



(51) 국제특허분류:

A61K 38/39 (2006.01)

A61K 47/64 (2017.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 47/69 (2017.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2017/012991

(22) 국제출원일:

2017년 11월 16일 (16.11.2017)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2016-0152646 2016년 11월 16일 (16.11.2016) KR

(71) 출원인: 포항공과대학교 산학협력단 (POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION) [KR/KR]; 37673 경상북도 포항시 남구 청암로 77, Gyeongsangbuk-do (KR).

(72) 발명자: 차형준 (CHA, Hyung Joon); 37672 경상북도 포항시 남구 지곡로379번길 7-1, Gyeongsangbuk-do (KR). 김효정 (KIM, Hyo Jeong); 37655 경상북도 포항시 남구 유동길 26번길, 205호, Gyeongsangbuk-do (KR). 이재윤 (LEE, Jae Yun); 37664 경상북도 포항시 남구 효자동길6번길 16, 203호, Gyeongsangbuk-do (KR). 전은영 (JEON, Eun Young); 37835 경상북도 포항시 남구 효성로93번길 5, 301, Gyeongsangbuk-do (KR). 박태윤 (PARK, Tae

Yoon); 42759 대구시 달서구 조암남로 116, 104동 1301호, Daegu (KR). 최근호 (CHOI, Geun Ho); 37673 경상북도 포항시 남구 청암로 77, 13동 205호, Gyeongsangbuk-do (KR). 최봉혁 (CHOI, Bong Hyuk); 14317 경기도 광명시 신촌로15번길 20-10, 101호, Gyeonggi-do (KR). 주계일 (JO, Kye Il); 41525 대구시 북구 복현로 105, 107동 502호, Daegu (KR).

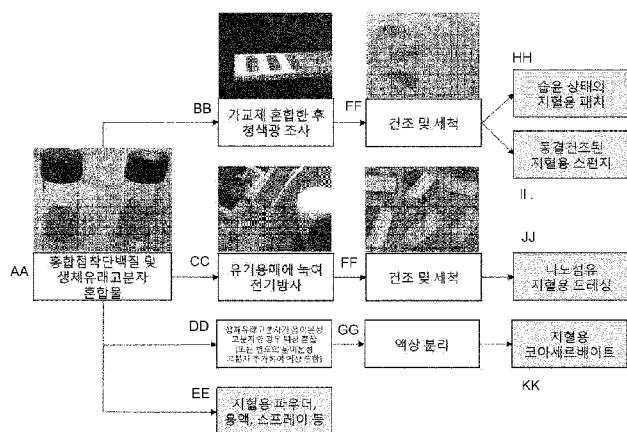
(74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 08380 서울시 구로구 디지털로 31길 20 (구로동) 601호, Seoul (KR).

(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 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,

(54) Title: NOVEL HEMOSTATIC AGENT COMPRISING MUSSEL ADHESIVE PROTEIN AND METHOD FOR PREPARING SAME

(54) 발명의 명칭: 홍합 접착 단백질을 포함하는 신규한 지혈제 및 이의 제조 방법



AA ... Mixture of mussel adhesive protein and bio-derived polymer
BB ... Blue light irradiation after mixing mixture with cross-linking agent
CC ... Electrospinning by dissolving mixture in organic solvent
DD ... Liquid-phase mixing when bio-derived polymer is anionic polymer (or liquid-phase mixing by adding separate anionic polymer)
EE ... Powder, solution, spray, etc. for hemostasis
FF ... Drying and washing
GG ... Liquid phase separation
HH ... Wet hemostatic patch
JJ ... Lyophilized hemostatic sponge
KK ... Hemostatic coacervate

(57) Abstract: The present invention relates to a hemostatic composition, a hemostatic agent comprising the same, and a method for preparing same. The hemostatic composition comprises: a mussel adhesive protein as a first component; and a bio-derived polymer other than the mussel adhesive protein as a second component. The present invention has excellent biocompatibility, biodegradability, hemostatic effects in underwater environments, and mechanical properties suitable for tissue environments.

(57) 요약서: 본 발명은 제1 성분으로서 홍합 접착 단백질; 및 제2 성분으로서 홍합 접착 단백질 이외의 생체 유래 고분자;를 포함하는 지혈용 조성물, 이를 포함하는 지혈제 및 그 제조 방법에 관한 것으로서, 우수한 생체적합성, 생분해성, 수중 환경에서의 지혈 효능 및 조직 환경에 적합한 기계적 물성을 가지는 것을 특징으로 한다.



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))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 홍합 접착 단백질을 포함하는 신규한 지혈제 및 이의 제조 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 홍합 접착 단백질을 포함하는 신규한 지혈제 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 일상 생활 및 작업 현장에서 상해가 발생할 경우 신속하고 안전한 응급 지혈이 과다 출혈과 이에 수반되는 생명의 위협을 막는 데에 중요한 역할을 한다. 외과 수술에서 환부의 효율적인 지혈은 환자의 출혈량을 줄이고 수혈량을 절약할 수 있으며 수술 의사의 시야를 확보함으로써 수술에 소요되는 시간과 비용을 절감할 수 있다. 지혈을 위해서는 붕대, 거즈, 수술용 봉합사, 스테이플러 등 물리적 압박 또는 전기, 초음파, 레이저 등 기기를 이용하는 방법이 사용되기도 하나 출혈 부위와 손상과 감염 등을 유발할 수 있다. 지혈의약품은 출혈 부위에 도입 시 제품에 따라 물리적, 화학적, 생리활성 등의 성질을 이용해 출혈을 차단하며 상처 조직의 손상과 감염을 방지할 수 있어 안전성 및 효율성 측면에서 비교우위에 있다.
- [3] 해양생물인 홍합은 족사에서 접착 단백질을 분비하여 수중의 표면에 부착함으로써 해류와 부력에 휩쓸리지 않고 위치를 유지할 수 있다. 이러한 홍합 접착 단백질은 수중에서 금속, 유리, 플라스틱 및 생체물질에 강하게 접착할 수 있고 생체 내 면역반응을 유발하지 않는 것으로 알려져, 접착 능력을 보유한 생체 소재로 활용 가능하다. 표면 코팅, 하이드로젤, 나노섬유, 나노입자 등의 제형화를 통한 조직공학 및 의료 분야로 적용 가능성이 확인된 바 있으며 생체적합성, 생분해성 및 생물학적 안전성 등이 검증된 바 있다.
- [4] 말미잘은 해양생물 중 강장류에 해당하며 특유한 자포 기관을 이용하여 먹이와 외적 등을 쏘아 독을 주입한다. 스타렛 말미잘의 자포에 분포하는 구조 단백질들 중 누에 실크, 콜라겐 등과 유전자 반복 서열과 기계적 물성에서 유사성을 가지는 단백질이 존재하며 이 단백질을 하이드로젤, 나노섬유, 마이크로섬유 등으로 제형화할 수 있다는 것이 밝혀졌다. 이 말미잘 실크 단백질은 생체적합성, 생분해성을 보유하고 있으며 세포 포집 및 동물 실험 등을 통하여 생물학적 안전성이 확인되었다.
- [5] 가재, 게, 새우 등의 해양생물을 비롯한 갑각류 껍데기의 주성분인 키틴을 탈아세틸화 처리하면 글루코사민 중합체인 키토산을 얻을 수 있다. 키토산 소재는 혈장 흡수, 적혈구 응집, 혈소판 부착 및 활성화 등 지혈 효과를 보유하고 있으며, 생체적합성, 생분해성, 항감염성 등이 우수하기 때문에 지혈 소재로 활용되고 있다.

- [6] 하이드로젤은 물 또는 체액 내에서 가교된 격자 안으로 많은 양의 물 또는 체액을 흡수하여 팽윤되며 삼차원 구조를 유지하는 재료를 의미한다. 팽윤된 이후에도 열역학적으로 안정하게 존재하여 액체와 고체의 중간 형태에 해당하는 기계적 및 물리화학적 특성을 가진다. 이러한 하이드로젤은 대개 생체 적합성, 높은 다공성 및 산소 투과도를 보이며, 생체 연조직과의 비슷한 물리적 특성을 나타낼 수 있다.
- [7] 전기방사는 고분자 물질을 포함한 용액을 포함한 주사기 등에 높은 전기장을 가하여 순간적으로 섬유 형태로 방사하는 방법이다. 휘발성이 높은 용매를 포함하는 낮은 점도 상태의 용액이 전기장 내에서 낙하 시, 고분자에 가해지는 정전기력이 표면장력을 극복하고 용매가 증발함에 따라 고분자가 직경 수십~수백 나노미터의 섬유를 형성하게 된다. 이러한 나노섬유는 그 형태가 세포외기질과 유사하고 다공성의 박막 형태로 제조할 수 있어 생체 소재로 활용이 가능하다.
- [8] 코아세르베이트는 음이온성 고분자 전해질과 양이온성 고분자 전해질이 특정 조건에서 혼합되었을 때 형성되는 콜로이드 물질의 일종으로, 코아세르베이트가 형성되는 경우 용액의 흡광도가 증가하며, 용액 상에서 동그란 구 형태로 외부 용액과 분리되어 존재한다. 코아세르베이트 형성 시, 참여 전해질은 용액에서 분리되어 응축되고 여전히 액상을 띠게 되며, 이때 표면장력이 줄어들고 점성이 늘어나는 등, 물성도 변화한다. 코아세르베이트는 단백질과 그 반대 성질을 띠는 고분자 전해질과의 혼합을 통해서도 일어날 수 있다. 코아세르베이트의 낮은 표면장력에 기인해 약물, 효소, 세포, 식품첨가물 등의 기능성 물질을 미세캡슐 안에 고정화 하는데 쓰이는 기술도 보고되어 있다.
- [9] 생물학적 지혈작용을 촉진하는 피브린 글루 등의 제품군은 상용화 지혈제의 주를 이루고 있으나 기계적 물성이 높지 않은 문제점이 있다. 물리적 압박을 이용하는 제품군은 대부분 비생체 고분자 소재를 기반으로 하고 있는데, 이러한 제품들은 공통적으로 단순 지혈효과만을 가지며 출혈 부위에 붙는 접착력을 충분히 보유하지 못하고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명의 목적은 생체 적합성과 물성이 우수한 해양 생체 유래 소재를 이용하여 상처 부위의 지혈을 도와줄 수 있는 신규한 복합 기능성 지혈제를 제공하는 것이다.
- [11] 또한, 본 발명의 목적은 제1 성분으로서 혼합 접착 단백질 및 제2 성분으로서 혼합 접착 단백질 이외의 생체 유래 고분자를 포함하는 지혈용 조성물 및 이를 포함하는 지혈제를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [12] 본 발명자들은 생체적합성과 물성이 우수한 해양생체 유래 소재를 이용하여

기능성 지혈제를 개발할 수 있다는 점에 착안하여, 홍합 접착 단백질을 포함하는 지혈용 조성물 및 이를 포함하는 지혈제를 제안하였다.

