

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 4월 20일 (20.04.2017)



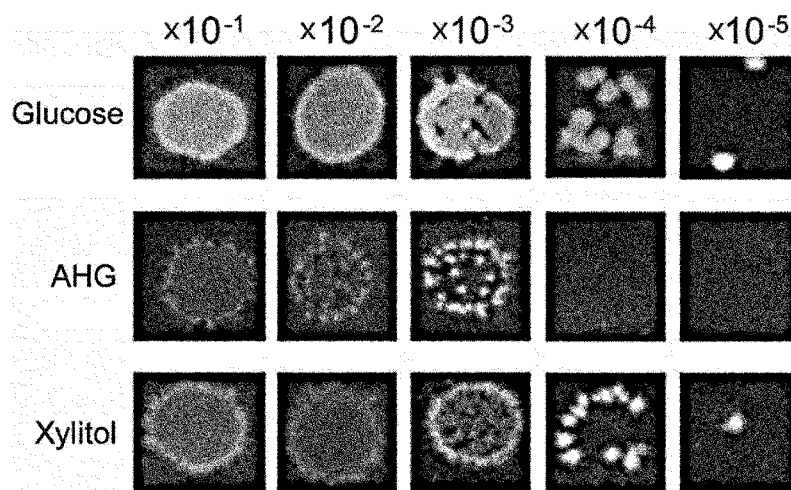
(10) 국제공개번호
WO 2017/065546 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 31/7004 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A61K 8/60 (2006.01) A61Q 11/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/011530
- (22) 국제출원일: 2016년 10월 14일 (14.10.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0144679 2015년 10월 16일 (16.10.2015) KR
- (71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김경현 (KIM, Kyoung Heon); 06601 서울시 서초구 서초중앙로 200 18 동 805 호(서초 4 동, 삼풍아파트), Seoul (KR). 최인걸 (CHOI, In-Geol); 07016 서울시 동작구 남부순환로 263 길 34 501 호(사당동, 태영아트빌), Seoul (KR). 윤은주 (YUN, Eun-Ju); 08640 서울시 금천구 시흥대로 53 14 동 104 호(시흥동, 현대빌라), Seoul (KR). 이아름 (LEE, Ah-Reum); 02477 서울시 동대문구 약령시로 11-1, 203 호(계기동), Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM); 06242 서울시 강남구 역삼로 3 길 11 광성빌딩 신관 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, DJ, 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, 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, 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, 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).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: USE OF 3,6-ANHYDRO-L-GALACTOSE FOR PREVENTING DENTAL CARIES

(54) 발명의 명칭 : 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 항충치 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a use of 3,6-anhydro-L-galactose for preventing dental caries. More specifically, 3,6-anhydro-L-galactose inhibits the growth of oral microorganisms and exhibits anti-caries activity to inhibit the production of acids caused by the consumption of a carbon source by the oral microorganisms. Thus, 3,6-anhydro-L-galactose can be used in pharmaceuticals, food products, oral hygiene preparations, etc. for preventing, ameliorating or treating oral diseases caused by oral microorganisms, such as dental caries, gingivitis, periodontitis, oral mucosal ulcer, halitosis or xerostomia.

(57) 요약서: 본 발명은

[다음 쪽 계속]

WO 2017/065546 A1

**공개:**

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(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))

3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 항충치 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 구강 미생물의 성장을 저해하고, 구강 미생물의 탄소원 소비에 의한 산의 생성을 저해하는 항충치 활성을 가지고 있어 구강 미생물에 의한 치아우식증, 치은염, 치주염, 구강내 점막 궤양, 구취 또는 구강건조증 등의 구강 질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 의약, 식품, 구강 위생제 등에 사용할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 항충치 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 구강 미생물의 성장을 저해하고, 산 생성을 억제하여 구강 질환을 예방 또는 치료하는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 항충치 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 치아우식증은 사람들이 치과를 찾는 주 원인 중의 하나인 구강 질환으로 인류가 설탕을 감미료로 사용하게 됨에 따라 발병률이 증가하게 되었다. 치아우식증의 주 원인균으로 류탄스균(*Streptococcus mutans*)을 들 수 있다(Loesche WJ *et al.* (1975) *Infect Immun.* 11(6): 1252-60). 류탄스균은 구강 내에서 당을 분해하고, 글루코실트랜스퍼라제(glucosyltransferase, GTF)를 분비하여 불용성 글루칸(glucan)을 치면에 형성해 류탄스균 또는 다른 각종세균들을 치아표면에 부착하여 증식하게 한다. 치면의 세균들이 당질 대사산물인 젖산과 같은 유기산에 의해 치아표면의 법랑질이 탈회되면서 충치를 유발하게 되는 것이다(Dashper SG *et al.* (1996) *Microbiol.* 142, 33-29). 치아우식증을 예방하기 위한 물질로 치면세균막 내 류탄스균의 수를 감소시켜 치아우식증을 예방하는 불소화합물과 자일리톨(xylitol)이 대표적으로 알려져 있다(Trahan L *et al.* (1985) *Caries Res.* 19: 53-63). 자연계에 존재하는 5탄당 알코올인 자일리톨은 설탕과 비슷한 단맛과 청량감의 장점으로 인해 껌으로 제조되어 널리 사용되고 있지만 고농도의 자일리톨의 경우에서만 류탄스균의 성장을 억제할 수 있다는 단점이 있다.
- [3] 현재 류탄스균에 대한 항균력이 있는 천연물질에 대한 연구와 항우식성 감미료로서 천연당에 대한 관심이 높아지고 있지만 자일리톨 만큼의 항충치 효과가 있는 천연당의 연구결과는 미약한 실정이다. 자일리톨의 경우 류탄스균이 자일리톨을 섭취하였을 때 포스포엔올피루브산 자일리톨 포스포트랜스퍼라제 시스템(phosphoenolpyruvate-xylitol phosphotransferase system, PEP-xylitol PTS)의 활성화에 의해 자일리톨-5-인산을 형성한다. 이는 당분해효소의 활성을 저해하고 더 이상 대사가 되지 않아 다시 자일리톨의 형태로 세포 외로 배출되어 에너지를 생성하지 못하고 소비만 하는 무익회로 과정을 통해 세균증식과 산 생성을 억제하게 된다. 이때 25 g/L 농도 이상의 자일리톨에서만 류탄스균의 성장을 억제할 수 있을 뿐만 아니라 자일리톨을 함유한 배지에서 지속적인 배양을 하면 자일리톨에 의한 성장이 저해되지 않는 내성균주가 형성된다는 연구결과도 있다(Knuuttila *et al.* (1975) *Caries Research*, 9(3), 177-189.)
- [4] 따라서, 내성균주 형성없이 저 농도에서도 효과적으로 구강 세균의 성장을 억제할 수 있는 항충치제의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 상세한 설명

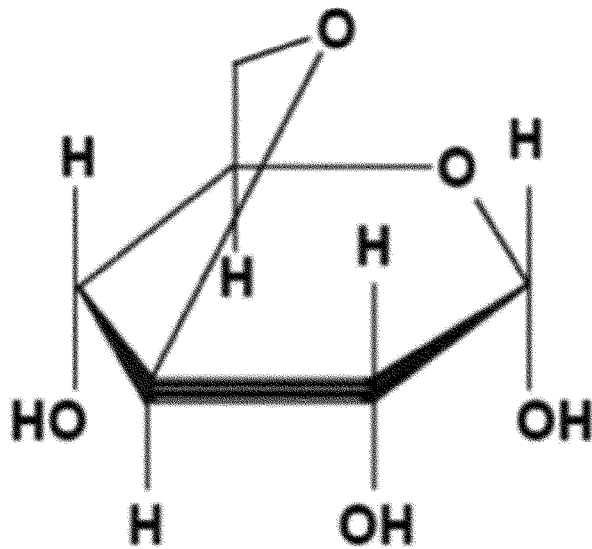
기술적 과제

- [5] 본 발명의 목적은 구강 미생물의 성장과 산 생성 저해 활성이 있는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 유효성분으로 포함하는 구강 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 또는 구강 질환의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [6] 본 발명의 다른 목적은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 그것을 필요로 하는 대상체에 투여하여 구강질환을 치료하는 방법을 제공하는 것이다.
- [7] 본 발명의 또 다른 목적은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 유효성분으로 포함하는 구강 질환의 예방 또는 개선용 구강 위생 조성물을 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 또 다른 목적은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 유효성분으로 포함하는 구강 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [9] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose)를 포함하는 구강 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [10] 본 발명은 또한, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 포함하는 구강 질환의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 약학 조성물을 제공한다.
- [11] 또한, 본 발명은 상기 구강 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 제조를 위한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 용도를 제공한다.
- [12] 본 발명은 또한 약제학적 유효량의 상기 구강 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 그것을 필요로 하는 대상체에 투여하는 것을 포함하는 구강 질환의 치료 방법을 제공한다.
- [13] 본 발명은 또한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 포함하는 구강 질환의 예방 또는 개선용 구강 위생 조성물을 제공한다.
- [14] 본 발명은 또한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 포함하는 구강 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [15] 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 하기 화학식 1로 표시될 수 있다:
- [16] [화학식 1]

[17]



- [18] 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는,
 [19] 전처리된(pretreated) 아가로스화, 아가로스 분해효소, 아가분해능이 있는 베타-갈락토시다아제(agarolytic β -galactosidase) 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소의 효소 혼합물을 반응시키거나,
 [20] 전처리된 아가로스화, 아가로스 분해효소, 아가분해능이 있는 베타-갈락토시다아제(agarolytic β -galactosidase) 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 순차적으로 반응시켜 얻은 반응 산물을 분리 정제하여 수득한 것일 수 있다.
 [21] 상기 전처리는 아가로스화 약산을 40 내지 150°C의 온도 범위에서 5분 내지 6시간 동안 반응시키는 것일 수 있다.
 [22] 상기의 효소 반응은 20 내지 40 °C의 온도 범위에서 30분 내지 7일간 실시하는 것일 수 있다.
 [23] 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*), 스트렙토코커스 오랄리스(*Streptococcus oralis*), 스트렙토코커스 생귀니스(*Streptococcus sanguinis*), 푸조박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*), 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*), 악티노마이세스 비스코서스(*Actinomyces viscosus*), 악티노바실러스 악티노마이세탐코미탄스(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*) 및 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 구강 미생물의 성장과 산 생성을 저해하여 구강 질환을 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.
 [24] 상기 구강 미생물은 글루코오스, 수크로오스, 프룩토오스 및 말토오스로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 탄소원으로 사용할 수 있다.
 [25] 상기 구강 질환은 치아우식증, 치은염, 치주염, 구강내 점막 궤양, 구취 또는

구강건조증 중에서 선택된 어느 하나일 수 있다.

발명의 효과

- [26] 본 발명의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 구강 미생물의 성장을 저해하고, 구강 미생물의 탄소원 소비에 의한 산의 생성을 저해하여 항충치 활성을 가지고 있다.
- [27] 따라서, 구강 미생물에 의한 치아우식증, 치은염, 치주염, 구강내 점막 궤양, 구취 또는 구강건조증 등의 구강 질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 의약, 식품, 구강 위생제 등에 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [28] 도 1은 탄소원으로 10g/L의 글루코오스, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 및 자일리톨이 첨가된 액체 최소배지에서 고체 최소배지에서 *뮤탄스균* 성장에 대한 단일 탄소원의 효과를 나타낸 것이다(기질조건: 10g/L의 글루코오스; 10g/L의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스; 10g/L의 자일리톨. 희석 배수: 10배, 100배, 1,000배, 10,000배, 100,000배).
- [29] 도 2는 탄소원으로 10g/L의 글루코오스, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 및 자일리톨이 첨가된 액체 최소배지에서 *뮤탄스균* 성장에 대한 단일 탄소원의 효과를 나타낸 것이다.
- [30] 도 3a-f는 탄소원으로 10g/L의 글루코오스를 함유하는 최소배지에서 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(도 3a)와 자일리톨(도 3b)의 농도별 *뮤탄스균* 억제 효과와, *스트렙토코커스 오랄리스*(*S. oralis*)(도 3c: 3,6-안하이드로-L-갈락토오스, 도 3d: 자일리톨) 및 *스트렙토코커스 생귀니스*(*S. sanguinis*)(도 3e: 3,6-안하이드로-L-갈락토오스, 도 3f: 자일리톨)의 농도별 억제 효과를 나타낸 것이다.
- [31] 도 4a-c는 탄소원으로 10g/L의 글루코오스를 함유하는 최소배지에 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 0g/L(도 4a), 5g/L(도 4b), 10g/L(도 4c)을 첨가하여 *뮤탄스*의 성장, 잔존하는 탄소원의 농도, 및 산(젖산, 포름산, 아세트산) 생성량 분석 결과를 나타낸 것이다.
- [32] 도 5a-b는 탄소원으로 10g/L의 글루코오스를 함유하는 최소배지에 자일리톨을 20g/L(도 5a) 및 40g/L(도 5b)를 첨가하여 *뮤탄스균*의 성장, 잔존하는 탄소원의 농도, 산(젖산, 포름산, 아세트산) 생성량 분석 결과를 나타낸 것이다.
- [33] 도 6a-f는 탄소원으로 10 g/L의 수크로오스(도 6a, 도 6d), 프룩토오스(도 6b, 도 6e) 또는 말토오스(도 6c, 도 6f)를 함유하는 최소배지에 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(0-10 g/L; 도 6a-c) 또는 자일리톨(0-40 g/L; 도 6d-f)을 첨가하여 *뮤탄스균*의 성장을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [34] 본 발명자들은 아가로를 전 처리하고, 세가지 효소를 이용한 효소적 가수분해를 통해 단당체인 갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를

생산한 다음 3,6-안하이드로-L-갈락토오스만 분리 정제하여 뮤탄스균에 대한 탄소원으로 사용하였다. 3,6-안하이드로-L-갈락토오스에 대한 뮤탄스균의 성장과 산 생성 저해를 관찰하여 항충치 효과를 분석하였고, 대조군으로 글루코오스, 이외에 수크로오스, 프룩토오스, 말토오스 등의 발효당과 자일리톨을 탄소원으로 사용하여 비교 실험하였다.

