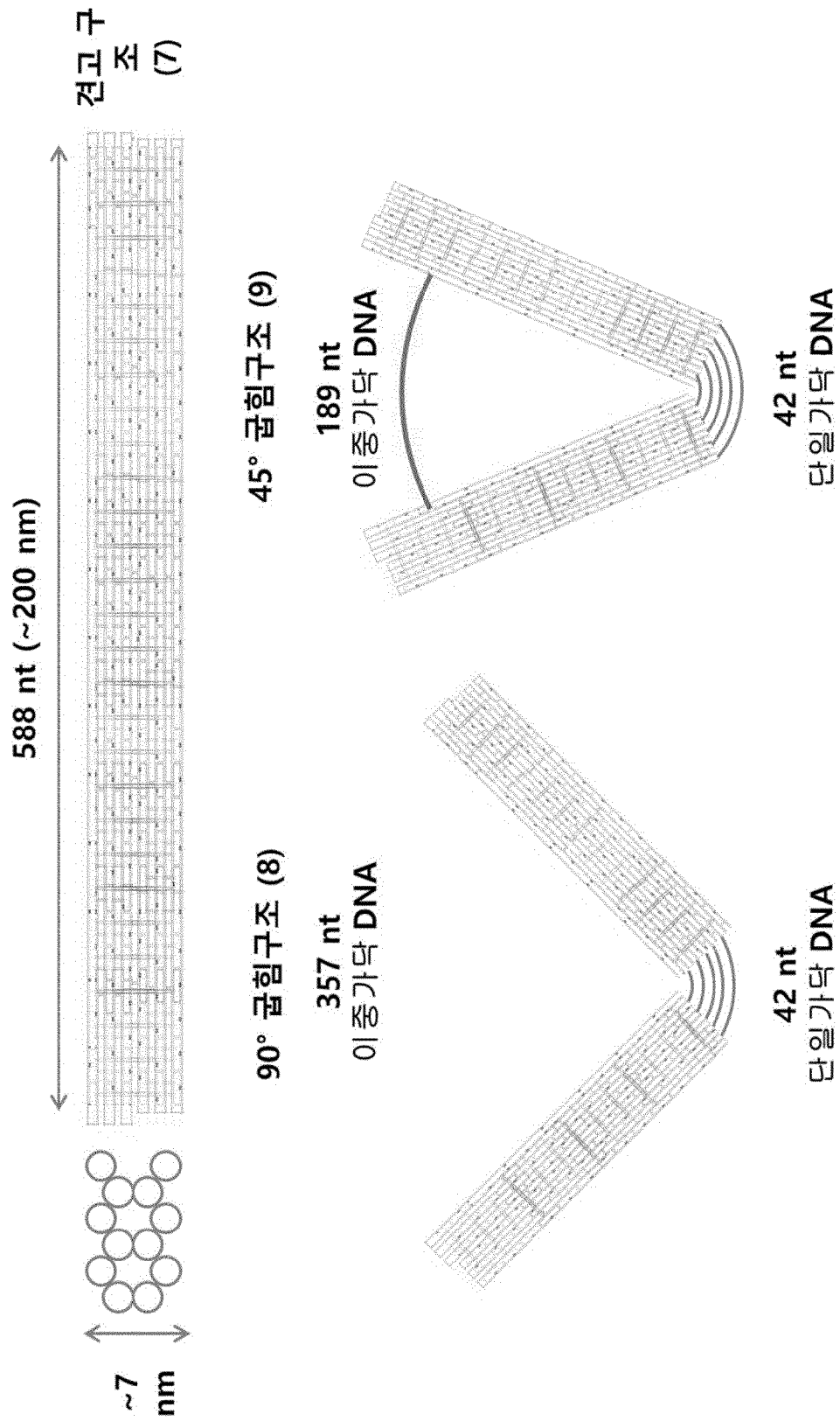


[도14]

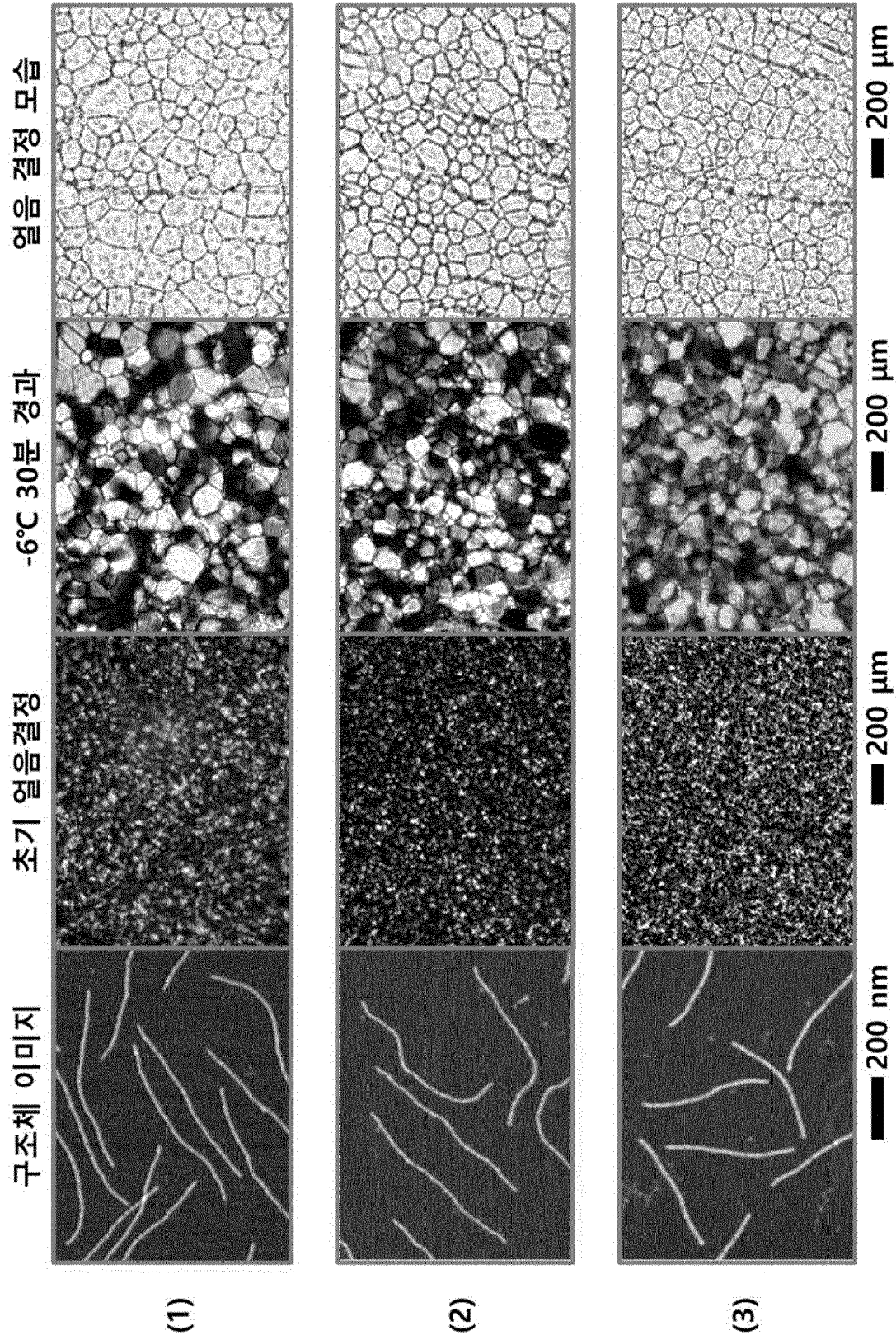


로테문트스
케어(3)