[13] 따라서, 본 발명은 제1 성분으로서 홍합 접착 단백질 및 제2 성분으로서 홍합 접착 단백질 이외의 생체 유래 고분자를 포함하는 지혈용 조성물에 관한 것이다.

[14] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 지혈용 조성물을 포함하는 지혈제에 관한 것이다.

발명의 효과

[15] 본 발명에 따라 해양생물 유래 구조단백질 원천소재를 포함하는 지혈제가 제공되며, 이는 기존 지혈제에서 부족했던 수중 상처부위 지혈 효능을 가지며, 우수한 생체적합성, 생분해성을 가진다.

[16] 본 발명에 따른 지혈제는 수중 환경에서 강한 조직 접착력을 보유하는 홍합 접착 단백질을 함유하여, 출혈량이 많아 지혈이 어려운 부위에서 우수한 지혈 효능이 있다.

[17] 본 발명에 따른 지혈제는 말미잘 실크 단백질을 함유하여, 팽창과 수축이 많은 조직 환경에서도 우수한 기계적 물성을 확보할 수 있다.

[18] 본 발명에 따른 지혈제는 합성 고분자가 아닌 천연 해양 구조단백질 소재를 이용하여 높은 생체 안정성을 보유하며 미생물 시스템을 통한 대량생산이 가능하다.

[19] 본 발명에 따른 지혈제는 적용 부위의 특성에 따라 다양한 형태로의 제형이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[20] 도 1은 본 발명에 따른 지혈제 제조방법에 관한 개념도이다.

[21] 도 2는 실시예 1에 따라 제조한 홍합 접착 단백질을 포함하는 하이드로젤 소재 및 홍합 접착 단백질/말미잘 실크 단백질 광가고 하이드로젤 소재의 최대 인장 응력을 나타낸 그래프이다. 막대그래프 가운데에 표시된 선분은 표준편차를 의미한다.

[22] 도 3은 실시예 1에 따라 제조한 홍합 접착 단백질을 포함하는 하이드로젤 소재 및 홍합 접착 단백질/말미잘 실크 단백질 광가고 하이드로젤 소재의 영 계수를 나타낸 그래프이다. 막대그래프 가운데에 표시된 선분은 표준편차를 의미한다.

[23] 도 4는 실시예 1에 따라 제조한 하이드로젤을 이용하는 경우의 혈액 응고 정도를 540nm 파장 흡광도를 이용하여 측정한 결과를 나타낸 그래프이다. 막대그래프 가운데에 표시된 선분은 표준편차를 의미한다.

[24] 도 5는 실시예 1에 따라 제조한 하이드로젤이 신호전달물질 PF4 (Platelet Factor 4) 분비에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 막대그래프 가운데에 표시된 선분은 표준편차를 의미한다.

[25] 도 6은 실시예 1에 따라 제조한 하이드로젤을 이용하는 경우 마우스에서 출혈량이 감소되는 것을 확인한 사진이다.

- [26] 도 7은 실시예 2에 따라 제조한 콜로이드 용액이 혈소판 활성을 시키는 것을 나타내는 전자현미경 사진이다.
- [27] 도 8은 실시예 2에 따라 제조한 콜로이드 용액의 상대적인 혈액응고 능력을 나타낸 그래프이다. 막대그래프 가운데에 표시된 선분은 표준편차를 의미한다.
- [28] 도 9는 실시예 2에 따라 제조한 콜로이드 용액의 상대적인 PF4 분비량을 나타낸 그래프이다. 막대그래프 가운데에 표시된 선분은 표준편차를 의미한다.
- [29] 도 10은 실시예 2에 따라 제조한 콜로이드 용액을 사용하는 경우 혈액 흡수 및 응고가 일어난 형태를 나타낸 전자현미경 사진이다.
- [30] 도 11은 실시예 3에 따라 제조한 나노섬유에서 혈액이 통과하지 않고 표면에서 응고되는 것을 나타낸 사진이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [31] 본 발명은 제1 성분으로서 홍합 접착 단백질; 및 제2 성분으로서 홍합 접착 단백질 이외의 생체 유래 고분자;를 포함하는 지혈용 조성물에 관한 것이다.
- [32] 본 발명의 조성물은 제1 성분으로서 홍합 접착 단백질을 포함한다. 상기 홍합 접착 단백질은 홍합에서 유래한 접착 단백질로, 미틸러스 에둘리스(*Mytilus edulis*), 미틸러스 갈로프로빈시얼리스(*Mytilus galloprovincialis*) 및 미틸러스 코루스쿠스(*Mytilus coruscus*)로 구성된 군에서 선택되는 홍합과 패류에서 유래된 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [33] 본 발명에 따른 지혈용 조성물에서 상기 홍합 접착 단백질은 홍합에서 유래한 Mefp(*Mytilus edulis* foot protein)-1, Mgfp(*Mytilus galloprovincialis* foot protein)-1, Mcfp(*Mytilus coruscus* foot protein)-1, Mefp-2, Mefp-3, Mgfp-3 및 Mgfp-5로 이루어진 군에서 1 종 이상 선택되는 것일 수 있고, 바람직하게는 fp(foot protein)-1(서열번호 1), fp-2(서열번호 2), fp-3(서열번호 3), fp-4(서열번호 4), fp-5(서열번호 5), 및 fp-6(서열번호 6)로 이루어진 군에서 1 종 이상 선택되는 것일 수 있다. 또한, 본 발명의 홍합 접착 단백질은 WO2006/107183A1 또는 WO2005/092920A1에 기재된 모든 홍합 접착 단백질 중에서 1종 이상 선택되는 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 홍합 접착 단백질은 fp-151(서열번호 7), fp-131(서열번호 8), fp-353(서열번호 9), fp-153(서열번호 10) 및 fp-351(서열번호 11)으로 이루어진 군에서 1종 이상 선택되는 것일 수 있다. 홍합 접착 단백질은 접착 효과 뿐 아니라, 혈소판을 활성화시키며 지혈 효과가 있는 것으로 알려져 있다.
- [34] 이때 본 발명에 따른 지혈용 조성물은 홍합 접착 단백질 20 중량% 이상, 바람직하게는 30 중량% 이상, 더욱 바람직하게는 50 중량% 이상을 포함할 수 있다. 홍합 접착 단백질이 20 중량%보다 적게 포함되는 경우에는 지혈 효과가 현저히 떨어지는 문제점이 있다.
- [35] 또한, 본 발명의 조성물은 제2 성분으로서 생체 유래 고분자를 포함한다. 상기 생체 유래 고분자는 홍합 접착 단백질 이외의 생체 유래 고분자로서, 말미잘

실크 단백질, 키토산, 히알루론산, 콜라젠(collagen), 젤라틴(gelatin), 알부민(albumin), 알긴산(alginate), 셀룰로오스(cellulose), 트롬빈(thrombin) 및 피브린(fibrin)으로 구성된 군에서 1종 이상 선택될 수 있다. 지혈용 조성물은 출혈 부위에서 혈액에 흘러내리지 않고, 조직의 신축에 따라 형태를 유지할 수 있어야 한다. 이를 위해 본 발명에서는 조성물 내에 생체 구조 소재로서 상기와 같은 생체 유래 고분자를 더 포함시켜 기계적 물성을 개선한다. 말미잘 실크 단백질은 아네로인(aneroxin)이라고도 불리며, 제형화했을 때 강한 기계적 물성을 나타내고, 특히 인체 내 장기에 필요한 탄성을 가지고 있다. 말미잘 실크 단백질은 서열번호 12 내지 14로 구성된 군에서 1종 이상 선택될 수 있다. 키토산의 경우 지혈 효과를 가지고 있으며 생체 재료로 적합하다. 히알루론산은 N-아세틸-D-글루코사민과 D-글루쿠론산이 교대로 사슬 형태로 결합된 생체 유래 고분자 물질로서, 피부, 탯줄 등 동물의 조직에 많이 존재하며, 생체 재료로 적합하고, 물성 조절이 용이하다. 콜라젠은 피부, 모발, 연골, 뼈 등을 구성하는 단백질로 혈액이 콜라젠에 노출될 경우 혈액 응고가 촉진된다. 젤라틴은 콜라젠을 고온으로 처리하여 얻을 수 있으며 콜라젠과 마찬가지로 혈액 응고를 촉진시킬 수 있다. 알부민은 혈액 및 조직액에 포함되는 주 단백질로 삼투압 조절 등 역할을 한다. 알긴산은 갈조류에 함유되는 다당류로 칼슘 이온에 노출되면 겔화하는 성질이 있어 혈액 응고에 사용할 수 있다. 셀룰로오스는 식물을 주로 구성하는 다당류로 지혈 소재로 이용되어 혈액 응고를 촉진할 수 있다. 트롬빈은 혈장에 존재하는 분해효소로 피브리노겐을 피브린으로 분해하여 혈전을 형성한다. 피브린은 혈전의 주요 성분으로 혈구 및 혈장 단백질과 함께 응집하여 지혈 막개를 형성한다.

