

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

정정판

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2020년 10월 29일 (29.10.2020)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호

WO 2020/218727 A9

(51) 국제특허분류:

C07K 5/06 (2006.01)

C07K 5/062 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

A23L 33/18 (2016.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2020/002769

(22) 국제출원일:

2020년 2월 26일 (26.02.2020)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2019-0049237 2019년 4월 26일 (26.04.2019) KR

(71) 출원인: 계명대학교 산학협력단 (INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY) [KR/KR]; 42601 대구시 달서구 달구벌대로 1095, Daegu (KR).

(72) 발명자: 이승욱 (LEE, Syng Ook); 42913 대구시 달성군 다사읍 대실역북로 26, 207동 102호, Daegu (KR). 조혜

린 (CHO, Hye-Rin); 42278 대구시 수성구 달구벌대로 3280, 104동 505호, Daegu (KR).

(74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 08506 서울시 금천구 가산디지털로151 이노플렉스1차 601호, Seoul (KR).

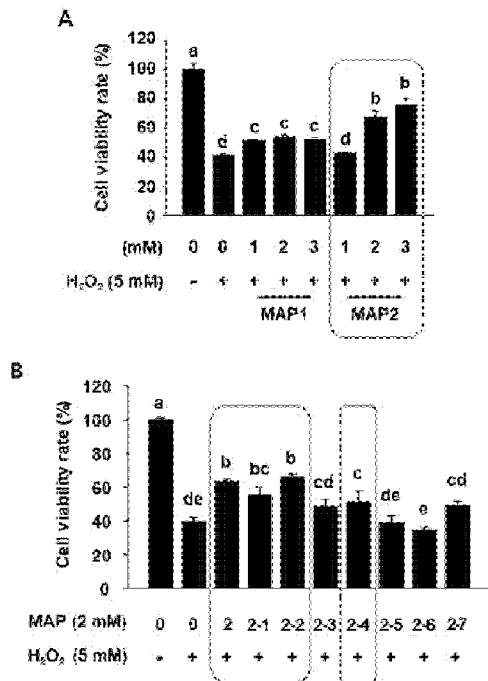
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유

(54) Title: PEPTIDE ISOLATED FROM PROTEIN HYDROLYSATE OF TENEBRIO MOLITOR MEALWORM AND COMPOSITION COMPRISING SAME AS ACTIVE INGREDIENT FOR PREVENTION OR TREATMENT OF LIVER INJURY

(54) 발명의 명칭: 갈색거저리 유충의 단백질 가수분해물로부터 분리된 펩타이드 및 이를 유효성분으로 포함하는 간 손상 예방 또는 치료용 조성물

[도11]



(57) Abstract: The present invention relates to peptides isolated from a protein hydrolysate of Tenebrio molitor mealworm and a composition comprising same as an active ingredient for prevention or treatment of liver injury. According to the present invention, a protein hydrolysate of Tenebrio molitor mealworm contains biologically active peptides having a size of 1 kDa or less, reduces the generation of reactive oxygen species, and increases the expression and activity of antioxidative enzymes, thereby effectively protecting hepatocytes from oxidative stress. Thus, the peptide can be advantageously used in a composition for prevention or treatment of liver injury, a health food composition for prevention or alleviation of liver injury, a health food composition for protection of the liver, an anti-oxidative health food composition, and so on.

(57) 요약서: 본 발명은 갈색거저리 유충의 단백질 가수분해물로부터 분리된 펩타이드 및 이를 유효성분으로 포함하는 간 손상 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물은 1 kDa 이하 크기의 생리활성 펩타이드를 포함하여 활성산소의 생성을 감소시키고 항산화 효소들의 발현과 활성을 증가시킴으로써 산화적 스트레스로부터 간세포를 효과적으로 보호하는 바, 간 손상 예방 또는 치료용 조성물, 간 손상 예방 또는 개선용 건강식품 조성물, 간 보호용 건강식품 조성물, 항산화용 건강식품 조성물 등으로 유용하게 활용될 수 있다.



럼 (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))
- 규칙 91.3(b) 규정에 의한 명백한 잘못의 정정 허가에 관한 정보와 함께 (규칙 48.2(i))

(88) 국제조사보고서 공개일:

2020 년 12 월 30 일 (30.12.2020)

(48) 본 정정판 공개일:

2021 년 2 월 18 일 (18.02.2021)

(15) 정정사항에 관한 정보:

2021 년 2 월 18 일 (18.02.2021) 자 공지 참조

명세서

발명의 명칭: 갈색거저리 유충의 단백가수분해물로부터 분리된 펩타이드 및 이를 유효성분으로 포함하는 간 손상 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 갈색거저리 유충의 단백가수분해물로부터 분리된 펩타이드 및 이를 유효성분으로 포함하는 간 손상 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 최근 국제식량농업기구(FAO)에서는 질병이나 환경오염으로 인한 식량부족 문제를 해결하기 위한 정책으로 미래 식량자원으로서의 식용 곤충의 활성화 방안을 발표한 바 있고, 이에 대한 관심이 전 세계적으로 증대되고 있다. 이와 맞맞추어 국내에서는 농림수산식품부가 “곤충산업육성 5개년 종합계획”을 발표하였고, 그에 따라 곤충 산업에 대한 지원이 이루어져 왔다.
- [3] 곤충은 약 100만 종 이상 보고되었음에도 100만 종 이상이 아직 보고되지 않은 상태로 남아있다고 예측될 정도로 지구상에서 가장 다양성이 풍부한 종이다. 예로부터 곤충은 약용으로 사용해 왔으며, 그 중 누에, 메뚜기, 굼벵이, 지네 등은 당뇨, 염증성 질환, 간 질환 및 동맥경화 등의 만성 질환 치료에 효과적이라는 연구결과가 보고되었다.
- [4] 한편, 갈색거저리(*Tenebrio molitor*)는 딱정벌레목 거저리과의 곤충으로 "갈색쌀거저리"라고도 불린다. 현재 한국을 비롯한 전 세계에 분포되어 있으며, 강한 적응력, 짧은 번데기 기간 및 연중 사육으로 인해 산업화에 용이한 곤충이다. 또한, 갈색거저리의 영양성분은 수분이 2.90%, 조단백질이 50.32%, 조지방이 33.70%, 조회분이 3.76%, 조섬유가 4.81%로, 매우 높은 영양성분들을 가지고 있다. 이와 관련하여, 갈색거저리가 단백질 함량이 매우 높은 고단백질 소재로 2016년 식용곤충원료로 식품공전에 등록됨으로써 갈색거저리의 활용에 대한 관심이 높아지고 있다. 갈색거저리 유충(mealworm)은 대두보다 필수 아미노산을 많이 함유하고 있고, 육류에 비해 불포화 지방산 함량이 높으며, 비타민 A와 철, 식이섬유 등이 비교적 풍부하다. 더욱이, 가축 사육과는 달리 곤충 사육에 필요한 땅을 개선할 필요가 없고, 적은 사료만으로도 간편하게 많은 양의 곤충을 사육하여 보급할 수 있으므로 경제적 부담이 적은 장점도 있다.
- [5] 갈색거저리 유충에 관한 연구로는 갈색거저리 유충 추출물의 간암세포에 대한 세포 독성 효능, 갈색거저리 에탄올 추출물의 멜라닌 생성 저해 효과 등이 있으나, 갈색거저리 유충의 가수분해물로부터 분리된 생리활성 펩타이드 및 이를 이용한 간 손상 치료 또는 간 보호 효과에 대한 연구는 부족한 실정이다.
- [6] 생리활성 펩타이드는 일반적으로 생리적 활성을 가지는 분자량이 작은 펩타이드로 정의되며, 보통 3-20개의 아미노산으로 구성되고 아미노산의

조성이나 서열에 따라 그 활성이 다양하다. 또한, 크기가 작아 생체 내로 쉽게 흡수되어 다양한 기능적 특성을 나타낸다. 지금까지 연구된 생리활성 펩타이드의 효과로는 우유 단백질 가수분해물의 체내 항산화 기능 향상과 가공식품에서의 산화 반응 방지, 달걀흰자 가수분해물의 새로운 항균 펩타이드 등이 있으며, 그 외에도 항 고혈압, 항 혈전, 면역조절 등의 생리활성 펩타이드의 기능성 연구가 활발하게 진행되고 있다.

