

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 7월 2일 (02.07.2020)



(10) 국제공개번호
WO 2020/138886 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 49/22 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/018303

(22) 국제출원일: 2019년 12월 23일 (23.12.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2018-0168173 2018년 12월 24일 (24.12.2018) KR

(71) 출원인: 서강대학교 산학협력단 (SOGANG UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION) [KR/KR];
04107 서울시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교),
Seoul (KR).

(72) 발명자: 김현철 (KIM, Hyun Cheol); 07344 서울시 영등포구 63로 7, B동 501호, Seoul (KR). 장용호 (JANG, Yong Ho); 04096 서울시 마포구 독막로29길 42, 201호, Seoul (KR). 김도연 (KIM, Do Yeon); 02831 서울시 성북구 성북로4길 52, 110-705, Seoul (KR).

(74) 대리인: 김현진 (KIM, Hyun Jin); 06142 서울시 강남구 테헤란로37길 7, 조이타워301호(대신국제특허법률사무소), 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,

SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

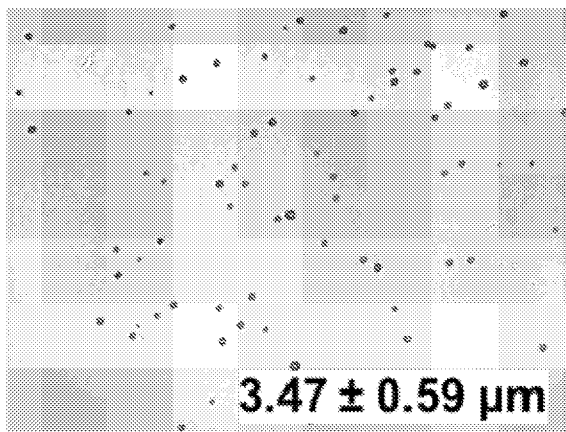
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, 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: EXTRACELLULAR VESICLE-BASED MICROBUBBLES FOR ULTRASONIC CONTRAST MEDIUM, AND PREPARATION METHOD THEREFOR

(54) 발명의 명칭: 세포의 소포 기반의 초음파 조영제용 마이크로버블 및 이의 제조방법



(57) Abstract: The present invention relates to extracellular vesicle-based microbubbles for an ultrasonic contrast medium, and a preparation method therefor and, more specifically, to: extracellular vesicle-based microbubbles for an ultrasonic contrast medium, and a preparation method therefor, the microbubbles being prepared by mixing a predetermined proportion of extracellular vesicles with a membrane-forming material, so as to have improved stability, thereby enabling the functions thereof to be maintained for a longer period in the body, and effectively enable a contrast medium to be induced in specific cells or tissues, thereby enabling an ultrasound contrast effect to be maximized.

(57) 요약서: 본 발명은 세포의 소포 기반의 초음파 조영제용 마이크로버블 및 이의 제조방법에 대한 것으로, 더욱 상세하게는 멤브레인 형성물질에 일정 비율의 세포의 소포를 혼합하여 마이크로버블을 제조함으로써, 안정성이 향상되어 신체 내에서 보다 오래기간 동안 그 기능을 유지할 수 있고, 특정 세포나 조직으로 조영제를 효과적으로 유도할 수 있어, 초음파 조영을 효과를 극대화 할 수 있는 세포의 소포 기반의 초음파 조영제용 마이크로버블 및 이의 제조방법에 대한 것이다.



WO 2020/138886 A1

명세서

발명의 명칭: 세포외 소포 기반의 초음파 조영제용 마이크로버블 및 이의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 세포외 소포 기반의 초음파 조영제용 마이크로버블 및 이의 제조방법에 대한 것으로, 더욱 상세하게는 멤브레인 형성물질에 일정 비율의 세포외 소포를 혼합하여 마이크로버블을 제조함으로써, 안정성이 향상되어 신체 내에서 보다 오래기간 동안 그 기능을 유지할 수 있고, 특정 세포나 조직으로 조영제를 효과적으로 유도할 수 있어, 초음파 조영을 효과를 극대화 할 수 있는 세포외 소포 기반의 초음파 조영제용 마이크로버블 및 이의 제조방법에 대한 것이다.

배경기술

- [2] 초음파 조영은 다른 의료 진단 방법과 다르게 방사선을 사용하지 않아 안전하고 실시간으로 영상을 구현할 수 있으며, 가격이 저렴하여 현재 많이 활용되고 있는 진단 기술이다. 하지만, 낮은 해상도와 분해능으로 인해 정확한 진단을 내리기 어려운 한계점을 가지고 있어, 이를 해결하기 위하여 마이크로버블을 이용한 초음파 조영제를 사용하고 있다. 상기 마이크로버블은 하기의 특허처럼 수 ~ 수십 마이크로미터의 직경을 가지는 미세기포로, 내부에 기체를 포함하고 있으며 표면물질(예컨대, 지질, 단백질, 고분자 등의 유기물질)이 상기 기체를 에워싸는 형태를 가진다. 즉, 조영제용 마이크로버블은 유기물질로 이루어진 쉘 내부에 기체가 충전된 형태를 가진다.
- [3] <특허문헌>
- [4] 공개특허 제10-2015-0109064호(2015. 10. 01. 공개) "약물을 함유한 나노입자가 결합된 이중-목적 PAT/초음파 조영제 및 이의 제조방법"
- [5] 하지만, 현재 상용화된 초음파 조영제는 신체 내에서 불안정하여 빠르게 그 기능을 잃는 문제가 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로,
- [7] 본 발명은 신체 내에서 보다 오래가고 특정 세포 또는 조직의 초음파 조영을 극대화 할 수 있는 세포외 소포 기반의 초음파 조영제용 마이크로버블 및 이의 제조방법을 제공하는데 그 목적이 있다.
- [8] 또한, 본 발명은 멤브레인 형성물질에 일정 비율의 세포외 소포를 혼합하여 마이크로버블을 제조함으로써, 안정성이 향상되어 신체 내에서 보다 오래기간 동안 그 기능을 유지할 수 있는 세포외 소포 기반의 초음파 조영제용 마이크로버블 및 이의 제조방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

- [9] 또한, 본 발명은 모세포의 membrane protein 종류 및 표적 세포의 세포막 특성 등에 의해 특정 세포에 높은 선택적 표적능을 보이는 세포외 소포를 이용하여, 특정 세포나 조직으로 조영제를 효과적으로 유도할 수 있는 세포외 소포 기반의 초음파 조영제용 마이크로버블 및 이의 제조방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제 해결 수단

