

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 10월 6일 (06.10.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/159554 A1

- (51) 국제특허분류:
A23L 1/30 (2006.01) *A61K 31/702* (2006.01)
A61K 31/565 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/002873
- (22) 국제출원일: 2016년 3월 22일 (22.03.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0043404 2015년 3월 27일 (27.03.2015) KR
10-2016-0014477 2016년 2월 4일 (04.02.2016) KR
10-2016-0014484 2016년 2월 4일 (04.02.2016) KR
10-2016-0014492 2016년 2월 4일 (04.02.2016) KR
- (71) 출원인: 전남대학교 산학협력단 (INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 61186 광주시 북구 용봉로 77, Gwangju (KR).
- (72) 발명자: 김두운 (KIM, Du Woon); 61031 광주시 북구 우치로 537번길 10 동아아파트 105-103, Gwangju (KR).
- (74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo Hyun); 08793 서울시 관악구 남부순환로 1922, 청동빌딩 301호, Seoul (KR).

- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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).

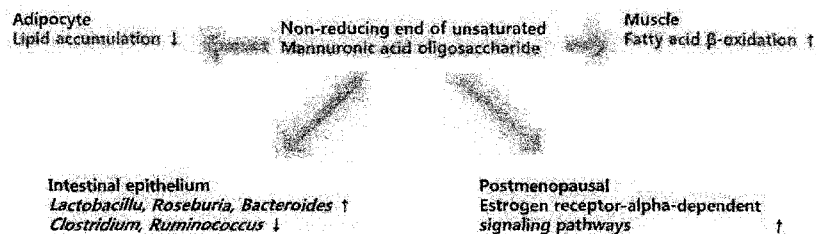
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: NON-REDUCING END OF UNSATURATED MANNURONIC ACID OLIGOSACCHARIDE, AND COMPOSITION CONTAINING SAME AS ACTIVE INGREDIENT

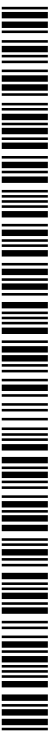
(54) 발명의 명칭 : 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 및 이를 유효성분으로 포함하는 조성물

Fig. 13



(57) Abstract: The present invention relates to a non-reducing end of unsaturated mannuronic acid oligosaccharide, the oligosaccharide being degraded by an alginate lyase with a poly-mannuronate substrate and having a molecular weight of at least 100-3000 Da. The present invention provides: the non-reducing end of unsaturated mannuronic acid oligosaccharide; and a pharmaceutical composition for alleviating, preventing, or treating obesity, diabetes, and climacteric syndrome, and a probiotic for promoting intestinal beneficial bacteria, both of which contain the same as an active ingredient. According to the present invention, anti-obesity, anti-diabetic, and estrogenic activity effects and an effect of regulating intestinal microbiota of the present invention are remarkably excellent compared to those of a mannuronic acid oligosaccharide of a non-reducing end of saturated mannuronic acid oligosaccharides.

(57) 요약서: 본 발명은 폴리만뉴론산(poly-mannuronate) 기질로 하여 알긴산 라이아제(alginate lyase)에 의해 분해된 분자량 100-3000 Da 이하의 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당에 관한 것으로, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 및 이를 유효성분으로 포함하는 비만, 당뇨 및 갱년기 증후군의 개선, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 및 장내 유익균 증진용 프로바이오틱스를 제공한다. 본 발명에 의하면, 본 발명의 항비만, 항당뇨, 에스트로겐 활성 및 장내 미생물 균형 조절 효과는 비환원성 말단의 포화형 만뉴론산 올리고당의 만뉴론산 올리고당과 비교하여 현저히 우수하다.



WO 2016/159554 A1

【명세서】

【발명의 명칭】

비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 및 이를 유효성분으로 포함하는 조성물

5

【기술 분야】

본 특허출원은 2015년 03월 27일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제 10-2015-0043404 호, 2016년 02월 02일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제 10-2016-0014477 호, 대한민국 특허출원 제 10-2016-0014484 호 및 대한민국 특허출원 제 10-2016-0014492 호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

15

【배경 기술】

현대사회에는 비만(2014년 기준, OECD 성인 18%가 비만) 및 당뇨병(2011년 기준, 6.9 %가 당뇨병)에 의해 나타나는 복합적 대사증후군(metabolic syndrome)이 증가됨에 따라 기능성 식품 시장이 확대되고 있다.

20

대사증후군은 비만과 인슐린 저항성에 의해 발생하는 제 2형 당뇨병과 다양한 여러 대사이상이 복합적으로 발생하는 증후군을 지칭하는 말이다. 대사증후군은 인구의 고령화와 고열량의 식습관 등에 의하여 급증함에 따라 사회적인 비용이 많이 요구됨으로서 근본적인 원인 예방 및 의약품 또는 식품 소재 개발이 시급한 실정이다.

25

인간의 장내 생태계는 출생과 동시에 미생물이 서식하기 시작하여 유익균과 유해균이 균형을 유지하며 장내 미생물 군총을 형성하고 인간과 공생하며 상호작용을 통해 인간의 건강에 직·간접으로 영향을 미친다. 최근 미국 국립보건원(NIH)은 ‘인간 미생물 군집 프로젝트’를 통해 장내 미생물 군총과 질병과의 관계를 연구하여 미생물 군총의 불균형이 염증성 장질환 등의 발병에 중요한 원인을 제공함에 따라 장내 미생물 군총의

30

정상화의 중요성을 대두시켰다.1,2

2006년 과학저널 ‘네이처’에 발표된 비만과 장내 세균의 연관성
 논문에 따르면 마른 사람과 비만인 사람 사이 장내 세균 분포가 다르며,
 쥐를 이용한 실험을 통해 비만 쥐에서는 퍼미테쿠스(Firmicutes)에 속하는
 5 세균이 박테로이데트(Bacteroidetes)에 속하는 세균보다 상대적으로 높은
 구성비율을 보임을 확인하였다.3 이 후 장내 미생물과 인체에 대한 연구가
 다양한 영역에서 진행되고 있으며, 장내 미생물 균총 개선을 통한 비만
 억제 및 질환 치료 등을 위하여 장내 미생물 균총 개선제 개발이 필요하다.

해양생물은 지구상 생물종의 약 80%에 해당하는 약 50만 종의 생물이
 10 서식하고 있는 것으로 추정되나, 이 가운데 유용생물자원으로 개발되고
 있는 것이 1% 미만으로 개발 잠재력이 매우 높다. 해조류 유래 기능성
 소재로서 대표적인 해조 다당류 알긴산(alginic acid)은 다시마, 미역등과
 같은 갈조류에 15-35% 함유되어 있으며, β -D-만뉴론산(β -D-mannuronic
 acid; M)과 α -L-글루론산(α -L-guluronic acid; G)의 2종류의
 15 우론산(uronic acid)이 각종 비율로 1, 4 글리코시드(glycoside) 결합을 한
 폴리우로나이드(polyuronide)의 특징을 갖는다. 알긴산 유래 올리고당은
 구성당에 따라 만뉴론산 올리고당(MOS, mannuro-oligosaccharide)과
 글루론산 올리고당(GOS, guluro-oligosaccharide) 및 만뉴론산 글루론산
 혼합 올리고당(AOS, alginate oligosaccharide)으로 나눌 수 있으며 또한
 20 당 말단의 이중결합에 따라 구분할 수 있다.

해양 유래 다당류는 오래전부터 인간생활에 이용되어 왔으며,
 세계적으로 해양생물 유래의 항암, 항산화, 항고혈압 및 항균물질 등의
 생리활성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 전세계적으로 생산되는
 알긴산 원조 생산량은 약 10만 톤으로 이중 30% 가량이 식품첨가물로
 25 이용되고 있으나 이를 고부가 의약품 원료로 개발 할 경우 그 가치를 배가
 시킬 수 있다. 알긴산 유래 올리고당의 경우 구조적인 특징에 따라
 고등식물의 뿌리 성장촉진, 비피도박테리움 에스피(Bifidobacterium sp.)
 성장촉진, 항염증, 항산화, 항균 작용 등의 생물학적 활성이 보고되는 등
 가시적인 연구 성과가 이루어짐에 따라 응용분야가 폭넓게 확산되고 있다.

30

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그

인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

5 【발명의 내용】

【해결하려는 과제】

본 발명자들은 알긴산 올리고당을 소재로 하는 의약품 및 식품으로의 이용을 증진시키고자 노력하였다. 그 결과, 항비만, 항당뇨, 장내 미생물 군총 개선 및 에스트로겐 효능과 같은 다양한 생리활성을 갖는 알긴산 유래
10 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

따라서, 본 발명의 목적은 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 비만 개선, 예방 또는 치료용 조성물을
15 제공하는 데 있다.

본 발명의 또다른 목적은 당뇨 개선, 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 장내 유익균 증진용 프로바이오틱스를 제공하는 데 있다.

20 본 발명의 또다른 목적은 갱년기 증후군 개선, 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

25

【과제의 해결 수단】

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 폴리만뉴론산(poly-mannuronate) 기질로 하여 알긴산 라이아제(alinate lyase)에 의해 분해된 분자량 100-3000 Da 이하의 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을
30 제공한다.

본 발명자들은 알긴산 올리고당을 소재로 하는 의약품 및 식품으로의

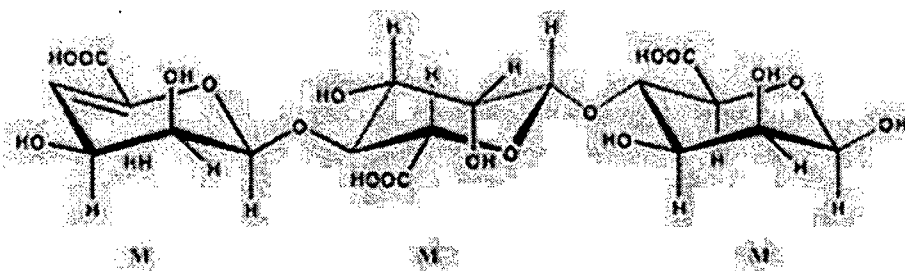
이용을 증진시키고자 노력하였다. 그 결과, 항비만, 항당뇨, 장내 미생물
균총 개선 및 에스트로겐 효능과 같은 다양한 생리활성을 갖는 알긴산 유래
비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 규명하였다.

본 명세서에서 용어 “비환원성”은 올리고당의 구조에 있어서,
5 아노머[단당류의 헤미아세탈(C-1과 C-5 사이의 고리 형성), 헤미케탈(C-2와
C-5 사이의 고리 형성)을 생성하는 고리화 반응에서 한 탄소에 붙은
수소원자와 수산화기의 위치가 바뀐 부분입체 이성질체가 생기는 현상]
탄소를 갖지 못한 성질을 의미한다.

본 명세서에서 용어 “불포화형”은 수소원자를 갖는
10 탄소사슬(carbon chain)이 불포화된 형태를 의미하고, “포화형”은
수소원자를 갖는 탄소사슬이 포화된 형태를 의미한다.

본 발명의 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 아노머
탄소를 갖지 못하고 수소원자의 탄소사슬이 불포화된 형태의 모든 만뉴론산
올리고당을 의미한다.

15 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 다음의 일
예(3개의 당이 결합된 만뉴론산 올리고당)의 구조식 1을 갖는다:
[구조식 1]



상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 1 당인 경우에
20 175, 2 당인 경우에 351, 3 당인 경우에 527, 4 당인 경우에 704, 5 당인
경우에 880, 6 당인 경우에 1056, 7 당인 경우에 1232의 Z-평균
분자량(m/z)을 갖는다(도 2).

또한, 본 명세서에서 용어 “비환원성 말단의 포화형 만뉴론산
올리고당”은 폴리만뉴론산을 산 가수분해하여 얻은 포화형 만뉴론산

올리고당을 의미한다.

본 발명의 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 폴리만뉴론산(poly-mannuronate) 기질로 하여 알긴산 라이아제(alginate lyase)에 의해 분해되어 제조된다.

5 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 알긴산 라이아제는 폴리글루론산(polyguluronate) 및 폴리만뉴론산(polymannuronate)로 구성된 알긴산(alginate)를 분해하여 저분자화 하는 효소를 의미한다.

본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 알긴산 라이아제는 전복 장내 균주 유래의 AlyDW11(대한민국 등록특허 10-1277706)이다.

10 본 발명의 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 하나 이상의 당으로 구성된다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 1개 내지 10개의 만뉴론산 또는 글루론산을 포함한다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 1개 내지 9개의 만뉴론산 또는
15 글루론산을 포함한다. 본 발명의 또다른 구현예에 따르면, 1개 내지 8개의 만뉴론산 또는 글루론산을 포함한다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 1개 내지 7개의 만뉴론산 또는 글루론산을 포함한다.

