

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일

2019년 10월 24일 (24.10.2019) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호

WO 2019/203486 A1

- (51) 국제특허분류: *G01N 33/543* (2006.01) *G01N 21/33* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/004132
- (22) 국제출원일: 2019년 4월 8일 (08.04.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2018-0044461 2018년 4월 17일 (17.04.2018) KR
- (71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 윤대성 (YOON, Dae Sung); 06359 서울시 강남구 광평로10길 6, 한솔마을아파트 101동 201호, Seoul (KR). 김인수 (KIM, In Su); 02856 서울시 성북구 인촌로24가길 4-11, B03호, Seoul (KR). 권도형 (KWON, Do Hyung); 02475 서울시 동대문구 제기로6길 9-3, 태양빌리지 206호, Seoul (KR). 이동택 (LEE, Dong Tak); 02584

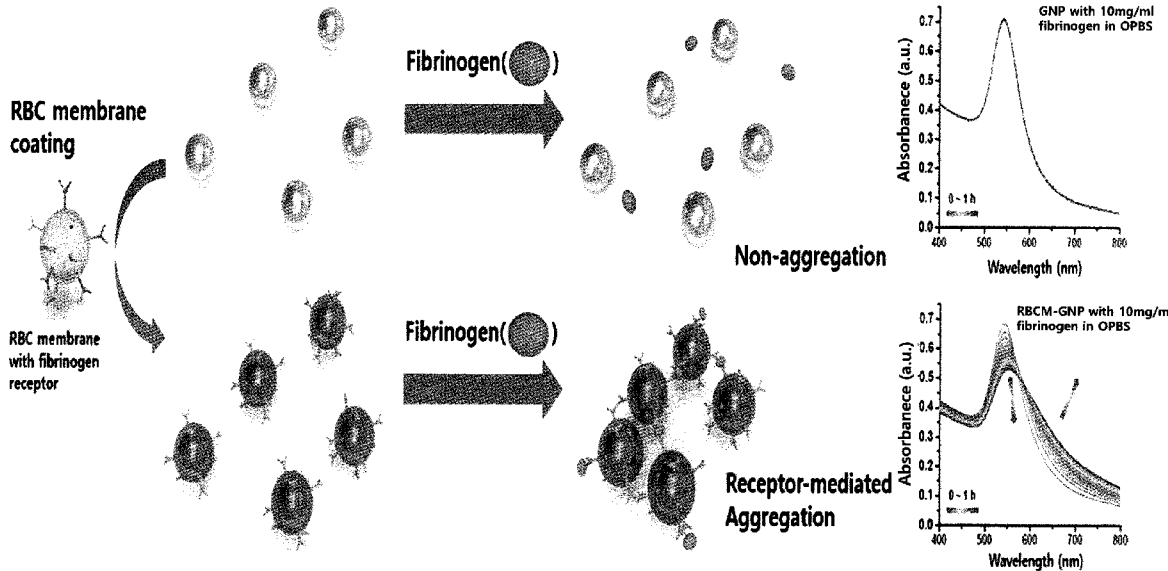
서울시 동대문구 무학로30길 6, 303호, Seoul (KR). 이상원 (LEE, Sang Won); 06683 서울시 서초구 효령로29길 42 베토벤하이츠 1동 301호, Seoul (KR). 이규복 (LEE, Gyu Bok); 05823 서울시 송파구 동남로 193, 가락쌍용아파트 203동 807호, Seoul (KR). 이규도 (LEE, Gyu Do); 12102 경기도 남양주시 별내5로5번길 49, 은원빌딩 302호, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인다해 (DAHAI INTERNATIONAL PATENT & LAW FIRM); 06156 서울시 강남구 삼성로 531 고운빌딩 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, 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,

(54) Title: METHOD FOR MEASURING FIBRINOGEN CONCENTRATION IN BLOOD SAMPLE, AND NANOPARTICLES THEREFOR

(54) 발명의 명칭: 혈액 샘플 내 피브리노겐 농도 측정 방법 및 이를 위한 나노입자



(57) Abstract: The present invention relates to a method for measuring fibrinogen concentration in a blood sample, the method enabling the measuring of the concentration of a fibrinogen protein present in a blood sample from a human body. By using the method for measuring fibrinogen concentration, according to the present invention, an enzyme is not used, and thus convenient usage is achieved, and an error due to a factor affecting in-vivo enzyme activity does not occur, and since a reference plasma is not measured, the measuring time is reduced, and convenience is achieved, and thus, by having excellent accuracy, precision and reproducibility compared to conventional techniques, the method may be usefully employed for measuring fibrinogen concentration in a blood sample.



WO 2019/203486 A1

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 역  
내 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), 유  
럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,  
MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

---

(57) 요약서: 본 발명은 인체의 혈액 샘플 내 존재하는 피브리노겐(fibrinogen) 단백질의 농도를 측정할 수 있는 혈액 샘플 내 피브리노겐 농도 측정 방법에 관한 것으로, 본 발명의 피브리노겐 농도 측정 방법을 이용하면, 효소를 사용하지 않기 때문에 사용이 편리하고, 생체 내 효소의 활성에 영향을 주는 인자로 인한 오차가 발생하지 않으며, 레퍼런스 플라즈마의 측정이 없기 때문에 측정 시간이 감소하며 편리하므로, 종래의 기술에 비해 정확도, 정밀도 및 재현성이 우수하여, 혈액 샘플 내 피브리노겐 농도를 측정하는데 유용하게 사용될 수 있다.

## 명세서

# 발명의 명칭: 혈액 샘플 내 피브리노겐 농도 측정 방법 및 이를 위한 나노입자

### 기술분야

- [1] 본 발명은 혈액 샘플 내 피브리노겐 농도 측정 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 인체의 혈액 샘플 내 존재하는 피브리노겐 (fibrinogen) 단백질의 농도를 측정할 수 있는 혈액 샘플 내 피브리노겐 농도 측정 방법 및 상기 방법을 위한 나노입자에 관한 것이다.

### 배경기술

- [2] 우리 인간은 많은 감각기관이 있어서 오감은 물론 통증, 온도감지 등 외부에서 오는 여러 가지 자극을 감지한다. 이러한 기능을 생명체에서는 감각기관이라 하며 기계나 기구는 센서라고 한다. 결국 바이오센서는 측정 대상물로부터 정보를 얻을 때, 생물학적 요소를 이용하거나 생물학적 체계를 모방하여 색, 형광, 전기적 신호 등과 같이 인식 가능한 신호로 변환시켜주는 시스템이라고 할 수 있다. 측정 대상물질, 센서에 고정된 생물학적 요소, 신호변환기 등으로 여러 형태로 구성될 수 있으며, 상기 신호변환기의 신호변환 방법으로 전기화학, 열, 광학, 역학적 방법 등 다양한 물리, 화학적 기법이 사용되고 있다.
- [3] 최초의 바이오센서는 1962년 클락이 포도당 측정을 위해 투석막을 이용하여 제작한 글루코스 센서로 알려져 있으며, 초창기에는 효소를 신호변환 소자에 고정하여 제작한 것이 대부분이었으나, 최근에는 분자생물학의 급속한 발달과 더불어 단일클론 항체나 항체-효소 결합체 등을 사용하여 제작한 센서들이 개발되어 사용되고 있다. 또한 대량의 유전정보를 초고속으로 처리하기 위한 DNA칩, 단백질칩과 같은 칩 센서에 대한 개발 연구들이 활기를 띠고 있으며 분자생물학기술, 나노기술 및 정보통신기술들이 융합된 첨단 센서들의 개발에 많은 노력이 집중되고 있다.
- [4] 이러한 바이오센서는 목적하는 물질의 존재 유무 또는 농도에 따른 물리적 또는 화학적인 반응을 전기적, 광학적 등의 방법으로 정량 또는 정성하는 것을 목적으로 한다. 바이오센서는 임상진단/의료용도가 전체 바이오센서 시장의 90%정도를 차지하고 있고 이외에도 환경호르몬, 폐수의 BOD, 중금속, 농약과 같은 환경관련 물질의 검출 용도, 식품에 포함된 잔류농약, 항생제, 병원균, 중금속과 같은 유해한 물질의 검출에 사용되는 식품 안전성 검사용도, 사린, 탄저균과 같은 살상용 생화학 무기를 감지할 수 있는 군사적 용도, 발효공정에서 미생물의 성장조건을 제어하거나 화학/석유화학, 제약, 식품공정 등에서 발생하는 특정화학물질에 대한 모니터링 등 산업적 용도 및 생체물질 간의 결합에 대한 속도론적 분석과 같은 연구용 등 다양한 분야에 활용되고 있다.
- [5] 하지만 현재까지 적용하고 있는 바이오센서 기술은 검출하고자 하는 바이오

물질 인식을 위해서 다량의 샘플이 요구된다. 또한, 샘플을 분석하기 위하여 분석물 투입단계, 신호 발생 단계, 신호 증폭 단계, 복잡한 분석 결과 해석 단계 등 매우 복잡한 과정을 거쳐야만 하는 번거로움이 있고, 실생활에 적용하기에 매우 고가의 비용이 소요된다.