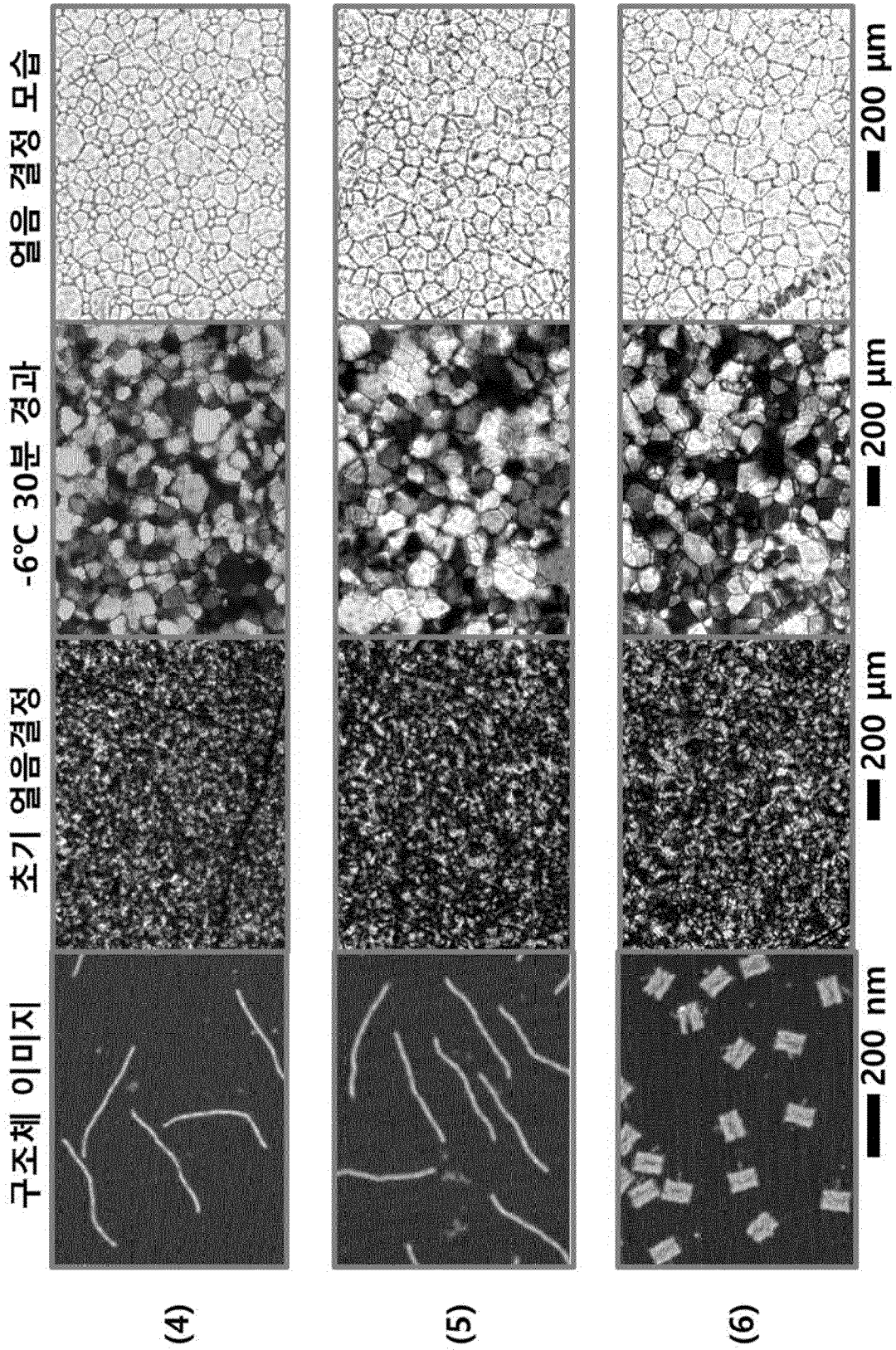
[도16]



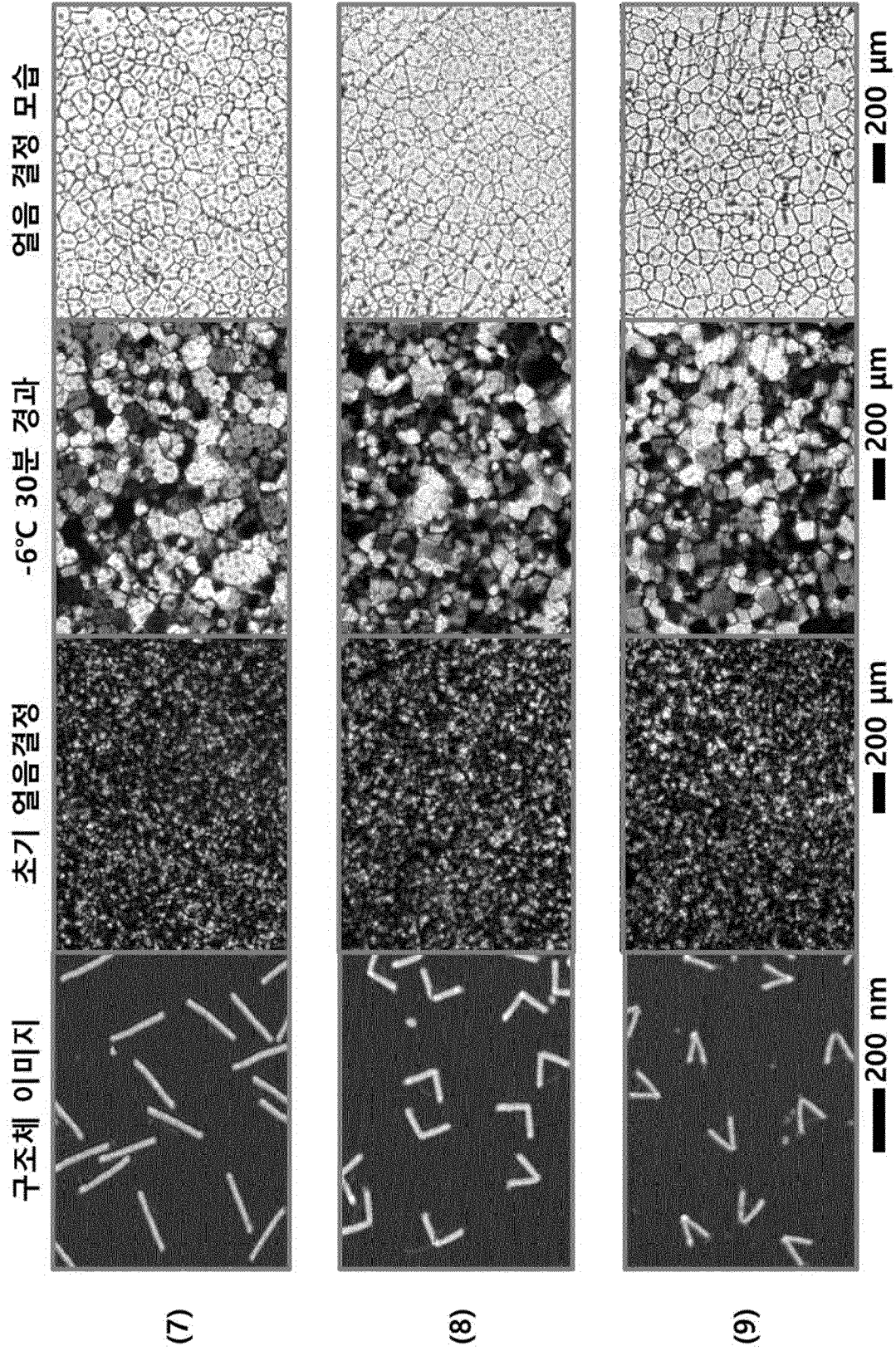
[도17]