본 발명의 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 비환원성 말단의 포화형 만뉴론산 올리고당과 비교하여 물 분자가 제거되어 물
20 분자의 질량값인 18 정도의 작은 질량값을 갖는다(도 2).

본 발명의 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 만뉴론산 및 글루론산으로 이루어져 있다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당의 만뉴론산:글루론산의 비율은 1.2-5.0:1이다. 본
25 발명의 다른 구현예에 따르면, 1.2-4.5:1이다. 본 발명의 또다른 구현예에 따르면, 1.8-4.0:1이다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 2.0-3.0:1이다.

즉, 본 발명의 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 만뉴론산을 글루론산보다 1.2-5.0, 1.2-4.5, 1.8-4.0 또는 2.0-3.0배
우세하게 포함한다(도 4).

30

본 발명의 다른 양태에 따르면, 상기 비환원성 말단의 불포화형

만뉴론산 올리고당을 유효성분으로 포함하는 비만 개선, 예방 또는 치료용 조성물을 포함한다.

본 명세서에서 사용되는 용어 “비만”은 건강에 이상을 초래할 정도로 지방 조직이 체내에 과잉으로 축적된 상태를 의미한다.

5 본 발명의 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 지방 축적을 억제한다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 중성지방의 축적에 대하여 20-60%, 25-50% 또는 30-40% 저해하고, 비환원성 말단의 포화형 만뉴론산 올리고당은 10-30%, 10-10
25 25% 또는 10-30% 저해한다.

본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 비환원성 말단의 포화형 만뉴론산 올리고당과 비교하여 중성지방의 축적을 2배 이상 저해한다.

상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 비만을
15 유도하는 장내 미생물 균총을 조절한다.

본 명세서에서, 용어 “장내 미생물 균총(intestinal microflora 또는 gut microflora)”은 구성하는 동물의 소화관에서 성장하는 미생물 군락집단(complex community)을 의미한다. 장내 미생물 균총을 구성하는 개개의 미생물은 물질생산 또는 분해능에 의해 숙주에게 피해 또는 이익을
20 주기도 하는데 장내 균총 전체적으로 볼 때는 비타민 공급, 감염방지 및 장 기능(연동운동 및 흡수)을 돕는데 관여하고 있고 이로 인해 균총의 조성은 변비, 장 관련 질환 발생 등과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다(Mitsuoka T. Bifidobacteria Microflora, 1(1): 3, 1982).

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 비환원성 말단의 불포화형
25 만뉴론산 올리고당은 장내 미생물 균주의 성장을 감소시켜 장내 미생물 균총을 조절한다.

본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 장내 미생물 균주는 로즈버리아 종(*Roseburia* sp.) 및 락토바실러스 종(*Lactobacillus* sp.)로 구성된 군으로부터 선택되는 균주이다.

30 본 발명의 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 비만을 유도하는 지방-분화와 관련된 유전자의 발현을 억제한다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 aP2(adipocyte protein 2), C/EBP α (CAAT enhancer binding protein α) 및 PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ)의 발현을 억제한다.

- 5 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 aP2, C/EBP α 및 PPAR γ 의 발현을 각각 15-35%, 50-70% 및 30-50% 억제한다. 이러한 효과는 비환원성 말단의 포화형 만뉴론산 올리고당과 비교하여 1.5 내지 7.0배 우수하다.

- 10 본 발명의 비만 개선, 예방 또는 치료용 조성물은 비만 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 비만 개선 또는 예방용 식품 조성물 또는 기능성 식품 조성물로 제조될 수 있다.

- 15 본 발명의 또다른 양태에 따르면, 본 발명은 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 유효성분으로 포함하는 당뇨 개선, 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

- 20 본 명세서에서, 용어 “당뇨”는 포도당-비관용(intolerance)을 초래하는 인슐린의 상대적 또는 절대적 부족으로 특징되는 만성질환을 의미한다. 용어 당뇨는 모든 종류의 당뇨병을 포함하며, 예를 들어, 제1형 당뇨, 제2형 당뇨 및 유전성 당뇨를 포함한다. 제1형 당뇨는 인슐린 의존성 당뇨병으로서, β -세포의 파괴에 의해 주로 초래된다. 제2형 당뇨는 인슐린 비의존성 당뇨병으로서, 식사 후 불충분한 인슐린 분비에 의해 초래되거나 또는 인슐린 내성에 의해 초래된다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 글루코오스(glucose)의 흡수(uptake)를 촉진한다.

- 25 본 발명의 이러한 효과는 비환원성 말단의 포화형 만뉴론산 올리고당에서는 나타나지 않는 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당만의 효과이다.

- 30 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 AMPK(AMP-activated Protein Kinase) 경로를 매개하여 당 흡수를 촉진한다.

본 발명의 당뇨 개선, 예방 또는 치료용 조성물은 비만 예방 또는

치료용 약제학적 조성물, 당뇨 개선 또는 예방용 식품 조성물 또는 기능성 식품 조성물로 제조될 수 있다.

본 발명의 또다른 양태에 따르면, 본 발명은 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 유효성분으로 포함하는 장내 유익균 증진용 프로바이오틱스를 제공한다.

본 발명의 장내 유익균 증진용 프로바이오틱스는 장내 유익균의 성장을 증진시킨다.

본 발명의 일 구현예에서, 상기 장내 유익균은 로즈버리아 종(*Roseburia* sp.) 및 락토바실러스 종(*Lactobacillus* sp.)로 구성된 군으로부터 선택되는 장내 유익균이다.

본 명세서의 용어 “프로바이오틱스”는 숙주 유기체에 의 건강에 도움을 주는 생균의 식품 보조물을 의미한다. 본 발명의 프로바이오틱스 조성물은 발효유 제품으로 제조될 수도 있으나 과립, 분말 등의 형태로 제조될 수도 있다.

본 발명의 프로바이오틱스 조성물의 투여방법은 특별히 한정되지 않지만 환제, 정제 등으로 제조하여 경구 투여할 수도 있고, 분말형 또는 과립형으로 제조하여 음식물에 첨가하여 투여할 수도 있다. 본 발명의 조성물은 예를 들면, 의약품으로서 사용하는 경우의 제형은 각 성분의 분말을 제제화하지 않고 그 자체로 사용할 수 있지만, 산제, 과립제, 세립제, 정제, 당의정제, 캡슐제, 정제, 장용 피복제 등의 형태로 제제화할 수 있다. 희석제로서는 일반의 의약품제제에 사용되는 부형제, 결합제, 붕괴제 등이 사용되고, 이외에 착색제, 안정화제, 보존제, 윤활제 등을 첨가할 수 있다. 본 발명의 음식용 조성물을 식품으로서 사용하는 경우는 이대로 각 성분의 분말을 제제화하지 않고 사용할 수 있지만, 다른 식물섬유, 올리고당, 곡물류, 비타민류 등을 첨가하거나, 또는 향미료, 착색제, 교미제 등을 첨가하여, 섭취하기에 적합한 형태로 형성 가공하는 것도 가능하다. 또한, 식품 첨가물로서, 다른 식품에 첨가 혼합하여 사용할 수도 있다.

본 발명의 장내 유익균 증진용 프로바이오틱스는 약제학적 조성물, 식품 조성물 또는 기능성 식품 조성물로 제조될 수 있다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 유효성분으로 포함하는 갱년기 증후군 개선, 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

본 명세서에서 용어 “갱년기 증후군”은 여성 내분비 증후군의 일종으로 자연적 손실이든, 외과적 수술에 의한 손실이든 또는 화학적으로 유도된 손실이든 관계없이 난소 기능의 전반적이고 점진적인 감소가 일어나 생리적 기능 및 생기능이 감소 내지 소실되는 과도기를 말하며, 갱년기의 한 과정으로 난소 기능의 정지 후에 일어나는 생리의 영구적인 정지인 폐경이 오게 된다. 폐경기에는 에스트로겐 생성의 감소, 난포자극호르몬 및 황체화호르몬의 상승 등 호르몬의 변화에 따라 급만성 증상이 나타날 수 있다. 즉, 초기증상으로 열성홍조, 야간 발한 등의 혈관 운동성 증상과 불안감, 집중력 감퇴, 우울증 등의 심리적 증상이 나타날 수 있으며, 폐경 수년 내에 나타나는 비노생식계 및 표피증상이, 폐경 수년 후에는 골다공증, 심장혈관 및 뇌혈관 등의 질환 등이 있을 수 있다.

상기 갱년기 증후군은 안면홍조, 발한, 심장 불편감, 수면 문제, 우울증, 과민성, 불안감, 신체적 피로, 정신적 피로, 성적 문제, 배뇨 문제, 질 건조감, 관절 불편감 및 근육 불편감으로 구성된 군으로부터 선택되는 증후군을 포함한다.

본 발명의 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 유효성분으로 포함하는 조성물은 에스트로겐의 활성을 증가시킨다.

상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 에스트로겐을 리간드로 작용하는 에스트로겐 수용체 경로 및 에스트로겐 비의존적으로 작용하는 에스트로겐 관련 수용체 알파 경로를 경유하여 에스트로겐 반응 요소(estrogen response element; ERE)-매개 하부 유전자의 발현을 통해 에스트로겐을 활성화시킨다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 에스트로겐 수용체 α 를 경유하여 ERE의 발현을 유도한다.

본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 에스트로겐 관련 수용체 알파를 발현시켜 ERE의 발현을 유도한다.

상기 ERE의 발현으로 인해 하부 에스트로겐 유전자의 발현을 통해 에스트로겐의 활성이 증가된다.

본 발명의 또다른 구현예에 따르면, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 pS2(Presenilin 2), PR(Progesteron Receptor) 및
5 CTSD(E2-mediated Cathepsin D) mRNA의 발현을 증가시킨다.

본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α), ERR α (Estrogen-related receptor α),
10 GATA3(Trans-acting T-cell-specific Transcription Factor) 및 FOXA1(Forkhead box protein A1) mRNA의 발현을 증가시킨다.

상기 GATA3 및 FOXA1는 유방 세포 분화에 중요한 인자이며, 암세포나 악성 종양으로의 분화를 억제하는 역할을 한다.

본 발명의 조성물은 17 β -에스트라디올(17 β -estradiol)을 추가적으로 포함한다.

15 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 17 β -에스트라디올(17 β -estradiol)과 동반상승효과(synergic effect)를 나타낸다.

본 발명의 조성물은 갱년기 증후군 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 갱년기 증후군 개선 또는 예방용 식품 조성물 또는 기능성 식품
20 조성물로 제조될 수 있다.

본 발명의 (a) 비만 개선, 예방 또는 치료용 조성물; (b) 당뇨 개선, 예방 또는 치료용 조성물; (c) 장내 유익균 증진용 프로바이오틱스; 및 (d) 갱년기 증후군 개선, 예방 또는 치료용 조성물은 약제학적 조성물로 제조될 수 있다.

25 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 (a) 상술한 본 발명의 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물이다. 본 명세서에서 용어 “약제학적 유효량”은 상술한 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당의 효능 또는 활성을 달성하는 데
30 충분한 양을 의미한다.

본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의

약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 5 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

10 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여 방식으로 적용된다.

본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 15 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 일반적인 투여량은 성인 기준으로 0.001 $\mu\text{g/kg}$ - 100 mg/kg 범위 내이다.

본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 20 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 25 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

본 명세서에서 용어 “유효성분으로 포함하는”이란 상술한 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당의 효능 또는 활성을 달성하는 데 30 충분한 양을 포함하는 것을 의미한다. 상술한 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당이 본 발명의 조성물에 포함된 양적 상한은 당업자가 적절한 범위 내에서 선택하여 실시할 수 있다.

본 발명의 (a) 비만 개선, 예방 또는 치료용 조성물; (b) 당뇨 개선,

예방 또는 치료용 조성물; (c) 장내 유익균 증진용 프로바이오틱스; 및 (d) 갱년기 증후군 개선, 예방 또는 치료용 조성물은 식품 조성물로 제조될 수 있다.

본 발명의 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 유효성분
 5 포함하는 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 유효성분으로서 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 뿐 만 아니라, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어
 10 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 사이클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 식품
 15 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

본 발명의 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 유효성분
 20 포함하는 기능성 식품 조성물로 제조될 수 있다. 본 발명의 조성물이 기능성 식품 조성물로 제조되는 경우, 식품 제조 시 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소 및 조미제를 포함한다. 예컨대, 드링크제로 제조되는 경우에는 유효성분으로서 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 이외에 향미제 또는 천연 탄수화물을
 25 추가 성분으로 포함시킬 수 있다. 예를 들어, 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예컨대, 글루코오스, 프럭토오스 등); 디사카라이드(예컨대, 말토스, 수크로오스 등); 올리고당; 폴리사카라이드(예컨대, 텍스트린, 시클로텍스트린 등); 및 당알코올(예컨대, 자일리톨, 소르비톨, 에리쓰리톨 등)을 포함한다. 향미제로서 천연 향미제(예컨대, 타우마틴, 스테비아
 30 추출물 등) 및 합성 향미제(예컨대, 사카린, 아스파르탐 등)를 이용할 수 있다.

