

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018년 2월 15일 (15.02.2018) **WIPO | PCT**

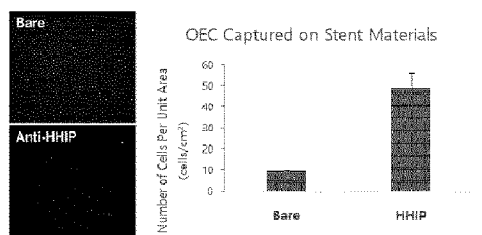


(10) 국제공개번호
WO 2018/030871 A1

- (51) 국제특허분류:
A61L 31/08 (2006.01) *A61L 31/12* (2006.01)
A61L 31/16 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/008810
- (22) 국제출원일: 2017년 8월 11일 (11.08.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어 공개:
- (30) 우선권정보:
10-2016-0102957 2016년 8월 12일 (12.08.2016) KR
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))
- (71) 출원인: 서울대학교 산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826
서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 조제열 (CHO, Je-Yoel); 06280 서울시 강남구 삼성로51길 37, 106동 805호, Seoul (KR). 이봄내린 (LEE, Bom Nae Rin); 12275 경기도 남양주시 와부읍 덕소로 270, 108동 203호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 다래 (DARAE IP FIRM); 06235 서울시 강남구 테헤란로 132, 10층 (역삼동, 한독타워), 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,

(54) Title: HIP STENT COATING COMPOSITION FOR CAPTURING AND PROLIFERATING LATE ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS, AND STENT USING SAME

(54) 발명의 명칭: 후기내피전구세포의 포획 및 증식을 위한 HIP 스텐트 코팅 조성물 및 이를 이용한 스텐트



(57) Abstract: The present invention relates to a medical instrument coating composition for inducing the capture and proliferation of late endothelial progenitor cells and to a medical instrument using same, the medical instrument coating composition being characterized in that the coating composition comprises a treatment-effective amount of one or more kinds of antibodies, or fragments thereof, reacting with HIP. The coating composition is capable of preventing the restenosis of and promoting the reendothelialization of blood vessels.

(57) 요약서: 본 발명은 후기내피전구세포의 포획 및 증식을 유도하는 의료기구 코팅 조성물에 있어서, 상기 코팅 조성물은 HIP와 반응하는 치료에 유효한 양의 일종 이상의 항체 또는 이의 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 의료기구 코팅조성물 및 이를 이용한 의료기구에 대한 것이며, 상기 코팅조성물을 통해 혈관의 재협착을 방지하고, 혈관의 재내피화를 촉진할 수 있다.

WO 2018/030871 A1

명세서

발명의 명칭: 후기내피전구세포의 포획 및 증식을 위한 HIP 스텐트 코팅 조성물 및 이를 이용한 스텐트

기술분야

- [1] 본 발명은 후기내피전구세포(late endothelial progenitor cell, late EPC)의 포획 및 증식을 위한 스텐트 코팅 조성물 및 이를 이용한 스텐트에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 관상동맥질환은 심장 근육에 혈액을 공급하는 관상동맥이 동맥경화와 혈전에 의해 좁아져 심장근육에 충분한 혈액공급이 이루어지지 못하는 경우를 말한다. 관상동맥질환의 종류에는 대표적으로 협심증과 심근경색이 있다. 이를 치료하기 위한 치료법은 약물치료, 관상동맥 풍선확장술 또는 관상동맥 스텐트 삽입술이 있다.
- [3] 그러나 스텐트 삽입의 부작용중 하나는 스텐트내에 신생내막과증식이 발생하여 혈관의 재협착이 여전히 발생한다는 것이다. 스텐트 삽입중에 필연적으로 발생하는 관상동맥 내피에 손상이 발생하고, 이때 신생내막 증식이 발생하게 되어 스텐트 재협착과 스텐트 혈전증이 발병하게 되는 것이다. 이를 방지하기 위해, 약물방출 스텐트가 개발되었으나, 약물방출 스텐트 표면에 입혀진 항증식 물질로 인하여 스텐트가 혈관내피세포로 잘 덮여지지 않는 문제가 발생하였다. 결국 스텐트 삽입후 스텐트 표면의 재내피화(re-endothelialization)를 촉진시킬 수 있는 방법이 혈관의 재협착을 막는 중요한 대안으로 연구되었다.
- [4] 한편 내피전구세포(Endothelial progenitor cell, EPC)는 내피손상 복구에 중요한 역할을 수행하는 것으로 발견되었으며, 말초혈액으로부터 CD34+ 세포를 분리하면서 발표하였다. 최초 발표 이후, 수많은 연구자들이 말초혈액, 골수, 태아의 간, 제대로부터 EPC를 분리하였다. 이전 연구에서 CD34, CD133, KDR/FLK-1/VEGFR2, VE-cadherin/CD144, Tie-2 또는 이들의 조합과 같은 세포 표면 단백질이 사용되었다.
- [5] 이 중에서 CD34 항체를 코팅한 스텐트로 재내피화를 촉진시키는 기술이 개발되었으나, 골수조혈모세포의 표면에서 공통적으로 발현되기 때문에 CD34 항체 코팅 스텐트는 혈중 EPC를 선택적으로 붙잡기 어려운 문제가 발생하였고, 결과적으로 재협착을 효과적으로 개선하기 위해서는 다른 방법이 요구되는 실정이었다.
- [6] 이러한 문제들을 개선하고자, 계속된 연구끝에 EPC의 하위개념으로서, 후기내피전구세포(outgrowth endothelial cells (OECs) , circulating or late EPCs, endothelial colony-forming cells (ECFCs))가 확인되었다. 후기내피전구세포는 증식 및 혈관생성 (angiogenesis) 촉진에 대한 상당한 잠재력을 보여준다. EPC의

또 다른 하위개념이며, 단핵세포의 배양중 초기에 발생하며 이질성(heterogenous) 비-증식성을 보이는 초기내피전구세포(early EPC)와는 달리, 후기내피전구세포는 단핵세포의 최초배양으로부터 14일 경과후 발생하고, 동질성(homogenous)을 보인다. 게다가 후기내피전구세포는 전기내피전구세포보다 더 큰 이동 잠재력 및 모세혈관 튜브-생성능을 갖는다. 이러한 이유 때문에, 후기내피전구세포는 심혈관재생분야에서 신혈관형성 치료법을 위한 새로운 패러다임을 이끌고 있다.