- [6] 한편, 응고인자 I(clotting factor I)으로도 알려진, 피브리노겐(fibrinogen)은 지혈(haemostasis) 및 상처 치유에 주요한 역할을 수행한다. 피브리노겐은 340kDa의 겔보기 분자량(apparent molecular weight)으로 간에서 합성되는 당단백질이며, 이황화물 다리(disulfide bridge)로 연결된  $\text{A}\alpha$ ,  $\text{B}\beta$  및  $\gamma$ 로 지칭되는 동일하지 않은 폴리펩티드 체인 3쌍으로 각각 이루어진, 두개의 이량체(dimer)로 구성된다. 이는 약 150-400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 혈류 내에서 순환한다. 혈관의 손상시, 혈소판이 활성화되고 플러그(plug)가 형성된다. 피브리노겐은 활성화된 혈소판의 교차-결합(cross-linking)에 기여함으로써 일차 지혈에 관여한다.
- [7] 동시에, 응고 캐스케이드의 활성이 개시된다. 종점으로, 트롬빈에 의한 피브리노펩티드 A 및 더 느린 속도로 피브리노펩티드 B의 단백질 가수분해성 방출에 따라 피브리노겐은 피브린으로 전환된다. 가용성 피브린 단량체는 이중 가닥의 꼬인 원섬유(fibril)로 조립된다. 후속적으로 상기 원섬유는 측방향(lateral manner)으로 배열되어, 더 두꺼운 섬유를 야기한다. 뒤이어 이 섬유는 FXIIIa에 의하여 피브린 그물망(fibrin network)으로 교차결합되어, 활성화된 혈소판과 피브린의 상호작용으로 혈소판 플러그를 안정화시켜서, 안정된 응고를 야기한다.
- [8] 최근, 피브리노겐 측정 기술은 피브리노겐을 응집시키는 효소를 사용하여 피브리노겐이 응집됨에 따라 광학적 특성이 변하는 것을 측정하는 방식을 사용하고 있다(Clauss assay, prothrombin time derived assay). 하지만, 상기 기술은 측정을 위해서 피브리노겐의 농도를 알고 있는 용액을 측정 후(calibration curve를 그린 후)에야 원하는 샘플의 피브리노겐 농도를 측정할 수 있다.
- [9] 효소를 사용하기 때문에 효소의 보관 및 정량을 투여하는 것이 상대적으로 어려움이 있다. 결과적으로 측정마다 오차가 발생하는 문제점이 있다. 또한, 샘플의 피브리노겐 농도를 측정하기 위해서는 피브리노겐의 농도를 알고 있는 용액(레퍼런스 플라즈마)을 희석해가며 몇 회 측정 후(calibration curve를 그린 후), 측정하고자 하는 샘플을 측정해야 한다. 따라서, 측정이 번거로울 뿐 아니라 각 회사에서 판매하는 레퍼런스 플라즈마를 사용할 때 마다 결과값이 다르게 나온다는 문제점이 있다.
- [10] 이에, 본 발명자들은 효소 및 레퍼런스 플라즈마를 사용하지 않으며 혈액 샘플 내 피브리노겐 농도를 측정하고자 예의 노력한 결과, 광학적 특성을 갖는 금 나노입자의 표면에 피브리노겐을 붙잡을 수 있는 세포막을 코팅한 나노입자를 이용하면, 피브리노겐의 이량체인 구조적특성에 의해 농도에 비례하여 금 나노입자들이 서로 뭉치며, 상기 뭉치는 현상은 금 나노입자의 광학적 특성을 변화시므로, 피브리노겐의 농도를 측정할 수 있다는 것을 확인하고, 세포막이

피브리노겐 외의 분자들의 접근을 막아 혈액내의 다른 단백질들에 대한 반응성이 현저히 낮아지게 되어 본 발명을 완성하게 되었다.

### 발명의 상세한 설명

#### 기술적 과제

- [11] 본 발명의 목적은 인체의 혈액 샘플 내 존재하는 피브리노겐 (fibrinogen) 단백질의 농도를 측정할 수 있는 혈액 샘플 내 피브리노겐 농도 측정 방법을 제공하는데 있다.
- [12] 본 발명의 다른 목적은 상기 혈액 샘플 내 피브리노겐 농도 측정 방법을 위한 나노입자를 제공하는데 있다.

#### 과제 해결 수단

- [13] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 피브리노겐과 특이적으로 결합하는 물질이 표면에 코팅된 피브리노겐 농도 측정용 나노입자를 제공한다.
- [14] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 혈액 샘플 내 피브리노겐 농도 측정 방법을 제공한다:
- [15] (1) 피브리노겐과 특이적으로 결합하는 물질이 표면에 코팅된 나노입자와 혈액 샘플을 접촉시키는 단계; (2) 상기 나노입자 표면에 코팅된 물질과 혈액 샘플 내 피브리노겐의 결합에 따른 상기 나노입자의 뭉침을 유도하는 단계; (3) 상기 나노입자의 분광학적 물성을 측정하는 단계; 및 (4) 상기 측정된 나노입자의 분광학적 물성을 이용하여 혈액 샘플 내 피브리노겐 농도를 계산하는 단계.

#### 발명의 효과

- [16] 본 발명의 피브리노겐 농도 측정 방법은 효소를 사용하지 않기 때문에 사용이 편리하고, 생체 내 효소의 활성에 영향을 주는 인자로 인한 오차가 발생하지 않으며, 레퍼런스 플라즈마의 측정이 없기 때문에 측정 시간이 감소하며 편리하므로, 종래의 기술에 비해 정확도, 정밀도 및 재현성이 우수하여, 혈액 샘플 내 피브리노겐 농도를 측정하는데 유용하게 사용될 수 있다.

#### 도면의 간단한 설명

- [17] 도 1은 본 발명의 혈액 샘플 내 피브리노겐 농도 측정 방법을 나타낸 개략도이다.
- [18] 도 2는 본 발명의 금 나노입자와 적혈구 막이 코팅된 금 나노입자의 TEM 이미지이다.
- [19] 도 3은 본 발명의 전혈에서 적혈구 정제를 실시한 튜브 사진이다.
- [20] 도 4는 본 발명의 적혈구 막이 코팅되기 전후의 금 나노입자의 광학적 특성 변화(좌) 및 입도 변화(우)를 나타낸 것이다.
- [21] 도 5는 본 발명의 적혈구 막이 코팅된 금 나노입자의 피브리노겐 측정 spectrum (위) 및 금 나노입자의 피브리노겐 측정 spectrum (아래) 결과이다.
- [22] 도 6은 본 발명의 적혈구 막이 코팅된 금 나노입자의 피브리노겐 측정 spectrum의 분석 (위), 금 나노입자의 피브리노겐 측정 spectrum의 분석 (아래),

(650nm/542nm, 609nm/542nm, 및 700nm/542nm) 결과이다.

- [23] 도 7은 본 발명의 적혈구 막이 코팅된 금 나노입자의 사람혈청 알부민(좌) 및 감마 글로불린(우) 측정 spectrum 결과이다.
- [24] 도 8은 본 발명의 멀티-플레이트 판독기를 이용한 96-well의 모양(좌) 및 96-well을 이용한 측정 값(우)을 나타낸 것이다.
- [25] 도 9는 본 발명의 단핵 백혈구 막이 코팅된 금 나노입자의 피브리노겐 측정 spectrum 결과이다.
- [26] 도 10은 각 나노입자의 흡수할 수 있는 파장대를 나타낸 것이다.

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [27] 본 발명에서는 광학적 특성을 갖는 금 나노입자의 표면에 피브리노겐을 붙잡을 수 있는 세포막을 코팅하였다. 세포막이 코팅된 금 나노입자는 피브리노겐이 존재할 경우 피브리노겐의 농도에 비례하여 금 나노입자들이 서로 뭉치는 현상을 나타낸다는 것을 확인하였다. 금 나노입자가 뭉치는 현상은 금 나노입자의 광학적 특성을 변화시켜 피브리노겐의 농도를 측정할 수 있다는 것을 확인하였다.
- [28] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, (1) 피브리노겐과 특이적으로 결합하는 물질이 표면에 코팅된 나노입자와 혈액 샘플을 접촉시키는 단계; (2) 상기 나노입자 표면에 코팅된 물질과 혈액 샘플 내 피브리노겐의 결합에 따른 상기 나노입자의 뭉침을 유도하는 단계; (3) 상기 나노입자의 분광학적 물성을 측정하는 단계; 및 (4) 상기 측정된 나노입자의 분광학적 물성을 이용하여 혈액 샘플 내 피브리노겐 농도를 계산하는 단계;를 포함하는 혈액 샘플 내 피브리노겐 농도 측정 방법을 제공할 수 있다.
- [29] 본 발명에서, 용어 "피브리노겐(fibrinogen)"은 본 명세서에서 천연 피브리노겐, 재조합 피브리노겐, 또는 피브린을 형성하기 위해 트롬빈에 의해 전환될 수 있는 피브리노겐의 유도체(예를 들어, 자발적 조립이 가능할 수도 있고 가능하지 않을 수도 있는 천연 또는 재조합 피브린 단량체, 또는 유도체)를 포함하기 위해 사용된다. 피브리노겐은 적어도 2개의 피브리노겐 결합 펩타이드에 결합할 수 있어야 한다. 피브리노겐은 임의의 공급원으로부터, 그리고 임의의 종(소 피브리노겐을 포함)으로부터 얻어질 수 있지만, 바람직하게는 인간 피브리노겐이다. 인간 피브리노겐은 자가 또는 공여체 혈액으로부터 얻을 수 있다. 자가 피브리노겐, 또는 재조합 피브리노겐이 바람직한데, 이것은 대상체에게 투여될 때 감염 위험을 감소시키기 때문이다.
- [30] 본 발명에 있어서, 상기 나노입자의 분광학적 물성은 조사되는 빛에 대한 특정 파장 영역대에 대한 흡광도인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [31] 본 발명에 있어서, 상기 혈액 샘플 내 피브리노겐의 농도를 검출하는 단계는, 상기 나노입자의 뭉침 크기 증가에 따라 강해지는 특정 파장 영역대의 흡광도와, 상기 나노입자의 뭉침 크기 증가에 따라 감소되는 특정 파장 영역대의 흡광도의

