



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년03월06일
(11) 등록번호 10-1121543
(24) 등록일자 2012년02월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/70 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0064291
(22) 출원일자 2008년07월03일
심사청구일자 2008년07월03일
(65) 공개번호 10-2009-0004706
(43) 공개일자 2009년01월12일
(30) 우선권주장
1020070066887 2007년07월04일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
Am. J. Clin. Nutr. 68: 248-257(1998)*
Journal of the American College of Nutrition
19(3): 308S-311S(2000)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
학교법인 선목학원
대구 중구 남산3동 225-1
주식회사 하이폭시
대구광역시 남구 두류공원로17길 33, 대구가톨릭
대학교 의과대학 루가관 320호 (대명동)
(72) 발명자
이종원
대구광역시 수성구 달구벌대로496길 72, 서한두레
맨션 102동 505호 (범어동)
김예실
대구광역시 수성구 범어4동 두레맨션 102동 505호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 2 항

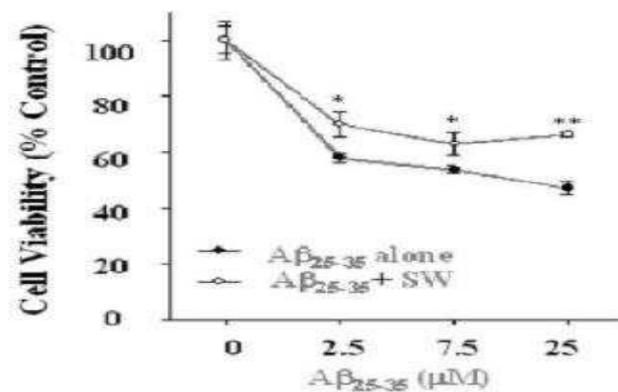
심사관 : 최승희

(54) 발명의 명칭 **벼과식물로부터 수득되는 전분 또는 식이섬유를 포함하는허혈성 질환 및 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료를 위한조성물**

(57) 요약

본 발명은 세포 생존능 개선 활성을 갖는 전분 (starch) 또는 식이섬유 (dietary fiber)를 주성분으로 하는 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 본 발명의 벼과식물로부터 분리된 전분 및 식이섬유는 저산소 조건 배양 세포, 베타-아밀로이드 배양 세포 및 하이드록시도파민 존재 하 배양 세포에 대한 생존능 개선 활성, 심근경색 치료활성, 뇌경색 치유 효과, 치매 동물 모델에서 기억력 감소 억제 효과 및 혈관성 치매 치유 효과가 탁월하므로, 상기 조성물은 허혈성 질환 및 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료용 약화조성물 및 건강기능식품으로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도3a



(72) 발명자

송경식

대구광역시 수성구 신매로 71, 229동 1106호 (신매동, 시지천마타운)

한형수

대구광역시 수성구 동대구로 226, 범어우방APT 6-305 (범어동)

장정희

대구광역시 남구 봉덕3동 2차 대덕맨션 202동 809호

양재하

대구광역시 남구 이천로5길 70-1 (봉덕동)

임선하

대구광역시 달서구 월성로 77, 월성주공아파트2단지 211동 1508호 (월성동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PF06221-00

부처명 교육과학기술부

연구사업명 자생식물이용기술개발사업

연구과제명 세포자살을 억제하는 자생식물 추출물로부터 노인성질환용식품의약의 개발

주관기관 대구가톨릭대학교 (선목학원)

연구기간 2008년 04월 01일 ~ 2009년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

아라비노자일란(arabinoxylan)을 유효성분으로 함유하는 심근경색, 뇌경색, 허혈성 뇌졸중, 알츠하이머형 치매, 또는 뇌혈관성 치매의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

아라비노자일란(arabinoxylan)을 유효성분으로 함유하는 심근경색, 뇌경색, 허혈성 뇌졸중, 알츠하이머형 치매, 또는 뇌혈관성 치매의 개선용 건강기능식품.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 전분 또는 식이섬유를 유효성분으로 함유하는 허혈성 질환 및 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] [문헌 1] Crow MT et al., *Circ. Res.*, 95(10), pp957-970, 2004

[0003] [문헌 2] Friedlander RM, *N. Engl. J. Med.*, 348(14), pp1365-1375, 2003

[0004] [문헌 3] Daemen MA et al., *Transplantation*, 73(11), pp1693-1700, 2002

[0005] [문헌 4] Gastman BR et al., *Plast. Reconstr. Surg.*, 111, pp1481-1496, 2003

[0006] [문헌 5] Kang TC et al., *J. Neurocytol.*, 30(12), pp945-955, 2001

[0007] [문헌 6] Won MH et al., *Brain Res.*, 836(1-2), pp70-78, 1999

[0008] [문헌 7] Yrjanheikki J et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(23), pp13496-13500, 1999

[0009] [문헌 8] Scarabelli TM et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, 43(5), pp865-874, 2004

[0010] [문헌 9] Wang J et al., *J. Biol. Chem.*, 279(19), pp19948-19954, 2004

[0011] [문헌 10] Hunter CL, *Eur. J. Neurosci.*, 19(12), pp3305-3316, 2004

[0012] [문헌 11] Wu DC et al., *J. Neurosci.*, 22(5), pp1763-1771, 2002

[0013] [문헌 12] Zhu S et al., *Nature*, 417(6884), pp74-78, 2002

[0014] [문헌 13] Chen M et al., *Nat. Med.*, 6(7), pp797-801, 2000

[0015] [문헌 14] Teng YD et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(9), pp3071-3076, 2004

[0016] [문헌 15] KR 10-0404134호

[0017] [문헌 16] US 특허등록번호 6716822호

[0018] [문헌 17] US 특허등록번호 6818625호

[0019] [문헌 18] KR 특허등록 제10-0723950호

[0020] [문헌 19] PCT/KR2006/000027

[0021] [문헌 20] Ranhotra GS et al., *Cereal Chem.*, 68(5), pp556-558, 1991

[0022] [문헌 21] Grausgruber H et al., In *Genetic variation for plant breeding* (Vollmann J et al. (Eds.)) pp23-26, Eucarpia & Boku, Vienna, 2004

[0023] [문헌 22] Izydorczyk MS et al., *Carbohydrate Polymers*, 28, pp33-48, 1995

[0024] [문헌 23] Zekovic DB et al., *Crit. Rev. Biotech.*, 25, pp205-230, 2005

[0025] [문헌 24] Philippe S et al., *Planta*, 224(2), pp449-461, 2006

[0026] [문헌 25] Vinkx CJA et al., *J. Cereal Sci.*, 24, pp1-14, 1996

[0027] [문헌 26] Miller SS et al., *Cereal Chem.*, 72(5), pp421-427, 1995

[0028] [문헌 27] Kanauchi M et al., *Cereal Chem.*, 78(2), pp121-124, 2001

- [0029] [문헌 28] Adams EL et al., *Carbohydr. Res.*, 340, pp1841-1845, 2005
- [0030] [문헌 29] Zhou K et al., *J. Agric. Food Chem.*, 52, pp6108-6114, 2004
- [0031] [문헌 30] Clifford MN, *J. Sci. Food Agric.*, 79, pp362-372, 1999
- [0032] [문헌 31] Yoo et al., *Carbohydr. Polymers*, 49, pp297-305, 2002
- [0033] [문헌 32] Lee SC et al., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 75, pp395-416, 1992
- [0034] [문헌 33] Prosky L et al., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71, pp1017-1023
- [0035] [문헌 34] Houben R et al., *J. Cereal Sci.*, 26, pp37-46, 1997
- [0036] [문헌 35] Virkki L et al, *Carbohydr. Res.*, 343, pp521-529, 2008
- [0037] [문헌 36] Ordaz-Ortiz JJ, et al., *J. Cereal Sci.*, 42, pp119-125, 2005
- [0038] [문헌 37] Van Der Borghet et al., *J. Cereal Sci.*, 41, pp221-237, 2005
- [0039] [문헌 38] Hoffman RM, In *Cell Biology* (Celis JE (Ed.), Academic Press, New York, Vol. 1, pp369-370, 1994
- [0040] [문헌 39] Guo S et al., *Free Radic. Biol. Med.*, 39(5), pp682-695, 2005
- [0041] [문헌 40] Haisong J et al., *Circulation*, 97, pp892-899, 1998
- [0042] [문헌 41] Han HS et al., *J. Neurosci.*, 22, pp3921-3928, 2002
- [0043] [문헌 42] Lindner MD et al., *Psychopharmacol.* 188, pp629-640, 2006
- [0044] [문헌 43] Fan et al., *Neurosci. Lett.* 374, pp222-226, 2005
- [0045] [문헌 44] Cho KO et al., *J. Neurosci. Res.*, 83, pp285-291, 2006