- [10] 본 발명은 앞서 본 목적을 달성하기 위하여 다음과 같은 구성을 가진 실시예에 의해 구현된다.
- [11] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 초음파 조영제용 마이크로버블은 기체와, 상기 기체를 에워싸는 멤브레인을 포함하며, 상기 멤브레인은 멤브레인 형성물질과 세포외 소포가 융합되어 형성되는 것을 특징으로 한다.
- [12] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 초음파 조영제용 마이크로버블에 있어서 상기 멤브레인의 형성물질은 지질이 사용되는 것을 특징으로 한다.
- [13] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 초음파 조영제용 마이크로버블에 있어서 상기 세포외 소포는 초음파 조영을 목적하는 세포로부터 분리된 세포외 소포가 사용되는 것을 특징으로 한다.
- [14] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 초음파 조영제용 마이크로버블에 있어서 상기 세포외 소포는 멤브레인 형성물질과 세포외 소포의 혼합물 대비 1 내지 25중량%로 사용되는 것을 특징으로 한다.
- [15] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 초음파 조영제용 마이크로버블에 있어서 상기 세포외 소포는 멤브레인 형성물질과 세포외 소포의 혼합물 대비 5 내지 15중량%로 사용되는 것을 특징으로 한다.
- [16] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 초음파 조영제용 마이크로버블에 있어서 상기 세포외 소포는 엑소좀 또는 마이크로비시클이 사용되는 것을 특징으로 한다.
- [17] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 초음파 조영제용 마이크로버블의 제조방법은 모세포로부터 세포외 소포를 분리하는 세포외 소포 분리단계와; 멤브레인 형성물질과 상기 세포외 소포 분리단계에서 얻은 세포외 소포를 포함하는 혼합용액을 준비하는 혼합용액 형성단계와; 상기 혼합용액에 가스를 공급한 후 물질적 힘을 가해 가스를 에워싸며 멤브레인 형성물질과 세포외 소포가 융합되어 형성된 멤브레인을 가지는 마이크로버블을 형성하는 가스충진단계;를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [18] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 초음파 조영제용 마이크로버블의 제조방법에 있어서 상기 세포외 소포 분리단계에서는 초음파 조영을 목적하는 세포로부터 세포외 소포를 분리하는 것을 특징으로 한다.
- [19] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 초음파 조영제용

마이크로버블의 제조방법에 있어서 상기 세포외 소포는 멤브레인 형성물질과 세포외 소포의 혼합물 대비 1 내지 25중량%로 사용되는 것을 특징으로 한다.

- [20] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 초음파 조영제용 마이크로버블의 제조방법에 있어서 상기 혼합용액 형성단계에서 세포외 소포는 멤브레인 형성물질과 세포외 소포의 혼합물 대비 5 내지 15중량%로 사용되는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [21] 본 발명은 앞서 본 실시예에 의해 다음과 같은 효과를 얻을 수 있다.
- [22] 본 발명은 신체 내에서 보다 오래가고 특정 세포 또는 조직의 초음파 조영을 극대화 할 수 있는 효과가 있다.
- [23] 또한, 본 발명은 멤브레인 형성물질에 일정 비율의 세포외 소포를 혼합하여 마이크로버블을 제조함으로써, 안정성이 향상되어 신체 내에서 보다 오래기간 동안 그 기능을 유지할 수 있는 효과가 있다.
- [24] 또한, 본 발명은 모세포의 membrane protein 종류 및 표적 세포의 세포막 특성 등에 의해 특정 세포에 높은 선택적 표적능을 보이는 세포외 소포를 이용하여, 특정 세포나 조직으로 조영제를 효과적으로 유도할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [25] 도 1은 종래의 마이크로버블(MBs)과, 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로버블(EV-MBs)의 모식도.
- [26] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로버블의 제조에 사용되는 마이크로 플루이딕 채널의 이미지.
- [27] 도 3 및 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로버블의 광학현미경 이미지.
- [28] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로버블의 현광현미경 이미지.
- [29] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로버블의 안정성 분석 결과를 나타내는 도표.
- [30] 도 7은 세포외 소포의 함유 비율에 따른 마이크로버블의 안정성 분석 결과를 나타내는 도표.
- [31] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로버블의 공명주파수 분석 결과를 나타내는 도표.
- [32] 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로버블의 초음파 조영능을 확인하기 위한 초음파 이미지.
- [33] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로버블의 표적능을 확인하기 위한, 공초점 현미경 이미지.
- [34] 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로버블의 표적능을 평가하기 위한, 유세포 측정기(Flow cytometry)를 이용한 분석결과를 나타내는 도표.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [35] 이하에서는 본 발명에 따른 세포외 소포 기반의 초음파 조영제용 마이크로버블

및 이의 제조방법을 첨부된 도면을 참조하여 상세히 설명한다. 특별한 정의가 없는 한 본 명세서의 모든 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 기술자가 이해하는 당해 용어의 일반적 의미와 동일하고 만약 본 명세서에 사용된 용어의 의미와 충돌하는 경우에는 본 명세서에 사용된 정의에 따른다. 또한, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대해 상세한 설명은 생략한다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[36]

[37] 본 발명의 일 실시예에 따른 세포의 소포 기반의 초음파 조영제용 마이크로버블을 도 1 내지 11을 참조하여 설명하면, 상기 마이크로버블은 기체와, 상기 기체를 에워싸는 멤브레인을 포함한다.

[38] 상기 마이크로버블은 체내에 주입되어 초음파 조영제로 사용되는데, 멤브레인(membrane)이 내부의 기체(core gas)를 에워싸는 형태를 가지며, 상기 기체는 공지된 기체를 제한 없이 사용할 수 있으며, 일 예로서 이산화탄소, 헬륨, 질소, 아르곤, 설퍼 헥사플루오라이드, 퍼플루오르화 기체 등을 사용할 수 있다. 상기 기체는 불소가스가 포함된 불화물이 바람직하고, 예로는 퍼플루오로프로판(C_3F_8), 설퍼헥사플루오라이드(SF_6), 퍼플루오로펜탄(perfluoropentane), 데카플루오로부탄(decafluorobutane) 및 퍼플루오로헥산(perfluorohexane) 등이 있다.

[39] 상기 멤브레인은 멤브레인 형성물질과 세포의 소포가 융합되어 형성되는데, 멤브레인 형성물질은 마이크로버블의 멤브레인을 형성하기 위한 종래의 물질이 사용될 수 있으며, 예컨대 단백질 또는 지질이 사용될 수 있으며 바람직하게는 인지질이 사용될 수 있다. 상기 세포의 소포(Extracellular vesicle)는 멤브레인 형성물질에 혼합 사용되어 상기 멤브레인 형성물질과 함께 멤브레인을 형성하는 구성으로, 다양한 세포의 exosome, microvesicle 등이 사용될 수 있다. 상기 세포의 소포는, 물리적 방법 등을 포함하여 여러 방법에 의해 모세포로부터 분리될 수 있으며, 초음파 조영을 목적으로 하는 세포로부터 분리된 세포의 소포가 사용되는 것이 바람직하며, 멤브레인의 형성물질(단백질 또는 지질)과 세포의 소포의 혼합물 대비 1 내지 25중량%로 사용되는 것이 바람직하며, 5 내지 15중량%로 사용되는 것이 더욱 바람직하다. 세포의 소포가 25중량%보다 많이 사용되는 경우 멤브레인 형성할 수 없게 된다. 종래 마이크로버블을 형성시 지질 등을 이용하여 멤브레인을 형성하는데 이 경우 제조된 마이크로버블의 안정성이 떨어지게 되므로, 본 발명은 기존 멤브레인 형성물질(지질 등)에 세포의 소포가 일정 비율로 혼합사용되어, 즉 기존 멤브레인 형성물질과 세포의 소포가 융합되어 멤브레인을 형성하므로, 마이크로버블의 안정성을 향상시킬 수 있고, 세포의 소포의 막단백질의 존재로 인해 특정 세포로의 표적능을 가지게 되어, 특정 세포 또는 조직의 초음파 조영을 극대화할 수 있다.

[40]

[41] 본 발명의 다른 실시예에 따른 세포의 소포 기반의 초음파 조영제용 마이크로버블의 제조방법을 설명하면, 상기 마이크로버블의 제조방법은 세포의 소포 분리단계, 혼합용액 형성단계, 가스충진단계 등을 포함한다.