- [35] 그 결과, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 자일리톨 조건에서는 글루코오스 조건에 비해 콜로니 형성이 저해되고, 탄소원의 희석배율이 높은 경우 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 조건에서 콜로니가 형성되지 않았다. 또한, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 뮤탄스균의 성장 촉진에 영향을 미치지 않았다. 따라서, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 자일리톨처럼 뮤탄스균에 대해 비발효성 당이고, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 자일리톨보다 훨씬 높은 성장 저해 효과가 있음을 확인하였다. 또한, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와, 글루코오스, 수크로오스, 프룩토오스, 또는 말토오스 등의 혼합 탄소원 조건에서 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 저농도에서는 뮤탄스균의 성장을 저해하나 고농도에서는 뮤탄스균의 성장이 일어나지 않았다. 또한, 저농도(5g/L)의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 뮤탄스균의 지연기가 길어지고, 성장속도가 감소되며, 생성된 산의 농도가 감소되어 뮤탄스균의 세포 성장과 산 생성 저해 효과가 약하게 있음을 확인할 수 있고, 고농도(10g/L)의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 뮤탄스균의 성장과 산 생성이 전혀 관찰되지 않았고, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 농도 변화가 없어 뮤탄스균은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 탄소원으로 사용할 수 없음을 알 수 있었다. 한편, 충치를 예방하는 당으로 알려진 자일리톨은 농도가 증가할수록 뮤탄스균의 성장을 저해하지만 3,6-안하이드로-L-갈락토오스보다 훨씬 높은 농도인 40g/L의 조건에서도 상당한 뮤탄스균의 성장이 관찰되었고, 산 생성을 완전히 저해하지는 못했다. 이는 자일리톨보다 낮은 농도의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스에서도 뮤탄스균에 대한 성장과 산 생성 저해 효과가 훨씬 크다는 것을 의미한다.
- [36] 따라서, 본 발명은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 포함하는 구강 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [37] 본 발명은 또한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 포함하는 구강 질환의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 약학 조성물을 제공한다.
- [38] 또한, 본 발명은 상기 구강 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 제조를 위한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 용도를 제공한다.
- [39] 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 홍조류 바이오매스를 구성하는 대표적인 탄수화물 성분인 한천의 구성 단당으로,
- [40] 화학적 합성을 통해 얻거나;
- [41] 전처리된 아가로스, 아가로스 분해효소, 아가분해능이 있는 베타-갈락토시다아제(*agarolytic β -galactosidase*) 및 알파-네오아가로바이오스

- 가수분해효소의 효소 혼합물을 반응시켜 얻거나;
- [42] 전 처리된 아가로스와, 아가로스 분해효소, 아가분해능이 있는 베타-갈락토시다아제(agarolytic β -galactosidase) 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 순차적으로 반응시켜 얻은 반응 산물을 분리 정제하여 수득한 것을 사용할 수 있다.
- [43] 상기 아가로스의 전처리는 아가로스 및 약산을 40 내지 150°C의 온도 범위에서 5분 내지 6시간 동안 반응시키는 것일 수 있다. 상기 범위 내일 경우 약산에 의한 아가로스의 과분해산물 및 잔존한 아세트산을 최소화할 수 있다.
- [44] 상기 약산은 아세트산(Acetic acid), 포름산(Formic acid), 숙신산(Succinic acid), 시트르산(Citric acid), 말산(Malic acid), 말레산(Maleic acid) 또는 옥살산(Oxalic acid) 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [45] 상기 약산은 생산단가 및 약산 중화 후 생성되는 염의 분리를 고려하여 0.5 내지 60%(w/v)의 농도로 사용하는 것이 좋다. 보다 구체적으로 20 내지 40% (w/v)의 농도로 사용할 수 있다.
- [46] 상기에서 전처리 후 생성된 아가로올리고당을 이당체를 생산하는 엑소-타입(exo-type)의 아가로스 분해효소와 반응시켜 아가로트리오스와 네오아가로바이오스를 생산한다.
- [47] 상기 아가로트리오스에 대해 비환원말단의 β -1,4 결합의 분해효소인 아가분해능이 있는 베타-갈락토시다아제(agarolytic β -galactosidase)를 처리하여 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 네오아가로바이오스를 생산하고, 마지막으로 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 사용하여 네오아가로바이오스를 단당체인 D-갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스로 분해한다.
- [48] 상기 효소 반응은 20 내지 40°C의 온도 범위에서 30분 내지 7일 동안 실시할 수 있다.
- [49] 상기 효소 반응을 보다 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- [50] 우선, 아가로올리고당을 분해하여 이당체인 네오아가로바이오스를 생산하는 아가로스 분해효소는 아가로스의 D-갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 사이의 베타-1,4-글리코사이드 결합을 절단하는 효소(Aga50D'라고도 함)를 사용할 수 있다.
- [51] 상기 아가로스 분해효소는 SEQ ID NO:1에 기재된 아미노산 서열뿐만 아니라 상기 효소의 하나 이상의 치환, 결손, 전위, 첨가 등의 변이 단백질로서 상기 아가로올리고당 가수분해 활성을 가지는 단백질도 본 발명의 효소의 권리범위에 포함되며, 바람직하게는 SEQ ID NO: 1에 개시된 아미노산 서열과 서열 동일성이 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 및 99% 이상인 아미노산 서열을 포함한다.
- [52] 상기 아가로스 분해효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40T에서 유래한 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

- [53] 상기 아가로스 분해효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T의 배양물의 상등액으로부터 분리 및 정제할 수 있으며, 유전공학적 재조합 기술을 이용하여 사카로파거스 데그라단스 이외 균주 또는 인공적인 화학적 합성법 등에 의하여 생산 및 분리할 수 있다.
- [54] 재조합 기술을 이용하는 경우, 통상적인 재조합 단백질 발현의 용이함을 위하여 사용되는 인자들, 예컨대 항생제 저항성 유전자, 친화성 컬럼 크로마토그래피에 사용될 수 있는 리포터 단백질 또는 펩타이드를 사용할 수 있으며, 이러한 기술은 본원발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 용이하게 실시 가능한 범주에 해당된다. 예컨대 상기 아가로스 분해효소는 식용균주, 예컨대 효모에 형질전환시켜 형질전환된 효모의 배양물 상등액을 대체하여 이용할 수 있다. 보다 구체적인 제조 기술은 대한민국 공개특허 제2010-0040438호(2010.04.20)를 참조할 수 있다.
- [55] 상기 아가로올리고당 및 아가로스 분해효소의 반응은 20 내지 40°C의 온도 범위에서 30분 내지 7일간 실시할 수 있다. 보다 구체적으로, 25 내지 35°C의 온도 범위에서 1일 내지 4일 동안 실시할 수 있다.
- [56] 다음으로, 아가로올리고당 가수분해 산물인 아가로트리오스를 네오아가로바이오스와 D-갈락토오스로 가수분해하는 아가분해능이 있는 베타-갈락토시다아제(agarolytic β -galactosidase)('VejABG'라고도 함)는 종래기술에서는 가수분해되지 않고 잔존하는 아가로트리오스를 효과적으로 분해하여 아가로스로부터 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산 효율을 현저히 개선할 수 있다.
- [57] 상기 아가분해능이 있는 베타-갈락토시다아제(agarolytic β -galactosidase)는 GH family 2에 속하는 효소로, 다른 GH family 2에 속하는 베타-갈락토시다제들과의 활성을 비교할 경우, 종래의 보고된 베타-갈락토시다제는 아가로트리오스를 분해하여 D-갈락토오스 및 네오아가로바이오스를 생산하는 활성을 나타내지 않으나, 비브리오 속(*Vibrio* sp.) EJY3 유래의 상기 아가분해능이 있는 베타-갈락토시다아제(agarolytic β -galactosidase)는 아가로트리오스 분해 활성을 나타낼 수 있다. 또한, 다양한 아가로올리고당(n), 예컨대, 아가로펜타오스, 아가로헵타오스의 비환원성말단에 작용하여 아가로올리고당을 D-갈락토오스와 네오아가로바이오스(n-1)로 가수분해할 수 있다.
- [58] 상기 아가분해능이 있는 베타-갈락토시다아제(agarolytic β -galactosidase)는 효소의 코딩 영역 전 및 후의 영역뿐만 아니라 개별 코딩 분절 사이의 개재 서열이 포함된 폴리펩티드를 생산하는데 연관된 DNA 분절, 즉 코딩 유전자를 통해 전사 및 번역될 수 있다. 예컨대, SEQ ID NO:2에 기재된 서열로부터 전사 및 번역될 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 효소의 하나 이상의 치환, 결손, 전위, 첨가 등의 변이 단백질로서 상기 아가로트리오스 가수분해 활성을 가지는 단백질도 본 발명의 효소의 권리범위에 포함되며, 바람직하게는 SEQ ID NO:2에 개시된 아미노산 서열과 서열 동일성이 80% 이상,

85% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 및 99% 이상인 아미노산 서열을 포함한다.

- [59] 상기 아가분해능이 있는 베타-갈락토시다아제(agarolytic β -galactosidase)는 비브리오 속(*Vibrio* sp.) EJY3 배양물의 상등액으로부터 분리 및 정제할 수 있으며, 유전공학적 재조합 기술을 이용하여 비브리오 속(*Vibrio* sp.) EJY3 이외 균주 또는 인공적인 화학적 합성법 등에 의하여 생산 및 분리할 수 있다. 재조합 기술을 이용하는 경우, 대장균에 형질전환시켜 형질전환된 대장균의 배양물 상등액 또는 상청액을 대체하여 이용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다. 보다 구체적인 제조 기술은 대한민국 공개특허 제2015-0043040호(2015.04.22)를 참조할 수 있다.
- [60] 상기 아가로트리오스 및 아가분해능이 있는 베타-갈락토시다아제(agarolytic β -galactosidase)의 반응은 20 내지 40°C의 온도 범위에서 30분 내지 7일간 실시할 수 있다. 보다 구체적으로 25 내지 35°C의 온도 범위에서 1일 내지 4일 동안 실시할 수 있다.
- [61] 상기 아가분해능이 있는 베타-갈락토시다아제(agarolytic β -galactosidase)는 아가로트리오스에 대해 약 30 내지 40°C에서, 약 pH 5 내지 9.6에서 최적 활성을 나타낼 수 있다.
- [62] 마지막으로, 상기 네오아가로바이오스를 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스로 분해할 수 있는 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소('sdNABH'라고도 함)는 SEQ ID NO:3에 기재된 아미노산 서열 뿐만 아니라 상기 효소의 하나 이상의 치환, 결손, 전위, 첨가 등의 변이 단백질로서 상기 네오아가로바이오스 가수분해 활성을 가지는 단백질도 본 발명의 효소의 권리범위에 포함되며, 바람직하게는 SEQ ID NO: 4에 개시된 아미노산 서열과 서열 동일성이 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 및 99% 이상인 아미노산 서열을 포함한다.
- [63] 상기 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40T에서 유래한 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [64] 상기 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*)의 배양물의 상등액 또는 상청액으로부터 분리 및 정제할 수 있으며, 유전공학적 재조합 기술을 이용하여 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 이외 균주 또는 인공적인 화학적 합성법 등에 의하여 생산 및 분리할 수 있다. 보다 구체적인 제조 기술은 대한민국 공개특허 제2013-0085017호(2013.07.26)를 참조할 수 있다.
- [65] 상기 네오아가로바이오스와 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소의 반응은 20 내지 40°C의 온도 범위에서 30분 내지 7일 동안 실시할 수 있다. 보다 구체적으로 25 내지 35°C의 온도 범위에서 1일 내지 4일 동안 실시할 수 있다.
- [66] 상기 네오아가로바이오스의 분해 산물에 대해 흡착 크로마토그래피인 실리카

젤 크로마토그래피 및 젤 투과 크로마토그래피인 바이오 젤 P2 크로마토그래피를 순차적으로 실시하여 대략 95%의 고순도의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 분리 정제할 수 있다.

- [67] 본 명세서에서 "단백질" 및 "폴리펩티드"는 본원에서 상호 교환 가능하게 사용된다.
- [68] 본 발명에서 폴리펩티드가 또 다른 서열에 대하여 특정 비율(예컨대, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%)의 서열 동일성을 가진다는 것은, 상기 두 서열을 정렬시킬 때, 상기 서열들의 비교시 상기 비율의 아미노산 잔기가 동일함을 의미한다. 상기 정렬 및 백분율 상동성 또는 동일성은, 당업계에 공지된 임의의 적당한 소프트웨어 프로그램, 예를 들어 문헌[Current Protocols in Molecular Biology(F. M. Ausubel 등 (eds) 1987 Supplement 30 Section 7.7.18)]에 기재된 것들을 사용하여 결정할 수 있다. 바람직한 프로그램으로는, GCG Pileup 프로그램, FASTA(Pearson 등 1988 *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85:2444-2448), 및 BLAST(BLAST Manual, Altschul 등, Natl. Cent. Biotechnol. Inf., Natl Lib. Med.(NCIB NLM NIH), Bethesda, MD, 및 Altschul 등 1997 NAR25:3389-3402)이 있다. 또 다른 바람직한 정렬 프로그램은 ALIGN Plus(Scientific and Educational Software, PA)로서, 바람직하게는 기본 매개변수를 사용하는 것이다. 사용 가능한 또 다른 서열 소프트웨어 프로그램은 Sequence Software Package Version 6.0(Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)에서 이용 가능한 TFASTA Data Searching Program 이다.
- [69] 본 발명에서 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터와 관련하여 사용될 때 용어 "재조합"은, 상기 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터가 이중 핵산 또는 단백질의 도입 또는 본래적 핵산 또는 단백질의 변경에 의해 변형되었거나, 또는 상기 세포가 이렇게 변형된 세포로부터 유래한 것을 가리킨다. 즉, 예를 들어, 재조합 세포는 상기 세포의 본래적 (비(非)재조합) 형태 내에서는 발견되지 않는 유전자를 발현하거나 또는, 다르게는 발현 시 비정상적으로 발현되거나 또는 전혀 발현되지 않는 본래적 유전자를 발현한다.
- [70] 본 명세서에서 "핵산"은 단일가닥 또는 이중가닥의 DNA, RNA, 및 이들의 화학적 변형체를 포괄한다. "핵산" 및 "폴리뉴클레오티드"는 본원에서 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 유전 암호가 축퇴되어 있기 때문에, 특정 아미노산을 인코딩하기 위해서 하나 이상의 코돈을 사용할 수 있으며, 본 발명은 특정 아미노산 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포괄한다.
- [71] 핵산 서열을 세포 내로 삽입하는 용어 "도입"은 "트랜스펙션(transfection)", 또는 "형질전환" 또는 "형질도입(transduction)"을 의미하며, 핵산 서열의 진핵 또는 원핵 세포 내로의 통합에 대한 언급이 포함되고, 이때 상기 핵산 서열은 세포의 게놈 (예컨대, 염색체, 플라스미드, 색소체, 또는 미토콘드리아 DNA) 내로 통합되어, 자율 레플리콘으로 전환되거나, 또는 일시적으로 발현된다.
- [72] 상기의 효소 반응 후 생산된 산물 중에서 3,6-안하이드로-L-갈락토오스만을

분리 정제하기 위해 흡착 크로마토그래피인 실리카 젤 크로마토그래피와 젤 투과 크로마토그래피인 바이오 젤 P2크로마토그래피를 사용하고, GC/MS 분석을 통해 정량할 수 있다.