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0046] 대표적인 허혈성 질환인 뇌경색과 심근경색은 고혈압, 고지혈증, 당뇨, 흡연 등에 의해 혈관이 좁아지는 동맥경화증에 빠진 상태에서 혈전 등에 의해 뇌에 혈액을 공급하는 뇌동맥 또는 심장에 혈액을 공급하는 관상동맥이 막혀 주위조직이 괴사됨으로써 발생한다.
- [0047] 심혈관질환은 세계적으로 전체 사망 원인의 30 %를 차지하고 있어 사망원인 1위를 차지하고 있으며, 이 중의 75 %는 심근경색과 뇌경색과 같은 허혈성질환이다. 심근경색과 뇌경색 각각은 압과 더불어 사망률 최고를 차지하고 있다. 이러한 심근경색과 뇌경색에 의한 사망률을 줄이는 방법에는 고혈압과 고지혈증을 치료하여 혈관의 폐색을 방지하는 방법과 혈관 폐색시 주위조직의 괴사를 감소시키는 방법이 있다.
- [0048] 이 중, 괴사 부위를 감소시키는 최선의 방법은 빠른 시간 내에 막힌 혈관을 혈전용해제 등으로 뚫어 혈관을 재관류 시키는 것이나, 호흡에 의해 에너지를 얻는 심장과 뇌는 혈관이 막히는 폐색 3~ 6 시간 이내에 조직들이 괴사되어 이후에는 재관류를 시키더라도 그 치료효과를 기대할 수 없다. 그러나, 치료효과를 높이는데 필요한 시간인 폐색 3~ 6 시간 이내에 병원에 도착하여 치료를 받아 재관류 시키는 것이 어려운 현실이며, 또한 심장과 뇌는 일단 손상을 입으면 재생이 잘 되지 않는다. 따라서 병원에서 재관류 시킬 때까지 허혈상태에서의 세포생존능을 개선할 수 있다면 치료효과를 높일 수 있다. 이 때, 조직괴사 원인 중 하나는 세포자살이며 (Crow MT et al., *Circ. Res.*, 95(10), pp957-970, 2004; Friedlander RM, *N. Engl. J. Med.*, 348(14), pp1365-1375, 2003), 이를 억제함으로써 세포생존능을 개선할 수 있다.
- [0049] 또한, 신장이식 (Daemen MA et al., *Transplantation*, 73(11), pp1693-1700, 2002)이나 성형외과적인 수술 (Gastman BR et al., *Plast. Reconstr. Surg.*, 111, pp1481-1496, 2003) 등에서 이식된 조직의 손상도 허혈에 의한 재관류에 따른 세포자살에 의해 발생한다.
- [0050] 또한, 심장을 정지시키고 시행하는 수술의 경우, 심폐기에 의해 공급되는 산소량보다 요구되는 산소량이 많게 되면 심근손상 또는 저혈압에 의한 뇌손상이 발생할 수 있다. 예를 들어, 관상동맥 폐색 시에 실시하는 우회로

이식 (bypass graft) 수술, 뇌동맥이나 대동맥에 발생한 동맥류 (aneurysm) 수술 등, 혈액을 일부 차단하는 수술 시에 허혈로 인한 심근손상 및 뇌손상으로 심부전 및 반신불수 등의 부작용이 발생할 수 있다. 실제로 대동맥류의 수술적 또는 중재적 치료 시, 3-16 %의 환자에게서 심근허혈, 신부전, 하지마비 등의 부작용이 나타난다. 따라서 허혈조건에서 세포자살을 억제하는 약물을 전처치에 이용한다면, 상기 부작용을 감소시킬 수 있다.

[0051] 신경세포자살의 원인은 아직 명확하게 밝혀지지 않았지만 대뇌에 일시적인 뇌허혈이 유발되는 경우, 산소와 포도당의 공급이 차단되어 신경세포에서는 아데노신 삼인산 (ATP)이 감소하고 부종 (edema)이 발생되면서 신경세포자살이 유발되는 것으로 알려져있다. 뇌허혈에 의한 신경세포자살 기전으로는 허혈에 의해서 세포 밖에 과도한 글루탐산 (glutamate)이 축적되게 되고 이 글루탐산이 세포내로 유입되어 결국 과도한 세포내 칼슘의 축적으로 신경세포자살이 유발된다는 흥분성 신경세포자살 기전 (Kang TC et al., *J. Neurocytol.*, 30(12), pp945-955, 2001)과 허혈-재관류 시에 갑작스러운 산소 공급으로 인한 생체 내 라디칼의 증가가 DNA 및 세포질에 손상을 입혀 신경세포사멸이 유발된다는 산화성 신경세포자살 기전 (Won MH et al., *Brain Res.*, 836(1-2), pp70-78, 1999)이 있다. 이러한 기전적인 연구를 바탕으로 뇌허혈로 인한 신경세포자살을 효과적으로 억제하는 물질을 탐색하거나 물질에 대한 기전을 밝히는 연구가 많이 수행되고 있지만 아직까지 신경세포자살을 효과적으로 억제하는 물질은 거의 발견되지 않았다.

[0052] 다만, 허혈조건에서 세포자살을 억제하는 테트라사이클린 계열의 항생제인 미노사이클린의 경우, 뇌경색 (Yrjanheikki J et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(23), pp13496-13500, 1999), 심근경색 (Scarabelli TM et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, 43(5), pp865-874, 2004) 및 허혈성급성신부전증 (Wang J et al., *J. Biol. Chem.*, 279(19), pp19948-19954, 2004) 등의 허혈성질환뿐만 아니라 알츠하이머병 (Hunter CL, *Eur. J. Neurosci.*, 19(12), pp3305-3316, 2004), 파킨슨병 (Wu DC et al., *J. Neurosci.*, 22(5), pp1763-1771, 2002), 근위축성 측삭 경화증 (amyotrophic lateral sclerosis; Zhu S et al., *Nature*, 417(6884), pp74-78, 2002), 헌팅턴병(Chen M et al., *Nat. Med.*, 6(7), pp797-801, 2000) 및 척수손상 (Teng YD et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(9), pp3071-3076, 2004) 등의 신경세포자살에 의해 발생하는 퇴행성 뇌질환의 치료에도 효과가 있다는 것이 알려져 있다. 또한, 본 발명자들은 이러한 테트라사이클린 계열의 항생제가 본 연구와 유사한 허혈조건에서 세포의 생존을 개선시키는 것을 확인하였다 (대한민국특허등록번호 0404134호; 미국특허등록번호 6716822, 6818625호). 더군다나 미노사이클린 뿐만 아니라 아미노글리코사이드 계열, 퀴놀론 계열의 항생제들도 미노사이클린과 마찬가지로 허혈조건에서 세포의 생존을 개선시켰으며, 이 중에서 특히 아미노글리코사이드 계열의 G418 (제네티신)은 심근경색 치료 효과가 관찰되었다 (미국특허등록번호 6716822). 이 후의 실험에서 G418은 허혈조건에서 세포자살을 억제하며 심근경색뿐만 아니라 뇌경색에도 치료효과를 나타내는 것을 확인하였다. 상기의 결과로, 허혈조건에서 G418과 동일한 세포 생존 개선 효과를 나타내는 시료들이 궁극적으로 심근경색 등의 허혈성질환의 치료에 효과를 나타내고 아울러 퇴행성뇌질환 등 세포자살에 의해 발생하는 질환의 예방 및 치료에도 효과를 나타낼 것으로 예상되어 탐색을 한 결과 소맥을 포함한 벼과식물 추출물이 세포생존을 개선효과를 나타내는 것을 확인하였으며, 이를 근거로 소맥추출물을 허혈성 질환 및 퇴행성 뇌질환 동물모델에 적용하여 실험을 실시한 결과 뇌경색 및 심근경색 등의 허혈성질환과 알츠하이머병 등의 퇴행성뇌질환에 대한 치료에도 효과를 나타내는 것을 확인한 바 있다. (대한민국 특허등록번호 제10-0723950호 및 국제출원번호 PCT/KR2006/000027).

[0053] 대표적인 벼과식물인 소맥, 호밀, 보리 및 귀리의 알곡 전체의 조성은, 란호트라 등의 보고에 의하면 10% 정도의 수분, 50-60% (보리는 25%)의 전분을 포함한 탄수화물, 10-20%의 단백질, 2-8%의 지방, 10-20% (보리는 40%)의 전체식이섬유 [1-3% (보리는 9%)의 수용성 식이섬유]로 구성되어 있으며 (Ranhotra GS et al., *Cereal Chem.*, 68(5), pp556-558, 1991), 그라우스그루버 등의 보고에 의하면 50-60%의 전분, 10-20%의 단백질, 1-5%의 지방, 10-20%의 전체식이섬유로 구성되어 있어 상기 두 보고는 유사하다 (Grausgruber H et al., *In Genetic variation for plant breeding* (Vollmann J et al. (Eds.)) pp23-26, Eucarpia & Boku, Vienna, 2004).

[0054] 이 중에서 식이섬유를 이루는 구성요소 중의 하나로 배유세포 (endosperm cell)의 세포벽을 이루는 아라비노자일란 (arabinoxylan)과 베타-글루칸 (β -glucan)이 있다 (Izydorczyk MS et al., *Carbohydrate Polymers*, 28, pp33-48, 1995; Zekovic DB et al., *Crit. Rev. Biotech.*, 25, pp205-230, 2005). 소맥 (Philippe S et al., *Planta*, 224(2), pp449-461, 2006) 및 호밀 (Vinkx CJA et al., *J. Cereal Sci.*, 24, pp1-14, 1996)의 경우는 상기 세포벽에 베타-글루칸보다 아라비노자일란이 많이 함유된 반면, 귀리 (Miller SS et al., *Cereal Chem.*, 72(5), pp421-427, 1995) 및 보리 (Kanauchi M et al., *Cereal Chem.*, 78(2), pp121-124, 2001)의 경우는 아

라비노자일란보다 베타-글루칸이 많이 함유되어 있으며, 일반적으로, 아라비노자일란은 아라비노스 (arabinose)와 자일로스 (xylose)로 구성되어 있으며, 베타-글루칸은 포도당으로 구성되어 있다(Izydorczyk MS et al., *Carbohydr. Polym.*, 28, pp33-48, 1995).

[0055] 세포벽을 구성하는 것으로는 상기한 아라비노자일란 및 베타-글루칸과 같은 고분자 이외에도 항산화효과를 가지는 화합물로 아라비노자일란 분자끼리의 결합에 참여하는 페룰린산 (ferulic acid; Adams EL et al., *Carbohydr. Res.*, 340, pp1841-1845, 2005)을 포함하여 쿠마릭산 (coumaric acid), 바닐릭산 (vanillic acid), 파라벤조익산 (p-OH benzoic acid) 및 시린직산 (syringic acid; Zhou K et al., *J. Agric. Food Chem.*, 52, pp6108-6114, 2004; Clifford MN, *J. Sci. Food Agric.*, 79, pp362-372, 1999) 등이 있다.