[42] 상기 세포의 소포 분리단계는 모세포로부터 세포의 소포를 분리하는 단계로, 물리적 방법 등을 포함하여 공지의 여러 방법이 사용될 수 있다. 상기 세포의 소포는 모세포의 막 조성과 동일(또는 유사)한 막 조성을 가지며 모세포의 세포질 부분 등을 포함하므로, 상기 세포의 소포 분리단계에서 초음파 조영을 목적하는 세포로부터 세포의 소포를 분리하고, 이를 이용하여 마이크로버블을 형성하는 경우, 상기 마이크로버블의 목적하는 세포로의 표적능을 향상시킬 수 있게 된다.

[43] 상기 혼합용액 형성단계는 마이크로버블의 멤브레인을 형성하기 위한 물질(단백질, 지질 등)과 상기 세포의 소포 분리단계에서 얻은 세포의 소포를 포함하는 혼합용액을 준비하는 단계로, 바람직하게는 상기 세포의 소포는 마이크로버블의 멤브레인을 형성하기 위한 물질 및 세포의 소포의 혼합물 대비 1 내지 25중량%로 사용되는 것이 바람직하며, 5 내지 15중량%로 사용되는 것이 더욱 바람직하다. 상기 세포의 소포가 위 수치 범위(5 내지 15중량%)에서 사용되는 경우 제조된 마이크로버블의 안정성을 더욱 향상시킬 수 있다.

[44] 상기 가스충진단계는 상기 혼합용액에 가스를 공급한 후 물질적 힘을 가해 가스를 에워싸며, 멤브레인 형성물질과 세포의 소포가 융합되어 형성된 멤브레인을 가지는 마이크로버블을 형성하는 단계로, 상기 가스충진단계는 종래의 vial mixer, 미세 유체 시스템을 이용한 방법이 이용될 수 있다. 예컨대, vial mixer를 이용한 방법의 경우 혼합용액이 들어있는 vial에 기체를 채우고 vial mixer를 이용하여 흔들어 버블을 형성하게 되며, 미세 유체 시스템을 이용한 방법의 경우 혼합용액과 기체를 프루이딕 채널에 주입해 버블을 형성하게 된다. 위와 같은 방법에 의해 만들어진 마이크로버블은 향상된 안정성을 가지고 세포 표적능이 뛰어나 초음파 조영능을 극대화할 수 있으며, 마이크로버블의 특징을 그대로 가져올 수 있으므로 기존의 마이크로버블처럼 약물을 담지 할 수 있고, microfluidics system을 사용할 수 있기 때문에 버블의 크기를 보다 정확하게 조절할 수 있어 서로 다른 공명주파수를 통한 multicolor imaging하는 것도 가능하다.

[45]

[46] 이하, 실시예를 통해서 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 하지만, 이들은 본 발명을 보다 상세하게 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 권리범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[47]

[48] <실시예 1> 초음파 조영제용 마이크로버블의 제조

[49] 1. 세포의 소포를 포함하는 마이크로버블의 제조(vial mixer 방법 이용)

- [50] (1) 세포외 소포(Extracellular Vesicle, EV)로는 MIA-PACA-2 AR 세포의 microvesicle(MV)이 사용되었으며, 구체적으로 cell medium(DMEM)을 100.000g로 11시간 원심분리하여 상층액만 취한 EV free DMEM을 사용하여 이틀 동안 MIA-PACA-2 AR 세포를 배양한 후, 상기 medium을 300g로 10분 원심분리하여 상층액을 취하고(cell 제거), 상기 상층액을 2,000g로 10분 원심분리 후 상층액을 취하고(cell debris 제거), 상기 상층액을 10,000g로 30분을 원심분리한 후 침전물을 얻은 후 PBS로 분산시켜 다시 10,000g로 30분을 원심분리하여 분순물을 제거하여 마이크로비시클(MV)를 얻었다.
- [51] (2) 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DSPC)와, 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[succinyl(polyethylene glycol)-2000](DSPE-PEG2k)를 9:1의 몰비로 혼합한 후 1mg/vial이 되도록 chloroform에 녹이고 질소를 통해 chloroform을 증발시켜 건조된 phospholipid를 형성하였다.
- [52] (3) 상기 건조된 phospholipid와 MV를 9:1의 질량비로 혼합하고 1mg/ml이 되게 PBS를 넣고 bath sonicator로 건조된 phospholipid를 수용액 상으로 분산시킨 뒤, tip sonicator로 amplitude 20%, cycle 100%로 30초 동안 sonication, 30초 휴식의 과정을 3번 반복한 후, C₃F₈ 가스를 vial에 가득 채우고 vial mixer를 이용하여 20s간 흔들어 만들어진 버블을 15ml snap tube로 옮겨 5분간 중력 하에서 버블이 떠오르기는 기다려서, 떠오른 버블을 제거하고 나머지를 5ml 주사기에 옮겨 용액의 양이 2ml이 되게 PBS를 추가하고, 주사기 입구를 파라필름으로 봉한 뒤 20g로 1분간 원심분리 시킨 후, 떠오른 버블을 제거하고 다시 용액을 2ml로 만들고 위 과정을 반복하여, 원심분리 후 용액이 투명해질 때까지 위 과정을 반복하여 세포외 소포를 포함하는 마이크로버블(Microvesicle-Microbubble, MV-MB)을 얻었다. 상기 MV-MB는 GP 용액(glycerol과 propylene glycol이 1:1의 부피로 혼합되어 형성)이 10% 포함된 PBS 200ul와 혼합된 후 1ml syringe에 보관되었다.
- [53] 2. 마이크로버블의 제조
- [54] 상기 건조된 phospholipid와 MV의 혼합물 대신에 상기 건조된 phospholipid를 사용한 것을 제외하고는 다른 조건을 실시예 1의 1과 동일하게 하여 마이크로버블(Microbubble, MB)를 얻었다.
- [55] 3. 세포외 소포를 포함하는 마이크로버블의 제조(미세유체시스템 이용)
- [56] (1) PDMS base와 경화제(curing agent)를 10:1의 질량비로 혼합하여 Silicon wafer틀(mould) 위에 부어 경화시킨 뒤, 적절한 크기로 다듬어서 도 2에 도시된 형태의 마이크로 플루이드 채널을 제조하고, A 부위에 기체를 공급하는 관을 연결하고, B 부위에 용액을 공급하는 관을 연결하였다.
- [57] (2) 실시예 1의 1에서 얻은 건조된 phospholipid와 MV를 9:1의 질량비로 혼합하고 1mg을 취해 용매(4mg/ml NaCl, 2% v/v Tween20, DW) 900ul와 혼합하고 bath sonicator를 이용해 분산시키고, GP 용액 100ul를 추가로 넣고 bath

sonicator를 이용해 분산시켜 유기물질 용액을 얻었다. A 부위를 통해 C_3F_8 가스를 공급하고, B 부위를 통해 상기 유기물질 용액을 공급하여(가스의 압력은 15.4psi이고, 용액의 압력은 29.7psi이고, flow rate는 55.6ul/min이 되도록 함), 세포와 소포를 포함하는 마이크로버블을 제조하였다.

[58]

[59] <실시예 2> 초음파 조영제용 마이크로버블의 물성 확인

[60] 1. 실시예 1의 1에서 제조된 MV-MB와 실시예 1의 2에서 제조된 MB를 광학현미경을 이용하여 촬영하고 입자 크기 분석 프로그램을 통한 입자 크기를 측정하여 도 3에 나타내었다. 또한, 실시예 1의 3에서 제조된 세포와 소포를 포함하는 마이크로버블을 대해서도 광학현미경을 이용하여 촬영하고 입자 크기 분석 프로그램을 통한 입자 크기를 측정하여 도 4에 나타내었다.