- [7] 즉, 갈색거저리 유충은 사육이 용이하고 다양한 영양소를 함유하고 있는 바, 갈색거저리 유충에서 분리된 생리활성 펩타이드 획득을 위한 기술 개발 및 이를 이용한 새로운 간 손상 치료제 또는 간 보호제 개발이 필요한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명의 목적은 갈색거저리 유충의 단백가수분해물로부터 분리된 펩타이드를 제공하는 데에 있다.
- [9] 본 발명의 다른 목적은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간 손상 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데에 있다.
- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간 손상 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공하는 데에 있다.
- [11] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간 보호용 건강식품 조성물을 제공하는 데에 있다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항산화용 건강식품 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제 해결 수단

- [13] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 5로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 제공한다.
- [14] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간 손상 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간 손상 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.
- [16] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간 보호용 건강식품 조성물을 제공한다.
- [17] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항산화용 건강식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [18] 본 발명에 따르면, 갈색거저리 유충 단백가수분해물은 1 kDa 이하 크기의 생리활성 펩타이드를 포함하여 활성산소의 생성을 감소시키고 항산화 효소들의 발현과 활성을 증가시킴으로써 산화적 스트레스로부터 간세포를 효과적으로

보호하는 바, 간 손상 예방 또는 치료용 조성물, 간 손상 예방 또는 개선용 건강식품 조성물, 간 보호용 건강식품 조성물, 항산화용 건강식품 조성물 등으로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [19] 도 1은 H_2O_2 에 대한 갈색거저리 유충 단백질가수분해물의 간세포 보호 활성을 확인한 결과이다.
- [20] 도 2 및 도 3은 H_2O_2 에 대한 갈색거저리 유충 저분자 알칼라아제 단백질가수분해물의 간세포 보호 활성을 확인한 결과이다.
- [21] 도 4는 알코올에 대한 갈색거저리 유충 저분자 알칼라아제 단백질가수분해물의 간세포 보호 활성을 확인한 결과이다.
- [22] 도 5는 갈색거저리 유충 저분자 알칼라아제 단백질가수분해물의 활성산소 생성 감소 및 항산화 효소 증가를 확인한 결과이다.
- [23] 도 6은 갈색거저리 유충 저분자 알칼라아제 단백질가수분해물의 총 GSH 함량, 카탈라아제 활성 및 Ho-1 단백질의 증가를 확인한 결과이다.
- [24] 도 7은 갈색거저리 유충 저분자 알칼라아제 단백질가수분해물의 Nrf2 단백질 발현 증가 및 핵 내 이동(활성화)을 확인한 결과이다.
- [25] 도 8은 H_2O_2 에 대한 갈색거저리 유충 저분자 알칼라아제 단백질가수분해물 분획물의 간세포 보호 활성을 확인한 결과이다.
- [26] 도 9는 상기 분획물을 역상 HPLC로 분리하여 머무름 시간별로 제조된 총 4종의 분획물(fr. 0-4)의 간세포 보호 활성을 확인한 결과이다.
- [27] 도 10은 상기 fr. 2 분획물 내에 함유되어 있는 헥사머 1종(MAP1) 및 다이머 1종(MAP2)의 펩타이드 및 이의 서열을 확인한 결과이다.
- [28] 도 11은 상기 MAP2 구조를 기초로 합성한 아미노산 결실 변이체의 간세포 보호 활성을 확인한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [29] 본 발명의 발명자들은 갈색거저리 유충의 저분자 단백질가수분해물이 1 kDa 이하 크기의 생리활성 펩타이드를 포함하며, 산화적 스트레스로부터 간세포 보호 활성을 나타내는 것을 확인하며 본 발명의 완성하였다.
- [30]
- [31] 이에, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 5로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 제공한다.
- [32] 상기 펩타이드는 단백질 가수분해효소인 알칼라아제(Alcalase)로 가수분해된 갈색거저리(*Tenebrio molitor*) 유충의 단백질가수분해물로부터 분리된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [33] 상기 알칼라아제는 박테리아나 진균에서 생성되는 단백질 가수분해 효소로, pH 7-9 부근의 조건에서 강한 단백질 분해능을 나타낼 수 있다.
- [34] 상기 펩타이드는 1 kDa 이하의 크기를 가지는 펩타이드일 수 있으나, 이에

제한되는 것은 아님을 명시한다.

[35] 상기 펩타이드는 간세포 보호 활성을 나타낼 수 있고, 활성산소의 생성을 감소시키고 항산화 효소의 발현과 활성을 증가시킬 수 있다.

[36] 상기 항산화 효소는 글루타치온 합성효소(glutathione synthetase), 글루탐산염 시스테인 연결효소(glutamate-cysteine ligase), 글루탐산염 시스테인 변경 서브유닛(glutamate-cysteine ligase modifier subunit) 및 카탈라아제(catalase)로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[37]

[38] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간 손상 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[39] 상기 간 손상은 산화적 스트레스, 과로, 약물, 독성물질, 알코올, 비알코올, 지방간, 간경화 또는 감염으로 유도되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[40] 상기 산화적 스트레스는 활성산소에 기인한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[41]

[42] 본 발명의 조성물이 약학 조성물인 경우, 투여를 위하여, 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다.

상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[43] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형 제제는 상기 유효성분 외에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 과제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르

등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텡솔, 마크로솔, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[44] 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 시간에 따라 다르지만, 당 업자에 의해 적절하게 선택될 수 있는 바, 상기 조성물의 일일 투여량은 바람직하게는 0.001 mg/kg 내지 50 mg/kg이며, 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.

[45]

[46] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간 손상 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.

[47]

[48] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간 보호용 건강식품 조성물을 제공한다.

[49]

[50] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항산화용 건강식품 조성물을 제공한다.

[51]

[52] 본 발명의 조성물이 건강식품 조성물인 경우, 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일 주스, 합성 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.

[53] 또한, 상기 건강식품 조성물은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, 식품첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전처에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반 시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[54] 상기 식품첨가물공전에 기재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산 칼륨, 니코틴산, 게피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고령색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가 알칼리제, 보존료제제, 타르색소 제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다.

[55] 이때, 건강식품 조성물을 제조하는 과정에서 식품에 첨가되는 본 발명에 따른 조성물은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[56] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[57]

[58] **실시예 1: 갈색거저리 유충 단백질가수분해물 제조**

[59] 본 실험에서 사용된 갈색거저리 유충은 영농조합법인 예천곤충나라에서 생산, 판매된 것으로 열풍건조된 형태로 구입하였으며, -20°C 동결고에 저장하여 실험에 사용하였다.