- [7] 그러나, 후기내피전구세포에 대한 수많은 연구에도 불구하고, 후기내피전구세포를 이용한 세포치료제는 많은 어려움을 겪고 있다. 명확한 후기내피전구세포의 명확한 마커가 존재하지 않기 때문이다. 많은 연구자들이 치료제 개발 성공은 타겟 세포의 분리 및 평가에 달려있다고 지적한다. 아직까지 소수의 단백질이 후기내피전구세포의 분리 및 평가를 위해 사용되고 있다. 예를 들면, Flk-1, VE-cadherin, PECAM-1 및 CD34가 후기내피전구세포의 마커로서 사용되고 있다. 그러나 이것중 어느 무엇도 후기내피전구세포의 마커로서 유용성을 입증하지 못하고 있다. 그러므로, 후기내피전구세포의 분리를 위해, 특이적인 표면 마커를 확인하는 것이 중요하다. 본 발명자들은 질량분석기반의 프로테오믹스 분석을 통해 후기내피전구세포의 고유한 표면마커로서 Hedgehog-Interacting Protein (HIP)를 확인하였고, HIP은 미성숙한 단핵구세포에서 발현되지 않으며 또한 조기내피전구세포에서도 발현하지 않지만 후기내피전구세포에서만 특이적으로 발현함을 확인하였다. 또한 HIP에 대한 항체를 이용하여 스텐트등의 의료기구에 상기 항체를 부착하여 후기내피전구세포의 포획 및 증식을 유발하고, 결과적으로 혈관의 재협착을 방지하고, 산화적 스트레스에 저항하는 세포 생존율이 높아지며, 신생혈관재생능력이 우수해져, 재내피화를 촉진할 수 있을 것으로 판단된다.

[8] [선행기술문헌]

[9] [특허문헌]

[10] (특허문헌 1) KR2006-0091028 A

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 본 발명의 목적은 후기내피전구세포의 포획 및 증식을 유도하는 의료기기 코팅 조성물에 있어서, 상기 코팅 조성물은 HIP와 반응하는 치료에 유효한 양의 일종 이상의 항체 또는 이의 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 의료기기 코팅조성물을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 의료 기구의 표면상에 후기내피전구세포의 포획 및 증식을 유도하는 코팅을 포함하는 의료기구에 있어서, 상기 코팅은 HIP와 반응하는 치료에 유효한 양의 일종 이상의 항체 또는 이의 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 코팅된 의료기구를 제공하는 것이다.

- [13] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 의료기구 표면상에 합성 또는 천연 물질을 포함하는 한층 이상의 매트릭스로 이루어진 매트릭스 코팅층을 형성하는 단계; 및 (b) HIP와 반응하는 치료에 유효한 양의 일종 이상의 항체 또는 이의 단편을 상기 매트릭스층에 첨가하는 단계를 포함하는 의료기구의 표면상에 후기내피전구세포의 포획 및 증식을 유도하는 코팅층이 형성된 의료 기구의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 또 다른 목적은 a) 의료기구 표면상에 아민기를 유도하는 단계; (b) HIP 항체의 카르복시기를 활성화하는 단계 및 (c) 아민기가 유도된 의료기구 표면에 카르복시기가 활성화된 HIP 항체를 가하여, 의료기구 표면에 HIP 항체를 결합시키는 단계를 포함하는 의료기구의 표면상에 후기내피전구세포의 포획 및 증식을 유도하는 코팅층이 형성된 의료 기구의 제조방법.

과제 해결 수단

- [15] 상기 목적을 달성하기 위해, 후기내피전구세포의 포획 및 증식을 유도하는 의료기구 코팅 조성물에 있어서,
- [16] 상기 코팅 조성물은 HIP와 반응하는 치료에 유효한 양의 일종 이상의 항체 또는 이의 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 의료기구 코팅조성물을 제공한다.
- [17] 상기 항체는 모노클로날 항체일 수 있다.
- [18] 상기 모노클로날 항체는 Fab 또는 F(ab')₂ 단편을 포함할 수 있다.
- [19] 상기 의료기구는 스텐트일 수 있다.
- [20] 또한, 의료 기구의 표면상에 후기내피전구세포의 포획 및 증식을 유도하는 코팅을 포함하는 의료기구에 있어서,
- [21] 상기 코팅은 HIP와 반응하는 치료에 유효한 양의 일종 이상의 항체 또는 이의 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 코팅된 의료기구를 제공한다.
- [22] 상기 코팅은 의료 기구의 표면을 코팅하는 매트릭스층을 더 포함할 수 있다.
- [23] 상기 매트릭스층은 상기 항체와 결합할 수 있다.
- [24] 상기 항체는 모노클로날 항체일 수 있다.
- [25] 상기 모노클로날 항체는 Fab 또는 F(ab')₂ 단편을 포함할 수 있다.
- [26] 상기 매트릭스층은 폴리우레탄, 단편화된 폴리우레탄-우레아/헤파린, 폴리-L-락트산, 폴리-D,L-락티드, 셀룰로오스 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜, 콜라겐, 라미닌, 헤파린, 피브린, 엘라스틴, 셀룰로오스 및 탄소로 이루어진 그룹에서 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [27] 상기 의료기구는 스텐트일 수 있다.
- [28] 또한, (a) 의료 기구를 합성 또는 천연 물질을 포함하여 이루어지는 한층 이상의 매트릭스로 매트릭스 코팅층을 형성하는 단계; 및 (b) HIP와 반응하는 치료에 유효한 양의 일종 이상의 항체 또는 이의 단편을 상기 매트릭스층에 첨가하는 단계를 포함하는 의료 기구의 표면상에 후기내피전구세포의 포획 및 증식을

유도하는 코팅층이 형성된 의료 기구의 제조방법을 제공한다.

