(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021 년 4 월 15 일 (15.04.2021)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2021/071318 A1

(51) 국제특허분류:
*C12N 9/18* (2006.01) *C12N 15/81* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/013803

(22) 국제출원일: 2020 년 10 월 8 일 (08.10.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2019-0124749 2019 년 10 월 8 일 (08.10.2019) KR

(71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (**EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION**) [KR/KR]; 03760 서울시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR). 중앙대학교 산학협력단 (**CHUNG ANG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION**) [KR/KR]; 06974 서울시 동작구 흑석로 84, Seoul (KR).

(72) 발명자: 박진병 (**PARK, Jin-Byung**); 07324 서울시 영등포구 여의동로 3길 10, 401동 902호, Seoul (KR). 김선기 (**KIM, Sun-Ki**); 08726 서울시 관악구 은천로 39길 56, 2동 304호, Seoul (KR). 황예지 (**HWANG, Ye-Ji**); 10513 경기도 고양시 덕양구 행신로 143번길 75, 2층, Gyeonggi-do (KR). 조아라 (**CHO, Ara**); 14236 경기도 광명시 철산로 13-12, 102동 1503호, Gyeonggi-do (KR).

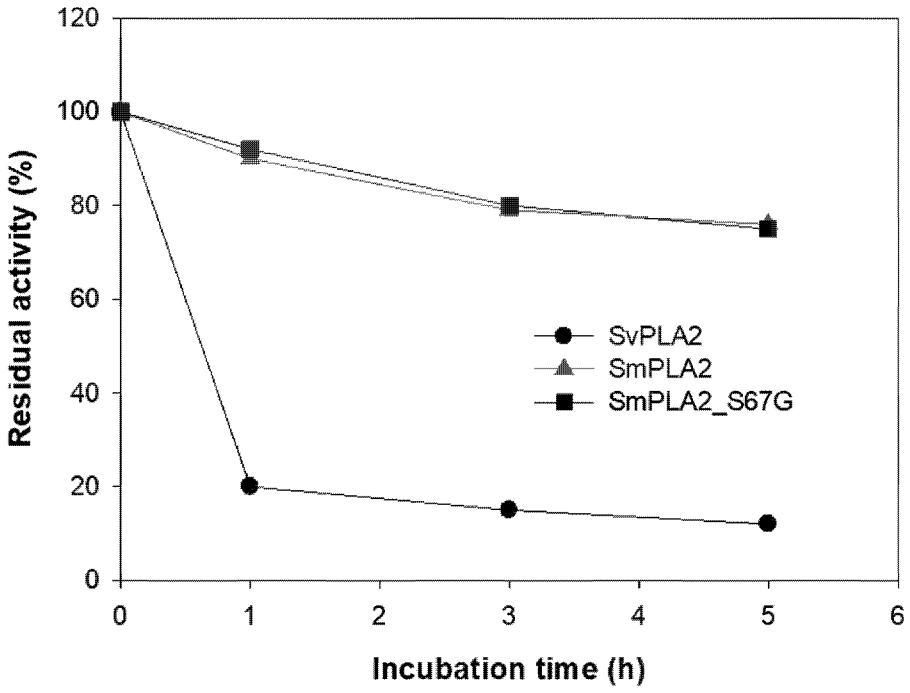
(74) 대리인: 특허법인한얼 (**HANOL INTELLECTUAL PROPERTY AND LAW**); 05836 서울시 송파구 법원로 135, 6층, Seoul (KR).

(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, IT, 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 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,

(54) **Title:** THERMOSTABLE PHOSPHOLIPASE A2 AND USE THEREOF

(54) **발명의 명칭:** 내열성 포스포리파아제 A2 및 이의 용도




(57) **Abstract:** The present invention relates to a thermostable phospholipase A2 (PLA2) and a use thereof, and, more particularly, to a method for hydrolyzing lecithin by using a PLA2 enzyme having thermal stability.

(57) 요약서: 본 발명은 내열성 포스포리파아제 A2(Phospholipase A2; PLA2) 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 내열성을 갖는 PLA2 효소를 이용하여 레시틴을 가수분해하는 방법에 관한 것이다.

[다음 쪽 계속]

WO 2021/071318 A1

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))

— 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))

# 명세서

## 발명의 명칭: 내열성 포스포리파아제 A2 및 이의 용도

### 기술분야

[1] 본 발명은 내열성 포스포리파아제 A2(Phospholipase A2; PLA2) 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 내열성을 갖는 PLA2 효소를 이용하여 레시틴을 가수분해하는 방법에 관한 것이다.

[2]

### 배경기술

[3] 포스포리파아제는 인지질을 가수분해하는 효소로서 레시티나아제라고도 한다. 포스포리파아제는 인지질을 분해하는 위치에 따라 A1, A2, B, C, D 로 분류되며, 상기 포스포리파아제 중 포스포리파아제 A2 성분은 세포막 구성 지질인 포스포리피드의 글리세린의 BDP 결합하는 지방산을 유리시켜 리조포스파티드로 만들기 때문에 세포조직의 파괴, 용혈작용 및 촉매 작용 등을 일으키는 것으로 알려져 있다. 포스포리파아제 A2의 이러한 작용을 활용하여 다양한 약학 조성물을 개발 할 수 있으며, 대한민국 공개 특허 제10-2015-0049438호에서 인플루엔자, 수포성 구내염 등과 같은 바이러스성 질환을 예방 및 치료할 수 있는 조성물을 제시하고 있다.

[4] 한편, 효소를 생물 촉매로 이용하여 유용한 물질을 생산하는 생물공정에 있어서 가장 중요한 것은 효소의 안정성이다. 특히, 고온에서 이루어지는 생물촉매 반응이 저온에서 이루어지는 효소 반응에 비하여 상대적으로 생산수율과 생산속도가 높은 것으로 알려져 있으므로, 생물공정에서 효소의 열안정성은 상당히 중요한 문제이다. 게다가, 고온의 효소 반응은 상온이나 저온에서의 반응에 비하여 효소의 기질 용해도가 높고, 미생물 오염이 감소되며, 용액의 점성(viscosicty)이 감소하는 등의 장점이 있기 때문에, 열안정성이 높은 효소의 개발은 생물공정 및 이를 응용한 산업에 매우 유용하다. 이외에도, 열에 대한 안정성이 증가된 내열성 효소는 상온에서의 구조적 안정성, 유기용매에 대한 안정성, 극단의 수소 이온 농도에 대한 안정성 및 단백질 변성제에 대한 안정성 등이 향상될 수 있다고 알려져 있다.

