

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국



(10) 국제공개번호

**WO 2017/222302 A1**

2017 년 12 월 28 일 (28.12.2017) **WIPO | PCT**

(51) 국제특허분류:

*A61K 31/702* (2006.01)

*A23L 33/10* (2016.01)

*A61K 31/7012* (2006.01)

*C12N 9/88* (2006.01)

*A61K 31/734* (2006.01)

*C12P 19/04* (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2017/006529

(22) 국제출원일:

2017 년 6 월 21 일 (21.06.2017)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2016-0077436 2016 년 6 월 21 일 (21.06.2016) KR

10-2016-0096251 2016 년 7 월 28 일 (28.07.2016) 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 우치로537번길 10,105동103, Gwangju (KR).

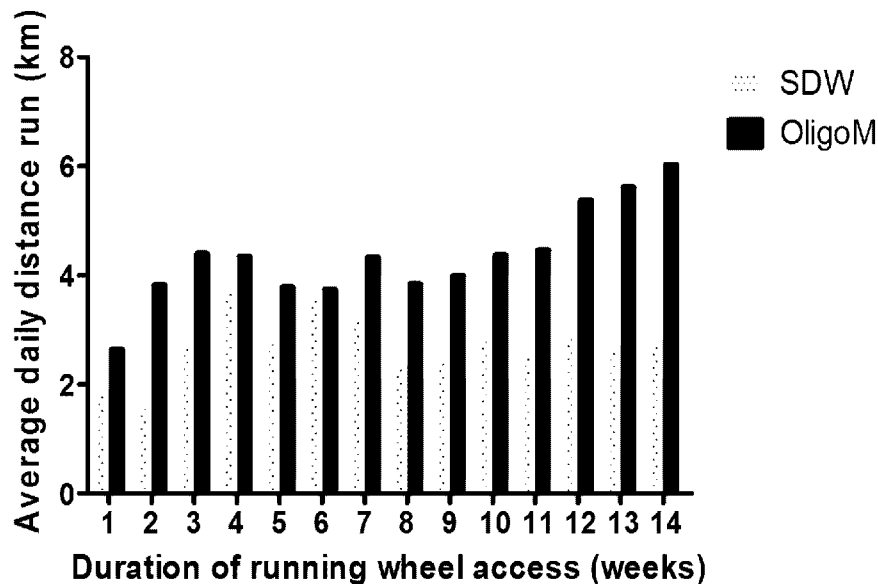
(74) 대리인: 윤대웅 (**YOON, Dae Woong**); 08793 서울시 관악구 남부순환로 1922 청동빌딩 301, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, 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 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,

(54) Title: COMPOSITION FOR IMPROVING EXERCISE ABILITY AND TREATING OSTEOPOROSIS, CONTAINING NON-REDUCING END UNSATURATED MANNURONIC ACID OLIGOSACCHARIDE

(54) 발명의 명칭: 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 포함하는 운동 수행 능력 개선 및 골다공증 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention provides a composition for improving exercise ability and a composition for alleviating, preventing, or treating osteoporosis, both compositions containing a non-reducing end unsaturated mannuronic acid oligosaccharide (OligoM) as an active ingredient. The composition exhibits effects of improving rapid exercise ability and alleviating osteoporosis caused by natural aging and has advantages of facilitating the preparation of an active ingredient and being economical.

[다음 쪽 계속]



WO 2017/222302 A1

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 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))

---

**(57) 요약서:** 본 발명은 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당(OligoM)을 유효성분으로 포함하는 운동 수행 능력 개선용 조성물 및 골다공증 개선, 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 신속한 운동 수행 능력 및 자연노화에 따른 골다공증에 대한 개선 효과를 나타내며, 활성 물질의 제조가 용이하고 경제적인 이점을 갖는다.

## 명세서

### 발명의 명칭: 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 포함하는 운동 수행 능력 개선 및 골다공증 치료용 조성물 기술분야

- [1] 본 특허출원은 2016년 06월 21일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제10-2016-0077436호 및 2016년 07월 28일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제10-2016-0096251호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [2] 본 발명은 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 유효성분으로 포함하는 운동 수행 능력 개선 및 골다공증 치료용 조성물에 관한 것이다.

[3]

### 배경기술

- [4] 알긴산은 해조류인 미역, 감태, 태황, 패, 툇 등의 갈조류의 세포막 사이를 채우고 있는 해조 다당류이다. 알긴산은 b-D-만뉴론산(b-D-mannuronic acid; M) 및 a-L-글루쿠론산(a-L-guluronic acid; G)의 2종류의 우론산(uronic acid)이 각종 비율로 1,4-글리코시드 결합을 한 헤테로형의 다당류이고, 양질의식이섬유 기능을 가진다. 알긴산은 분자 속에 우론산의 카르복시기(-COOH)가 있으므로 산의 성질을 나타낸다. 해조류별 알긴산의 함유량은 종류, 장소, 계절, 부위에 따라 다르지만 여름철에 수확한 갈조류의 경우 전체 건조중량의 16-34%가 알긴산으로 이루어져 있다. 알긴산은 전체 소비량의 약 30%가 식품첨가물로 사용되고 있고, 식용 가공품으로만 이용되고 있어 부가가치가 낮은 실정이다. 제약업계에서는 정제의 선형제 등으로 사용되며 아직까지 약물로써 부작용이 알려진 바는 없다. 따라서, 알긴산의 저분자화를 통해 의약품 원료로 개발 할 경우 그 가치를 배가시킬 수 있다.
- [5] 산업적으로 이용 가능한 알긴산 올리고당 생산을 위해서는 첫째, 고온고압 혹은 방사선으로 연화시킨 후 분리하는 방법과 둘째, 산과 알칼리 처리를 이용한 제조방법, 셋째, 알긴산 분해효소를 이용한 효소적 제조방법이 있다. 알긴산 분해효소인 알지네이트 라이아제(alginate lyase)는 알긴산의 b-1,4-글리코시드 결합을 분해하여 4,5-불포화 비환원성 말단을 갖는 산물을 생산한다. 최근에는 효소분해를 통해 생산한 알긴산 올리고당의 기능성이 우수함이 보고됨에 따라 효소적 제조에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.
- [6] 알긴산 올리고당은 다기능성 소재로서 HepG2 세포에 알긴산 올리고당(3 mg/ml)을 처리하면 LDL-콜레스테롤이 LDLR(lipoprotein receptor)를 통해 흡수가 촉진되고 (Yang *et al.*, 2015), 난백알부민(ovalbumin)으로 천식을 유도한 동물모델에서 면역세포와 IgE를 감소시켜 알긴산 올리고당의 천식 억제 효과가 보고되었다(Bang *et al.*, 2015). 최근에는 2-DE 방법을 이용하여 글루론산

올리고당의 항염증 기능을 규명하고자 하였으며, 단백질체 분석 결과 NF- $\kappa$ B 시그널을 통해 항산화, 전염증성(pro-inflammatory) 및 항-염증 기능이 확인된 바 있다 (Xu Xu *et al.* 2015). 크롬(chromium)이 복합된 알긴산 올리고당은 근육세포(C2C12 skeletal muscle cells)에서 AMPK 인산화를 촉진하며 인슐린 감작 효과가 있음이 보고되었으며, 기능성 소재로서 알긴산 올리고당의 약물동태학(pharmacokinetics)을 관찰하기 위하여 2008년 Nishikawa 연구진이 5주령 쥐에 알긴산 올리고당을 경구투여 후 시간 경과에 따른 혈액 및 소변에서의 알긴산 올리고당을 검출한 결과, 혈장에서는 경구투여 2시간 까지 검출되고, 소변에서는 6시간까지도 일정하게 검출되었다. 그 결과 알긴산 올리고당이 장에서 흡수된 후 혈액순환을 통해 소변으로 배출됨을 확인하였다(Nishikawa T *et al.*, 2008). 따라서 위와 같은 기능성을 토대로 알긴산 올리고당은 에르고제닉 에이드(ergogenic aid)용 소재로서 이용가치가 우수하다.

- [7] 스포츠에서 경기력 향상을 위하여 선수들은 경기력 향상 보조물인 에르고제닉 에이드(ergogenic aid)를 섭취한다. 현재 사용되거나 알려져있는 영양학적 에르고제닉 에이드는 주로 비타민, 카르니틴, 카페인, 항산화제 등과 한약재 중 홍삼, 동충하초, 가시오가피, 매실 등의 성분으로 구성되어 있다. 영양학적 보조제인 에르고제닉 에이드는 선수의 경기력 측면에 도움을 줄 수 있음에도 불구하고 오남용으로 인해 다양한 부작용이 발생하며 그에 따른 성분들의 상당 부분이 금지 약물로 지정되어 있어 트레이닝 현장에서 적용하기 어려운 문제가 있다.
- [8] 일반적으로 에르고제닉 에이드는 탈수 방지, 에너지 공급 보충, 에너지 대사나 체내 노폐물 제거와 관련된 생리작용을 조절해주는 기능을 가진다. 카페인의 경우 세계적으로 널리 이용되는 약물 중 하나로 커피, 홍차, 등에 함유되어 있어 섭취 시 지방대사에 관여하고, 인체내에서 cAMP 분해효소인 포스포디에스테라아제(phosphodiesterase)의 활성을 억제시켜 지방세포 내 cAMP의 농도를 증가시킴에 따라 AMPK 단백질의 인산화를 통해 저장지방을 분해한다. 그 결과 운동 중 혈중 유리지방산의 동원을 증가시켜 간과 근육의 글라이코겐 손실을 억제하는 효과가 있다. 하지만 카페인의 경우 중추신경자극제로 작용하므로 민감한 사람에게는 두통 불안, 신경과민 등을 유발할 수 있으며, 이노작용으로 인해 고온에서 장시간 운동 시 체내탈수증을 유발하는 문제점이 발생한다.
- [9] 골다공증 발생의 중요한 원인 요소 중 하나는 노령이다. 골의 재형성은 조골세포의 골 생성과 파골세포의 골 흡수 균형에 의해 이루어진다. 연령 증가에 따라 골 생성에 비해 골감소가 증가하고, 이에 따른 지속적인 골 감소는 골다공증을 유발하게 된다. 그러나 골다공증에 대한 약물의 효능을 검증하고자 하는 대부분의 연구에서는 건강하고 젊은 실험동물을 사용하고 있으며, 원인요소를 감안하는 노령의 실험동물을 사용한 연구는 매우 드물고, 실험적 연구결과와 실제 임상에서 나타날 수 있는 효능 사이에 차이가 있을 수 있다.

- [10] 본 연구에서는 실제 골다공증의 발병 연령이 노령인 점을 감안하여 실험동물을 출생 후 17개월된 노령 쥐를 사용함으로써 실험적 개선을 시도하였다.
- [11] 폐경 후 여성의 에스트로겐 레벨은 감소하고, 이에 따라 파골세포의 활성이 증가되며 조골세포의 활성은 증가되지 않는다. 최근 항골다공증(anti-osteoporotic)의 주요 타겟 중 하나인 ERRa(estrogen-related receptor)은 조골세포의 분화를 상승시켜 골다공증 치료제로 사용된다. ERR은 에스트로겐/엔드로젠 연관 질환에서 주요 역할을 한다. Laflamme 연구진이 2005년 성인여성을 대상으로한 다형성과 BMD의 연관성에 관한 실험에서 ERRa의 발현이 높은 BMD의 발현으로 연관된다고 주장하였다. Liu 연구진은 2003년 ERRa의 발현이 자궁의 에스트로겐을 상향-조절시키는 기능을 확인하였으며, 골에서의 ERRa의 기능은 성숙된 조골세포로의 분화와 증식을 상승시키는 리셉터로 작용한다고 보고된 바 있다(Stein, R.A. *et al.*, 2008. Bianco, S. *et al.*, 2009). 이 때 ERRa의 조절자로 PGC-1a이 작용하게 된다. PGC-1a은 전사인자인 ERRa의 활성화 시켜 핵 내 DNA 코딩된 미토콘드리아 단백질의 발현을 증가시킨다. 이들 단백질들은 mtDNA의 복제와 발현을 증가시켜 미토콘드리아성 바이오제네시스를 상승시키는 역할을 한다(Lloye M. Dillon. *et al.*, 2012).
- [12] 장내 생태계는 출생과 동시에 미생물이 서식하기 시작하여 유익균과 유해균이 균형을 유지하며 장내 균총을 형성하고 인간과 공생하며 상호작용을 통해 인간의 건강에 직간접으로 영향을 미친다. Rhee SH 연구진에 따르면 내분비 세포는 장내 미생물 군 총의 균형에 따라 영향을 받아 호르몬 방출을 통하여 숙주의 면역세포와 신경세포에 영향을 미친다고 보고하였다. 특히, 노화가 진행됨에 따라 장내 균총의 불균형이 야기되고 이때 장내 미생물은 골 관련 치주염, 관절염, 골다공증을 야기한다(Schogor ALB. *et al.*, 2014). Klara sjogren 연구진에 따르면 장내 미생물이 마우스의 골량을 조절하며, 이는 파골세포가 조절하는 골 흡수에 영향을 줄 수 있다고 보고하였다. 특히 후벽균(Firmicutes)은 노년기에 접어들면서 급격히 증가하게 되나 낮은 비율에서 항생제와 높은 상호작용을 보인다(Zapata *et al.*, 2015). 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*)의 경우 영유아들에게 발생하는 설사와 습진, 알레르기를 예방하지만, 노년기에는 염증을 유발하거나 심혈관 질환을 증가시킬 수 있다고 보고되었다(Forsythe, P. *et al.*, 2007, Van Niel. *et al.*, 2002, Mikelsaar *et al.*, 2010). 건강하게 장수하려면 노년기에 프리보텔라(Prevotella) 종 등의 유익균이 많아야 하는 반면, 후벽균 및 락토바실러스 루테리 등의 균이 적은 상태로 장내 균총을 유지시켜야 한다.
- [13]
- [14] 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.

