

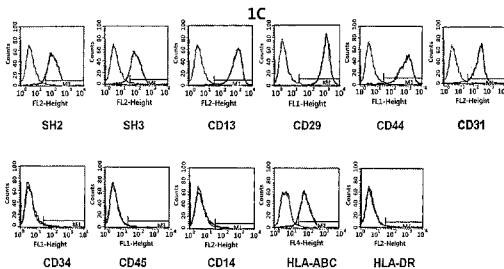
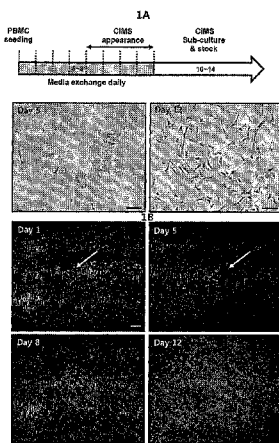


- (51) 국제특허분류:
C12N 5/074 (2010.01) A61K 35/12 (2006.01)
C12N 5/02 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/003313
- (22) 국제출원일: 2014년 4월 16일 (16.04.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0048486 2013년 4월 30일 (30.04.2013) KR
- (71) 출원인: 서울대학교병원 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL) [KR/KR]; 110-744 서울시 종로구 대학로 101, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김효수 (KIM, Hyo-Soo); 140-210 서울시 용산구 독서당로 111, 105 동 T-202 호 (한남동, 한남더힐), Seoul (KR). 양한모 (YANG, Han-Mo); 135-100 서울시 강남구 도산대로 89길 49, 101 동 1208 호 (청담동, 건영아파트), Seoul (KR). 김주영 (KIM, Ju-Young); 440-722 경기도 수원시 장안구 정자천로 188 번길 28, 352 동 1503 호 (정자 2 동, 두견마을 벽산아파트), Gyeonggi-do (KR). 조현재 (CHO, Hyun-Jai); 138-918 서울시 송파구 올림픽로 35길 104, 23 동 410 호 (잠실 6 동, 잠미아파트), Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 이룸 (ERUUM PATENT LAW FIRM); 135-851 서울시 강남구 역삼로 601 (대치동, 보성빌딩 5층), 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: ENDOCARDIUM-DERIVED ADULT STEM CELLS AND METHOD FOR PRODUCING SAME

(54) 발명의 명칭 : 심장내막 유래의 성체줄기세포 및 이의 제조방법



(57) Abstract: The present invention relates to endocardium-derived adult stem cells obtained by culturing peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) separated from peripheral blood, and a cell therapeutic agent for treating cardiovascular diseases containing the same as an active ingredient. The adult stem cells, according to the present invention, have an origin that is the endocardium and strong blood vessel formation, and is thus remarkably useful for treating cardiovascular diseases such as ischemia, myocardial infarction, and the like.

(57) 요약서: 본 발명은, 말초혈액에서 분리된 말초혈액단핵세포(PBMC)를 배양함으로써 획득되는 심장내막 유래의 성체줄기세포, 및 이를 유효성분으로 함유하는 혈관질환 치료용 세포치료제에 관한 것이다. 본 발명에 따른 성체줄기세포는 그 기원이 심장의 내막이고 강한 혈관형성능을 갖기 때문에 허혈이나 심근경색 등의 심혈관계질환의 치료에 크게 유용하다.



(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, 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 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 심장내막 유래의 성체줄기세포 및 이의 제조방법 기술분야

- [1] 본 발명은, 말초혈액에서 분리된 말초혈액단핵세포(peripheral blood mononuclear cell; PBMC)를 배양함으로써 수득되는 심장내막 유래의 성체줄기세포, 및 이를 유효성분으로 함유하는 혈관질환 치료용 세포치료제에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 환자 맞춤형 세포치료제로 사용할 수 있는 세포는 종류 및 분화 정도에 따라 체세포 치료제와 줄기세포 치료제로 나뉘며, 그 중 줄기세포 치료제는 성체줄기세포 치료제와 배아줄기세포 치료제, 최근에 배아줄기세포를 대체할 것으로 각광받고 있는 역분화줄기세포 치료제가 있다.
- [3] 성체줄기세포는 신생아나 성인의 발달된 장기와 기관에서 발견되는 세포로서 자가 재생능을 가지며 생물 조직을 이루는 다양한 세포들로 분화될 수 있는 세포로 정의된다. 상처나 사고 등으로 조직이나 세포에 손상을 입었을 때 근육, 뼈, 지방, 신경 등의 세포로 분화되어 손상된 부위를 복구시킬 수 있는 세포이다.
- [4] 성체줄기세포에는 조혈줄기세포, 중간엽 줄기세포, 다른 조직 재생에 관여하는 제한된 분화능을 가진 조직 특이적 전구세포가 속한다. 그 중 가장 비침습적인 방법을 이용해 얻을 수 있는 세포는 골수채취를 통한 조혈줄기세포나 중간엽 줄기세포이고, 다른 세포들은 생검을 통한 침습적인 조직을 획득하는 과정을 통해 분리해서 이용되어 왔다. 가장 비침습적인 방법이라고 해도 골수채취는 마취가 필요하고 고통을 유발하기에 환자 맞춤형 줄기세포를 분리하기 위한 더 비침습적인 방법으로서 말초혈액을 이용한 세포획득법이 요구되고 있다. 그러나 말초혈액만으로는 성인에서 분리할 수 있는 조혈줄기세포나 중간엽 줄기세포의 수가 너무 적고 분리방법이 경제적이지 못하며, 분리해낸다고 해도 세포치료에 사용가능한 양만큼 증식이 원활하지 않은 경우가 대부분이기에 좀 더 실용성을 높일 수 있는 대체 성체줄기세포나 세포획득법이 요구되고 있다.
- [5] 종래, 생검을 통해 획득할 수 있는 조직 특이적 전구세포 중 심장의 재생에 관련된 성체줄기세포는 심장이외막과 심근에서 동정되어 왔다. 심근에서 획득된 줄기세포는 심근과 관상동맥혈관을 만들 수 있는 능력을 갖고 있으며 c-kit, Sca-1, side population, Islet-1 등의 마커를 가지고 있다. 심장이외막에서 획득된 줄기세포는 중간엽 줄기세포와 비슷한 특징을 지니고 있으며 심근과 평활근세포로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있다. 하지만, 심장내막에서는 이제까지 어떠한 성체줄기세포도 동정되지 않았고, 단지 혈관내피세포와 동일한 세포로 구성되어 있으리라 여겨지고만 있었다. 이러한 심장내막세포는 심장의 발생단계에서 심장판막과 심장내 혈관형성의 역할을 담당하고 있고

NFATc1의 마커를 가지고 있으나, 성체가 되어가면서 NFATc1 마커의 발현은 점차적으로 감소한다고 알려져 왔다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 이에, 본 발명자는 인간 말초혈액으로부터 심장내막 유래의 다분화능 성체줄기세포를 분리하여, 대체 성체줄기세포와 비침습적인 세포획득법의 제공이라는 두 가지 요건을 충족하기 위해 예의 노력한 결과, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [7] 구체적으로, 본 발명의 목적은 비침습적인 방법인 소량의 말초혈액 채혈을 통해 환자 맞춤형 세포 치료에 이용하기 위한 심장내막 유래의 성체줄기세포, 이를 이용한 세포치료제 및 그 제조방법을 제공하는 것이다.
- [8] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [9] 본 발명은, 말초혈액에서 분리된 말초혈액단핵세포(PBMC)를 EGM-2MV(Microvascular Endothelial Cell Growth Media-2) 배지에 현탁하여 씨딩한 후, 5일 내지 8일동안 매일 배지를 교환하면서 T세포를 제거하여 배양함으로써 수득되는, 심장내막 유래의 성체줄기세포를 제공한다.
- [10] 본 발명은, 말초혈액에서 말초혈액단핵세포(PBMC)를 분리한 후 EGM-2MV 배지에 현탁하여 씨딩하는 단계; 및 상기 씨딩 후 5일 내지 8일동안 매일 배지를 교환하면서 T세포를 제거하여 배양하는 단계를 포함하는, 심장내막 유래의 성체줄기세포의 제조방법을 제공한다.
- [11] 본 발명의 일 구체예로, 상기 성체줄기세포는 (a) NFATc1, MixL1 및 CD31에 대하여 양성인 면역학적 특성을 나타내고, WNT5A 및 CD3에 대하여 음성인 면역학적 특성을 나타내며, (b) 부착되어 성장하며, 선형태(spindle-shape)의 형태학적 특성을 나타내는 것을 특징으로 한다.
- [12] 본 발명은, 상기 성체줄기세포를 유효성분으로 함유하는, 혈관질환 치료용 세포치료제를 제공한다.
- [13] 본 발명은, 약학적으로 유효량의 상기 성체줄기세포를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 혈관질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [14] 본 발명은, 상기 성체줄기세포를 혈관질환의 예방 또는 치료에 이용하는 방법을 제공한다.
- [15] 본 발명의 일 구체예로, 상기 혈관질환은 심근경색 또는 하지허혈인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [16] 본 발명의 줄기세포는 종래에 연구되어 온 심장외막과 심근 기원이 아닌

심장내막 기원으로, 다분화능을 가지며 소량의 말초혈액만으로도 분리 배양 가능하며, 배양단계에서 단순히 잦은 배지 교환만으로도 성체줄기세포를 억제하고 있는 세포 및 환경을 제거해 줌으로서 손쉽게 제조할 수 있다.