- [73] 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다.
- [74] 상기 약제학적으로 허용 가능한 담체는 의약 분야에서 통상 사용되는 담체 및 비히클을 포함하며, 구체적으로 이온 교환 수지, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 각종 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨 및 아연 염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 또는 양모지 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [75] 또한, 본 발명의 약학 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [76] 한 양태로서, 본 발명에 따른 약학 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여를 위한 적합한 다양한 제형으로 제제화되어 사용될 수 있다.
- [77] 상기 경구 투여용 제제의 비제한적인 예로는, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 정제, 수용성 현탁액, 유성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀전, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제 등을 들 수 있다.
- [78] 본 발명의 상기 약학 조성물을 경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴(Amylopectin), 셀룰로오스(Cellulose) 또는 젤라틴(Gelatin) 등과 같은 결합제; 디칼슘 포스페이트(Dicalcium phosphate) 등과 같은 부형제; 옥수수 전분 또는 고구마 전분 등과 같은 붕괴제; 스테아르산 마그네슘(Magnesium stearate), 스테아르산 칼슘(Calcium stearate), 스테아릴 푸마르산 나트륨(Sodium stearyl fumarate) 또는 폴리에틸렌 글리콜 왁스(Polyethylene glycol wax) 등과 같은 윤활유 등을 사용할 수 있으며, 감미제, 방향제, 시럽제 등도 사용할 수 있다.
- [79] 나아가 캡슐제의 경우에는 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체 등을 추가로 사용할 수 있다.
- [80] 상기 비경구용 제제의 비제한적인 예로는, 주사액, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 구강용 스프레이제, 구강용 세정제, 치약제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 크림 등을 들 수 있다.
- [81] 본 발명의 상기 약학 조성물을 비경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결 건조 제제, 외용제 등을 사용할 수 있으며, 상기 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

- [82] 또한, 보다 구체적으로 본 발명의 상기 약학 조성물을 주사액으로 제제화하는 경우, 본 발명의 상기 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고 이를 앰플(ampoule) 또는 바이알(vial)의 단위 투여용으로 제제화할 수 있다. 또한, 본 발명의 상기 약학적 조성물을 에어로졸제로 제제화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합할 수 있다.
- [83] 또한, 본 발명의 상기 약학 조성물을 연고, 크림 등으로 제제화하는 경우에는, 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화 아연 등을 담체로 사용하여 제제화할 수 있다.
- [84] 본 발명의 상기 약학 조성물의 약학적 유효량, 유효 투여량은 상기 약학적 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 상기 약학 조성물의 투여로 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 투여 대상이 되는 개체의 종류, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 질병의 중세나 정도, 성별, 식이, 배설, 해당 개체에 동시 또는 다른 시기에 함께 사용되는 약물 기타 조성물의 성분 등을 비롯한 여러 인자 및 의약 분야에서 잘 알려진 유사 인자에 따라 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 본 발명의 상기 약학 조성물의 투여는 하루에 1 회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [85] 본 발명의 상기 약학 조성물의 투여 경로 및 투여 방식은 각각 독립적일 수 있으며, 그 방식에 있어 특별히 제한되지 아니하며, 목적하는 해당 부위에 상기 약학 조성물이 도달할 수 있는 한 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다. 상기 약학 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있다.
- [86] 상기 비경구 투여하는 방법으로는, 예를 들어 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 경피 투여 또는 피하 투여 등을 이용할 수 있으며, 상기 조성물을 질환 부위에 도포하거나 분무, 흡입하는 방법 또한 이용할 수 있으나 이들에 제한되지 아니한다.
- [87] 본 발명의 상기 약학 조성물은 바람직하게는 경구 투여되거나 주사 투여될 수 있다.
- [88] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란, 본 발명의 상기 약학 조성물을 개체에 투여하여 구강 질환의 발병을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [89] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란, 본 발명의 상기 약학 조성물을 개체에 투여하여 구강 질환의 중세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미한다.
- [90] 본 발명에서 상기 구강 질환은 구강에 발생하는 질환이라면 그 병중에 관계없이 모두 포함하는 개념이며, 예컨대, 스트렙토코커스 류탄스(*Streptococcus*

mutans), 스트렙토코커스 오랄리스(*Streptococcus oralis*), 스트렙토코커스 생귀니스(*Streptococcus sanguinis*), 푸조박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*), 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*), 악티노마이세스 비스코서스(*Actinomyces viscosus*), 악티노바실러스 악티노마이세템코미탄스(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*) 또는 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*) 등과 같은 구강 미생물로부터 주로 야기되는 구강 질환, 또는 구강 면역 저하에 의한 구강 질환을 의미할 수 있다. 상기 구강 질환의 비제한적인 예로는 치아우식증, 치은염, 치주염, 구강 내 점막 궤양, 구취, 구강건조증 등을 들 수 있다.

- [91] 본 발명은 또한 약제학적 유효량의 상기 구강 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 그것을 필요로 하는 대상체에 투여하는 것을 포함하는 구강 질환의 치료 방법을 제공한다.
- [92] 본 발명에서 사용되는 용어, "대상체"는 쥐, 가축, 인간 등을 포함하는 포유 동물을 비롯한 모든 동물을 의미한다.
- [93] 본 발명의 상기 구강 질환의 치료 방법에서, 상기 약학 조성물의 투여량, 투여 경로, 투여 방식 등에 관한 설명은, 본 발명의 상기 약학 조성물과 관련하여 상기에서 설명한 바와 동일하다.
- [94] "유효량"은 목적하는 면역반응을 적어도 부분적으로 달성하거나 또는 치료되어야 할 특정 질환의 발병 또는 진행을 지연하거나 전적으로 중지시키는 데 필요한 양을 의미한다. 이 양은 치료되어야 할 대상체의 건강과 물리적 상태, 치료되어야 할 대상체의 분류적 군, 항체를 합성하는 대상체의 면역계의 능력, 목적하는 보호의 정도, 백신 제제, 의학적 상황의 평가 및 기타 관련 인자에 따라 달라진다. 이 양은 통상적인 시도를 통해 측정될 수 있는 비교적 광범위한 범위에 속할 것이다.
- [95] 본 발명은 또한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 포함하는 구강 질환의 예방 또는 개선용 구강 위생 조성물에 관한 것이다.
- [96] 본 발명에서, 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스, 구강 질환 및 예방에 관한 설명은, 본 발명의 상기 약학 조성물과 관련하여 상기에서 설명한 바와 동일하다.
- [97] 본 발명에서 상기 구강 위생 조성물은 구강의 위생을 위하여 사용할 수 있는 모든 종류 및 제형을 포함한다. 예컨대, 상기 구강 위생 조성물은 치약, 구강세정제, 구강청정제, 구강용 스프레이, 구강용 연고제, 구강용 바니쉬, 구강양치액 및 검으로 이루어진 군 중에서 선택되는 구강 제품에 포함될 수 있다.
- [98] 본 발명의 상기 구강 위생 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여에 적합한 다양한 제형으로 제제화되어 사용될 수 있으며, 이에 관한 설명은 본 발명의 상기 약학 조성물과 관련하여 상기에서 설명한 바와 동일하다.
- [99] 본 발명에서 사용되는 용어, "개선"은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를

들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[100] 본 발명은 또한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 포함하는 구강 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

[101] 본 발명에서, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스, 구강 질환, 예방, 및 개선에 관한 설명은, 본 발명의 상기 약학 조성물과 관련하여 상기에서 설명한 바와 동일하다.

[102] 본 발명의 상기 식품 조성물은 특별히 제한되지 아니하며, 건강기능식품 조성물을 포함한다.

[103] 용어, "건강기능식품"이란, 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미한다.

[104] 본 발명의 상기 건강기능식품 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[105] 상기 식품의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 비제한적인 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.

[106] 본 발명의 상기 건강기능식품 조성물이 음료 조성물인 경우, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비제한적인 예로 포도당, 과당과 같은 단당류; 말토오스, 수크로오스와 같은 이당류; 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 들 수 있다. 상기 첨가되는 추가 성분의 비율은 당업자의 선택에 의해 적절하게 결정될 수 있다.

[107] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강기능식품 조성물은 천연 과일 주스, 과일 음료 또는 야채 음료 등의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 사용되거나 2 이상을 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가물의 비율 또한 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[108] 이하, 본 발명을 실시예를 통해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[109] <실시예 1> 아가로스 전 처리

- [110] 3N의 아세트산에 7%(w/v) 농도의 아가로스가 되도록 녹여 microwave digester를 이용하여 130°C에서 10분간 반응한 후 1.5L의 94% 에탄올로 두 번 워싱하여 잔존한 아세트산 및 과분해산물을 제거하였다. 반응산물을 24시간동안 동결 건조하여 분말상태의 아가로올리고당을 얻었다.
- [111] <실시예 2> 아가로올리고당의 효소적 가수분해에 의한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산
- [112] 실시예 1로부터 생산한 산 가수분해물(아가로올리고당)을 단당체인 D-갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스로 분해하기 위하여 엑소-타입(exo-type)의 베타-아가라제인 Aga50D(대한민국 공개특허 제2010-0040438호, 2010.04.20 참조)와 반응시켰으며, 반응산물로 아가로트리오스와 네오아가로바이오스를 생산하였다.
- [113] Aga50D 반응이 끝난 후에 아가로트리오스를 비환원말단의 β 1-4결합의 분해효소인 *VejABG*(대한민국 공개특허 제2015-0043040호, 2015.04.22 참조)를 처리하여 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 네오아가로바이오스를 생산하였다.
- [114] 네오아가로바이오스로부터 단당체인 D-갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 생산하기 위하여 *VejABG* 반응 산물을 *sdNABH* 효소(대한민국 공개특허 제2013-0085017호, 2013.07.26 참조)와 반응시켰다.
- [115] 이 세 가지 재조합 효소는 대장균(*Escherichia coli*) BL21(DE3)에 발현시켰고, HisTrap 컬럼으로 정제하였다. 효소 반응 조건은 200mL의 50mM Tris-HCl 버퍼(pH 7.4)에 5%(w/v) 아가로올리고당을 부가하여 30°C에서 Aga50D, *VejABG*, *SdNABH* 순으로 3일간 반응시켰다. 효소 반응시 사용한 효소의 양은 총 200mL 당 Aga50D는 20mg, *VejABG*는 1mg, *SdNABH*는 2mg이었다.
- [116] <실시예 3> 실리카 젤 크로마토그래피와 바이오 젤 P2 크로마토그래피를 이용한 분리 정제
- [117] 실시예 2에서 생산된 반응산물 중에서 3,6-안하이드로-L-갈락토오스만을 분리 정제하기 위하여 크로마토그래피를 실시하였다. 반응산물을 셀라이트에 흡착시켜 파우더 형태의 샘플을 만든 후에 흡착 크로마토그래피인 실리카 젤 크로마토그래피를 실시하였다. 이동상은 클로로포름: 메탄올: 물을 각각 78:20:2(v/v/v)의 비율로 혼합한 용매를 사용하였으며 전체 이동상의 용매의 볼륨은 4L였다. 한 분획의 볼륨은 20mL였으며 총 200 분획의 샘플을 TLC로 분석한 후 그 중 3,6-안하이드로-L-갈락토오스가 있는 분획을 모아 회전진공농축기로 유기용매를 제거하였다.
- [118] <실시예 4> GC/MS 분석을 통한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 정성 및 정량
- [119] 실시예 3을 통해 생산한 고순도의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 GC/MS로 분석하여 정량하였다. GC/MS 분석을 위한 유도체화 과정은 다음과 같다. 정제한 샘플을 스피드 백으로 건조시킨 후에 10 μ L의 4%(w/v)농도의 피리딘에 녹인 O-메틸하이드록실아민 하이드로클로라이드(O-methylhydroxylamine hydrochloride in pyridine)을 넣고 30°C에서 120분간 반응시켰다. 그리고 45 μ L의 N

-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide를 넣고 37°C에서 30분간 반응을 실시하였다. GC/MS 분석을 위한 기기 조건은 다음과 같다. 분석 시 사용한 컬럼은 DB5-MS capillary column이며 GC 컬럼 온도 조건은 먼저 100°C에서 3.5분간 유지하고 160°C까지 승온시킨 후 20분간 유지하였다. 그 후 200°C까지 승온한 후 15분간 유지하고 마지막으로 280°C까지 승온한 후에 5분간 유지하였다. 1 μ l의 샘플을 9.6의 split ratio로 분석하였다.

[120] <실시에 5> 세포배양 조건

[121] 본 실험에서 사용한 균주는 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*) ATCC 25175, 스트렙토코커스 오랄리스(*S. oralis*), 스트렙토코커스 생귀니스(*S. sanguinis*)이다. 대표적으로, 뮤탄스균을 Brain-heart infusion(BHI) 배지에 12시간 동안 전 배양(pre-culture)하고, 2mM 인산칼륨 버퍼로 두 번 워싱한 뒤 이전에 보고된 문헌을 참고하여 만든 최소배지에서(Fujiwara et al (1978) Arch Oral Biol. 23, 601-602) 본 배양(main culture)을 37°C, 180rpm 조건에서 진행하였다. 최소배지의 조성은 5mL의 50mM Tris-HCl 버퍼(pH 7.4)에 10mg의 L-글루탐산, 1mg의 시스테인 염산염, 4.5mg의 L-류신, 5mg의 염화암모늄, 17.5mg의 인산수소칼륨, 7.5mg의 인산이수소칼륨, 21mg의 탄산염, 6mg의 황산마그네슘7수화물, 0.1mg의 염화망간4수화물, 3mg의 피루브산나트륨, 5 μ g의 리보플라빈, 2.5 μ g의 티아민염산염, 0.5 μ g의 비오틴, 5 μ g의 니코틴산, 0.5 μ g의 p-아미노벤조산, 2.5 μ g의 판토텐산 칼슘, 5 μ g의 피리독신염산염을 포함한다.

[122] <실시에 6> 단일 탄소원 조건에서 뮤탄스균의 성장 저해 효과

[123] 단일 탄소원 조건에서 뮤탄스균의 성장 저해 효과를 보기 위해 10g/L의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스, 글루코오스, 자일리톨을 각각 함유하는 고체 최소배지와 액체 최소배지에 뮤탄스균을 배양하였다. 전 배양(pre-culture)한 뮤탄스균을 2mM의 인산칼륨 버퍼에 10배, 10²배, 10³배, 10⁴배, 10⁵배 희석하여 고체배지에 스포팅(spotting)하고 30시간 배양하였다.

[124] 도 1에 나타난 바와 같이, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 자일리톨 조건에서는 글루코오스 조건에 비해 콜로니 형성이 저해되었다. 특히 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 경우에는 10⁴배, 10⁵배 희석한 조건에서 콜로니가 전혀 관찰되지 않았다.

[125] 또한, 10g/L의 각각의 탄소원(3,6-안하이드로-L-갈락토오스, 글루코오스, 자일리톨)을 포함하는 액체 최소배지에 뮤탄스균을 배양하여 세포 성장 저해 효과를 관찰하였다. 실시예 5의 방법으로 35시간 동안 본 배양(main-culture)하여 5시간 마다 600nm의 파장에서 배양액의 흡광도를 측정하여 세포 성장의 정도를 측정하였다.

[126] 도 2에 나타난 바와 같이, 글루코오스의 조건에서는 뮤탄스균이 정지기(stationary phase)에 접어드는 20시간 경과후의 건조균체량(dry cell weight, DCW)이 4.05g/L 농도가 측정되었고, 자일리톨의 경우에는 건조균체량이 훨씬 감소하여 1.46g/L 농도가 측정되었으며, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의

경우에는 류탄스균의 성장이 전혀 관찰되지 않았다. 따라서, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 자일리톨처럼 류탄스균에 대해 비발효성 당이고, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 자일리톨보다 훨씬 높은 성장 저해 효과가 있음을 확인하였다.

[127] <실시에 7> 혼합 탄소원 조건에서 류탄스균의 성장 저해 효과

[128] 실시예 5의 방법으로 10g/L의 글루코오스와 농도별

3,6-안하이드로-L-갈락토오스 또는 자일리톨을 포함하는 200 μ L의 액체 최소 배지에 류탄스균, 스트렙토코커스 오랄리스(*S. oralis*), 스트렙토코커스 생귀니스(*S. sanguinis*)를 96-웰 플레이트에 소량으로 배양하고 시간별로 600nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 성장 저해 효과를 관찰하였다. 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 농도는 0g/L에서 20g/L, 자일리톨은 0g/L에서 60g/L 사이의 농도로 각각 처리하였다.