- [15]
- [16] [선행기술문헌]
- [17] [비특허문헌]
- [18] (비특허문헌 1) Yang JH *et al.* Alginate oligosaccharide enhances LDL uptake via regulation of LDLR and PCSK9 expression. *J Nutr Biochem.* (2015) 1393-400
- [19] (비특허문헌 2) MA Bang *et al.* Bacillus subtilis KCTC 11782BP-Produced Alginate Oligosaccharide Effectively Suppresses Asthma via T-Helper Cell Type 2-Related Cytokines. *Plos One*(2015) e0130510
- [20] (비특허문헌 3) X Xu *et al.* Unsaturated guluronate oligosaccharide enhances the antibacterial activities of macrophages. *FASEB* (2014). 2645-2654
- [21] (비특허문헌 4) C Hao *et al.* Insulin Sensitizing Effects of Oligomannuronate-Chromium (III) Complexes in C2C12 Skeletal Muscle Cells. *Plos One* (2011). e24598
- [22] (비특허문헌 5) Nishikawa T *et al.* Detection and pharmacokinetics of alginate oligosaccharides in mouse plasma and urine after oral administration by a liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method. *Biosci Biotechnol Biochem.* (2008) 2184-90
- [23] (비특허문헌 6) 강윤석 등. "지구력 트레이닝이 T2DM 흰쥐 심장근 내 p-AMPK, PGC-1 $\alpha$  및 irisin 발현에 미치는 영향." *한국체육과학회지* 24.2 (2015): 1049-1060.
- [24] (비특허문헌 7) Wrann, Christiane D. *et al.* "Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1 $\alpha$ /FNDC5 pathway." *Cell metabolism* 18.5 (2013): 649-659.
- [25] (비특허문헌 8) Bonnelye, E. *et al.* The orphan nuclear estrogen receptor-related receptor  $\alpha$ (ERR $\alpha$ ) is expressed throughout osteoblast differentiation and regulates bone formation in vitro. *J. Cell Biol.* 153 (2001) 971-983.
- [26] (비특허문헌 9) Laflamme, N. *et al.* A frequent regulatory variant of the Estrogen-Related Receptor  $\alpha$  gene associated with BMD in French Canadian premenopausal women. *J. Bone Miner. Res.* 20 (2005) 938-944.
- [27] (비특허문헌 10) Liu, D. *et al.* Estrogen stimulates estrogen-related receptor( $\alpha$ ) gene expression through conserved hormone response elements. *Endocrinology* 144 (2003) 4894-4904.
- [28] (비특허문헌 11) Stein, R.A. *et al.* Estrogen-Related Receptor  $\alpha$  is critical for the growth of estrogen receptor negative breast cancer. *Cancer Res.* 68 (2008) 8805-8812.
- [29] (비특허문헌 12) Bianco, S. *et al.* Modulating ERR $\alpha$  activity inhibits cell proliferation *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 23286-23292.
- [30] (비특허문헌 13) Lloye M. Dillon. *et al.* The Role of PGC-1 Coactivators in Aging Skeletal Muscle and Heart. *IUBMB Life.* 64(3) (2012) 231-241.
- [31] (비특허문헌 14) Rhee SH *et al.* Principles and clinical implications of the

- brain-gut-enteric microbiota axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 6(5) (2009) 306-14.
- [32] (비특허문헌 15) Schogor ALB *et al.* Ruminal Prevotella spp. May Play an Important Role in the Conversion of Plant Lignans into Human Health Beneficial Antioxidants. *PLoS ONE* 9(4) (2014).
- [33] (비특허문헌 16) Sjogren, Klara, *et al.* The gut microbiota regulates bone mass in mice. *JMBR* 27.6 (2012) 1357-1367.
- [34] (비특허문헌 17) Zapata *et al.* The Microbiota and Microbiome in Aging: Potential Implications in Health and Age-Related Diseases. *JAGS* 63.4 (2015) 776-781.
- [35] (비특허문헌 18) Van Niel *et al.* Lactobacillus therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. *Pediatrics* 109(4) (2002) 678-684.
- [36] (비특허문헌 19) Forsythe, P. *et al.* Oral treatment with live Lactobacillus reuteri inhibits the allergic airway response in mice. *AJRCCM* 175(6) (2007) 561-569.
- [37] (비특허문헌 20) Mikelsaar, Marika, *et al.* Intestinal Lactobacillus sp. is associated with some cellular and metabolic characteristics of blood in elderly people. *Anaerobe* 16(3) (2010) 240-246.

[38]

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [39] 본 발명자는 알긴산 분해효소의 폴리만뉴론산 분해에 의해 생성된 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당(OligoM)의 효용성을 조사하고자 노력하였다. 그 결과, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당이 단시간에 운동 수행 능력을 개선시키고, 골다공증을 개선시키는 효과를 가짐을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [40] 따라서, 본 발명의 목적은 운동 수행 능력 개선용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [41] 본 발명의 다른 목적은 골다공증 개선, 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [42]
- [43] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

[44]

### 과제 해결 수단

- [45] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 유효성분으로 포함하는 운동 수행 능력 개선용 조성물을 제공한다.
- [46]
- [47] 본 발명자는 알긴산 분해효소의 폴리만뉴론산 분해에 의해 생성된 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당(OligoM)의 효용성을 조사하고자 노력하였다. 그 결과, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당이

단시간에 운동 수행 능력을 개선시키고, 골다공증을 개선시키는 효과를 가짐을 확인하였다.

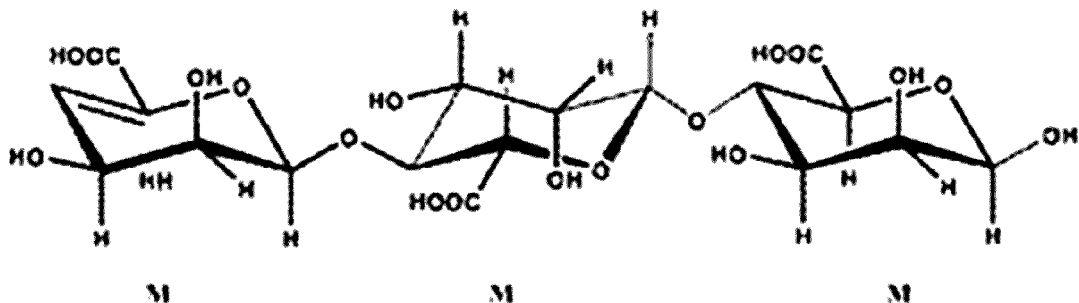
[48]

[49] 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 알긴산 분해효소의 분해에 의해 생성된 폴리만뉴론산, 폴리글루루로닉산, 또는 폴리만뉴론산 및 폴리글루루로닉산이 혼합된 형태의 알긴산 올리고당이다.

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

[51] [구조식 1]

[52]



[53] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 1 내지 20개의 당으로 구성된다.

[54] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 1 내지 18개, 1 내지 15개, 1 내지 13개, 1 내지 10개 또는 1 내지 7개의 당으로 구성된다.

[55] 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 1 당인 경우에 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 3).

[56] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 100-5000 Da 크기이다.

[57] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 100-4500 Da, 100-4000 Da, 100-3500 Da 또는 100-3000 Da이다.

[58]

[59] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 폴리만뉴론산(poly-mannuronate) 기질로 하여 알긴산 라이아제(alginate lyase)에 의해 분해되어 제조된다.

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

[61] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 알긴산 라이아제는 전복 장내 균주 유래의 ALyDW11이다.

- [62] 상기 AlyDW11은 서열목록 제2서열의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [63] 상기 AlyDW11은 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진다.
- [64] 본 발명의 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 최소 2종의 당으로 구성된다.
- [65] 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 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.
- [66] 본 발명의 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 비환원성 말단의 포화형 만뉴론산 올리고당과 비교하여 물 분자가 제거되어 물 분자의 질량값인 18 정도의 작은 질량값을 갖는다(도 3).
- [67] 본 발명의 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 만뉴론산 및 글루론산으로 이루어져 있다.
- [68] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당의 만뉴론산:글루론산의 비율은 1.2-5.0:1이다. 본 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.
- [69] 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).
- [70] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 본 발명의 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 비환원성 말단의 공액이중결합형 만뉴론산 올리고당이다.
- [71] 본 명세서에서 용어 "비환원성"은 올리고당의 구조에 있어서, 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.
- [72] 본 명세서에서 용어 "공액이중결합형"은 단일결합과 이중결합이 반복되어 형성된 구조를 의미한다. 비환원성 만뉴론산 올리고당의 경우 효소분해로 인하여 생성된 비환원성 말단이 이중결합 하나만 있는 형태이다.
- [73] 상기 폴리만뉴론 알긴산의 분해는 산-알칼리 가수분해, 방사선 조사, 고온고압, 효소에 의해 실시할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [74] 본 명세서의 용어 "비환원성 말단의 공액이중결합형 만뉴론산 올리고당"은 폴리 만뉴론산을 알긴산 분해효소 처리하여 제조된 것으로, "비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당"과 동일한 의미를 갖는다.
- [75] 본 명세서에서 용어 "운동 수행"은 근육 수축에 의존적인 신체적 특성을 의미한다. 예컨대, 상기 운동 수행은 달리기 속도 및 지구력, 근력 및 지구력,

수영 속도 및 지구력, 최대 근력, 들어올리는 힘 및 지구력, 당기는 힘 및 지구력, 던지는 힘 및 지구력 등이 포함되며 이에 한정되지 않는다.

[76] 본 명세서에서 용어 "운동 수행 능력"은 운동 수행 시간 동안 목적하는 결과를 달성할 수 있도록 유지되는 강도, 속도, 체력, 힘, 정밀도 또는 대사출력 등에 대한 대상의 기량을 의미한다.

[77] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 본 발명의 운동 수행 능력 개선은 운동 힘의 증가, 운동 속도의 증가 및/또는 체력의 증가이다.

[78] 본 발명의 운동 수행 능력 개선용 조성물은 무산소운동(anaerobic exercise) 또는 유산소운동(aerobic exercise)에 대한 운동 수행 능력 개선용 조성물이다.

[79] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 운동은 무산소운동이다.

[80] 본 명세서에서 용어 "무산소운동"은 운동에 필요한 에너지를 산소 없이 생성하는 운동으로 근육에 축적된 글리코젠이 분해되어 에너지로 전환되는 운동을 의미한다. 무산소운동은 순간적인 에너지를 낼 수 있는 힘을 만들며, 근육을 강화시킨다.

[81] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 섭취 전/후와 비교하여 5 내지 20% 향상된 운동 속도를 나타낸다.

[82] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 조성물은 섭취 전/후와 비교하여 5 내지 30% 향상된 무산소성 파워를 나타낸다.

[83] 본 명세서에서 용어 "무산소성 파워"는 유산소성 에너지 공급에 의존하지 않고 수행할 수 있는 단위 시간당 최대 작업량을 의미한다.

[84] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 운동은 유산소운동이다.

[85]

[86] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 유효성분으로 포함하는 골다공증 개선, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[87]

[88] 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 앞서 기재한 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당과 동일한 구조적 특징을 가지기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[89]

[90] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 폴리만뉴론산(poly-mannuronate) 기질로 하여 알긴산 라이아제(alginate lyase)에 의해 분해되어 제조된다.

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

[92] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 알긴산 라이아제는 해양생물 장내균주

- 유래 알긴산 분해 효소이다.
- [93] 상기 알긴산 라이아제는 서열목록 제4서열 또는 제6서열의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [94] 상기 알긴산 라이아제는 서열목록 제3서열 또는 제5서열의 뉴클레오타이드 서열에 의하여 인코딩 될 수 있다..
- [95]
- [96] 본 발명의 조성물의 유효성분인 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 골다공증 개선, 예방 또는 치료 효과를 갖는다.
- [97] 상기 골다공증은 뼈의 성분인 칼슘이 급격히 빠져나와 정상적인 뼈에 비하여 골밀도가 낮아져 "구멍이 많이 난 뼈"를 말하며, 폐경, 노화, 뼈에 해로운 약물의 사용 등의 여러 가지 원인에 의하여 뼈가 많이 손실되고 약해져 경미한 충격에도 쉽게 골절이 일어나는 질환이다.
- [98] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 골다공증은 노인성 골다공증이다.
- [99] 본 명세서에서 용어 '노인성 골다공증'은 노화(aging)에 의한 골다공증을 의미한다.
- [100] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 상기 조성물은 골밀도를 증가시키고 장내 균총을 개선시키는 효과를 갖는다.
- [101] 본 발명의 조성물은 골다공증의 개선, 예방 또는 치료용 조성물은 약제학적 조성물로 제조될 수 있다.
- [102] 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 충분한 양을 의미한다.
- [103] 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, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 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. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [104] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여 방식으로 적용된다.