[0056] 전분 (starch)은 녹말이라고도 불리며, 엽록소를 가진 식물체에 널리 존재한다. 녹말은 식물의 씨, 뿌리, 줄기, 알뿌리, 열매 등에 함유된 중요한 저장물질의 하나이며, 고등동물에서도 탄수화물의 영양원으로서 중요한 물질이다. 전분은 무미, 무취의 백색분말로 물에는 녹지 않는다. 분자량은 1백만~1천만이며, 비중은 1.65 정도이므로 물속에서는 침전한다. 일반적으로 입자의 형태로 존재하는데, 그 크기나 형태는 식물의 종류에 따라 다르다. 전분은 단일물질로 이루어진 것이 아니라 아밀로오스 (amylose)와 아밀로펙틴 (amylopectine)의 혼합물이며, 그 비율은 전분의 종류에 따라 대체로 일정하다. 일반적으로 아밀로오스 20-30%, 아밀로펙틴 70~80%가 함유되어 있다 (Yoo et al., *Carbohydr. Polymers*, 49, pp297-305, 2002). 그러나 찹쌀, 찰옥수수 등은 아밀로오스가 거의 없고 아밀로펙틴만으로 이루어져있다.

[0057] 소맥을 비롯한 벼과식물 추출물의 저산소 조건에서 세포 생존능 개선 활성 및 허혈성 질환 및 퇴행성 뇌질환 동물모델에서의 개선 및 치료 효과를 확인한 바는 이미 본 발명의 발명자들에 의해 발표된 바 있으나 (대한민국 특허등록번호 제10-0723950호 및 국제출원번호 PCT/KR2006/000027), 벼과식물로부터 분리 정제된 전분이나 식이 섬유(이하, 식이섬유뿐만 아니라 그 구성성분인 아라비노자일란, 아라비노스, 자일로스 및 베타-글루칸 포함)가 허혈성 질환 및 퇴행성 뇌질환 개선 및 치료 활성에 대해서는 알려진 바 없다.

[0058] 따라서 본 발명자들은 저산소조건, 베타-아밀로이드 및 하이드록시도파민 (6-hydroxydopamine) 처리조건 하의 시험관 내 실험에 전분 및 식이섬유를 적용하여 세포 생존능 개선 활성을 확인함과 동시에 허혈성 질환 및 퇴행성 뇌질환 동물모델에서의 개선 및 치료 효과를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제 해결수단

[0059] 상기 목적을 수행하기 위하여, 본 발명은 전분 또는 식이섬유를 유효성분으로 함유하는 허혈성 질환 및 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0060] 또한, 본 발명은 전분 또는 식이섬유를 유효성분으로 함유하는 허혈성 질환 및 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료용 건강기능식품을 제공한다.

[0061] 또한, 본 발명은 아라비노자일란(arabinoxylan), 베타-글루칸(β -glucan), 아라비노스 (arabinose) 및 자일로스 (xylose)로 구성된 균으로부터 선택된 하나 이상의 성분을 유효성분으로 함유하는 허혈성 질환 및 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0062] 또한, 본 발명은 아라비노자일란(arabinoxylan), 베타-글루칸(β -glucan), 아라비노스 (arabinose) 및 자일로스 (xylose)로 구성된 균으로부터 선택된 하나 이상의 성분을 유효성분으로 함유하는 허혈성 질환 및 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료용 건강기능식품을 제공한다.

[0063] 본원에서 정의되는 허혈성 질환은 심근경색, 뇌경색, 허혈성 급성신부전증, 허혈성 급성간부전증, 당뇨병 족부 궤양, 당뇨병 신증, 외과수술 부작용에 기인한 허혈성 질환 또는 기관 조직 손상, 바람직하게는 심근경색, 뇌경색 등을 포함한다.

[0064] 본원에서 정의되는 외과수술 부작용에 기인한 허혈성 질환은 허혈성 심부전, 허혈성 신부전, 허혈성 간부전 또는 허혈성 뇌졸중, 바람직하게는 허혈성 심부전, 허혈성 뇌졸중 등을 포함한다.

[0065] 본원에서 정의되는 기관 조직 손상은 허혈 후 재관류를 동반하는 장기 수술 또는 이식, 외상성 절단사지 재접합으로 인한 것임을 특징으로 한다.

[0066] 상기 장기는 신장, 간장, 췌장, 폐 또는 심장 등을 포함한다.

- [0067] 본원에서 정의되는 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머형 치매, 뇌혈관성 치매, 파킨슨병, 근위축성 측삭경화증, 헌팅턴병, 피크(Pick)병, 크로이츠펠트-야콥 (Creutzfeldt-Jakob)병 또는 척수손상, 바람직하게는 알츠하이머형 치매, 뇌혈관성 치매, 파킨슨병 등을 포함한다.
- [0068] 본 발명에서 정의되는 “전분”은 소맥 (*Triticum aestivum* L.), 부소맥, 호밀 (*Secale cereale* L.), 쌀, 보리 (*Hordeum vulgare* var. *hexastichon* ASCH.), 맥아, 귀리 (*Avena sativa*), 옥수수 (*Zea mays* L.), 수수 (*Sorghum bicolor* MOENCH), 율무 (*Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* STAPF), 기장 (*Panicum miliaceum* L.), 조 (*Setaria italica* Beauv.) 또는 감자로부터 분리 정제된 전분, 바람직하게는 소맥 (*Triticum aestivum* L.), 호밀 (*Secale cereale* L.), 보리 (*Hordeum vulgare* var. *hexastichon* ASCH.), 귀리 (*Avena sativa*), 옥수수 (*Zea mays* L.), 쌀 또는 감자로부터 분리 정제된 전분, 보다 바람직하게는, 소맥으로부터 분리 정제된 전분, 옥수수로 부터 분리 정제된 전분, 쌀로부터 분리 정제된 전분 또는 감자로부터 분리 정제된 수용성전분, 가장 바람직하게는, 분자량 1,000,000 내지 10,000,000에 해당하는 소맥으로부터 분리 정제된 전분, 옥수수로 부터 분리 정제된 전분, 쌀로부터 분리 정제된 전분 또는 감자로부터 분리 정제된 수용성전분 임을 특징으로 한다.
- [0069] 본 발명에서 “식이섬유”은 소맥 (*Triticum aestivum* L.), 부소맥, 호밀 (*Secale cereale* L.), 쌀, 보리 (*Hordeum vulgare* var. *hexastichon* ASCH.), 맥아, 귀리 (*Avena sativa*), 옥수수 (*Zea mays* L.), 수수 (*Sorghum bicolor* MOENCH), 율무 (*Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* STAPF), 기장 (*Panicum miliaceum* L.), 조 (*Setaria italica* Beauv.) 또는 감자로부터 분리 정제된 총 식이섬유, 바람직하게는 소맥 (*Triticum aestivum* L.), 호밀 (*Secale cereale* L.), 보리 (*Hordeum vulgare* var. *hexastichon* ASCH.), 귀리 (*Avena sativa*), 옥수수 (*Zea mays* L.) 또는 현미로부터 분리 정제된 총 식이섬유를 포함하며, 보다 바람직하게는 소맥 (*Triticum aestivum* L.)으로부터 분리 정제되고 아라비노자일란(arabinoxylan), 베타글루칸(β -glucan) 및 아라비노갈락탄(arabinogalactan)의 상대적 중량비가 전체의 5~20: 1 : 1~10 을 포함하며, 보다 더 바람직하게는 소맥 (*Triticum aestivum* L.)으로부터 분리 정제되고 약 50,000 내지 400,000달톤 범위의 아라비노자일란(arabinoxylan) 및 베타-글루칸(β -glucan)으로 구성되는 총 식이섬유를 포함한다.
- [0070] 본 발명에서 “아라비노스”와 “자일로스”는 각각 L형과 D형을 포함하며, 보다 바람직하게는 자연에서 생성되는 즉, 아라비노스(arabinose)는 L형, 자일로스(xylose)는 D형을 포함한다.
- [0071]
- [0072] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0073] 본 발명의 전분은 하기와 같이 수득될 수 있다.
- [0074] 건조 후, 잘게 부순 벼과식물의 열매, 바람직하게는 소맥, 부소맥, 호밀, 현미, 보리, 맥아, 귀리, 옥수수, 수수, 율무, 기장 또는 조의 열매, 더욱 바람직하게는 소맥 열매를 잘게 부순 후, 열매의 수분함량이 10 내지 100%, 바람직하게는 50 내지 70% 범위가 되도록 물을 넣어 반죽을 만든 후, 이 반죽을 나일론 망사 등의 망사체를 이용하여 넣어 흐르는 물로 반죽하면서 전분이 흘러나오도록 하고, 흘러나온 전분을 원심 분리하여 가라앉은 침전물을 수득하고, 물에 부유시켜 1 내지 7회, 바람직하게는 3 내지 5회 원심 분리하여 순수한 전분을 수득할 수 있다.
- [0075] 또한 본 발명의 식이섬유는 하기와 같이 수득될 수 있다.
- [0076] 건조 후, 잘게 부순 벼과식물의 열매, 바람직하게는 소맥, 부소맥, 호밀, 현미, 보리, 맥아, 귀리, 옥수수, 수수, 율무, 기장 또는 조의 열매, 더욱 바람직하게는 소맥, 현미 또는 옥수수 열매 각각을 잘게 부순 후, 각 중량의 약 1 내지 15배의 부피, 바람직하게는 약 5 내지 10배 분량의 물, 에탄올, 메탄올 등과 같은 C₁ 내지 C₄의 저급알콜 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물, 또는 약 1: 0.1 내지 1: 10의 혼합비를 갖는 이들의 혼합용매, 보다 바람직하게는 물 또는 약 1: 0.1 내지 1: 10의 혼합비를 갖는 물 및 에탄올 혼합용매를 가하고 20 내지 100℃, 바람직하게는 25 내지 100℃의 추출온도에서 약 0.5시간 내지 2일, 바람직하게는 1시간 내지 1일 동안 냉침추출, 열수추출, 초음파 추출, 환류냉각 추출, 약탕기 추출법 등의 추출방법으로, 바람직하게는 약탕기 추출법으로 약 1회 내지 12회, 바람직하게는 3회 내지 4회 반복하여 추출한 후에 여과하고, 여과한 추출물을 진

공회전농축기로 20 내지 100℃, 바람직하게는 40 내지 70℃에서 감압농축한 후 추출된 잔사를 진공 동결건조기로 건조하여 베타과식물 조추출물을 수득하고, 상기 조추출물에 대해 우선 건조 후 당 함량이 50% 이상이면 에탄올을 사용하여 당을 제거하는데, 바람직하게는 85% 에탄올을 사용하여 침전시킨 물질을 건조하고 시료에 대해 10 내지 70배, 바람직하게는 30 내지 50배의 비율로 완충 용액에 잘 녹이고, 50 내지 120℃, 바람직하게는 70 내지 90℃에서 10 내지 60분, 바람직하게는 25 내지 45분간 알파-아밀라아제를 처리하고, 30 내지 90℃, 바람직하게는 50 내지 70℃에서 프로테아제(protease)를 처리함으로써 단백질을 제거하고 아세트산을 이용하여 pH 4.1 내지 4.5 바람직하게는 pH 4.2 내지 4.4로 조절하고 20 내지 100℃, 바람직하게는 50 내지 70℃에서 아밀로글루코시다제(amyloglucosidase)를 처리 한 후에 전체 용액 부피의 약 1 내지 7배, 바람직하게는 3 내지 5배의 부피의 에탄올로 침전시키고 건조시키는 단계를 통하여 본 발명의식이섬유를 수득할 수 있다.