[61] 2. 도 3을 보면, 세포와 소포가 포함되어도 마이크로버블이 잘 형성됨을 알 수 있고, MB의 경우 3.5um의 평균 크기를 가지고 MV-MB의 경우 3.9um의 평균 크기를 가지는 것을 확인할 수 있어 세포와 소포의 추가로 인해 마이크로버블 크기에 큰 변화가 없음을 알 수 있다. 또한, 도 4를 통해 vial mixer 방법뿐만 아니라 미세유체시스템을 이용하여도 세포와 소포가 포함된 마이크로버블을 제조할 수 있음을 알 수 있다.

[62]

[63] <실시예 3> 초음파 조영제용 마이크로버블의 구성 성분 확인

[64] 1. amine 작용기가 있어야 결합할 수 있는 형광 염료 Alexa-555-NHS(즉, 단백질을 타겟팅하는 형광 염료)를 이용하여 실시예 1의 1 및 2에서 제조된 MB와 MV-MB를 염색한 후, 현광 현미경을 이용하여 촬영하여 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[65] 2. 도 5를 보면, MB와 달리 MV-MB의 경우 멤브레인 전체에 걸쳐 형광이 발현되는 것을 확인할 수 있어, MV-MB에는 막단백질이 잘 분포되어 있음을 알 수 있다.

[66]

[67] <실시예 4> 초음파 조영제용 마이크로버블의 안정성 평가

[68] 1. 실시예 1의 1 및 2에 따라 제조되어 밀봉 상태로 보관 중인 MB와 MV-MB를 시간에 따라 광학현미경으로 촬영하고 입자 크기 분석 프로그램을 이용하여 입자 크기를 분석하여, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[69] 2. 도 6을 보면, MB의 경우 시간에 따라 점점 크기가 작아져 24 시간 안에 완전히 사라지는데 반해, MV-MB의 경우 48시간 까지는 크기 변화가 거의 없는 것을 확인할 수 있어, MV-MB가 MB보다 안정성이 현저하게 뛰어남을 알 수 있다.

[70]

[71] <실시예 5> 세포와 소포 비율에 따른 초음파 조영제용 마이크로버블의 안정성 평가

- [72] 1. 건조된 phospholipid와 MV의 혼합 질량비를 달리한 것을 제외하고는 다른 조건을 실시예 1의 1과 동일하게 하여 MV-MB를 제조하였다.
- [73] 2. 실시예 1의 1 및 2에서 제조한 MB(0%), MV-MB(10%), 실시예 5의 1에서 제조한 MV-MB들(5, 15, 20%)을 100분의 1로 희석해서 UV/Vis spectrometry로 흡광도를 측정하여 안정성을 평가하여 그 결과를 도 7에 나타내었다. 도 7에서 X%는 MV의 질량/(phospholipid의 질량+MV의 질량) $\times$ 100의 값을 나타낸다.
- [74] 3. 도 7을 보면, 실시예 4의 실험 결과와 마찬가지로 세포외 소포가 포함되지 않은 마이크로버블(MV)의 경우 시간이 지남에 따라 급격하게 안정성이 떨어짐을 확인할 수 있으며, 세포외 소포가 5 내지 15% 포함된 마이크로버블(MV-MB)의 경우 오랜 시간 동안 높은 안정성을 가지고, 세포외 소포가 20% 포함된 마이크로버블(MV-MB)의 경우 상대적으로 안정성이 떨어짐을 확인할 수 있어, 세포외 소포를 일정 비율로 포함시킬 때 마이크로버블의 안정성을 더욱 높일 수 있음을 알 수 있다.
- [75]
- [76] <실시예 6> 초음파 조영제용 마이크로버블의 안정성 평가
- [77] 1. 실시예 1의 1 및 2에서 제조된 MB와 MV-MB에 대하여, 공명주파수를 분석하여 그 결과를 도 8에 나타내었고, 초음파 영상을 얻어 도 9에 나타내었다. 공명주파수 분석은 MB와 MV-MB를 희석한 후 0.2MHz 간격으로 초음파를 쏜 후 초음파 감쇠량을 측정하여 초음파 감쇠가 가장 큰 부분을 확인하였으며, 초음파 영상은 마이크로버블을 agarose를 통해 만든 gel phantom에 위치시킨 후 영상을 획득하는 종래의 방법이 이용되었으며, 이 과정에서 2-5MHz의 transducer를 이용하는 상용화된 초음파 진단기가 사용되었다.
- [78] 2. 도 8을 보면 MB(4MHz)와 MV-MB(3.6MHz)는 약간의 공명주파수 차이가 있음을 확인할 수 있으나 그 차이가 의료용 초음파로써 의미 있는 수준이 아님을 확인할 수 있고, 도 9를 보면 세포외 소포가 혼합되어도 초음파 조영능에는 유의미한 변화가 없음을 확인할 수 있어, MV-MB가 현재의 초음파 시스템에 그대로 적용이 가능하여 높은 상용화 가능성을 가짐을 알 수 있다.
- [79]
- [80] <실시예 7> 초음파 조영제용 마이크로버블의 표적능 확인
- [81] 1. 실시예 1의 1 및 2에서 제조된 MV-MB의 세포 표적능을 평가하기 위해, 공초점 현미경을 이용하여 이미지화하여 그 결과를 도 10에 나타내었고, 유세포 측정기(Flow cytometry)를 이용하여 분석하여 그 결과를 도 11에 나타내었다. 공초점 현미경을 이용한 분석은 형광염료 DAPI로 염색된 MIA-PACA-2 세포(1×10^5) 및 HUVEC 세포(1×10^5) 각각에 형광염료 DiI로 염색된 MV-MB를 처리하여 수행하였다. 또한, 유세포 측정기를 이용한 분석은 MIA-PACA-2 세포(1×10^4) 및 HUVEC 세포(1×10^4) 각각에 형광 염료 DiO가 표지된 MV-MB를 처리한 후 FACS를 통해 형광량을 측정하여 수행하였다.
- [82] 2. 도 10 및 11을 보면, MV-MB는 정상세포인 HUVEC 세포에 비해

MIA-PACA-2 세포에 더 많이 표적되는 것을 확인할 수 있어, 진단하고자 하는 세포로부터 분리된 세포외 소포가 포함된 마이크로버블을 이용하여, 목적하는 세포 또는 조직의 초음파 조영을 극대화할 수 있음을 알 수 있다.