- [105] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 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 ug/kg - 100 mg/kg 범위 내이다.
- [106] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 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 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [107] 본 명세서에서 용어 "유효성분으로 포함하는"이란 상술한 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당의 효능 또는 활성을 달성하는 데 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.
- [108]
- [109] 본 발명의 또다른 양태에 따르면, 본 발명은 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 유효성분으로 포함하는 운동수행능력 개선용 또는 골다공증 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [110] 본 발명의 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 유효성분 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 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 사이클로덱스트린 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 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.
- [111]
- [112] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 유효성분으로 포함하는 운동수행능력 개선용 또는 골다공증 개선용 기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [113]

- [114] 본 발명의 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 유효성분 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 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, 타우마린, 스테비아 추출물 등) 및 합성 향미제(예컨대, 사카린, 아스파르탐 등)를 이용할 수 있다.
- [115]
- [116] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 객체에 투여하는 단계를 포함하는 운동 수행 능력을 개선시키는 방법을 제공한다.
- [117] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 경구투여한 임상 실험 결과, 객체의 운동 속도 및 파워를 증가시키는 효과를 나타내므로, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 객체에게 투여하여 운동 수행 능력을 개선시킬 수 있다.
- [118]
- [119] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 객체에 투여하는 단계를 포함하는 골다공증의 개선, 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [120] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 경구투여한 전임상 실험 결과, 객체의 골밀도 증가 및 장내 균총의 불균형 개선 효과를 나타내므로, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 객체에게 투여하여 골다공증을 치료할 수 있다.
- [121]
- [122] 본 명세서에서 사용된 용어 "투여" 또는 "투여하다"는 본 발명의 올리고당을 포함하는 조성물의 운동능력 또는 골다공증의 개선, 예방 또는 치료를 위한 유효량을 상기 올리고당을 필요로 하는 객체(대상체)에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다.
- [123] 조성물의 상기 "치료를 위한 유효량"은 조성물을 투여하고자 하는 대상체에게 치료적 또는 예방적 효과를 제공하기에 충분한 조성물의 함량을 의미하며, 따라서 "예방적 유효량"을 포함하는 의미이다. 또한, 본 명세서에서 사용된 용어, "대상체"는 제한 없이 인간, 마우스, 랫트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함한다. 구체적으로는 본 발명의

대상체는 인간이다.

- [124] 상기 운동 수행 능력을 개선시키는 방법, 및 골다공증의 개선, 예방 또는 치료 방법은 앞서 기재한 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 또는 이를 포함하는 조성물의 유효량을 객체에 투여하여 치료하는 방법으로, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[125]

### 발명의 효과

- [126] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [127] (a) 본 발명은 운동 수행 능력 개선용 및 골다공증 개선용 조성물을 제공한다.
- [128] (b) 본 발명의 조성물은 신속한 운동 수행 능력 및 자연노화에 따른 골다공증에 대한 개선 효과를 갖는다.
- [129] (c) 본 발명의 조성물은 활성 물질의 제조가 용이하고 경제적인 이점을 갖는다.
- [130]

### 도면의 간단한 설명

- [131] 도 1은 알긴산 분해효소를 이용하여 만뉴론산(poly mannuronate, poly M, CMOS)에 대한 디폴리머리제이션 결과를 상업용 알긴산 올리고당(marker)을 표준물질로 사용하여 TLC(Thin Layer Chromatography)로 보여준다.
- [132] 도 2는 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당(CMOS)의 질량분석 결과를 나타낸다.
- [133] 도 3은 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당(CMOS)의 이중결합 비율을 나타낸다.
- [134] 도 4는 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당(CMOS)의 당 구성을 원편광 이색성 분광 측정법(CD, circular dichorism) 방법으로 확인한 결과를 나타낸다.
- [135] 도 5는 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 처리에 의한 3T3-L1 지방분화전 세포에서 AMPK-ACC 인산화 증진 효과를 나타낸다.
- [136] 도 6은 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당(OligoM) 처리에 따른 PGC-1 $\alpha$ 의 mRNA 발현양을 나타낸다.
- [137] 도 7은 비만을 유도한 랫트 근육 단백질체 분석 결과 TCA 회로 관련 단백질의 상향 조절(up-regulation)을 나타낸다.
- [138] 도 8은 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당(OligoM)의 운동수행능력 향상 실험 설계를 나타낸다.
- [139] 도 9는 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당(OligoM) 급이가 성인남성의 순간운동 스피드 향상에 미치는 결과를 나타낸다.
- [140] 도 10은 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당(OligoM) 급이가 성인남성의 무산소성 파워 향상에 미치는 결과를 나타낸다.

- [141] 도 11은 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당(OligoM) 급이가 마우스 운동량 개선에 미치는 영향을 나타낸 결과이다.
- [142] 도 12는 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당(OligoM) 처리에 따른 PGC-1 $\alpha$ 의 mRNA 발현양을 나타낸다.
- [143] 도 13은 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 급이가 대퇴골의 골밀도 향상에 미치는 영향을 나타낸다. 멸균 음용수를 급여한 그룹(SDW), 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 음용수로 급여한 그룹(OligoM), 멸균 음용수 급이와 운동을 병행한 그룹(SDW\_Exer) 및 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 음용수 급이와 운동을 병행한 그룹(OligoM\_Exer)별 골밀도를 나타낸다.
- [144] 도 14는 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 급이가 정강이 뼈의 골밀도 향상에 미치는 영향을 나타낸다. 멸균음용수를 급여한 그룹(SDW), 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 음용수로 급여한 그룹(OligoM), 멸균음용수 급이와 운동을 병행한 그룹(SDW\_Exer) 및 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 음용수 급이와 운동을 병행한 그룹(OligoM\_Exer)별 골밀도를 나타낸다.
- [145] 도 15는 일반 사료 급이에 따른 노령쥐의 대퇴골의 단면 이미지를 나타낸다.
- [146] 도 16은 일반 사료 급이 및 운동에 따른 노령쥐의 대퇴골 단면 이미지를 나타낸다.
- [147] 도 17은 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 음용 섭취와 운동에 따른 노령쥐의 대퇴골의 단면 이미지를 나타낸다.
- [148] 도 18은 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당(OligoM) 음용 섭취에 따른 노령 쥐의 장내 균총을 나타낸다.
- [149] 도 19는 멸균수 음용 섭취 1개월령(C1-M)과 17개월령(C17-M)쥐와 실험군인 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 음용 섭취에 따른 1개월령(A1-M) 및 17개월령(A17-M)의 장내균총을 나타낸다.
- [150]

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [151] 본 실시예에서는 0.3% 폴리만뉴론산 수용액에 알긴산 분해효소(서열목록 제2서열, 제4서열 또는 제6서열의 아미노산 서열로 이루어진 알긴산 분해 효소) 첨가 후 45°C에서 24시간 분해하고 TLC(Thin Layer Chromatography)를 이용하여 디폴리머리제이션(depolymerization)을 확인하였고, 알긴산 분해 올리고당 혼합물인 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 확보하였다. 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 혼합물을 한외여과막 시스템(VivaFlow 50, Sartorius)을 이용하여 분자량 3000 Da 이하의 분획물을 확보하였으며, 확보한 분자량 3000 Da 이하의 분획물은 동결건조를 통해 분말형태로 시험전까지 -20°C에 보관하였다.

- [152] 도 1에 제시한 바와 같이, 알긴산 분해효소를 이용하여 생산한 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 TLC를 통해 1-7당(DP 1-7)으로 구성되어 있음을 확인하였으며, TLC의 스팟(spot)의 세기(intensity)를 비교하였을 때, 상대적으로 2-5당이 높은 비율로 존재함을 확인하였다.
- [153]
- [154] 실시예 2: 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 구성 및 구조적 특징 분석
- [155] 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, 일괄성 있는 CD 시그널을 얻기 위하여 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 1 mg/ml 농도로 사용하였다. 만뉴론산:글루론산 구성비를 알아보기 위하여 피크(peak, 200 nm 흡광도 값) 및 트로프(trough, 215 nm 흡광도 값)를 측정하여 만뉴론산과 글루론산의 비율을 계산하였으며, 계산식은 다음과 같다:
- [156] (1)  $\text{피크/트로프} < 1$ , 만뉴론산/글루론산 =  $2.0(\text{피크/트로프})$
- [157] (2)  $\text{피크/트로프} > 1$ , 만뉴론산/글루론산 =  $27(\text{피크/트로프}) + 40$
- [158]
- [159] 도 2에서 알 수 있듯이, 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 만뉴론산/글루론산 비율이 2.59(피크=3.82, 트로프=3.20)이며, 비환원성 말단의 공액이중결합형 형성으로 인하여 215 nm의 흡광도값 측정이 방해됨을 확인할 수 있었다.
- [160] 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당의 구성당을 분석하기 위하여, 준비된 시료는 이온 교환 수지 컬럼(Hitrap DEAE Sepharose FF, GE Healthcare)을 이용하여 정제한 후 동결건조를 실시하였다. 정제된 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 물에 용해 후 UPLC/MS 시스템에 주입함으로써 구성당 분석을 수행하였다.
- [161] 초고성능 액체 크로마토그래피(Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC, Waters) 설정은 ACQUITY UPLC BEH C18(1.7  $\mu\text{m}$  1.0 \* 100 mm, Waters) 컬럼을 이용하였으며 0.4 ml/분에서 12분 동안 용매 A(15 mM Amylamin, 25 mM HFIP)와 용매 B(15 mM Amylamin, 25 mM HFIP in Acetonitrile)의 선형 구배를 조절하였다. C18-UPLC로 분리되어 나온 용리액은 질량분석기 (Quadrupole-Time of Flight, Q-TOF, Waters)로 분석하였다. Q-TOF는 ESI 네거티브 모드에서 분석하였으며, 캐필러리와 샘플링콘(sampling cone)의 전압은 각각 3 kV와 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/ $\mu\text{l}$ 의 로이신

엔케팔린(leucine enkephalin, ESI 네거티브 모드에서 554.2619 Da)을 락스스레이(lack spray)로 사용하였다.

- [162] 도 3에서 알 수 있듯이, 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당의 질량분석 결과 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 1-7당으로 구성되어 있으며, 특히 기보고된 만뉴론산 올리고당 질량값 보다 18이 적은 피크들이 관찰됨에 따라 물 분자가 제거되어 비환원성 말단의 공액이중결합형이 형성된 올리고당이 형성되며 비공액이중결합형 만뉴론산 올리고당(nonconjugated carbonyl mannuronic acid oligosaccharide, NCMOS)보다 우세하게 존재함을 알 수 있었다. 비환원성 말단의 공액이중결합형 만뉴론산 올리고당(CMOS)과 비공액이중결합형 만뉴론산 올리고당(NCMOS)의 비율을 나타낸 결과는 도 4에 제시되었다.
- [163] 도 4와 같이, 비환원성 말단의 공액이중결합형 만뉴론산 올리고당은 비공액이중결합형 만뉴론산 올리고당 보다 평균 2배 이상의 비환원성 말단의 공액이중결합형 만뉴론산 올리고당의 단당들이 존재함을 확인하였다. 비공액이중결합형 만뉴론산 올리고당 분자량은 다음과 같다: 1당 (m/z 175), 2당 (m/z 369), 3당 (m/z 545), 4당 (m/z 722), 5당 (m/z 898) 6당 (m/z 1074), 7당 (m/z 1250).
- [164] 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 'OligoM'이라고 명명하였다.
- [165]
- [166] **실시예 3: 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당의 AMPK-ACC 인산화 촉진**
- [167] 에너지 대사에 중요한 단백질인 AMPK-ACC 인산화 촉진 여부를 확인하기 위하여 3T3-L1 지방 분화 전 세포에 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 0.2 mg/mL 농도로 처리 후 단백질을 추출하여 웨스턴 블롯을 실시하여 단백질 발현 패턴을 처리 시간별로 확인하였다. 도 5에 제시한 바와 같이, AMPK, phospho-AMPKα(Thr172), ACC, phospho-ACC(Ser79) 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 실시한 결과, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 처리 시간 의존적으로 AMPK-ACC 인산화가 촉진됨을 확인하였다. 따라서, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 에너지 대사에 중요한 단백질인 AMPK 인산화를 통해 활성화하여 에너지 대사를 촉진시킬 것으로 확인되었다.
- [168] PGC-1α(peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 alpha)은 AMPK 인산화를 통해 활성화되는 공활성화 인자로써 포도당 신생합성을 촉진하는 전사인자를 활성화 시킨다. 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당이 PGC-1α의 상위조절자인 AMPK의 인산화를 촉진이 확인됨에 따라 PGC-1α의 발현을 mRNA 수준에서 확인해 보고자 하였다.
- [169] MCF-7 세포는 10%의 우태아혈청, 페니실린-스트렙토마이신 (100 U/ml) 및 1%

소 인슐린이 포함된 DMEM/F12 배지에서 37°C 온도에 배양하여 PGC-1a 발현양을 측정하기 위한 세포모델로 사용하였다. MCF-7세포에 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당(OligoM)을 0.1 mg/mL 농도로 48시간 처리 후 GeneJET RNA 정제 키트 방법에 따라 RNA 추출 후 cDNA를 합성하여 PGC-1a의 발현양을 실-시간 PCR로 확인하였다. 도 6에 제시한 바와 같이, 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 처리 시 PGC-1a의 mRNA 발현을 증가하였다.