[129] 도 3a-b에 나타난 바와 같이, 1.3 및 2.5g/L 농도의

3,6-안하이드로-L-갈락토오스에서는 류탄스균의 성장에 큰 변화가 없었고, 5 및 10g/L 농도에서부터 상당한 세포 성장 저해 효과를 관찰하였으며, 20g/L의 농도에서는 세포 성장이 일어나지 않았다. 자일리톨의 경우에는 자일리톨의 농도를 높게 처리할수록 류탄스균의 성장이 저해되었지만, 상당히 높은 농도인 40g/L의 농도에서도 상당한 세포 성장이 관찰되었다. 따라서, 자일리톨보다 낮은 농도의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스에서도 세포 성장 저해 효과가 더 크다는 결과를 확인하였다.

[130] 또한, 스트렙토코커스 오랄리스(*S. oralis*) 및 스트렙토코커스 생귀니스(*S. sanguinis*)에 대해서도, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 농도가 증가할수록 세포 성장 저해 효과를 보였다(도 3c 및 3d). 자일리톨의 경우 60g/L의 고농도에서 스트렙토코커스 생귀니스(*S. sanguinis*)에 대해 강한 저해 효과를 보였다(도 3e 및 도 3f).

[131] <실시에 8> 혼합 탄소원 조건에서 류탄스균의 성장과 산 생성 저해 효과

[132] 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 또는 자일리톨이 류탄스균의 성장과 산 생성에 미치는 영향을 확인하기 위해 실시예 5의 방법으로 10g/L의 글루코오스와 0, 5, 10g/L의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 또는 20, 40g/L의 자일리톨을 각각 포함하는 5mL의 액체 최소 배지에 류탄스균을 35시간 동안 배양하고 5시간 마다 흡광도를 이용하여 세포 성장, HPLC를 이용하여 세포 외 기질 농도와 산 생성 농도를 확인하였다. 글루코오스만 첨가한 조건은 음성 대조군, 글루코오스와 자일리톨을 첨가한 조건은 양성 대조군으로 설정하였다. 분석 시 사용한 컬럼은 Aminex HPX-87H 이며, 이동상으로 0.01N 황산을 65°C에서 0.5mL/min의 속도로 흘려주었다.

[133] 도 4a에 나타난 바와 같이, 탄소원으로 글루코오스만 포함하는 조건에서는 건조 균체량이 3.34g/L로 측정되었고, 비성장속도는 0.086h⁻¹이었다. 글루코오스는 30시간만에 모두 소비되었으며 젖산의 농도는 5.24g/L로

측정되었다. 그 외에도 소량 생성된 포름산과 아세트산의 농도는 각각 0.82, 0.71g/L 이었다.

- [134] 10g/L의 글루코오스에 5g/L의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 포함하는 조건에서는 뮤탄스균의 최종 건조균체량의 농도 감소는 없었지만 지연기(lag phase)가 길어지고, 비성장속도의 값이 0.075h^{-1} 로 감소한 점과 생성된 산의 농도가 줄어든 결과를 통해 세포 성장과 산 생성 저해 효과가 약하게 있다는 것을 확인하였다(도 4b).
- [135] 10g/L의 글루코오스에 10g/L의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 포함하는 조건에서는 뮤탄스균의 성장과 산 생성이 전혀 관찰되지 않았다. 또한 두 조건 모두 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 농도변화가 없었으며, 이 사실을 통해 뮤탄스균은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 탄소원으로 이용할 수 없다는 점을 확인하였다(도 4c).
- [136] 또한, 양성대조군으로서 10g/L의 글루코오스에 20g/L의 자일리톨을 포함하는 조건에서는 최종 건조균체량이 1.42g/L로 뮤탄스균 성장 저해가 일어났지만 비성장속도 값은 0.087h^{-1} 로 음성대조군의 0.086h^{-1} 와 비교했을 때 변화는 없었다. 글루코오스는 총 5.28g/L가 소비되었고, 생성된 젖산과 아세트산의 농도는 각각 3.67, 0.55g/L로 음성대조군에 비해 감소되었다(도 5a). 10g/L의 글루코오스에 40g/L 고농도의 자일리톨을 포함하는 조건에서는 20g/L의 자일리톨에 비해 지연기(lag phase)가 길어진 것을 관찰할 수 있었고, 소비된 글루코오스의 농도는 5.42g/L로 비슷하게 측정이 되었다. 글루코오스의 소비로 인해 생성된 젖산과 아세트산의 농도는 각각 3.67, 0.55g/L로 측정이 되었다(도 5b).
- [137] 또한, 뮤탄스균의 발효 과정 중의 자일리톨의 농도는 일정하게 유지되는 점을 통해 뮤탄스균에 대한 자일리톨의 비발효 성질을 확인하였다.
- [138] 이 결과를 통해 충치를 예방하는 당으로 알려진 자일리톨은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스보다 훨씬 높은 농도인 40g/L의 조건에서도 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 10g/L의 조건의 결과처럼 뮤탄스균의 성장과 산 생성을 완전히 저해하지는 못했다. 이는 자일리톨보다 낮은 농도의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스에서도 뮤탄스균에 대한 성장과 산 생성 저해 효과가 훨씬 크다는 것을 의미한다.
- [139] <실시예 9> 글루코오스 이외의 다양한 당의 조건에서 뮤탄스균에 대한 AHG 및 자일리톨의 저해 효과
- [140] 글루코오스 이외의 발효 당, 예컨대, 수크로오스, 프룩토오스 및 말토오스의 조건 하에서 뮤탄스균(*S. mutans*)에 대한 AHG 및 자일리톨의 저해 효과를 조사하였다. 실험은 10 g/L의 수크로오스, 프룩토오스 및 말토오스 각각을 포함하는 명시된 최소 배지에서 0-10 g/L의 AHG 또는 0-40 g/L의 자일리톨을 포함하는 96-웰 플레이트에서 수행하였다.
- [141] 수크로오스, 프룩토오스 및 말토오스의 조건 하에서, 뮤탄스균의 성장은 AHG에 의해 억제되었다. 수크로오스의 조건 하에서 1.3 g/L의 AHG에서는 세포

성장에서의 유의적인 감소가 관찰되지는 않았으나, AHG의 농도가 증가할수록(2.5g/L의 AHG), 세포 성장이 유의적으로 저해되었다. 5 g/L 및 10 g/L의 고농도의 AHG에서, 류탄스균의 세포 성장은 완전히 저해되었다(도 6a). AHG에 의한 류탄스균의 세포 성장의 저해에 대해 프룩토오스 및 말토오스의 조건에서도 유사한 결과가 관찰되었다(도 6b 및 도 6c).

[142] 2.5 g/L의 AHG 및 수크로오스의 조건 하에서, 비성장속도 값은 40 g/L의 자일리톨 및 수크로오스의 조건(0.061 h^{-1}) 보다 더 낮았다(0.040 h^{-1})(도 6a 및 도 6d). 또한, 1.3 g/L의 AHG 및 프룩토오스의 조건 하에서, 비성장속도 값은 40 g/L의 자일리톨 및 프룩토오스의 조건(0.085 h^{-1}) 보다 훨씬 더 낮았다(0.052 h^{-1})(도 6b 및 도 6e). 마찬가지로, 2.5 g/L의 AHG 및 말토오스의 조건 하에서, 비성장속도 값은 40 g/L의 자일리톨 및 말토오스의 조건(0.045 h^{-1}) 보다 더 낮았다(0.031 h^{-1})(도 6c 및 도 6f).

[143] 자일리톨 및 수크로오스의 조건 하에서, 자일리톨의 농도가 증가함에 따라 류탄스균의 세포 성장은 감소하였다(도 6d). 그러나, 본 실험에서 사용된 최대 농도(40 g/L)의 자일리톨에서조차도 자일리톨은 류탄스균의 세포 성장을 완전히 저해하지 못하였다(도 6d). 대조적으로, 훨씬 더 낮은 농도(5 g/L)의 AHG에서 수크로오스의 조건 하에서 류탄스균의 세포 성장이 완전히 저해되었다(도 6a).

[144] 상기 결과로부터 AHG는 글루코오스 대사뿐만 아니라 다른 발효 당, 즉, 수크로오스, 프룩토오스 및 말토오스의 대사를 저해함을 알 수 있었다. 특이하게도, 네 가지 발효 당 중에서, AHG의 저해 효과는 프룩토오스의 조건에서 가장 유의적이었다. 이는 다른 당에 비해 AHG와 프룩토오스 간의 더 큰 구조적 유사성, 즉, 푸라노오스 링이 있는 케토오스 당 때문인 것으로 보인다.

산업상 이용가능성

[145] 본 발명은 구강 질환 예방, 개선, 치료 분야에서 의약, 식품, 구강 위생제 등으로 사용할 수 있다.

[146]

청구범위

- [청구항 1] 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose)를 포함하는 구강 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*), 스트렙토코커스 오랄리스(*Streptococcus oralis*), 스트렙토코커스 생귀니스(*Streptococcus sanguinis*), 푸조박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*), 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*), 악티노마이세스 비스코서스(*Actinomyces viscosus*), 악티노바실러스 악티노마이세템코미탄스(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*) 및 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 구강 미생물의 성장과 산 생성을 억제하여 구강 질환을 예방 또는 치료하는 것인, 구강 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
구강 미생물은 글루코오스, 수크로오스, 프룩토오스 및 말토오스로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 탄소원으로 사용하는 것인, 구강 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
구강 질환은 치아우식증, 치은염, 치주염, 구강내 점막 궤양, 구취 또는 구강건조증 중에서 선택된 어느 하나인, 구강 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 5] 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 포함하는 구강 질환의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 약학 조성물.
- [청구항 6] 제1항의 구강 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 제조를 위한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 용도.
- [청구항 7] 약제학적 유효량의 제1항의 구강 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 그것을 필요로 하는 대상체에 투여하는 것을 포함하는 구강 질환의 치료 방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
구강 질환은 치아우식증, 치은염, 치주염, 구강내 점막 궤양, 구취 또는 구강건조증 중에서 선택된 어느 하나인, 구강 질환의 치료 방법.
- [청구항 9] 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose)를 포함하는 구강 질환의 예방 또는 개선용 구강 위생 조성물.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,

상기 조성물은 치약, 구강세정제, 구강청정제, 구강용 스프레이, 구강용 연고제, 구강용 바니쉬, 구강양치액 및 검으로 이루어진 군 중에서 선택되는 구강 제품에 포함되는 것인, 구강 질환의 예방 또는 개선용 구강 위생 조성물.

[청구항 11]

제9항에 있어서,

구강 질환은 치아우식증, 치은염, 치주염, 구강내 점막 궤양, 구취 또는 구강건조증 중에서 선택된 어느 하나인, 구강 질환의 예방 또는 개선용 구강 위생 조성물.

[청구항 12]

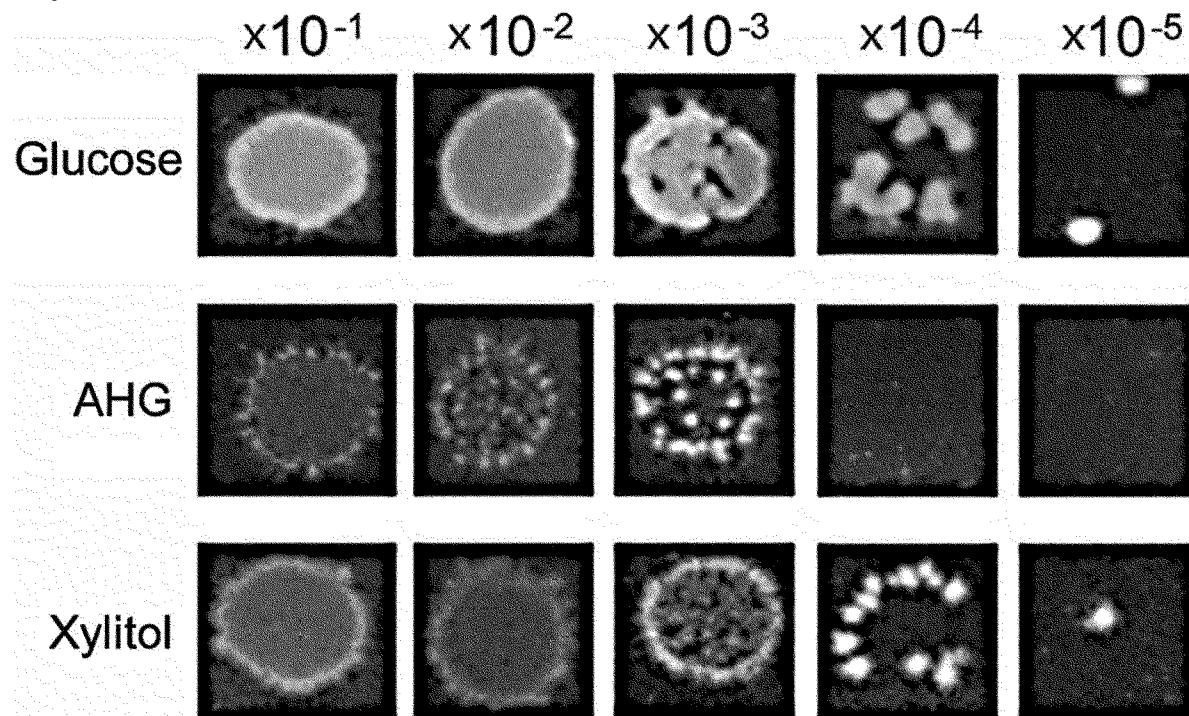
3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose)를 포함하는 구강 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

[청구항 13]

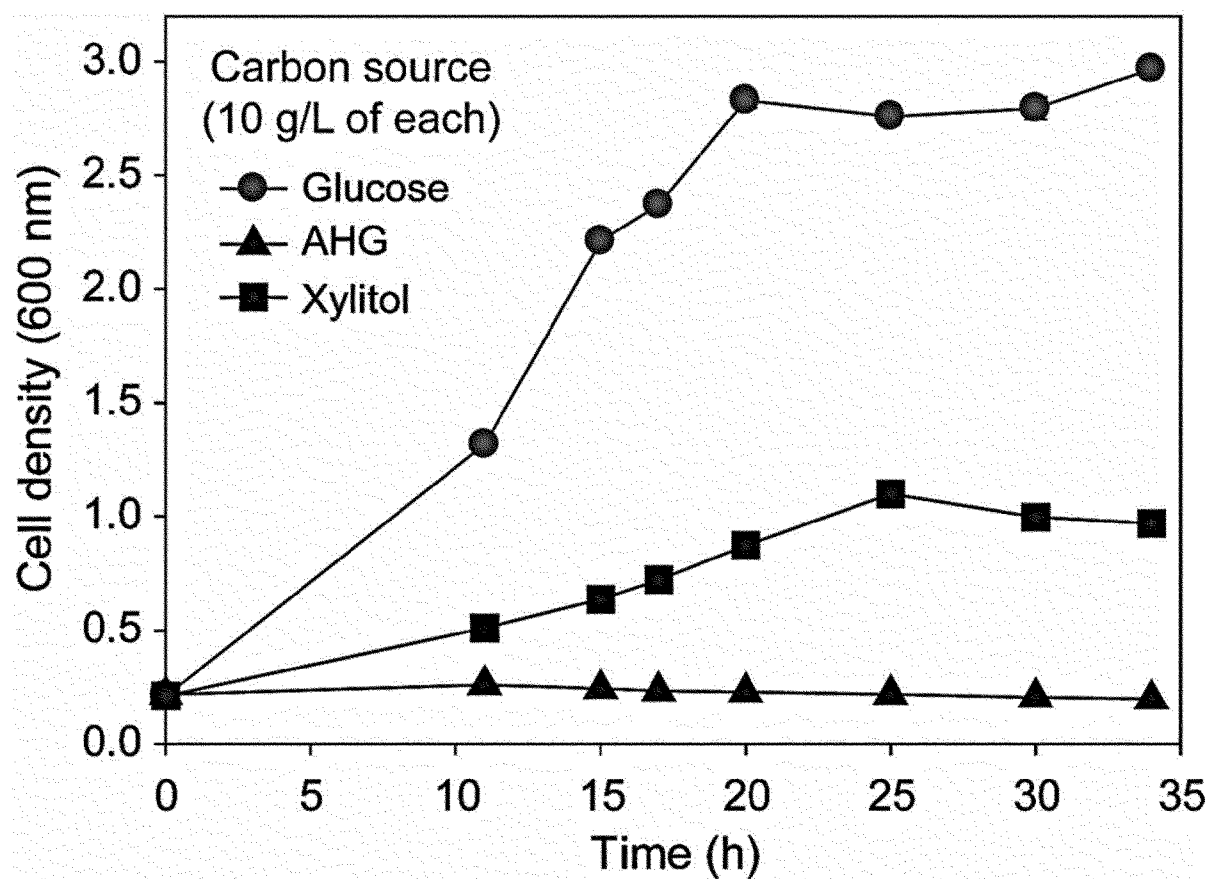
제12항에 있어서,

구강 질환은 치아우식증, 치은염, 치주염, 구강내 점막 궤양, 구취 또는 구강건조증 중에서 선택된 어느 하나인, 구강 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