[83]

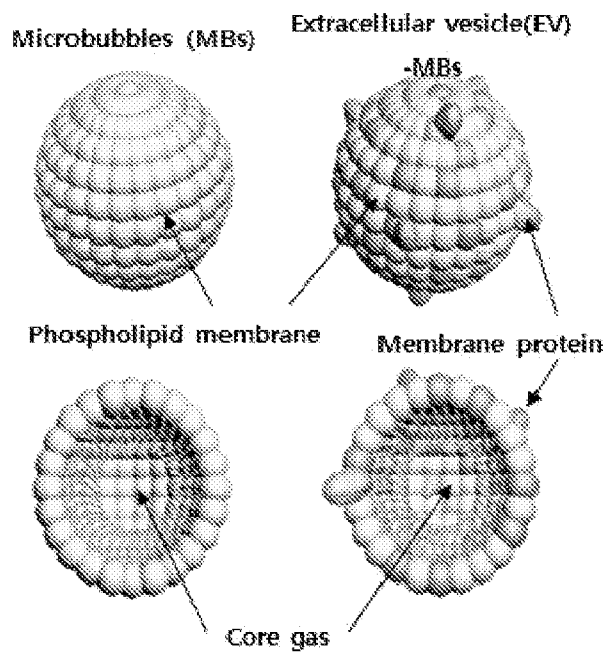
[84] 이상에서, 출원인은 본 발명의 바람직한 실시예들을 설명하였지만, 이와 같은 실시예들은 본 발명의 기술적 사상을 구현하는 일 실시예일 뿐이며 본 발명의 기술적 사상을 구현하는 한 어떠한 변경예 또는 수정예도 본 발명의 범위에 속하는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

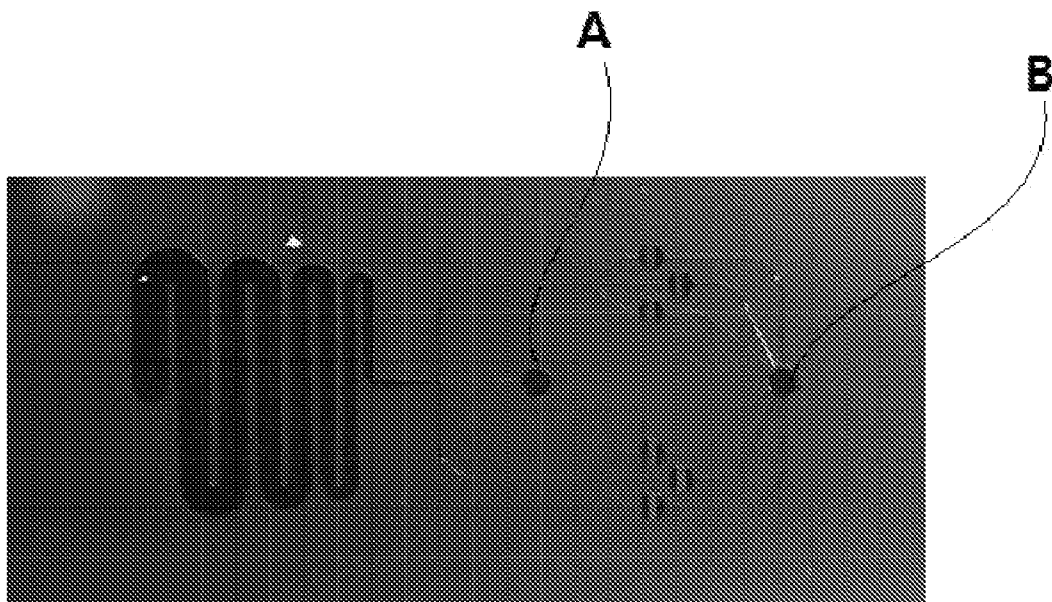
- [청구항 1] 기체와, 상기 기체를 에워싸는 멤브레인을 포함하는 마이크로버블에 있어서,
상기 멤브레인은 멤브레인 형성물질과 세포외 소포가 융합되어 형성되는 것을 특징으로 하는 초음파 조영제용 마이크로버블.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 멤브레인의 형성물질은 지질이 사용되는 것을 특징으로 하는 초음파 조영제용 마이크로버블.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 세포외 소포는 초음파 조영을 목적하는 세포로부터 분리된 세포외 소포가 사용되는 것을 특징으로 하는 초음파 조영제용 마이크로버블.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 세포외 소포는 멤브레인 형성물질과 세포외 소포의 혼합물 대비 1 내지 25중량%로 사용되는 것을 특징으로 하는 초음파 조영제용 마이크로버블.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 세포외 소포는 멤브레인 형성물질과 세포외 소포의 혼합물 대비 5 내지 15중량%로 사용되는 것을 특징으로 하는 초음파 조영제용 마이크로버블.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 세포외 소포는 엑소좀 또는 마이크로비시클이 사용되는 것을 특징으로 하는 초음파 조영제용 마이크로버블.
- [청구항 7] 모세포로부터 세포외 소포를 분리하는 세포외 소포 분리단계와;
멤브레인 형성물질과 상기 세포외 소포 분리단계에서 얻은 세포외 소포를 포함하는 혼합용액을 준비하는 혼합용액 형성단계와; 상기 혼합용액에 가스를 공급한 후 물질적 힘을 가해 가스를 에워싸며 멤브레인 형성물질과 세포외 소포가 융합되어 형성된 멤브레인을 가지는 마이크로버블을 형성하는 가스충진단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 초음파 조영제용 마이크로버블의 제조방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 세포외 소포 분리단계에서는 초음파 조영을 목적하는 세포로부터 세포외 소포를 분리하는 것을 특징으로 하는 초음파 조영제용 마이크로버블의 제조방법.
- [청구항 9] 제7항에 있어서,
상기 세포외 소포는 멤브레인 형성물질과 세포외 소포의 혼합물 대비 1 내지 25중량%로 사용되는 것을 특징으로 하는 초음파 조영제용 마이크로버블.

- [청구항 10] 제7항에 있어서,
상기 혼합용액 형성단계에서 세포외 소포는 멤브레인 형성물질과 세포외 소포의 혼합물 대비 5 내지 15중량%로 사용되는 것을 특징으로 하는
초음파 조영제용 마이크로버블의 제조방법.

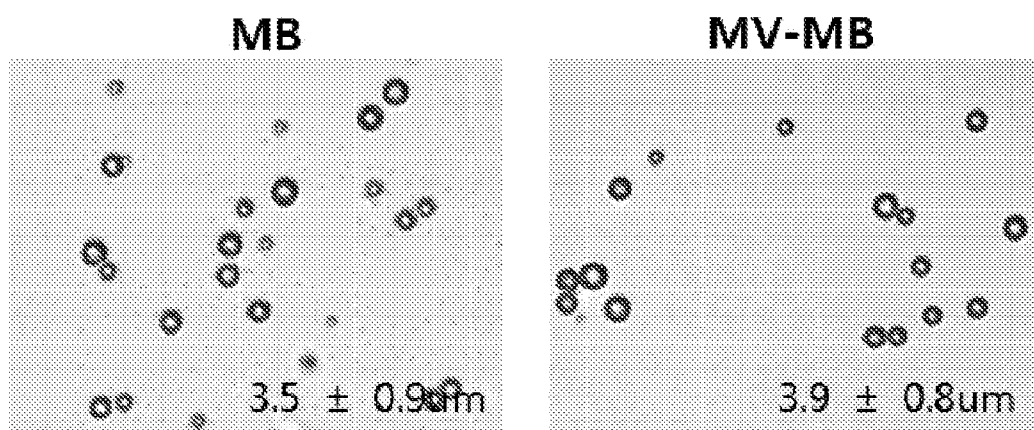
[도1]



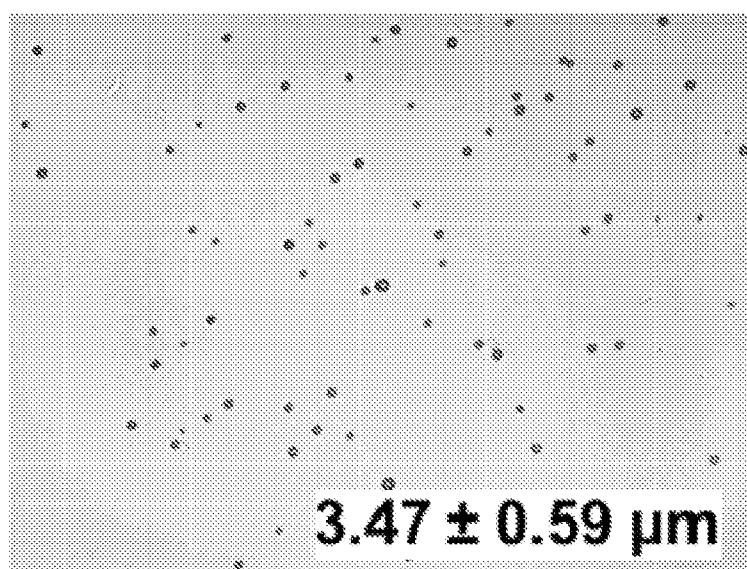
[도2]