[170]

[171] 실시예 4: 단백질체 분석기술을 활용한 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당의 TCA 회로 활성화 검증

[172] 비만을 유도한 랫트에서 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당(OligoM) 투여에 따른 에너지 대사 활성화를 확인하기 위하여 근육 단백질체 분석을 실시하였다. 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 체중 1 kg 당 250 mg 용량으로 2일에 1번 9주 동안 복강투여를 실시한 랫트의 뒷다리 근육을 채취한 후 lysis buffer (0 mM Tris, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10% Triton X-100 and 10% NP40, protease inhibitor and phosphatase inhibitor in H<sub>2</sub>O, pH 7.5)를 넣고 세포질 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 DC protein 정량법을 이용하여 동량으로 정량 후 Tube-Gel digestion 방법을 이용하여 trypsin digestion을 수행 후 펩타이드 혼합물은 A nano-ACQUITY Ultra Performance LC Chromatograph™ equipped with a Synapt™ HDMS System (Waters Corp., Milford, MA, USA) 시스템을 이용하여 단백질체 분석을 수행하였다.

[173] 단백질체 분석결과에 대하여 Ingenuity Pathway Analysis (IPA version 9.0; Ingenuity Systems Inc., Redwood City, CA, USA) 실시한 결과 도 7에 제시한 바와 같이 TCA cycle 관련 시트르산 합성효소(citrate synthase, 1.33배), 아코니타아제(aconitase, 1.39배), 옥소글루타르산(oxoglutarate, 1.47배), 숙신산 탈수소효소(succinate dehydrogenase complex, 1.35 배), 말산 탈수소효소(malate dehydrogenase, 1.47배)가 증가함을 확인하였다. 따라서 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 에너지 대사에 필요한 NADH를 생산하는 TCA 회로 효소의 발현을 증가하는 것을 확인하였다.

[174]

[175] 실시예 5: 운동수행능력 향상 실험 설계 및 방법

[176] 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당(OligoM)의 운동수행 향상능력에 대한 평가를 실시하였다. 본 실험의 대상은 의학적으로 이상 소견이 없고 식이 통제가 가능한 성인 남성 4명을 대상으로 하였다. 실험기간은 운동 전 단시간(30분)의 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 섭취가 운동선수의 운동수행능력에 미치는 영향을 조사하였다. 30분 동안 간격을 두고 세차례 원게이트 무산소성 능력 검사(Wingate Anaerobic Cycle Test; WACT)를 실시하여 운동수행능력(평균파워)을 측정하였다. 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당의 섭취는 다음과 같은 방법을 통하여 두차례에 걸쳐 1인당

총 5 g을 섭취하였다(도 8). 첫 번째 테스트와 두 번째 테스트 사이 1인당 2.5 g, 두 번째 테스트와 세 번째 테스트 사이 1인당 2.5 g을 경구투여 하였고 본 실험을 위하여 실험참가자는 실험기간 중 합숙하며 동일한 식사를 하였다(도 8).

[177]

[178]     **실시예 6: 무산소성 운동수행능력 측정 방법**

[179]     무산소성 운동수행능력의 판단 기준으로 평균 파워를 측정하기 위해 자전거 에르고 미터를 이용한 간헐적 부하운동을 탈진(all-out)될 때까지 반복적으로 지속시켰다. 무산소성 파워 측정 (Wingate test)의 컴퓨터 모니터 상에서 페달링 운동속도가 300 rpm 이하로 5초 이상 저하될 경우 운동을 중지시키고, 이 때까지의 시간을 초단위로 계측해서 운동지속시간으로 결정하였다. 30분 동안 휴식(1세트)한 다음 같은 방법으로 반복적인 운동을 하였다. 휴식의 형태는 자전거 에르고미터의 안장에 앉아 정적인 휴식을 하였다.

[180]

도 9에 나타난 바와 같이 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당(OligoM) 경구투여 이후 실시된 두차례의 무산소성 능력테스트에서 두 번 모두 8.7% 및 13.7%의 스피드 증가가 관찰되었으며, 도 10에 나타난 바와 같이 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 경구투여 이후의 무산소성 평균파워는 각각 9.2% 및 16.8% 증가하는 것으로 나타났다.

[181]

[182]     **실시예 7: 운동성 향상 실험 설계 및 트레드밀 운동량 측정 방법**

[183]     비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당의 운동성 향상 효능에 대한 평가를 실시하였다. 본 실험에서는 17개월령 마우스 12마리(멸균 증류수 음용군(SDW): 6마리, OligoM 음용군(OligoM): 6마리)를 대상으로 하였다. 실험기간은 총 18주로 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 섭취가 노령 쥐의 운동능력 개선을 트레드밀 운동량 측정을 통하여 조사하였다. 실험 실시에 앞서 환경 적응을 위하여 모든 쥐를 1주일 동안 실험 케이지에 순응시켰다. 대조집단인 멸균 증류수 음용군(n=6, SDW)과 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 음용군(n=6, OligoM)으로 구분하여 사육용 케이지에 3마리씩 넣어 사육하였다. 운동그룹의 경우 실험 시작 4주 이후부터 14주간 자유 트레드밀 운동을 실시하였다. 모든 마우스는 멸균사료 및 멸균 음용수를 자유롭게 섭취하였다. 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당의 섭취는 매주 200 ppm 농도의 음용수를 자유 섭취하도록 하였다.

[184]

비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 자유섭취의 이후, 소형 동물용 트레드밀을 이용하여 자유롭게 운동을 할 수 있도록 하였다. 각 그룹별 트레드밀 회전수를 주별 측정하여, 개체별 총 운동 거리를 계산하였다(표 1).

[185] [표1]

| weeks | SDW      | OligoM   |
|-------|----------|----------|
| 1     | 1.888982 | 2.641536 |
| 2     | 1.667214 | 3.815896 |
| 3     | 2.767784 | 4.39533  |
| 4     | 3.764986 | 4.341866 |
| 5     | 2.848022 | 3.777922 |
| 6     | 3.640014 | 3.735512 |
| 7     | 3.250758 | 4.327129 |
| 8     | 2.385186 | 3.838127 |
| 9     | 2.49025  | 3.987842 |
| 10    | 2.900418 | 4.370315 |
| 11    | 2.582273 | 4.456916 |
| 12    | 2.951631 | 5.369557 |
| 13    | 2.695062 | 5.608134 |
| 14    | 2.795259 | 6.029962 |

[186]

[187] 도 11에 나타난 바와 같이 운동 18주 경과 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 식이한 OligoM 그룹에서 평균 6.0299 km/day, 멸균 증류수 음용그룹에서 평균 2.6415 km/day 운동량을 나타냈다. 따라서 OligoM 그룹에서 멸균 증류수 음용그룹 대비 일 평균 운동량이 2.28배 증가함을 확인 하였다.

[188] 따라서 상기 결과를 토대로 본 발명자들은 본 발명의 운동보충제 조성물이 무산소성 운동수행능력 향상을 위하여 에너지 공급원을 원활하게 공급해주며, 짧은 휴식시간과 높은 에너지를 요구하는 운동 경기에서 운동보충제로 활용 될 수 있는 조성물을 신규하게 발명하였다.

[189]

[190] 실시예 8: PGC-1a의 mRNA 발현 평가

[191] 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당이 PGC-1a의 상위조절자인 AMPK의 인산화를 촉진함이 확인됨에 따라 PGC-1a의 발현을 mRNA 수준에서 확인해 보고자 하였다.

[192] MCF-7 세포는 10%의 우태아혈청, 페니실린-스트렙토마이신 (100 U/ml) 및 1% 소 인슐린이 포함된 DMEM/F12 배지에서 37°C 온도에 배양하여 PGC-1a 발현양을 측정하기 위한 세포모델로 사용하였다. MCF-7세포에 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 (0.1 mg/ml, OligoM)과 에스트라디올 (10 nM, E2)를

48시간 처리 후 GeneJET RNA 정제 키트 방법에 따라 RNA 추출 후 cDNA를 합성하여 PGC-1a의 발현양을 실-시간 PCR으로 확인하였다. 도 12에 제시한 바와 같이, 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 처리 하여 PGC-1a의 mRNA 발현을 확인한 결과 무처리구 대비 64배 발현을 유도하였으며 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당과 에스트라디올을 동시 처리한 경우(E2+OligoM) 128.33배 증가하여 에스트라디올 단독 처리 실험구(E2) 대비 5.8배 발현이 증가하였다. 항골다공증(anti-osteoporotic)의 주요 타겟 중 하나로 ERRa(estrogen-related receptor)은 조골세포의 분화를 상승시켜 골다공증 치료제로 사용된다. PGC-1a은 전사 인자인 ERRa의 활성화 시켜 핵 내 DNA 코딩된 미토콘드리아 단백질의 발현을 증가시킨다. ERRa의 조절자로 작용하는 PGC-1a의 발현이 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당에 의해 증가되는것을 확인하였다.

[193]

[194]     **실시예 9: 골다공증 치료 실험 설계 및 방법**

[195]     비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당의 골다공증 치료 효능에 대한 평가를 실시하였다. 본 실험에서는 1개월령 마우스 12마리[자성, 대조군(1M SDW): 6마리, 실험군(1M OligoM): 6마리), 17개월령 마우스 24마리(자성, 대조군(18M SDW): 6마리, 실험군(18M OligoM): 6마리, 운동대조군(18M SDW\_Exer): 6마리, 운동실험군(18M OligoM Exer): 6마리]를 대상으로 하였다. 실험기간은 총 12주로 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 섭취가 노령 쥐의 골다공증 개선에 미치는 영향을 CT 촬영을 통하여 조사하였다. 실험 실시에 앞서 환경 적응을 위하여 모든 쥐를 1주일 동안 실험 케이지에 순응시켰다. 대조집단인 증류수 음용군(n=18, SDW)과 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 음용군(n=18, OligoM)으로 구분하여 사육용 케이지에 3마리씩 넣어 사육하였다. 운동그룹의 경우 실험 시작 4주 이후부터 8주간 자유 트레드밀 운동을 실시하였다. 모든 마우스는 멸균사료 및 멸균 음용수를 자유롭게 섭취하였다. 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당의 섭취는 매주 200 ppm 농도의 음용수를 자유 섭취하도록 하였다.

[196]

[197]     **실시예 10: 조직형태측정학적 분석 방법**

[198]     골밀도(Bone Mineral density)측정

[199]     비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 자유섭취 이후, 각 개체별 흡입 마취 하여 마이크로 CT의 X선 카메라 장치를 이용하여 용적 당 골량을 측정하였다. 도 14에 나타난 바와 같이 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 식이한 1M OligoM, 18M OligoM 및 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 식이와 운동을 병행한 18M OligoM Exer에서 각각 대퇴골의 골밀도가 증가하였다. 도 7에 나타난 바와 같이, 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 식이한 1M OligoM, 18M OligoM 및 비환원성 말단의

불포화형 만뉴론산 올리고당 식이와 운동을 병행한 18M OligoM Exer에서 각각 정강이의 골밀도가 증가하였다.

- [200] 도 15, 16 및 17에 나타난 바와 같이, 각 개체별 흡입 마취하여 마이크로 CT의 X선 카메라 장치를 이용하여 촬영한 대퇴골의 단면 모습이다. 도 15는 일반 사료 급이에 따른 17개월 노령쥐의 대퇴골 단면 이미지를 나타내며, 도 16은 일반 사료 급이 및 운동에 따른 노령쥐의 대퇴골 단면 이미지이다. 도 17은 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 음용 섭취와 운동에 따른 노령쥐의 대퇴골의 단면 이미지를 나타낸다. 일반 사료 급이에 따른 대퇴골의 단면 이미지 대비 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 음용 섭취와 운동에 따른 대퇴골의 단면이미지가 섬유주(trabecular)의 증가를 나타낸다.

[201]

- [202] 실시예 11: 노령 마우스에서 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 투여 실험실시

- [203] 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 1주 동안 적응 기간 후 무작위로 3 마리씩 대조구와 실험구로 나누어 그룹을 1개월령과 17개월 별 그룹을 선정하였다. 실험구는 공급하는 물에 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 0.2 mg/ml 농도로 공급하였으며, 대조구는 물만 공급하여 10주 동안 실험을 진행하였다. 실험 종료 후 마우스는 해부하여 장내 내용물을 분리하여 200 mg을 취하여 Fast DNA SPIN 키트(for Soil kit)를 이용하여 DNA를 키트에 제시된 방법을 토대로 순수한 DNA를 확보하고, 추출한 DNA의 농도와 순도를 확인하기 위해서 나노드롭을 활용하여 측정한 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-V3 초가변영역(hypervariable region)을 포함하는 27F 정방향 프라이머(5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 518R 역방향 프라이머(5'-WTTACCGCGGCTGCTGG-3')를 이용하여  $94^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 동안 초기 변성시키고,  $94^{\circ}\text{C}$ 에서 30초,  $55^{\circ}\text{C}$ 에서 45초,  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 1분 30초로 30회 반복하여 증폭 PCR을 수행 후 QIAquick 겔 추출 키트(Qiagen, Germany)를 통해 정제하였다. PCR 산물은 GS 주니어 티타늄 시스템(Roche, Germany) 염기서열분석기를 이용하여 파이로시퀀싱(pyrosequencing)을 진행하였으며 파이로시퀀싱에 필요한 방법과 반응들은 제조회사(Roche)의 매뉴얼에 따라 (주)천연연구소(Chunlab, Korea)에서 수행 하였다.

[204]

- [205] 실시예 12: 노령 마우스에서 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 투여 실험실시

- [206] 실험 종료 후 실험동물의 내장 내용물을 수집 후 200 mg을 취하여 실시예 11에

기재된 방법대로 DNA를 분리하여 파이로시퀀싱을 실시하였다.