[5] 그러나, 기존에 일반적으로 사용되는 미생물 유래 PLA2 (예로 스트렙토마이세스 비올라세루버(Streptomyces violaceoruber) 유래의 PLA2 (SvPLA2))는 내열성이 낮아 활성에 문제가 있다는 단점이 있다. 따라서, 포스포리파아제 A2를 생물공정에 적극적으로 활용하기 위하여, 포스포리파아제 A2의 열안정성을 향상시켜야할 필요성이 대두되었다.

[6]

### 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

[7] 본 발명자들은, 열안정성이 향상된 포스포리파아제 A2를 개발하기 위하여 노력을 계속한 결과, 시시오넬라 마리나(Sciscionella marina) 유래의 포스포리파아제 A2 (SmPLA2)가 내열성이 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[8]

## 과제 해결 수단

[9] 본 발명의 하나의 목적은 내열성을 갖는 포스포리파아제 A2(PLA2) 효소를 이용하여 레시틴을 가수분해하는 방법을 제공하는 것이다.

[10] 본 발명의 다른 하나의 목적은 내열성을 갖는 포스포리파아제 A2(PLA2) 효소를 제공하는 것이다.

[11]

## 발명의 효과

[12] 본 발명의 PLA2는 증가된 내열성을 지니므로, PLA2 효소의 생산, 개발 및 활용에 널리 활용될 수 있을 것이다.

[13]

## 도면의 간단한 설명

[14] 도 1은 SvPLA2, SmPLA2 및 SmPLA2_S67G의 내열성을 비교하는 그래프이다.

[15] 도 2는 SvPLA2 및 SmPLA2의 내열성을 비교하는 그래프이다.

[16] 도 3은 SvPLA2 및 SmPLA2_S67G의 대두 레시틴으로부터 라이소레시틴과 리놀레산 생산 결과를 비교하는 그래프이다.

[17]

## 발명의 실시를 위한 최선의 형태

[18] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 실시 양태는 내열성을 갖는 시시오넬라 마리나(*Sciscionella marina*) 유래의 포스포리파아제 A2(PLA2) 효소를 이용하여 레시틴을 가수분해하는 방법을 제공한다.

[19] 구체적으로, 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열을 포함하는 포스포리파아제 A2(PLA2) 효소를 이용하여, 레시틴을 가수분해하는 방법을 제공할 수 있다.

[20] 보다 구체적으로는, 본 발명의 레시틴을 가수분해하는 방법은, (a) 시시오넬라 마리나(*Sciscionella marina*) 유래의 포스포리파아제 A2(PLA2) 효소를 포함하는 재조합 대장균을 배양하여, 포스포리파아제 A2 효소를 수득하는 단계; 및 (b) 상기 포스포리파아제 A2 효소와 레시틴을 반응시켜, 레시틴을 가수분해하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[21]

[22] 본 발명의 용어, "포스포리파아제(Phospholipase)"는 인지질을 가수분해하는 효소로서 레시티나아제라고도 한다. 포스포리파아제는 인지질을 분해하는 위치에 따라 A1, A2, B, C, D 로 분류되며, 상기 포스포리파아제 중 본 발명의 "포스포리파아제 A2(PLA2)"는 세포막 구성 지질인 포스포리피드의 글리세린의

BDP 결합하는 지방산을 유리시켜 리조포스파티드로 만들기 때문에 세포조직의 파괴, 용혈작용 및 촉매 작용 등을 일으키는 것으로 알려져 있다. 구체적으로, PLA2는 PLA 중에서 SN-2 아실 체인을 절단하는 형태의 PLA를 의미한다.

[23] 상기 PLA2는 시시오넬라 마리나(*Sciscionella marina*)에서 유래된 SmPLA2일 수 있으며, 예시로서 시시오넬라 마리나(*Sciscionella marina*)에서 유래된 서열번호 1을 포함하는 SmPLA2일 수 있고, 다른 예시로서 상기 SmPLA2에서 S67G 치환을 갖는 서열번호 2를 포함하는 SmPLA2 변이체(SmPLA2_S67G)일 수 있다. 구체적으로, 상기 PLA2는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 PLA2 효소는 pH 7.5 및 온도 50℃에서 최적 생물전환 반응 활성을 갖는 것일 수 있다.

[24] 본 발명에서, 내열성을 지니는 PLA2는 스트렙토마이세스 비올라세루버(Streptomyces violaceoruber) 유래의 PLA2 (SvPLA2)와 비교하여 내열성이 높은 것을 특징으로 한다. 상기 PLA2는 50℃ 내지 70℃, 구체적으로는 50℃ 내지 60℃의 고온 배양에서도 내열성을 갖는 것인 효소일 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에서는 Streptomyces violaceoruber 및 Sciscionella marina 유래의 PLA2를 여러 온도에서 배양/반응하여 신규 PLA2 효소들이 상대적으로 내열성이 높고 반응 활성이 우수한 것을 확인하였다(도 1 및 2). 또한, SmPLA2_S67G를 이용하여 고농도의 대두 레시틴으로부터 고수율로 라이소레시틴과 리놀레산을 생산할 수 있음을 확인하였다 (도 3).

[25]

[26] 본 발명에서 상기 (a) 단계는, 시시오넬라 마리나(*Sciscionella marina*) 유래의 포스포리파아제 A2(PLA2) 효소를 포함하는 재조합 대장균을 배양하여, 포스포리파아제 A2 효소를 수득하는 단계이다. 구체적으로, 상기 재조합 대장균은 상기 포스포리파아제 A2(PLA2) 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하는 것일 수 있다.

[27] 본 발명에서 제공하는 폴리뉴클레오티드는 상기 본 발명에서 제공하는 PLA2 효소를 코딩하며, 구체적으로, 서열번호 3 내지 서열번호 4를 포함할 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있다. 뉴클레오티드 서열을 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당업계에 널리 공지된 합성법, 예를 들어 문헌(Engels and Uhlmann, Angew Chem IntEd Engl., 37:73-127, 1988)에 기술된 방법을 이용할 수 있으며, 트리에스테르, 포스파이트, 포스포르아미다이트 및 H-포스페이트 방법, PCR 및 기타 오토프라이머 방법, 고체 지지체상의 올리고뉴클레오타이드 합성법 등을 들 수 있다.