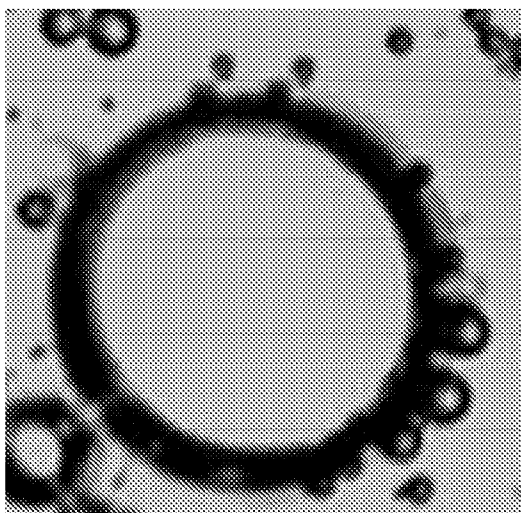
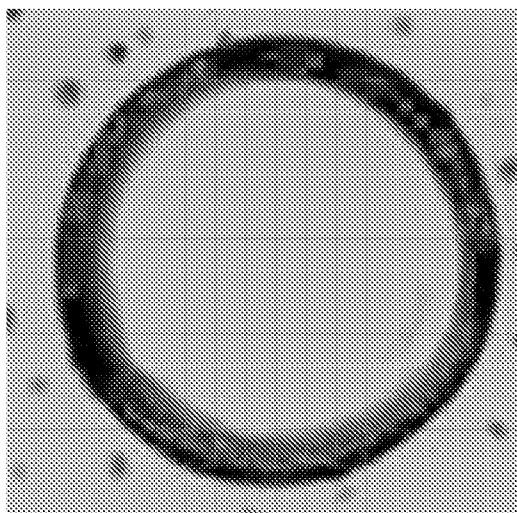
[도3]



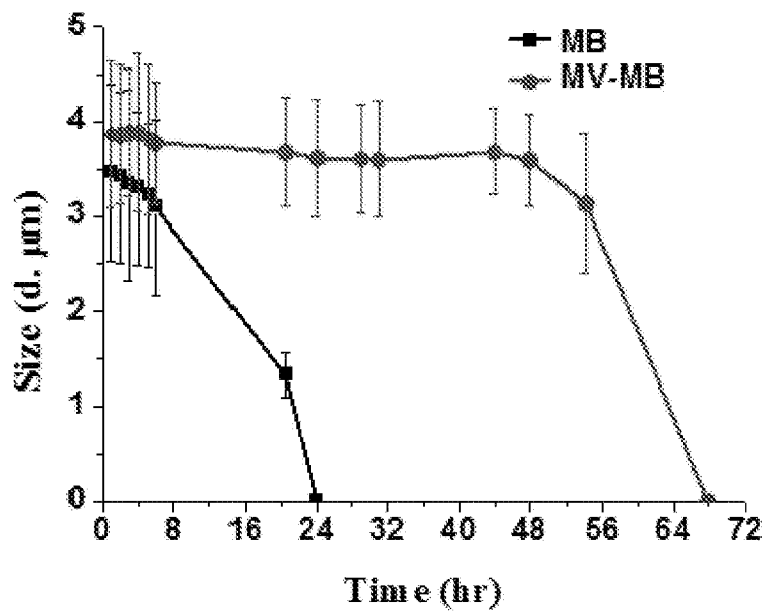
[도4]



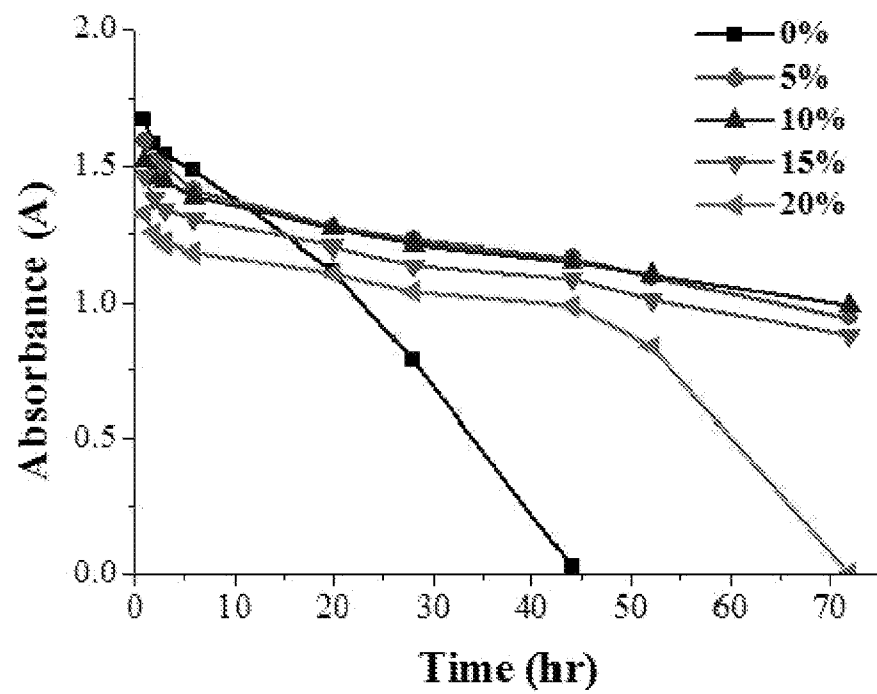
[도5]

MB**MV-MB**

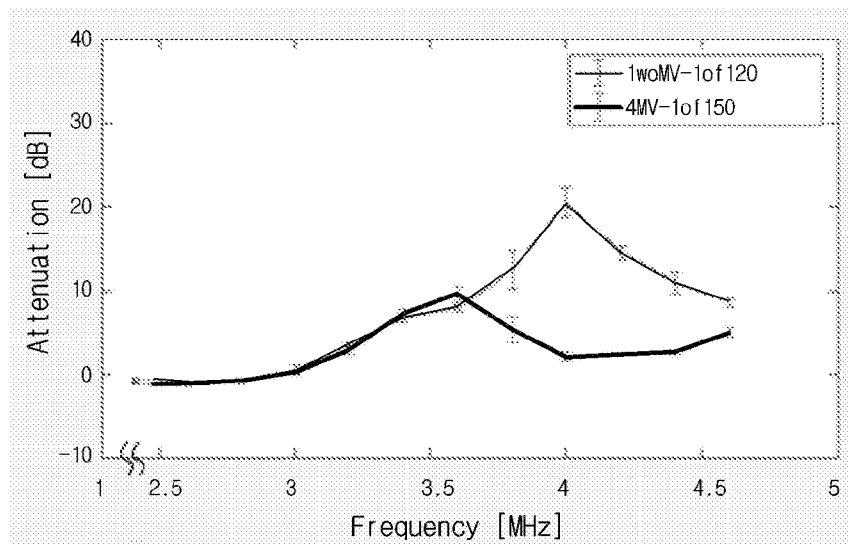
[도6]