- [207] 도 18 및 19에 제시한 바와 같이, 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 음용 섭취한 노령쥐의 경우 1개월령의 쥐의 장내 균총과 유사하며, 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 음용 섭취하지 않은 17개월령의 쥐의 장내 균총과는 차이가 있음을 확인하였다. 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 투여한 쥐의 장내 균총의 경우, 노년기에 증가하는 대표 균총인 그람양성세균(Firmicutes)인 클로스트리디움(*Clostridium*) 속 균총과 락토바실러스 뉴테리(*Lactobacillus reuteri*)가 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당 비음용구(대조군) 대비 낮은 비율로 존재함을 보였고, 프레보텔라(*Prevotella*) 중, 락토바실러스 인테스티날리스(*Lactobacillus intestinalis*) 등의 유익균의 증가를 확인하였다.
- [208] 공지된 연구에 따르면, 노화가 진행됨에 따라 장내 균총의 불균형이 야기되고 이때 장내 미생물은 골 관련 치주염, 관절염, 골다공증을 야기하며, 장내 미생물이 숙주의 골량을 조절하고, 이는 파골세포가 조절하는 골 흡수에 영향을 줄 수 있다고 알려져 있다.
- [209] 따라서 상기 결과를 토대로 본 발명자들은 본 발명의 골다공증 치료용 조성물이 골을 생성하는 조골세포의 활성을 촉진시켜주며 파골세포의 활성을 억제시키는 자연노화에 따른 골다공증 치료제로 활용될 수 있는 조성물을 신규 발명하였다.
- [210]
- [211] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 구체적인 구현예일뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.
- [212]

### 서열목록 Free Text

- [213] 서열목록 제1서열 및 제2서열은 각각 AlyDW11의 뉴클레오타이드 서열 및 아미노산 서열이고, 서열목록 제3서열 및 제4서열은 각각 Aly3의 뉴클레오타이드 서열 및 아미노산 서열이며, 서열목록 제5서열 및 제6서열은 각각 Aly5의 뉴클레오타이드 서열 및 아미노산 서열이다.

## 청구범위

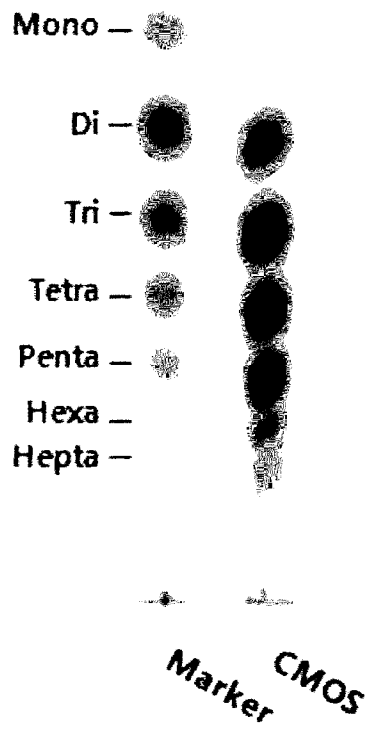
- [청구항 1] 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 유효성분으로 포함하는 조성물.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 1 내지 20 단당(monosacharride)으로 구성되는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 폴리만뉴론산을 서열목록 제2서열, 제4서열 또는 제6서열의 아미노산 서열로 이루어진 알긴산 라이아제(alginate lyase)로 분해하여 생성된 알긴산 올리고당인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 4] 제 3 항에 있어서, 상기 알긴산 라이아제는 서열목록 제1서열, 제3서열 또는 제5서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 5] 제 1 항에 있어서, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 비환원성 말단의 공액이중결합형 만뉴론산 올리고당(Conjugated Carbonyl Manuronic Oligosaccharide; CMOS)인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 6] 제 1 항에 있어서, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 산-알칼리가수 분해에 의해 생성된 알긴산 올리고당인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 7] 제 1 항에 있어서, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 방사선 조사에 의해 생성된 알긴산 올리고당인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 8] 제 1 항에 있어서, 상기 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당은 100-5000 Da 크기를 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 9] 제 1 항에 있어서, 상기 알긴산 올리고당은 만뉴론산(mannuronate) 및 글루론산(guluronate)의 비율이 1.2-5.0:1 몰비인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 10] 제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 운동능력 개선용 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 11] 제 10 항에 있어서, 상기 운동은 무산소운동(anaerobic exercise) 또는 유산소운동(aerobic exercise)인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 12] 제 1 항의 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 유효성분으로 포함하는 조성물을 객체에 투여하는 단계를 포함하는 운동 수행 능력을 개선시키는 방법.
- [청구항 13] 제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 골다공증 개선, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 14] 제 13 항에 있어서, 상기 골다공증은 노인성 골다공증인 것을 특징으로

하는 조성물.

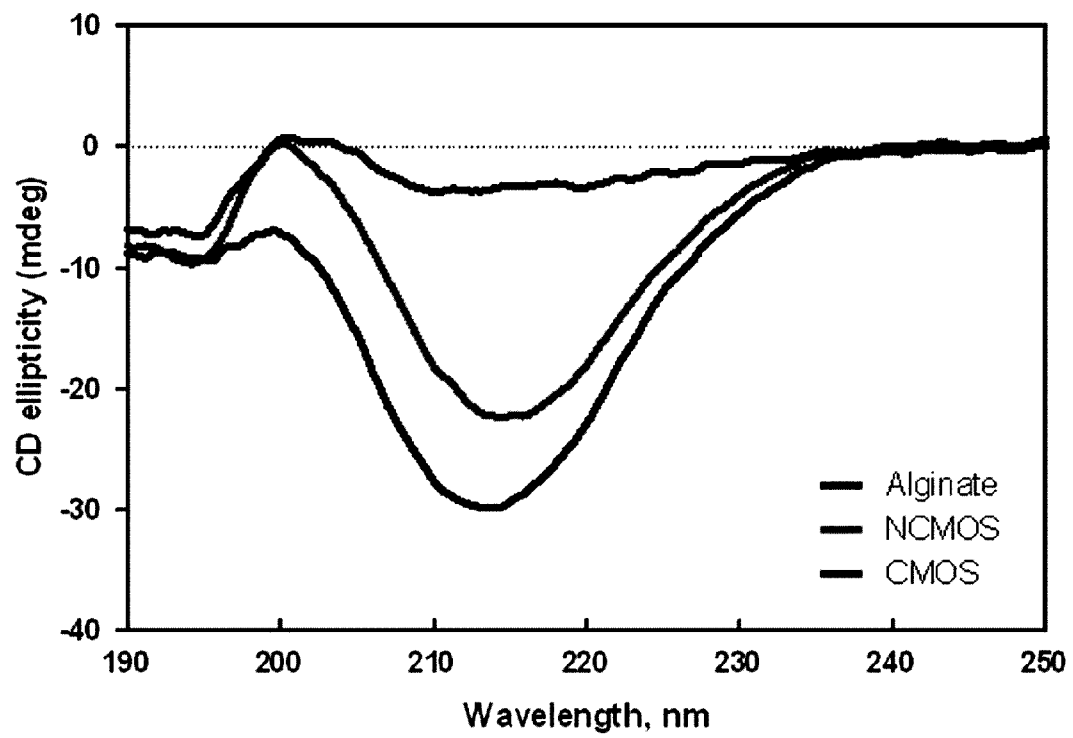
[청구항 15] 제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 골다공증 개선 또는 예방용 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 16] 제 13 항의 비환원성 말단의 불포화형 만뉴론산 올리고당을 객체에 투여하는 단계를 포함하는 골다공증의 개선, 예방 또는 치료 방법.

[도1]

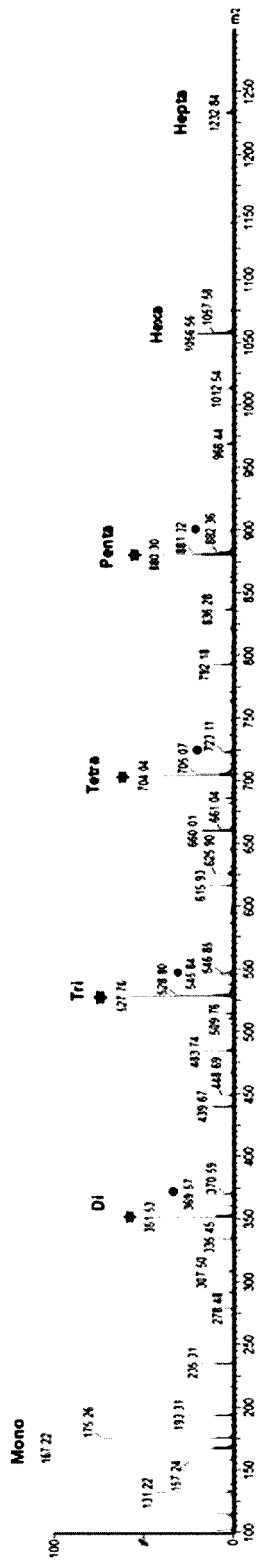


[도2]

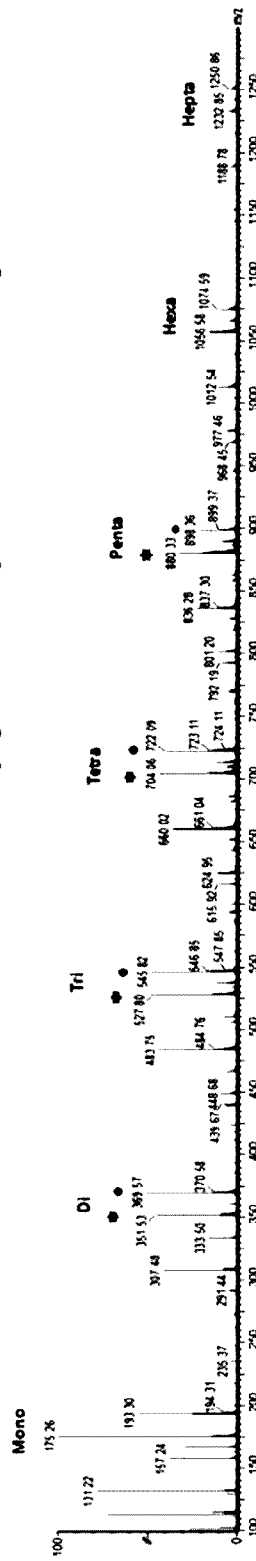


[도3]

공액이중결합형 만뉴론산 올리고당 (CMOS, Conjugated carbonyl mannuronic acid oligosaccharide)

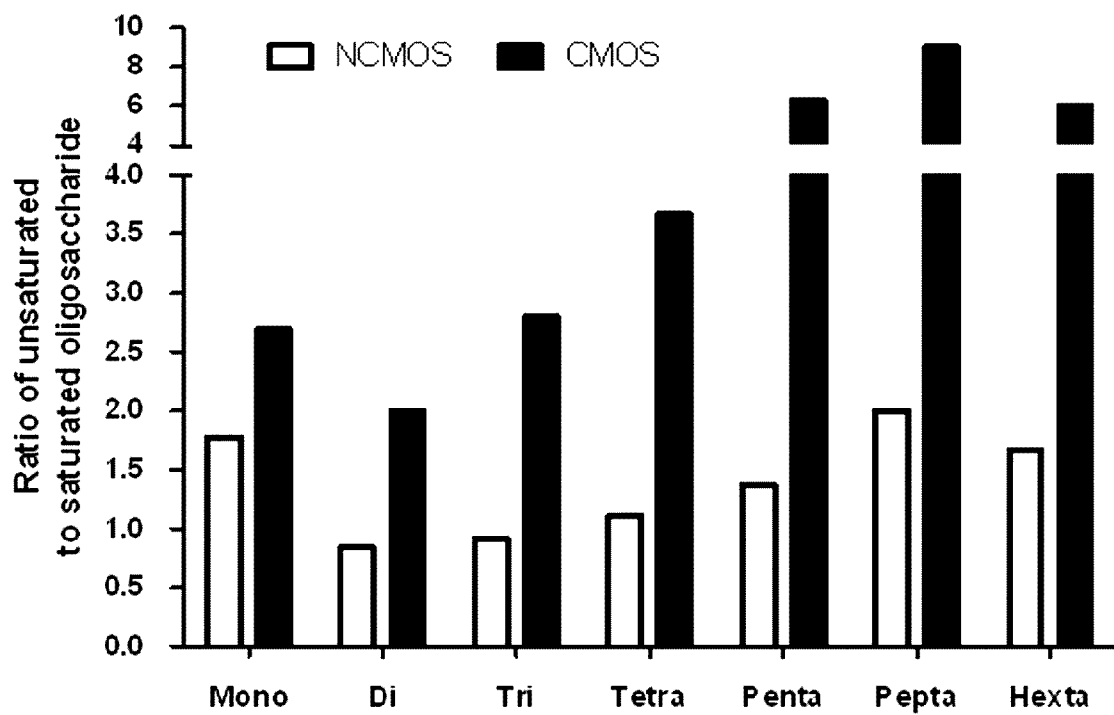


비공액이중결합형 만뉴론산 올리고당 (NCMOS, Nonconjugated carbonyl mannuronic acid oligosaccharide)