[17] 또한, 본 발명의 줄기세포는 높은 증식력을 가지고 있어 배양 후 한달 안에는 유전적 변이 없이 보관 및 세포치료에 쓰일 수 있을 정도의 세포수(1×10^7 cells)를 확보할 수 있다.

[18] 또한, 본 발명의 줄기세포는 세포자체가 가진 증식력과 분화력으로 조직에 주입했을 때 혈관형성을 유도할 수 있으므로 허혈이 야기되는 병증의 치료에 이용될 수 있고, 면역세포에 비해 높은 유전자 도입 효율을 갖기에 유전자 도입 후 다른 종류의 세포로 분화시키거나 치료에 이용할 수 있다.

[19] 또한, 본 발명의 줄기세포는 그 기원이 심장의 내막이고 강한 혈관형성능을 갖기 때문에 심근경색 등의 심혈관계질환의 기전 연구와 치료에 크게 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[20] 도 1은 CiMS 줄기세포의 배양방법(도 1a), CiMS 줄기세포 출현 시기에 따른 세포형태(도 1b), 및 CiMS 줄기세포의 표면마커(도 1c)를 나타낸 것이다.

[21] 도 2a는 T 림프구에 의한 CiMS 줄기세포 배양 억제효과를 콜로니 염색으로 나타낸 것이며, 도 2b는 초기 CiMS 배양에서 부유세포 내 CD3⁺세포의 비율을 나타낸 것이다.

[22] 도 3a는 골수이식, 간이식, 신장이식을 받은 환자에서의 CiMS 유전자형 분석결과이며, 도 3b는 심장 공여자와 수여자의 혈액에서 획득한 CiMS 유전자형 분석결과이다.

[23] 도 4a는 면역염색을 이용하여 CiMS 에서 NFATc1의 위치를 나타낸 것이며, 도 4b는 CiMS 특이적 마커를 확인한 RT-PCR 결과이다.

[24] 도 5는 심장조직에서의 NFATc1, CD31 마커의 염색 결과이다.

[25] 도 6은 말초혈액단핵세포에서 CiMS 특이적 마커인 NFATc1/CD31 염색을 이용하여 CiMS를 배양한 결과이다.

[26] 도 7a는 건강한 자원자와 심장이식환자에서 CiMS의 출현시기에 대한 비교를 나타낸 결과이고, 도 7b는 건강한 자원자와 심장이식환자에서 CiMS 마커인 (NFATc1+/CD31+/CD3-) 발현 세포의 수를 나타낸 결과이다.

[27] 도 8a는 마우스 심근경색 모델에서 CiMS 주입의 효과를 나타낸 것이고, 도 8b는 심근경색 심장조직에서 GFP-CiMS의 분포를 나타낸 것이고, 도 8c는 마우스 하지허혈 모델에서 CiMS 주입의 효과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[28] 본 발명은 말초혈액중의 말초혈액단핵세포(PBMC)에서 분리된 심장내막 유래의 다분화능 줄기세포에 관한 것이다.

[29] 본 발명에 있어서 '줄기세포'란, 개체를 구성하는 세포나 조직의 근간이 되는

세포로서 그 특징은 반복분열하여 자가 재생산(self-renewal)할 수 있고, 환경에 따라 특정한 기능을 지닌 세포로 분화할 수 있는 다분화 능력을 갖는 세포를 의미한다. 태아의 발생과정중 모든 조직에서 생겨나며, 성인이 되어서도 골수, 상피조직 등 세포가 활발히 교체되는 일부 조직에서 발견된다. 줄기세포는 분화가능한 세포의 종류에 따라 수정란이 첫분열을 시작할 때 형성되는 만능성 줄기세포(totipotent stem cells)와, 이 세포들이 계속 분열해 만들어진 포배 내막에 있는 전분화성 줄기세포(pluripotent stem cells), 그리고 성숙한 조직과 기관속에 들어있는 다능성 줄기세포(multipotent stem cells)로 분류된다. 이때, 다능성 줄기세포는, 이 세포가 포함되어 있는 조직 및 기관에 특이적인 세포로만 분화할 수 있는 세포로서, 태아기, 신생아기 및 성체기의 각 조직 및 장기의 성장과 발달은 물론 성체조직의 항상성 유지와 조직 손상시 재생을 유도하는 기능에 관여하고 있다. 이러한 조직 특이적 다능성 세포들을 총칭하여 성체 줄기세포라고도 한다.

- [30] 본 발명에 있어서 '말초혈액'이란, 인간을 포함한 포유동물에서 신체를 떠도는 혈액을 말하는 것으로 동맥, 정맥, 말초혈관 등을 이용하여 다양하게 추출가능하다.
- [31] 본 발명에 있어서 '말초혈액단핵세포(PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cell)'란, 말초혈액내에 존재하는 단핵의 세포로서, B cell, T cell, Macrophage, Dendritic cell, NK cell(natural killer cell) 등의 면역세포, 호염기구(basophil), 호산구(eosinophil), 호중구(neutrophil)와 같은 과립구세포(granulocytes) 등을 포함하고 있다. 상기 PBMC는 통상의 제조방법, 예를 들어 Ficoll-Paque을 이용한 비중 원침법으로 분리할 수 있다(Blood, 1998, 92: 2989-93 등).
- [32] 본 발명에 있어서, 심장내막 유래의 줄기세포를 제조하는 방법은, 말초혈액에서 말초혈액단핵세포(PBMC)를 분리한 후 EGM-2MV 배지(Microvascular Endothelial Cell Growth Media-2)(Lonza; Basel, Switzerland)에 현탁하여 씨딩(seeding)한 후, T 세포로 구성된 콜로니가 형성되지 못하도록 배지를 초기 5일간 매일 갈아주는 것이 바람직하다. 이와 같이, 매일 배지를 갈아주면 약 5에서 8일 사이에 몇 개의 세포가 관찰되며, 2주 이내에 계대하고 보관할 수 있을 양의 세포로 증식하는데, 이 세포를 "CiMS(Circulating Multipotent Stem Cell)"라고 명명했다. CiMS는 SH2, SH3, CD13, CD29, CD44, HLA-ABC 등의 중간엽 줄기세포의 마커들과 CD31의 내피세포 표면마커를 발현하고 있었고, CD14, CD34, CD45, HLA-DR 등의 마커를 발현하지 않아, 골수유래 혈액 세포와는 다른 성질을 가지고 있었다.
- [33] 본 발명에서, CiMS는 부착 성장 및 선형태(spindle-shape)의 형태학적 특성을 나타내며, 이때 '부착'은 배양 플라스크, 플라스틱 등에 부착하여 성장한다는 의미로 부착 대상에 제한은 없다.
- [34] 본 발명은 말초혈액단핵세포(PBMC)내의 특정 성체줄기세포의 출현을 억제하는 T세포(림프구)를 제거하는 단순한 배양방법에 의해, 심장내막 유래의

줄기세포를 제조할 수 있다.

[35] 본 발명에서 CiMS의 기원을 밝히기 위해서 골수이식받은 환자, 간이식을 받은 환자, 신장이식을 받은 환자와 심장이식을 받은 환자의 혈액을 배양하고 공여자의 유전자형과 수여자의 유전자형을 STR검사를 통해 확인한 결과, 획득된 CiMS는 심장이식을 받은 환자의 CiMS를 제외하고는 전부 수여자와 일치하는 유전자형을 가지고 있었고, 심장이식을 받은 환자에서 배양된 CiMS만이 공여자와 일치하는 유전자를 갖고 있었다.