[60] 상기 열풍건조된 유충을 증류수에 현탁하여 4%(w/v)의 기질용액으로 제조한 후, 95°C에서 20분간 중탕시켜 자가 효소를 불활성화 시켰다. 기질용액에 기질 대비 1%의 효소(알칼라아제, 뉴트라아제, 플라보르자임)(w/w)를 각각 첨가하고, 55°C, 100 rpm에서 8시간 동안 가수분해시켰다. 이후 95°C에서 20분간 효소를 불활성화 시켰다. 방랭한 후 단백가수분해물을 4°C, 12,000 xg로 15분 동안 원심분리하여 고형분을 제거하고 상등액을 획득하였으며, 상등액은 저분자 펩타이드의 분리를 위해 cell strainer로 필터하였다. Membrane filter를 이용하여 4°C, 5,000 xg로 1시간 동안 원심분리 함으로써 최종적으로 분자량 3 kDa 이하와 1 kDa 이하의 단백가수분해물을 각각 획득하였다.

[61]

[62] **실시예 2: 세포 배양**

[63] 마우스 유래 정상 간세포인 AML-12 세포는 American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)에서 분양 받아 사용하였으며, 분양 받은 후 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS), 1% 인슐린-트랜스페린-셀레늄(insulin-transferrin-selenium; ITS), 1% 항생제(페니실린/스트렙토마이신) 및 덱사메타손(40 ng/mL)이 포함된 DMEM/F-12 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

[64]

[65] **실시예 3: 산화적 스트레스에 대한 갈색거저리 유충 단백질가수분해물의 간세포 보호 활성 분석**

[66] 활성산소로 인한 세포독성으로부터 갈색거저리 유충 단백질가수분해물의 간세포 보호 효과를 분석하기 위하여, AML-12 세포를 2×10⁴ 세포/웰의 밀도로 96-웰 플레이트에 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 이후, 알칼라아제, 뉴트라아제 및 플라보르자임 처리 단백가수분해물을 각 농도 별로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 이후, 7 mM의 H₂O₂를 1시간 처리하고, MTT 시약(2.5 mg/mL)을 각 웰에 20 µL씩 첨가하여 3시간 동안 반응시킨 다음, 상층액을 제거하고 각 웰에 생성된 포르마잔(formazan) 결정을 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide; DMSO)로 용해시켜 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 간세포 보호 효과는 H₂O₂ 무처리군(대조군)의 생존율을 기준으로 각 처리군의 상대적인 세포

생존율(cell viability)을 평가하여 계산하였다.

[67] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 7 mM H₂O₂를 처리한 세포의 경우 생존율이 22% 정도로 감소한 반면, 각 단백질가수분해물을 처리한 세포의 경우 세 가지 효소 처리군 모두에서 유의적으로 세포 생존율의 증가를 나타내었다. 특히, 그 중 알칼라아제 처리 단백질가수분해물은 2.5와 5 mg/mL의 농도에서 다른 두 효소 가수분해물에 비해 유의적($P < 0.05$)으로 높은 간세포 보호 효과를 나타내었다. 알칼라아제 처리 단백질가수분해물은 2.5와 5 mg/mL의 농도에서 각각 69 및 78%의 세포 생존율을 나타내는 바, 활성산소에 의한 세포독성으로부터 간세포를 보호하는 효과가 가장 큰 것을 확인할 수 있었다.

[68] 즉, 알칼라아제, 뉴트라아제 및 플라보르자임 처리 단백질가수분해물이 간세포 보호 효과를 나타내는 것을 확인하였으며, 특히 알칼라아제 처리 단백질가수분해물의 간세포 보호 효과가 가장 큰 것으로 나타났다.

[69]

[70] **실시예 4: 산화적 스트레스에 대한 갈색거저리 유충 저분자(MW<1 kDa) 단백질가수분해물의 간세포 보호 활성 분석**

[71] 산화적 스트레스에 대한 간세포 보호 활성이 가장 우수한 갈색거저리 유충의 알칼라아제 단백질가수분해물을 대상으로 자세한 간세포 보호 활성을 분석하였다

[72] 먼저, 한외 여과막을 이용하여 알칼라아제 단백질가수분해물을 순차적으로 1-3 kDa과 1 kDa 이하 크기로 분리한 후 H₂O₂에 대한 간세포 보호 활성을 비교하였다. 그 결과, 도 2 및 도 3에 나타난 바와 같이, 1-3 kDa 크기의 단백질가수분해물보다 1 kDa 이하 크기의 저분자 단백질가수분해물이 상대적으로 우수한 간세포 보호 활성을 나타내었으며, 0.1-5.0 mg/mL 처리 농도에서 농도 의존적인 간세포 보호 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

[73] 또한, 도 4에 나타난 바와 같이, 1 kDa 이하 크기의 저분자 알칼라아제 단백질가수분해물은 알코올에 대해서도 유의적인 간세포 보호 활성을 나타내었다.

[74] 즉, 상기 결과들로부터 갈색거저리 유충에 알칼라아제 처리 시, 간세포 보호 활성을 가지는 펩타이드가 생성되고, 1 kDa 이하 크기의 저분자 펩타이드의 간세포 보호 활성이 상대적으로 높은 것을 확인할 수 있었다.

[75] **실시예 5: 산화적 스트레스에 대한 갈색거저리 유충 저분자(MW<1 kDa) 단백질가수분해물의 간세포 보호 활성 기전 분석**

[76] 단백질가수분해물의 간세포 보호 활성 기전을 분석하기 위하여, AML12 세포에 알칼라아제 단백질가수분해물을 처리하고 24시간 동안 배양한 후, 7 mM의 H₂O₂를 처리하여 1시간 동안 추가 배양한 후 세포 내 ROS 생성량을 측정하였다.

[77] 그 결과, 도 5A에 나타난 바와 같이, H₂O₂ 단독 처리구에 비해 저분자 알칼라아제 단백질가수분해물을 전처리한 세포에서 ROS의 생성량이 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 상기 결과는 저분자 알칼라아제 단백질가수분해물(MW<1 kDa)이 세포 내 ROS 생성을 유의적으로 감소시킴으로써

산화적 스트레스로부터 AML12 세포를 보호한다는 것을 의미한다.

[78]

[79] 더불어, AML12 세포에 알칼라아제 단백가수분해물을 처리하고 18시간 동안 배양한 후 mRNA 발현 수준을 qPCR로 측정하였다. ROS 생성 억제에 관여하는 기전을 분석하기 위하여, 대표적인 세포 내 항산화 시스템을 구성하는 유전자들의 발현에 미치는 단백가수분해물의 영향을 분석하였다. 이를 위해 q-PCR 분석법을 이용하였으며, 분석 대상이 된 유전자는 하기 표 1에 나타난 바와 같이, 항산화 물질인 GSH의 합성에 관여하는 Gss, Gclc, Gclm과 세포 내 ROS 대사에 관여하는 대표적인 항산화 효소로 알려진 Sod1, Sod2, Gpx2, Cat, Gr 그리고 Ho-1 총 9종의 유전자이다.

[80] 그 결과, 도 5B에 나타난 바와 같이, GSH 합성에 관여하는 효소들인 Gss, Gclc와 Gclm과 항산화 효소인 Cat과 Ho-1의 유전자 발현이 저분자 알칼라아제 단백가수분해물(5 mg/mL) 처리에 의해 대조구 대비 2배 이상 증가하는 것을 확인하였다.