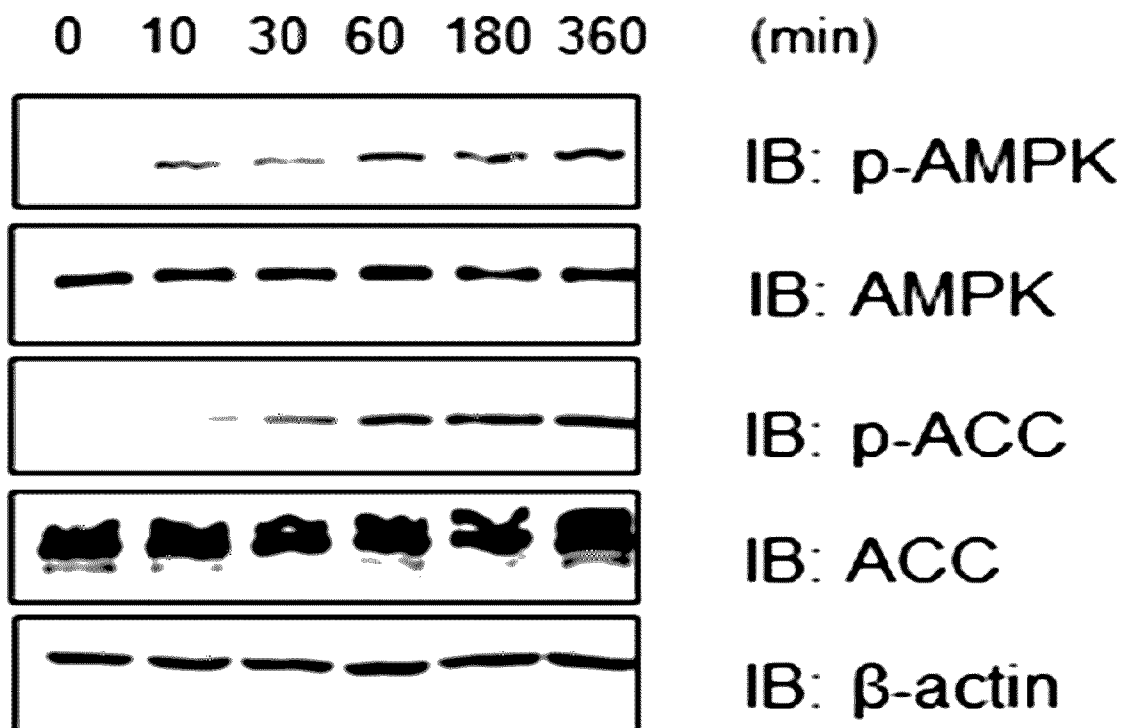


- ★ Conjugated carbonyl mannuronic acid
- Nonconjugated carbonyl mannuronic acid

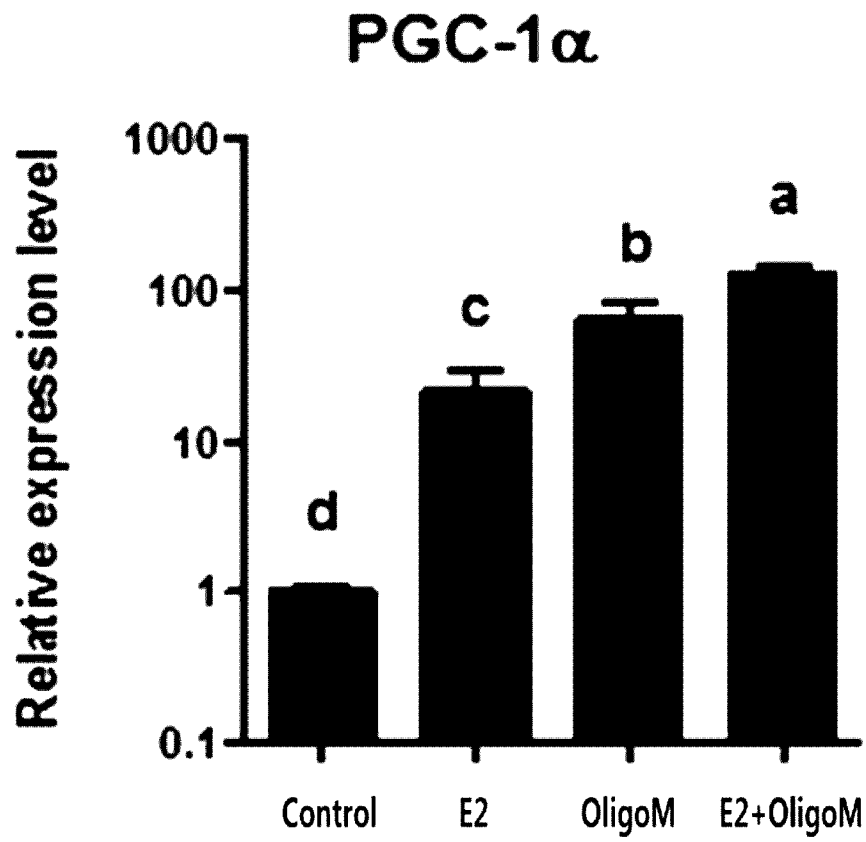
[도4]



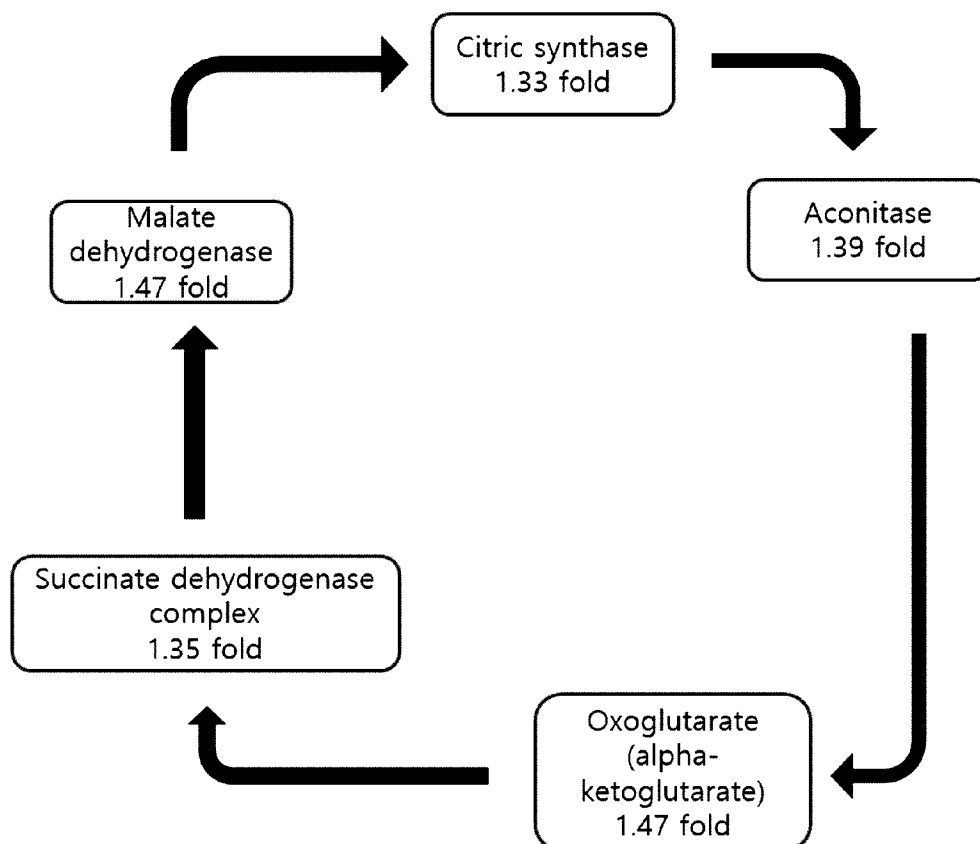
[도5]



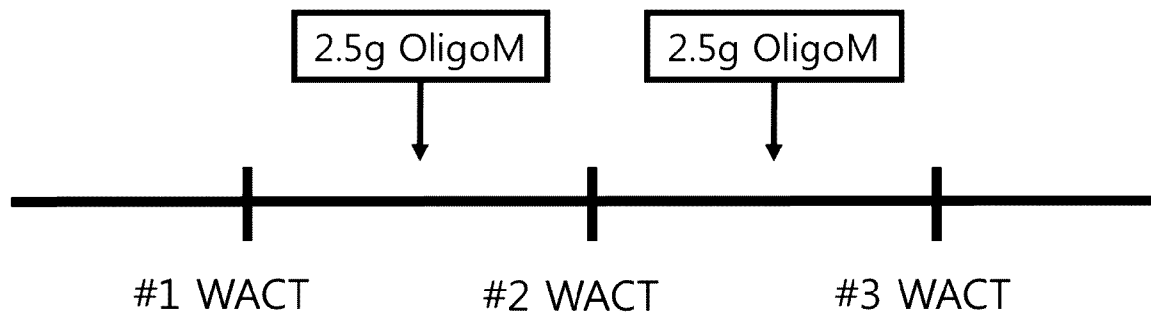
[도6]



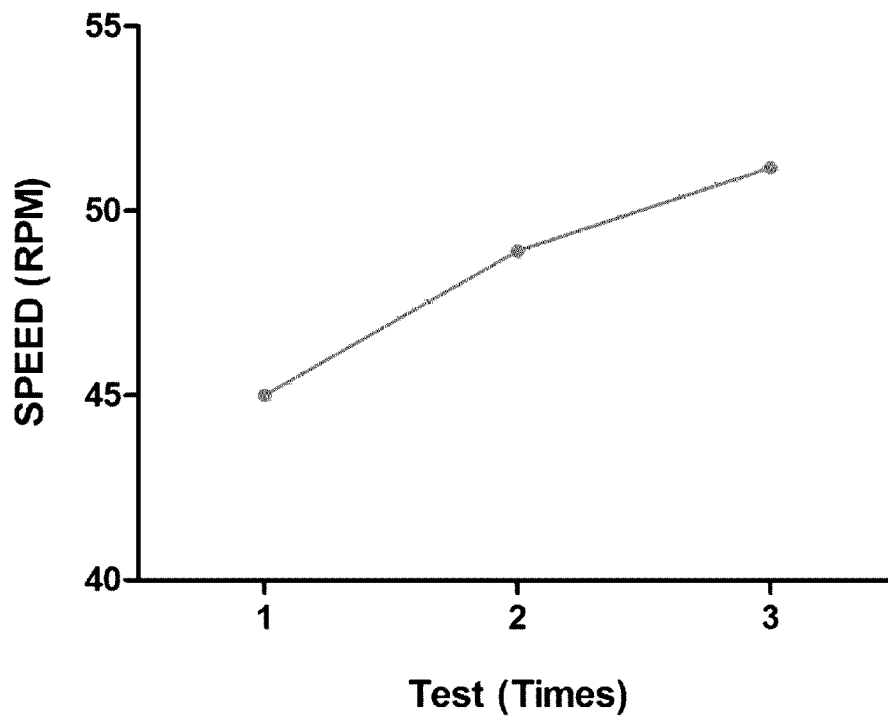
[도7]



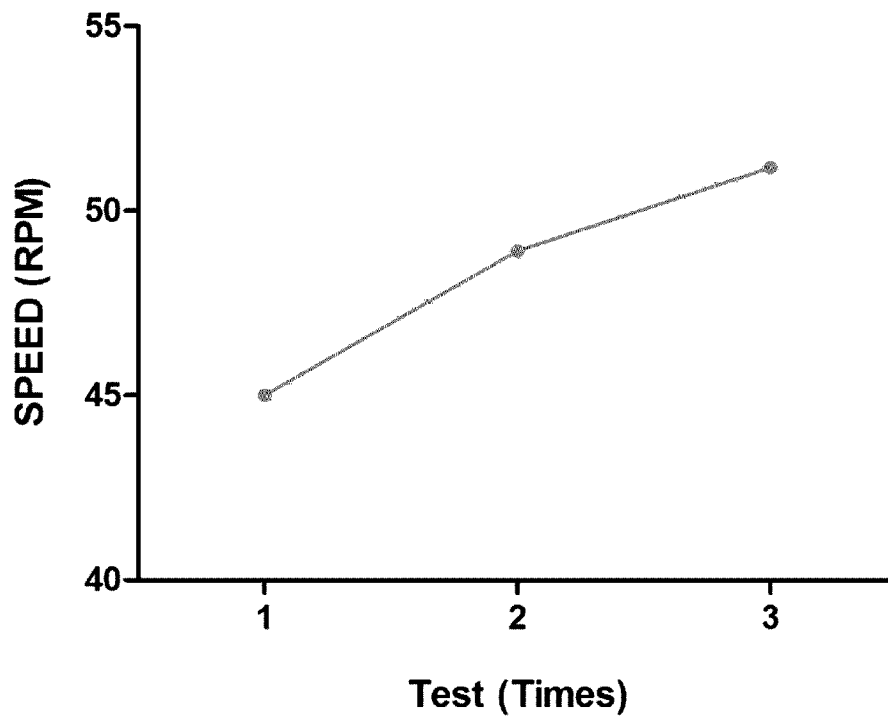
[도8]