- 비(ratio)에 따라 상기 피브리노겐의 농도를 계산하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [32] 본 발명에서, 피브리노겐 농도를 검출하기 위하여, 나노입자의 뭉침 크기 증가에 따라 강해지는 특정 파장 영역대의 흡광도와, 나노입자의 뭉침 크기 증가에 따라 감소되는 특정 파장 영역대의 흡광도의 신호 값을 나눈 결과를 사용하였다. 이는, 정량화 및 신호의 증폭을 위함이다. 단일 파장을 통한 정량화는 장비마다 다른 흡광도 값을 가지게 되어, 단위를 분명히 할 수 없게 되며(arbitrary unit, a.u.), 따라서 흡광도를 측정하는 장비마다 다른 정량 값을 얻게 된다. 반면, 본 발명과 같이 두 파장을 선택하여 나누면, 단위가 약분되게 되어 단위가 없는 상수가 되고, 서로 다른 장비에서 다른 정량 값이 나오게 되더라도, 두 파장의 비는 일정하게 유지되기 때문에 어떤 장비로 흡광도를 측정하더라도 유의미하게 같은 정량 값을 구할 수 있다. 또한, 감소하는 신호로 증가하는 신호를 나누어주게 되면, 신호 변화가 단일 파장의 변화보다 더 크게 변하게 되어 신호를 증폭할 수 있다.
- [33] 본 발명에 있어서, 상기 나노입자는 상기 나노입자는 금 나노입자(gold nanoparticle), 은 나노입자(silver nanoparticle), 백금 나노입자(platinum nanoparticle), 은 나노큐브(Silver nanocube), 은 나노판(silver nanoplate) 및 금나노막대(gold nanorod)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [34] 본 발명에서, 사용한 금 나노입자가 뭉침에 따라 색이 변하는 현상은 localized surface plasmon resonance(LSPR) 현상에 의해서 일어난다.
- [35] 따라서, 본 발명에서, 나노입자는 LSPR 현상을 보이는 나노물질의 경우 모두 사용 가능하며, 그 예로, 백금 나노입자(platinum nanoparticle), 은 나노입자(silver nanoparticle), 금 나노입자(gold nanoparticle), 은 나노큐브(Silver nanocube), 은 나노판(silver nanoplate), 금나노막대(gold nanorod) 등이 있다.
- [36] 본 발명에서, 상기 나노입자는 일 예로써, 금 나노입자를 실시예에서 예시하고 있으나, 이것 이외에도, 유기 나노입자, 무기, 금속 나노입자 등의 비유기 나노입자 또한 모두 적용이 가능할 것이다.
- [37] 본 발명에서, 사용된 금 나노입자는 상술된 논문[Schneider and Decher(Nano Letters, 2004, Vol. 4, No. 10, 1833-1839), Dorris et al.(Langmuir, 2008, 24(6), 2532-2538), 및 Schneider and Decher(Langmuir, 2008, 24, 1778-1789)]에 기술된 것과 유사하다. 제1층이 소듐 폴리스티렌술포네이트로 제조된 입자들은 상기 Chanana et al.의 논문에 기술되어 있다.
- [38] 본 발명은 일 양태에서, 금나노입자를 실리카(이산화규소)로 코팅한 나노입자를 사용하여 안정성을 높일 수 있다.
- [39] 본 발명에 있어서, 상기 물질은 세포막인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [40] 본 발명에 있어서, 세포막으로 적혈구, 백혈구(중에서도 단핵 백혈구와 대식세포) 또는 혈소판을 세포막 물질로 사용하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 세포막 물질들은 피브리노겐 리셉터(fibrinogen receptor)를 가지고 있는

것을 특징으로 할 수 있다.

- [41] 본 발명에서, 세포막은 피브리노겐과 결합할 수 있는 물질을 일컬으며, 본 발명의 일 실시예에서는 적혈구 막 및 단핵 백혈구를 이용하였다.
- [42] 본 발명에서, 혈액 샘플이란 전혈, 혈소판-풍부 혈장 및 혈소판-결핍 혈장을 말한다. 혈액 샘플은 또한 혈청을 말할 수 있으며, 이때 상기 조건에서 본 발명에 따른 분리 메카니즘 작업을 가능하게 하기 위해 피브리노겐이 상기 샘플에 첨가되어야 한다. 본 발명에 따른 혈액은 또한 명백하게 혈액 성분, 혈액 첨가제 또는 혈액 기능을 모방하는 임의의 다른 성분들로 이루어진 혈액 대체물 또는 인공적으로 조성된 샘플을 말할 수 있다. 수혈에 통상적으로 사용되는 상기 혈액 성분의 전형적인 예로는 혈소판 농축물, 적혈구(헤모글로빈) 농축물, 혈청 또는 혈장 대체물(혈장 증량제로도 알려져 있음)이 포함된다. 상기 혈액 샘플이, 예를 들면, 패혈증 샘플, 조성된 혈액 샘플 또는 혈액 대체물과 같은 일부 임상 경우에서처럼 응고 인자(주로 피브리노겐)가 결핍되는 경우, 상기 결핍은 피브리노겐을 포함하는 응고 인자를 본 발명에 따라 표적 입자 또는 분자를 분리할 수 있는 필수 성분으로서 상기 혈액 샘플에 첨가함으로써 상쇄될 수 있다.
- [43] 그러므로, 같은 의도 안에서, 본 발명에 따른 혈액 샘플은 또한 혈액 샘플을 피브리노겐 결핍 샘플과 혼합하여 수득된 인공적으로 조성된 혈액 샘플을 말할 수 있다. 상기 피브리노겐 결핍 샘플은, 예를 들면, 생물, 임상, 식품 및 환경 샘플과 같은 임의의 공급원으로부터의 샘플을 포함할 수 있다. 보다 특히, 본 발명에 따른 혈액 샘플이란 용어는 적어도 피브리노겐을 포함하는 응고 인자를 피브리노겐 결핍 샘플과 혼합함으로써 인공적으로 조성된 혈액 샘플을 포함한다.
- [44] 본 발명은 다른 관점에서, 상기에 따른 혈액 샘플 내 피브리노겐 농도 측정 방법을 위한 나노입자로서, 상기 나노입자 표면에는 혈액 샘플 내 피브리노겐과 특이적으로 결합하는 물질이 코팅된 것을 특징으로 하는 나노입자에 관한 것이다.
- [45] 본 발명에 있어서, 상기 나노입자는 상기 피브리노겐의 결합에 따라 뭉치는 특성을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [46] 본 발명에 있어서, 상기 나노입자는 상기 피브리노겐의 결합량 증가에 따라 뭉치는 크기가 증가하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [47] 본 발명에 있어서, 상기 나노입자는 뭉치는 크기에 따라 분광학적 특성이 변화되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [48] 본 발명에 있어서, 상기 나노입자는 금 나노입자(gold nanoparticle), 은 나노입자(silver nanoparticle), 백금 나노입자(platinum nanoparticle), 은 나노큐브(Silver nanocube), 은 나노판(silver nanoplate) 및 금나노막대(gold nanorod)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [49] 본 발명에 있어서, 상기 물질은 세포막인 것을 특징으로 할 수 있다.

- [50] 본 발명에 있어서, 세포막으로 적혈구, 백혈구(중에서도 단핵 백혈구와 대식세포) 또는 혈소판을 세포막 물질로 사용하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 세포막 물질들은 피브리노겐 리셉터(fibrinogen receptor)를 가지고 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [51] 본 발명에서, “피브리노겐 센서”는 세포막이 코팅된 나노입자를 일컫는다.
- [52] 본 발명의 일 실시예에서는, 적혈구 막 및 단핵 백혈구를 정제하여, 금 나노입자에 코팅시켰다. 적혈구 막이 코팅된 금 나노입자의 광학적 특성 및 입도가 변화한 것을 확인하였다(도 4). 적혈구 막이 코팅된 금 나노입자를 이용하여 피브리노겐과 반응시킨 결과, 피브리노겐에 대한 반응성이 있으며, 신호가 상승하는 것을 확인하였다(도 5 및 도 6). 반면, 혈액 내에 존재하는 혈청 알부민과 감마 글로불린에 대하여 같은 실험을 진행하였을 때, 상기 두 물질은 적혈구 막이 코팅된 금 나노입자에 영향을 주지 않는다는 것을 확인하였다(도 7). 또한, 멀티-플레이트 판독기를 이용한 피브리노겐 측정을 통하여, 피브리노겐 농도가 증가할수록 피브리노겐 센서들이 뭉쳐 흡광도가 증가하는 것을 확인하였다(도 8).
- [53] 본 발명에 사용된 용어 "정제(purification)"는 "정화(clarification)"와 혼용하여 사용할 수 있으며, 침전물 등을 완충용액을 이용하여 재용해 시킨 후, 재용해된 용액 내에 포함된 불순물을 제거하는 것을 의미한다.