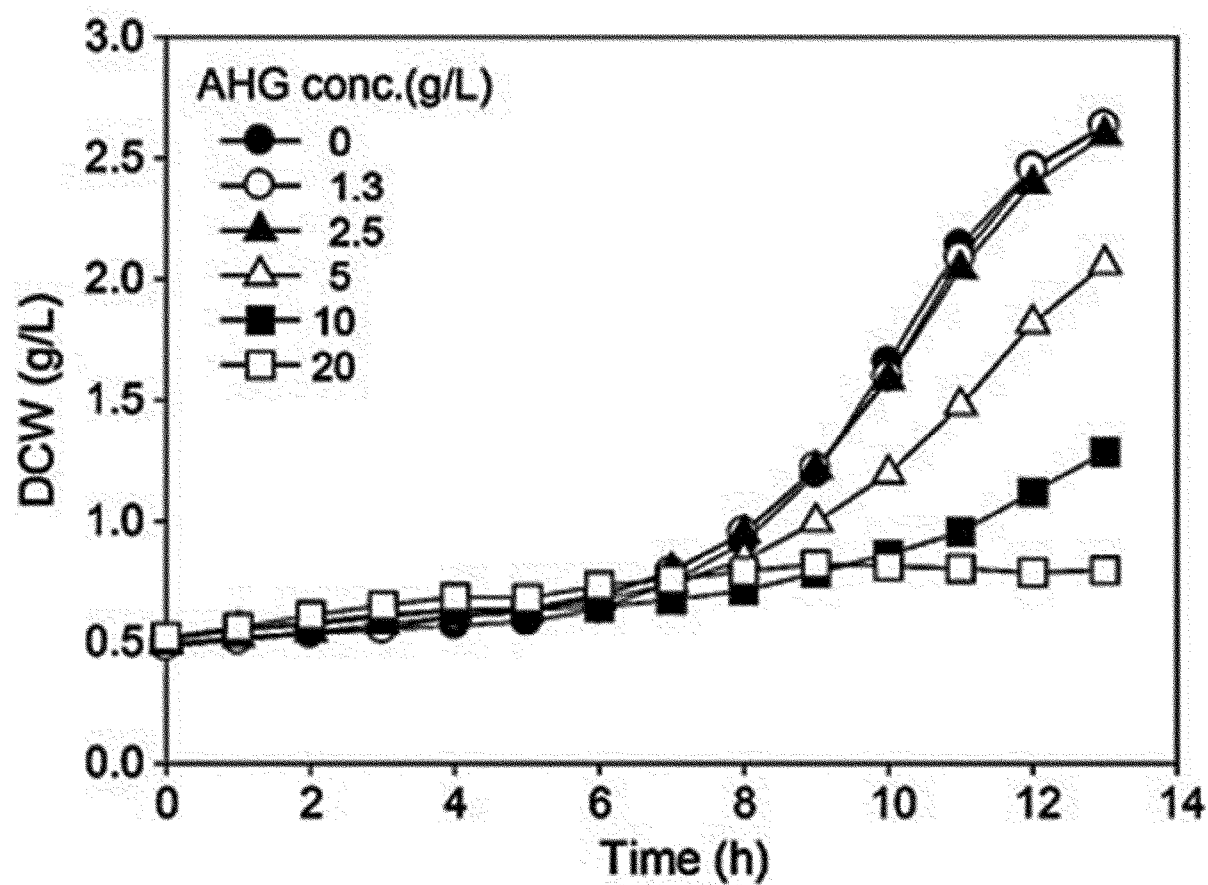
[Fig. 1]



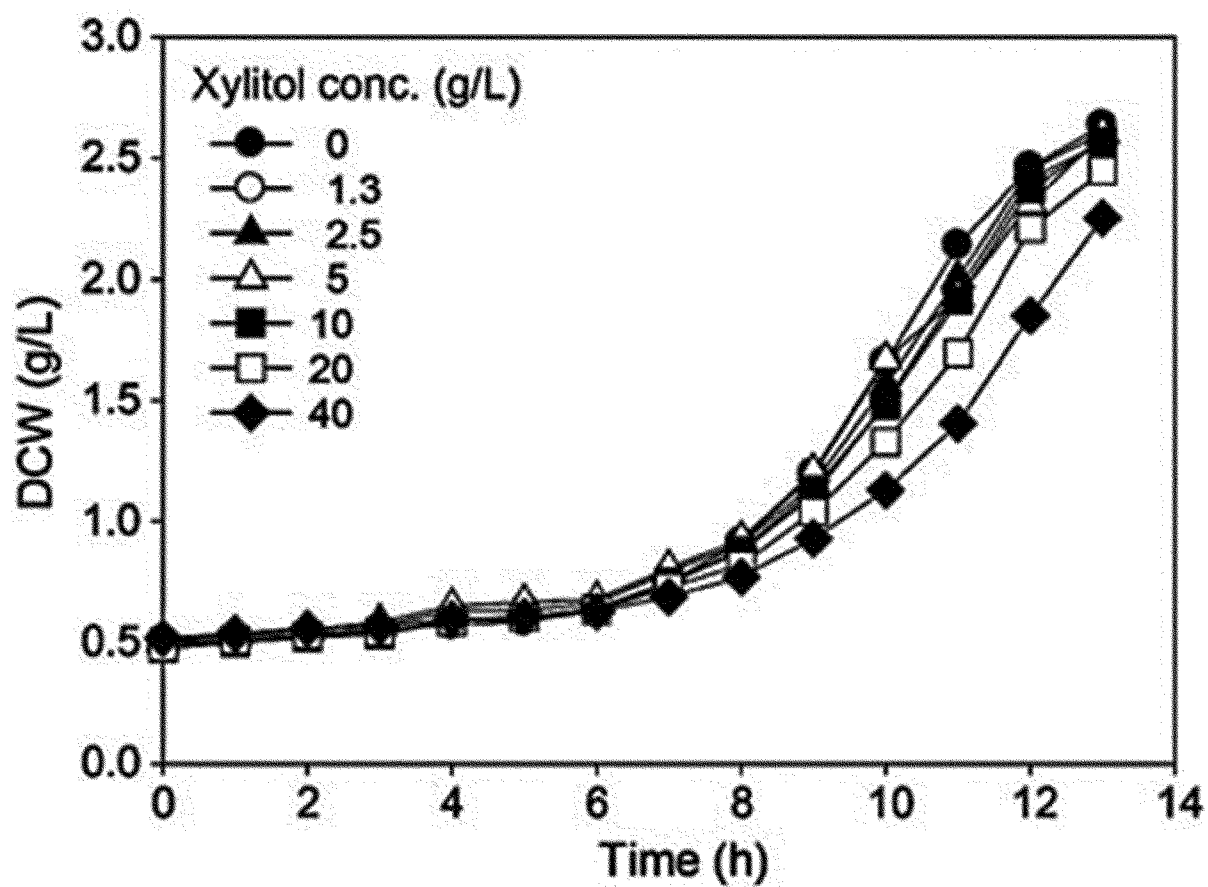
[Fig. 2]



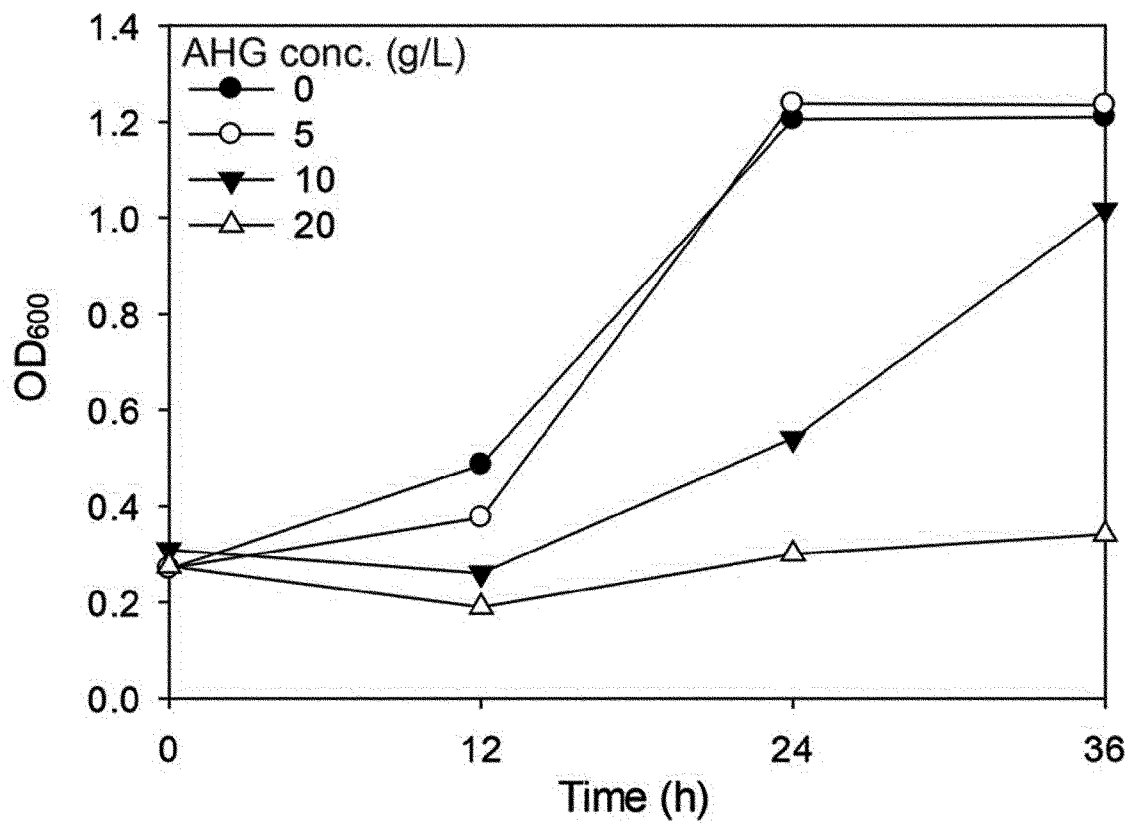
[Fig. 3a]



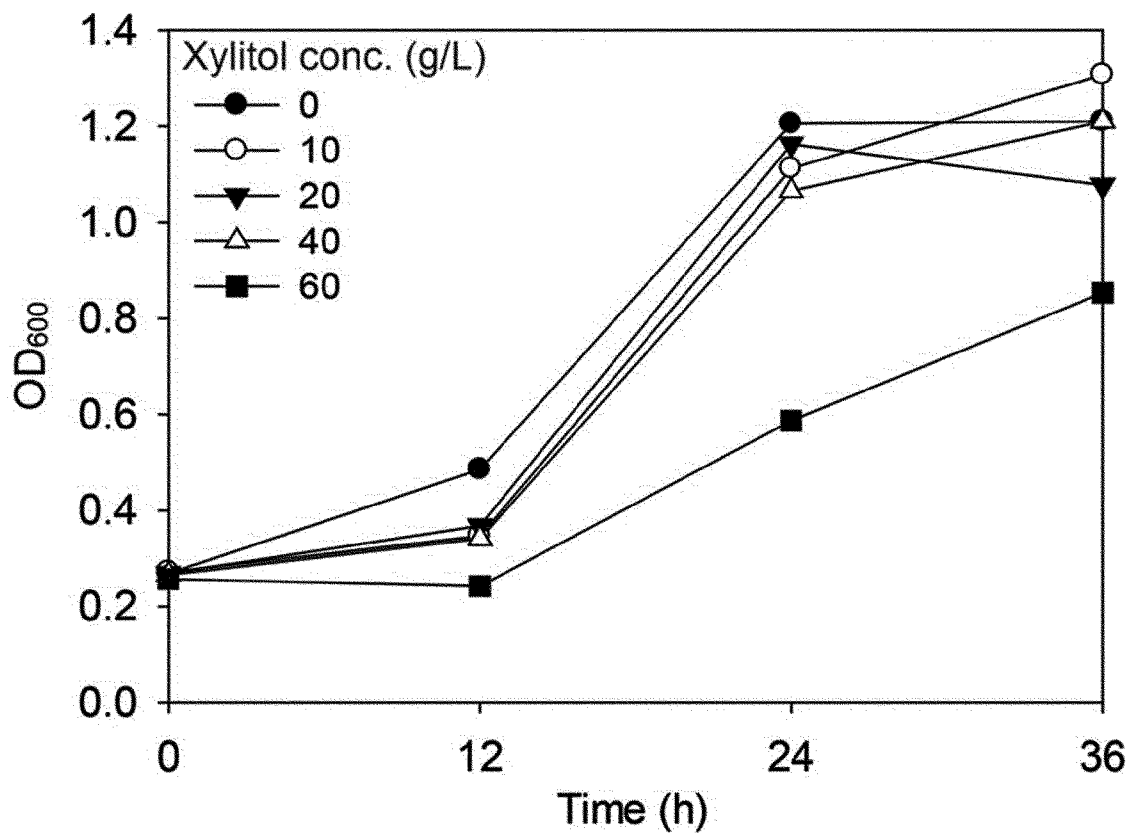
[Fig. 3b]