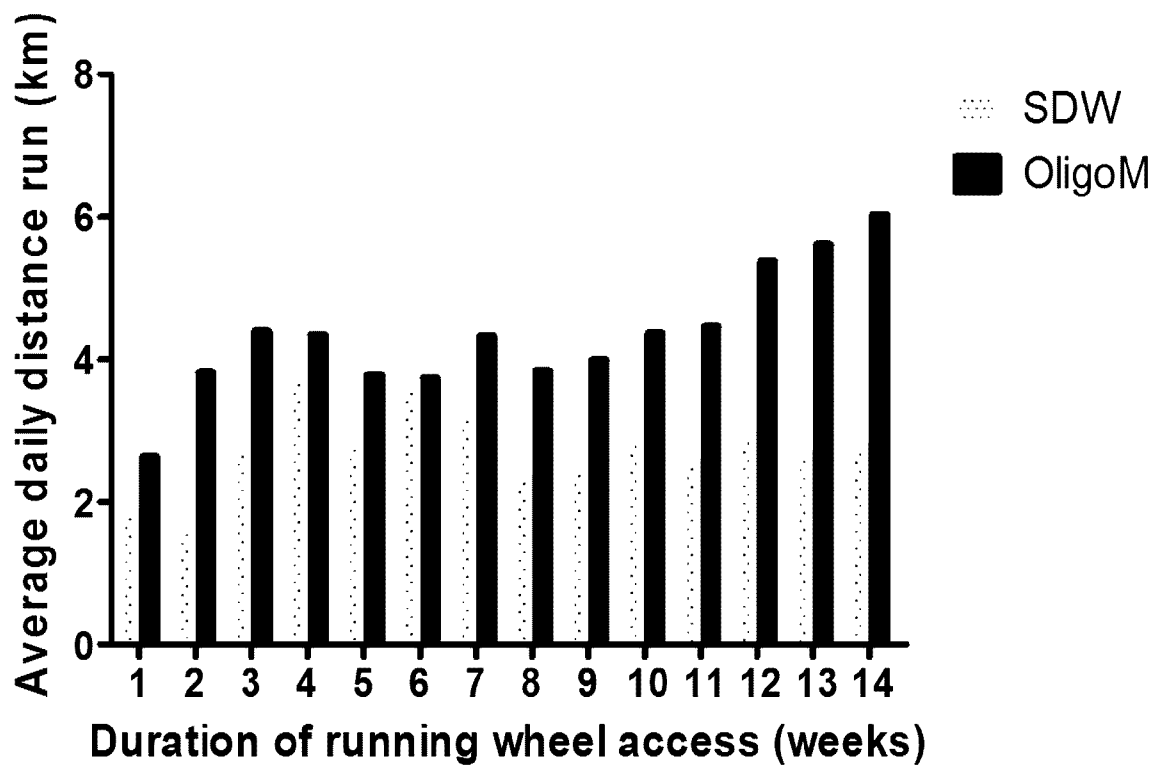
[도9]



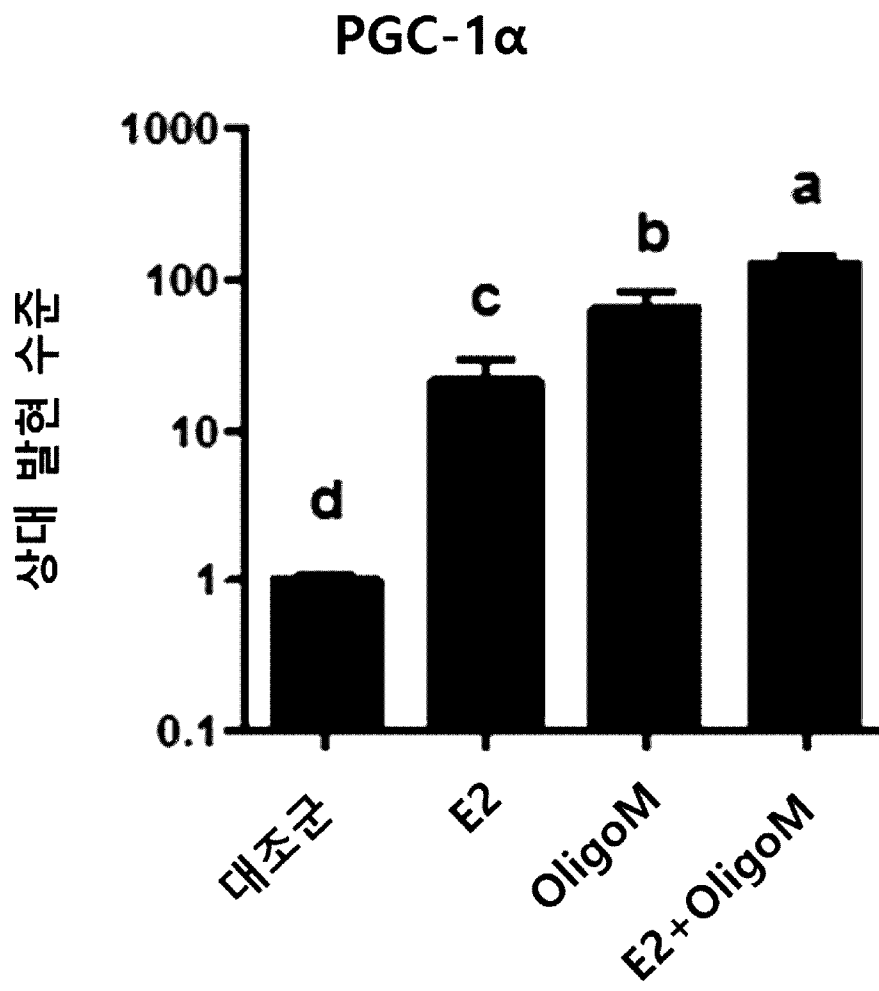
[도10]



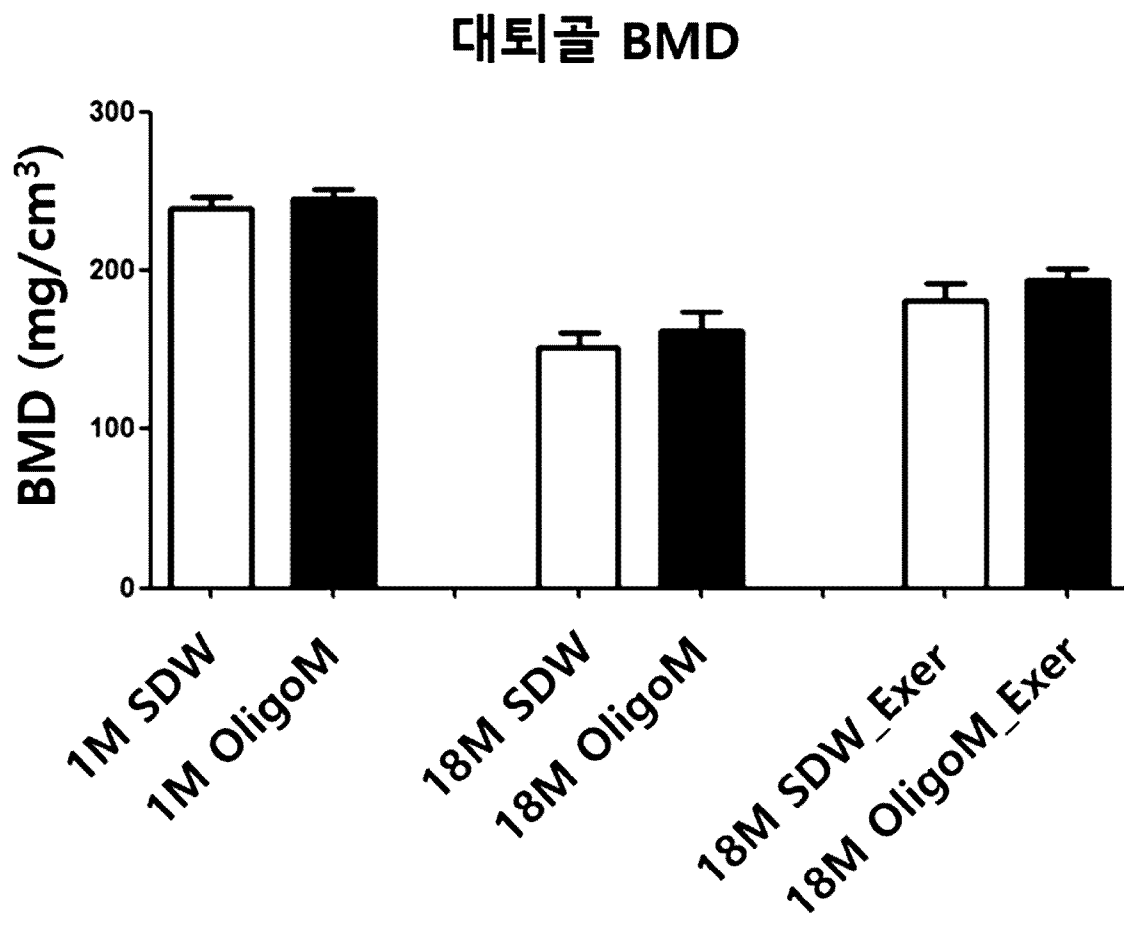
[도11]



[도12]

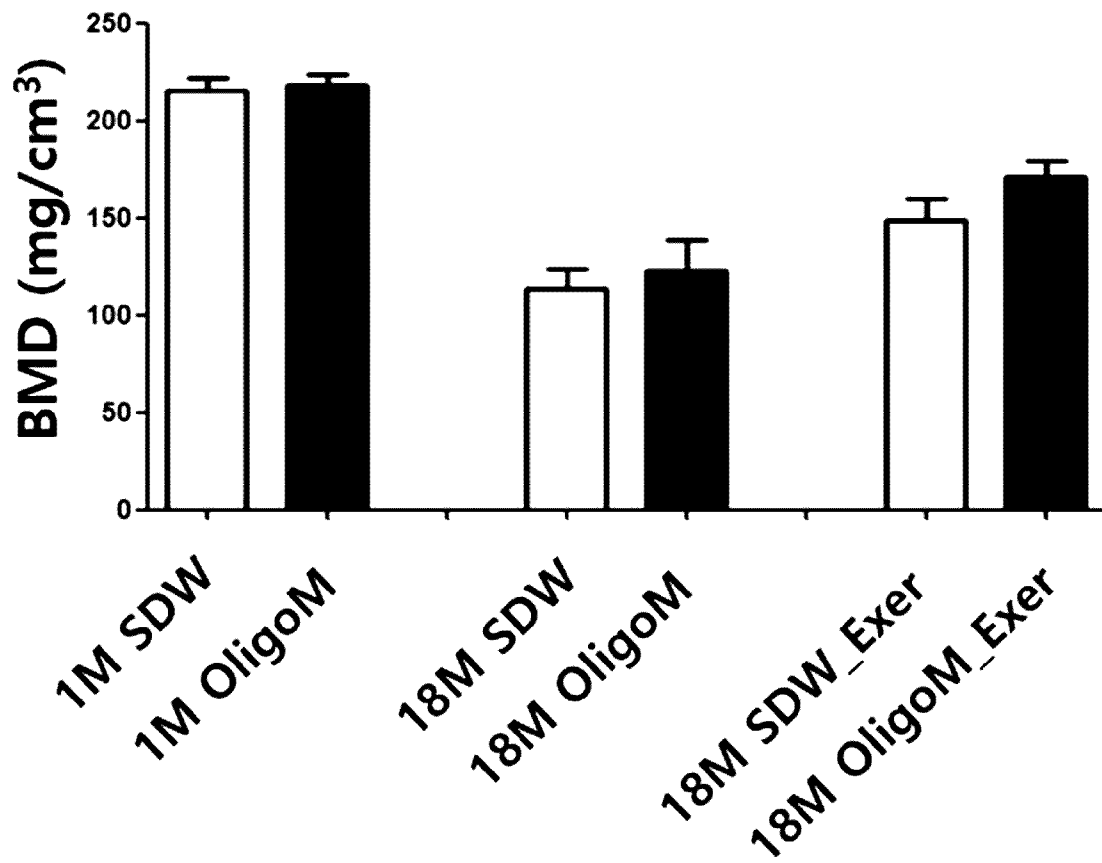


[도13]



[도14]

## 정강이 BMD

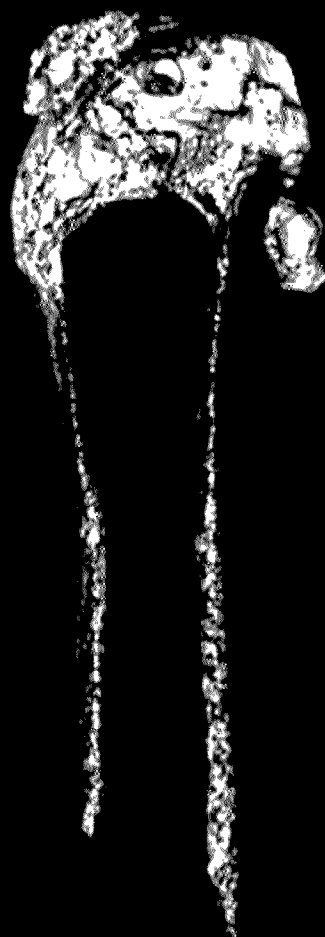


[도15]

**ID:11**

**Study:20160627**

**Series:162100**

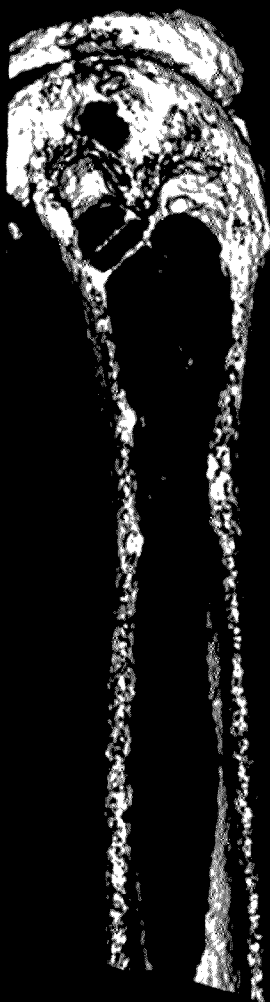


[도16]