[28] 본 발명의 용어 "발현벡터"란, 목적하는 숙주세포에서 목적 펩타이드를 발현할 수 있는 재조합 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 제작물을 의미한다. 상기 발현벡터는

개시코돈, 종결코돈, 프로모터, 오퍼레이터 등의 발현조절 요소들을 포함하는데, 상기 개시코돈 및 종결코돈은 일반적으로 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 제작물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다.

[29] 본 발명의 용어 "작동가능하게 연결(operably linked)"이란, 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 상태를 의미다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 발현 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용할 수 있다.

[30] 또한, 상기 발현벡터는 세포 배양액으로부터 단백질의 분리를 촉진하기 위하여 융합 폴리펩타이드의 배출을 위한 시그널 서열을 포함할 수 있다. 특이적인 개시 시그널은 또한 삽입된 핵산 서열의 효율적인 번역에 필요할 수도 있다. 이들 시그널은 ATG 개시코돈 및 인접한 서열들을 포함한다. 어떤 경우에는, ATG 개시 코돈을 포함할 수 있는 외인성 번역 조절 시그널이 제공되어야 한다. 이들 외인성 번역 조절 시그널들 및 개시 코돈들은 다양한 천연 및 합성 공급원일 수 있다. 발현 효율은 적당한 전사 또는 번역 강화 인자의 도입에 의하여 증가될 수 있다.

[31] 아울러, 상기 발현벡터는 PLA2 효소의 검출을 용이하게 하기 위하여, 임의로 엔도펩티아이제를 사용하여 제거할 수 있는 단백질 태그를 추가로 포함할 수 있다.

[32] 본 발명의 용어 "태그(tag)"란, 정량가능한 활성 또는 특성을 나타내는 분자를 의미하며, 플로오레세인과 같은 화학적 형광물질(fluoracer), 형광 단백질(GFP) 또는 관련 단백질과 같은 폴리펩타이드 형광물질을 포함한 형광분자일 수도 있고; Myc 태그, 플래그(Flag) 태그, 히스티딘 태그, 루신 태그, IgG 태그, 스트랩타비딘 태그 등의 에피톱 태그일 수도 있다. 특히, 에피톱 태그를 사용할 경우, 바람직하게는 6개 이상의 아미노산 잔기로 구성되고, 보다 바람직하게는 8개 내지 50개의 아미노산 잔기로 구성된 펩타이드 태그를 사용할 수 있다.

[33] 본 발명에 있어서, 상기 발현벡터는 상술한 본 발명에서 제공하는 PLA2 효소를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있는데, 이때 사용되는 벡터는 본 발명의 PLA2 효소를 제조할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 플라스미드 DNA, 파아지 DNA 등이 될 수 있고, 보다 바람직하게는 상업적으로 개발된 플라스미드(pUC18, pBAD, pIDTSAMRT-AMP 등), 대장균 유래 플라스미드(pYG601BR322, pBR325, pUC118, pUC119 등), 바실러스 서브틸리스 유래 플라스미드(pUB110, pTP5 등), 효모-유래

플라스미드(YEp13, YEp24, YCp50 등), 파아지 DNA(Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λgt10, λgt11, λZAP 등), 동물 바이러스 벡터(레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 백시니아 바이러스(vaccinia virus) 등), 곤충 바이러스 벡터(배큘로바이러스(baculovirus) 등)이 될 수 있다. 상기 발현벡터는 숙주 세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용함이 바람직하다.

[34] 본 발명에서 제공하는 형질전환체는 상기 본 발명에서 제공하는 발현벡터를 숙주에 도입하여 형질전환시켜서 제작되고, 상기 발현벡터에 포함된 폴리뉴클레오티드를 발현시켜서, 본 발명의 PLA2 효소를 제조하는데 사용될 수 있다. 상기 형질전환은 다양한 방법에 의하여 수행될 수 있는데, 내열성일 지니는 본 발명의 PLA2 효소를 제조할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, CaCl2 침전법, CaCl2 침전법에 DMSO(dimethyl sulfoxide)라는 환원물질을 사용함으로써 효율을 높인 Hanahan 방법, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아 매개된 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 덱스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 사용될 수 있다. 또한, 상기 형질전환제의 제작에 사용되는 숙주 역시 본 발명의 PLA2 효소를 제조할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 대장균(E. coli), 스트렙토 마이세스, 살모넬라 티피뮤리움 등의 박테리아 세포; 사카로마이세스 세레비지애, 스키조사카로마이세스 폼베 등의 효모 세포; 피치아 파스토리스 등의 균류 세포; 드로조필라, 스포도프테라 Sf9 세포 등의 곤충 세포; CHO, COS, NSO, 293, 보우 멜라노마 세포 등의 동물 세포; 또는 식물 세포가 될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에서는 대장균 BL21star(DE3) 균주를 숙주로서 사용하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[35]

[36] 본 발명의 용어 "배양"이란, 미생물을 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 방법을 의미한다.

[37] 본 발명에 있어서, 상기 형질전환체를 배양하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 본 발명의 PLA2 효소를 발현시켜서 제조할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 배치 공정 또는 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch or repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있다.

[38] 배양에 사용되는 배지는 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에 온도, pH 등을 조절하면서 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 한다. 사용될 수 있는 탄소원으로는 글루코즈 및 자일로즈 혼합당을 주 탄소원으로 사용하여 이외에 수크로즈, 락토즈, 프락토즈, 말토즈, 전분, 셀룰로즈와 같은 당 및 탄수화물, 대두유,

해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산안모늄, 및 질산암모늄과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민과 같은 아미노산 및 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해생성물 등 유기질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로서 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함된다. 또한, 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간 및 탄산칼슘 등이 사용 될 수 있다. 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다.

[39] 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식, 유가식 또는 연속식으로 첨가될수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다.

[40] 또한, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 호기 상태를 유지하기 위해 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체(예, 공기)를 주입한다. 배양물의 온도는 보통 27℃ 내지 37℃, 바람직하게는 30℃내지 35℃이다. 배양은 D형 젖산의 생성량이 최대로 얻어질 때까지 계속한다.