[81] 또한, AML12 세포에 알칼라아제 단백가수분해물을 처리하고 24시간 동안 배양한 후 총 GSH 함량과 카탈라아제 활성을 측정하였으며, 세포 용해물은 웨스턴 블롯을 수행하였다. 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 저분자 알칼라아제 단백가수분해물 처리에 따라 세포 내 총 GSH 함량과 카탈라아제 활성 그리고 Ho-1 단백질 발현량이 증가하는 것을 추가적으로 확인하였다.

[82]

[83] 이들 항산화 효소들의 발현은 일차적으로 전사인자인 Nrf2(nuclear factor-E2-related factor 2)에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. 즉 Nrf2는 이들 항산화 유전자의 프로모터에 존재하는 항산화 반응 요소(antioxidant response element; ARE)에 결합하여 이들 유전자의 발현과 단백질 생성을 조절함으로써 산화적 스트레스에 대한 생체방어기전에 핵심적 역할을 담당하고 있다.

[84] 알칼라아제 단백가수분해물이 Nrf2의 활성화에 미치는 영향을 분석하기 위하여, AML12 세포에 알칼라아제 단백가수분해물을 처리하고 4시간 동안 배양한 후 웨스턴 블롯 및 면역형광염색을 수행하였다. Nrf2 활성화제로 알려진 설포라판(Sulforaphane)은 대조군으로 사용하였다.

[85] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 저분자 알칼라아제 단백가수분해물을 전처리한 간세포에서 Nrf2 단백질 발현의 증가와 핵 내 이동(활성화)이 관찰되었다.

[86] 상기 결과들로부터 갈색거저리 유충의 저분자 알칼라아제 단백가수분해물(MW<1 kDa)이 Nrf2의 활성화를 유도하여 항산화 효소들(Gss, Gclc, Gclm, Cat, Ho-1)의 발현과 활성을 증가시킴으로써 산화적 스트레스로부터 간세포를 효과적으로 보호함을 확인하였다.

[87] [표1]

타겟 유전자		프라이머 서열
Tbp	SenceAntisence	5'-GTATGACTCCACTCACGGCA-3' 5'-GGTCTCGCTCCTGGAAGATG-3'
Gss	SenceAntisence	5'-GAAGCAGCTCGAAGAACTGG-3' 5'-AGCACTGGGTACTGGTGAGG-3'
Gclc	SenceAntisence	5'-CTGCACATCTACCACGCAGT-3' 5'-GTCTCAAGAACATCGCCTCC-3'
Gclm	SenceAntisence	5'-CCAAAACATCTGGAAACTCCC-3' 5'-CGGGAACCTGCTCAACTG-3'
Sod1	SenceAntisence	5'-ACCATCCACTTCGAGCAGAA-3' 5'-AAATGAGGTCCTGCACTGG-3'
Sod2	SenceAntisence	5'-AACTCAGGTCGCTCTTCAGC-3' 5'-GCTTGATAGCCTCCAGCAAC-3'
Gpx2	SenceAntisence	5'-AGGTCGGACATACTTGAGGC-3' 5'-GGTAGTTCTCGGCTTCCCTT-3'
Cat	SenceAntisence	5'-CCCGCGGTCATGATATTAAGT-3' 5'-GATGAAGCAGTGGAAGGAGC-3'
Gr	SenceAntisence	5'-ATCGTGCATGAATTCCGAGT-3' 5'-GGTGGTGGAGAGTCACAAGC-3'
Ho-1	SenceAntisence	5'-ACAACCAGTGAGTGGAGCCT-3' 5'-TCAAGGCCTCAGACAAATCC-3'

[88] * Gapdh; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Tbp; TATA-binding protein, Gss; glutathione synthetase, Gclc; glutamate-cysteine ligase, Gclm; glutamate-cysteine ligase modifier subunit, Sod1; superoxide dismutase 1 (soluble), Sod2; superoxide dismutase 2 (mitochondrial), GPx2; glutathione peroxidase 2, Cat; catalase, Gr; glutathione reductase, Ho-1; heme oxygenase-1

[89]

[90] 실시예 6: 저분자 알칼라아제 단백가수분해물로부터 활성 펩타이드 분리 및 정제

[91] 갈색거저리 유충 저분자 알칼라아제 단백가수분해물(MW<1 kDa)은 Sep-pak C18 카트리지와 메탄올(MeOH)을 이용하여 극성 차에 따라 부분적으로 분리하였다. 즉, 하기에 기재한 바와 같은 조건에서 역상 HPLC 분석을 수행하였는데, 카트리지에 상기 단백가수분해물을 주입한 후 물(SFM0), 10% MeOH(SFM10), 60% MeOH(SFM60) 및 100% MeOH(SFM100)로 각각 용출시켜

각 분획물을 제조하였다.

[92] <역상 HPLC 분석 조건>

[93] - 칼럼: AKZO NOBEL KR100-5C18 (4.6 x 250 mm), 30°C

[94] - 분석기: UV 220 nm

[95] - 용매: A, 0.1% 트리플루오로 아세트산(TFA) 수용액

[96] B, 0.1% TFA를 포함하는 아세토니트릴(ACN)

[97] - 용매 농도구배: A 용매는 농도를 95%에서 35%까지 그리고 B 용매는 농도를 5%에서 65%까지 60분간 농도 경사를 줌

[98] - 유속: 1 mL/min

[99] - 주입 부피: 100 µl (50 mg/mL).

[100]

[101] 이후, 도 8에 나타난 바와 같이, 상기에 개시된 방법대로 각 분획물의 간세포 보호 활성을 확인하였고, 도 9A에 나타난 바와 같이, 이중 가장 높은 간세포 보호 활성을 나타낸 SFM0를 역상 HPLC로 분리한 후 머무름 시간별로 총 4종의 분획물(fr. 0-4)을 제조하였다. 도 9B에 나타난 바와 같이, 상기 5종의 분획물(1 mg/mL)로 간세포 보호 활성을 재차 평가한 결과, fr. 2가 가장 우수한 간세포 보호 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

[102]

[103] 이후, fr. 2를 LC-MS/MS로 분석한 결과, 분획물 내에 2종의 펩타이드가 포함되어 있음을 확인하였고, 펩타이드 맵핑 및 de-novo 시퀀싱을 통해 이들 펩타이드들의 아미노산 서열을 확인하였다. 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 최종 확인된 펩타이드는 헥사머 1종(MAP1)과 다이머 1종(MAP2)으로, 각각의 아미노산 서열은 AKKHKE와 LE였다.

[104] 이들을 대상으로 간세포 보호 활성을 분석한 결과, 도 11A에 나타난 바와 같이, 두 펩타이드 모두 유의적인 간세포 보호 활성을 나타냈으며, 특히 MAP1에 비해 MAP2의 간세포 보호 활성이 상대적으로 높은 것을 확인하였다.

[105]

[106] 또한, MAP2 구조를 기초로 7종의 아미노산 결실 변이체(MAP2-1~2-7)를 합성하여 간세포 보호 활성을 비교하였으며, 이때 각 결실 변이체의 아미노산 서열은 하기 표 2에 나타내었다. 그 결과, 도 11B에 나타난 바와 같이, MAP2-1, 2-2 및 2-4만이 유의적인 간세포 보호 활성을 나타내었으며, 이중 MAP2-1와 2-2는 MAP2와 유사한 간세포 보호 활성을 나타내는 것을 확인하였다($P < 0.05$).