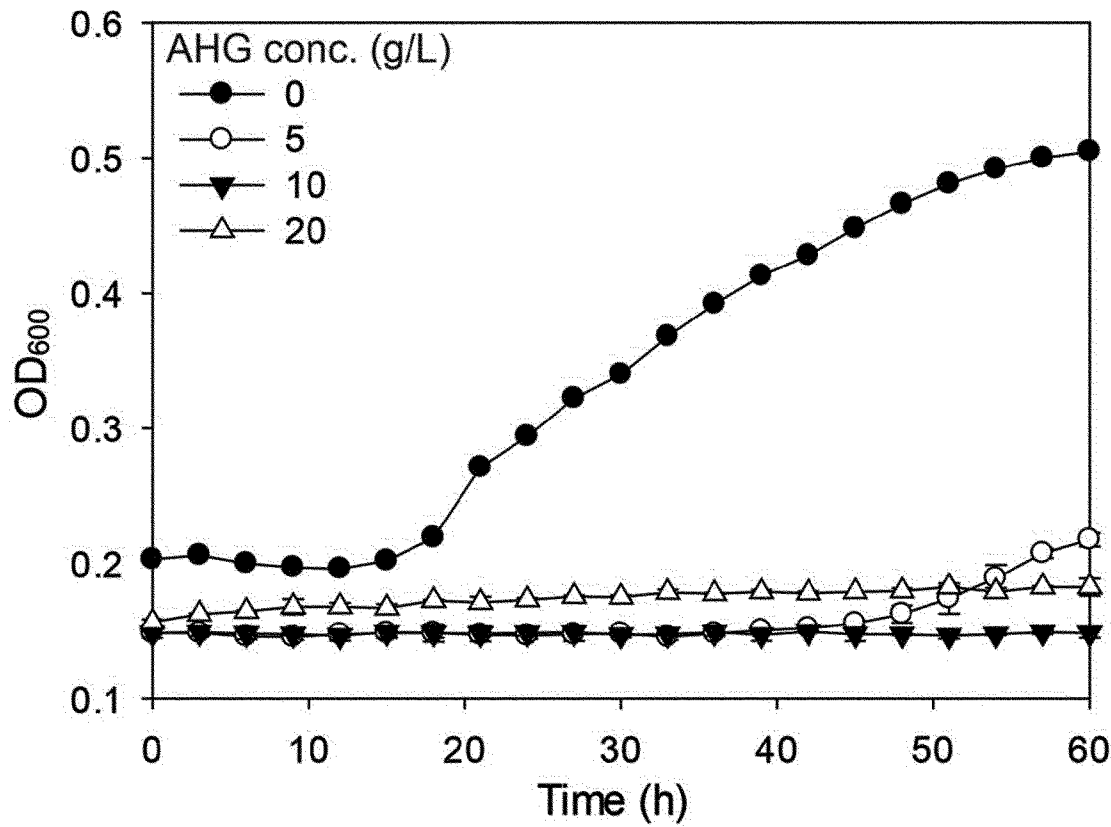
[Fig. 3c]



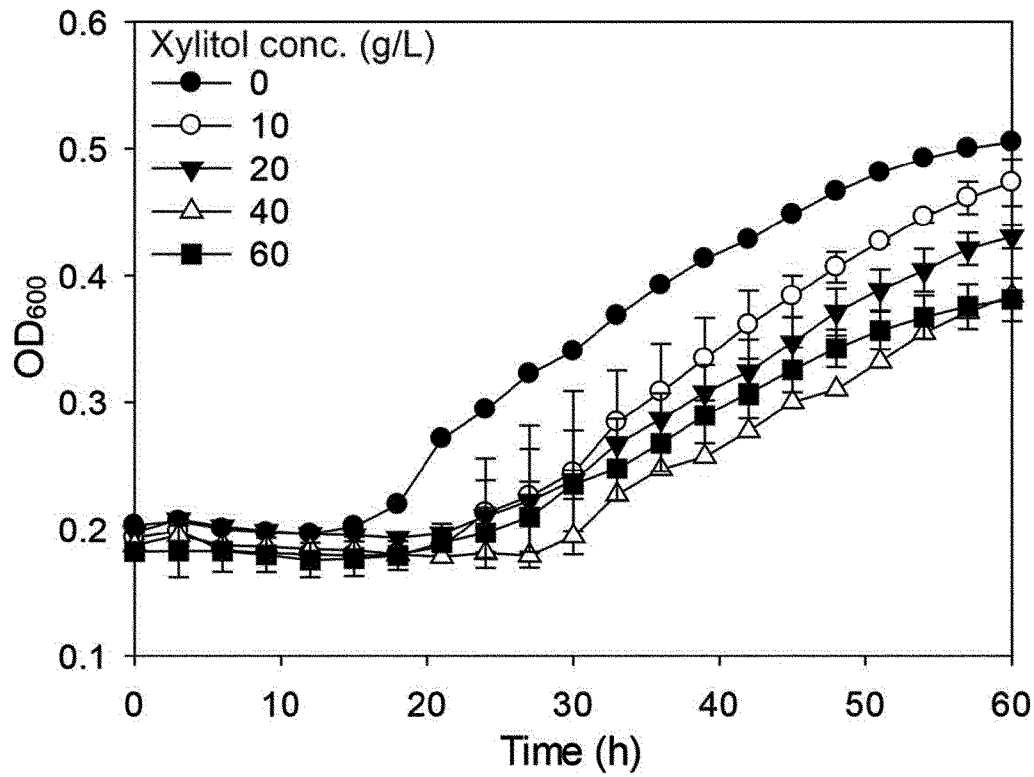
[Fig. 3d]



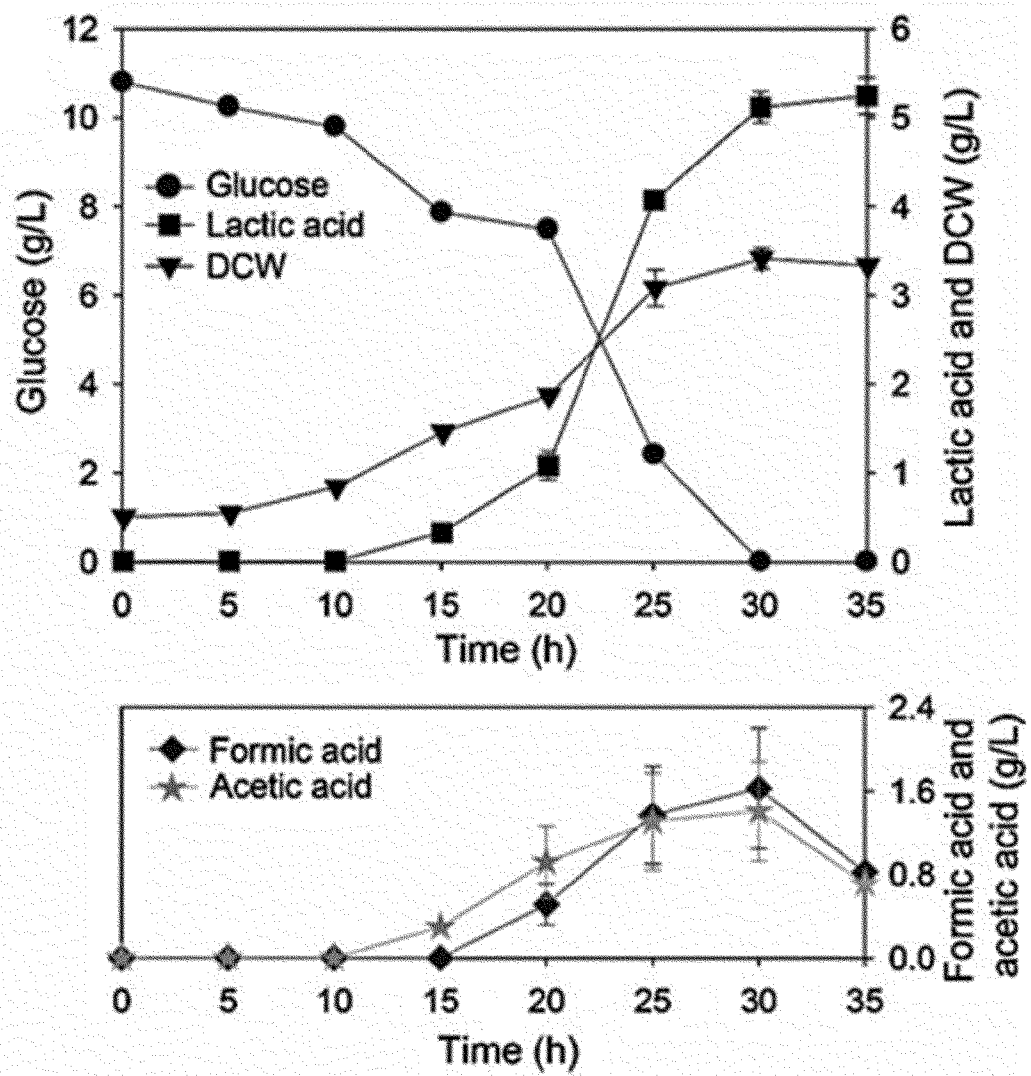
[Fig. 3e]



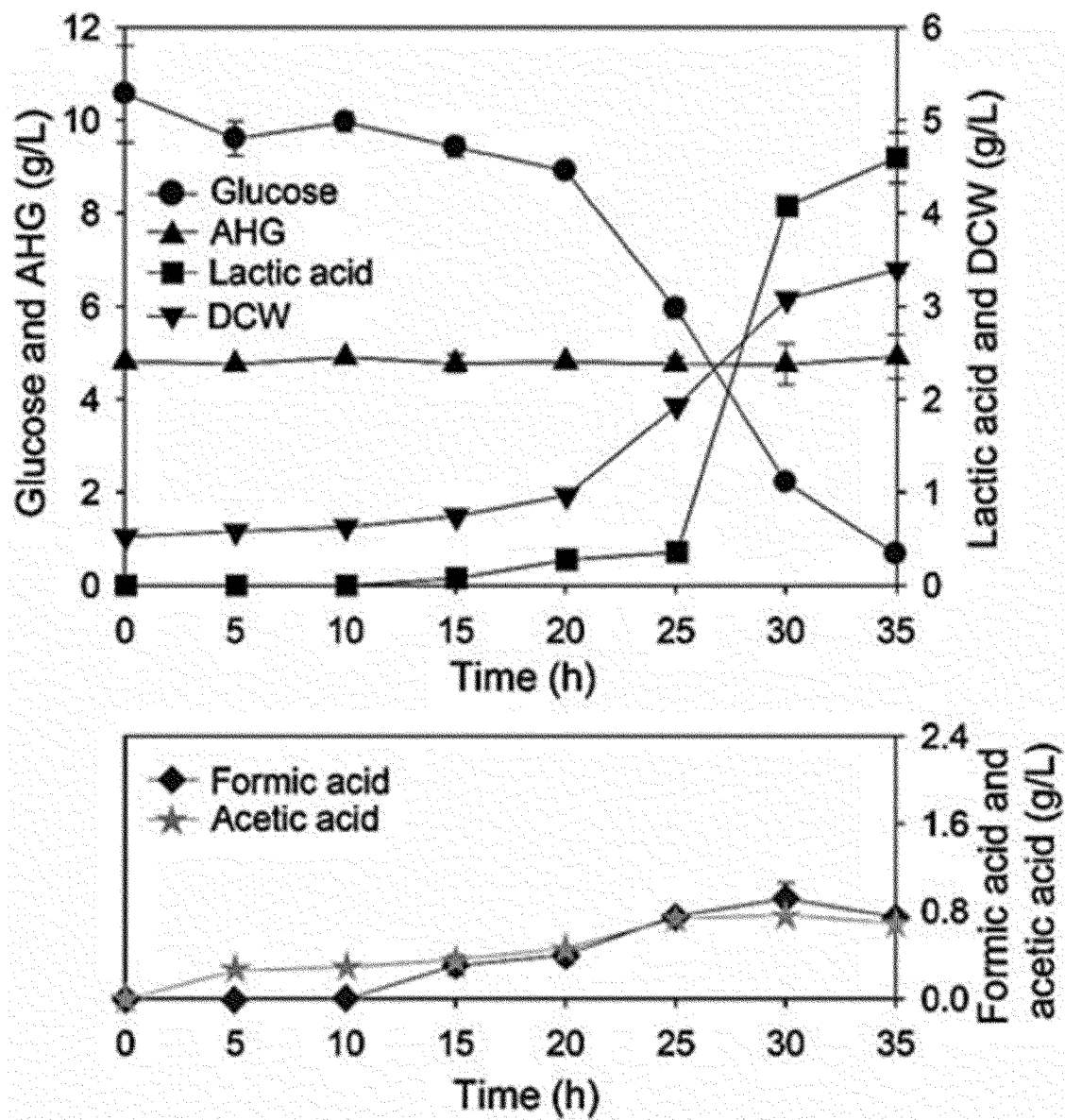
[Fig. 3f]



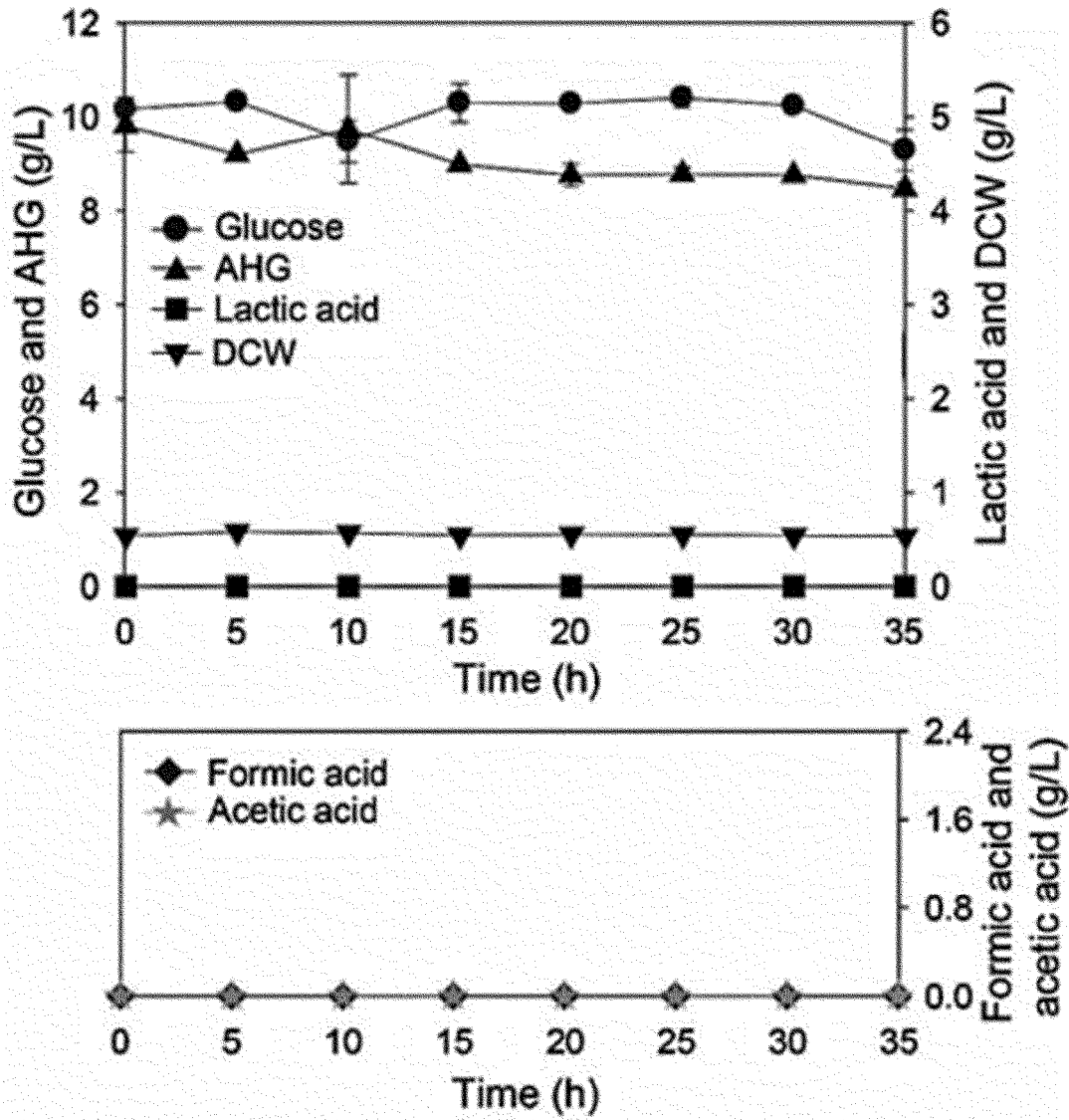
[Fig. 4a]