- [0077] 본 발명은 상기 제조방법으로 수득된 본 발명의 전분 또는 식이섬유를 유효성분으로 함유하는 허혈성질환 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [0078] 상기와 같이 본 발명의 전분, 식이섬유, 아라비노자일란, 베타-글루칸, 아라비노스 및 자일로스는 통상적인 모든 추출, 분리, 정제방법에 의해 수득되거나, 시판되는 시약을 사용할 수도 있다.
- [0079] 본 발명의 전분 및 식이섬유는 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.
- [0080] 본 발명의 전분 또는 식이섬유를 포함하는 약학조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0081] 본 발명의 전분 또는 식이섬유를 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0082] 본 발명에 따른 전분 또는 식이섬유를 포함하는 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴, 카르복시메틸셀룰로스(carboxymethyl cellulose) 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골(macrogol), 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0083] 본 발명의 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다.
- [0084] 본 발명의 전분 또는 식이섬유의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으나, 전분은 0.1 내지 1000 mg/kg의 양을 1일 1회 내지 수회 투여할 수 있고, 식이섬유는 0.01 내지 100 mg/kg의 양을 1일 1회 내지 수회 투여할 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니며, 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다.
- [0085] 본 발명은 전분 또는 식이섬유를 유효성분으로 함유하는 허혈성 질환 및 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료용 건강기능식품을 제공한다.
- [0086] 본원에서 정의되는 "건강기능식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진

원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0087] 본 발명의 허혈성 질환 및 퇴행성 뇌질환의 예방 및 개선을 위한 건강기능식품은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 전분 또는 식이섬유를 0.01 내지 95 %, 바람직하게는 1 내지 80 % 중량백분율로 포함한다.

[0088] 또한, 허혈성 질환 및 퇴행성 뇌질환의 예방 및 개선을 위한 목적으로 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 환제, 현탁액, 에멀전, 시럽 등의 약학투여형태 또는 건강음료 등의 형태인 건강기능식품으로 제조 및 가공이 가능하다.

[0089] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 전분을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제 (타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 1~ 20 g, 바람직하게는 약 5~ 12 g이다.

[0090] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0091] 또한, 본 발명의 전분 및 식이섬유는 허혈성질환 및 퇴행성 뇌질환의 예방 효과를 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 전분 또는 식이섬유의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1g의 비율로 가할 수 있다.

효 과

[0092] 본 발명의 전분 및 식이섬유는 저산소 조건, 베타-아밀로이드 및 하이드록시도파민 (6-hydroxydopamine) 처리 하에서 배양된 세포에 처리하였을 때 세포 생존능을 개선하는 효과를 가지며 또한 심근경색, 뇌경색, 건망증 유발 동물모델에서 기억력 감퇴의 완화 및 혈관성 치매 유발 동물모델에서도 치매의 완화 효과를 가지므로 허혈성 질환 및 퇴행성 뇌질환의 치료를 위한 의약 및 건강기능식품에 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0093] 이하, 본 발명을 하기의 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0094] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0095] 참고예 1. 시료 준비

[0096] 옥수수로부터 분리 정제된 전분 (제품번호 S4180 ; 이후 SC로 명명함), 쌀로부터 분리 정제된 전분 (제품번호 S7260 ; 이후 SR로 명명함), 감자로부터 분리 정제된 수용성 전분 (제품번호 S9765 ; 이후 SS로 명명함)은 모두 시그마사 (Sigma, USA)로부터 구입하여 사용하였고, 식이섬유의 대표적 구성성분인 아라비노자일란 (arabinoxylan)은 중간 점성 (medium viscosity)을 가진 것 (제품번호 P-WAXYM : from wheat, viscosity : 25 cSt, MW :270,000 daltons.), 베타-글루칸(β -glucan)도 중간 점성을 가진 것 (medium viscosity) (제품번호 P-BGBM : from barley viscosity : 28 cSt, MW :260,000 daltons)을 메가자임사 (Megazyme)에서 구입하여

사용하였다. 또한 아라비노자일란의 대표적인 구성물질인 아라비노스(arabinose) (제품번호 A3256 : L(+) form , MW 150.13) 는 시그마사 (Sigma, USA)에서 구입하여 사용하였고 자일로스(xylose) (제품번호 95729 : D(+) form , MW 150.13) 는 플루카사 (Fluka, Germany)에서 구입하여 사용하였다.

[0097] **참고예 2. 실험동물의 준비**

[0098] 실험동물은 체중 250-300 g의 스프라그-다우리 (Sprague-Dawley)계 수컷 랫트 (효창사이언스 사)를 사용하였고, 대구카톨릭의대 동물사육실에서 일정한 조건(온도: 21± 2 °C, 명암: 12시간 명암주기)에서, 사료와 음수의 자유로운 섭취가 가능하도록 실험시작 전까지 물과 먹이를 충분히 제공하여, 실험시작 전에 실험동물을 10분 동안 사전취급 (handling) 하였다.

[0099] **실시예 1. 벼과식물 조추출물의 제조**

[0100] 시중에서 구입한 소맥을 시료로 하여 깨끗이 수세하고, 재래식 약탕기추출법에 따라서 소맥 100g에 물 2 ℓ를 가하고 2시간 동안 전기 약탕기(대용약탕기 DWP-2000, 대용)에서 2회 반복하여 추출한 후, 여과하였다. 여과하여 얻은 추출물 2 ℓ를 냉동건조하여 소맥 물추출물 22 g을 수득하였다 (이하 HY6228로 명명함). 한편, 현미 및 옥수수에 대해서도 상기 소맥 추출물 제조방법과 동일한 방법을 적용하여 100 g 당 각각 20 g 및 9 g을 수득하였다 (이하 HY6228A, HY6228F로 명명함).

[0101] 또한, 상기 HY6228 내에 존재하는 작은 분자량(M.W.6-8,000)의 물질을 제거하기 위해 HY6228 10g을 100ml 증류수에 현탁하여 투석막 (dialysis membrane; Spectra/Por 1-132675, Spectrumlabs)에 넣고 500ml의 증류수 상에서 4°C 냉장고에서 24시간동안 교반시켜 주면서 3일동안 500ml의 증류수를 3번 교체하여 투석막 안의 용액을 동결건조한 후 고분자량 물질 함유 소맥 물추출물 6.66g을 수득하였다 (이하 HY6228d로 명명함).

[0102] **실시예 2. 벼과식물 식이섬유의 제조**

[0103] 벼과식물 중 실시예 1에서 수득한 소맥의 조추출물을 이용하여 총 식이섬유 (total dietary fiber, TDF)를 문헌 (Lee SC et al., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 75, pp395-416, 1992; Prosky L et al., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71, pp1017-1023)에 기재된 방법을 적용한 메가자임 (Megazyme) 회사의 방법 (TDFR 06/01)으로 제조하였다.

[0104] 실시예 1에서 얻어진 HY6228 10 g를 500ml 병에 넣고, 여기에 400 ml의 MES/TRIS 완충액 (각각 0.05M, pH8.0, 24°C)을 넣어 잘 섞어 준 후 70µl α-아밀라아제 (Termamyl 23 mg/ml, 930 U/mg, Denmark)를 넣어 80 °C 진탕 항온수조에서 35분 동안 반응시켰다. 반응 후, 실온에서 60°C로 냉각시킨 다음 1000 µl 프로테아제 (~350U/ml, Megazyme cat. no. E-BSPRT)를 넣어 60 °C 진탕항온수조에서 30분 동안 반응 시켰다. 그 후 3M 아세트산으로 pH를 4.3으로 맞추고 2000µl의 아밀로글루코시다제 (amylglucosidase, 3,300U/ml Megazyme cat. no. E-AMGDF)를 넣어 60 °C의 진탕항온수조에서 30분 동안 반응시켰다. 60°C로 미리 예열한 95% EtOH 1600ml을 넣어 잘 섞은 다음 상온에서 60분간 정치시켰다. 이것을 원심분리하여 얻어진 침전물을 수거하여 건조한 결과 2.3 g의 총 식이섬유 (TDF)가 얻어졌다.

[0105] **실시예 3. 아라비노자일란 (arabinoxylan)과 베타-글루칸 (β-glucan)등을 포함하는 식이섬유(TDF)를 구성하는 당의 조성에 관한 분석실험**

[0106] 하기의 실시예에서 사용하는 식이섬유(TDF)를 구성하는 아라비노자일란(arabinoxylan: arabinose와 xylose)과 베타-글루칸의 조성을 알기 위해 아라비노스 (arabinose), 자일로스 (xylose), 글루코스 (glucose) 및 갈락토스 (galactose)의 분석을 세종대학교 탄수화물소재연구소(<http://www.carbo.or.kr>)에 의뢰하여 실험하였다.