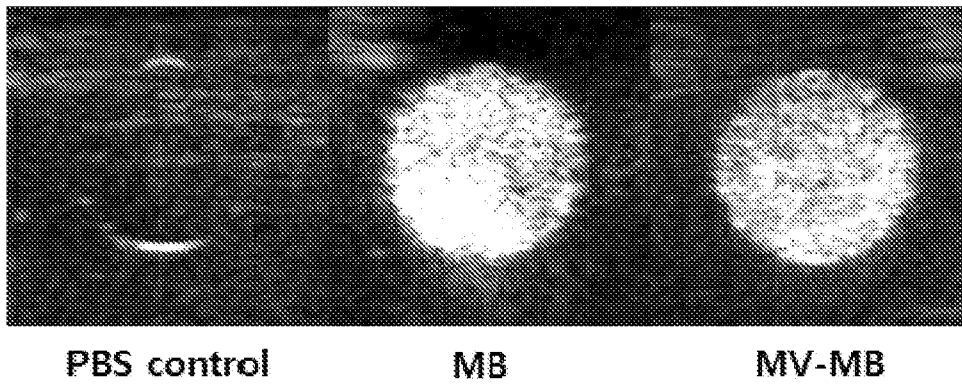
[도7]



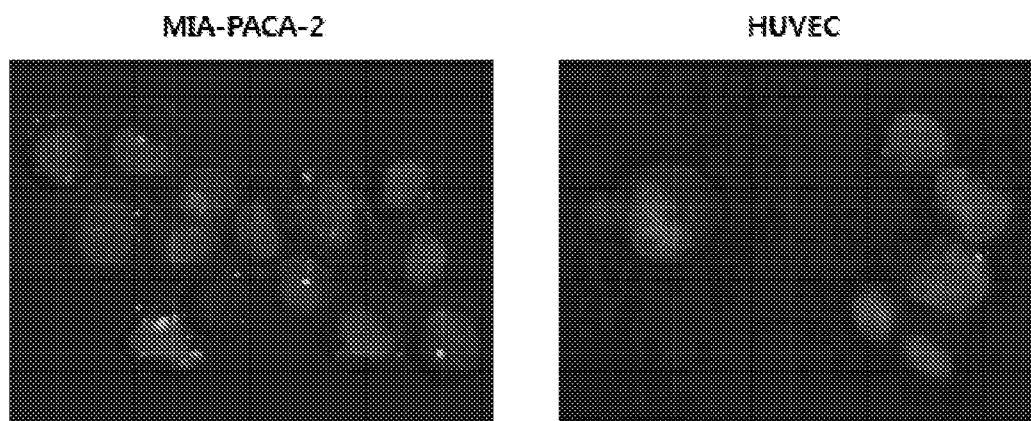
[도8]



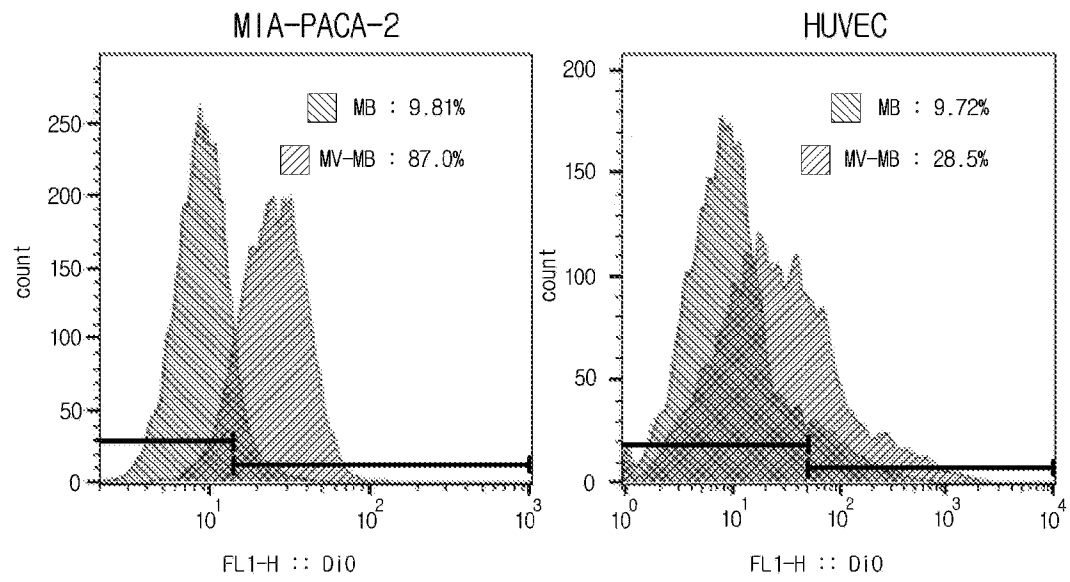
[도9]



[도10]



[도11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/018303

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 49/22(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)

A61K 49/22; A61B 5/00; A61B 8/08; A61K 049/00; A61K 49/04; A61K 9/00; A61K 9/127; A61K 9/19

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: ultrasound contrast agent, gas-filled microbubble, membrane, extracellular vesicle, lipid

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-1076053 B1 (BRACCO INTERNATIONAL B.V.) 21 October 2011 See paragraphs [0030], [0073], [0075], [0079]; claim 2.	1-10
Y	JC BOSE, Rajendran et al. Tumor cell-derived extracellular vesicle-coated nanocarriers: An efficient theranostic platform for the cancer-specific delivery of anti-miR-21 and imaging agents. ACS Nano. 16 October 2018, vol. 12, pages 10817-10832 See pages 10818-10819, 10829, 10831; figure 5.	1-10
Y	US 2005-0019266 A1 (UNGER, Evan C. et al.) 27 January 2005 See claims 1-2.	1-10
Y	WO 2018-041906 A1 (BRACCO SUISSE SA.) 08 March 2018 See pages 15, 19.	1-10
Y	KR 10-1665633 B1 (SOGANG UNIVERSITY RESEARCH & BUSINESS DEVELOPMENT FOUNDATION) 12 October 2016 See claims 9, 16.	1-10
A	US 2014-0288421 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 25 September 2014 See the entire document.	1-10



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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

08 APRIL 2020 (08.04.2020)

Date of mailing of the international search report

08 APRIL 2020 (08.04.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-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/KR2019/018303