### 발명의 실시를 위한 형태

- [54] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[55]

[56] **실시예 1: 세포막 준비**

[57] 1.1 적혈구 막의 정제

- [58] EDTA가 처리된 튜브에 혈액(전혈)을 채취한다. 이후 온도를 4°C로 유지하며, 혈액을 원심분리기에 1000g로 5분간 돌려준다. 혈장과 백혈구 등은 상층으로, 적혈구는 하층으로 나뉘게 한 후, 상층부를 제거함으로써 혈액에서 적혈구를 추출하였다. 이 후, 1X PBS(pH 7.4, Gibco)에 적혈구를 담그고, 원심분리를 통해 적혈구를 추출해 주는 세척(washing)을 세 차례 진행하였다. 이후 적혈구의 용혈을 위해서, 적혈구를 0.25X PBS에 20분간 담가놓는다. 이후 PBS용액에는 적혈구 막과 막 단백질, 그리고 헤모글로빈이 혼재하게 되는데, 세포막 및 막단백질을 분리시키기 위해, 상기 용액을 원심분리기에 1000g로 5분간 유지시킨다. 이후 연분홍빛으로 하층에 가라앉은 적혈구 막과 막 단백질을 제외한 나머지 상층부를 제거한 후 세 번 세척(washing)하였다.

[59]

[60] 1.2 단핵 백혈구의 정제

[61] 온도는 4°C를 유지하며, 세포와 세포 배양 배지를 원심분리기에 1000g로 5분간 돌려준다. 이렇게 하여 하층의 세포들을 포집하여 세포들의 균집을 얻는다. 1X PBS(pH 7.4, Gibco)에 세포를 담그고, 원심분리를 통해 세포를 추출해 주는 세척(washing)을 세 차례 진행하였다. 이후 세포의 용혈을 위해서 세포를 20분간 0.25X PBS에 담가놓는다. 이후 PBS용액에는 세포 막과 막단백질, 그리고 세포내 소기관이 혼재하게 되는데, 세포막 및 막 단백질을 분리시키기 위해, 상기 용액을 원심분리기에 20000g로 5분간 유지시킨다. 이후 하층에 가라앉은 적혈구 막과 막 단백질을 제외한 나머지 상층부를 제거한 후 세 번 세척(washing)하였다(도 3).

[62]

[63] **실시예 2: 나노입자에 세포막 코팅**

[64] 나노입자에 세포막을 코팅하기 위하여, 정제된 세포막(적혈구 및 단핵 백혈구)을 정제수에 1% (v/v) 비율로 희석시킨 후, 72 W의 에너지로 5분간 초음파 처리하였다. 초음파 처리된 세포막(적혈구 및 단핵 백혈구)은 리포솜과 같은 구형의 상태가 되는데, 이곳에 50~100 nm 크기의 금 나노입자를 넣고 다시 5분간 초음파 처리하였다. 입자와 세포막은 3 ul: 800ul (0.025mg/ml)의 비율로 넣어주었다.

[65] 초음파 처리 후의 용액은 나노입자에 코팅된 세포막(적혈구 및 단핵 백혈구)과 코팅되고 남은 세포막이 공존하는데, 코팅되고 남은 세포막을 제거하기 위해, 3000rpm으로 50분간 원심분리하였다. 원심분리 후 밑에 가라앉은 입자들을 남기고 상층액을 제거한 후, 다시 같은 양의 정제수를 넣어주었다.

[66] 그 결과, 적혈구 막을 코팅한 금 나노입자 및 단핵 백혈구를 코팅한 금 나노입자를 수득하였다.

[67] 금 나노입자와 적혈구 막이 코팅된 금 나노입자를 TEM으로 관찰하였다(도 2).

[68]

[69] **실시예 3: 피브리노젠 농도 측정**

[70] 피브리노젠의 농도를 측정하기 위하여, dulbecco's phosphate buffer with calcium and magnesium에 적절한 농도의 피브리노젠을 녹인 후 자외선-가시광선 분광기(UV-Vis spectrometer)와 멀티플레이트 판독기(multiplate reader)를 통한 측정을 하였다.

[71]

[72] 3.1 자외선-가시광선 분광기(UV-vis spectrometer)를 이용한 측정

[73] 자외선-가시광선 분광기를 이용하여 투명한 큐벳 셀에 입자 400 ul와 특정 농도의 피브리노젠 400ul를 혼합하여 넣고 1분 간격으로 1시간 동안 400nm부터 800nm 까지의 범위를 측정하였으며, 측정된 값 중 650nm의 신호를 542nm의 신호값으로 나눈 결과인 상대적 흡광도를 사용하였다(A650nm/542nm, A609nm/542nm, 및 A700nm/542nm) (A: Absorbance).

[74] 그 결과, 적혈구 막을 코팅할 경우, 피브리노겐에 대한 반응성이 생기고 신호가 상승하는 것을 알 수 있다(도 5 및 도 6).

[75] 또한, 단핵 백혈구 막을 코팅하였을 때도, 피브리노겐과 반응하는 것을 확인하였다(도 9).

[76] 또한, 혈액 내에 존재하는 대표적인 단백질인 사람혈청알부민(human serum albumin)과 감마 글로불린(gamma globulin)에 대해 같은 실험을 진행한 결과, 상기 두 물질은 본 센서에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(도 7).

[77]

[78] 3.2 멀티-플레이트 판독기(multi-plate reader)를 이용한 측정

[79] 멀티-플레이트 판독기를 이용하여 투명한 96-well에 본 발명의 입자 100 ul와 특정 농도의 피브리노겐 100ul를 혼합하여 넣고 1분 간격으로 30분간 25°C에서 542nm와 650nm의 파장을 측정하였고, 650nm의 신호를 542nm의 신호값으로 나눈 상대적 흡광도를 사용하였다(A650nm/542nm). 멀티-플레이트 판독기를 사용함으로써 보다 적은 용량으로, 한번에 많은 수의 샘플을 측정할 수 있다.

[80] 그 결과, 피브리노겐 농도가 높을수록 상대적 흡광도가 증가하는 것을 확인하였다(도 8).

[81]

[82] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

### 산업상 이용가능성

[83] 본 발명의 나노입자의 제공으로 피브리노겐 농도 측정을 위한 효소 및 레퍼런스 플라즈마 측정을 이용하지 않을 수 있어, 보다 간편하고 정확하게 우수한 재현성을 나타내는 피브리노겐 농도 측정이 가능한바, 심장 질환의 위험도 평가, 유전성 섬유소원 결핍 또는 이상의 평가 등을 위한 진단시장에서 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