[0107] 우선, 식이섬유(TDF)를 2 mg/ml 농도로 만든 후 트리플루오루아세트 산(trifluoroacetic acid)으로 100°C에서 4시간 동안 산가수 분해 한 후, 이 중 10 µl (총 0.2 µg)을 CarboPac™ PA1 칼럼 (HPAEC-PAD system, Dionex, USA)에 주입하여 18 mM NaOH로 1.0 ml/min의 유량으로 용출 (elution)시켰다 (Houben R et al., *J. Cereal Sci.*, 26, pp37-46, 1997). 그 결과 도 1과 같은 결과를 얻었으며, 표준품과 비교한 결과 용출되어 나오는 순

서대로 아라비노스 (Ara), 갈락토스 (Gal), 포도당 (Glc) 및 자일로스 (Xyl)가 관찰되었다. 이 것의 면적으로부터 각각 성분의 용량을 계산한 결과 각각 69.5 pmol (10.4 ng), 27.0 pmol (4.9 ng), 652.7 pmol (117.5 ng) 및 81.6 pmol (12.2 ng)이었다. 그런데 소맥에서의 갈락토스는 아라비노갈락탄 (arabinogalactan)으로부터 오고 아라비노갈락탄 내에서의 아라비노스 양은 갈락토스의 0.7배에 해당하므로 (Virkki L et al, *Carbohydr. Res.*, **343**, pp521-529, 2008) 측정된 아라비노스 값 (10.4 ng)에서 아라비노갈락탄에서 온 아라비노스 값 (3.4 ng)을 빼면 아라비노자일란으로부터 온 아라비노스는 7 ng이 된다. 따라서, ara/xyl (중량비) = 0.58로 문헌에 보고된 값 (Ordaz-Ortiz JJ, et al., *J. Cereal Sci.*, **42**, pp119-125, 2005)과 일치하였으며, 0.2 µg (200 ng)의 식이 섬유(TDF)에 들어있는 아라비노자일란의 양은 19.2 ng (9.6%, 중량비)이 되며, 아라비노갈락탄은 8.3 ng (4.1%, 중량비)이 된다.

[0108] 한편, 식이섬유(TDF)에 들어있는 포도당은 베타-글루칸뿐만 아니라 셀룰로스 및 저항성 전분 (resistant starch) 등으로부터 올 수 있으므로 식이섬유(TDF)에 들어있는 베타-글루칸의 양을 McCleary method인 mixed-linkage β-glucan assay kit를 사용하여 따로 측정하였다 [Mixed linkage beta-glucan assay procedure (McCleary method), Megazyme K-BGLU 04/06]. 이 방법에서는 베타-글루칸만을 분해하는 효소인 리체나제 (lichenase)를 이용하여 일부 분해한 후 이 것을 베타-글루코시다제 (β-glucosidase)를 이용하여 완전 분해한다. 이 때 생성된 포도당의 양은 글루코스 옥시다제/페로시다제 (glucose oxidase/oxidase) 시약을 이용하여 생긴 색깔을 510 nm에서 측정하여 얻는다. 그 결과 TDF에 들어있는 베타-글루칸은 약 1.1% (중량비)였다.

[0109] 상기의 실험결과를 요약하면, 본 연구에서 사용된 식이섬유(TDF)에는 아라비노자일란 (ara/xyl=0.58), 베타-글루칸, 및 아라비노갈락탄은 각각 9.6%, 1.1% 및 4.1% (중량비)가 들어있으며, 베타-글루칸 이외의 포도당은 115.3 ng (57.7%, 중량비)이 들어있다.

[0110]

[0111] **실시예 4. 벼과식물 전분의 제조**

[0112] 벼과식물 중 소맥으로부터의 전분 (SW)의 분리는 문헌 (Van Der Borgh et al., *J. Cereal Sci.*, **41**, pp221-237, 2005)에 기재된 방법을 이용하여 제조하였다. 50g의 밀가루에 물을 첨가하여 50%의 수분함량이 되도록 반죽을 만든 후, 이것을 나일론 망사 (nylon bolting cloth, 50 µm)에 넣었다. 이것을 흐르는 물에 주물러서 천 사이로 희고 흐린 물이 나오지 않을 때까지 얻어진 것을 원심 분리하여 그 침전물을 전분 (SW)으로 확보하였다.

[0113]

[0114] **실험예 1. 저산소 조건 하에서 전분의 세포생존능 개선 활성 측정 (in vitro)**

[0115] 벼과식물 조추출물 또는 이로부터 분리된 전분과 식이섬유가 저산소 조건에서 세포의 생존에 미치는 영향을 조사하기 위하여 하기와 같이 실험을 수행하였으며, 세포생존을 개선시키는 정도를 문헌에 기재된 MTT 어세이법 (Hoffman RM, In *Cell Biology* (Celis JE (Ed.), Academic Press, New York, Vol. 1, pp369-370, 1994)을 변형하여 측정하였다.

[0116] 인간 간암세포주 (human hepatoma cell line)인 HepG2 (ATCC HB 8065, 미국)를 항생제로는 페니실린 지 (penicillin G sodium, 100 Units/ℓ, Invitrogen, USA) 및 스트렙토마이신 (streptomycin sulfate, 100 mg/L, Invitrogen, USA)과 혈청으로는 10 % 우태아혈청 (fetal bovine serum, Invitrogen, USA)이 첨가된 이글 최소 배지 (EMEM, Eagle's minimum essential medium; Invitrogen, 미국)를 사용하여 12웰 플레이트 (12well-plate)에서 2×10^5 세포수/800 µℓ배지로 배양하였다. 세포들을 37 °C 및 5 % CO₂-95% 대기상태에서 48시간 동안 배양하고 새로운 배양배지로 교체한 후, 상기 실시예의 조추출물, 전분들 및 식이섬유를 100% 디메틸설폭시화물 (DMSO; dimethyl sulfoxide)에 50 mg/ml 농도로 녹인 후, 최종농도를 100, 200, 400 및 800 µg/ml (총 식이섬유인 TDF는 100, 1000 µg/ml)로 하여 배양배지에 첨가한 실험군 및 아무것도 첨가하지 않은 음성대조군 (negative control)을 저산소 (산소농도 1 %) 조건에서 각각 2일 동안 배양하면서 하기의 MTT 어세이를 수행하여 그 결과를 도 2a 및 도 2b에 나타냈다.

[0117] 도 2a에 나타난 바와 같이, SR, HY6228A, SW 및 HY6228d는 200 µg/ml 이상 농도에서, HY6228, SC 및 HY6228F는 400 µg/ml 이상 농도에서, SS는 800 µg/ml 이상 농도에서 각각 세포 생존능 개선 효과를 나타내었다.

- [0118] 또한, 도 2b에 나타난 바와 같이, HY6228은 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 세포생존능 개선 효과가 확실히 나타났다.
- [0119]
- [0120] 상기와 같이, 벼과식물인 소맥, 현미 (쌀) 및 옥수수 조추출물 뿐만 아니라 이로부터 분리된 전분 또한 저산소 조건에서 세포생존을 개선시키는 효과를 나타내었다. 그러나 총 식이섬유는 저산소 조건에서 세포생존을 개선시키지 못하였다. 선행연구 (대한민국 특허등록번호 제10-0723950호 및 국제출원번호 PCT/KR2006/000027)에 의하면, 저산소 조건에서 세포생존을 개선시키는 소맥 조추출물이 뇌경색 등의 허혈성질환 뿐만 아니라 알츠하이머 병 등 퇴행성뇌질환에 대한 치료효과를 나타내었으므로, 선행연구의 조추출물과 비교하여 그 이상의 탁월한 세포생존능 개선 효과를 나타내는 본 발명의 벼과식물 유래 전분 또한 동일 질환의 치료에 효과를 나타낼 것으로 예상할 수 있다.
- [0121] **실험예 2. 베타-아밀로이드 (β -amyloid) 존재 하에서 전분 및 식이섬유의 세포생존능 개선 활성 측정 (*in vitro*)**
- [0122] 벼과식물 조추출물 또는 이로부터 분리된 전분 및 식이섬유가 알츠하이머병을 유발하는 베타-아밀로이드를 첨가한 조건하에서 세포의 생존에 미치는 영향을 조사하기 위하여 하기와 같이 실험을 수행하였으며, 세포생존을 개선시키는 정도를 문헌에 기재된 MTT 어세이법 (Hoffman RM, In *Cell Biology* (Celis JE (Ed.), Academic Press, New York, Vol. 1, pp369-370, 1994)을 변형하여 측정하였다.
- [0123] 인간 신경아세포종 세포주 (human neuroblastoma cell line)인 SH-SY5Y (ATCC CRL-2266, 미국)를 항생제로는 페니실린 지 (penicillin G sodium, 100 Units/ ℓ , Invitrogen, USA) 및 스트렙토마이신 (streptomycin sulfate, 100 mg/L, Invitrogen, USA)과 혈청으로는 10 % 우태아혈청 (fetal bovine serum, Invitrogen, USA) 이 첨가된 Dulbecco 's modified eagle medium (DMEM)/F12 90% 배지 (Invitrogen, 미국)를 사용하여 48웰 플레이트 (48well-plate)에서 4×10^4 세포수/300 μl 배지로 배양하였다. 세포들을 37 $^{\circ}\text{C}$ 및 5 % CO_2 -95% 대기상태에서 48시간 동안 배양하고 새로운 배양배지로 교체한 후, 베타-아밀로이드 (β -amyloid, Sigma, 미국)만을 최종 농도가 0, 2.5, 7.5 및 25 μM 이 되도록 첨가한 군 ($A\beta_{25-35}$ alone), 또는 상기와 동일한 농도의 베타-아밀로이드에 100% 디메틸설폭사이드 (DMSO; dimethyl sulfoxide)에 50 mg/ml 농도로 녹인 전분, 총식이섬유 또는 조추출물들을 최종농도가 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (전분, 총식이섬유) 또는 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (조추출물)이 되도록 첨가한 군 ($A\beta_{25-35}$ + SS 또는 SW)으로 나누어 각각 1일 동안 배양하였다. 배양 후, 상기 세포들에 MTT 용액을 최종농도 1 mg/ml로 가하고 2시간 동안 배양한 다음 DMSO로 용해시켜 리더 (microplate reader, FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH, Germany)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 결과를 하기와 같이 도 3a 내지 3e에 나타내었다.
- [0124] 도 3a 및 3b에 나타난 바와 같이, 0-25 μM 농도의 베타-아밀로이드에 SW (도 3a 참조) 또는 SS (도 3b 참조)를 각각 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 씩 첨가한 경우, 2.5 μM 농도 이상의 베타-아밀로이드 존재하에서 벼과식물로부터 분리 정제된 전분은 베타아밀로이드에 의한 독성을 유의하게 감소시켰다 [$p < 0.05$ (*) 또는 0.01 (**)].
- [0125] 상기 결과로 벼과식물 추출물 또는 벼과식물 유래 전분들은 25 μM 의 베타-아밀로이드 농도에서 세포생존 개선 효과가 가장 탁월하였으므로, 베타-아밀로이드 농도를 25 μM 로 고정해두고 소맥 조추출물인 HY6228 (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 SS, SC, SR, SW (125 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 각각 첨가하여 배양한 후 그 결과를 도 3c에 나타내었다. 또한 베타-아밀로이드 농도를 25 μM 로 고정해 두고 소맥에서 유래한 식이섬유 (500, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 각각 첨가하여 배양한 후 그 결과를 도 3d 에 나타내었다.
- [0126] 또한 베타-아밀로이드 농도를 15 μM 로 고정해 두고 식이섬유에서 유래한 아라비노자일란 (arabinoxylan) (AX) (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 아라비노스 (arabinose) (Ara) (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 자일로스 (xylose) (Xyl) (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 베타글루칸 (β -glucan) (b-glu) (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 각각 첨가하여 배양한 후 그 결과를 도 3e 에 나타내었다.
- [0127] 실험 결과, 도 3c에 나타난 바와 같이, 베타-아밀로이드만 첨가한 경우에 비해 벼과식물로부터 분리 정제된 전분들을 함께 첨가한 군은 모두 세포생존을 유의하게 개선시켰으며 (도 3c 참조), 도 3d에 나타난 바와 같이, 베타-아밀로이드만 첨가한 경우에 비해 소맥에서 유래한 총 식이섬유를 첨가한 군은 세포생존을 개선시켰다 (도 3d),