[107] [표2]

펩타이드	m/z	서열
MAP2-1	246.26	LD
MAP2-2	260.29	IE
MAP2-3	246.26	ID
MAP2-4	260.29	EL
MAP2-5	260.29	EI
MAP2-6	246.26	DL
MAP2-7	246.26	DI

[108]

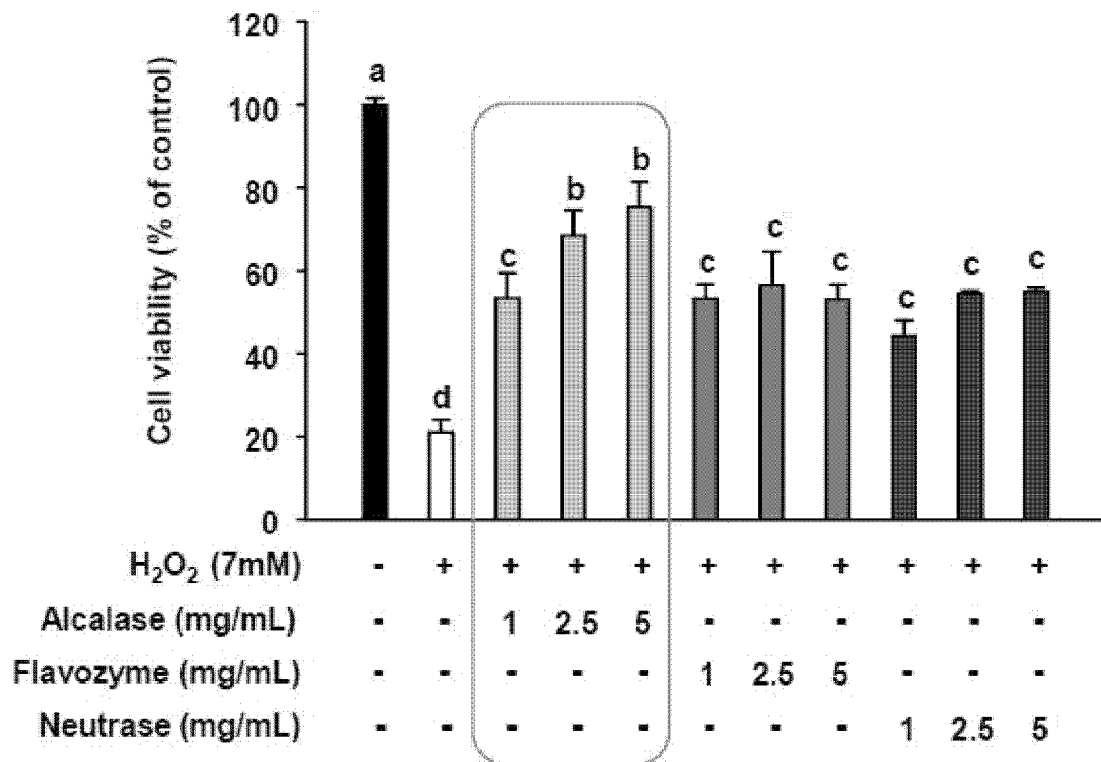
[109] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[110] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

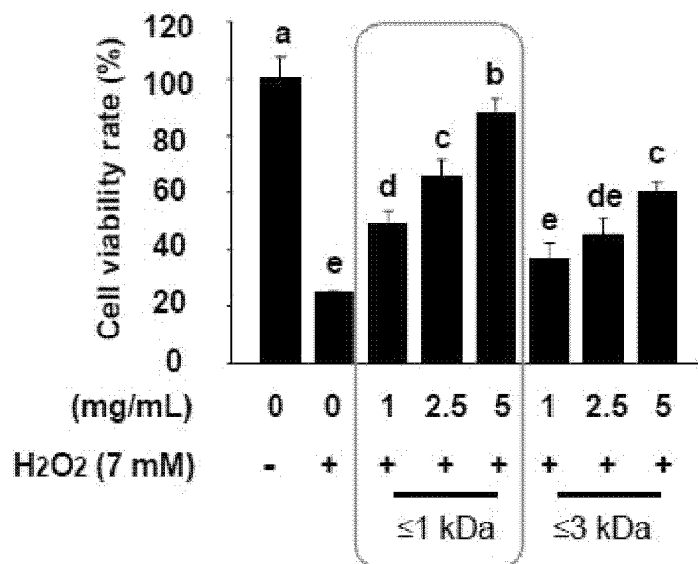
청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1 내지 서열번호 5로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 단백질 가수분해효소인 알칼라아제(Alcalase)로 가수분해된 갈색거저리(*Tenebrio molitor*) 유충의 단백가수분해물로부터 분리된 것을 특징으로 하는 펩타이드.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 1 kDa 이하의 크기를 가지는 것을 특징으로 하는 펩타이드.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 간세포 보호 활성을 나타내는 것을 특징으로 펩타이드.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 활성산소의 생성을 감소시키고 항산화 효소의 발현과 활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 펩타이드.
- [청구항 6] 제 5항에 있어서, 상기 항산화 효소는 글루타치온 합성효소(glutathione synthetase), 글루탐산염 시스테인 연결효소(glutamate-cysteine ligase), 글루탐산염 시스테인 변경 서브유닛(glutamate-cysteine ligase modifier subunit) 및 카탈라아제(catalase)로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 펩타이드.
- [청구항 7] 제 1항에 따른 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간 손상 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 8] 제 7항에 있어서, 상기 간 손상은 산화적 스트레스, 과로, 약물, 독성물질, 알코올, 비알코올, 지방간, 간경화 또는 감염으로 유도되는 것을 특징으로 하는 간 손상 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 9] 제 8항에 있어서, 상기 산화적 스트레스는 활성산소에 기인한 것을 특징으로 하는 간 손상 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 10] 제 1항에 따른 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간 손상 예방 또는 개선용 건강식품 조성물.
- [청구항 11] 제 1항에 따른 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간 보호용 건강식품 조성물.
- [청구항 12] 제 1항에 따른 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항산화용 건강식품 조성물.

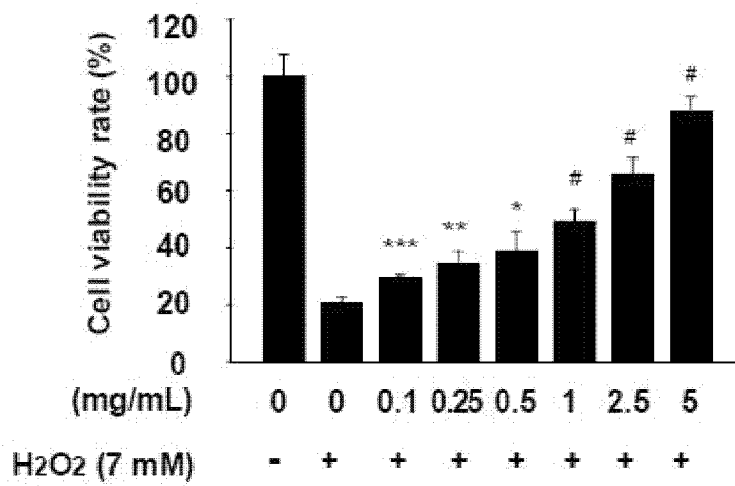
[도1]