- [36] 본 발명의 지혈용 조성물은 제1 성분인 홍합 접착 단백질과 제2 성분인 홍합 접착 단백질 이외의 생체 유래 고분자를 2:8~8:2의 중량비로 포함할 수 있다. 2 성분이 상기 중량비보다 낮은 범위로 포함되는 경우에는 지혈제로 사용하기 위한 기계적 물성을 확보할 수 없고, 상기 중량비보다 높은 범위로 포함되는 경우에는 지혈 및 접착 효과가 떨어지는 문제가 있다.
- [37] 본 발명의 지혈용 조성물은 염화칼슘(CaCl_2), 아데노신이인산(ADP), 비타민 K, 트롬보플라스틴, 포도당, 탈크, 탄산나트륨, 스테아린산마그네슘 및 폴리비닐알코올로 이루어진 군에서 1종 이상 선택되는 첨가제를 더 포함할 수 있으나, 이에 한정되지는 않으며, 본 발명의 지혈용 조성물의 형태, 용도, 투여 부위 및 경로, 사용량에 따라 필요한 약학적 성분들을 추가로 포함할 수 있다. 여기서, 염화칼슘을 염 또는 수용액의 형태로 지혈용 조성물 리터당 약 5~25 mM을 첨가하여 지혈 경로 활성화에 필요한 칼슘 이온을 제공할 수 있다. 아데노신이인산을 염 또는 수용액의 형태로 지혈용 조성물 리터당 약 0.5~5 μM 을 첨가하여 지혈 경로를 활성화할 수 있다.
- [38] 본 발명에 따른 지혈용 조성물은 하이드로젤, 콜로이드 용액, 나노섬유, 용액, 분말 또는 스프레이 형태로 제공될 수 있다.

- [39] 본 발명의 조성물이 하이드로젤 형태로 제공되는 경우, 상기 하이드로젤은 제1 성분, 제2 성분 및 트리스비피리딘루테튬디클로라이드($\text{Ru(II)bpy}_3^{2+}2\text{Cl}^-$) 또는 과황산나트륨(SPS)의 혼합물을 젤화하여 제조되는 것일 수 있다. 하이드로젤은 제1 성분 및 제2 성분의 혼합물이 광가교되어 형성된 것일 수 있다. 제1 성분 및 제2 성분을 광가교하여 젤화시킨 소재는 높은 기계적 물성과 다공성 구조 및 접착 능력을 지니게 된다. 이 하이드로젤은 세척 후 습윤 상태의 지혈 패치 또는 동결 건조한 스펀지 형태로 이용될 수 있다.
- [40] 본 발명의 조성물이 콜로이드 용액의 형태로 제공되는 경우, 상기 콜로이드 용액은 제1 성분 및 제2 성분으로 형성된 코아세르베이트를 포함할 수 있다. 이 경우 제2 성분은 음이온성 고분자일 수 있다. 또는, 제1 성분 및 제2 성분에 음이온성 고분자가 더 첨가된 것일 수 있다. 음이온성 고분자는 페레독신(ferredoxin), 폴리스티렌술포산(poly styrene sulfonic acid), 아라비아검(gum arabic), 카보폴(carbopol), 고 또는 저 메톡실 펙틴(high or low methoxyl pectin), 카르복시메틸 구아검 나트륨(sodium carboxymethyl guar gum), 잔탄검(xanthan gum), 유청 단백질(whey protein), 레구민(faba bean legumin), 카르복시메틸 셀룰로오스(carboxymethyl cellulose), 알긴산(alginate), 캐러지닌(carrageenan), 헥사메타인산나트륨(sodium hexametaphosphate), 카제인 나트륨(sodium casinate), 헤모글로빈(hemoglobin), 헤파린(heparin) 및 세포외 다당체 B40(exopolysaccharide B40)으로 구성된 군에서 선택되는 것일 수 있다. 본 발명에 따른 콜로이드 용액 형태의 지혈용 조성물은 제1 성분 및 제2 성분을 1:0.25 내지 1:2.33의 중량비로 포함할 수 있다. 중량비가 이 범위를 벗어나는 경우 코아세르베이트 수율이 낮아져 충분한 양의 코아세르베이트를 얻을 수 없게 된다.
- [41] 본 발명의 조성물이 나노섬유 형태로 제공되는 경우, 나노섬유는 제1 성분 및 제2 성분의 혼합물을 전기방사하여 제조한 것이거나, 제2 성분을 전기방사하여 제조한 나노섬유에 제1 성분을 흡착시키거나 코팅한 것일 수 있다.
- [42] 본 발명의 조성물이 용액 형태로 제공되는 경우, 용액은 제1 성분 및 제2 성분을 멸균수, 식염수, 완충액 및 초산나트륨 수용액으로 이루어진 군에서 선택되는 용매와 혼합한 것일 수 있다. 상기 용액은 약학적으로 허용되는 첨가제를 더 포함할 수 있고, 투여 부위 및 경로에 따라 주사액, 드레싱, 실란트, 농축액, 젤 등의 형태로 활용될 수 있다.
- [43] 본 발명의 조성물이 분말 형태로 제공되는 경우, 분말은 제1 성분 및 제2 성분의 혼합물을 1 mm 이상의 입체, 1 μm 내지 1 mm의 분체, 0.1 내지 1 μm 의 미분체 또는 1 μm 미만의 초미분체로 파쇄한 것일 수 있다. 상기 혼합물은 약학적으로 허용되는 첨가제를 더 포함할 수 있다.
- [44] 본 발명의 조성물이 스프레이 형태로 제공되는 경우, 스프레이는 제1 성분 및 제2 성분의 혼합물을 외상 및 외과 수술 부위에 스프레이로 도포하는 것일 수 있다.

[45]

[46] 실시예 및 실험예

[47] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[48]

[49] 실시예 1. 혼합 접착 단백질/말미잘 실크 단백질이 광가교된 하이드로젤

[50] 300 mg/mL의 fp-151 단백질 포름산 용액 2 mL와 300 mg/mL 서열번호 12의 말미잘 실크 단백질 포름산 용액 1 mL를 상온에서 혼합하고 3시간 동안 교반하였다. 혼합물에 가교제로 트리스비피리딘루테늄디클로라이드 1 mM 및 과황산나트륨 30 mM를 첨가하고, 치과용 LED 조사 램프를 이용하여 (FORZA4, 1200 mW/cm²) 460 nm 파장의 청색광을 3분간 조사하였다. 이를 상온에서 1시간 동안 건조시키고, 증류수로 5회 이상 세척해 용매와 가교제를 제거하여 하이드로젤을 수득하였다.

[51]

[52] 비교예 1. 혼합 접착 단백질을 포함하는 하이드로젤

[53] 실시예 1에 따라 fp-151 단백질 포름산 용액만을 사용하여 하이드로젤을 제조하였다.

[54]

[55] 비교예 2. 말미잘 실크 단백질을 포함하는 하이드로젤

[56] 실시예 1에 따라 서열번호 12의 말미잘 실크 단백질 포름산 용액만을 사용하여 하이드로젤을 제조하였다.

[57]

[58] 기계적 물성 확인

[59] 실시예 1, 비교예 1 및 2에 따라 제조한 하이드로젤의 기계적 물성을 확인하였다. 추가적인 대조군으로는 시중에서 판매되는 써지셀 (Surgicel®) 및 바이오글루 (Bioglue®)를 사용하였다.

[60] 각 샘플을 0.5 × 2 cm의 직사각형으로 절단하여 인장강도계에 걸고 0.83 mm/s의 속력으로 인장하여 샘플이 끊어지기 직전에 걸린 힘을 샘플의 단면적으로 나누어 각 샘플의 최대 인장 응력을 확인하였다 (도 2).

[61] 각 샘플의 초기 인장 응력을 길이 변형률로 나누어 각 샘플의 영 계수를 확인하였다 (도 3).

[62]

[63] 실시예 2. 혼합 접착 단백질 및 히알루론산을 포함하는 콜로이드 용액

[64] 10 mg/mL의 fp-151 단백질 포름산 용액과 10 mg/mL의 히알루론산 수용액을 1:0.25의 중량비로 혼합하여 코아세르베이트를 포함하는 콜로이드 용액을 얻었다. 그 다음 원심분리기를 이용해 코아세르베이트 상을 분리하였다.

[65]

[66] 비교예 3. 혼합 접착 단백질을 포함하는 용액

[67] fp-151 단백질을 인산 완충액에 300 g/L의 농도로 혼합하여 혼합 접착 단백질 용액을 준비하였다.

[68]

[69] 실시예 3. 혼합 접착 단백질 및 말미잘 실크 단백질을 포함하는 나노섬유

[70] 헥사플루오로이소프로판올(HFIP)과 트리플루오로아세트산(TFA)를 9:1의 부피비로 혼합한 혼합물 1 mL에 150 mg의 서열번호 12의 말미잘 실크 단백질을 첨가하여 혼합하고, 상온에서 3시간 동안 교반하였다. 23 gauge 바늘 주사기에 상기 혼합물을 넣고 3 kV/cm의 전기장 내에서 1 mL/hr의 속도로 사출하고, 방사된 나노섬유를 상온에서 3시간 동안 건조한 후 90% 에탄올 용액에 넣어 경화시켰다.

[71] 말미잘 실크 단백질을 포함하는 나노섬유의 표면에 10 mg/mL fp-151 단백질 포름산 용액 1 mL를 부어 fp-151 단백질을 6시간 동안 흡착시키고, 동결 건조하여 혼합 접착 단백질 및 말미잘 실크 단백질을 포함하는 나노섬유를 제조하였다.

[72]

[73] 비교예 4. 말미잘 실크 단백질을 포함하는 나노섬유 제조

[74] 실시예 3에 따른 방법으로 말미잘 실크 단백질을 포함하는 나노섬유를 제조하였다.

[75]

[76] 실험예 1. 하이드로젤 소재의 혈액 응고 효과

[77] 실시예 1에 따라 제조한 하이드로젤을 각 10 mg 크기로 캐스팅하여 동결 건조한 후 96-웰 플레이트에 넣고, 혈액 0.1 mL를 첨가하여 37 °C 인큐베이터에서 45분 동안 방치하였다. 대조군으로는 비교예 1, 2 및 바이오글루를 사용하였다.

[78] 각 샘플과 반응한 후의 잔류 혈액을 증류수에 200 배로 희석하고, 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 540 nm 파장의 흡광도를 측정하여, 각 샘플과 응고되지 않은 적혈구의 농도를 측정함으로써, 혈액 응고 효과를 확인하였다(도 4).