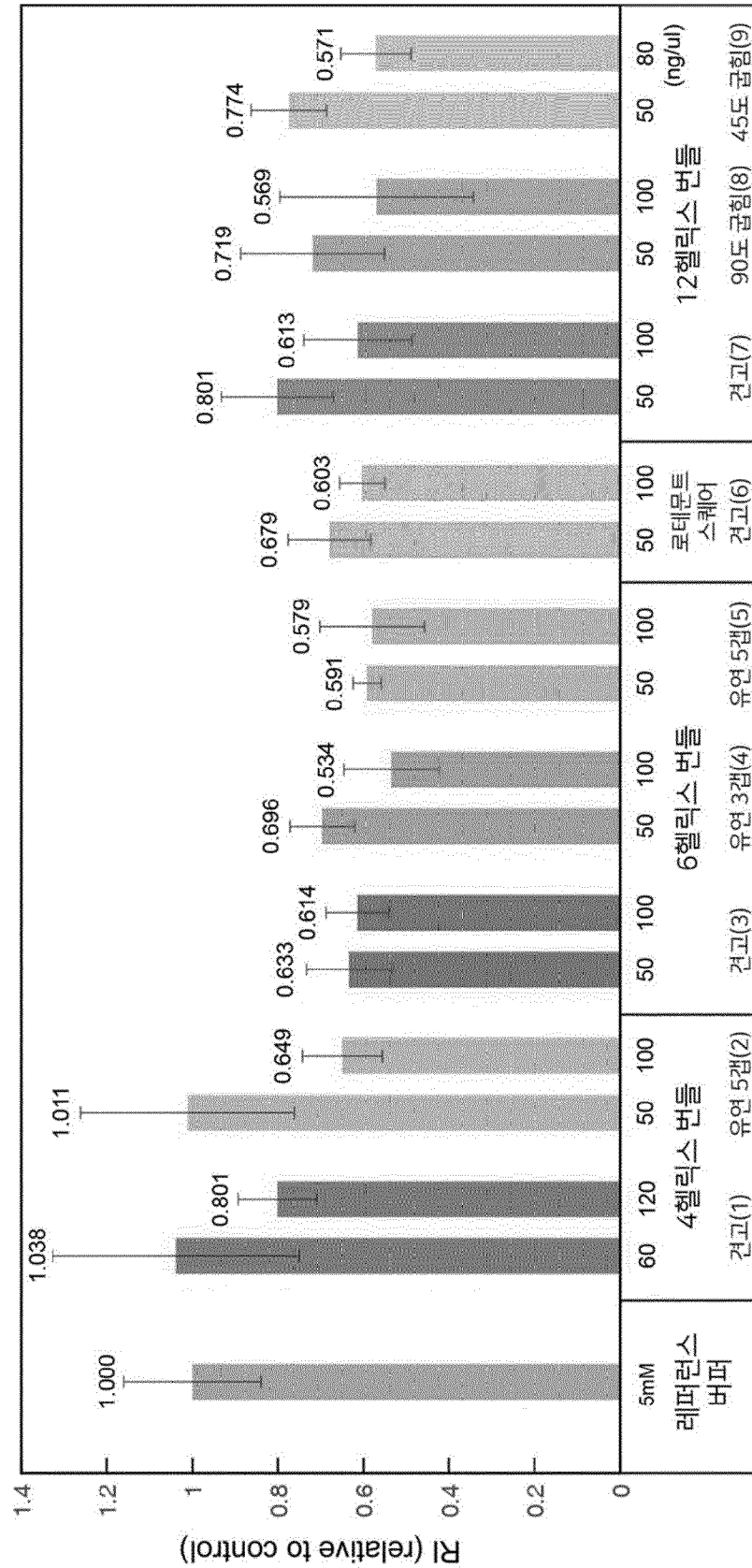
[도18]



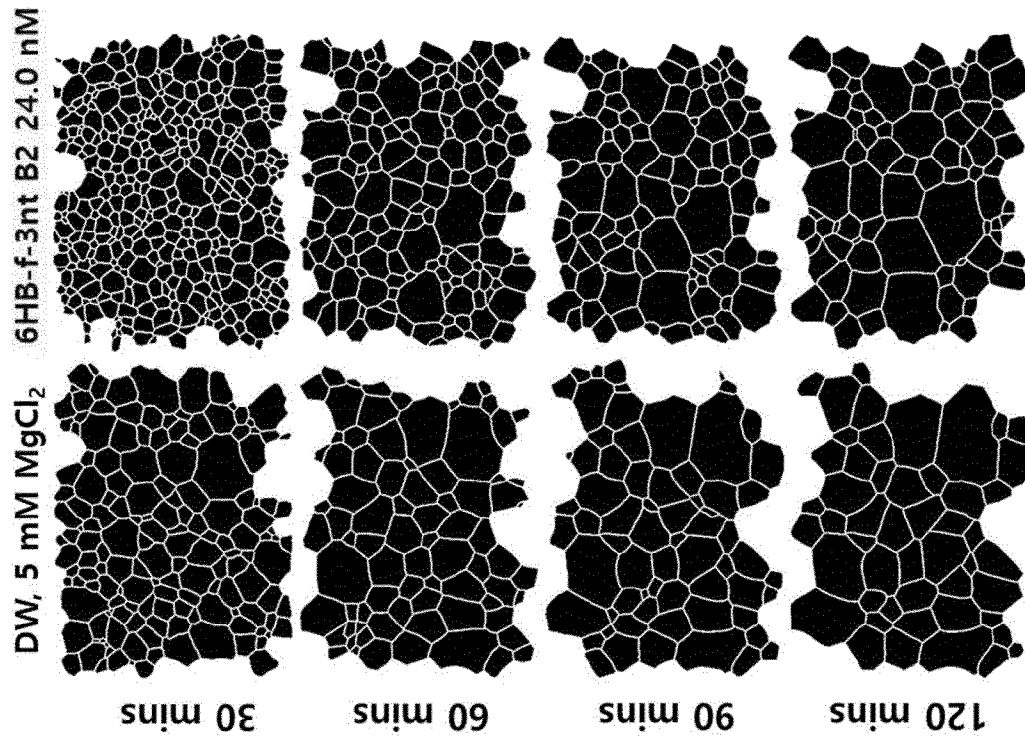
[도 19]



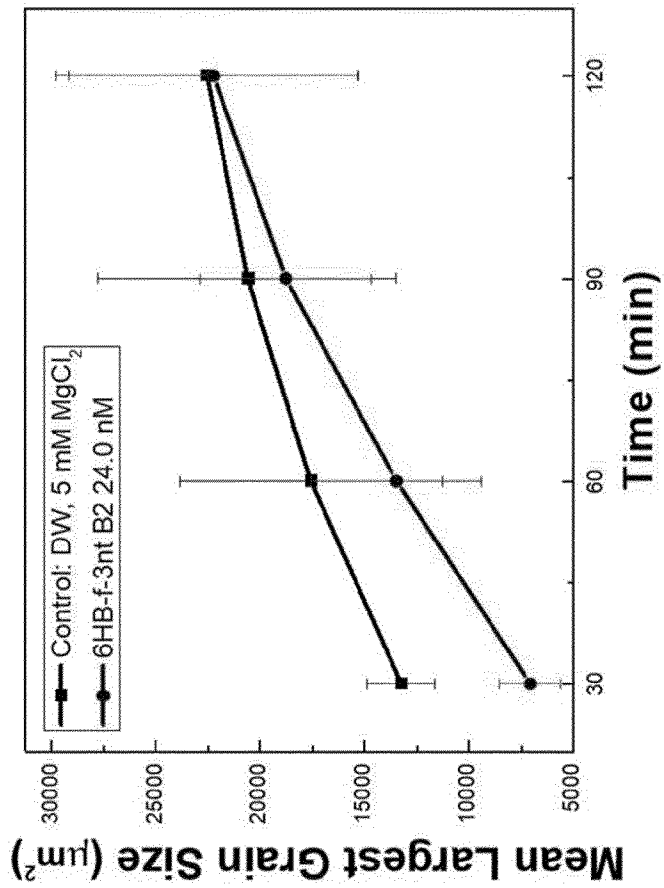
[도20]