[36] 본 발명에서 CiMS는 다른 내피세포나 중간엽 줄기세포, 피부섬유아세포, 혈액세포에 비해 심근내막세포 마커인 NFATc1을 강하게 발현하고 있었고, 원시선 (primitive streak)과 중배엽의 마커인 MixL1을 발현하고 있으나, 내피세포의 증식이나 이주에 관련된 마커인 Wnt5a는 발현하고 있지 않았다. 이를 이용하여 심장이식을 받는 환자를 대상으로 심장조직을 얻어 조직염색을 한 결과, 심장의 내막에 NFATc1과 CD31을 동시에 발현하는 세포가 군데군데 존재하는 것으로 보아 CiMS의 기원이 심장의 내막임을 밝혀내었다.

[37] 본 발명에서 제조된 CiMS를 이용하여 면역염색한 결과 세포질에서 NFATc1이 염색되었다. 이에 본 발명자는 혈액에서 말초혈액단핵세포를 분리하고 SLO를 이용하여 세포막내로 항NFATc1 항체가 투과할 수 있는 조건을 만들고, CD3 negative군에서 NFATc1/CD31 double positive군을 배양하여 CiMS를 직접적으로 선택 배양할 수 있는 방법을 확립하였다. 이러한 방법을 통해 확인한 결과, 혈액에서 분리된 CiMS는 정상인보다 면역억제제 투여로 인해 CD3세포의 기능이 현저히 저하되어 있는 심장이식환자에서 더 많이 존재하고 배양시 그 출현시기도 단축되어 있었다.

[38] 본 발명의 CiMS는 다분화능을 가지나 GFP로 염색을 한 CiMS를 심근경색을 유도한 마우스의 심장과 허혈을 유도한 마우스의 하지근육에 주입한 결과, 14일 경과 후에 대조군에 비해 CiMS를 주입한 군에서 좌심실수축능과 혈행이 향상됨을 관찰할 수 있었고, 녹색형광을 띄고있는 세포들이 마우스 심장에서 내피세포와 혈관평활근세포로 분화하여 혈관을 형성하고 있는 것을 관찰할 수 있었다. 이에 CiMS의 주요기능이 손상된 혈관의 복구임을 간접적으로 알 수 있었다.

[39]

[40] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 일례일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 한정된 것은 아니다.

[41]

[42] [실시예]

[43] 실시예 1. 말초혈액에서 줄기세포의 분리 및 배양법의 확립

[44] 실시예 1-1. 말초혈액을 이용한 CiMS 배양방법

[45] 사람 혈액에서 Ficoll-Paque를 이용해 말초혈액단핵세포(PBMC)를 분리한 후, EGM-2MV 배지(Lonza; Basel, Switzerland)에 현탁하여 10 μ g/ml fibronectin이

코팅된 6 well 플레이트에 well당 PBMC가 4×10^6 개/ml이 되도록 씨당한 후 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 다음날 플레이트를 여러 번 강하게 흔들어서 떠있는 세포들을 강한 suction을 통해 제거한 후, 새로운 배지로 갈아주고 배양하는 것을 7일간 반복하고 7일 이후에는 2일에 한 번 배지를 갈아주었다. 그 결과, 도 1a 및 1b에 나타낸 바와 같이, 5일~8일 사이에 CiMS 세포의 출현을 확인할 수 있었으며 CiMS 세포의 출현 후 2주안에 콜로니를 형성하면서 증식하였다. 이 콜로니를 0.05% 트립신/EDTA를 이용하여 sub-culture하고 10% DMSO가 포함되어 있는 FBS stock 배지에 현탁하여 이소프로판올 프리징 컨테이너(isopropanol freezing container)에 넣어서 -70°C에서 24시간 둔 다음 -190°C에서 보관하였다.

[46]

[47] **실시예 1-2. 분리된 CiMS의 마커 확인**

[48] 실시예 1-1에서 얻어진 CiMS 세포의 표면 마커를 확인하기 위해 유세포 분석을 실시하였다. 그 결과, 도 1c에 나타낸 바와 같이, CiMS는 SH2, SH3, CD13, CD29, CD44, HLA-ABC의 중간엽 줄기세포의 마커들과 CD31의 내피세포 표면마커를 발현하고 있었고, 골수유래 혈액 세포의 마커인 CD14, CD34, CD45, HLA-DR은 발현하지 않았다.

[49]

[50] **실시예 2. T 림프구로 인한 줄기세포 배양의 억제효과 확인**

[51] 말초혈액단핵세포에서 pan T MACS (Magnetic-activated cell sorting) 분리 키트를 이용하여 T 림프구를 제거한 군과 T 림프구가 포함되어 있는 군으로 나누는 후, 반복적인 배지의 교체 없이 부유세포가 존재하는 상태에서 CiMS 배양을 진행하였다. 그 다음, CiMS 콜로니를 크리스탈 바이올렛으로 염색하여, T 림프구의 첨가여부에 따른 CiMS 출현을 확인하였다. 그 결과, 도 2a에 나타낸 바와 같이, T 림프구가 존재하는 배양군에서 CiMS의 출현이 저해되는 현상을 관찰하였으며, 이는 반복적으로 배지를 교체함으로써 CiMS의 출현을 억제하고 있는 T 림프구가 제거되었음을 보여주는 것이다.

[52] 또한, 매일 상등액의 부유세포를 획득한 후 CD3 항체로 T 림프구를 염색한 후 유세포 분석을 실시하였다. 이를 통해서 CiMS 배양시 초기에 제거되는 부유세포에서 T 림프구의 퍼센트를 확인하였으며, 그 결과를 도 2b에 나타내었다.

[53]

[54] **실시예 3. CiMS의 기원 확인**

[55] CiMS의 기원을 밝히기 위해서, 골수이식을 받은 환자, 간이식을 받은 환자, 신장이식을 받은 환자의 말초혈액단핵세포로부터 실시예 1-1의 방법으로 CiMS를 획득한 후, 유전자형이 수여자와 동일한지 공여자와 동일한지를 STR 검사와 HLA typing으로 확인하였다. 그 결과, 도 3a에 나타낸 바와 같이, CiMS는 수여자와 동일한 유전자형을 가짐을 확인하였는 바, CiMS는 골수, 간, 신장에서

기원하는 것이 아님을 알 수 있었다.

- [56] 또한, 심장이식을 받은 환자의 말초혈액단핵세포로부터 획득한 CiMS의 유전자형을 STR 검사로 분석하였다. 그 결과, 도 3b에 나타낸 바와 같이, CiMS는 공여자와 동일한 유전자형을 가진다는 것을 관찰하였으며, 심장이식을 받기 전후를 비교하였을 때 심장이식 전에 수여자의 유전자형과 동일하던 CiMS가 심장이식 후에는 공여자의 유전자형을 갖는 CiMS로 바뀌는 현상을 11명의 케이스에서 관찰하였다. 이는 CiMS의 기원이 심장이라는 사실을 증명하는 것이다.

[57]

[58] 실시예 4. CiMS의 심장내막 특이적 유전자 발현 규명

- [59] 심장내에서 CiMS의 지리적 위치를 밝히기 위해서 CiMS 특이적인 마커를 발굴할 필요가 있다. 이를 위해 CiMS를 면역염색한 결과, 도 4a에 나타낸 바와 같이, NFATc1가 CiMS의 세포질에 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 여러 유전자의 스크리닝(screening)을 통해 CiMS가 다른 내피세포나 중간엽 줄기세포, 피부섬유아세포, 혈액세포, 배아줄기세포에 비해 심근내막세포에 특이적으로 발현하는 심근내막세포 마커인 NFATc1을 강하게 발현하고 있는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서, NFATc1를 CiMS의 세포 특이적 마커로 정하였다.

- [60] 또한, 도 4b에 나타낸 바와 같이, CiMS는 원시선(primitive streak)과 중배엽의 마커인 MixL1을 발현하고 있어 전구세포의 성질을 가짐을 알 수 있었고, 내피세포의 증식 및 이주에 관련된 마커인 WNT5A는 발현하고 있지 않아 이를 negative 마커로 사용할 수 있음을 밝혔다.