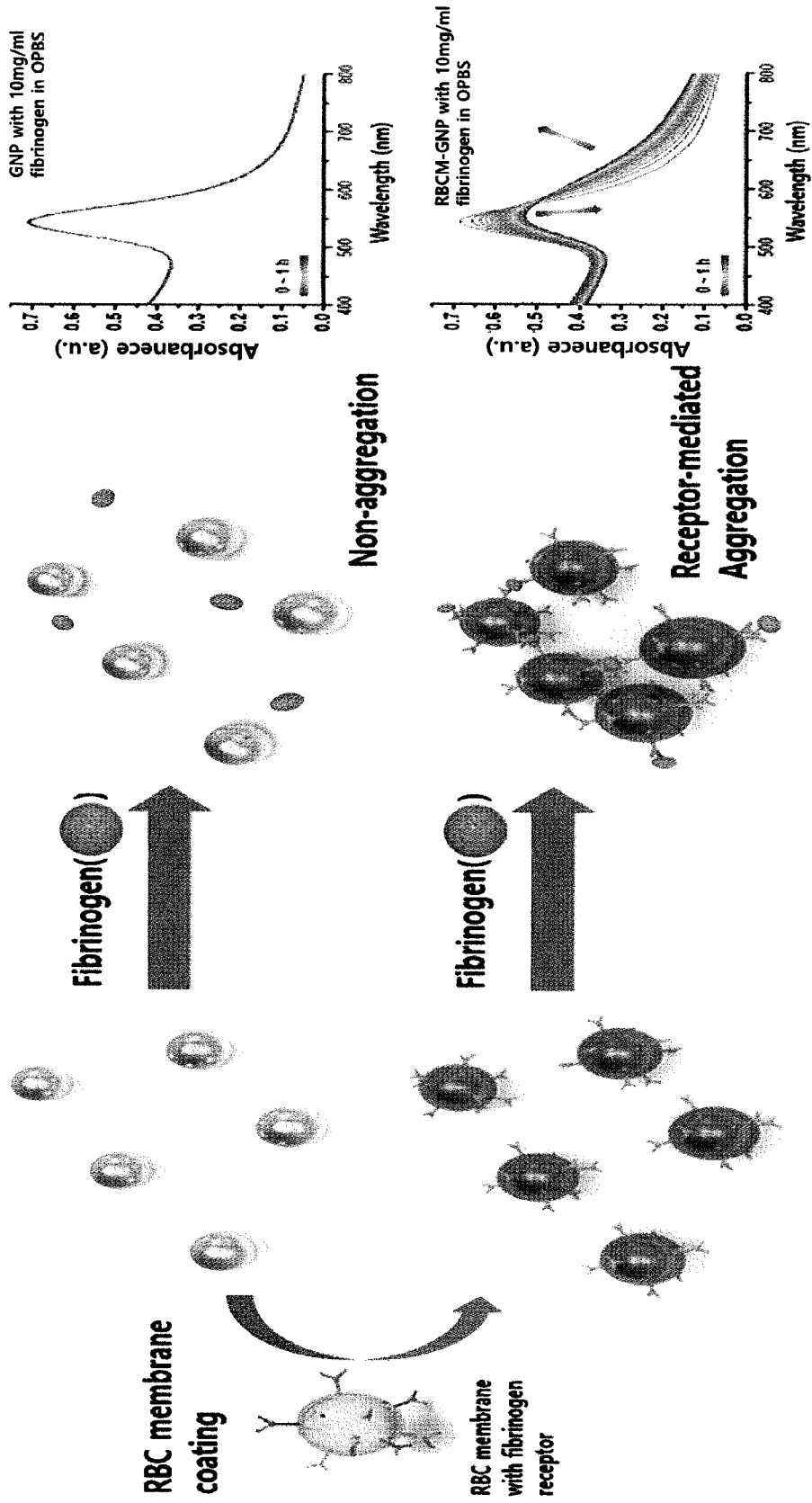
## 청구범위

- [청구항 1] 피브리노겐과 특이적으로 결합하는 물질이 표면에 코팅된 피브리노겐(fibrinogen) 농도 측정용 나노입자.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,  
상기 나노입자는 표면에 코팅된 물질과 피브리노겐의 결합에 따라 뭉치는 특성을 나타내는 것을 특징으로 하는, 피브리노겐 농도 측정용 나노입자.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,  
상기 나노입자는 표면에 코팅된 물질과 피브리노겐의 결합량이 증가함에 따라 뭉치는 크기가 증가하는 것을 특징으로 하는, 피브리노겐 농도 측정용 나노입자.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,  
상기 나노입자는 뭉치는 크기에 따라 분광학적 특성이 변화되는 것을 특징으로 하는, 피브리노겐 농도 측정용 나노입자.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,  
상기 나노입자는 금 나노입자(gold nanoparticle), 은 나노입자(silver nanoparticle), 백금 나노입자(platinum nanoparticle), 은 나노큐브(Silver nanocube), 은 나노판(silver nanoplate) 및 금나노막대(gold nanorod)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 피브리노겐 농도 측정용 나노입자.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,  
상기 나노입자 표면에 코팅되는 물질은 세포막인 것을 특징으로 하는, 피브리노겐 농도 측정용 나노입자.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,  
상기 세포막은 적혈구, 백혈구, 및 혈소판으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 세포막인 것을 특징으로 하는, 피브리노겐 농도 측정용 나노입자.
- [청구항 8] 하기의 단계를 포함하는 혈액 샘플 내 피브리노겐 농도 측정 방법:  
(1) 피브리노겐과 특이적으로 결합하는 물질이 표면에 코팅된 나노입자와 혈액 샘플을 접촉시키는 단계;  
(2) 상기 나노입자 표면에 코팅된 물질과 혈액 샘플 내 피브리노겐의 결합에 따른 상기 나노입자의 뭉침을 유도하는 단계;  
(3) 상기 나노입자의 분광학적 물성을 측정하는 단계; 및  
(4) 상기 측정된 나노입자의 분광학적 물성을 이용하여 혈액 샘플 내 피브리노겐 농도를 계산하는 단계.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,  
상기 (3) 단계에서 측정하는 물성은 나노입자가 흡수하는 특정 파장

영역대의 흡광도인 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플 내 피브리노겐 농도 측정 방법.

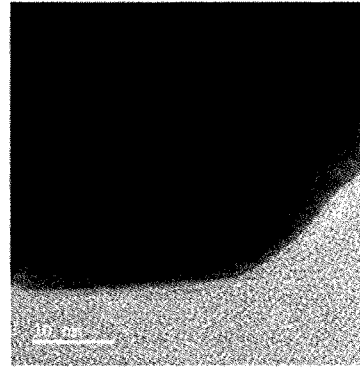
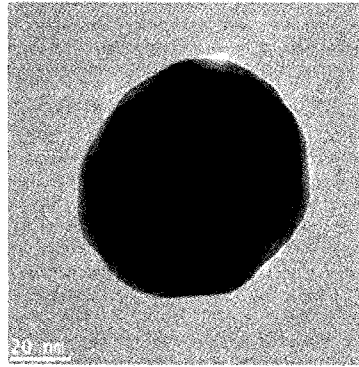
- [청구항 10] 제8항에 있어서,  
 상기 (4) 단계에서 피브리노겐 농도의 계산은 상기 나노입자의 뭉침 크기 증가에 따라 강해지는 특정 파장 영역대의 흡광도와, 상기 나노입자의 뭉침 크기 증가에 따라 감소되는 특정 파장 영역대의 흡광도의 비(ratio)를 이용하는 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플 내 피브리노겐 농도 측정 방법.
- [청구항 11] 제10항에 있어서,  
 상기 강해지는 흡광도의 파장 영역대는 560 내지 800 nm이고, 감소되는 흡광도의 파장 영역대는 400 내지 560 nm 인 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플 내 피브리노겐 농도 측정 방법.
- [청구항 12] 제8항에 있어서,  
 상기 나노입자는 금 나노입자(gold nanoparticle), 은 나노입자(silver nanoparticle), 백금 나노입자(platinum nanoparticle), 은 나노큐브(Silver nanocube), 은 나노판(silver nanoplate) 및 금나노막대(gold nanorod)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플 내 피브리노겐 농도 측정 방법.
- [청구항 13] 제8항에 있어서,  
 상기 (1) 단계에서 나노입자 표면에 코팅된 물질은 세포막인 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플 내 피브리노겐 농도 측정 방법.
- [청구항 14] 제13항에 있어서,  
 상기 세포막은 적혈구, 백혈구, 및 혈소판으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 세포막인 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플 내 피브리노겐 농도 측정 방법.

[도 1]

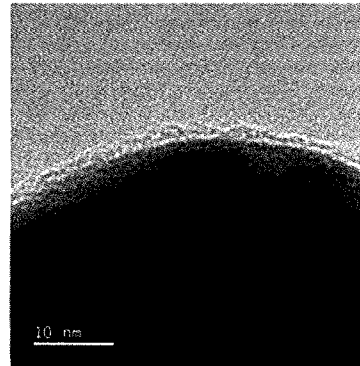
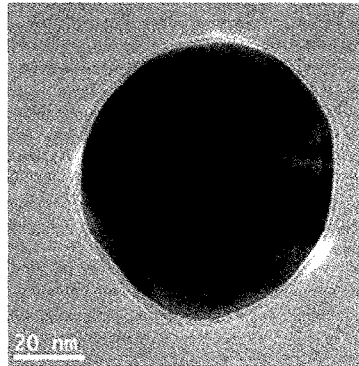


[도2]