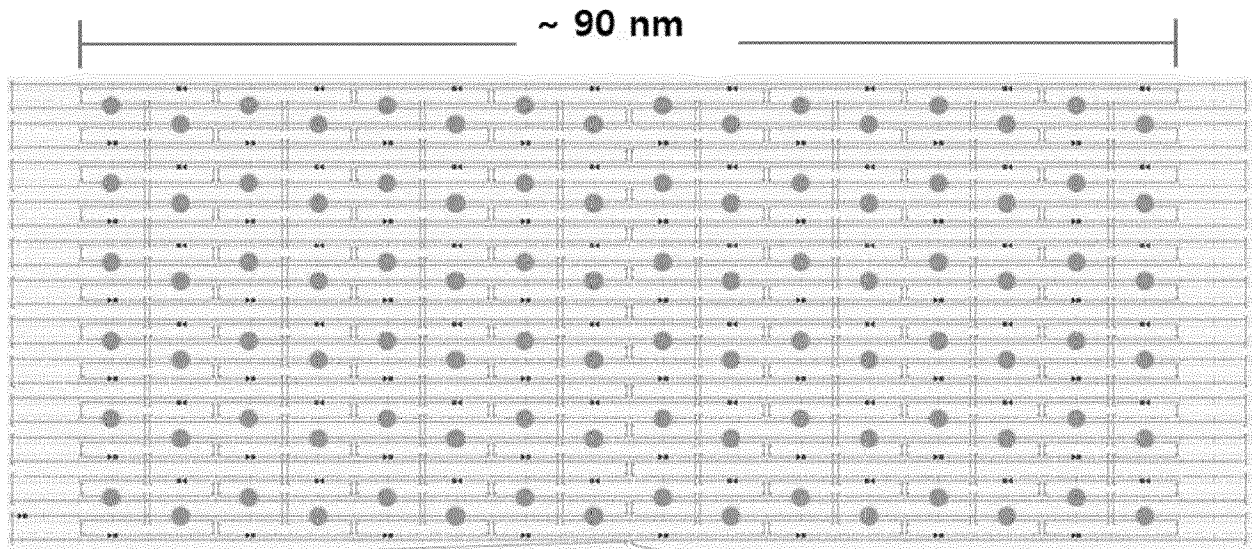
[도21]



Mean Largest Grain Size Analysis Versus Time

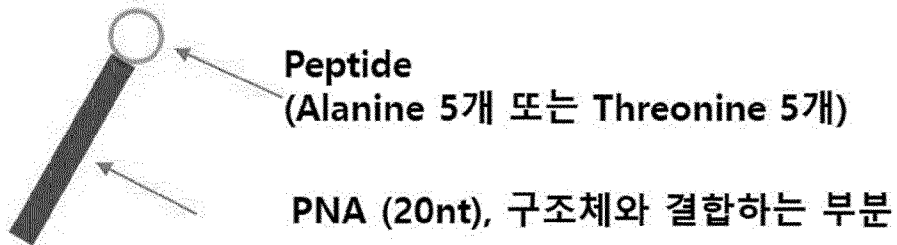


[도22]

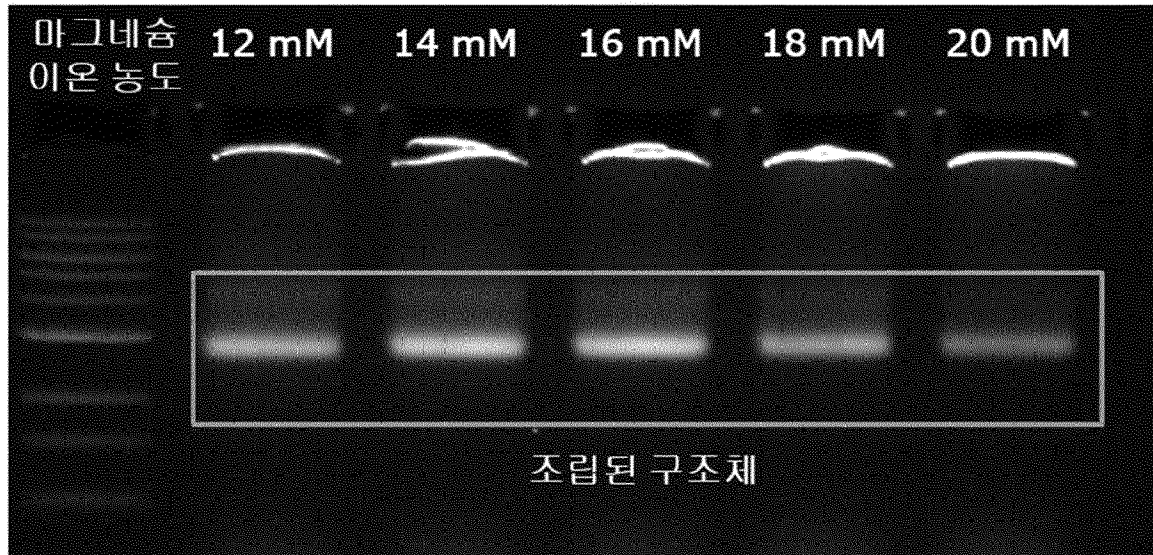
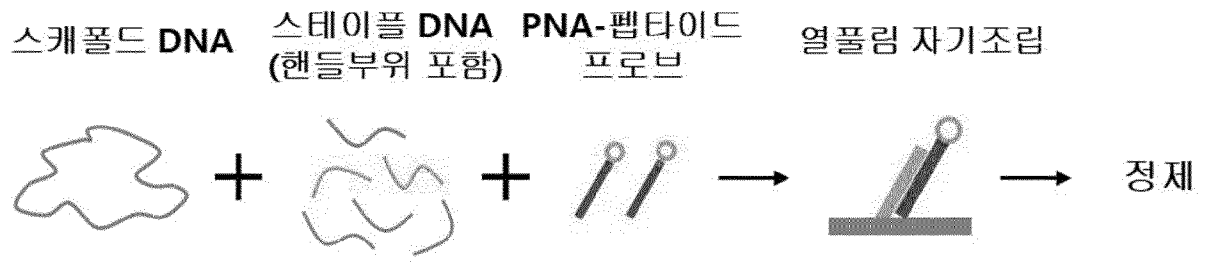


● Handle 위치(최대 96개)