본 발명의 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 종래에 알려진 알긴산의 생리활성의 활성성분으로서, 항비만, 항당뇨, 갱년기 증후군 개선 및 장내 미생물 균총의 조절 효과를 나타낸다. 이러한 효과는 비환원성 말단의 포화형 만뉴론산 올리고당과 비교하여 현저히 우수한 효과이며, 이에 상기 효과를 나타내는데 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당에서 나타나는 말단당의 이중결합 및 이의 불포화 형태가 중요한 요소임을 의미한다.

【발명의 효과】

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

- (a) 본 발명은 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당, 이를 유효성분으로 포함하는 비만, 당뇨 및 갱년기 증후군의 개선, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 및 장내 유익균 증진용 프로바이오틱스를 제공한다.
- (b) 본 발명은 알긴산의 활성물질인 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 제조하여 이의 우수한 항비만, 항당뇨, 에스트로겐 활성 및 장내 미생물 균총 조절 효과를 제공한다.
- (c) 이러한 효과는 종래의 비환원성 말단의 포화형 만뉴론산 올리고당의 형태를 나타내는 만뉴론산 올리고당과 비교하여 현저히 우수하다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당의 박막크로마토그래피 결과를 나타낸다.

도 2는 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 및 비환원성 말단의 포화형 만뉴론산 올리고당의 질량분석 결과를 나타낸다.

도 3은 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당(Non-reducing end of unsaturated Mannuroic Acid Oligosaccharide; USMOS) 및 비환원성 말단의 포화형 만뉴론산 올리고당(Non-reducing end of saturated Mannuroic Acid Oligosaccharide; SMOS)의 이중결합 비율을 나타낸다.

도 4는 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당(USMOS) 및 비환원성 말단의 포화형 만뉴론산 올리고당(SMOS)의 당 구성을 원평광

이색성 분광 측정법(CD, circular dichorism) 방법으로 확인한 결과를 나타낸다.

5 도 5a 및 5b는 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당(USMOS) 처리에 의한 지방축적 저해 결과 및 실-시간 PCR을 이용한 비만-관련 유전자, aP2, C/EBP α 및 PPAR γ 의 발현 억제 효과를 나타낸다.

도 6a 내지 6c는 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당(USMOS) 처리에 따른 당흡수 촉진 결과 및 관련 단백질, p-PAK, p-Akt 및 p-AS160의 발현양을 나타낸다.

10 도 7a 및 7b는 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당(USMOS) 복강투여에 따른 비만 유도 랫트의 장내 균총 분석 결과를 나타낸다.

도 8는 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당(USMOS)의 음용섭취에 따른 노령쥐의 장내 미생물 균총을 PCO(principal coordinate) 분석 결과를 나타낸다.

15 도 9은 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당(USMOS) 음용섭취에 따른 노령쥐의 장내 균총 변화를 문(phylum)에서 비교 분석한 결과를 나타낸다.

도 10a 및 10b는 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당(USMOS) 처리에 따른 pS2, PR 및 CTSD의 mRNA 발현양을 나타낸다.

20 도 11은 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당(USMOS) 처리에 따른 PGC-1 α , ERR α , GATA3 및 FOXA1의 mRNA 발현양을 나타낸다.

도 12는 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당(USMOS)의 작용기전을 나타낸다.

도 13은 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당(USMOS)의 다양한 생리활성 효과를 나타낸다.

25

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

이하, 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

30

실시예 1: 알긴산 올리고당의 제조

폴리만뉴론산(poly-mannuronate; poly M)을 제조하기 위하여 알긴산 나트륨 1 g(Wako, Osaka Japan)과 함께 0.3 M HCl 100 ml을 넣고 100℃에서 2시간 동안 가열하였다. 가열된 알긴산 나트륨-HCl 용액을 500 g로 5 분 동안 원심 분리하여 분리된 침전물을 증류수에 용해시켰다. 증류수에 용해시킨 침전물이 0.1 M이 되도록 NaCl을 첨가한 후, pH를 2.8-3.0으로 조절하여 500 g, 5분 동안 원심 분리로 상정액과 침전물을 분리하였다. 분리된 침전물과 상정액은 알코올 침전 후 건조하여 상정액 부분을 poly M으로, 침전물 부분을 poly G로 제조하여 알긴산 분해 효소를 활용한 만뉴론산 올리고당 제조를 위한 기질로 사용하였다(Haug, A et al. A study of the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis. ActaChemicaScandinavica, 1966, 20(1): 183-190. 및 Joo, D. S. et al. Preparation of oligosaccharides from alginic acid by enzymic hydrolysis. Korean Society of Food Science and Technology, 1996, 28(1): 146-151).

비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 제조하기 위하여 2009년 2월 대한민국 여수 근해에서 서식하는 전복의 장내 DNA 메타지놈 라이브러리에서 선별된 만뉴론산 분해능이 우수한 ORF11에 해당되는 유전자를 pMAL-c2x 발현 벡터에 재조합한 후 BL21(DE3) 균주에 클로닝을 실시하여 제작된 유전자 형질 전환 균주를 이용하였다(대한민국 등록특허 10-1277706).

40 L의 앰피실린(ampicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 Luria-Bertani(LB)에 500 ml의 상기 유전자 형질 전환 균주를 접종하여 37℃에서 배양하고, 600 nm에서 흡광도가 0.4-0.5가 되었을 때, 배양액의 IPTG(Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) 최종 농도가 0.3 mM이 되도록 첨가한 후 12시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 배양액을 15분 동안 9,000 g에서 원심 분리하여 세포를 침전시켰다. 침전된 세포를 pH 7.0의 10 mM 인산 완충액(phosphate buffer)으로 부유 시킨 후 세포막을 분해하기 위하여 초음파 분해(sonication)를 실시하고 조효소를 분리해내기 위해 15분 동안 9,000 g에서 원심분리를 실시하였다. 원심분리 후 분리된 상층액을 조효소로 사용하였으며, 기질로서 폴리만뉴론산(poly-

mannuronate(poly M))을 0.3% 농도로 pH 7.0의 10 mM 인산 완충액 1L에 녹인 후 최종 농도가 1 mM이 되도록 AgNO₃을 첨가하였다. 2.5 L 발효기(KBT KB-250, Japan)를 이용하여 45℃에서 48시간 동안 기질 분해 반응을 진행하였다. 반응 후 분자량 3,000 Da이하의 올리고당 혼합물을 얻기 위해

5 한외 여과막 시스템(VivaFlow 50, Sartorius, Ag, Germany)으로 여과하여 이를 동결 건조 한 후 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 제조하였다.

올리고당의 생산 여부를 확인하기 위하여 박막크로마토그래피(thin-layer chromatography)을 실시하였으며, 방법은 다음과 같다. 비환원성

10 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 0.1 mg/ μ l 농도로 물에 용해 후, 실리카겔 플레이트(Merck KGaA, Germany)에 3 μ l 스팟팅을 실시하였다. 전개용매 (1-부탄올 : 포름산 : 물 = 4 : 6 : 1)을 이용하여 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 크기별로 분리 후 황산을 가한 발색시약(아니스알데하이드 0.5 ml, 아세트산 10 ml, MeOH 85 ml, H₂SO₄ 5

15 ml)을 사용하여 올리고당의 존재를 확인하였다.

실시예 2: 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 구성 및 구조적 특징 분석

본 실험예에서는 AlyDW11 알긴산 분해효소를 이용하여

20 폴리만뉴론산을 분해 후 확보된 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 혼합물을 한외여과막 시스템(VivaFlow 50, Sartorius)을 이용하여 분자량 3000 Da 이하의 분획물을 확보하였다. 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당의 구성당을 분석하기 위하여, 준비된 시료를 이온 교환 수지 컬럼(Hitrap DEAE Sepharose FF, GE Healthcare)을 이용하여 정제한

25 후 동결건조 시켰다. 정제된 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 물에 용해 후 UPLC/MS 시스템에 주입함으로써 구성당 분석을 수행하였다.

초고성능 액체 크로마토그래피(Ultra Performance Liquid Chromatography; UPLC, Waters) 설정은 ACQUITY UPLC BEH C18(1.7 μ m

30 1.0×100 mm, Waters) 컬럼을 이용하였으며 0.4 ml/분에서 12분 동안 용매 A[15 mM Amlyamine 및 25 mM HFIP(Hexafluoroisopropanol)]와 용매 B(15 mM

Amylamin 및 25 mM HFIP in Acetonitrile)의 선형 구배를 조절하였다. C18-UPLC로 분리되어 나온 용리액을 질량분석기(Quadrupole-Time of Flight, Q-TOF, Waters)로 분석하였다. Q-TOF는 ESI 네거티브 모드에서 분석하였으며, 캐필러리 및 샘플링콘(sampling cone)의 전압은 각각 3 kV 및 40 V, 탈용매(desolvation)는 유속 600 L/h, 온도 300°C, 소스 온도는 120°C 조건에서 실시하였다. TOF MS 데이터는 스캔시간은 0.5 초 m/z 100-1300 범위에서 분석하였다. 분석의 정확도를 위해 모든 분석에 2 ng/ μ l의 류신 엔케팔린(leucine enkephalin, ESI 네거티브 모드에서 554.2619 Da)을 락스프레이(lock spray)로 사용하였다.

도 2에서 알 수 있듯이, 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당의 질량분석 결과 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 1개 내지 7개의 당으로 구성되어 있으며, 특히 기 보고된 만뉴론산 올리고당 질량값 보다 18이 적은 피크들이 관찰됨에 따라 물 분자가 제거되어 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당이 형성되어 비환원성 말단의 포화형 만뉴론산 올리고당(non-reducing end of Saturated Mannuronic Acid Oligosaccharide; SMOS)보다 우세하게 존재함을 알 수 있었다.

비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당(USMOS)과 비환원성 말단의 포화형 만뉴론산 올리고당(SMOS)의 비율을 나타낸 결과는 도 3에 제시되었다. 도 3과 같이 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 비환원성 말단의 포화형 만뉴론산 올리고당 보다 평균 2배 이상의 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당의 단당들이 존재함을 확인하였다. 비환원성 말단의 포화형 만뉴론산 올리고당 분자량은 다음과 같다. 1당 (m/z 193), 2당 (m/z 369), 3당 (m/z 545), 4당 (m/z 722), 5당 (m/z 898), 6당 (m/z 1074), 7당 (m/z 1250).

상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당의 만뉴론산 비율을 측정하기 위하여 원편광 이색성 분광법(Circular Dichroism; CD, J-715 spectropolarimeter, JASCO)을 이용하여 원편광 이색성 분광 신호를 측정하였다. 상기 CD 신호는 상온에서 1 cm의 큐벳을 이용하여 190-250 nm 영역에서 측정하였으며, 일관성 있는 CD 시그널을 얻기 위하여 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 1 mg/ml 농도로 사용하였다.

만뉴론산:글루론산 구성비를 알아보기 위하여 정점(peak, 200 nm 흡광도 값), 저점(trough, 215 nm 흡광도 값)을 측정하여 만뉴론산과 글루론산의 비율을 계산하였으며, 계산식은 다음과 같다:

5 (1) peak/trough < 1, mannuronic acid/guluronic acid = 2.0(peak/trough)

(2) peak/trough > 1, mannuronic acid/guluronic acid = 27(peak/trough) + 40

10 도 4에서 알 수 있듯이, 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 만뉴론산/글루론산 비율이 2.12(peak=6.66, trough=6.42)임을 확인하였다.

15 실시예 3: 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당에 의한 지방세포의 지방축적 억제

3T3-L1 지방전구세포를 DMEM 배지에 배양하여 컨플루언시(confluency)에 이르면 0.5 mM IBMX(isobutylmethylxanthine, IBMX), 1 mM 덱사메사손(dexamethasone) 및 1 μ g/ml 인슐린(이상 MDI)으로 2일 동안 처리 후 1 μ g/ml 인슐린이 포함된 DMEM+혈청 배지로 48시간 20 간격으로 교체하여 7일 동안 지방세포로 분화를 유도하였다. 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 배지교체 시 0.2 mg/ml 농도로 함께 처리하였으며, 7일 후 지방세포의 지방 축적 및 분화 억제 정도를 오일 레드 O 염색(Oil red O stain) 및 RNA 추출을 하여 관찰하여 결과를 도 5에 나타내었다.