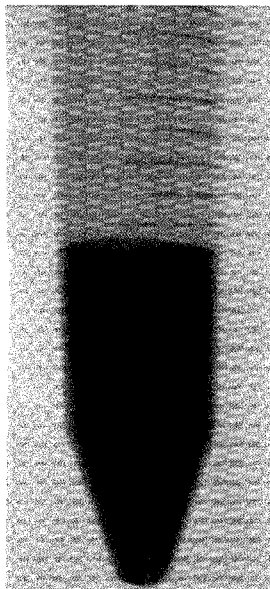
**Gold nanoparticles**



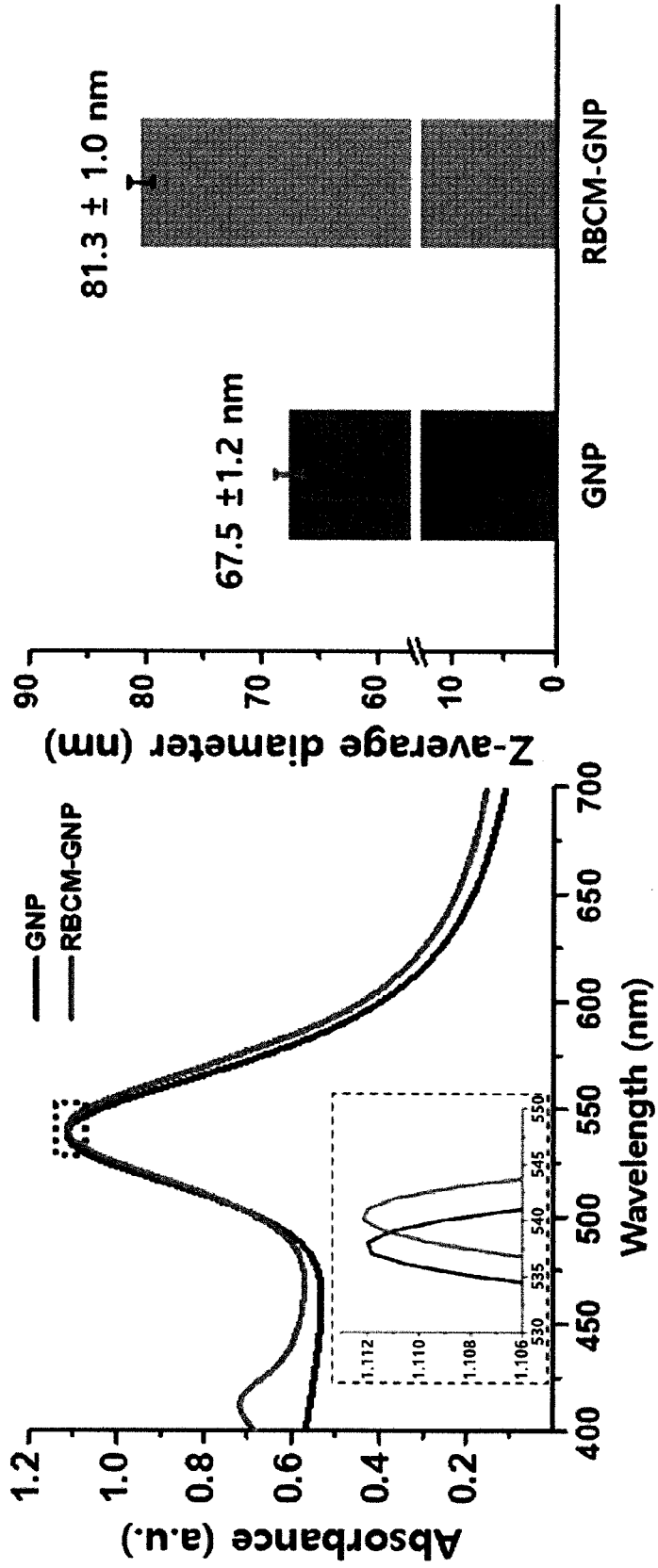
**RBC membrane coated  
Gold nanoparticles**



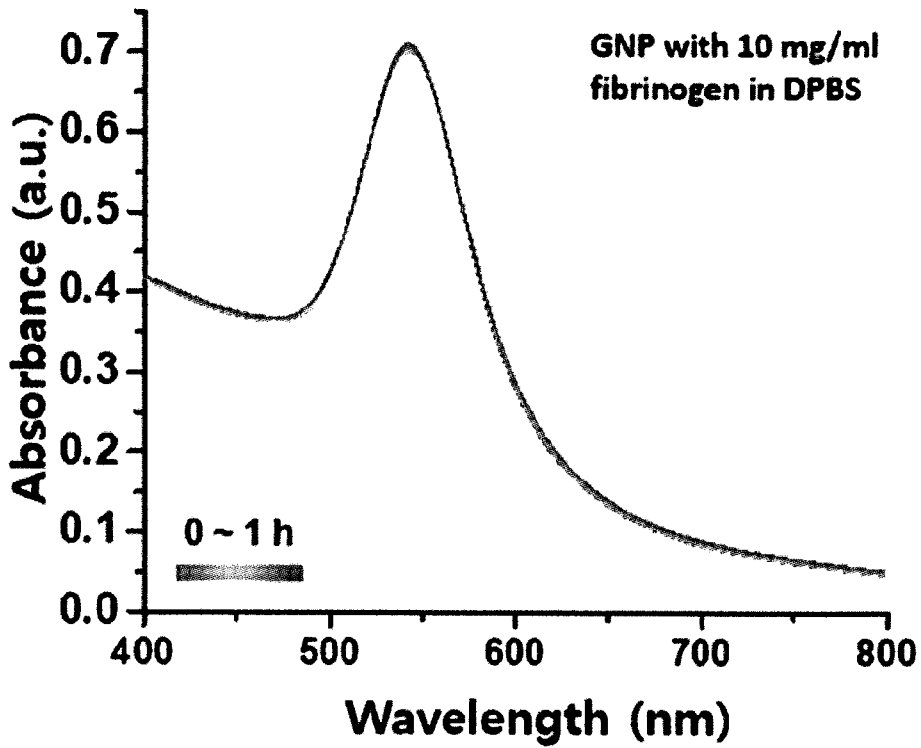
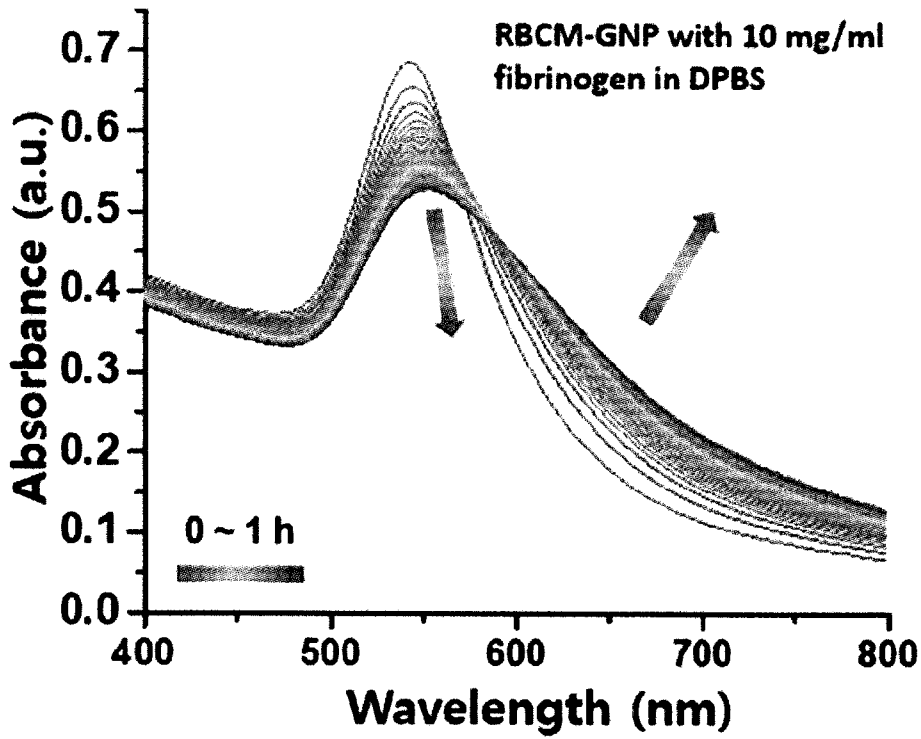
[도3]



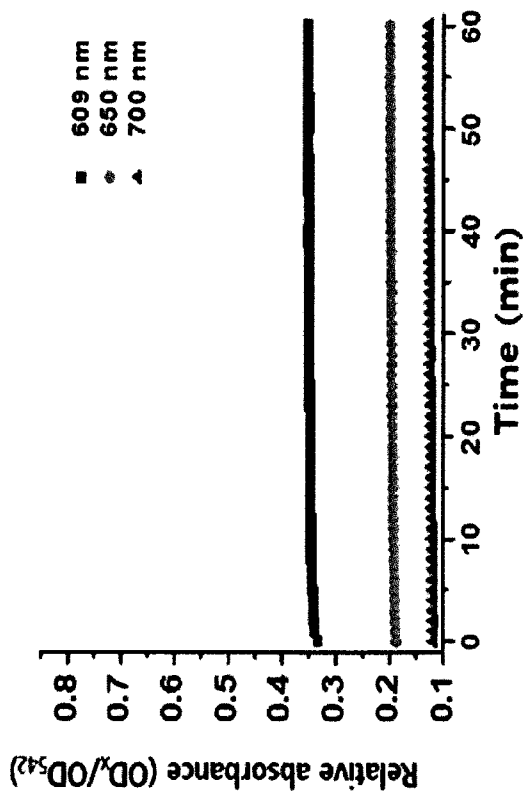
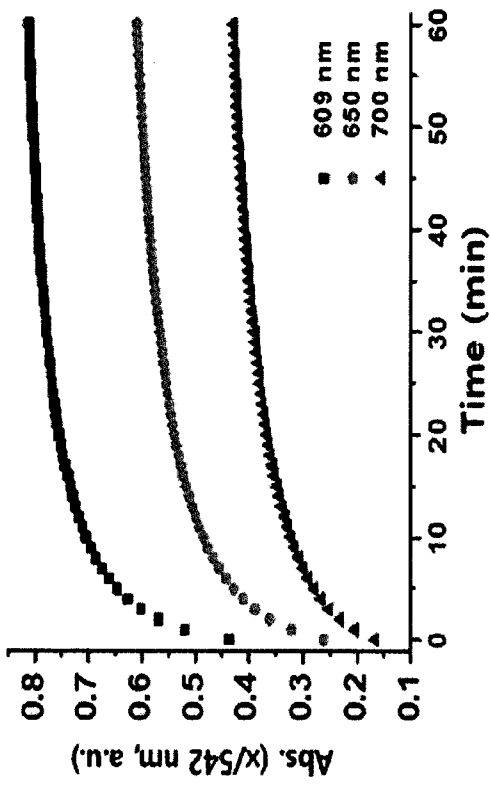
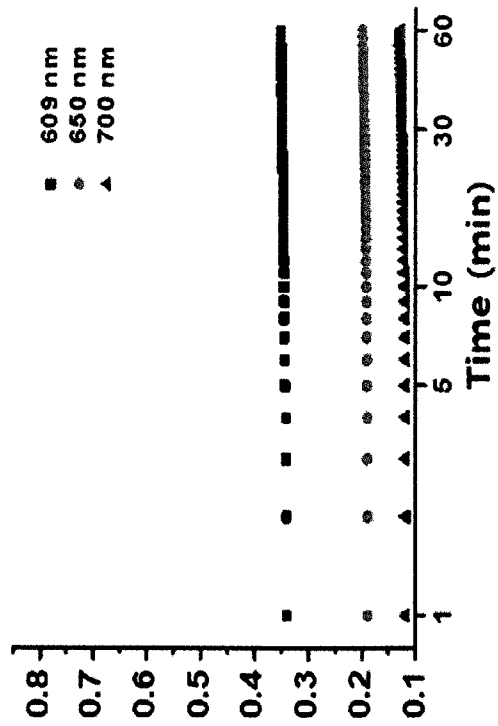
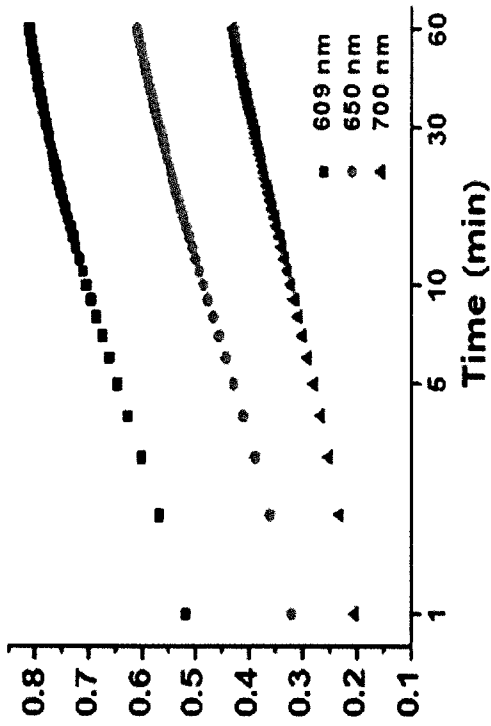
[도4]



