(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2025 년 3 월 27 일 (27.03.2025)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2025/063648 A1

(51) 국제특허분류:
G01N 33/557 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01) *C12Q 1/44* (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2024/013994

(22) 국제출원일: 2024 년 9 월 13 일 (13.09.2024)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2023-0124848 2023 년 9 월 19 일 (19.09.2023) KR

(71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (**EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION**) [KR/KR]; 03760 서울특별시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR).

(72) 발명자: 이정록 (**LEE, Jung Rok**); 03770 서울특별시 서대문구 북아현로1길 50, 101동 1402호, Seoul (KR). 임지수 (**IM, Ji Soo**); 05649 서울특별시 송파구 양재대로 1218, 253동 1202호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 김연권 (**KIM, Youn Gwon**); 05854 서울특별시 송파구 송파대로 201 B동 1416호, 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, 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))

(54) Title: ENDONUCLEASE DYNAMICS MEASUREMENT DEVICE BASED ON MAGNETIC SENSOR, AND MANUFACTURING METHOD THEREFOR

(54) 발명의 명칭: 자성 센서에 기반하는 엔도뉴클레아제 동역학 측정장치 및 그 제조방법

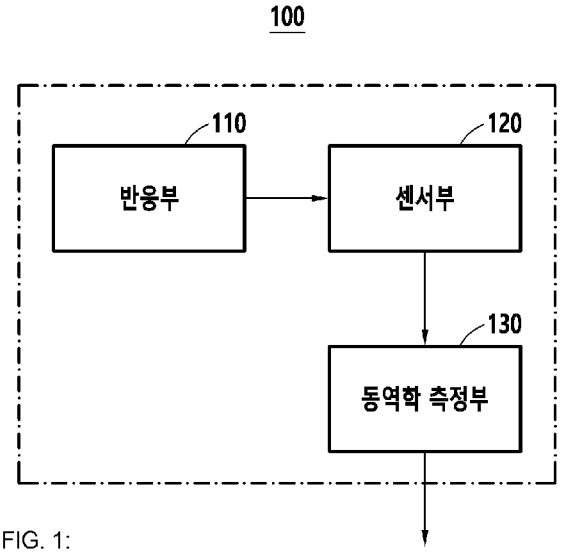


FIG. 1:
110 ... Reaction unit
120 ... Sensor unit
130 ... Dynamics measurement unit

(57) Abstract: Provided in an embodiment of the present invention is an endonuclease dynamics measurement device comprising: a reaction unit having at least one substrate which is connected to magnetic nanoparticles through one side, and which reacts with an endonuclease so as to cause a cleavage reaction; a sensor unit having at least one magnetic sensor connected through the other side of each substrate; and a dynamics measurement unit which receives, from the magnetic sensor, a magnetic signal corresponding to the result of the reaction between the substrate and the endonuclease, when the endonuclease is introduced into the reaction unit, and which generates the result of measurement of the cleavage dynamics of the substrate according to the endonuclease on the basis of the magnetic signal.

(57) 요약서: 본 발명의 실시예는, 일 측단을 통해 자성 나노입자와 연결되며 엔도뉴클레아제와 반응하여 절단 반응이 발생되는 적어도 하나의 기질(substrate) 을 구비하는 반응부와, 기질 각각의 타 측단을 통해 연결되는 적어도 하나의 자성 센서를 구비하는 센서부 및 반응부에 엔도뉴클레아제가 유입되면, 자성 센서로부터 기질과 엔도뉴클레아제의 반응 결과에 대응되는 자성 신호를 수신하고, 자성 신호에 기초하여 엔도뉴클레아제에 따른 기질의 절단 동역학의 측정 결과를 생성하는 동역학 측정부를 포함하는 엔도뉴클레아제 동역학 측정장치를 제공한다.

WO 2025/063648 A1

명세서

발명의 명칭: 자성 센서에 기반하는 엔도뉴클레아제 동역학 측정장치 및 그 제조방법

기술분야

[1] 본 발명은 동역학 측정장치 및 그 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 자성 센서를 이용하여 엔도뉴클레아제의 동역학을 측정하는 기술적 사상에 관한 것이다.

배경기술

[2] 엔도뉴클레아제 또는 DNA 제한효소(restriction enzyme)는 유전자의 특정 부위를 자르는 역할을 하며, 이에 따라 최근에는 유전자 편집 기술에 많이 활용되고 있다.

[3] 그러나, 이러한 엔도뉴클레아제의 활성(또는 효율)과 특이성은 엔도뉴클레아제와 DNA의 결합, 그리고 DNA의 공유 결합(covalent bond)을 끊는 반응에 의해 결정되기 때문에, 효소의 DNA 인식 부위의 염기 서열 및 온도, pH, 염 농도(salt concentration), 이온 강도(ionic strength) 등의 환경 변화에 영향을 받는다.

[4] 따라서, 유전자 편집 등을 위해 엔도뉴클레아제 기반의 유전자 가위 시스템을 생체 내 다양한 조건(예를 들면, 비교적 산성을 띠는 암 미세환경 등)에서 활용하려면, DNA 제한효소 정확한 반응 속도와 활동의 안전성에 대한 근거가 필요하다.

[5] 실제로, 최근 가장 활발히 연구되고 있는 유전자 가위 시스템인 CRISPR-Cas 시스템 등과 같은 DNA 제한효소 기반의 유전자 편집 도구에서 오프-타겟(off-target effect, 반응하지 말아야 하는 DNA 부위) 절단과 같이 유전자 가위의 특이성이 낮아지는 문제가 여전히 극복되지 못하고 있다.

[6] 이를 해결하기 위해, 최근 CRISPR-Cas 시스템의 동역학(kinetics)에 대한 이해가 필요하다는 주장이 지속되고 있으나, 생체 환경을 모사한 버퍼 조건에서, 다중 DNA 타겟을 인식하여 활성(activation), 효율(efficacy) 및 특이성(specificity)을 효과적으로 정량화하는 센서 플랫폼은 아직 존재하지 않는 실정이다.

[7] 특히, 효소 동역학 측정을 위해 많이 사용되었던 기존의 광학 기반 센서들의 경우, 온도, pH, 염 농도 등의 버퍼 조건에 따라 형광의 세기가 영향을 받는 형광 단백질을 신호 발생 물질로 사용하므로 운동 매개 변수를 측정하고자 하는 대상인 엔도뉴클레아제의 활동을 제대로 측정하기 어렵다는 단점이 있다.

[8] 따라서, 다양한 환경 변화에도 센서 신호가 영향을 받지 않고 온전히 엔도뉴클레아제가 DNA를 절단하는 속도만을 측정할 수 있는 센서의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 본 발명은 온도와 버퍼의 조성 등 주변 환경에 영향을 덜 받는 자성 센서에 기반하는 생체 모방 환경에서 다양한 엔도뉴클레아제의 효소 동역학을 보다 정확하게 측정할 수 있는 동역학 측정장치 및 그 제조방법을 제공하고자 한다.

[10] 또한, 본 발명은 다양한 DNA 염기 서열에 대한 엔도뉴클레아제의 반응성을 보다 용이하게 확인할 수 있는 동역학 측정장치 및 그 제조방법을 제공하고자 한다.

[11] 또한, 본 발명은 유전자 편집을 위한 정밀한 약제 개발에 필요한 정보를 제공하고, DNA 염기 서열에 따라 반응성이 달라지는지 여부도 확인하여 유전자 편집 기술을 적용할 때 원치 않는 DNA를 편집하는 부작용을 최소화할 수 있는 동역학 측정장치 및 그 제조방법을 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

[12] 본 발명의 일실시예에 따른 동역학 측정장치는 일 측단을 통해 자성 나노입자와 연결되며 엔도뉴클레아제와 반응하여 절단 반응이 발생되는 적어도 하나의 기질(substrate)을 구비하는 반응부와, 기질 각각의 타 측단을 통해 연결되는 적어도 하나의 자성 센서를 구비하는 센서부 및 반응부에 엔도뉴클레아제가 유입되면, 자성 센서로부터 기질과 엔도뉴클레아제의 반응 결과에 대응되는 자성 신호를 수신하고, 자성 신호에 기초하여 엔도뉴클레아제에 따른 기질의 절단 동역학의 측정 결과를 생성하는 동역학 측정부를 포함할 수 있다.

[13] 일측에 따르면, 센서부는 서로 다른 염기 서열을 갖는 기질 각각이 자성 센서 각각에 부착될 수 있다.

[14] 일측에 따르면, 기질은 이중 가닥 DNA, 단일 가닥 DNA 및 RNA 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[15] 일측에 따르면, 기질은 자성 센서와 연결되는 프로브 DNA 및 프로브 DNA와 결합하고 자성 나노입자가 부착되는 타겟 DNA를 포함할 수 있다.

[16] 일측에 따르면, 프로브 DNA는 디스펜서(dispenser), 스탬프(stamp) 및 미세유로 중 적어도 하나를 통해 자성 센서 각각에 부착될 수 있다.

[17] 일측에 따르면, 기질은 비오틴(biotin) 및 황(sulfur) 중 적어도 하나의 부착 물질이 일 측단에 부착되고, 부착 물질을 통해 자성 나노입자와 연결될 수 있다.

[18] 일측에 따르면, 센서부는 엔도뉴클레아제와의 반응으로 인해 기질이 잘려나가면서 자성 센서와 자성 나노입자 사이에 거리 차이가 발생되면, 거리 차이에 대응되는 자성 신호를 출력할 수 있다.

[19] 일측에 따르면, 자성 센서는 GMR(giant magneto-resistance) 센서, TMR(tunnel magnetic resistance) 센서, AMR (anisotropic magnetic resistance) 센서 및 홀(hall) 센서 중 적어도 하나의 센서를 포함할 수 있다.

[20] 일측에 따르면, 동역학 측정장치는 자성 센서 각각에 대응되는 영역의 온도를 조절 및 보정하는 온도 제어부를 더 포함할 수 있다.

[21] 본 발명의 일실시예에 따른 동역학 측정장치의 제조방법은 엔도뉴클레아제와 반응하여 절단 반응이 발생되는 적어도 하나의 기질(substrate)의 절단 동역학의 측정 결과를 생성하는 동역학 측정부와 연결되고, 적어도 하나의 자성 센서를 구비하는 센서부를 준비하는 단계와, 반응부를 구성하는 기질을 자성 센서 각각에 부착하는 단계 및 적어도 하나의 자성 나노입자를 주입하여, 자성 나노입자를 기질의 일 측단에 형성된 부착물질을 통해 기질과 연결하는 단계를 포함하고, 여기서 동역학 측정부는 반응부에 엔도뉴클레아제가 유입되면, 자성 센서로부터 기질과 엔도뉴클레아제의 반응 결과에 대응되는 자성 신호를 수신하고, 자성 신호에 기초하여 엔도뉴클레아제에 따른 기질의 절단 동역학의 측정 결과를 생성할 수 있다.

[22] 일측에 따르면, 기질을 자성 센서 각각에 부착하는 단계는 서로 다른 염기 서열을 갖는 기질 각각을 자성 센서 각각에 부착할 수 있다.

[23] 일측에 따르면, 기질은 이중 가닥 DNA, 단일 가닥 DNA 및 RNA 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[24] 일측에 따르면, 기질을 자성 센서 각각에 부착하는 단계는 디스펜서(dispenser), 스탬프(stamp) 및 미세유로 중 적어도 하나를 통해 자성 센서 각각에 프로브 DNA를 부착하는 단계 및 프로브 DNA 각각에 상보적인 타겟 DNA를 대응되는 프로브 DNA 각각과 결합시키는 단계를 포함할 수 있다.

[25] 일측에 따르면, 프로브 DNA 각각과 결합시키는 단계는 디스펜서, 스탬프 및 미세유로 중 적어도 하나를 통해 자성 센서 각각에 부착된 프로브 DNA 각각에 대응되는 타겟 DNA를 자성 센서 상에 주입할 수 있다.

발명의 효과

[26] 일실시예에 따르면, 본 발명은 온도와 버퍼의 조성 등 주변 환경에 영향을 덜 받는 자성 센서에 기반하는 생체 모방 환경에서 다양한 엔도뉴클레아제의 효소 동역학을 보다 정확하게 측정할 수 있다.

[27] 일실시예에 따르면, 본 발명은 다양한 DNA 염기 서열에 대한 엔도뉴클레아제의 반응성을 보다 용이하게 확인할 수 있다.

[28] 일실시예에 따르면, 본 발명은 유전자 편집을 위한 정밀한 약제 개발에 필요한 정보를 제공하고, DNA 염기 서열에 따라 반응성이 달라지는지 여부도 확인하여 유전자 편집 기술을 적용할 때 원치 않는 DNA를 편집하는 부작용을 최소화할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[29] 도 1은 일실시예에 따른 동역학 측정장치를 설명하기 위한 도면이다.

[30] 도 2a 내지 도 2d는 일실시예에 따른 동역학 측정장치의 제1 실시예를 설명하기 위한 도면이다.

[31] 도 3은 일실시예에 따른 동역학 측정장치의 기질과 효소의 반응 속도를 설명하기 위한 도면이다.