- [0128] 또한, 도 3e에 나타난 바와 같이, 베타-아밀로이드만 첨가한 경우에는 세포생존이 60.4%로 감소하였으나, 아라비노사일란, 아라비노스, 자일로스 및 베타글루칸을 첨가한 경우에는 세포생존이 각각 75.5%, 71.1%, 72.1% 및 70%로 세포생존을 유의 ($p < 0.05$)하게 개선시켰다 (도 3e).
- [0129] 상기 결과로 베타식물로부터 분리 정제된 전분 및 식이섬유는 베타식물 조추출물과 마찬가지로 베타-아밀로이드에 의한 세포독성을 낮추어 세포생존능 개선 효과를 나타내는 것을 알 수 있으며, 이로부터 베타식물로부터 분리 정제된 전분 및 식이섬유가 베타-아밀로이드의 축적에 의해 발생하는 질환인 알츠하이머병의 치료에도 효과를 나타낼 수 있다는 것을 알 수 있다.
- [0130] **실험예 3. 하이드록시도파민 (6-hydroxydopamine) 존재 하에서 조추출물 (HY6228)의 세포생존능 개선 활성 측정 (in vitro)**
- [0131] 베타식물 조추출물이 파킨슨병을 유발할 수 있는 하이드록시도파민을 첨가한 조건하에서 세포의 생존에 미치는 영향을 참고문헌 (Guo S et al., *Free Radic. Biol. Med.*, 39(5), pp682-695, 2005)에서와 같은 방법을 이용하여 조사하기 위하여 하기와 같이 실험을 수행하였으며, 세포생존을 개선시키는 정도는 문헌에 기재된 MTT 어세이법 (Hoffman RM, In *Cell Biology* (Celis JE (Ed.), Academic Press, New York, Vol. 1, pp369-370, 1994)을 변형하여 측정하였다.
- [0132] 인간 신경아세포종 세포주 (human neuroblastoma cell line)인 SH-SY5Y (ATCC CRL-2266, 미국)를 항생제로는 페니실린 지 (penicillin G sodium, 100 Units/ ℓ , Invitrogen, USA) 및 스트렙토마이신 (streptomycin sulfate, 100 mg/L, Invitrogen, USA)과 혈청으로는 10 % 우태아혈청 (fetal bovine serum, Invitrogen, USA)이 첨가된 Dulbecco 's modified eagle medium (DMEM)/F12 90% 배지 (Invitrogen, 미국)를 사용하여 48웰 플레이트 (48well-plate)에서 6×10^4 세포수/300 $\mu\ell$ 배지로 배양하였다. 세포들을 37 $^{\circ}\text{C}$ 및 5 % CO_2 -95% 대기상태에서 배양한 이튿날 6-hydroxydopamine (6-OHDA : Sigma-Aldrich Co., 미국)를 250 μM 의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양 (HY6228은 0.25, 0.5, 1 mg/ml의 농도로 만들어 6-OHDA를 첨가하기 30분 전에 처리하였다) 한 후, 상기 세포들에 MTT 용액을 최종농도 1 mg/ml로 가하고 2시간 동안 배양한 다음 DMSO로 용해시켜 리더 (microplate reader, FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH, Germany)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 결과를 하기도 4에 나타내었다.
- [0133] 도 4에 나타난 바와 같이, HY6228을 1 mg/ml로 첨가한 경우 HY6228을 첨가하지 않은 경우에 비해 세포생존을 유의하게 개선시켰다 [$p < 0.01$].
- [0134] 상기 결과로 베타식물 조추출물은 하이드록시도파민에 의한 세포독성을 낮추어 세포생존능 개선 효과를 나타내는 것을 알 수 있으며, 이로부터 베타식물 조추출물은 파킨슨병의 치료에도 효과를 나타낼 수 있다는 것을 알 수 있다.
- [0135] **실험예 4. 경구투여 시, 전분 및 식이섬유의 심근경색에 대한 효과 시험 (in vivo)**
- [0136] 전분 및 식이섬유의 심근경색에 대한 치료 효과를 검증하기 위해서 문헌 (Haisong J et al., *Circulation*, 97, pp892-899, 1998)에 기재된 실험을 변형하여 상기 참고예 1에서 준비한 랫트로 하기와 같이 심근경색모델을 만들어 전분 및 식이섬유의 경구투여 시, 그 효과를 측정하였다.
- [0137] 상기 참고예 1의 랫트에 10 mg/kg의 케타민 (ketamine, 유한, 대한민국)과 5 mg/kg의 자이라진 (xylazine, Sigma, 미국)을 투여하여 마취를 유도하고 기도에 삽관한 후 전신마취 시켰다. 그 후, 흉골을 절제하여 흉부를 연 다음, 심장을 도출시키고 5-0 prolene 봉합실을 좌관상동맥 (LAD)의 윗부분을 통과시켜서 PE 50을 이용하여 올가미 모양으로 만들어 혈관을 폐색시켜 허혈상태를 30분 동안 유지하고 다시 죄었던 PE 50을 느슨하게 함으로 3시간 동안 재관류를 실시하였다.
- [0138] 심근경색 부위의 조사는 에반스 블루 다이 (EVANS blue dye, Sigma, 미국)와 TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, Sigma, 미국) 염색을 통하여 일정군의 경색 부위 크기를 측정하여 전분 및 식이섬유의 효과를 다음과 같이 관찰하였다. 먼저 허혈-재관류가 끝난 후 바로 다시 PE 50을 죄어서 허혈상태와 동일한 상태로 만들어 준 후 1% 에반스 블루 다이 용액을 2 ml 정도 정맥투여 하여 랫트 전체를 순환시켜주고 그 후 심장을 적출하여 우

심실 및 우심방을 제거하고 2-3 mm 의 두께로 자른 뒤 단면적의 사진을 찍어 영상분석시스템 (Quantity One 4.2, Bio-Rad, 미국)으로 다이가 염색된 곳과 염색되지 않은 곳의 면적을 측정하여 혈액이 지나가지 않은 지역 (Area At Risk, AAR /LV%)의 면적을 구하였다. 그 후 다시 그 심장조각들을 37 °C에서 1% TTC 용액으로 15분 동안 염색시킨 후 10% 포르말린 용액에 고정하여 다음날 다시 단면적을 측정하여 전체 면적에 대한 조직이 죽은 흰 지역의 면적, 즉 경색부위의 면적 (Infarcted Area, IA/LV%)을 구하였다. 그리고 AAR에 대한 IA의 비로 대조군과 실험군을 비교하였다.

[0139] 상기 실시예 1의 HY6228과 실시예 2의 소맥에서 분리 정제된 전분과 식이섬유, 식이섬유의 대표적인 구성성분들의 심근경색모델 만들기 3일전부터 가루로 된 사료와 섞여 먹이고 심근경색모델을 만든 후에 피사부위의 면적을 조사하였다. 이 때 독성을 나타내지 않는 안전량 및 효과를 나타내는 용량인 적정 투여량 결정을 위하여, 상기 실험예 1의 결과를 바탕으로 가능한 최소량을 시작점으로 잡아 단계별로 상승시키는 방법을 이용하였다. 이를 위해 용량 증가는 2배수 증가법을 채택하였으며, 100 mg/kg로 시작할 경우 200 mg/kg, 400 mg/kg 등으로 증가시켰다.

[0140] 좌관상동맥을 묶어 허혈을 유발하기 3일 전에 400 mg/kg/day 의 HY6228과 전분을, 10 mg/kg/day의 식이섬유와 식이섬유의 대표적인 구성성분들인 아라비노자일란, 베타-글루칸, 아라비노스 및 자일로스를 사료 20g와 각각 섞어 자유롭게 먹이고, 심근경색을 유발시키고 손상 면적을 측정하여 IA(%AAR)의 값을 계산하여 전분 및 식이섬유의 효과를 비교하였다.