25 도 5에 제시한 바와 같이, 중성지방을 오일 레드 O 색소로 염색한 후 광학현미경으로 세포를 관찰한 결과 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 0.2 mg/ml 농도로 처리 시 대조구 대비 지방세포의 오일 레드 O 염색강도가 현저히 약화되었다. 나아가 오일 레드 O로 염색된 중성지방에서 색소를 추출하여 정량한 결과 비환원성 말단에 이중결합을 형성한 USMOS가 30 대조구 대비 중성지방 축적을 약 40 % 억제하였으며, 비환원성 말단의 포화형 만뉴론산 올리고당의 경우 지방축적 저해 효과가 대조구 대비 약

15% 정도만 저해함에 따라 이중결합 형성이 항비만 효과에 중요한 요소임을 확인하였다.

3T3-L1 지방전구세포를 동일한 방법으로 지방세포로 분화시켜 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 0.2 mg/ml 농도로 처리 후
5 GeneJET RNA 정제 키트 방법에 따라 RNA 추출 후 지방 분화 지표인 aP2, 지방 분화 관련 유전자 C/EBP α (CAAT enhancer binding protein α) 및 PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor) γ 발현억제 결과를 도 4에 나타내었다.

도 5에 나타낸 바와 같이, 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산
10 올리고당 처리시 대조구 대비 발현양이 aP2, C/EBP α 및 PPAR γ 는 각각 25%, 60% 및 40% 억제됨을 확인하였다. 또한 비환원성 말단의 포화형 만뉴론산 올리고당 대비 항비만 효과가 우수함을 확인하였다.

15 실시예 4: 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 당흡수 조절 확인

L6 근육세포를 10% 혈청이 함유된 DMEM 배지에 배양 후 2% 혈청 배지로 교체하며 L6 세포를 완전히 분화시킨다. 완전히 분화시킨 L6 근육 세포의 배지를 무혈청 DMEM 배지로 교환하여 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 0.2 mg/ml, 수준으로 1 시간동안 처리 후, 비환원성
20 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당이 처리된 배지를 제거하고 미리 가온한 37°C KRH 완충액(Krebs-Ringer Hepes buffer)로 2회 세척하여 배지 내에 존재하는 포도당을 제거하였다. [3H]-2-데옥시글루코오스([3H]-2-deoxyglucose)를 0.04 mM 농도로 15분 처리한 후 [3H]-2-데옥시글루코오스를 포함한 KRH 완충액을 신속히 제거하고 빙냉한 PBS를
25 가함으로써 반응을 정지시켰다. 세포 용해 완충액(Cell lysis buffer)를 이용하여 세포를 파쇄한 후 섬광계수기(scintillation counter)로 방사능성(radioactivity)를 측정하여 알긴산 올리고당 처리에 따른 포도당 수송능 증가 효과를 확인하였다.

도 6에 제시한 바와 같이, 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산
30 올리고당을 처리 시 양성대조구인 인슐린(0.2 μ M)과 비교하여 유사한 세포 내 당 흡수가 촉진됨을 확인하였다. 비환원성 말단의 포화형 만뉴론산

올리고당을 0.2 mg/ml 농도로 처리 시 당흡수가 일어나지 않음에 따라 당흡수 촉진에 비환원성 말단의 이중결합의 형성이 중요함을 확인하였으며, 당 흡수에 중요 단백질인 AMPK(AMP-activated protein kinase)의 억제제인 C.C(Compound C, 1 μ M)와 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을
 5 동시 처리 시 당흡수가 억제됨에 따라 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당이 AMPK 경로를 통하여 당흡수를 촉진함을 확인하였다.

도 6에 제시한 바와 같이, 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 처리 시 당흡수 촉진과 관련한 수송체 발현에 영향을 주는 PAK, Akt 및 AS160의 인산화 증가를 알아보기로 농도별로 근육세포에 처리하여
 10 단백질을 추출 후 웨스턴 블릿 방법을 통하여 확인한 결과 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 농도 의존적으로 증가함을 확인하였다. 따라서 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 당흡수 촉진을 위하여 AMPK 경로 및 PAK, Akt, AS160의 인산화를 촉진하여 당수송체(GLUT4, glucose transporter 4)의 발현에도 영향을 줄 것으로 예상하였다.

실시에 5: 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당의 장내 균총 조절 효능 확인

비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당의 장내 균총 개선 효능을 확인하기 위하여 비만 동물 모델인 랫트와 노령 동물 모델인
 20 마우스를 이용하였다. 비만을 유도한 랫트는 생후 3주령의 수컷 SD 랫트를 (주)중앙동물에서 구입하여 3일 동안 적응시킨 후 사육환경은 온도 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도는 $50 \pm 10\%$ 이며 명암주기는 1일 12시간으로 조절하여 10주 동안 고지방식이를 유도하여 실험군에는 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 0.25 mg/kg 농도로 48시간 주기로 복강 투여를 실시하며 실험을
 25 진행하였다. 노령 쥐는 생후 1개월령 및 17개월령 수컷 C57BL/6J을 한국기초과학지원연구원에서 구입하여 사육환경은 온도 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도는 $50 \pm 10\%$ 이며 명암주기는 1일 12시간으로 조절하여 10주 동안 실험을 실시하였으며 실험군은 공급하는 물에 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 0.2 mg/kg 농도로 공급하였다. 실험 종료 후
 30 실험동물의 내장 내용물을 수집 후 200 mg을 취하여 Fast DNATMSPIN Kit for Soil kit를 이용하여 DNA를 kit에 제시된 방법을 토대로 순수한 DNA를

확보하고, 추출한 DNA의 농도와 순도를 확인하기 위해서 나노드롭(nanodrop)을 활용하여 측정 후, 아가로스겔 전기영동을 통해 추출된 DNA 밴드 결과를 토대로 DNA 농도와 순도를 확인하였다. 분리된 DNA 내 세균의 16S rRNA 유전자 증폭을 위하여 세균에 특이적으로 결합하는 V1-
 5 V3 과가변영역(hypervariable region)을 포함하는 27F 정방향 프라이머(GAGTTTGATCMTGGCTCAG)와 518R 역방향 프라이머(WTTACCGCGGCTGCTGG)를 이용하여 94℃에서 5분 동안 초기 변성(denaturation) 시키고, 94℃에서 30초, 55℃에서 45초, 72℃에서 1분 30초로 30회 반복하여 증폭 PCR을 수행 후 QIAquick 겔 추출 키트(Qiagen,
 10 Germany)를 통해 정제한 PCR 산물은 GS Junior Titanium system(Roche, Germany) 염기서열분석기를 이용하여 파이로시퀀싱(pyrosequencing)을 진행하였으며 파이로시퀀싱에 필요한 방법과 반응들은 제조회사(Roche)의 매뉴얼에 따라 (주)천연구소(Chunlab, Korea)에서 수행하였다.

도 7에 제시한 바와 같이, 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산
 15 올리고당을 투여한 비만 랫트 장내 균총의 경우 그람양성세균(Firmicutes)에 속하는 항비만 지표균주인 Roseburia sp. 및 Lactobacillus sp.가 대조군(비만 유도 랫트, 고지방식이, high fat diet; HFD) 대비 각각 약 4% 및 2% 증가 하여 균총의 변화가 일어났으며, 또한 그람음성세균(Bacteroidetes)에 속하는 Clostridium sp. 및 Ruminococcus
 20 sp. 균주가 각각 약 1%씩 감소됨을 확인하였다.4,5

도 8에 제시한 바와 같이, PCO 분석을 통해 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 음용섭취한 노령쥐의 경우 1개월령의 쥐의 장내 균총과 유사하며 17개월령의 쥐의 장내 균총과는 차이가 있음을 확인하였다. 또한 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 섭취
 25 1개월령과 유사한 장내 균총을 형성함을 확인하였다.

도 9에 제시한 바와 같이, 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 음용섭취한 17개월령 노령쥐의 경우 대조구(17개월령 마우스) 대비 그람음성세균(Bacteroidetes)가 약 22% 증가하며, 상대적으로 그람양성세균(Firmicutes) 균이 22% 감소하여 1개월령 쥐의 장내 균총과
 30 유사하게 변화하였음을 확인하였다.

실시예 6: 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당의 에스트로겐 증감제 기능 확인

본 연구에서 사용된 17β -estradiol은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, DMEM/F12(Dulbecco's modified Eagle's medium/F12), 우태아혈청(Fetal bovine serum), Opti-MEM 배지 및 페니실린-스트렙토마이신은 Gibco (NY, USA)에서 구입하였다. PBS는 WelGENE(Daegu, Korea), 세포 계수 키트(CCK-8)는 Dojindo Molecular Technologies (Tokyo, Japan), RNeasy 소형 키트는 QIAGEN(Hiden, Germany), 소 인슐린은 Cell Applications(San Diego, USA), FuGENE HD는 Promega(Madison, WI, USA)에서 구입하여 사용하였다.

MCF-7 세포는 10%의 우태아혈청, 페니실린-스트렙토마이신(100 U/ml) 및 1% 소 인슐린이 포함된 DMEM/F12 배지에서 37°C 온도에 배양하여 에스트로겐 증감제 활성을 측정하고자 ERE(estrogen response element)-루시퍼레이즈 활성 및 pS2, PR, CTSD, PGC-1 α , ERR, GATA3 및 FOXO1 발현양을 확인하였다.

비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 0.1 mg/ml 농도로 48시간 처리 후 ERE-루시퍼레이즈 활성을 확인하고자 pEGFP-C1-ER α , 3X ERE TATA luc 및 pRL-SV40을 FuGENE HD 시약을 이용하여 MCF-7 세포에 트랜스펙션(transfection) 후 용해하여 루시퍼레이즈 분석을 실시하였으며, GeneJET RNA 정제 키트 방법에 따라 RNA 추출 후 pS2, PR, CTSD, PGC-1 α , ERR, GATA3 및 FOXO1의 발현양을 실시간 PCR로 확인하였다.

도 10에 제시한 바와 같이, 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 처리시 비환원성 말단의 포화형 만뉴론산 올리고당과 다르게 에스트로겐 시그널 하부 유전자인 pS2의 발현이 대조구 대비 약 5배 증가하였으며, 또한 에스트로겐(E2, 17β -estradiol)과 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 병행 처리 시 에스트로겐 수용체 α (ER α , estrogen receptor α)에 의한 ERE 루시퍼레이즈 활성 및 pS2, PR의 발현이 증가하고, CTSD의 발현을 감소시켜 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당이 선택적으로 에스트로겐 수용체 α 하부 시그널의 유전자의 발현을 조절함을 확인하였다.

도 11에 제시한 바와 같이, 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산

올리고당 처리 시 PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 α) 및 전사 파트너인 ERR α (estrogen related receptor α)의 발현을 증가시켜, ER α 경로와 함께 작용하여 GATA3 (GATA binding protein 3)와 FOXO1 (forkhead box protein A1)의 mRNA 발현을 증가시킴으로서
5 에스트로겐 증감제 효능을 갖는 것을 확인하였다.

실시예 7: 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당의 항비만, 항당뇨 및 에스트로겐 감수성 증대 기전 모식도

비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당의 항비만, 항당뇨 및
10 에스트로겐 감수성 증진기전에 대한 전체적인 모식도를 도 12에 제시하였다.

도 12에 제시한 바와 같이, 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 처리에 따른 항비만, 항당뇨 및 에스트로겐 감수성 증대 기전을 종합한 결과, 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 처리시 AMPK 활성화를 통해 PGC-1 α 의 발현이 증가 되고, PGC-1 α 의 전사 파트너인
15 ERRs (estrogen related receptor α , β , γ)를 활성화 시켜 지방산 β 산화를 촉진시킴으로서 항비만 효과를 갖는 것을 확인할 수 있었다. 또한 근육 내 AMPK는 지방산의 합성과 분해를 매개함으로서 지방산 β 산화 대사를 촉진하는 작용 및 PGC-1 α 발현을 통해 미토콘드리아 관련 유전자들의 발현을 증가시키는 것으로 보고됨에 따라, 비환원성 말단의 불포화형
20 만뉴론산 올리고당은 AMPK 활성화를 통해 또한 PGC-1 α 발현을 증가시켜, 미토콘드리아의 유전자의 발현 및 수의 증가를 통해 인슐린 저항성을 개선하는 효능을 갖는 것으로 기대되었다.

비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 에스트로겐 증감제로서 에스트로겐과 함께 처리시 ER α (estrogen receptor α) 경로를
25 통해 GATA3 및 FOXO1의 mRNA 발현을 증가시키고, ERR α 및 PGC-1 α 의 발현을 증가시킴에 따라, 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 PGC-1 α 에 의존하는 ER α 경로에 의해 ERE를 활성화 시켜 에스트로겐 증감제의 기능을 갖는 것으로 확인하였다.