[79]

[80] 실험예 2. 하이드로젤 소재가 PF4 분비에 미치는 영향

[81] 실험예 1에 따라 반응시킨 혈액을 12,000 rpm에서 30분 동안 원심 분리하여 혈장을 분리하고 증류수로 200 배 희석한 후 이 샘플에 존재하는 PF4의 농도를 ELISA로 분석하였다. PF4 캡처 항체로 코팅하고 BSA로 블로킹한 96-웰 마이크로플레이트에 각 샘플을 100 µm씩 넣어 상온에서 2시간 동안 반응시키고, 각 웰을 300 µm 워시 버퍼로 3회 세척하였다. 이후 검출 항체 용액 100 µm를 넣어 상온에서 2시간 반응한 후 마찬가지로 각 웰을 세척하였다. 이후 100 µm 스트렙타비딘-HRP 용액을 넣고 암실에서 20분간 반응시키고, 각 웰을 세척하였다. 이후 100 µm 과산화수소수-테트라메틸벤지딘 용액을 넣어

암실에서 20분 반응한 후 50 μ m 1M 황산 용액으로 발색을 중지하여 마이크로플레이트 리더로 각 웰의 450 nm 흡광도를 측정해 PF4 분비량(ng/mL)을 확인하였다(도 5). 실시예 1에 따른 하이드로젤 소재를 사용하는 경우에는 혈소판이 활성화되어 응집이 일어났을 때 분비되는 PF4가 600ng/mL 이상 분비된 것을 확인하였다.

[82]

[83] 실험예 3. 하이드로젤 소재의 지혈 효과

[84] 마우스의 간에 22 gauge로 구멍을 내고, 300 mg/mL의 fp-151 단백질 포름산 용액 2 mL와 300 mg/mL 서열번호 12의 말미잘 실크 단백질 포름산 용액 1 mL를 상온에서 혼합하고 3시간 동안 교반하여 얻은 혼합물 0.2 mL를 직접 주사하고, 460 nm 파장으로 평가교하여 젤화시켰다. 출혈이 멎을 때까지의 출혈량을 계량하였다(도 6). 본 발명의 하이드로젤을 도입하는 경우 음성 대조군에 비해 출혈량이 약 60% 이상 감소한 것을 확인하였다.

[85]

[86] 실험예 4. 콜로이드 용액의 혈액 응고 효과

[87] 실시예 2에 따라 제조한 콜로이드 용액 10 μ L을 혈액 100 μ L에 첨가하고 0.2 M의 염화칼슘 10 μ L와 혼합시켜 37 °C에서 10분 동안 반응시켰다. 대조군으로는 전혈, 음성 대조군(생리 식염수) 및 비교예 3을 사용하였다. 도 7은 음성 대조군과 실시예 2 및 비교예 3에 따른 콜로이드 용액을 혈액에 처리하였을 때 혈소판 활성화(화살표)를 확인한 전자현미경 사진이다.

[88] 각 샘플에서 실험예 1과 같은 방법으로 전혈을 기준으로 상대적인 혈액응고능력을 확인하였다(도 8). 실시예 2에 따른 콜로이드 용액을 사용하는 경우 전혈에 비해 약 1.7배 이상의 혈액응고능력이 있음을 확인하였다.

[89]

[90] 실험예 5. 콜로이드 용액이 PF4 분비에 미치는 영향

[91] 실시예 2에 따라 제조한 콜로이드 용액 10 μ L을 혈액 100 μ L에 첨가하고 상온에서 45분 동안 혼합하였다. 대조군으로는 음성 대조군(생리 식염수), 양성 대조군(5 μ g/mL 콜라겐 용액) 및 비교예 3을 사용하였다.

[92] 각 샘플에서 반응한 혈액을 2,500 rpm에서 30분 동안 원심 분리하여 혈장을 분리하고 증류수로 200 배로 희석한 후 이 샘플에 존재하는 PF4의 농도를 ELISA로 분석하였다. PF4 캡처 항체로 코팅하고 BSA로 블로킹한 96-웰 마이크로플레이트에 각 샘플을 100 μ m 넣고 4 °C에서 하룻밤 동안 반응시킨 후, 각 웰을 300 μ m 워시 버퍼로 4회 세척하였다. 이후 100 μ m 검출 항체 용액을 첨가하고 상온에서 1시간 반응시킨 후 각 웰을 세척하였다. 이후 100 μ m 스트렙타비딘-HRP 용액을 넣어 암실에서 45분 반응한 후 각 웰을 세척하였다. 이후 100 μ m 과산화수소수-테트라메틸벤지딘 용액을 넣어 암실에서 30분 반응시킨 후 50 μ m 0.45 M 황산 용액으로 발색을 중지하여 마이크로플레이트 리더로 각 웰의 450 nm 흡광도를 측정하여, 전혈을 기준으로한 상대적인 PF4 분비량을

확인하였다(도 9). 이때, 실시예 2에 따른 콜로이드 용액을 사용하는 경우 약 3배 이상의 PF4가 분비되는 것을 확인하였다. 각 샘플에서 혈소판이 활성화되어 응집된 것(화살표)을 전자현미경으로 확인하였다(도 10).

[93]

[94] **실험예 6. 나노섬유의 혈액 응고 효과**

[95] 실시예 3에 따라 제조한 나노섬유를 5 mm 생검 편치로 잘라내어 옐로 마이크로파이펫 팁 상단에 끼워 고정하고, 그 위에 혈액 0.1 mL를 얹었다. 대조군으로는 비교예 4의 나노섬유를 사용하였다. 5분 후 홍합 접착 단백질 및 말미잘 실크 단백질을 포함하는 나노섬유의 경우 혈액이 응고되어 나노섬유를 통과하는 혈액이 관찰되지 않았으나, 말미잘 실크 단백질만을 포함하는 나노섬유의 경우에는 혈액이 응고되지 못하고 나노섬유를 통과하여 팁 아래쪽으로 이동하는 것을 확인하였다(도 11).

[96]

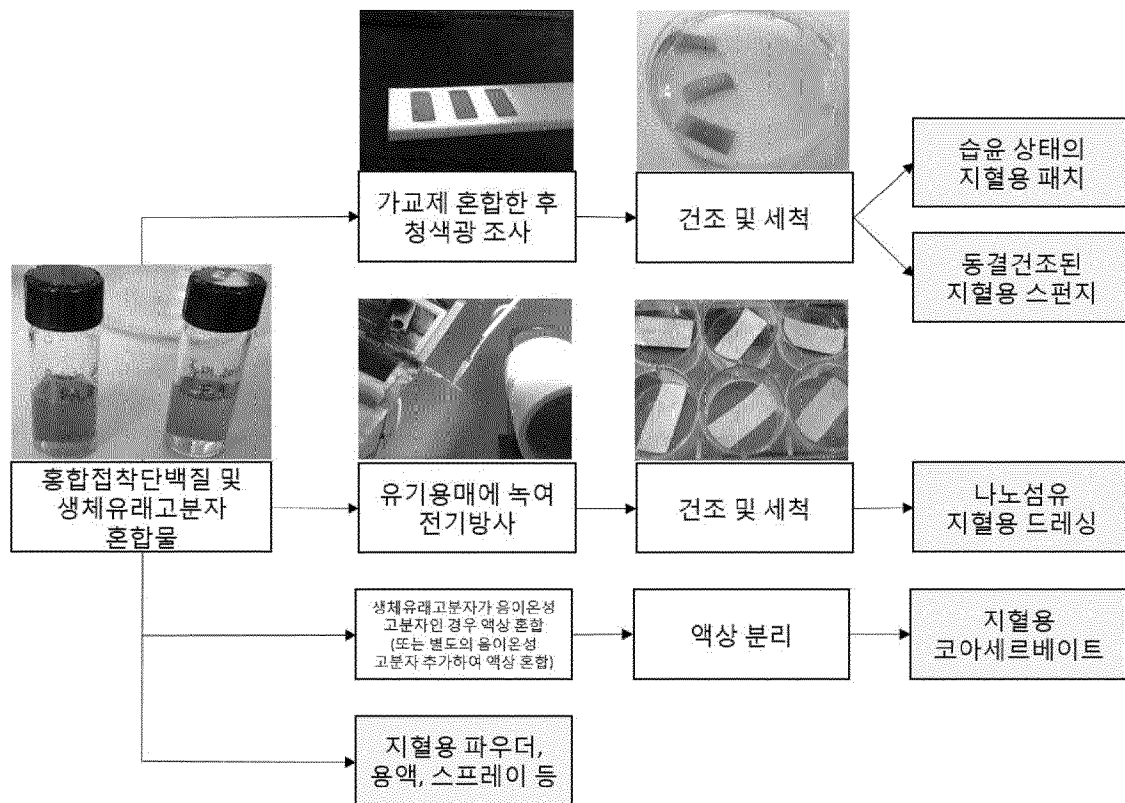
[97]

[98] 이상과 같이 실시예를 통하여 본 발명을 설명하였다. 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 상술한 실시예들은 모든 면에 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해되어야 한다. 본 발명의 범위는 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