[32] 도 4는 일실시예에 따른 동역학 측정장치의 온도 조절부를 보다 구체적으로 설명하기 위한 도면이다.

[33] 도 5 내지 도 9는 제1 실시예에 따른 동역학 측정장치의 동역학 측정 결과를 설명하기 위한 도면이다.

[34] 도 10a 내지 도 10c는 일실시예에 따른 동역학 측정장치의 제2 실시예를 설명하기 위한 도면이다.

[35] 도 11는 제2 실시예에 따른 동역학 측정장치의 동역학 측정 결과를 설명하기 위한 도면이다.

[36] 도 12는 일실시예에 따른 동역학 측정장치의 제조방법을 설명하기 위한 도면이다.

발명의 실시를 위한 형태

[37] 본 명세서에 개시되어 있는 본 발명의 개념에 따른 실시예들에 대해서 특정한 구조적 또는 기능적 설명들은 단지 본 발명의 개념에 따른 실시예들을 설명하기 위한 목적으로 예시된 것으로서, 본 발명의 개념에 따른 실시예들은 다양한 형태로 실시될 수 있으며 본 명세서에 설명된 실시예들에 한정되지 않는다.

[38] 본 발명의 개념에 따른 실시예들은 다양한 변경들을 가할 수 있고 여러 가지 형태들을 가질 수 있으므로 실시예들을 도면에 예시하고 본 명세서에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명의 개념에 따른 실시예들을 특정한 개시형태들에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 변경, 균등물, 또는 대체물을 포함한다.

[39] 제1 또는 제2 등의 용어를 다양한 구성요소들을 설명하는데 사용될 수 있지만, 구성요소들은 용어들에 의해 한정되어서는 안 된다. 용어들은 하나의 구성요소를 다른 구성요소로부터 구별하는 목적으로만, 예를 들면 본 발명의 개념에 따른 권리 범위로부터 이탈되지 않은 채, 제1 구성요소는 제2 구성요소로 명명될 수 있고, 유사하게 제2 구성요소는 제1 구성요소로도 명명될 수 있다.

[40] 어떤 구성요소가 다른 구성요소에 "연결되어" 있다거나 "접속되어" 있다고 언급된 때에는, 그 다른 구성요소에 직접적으로 연결되어 있거나 또는 접속되어 있을 수도 있지만, 중간에 다른 구성요소가 존재할 수도 있다고 이해되어야 할 것이다. 반면에, 어떤 구성요소가 다른 구성요소에 "직접 연결되어" 있다거나 "직접 접속되어" 있다고 언급된 때에는, 중간에 다른 구성요소가 존재하지 않는 것으로 이해되어야 할 것이다. 구성요소들 간의 관계를 설명하는 표현들, 예를 들면 "~사이에"와 "바로~사이에" 또는 "~에 직접 이웃하는" 등도 마찬가지로 해석되어야 한다.

[41] 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예들을 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 설시된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부분품 또는

이들을 조합한 것이 존재함으로 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부분품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[42] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 갖는 것으로 해석되어야 하며, 본 명세서에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[43] 이하, 실시예들을 첨부된 도면을 참조하여 상세하게 설명한다. 그러나, 특허출원의 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 각 도면에 제시된 동일한 참조 부호는 동일한 부재를 나타낸다.

[44] 도 1은 일실시예에 따른 동역학 측정장치를 설명하기 위한 도면이다.

[45] 도 1을 참조하면, 일실시예에 따른 동역학 측정장치(100)는 온도와 버퍼의 조성 등 주변 환경에 영향을 덜 받는 자성 센서에 기반하는 생체 모방 환경에서 다양한 엔도뉴클레아제의 효소 동역학을 보다 정확하게 측정할 수 있다.

[46] 또한, 동역학 측정장치(100)는 다양한 DNA 염기 서열에 대한 엔도뉴클레아제의 반응성을 보다 용이하게 확인할 수 있다.

[47] 또한, 동역학 측정장치(100)는 유전자 편집을 위한 정밀한 약제 개발에 필요한 정보를 제공하고, DNA 염기 서열에 따라 반응성이 달라지는지 여부도 확인하여 유전자 편집 기술을 적용할 때 원치 않는 DNA를 편집하는 부작용을 최소화할 수 있다.

[48] 구체적으로, 동역학 측정장치(100)는 다양한 버퍼 조건(일례로, 온도, pH, 염 농도 등의 환경 조건)의 변화에도 안정적으로 신호를 발생시킬 수 있는 자성 나노입자를 적용하여 자성 나노입자에 의해 유도되는 외부 자기장에 의한 저항의 변화를 통해 타겟 하고자 하는 분자를 감지하는 자성 센서 기반의 측정 플랫폼(일례로, 센서 칩)으로, 생체 환경을 모방한 다양한 조건에서 엔도뉴클레아제의 동역학, 즉 반응 속도 및 반응 속도에 따른 특성을 측정하는데 기존의 바이오 센서보다 적합한 특성을 나타낸다.

[49] 이를 위해, 동역학 측정장치(100)는 반응부(110), 센서부(120) 및 동역학 측정부(130)를 포함할 수 있다.

[50] 일실시예에 따른 반응부(110)는 일 측단을 통해 자성 나노입자와 연결되며 엔도뉴클레아제와 반응하여 절단 반응이 발생되는 적어도 하나의 기질(substrate)을 구비할 수 있다.

[51] 예를 들면, 기질은 이중 가닥 DNA(double-stranded DNA; dsDNA), 단일 가닥 DNA(single-stranded DNA; ssDNA) 및 RNA 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[52] 일실시예에 따른 센서부(120)는 기질 각각의 타 측단을 통해 연결되는 적어도 하나의 자성 센서를 구비할 수 있다.

[53] 일측에 따르면, 기질은 이중 가닥 DNA인 경우, 자성 센서와 연결되는 프로브 DNA 및 프로브 DNA와 결합하고 자성 나노입자가 부착되는 타겟 DNA를 포함할 수 있다.

[54] 또한, 기질은 단일 가닥 DNA(또는 RNA)인 경우, 단일 가닥 DNA(또는 RNA)의 일 측단을 통해 자성 나노입자가 부착되고, 타 측단을 통해 자성 센서가 부착될 수 있다.

[55] 또한, 자성 센서는 GMR(giant magneto-resistance) 센서, TMR(tunnel magnetic resistance) 센서, AMR(anisotropic magnetic resistance) 센서 및 홀(hall) 센서 중 적어도 하나의 센서를 포함할 수 있다.

[56] 일측에 따르면, 기질은 비오틴(biotin) 및 황(sulfur) 중 적어도 하나의 부착 물질이 일 측단에 부착되고, 부착 물질을 통해 자성 나노입자와 연결될 수 있으며, 자성 나노입자는 비오틴과 결합하는 물질인 스트렙타비딘(streptavidin) 또는 황과 결합하는 물질인 금으로 코팅될 수 있으나, 이에 한정되지 않고, protein A과 IgG 조합, tag protein과 이에 대응되는 항체 조합 (일례로, HA와 anti-HA, FLAG와 anti-FLAG)으로 구현될 수도 있다.

[57] 예를 들면, 부착 물질은 기질이 이중 가닥 DNA인 경우, 타겟 DNA에 형성되고, 프로브 DNA와 결합된 타겟 DNA는 부착 물질을 통해 자성 나노입자가 부착될 수 있다.

[58] 다시 말해, 자성 센서의 표면에 붙어있는 DNA와 자성 나노입자는 비오틴-스트렙타비딘(biotin-streptavidin) 결합을 통해 서로 결합할 수 있으나, 이에 한정되지 않고 DNA 끝에는 황을 붙여서 황화물 결합(sulfide bonding)을 통해 서로 결합될 수 있으며, 이 밖에도 DNA와 자성 나노입자는 DNA-DNA 결합, IgG Fc-protein A/G 결합 및 항원-항체 결합 중 어느 하나의 결합 방법을 통해 서로 결합될 수도 있다.

[59] 일측에 따르면, 센서부(120)는 디스펜서(dispenser), 스탬프(stamp) 및 미세유로 중 적어도 하나의 수단을 통해 프로브 DNA가 대응되는 자성 센서 각각에 부착될 수 있다.

[60] 구체적으로, 센서부(120)는 적어도 하나의 수단을 통해 프로브 DNA가 전달되면, 물리 흡착(physisorption), 전하 상호작용(charge interaction) 및 공유 결합(covalent bonding) 중 적어도 하나의 방법을 통해 프로브 DNA가 대응되는 자성 센서 각각에 부착될 수 있다.

[61] 또한, 센서부(120)는 타 측단에 아민기(NH_2)가 부착된 프로브 DNA와, 표면에 카르복실기(COOH)가 형성된 자성 센서 각각을 NHS-EDC에 기초하여 부착할 수도 있다.

[62] 일측에 따르면, 센서부(120)는 디스펜서 장비를 통해 프로브 DNA가 자성 센서 각각에 분주되고, 각 프로브 DNA에 상보적인 여러 타겟 DNA를 한꺼번에 혼합하여 도입될 수도 있다.

[63] 구체적으로, 타겟 DNA가 원하지 않는 프로브와 결합하지 않으려면 각각의 프로브-타겟 세트가 다른 세트에게 영향을 미치지 않고 독립적이여야 하므로, 센서부(120)는 DNA의 열역학적 특성을 활용하여 프로브-타겟 디자인이 독립적인 세트로 설계될 수 있으며, 이를 통해 여러 타겟 DNA를 한꺼번에 혼합하여 복수의 자성 센서에 주입하더라도 각 프로브 DNA는 상보적인 타겟 DNA와 보다 용이하게 결합될 수 있다.

[64] 또한, 센서부(120)는 디스펜서 장비를 통해 프로브 DNA가 자성 센서 각각에 분주되고, 디스펜서 장비를 통해 각 프로브 DNA에 상보적인 타겟 DNA 각각이 대응되는 자성 센서 각각에 분주되어, 각 프로브 DNA와 상보적인 타겟 DNA가 보다 정확하게 결합될 수도 있다.

[65] 실시예에 따라서는, 센서부(120)는 프로브 DNA와 타겟 DNA가 외부에서 결합된 상태로 자성 센서에 부착되어 형성될 수도 있으나, 이 경우 DNA의 여러 부위가 센서 표면에 결합하게 되면 효소가 절단을 하더라도 센서 표면에서 떨어지지 않는 상황이 발생될 수 있다.

[66] 한편, 센서부(120)는 반응부(110)에 엔도뉴클레아제(즉, 효소)가 유입되면, 자성 센서로부터 기질과 엔도뉴클레아제의 반응 결과에 대응되는 자성 신호를 생성할 수 있다.

[67] 일측에 따르면, 센서부(120)는 엔도뉴클레아제와의 반응으로 인해 기질이 잘려나가면서 자성 센서와 자성 나노입자 사이에 거리 차이가 발생되면, 거리 차이에 대응되는 자성 신호를 출력할 수 있다.

[68] 예를 들면, 센서부(120)는 엔도뉴클레아제가 반응부(110)에 주입될 때 변경된 버퍼 조건 하에서 주입되거나, 엔도뉴클레아제가 주입된 상태에서 조성(composition) 변경을 위해 추가적으로 Na^{+} 또는 Mg^{2+} 등을 주입하거나 EDTA와 같은 활성억제제를 주입하는 등 실험 조건의 변화에 따라 실시간 또는 기 설정된 주기마다 자성 신호를 출력할 수 있다.

[69] 일실시예에 따른 동역학 측정부(130)는 센서부(120)로부터 생성된 자성 신호를 수신하고, 자성 신호에 기초하여 엔도뉴클레아제에 따른 기질의 절단 동역학의 측정 결과를 생성할 수 있다.

[70] 구체적으로, 자성 나노입자는 엔도뉴클레아제의 반응으로 인해 잘려나가면서 기질이 절단 되면서 자성 센서로부터 멀어지게 되고, 이에 따라 자성 센서에 인가되는 자기장이 감소될 수 있다.

[71] 즉, 센서부(120)는 엔도뉴클레아제의 반응으로 인해 감소한 자기장의 세기에 대응되는 자성 신호를 제공하며, 이때 제공되는 자성 신호의 변화량은 엔도뉴클레아제의 반응 속도를 잘 나타내기 때문에, 동역학 측정부(130)는 센서부(120)로부터 제공받은 자성 신호를 활용하여 엔도뉴클레아제의 동역학, 즉 반응 속도를 보다 정확하고 용이하게 측정할 수 있다.

[72] 일측에 따르면, 자성 나노입자는 기질이 절단되는 경우, 절단된 기질과 함께 자성 센서 표면으로부터 멀어져서 자성 신호가 감소되어야 하기 때문에 가라앉지

않는 자성 입자를 사용할 수 있으며, 이를 위해 자성 나노입자는 지름이 100 nm 이하로 형성될 수 있다.

[73] 한편, 동역학 측정장치(100)는 자성 센서 각각에 대응되는 영역의 온도를 조절 및 보정하는 온도 제어부를 더 포함할 수 있다.

[74] 도 2a 내지 도 2d는 일실시예에 따른 동역학 측정장치의 제1 실시예를 설명하기 위한 도면이다.