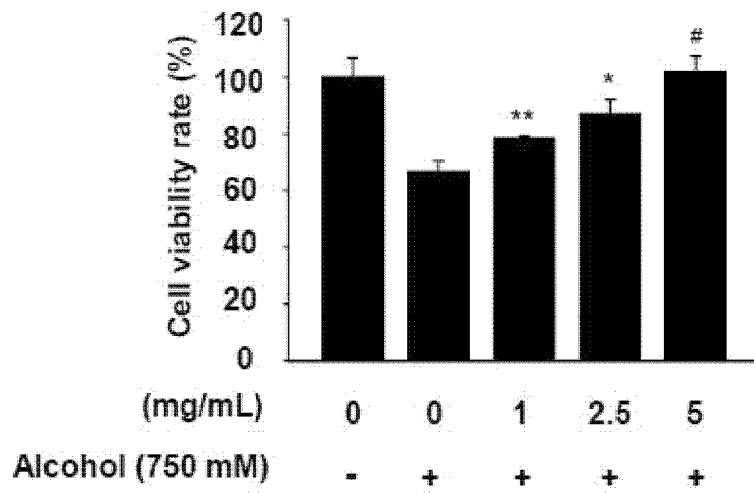
[도2]



[도3]

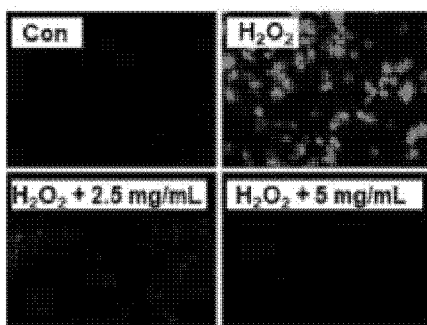


[도4]

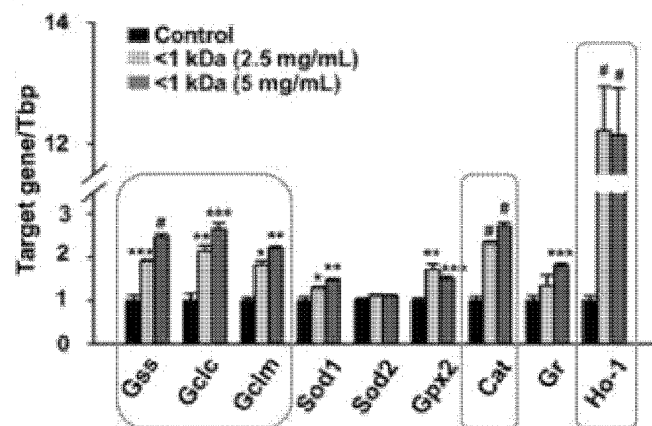


[도5]

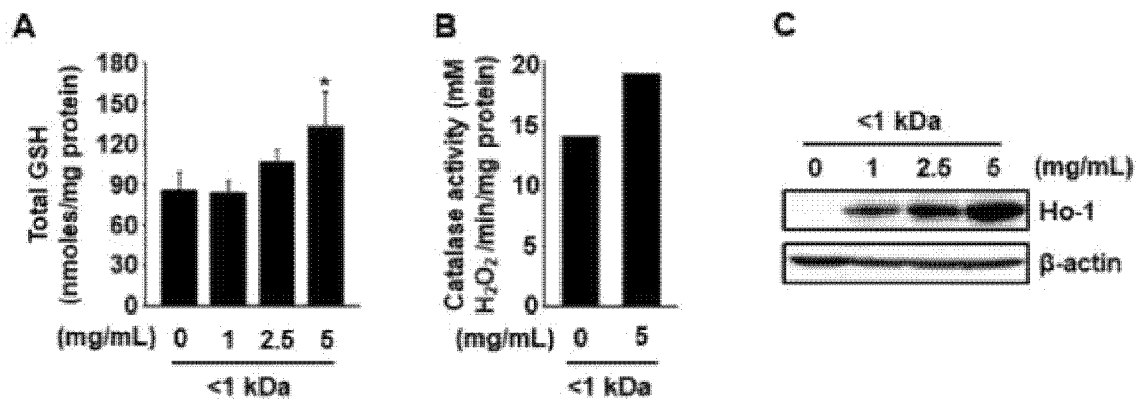
A



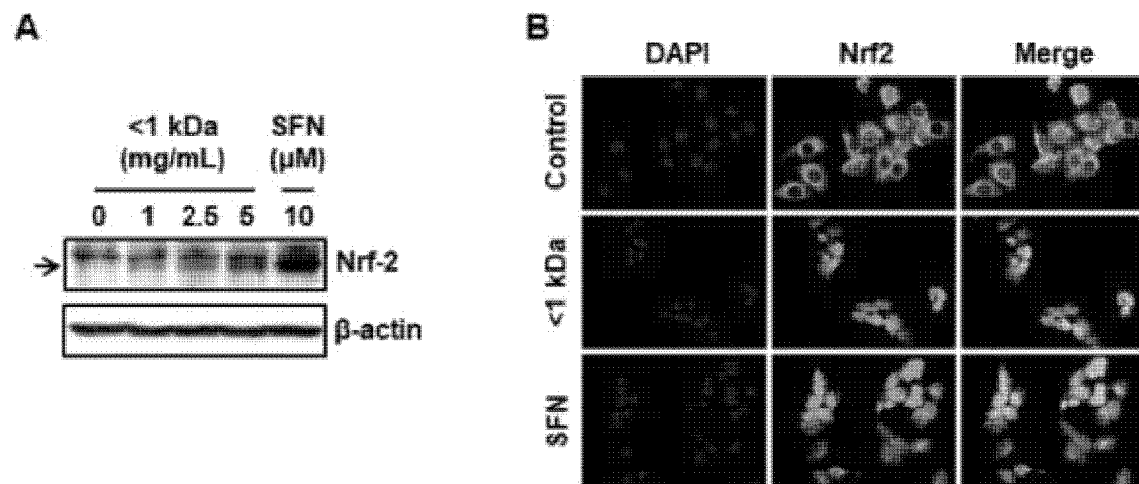
B



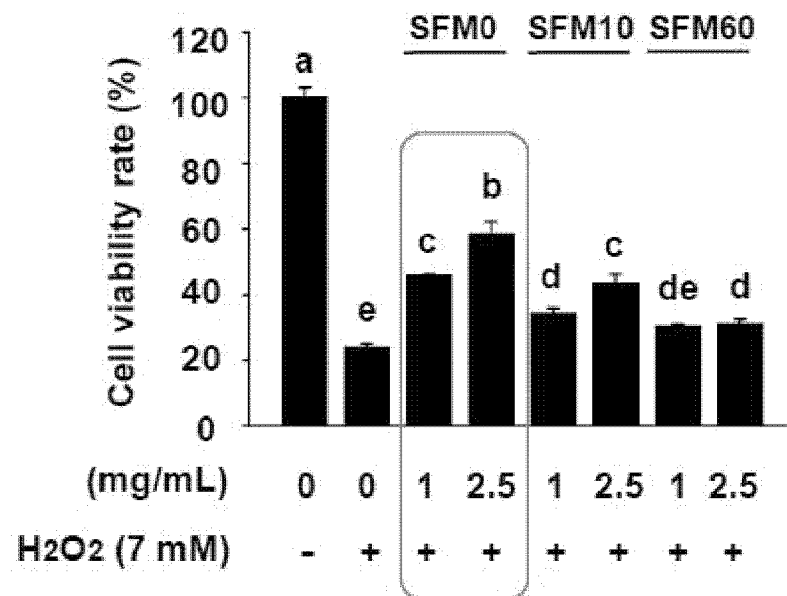
[도6]