또한, 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 체내에서 장내
30 균총을 개선하여 항비만 지표 균주(Roseburia sp., Lactobacillus sp.)를 증가시키고 비만 지표균주(Clostridium sp. Ruminococcus sp.)를 감소시켜

복합적인 항비만, 항당뇨, 장내 균총 개선 및 에스트로젠 감수성 증대 효능을 갖는 것으로 확인하였다.

<참고문헌>

- 5 1. Qin JI et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. nature. 2010. 59-65
2. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. nature. 2012. 207-214
3. Turnbaugh PJ et al. An obesity-associated gut microbiome with
10 increased capacity for energy harvest. nature. 2006. 1027-31
4. Nadal I et al. ts in clostridia, bacteroides and immunoglobulin-coating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents. Int J Obes(Lond). 2009. 758-767
5. Neyrinck AM et al. Prebiotic Effects of Wheat Arabinoxylan
15 Related to the Increase in Bifidobacteria, Roseburia and Bacteroides/Prevotella in Diet-Induced Obese Mice. PLoS One. 2011. e20944

20 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【특허 청구범위】**【청구항 1】**

폴리만뉴론산(poly-mannuronate)을 기질로 하여 알긴산 라이아제(alginate lyase)에 의해 분해된 분자량 100-3000 Da 이하의 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 1 개 내지 10 개의 만뉴론산 또는 글루론산을 포함하는 것을 특징으로 하는 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 만뉴론산:글루론산의 비율이 1.2-5.0:1 인 것을 특징으로 하는 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당.

【청구항 4】

상기 제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항의 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 유효성분으로 포함하는 비만 개선, 예방 또는 치료용 조성물.

【청구항 5】

제 4 항에 있어서, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 장내 미생물 균주의 생장을 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 6】

제 5 항에 있어서, 상기 장내 미생물 균주는 로즈버리아 종(Roseburia sp.) 및 락토바실러스 종(Lactobacillus sp.)로 구성된 군으로부터 선택되는 균주인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 7】

제 4 항에 있어서, 상기 비만 개선, 예방 또는 치료용 조성물은 비만 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 비만 개선 또는 예방용 식품 조성물 또는 기능성 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

5

【청구항 8】

상기 제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항의 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 유효성분으로 포함하는 당노 개선, 예방 또는 치료용 조성물.

10

【청구항 9】

제 8 항에 있어서, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 글루코오스(glucose)의 흡수(uptake)를 촉진함을 특징으로 하는 조성물.

15

【청구항 10】

제 8 항에 있어서, 상기 당노 개선, 예방 또는 치료용 조성물은 당노 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 당노 개선 또는 예방용 식품 조성물 또는 기능성 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

20

【청구항 11】

상기 제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항의 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 유효성분으로 포함하는 장내 유익균 증진용 프로바이오틱스.

25

【청구항 12】

제 9 항에 있어서, 상기 장내 유익균은 로즈버리아 종(*Roseburia* sp.) 및 락토바실러스 종(*Lactobacillus* sp.)로 구성된 균으로부터 선택되는 장내 유익균인 것을 특징으로 하는 프로바이오틱스.

30

【청구항 13】

제 11 항에 있어서, 상기 장내 유익균 증진용 프로바이오틱스는 약제학적 조성물, 식품 조성물 또는 기능성 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 프로바이오틱스.

5 **【청구항 14】**

상기 제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항의 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 유효성분으로 포함하는 갱년기 증후군 개선, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

10 **【청구항 15】**

제 14 항에 있어서, 상기 조성물은 17β -에스트라디올(17β -estradiol)을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 16】

15 제 11 항에 있어서, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 17β -에스트라디올(17β -estradiol)과 동반상승효과(synergic effect)를 나타내는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 17】

20 제 14 항에 있어서, 상기 갱년기 증후군 개선, 예방 또는 치료용 조성물은 갱년기 증후군 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 갱년기 증후군 개선 또는 예방용 식품 조성물 또는 기능성 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

Fig. 1

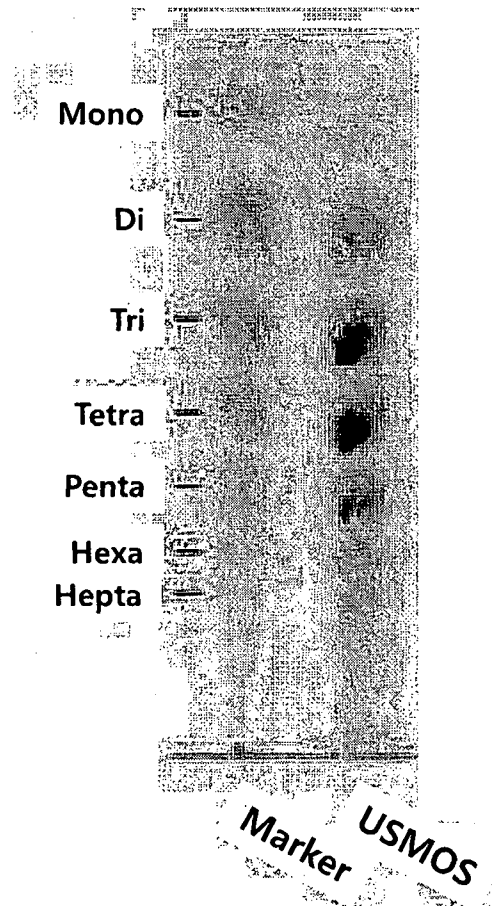
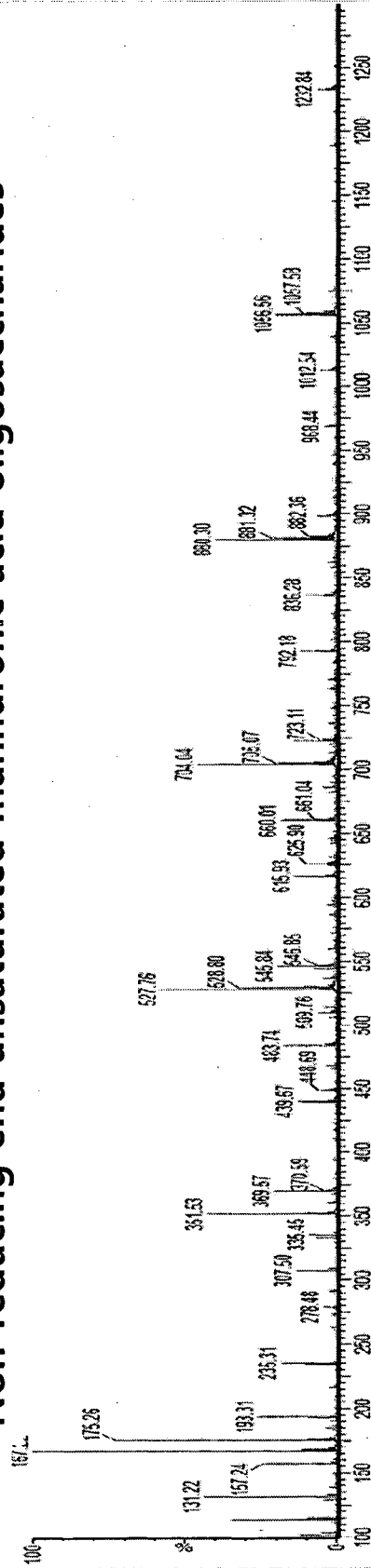


Fig. 2

Non-reducing end unsaturated mannuronic acid oligosaccharides



Non-reducing end saturated mannuronic acid oligosaccharides

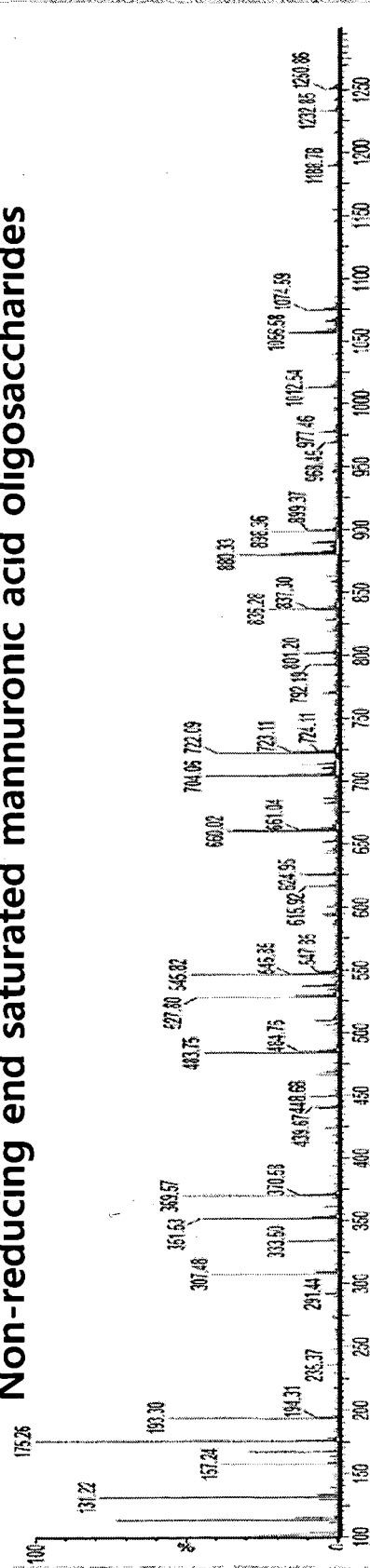


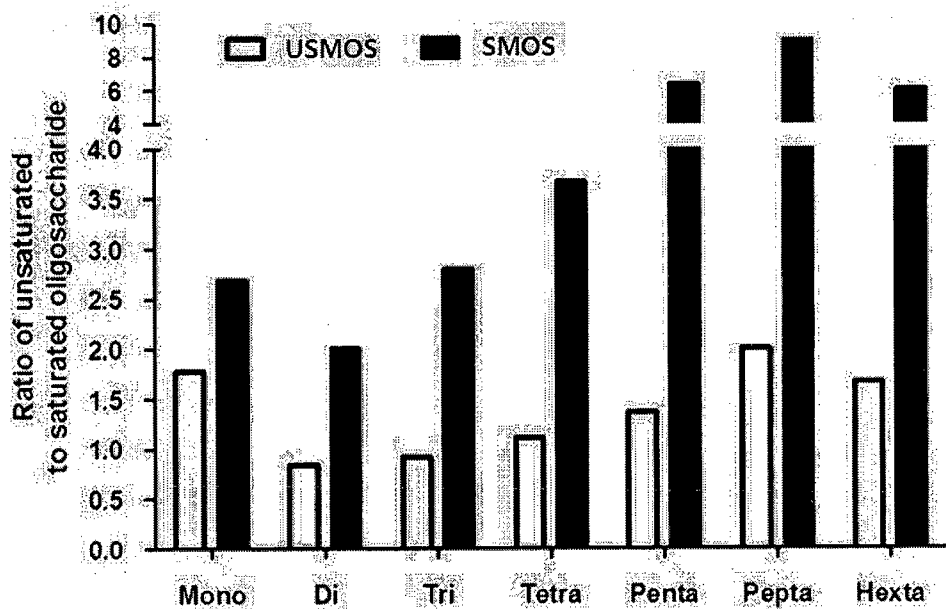
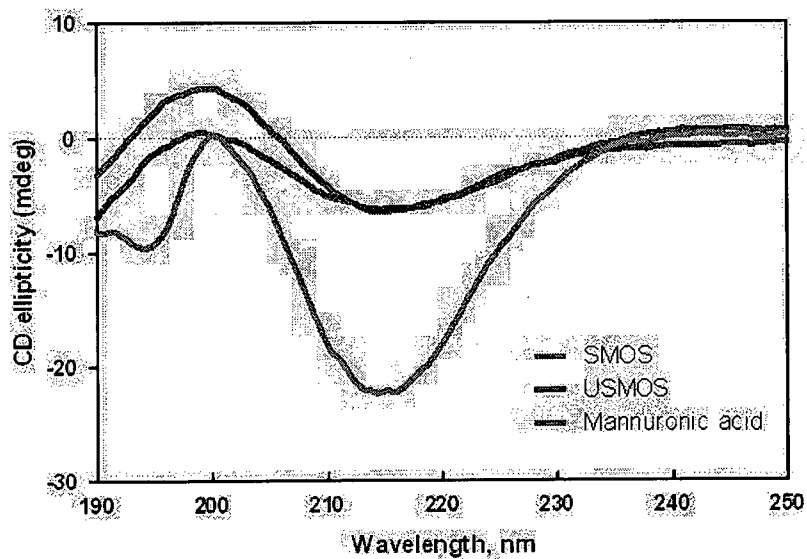
Fig. 3**Fig. 4**