[0141] 상기 실험을 수행한 결과, 시료를 투여하지 않은 랫트 (57 마리, 대조군, Control)는 IA(%AAR)가 51.8 % 인데 비해 소맥 조추출물을 투여한 랫트 (9 마리, 실험군, HY6228)는 42.3 %, 전분을 투여한 랫트 (8 마리, 실험군, SW)는 40.6 %에 불과하였다. 이는 피사부위의 부피가 각각 18.3 %, 21.6% 정도 (p<0.05) 감소한 것으로써, 전분을 경구투여 했을 경우, 소맥 조추출물만큼 심근경색에 탁월한 효과가 있음을 확인할 수 있었다 (도 5a 참조). 또한 소맥에서 분리 정제된 식이섬유를 투여한 랫트 (9마리, 실험군, TDF)의 IA(% AAR) 가 40.2% 로 역시 피사부위의 부피가 대조군 대비 22.4% (p<0.05) 감소한 것으로써, 식이섬유를 경구투여 했을 경우도 소맥 조추출물만큼 심근경색에 탁월한 효과가 있음을 확인할 수 있었다 (도 5b 참조). 또한 시료를 투여하지 않은 랫트 (29 마리, 대조군, Control)는 IA(%AAR)가 50.6 %인데 비해 베타-글루칸 (β - glucan)을 투여한 랫트 (11 마리, 실험군, b-glu 10)는 43.8 %, 아라비노자일란 (arabinoxylan) 을 투여한 랫트 (6 마리, 실험군, AX 10)는 42.3 %, 아라비노스 (arabinose) 를 투여한 랫트 (11 마리, 실험군, ara 10)는 43.4 %, 자일로스 (xylose) 를 투여한 랫트 (6 마리, 실험군, xyl 10)는 42.1 %에 불과하였다. 이는 피사부위의 부피가 각각 13.4 %, 16.4%, 14.2%, 16.8% 정도 (p<0.05) 감소한 것으로써, 식이섬유의 대표적인 구성성분들을 경구투여 했을 경우, 소맥 조추출물만큼 심근경색에 탁월한 효과가 있음을 확인할 수 있었다 (도 5c 참조)

[0142] 실험예 5. 경구투여 시, 전분 및 식이섬유의 뇌경색에 대한 효과 시험 (in vivo)

[0143] 전분과 식이섬유의 뇌경색에 대한 치료 효과를 검증하기 위하여 문헌 (Han HS et al., J. Neurosci., 22, pp3921-3928, 2002)에 기재된 실험을 변형하여 상기 참고예 1의 랫트로 뇌경색모델을 만들어 하기와 같이 동물 실험을 수행하였다.

[0144] 상기 참고예 1의 랫트를 엔플루란 (enflurane, 중외제약, 대한민국)으로 흡입 마취시킨 후 하지동맥에서 혈압측정 및 혈액 채취 경로를 확보하고 경부를 절개하여 경동맥을 노출시킨 후, 경동맥과 외경동맥을 결찰하고 내경동맥으로 3-0 나일론 봉합사를 넣어 중간대뇌동맥 (middle cerebral artery)을 막아서 뇌경색 모델을 만들었다. 중간대뇌동맥을 막아 허혈을 유발하기 7일 전부터 수술 전 24시간 전까지 상기 실시예 1의 HY6228을, 실시예 3의 전분을 7일 동안 매일 400 mg/kg (0.5 ml)을 경구로 투여하였으며, 허혈 유발 후 2 시간동안 허혈 상태로 방치한 뒤 봉합사를 제거하고 동물을 회복시켰다. 또한 실시예 2의 총식이섬유를 7일 동안 매일 50 mg/kg (0.5 ml)을 경구로 투여하였다. 22 시간 경과 후 실험동물을 안락사 시켜 뇌조직을 적출하여 TTC 용액에 넣어 염색한 후, 뇌반구에 대한 손상정도를 영상분석 시스템으로 측정하여 하기 수학적 1과 같은 방법으로 허혈지수 (ischemic index)를 계산하여 약물의 효과를 비교하였다.

수학적 1

[0145] 허혈지수 (%) = A/B × 100

- [0146] A: 뇌 반구(半球) 중 손상 부위의 부피(mm³),
- [0147] B: 뇌 반구의 전체 부피(mm³).
- [0148]
- [0149] 상기 실험을 수행한 결과, 시료를 투여하지 않은 랫트 (12마리, 대조군, Control)는 허혈지수가 93 %인데 비해, 전분을 투여한 랫트 (6마리, 실험군, SW)는 74.5 %로, 피사부위의 부피가 19.7 %정도(p<0.05) 감소한 것으로 나타나 전분도 뇌경색모델에서 효과가 있음을 확인할 수 있었다 (도 6 참조).
- [0150] **실험예 6. 경구투여 시, 소맥에서 분리 정제된 전분 및 식이섬유의 스코폴라민에 의해 유도된 치매에 대한 효과 시험 (in vivo)**
- [0151] 전분 및 식이섬유를 아세틸콜린 수용체의 길항제로 작용함으로써 기억력을 억제하는 스코폴라민에 의해 유도된 치매모델 (Lindner MD et al., *Psychopharmacol.* 188, pp629-640, 2006)에 대한 치료 효과를 검증하기 위하여 문헌 (Fan et al., *Neurosci. Lett.* 374, pp222-226, 2005)에 기재된 실험을 변형하여 상기 참고예 1의 랫트로 치매 유발 모델을 만들어 하기와 같이 동물실험을 수행하였다.
- [0152] 시료를 강제경구투여로 총 12일간 먹였으며, 시료를 먹이기 시작한 8일 째부터 랫트에 복강으로 매일 0.5 mg/kg의 스코폴라민 (scopolamine)을 5일 동안 주사하였다. 물미로 실험 또한 시료를 먹이기 시작한 8일 째부터 매일 시행하여 총 5일간 시행되었다. 실제 기억력 상실 정도는 물-미로검사 (water-maze test)로 확인되었다. 물-미로검사는 플랫폼 (지름 10 cm, 높이 25 cm)이 설치된 원통의 물탱크 (지름 180 cm, 높이 50 cm)와 랫트의 움직임을 기록하는 비디오 추적장치 (video-tracking system; Ethovision, Noldus, Netherlands)를 사용하여 시행하였다. 이 때 물의 온도는 22-23℃, 물의 높이는 플랫폼 위 2 cm까지로 하였다. 실제 실험은 실험용 랫트가 플랫폼까지 찾아가서 플랫폼에서 30초 이상 머무르면 찾아갈 때까지 걸린 시간을 탈출 잠복기 (escape latency)로 하였으며, 이를 하루 3회 실시하여 나온 평균값을 평균 탈출 잠복기 (mean escape latency)로 하였다. 이 때 평균 탈출 잠복기가 90초를 초과하는 경우에는 90초로 동일한 값을 취하였고, 5일 조사기간 동안에 랫트 한 마리당 총 15회의 실험을 실시하였다.
- [0153] 치매 유발 전, 상기 실시예 1의 HY6228과 실시예 3의 전분을 각각 200 mg/kg의 용량으로, 또 실시예 2의 식이섬유를 50 mg/kg의 용량으로 경구투여하거나 (실험군) 또는 생리식염수 (대조군)를 투여한 다음 8일째 0.5 mg/kg의 스코폴라민 (scopolamine)을 5일 동안 주사하면서 물-미로 테스트 (water-maze test)를 실시하였다.
- [0154] 상기 실험을 수행한 결과, 실험군은 손상을 주지 않은 랫트 (3마리, 겐보기군, Normal) 에 비해 플랫폼을 찾아가는 시간이 조금 더 걸리긴 하나 시료를 경구투여하지 않고 건망증을 유발시킨 랫트 (5마리, 대조군, SC)에 비해 전분을 경구투여하고 건망증을 유발시킨 랫트 (4마리, 실험군, SC + SW)는 실험기간인 6일간 중 4, 5일 째에 각각 플랫폼을 찾아가는 시간이 현저하게 감소하였다 (p<0.05) (도 7a 참조). 또한 식이섬유를 경구투여하고 건망증을 유발시킨 랫트 (7마리, 실험군, SC + TDF)도 시료를 경구투여하지 않고 건망증을 유발시킨 랫트 (4마리, 대조군, SC)에 비해 실험기간인 5일 중 4, 5일 째에 각각 플랫폼을 찾아가는 시간이 현저하게 감소하였다 (p<0.05) (도 7b 참조). 이러한 결과는 전분 및 식이섬유가 기억력의 감소를 억제하여 건망증 증상을 완화시킬 수 있다는 것을 나타낸다.
- [0155] **실험예 7. 경구투여 시, 소맥에서 분리 정제된 전분 및 식이섬유의 혈관성 치매에 대한 효과 시험 (in vivo)**
- [0156] 전분 및 식이섬유를 치매에 대한 치료 효과를 검증하기 위하여 문헌 (Cho KO et al., *J. Neurosci. Res.*, 83, pp285-291, 2006)에 기재된 실험을 변형하여 상기 참고예 1의 랫트로 혈관성치매 유발 모델을 만들어 하기와 같이 동물실험을 수행하였다.
- [0157] 상기 참고예 1의 랫트를 엔플루란 (enflurane, 중의제약, 대한민국)으로 흡입 마취시킨 후, 두 총경동맥 (common carotid artery)을 수술로 노출시켜 봉합실로 묶는 BCCAO (bilateral common carotid artery occlusion) 방법으로 전체 뇌에 공급되는 혈류량을 4주 동안 감소시켰다. 상기 실험예 6에서 시행된 것과 같은 물-미로 실험은 이후 5일간 시행되었다.
- [0158] 총경동맥을 묶어 4주간 방치하였을 때 묶은 7일 후부터 1주일간 HY6228 (200 mg/kg), 전분 (SW) (200 mg/kg),

식이섬유 분획 (TDF) (50 mg/kg) 및 아라비노자일란을 (50 mg/kg) 먹인 경우 플랫폼을 찾아가는 시간 (평균 탈출 잠복기; Mean Escape Latency)을 측정하였다. HY6228에 대한 실험결과 미로실험을 시행한 첫 날은 평균 탈출 잠복기가 손상만 입힌 대조군과 비슷하였으나 3일 후부터는 정상적인 쥐와 비슷하였다 (도 8a).