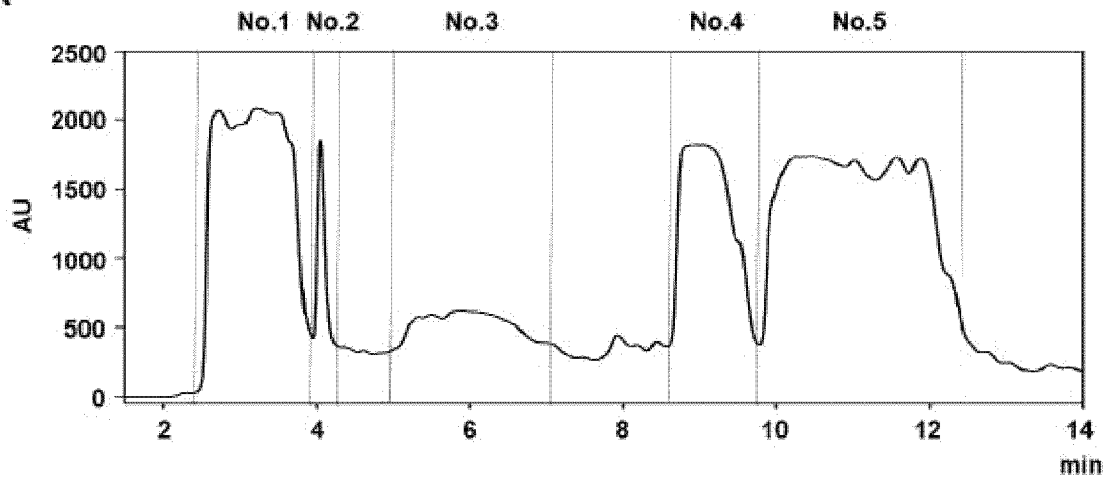
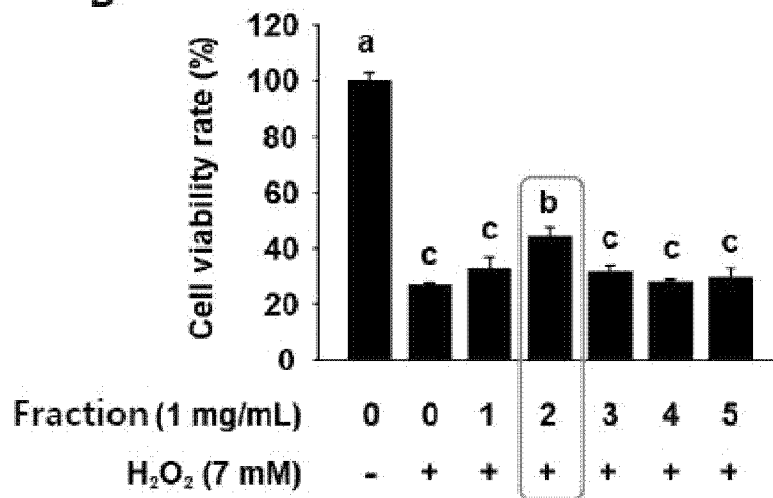
[도7]



[도8]

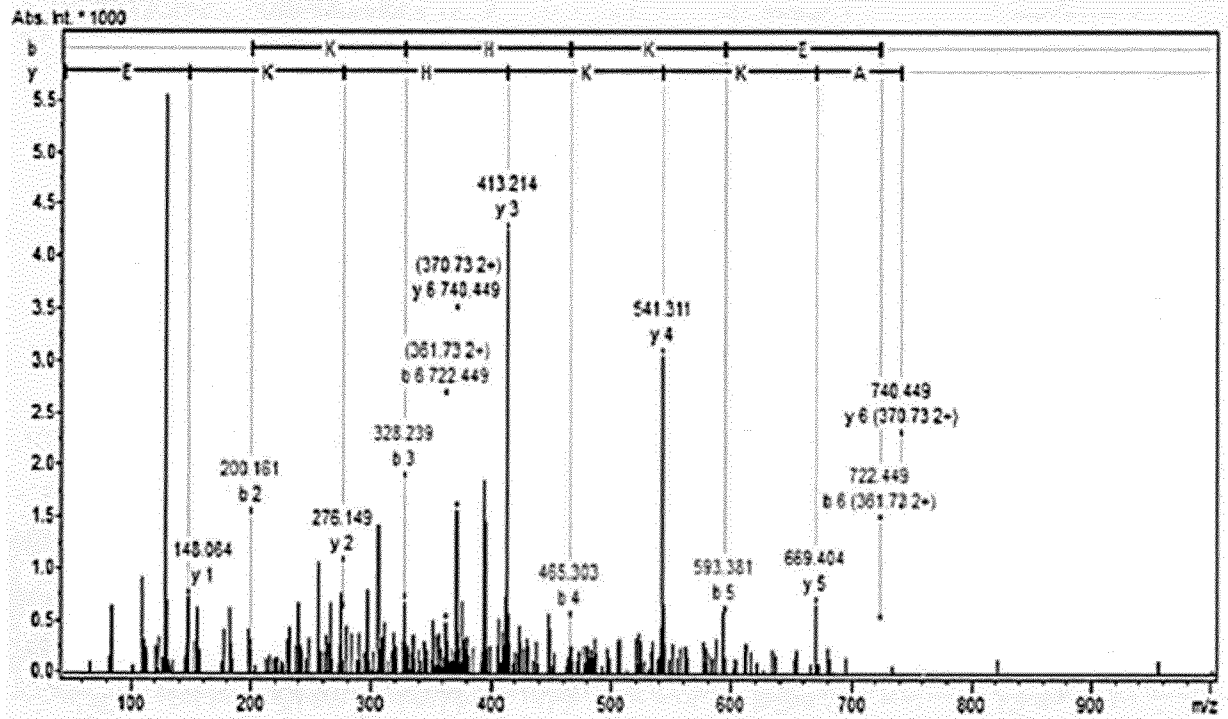


[도9]