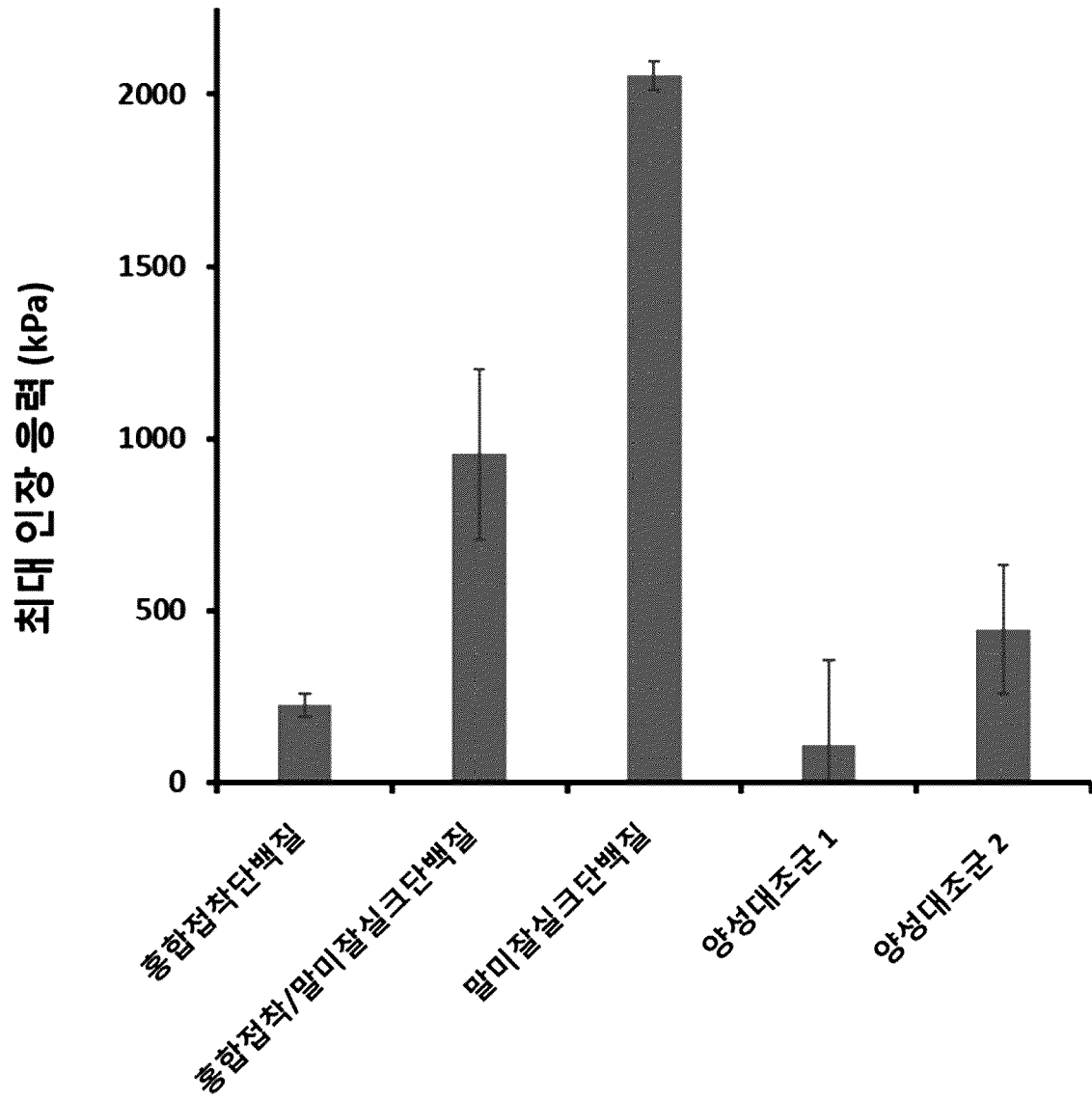
청구범위

- [청구항 1] 제1 성분으로서 홍합 접착 단백질; 및
제2 성분으로서 홍합 접착 단백질 이외의 생체 유래 고분자;
를 포함하는 지혈용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
홍합 접착 단백질은 Mefp-1, Mgfp-1, Mcfp-1, Mefp-2, Mefp-3, Mgfp-3 및
Mgfp-5로 이루어진 군에서 1종 이상 선택되는 것인, 지혈용 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
홍합 접착 단백질은 fp-1, fp-2, fp-3, fp-4, fp-5 및 fp-6로 이루어진 군에서
1종 이상 선택되는 것인, 지혈용 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
홍합 접착 단백질은 fp-151, fp-131, fp-353, fp-153 및 fp-351로 이루어진
군에서 1종 이상 선택되는 것인, 지혈용 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
홍합 접착 단백질 20 내지 80 중량%를 포함하는 지혈용 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 생체 유래 고분자는 말미잘 실크 단백질, 키토산, 히알루론산,
콜라젠, 젤라틴, 알부민, 알긴산, 셀룰로오스, 트롬빈 및 피브리노
이루어진 군에서 1종 이상 선택되는 것인, 지혈용 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
제1 성분 및 제2 성분을 2:8 내지 8:2의 중량비로 포함하는 지혈용 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
염화칼슘, 아데노신이인산, 비타민 K, 트롬보플라스틴, 포도당, 탈크,
탄산나트륨, 스테아린산마그네슘 및 폴리비닐알코올로 이루어진 군에서
1종 이상 선택되는 첨가제를 더 포함하는 지혈용 조성물.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
하이드로젤, 콜로이드 용액, 나노섬유, 용액, 분말 및 스프레이로
이루어진 군에서 선택되는 형태로 제공되는 지혈용 조성물.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 콜로이드 용액은 제1 성분 및 제2 성분으로 형성된
코아세르베이트를 포함하는 것인, 지혈용 조성물.
- [청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 코아세르베이트는 제1 성분 및 제2 성분을 1:0.25 내지 1:2.33의
중량비로 포함하는 것인, 지혈용 조성물.
- [청구항 12] 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 지혈용 조성물을 포함하는 지혈제.

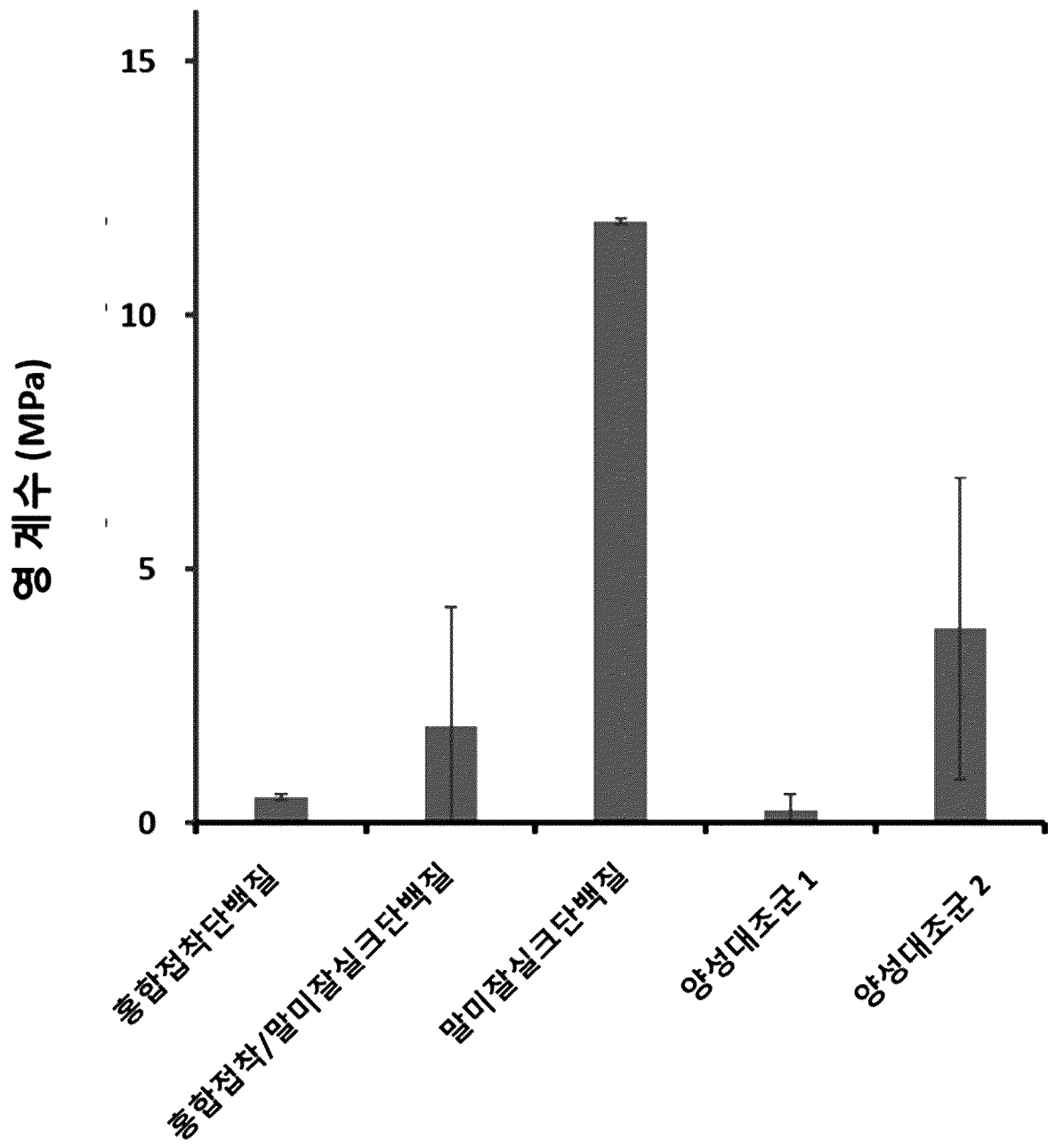
[도1]