[75] 도 2a 내지 도 2d를 참조하면, 도면부호 210 내지 240은 이중 가닥 DNA (dsDNA)에 기반하는 동역학 측정장치를 설명하는 도면으로, 이를 위해 다중 프로브-타겟 올리고뉴클레오타이드 세트를 이용하여 엔도뉴클레아제의 동역학을 측정하는 방법을 예시한다.

[76] 구체적으로, 도면부호 210 내지 240의 동역학 측정장치는 엔도뉴클레아제(즉, 효소)로 GAATTC의 염기서열을 인식하여 반응하는 EcoRI와 차세대 유전자 가위로 주목받고 있는 Cas12a를 사용하고, 여러 자성 센서 중에 바이오센싱 기술로서 발전이 많이 이루어진 거대자기저항 센서를 사용할 수 있다.

[77] 또한, 동역학 측정장치는 10×8의 배열 형태로 제작된 총 80개의 자성 센서가 하나의 칩 위에 형성되며, 자성 센서 각각에는 서로 다른 염기 서열을 갖는 DNA가 부착되도록 설계될 수 있다.

[78] 도면부호 210에 따르면, 동역학 측정장치는 자성 센서 위에 프로브 DNA를 부착시킨 후에 상보적인 타겟 DNA를 주입하게 되면, 타겟 DNA가 대응되는 프로브 DNA에만 결합하게 되어 이중 가닥 DNA(dsDNA)을 형성할 수 있다.

[79] 도면부호 220에 따르면, 동역학 측정장치는 프로브 DNA에 상보적인 타겟 DNA의 일 측단에는 비오틴(biotin)이 부착되어 있어, 타겟 DNA는 일 측단을 통해 스트렙타비딘(streptavidin)으로 코팅된 자성나노파티클과 서로 결합될 수 있으며, 이 경우, 자성 센서는 비오틴-스트렙타비딘 결합에 의해 센서 표면 가까이에 붙잡힌 자성 나노입자로부터 발생하는 외부 자기장을 인지하여 자성 신호를 생성할 수 있다.

[80] 도면부호 230 및 240에 따르면, 동역학 측정장치는 EcoRI과 같이 특정 서열을 인식하여 DNA를 절단하는 제한효소나 CRISPR/Cas12a의 trans-cleavage와 같이 서열에 상관없이 절단을 하는 엔도뉴클레아제를 도입할 수 있다.

[81] 이 경우, 동역학 측정장치는 인식 부위를 발견한 제한효소가 DNA의 특정 부위를 절단하게 되고 이를 통해 자성 센서 표면에 자성 나노입자도 센서 표면에서 떨어져나오면서 신호가 감소될 수 있으며, 이러한 자성 신호를 이용하여 제한효소의 활성과 절단 속도 등의 동역학을 측정 및 정량화할 수 있다.

[82] 도 3은 일실시예에 따른 동역학 측정장치의 기질과 효소의 반응 속도를 설명하기 위한 도면이다.

[83] 도 3을 참조하면, 도면부호 300은 자성 센서의 표면에 부착된 기질(일례로, 이중 가닥 DNA 또는 단일 가닥 DNA)(S)과 효소 반응 속도론을 예시한다.

[84] 도면부호 300에서 k_1은 효소(E, enzyme)-기질(S)의 복합체(ES)를 형성하는 속도, k_{-1}은 효소 기질 복합체(ES)에서 다시 효소(E)와 기질(S)로 해리되는 속도, k_{cat}는 효소-기질 복합체에서 효소 반응 (본 발명에서는 DNA 절단)이 일어나 생성물(P)이 생성되는 속도(turnover number)를 의미한다.

[85] 도면부호 300에 따르면, 자성 센서의 표면에서 반응을 하는 경우는 반응 모델이 하기 수식1과 같이 표현될 수 있으며, 일실시예에 따른 동역학 측정장치는 수식1을 이용하여 매개 변수를 찾음으로써 유효 반응 속도를 파악할 수 있다.

[86] [수식1]

[87]
$$Signal = \frac{1-c}{2}\left\{(1+\lambda)\exp\left(-\frac{\sigma(\lambda-1)}{2\lambda}t\right)+(1-\lambda)\exp\left(-\frac{\sigma(\lambda+1)}{2\lambda}t\right)\right\}+c$$

$$\sigma = k_1[E]_t + k_{-1} + k_{cat},\ \lambda = 1/\sqrt{1-4k_1[E]_t k_{cat}/\sigma^2}$$

$[E]_t$는 전체 효소의 농도

[88] 구체적으로, DNA 제한효소(즉, 엔도뉴클레아제)의 동역학을 측정할 때는 기본적으로 미켈리스-멘튼 반응 속도론(michaelis-menten enzyme kinetics)을 기반으로 하는 표면 효소 운동 방정식(surface enzyme kinetics)을 이용하며, 기존 광학 기반 센서들은 액체 상태의 버퍼에서 엔도뉴클레아제가 절단 시켜야하는 타겟 DNA의 위치나 방향성 등에 영향을 받지 않고 둥둥 떠다니는 상태에서 3D 기반 동역학을 측정하기 때문에 유전자 편집이 이루어질 때의 상황과는 다를 수 있다.

[89] 반면, 일실시예에 따른 동역학 측정장치는 센서 표면에 부착된 타겟 DNA를 인식하여 절단하기 때문에 유전자 편집 시 세포 내의 실제 상황과 가장 유사한 엔도뉴클레아제의 절단 활동을 측정할 수 있다.

[90] 도 4는 일실시예에 따른 동역학 측정장치의 온도 조절부를 보다 구체적으로 설명하기 위한 도면이다.

[91] 도 4를 참조하면, 동역학 측정장치는 일 측단을 통해 자성 나노입자와 연결되며 엔도뉴클레아제와 반응하여 절단 반응이 발생되는 적어도 하나의 기질이 구비된 반응부(400-1, 400-2)와, 기질 각각의 타 측단을 통해 연결되는 적어도 하나의 자성 센서를 구비하는 센서부(도면부호 400-1의 하부의 빗금 영역)를 포함할 수 있다.

[92] 또한, 동역학 측정장치는 자성 센서에 대응되는 영역의 온도를 조절 및 보정하는 온도 제어부를 더 포함할 수 있다.

[93] 즉, 효소의 반응성은 온도의 영향을 받기 때문에, 동역학 측정장치는 온도를 스스로 조절하고 보정할 수 있는 온도 제어부를 탑재하여 정확한 온도 제어를 통해 보다 정밀하게 동역학을 측정할 수 있다.

[94] 일측에 따르면, 동역학 측정장치는 칩 상에 복수개(일례로, 80개)의 자성 센서가 배치되고, 온도 제어부는 센서부 하부에 배치되는 저항 온도 감지기(resistance temperature detector; RTD)와 열전 냉각기(thermoelectric cooler; TEC)를 포함할 수

있으며, 이를 통해 복수개의 자성 센서 각각을 기 설정된 온도로 제어 및 유지할 수 있다.

[95] 구체적으로, 온도 제어부는 자체적으로 온도를 조절 및 보정하는 시스템으로, 센서 리더기에 탑재된 형태로 구현될 수 있으며, 여기서 센서 리더기는 자성 센서를 감싸고 있는 카트리지 내부에 저항 온도 감지기(RTD)와 열전 냉각기 (TEC)가 배치되며, DAQ 보드를 통해 컴퓨터와 통신하며 온도를 조절 및 보정할 수 있다. 이를 통해, 동역학 측정장치는 엔도뉴클레아제의 반응 온도를 균일하게 유지하거나 필요에 따라 변화시킬 수 있다.

[96] 도 5 내지 도 9는 제1 실시예에 따른 동역학 측정장치의 동역학 측정 결과를 설명하기 위한 도면이다.

[97] 도 5 내지 도 9를 참조하면, 도 5의 (a)는 자성 센서 각각에 부착된 서로 다른 염기 서열을 갖는 DNA(P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7 및 NP)에 대한 동역학(즉, 특이적인 반응 유무 및 속도)의 측정 결과를 도시하고(여기서, △MR은 자성 신호의 변화를 의미한다), 도 5의 (b)는 측정된 신호를 미켈리스-멘튼 반응 속도론(michaelis-menten enzyme kinetics)을 기반으로 하는 표면 효소 운동 방정식(surface enzyme kinetics)에 커브 피팅(curve fitting)한 결과(즉, 상술한 수식1을 통해 피팅한 결과)를 도시한다.

[98] 도 5의 (a)에서 BSA는 네거티브 컨트롤(negative control)로서 비-특이(non-specific)한 결합신호가 없는지 등을 확인하여 신호가 낮게 나오면 실험이 잘 되었는지를 확인하는데 활용될 수 있다.

[99] 도 6의 (a)는 엔도뉴클레아제인 EcoRI의 인식 부위를 포함하지만 서로 독립적으로 디자인된 DNA 쌍, 즉 프로브-타겟의 조합에 대한 교차 반응성을 검증한 결과를 도시하고, 도 6의 (b)는 일실시예에 따른 온도 제어부를 이용하여 온도를 변화시켜가며 측정한 유효 반응 속도 매개변수(k_{eff})의 측정 결과를 도시하며, 도 6의 (c) 및 (d)는 EcoRI의 농도에 따른 유효 반응 속도 매개변수(k_{eff})의 측정 결과를 도시한다. 여기서 도 6의 (c)는 엔도뉴클레아제의 반응 시간에 따라 실시간으로 감소하는 GMR 센서의 신호를 나타내며, 엔도뉴클레아제를 주입하기 바로 직전의 신호로 모든 신호를 나눠줬기 때문에 각 농도 별 신호는 1에서 시작한다.

[100] 또한, 도 7의 (a) 내지 (d) 각각은 순서대로 염 농도, 이온 강도, pH, 효소 활동 억제제(EDTA)의 농도를 변화시켜가면서 측정한 유효 반응 속도 매개변수(k_{eff})의 측정 결과를 도시하고, 도 7의 (e) 및 (f)는 엔도뉴클레아제의 활동 중간에 억제제인 효소 활동 억제제(EDTA)를 고농도로 넣어주어 실시간으로 버퍼의 조성을 변경한 후, 그에 따른 자성 신호의 변화를 측정한 결과를 도시한다.

[101] 도 8의 (a) 내지 (d) 각각은 순서대로 금속 보조인자, pH, 염 농도, 이온 강도를 변화시켜가면서 측정한 EcoRI의 유효 반응 속도 매개변수(k_{eff})의 측정 결과를 도시한다.

[102] 여기서, PT1부터 PT6는 P1부터 P6 프로브 DNA를 GMR 센서 표면에 부착시키고 여기에 상보적인 타겟 DNA, T1부터 T6까지 넣어서 이중 가닥 DNA (dsDNA)를 생성한 자성 센서를 의미한다.

[103] 즉, PT1부터 PT6는 각각 EcoRI이 일반적으로 절단하는 GAATTC의 서열을 갖거나(PT1) 또는 스타 활성이 발생할 때 자른다고 알려진 서열(PT2부터 PT6)까지를 포함하고 있으며, 효소의 스타 활성은 인식 부위의 염기 서열에 따라 특이적으로 나타나므로 그래프의 각 바는 각각 다른 프로브-타겟 세트에 대한 반응 속도를 의미한다. 또한 *로 나타낸 그래프는 효소의 절단 반응을 확인할 수 없는 프로브-타겟 세트를 의미한다.

[104] 도 9의 (a) 및 (b)는 각종 버퍼 및 타액/혈청에는 프로브-타켓 세트를 자르거나 교란시키는 성분이 들어있지 않음을 검증한 결과를 도시한다.

[105] 또한, 도 9의 (c)는 EcoRI의 효소 활동 매개 변수를 생체 모방 버퍼 조건에서 측정한 결과를 도시하고, 도 9의 (d)는 마그네슘 이온(Mg^{2+})이 없는 버퍼에 EcoRI를 투입한 후, 이러한 버퍼를 반응부에 투입하고, 중간에 마그네슘 이온(Mg^{2+})를 투입한 실험 결과를 도시하며, 도 9의 (e) 및 (f)는 마그네슘 이온(Mg^{2+})을 중간에 투입한 결과와, 처음부터 투입한 결과의 비교 결과를 도시한다.

[106] 도 5에 따르면, 동역학 측정장치는 엔도뉴클레아제의 반응 속도를 측정할 때 여러 개의 자성 센서를 포함하는 센서 칩을 이용하고, 각 센서마다 다른 서열을 갖는 DNA를 부착하여 엔도뉴클레아제의 DNA 서열에 대한 특이적인 반응 유무 및 속도를 측정할 수 있다.

[107] 또한, 동역학 측정장치는 엔도뉴클레아제에 절대로 절단 될 수 없는 DNA 서열 등을 추가하여 플랫폼이 정상적으로 측정되는지 여부를 판단할 수 있으며, 다양한 서열을 추가함으로써 기존에 알려지지 않았던 반응성을 도출할 수도 있다.

[108] 이와 같이, 동역학 측정장치는 엔도뉴클레아제의 반응에 따른 자성 센서 신호의 변화량을 측정하게 되면 수학적인 모델에 대해 커브 피팅(curve fitting)을 진행하여 효소의 유효 반응 속도 매개변수(k_{eff})를 용이하게 계산할 수 있다.