- [29] 또한, (a) 의료기구 표면에 아민기를 유도하는 단계; (b) HIP 항체의 카르복시기를 활성화하는 단계 및 (c) 아민기가 유도된 의료기구 표면에 카르복시기가 활성화된 HIP 항체를 가하여, 의료기구 표면에 HIP 항체를 결합시키는 단계를 포함하는 의료기구의 표면에 후기내피전구세포의 포획 및 증식을 유도하는 코팅층이 형성된 의료 기구의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [30] 후기내피전구세포의 신규한 마커인 HIP에 대한 항체를 의료기구 및 스텐트에 부착하여, 혈액내의 HIP 양성 후기내피전구세포를 포획하고, 포획된 후기내피전구세포의 증식을 촉진하여, 혈관재협착을 방지하고 혈관의 재내피화를 촉진할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [31] 도1은 후기내피전구세포에 특이적인 마커 후보군을 선별하기 위한 모식도이다.
- [32] 도2는 후기내피전구세포에 특이적인 마커를 도출하기 것으로, 도2a는 RNA 시퀀싱 결과이며, 도2b는 프로테오믹스 분석 결과이며, 도2c는 RNA 시퀀싱과 프로테오믹스 분석에 의한 도출된 마커분석 결과이다.
- [33] 도3은 후기내피전구세포에서 강하게 발현되는 HIP에 대한 것으로, 도2a는 HIP mRNA 발현수준을 하우스 키핑 마커와 비교한 결과이며, 도2b는 항-인간 HIP 항체를 이용한 웨스턴 블롯 결과이다.
- [34] 도4은 HIP 녹다운(knock down)에 의한 후기내피전구세포의 증식 여부에 대한 실험으로써, 도 4a는 scramble shRNA 또는 HIP shRNA로 형질전환된 후기내피전구세포의 HIP mRNA 발현수준에 대한 정량 RT-PCR 분석 결과이며, 도4b는 HIP 단백질 발현에 대한 혈관생성능 웨스턴 블롯 결과이며, 도4c는 후기내피전구세포에서 scramble 및 HIP shRNA에 대한 튜브생성능(튜브생성갯수) 비교결과이다. 도4d 및 도4e는 scramble shRNA(도4d) 또는 HIP shRNA(도4e)로 형질전환된 후기내피전구세포에서의 혈관지속능을 관찰한 결과이며, 도4f는 마우스의 대동맥에 HIP 녹다운을 시킨 후 대동맥 형성능을 비교관찰한 결과이다. 도4g 및 도4h는 혈관의 갯수 및 튜브의 가지생성능을 비교한 결과이다.
- [35] 도5는 녹다운후 산화적 스트레스를 주었을 때 후기내피전구세포의 생존력 분석결과로서, 도5a는 scramble shRNA 또는 HIP shRNA로 형질전환된 후기내피전구세포의 생존력을 DAPI(핵염색)을 통해 본 결과이며, 도5b 및 도5c는 세포증식 카운트 분석결과 및 MTT 어세이 결과이며, 도 5d는 caspase3의 활성화로 세포사멸로 가는 후기내피전구세포를 측정된 웨스턴 블롯 결과이다.
- [36] 도6은 항-HIP 항체가 고정된 시편에 의한 EPC 포획정도를 나타낸 결과이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [37] Hedgehog-Interacting protein (HIP)(서열번호 1참조)은 hedgehog gene family의 산물에 결합하는 단백질을 의미하며, Hedgehog signaling pathway의 조절요소에 해당한다. hedgehog gene family는 진화론적으로 보존된 단백질이며, 관절의 전후방향 패턴 및 좌우 대칭의 조절을 포함하는 배아 발생에 있어서의 기초적인 프로세스와 연관되어 있다. Hedgehog signaling pathway는 적절한 발생에 요구되는 배아세포에 정보를 전달하는 신호전달기작이다. 배아의 서로 다른 부분은 상이한 농도의 Hedgehog 신호전달 단백질을 갖는다.
- [38] 그러나 HIP에 대한 많은 연구에도 불구하고, 후기내피전구세포에서의 발현 및 역할에 대해서는 연구된 바 없다. 본 발명에서는 후기내피전구세포의 HIP의 생물학적 역할을 발견하였으며, HIP이 후기내피전구세포의 고유한 세포 표면 마커로서 후기내피전구세포의 증식, 혈관생성을 조절할 수 있음을 발견하였다.
- [39] '의료기구'는 의학적 상태의 예방 또는 치료를 위하여 포유류에 일시적 또는 영구적으로 도입되는 기구를 의미한다. 이러한 기구에는, 피하, 경피 또는 수술로 도입되어 장기, 조직 또는 관강에 남겨지는 모든 것이 포함된다. 의료기구에는, 스텐트, 폴리테트라플루오로에틸렌(PTFE) 또는 팽창된 폴리테트라플루오로에틸렌(ePTFE)으로 도포된 스텐트와 같은 도포 스텐트, 합성 이식편, 인공 심장 밸브, 인공 심장 및 인공삽입 장기를 혈관 순환에 연결하는 고정장치, 정맥 밸브, 복강 대동맥 동맥류(abdominal aortic aneurysm)(AAA) 이식편, 하방 정맥 대정맥 필터(inferior venal caval filters), 영구 약물 주입 카테터, 색전 코일, 혈관 전색에 사용되는 색전 물질 및 혈관 봉합선이 포함될 수 있다.
- [40] 본 발명의 조성물 및 방법으로 의료 기구를 코팅하면, 의료 기구 표면에 내피 세포층의 생성이 자극되어, 재발협착증 및 의료 기구 이식에 따른 다른 혈전색전증 합병증을 막을 수 있다.
- [41] '스텐트'라는 용어는, 혈관 관강 내에 삽입되는 경우에 혈관의 단면 관강을 팽창시키는 모든 의료 기구를 의미한다.
- [42] HIP 항체를 포함하는 의료기구 코팅조성물은 의료기구의 표면에 HIP 항체를 코팅하기 위한 조성물로서, 매트릭스층을 추가로 포함할 수 있다.
- [43] 의료 기구를 코팅하는 '매트릭스'는 폴리우레탄, 단편화된 폴리우레탄-우레아/헤파린, 폴리-L-락트산, 폴리-D,L-락티드, 셀룰로오스 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜, 콜라겐, 라미닌, 헤파린, 피브린, 엘라스틴, 셀룰로오스 및 탄소등 합성 또는 자연물질로 구성될 수 있다. 매트릭스는 합성 또는 천연 물질로 구성되는 제 1층과 항체로 구성되는 제 2층을 갖는 수개의 층을 포함하여 이루어질 수 있다. 이 층들은, 제 1층이 스텐트 또는 합성 이식편 표면과 직접 접촉하고, 제 2층의 한쪽 표면이 제 1층과 접촉하며, 반대쪽 표면이 혈관 관강과 접촉하면서, 순차적으로 정렬될 수 있다. 매트릭스는 의료 기구에 비공유 또는 공유결합으로 부착시킬 수 있다. 항체는 이중- 또는 동종 이작용성 가교결합제를 사용하여 매트릭스에 공유 결합으로 부착될 수 있다.