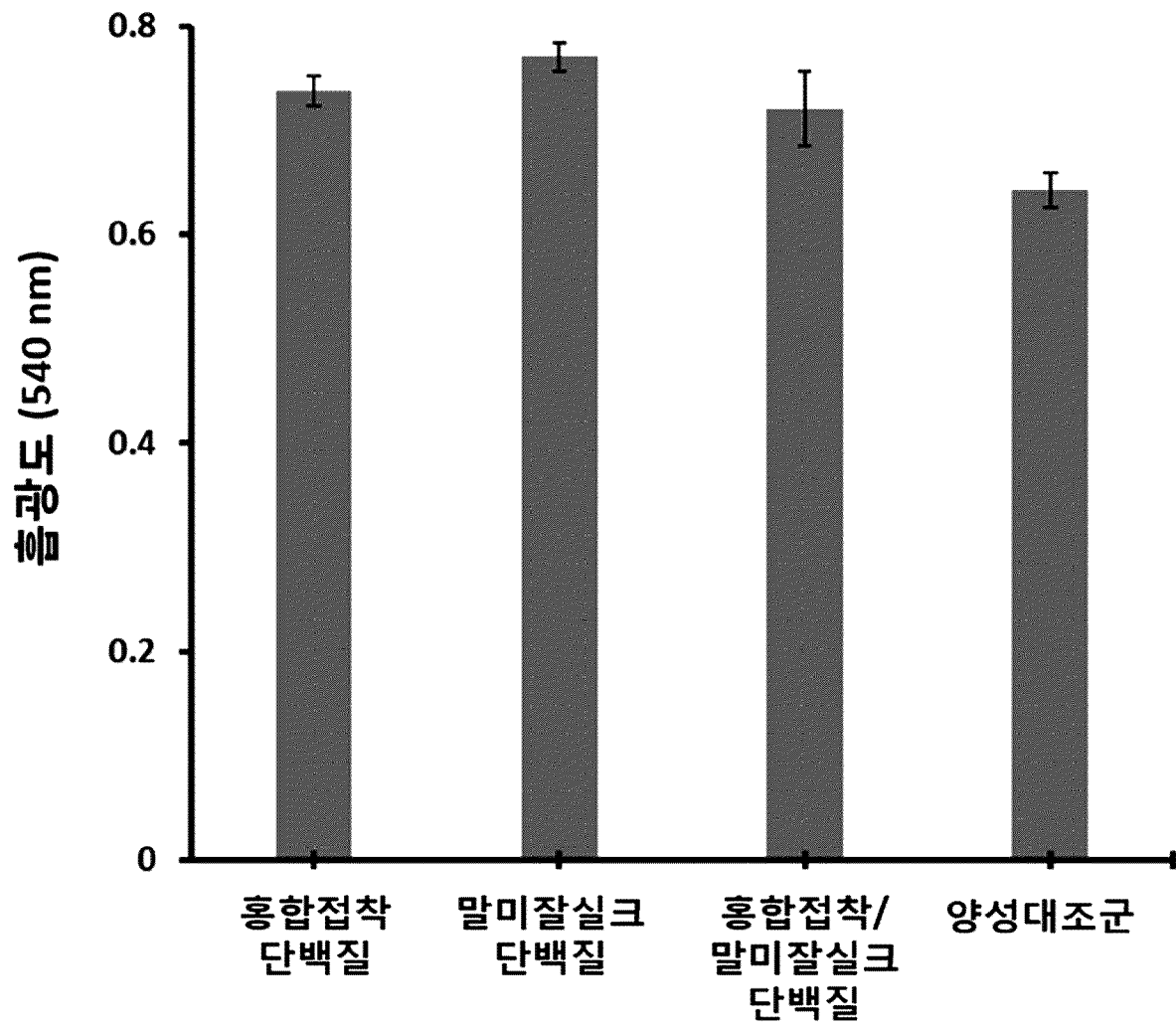
[도2]



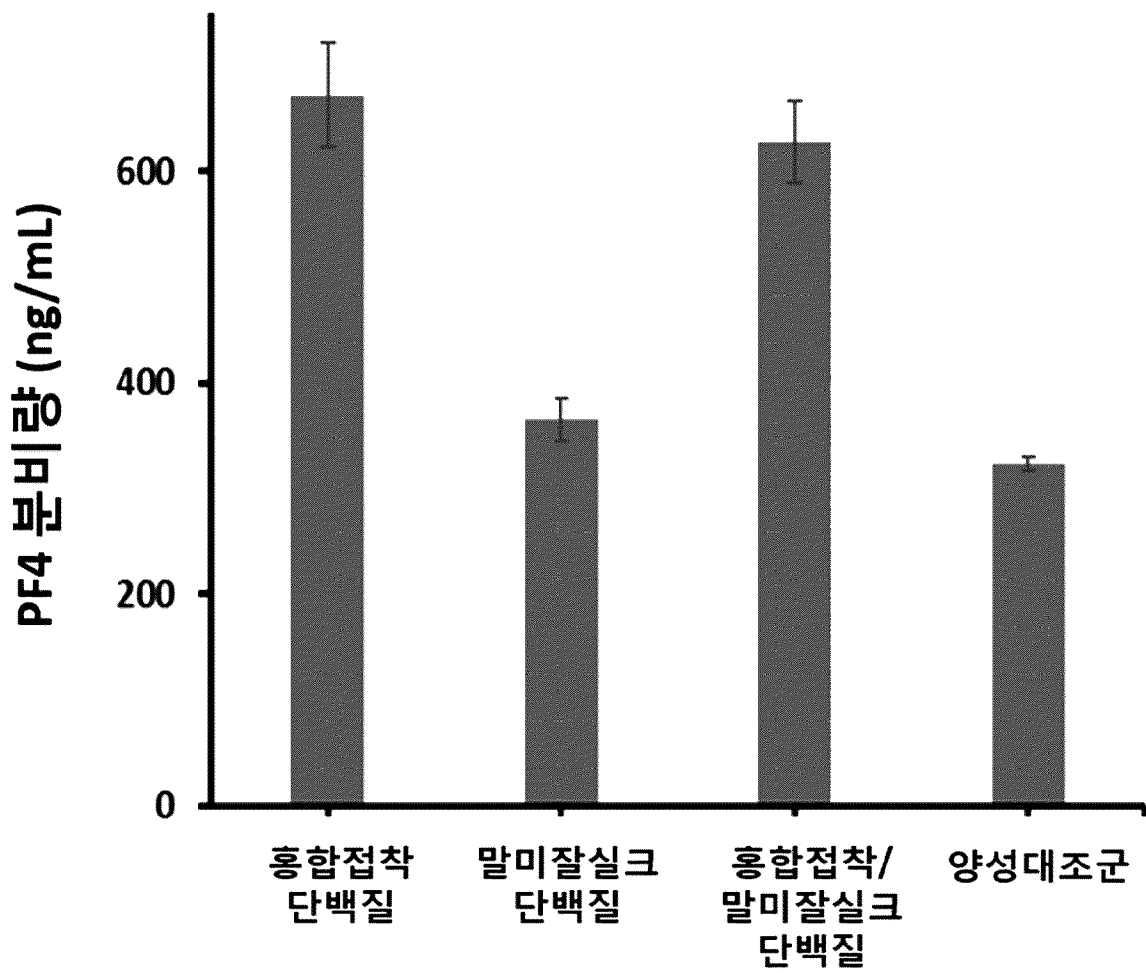
[도3]



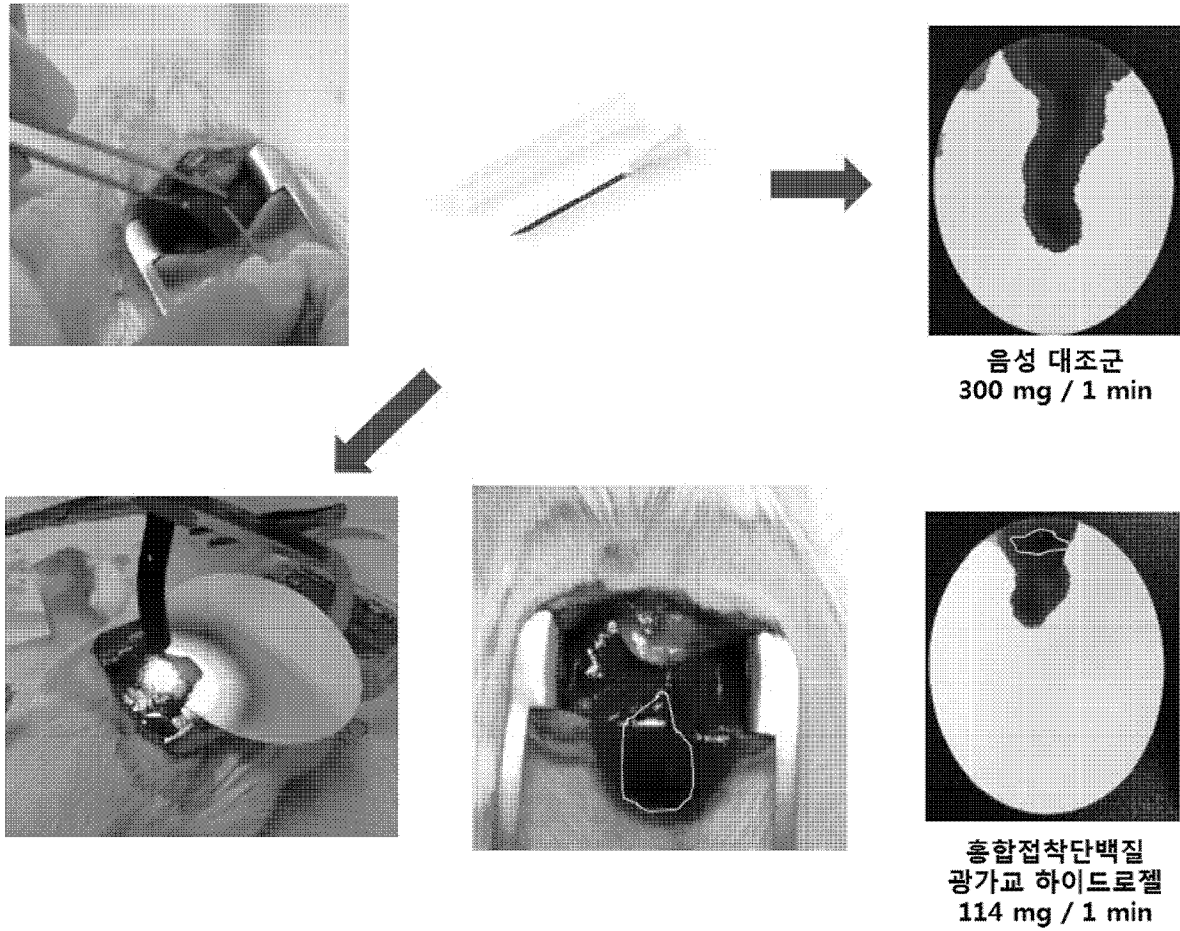
[도4]



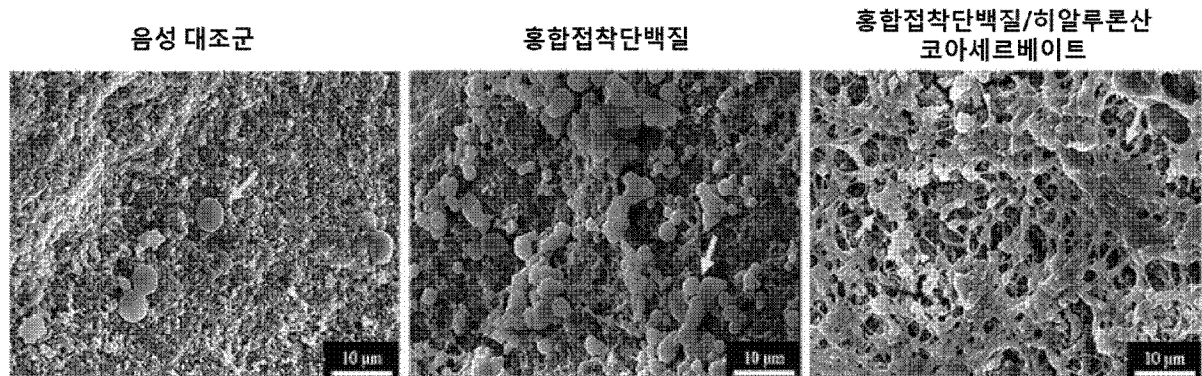
[도5]