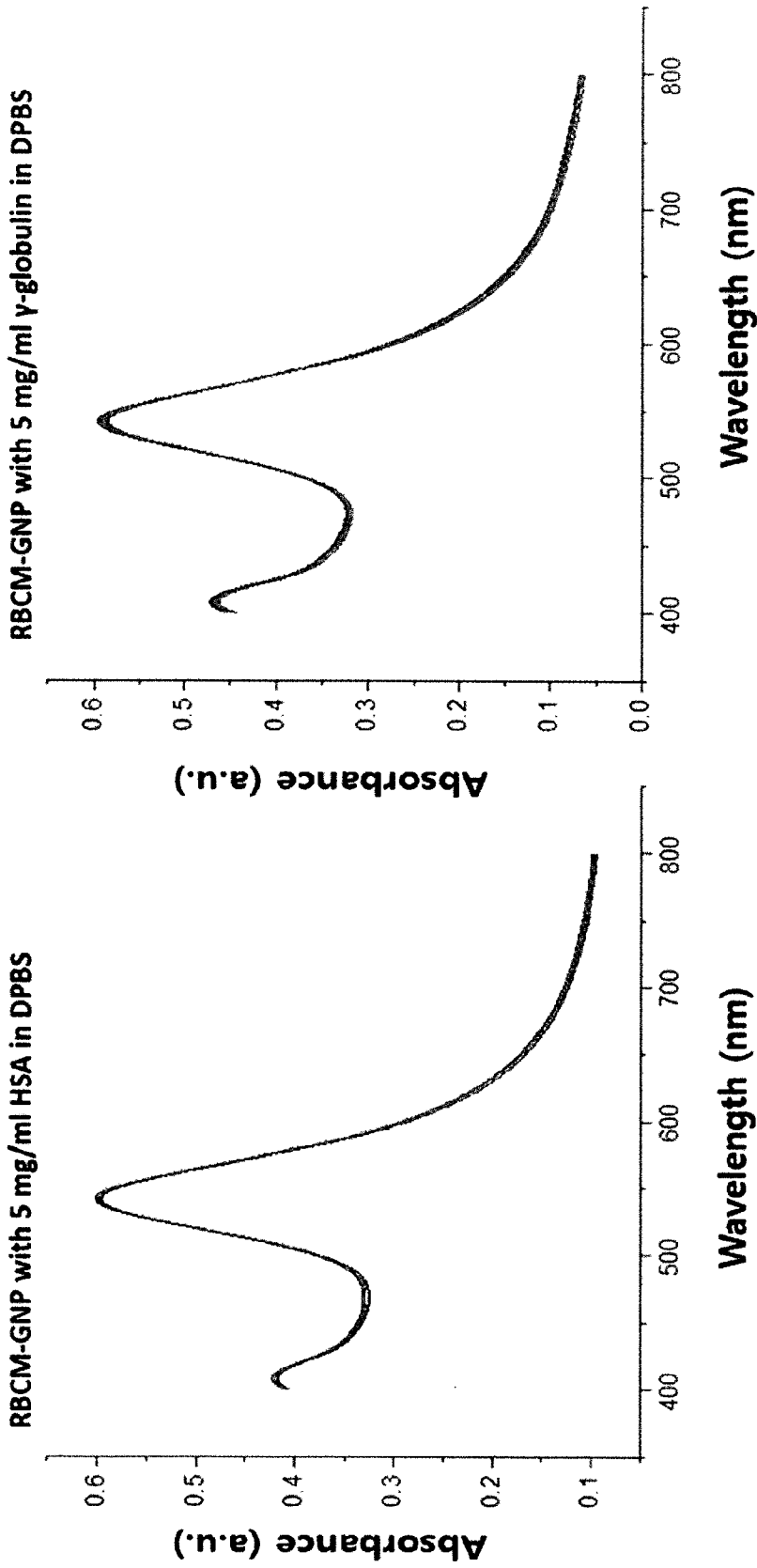
[도5]



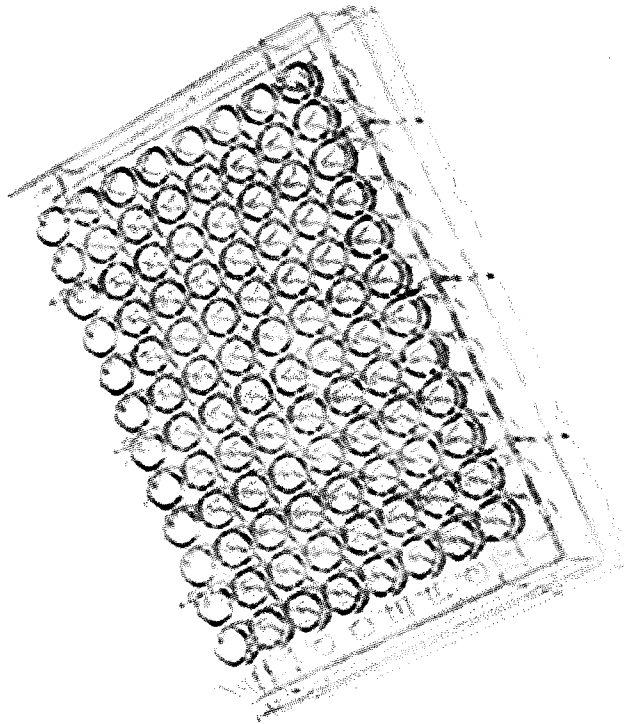
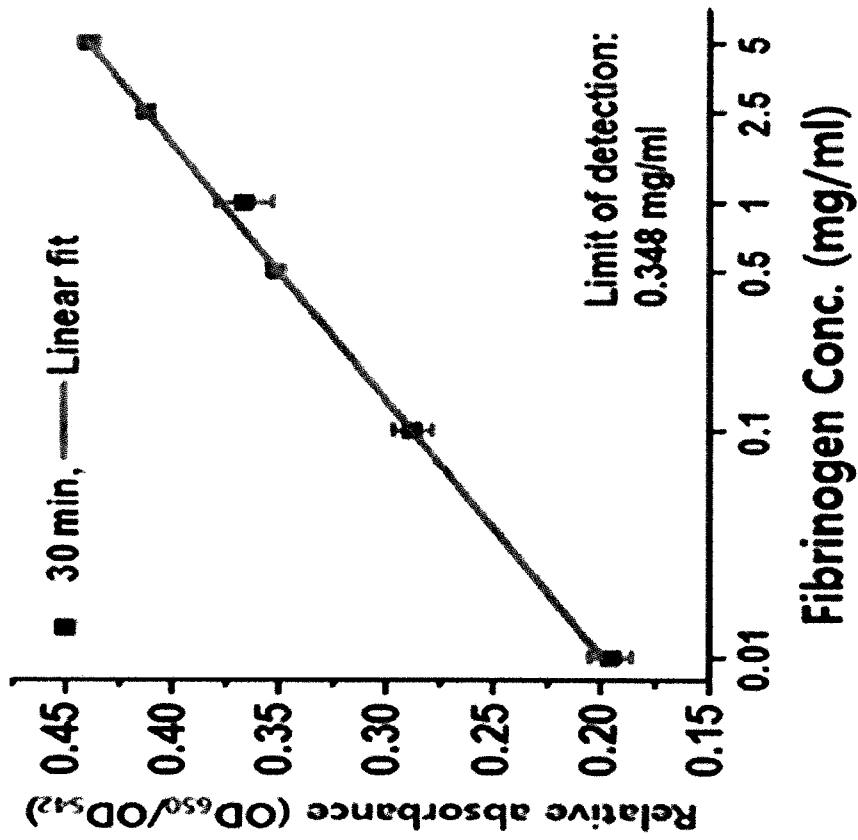
[도6]