[41] 이러한 목적으로 보통 10 내지 100 시간에서 달성된다. 대체로 D형 젖산은 배양 배지 중으로 배출되지만, 경우에 따라서는 세포 중에 포함되어 있을 수 있다.

[42] 아울러, 배양물로부터 상기 PLA2 효소를 회수하는 단계는 당업계에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 구체적으로, 상기 회수 방법은 제조된 본 발명의 PLA2 효소를 회수할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 원심분리, 여과, 추출, 분무, 건조, 증방, 침전, 결정화, 전기영동, 분별용해(예를 들면 암모늄 설페이트 침전), 크로마토그래피(예를 들면 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기배제) 등의 방법을 사용할 수 있다.

[43]

[44] 본 발명에서, (b) 단계는, 상기 포스포리파아제 A2 효소와 레시틴을 반응시켜, 레시틴을 가수분해하는 단계이다. 구체적으로, 본 발명의 PLA2 효소는 내열성을 갖기 때문에, 포스포리파아제 A2 효소와 레시틴을 50℃ 내지 70℃에서 반응시키는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로는 50℃ 내지 60℃에서 반응시키는

것일 수 있다.

[45] 본 발명에서 상기 레시틴을 가수분해하여 라이소레시틴을 생성할 수 있으며, 상기 가수분해에 의한 산물로 리놀레산이 생산될 수 있다.

[46]

[47] 본 발명의 다른 하나의 양태로서, 내열성을 갖는 포스포리파아제 A2(PLA2) 효소 및 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 구체적으로, 상기 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 내열성을 갖는 포스포리파아제 A2(PLA2) 효소 및 이를 코딩하는 서열번호 3 또는 서열번호 4의 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공할 수 있으며, 이에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[48] 그 중에서, 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 포스포리파아제 A2(PLA2) 효소는 변이체 효소로서 신규 효소에 해당하며, 내열성이 높을 뿐만 아니라 증가된 생물전환 활성을 가진다는 특징이 있다.

[49]

## 발명의 실시를 위한 형태

[50] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[51]

[52] **실시예 1: SvPLA2 및 SmPLA2, SmPLA2_S67G 효소의 내열성 비교**

[53]

[54] **실시예 1-1: SvPLA2를 포함하는 재조합 발현벡터 및 대장균 형질전환체의 구축**

[55] Streptomyces violaceoruber 유래 PLA2 효소인 SvPLA2가 대장균에서 생산되어 세포 외로 분비되게 하기 위하여 형질전환체를 제작하였다.

[56] 보다 구체적으로, 증폭시킨 SvPLA2 효소 유전자를 플라스미드 벡터 pET-26b(+)에 삽입하여, 대장균의 세포질로 분비될 수 있는 SvPLA2 효소 유전자를 포함하는 pET26b(+)-SvPLA2 벡터를 제작하였고, 플라스미드 벡터 pET26b(+)는 세포내에서 생산된 단백질을 페리플라즘으로 분비되게 하는 N-말단의 PelB 신호 서열을 포함하고 있다. pET26b(+) 벡터는 제한효소 MscI와 XhoI를 처리하여 절편을 얻었고,
5'-GGCGTGGCCATGGCCCCCGCGGAC-3'(서열번호 5, MscI) 및
3'-CCGCTCGAGGCCGAAGATCTTGACGG-5'(서열번호 6, XhoI) 의 프라이머를 제작하여 SvPLA2 유전자를 증폭하였으며, 증폭된 절편은 PCR 정제 키트를 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 생성물은 T4 DNA 리가아제를 사용하여 플라스미드 벡터에 삽입하였다. 이후, 상기의 방법을 제작된 발현 벡터 pPICZαA-SvPLA2는 대장균 BL21 star(DE3)를 형질전환시키기 위해 사용하였고,

형질전환된 세포들은 100μg/mL의 카나마이신(kanamycin)이 포함된 LB 배지에서 자라게 하였다.

[57]

[58] **실시예 1-2: SmPLA2를 포함하는 재조합 발현벡터 및 대장균 형질전환체 구축**

[59] 본 발명에서는 해양 미생물인 Sciscionella marina 유래 PLA2(SmPLA2)를 신규 발굴하였으며, 이는 SvPLA2와 약 56%의 서열 상동성(Sequence identity)을 가진다. 상기 SmPLA2가 대장균에서 생산되어 세포 외로 분비되는 형질전환체를 제작하기 위해, 증폭시킨 SmPLA2 효소 유전자를 플라스미드 벡터 pET-26b(+)에 삽입하여, SmPLA2 효소 유전자를 포함하는 pET26b(+)-SmPLA2 벡터를 제작하였다.

[60] 보다 구체적으로, SmPLA2는 서열을 기반으로 코스모진텍(Seoul, Korea)에서 합성되었고, 플라스미드 벡터 pET26b(+)는 세포내에서 생산된 단백질을 페리플라즘으로 분비되게 하는 N- 말단의 PelB 신호 서열 및 정제를 위한 C-말단의 his 태그를 포함하게 하였으며, 5'-CCGGCGATGGCCATGG AGAGCATCGAAAGCATCAC-3' (서열번호 7, NcoI) 및 3'-GGTGGTGGTG CTCGAGACTGCCGAATTTGCGGAC-5' (서열번호 8, XhoI)의 프라이머를 제작하여 SmPLA2 유전자를 증폭하였다. 이후, 상기 서열에 밑줄로 그어진 부분에 해당하는 제한효소를 이용하여 DNA의 절편을 얻었고 in-fusion 클로닝을 통해 플라스미드 벡터 pET26b(+)에 삽입하였다. 상기 방법으로 제작된 발현 벡터 pET26b(+)-SmPLA2는 대장균 BL21 star(DE3)을 형질전환 시키기 위해 사용하였고, 형질전환된 세포들은 100 μg/mL의 카나마이신을 포함하는 LB 배지에서 자라게 하였다.