[61]

[62] 실시예 5. 심장내막에서 NFATc1과 CD31 염색을 통한 CiMS의 존재 검증

- [63] 심장이식을 받은 환자를 대상으로 심장조직을 얻은 후 CiMS 특이적 마커를 이용하여 다음과 같은 방법으로 면역조직염색을 시행하였다. 심장조직을 파라포름알데하이드(PFA, Paraformaldehyde)로 고정하여 파라핀 블록을 만들고, 탈파라핀화(deparaffinization) 과정을 거친 후 DAKO retrieval solution에 담귀 전자렌지에서 retrieval 과정을 거치고 나서 염색에 이용하였다. NFATc1에 대한 항체는 시그널의 증폭과 특이성을 위해 Solulink Chromalink digoxigenin one-shot antibody labeling kit를 이용하여 디곡시제닌(digoxigenin)을 컨쥬게이션하여 1:100으로 이용하였고, CD31에 대한 항체 역시 비오티인 컨쥬게이션된 것을 1:100으로 이용하였다. 면역 염색 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 심장외막이나 심근보다 심장의 내막에 NFATc1과 CD31을 동시에 발현하는 세포가 존재함을 확인할 수 있었다(화살표 표시 참조). 따라서, CiMS의 심장내의 지리적 위치가 심장의 내막임을 알 수 있다.

[64]

[65] 실시예 6. CiMS 특이적 마커(NFATc1/CD31)를 이용한 CiMS의 배양

- [66] NFATc1이 CiMS의 세포질에 존재한다는 결과를 바탕으로, NFATc1 마커를

이용하여 CiMS를 말초혈액단핵세포에서 직접 분리해내는 방법을 개발하였다. 우선 혈액에서 말초혈액단핵세포를 분리한 후 SLO(Streptolysin O)를 처리하여 세포막내로 NFATc1 항체가 투과할 수 있는 조건을 만들었다. 이후 CD31과 CD3 항체를 붙인 후에 CD3 negative군에서 NFATc1과 CD31에 동시에 가장 강하게 염색되는 세포군을 유세포 분석을 통한 sorting으로 분리해내고 배양하였다. 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, NFATc1-/CD31-/CD3-, NFATc1-/CD31+/CD3-, NFATc1+/CD31+/CD3- 배양군 중에서 NFATc1+/CD31+/CD3- 군에서만 CiMS 콜로니가 확인되었는 바, CiMS를 말초혈액단핵세포에서 직접적으로 선택 배양할 수 있는 방법을 확립하였다.

[67]

[68] 실시예 7. 말초혈액내에서 CiMS의 출현시기와 양 분석

[69] 대조군으로서 건강한 자원자(healthy volunteer)와 심장이식환자(HTPL patient)로부터 CiMS를 배양하여 이것의 출현시기를 비교분석하였다. 그 결과, 도 7a에 나타낸 바와 같이, CiMS는 건강한 자원자(58명)보다 면역억제제 투여로 인해 T 림프구의 기능이 현저히 저하되어 있는 심장이식환자(42명)에서 평균 2일 정도 더 빨리 출현하는 것을 알 수 있었다.

[70] 또한, 건강한 자원자와 심장이식환자로부터 CiMS를 배양하여, CiMS 특이적 마커인 (NFATc1+/CD31+/CD3-)를 이용하여 유세포 분석한 결과, 도 7b에 나타낸 바와 같이, 심장이식환자의 CiMS 수가 건강한 자원자에 비해 약 4배 정도 증가되어 있는 것을 알 수 있었다.

[71]

[72] 실시예 8. 마우스 심근경색 모델과 하지허혈 모델에서 CiMS의 역할 규명

[73] 마우스 심근경색 모델에서 CiMS의 역할을 규명하기 위하여, 녹색형광단백질(GFP)로 표지된 CiMS를 심근경색(myocardial infarction)을 유도한 마우스의 심장에 주입하였다(3×10^6 cells). 그 결과, 도 8a에 나타낸 바와 같이, 14일 경과 후에 CiMS를 주입하지 않은 대조군은 심근경색의 크기가 19.52%였고, CiMS를 주입한 군에서는 심근경색의 크기가 8.23%로서, CiMS의 주입이 심근경색을 크게 줄이는 효과가 있음을 관찰하였다. 또한, 좌심실 내경(Fractional shortening), 좌심실의 수축기(LVESD), 및 이완기말 좌심실 내경(LVEDD)의 측정을 통한 좌심실 수축능도 대조군에 비해 CiMS를 주입한 군에서 증가됨을 관찰할 수 있었다. 또한, 심근경색 유도된 마우스의 심장조직을 분석한 결과, 도 8b에 나타낸 바와 같이, CiMS는 주로 내피세포(EC)와 평활근세포(VSMC)로 분화되어 혈관을 이루고 있음을 확인할 수 있었다.

[74] 또한, 마우스 하지허혈 모델에서 CiMS의 역할을 규명하기 위하여, 녹색형광단백질(GFP)로 표지된 CiMS를 하지허혈을 유도한 마우스의 하지근육에 주입하였다(3×10^6 cells). 그 결과, 도 8c에 나타낸 바와 같이, 14일 경과 후에 CiMS를 주입하지 않은 대조군에 비하여 CiMS를 주입한 군에서 하지재생이 뛰어나게 이루어졌고, 레이저 도플러로 혈류량을 측정하였을 때

CiMS 주입군이 대조군에 비해 혈류량 비율이 증가하는 양상이 관찰되었다.

- [75] 이러한 결과를 통해 CiMS의 조직내 주요기능은 손상된 혈관의 복구를 통해 조직의 재생에 기여함을 확인할 수 있었다.