[도7]

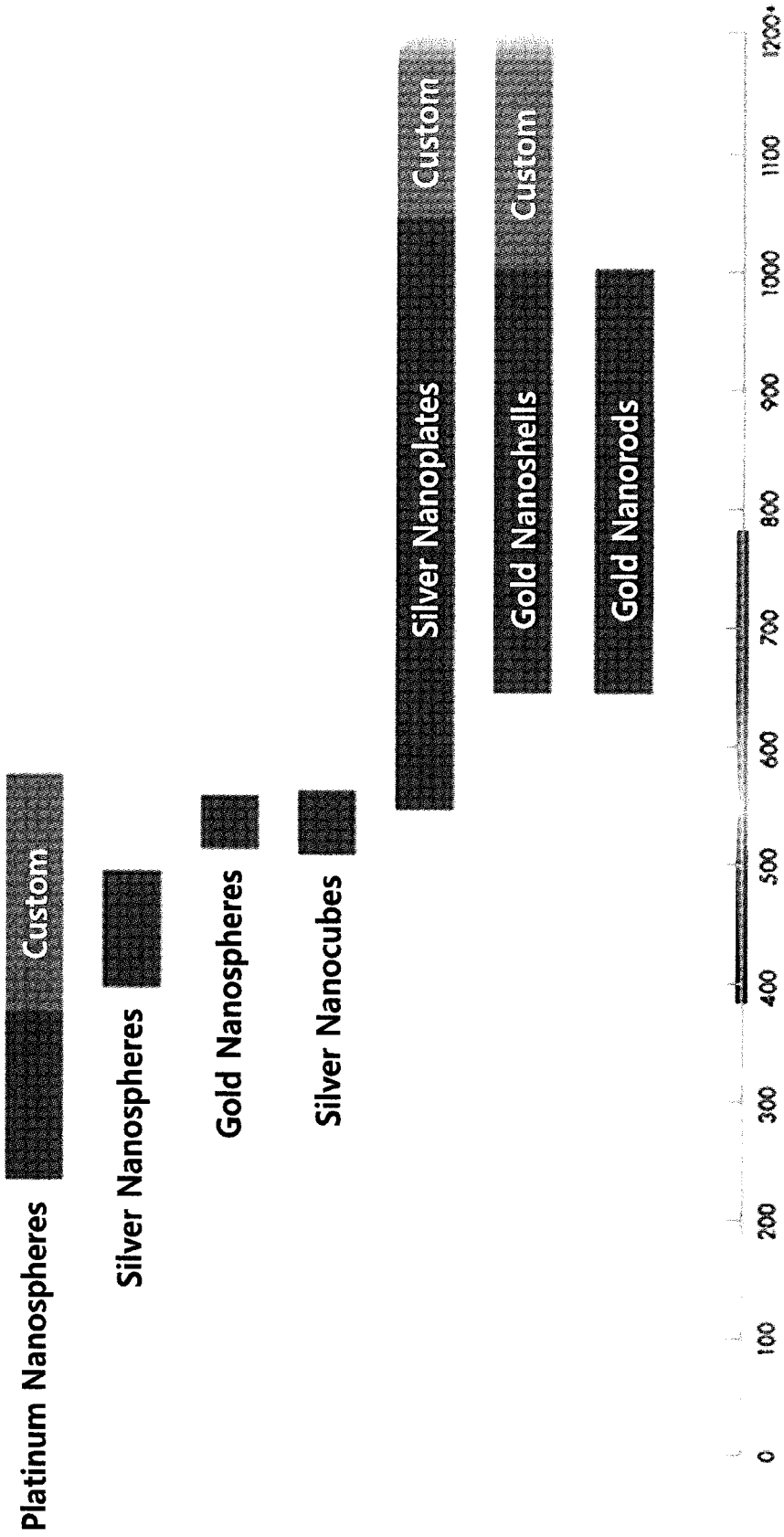


[도8]





[도 10]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/004132

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*G01N 33/543(2006.01)i, G01N 21/33(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 33/543; C12Q 1/00; C12Q 1/56; G01N 21/33

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) &amp; Keywords: fibrinogen, coating, nanoparticle, cell membrane

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DENG, Z. J. et al. Molecular Interaction of Poly(acrylic acid) Gold Nanoparticles with Human Fibrinogen. ACS NANO. Epub. 20 September 2012, vol. 6, no. 10, pages 8962-8969 See abstract; pages 8962-8967; and figure 4.	1-5,8-12
Y		6-7,13-14
Y	GAO, W. et al. Engineering red-blood-cell-membrane-coated nanoparticles for broad biomedical applications. AIChE Journal. March 2015, vol. 61, no. 3, pages 738-746 See abstract.	6-7,13-14
Y	SALDANHA, C. Fibrinogen interaction with the red blood cell membrane. Clinical Hemorheology and Microcirculation. 2013, vol. 53, pages 39-44 See abstract; and page 41.	6-7,13-14
A	US 5350676 A (OBERHARDT, Bruce J. et al.) 27 September 1994 See the entire document.	1-14
PX	조성재 등. 적혈구 막으로 덮은 금 나노입자 기판을 이용한 국소 표면 플라즈몬 공명 기반 피브리노겐 탐지. 대한기계학회 춘추학술대회, December 2018, pages 1805-1806 (JO, Seongjae et al. Fibrinogen Detection Using Erythrocyte Membrane Blanketed Gold Nanoparticles Substrate Based on Localized Surface Plasmon Resonance. The Korean Society of Mechanical Engineers Spring and Autumn Conference.) See the entire document.	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

"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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 JULY 2019 (16.07.2019)

Date of mailing of the international search report

16 JULY 2019 (16.07.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office  
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu,  
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2019/004132**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 5350676 A	27/09/1994	AT 174633 T	15/01/1999
		AU 660624 B2	06/07/1995
		AU 8311991 A	04/02/1992
		CA 2087033 A1	11/01/1992
		CA 2087033 C	24/06/2003
		DE 69130644 T2	29/07/1999
		EP 0538393 A1	28/04/1993
		EP 0538393 A4	26/01/1994
		EP 0538393 B1	16/12/1998
		EP 0867723 A2	30/09/1998
		EP 0867723 A3	08/10/2003
		ES 2128321 T3	16/05/1999
		JP 06-500463 A	20/01/1994
		JP 2649608 B2	03/09/1997
		TW 221493 B	01/03/1994
		WO 92-01065 A1	23/01/1992

<b>A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))</b> <b>G01N 33/543(2006.01)i, G01N 21/33(2006.01)i</b>		
<b>B. 조사된 분야</b> 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 33/543; C12Q 1/00; C12Q 1/56; G01N 21/33 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: 피브리노겐(fibrinogen), 코팅(coating), 나노입자(nanoparticle), 세포막(cell membrane)		
<b>C. 관련 문헌</b>		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	DENG, Z. J. 등, "Molecular Interaction of Poly(acrylic acid) Gold Nanoparticles with Human Fibrinogen", ACS NANO, Epub. 2012.09.20, 6권, 10호, 페이지 8962-8969 초록; 페이지 8962-8967; 및 도면 4 참조.	1-5,8-12
Y		6-7,13-14
Y	GAO, W. 등, "Engineering red-blood-cell-membrane-coated nanoparticles for broad biomedical applications", AIChE Journal, 2015.03, 61권 3호, 페이지 738-746 초록 참조.	6-7,13-14
Y	SALDANHA, C., "Fibrinogen interaction with the red blood cell membrane", Clinical Hemorheology and Microcirculation, 2013, 53권, 페이지 39-44 초록; 및 페이지 41 참조.	6-7,13-14
A	US 5350676 A (OBERHARDT; BRUCE J. 등) 1994.09.27 전체 문헌 참조.	1-14
PX	조성재 등, "적혈구 막으로 덮은 금 나노입자 기판을 이용한 국소 표면 플라즈몬 공명 기반 피브리노겐 탐지", 대한기계학회 춘추학술대회, 2018.12, 페이지 1805-1806 전체 문헌 참조.	1-14
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 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 2019년 07월 16일 (16.07.2019)	국제조사보고서 발송일 2019년 07월 16일 (16.07.2019)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 감유림 전화번호 +82-42-481-3516	

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 5350676 A	1994/09/27	AT 174633 T AU 660624 B2 AU 8311991 A CA 2087033 A1 CA 2087033 C DE 69130644 T2 EP 0538393 A1 EP 0538393 A4 EP 0538393 B1 EP 0867723 A2 EP 0867723 A3 ES 2128321 T3 JP 06-500463 A JP 2649608 B2 TW 221493 B WO 92-01065 A1	1999/01/15 1995/07/06 1992/02/04 1992/01/11 2003/06/24 1999/07/29 1993/04/28 1994/01/26 1998/12/16 1998/09/30 2003/10/08 1999/05/16 1994/01/20 1997/09/03 1994/03/01 1992/01/23