[61]

[62] **실시예 1-3: 대장균 기반의 SmPLA2 생산**

[63] 형질전환체에서 생산된 효소의 지방산 가수분해반응을 위해서, SmPLA2 유전자를 발현하는 재조합 대장균을 리젠버그 배지에서 배양하였다. OD600 = 1.0에서 0.2 mM IPTG를 배양액에 첨가하고 25℃, 200 rpm에서 24시간동안 발현을 유도하였고, 배양액을 원심분리하여 상층액을 얻었다. 이후, 10 kDa Amicon을 사용하여 10배 농축된 상층액을 얻어 지방산 가수분해 반응에 사용할 서열번호 1을 포함하는 SmPLA2 효소를 생산하였다.

[64]

[65] **실시예 1-4: SmPLA2_S67G 효소 생산**

[66] SmPLA2에 비해 레시틴 가수분해 활성이 향상된 변이체인 SmPLA2_S67G (서열번호 2)를 구축하고, 실시예 1-2와 1-3에서 기술된 동일한 방법을 이용하여 SmPLA2_S67G 효소를 생산하였다.

[67]

[68] **실시예 2: SvPLA2 및 SmPLA2, SmPLA2_S67G의 내열성 평가**

[69] SmPLA2와 SmPLA2_S67G의 내열성을 평가하기 위하여, 기존에 알려진

SvPLA2와 내열성 비교 실험을 수행하였다. 효소의 내열성 실험은 진탕배양기(shaking incubator)안에 플라스크에서 180 rpm, 50℃ 및 60℃의 조건으로 수행하였으며, 플라스크에는 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)와 0.66 g/L 염화칼슘 수용액을 첨가하여 10% 부피 농도의 농축 상층액과 함께 배양하였다.

[70] 보다 구체적으로, 배양은 0, 1, 3, 5시간 진행하였으며 각 시간대의 샘플을 같은 온도로 준비해둔 기질과 함께 섞어 반응을 수행하였다.

[71] 그 결과, 도 1에서 볼 수 있듯이, SvPLA2는 50℃에서 배양 1시간 후, 활성이 20% 이하로 급격하게 줄어들었으나, SmPLA2와 SmPLA2_S67G는 50℃에서 5시간 배양 후에도 활성이 75% 이상 유지되는 것을 확인하였다.

[72] 또한, SmPLA2와 SmPLA2_S67G는 60℃에서 5시간 배양 후에도 50℃에서와 유사하게 활성을 70% 이상 유지하는 것을 확인하였다. 구체적으로, 도 2에서 SvPLA2와 비교하여, 50℃ 및 60℃에서 SmPLA2가 활성을 65% 이상 유지함을 확인할 수 있다.

[73] 이를 통해, SmPLA2와 SmPLA2_S67G는 SvPLA2와 비교하여 내열성이 현저히 우수한 것을 확인하여, 열에 의한 구조적 안정성이 증가한 것을 확인하였다.

[74]

[75] **실시예 3: SvPLA2 및 SmPLA2_S67G 효소 활성 비교**

[76] 신규한 SmPLA2_S67G 효소의 생물전환 활성을 확인하기 위해, 기존에 알려진 SvPLA2와의 생물전환 활성을 비교하였다.

[77] 보다 구체적으로, 형질전환체에서 생산된 효소의 레시틴 가수분해반응을 위해 재조합 대장균을 리젠버그 배지에서 배양하고, OD600 = 1.0에서 0.2 mM IPTG를 배양액에 첨가하고 25℃, 200 rpm에서 24시간동안 발현을 유도하였고, 배양액을 원심분리하여 상층액을 얻었다. 이후 10 kDa Amicon을 사용하여 10배 농축된 상층액을 얻어 레시틴 가수분해 반응에 사용하였다. 대두 유래 레시틴을 기질로 이용하여 50°C, pH 7.5에서 라이소레시틴(lysolecithin)과 리놀레산으로 가수분해하는 활성을 측정하였다.

[78] 그 결과, 도 3에서 볼 수 있듯이, SvPLA2는 132 mM (약 100 g/L)의 대두 레시틴으로부터 라이소레시틴과 리놀레산을 98 mM로 생성하였으나 (생산 수율: 74%), SmPLA2_S67G는 라이소레시틴과 리놀레산을 128 mM로 생성하였다 (생산 수율: 97%).

[79] 반응 시간 30분까지의 초기 생물전환 속도를 비교하면 SvPLA2와 SmPLA2_S67G 사이에 큰 차이가 없으나, 반응 시간 30분 이후의 생물전환 속도를 비교하면 SmPLA2_S67G가 SvPLA2에 비해 월등히 높았다. 이는 SmPLA2_S67G가 SvPLA2에 비해 내열성이 높아 생물전환 중에 반응 활성을 높게 유지할 수 있었기 때문인 것으로 사료된다.

[80] 종합적으로, SmPLA2_S67G는 SvPLA2에 비해 내열성이 우수하여 고농도의 대두 유래 레시틴 가수 분해 반응에서 우수한 반응 활성을 보여주는 것으로 판단된다.

[81]

[82] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

# 청구범위

[청구항 1] 시시오넬라 마리나(*Sciscionella marina*) 유래의 포스포리파아제 A2(PLA2) 효소를 이용하여, 레시틴을 가수분해하는 방법.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 포스포리파아제 A2(PLA2) 효소는 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 레시틴을 가수분해하는 방법.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 포스포리파아제 A2(PLA2) 효소는 50℃ 내지 70℃에서 내열성을 갖는 것을 특징으로 하는, 레시틴을 가수분해하는 방법.

[청구항 4] 제1항에 있어서, (a) 시시오넬라 마리나(*Sciscionella marina*) 유래의 포스포리파아제 A2(PLA2) 효소를 포함하는 재조합 대장균을 배양하여, 포스포리파아제 A2 효소를 수득하는 단계; 및
(b) 상기 포스포리파아제 A2 효소와 레시틴을 반응시켜, 레시틴을 가수분해하는 단계를 포함하는 것인, 레시틴을 가수분해하는 방법.

[청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 상기 재조합 대장균은 상기 포스포리파아제 A2(PLA2) 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하는 것인, 레시틴을 가수분해하는 방법.

[청구항 6] 제4항에 있어서, 상기 포스포리파아제 A2 효소와 레시틴을 50℃ 내지 70℃에서 반응시키는 것인, 레시틴을 가수분해하는 방법.

[청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 레시틴을 라이소레시틴으로 가수분해하는 것인, 레시틴을 가수분해하는 방법.

[청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 가수분해에 의한 산물로 리놀레산이 생산되는 것인, 레시틴을 가수분해하는 방법.