Fig. 5a

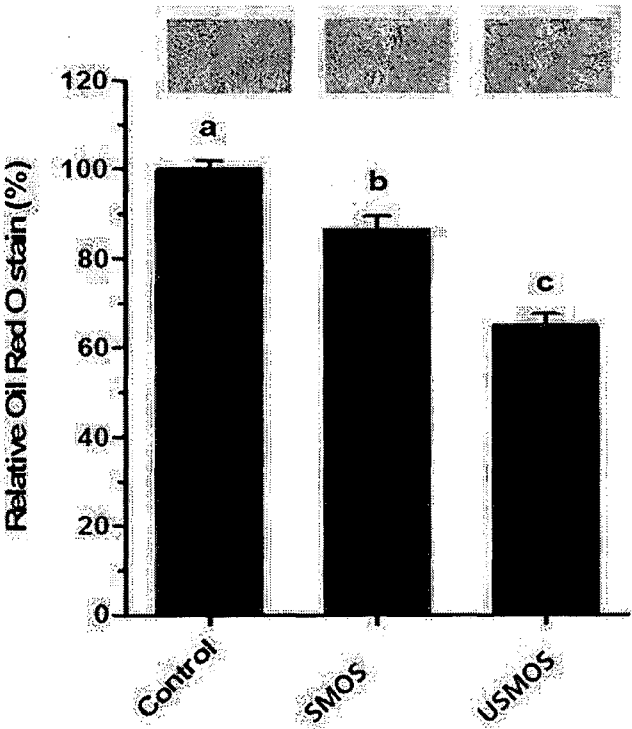


Fig. 5b

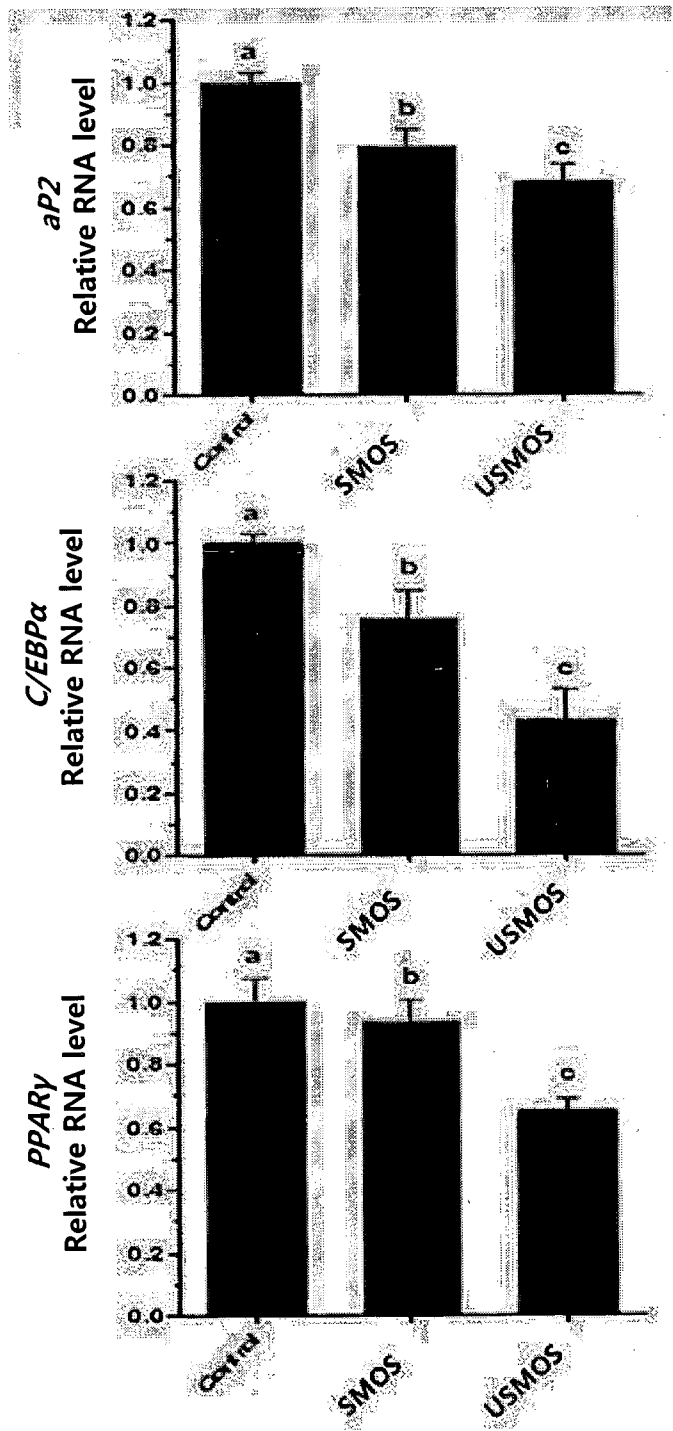


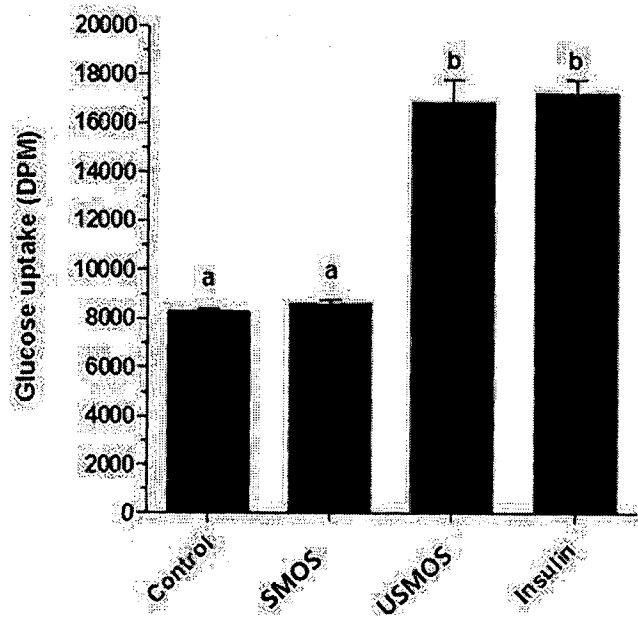
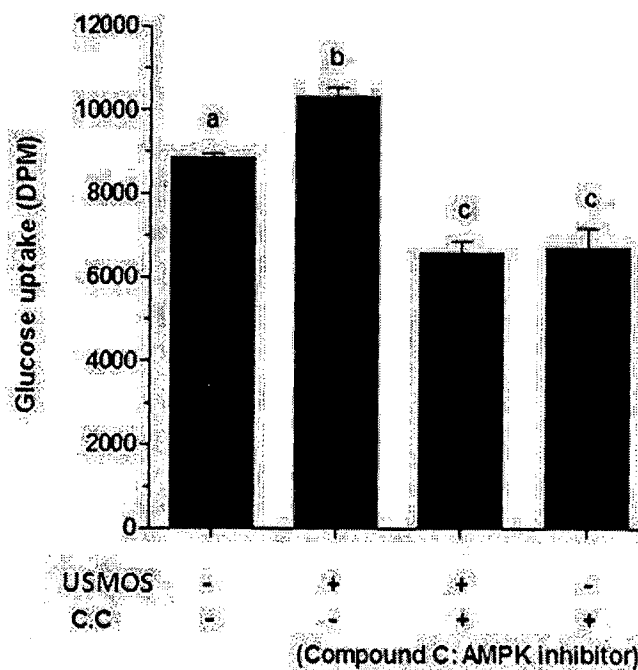
Fig. 6a**Fig. 6b**