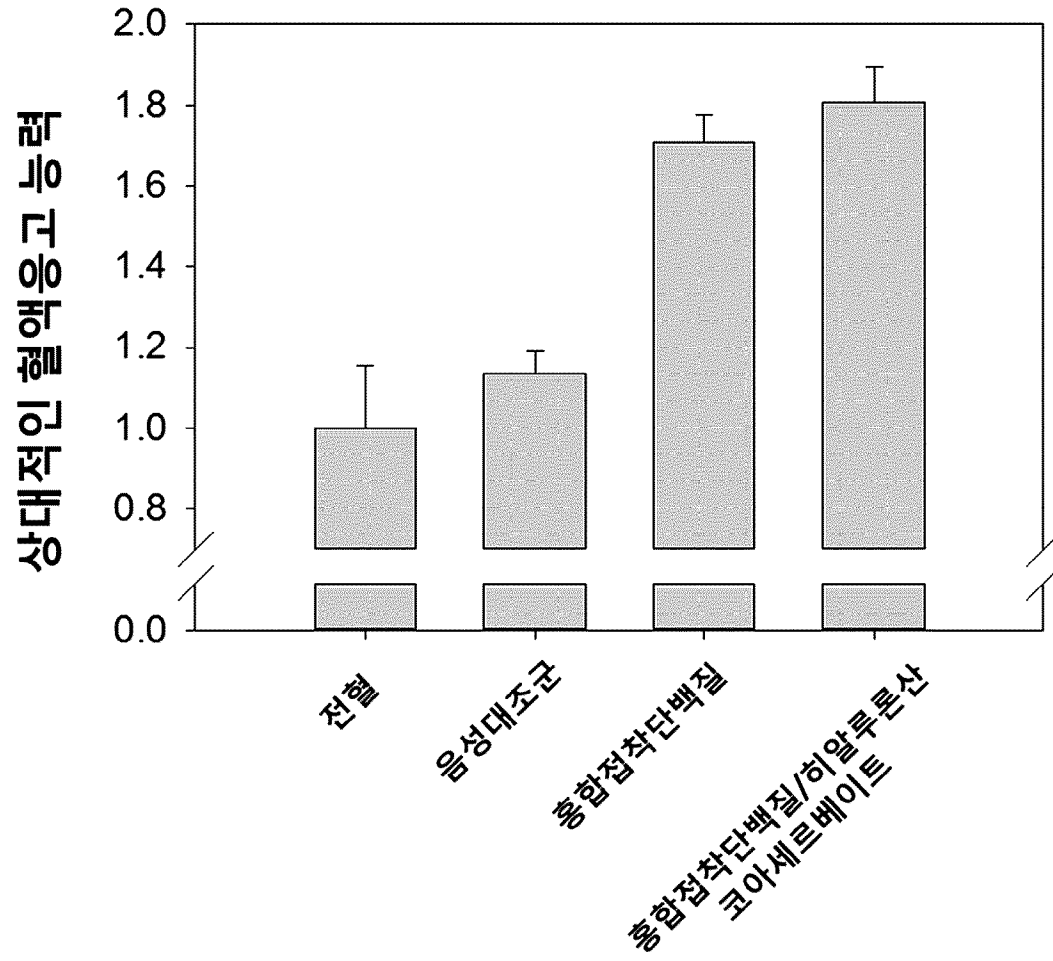
[도6]



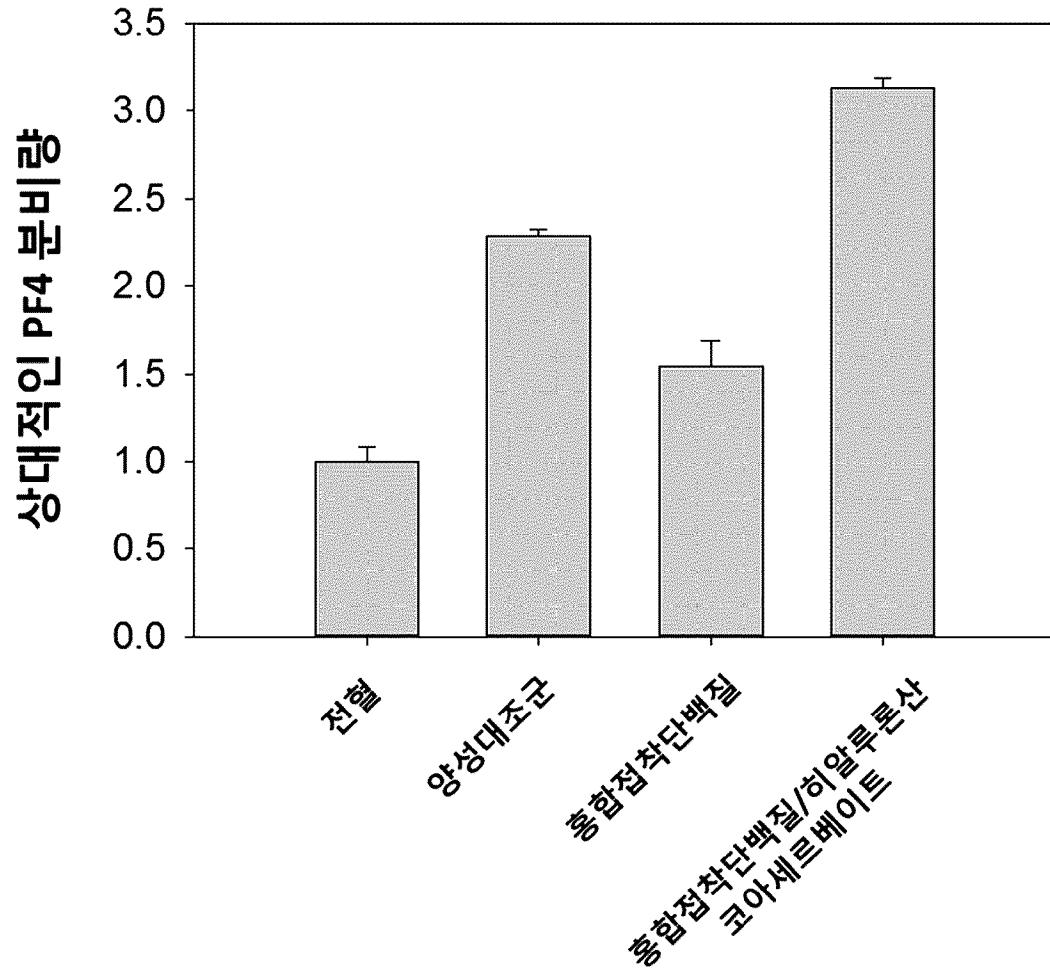
[도7]



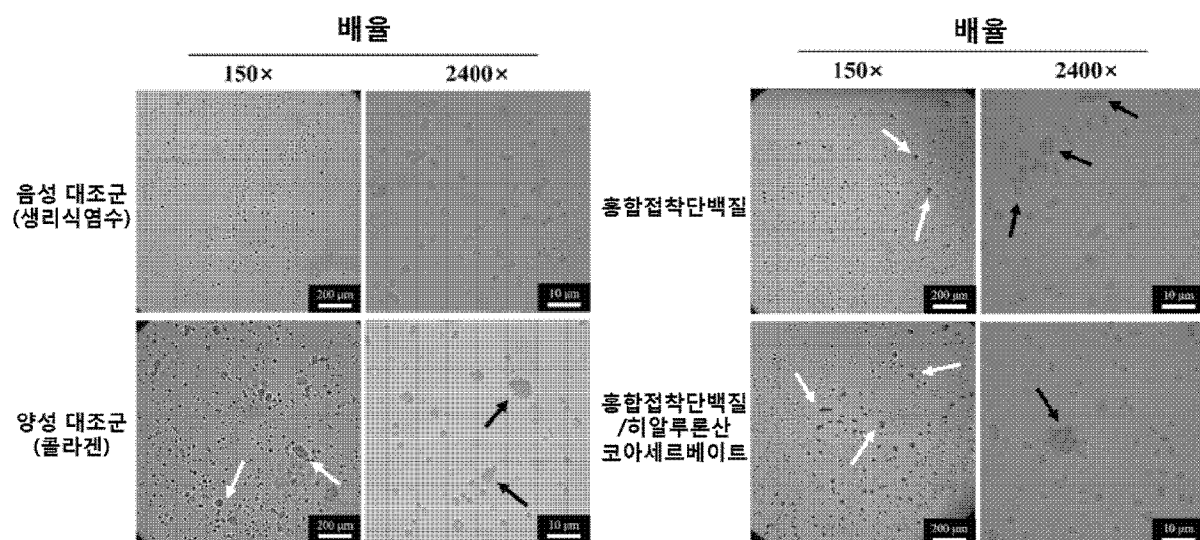
[도8]