**ID:15**

**Study:20160628**

**Series:110845**

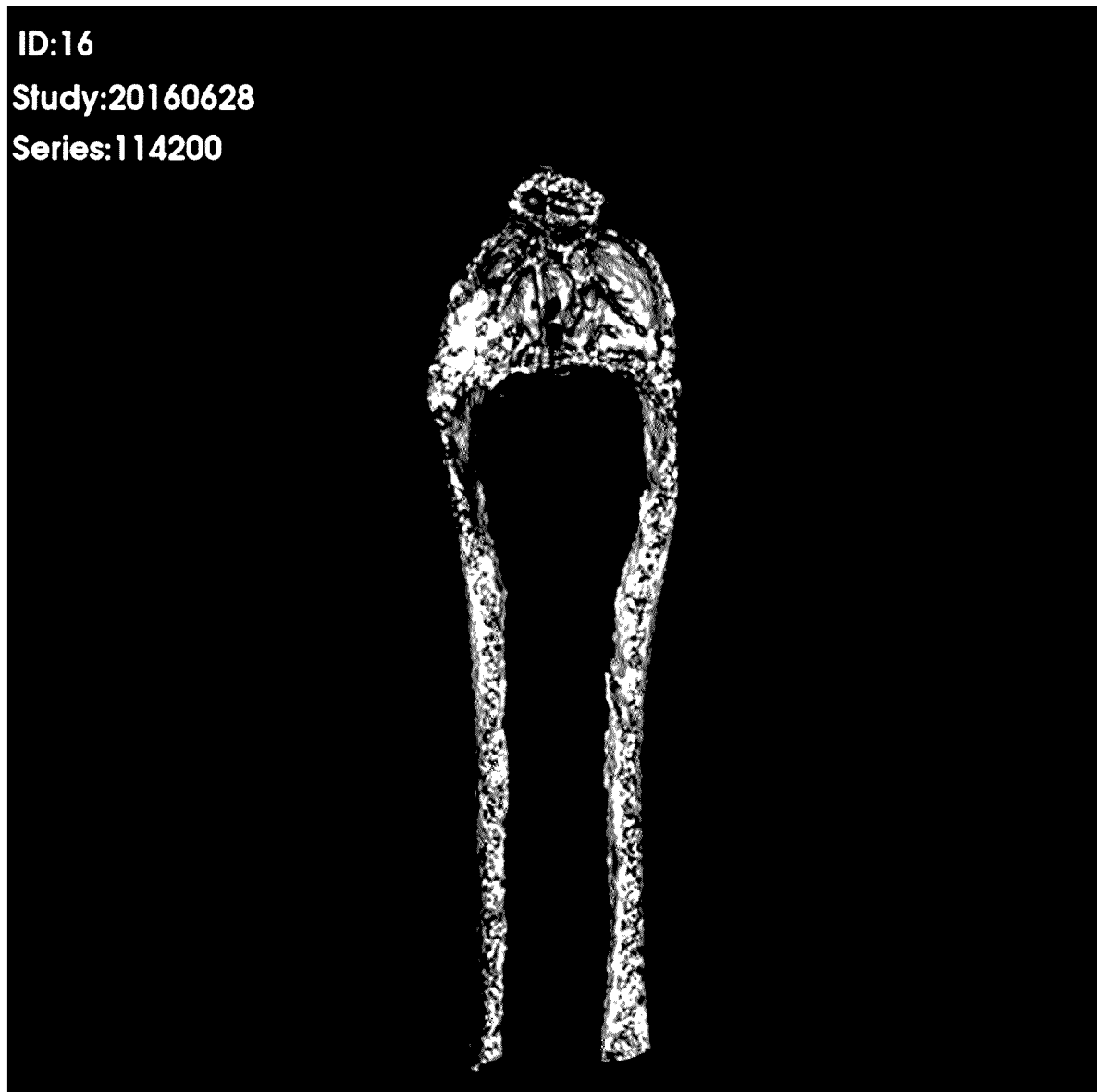


[도17]

**ID:16**

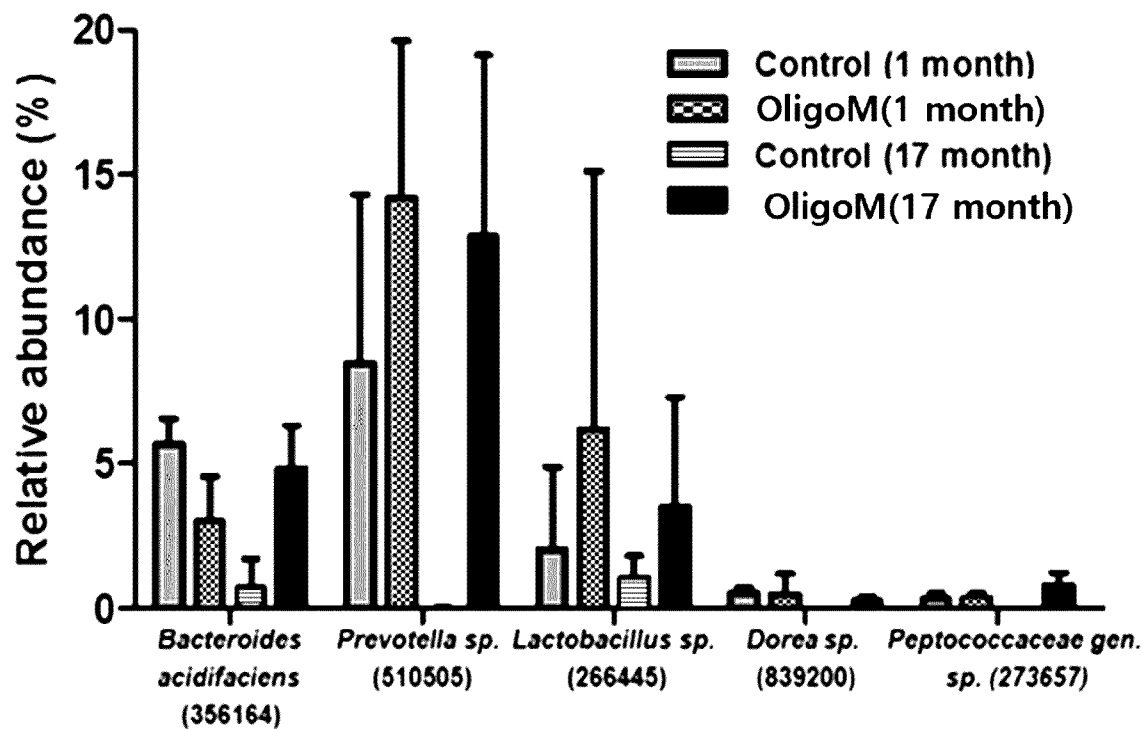
**Study:20160628**

**Series:114200**



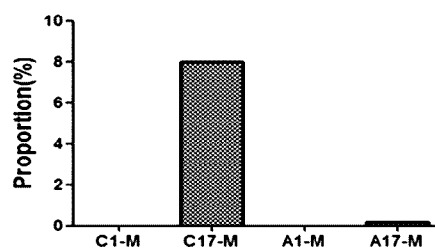
[도18]

• Relative abundance phylotype

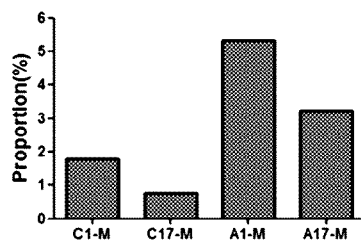


[도19]

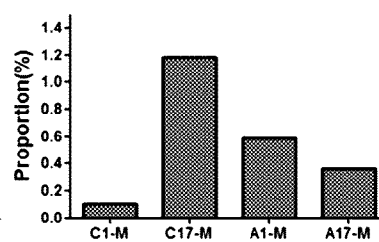
*Clostridium disporicum*



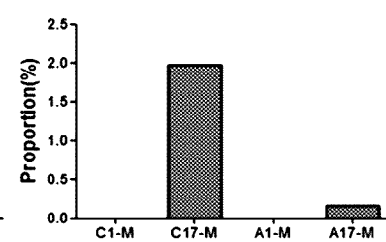
*Lactobacillus intestinalis*



*Lactobacillus reuteri*



*Lactobacillus johnsonii*



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/006529

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*A61K 31/702(2006.01)i, A61K 31/7012(2006.01)i, A61K 31/734(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)i, C12N 9/88(2006.01)i, C12P 19/04(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 31/702; A61K 31/734; A61P 19/10; A61K 31/7012; A23L 33/10; C12N 9/88; C12P 19/04

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: non-reducing end of unsaturated mannuronic acid, alginate oligosaccharide, alginate lyase, exercise capacity, osteoporosis

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                  | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | WO 2014-084427 A1 (ECOBIO INC.) 05 June 2014<br>See abstract; paragraphs [0040]-[0062], [0103]-[0163]; and claims 1-15.                                                                                                             | 1-2,5-11,13-15        |
| Y         |                                                                                                                                                                                                                                     | 3-4                   |
| Y         | NCBI, Reference Sequence no. : WP_017095150.1 (27 June 2013)<br>See ORIGIN.                                                                                                                                                         | 3-4                   |
| X         | LU, H.-T. et al., "Alterative Effects of an Oral Alginate Extract on Experimental Rabbit Osteoarthritis", Journal of Biomedical Science, 2015, vol. 22, thesis no. 64, internal pages 1-8<br>See abstract; page 2; and figures 1-4. | 1-11                  |
| X         | MIRSHAFIEY, A. et al., "Treatment of Experimental Arthritis with M2000, A Novel Designed Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug", Scandinavian Journal of Immunology, 2005, vol. 61, pages 435-441<br>See abstract; pages 436-439.    | 1,2,10,11             |



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

20 OCTOBER 2017 (20.10.2017)

Date of mailing of the international search report

20 OCTOBER 2017 (20.10.2017)

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. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/KR2017/006529**

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                        |                       |
|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                             | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                     | Relevant to claim No. |
| A                                                     | LI, W. et al., "Algal Oligosaccharides Ameliorate Osteoporosis via Up-regulation of Parathyroid Hormone 1-84 and Vascular Endothelial Growth Factor", Journal of Traditional Chinese Medicine, 15 June 2016, vol. 36, no. 3, pages 332-339<br>See the entire document. | 1-11,13-15            |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/006529

## 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.: **12, 16**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 12 and 16 pertain to a method for treatment of the human body by therapy, 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/KR2017/006529**

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|
| WO 2014-084427 A1                         | 05/06/2014          | NONE                    |                     |

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**

**A61K 31/702(2006.01)i, A61K 31/7012(2006.01)i, A61K 31/734(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)i, C12N 9/88(2006.01)i, C12P 19/04(2006.01)i**

**B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/702; A61K 31/734; A61P 19/10; A61K 31/7012; A23L 33/10; C12N 9/88; C12P 19/04

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: 비환원성 말단 불포화형 만능론산, 알긴산 올리고당, 알긴산 라이아제, 운동능력, 골다공증

**C. 관련 문헌**

| 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                                                                                                                                                      | 관련 청구항           |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| X     | WO 2014-084427 A1 (주식회사 이코바이오) 2014.06.05<br>요약; 단락 [0040]-[0062], [0103]-[0163]; 및 청구항 1-15 참조.                                                                                                                | 1-2, 5-11, 13-15 |
| Y     |                                                                                                                                                                                                                 | 3-4              |
| Y     | NCBI, Reference Sequence NO.: WP_017095150.1 (2013.06.27)<br>ORIGIN 참조.                                                                                                                                         | 3-4              |
| X     | LU, H.-T. 등, 'Alternative effects of an oral alginate extract on experimental rabbit osteoarthritis'<br>Journal of Biomedical Science, 2015년, 22권, 논문번호 64, 내부페이지 1-8<br>초록; 페이지 2; 및 도면 1-4 참조.                | 1-11             |
| X     | MIRSHAFIEY, A. 등, 'Treatment of experimental arthritis with M2000, a novel designed non-steroidal anti-inflammatory drug'<br>Scandinavian Journal of Immunology, 2005년, 61권, 페이지 435-441<br>초록; 페이지 436-439 참조. | 1, 2, 10, 11     |

☒ 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 10월 20일 (20.10.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 10월 20일 (20.10.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



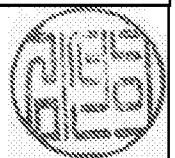
대한민국 특허청  
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,  
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김선희

전화번호 +82-42-481-5405



| C(계속). 관련 문헌 |                                                                                                                                                                                                                                                          |             |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| 카테고리*        | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                                                                                                                                                                                               | 관련 청구항      |
| A            | <p>LI, W. 등, 'Algal oligosaccharides ameliorate osteoporosis via up-regulation of parathyroid hormone 1-84 and vascular endothelial growth factor'</p> <p>Journal of Traditional Chinese Medicine, 2016.06.15, 36권, 3호, 페이지 332-339</p> <p>전체 문헌 참조.</p> | 1-11, 13-15 |

**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: 12, 16  
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,  
청구항 제12항 및 제16항은 치료에 의한 인체의 치치방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:  
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:  
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

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

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

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

이의신청에  
관한 기재

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

| 국제조사보고서에서<br>인용된 특허문헌 | 공개일        | 대응특허문헌 | 공개일 |
|-----------------------|------------|--------|-----|
| WO 2014-084427 A1     | 2014/06/05 | 없음     |     |