- [44] HIP 항체를 포함하는 의료기구 코팅조성물은 의료기구의 표면에 HIP 항체를 코팅하기 위한 것으로, 의료기구의 표면에 아민기를 유도하고, HIP 항체의 카르복실기를 활성화하여, 의료기구의 아민기에 HIP 항체를 연결시켜 의료기구의 표면을 항체로 코팅할 수 있다.
- [45] 의료기구 표면에 아민기를 유도하기 위한 방법으로, 플라즈마 코팅방법을 사용할 수 있으며, APTES(3-aminopropyltriethoxysilane 10mM in anhydrous toluene)를 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [46] '항체'는 하나의 항원 또는 이 항원의 기능적 등가물에 결합하는 일종의 모노클로날 또는 폴리클로날 항체를 의미한다. 항체라는 용어는, Fab, F(ab')₂ 또는 Fc 단편과 같은 항체 단편을 포함한다. 항체는, 항체 몰당 6.022x10²³ 분자에 상당하는 다수의 개별 항체 분자를 포함한다.
- [47] 본 발명의 'HIP 항체'는 HIP에 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 항체의 절편을 포함한다. HIP의 항체는 HIP과의 결합을 통해 HIP을 포획할 수 있고, HIP의 기능을 블로킹할 수 있다.
- [48] HIP 항체가 코팅된 의료기구는 후기내피전구세포를 선택적으로 포획할 수 있다. 기존의 CD34항체 코팅 스텐트는 혈관중에 존재하는 후기내피전구세포를 선택적으로 포획하기 어렵다. 후기내피전구세포의 표면 마커인 HIP 항체를 스텐트에 코팅함으로써 내피세포로 분화되기 바로 전단계인 후기 내피전구세포를 포획하여 스텐트내면의 재내피화를 촉진하고, 혈관의 재협착을 효과적으로 막을 수 있다.
- [49] 의료기구에 코팅된 HIP 항체는 후기내피세포를 선택적으로 포획함과 동시에 후기내피세포의 HIP의 기능을 억제할 수 있다. HIP의 기능이 억제되는 경우, 후기내피세포의 증식이 활발해지고, 후기내피전구세포에 의한 튜브형성을 촉진할 수 있다.
- [50] 본 명세서의 '치료에 유효한 항체의 양'은, 의료 기구에 대한 후기내피전구세포의 부착을 촉진하는 항체의 양을 의미한다. 본 발명의 실시예에 필요한 항체의 양은, 사용되는 항체의 성질에 따라, 예를 들어, 사용되는 항체의 양은, 항체 및 이와 반응하는 항원 간의 결합 상수에 따라 결정될 것이다. 특정 항원에 사용하기 위한, 치료에 유효한 항체의 양을 결정하는 방법은, 당업자에게 주지되어 있다.
- [51]
- [52] 실시예1. 후기내피전구세포에서 고발현되는 HIP
- [53] 본 발명자들은 단핵세포(MNCs), 초기내피전구세포(eEPC), 후기내피전구세포(LEPC) 및 HUVEC세포에서 HIP의 발현을 비교하였다. 4종의 세포 타입중에서, 후기내피전구세포 및 HUVEC세포의 HIP가 전사수준 (도3a) 및 단백질 수준(도3b)이 가장 높았다. 반면, 단핵세포에서 HIP의 전사수준 및 단백질 발현수준이 매우 낮은 것을 확인하였다(도3a, 도3b).
- [54]

[55] 실시예2. 후기내피전구세포의 튜브형성능을 억제하는 HIP

[56] 본 발명자들은 HIP 녹다운 후기내피전구세포주를 제조하여 HIP 다운-조절의 효과를 실험하였다. 렌티바이러스(lentivirus)-매개 형질도입 및 서열 특이적 short hairpin RNA(shRNA)의 발현을 사용하여 HIP 발현의 특이적 감소가 수행되었다. HIP shRNA 렌티바이러스의 감염은 두개의 후기내피전구세포주(LEPC shSCR, LEPC shHIP)에서 HIP mRNA의 발현수준을 상당히 감소시켰다(도4a). HIP 단백질 발현 수준은 대조군인 SCR shRNA-형질전이된 후기내피전구세포주(LEPC shSCR)에 비해, HIP shRNA-형질전이된 후기내피전구세포(LEPC shHIP)에서 상당히 다운조절되었다(도4b). 후기내피전구세포는 VEGF로 처리한 EGM-2 배지에서 튜브구조 형성능을 갖는다. HIP 녹다운 shRNA로 처리된 후기내피전구세포(LEPC shHIP)는 SCR shRNA-형질전이된 후기내피전구세포주(LEPC shSCR)에 비해 향상된 말초혈관 형성능을 보이고(도4g 및 도4h), VEGF 처리후 튜브출현시간 및 튜브 갯수도 측정가능하였으며(도4c~도4f), 그 결과 HIP의 발현을 억제하면 혈관생성능이 촉진되고 형성된 혈관이 오래 지속됨을 확인할 수 있었다.

[57]

[58] 실시예3. 후기내피전구세포의 증식을 억제하는 HIP

[59] 다음으로, 본 발명자들은 HIP가 후기내피전구세포 증식에 미치는 영향을 조사하였다. 분열지수(mitotic index)는 bromodeoxyuridine(BrdU) incorporation 에 의해 측정된 바와 같이, 대조군 세포주(LEPC shSCR)에 비해서 HIP 녹다운 세포주(LEPC shHIP)에서 상당히 증가한다(도5a). 세포 생존성은, MTT 에세이에 의해 측정된 바와 같이, HIP 녹다운 후기내피전구세포주(LEPC shHIP)에서 상당히 향상되었다(도5b 및 도5c). 이러한 결과는 HIP가 후기내피전구세포의 증식을 억제함을 의미한다. 또한 caspase3 활성도를 통해 후기내피전구세포의 세포사멸억제효과를 살펴본 결과, 대조군 세포주(LEPC shSCR)에 비해서 HIP 녹다운 세포주(LEPC shHIP)에서 caspase3의 활성도가 감소하여 세포사멸억제효과가 더 뛰어남을 의미한다.