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1076053 B1	21/10/2011	AT 480263 T	15/09/2010
		AU 2004-210221 A1	19/08/2004
		AU 2004-210221 B2	20/11/2008
		CA 2512454 A1	19/08/2004
		CA 2512454 C	30/10/2012
		CN 1003741651 C	12/03/2008
		CN 1744921 A	08/03/2006
		DK 1590006 T3	20/12/2010
		EP 1590006 A2	02/11/2005
		EP 1590006 B1	08/09/2010
		EP 2104488 A2	30/09/2009
		EP 2104488 B1	12/10/2016
		JP 2006-520754 A	14/09/2006
		JP 4670083 B2	13/04/2011
		KR 10-2005-0096959 A	06/10/2005
		MX PA05007730 A	31/01/2006
		RU 2005127634 A	20/01/2006
		RU 2345793 C2	10/02/2009
		US 2006-0034770 A1	16/02/2006
		US 2006-0051297 A1	09/03/2006
		US 2007-0128117 A1	07/06/2007
		US 2010-0086490 A1	08/04/2010
		US 2011-0236320 A1	29/09/2011
		US 2013-0101522 A1	25/04/2013
		US 9364569 B2	14/06/2016
		WO 2004-069284 A2	19/08/2004
		WO 2004-069284 A3	25/11/2004
		WO 2008-075191 A2	26/06/2008
		WO 2008-075191 A3	27/11/2008
US 2005-0019266 A1	27/01/2005	AU 1328502 A	15/05/2002
		AU 2002-213285 B2	21/12/2006
		AU 2003-210631 B2	01/05/2008
		AU 6185398 A	20/10/1998
		AU 6679198 A	20/10/1998
		AU 6971998 A	27/11/1998
		AU 6974798 A	27/11/1998
		CA 2428606 A1	10/05/2002
		CA 2473748 A1	31/07/2003
		EP 1015039 A1	05/07/2000
		EP 1015039 A4	11/09/2002
		EP 1015039 B1	27/08/2008
		EP 1037673 A1	27/09/2000
		EP 1037673 A4	02/05/2002
		EP 1037673 B1	23/08/2006
		EP 1365805 A2	03/12/2003
		EP 1478276 A2	24/11/2004
		EP 1478276 A4	19/04/2006
		JP 2001-514615 A	11/09/2001

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/018303

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		JP 2005-500245 A	06/01/2005
		JP 2005-516033 A	02/06/2005
		US 2002-159951 A1	31/10/2002
		US 2003-054027 A1	20/03/2003
		US 2003-120204 A1	26/06/2003
		US 2007-059248 A1	15/03/2007
		US 6028066 A	22/02/2000
		US 6090800 A	18/07/2000
		US 6120751 A	19/09/2000
		US 6143276 A	07/11/2000
		US 6403056 B1	11/06/2002
		US 6444660 B1	03/09/2002
		US 6537246 B1	25/03/2003
		US 6808720 B2	26/10/2004
		US 7105151 B2	12/09/2006
		US 7452551 B1	18/11/2008
WO 2018-041906 A1	08/03/2018	AU 2017-317646 A1	21/02/2019
		CA 3032062 A1	08/03/2018
		CN 109640951 A	16/04/2019
		EP 3506882 A1	10/07/2019
		JP 2019-526551 A	19/09/2019
		KR 10-2019-0042681 A	24/04/2019
		US 2019-0175516 A1	13/06/2019
KR 10-1665633 B1	12/10/2016	US 2018-0078236 A1	22/03/2018
		WO 2016-167423 A1	20/10/2016
US 2014-0288421 A1	25/09/2014	None	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 49/22(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 49/22; A61B 5/00; A61B 8/08; A61K 049/00; A61K 49/04; A61K 9/00; A61K 9/127; A61K 9/19

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: 초음파용 조영제(ultrasound contrast agent), 기체 충전 마이크로버블(gas-filled microbubble), 멤브레인(membrane), 세포외 소포(extracellular vesicle), 지질(lipid)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-1076053 B1 (브라코 인터내셔널 비.브이.) 2011.10.21 단락 [0030], [0073], [0075], [0079]; 청구항 2 참조.	1-10
Y	JC BOSE, RAJENDRAN 등, 'Tumor cell-derived extracellular vesicle-coated nanocarriers: an efficient theranostic platform for cancer-specific delivery of anti-miR-21 and imaging agents', ACS Nano, 2018.10.16, 12권, 페이지 10817-10832 페이지 10818-10819, 10829, 10831; 도면 5 참조.	1-10
Y	US 2005-0019266 A1 (UNGER, EVAN C. 등) 2005.01.27 청구항 1-2 참조.	1-10
Y	WO 2018-041906 A1 (BRACCO SUISSE SA) 2018.03.08 페이지 15, 19 참조.	1-10
Y	KR 10-1665633 B1 (서강대학교 산학협력단) 2016.10.12 청구항 9, 16 참조.	1-10
A	US 2014-0288421 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 2014.09.25 전체 문헌 참조.	1-10

☐ 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 이후 “X”에 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

2020년 04월 08일 (08.04.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 04월 08일 (08.04.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



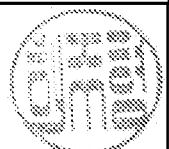
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1076053 B1	2011/10/21	AT 480263 T AU 2004-210221 A1 AU 2004-210221 B2 CA 2512454 A1 CA 2512454 C CN 1003741651 C CN 1744921 A DK 1590006 T3 EP 1590006 A2 EP 1590006 B1 EP 2104488 A2 EP 2104488 B1 JP 2006-520754 A JP 4670083 B2 KR 10-2005-0096959 A MX PA05007730 A RU 2005127634 A RU 2345793 C2 US 2006-0034770 A1 US 2006-0051297 A1 US 2007-0128117 A1 US 2010-0086490 A1 US 2011-0236320 A1 US 2013-0101522 A1 US 9364569 B2 WO 2004-069284 A2 WO 2004-069284 A3 WO 2008-075191 A2 WO 2008-075191 A3	2010/09/15 2004/08/19 2008/11/20 2004/08/19 2012/10/30 2008/03/12 2006/03/08 2010/12/20 2005/11/02 2010/09/08 2009/09/30 2016/10/12 2006/09/14 2011/04/13 2005/10/06 2006/01/31 2006/01/20 2009/02/10 2006/02/16 2006/03/09 2007/06/07 2010/04/08 2011/09/29 2013/04/25 2016/06/14 2004/08/19 2004/11/25 2008/06/26 2008/11/27
US 2005-0019266 A1	2005/01/27	AU 1328502 A AU 2002-213285 B2 AU 2003-210631 B2 AU 6185398 A AU 6679198 A AU 6971998 A AU 6974798 A CA 2428606 A1 CA 2473748 A1 EP 1015039 A1 EP 1015039 A4 EP 1015039 B1 EP 1037673 A1 EP 1037673 A4 EP 1037673 B1 EP 1365805 A2 EP 1478276 A2 EP 1478276 A4 JP 2001-514615 A	2002/05/15 2006/12/21 2008/05/01 1998/10/20 1998/10/20 1998/11/27 1998/11/27 2002/05/10 2003/07/31 2000/07/05 2002/09/11 2008/08/27 2000/09/27 2002/05/02 2006/08/23 2003/12/03 2004/11/24 2006/04/19 2001/09/11

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		JP 2005-500245 A	2005/01/06
		JP 2005-516033 A	2005/06/02
		US 2002-159951 A1	2002/10/31
		US 2003-054027 A1	2003/03/20
		US 2003-120204 A1	2003/06/26
		US 2007-059248 A1	2007/03/15
		US 6028066 A	2000/02/22
		US 6090800 A	2000/07/18
		US 6120751 A	2000/09/19
		US 6143276 A	2000/11/07
		US 6403056 B1	2002/06/11
		US 6444660 B1	2002/09/03
		US 6537246 B1	2003/03/25
		US 6808720 B2	2004/10/26
		US 7105151 B2	2006/09/12
		US 7452551 B1	2008/11/18
WO 2018-041906 A1	2018/03/08	AU 2017-317646 A1	2019/02/21
		CA 3032062 A1	2018/03/08
		CN 109640951 A	2019/04/16
		EP 3506882 A1	2019/07/10
		JP 2019-526551 A	2019/09/19
		KR 10-2019-0042681 A	2019/04/24
		US 2019-0175516 A1	2019/06/13
KR 10-1665633 B1	2016/10/12	US 2018-0078236 A1	2018/03/22
		WO 2016-167423 A1	2016/10/20
US 2014-0288421 A1	2014/09/25	없음	