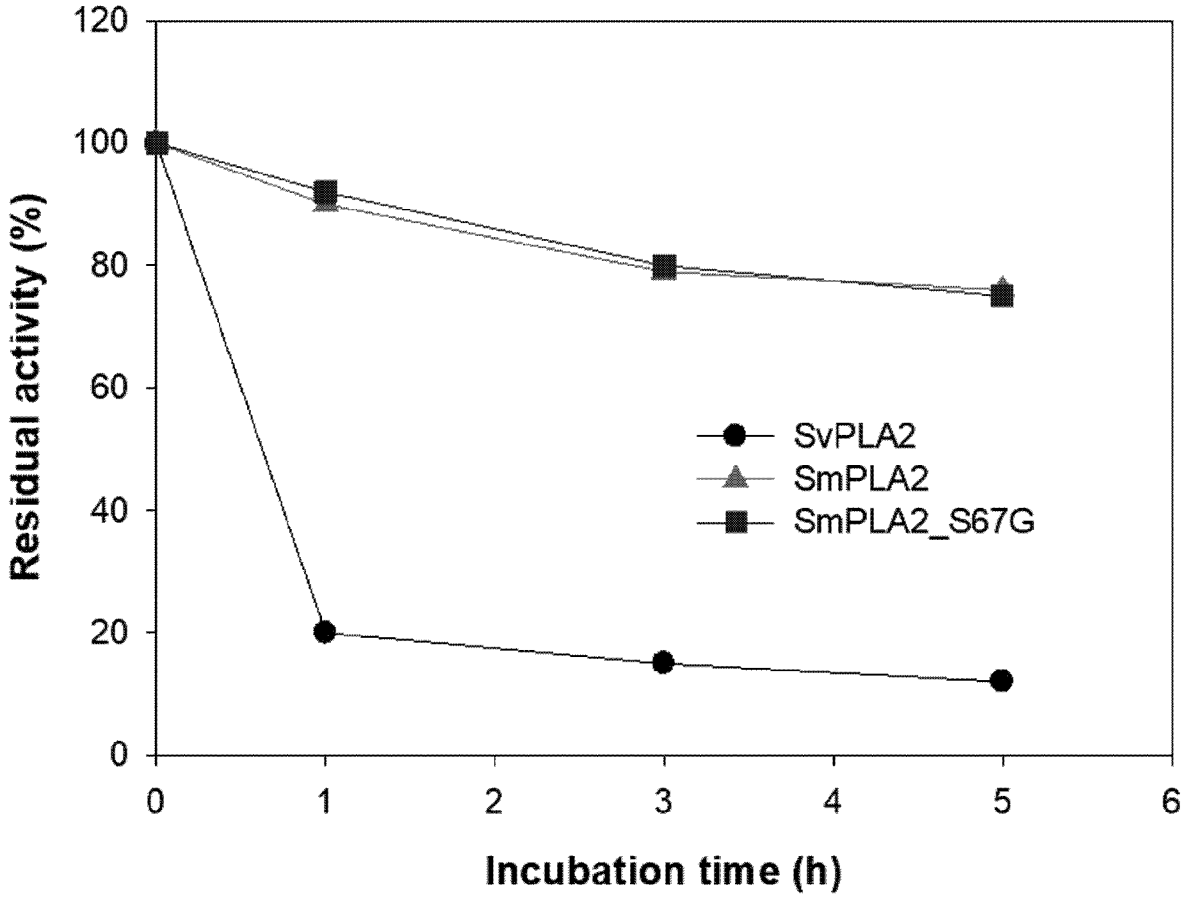
[청구항 9] 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는, 내열성을 갖는 포스포리파아제 A2(PLA2) 효소.

[청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 포스포리파아제 A2(PLA2) 효소는 증가된 생물전환 활성을 갖는 것을 특징으로 하는, 포스포리파아제 A2(PLA2) 효소.

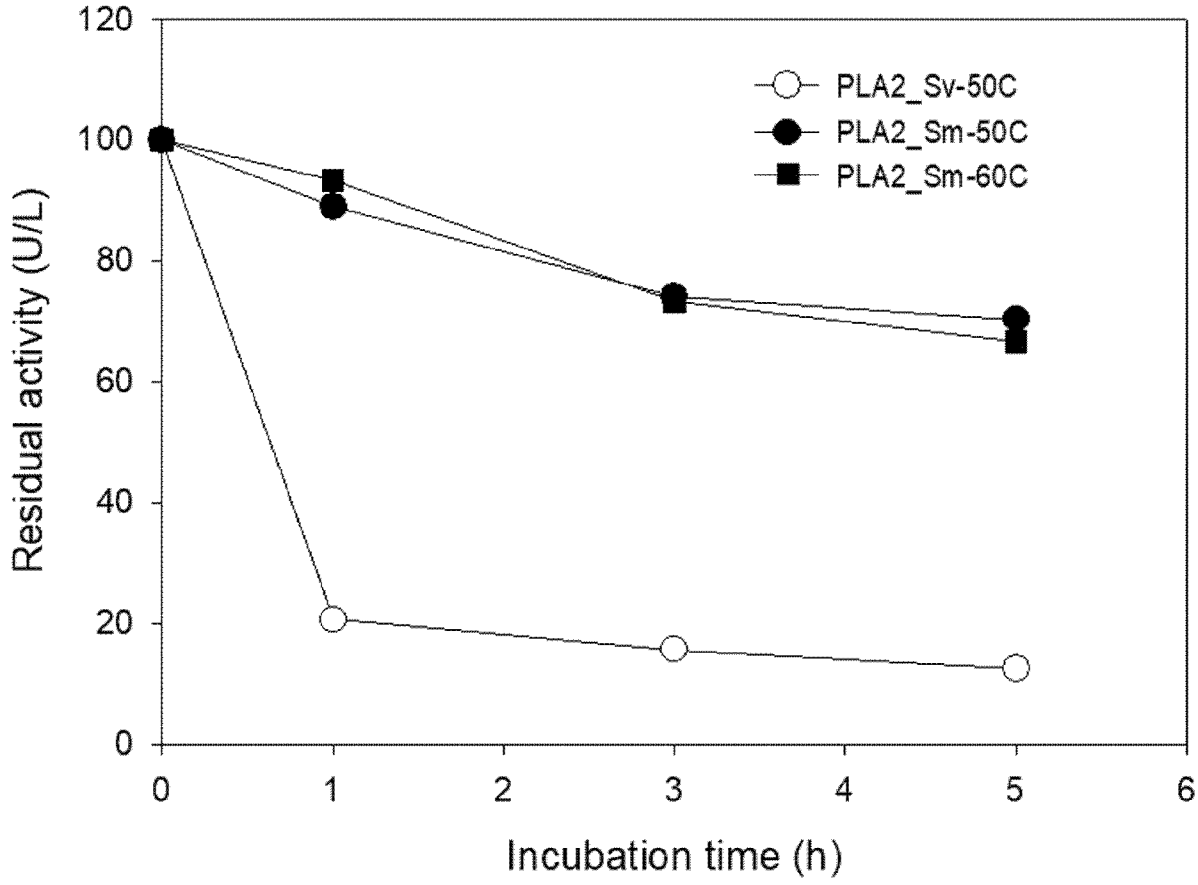
[청구항 11] 제9항의 포스포리파아제 A2(PLA2) 효소를 코딩하는, 폴리뉴클레오티드.