[60]

[61] 실시예4. HIP 항체가 고정된 실리콘 나노 섬유 표면의 제조

[62] 코발트 크롬 금속 시편(CoCr plate, 10×10×1mm)의 한 쪽 표면을 0.3μm 산화 알루미늄 현탁액(alumina suspension)을 이용하여 기계 연마하였다. 상기 연마한 시편은 산소 플라즈마 장비(Femto Science, Korea)를 사용하여 50 sccm 의 산소유량, 50W의 전압 조건에서 5분간 플라즈마 처리하여 표면에 수산기(hydroxyl group)를 유도하였다. 무수 톨루엔(Toluene anhydrous, Sigma-Aldrich, USA) 200 ml를 테플론 반응조에 채운 뒤 테플론 홀더에 금속 시편을 세워놓고 무수 톨루엔 용액에 완전히 잠기게 하였다. 반응조를 밀봉하고 200 RPM으로 용액을 교반하면서 33% 습도의 질소기체를 반응조로 30분간 주입한 뒤 TCMS(trichloro(methyl)silane, Sigma-Aldrich, USA) 200μl를 넣고

상온에서 90분간 반응시켰다. 반응이 끝난 뒤 시편을 톨루엔, 에틸 알코올, 50% 에틸 알코올로 각각 세 번씩 세척하고 120°C 오븐에서 2시간 동안 어닐링(annealing)하였다. 제작된 실리콘 나노 섬유 시편은 상기 조건과 동일한 산소 플라즈마 처리를 한 뒤 10mM APTES(3-aminopropyltriethoxysilane 10mM in anhydrous toluene)와 2시간 동안 반응시켜 표면에 아민기를 유도하였다. EDC, NHS(N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride, N-hydroxysulfosuccinimide, Sigma-Aldrich, USA)를 동 질량 비로 MES완충액(2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid buffer)에 녹인 용액에 항체(anti-Human HIP antibody)를 첨가한 뒤 시편이 담긴 용기에 넣고 2시간 동안 반응시켜 표면에 항체를 고정시켰다.

[63]

[64] 실시예4. HIP 항체가 고정된 실리콘 나노 섬유 표면에 대한 후기내피전구세포 포획 및 증식

[65] 후기내피전구세포(endothelial progenitor cells; EPCs)를5% 소태아혈청(fetal bovine serum), 재조합 인간 혈관내피 성장인자(recombinant human vascular endothelial growth factor), 재조합 인간 섬유아세포 성장인자-B(recombinant human fibroblast growth factor-B), 재조합 인간 상피 성장인자(recombinant human epidermal growth factor), 아스코르브산(ascorbic acid), 재조합 인슐린 유사 성장인자-1(recombinant long R insulin-like growth factor-1), 겐타마이신황산염 암포테리신-B(gentamicin sulfate amphotericin-B)를 포함하는EBM-2(endothelial basal medium-2, Lonza, USA)배지에 37°C, 5% 농도의 이산화탄소 조건이 갖춰진 세포배양기에서 배양하였다. 이틀에 한 번씩 배지를 교환하였으며 배양 용기의 70%내지 80%가 세포로 찻을 때 계대배양 하였다.

[66]

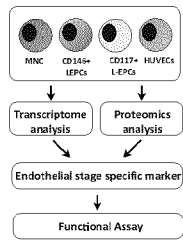
금속시편을 끼울 수 있는 구멍이 나있는 형태로 제작된 폴리디메틸실록산(polydimethylsiloxane; PDMS)형판에 항체가 고정된 금속시편을 끼운 뒤 Stick-Slide I^{0.6} Luer (Ibidi®, Germany) 미세유체칩을 덮고 튜브를 연결해 시편위로 배지가 흐를 수 있는 조건을 만들었다. 단위 체적당 10,000개의 EPCs가 들어있는 배지를 바닥 면이 일정한 방향으로15 dyne/cm²의 전단응력(shear stress)를 받도록 펌프와 유체 조절기(ibidi pump, fluidic unit, Ibidi®, Germany)를 이용해 흘려 보냈다. 37°C 배양기에 미세유체칩과 유체 조절기를 넣은 상태로 1시간 동안 배지를 순환시켰으며 1시간 뒤 칩 을 꺼내 내부에 순수한 배지를 세 번 흘려 보내 포획되지 않은 EPCs를 제거하였다. 포획된 EPCs는 Hoechst 33342(Thermo Fisher, USA) 5µg/ml로 20분간 처리하여 세포핵을 염색했으며 부착된 세포의 총 개수를 Image J 프로그램을 이용해 계산하였다(도6참조). 실험한 결과, HIP 항체가 코팅되지 않은 시편(bare)보다 HIP 항체가 코팅된 시편에서 보다 많은 후기내피전구세포가 포획되었으며, 결국 HIP 항체가 후기내피전구세포의 포획에 매우 효과적임이 확인되었다.