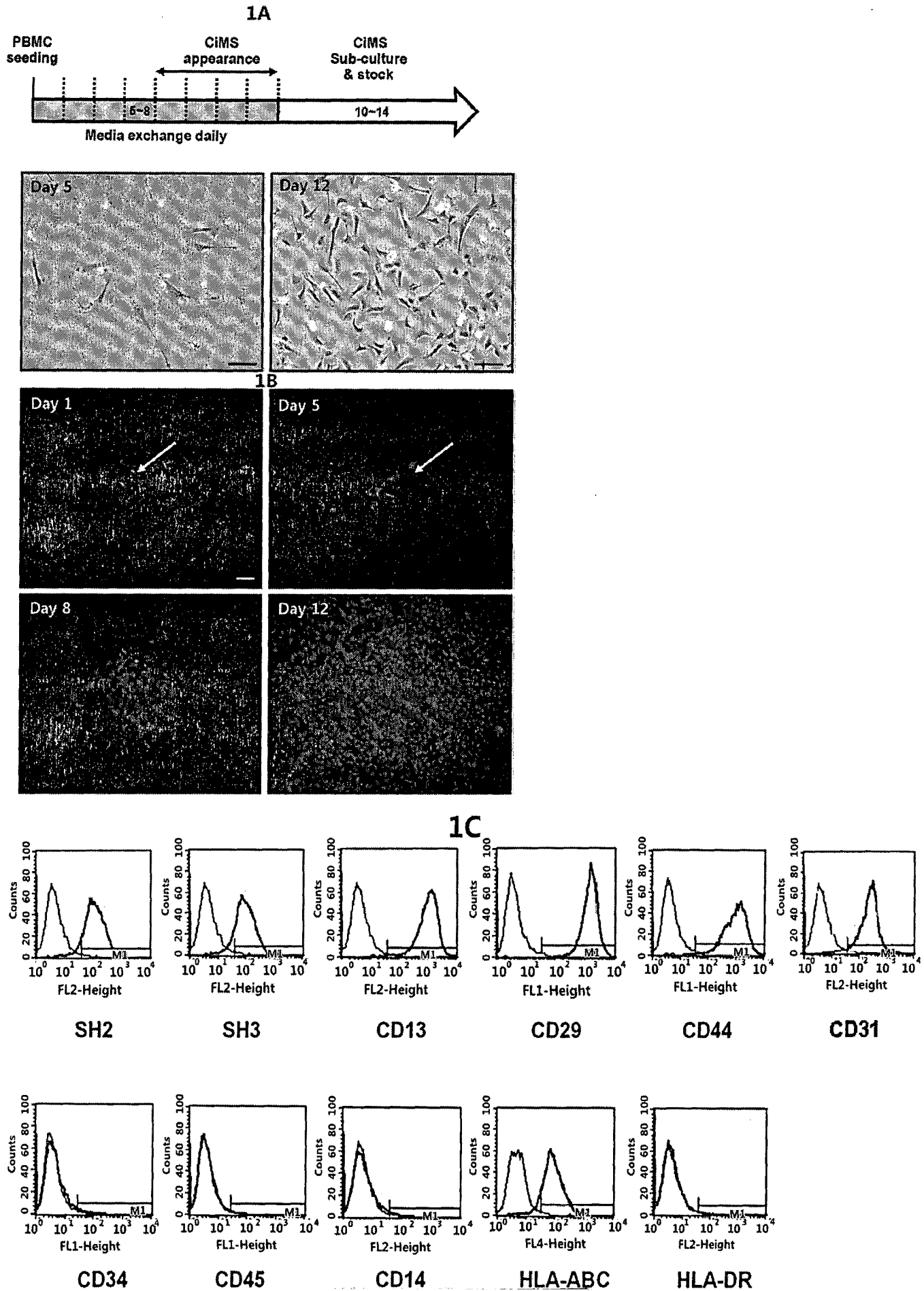
산업상 이용가능성

- [76] 본 발명의 줄기세포는 종래에 연구되어 온 심장외막과 심근 기원이 아닌 심장내막 기원으로, 다분화능을 가지며 소량의 말초혈액만으로도 분리 배양 가능하며, 배양단계에서 단순히 잦은 배지 교환만으로도 성체줄기세포를 억제하고 있는 세포 및 환경을 제거해 줌으로서 손쉽게 제조할 수 있다. 또한, 본 발명의 줄기세포는 심근경색 등의 심혈관계질환의 기전 연구와 치료에 크게 기여할 수 있다.

청구범위

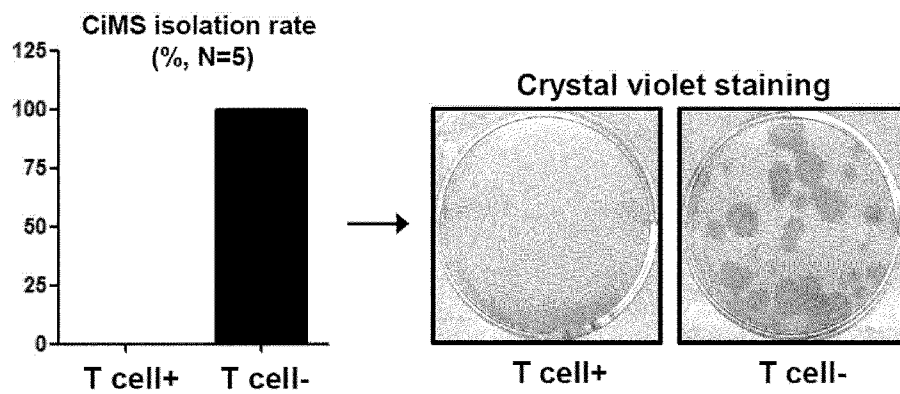
- [청구항 1] 말초혈액에서 분리된 말초혈액단핵세포(peripheral blood mononuclear cell;PBMC)를 EGM-2MV(Microvascular Endothelial Cell Growth Media-2) 배지에 현탁하여 씨딩(seeding)한 후, 5일 내지 8일동안 매일 배지를 교환하면서 T세포를 제거하여 배양함으로써 획득되는, 심장내막 유래의 성체줄기세포.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 성체줄기세포는 다음과 같은 특성을 나타내는 것을 특징으로 하는, 심장내막 유래의 성체줄기세포:
(a) NFATc1, MixL1 및 CD31에 대하여 양성의 면역학적 특성을 나타내고, WNT5A 및 CD3에 대하여 음성의 면역학적 특성을 나타냄; 및
(b) 부착되어 성장하며, 선형태(spindle-shape)의 형태학적 특성을 나타냄.
- [청구항 3] 말초혈액에서 말초혈액단핵세포(peripheral blood mononuclear cell;PBMC)를 분리한 후 EGM-2MV(Microvascular Endothelial Cell Growth Media-2) 배지에 현탁하여 씨딩(seeding)하는 단계; 및 상기 씨딩 후 5일 내지 8일동안 매일 배지를 교환하면서 T세포를 제거하여 배양하는 단계를 포함하는, 심장내막 유래의 성체줄기세포의 제조방법.
- [청구항 4] 제 3 항에 있어서, 상기 성체줄기세포는 다음과 같은 특성을 나타내는 것을 특징으로 하는, 심장내막 유래의 성체줄기세포의 제조방법:
(a) NFATc1, MixL1 및 CD31에 대하여 양성의 면역학적 특성을 나타내고, WNT5A 및 CD3에 대하여 음성의 면역학적 특성을 나타냄; 및
(b) 부착되어 성장하며, 선형태(spindle-shape)의 형태학적 특성을 나타냄.
- [청구항 5] 제1항 또는 제2항의 성체줄기세포를 유효성분으로 함유하는, 혈관질환 치료용 세포치료제.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 혈관질환은 심근경색 또는 하지허혈인 것을 특징으로 하는 세포치료제.
- [청구항 7] 제1항 또는 제2항의 성체줄기세포를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 혈관질환의 예방 또는 치료방법.
- [청구항 8] 제1항 또는 제2항의 성체줄기세포의 혈관질환 예방 또는 치료 용도.

[Fig. 1]

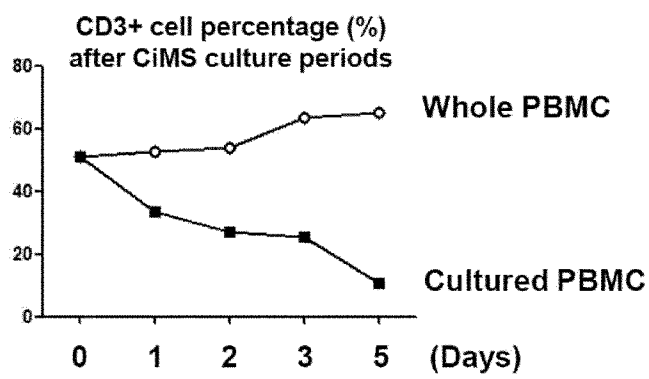


[Fig. 2]

2A



2B

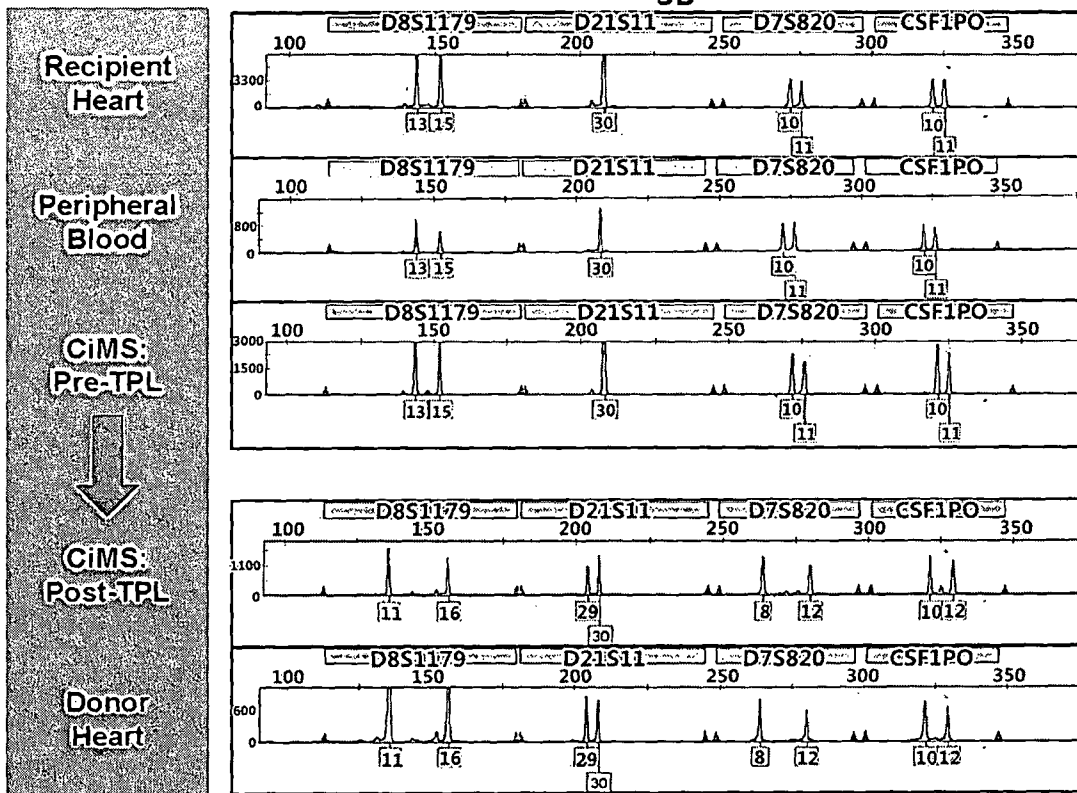


[Fig. 3]