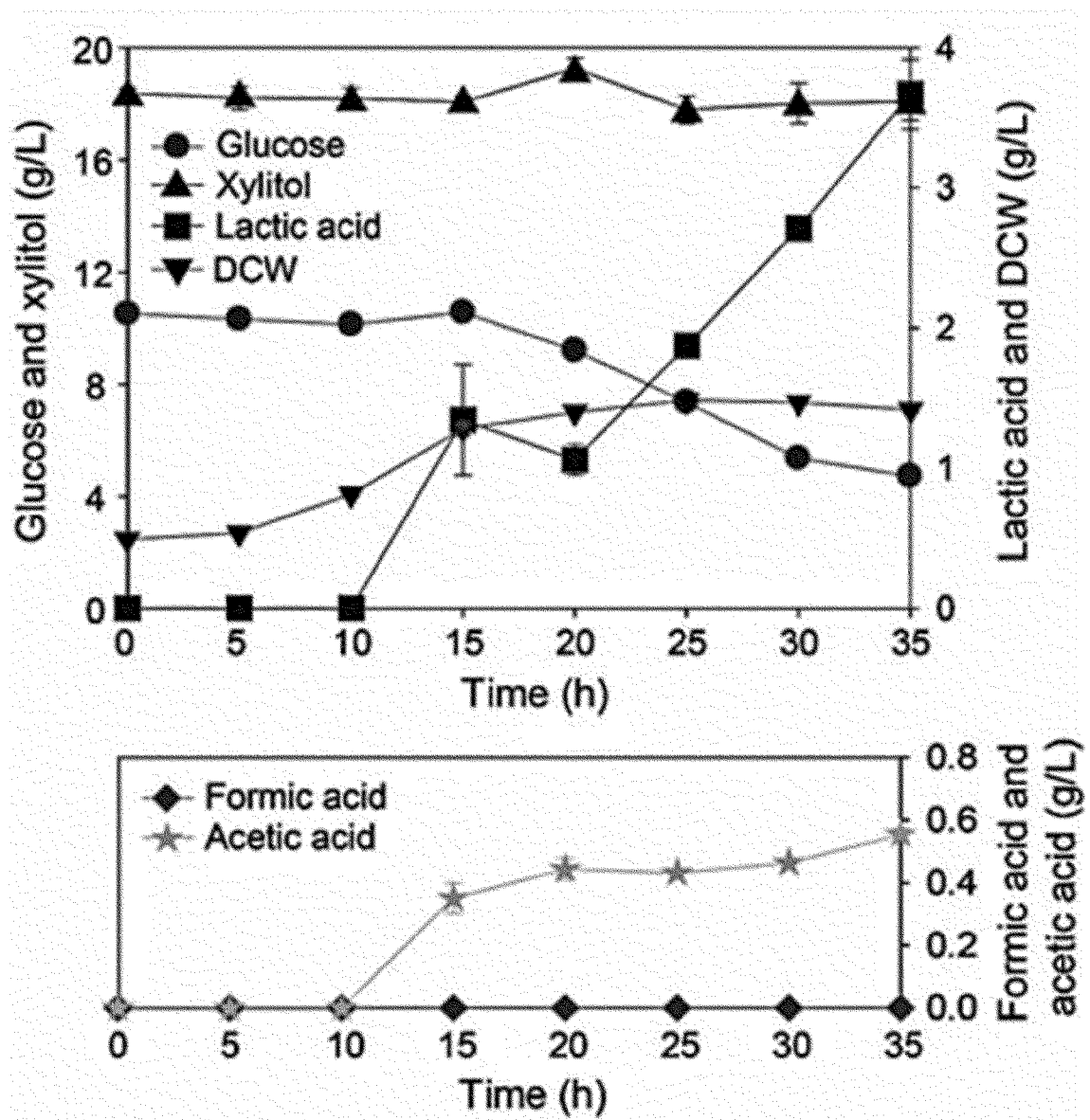
[Fig. 4b]



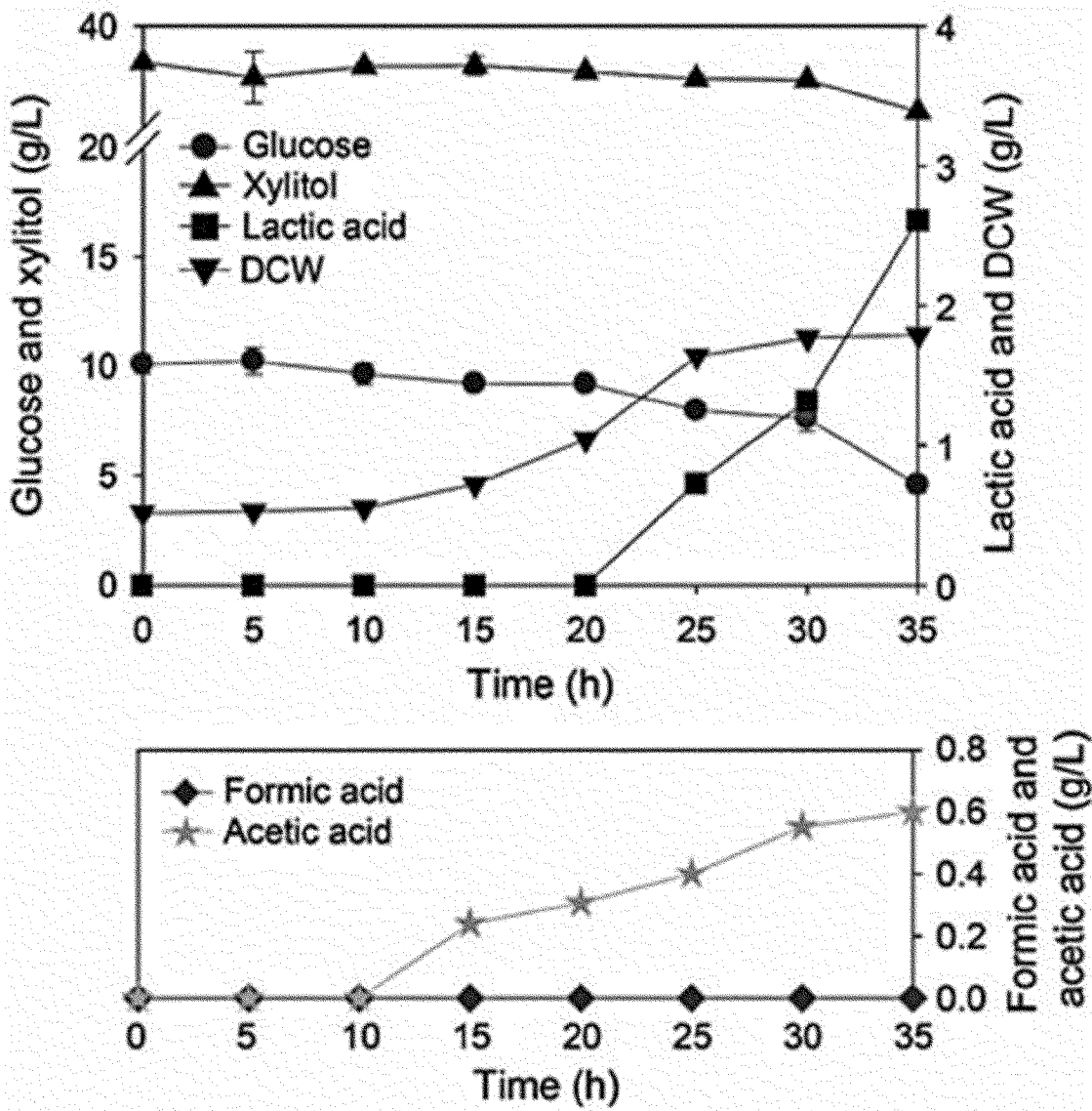
[Fig. 4c]



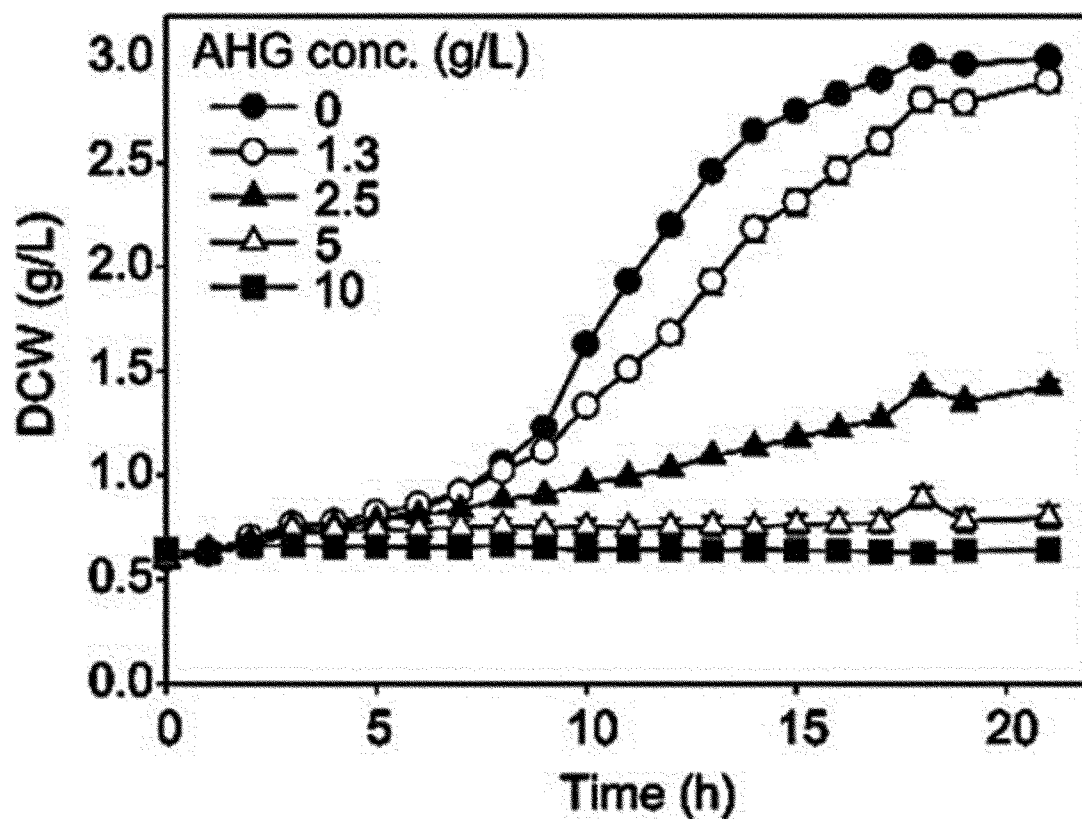
[Fig. 5a]



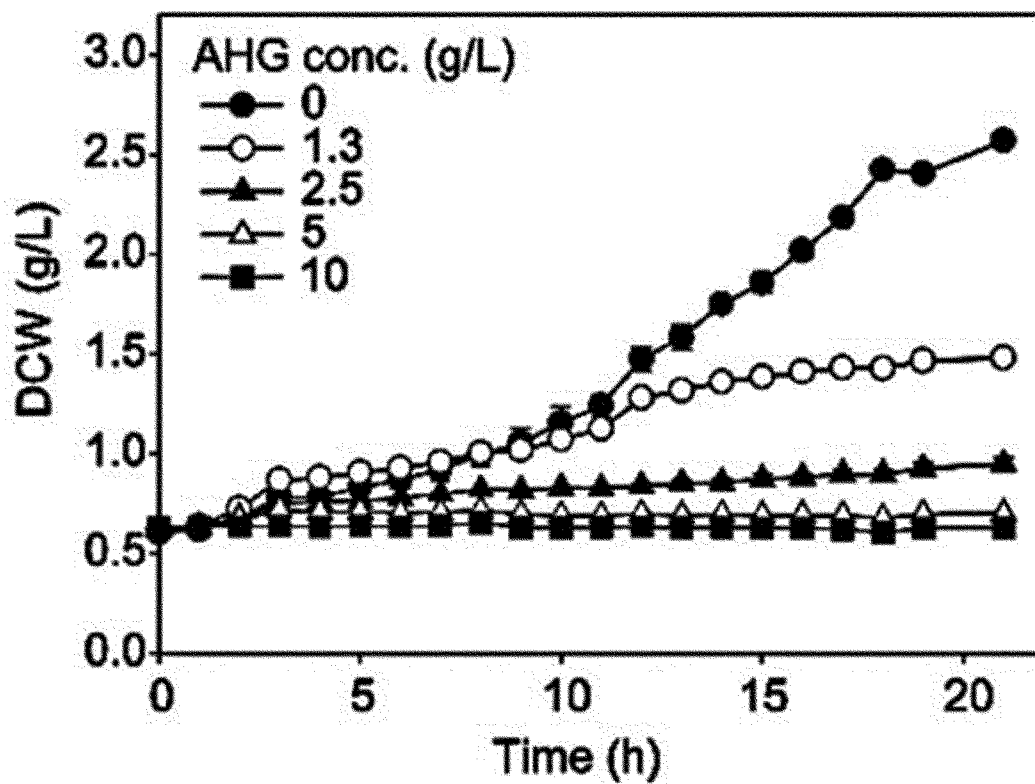
[Fig. 5b]



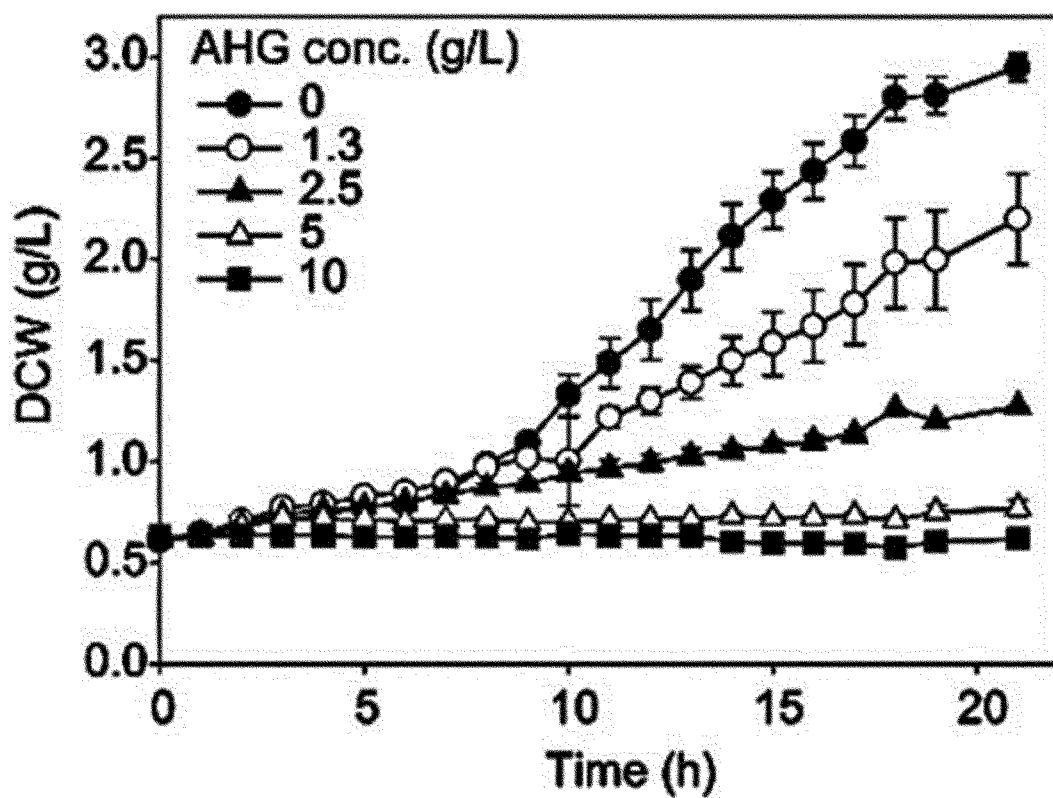
[Fig. 6a]