청구범위

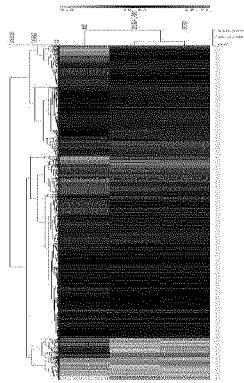
- [청구항 1] 후기내피전구세포의 포획 및 증식을 유도하는 의료기구 코팅 조성물에 있어서,
상기 코팅 조성물은 HIP와 반응하는 치료에 유효한 양의 일종 이상의 항체 또는 이의 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 의료기구 코팅조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 항체는 모노클로날 항체인 것을 특징으로 하는 의료기구 코팅조성물.
- [청구항 3] 제 2항에 있어서, 상기 모노클로날 항체는 Fab 또는 F(ab')₂ 단편을 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 의료기구 코팅조성물.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 의료기구는 스텐트인 것을 특징으로 하는 의료기구 코팅조성물.
- [청구항 5] 의료기구의 표면에 후기내피전구세포의 포획 및 증식을 유도하는 코팅을 포함하는 의료기구에 있어서,
상기 코팅은 HIP와 반응하는 치료에 유효한 양의 일종 이상의 항체 또는 이의 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 코팅된 의료기구.
- [청구항 6] 제 5항에 있어서, 상기 코팅은 의료 기구의 표면을 코팅하는 매트릭스층을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 의료기구.
- [청구항 7] 제 6항에 있어서, 상기 매트릭스층은 상기 항체와 결합하는 것을 특징으로 하는 의료기구.
- [청구항 8] 제 5항에 있어서, 상기 항체는 모노클로날 항체인 것을 특징으로 하는 의료기구.
- [청구항 9] 제 5항에 있어서, 상기 모노클로날 항체는 Fab 또는 F(ab')₂ 단편을 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 의료기구.
- [청구항 10] 제 6항에 있어서, 상기 매트릭스층은 폴리우레탄, 단편화된 폴리우레탄-우레아/헤파린, 폴리-L-락트산, 폴리-D,L-락티드, 셀룰로오스 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜, 콜라겐, 라미닌, 헤파린, 피브린, 엘라스틴, 셀룰로오스 및 탄소로 이루어진 그룹에서 어느 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 의료기구.
- [청구항 11] 제 5항에 있어서, 상기 의료기구는 스텐트인 것을 특징으로 하는 의료기구.
- [청구항 12] (a) 의료기구 표면에 합성 또는 천연 물질을 포함하는 한층 이상의 매트릭스로 이루어진 매트릭스 코팅층을 형성하는 단계; 및
(b) HIP와 반응하는 치료에 유효한 양의 일종 이상의 항체 또는 이의 단편을 상기 매트릭스층에 첨가하는 단계를 포함하는 의료기구의 표면에 후기내피전구세포의 포획 및 증식을 유도하는 코팅층이 형성된 의료 기구의 제조방법.

- [청구항 13] (a) 의료기구 표면에 아민기를 유도하는 단계;
(b) HIP 항체의 카르복시기를 활성화하는 단계 및
(c) 아민기가 유도된 의료기구 표면에 카르복시기가 활성화된 HIP 항체를
가하여, 의료기구 표면에 HIP 항체를 결합시키는 단계를 포함하는
의료기구의 표면에 후기내피전구세포의 포획 및 증식을 유도하는
코팅층이 형성된 의료 기구의 제조방법.

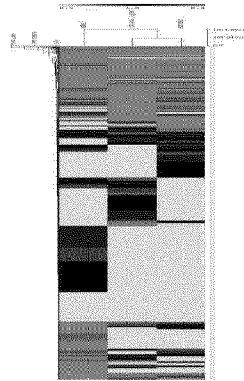
[도1]



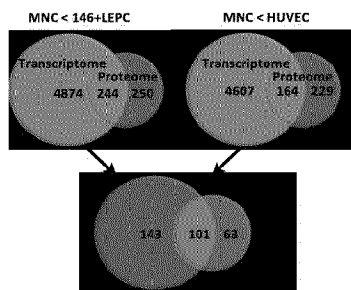
[도2a]



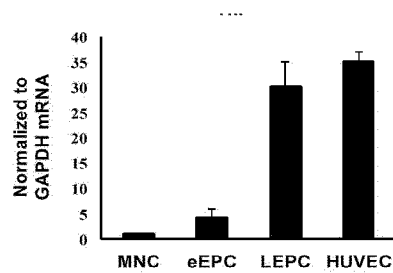
[도2b]



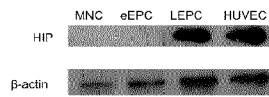
[도2c]



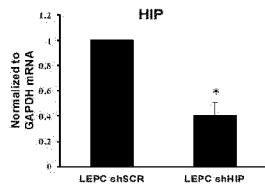
[도3a]



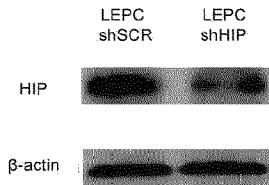
[도3b]



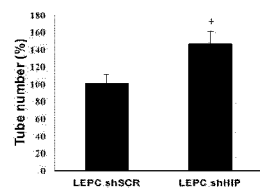
[도4a]



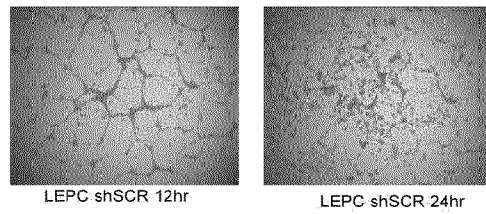
[도4b]



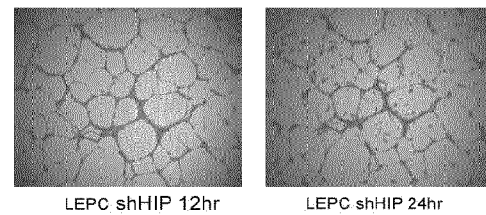
[도4c]



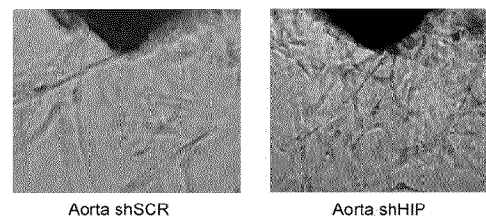
[도4d]



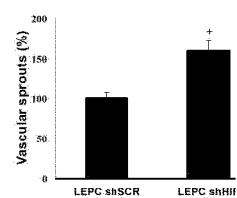
[도4e]



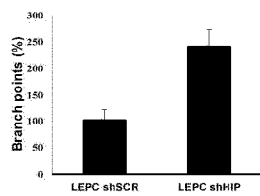
[도4f]



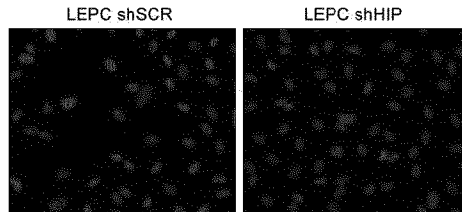
[도4g]