[청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 4의 핵산 서열을 포함하는 것인, 폴리뉴클레오티드.

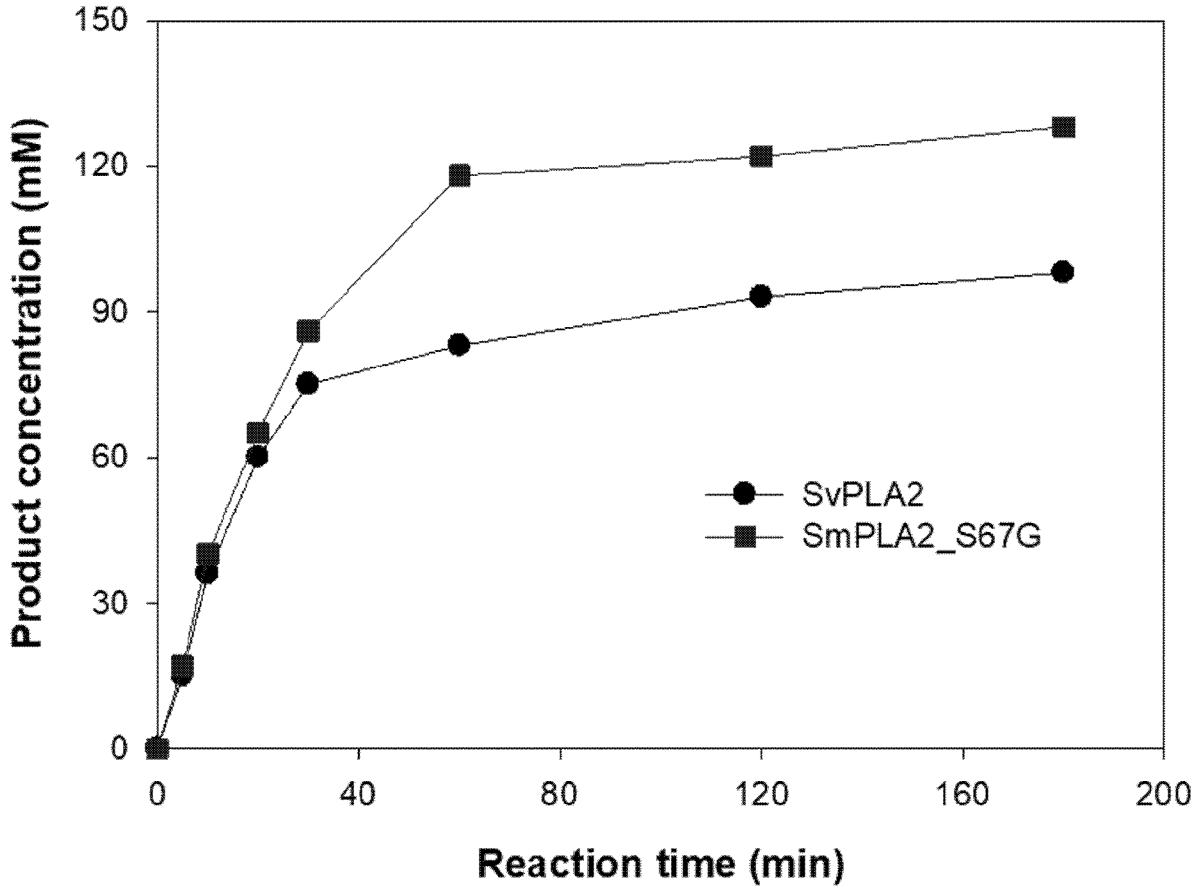
[도1]


Residual activity (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
6
Incubation time (h)
SvPLA2
SmPLA2
SmPLA2_S67G

[도2]


Residual activity (U/L)
120
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
6
Incubation time (h)
PLA2_Sv-50C
PLA2_Sm-50C
PLA2_Sm-60C

[도3]


150
120
90
60
30
0
Product concentration (mM)
0
40
80
120
160
200
Reaction time (min)
SvPLA2
SmPLA2_S67G

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
**PCT/KR2020/013803**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**C12N 9/18**(2006.01)i; **C12N 15/81**(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 9/18(2006.01); A61K 31/685(2006.01); A61K 45/00(2006.01); C12P 9/00(2006.01); C12Q 1/34(2006.01)

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: 포스포리파아제 A2(phospholipase A2), 내열성(thermostable), 레시틴(lecithin), 라이소레시틴(lysolecithin)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| Y | KR 10-1998-0081133 A (FUJI OIL COMPANY LIMITED) 25 November 1998 (1998-11-25)<br>See abstract; claim 1; and page 3. | 1-8 |
| A | | 9-12 |
| X | NCBI Reference Sequence: WP_020498377.1 (09 July 2013).<br>See entire document. | 9-12 |
| Y | | 1-8 |
| A | LIM, Y. S. et al. Overexpression and characterization of a thermophilic and hemolytic phospholipase of Vibrio vulnificus cloned in Escherichia coli (phospholipase of V. vulnificus). African Journal of Biotechnology. 19 July 2012, vol. 11, no. 58, pp. 12213-12221.<br>See entire document. | 1-12 |
| A | KR 10-2004-0044076 A (COLETICA) 27 May 2004 (2004-05-27)<br>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 | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| **01 February 2021** | **01 February 2021** |

| Name and mailing address of the ISA/KR | Authorized officer |
|---|---|
| **Korean Intellectual Property Office**<br>**Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208** | |
| Facsimile No. **+82-42-481-8578** | Telephone No. |