[109] 구체적으로, 동역학 측정장치는 자성 나노입자에 기반하는 자성 센서를 이용하여 엔도뉴클레아제(즉, 효소)가 DNA(즉, 기질)를 절단 시키는지, 그리고 절단을 시켰다면 얼마나 빠르게 절단하는지(즉, 절단 시간; 속도)와 같이 보다 용이하게 정량화된 엔도뉴클레아제의 동역학 측정 결과를 도출할 수 있다.

[110] 또한, 동역학 측정장치는 복수의 자성 센서 각각에 서로 다른 염기 서열을 갖는 DNA 각각을 부착함으로써, 엔도뉴클레아제가 동시에 다른 염기 서열을 갖는 DNA를 절단 시키는지, 그리고 절단을 시켰다면 얼마나 빠르게 절단하는지를 용이하게 확인할 수 있다.

[111] 도 6에 따르면, 동역학 측정장치는 자성 센서 각각에 모든 프로브 DNA가 올라가 있는 상황에서 한 가지 타겟 DNA만을 넣어줄 때 발생하는 신호를 관찰하여 각 프로브-타겟 조합이 독립적이며 대응되지 않는 DNA 쌍은 서로 결합하지 않

음을 보다 용이하게 확인할 수 있다. 구체적으로, T1은 P1에만 결합하고 P2, P3 등에는 결합하지 않으며, 마찬가지로 T2는 P2에만 결합하고 P1, P3 등에는 결합하지 않는 것을 확인할 수 있다.

[112] 도 7 및 도 8에 따르면, 동역학 측정장치는 환경 요인(염 농도, pH, 이온 강도 및 효소 활동 억제제(EDTA)의 농도 변화)이 변화함에 따라 반응 속도가 변화하는 것을 보다 용이하게 측정할 수 있다.

[113] 일측에 따르면, 동역학 측정장치는 엔도뉴클레아제의 동역학 측정 과정에서 효소 활동 억제제(EDTA)를 주입하여 엔도뉴클레아제의 반응을 중단시키고 실시간으로 버퍼 조건을 달리하여 동역학 측정 과정을 재수행할 수 있으며, 이 경우에도 안정적으로 엔도뉴클레아제의 동역학을 측정할 수 있다.

[114] 도 9에 따르면, GMR 센서의 신호가 혈장, 인공 침, DMEM, HBSS 등의 세포 배양액과 같은 생체 내 환경을 모방하는 버퍼들에서 안정적으로 동역학 측정 결과를 도출할 수 있으며, 실시간으로 Mg^{2+} 이온을 첨가하여 환경을 변화시키는 과정에서도 용이하게 신호 변화 및 효소의 활성 및 동역학의 측정 결과를 도출할 수 있다.

[115] 도 10a 내지 도 10c는 일실시예에 따른 동역학 측정장치의 제2 실시예를 설명하기 위한 도면이다.

[116] 도 10a 내지 도 10c에 따르면, 도면부호 1010 내지 1030은 단일 가닥 DNA (ssDNA)에 기반하는 동역학 측정장치를 설명하는 도면이다.

[117] 구체적으로, 도면부호 1010은 유전자 편집 기술에 응용되는 대표적인 유전자 가위 시스템, CRISPR/Cas12의 엔도뉴클레아제(효소) 활성 및 동역학을 측정하는 방법을 도시하는 도면으로, 엔도뉴클레아제(즉, 효소)인 CRISPR/Cas12a의 trans-cleavage를 활성화 하기 위해 크리스퍼 RNA (crRNA)와 이에 상보적인 타겟 DNA를 넣어 조립할 수 있다.

[118] 또한, 도면부호 1020 및 1030은 활성화된 CRISPR/Cas12a가 센서 표면에 부착된 각기 다른 염기 서열의 단일 가닥 DNA를 무분별하게 절단하는 예시를 도시한다.

[119] 구체적으로, 도면부호 1020 및 1030에 따르면, 자성 센서 위에 단일 가닥 DNA(ssDNA)를 부착 시킨 상태에서 자성 센서에 부착되지 않은 단일 가닥 DNA(ssDNA)의 측단에 자성 나노입자를 부착시킬 수 있으며, 이후 CRISPR/Cas12a가 도입되면, CRISPR/Cas12a는 DNA의 특정 부위를 절단하게 되고 이를 통해 자성 센서 표면에 자성 나노입자도 센서 표면에서 떨어져나오면서 신호가 감소될 수 있으며, 이러한 자성 신호를 이용하여 제한효소의 활성과 절단 속도 등의 동역학을 측정 및 정량화할 수 있다.

[120] 도 11은 제2 실시예에 따른 동역학 측정장치의 동역학 측정 결과를 설명하기 위한 도면이다.

[121] 도 11을 참조하면, 도 11의 (a)는 무분별한 절단 활성을 보이는 CRISPR/Cas12a에 의해 잘린 단일 가닥 DNA(ssDNA)와 이들 단일 가닥 DNA(ssDNA)의 측 단에

부착된 자성 나노입자가 센서 표면에서 멀어짐에 따라 발생하는 신호의 감소를 나타낸다.

[122] 또한, 도 10의 (b)의 * 표시는 크리스퍼 캐스 시스템의 효소 활성을 위해 필요한 Cas12a 효소, 크리스퍼 RNA(crRNA) 그리고 이에 상보적인 타겟 DNA (TS) 중 각각 하나씩을 제거하고 조립한 CRISPR/Cas12a 복합체가 활성을 띠지 못해 효소의 유효 반응 속도 매개변수(k_{eff})를 측정하지 못했음을 의미한다.

[123] 또한, 도 10의 (c)는 타겟 DNA (TS)의 길이에 따라서도 CRISPR/Cas12a의 절단 운동 매개 변수가 영향을 받고 있음을 나타낸다.

[124] 도 12는 일실시예에 따른 동역학 측정장치의 제조방법을 설명하기 위한 도면이다.

[125] 다시 말해, 도 12는 도 1 내지 도 11를 통해 설명한 일실시예에 따른 동역학 측정장치의 제조방법을 설명하는 도면으로, 이하에서 도 12를 통해 설명하는 내용 중 도 1 내지 도 11를 통해 설명한 내용과 중복되는 설명은 생략하기로 한다.

[126] 도 12를 참조하면, 1210 단계에서 제조방법은 엔도뉴클레아제와 반응하여 절단 반응이 발생되는 적어도 하나의 기질(substrate)의 절단 동역학의 측정 결과를 생성하는 동역학 측정부와 연결되고, 적어도 하나의 자성 센서를 구비하는 센서부를 준비할 수 있다.

[127] 다음으로, 1220 단계에서 제조방법은 반응부를 구성하는 기질을 자성 센서 각각에 부착할 수 있다.

[128] 일측에 따르면, 1220 단계에서 제조방법은 서로 다른 염기 서열을 갖는 기질 각각을 자성 센서 각각에 부착할 수 있으며, 여기서 기질은 이중 가닥 DNA, 단일 가닥 DNA 및 RNA 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[129] 일측에 따르면, 1220 단계에서 제조방법은 디스펜서(dispenser), 스탬프(stamp) 및 미세유로 중 적어도 하나의 수단을 통해 자성 센서 각각에 프로브 DNA를 부착한 후, 프로브 DNA 각각에 상보적인 타겟 DNA를 대응되는 프로브 DNA 각각과 결합시킬 수 있다.

[130] 구체적으로, 1220 단계에서 제조방법은 자성 센서 각각에 프로브 DNA를 부착한 후, 각 프로브 DNA에 상보적인 여러 타겟 DNA를 한꺼번에 혼합하여 프로브 DNA에 주입할 수 있다.

[131] 또한, 1220 단계에서 제조방법은 자성 센서 각각에 프로브 DNA를 부착한 후, 디스펜서, 스탬프 및 미세유로 중 적어도 하나를 통해 자성 센서 각각에 부착된 프로브 DNA 각각에 대응되는 타겟 DNA를 자성 센서 상에 주입할 수도 있다.

[132] 다음으로, 1230 단계에서 제조방법은 적어도 하나의 자성 나노입자를 주입하여, 자성 나노입자를 기질의 일 측단에 형성된 부착물질을 통해 기질과 연결할 수 있다.

[133] 한편, 동역학 측정부는 1210 내지 1230 단계를 통해 생성된 동역학 측정장치의 반응부에 엔도뉴클레아제가 유입되면, 자성 센서로부터 기질과 엔도뉴클레아제

의 반응 결과에 대응되는 자성 신호를 수신하고, 자성 신호에 기초하여 엔도뉴클레아제에 따른 기질의 절단 동역학의 측정 결과를 생성할 수 있다.

[134] 결국, 본 발명을 이용하면, 온도와 버퍼의 조성 등 주변 환경에 영향을 덜 받는 자성 센서에 기반하는 생체 모방 환경에서 다양한 엔도뉴클레아제의 효소 동역학을 보다 정확하게 측정할 수 있다.

[135] 또한, 본 발명을 이용하면, 다양한 DNA 염기 서열에 대한 엔도뉴클레아제의 반응성을 보다 용이하게 확인할 수 있다.

[136] 또한, 본 발명을 이용하면, 유전자 편집을 위한 정밀한 약제 개발에 필요한 정보를 제공하고, DNA 염기 서열에 따라 반응성이 달라지는지 여부도 확인하여 유전자 편집 기술을 적용할 때 원치 않는 DNA를 편집하는 부작용을 최소화할 수 있다.

[137] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기의 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 예를 들면, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 장치, 구조, 장치, 회로 등의 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

[138] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 특허청구범위의 범위에 속한다.

산업상 이용가능성

[139] 본 발명은 유전자 편집 기술 관련 산업 분야에 다양하게 적용될 수 있다.

청구범위

[청구항 1] 일 측단을 통해 자성 나노입자와 연결되며 엔도뉴클레아제와 반응하여 절단 반응이 발생되는 적어도 하나의 기질(substrate)을 구비하는 반응부;
상기 기질 각각의 타 측단을 통해 연결되는 적어도 하나의 자성 센서를 구비하는 센서부 및
상기 반응부에 상기 엔도뉴클레아제가 유입되면, 상기 자성 센서로부터 상기 기질과 상기 엔도뉴클레아제의 반응 결과에 대응되는 자성 신호를 수신하고, 상기 자성 신호에 기초하여 상기 엔도뉴클레아제에 따른 상기 기질의 절단 동역학의 측정 결과를 생성하는 동역학 측정부
를 포함하는 동역학 측정장치.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 센서부는,
서로 다른 염기 서열을 갖는 기질 각각이 상기 자성 센서 각각에 부착되는
동역학 측정장치.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 기질은,
이중 가닥 DNA, 단일 가닥 DNA 및 RNA 중 적어도 하나를 포함하는
동역학 측정장치.

[청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 기질은,
상기 자성 센서와 연결되는 프로브 DNA 및
상기 프로브 DNA와 결합하고 상기 자성 나노입자가 부착되는 타겟 DNA
를 포함하는
동역학 측정장치.

[청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 프로브 DNA는,
디스펜서(dispenser), 스탬프(stamp) 및 미세유로 중 적어도 하나의 수단을 통해 상기 자성 센서 각각에 부착되는
동역학 측정장치.

[청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 기질은,
비오틴(biotin) 및 황(sulfur) 중 적어도 하나의 부착 물질이 일 측단에 부착되고, 상기 부착 물질을 통해 상기 자성 나노입자와 연결되는
동역학 측정장치.

[청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 센서부는,

상기 엔도뉴클레아제와의 반응으로 인해 상기 기질이 잘려나가면서 상기 자성 센서와 상기 자성 나노입자 사이에 거리 차이가 발생되면, 상기 거리 차이에 대응되는 상기 자성 신호를 출력하는
동역학 측정장치.

[청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 자성 센서는,
GMR(giant magneto-resistance) 센서, TMR(tunnel magnetic resistance) 센서, AMR (anisotropic magnetic resistance) 센서 및 홀(hall) 센서 중 적어도 하나의 센서를 포함하는
동역학 측정장치.

[청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 자성 센서 각각에 대응되는 영역의 온도를 조절 및 보정하는 온도 제어부
를 더 포함하는 동역학 측정장치.

[청구항 10] 엔도뉴클레아제와 반응하여 절단 반응이 발생되는 적어도 하나의 기질(substrate)의 절단 동역학의 측정 결과를 생성하는 동역학 측정부와 연결되고, 적어도 하나의 자성 센서를 구비하는 센서부를 준비하는 단계;
반응부를 구성하는 상기 기질을 상기 자성 센서 각각에 부착하는 단계 및
적어도 하나의 자성 나노입자를 주입하여, 상기 자성 나노입자를 상기 기질의 일 측단에 형성된 부착물질을 통해 상기 기질과 연결하는 단계
를 포함하고,
상기 동역학 측정부는,
상기 반응부에 상기 엔도뉴클레아제가 유입되면, 상기 자성 센서로부터 상기 기질과 상기 엔도뉴클레아제의 반응 결과에 대응되는 자성 신호를 수신하고, 상기 자성 신호에 기초하여 상기 엔도뉴클레아제에 따른 상기 기질의 절단 동역학의 측정 결과를 생성하는
를 포함하는 동역학 측정장치의 제조방법.