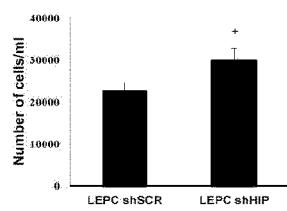
[도4h]



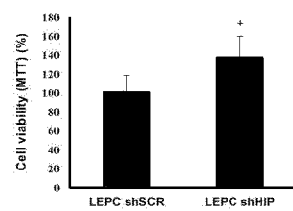
[도5a]



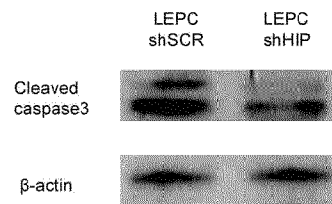
[도5b]



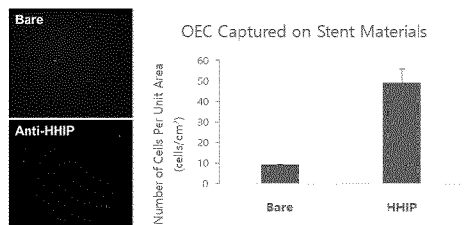
[도5c]



[도5d]



[도6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/008810**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***A61L 31/08(2006.01)i, A61L 31/16(2006.01)i, A61L 31/12(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)

A61L 31/08; A61F 2/07; A61M 31/00; A61K 9/06; A61K 48/00; A61K 38/18; A61M 29/02; A61L 31/16; A61L 31/12

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: outgrowth endothelial cell, HIP, stent, matrix, coating

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2011-0031075 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL) 24 March 2011 See claims 1-6.	1-13
A	KR 10-2007-0008714 A (ORBUSNEICH MEDICAL, INC.) 17 January 2007 See the entire document.	1-13
A	KR 10-1465596 B1 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 27 November 2014 See the entire document.	1-13
A	KR 10-2011-0098612 A (AVIDAL VASCULAR GMBH.) 01 September 2011 See the entire document.	1-13



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

12 DECEMBER 2017 (12.12.2017)

Date of mailing of the international search report

12 DECEMBER 2017 (12.12.2017)

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/KR2017/008810

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0031075 A	24/03/2011	NONE	
KR 10-2007-0008714 A	17/01/2007	AU 2003-219718 A1	02/09/2003
		AU 2003-241515 A1	12/12/2003
		EP 1263484 A1	11/12/2002
		EP 1263484 B1	16/05/2007
		EP 1471853 A2	03/11/2004
		EP 1471853 B1	22/03/2017
		EP 1505931 A1	16/02/2005
		EP 1740219 A2	10/01/2007
		EP 1740219 B1	04/03/2015
		EP 1753476 A2	21/02/2007
		EP 1753476 B1	29/07/2015
		EP 1948069 A2	30/07/2008
		EP 2671540 A2	11/12/2013
		EP 2671540 A3	04/06/2014
		JP 2003-526477 A	09/09/2003
		JP 2005-523050 A	04/08/2005
		JP 2005-525911 A	02/09/2005
		JP 2007-528275 A	11/10/2007
		JP 2007-535389 A	06/12/2007
		JP 2009-515659 A	16/04/2009
		JP 2013-046771 A	07/03/2013
		JP 2015-128597 A	16/07/2015
		JP 2015-128598 A	16/07/2015
		JP 5675744 B2	25/02/2015
		JP 5755395 B2	29/07/2015
		JP 5859179 B2	10/02/2016
		JP 5876173 B2	02/03/2016
		KR 10-0860860 B1	29/09/2008
		KR 10-2004-0105704 A	16/12/2004
		KR 10-2005-0010827 A	28/01/2005
		KR 10-2006-0131882 A	20/12/2006
		KR 10-2008-0072912 A	07/08/2008
		US 2002-0049495 A1	25/04/2002
		US 2003-0229393 A1	11/12/2003
		US 2004-0039441 A1	26/02/2004
		US 2005-0025752 A1	03/02/2005
		US 2005-0043787 A1	24/02/2005
		US 2005-0271701 A1	08/12/2005
		US 2006-0121012 A1	08/06/2006
		US 2006-0135476 A1	22/06/2006
		US 2006-0224531 A1	05/10/2006
		US 2007-0042017 A1	22/02/2007
		US 2007-0055367 A1	08/03/2007
		US 2007-0123977 A1	31/05/2007
		US 2007-0128723 A1	07/06/2007
		US 2007-0129789 A1	07/06/2007
		US 2007-0134290 A1	14/06/2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/008810

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		US 2007-0141107 A1	21/06/2007
		US 2007-0156232 A1	05/07/2007
		US 2007-0191932 A1	16/08/2007
		US 2007-0196422 A1	23/08/2007
		US 2007-0213801 A1	13/09/2007
		US 2010-0153319 A1	17/06/2010
		US 2012-0172970 A1	05/07/2012
		US 2013-0035755 A1	07/02/2013
		US 2013-0172988 A1	04/07/2013
		US 2013-0295156 A1	07/11/2013
		US 2015-0352261 A1	10/12/2015
		US 2015-0352263 A1	10/12/2015
		US 2016-0081797 A1	24/03/2016
		US 2016-0136337 A1	19/05/2016
		US 2016-0184114 A1	30/06/2016
		US 7037332 B2	02/05/2006
		US 7698111 B2	13/04/2010
		US 7803183 B2	28/09/2010
		US 8088060 B2	03/01/2012
		US 8460367 B2	11/06/2013
		US 8543359 B2	24/09/2013
		US 9072723 B2	07/07/2015
		US 9320829 B2	26/04/2016
		US 9364565 B2	14/06/2016
		US 9522217 B2	20/12/2016
		US 9555166 B2	31/01/2017
		WO 01-68158 A1	20/09/2001
		WO 03-65881 A2	14/08/2003
		WO 03-65881 A3	30/10/2003
		WO 03-99169 A1	04/12/2003
		WO 2005-086831 A2	22/09/2005
		WO 2005-086831 A3	12/04/2007
		WO 2005-107817 A2	17/11/2005
		WO 2005-107817 A3	23/08/2007
		WO 2007-059253 A2	24/05/2007
		WO 2007-059253 A3	18/10/2007
KR 10-1465596 B1	27/11/2014	NONE	
KR 10-2011-0098612 A	01/09/2011	AU 2009-231200 A1	08/10/2009
		CA 2719729 A1	08/10/2009
		EP 2106820 A1	07/10/2009
		EP 2271396 A2	12/01/2011
		JP 2011-516132 A	26/05/2011
		US 2011-0046724 A1	24/02/2011
		WO 2009-121565 A2	08/10/2009
		WO 2009-121565 A3	25/02/2010