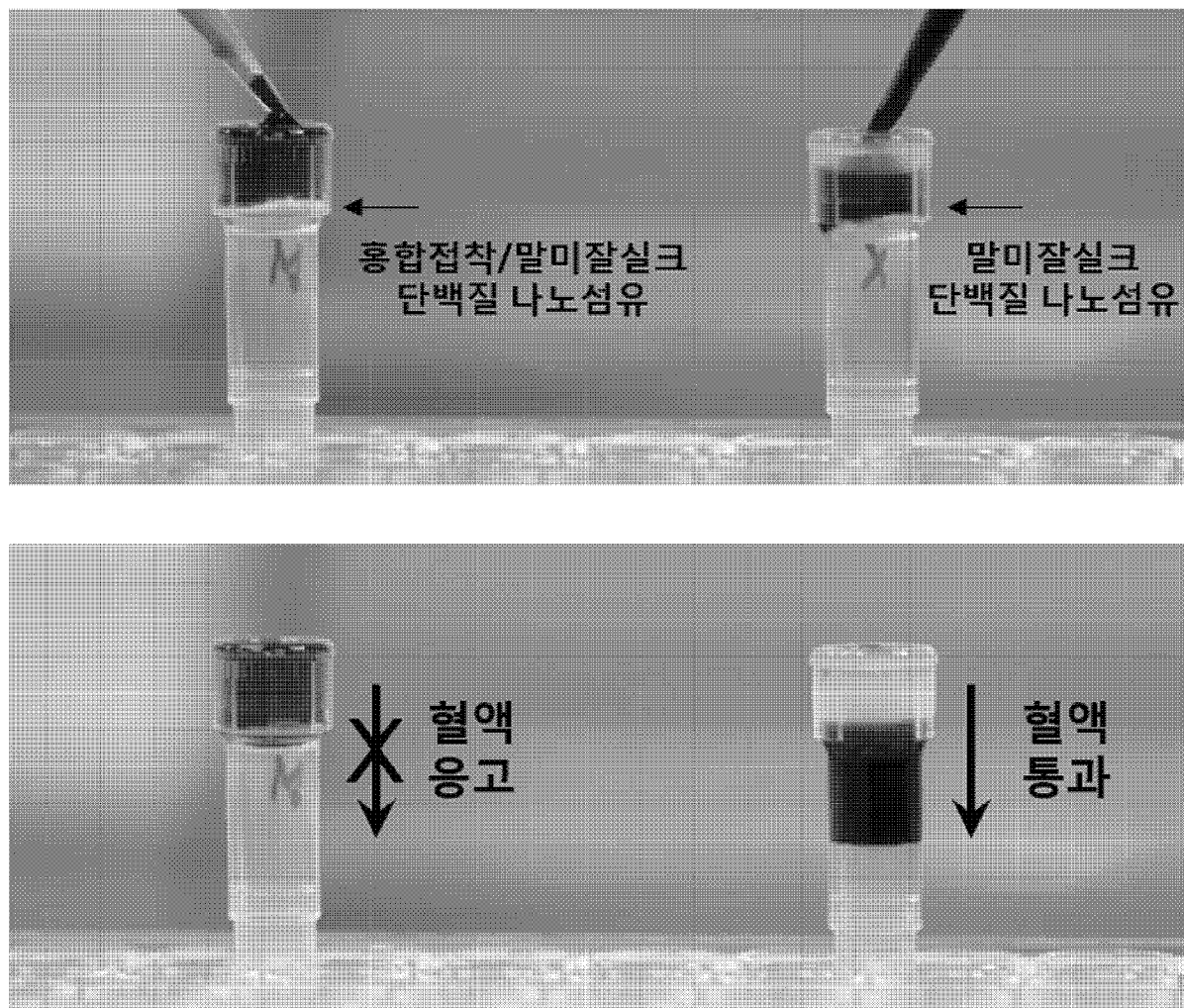
[도9]



[도10]



[도11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/012991

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/39(2006.01)i, A61K 38/17(2006.01)i, A61K 47/64(2017.01)i, A61K 47/69(2017.01)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 38/39; D04H 1/728; A61L 24/10; A61L 24/00; A61L 27/52; A61K 47/42; A61L 15/28; A61L 15/32; A61L 31/00; A61K 38/17; A61K 47/64; A61K 47/69

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: mussel adhesive protein, hemostasis, coacervate

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 105477674 A (BEIJING BOYI ELECTRONIC TECHNOLOGY CO., LTD. et al.) 13 April 2016 See abstract; claims 1-2, 5.	1-12
X	LIM, S. et al., "The Adhesive Properties of Coacervated Recombinant Hybrid Mussel Adhesive Proteins", Biomaterials, 2010, vol. 31, pages 3715-3722 See abstract; pages 3715-3716; figures 1-4.	1-12
X	MARTINEZ RODRIGUEZ, N. R. et al., "Mussel Adhesive Protein Provides Cohesive Matrix for Collagen Type-1 α ", Biomaterials, 2015, vol. 51, pages 51 -57 See abstract; figures 1-7.	1-12
Y	KR 10-2016-0026441 A (POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION) 09 March 2016 See claims 1, 17-18; paragraphs [0016], [0030]-[0033].	1-12
Y	KR 10-1442479 B1 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY et al.) 24 September 2014 See abstract; claims 1, 6.	1-12
A	KR 10-2014-0035251 A (POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION) 21 March 2014 See the entire document.	1-12
A	JP 2013-500072 A (UNIV. OF UTAH RESEARCH FOUNDATION) 07 January 2013 See the entire document.	1-12



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 FEBRUARY 2018 (08.02.2018)

Date of mailing of the international search report

08 FEBRUARY 2018 (08.02.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
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/KR2017/012991

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
CN 105477674 A	13/04/2016	NONE	
KR 10-2016-0026441 A	09/03/2016	KR 10-1631704 B1	17/06/2016
KR 10-1442479 B1	24/09/2014	NONE	
KR 10-2014-0035251 A	21/03/2014	KR 10-1492169 B1	10/02/2015
JP 2013-500072 A	07/01/2013	AU 2008-348311 A1	30/07/2009
		AU 2008-348311 B2	26/06/2014
		AU 2010-275504 A1	27/01/2011
		AU 2014-203210 A1	03/07/2014
		CA 2712843 A1	30/07/2009
		CA 2768501 A1	27/01/2011
		CN 101978040 A	16/02/2011
		CN 102548581 A	04/07/2012
		EP 2250248 A1	17/11/2010
		EP 2250248 B1	20/03/2013
		EP 2456466 A1	30/05/2012
		EP 2599508 A1	05/06/2013
		EP 2599508 B1	25/05/2016
		JP 2011-510152 A	31/03/2011
		JP 2014-177636 A	25/09/2014
		JP 5530934 B2	25/06/2014
		JP 5928825 B2	01/06/2016
		KR 10-1540752 B1	31/07/2015
		KR 10-2011-0005235 A	17/01/2011
		RU 2010-135333 A	27/02/2012
		RU 2530653 C2	10/10/2014
		US 2010-0120923 A1	13/05/2010
		US 2010-0305626 A1	02/12/2010
		US 2013-0189313 A1	25/07/2013
		US 8283384 B2	09/10/2012
		US 9272069 B2	01/03/2016
		WO 2009-094060 A1	30/07/2009
		WO 2011-011658 A1	27/01/2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 38/39(2006.01)i, A61K 38/17(2006.01)i, A61K 47/64(2017.01)i, A61K 47/69(2017.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 38/39; D04H 1/728; A61L 24/10; A61L 24/00; A61L 27/52; A61K 47/42; A61L 15/28; A61L 15/32; A61L 31/00; A61K 38/17; A61K 47/64; A61K 47/69

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: 융합 접착 단백질, 지혈, 코아세르베이트

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	CN 105477674 A (BEIJING BOYI ELECTRONIC TECHNOLOGY CO., LTD. 등) 2016.04.13 요약; 청구항 1-2, 5 참조.	1-12
X	LIM, S. 등, "The adhesive properties of coacervated recombinant hybrid mussel adhesive proteins", Biomaterials, 2010, 31권, 페이지 3715-3722 초록; 페이지 3715-3716; 도면 1-4 참조.	1-12
X	MARTINEZ RODRIGUEZ, N. R. 등, "Mussel adhesive protein provides cohesive matrix for collagen type-1a", Biomaterials, 2015, 51권, 페이지 51-57 초록; 도면 1-7 참조.	1-12
Y	KR 10-2016-0026441 A (포항공과대학교 산학협력단) 2016.03.09 청구항 1, 17-18; 단락 [0016], [0030]-[0033] 참조.	1-12
Y	KR 10-1442479 B1 (연세대학교 산학협력단 등) 2014.09.24 요약; 청구항 1, 6 참조.	1-12
A	KR 10-2014-0035251 A (포항공과대학교 산학협력단) 2014.03.21 전체 문헌 참조.	1-12
A	JP 2013-500072 A (UNIV OF UTAH RESEARCH FOUNDATION) 2013.01.07 전체 문헌 참조.	1-12

☐ 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

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2018년 02월 08일 (08.02.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 02월 08일 (08.02.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

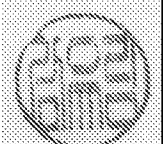
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

감유림

전화번호 +82-42-481-3516



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
CN 105477674 A	2016/04/13	없음	
KR 10-2016-0026441 A	2016/03/09	KR 10-1631704 B1	2016/06/17
KR 10-1442479 B1	2014/09/24	없음	
KR 10-2014-0035251 A	2014/03/21	KR 10-1492169 B1	2015/02/10
JP 2013-500072 A	2013/01/07	AU 2008-348311 A1	2009/07/30
		AU 2008-348311 B2	2014/06/26
		AU 2010-275504 A1	2011/01/27
		AU 2014-203210 A1	2014/07/03
		CA 2712843 A1	2009/07/30
		CA 2768501 A1	2011/01/27
		CN 101978040 A	2011/02/16
		CN 102548581 A	2012/07/04
		EP 2250248 A1	2010/11/17
		EP 2250248 B1	2013/03/20
		EP 2456466 A1	2012/05/30
		EP 2599508 A1	2013/06/05
		EP 2599508 B1	2016/05/25
		JP 2011-510152 A	2011/03/31
		JP 2014-177636 A	2014/09/25
		JP 5530934 B2	2014/06/25
		JP 5928825 B2	2016/06/01
		KR 10-1540752 B1	2015/07/31
		KR 10-2011-0005235 A	2011/01/17
		RU 2010-135333 A	2012/02/27
		RU 2530653 C2	2014/10/10
		US 2010-0120923 A1	2010/05/13
		US 2010-0305626 A1	2010/12/02
		US 2013-0189313 A1	2013/07/25
		US 8283384 B2	2012/10/09
		US 9272069 B2	2016/03/01
		WO 2009-094060 A1	2009/07/30
		WO 2011-011658 A1	2011/01/27