[청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 기질을 상기 자성 센서 각각에 부착하는 단계는,
서로 다른 염기 서열을 갖는 기질 각각을 상기 자성 센서 각각에 부착하는
동역학 측정장치의 제조방법.

[청구항 12] 제10항에 있어서,
상기 기질은,
이중 가닥 DNA, 단일 가닥 DNA 및 RNA 중 적어도 하나를 포함하는
동역학 측정장치의 제조방법.

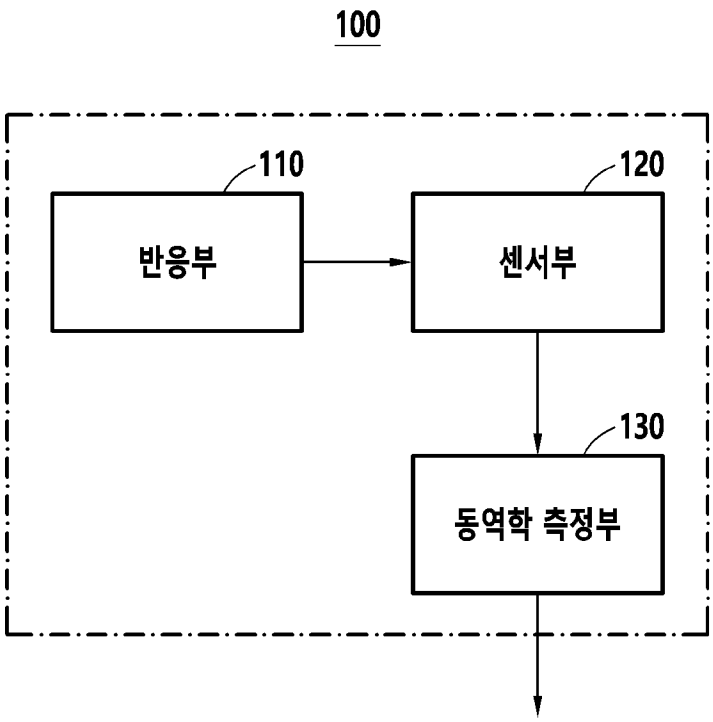
[청구항 13] 제10항에 있어서,
상기 기질을 상기 자성 센서 각각에 부착하는 단계는,

디스펜서(dispenser), 스탬프(stamp) 및 미세유로 중 적어도 하나의 수단을 통해 상기 자성 센서 각각에 프로브 DNA를 부착하는 단계 및
상기 프로브 DNA 각각에 상보적인 타겟 DNA를 대응되는 프로브 DNA 각각과 결합시키는 단계
를 포함하는 동역학 측정장치의 제조방법.

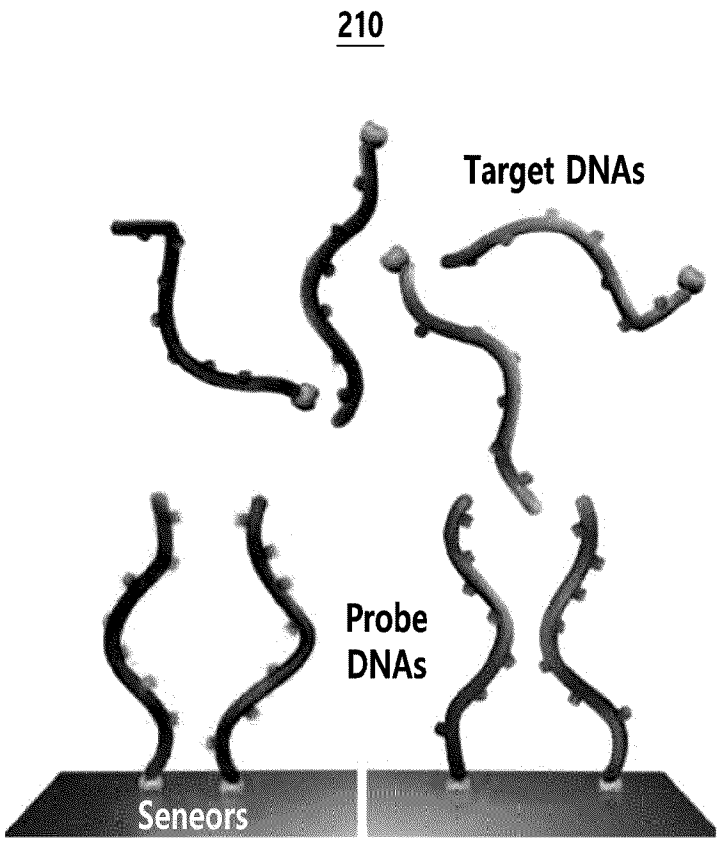
[청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 프로브 DNA 각각과 결합시키는 단계는,
상기 디스펜서, 상기 스탬프 및 상기 미세유로 중 적어도 하나를 통해 상기 자성 센서 각각에 부착된 상기 프로브 DNA 각각에 대응되는 상기 타겟 DNA를 상기 자성 센서 상에 주입하는
동역학 측정장치의 제조방법.

WO 2025/063648 PCT/KR2024/013994

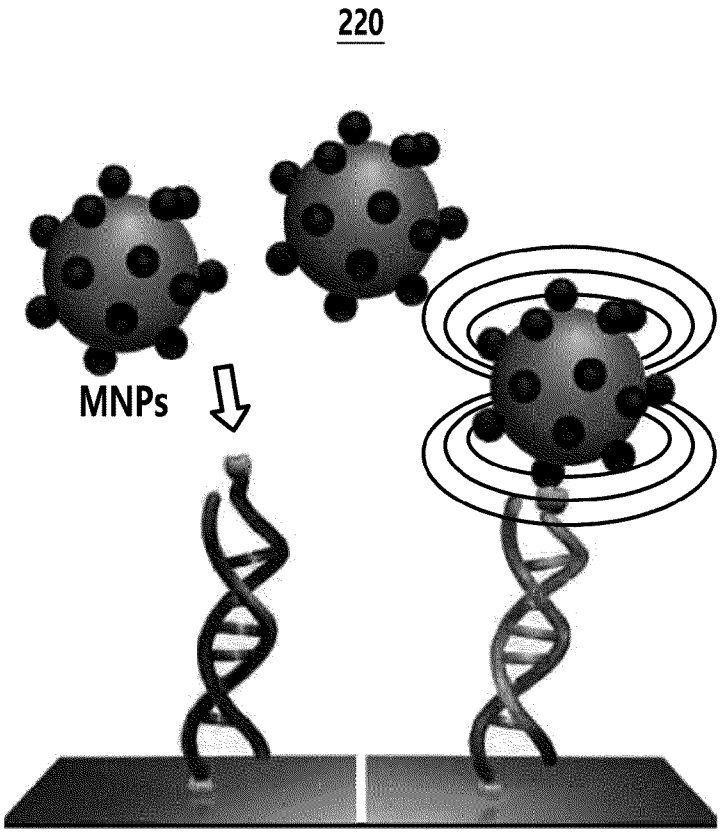
[도1]



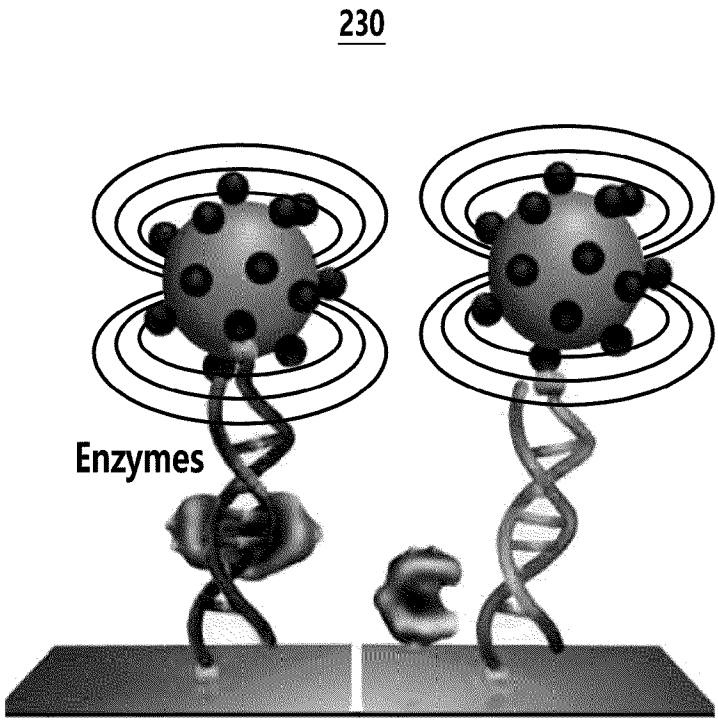
[도2a]



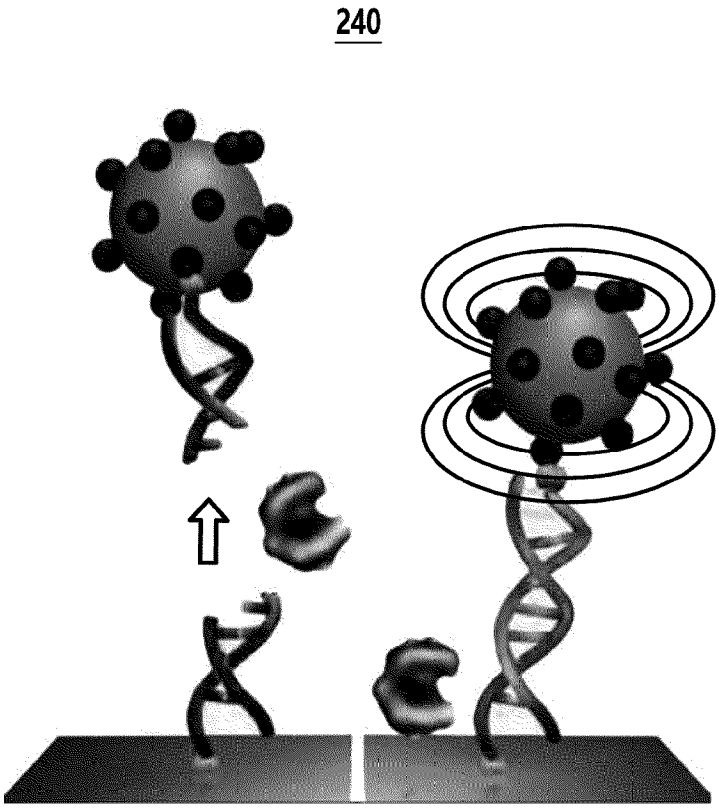
[도2b]



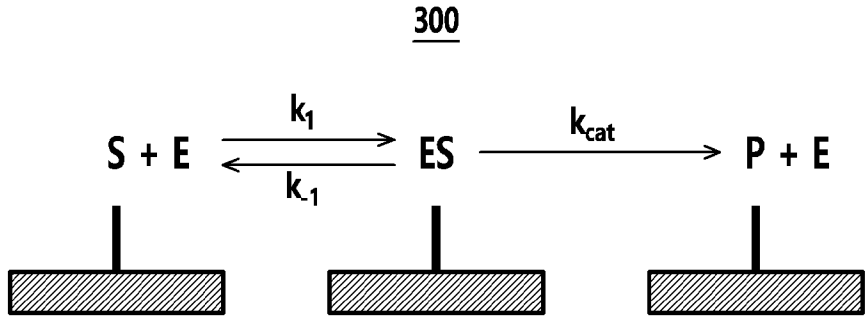
[도2c]



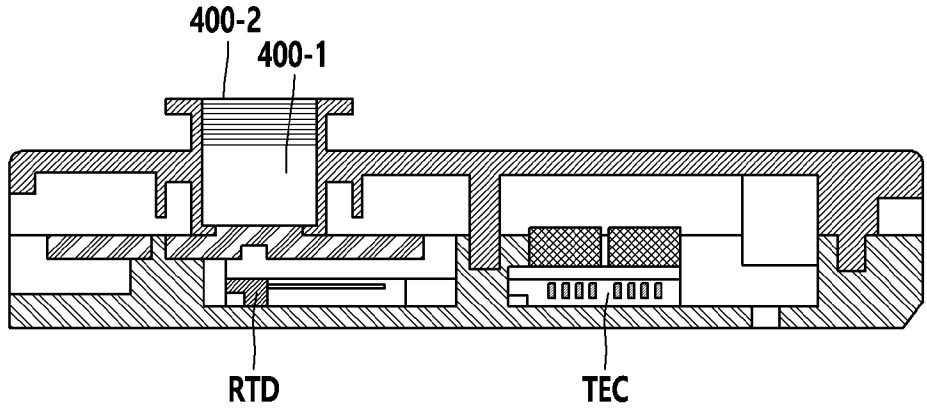
[도2d]