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61L 31/08(2006.01)i, A61L 31/16(2006.01)i, A61L 31/12(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61L 31/08; A61F 2/07; A61M 31/00; A61K 9/06; A61K 48/00; A61K 38/18; A61M 29/02; A61L 31/16; A61L 31/12

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: 후기내피전구세포, HIP, 스텐트, 매트릭스, 코팅

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2011-0031075 A (서울대학교병원) 2011.03.24 청구항 1-6 참조.	1-13
A	KR 10-2007-0008714 A (오르버스네이치 메디칼 인코포레이티드) 2007.01.17 전문 참조.	1-13
A	KR 10-1465596 B1 (서울대학교산학협력단) 2014.11.27 전문 참조.	1-13
A	KR 10-2011-0098612 A (아피달 파스쿨라르 게엠베하) 2011.09.01 전문 참조.	1-13

☐ 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

2017년 12월 12일 (12.12.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 12월 12일 (12.12.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



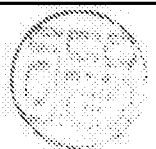
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

이동욱

전화번호 +82-42-481-8163



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0031075 A	2011/03/24	없음	
KR 10-2007-0008714 A	2007/01/17	AU 2003-219718 A1	2003/09/02
		AU 2003-241515 A1	2003/12/12
		EP 1263484 A1	2002/12/11
		EP 1263484 B1	2007/05/16
		EP 1471853 A2	2004/11/03
		EP 1471853 B1	2017/03/22
		EP 1505931 A1	2005/02/16
		EP 1740219 A2	2007/01/10
		EP 1740219 B1	2015/03/04
		EP 1753476 A2	2007/02/21
		EP 1753476 B1	2015/07/29
		EP 1948069 A2	2008/07/30
		EP 2671540 A2	2013/12/11
		EP 2671540 A3	2014/06/04
		JP 2003-526477 A	2003/09/09
		JP 2005-523050 A	2005/08/04
		JP 2005-525911 A	2005/09/02
		JP 2007-528275 A	2007/10/11
		JP 2007-535389 A	2007/12/06
		JP 2009-515659 A	2009/04/16
		JP 2013-046771 A	2013/03/07
		JP 2015-128597 A	2015/07/16
		JP 2015-128598 A	2015/07/16
		JP 5675744 B2	2015/02/25
		JP 5755395 B2	2015/07/29
		JP 5859179 B2	2016/02/10
		JP 5876173 B2	2016/03/02
		KR 10-0860860 B1	2008/09/29
		KR 10-2004-0105704 A	2004/12/16
		KR 10-2005-0010827 A	2005/01/28
		KR 10-2006-0131882 A	2006/12/20
		KR 10-2008-0072912 A	2008/08/07
		US 2002-0049495 A1	2002/04/25
		US 2003-0229393 A1	2003/12/11
		US 2004-0039441 A1	2004/02/26
		US 2005-0025752 A1	2005/02/03
		US 2005-0043787 A1	2005/02/24
		US 2005-0271701 A1	2005/12/08
		US 2006-0121012 A1	2006/06/08
		US 2006-0135476 A1	2006/06/22
		US 2006-0224531 A1	2006/10/05
		US 2007-0042017 A1	2007/02/22
		US 2007-0055367 A1	2007/03/08
		US 2007-0123977 A1	2007/05/31
		US 2007-0128723 A1	2007/06/07
		US 2007-0129789 A1	2007/06/07
		US 2007-0134290 A1	2007/06/14

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 2007-0141107 A1	2007/06/21
		US 2007-0156232 A1	2007/07/05
		US 2007-0191932 A1	2007/08/16
		US 2007-0196422 A1	2007/08/23
		US 2007-0213801 A1	2007/09/13
		US 2010-0153319 A1	2010/06/17
		US 2012-0172970 A1	2012/07/05
		US 2013-0035755 A1	2013/02/07
		US 2013-0172988 A1	2013/07/04
		US 2013-0295156 A1	2013/11/07
		US 2015-0352261 A1	2015/12/10
		US 2015-0352263 A1	2015/12/10
		US 2016-0081797 A1	2016/03/24
		US 2016-0136337 A1	2016/05/19
		US 2016-0184114 A1	2016/06/30
		US 7037332 B2	2006/05/02
		US 7698111 B2	2010/04/13
		US 7803183 B2	2010/09/28
		US 8088060 B2	2012/01/03
		US 8460367 B2	2013/06/11
		US 8543359 B2	2013/09/24
		US 9072723 B2	2015/07/07
		US 9320829 B2	2016/04/26
		US 9364565 B2	2016/06/14
		US 9522217 B2	2016/12/20
		US 9555166 B2	2017/01/31
		WO 01-68158 A1	2001/09/20
		WO 03-65881 A2	2003/08/14
		WO 03-65881 A3	2003/10/30
		WO 03-99169 A1	2003/12/04
		WO 2005-086831 A2	2005/09/22
		WO 2005-086831 A3	2007/04/12
		WO 2005-107817 A2	2005/11/17
		WO 2005-107817 A3	2007/08/23
		WO 2007-059253 A2	2007/05/24
		WO 2007-059253 A3	2007/10/18
KR 10-1465596 B1	2014/11/27	없음	
KR 10-2011-0098612 A	2011/09/01	AU 2009-231200 A1	2009/10/08
		CA 2719729 A1	2009/10/08
		EP 2106820 A1	2009/10/07
		EP 2271396 A2	2011/01/12
		JP 2011-516132 A	2011/05/26
		US 2011-0046724 A1	2011/02/24
		WO 2009-121565 A2	2009/10/08
		WO 2009-121565 A3	2010/02/25