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| A | JP 2011-088860 A (KYOTO UNIV) 06 May 2011 (2011-05-06)<br>See entire document. | 1-12 |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**
**Information on patent family members**

International application No.
**PCT/KR2020/013803**

| Patent document cited in search report | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) | Publication date (day/month/year) |
|---|---|---|---|
| KR 10-1998-0081133 A | 25 November 1998 | AT 243261 T | 15 July 2003 |
| | | CN 1197115 A | 28 October 1998 |
| | | DE 69815581 T2 | 24 December 2003 |
| | | EP 0870840 A2 | 14 October 1998 |
| | | EP 0870840 A3 | 01 September 1999 |
| | | EP 0870840 B1 | 18 June 2003 |
| | | ES 2196420 T3 | 16 December 2003 |
| | | JP 10-287686 A | 27 October 1998 |
| | | JP 3853464 B2 | 06 December 2006 |
| | | KR 10-0515462 B1 | 25 November 2005 |
| | | TW 575577 A | 11 February 2004 |
| | | TW 575577 B | 11 February 2004 |
| | | US 5955327 A | 21 September 1999 |
| KR 10-2004-0044076 A | 27 May 2004 | CH 694107 A5 | 15 July 2004 |
| | | DE 10320603 A1 | 09 June 2004 |
| | | DE 10362194 B4 | 13 November 2008 |
| | | DE 10362194 C5 | 27 October 2016 |
| | | FR 2847267 A1 | 21 May 2004 |
| | | FR 2847267 B1 | 28 July 2006 |
| | | JP 2004-166684 A | 17 June 2004 |
| | | JP 2009-108104 A | 21 May 2009 |
| | | JP 2012-224637 A | 15 November 2012 |
| | | JP 5425489 B2 | 26 February 2014 |
| | | KR 10-1172700 B1 | 09 August 2012 |
| | | US 2004-0096925 A1 | 20 May 2004 |
| | | US 2015-0110907 A1 | 23 April 2015 |
| JP 2011-088860 A | 06 May 2011 | None | |

# 국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
**PCT/KR2020/013803**

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**

**C12N 9/18**(2006.01)i; **C12N 15/81**(2006.01)i

**B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 9/18(2006.01); A61K 31/685(2006.01); A61K 45/00(2006.01); C12P 9/00(2006.01); C12Q 1/34(2006.01)

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: 포스포리파아제 A2(phospholipase A2), 내열성(thermostable), 레시틴(lecithin), 라이소레시틴(lysolecithin)

**C. 관련 문헌**

| 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재 | 관련 청구항 |
|---|---|---|
| Y | KR 10-1998-0081133 A (쓰지세이유가부시끼가이샤) 1998.11.25<br>요약; 청구항 1; 및 페이지 3 | 1-8 |
| A | | 9-12 |
| X | NCBI Reference Sequence: WP_020498377.1 (2013.07.09)<br>전체 문헌 | 9-12 |
| Y | | 1-8 |
| A | LIM, Y. S. 등, `Overexpression and characterization of a thermophilic and hemolytic phospholipase of Vibrio vulnificus cloned in Escherichia coli (phospholipase of V. vulnificus)', African Journal of Biotechnology, 2012.07.19, 11권, 58호, 페이지 12213-12221<br>전체 문헌 | 1-12 |
| A | KR 10-2004-0044076 A (꼴레띠까) 2004.05.27<br>전체 문헌 | 1-12 |
| A | JP 2011-088860 A (KYOTO UNIV) 2011.05.06<br>전체 문헌 | 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 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 | 국제조사보고서 발송일 |
|---|---|
| **2021년02월01일(01.02.2021)** | **2021년02월01일(01.02.2021)** |

| ISA/KR의 명칭 및 우편주소 | 심사관 |
|---|---|
| **대한민국 특허청**<br>**(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)** | **허주형** |
| 팩스 번호 **+82-42-481-8578** | 전화번호 **+82-42-481-5373** |

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2019년 7월)

# 국 제 조 사 보 고 서
## 대응특허에 관한 정보

국제출원번호
**PCT/KR2020/013803**

| 국제조사보고서에서 인용된 특허문헌 | 공개일 | 대응특허문헌 | 공개일 |
|---|---|---|---|
| KR 10-1998-0081133 A | 1998/11/25 | AT 243261 T | 2003/07/15 |
| | | CN 1197115 A | 1998/10/28 |
| | | DE 69815581 T2 | 2003/12/24 |
| | | EP 0870840 A2 | 1998/10/14 |
| | | EP 0870840 A3 | 1999/09/01 |
| | | EP 0870840 B1 | 2003/06/18 |
| | | ES 2196420 T3 | 2003/12/16 |
| | | JP 10-287686 A | 1998/10/27 |
| | | JP 3853464 B2 | 2006/12/06 |
| | | KR 10-0515462 B1 | 2005/11/25 |
| | | TW 575577 A | 2004/02/11 |
| | | TW 575577 B | 2004/02/11 |
| | | US 5955327 A | 1999/09/21 |
| KR 10-2004-0044076 A | 2004/05/27 | CH 694107 A5 | 2004/07/15 |
| | | DE 10320603 A1 | 2004/06/09 |
| | | DE 10362194 B4 | 2008/11/13 |
| | | DE 10362194 C5 | 2016/10/27 |
| | | FR 2847267 A1 | 2004/05/21 |
| | | FR 2847267 B1 | 2006/07/28 |
| | | JP 2004-166684 A | 2004/06/17 |
| | | JP 2009-108104 A | 2009/05/21 |
| | | JP 2012-224637 A | 2012/11/15 |
| | | JP 5425489 B2 | 2014/02/26 |
| | | KR 10-1172700 B1 | 2012/08/09 |
| | | US 2004-0096925 A1 | 2004/05/20 |
| | | US 2015-0110907 A1 | 2015/04/23 |
| JP 2011-088860 A | 2011/05/06 | 없음 | |