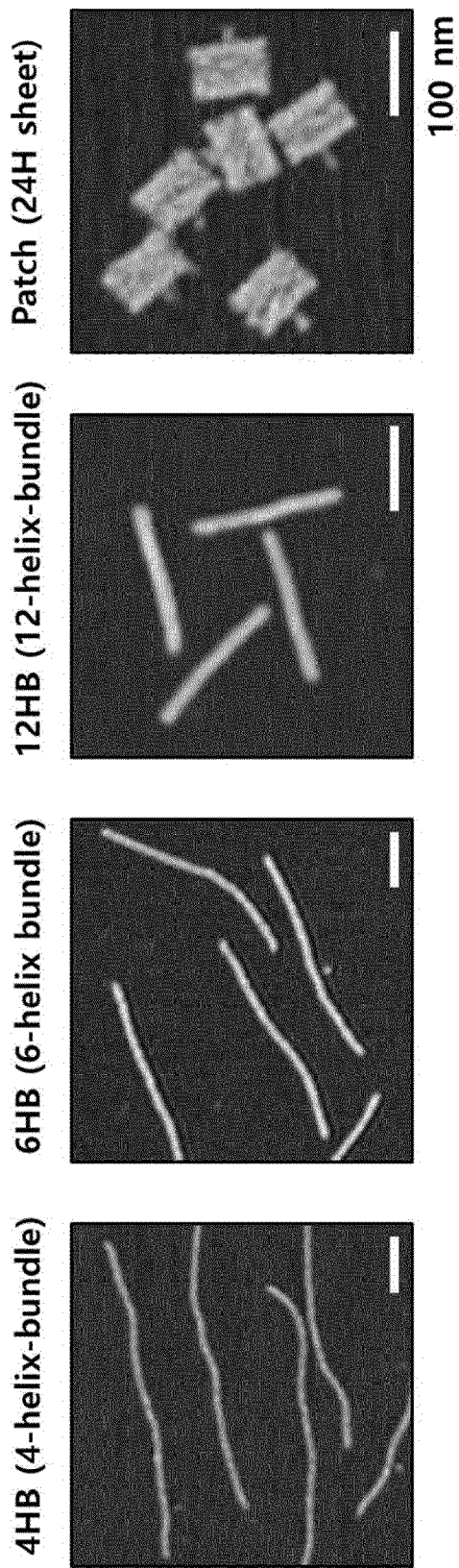
*핸들 위치에 결합하는 프로브 구조



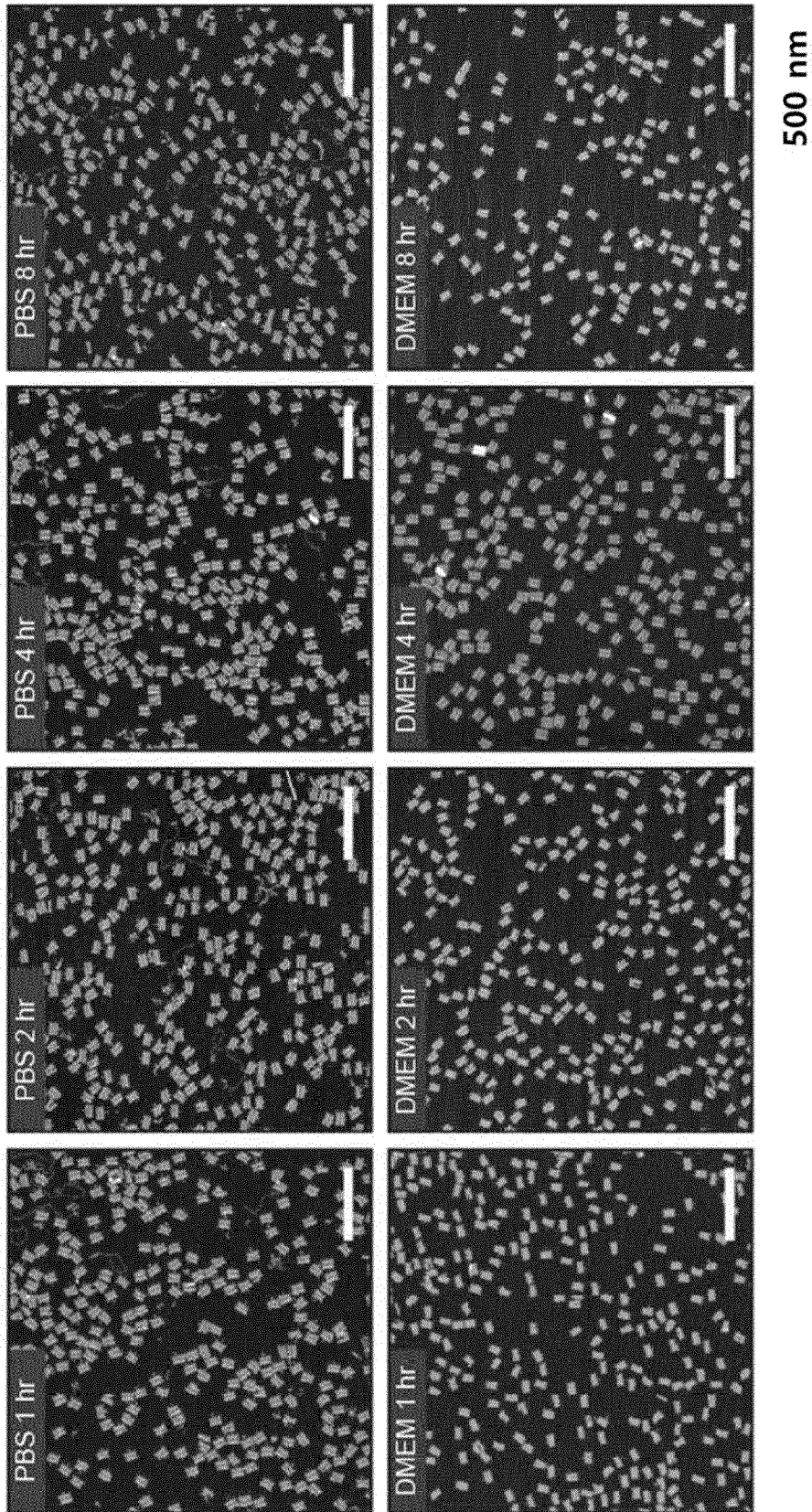
[도23]



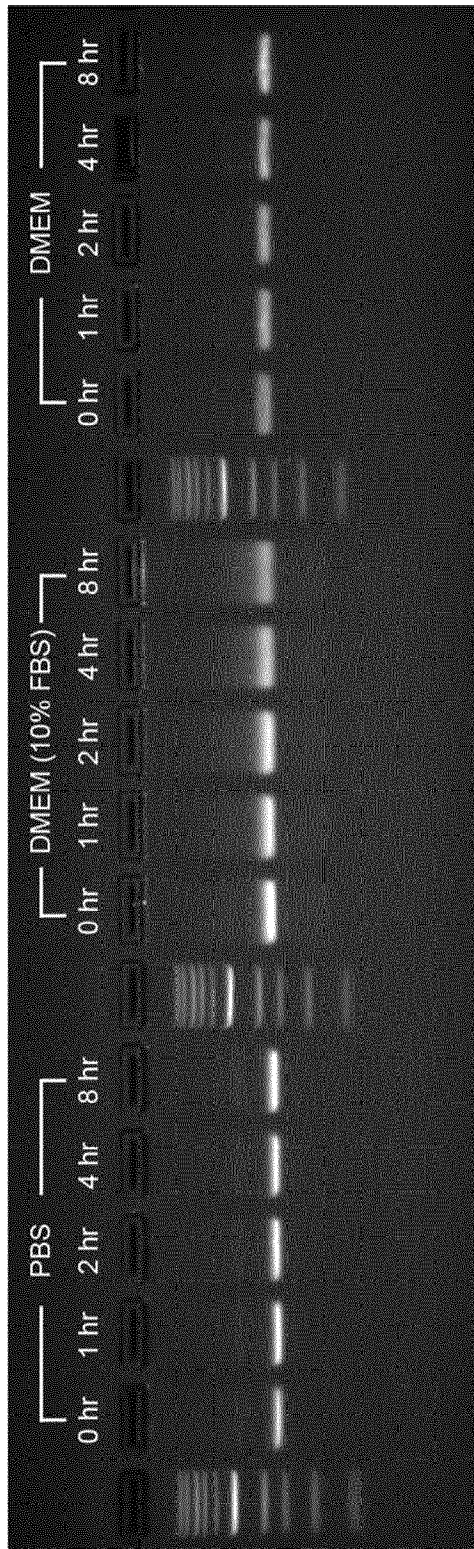
[도24]