3A

Transplant	Bone Marrow		Liver		Kidney	
Matching Test	The STR profile		The HLA type		The HLA type	
CiMS: Identical to	Donor	Recipient	Donor	Recipient	Donor	Recipient
Patient 1		O		O		O
Patient 2		O		O		O
Patient 3		O		O		O
Patient 4		O		O		O

3B

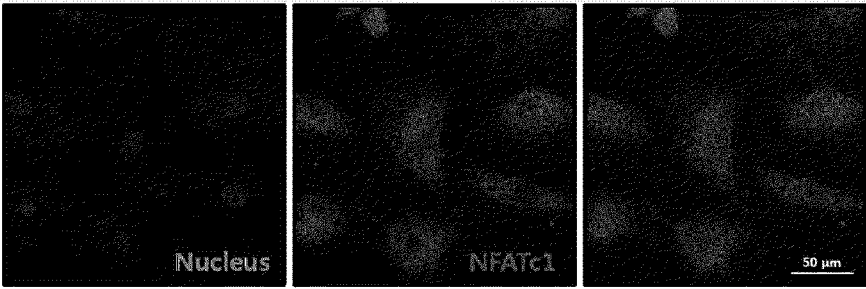


	Pre-transplantation	Post-transplantation
	The STR profile of CiMS Identical to	The STR profile of CiMS Identical to
Patient 1	Recipient Heart	Donor Heart
Patient 2	Recipient Heart	Donor Heart
Patient 3	Recipient Heart	Donor Heart
Patient 4	Recipient Heart	Donor Heart
Patient 5	Recipient Heart	Donor Heart

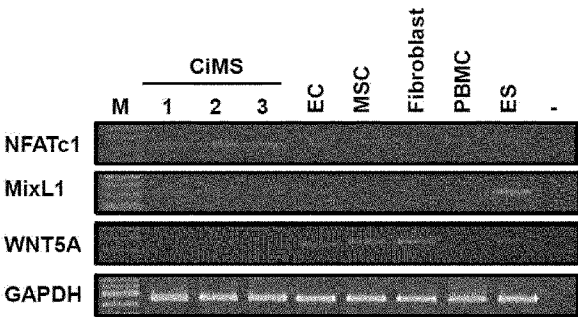
	Pre-transplantation	Post-transplantation
	The STR profile of CiMS Identical to	The STR profile of CiMS Identical to
Patient 6		Donor Heart
Patient 7		Donor Heart
Patient 8		Donor Heart
Patient 9		Donor Heart
Patient 10		Donor Heart
Patient 11		Donor Heart

[Fig. 4]

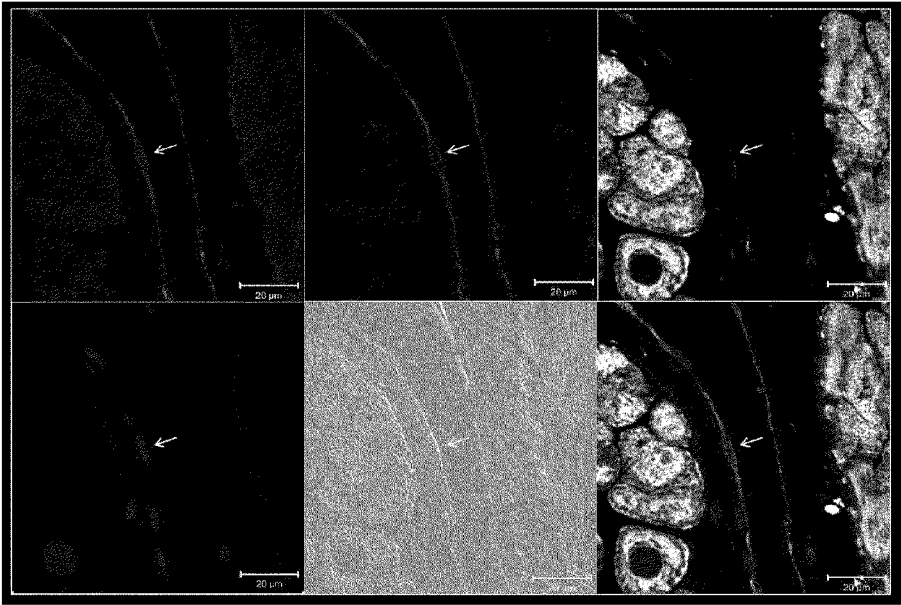
4A



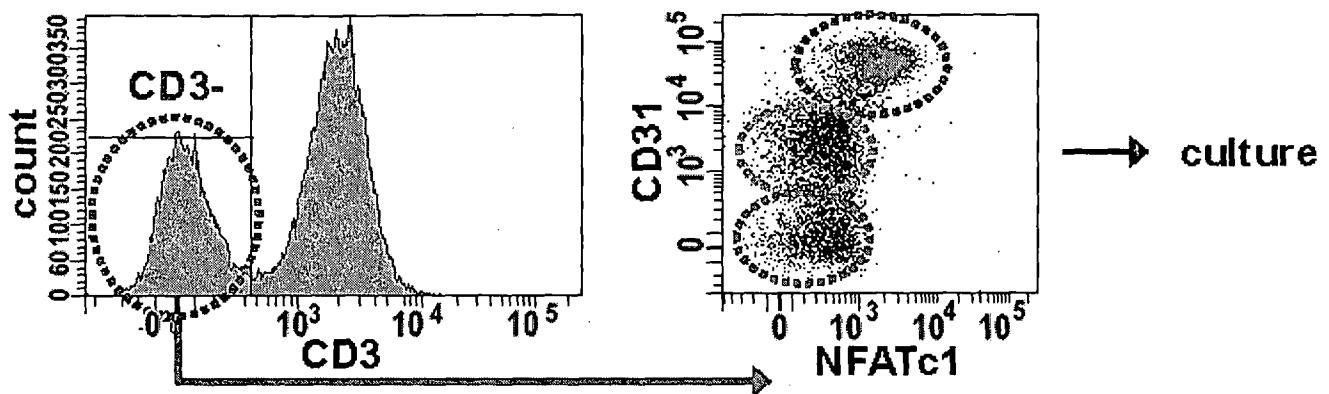
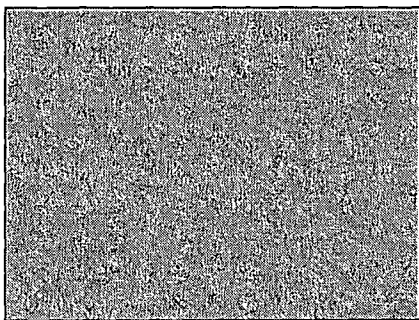
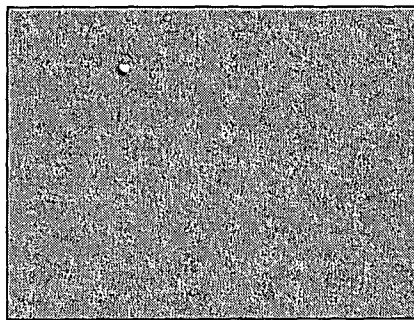
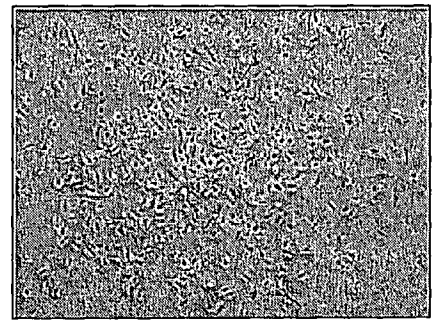
4B