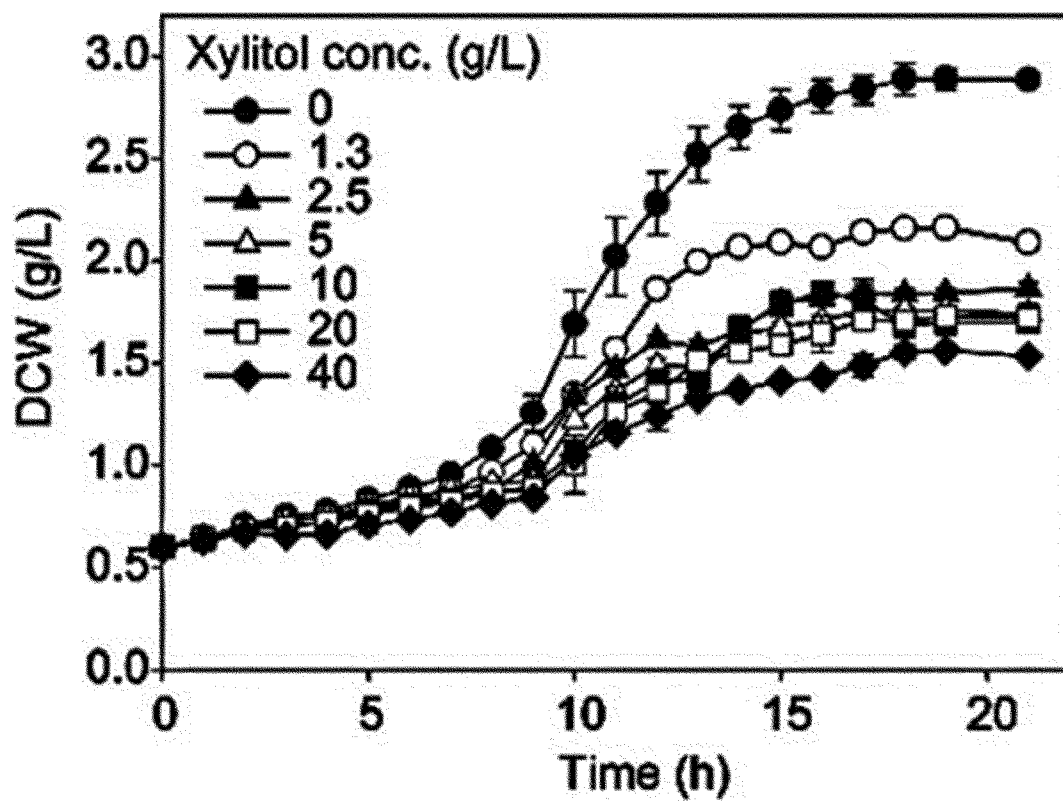
[Fig. 6b]



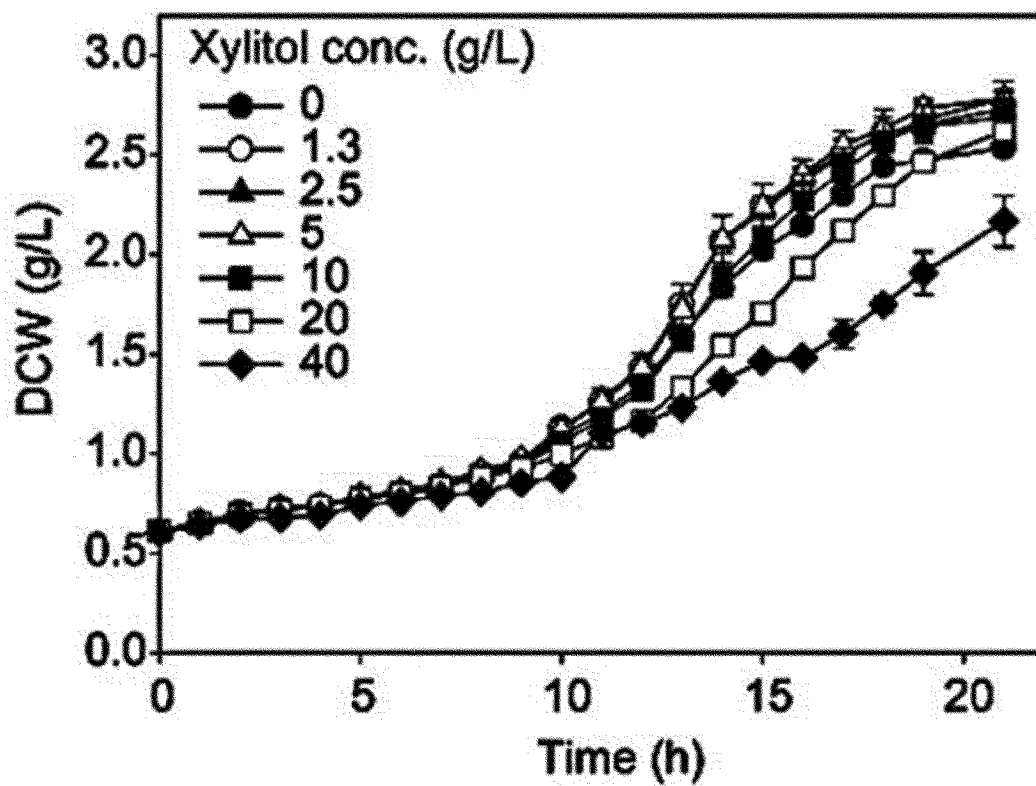
[Fig. 6c]



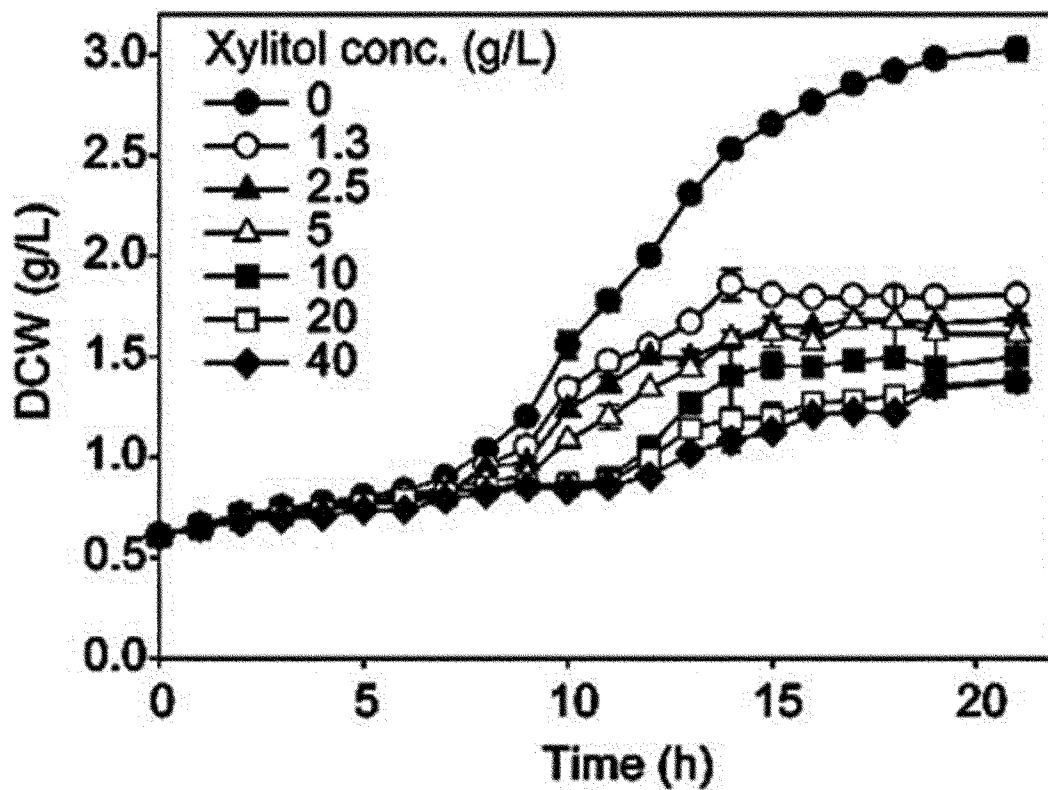
[Fig. 6d]



[Fig. 6e]



[Fig. 6f]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/011530**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***A61K 31/7004(2006.01)i, A61K 8/60(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)i, A61Q 11/00(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)

A61K 31/7004; C12N 15/55; A61K 8/73; C12N 9/02; C12N 9/14; A61K 8/60; A61Q 19/02; A23G 4/08; C12N 15/53;
A61Q 11/00; A23L 33/10

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: 3,6-anhydro-L-galactose, mouth, dental caries, gingivitis, periodontitis, halitosis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2009-0092565 A1 (KOYAMA, T. et al.) 09 April 2009 See abstract; and claims 1, 3.	1-6,9-13
A	KR 10-2013-0085017 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 26 July 2013 See abstract; and claim 1.	1-6,9-13
A	US 2014-0314905 A1 (WM. WRIGLEY JR. COMPANY) 23 October 2014 See the entire document.	1-6,9-13
A	KR 10-2012-0085364 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 01 August 2012 See the entire document.	1-6,9-13
A	KR 10-2010-0108241 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 06 October 2010 See the entire document.	1-6,9-13



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

09 FEBRUARY 2017 (09.02.2017)

Date of mailing of the international search report

10 FEBRUARY 2017 (10.02.2017)

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. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/011530

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, 8**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 7 and 8 pertain to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, and to a diagnostic method, and thus pertain 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/KR2016/011530

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2009-0092565 A1	09/04/2009	BR P10520199 A2	22/04/2009
		CN 101180032 A	14/05/2008
		CN 101180032 B	27/02/2013
		HK 1117751 A1	22/11/2013
		KR 10-2008-0008363 A	23/01/2008
		RU 2007147328 A	27/06/2009
		RU 2396969 C2	20/08/2010
		TW 1365072 B	01/06/2012
		WO 2006-123430 A1	23/11/2006
KR 10-2013-0085017 A	26/07/2013	CN 105745329 A	06/07/2016
		JP 2015-505323 A	19/02/2015
		KR 10-1525298 B1	03/06/2015
		KR 10-1573651 B1	02/12/2015
		KR 10-2015-0039159 A	09/04/2015
		US 2015-0216778 A1	06/08/2015
US 2014-0314905 A1	23/10/2014	AU 2013-327225 A1	23/05/2013
		AU 2013-327225 B2	17/09/2015
		CA 2854548 A1	16/05/2013
		EP 2775854 A1	17/09/2014
		EP 2775854 A4	25/11/2015
		MX 2014005495 A	19/03/2015
		RU 2014121320 A	10/12/2015
		WO 2013-070444 A1	16/05/2013
KR 10-2012-0085364 A	01/08/2012	KR 10-1316084 B1	13/11/2013
		US 2013-0303743 A1	14/11/2013
		US 9181208 B2	10/11/2015
		WO 2012-102552 A2	02/08/2012
		WO 2012-102552 A3	13/06/2013
KR 10-2010-0108241 A	06/10/2010	CN 102405282 A	04/04/2012
		CN 102405282 B	12/02/2014
		JP 2012-521755 A	20/09/2012
		JP 5468680 B2	09/04/2014
		KR 10-1293668 B1	13/08/2013
		US 2013-0171699 A1	04/07/2013
		US 9297000 B2	29/03/2016
		WO 2010-110599 A2	30/09/2010
		WO 2010-110599 A3	19/05/2011
		WO 2010-110599 A9	17/03/2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/7004(2006.01)i, A61K 8/60(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)i, A61Q 11/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/7004; C12N 15/55; A61K 8/73; C12N 9/02; C12N 9/14; A61K 8/60; A61Q 19/02; A23G 4/08; C12N 15/53; A61Q 11/00; A23L 33/10

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:3,6-안하이드로-L-갈락토오스, 구강, 치아우식증, 치은염, 치주염, 구취

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 2009-0092565 A1 (KOYAMA, T. 등) 2009.04.09 요약; 및 청구항 1, 3 참조.	1-6,9-13
A	KR 10-2013-0085017 A (고려대학교 산학협력단) 2013.07.26 요약; 및 청구항 1 참조.	1-6,9-13
A	US 2014-0314905 A1 (WM. WRIGLEY JR. COMPANY) 2014.10.23 전체 문헌 참조.	1-6,9-13
A	KR 10-2012-0085364 A (고려대학교 산학협력단) 2012.08.01 전체 문헌 참조.	1-6,9-13
A	KR 10-2010-0108241 A (고려대학교 산학협력단) 2010.10.06 전체 문헌 참조.	1-6,9-13

☐ 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 02월 09일 (09.02.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 02월 10일 (10.02.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



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

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

조기훈

전화번호 +82-42-481-5655



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, 8
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제7항 및 제8항은 수술 또는 치료에 의한 사람의 치료방법 또는 진단방법에 관한 것이므로, PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 본 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당합니다.
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 2009-0092565 A1	2009/04/09	BR PI0520199 A2 CN 101180032 A CN 101180032 B HK 1117751 A1 KR 10-2008-0008363 A RU 2007147328 A RU 2396969 C2 TW I365072 B WO 2006-123430 A1	2009/04/22 2008/05/14 2013/02/27 2013/11/22 2008/01/23 2009/06/27 2010/08/20 2012/06/01 2006/11/23
KR 10-2013-0085017 A	2013/07/26	CN 105745329 A JP 2015-505323 A KR 10-1525298 B1 KR 10-1573651 B1 KR 10-2015-0039159 A US 2015-0216778 A1	2016/07/06 2015/02/19 2015/06/03 2015/12/02 2015/04/09 2015/08/06
US 2014-0314905 A1	2014/10/23	AU 2013-327225 A1 AU 2013-327225 B2 CA 2854548 A1 EP 2775854 A1 EP 2775854 A4 MX 2014005495 A RU 2014121320 A WO 2013-070444 A1	2013/05/23 2015/09/17 2013/05/16 2014/09/17 2015/11/25 2015/03/19 2015/12/10 2013/05/16
KR 10-2012-0085364 A	2012/08/01	KR 10-1316084 B1 US 2013-0303743 A1 US 9181208 B2 WO 2012-102552 A2 WO 2012-102552 A3	2013/11/13 2013/11/14 2015/11/10 2012/08/02 2013/06/13
KR 10-2010-0108241 A	2010/10/06	CN 102405282 A CN 102405282 B JP 2012-521755 A JP 5468680 B2 KR 10-1293668 B1 US 2013-0171699 A1 US 9297000 B2 WO 2010-110599 A2 WO 2010-110599 A3 WO 2010-110599 A9	2012/04/04 2014/02/12 2012/09/20 2014/04/09 2013/08/13 2013/07/04 2016/03/29 2010/09/30 2011/05/19 2011/03/17