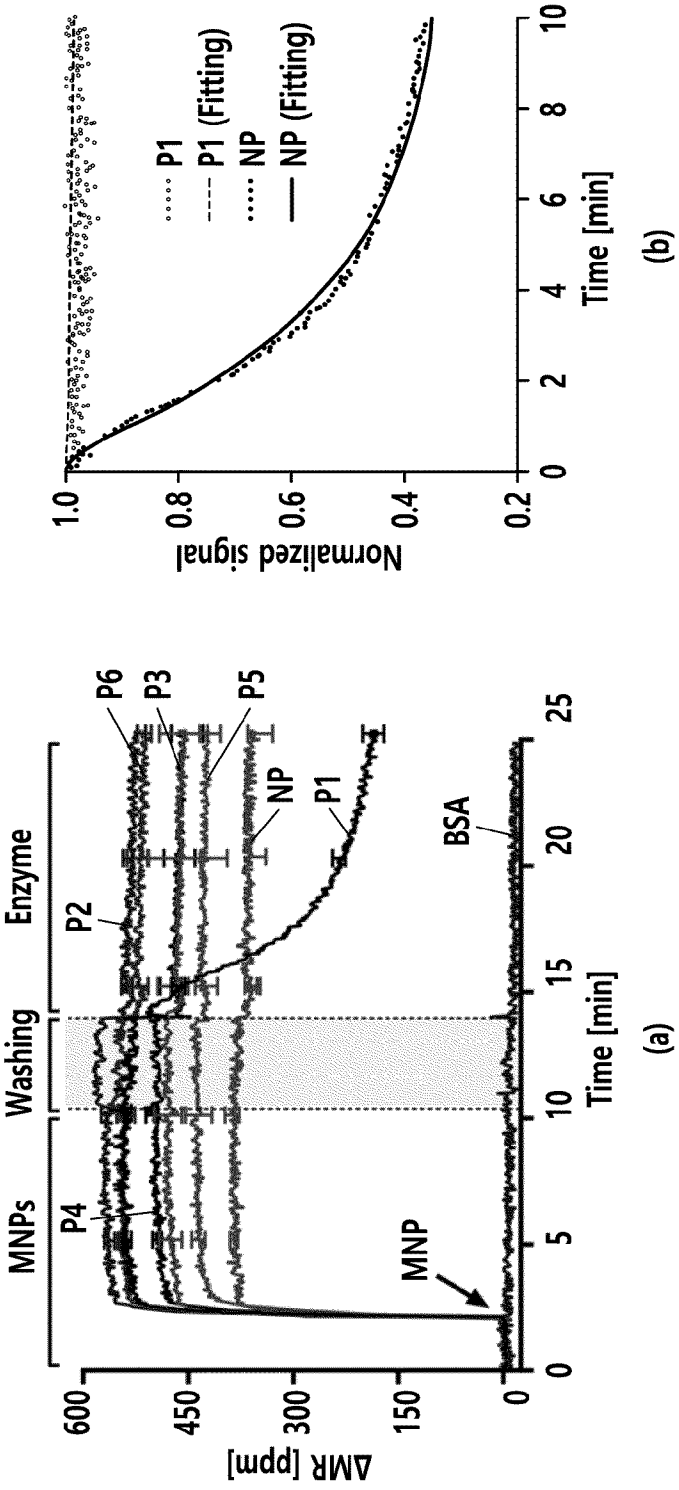
[도3]



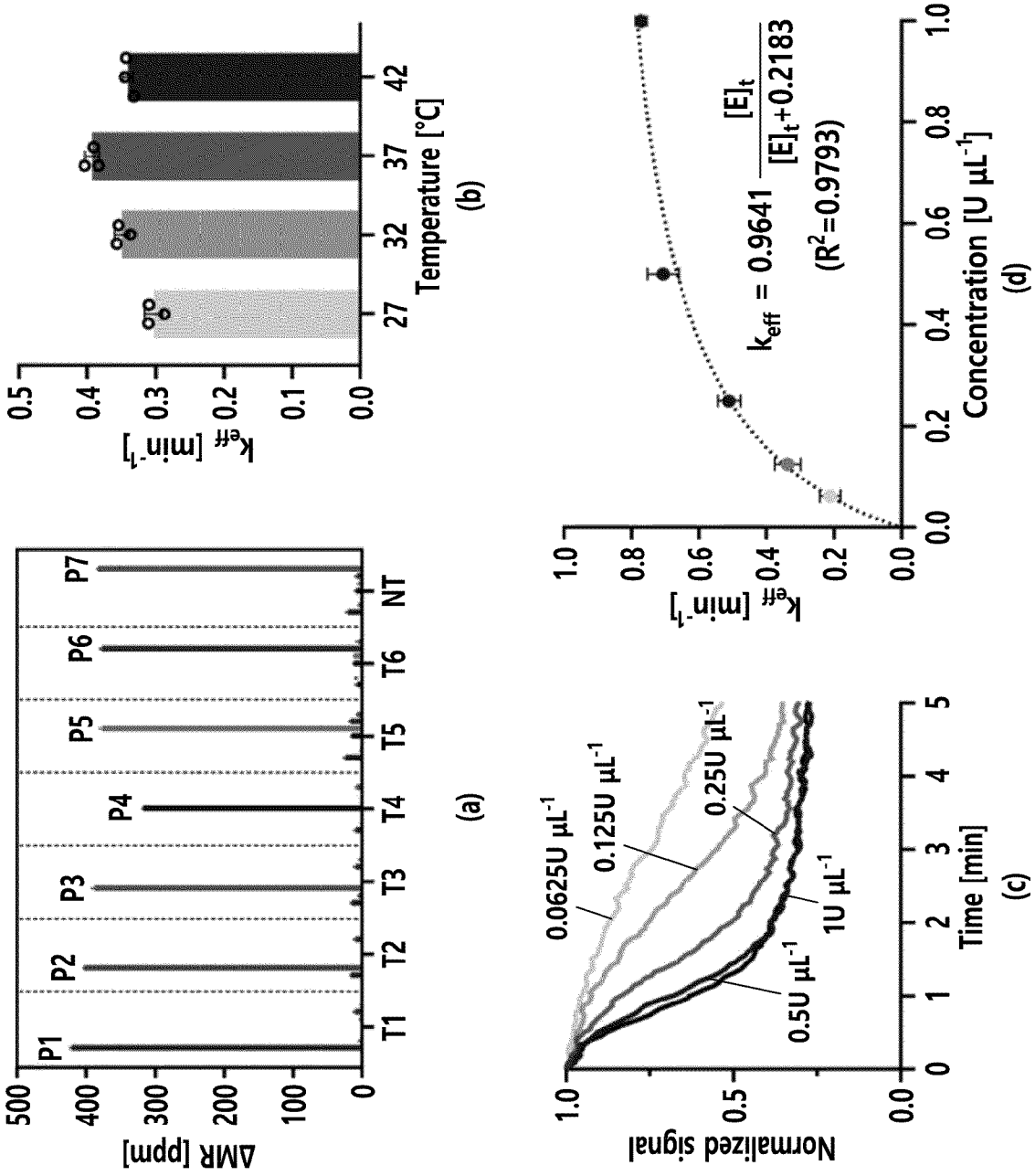
[도4]



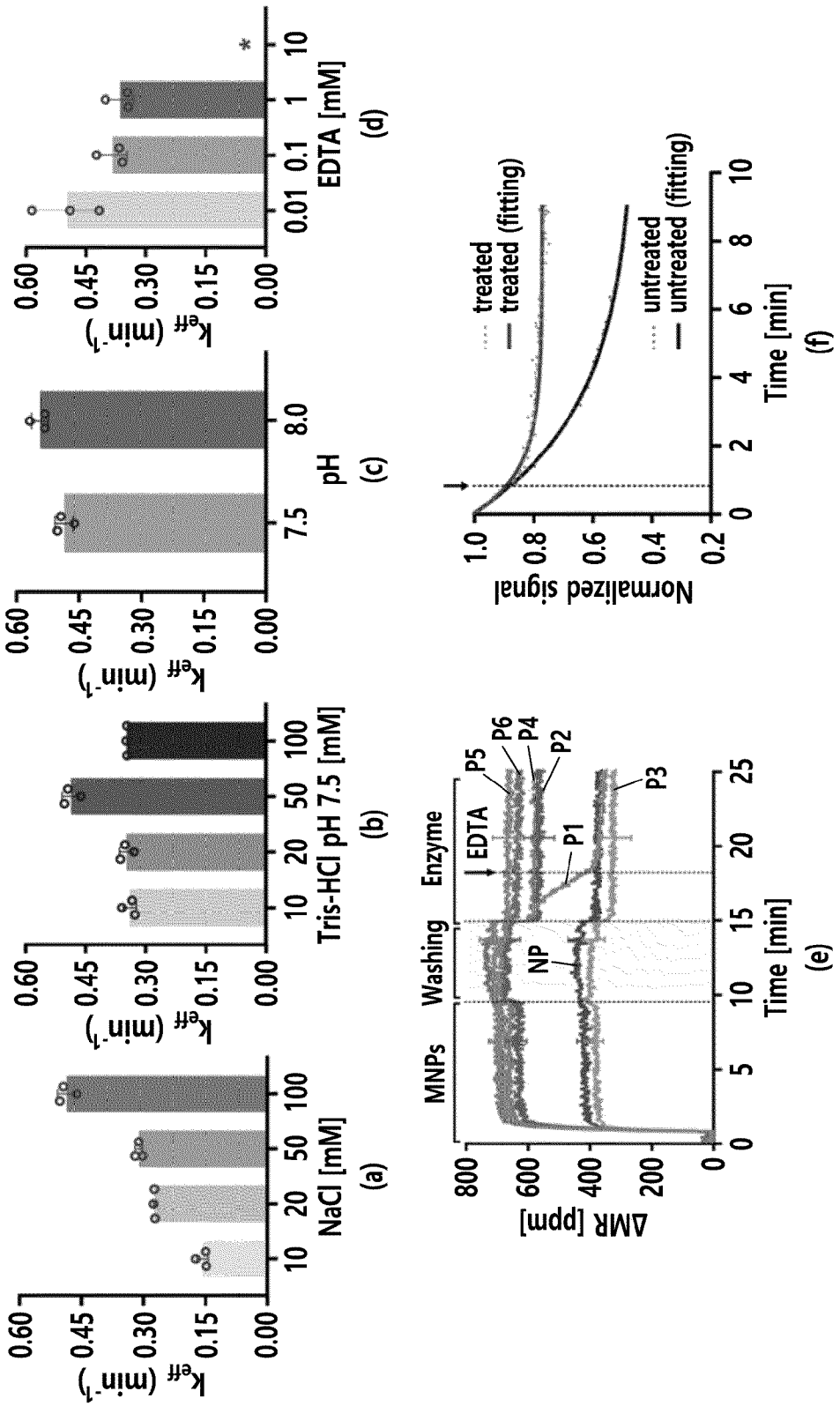
[도5]


P1
P1 (Fitting)
NP
NP (Fitting)
Normalized signal
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
2
4
6
8
10
Time [min]
(b)
MNPs
Washing
Enzyme
P4
P2
P6
P3
P5
NP
P1
BSA
MNP
ΔMR [ppm]
600
450
300
150
0
0
5
10
15
20
25
Time [min]
(a)

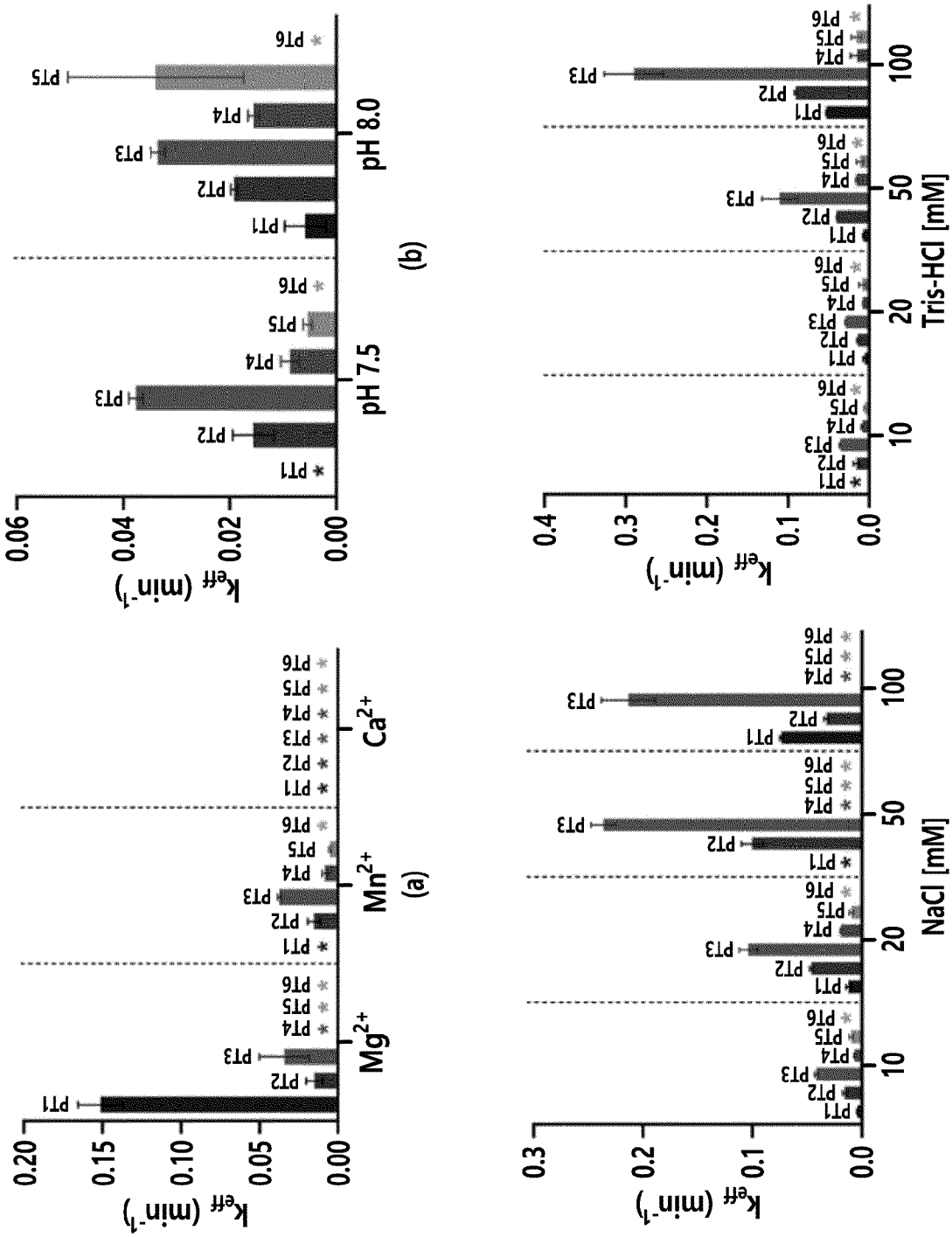
[도6]