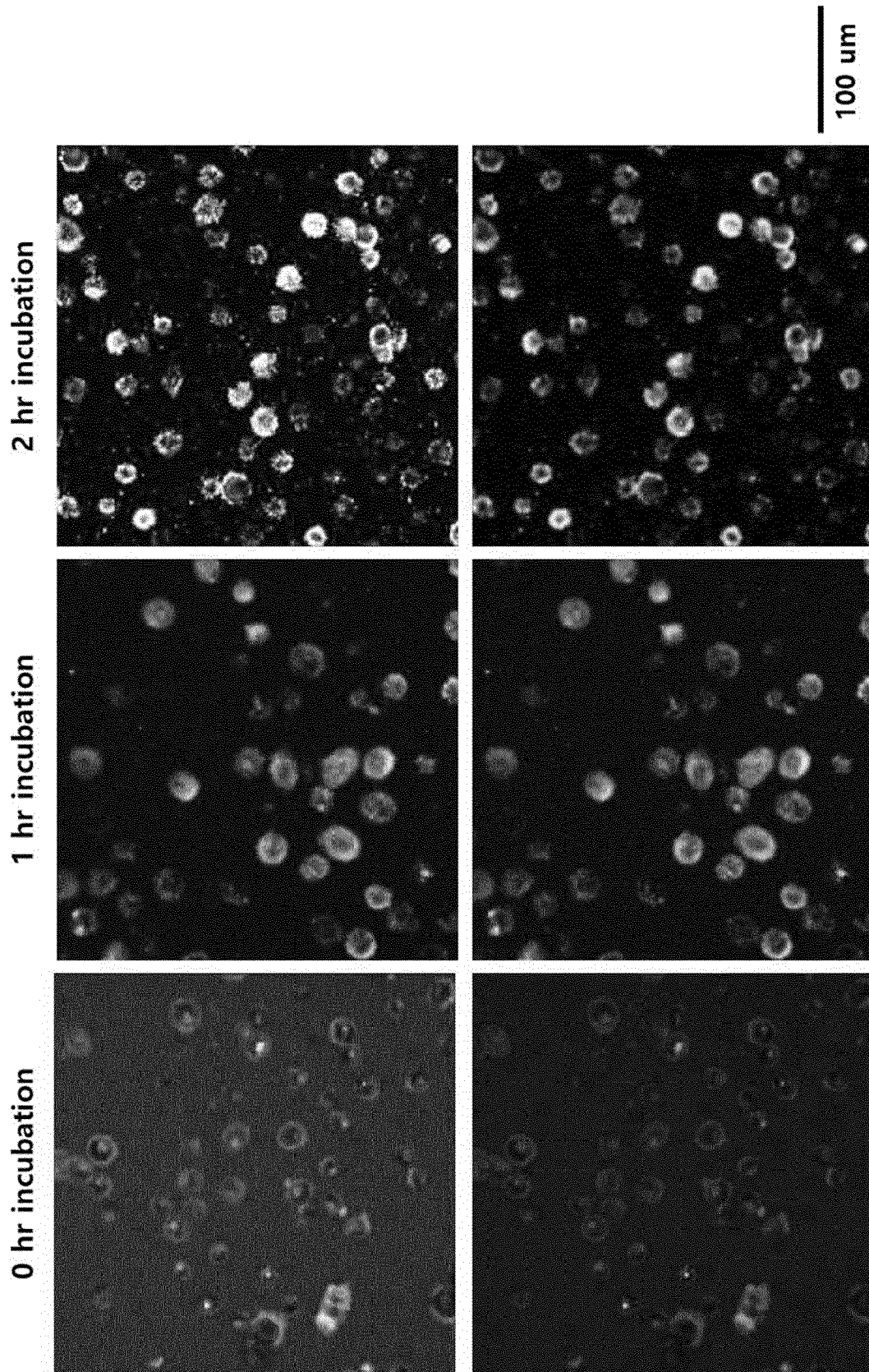
[도25]



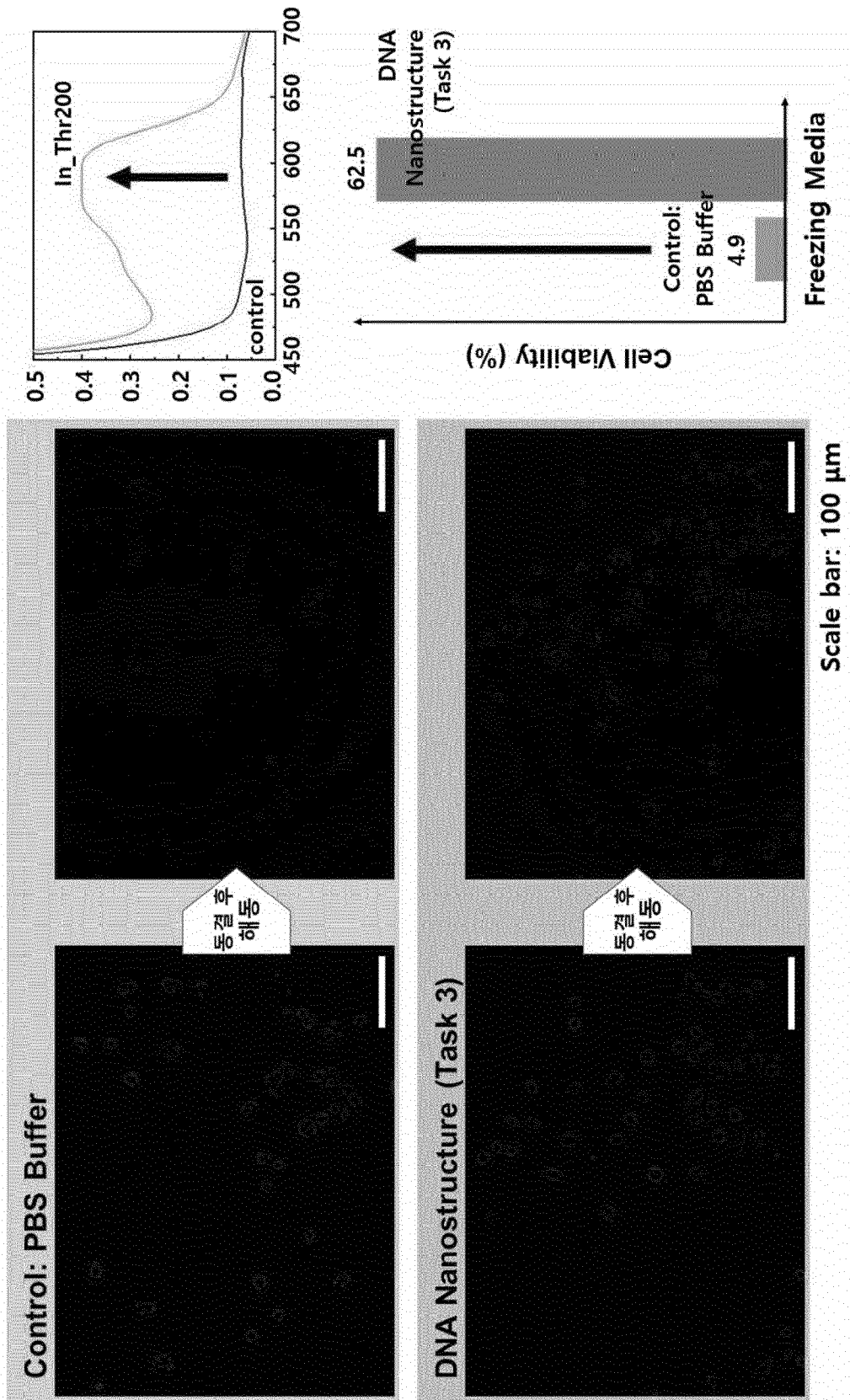
[도26]



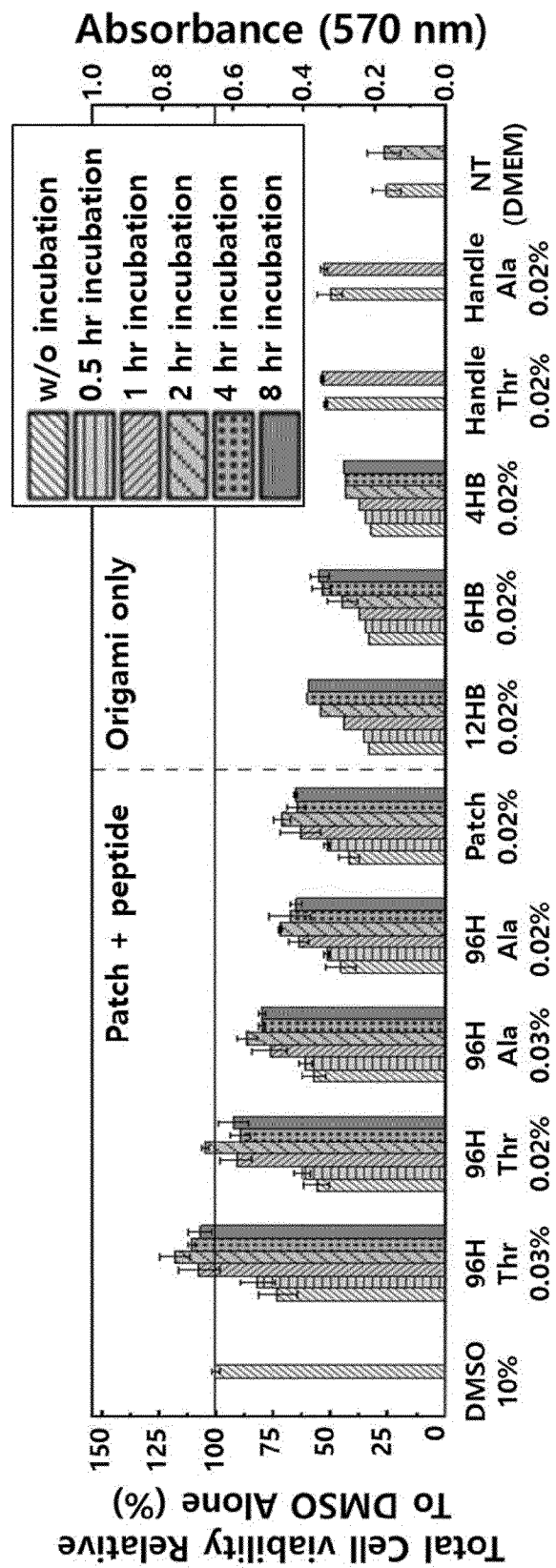
[도27]