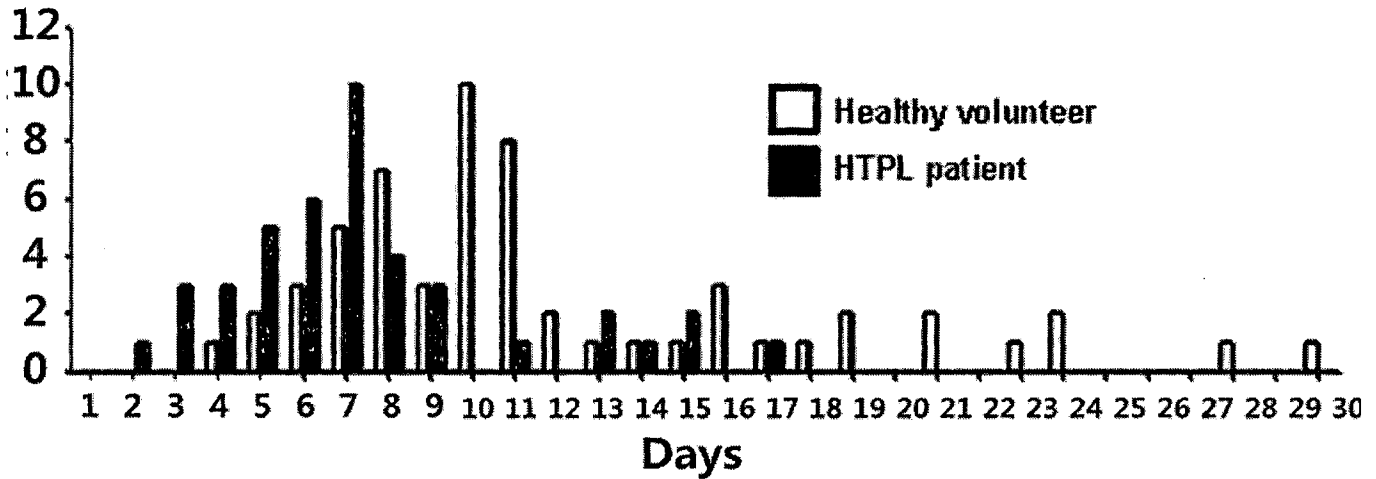
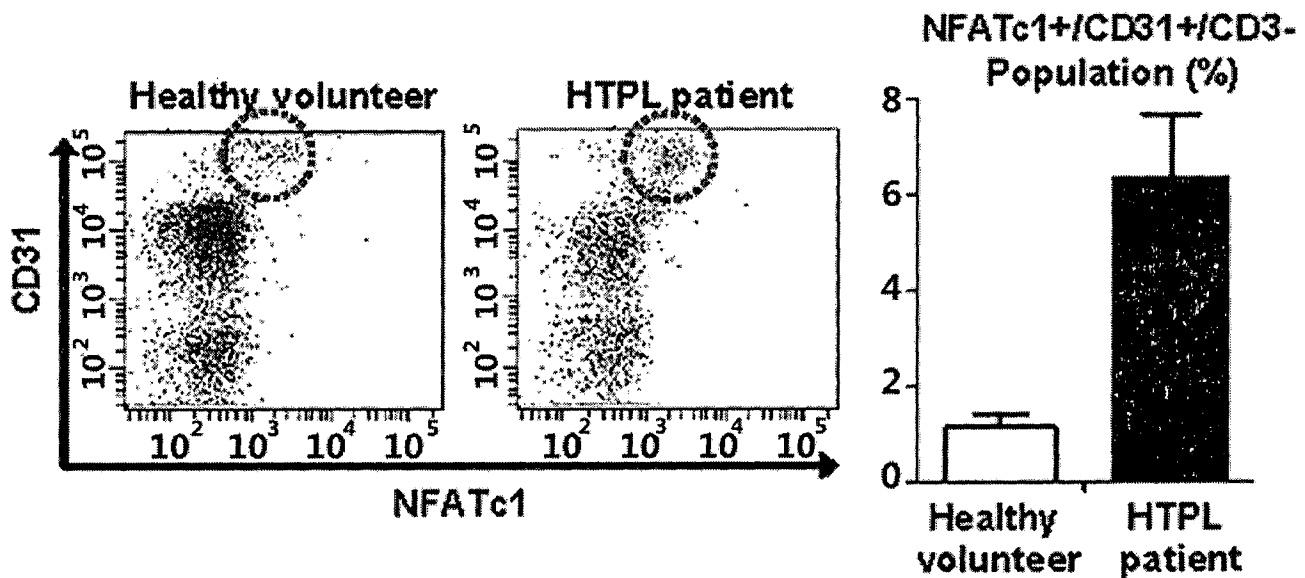
[Fig. 5]



[Fig. 6]

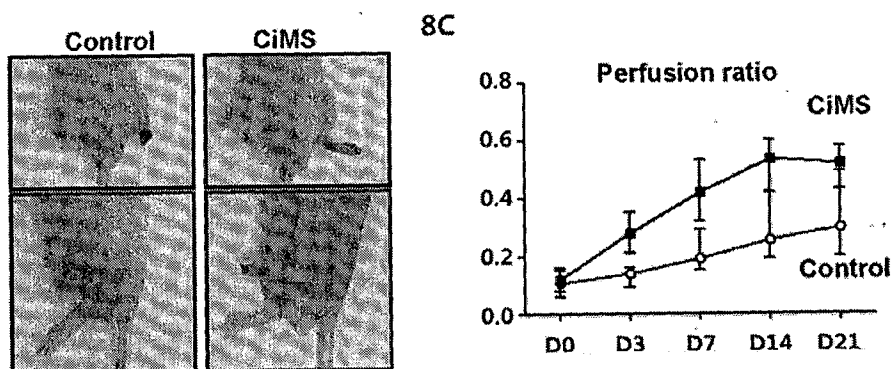
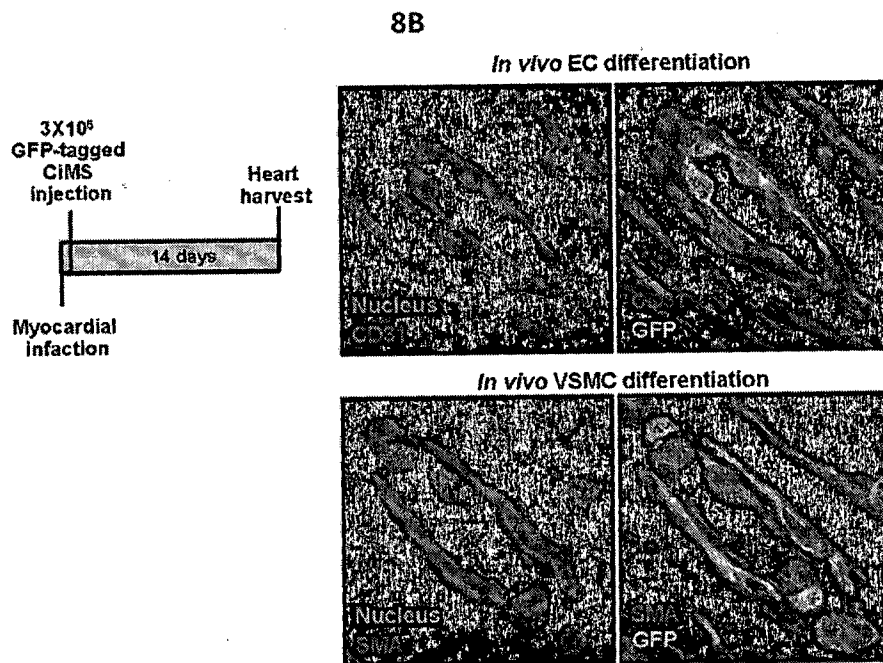
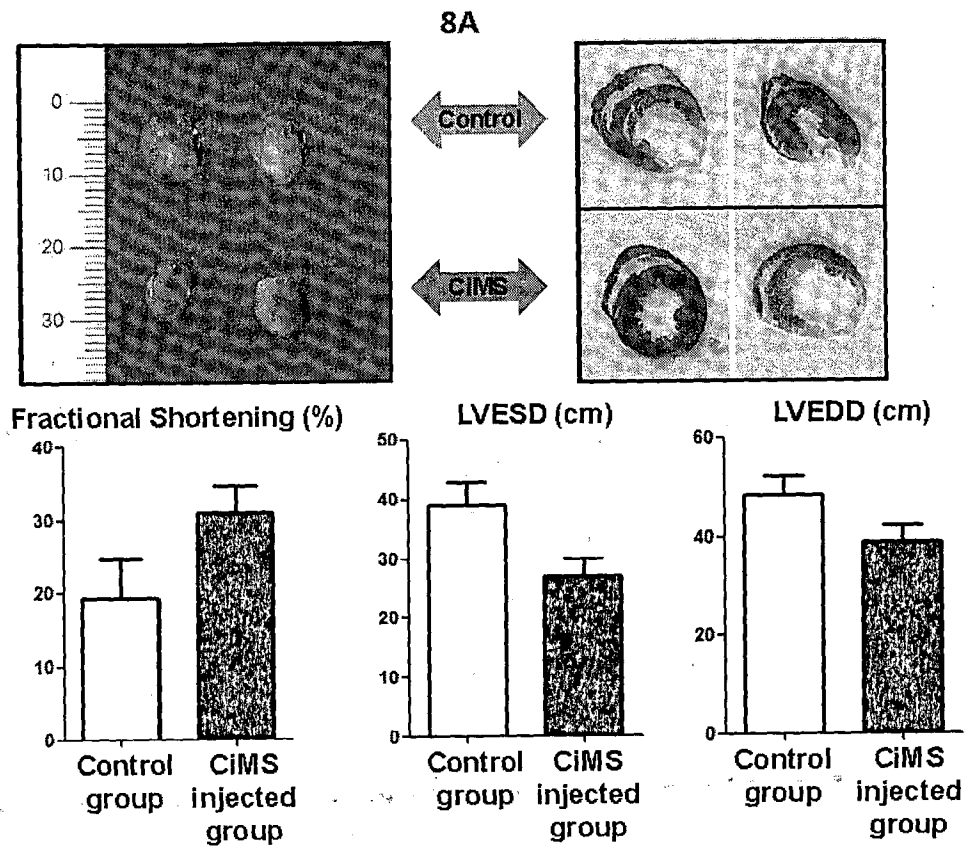
NFATc1+/CD31+/CD3- population sorting from human PBMC**NFATc1-/CD31-/CD3-****No growth****NFATc1-/CD31+/CD3-****No growth****NFATc1+/CD31+/CD3-****CiMS colony**