ΔMR [ppm]
P1
P2
P3
P4
P5
P6
P7
T1
T2
T3
T4
T5
T6
NT
(a)
k_{eff} [min^{-1}]
Temperature [°C]
(b)
Normalized signal
Time [min]
0.0625U μL^{-1}
0.125U μL^{-1}
0.25U μL^{-1}
0.5U μL^{-1}
1U μL^{-1}
(c)
k_{eff} [min^{-1}]
$k_{eff} = 0.9641 \frac{[E]_t}{[E]_t+0.2183}$
(R^2=0.9793)
Concentration [U μL^{-1}]
(d)

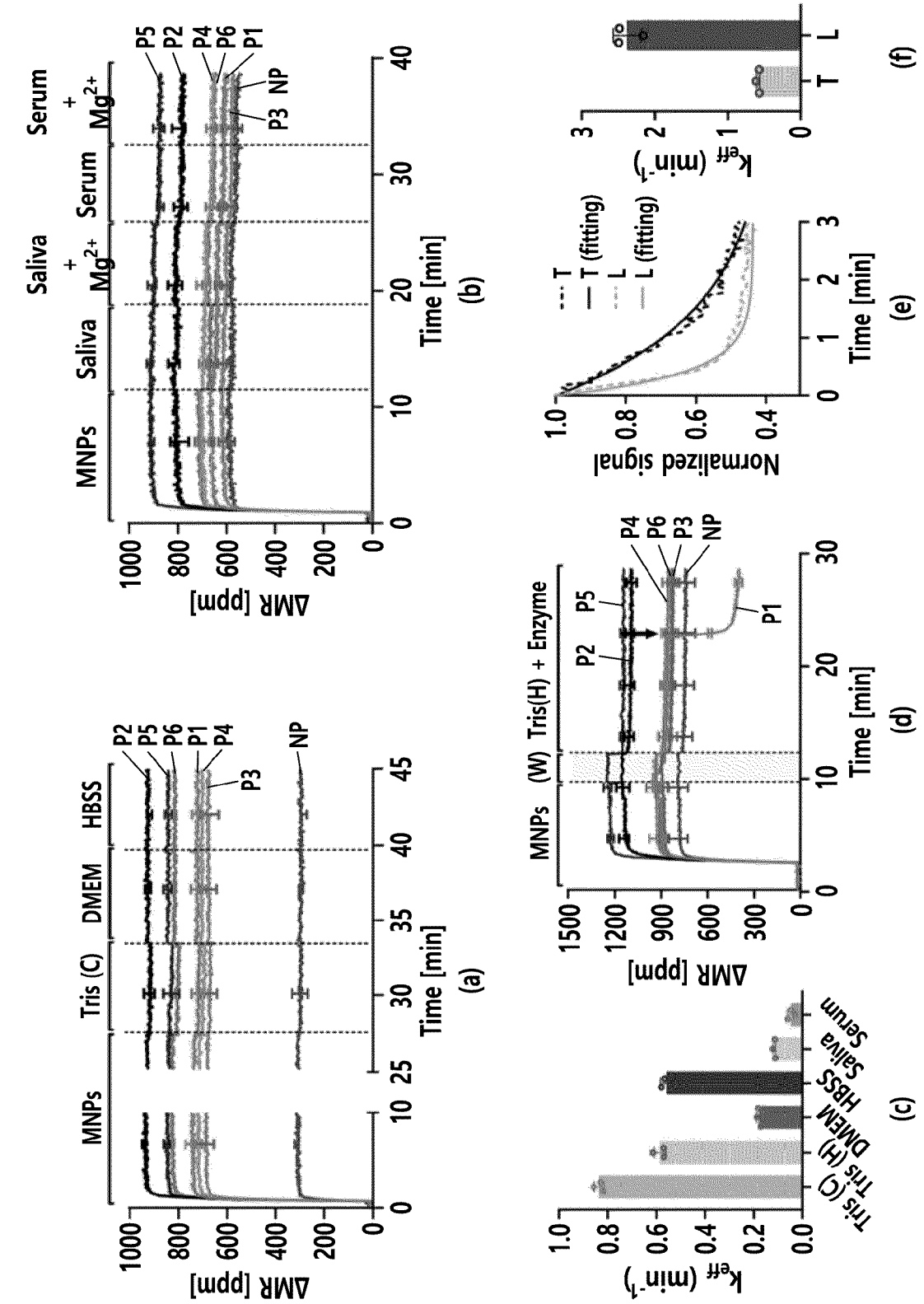
[도7]


k_{eff} (min^{-1})
NaCl [mM]
(a)
Tris-HCl pH 7.5 [mM]
(b)
pH
(c)
EDTA [mM]
(d)
MNPs
Washing
Enzyme
EDTA
NP
P1
P2
P3
P4
P5
P6
ΔMR [ppm]
Time [min]
(e)
Normalized signal
treated
treated (fitting)
untreated
untreated (fitting)
Time [min]
(f)

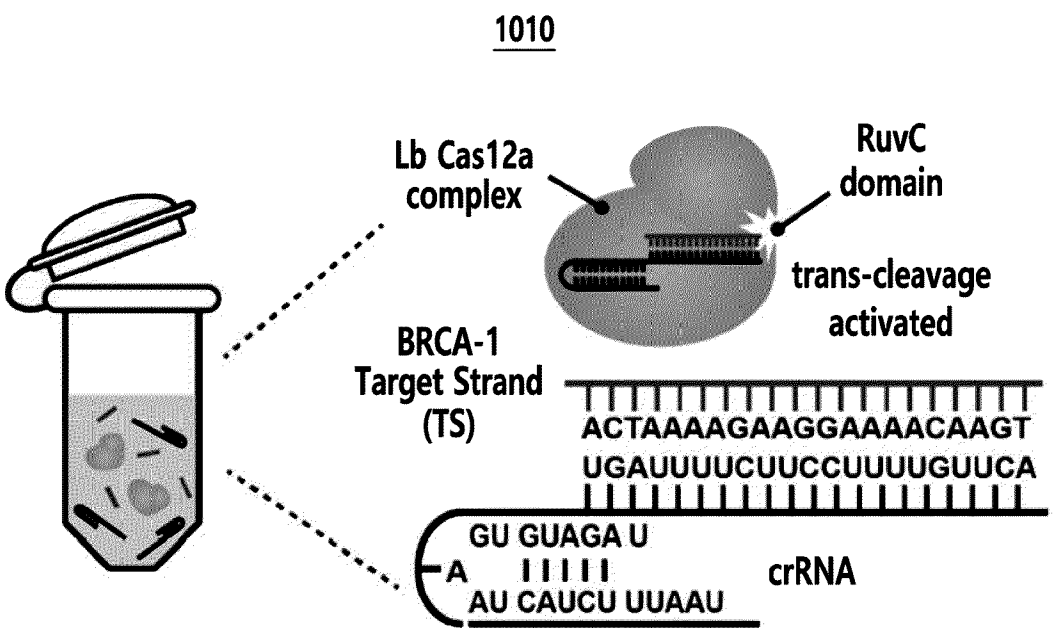
[도8]


(a)
(b)
Mg^{2+}
Mn^{2+}
Ca^{2+}
pH 7.5
pH 8.0
Tris-HCl [mM]
NaCl [mM]
k_{eff} (min^{-1})
P11
P12
P13
P14
P15
P16

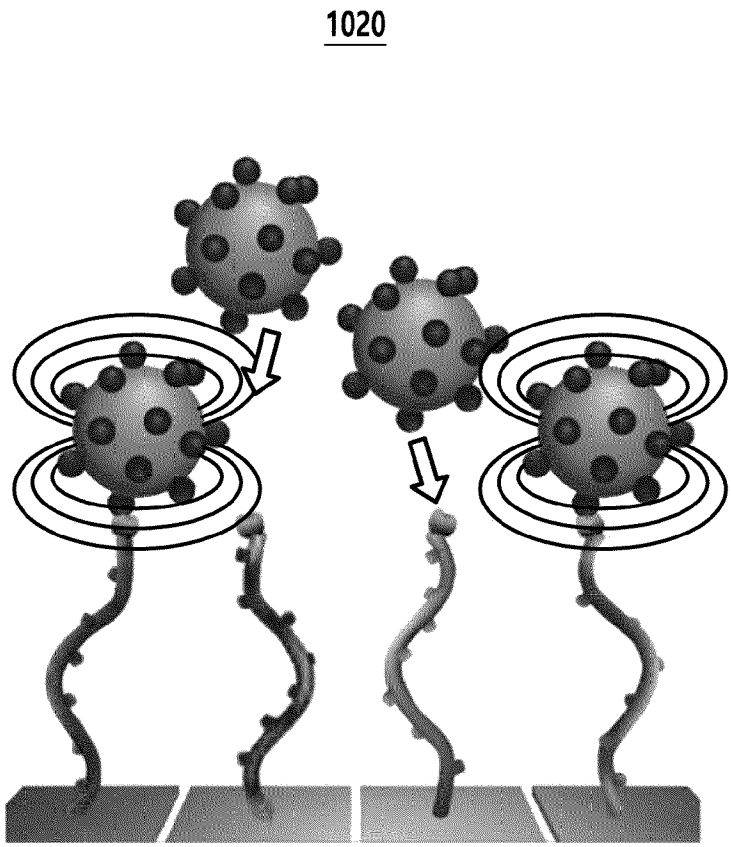
[도9]


MNPs
Tris (C)
DMEM
HBSS
P2
P5
P6
P1
P4
P3
NP
ΔMR [ppm]
Time [min]
(a)
MNPs
Saliva
+ Mg2+
Serum
+ Mg2+
P5
P2
P4
P6
P1
P3
NP
ΔMR [ppm]
Time [min]
(b)
Tris (C)
Tris (H)
DMEM
HBSS
Saliva
Serum
keff (min-1)
(c)
MNPs
(W)
Tris(H) + Enzyme
P5
P2
P4
P6
P3
NP
P1
ΔMR [ppm]
Time [min]
(d)
T
T (fitting)
L
L (fitting)
Normalized signal
Time [min]
(e)
keff (min-1)
T
L
(f)

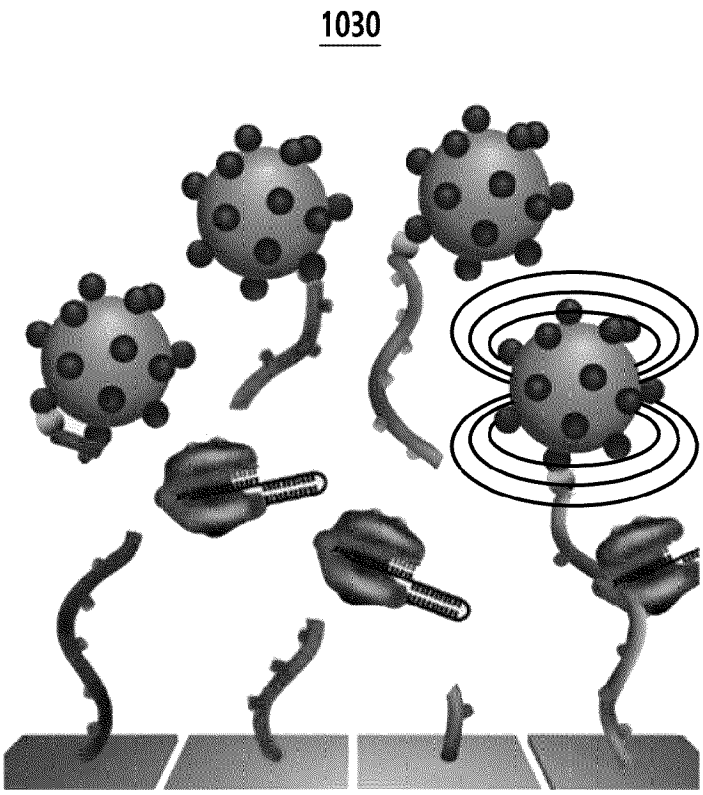
[도10a]