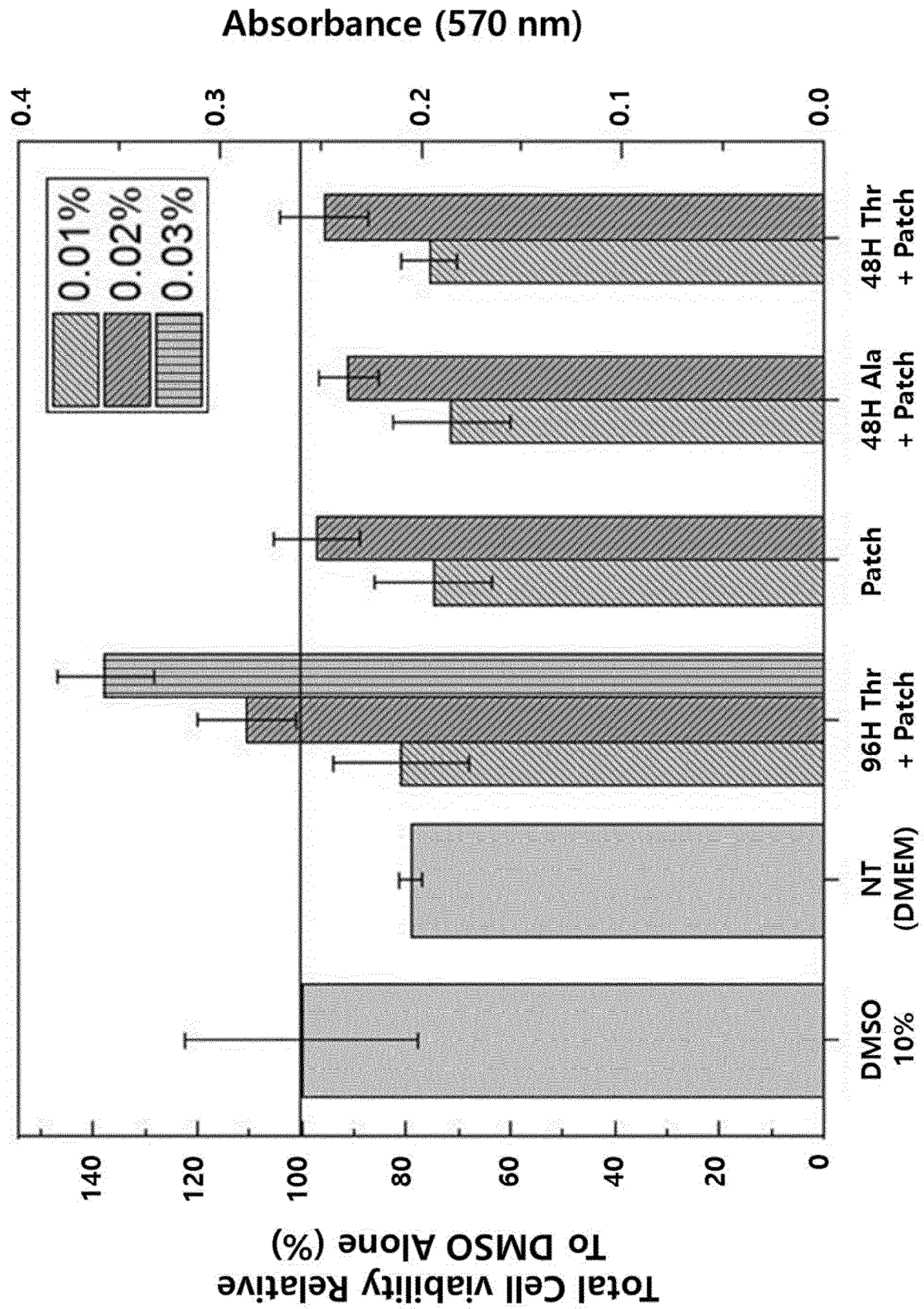
[도28]



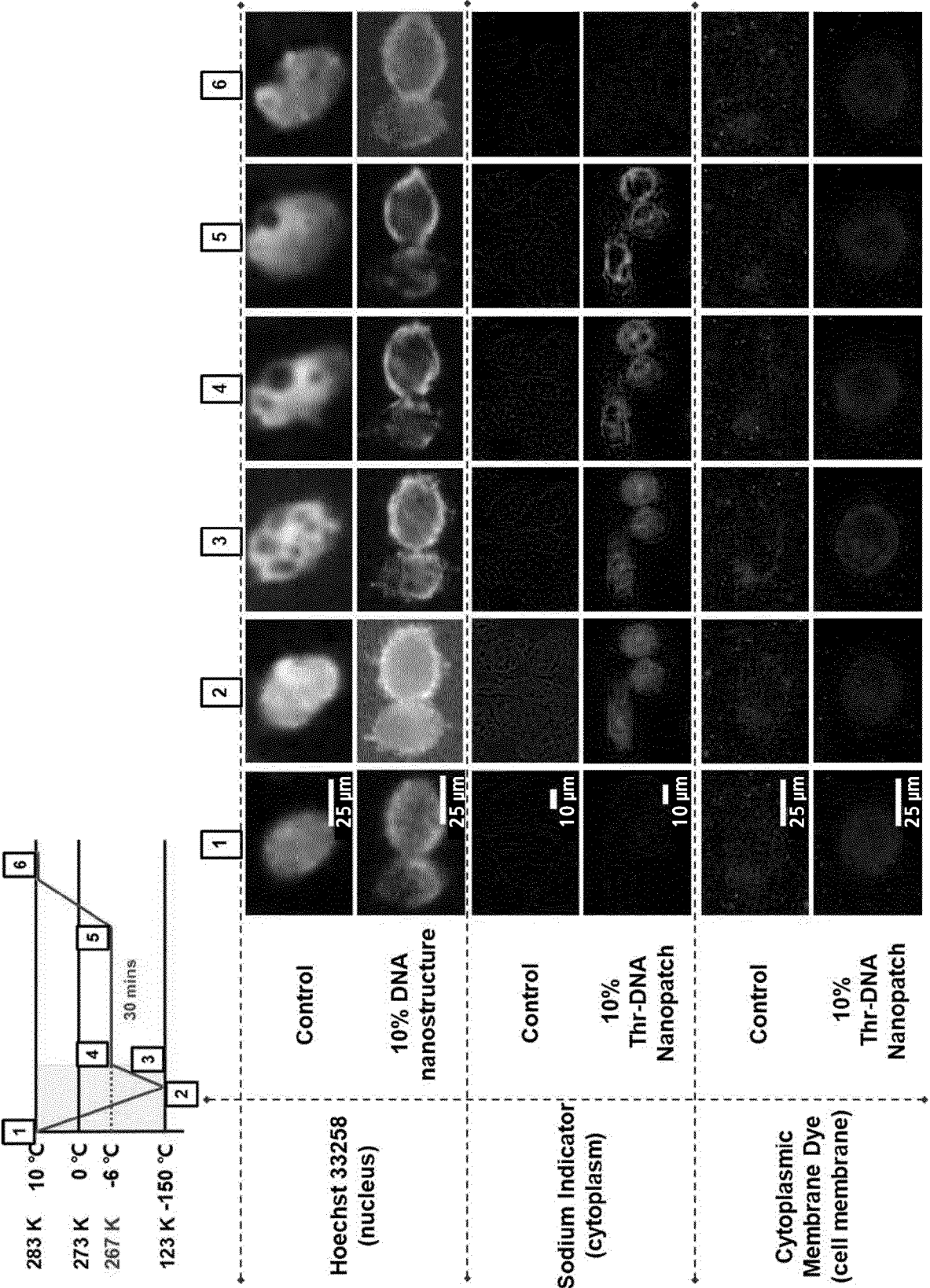
[도29]