Fig. 6c

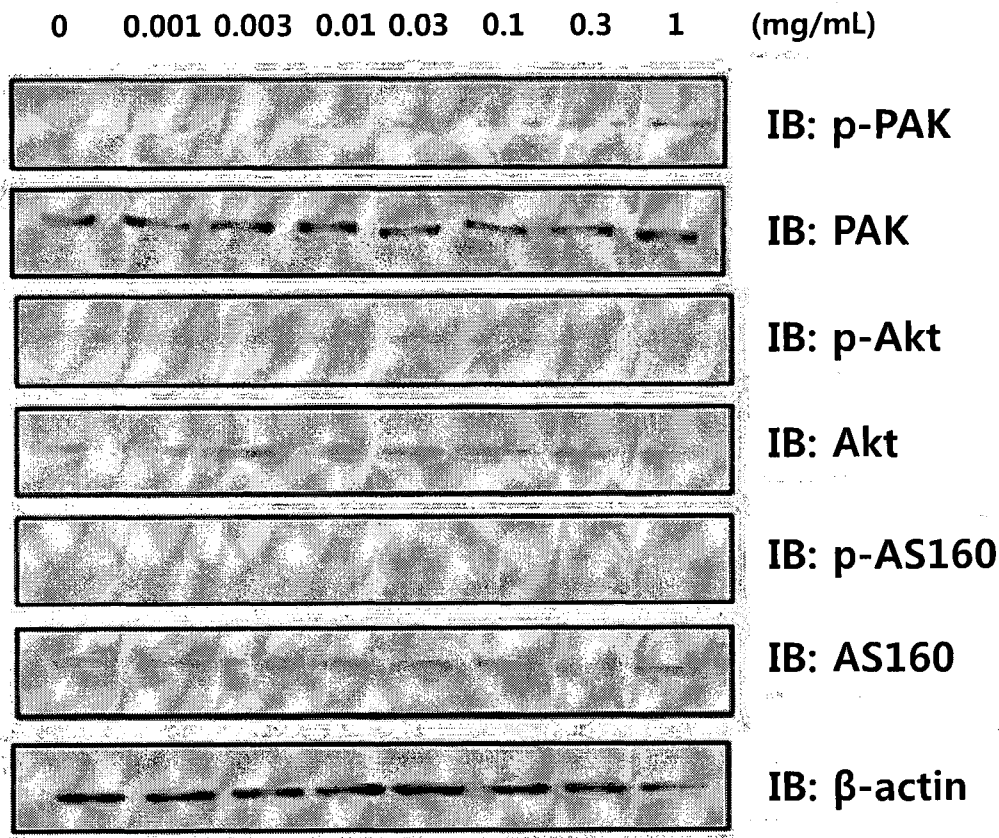


Fig. 7a

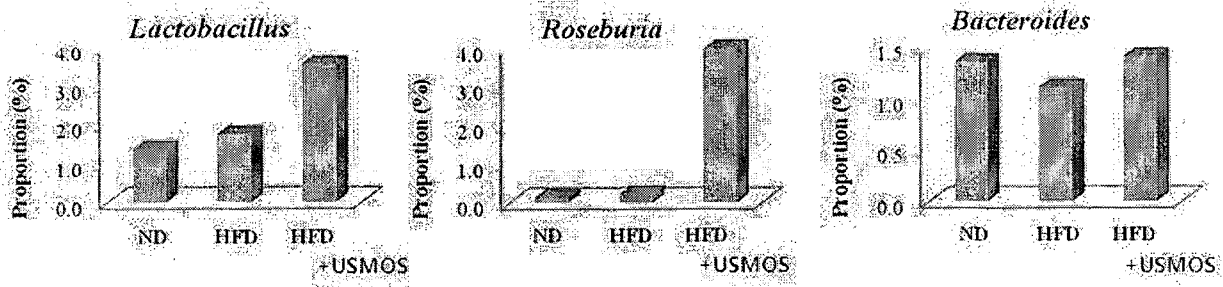


Fig. 7b

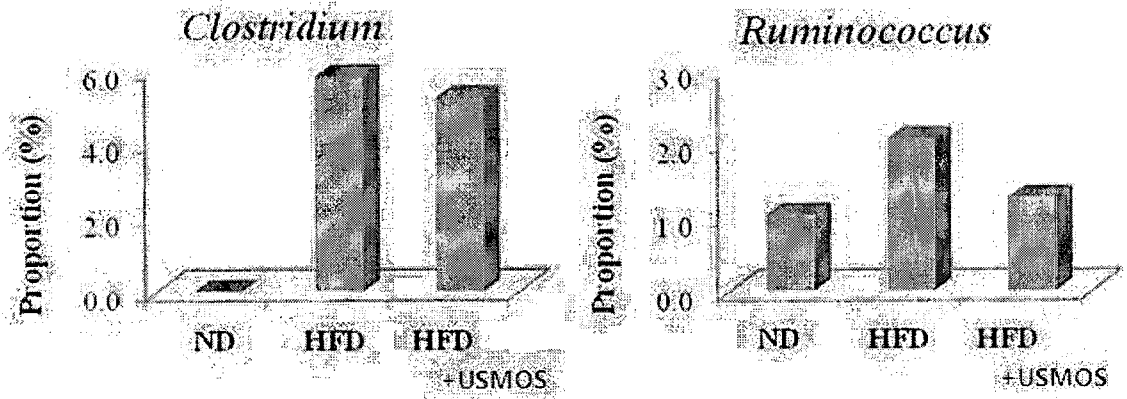


Fig. 8

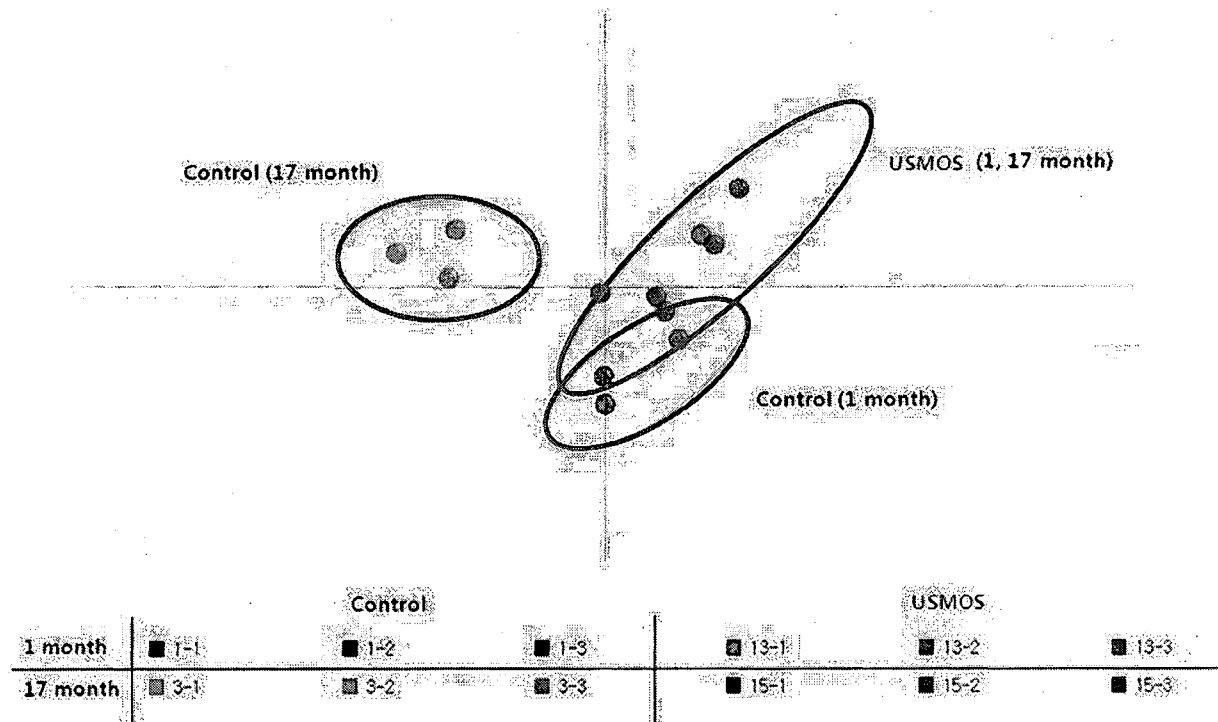


Fig. 9

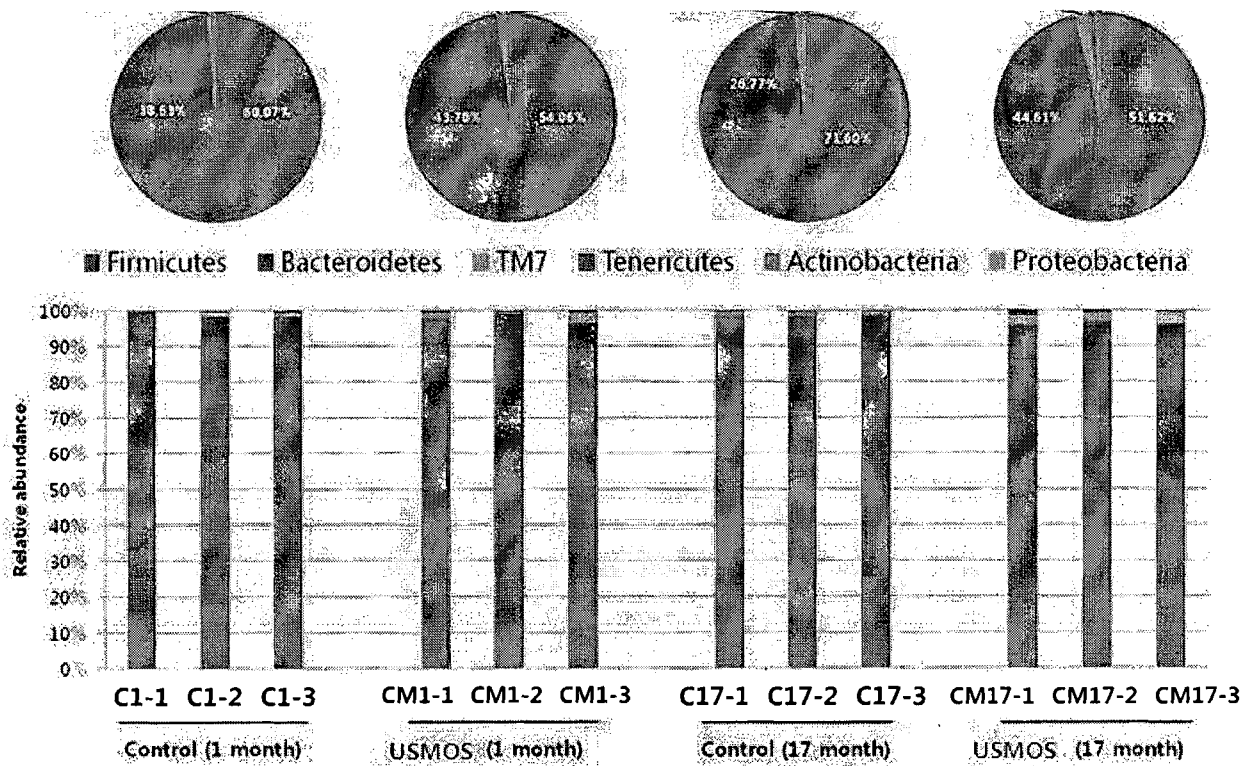


Fig. 10a

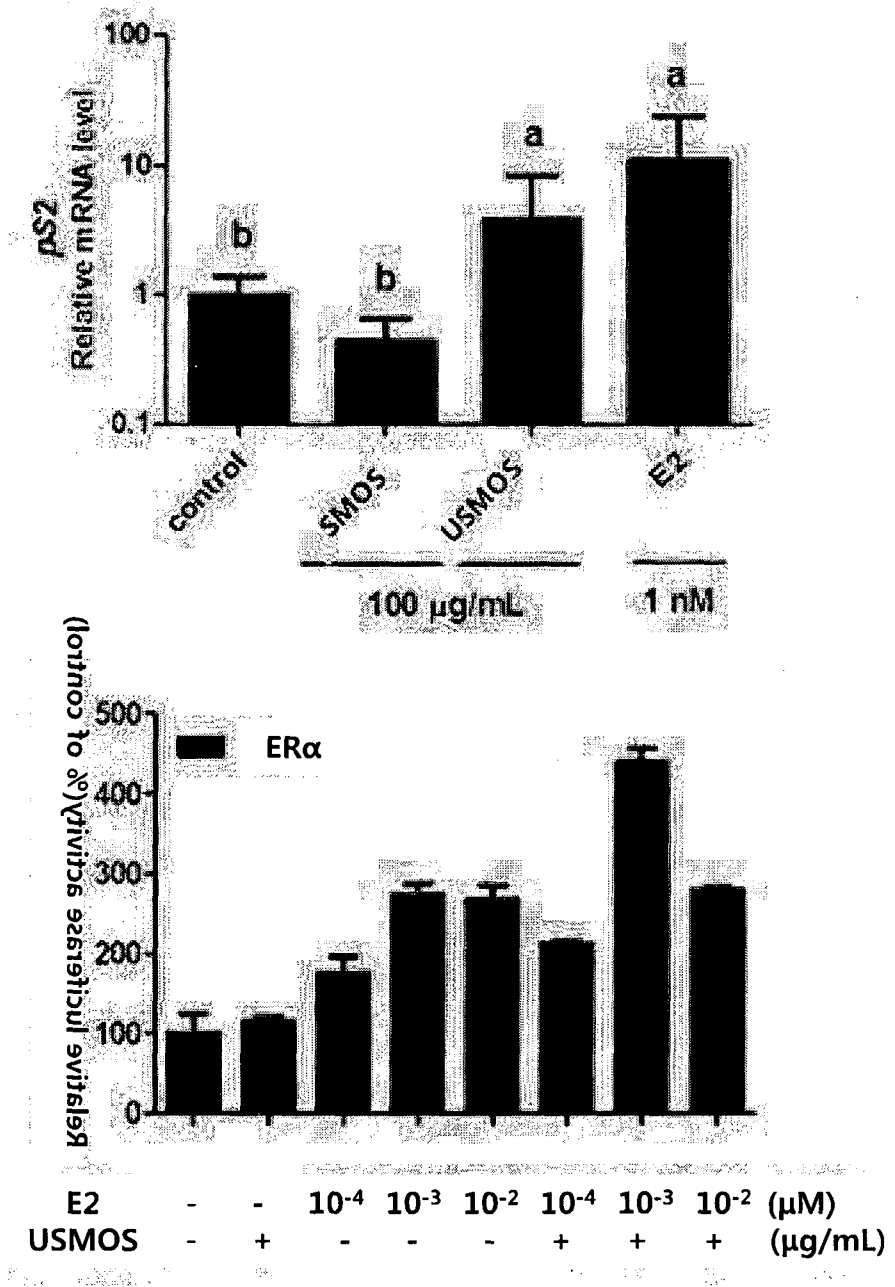


Fig. 10b

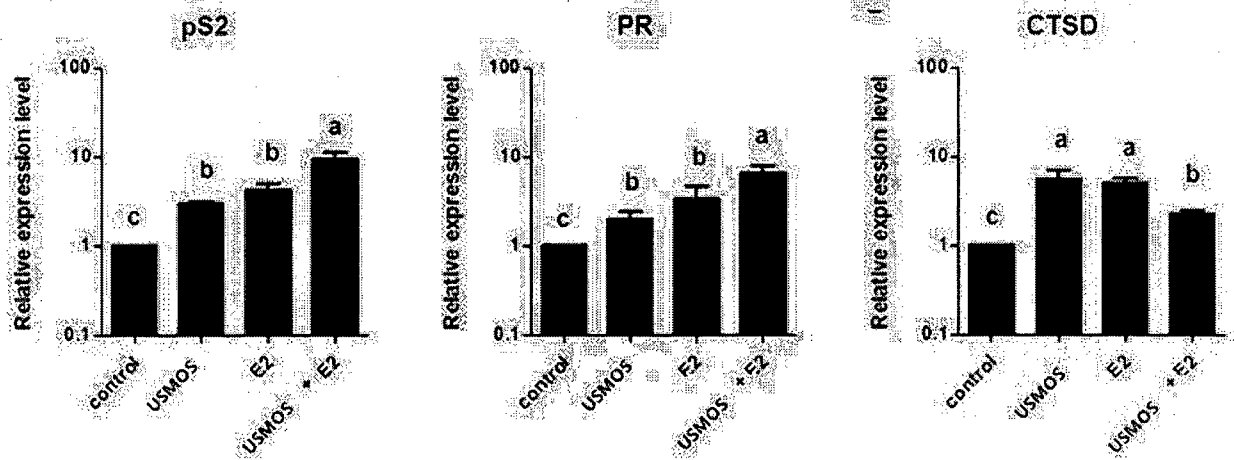


Fig. 11

E2: 17 β -estradiol(positive control)