[Fig. 7]

7A**Appearance time of CiMS****7B****NFATc1+/CD31+/CD3- population in PBMC from healthy volunteer and HTPL patients**

[Fig. 8]

7/7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/003313**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 5/074(2010.01)i, C12N 5/02(2006.01)i, A61K 35/12(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)

C12N 5/074; A61P 9/00; C12N 5/071; C12N 5/02; A61K 35/12; A61K 9/48; C12N 5/0789

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: peripheral blood mononuclear cell; PBMC, endocardium stem cell, NFATc1, MixL1, CD31, Wnt5A

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2010-0129440 A1 (YONG, Zhao et al.) 27 May 2010 See abstract; paragraph [0099].	1-6,8
A	US 2010-0061966 A1 (MARBAN, Eduardo et al.) 11 March 2010 See claims 1, 16; paragraphs [0058]-[0059].	1-6,8
A	KR 10-2007-0054140 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY FOUNDATION) 28 May 2007 See the examples.	1-6,8
A	KR 10-2011-0045760 A (SNU R&DB FOUNDATION) 04 May 2011 See abstract.	1-6,8



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

30 JULY 2014 (30.07.2014)

Date of mailing of the international search report

31 JULY 2014 (31.07.2014)

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. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/003313

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 7
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 7 pertains to a treatment method of the human by surgery or therapy, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/003313

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2010-0129440 A1	27/05/2010	CA 2666789 A1	24/04/2008
		EP 1941031 A2	09/07/2008
		EP 1941031 B1	25/12/2013
		US 2009-0175832 A1	09/07/2009
		WO 2007-044314 A2	19/04/2007
		WO 2007-044314 A3	13/09/2007
		WO 2008-048671 A1	24/04/2008
US 2010-0061966 A1	11/03/2010	AU 2005-304708 A1	18/05/2006
		AU 2005-304708 B2	19/01/2012
		AU 2005-304710 A1	18/05/2006
		CA 2585980 A1	18/05/2006
		CA 2586276 A1	18/05/2006
		CN 101087563 A0	12/12/2007
		CN 101437938 A	20/05/2009
		EP 1809740 A2	25/07/2007
		EP 1809740 A4	25/11/2009
		EP 1838220 A2	03/10/2007
		EP 2546333 A2	16/01/2013
		EP 2546333 A3	10/04/2013
		JP 05-202953 B2	05/06/2013
		JP 2008-518730 A	05/06/2008
		JP 2008-518730 T	05/06/2008
		JP 2008-518731 A	05/06/2008
		JP 2013-046780 A	07/03/2013
		US 2008-0267921 A1	30/10/2008
		US 2009-0012422 A1	08/01/2009
		US 2010-0068811 A1	18/03/2010
		WO 2006-052925 A2	18/05/2006
		WO 2006-052925 A3	14/05/2009
		WO 2006-052927 A2	18/05/2006
		WO 2006-052927 A3	12/07/2007
KR 10-2007-0054140 A	28/05/2007	EP 1807509 A1	18/07/2007
		EP 1807509 B1	18/11/2009
		JP 2007-528229 A	11/10/2007
		US 2007-0110727 A1	17/05/2007
		WO 2007-024036 A1	01/03/2007
KR 10-2011-0045760 A	04/05/2011	CN 102686724 A	19/09/2012
		EP 2495311 A1	05/09/2012
		JP 2013-507981 A	07/03/2013
		US 2012-0276625 A1	01/11/2012
		WO 2011-052818 A1	05/05/2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 5/074(2010.01)i, C12N 5/02(2006.01)i, A61K 35/12(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 5/074; A61P 9/00; C12N 5/071; C12N 5/02; A61K 35/12; A61K 9/48; C12N 5/0789 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: 말초혈액단핵세포, 심장내막 줄기세포, NFATc1, MixL1, CD31, Wnt 5A		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 2010-0129440 A1 (ZHAO YONG 외 1명) 2010.05.27. 초록; 식별번호 [0099] 참조.	1-6, 8
A	US 2010-0061966 A1 (MARBAN EDUARDO 외 2명) 2010.03.11. 청구항 1, 16; 식별번호 [0058]-[0059] 참조.	1-6, 8
A	KR 10-2007-0054140 A (재단법인서울대학교산학협력재단) 2007.05.28. 실시에 참조.	1-6, 8
A	KR 10-2011-0045760 A (서울대학교산학협력단) 2011.05.04. 초록 참조.	1-6, 8
☐ 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 “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 2014년 07월 30일 (30.07.2014)		국제조사보고서 발송일 2014년 07월 31일 (31.07.2014)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 이효진 전화번호 +82-42-481-8743 

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 7
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 7은 수술 또는 치료에 의한 사람의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2010-0129440 A1	2010/05/27	CA 2666789 A1 EP 1941031 A2 EP 1941031 B1 US 2009-0175832 A1 WO 2007-044314 A2 WO 2007-044314 A3 WO 2008-048671 A1	2008/04/24 2008/07/09 2013/12/25 2009/07/09 2007/04/19 2007/09/13 2008/04/24
US 2010-0061966 A1	2010/03/11	AU 2005-304708 A1 AU 2005-304708 B2 AU 2005-304710 A1 CA 2585980 A1 CA 2586276 A1 CN 101087563 A0 CN 101437938 A EP 1809740 A2 EP 1809740 A4 EP 1838220 A2 EP 2546333 A2 EP 2546333 A3 JP 05-202953 B2 JP 2008-518730 A JP 2008-518730 T JP 2008-518731 A JP 2013-046780 A US 2008-0267921 A1 US 2009-0012422 A1 US 2010-0068811 A1 WO 2006-052925 A2 WO 2006-052925 A3 WO 2006-052927 A2 WO 2006-052927 A3	2006/05/18 2012/01/19 2006/05/18 2006/05/18 2006/05/18 2007/12/12 2009/05/20 2007/07/25 2009/11/25 2007/10/03 2013/01/16 2013/04/10 2013/06/05 2008/06/05 2008/06/05 2008/06/05 2013/03/07 2008/10/30 2009/01/08 2010/03/18 2006/05/18 2009/05/14 2006/05/18 2007/07/12
KR 10-2007-0054140 A	2007/05/28	EP 1807509 A1 EP 1807509 B1 JP 2007-528229 A US 2007-0110727 A1 WO 2007-024036 A1	2007/07/18 2009/11/18 2007/10/11 2007/05/17 2007/03/01
KR 10-2011-0045760 A	2011/05/04	CN 102686724 A EP 2495311 A1 JP 2013-507981 A US 2012-0276625 A1 WO 2011-052818 A1	2012/09/19 2012/09/05 2013/03/07 2012/11/01 2011/05/05