[도30]



[도31]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/003087

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01N 1/02(2006.01)i; C07K 7/06(2006.01)i; A23L 3/3544(2006.01)i; A23L 3/3526(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01N 1/02(2006.01); A23G 9/32(2006.01); B82Y 5/00(2011.01); C07K 14/435(2006.01); C08G 69/10(2006.01); C12N 15/12(2006.01)

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: DNA, 핵산(nucleic aci), 나노구조체(nanostructure), 연결자(linker), 펩타이드(peptide), 동결방지(antifreezing)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2018-0109267 A (UNIVERSITY OF SEOUL INDUSTRY COOPERATION FOUNDATION) 08 October 2018 (2018-10-08) See abstract; and claim 1.	1-11
A	KR 10-2018-0084782 A (X-THERMA, INC.) 25 July 2018 (2018-07-25) See entire document.	1-11
A	KR 10-2015-0137440 A (KOREA INSTITUTE OF OCEAN SCIENCE & TECHNOLOGY) 09 December 2015 (2015-12-09) See entire document.	1-11
A	US 6307020 B1 (HEW, C. et al.) 23 October 2001 (2001-10-23) See entire document.	1-11
A	WO 91-10361 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 25 July 1991 (1991-07-25) See entire document.	1-11

☐ 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

“D” document cited by the applicant in the international application

“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

27 August 2021

Date of mailing of the international search report

27 August 2021

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/003087

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2018-0109267	A	08 October 2018	None			
KR	10-2018-0084782	A	25 July 2018	AU	2016-338410	A1	10 May 2018
				AU	2016-338410	B2	15 July 2021
				CA	3001065	A1	20 April 2017
				CN	108347916	A	31 July 2018
				EP	3370518	A2	12 September 2018
				HK	1258922	A1	22 November 2019
				IL	258648	D0	28 June 2018
				JP	2018-538359	A	27 December 2018
				MX	2018004518	A	18 September 2018
				SG	11201802777	A	30 May 2018
				US	10694739	B2	30 June 2020
				US	2017-295777	A1	19 October 2017
				US	2019-069537	A1	07 March 2019
				US	2021-0100238	A1	08 April 2021
				US	9986733	B2	05 June 2018
				WO	2017-066454	A2	20 April 2017
				WO	2017-066454	A3	15 June 2017
KR	10-2015-0137440	A	09 December 2015	None			
US	6307020	B1	23 October 2001	AU	1434597	A	22 August 1997
				AU	1997-14345	B2	07 September 2000
				AU	723712	B2	07 September 2000
				CA	2244737	A1	07 August 1997
				CN	1215430	A	28 April 1999
				CN	1215430	C	28 April 1999
				EP	0901524	A1	17 March 1999
				IL	125482	D0	12 March 1999
				JP	11-511338	A	05 October 1999
				KR	10-1999-0082185	A	25 November 1999
				WO	97-28260	A1	07 August 1997
WO	91-10361	A1	25 July 1991	AT	165208	T	15 May 1998
				AU	1567092	A	27 August 1992
				AU	659795	B2	01 June 1995
				AU	7335491	A	05 August 1991
				CA	2074162	A1	18 July 1991
				CA	2074162	C	11 May 1999
				CA	2076380	A1	18 July 1992
				DE	69129294	T2	01 October 1998
				DK	0511317	T3	25 January 1999
				EP	0511317	A1	04 November 1992
				EP	0511317	B1	22 April 1998
				ES	2117640	T3	16 August 1998
				JP	05-503706	A	17 June 1993
				JP	08-009521	B2	31 January 1996
				US	5358931	A	25 October 1994
				WO	92-12722	A1	06 August 1992

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A01N 1/02(2006.01)i; C07K 7/06(2006.01)i; A23L 3/3544(2006.01)i; A23L 3/3526(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A01N 1/02(2006.01); A23G 9/32(2006.01); B82Y 5/00(2011.01); C07K 14/435(2006.01); C08G 69/10(2006.01); C12N 15/12(2006.01) 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: DNA, 핵산(nucleic aci), 나노구조체(nanostructure), 연결자(linker), 펩타이드(peptide), 동결방지(antifreezing)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2018-0109267 A (서울시립대학교 산학협력단) 2018.10.08 요약; 청구항 1	1-11
A	KR 10-2018-0084782 A (엑스-써마 인코포레이티드) 2018.07.25 전체 문헌	1-11
A	KR 10-2015-0137440 A (한국해양과학기술원) 2015.12.09 전체 문헌	1-11
A	US 6307020 B1 (HEW, C. 등) 2001.10.23 전체 문헌	1-11
A	WO 91-10361 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 1991.07.25 전체 문헌	1-11
☐ 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 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2021년08월27일(27.08.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년08월27일(27.08.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 정다원 전화번호 +82-42-481-5373

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2018-0109267 A	2018/10/08	없음	
KR 10-2018-0084782 A	2018/07/25	AU 2016-338410 A1	2018/05/10
		AU 2016-338410 B2	2021/07/15
		CA 3001065 A1	2017/04/20
		CN 108347916 A	2018/07/31
		EP 3370518 A2	2018/09/12
		HK 1258922 A1	2019/11/22
		IL 258648 D0	2018/06/28
		JP 2018-538359 A	2018/12/27
		MX 2018004518 A	2018/09/18
		SG 11201802777 A	2018/05/30
		US 10694739 B2	2020/06/30
		US 2017-295777 A1	2017/10/19
		US 2019-069537 A1	2019/03/07
		US 2021-0100238 A1	2021/04/08
		US 9986733 B2	2018/06/05
		WO 2017-066454 A2	2017/04/20
		WO 2017-066454 A3	2017/06/15
KR 10-2015-0137440 A	2015/12/09	없음	
US 6307020 B1	2001/10/23	AU 1434597 A	1997/08/22
		AU 1997-14345 B2	2000/09/07
		AU 723712 B2	2000/09/07
		CA 2244737 A1	1997/08/07
		CN 1215430 A	1999/04/28
		CN 1215430 C	1999/04/28
		EP 0901524 A1	1999/03/17
		IL 125482 D0	1999/03/12
		JP 11-511338 A	1999/10/05
		KR 10-1999-0082185 A	1999/11/25
		WO 97-28260 A1	1997/08/07
WO 91-10361 A1	1991/07/25	AT 165208 T	1998/05/15
		AU 1567092 A	1992/08/27
		AU 659795 B2	1995/06/01
		AU 7335491 A	1991/08/05
		CA 2074162 A1	1991/07/18
		CA 2074162 C	1999/05/11
		CA 2076380 A1	1992/07/18
		DE 69129294 T2	1998/10/01
		DK 0511317 T3	1999/01/25
		EP 0511317 A1	1992/11/04
		EP 0511317 B1	1998/04/22
		ES 2117640 T3	1998/08/16
		JP 05-503706 A	1993/06/17
		JP 08-009521 B2	1996/01/31
		US 5358931 A	1994/10/25
		WO 92-12722 A1	1992/08/06