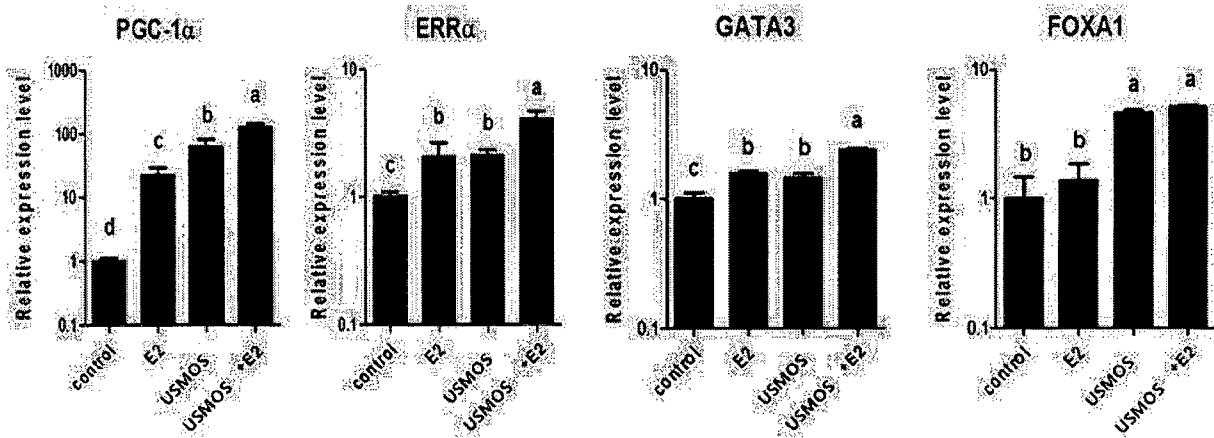


Fig. 12

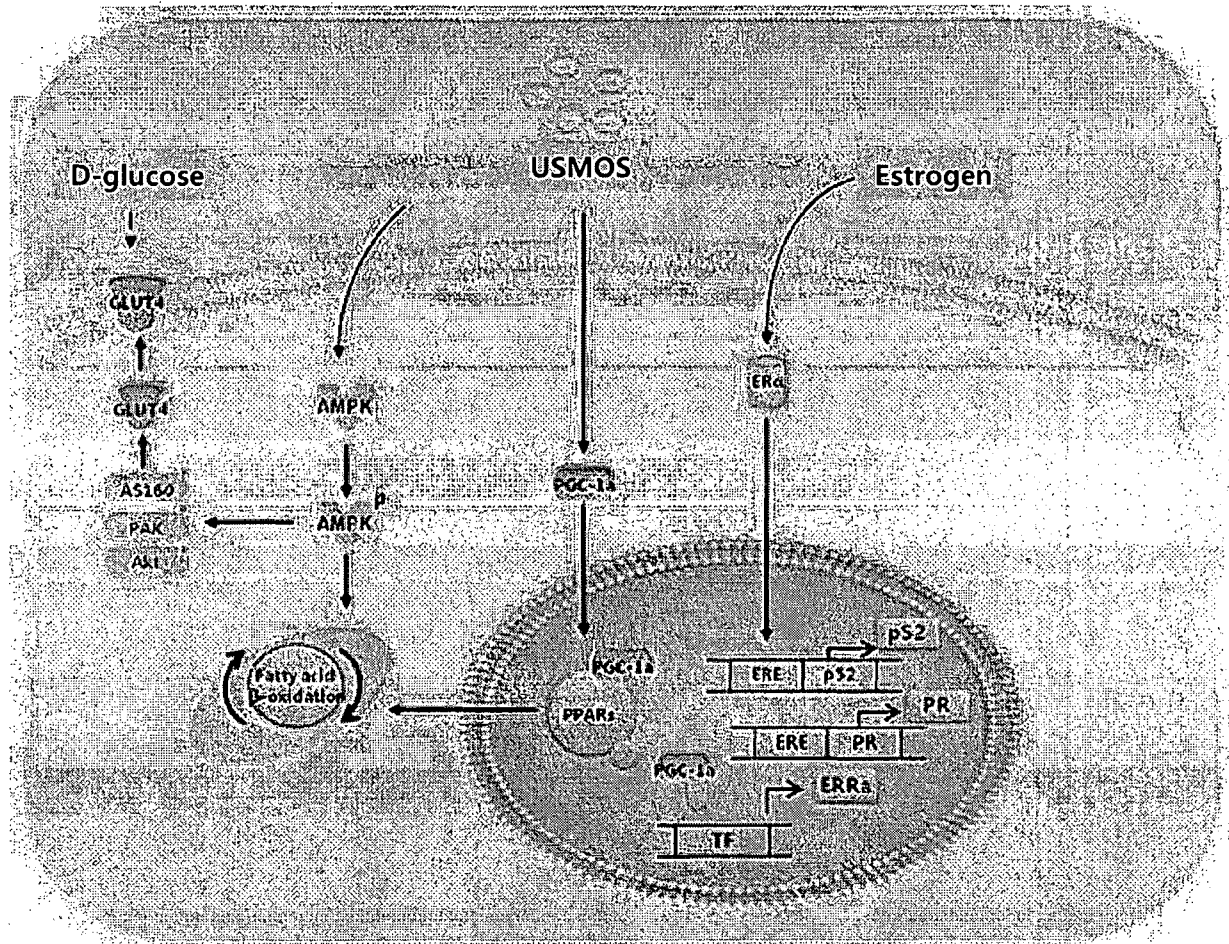
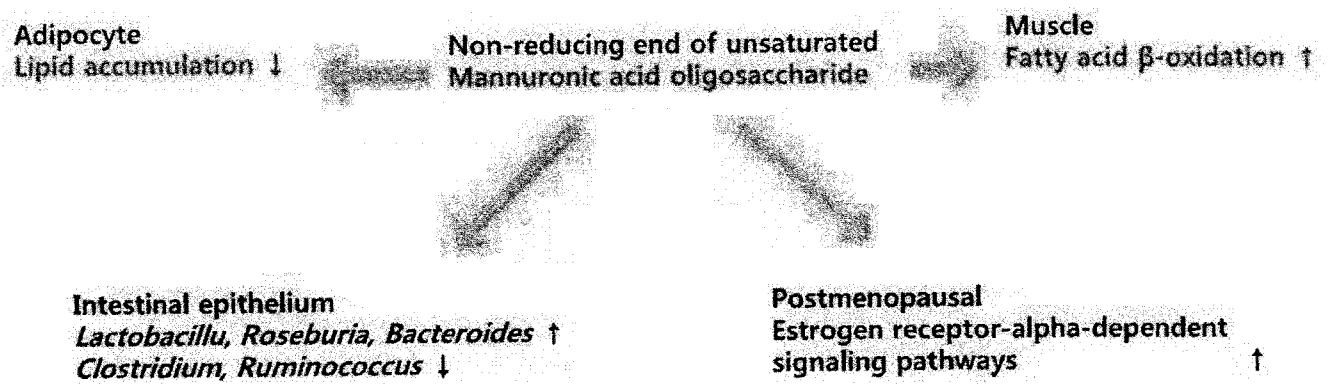


Fig. 13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/002873**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****A23L 1/30(2006.01)i, A61K 31/565(2006.01)i, A61K 31/702(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)

A23L 1/30; C12N 9/88; A61P 11/06; C12P 19/04; A61K 31/70; A61K 31/734; C07H 15/00; C12N 15/60; C12N 1/20; A61K 31/565; A61K 31/702

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: poly-mannuronate(poly-mamuronate), alginate lyhase(alginate lyhase), non-reducing end-group, mann uronic acid oligosaccharides

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2008-0093525 A (KYUNGSUNG UNIVERSITY INDUSTRY COOPERATION FOUNDATION et al.) 22 October 2008 See abstract; claims 1-7; paragraphs [60]-[67].	1-17
A	KR 10-2015-0000110 A (JEONNAM BIOINDUSTRY FOUNDATION) 02 January 2015 See abstract; claims 1-7.	1-17
A	KR 10-1277706 B1 (INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY) 24 June 2013 See abstract; claims 1-6.	1-17
A	EP 0979301 B1 (IFREMER INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE POUR L'EXPLOITATION DE LA MER) 08 September 2004 See abstract; claims 1-14 and 22.	1-17
A	US 2007-0254848 A1 (GENG, M. et al.) 01 November 2007 See abstract; claims 11-20.	1-17
L	KIM, Hwan Seon, "Effectiveness of Polymannuronate-derived Oligosaccharides as Estrogen Activity Sensitizer in MCF-7 cells", Master's Thesis, Chonnam National University Graduate School, February 2015 See pages 4-9. (The document is issued on February 2015, but publication date is not clear.)	1-17



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

23 JUNE 2016 (23.06.2016)

Date of mailing of the international search report

24 JUNE 2016 (24.06.2016)

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
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/002873

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2008-0093525 A	22/10/2008	KR 10-0876662 B1	09/01/2009
KR 10-2015-0000110 A	02/01/2015	NONE	
KR 10-1277706 B1	24/06/2013	CN 102971426 A	13/03/2013
		CN 102971426 B	05/11/2014
		KR 10-1245304 B1	19/03/2013
		KR 10-2012-0128337 A	27/11/2012
		WO 2012-157814 A1	22/11/2012
EP 0979301 B1	08/09/2004	EP 0979301 A1	16/02/2000
		FR 2760757 A1	18/09/1998
		FR 2760757 B1	28/05/1999
		WO 98-40511 A1	17/09/1998
US 2007-0254848 A1	01/11/2007	AU 2005-223923 A1	29/09/2005
		AU 2005-223923 B2	23/10/2008
		BR P10509217 A	04/09/2007
		CA 2561873 A1	29/09/2005
		CA 2561873 C	15/01/2013
		CN 1562050 A	12/01/2005
		CN 1933845 A	21/03/2007
		EP 1736160 A1	27/12/2006
		EP 1736160 A4	09/01/2013
		EP 1736160 B1	26/08/2015
		JP 2007-530718 A	01/11/2007
		JP 4709203 B2	22/06/2011
		KR 10-0844918 B1	09/07/2008
		KR 10-2007-0007397 A	15/01/2007
		MA 28971 B1	01/11/2007
		NO 20064825 A	27/12/2006
		US 2015-0105344 A1	16/04/2015
		US 8835403 B2	16/09/2014
		WO 2005-089776 A1	29/09/2005
		ZA 200608813 A	30/01/2008

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A23L 1/30(2006.01)i, A61K 31/565(2006.01)i, A61K 31/702(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A23L 1/30; C12N 9/88; A61P 11/06; C12P 19/04; A61K 31/70; A61K 31/734; C07H 15/00; C12N 15/60; C12N 1/20; A61K 31/565; A61K 31/702

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: 폴리만뉴론산(poly-mannuronate), 알긴산 라이아제(alginate lyhase), 비 환원성 말단, 만뉴론산 올리고당

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2008-0093525 A (경성대학교 산학협력단 등) 2008.10.22 요약; 청구항 1-7; 단락 [60]-[67] 참조.	1-17
A	KR 10-2015-0000110 A (재단법인 전남생물산업진흥원) 2015.01.02 요약; 청구항 1-7 참조.	1-17
A	KR 10-1277706 B1 (전남대학교산학협력단) 2013.06.24 요약; 청구항 1-6 참조.	1-17
A	EP 0979301 B1 (IFREMER INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE POUR L'EXPLOITATION DE LA MER) 2004.09.08 요약; 청구항 1-14 및 22 참조.	1-17
A	US 2007-0254848 A1 (GENG, M. 등) 2007.11.01 요약; 청구항 11-20 참조.	1-17
L	김환선, "MCF-7 세포에서 에스트로젠 활성 증감제로서의 폴리만뉴론산 올리고당의 활성기전", 석사학위논문, 전남대학교 대학원, 2015.02. 4-9 페이지 참조. (발행일은 2015.02이나, 공개시점이 불명확함)	1-17

☐ 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

2016년 06월 23일 (23.06.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 06월 24일 (24.06.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

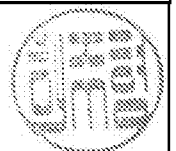
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (문산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2008-0093525 A	2008/10/22	KR 10-0876662 B1	2009/01/09
KR 10-2015-0000110 A	2015/01/02	없음	
KR 10-1277706 B1	2013/06/24	CN 102971426 A	2013/03/13
		CN 102971426 B	2014/11/05
		KR 10-1245304 B1	2013/03/19
		KR 10-2012-0128337 A	2012/11/27
		WO 2012-157814 A1	2012/11/22
EP 0979301 B1	2004/09/08	EP 0979301 A1	2000/02/16
		FR 2760757 A1	1998/09/18
		FR 2760757 B1	1999/05/28
		WO 98-40511 A1	1998/09/17
US 2007-0254848 A1	2007/11/01	AU 2005-223923 A1	2005/09/29
		AU 2005-223923 B2	2008/10/23
		BR PI0509217 A	2007/09/04
		CA 2561873 A1	2005/09/29
		CA 2561873 C	2013/01/15
		CN 1562050 A	2005/01/12
		CN 1933845 A	2007/03/21
		EP 1736160 A1	2006/12/27
		EP 1736160 A4	2013/01/09
		EP 1736160 B1	2015/08/26
		JP 2007-530718 A	2007/11/01
		JP 4709203 B2	2011/06/22
		KR 10-0844918 B1	2008/07/09
		KR 10-2007-0007397 A	2007/01/15
		MA 28971 B1	2007/11/01
		NO 20064825 A	2006/12/27
		US 2015-0105344 A1	2015/04/16
		US 8835403 B2	2014/09/16
		WO 2005-089776 A1	2005/09/29
		ZA 200608813 A	2008/01/30