1010
Lb Cas12a complex
RuvC domain
trans-cleavage activated
BRCA-1 Target Strand (TS)
ACTAAAAGAAGGAAAACAAGT
UGAUUUUCUUCCUUUUGUUCA
GU GUAGA U
A
AU CAUCU UUAAU
crRNA

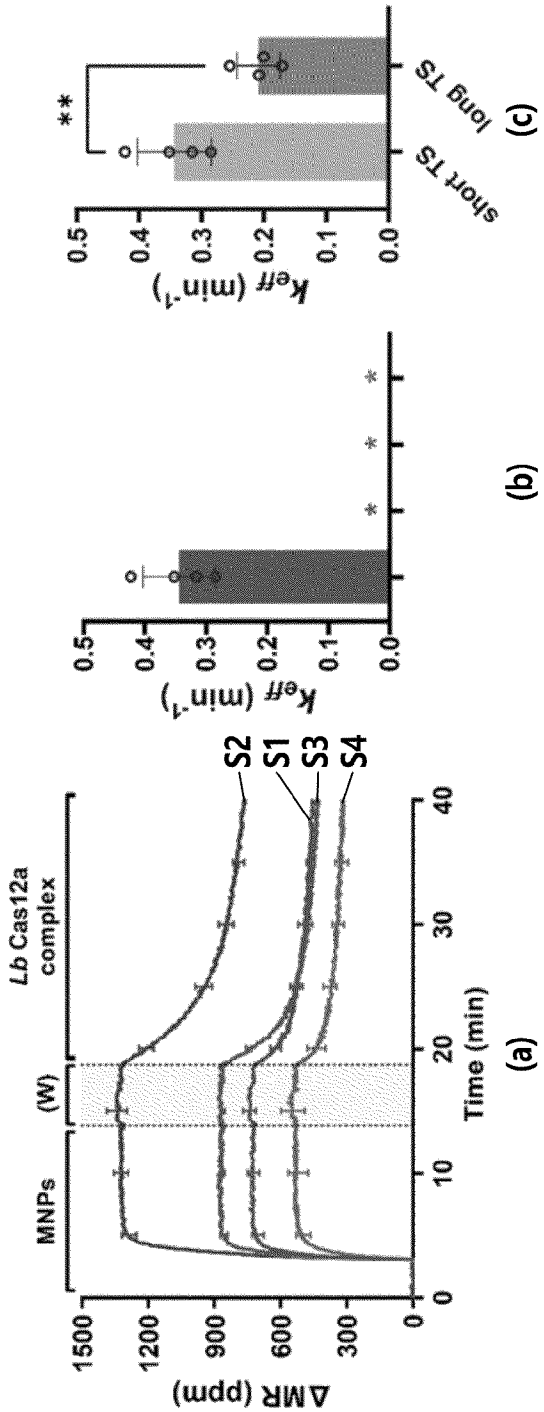
[도10b]


1020

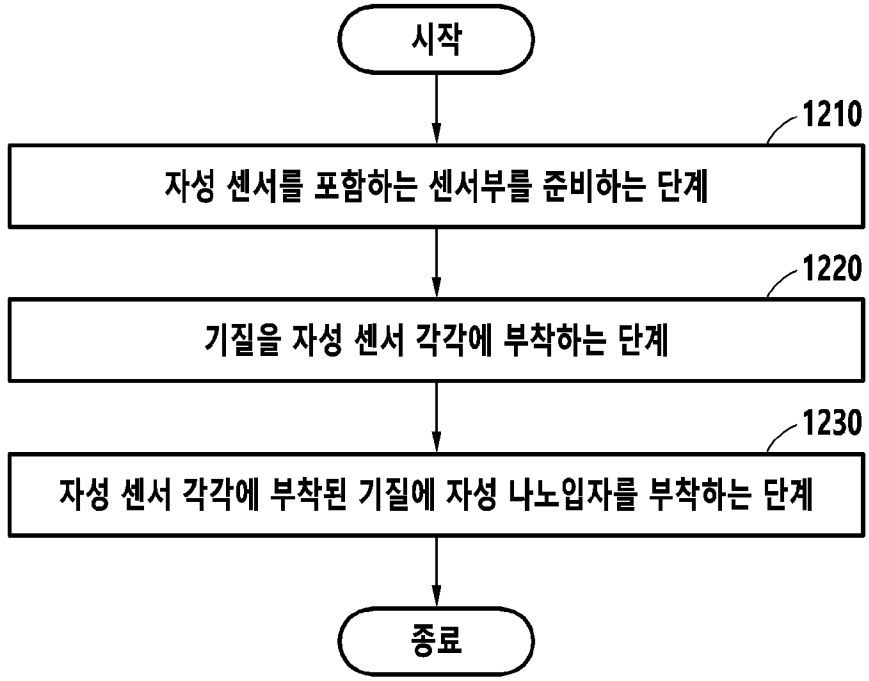
[도10c]



[도11]


S2
S1
S3
S4
Lb Cas12a complex
MNPs
(W)
ΔMR (ppm)
Time (min)
(a)
k_{eff} (min^{-1})
(b)
short TS
long TS
**
(c)

[도12]


시작
1210
자성 센서를 포함하는 센서부를 준비하는 단계
1220
기질을 자성 센서 각각에 부착하는 단계
1230
자성 센서 각각에 부착된 기질에 자성 나노입자를 부착하는 단계
종료

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2024/013994

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/557(2006.01)i; **G01N 33/573**(2006.01)i; **G01N 33/53**(2006.01)i; **G01N 33/543**(2006.01)i; **C12Q 1/44**(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)

G01N 33/557(2006.01); B01L 3/00(2006.01); C12Q 1/68(2006.01); G01N 27/74(2006.01); G01N 33/543(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: 자성 나노입자(magnetic nanoparticle, MNP), 엔도뉴클레아제(endonuclease), 동역학(kinetics), 센서(sensor), 효소 활성(enzyme activity)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GAN, Ning et al. An endonuclease-linked multiplex immunoassay for tumor markers detection based on microfluidic chip electrophoresis for DNA analysis. Sensors and Actuators B: Chemical. 2018, vol. 272, pp. 526-533 (online publication: 14 May 2018). See pages 526-532; and figure 1.	1-14
A	WO 2007-060599 A1 (KONINKLIJKE PHILIPS ELECTRONICS N.V.) 31 May 2007 (2007-05-31) See claim 12; and pages 3, 5-7 and 10.	1-14
A	KR 10-2023-0013259 A (QUANTUM IP HOLDINGS PTY LIMITED) 26 January 2023 (2023-01-26) See claims 7 and 11; and paragraphs [0190] and [0325].	1-14
A	CN 102652259 A (STANFORD UNIVERSITY BOARD OF DIRECTORS) 29 August 2012 (2012-08-29) See abstract; and claims 1 and 4-6.	1-14
A	CN 114467028 A (MAGARRAY, INC.) 10 May 2022 (2022-05-10) See abstract; and claims 1 and 35-37.	1-14

☑ 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	Date of mailing of the international search report
19 December 2024	**19 December 2024**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	IM, Jisoo et al. Evaluation of restriction and Cas endonuclease kinetics using matrix-insensitive magnetic biosensors. Biosensors and Bioelectronics. 2024, vol. 249, article no. 116017, inner pp. 1-8 (online publication: 09 January 2024). See entire document.	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2024/013994

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2007-060599	A1	31 May 2007	CN	101313218	A	26 November 2008
				EP	1957979	A1	20 August 2008
				JP	2009-517651	A	30 April 2009
				US	2008-0311598	A1	18 December 2008
KR	10-2023-0013259	A	26 January 2023	AU	2021-232687	A1	09 December 2021
				AU	2021-232687	B2	23 November 2023
				AU	2024-201129	A1	14 March 2024
				CA	3180264	A1	02 December 2021
				CN	114341641	A	12 April 2022
				EP	3938785	A1	19 January 2022
				JP	2023-528687	A	05 July 2023
				TW	202215051	A	16 April 2022
				US	11604187	B2	14 March 2023
				US	2022-0003758	A1	06 January 2022
				US	2023-0251249	A1	10 August 2023
				WO	2021-237283	A1	02 December 2021
CN	102652259	A	29 August 2012	CN	102652259	B	27 July 2016
				CN	106198715	A	07 December 2016
				CN	106198715	B	10 January 2020
				EP	2545367	A2	16 January 2013
				EP	2545367	B1	09 February 2022
				JP	2013-525746	A	20 June 2013
				JP	2015-038491	A	26 February 2015
				JP	2017-049257	A	09 March 2017
				JP	5937019	B2	22 June 2016
				JP	6104868	B2	29 March 2017
				US	10101299	B2	16 October 2018
				US	2011-0223612	A1	15 September 2011
				WO	2011-112929	A2	15 September 2011
				WO	2011-112929	A3	29 March 2012
CN	114467028	A	10 May 2022	EP	4010458	A1	15 June 2022
				JP	2022-543649	A	13 October 2022
				US	2021-0041434	A1	11 February 2021
				WO	2021-026251	A1	11 February 2021

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2024/013994

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/557(2006.01)i; **G01N 33/573**(2006.01)i; **G01N 33/53**(2006.01)i; **G01N 33/543**(2006.01)i; **C12Q 1/44**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 33/557(2006.01); B01L 3/00(2006.01); C12Q 1/68(2006.01); G01N 27/74(2006.01); G01N 33/543(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: 자성 나노입자(magnetic nanoparticle, MNP), 엔도뉴클레아제(endonuclease), 동역학(kinetics), 센서(sensor), 효소 활성(enzyme activity)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	GAN, NING 등, An endonuclease-linked multiplex immunoassay for tumor markers detection based on microfluidic chip electrophoresis for DNA analysis, Sensors and Actuators B: Chemical, 2018년, 272권, 페이지 526-533 (온라인 공개: 2018.05.14) 페이지 526-532; figure 1	1-14
A	WO 2007-060599 A1 (KONINKLIJKE PHILIPS ELECTRONICS N.V.) 2007.05.31 청구항 12; 페이지 3, 5-7, 10	1-14
A	KR 10-2023-0013259 A (퀀텀 아이피 홀딩스 피티와이 리미티드) 2023.01.26 청구항 7, 11; 단락 [0190], [0325]	1-14
A	CN 102652259 A (STANFORD UNIVERSITY BOARD OF DIRECTORS) 2012.08.29 요약; 청구항 1, 4-6	1-14
A	CN 114467028 A (MAGARRAY, INC.) 2022.05.10 요약; 청구항 1, 35-37	1-14

☑ 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 문헌과조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2024년12월19일(19.12.2024)	**2024년12월19일(19.12.2024)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관
대한민국 특허청 **(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)**	**허주형**
팩스 번호 **+82-42-481-8578**	전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2024/013994

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	IM, JISOO 등, Evaluation of restriction and Cas endonuclease kinetics using matrix-insensitive magnetic biosensors, Biosensors and Bioelectronics, 2024년, 249권, 기사번호 116017, 내부페이지 1-8 (온라인 공개: 2024.01.09) 전체 문헌	1-14

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2024/013994

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2007-060599 A1	2007/05/31	CN 101313218 A	2008/11/26
		EP 1957979 A1	2008/08/20
		JP 2009-517651 A	2009/04/30
		US 2008-0311598 A1	2008/12/18
KR 10-2023-0013259 A	2023/01/26	AU 2021-232687 A1	2021/12/09
		AU 2021-232687 B2	2023/11/23
		AU 2024-201129 A1	2024/03/14
		CA 3180264 A1	2021/12/02
		CN 114341641 A	2022/04/12
		EP 3938785 A1	2022/01/19
		JP 2023-528687 A	2023/07/05
		TW 202215051 A	2022/04/16
		US 11604187 B2	2023/03/14
		US 2022-0003758 A1	2022/01/06
		US 2023-0251249 A1	2023/08/10
		WO 2021-237283 A1	2021/12/02
CN 102652259 A	2012/08/29	CN 102652259 B	2016/07/27
		CN 106198715 A	2016/12/07
		CN 106198715 B	2020/01/10
		EP 2545367 A2	2013/01/16
		EP 2545367 B1	2022/02/09
		JP 2013-525746 A	2013/06/20
		JP 2015-038491 A	2015/02/26
		JP 2017-049257 A	2017/03/09
		JP 5937019 B2	2016/06/22
		JP 6104868 B2	2017/03/29
		US 10101299 B2	2018/10/16
		US 2011-0223612 A1	2011/09/15
		WO 2011-112929 A2	2011/09/15
		WO 2011-112929 A3	2012/03/29
CN 114467028 A	2022/05/10	EP 4010458 A1	2022/06/15
		JP 2022-543649 A	2022/10/13
		US 2021-0041434 A1	2021/02/11
		WO 2021-026251 A1	2021/02/11