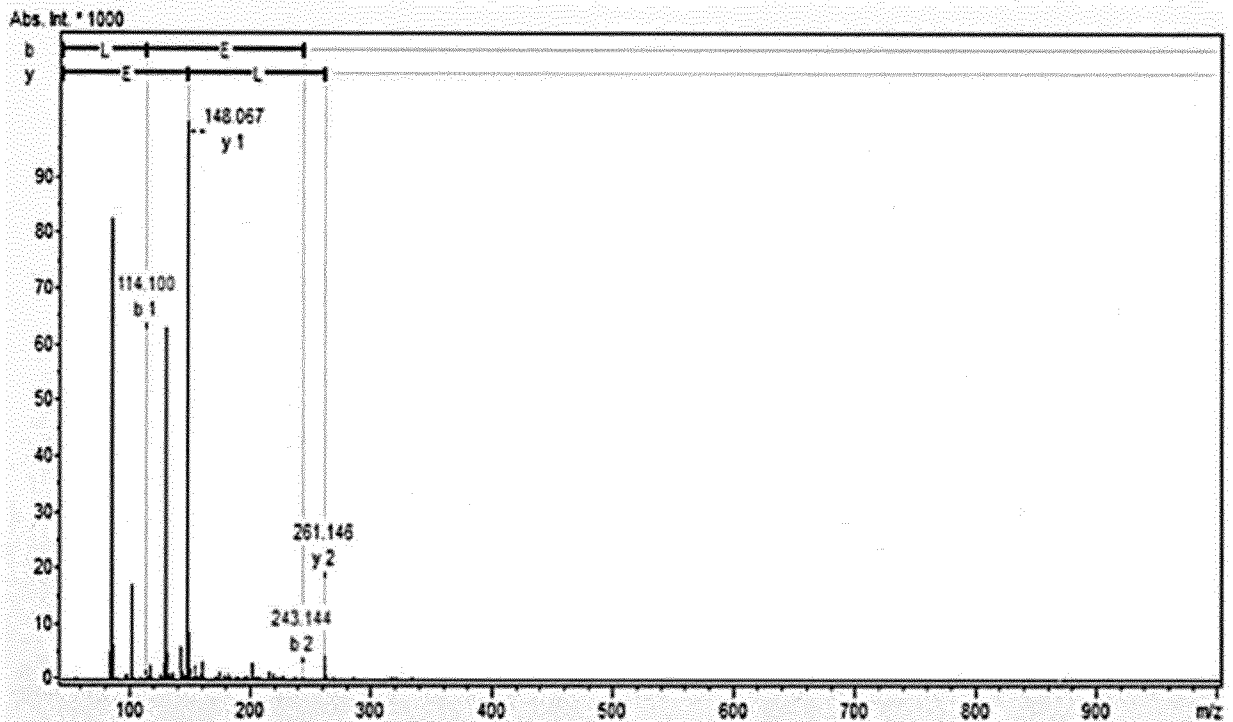
A**B**

[도 10]

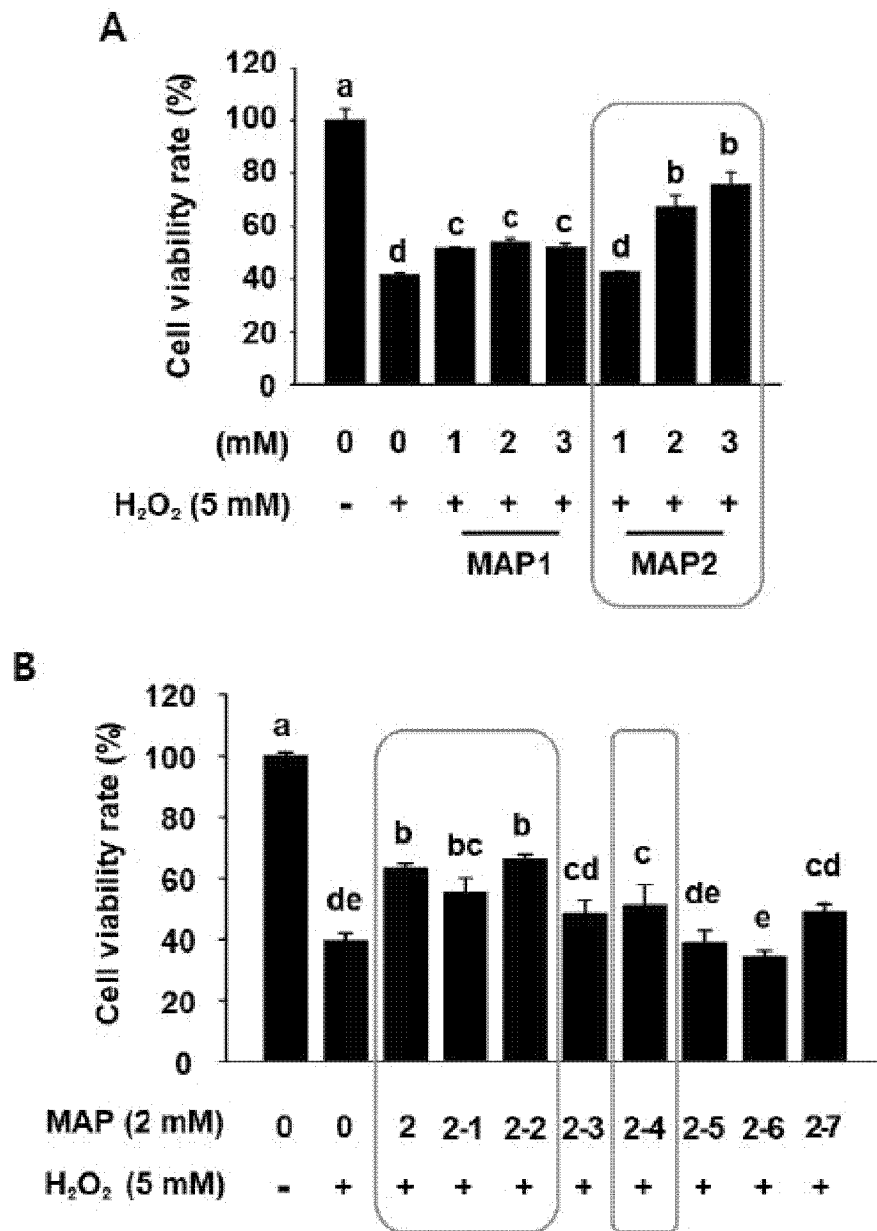
A

370.72 [M+2H]⁺: AKKHKE

B

261.14 [M+H]⁺: LE

[도11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/002769

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 5/06(2006.01)i; **C07K 5/062**(2006.01)i; **C07K 7/06**(2006.01)i; **A23L 33/18**(2016.01)i; **A61P 1/16**(2006.01)i;
A61K 38/00(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)

C07K 5/06; A23L 29/00; A23L 33/00; A61K 8/64; A61Q 19/02; C07K 5/062; C07K 7/06; A23L 33/18; A61P 1/16; A61K 38/00

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: 갈색거저리(Tenebrio molitor), 펩타이드(peptide), 간(liver), 보호(protect), 항산화(antioxidant)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	POWER, O. et al. Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. Amino Acids. 2013, vol. 44, pp. 797-820. See abstract; page 809; and table 1.	1-12
X	WO 2011-126163 A1 (WELSKIN CO., LTD.) 13 October 2011. See claim 1.	1-6
X	PubChem CID: 7019086 (29 July 2006). See entire document.	1-6
X	PubChem CID: 7009624 (29 July 2006). See entire document.	1-6
A	KR 10-2018-0055120 A (INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY) 25 May 2018. See 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
 “D” document cited by the applicant in the international application
 “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

17 November 2020

Date of mailing of the international search report

17 November 2020

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/002769

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2011-126163	A1	13 October 2011	None			
KR	10-2018-0055120	A	25 May 2018	KR	10-1966503	B1	05 April 2019

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 5/06(2006.01)i, C07K 5/062(2006.01)i, C07K 7/06(2006.01)i, A23L 33/18(2016.01)i, A61P 1/16(2006.01)i, A61K 38/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 5/06; A23L 29/00; A23L 33/00; A61K 8/64; A61Q 19/02; C07K 5/062; C07K 7/06; A23L 33/18; A61P 1/16; A61K 38/00

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: 갈색거저리(Tenebrio molitor), 펩타이드(peptide), 간(liver), 보호(protect), 항산화(antioxidant)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	POWER, O. 등, 'Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides', Amino Acids, 2013, 44권, 페이지 797-820 요약; 페이지 809; 표 1 참조.	1-12
X	WO 2011-126163 A1 (주식회사 웰스킨) 2011.10.13 청구항 1 참조.	1-6
X	PubChem CID: 7019086 (2006.07.29) 전체 문헌 참조.	1-6
X	PubChem CID: 7009624 (2006.07.29) 전체 문헌 참조.	1-6
A	KR 10-2018-0055120 A (계명대학교 산학협력단) 2018.05.25 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

“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 11월 17일 (17.11.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 11월 17일 (17.11.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



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

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

정다원

전화번호 +82-42-481-5373



국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

WO 2011-126163 A1

2011/10/13

없음

KR 10-2018-0055120 A

2018/05/25

KR 10-1966503 B1

2019/04/05