[0159] 이러한 결과, HY6228을 먹인 쥐들이 첫 날에는 기억력이 떨어져 적응력이 떨어지다가 시간이 지남에 따라 재빨리 적응력을 키우는 것을 알 수 있다. 즉, HY6228이 혈관성치매의 치료에도 효과가 있다는 것을 나타낸다. 또한 HY6228의 구성성분인 전분 (SW)과 식이섬유 (TDF)를 비교할 경우 두 경우 모두 평균 탈출 잠복기가 감소하였다 (도 8b). 마지막으로, 식이섬유의 구성요소 중의 하나인 아라비노자일란을 비교할 경우 평균탈출 잠복기가 혈관성 치매 (vascular dementia)만 유발한 경우에 비해 아라비노자일란을 투여한 경우에 평균 탈출 잠복기가 감소하였다 (도 8c). 이러한 결과는 전분 (SW), 식이섬유 (TDF) 및 아라비노자일란 (Arabinoxylan) 모두가 혈관성치매의 치료에 효과가 있다는 것을 나타낸다.

[0160] **실험예 8. 독성 실험**

[0161] 상기 실시예 2의 SW를 320± 20 g의 스프라그 다우리계 (Spague-Dawley) 수컷 랫트 5마리에게 주입하여 변화를 관찰하였다.

[0162] 500 mg/kg의 SW를 복강 내로 주사하여 24시간 후 몸무게를 측정하였더니 유의할 정도의 무게변화는 없었다. 또한 별다른 행동양상의 변화도 관찰되지 않았고 배를 절개해봤을 때 복수도 차지 않았다.

[0163] 또한, 5 g/kg의 SW를 랫트 2마리에 경구투여 하여 24시간 후 몸무게를 측정했을 때에도 유의할 정도의 무게변화는 없었으며 별다른 행동양상의 변화도 관찰되지 않았고 배를 절개해봤을 때 복수도 차지 않았다.

[0164] 본 발명의 전분 및 식이섬유를 함유하는 약학조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0165] **제제예 1. 산제의 제조**

[0166] 실시예 2의 TDF 300 mg

[0167] 유당 100 mg

[0168] 탈크 10 mg

[0169] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0170] **제제예 2. 정제의 제조**

[0171] 실시예 3의 SW 50 mg

[0172] 옥수수전분 100 mg

[0173] 유당 100 mg

[0174] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0175] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0176] **제제예 3. 캡셀제의 제조**

[0177] 실시예 3의 SC 50 mg

[0178] 옥수수전분 100 mg

[0179] 유당 100 mg

[0180]	스테아린산 마그네슘	2 mg
[0181]	통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.	
[0182]	제제예 4. 주사제의 제조	
[0183]	실시예 3의 SR	50 mg
[0184]	주사용 멸균 증류수	적량
[0185]	pH 조절제	적량
[0186]	통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.	
[0187]	제제예 5. 액제의 제조	
[0188]	실시예 2의 TDF	100 mg
[0189]	이성화당	10 g
[0190]	만니톨	5 g
[0191]	정제수	적량
[0192]	통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.	
[0193]	제제예 6. 건강 식품의 제조	
[0194]	실시예 3의 SW	1000 mg
[0195]	비타민 혼합물	적량
[0196]	비타민 A 아세테이트	70 μ g
[0197]	비타민 E	1.0 mg
[0198]	비타민 B ₁	0.13 mg
[0199]	비타민 B ₂	0.15 mg
[0200]	비타민 B ₆	0.5 mg
[0201]	비타민 B ₁₂	0.2 μ g
[0202]	비타민 C	10 mg
[0203]	비오틴	10 μ g
[0204]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0205]	엽산	50 μ g
[0206]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0207]	무기질 혼합물	적량
[0208]	황산제1철	1.75 mg
[0209]	산화아연	0.82 mg

[0210]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0211]	제1인산칼륨	15 mg
[0212]	제2인산칼슘	55 mg
[0213]	구연산칼륨	90 mg
[0214]	탄산칼슘	100 mg
[0215]	염화마그네슘	24.8 mg

[0216] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 제제에 6으로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[0217] **제제예 7. 건강 음료의 제조**

[0218]	실시에 2의 TDF	1000 mg
[0219]	구연산	1000 mg
[0220]	올리고당	100 g
[0221]	매실농축액	2 g
[0222]	타우린	1 g
[0223]	정제수를 가하여 전체	900 ml

[0224] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

[0225] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면의 간단한 설명

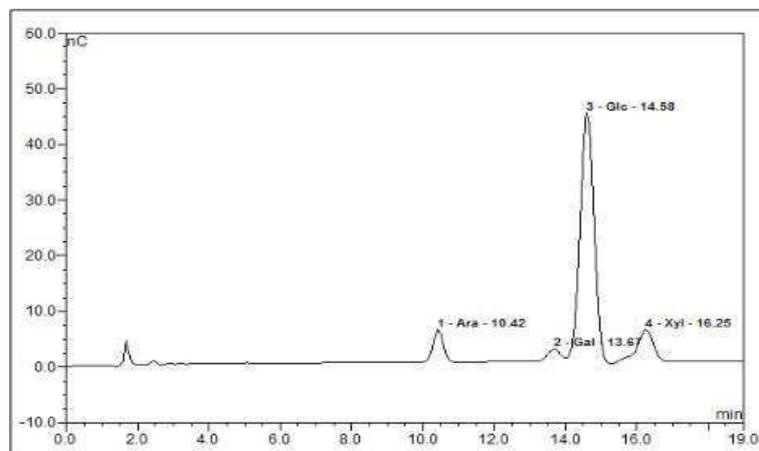
- [0226] 도 1는 아라비노자일란 (arabinoxylan)과 베타-글루칸 (β-glucan)등을 포함하는 식이섬유(TDF)를 구성하는 당의 조성에 관한 분석실험 결과를 나타낸 도이고,
- [0227] 도 2a는 저산소 조건 하에서 배양배지에 농도를 달리한 벼과식물 (소맥, 현미 및 옥수수)의 조추출물 및 상기 벼과식물로부터 분리 정제된 전분의 첨가에 따른 HepG2 세포의 생존율 개선 결과를 나타낸 도이며,
- [0228] 도 2b는 저산소 조건 하에서 배양배지에 농도를 달리한 소맥의 조추출물로부터 분리 정제된 총 식이섬유의 첨가에 따른 HepG2 세포의 생존율 개선 결과를 나타낸 도이고,
- [0229] 도 3a는 다양한 농도의 베타-아밀로이드 농도 조건 하에서 소맥으로부터 분리 정제된 전분의 첨가에 따른 SH-SY5Y 세포의 생존율 개선을 나타낸 도이며,
- [0230] 도 3b는 다양한 농도의 베타-아밀로이드 농도 조건 하에서 수용성 전분의 첨가에 따른 SH-SY5Y 세포의 생존율 개선을 나타낸 도이고,
- [0231] 도 3c는 25 μM의 베타-아밀로이드 농도 조건 하에서 소맥조추출물 (HY6228) 또는 벼과식물로부터 분리정제된 전분 (SC: 옥수수; SR: 쌀; SS: 수용성; SW: 소맥)의 첨가에 따른 SH-SY5Y 세포의 생존율 개선을 나타낸 도이며,
- [0232] 도 3d는 10 μM의 베타-아밀로이드 농도 조건 하에서 소맥으로부터 분리정제된 총 식이섬유의 첨가에 따른 SH-SY5Y 세포의 생존율 개선을 나타낸 도이고,
- [0233] 도 3e는 15 μM의 베타-아밀로이드 농도 조건 하에서 식이섬유를 구성하는 아라비노자일란과 베타-글루칸 및 아

라비노자일란을 구성하는 아라비노스, 자일로스 첨가에 따른 SH-SY5Y 세포의 생존율 개선을 나타낸 도이며,

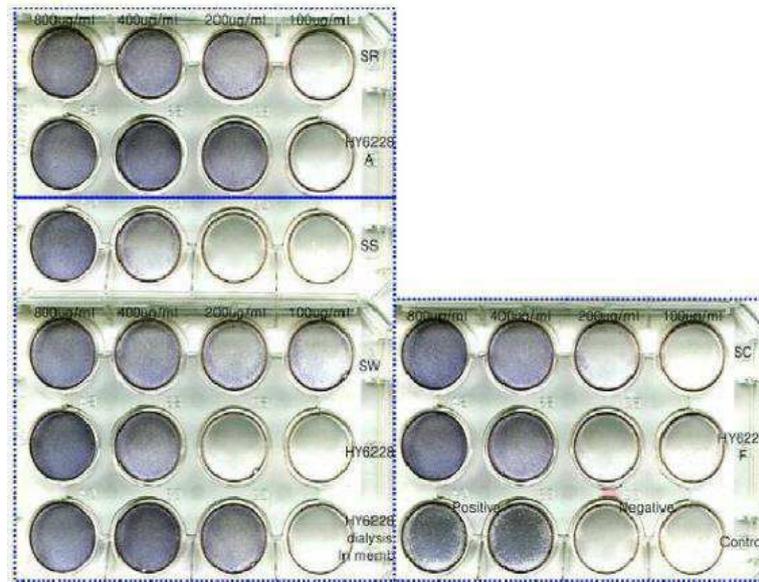
- [0234] 도 4는 250 μ M의 하이드록시도파민 농도 조건 하에서 소맥조추출물 (HY6228)의 첨가에 따른 SH-SY5Y 세포의 생존율 개선을 나타낸 도이고,
- [0235] 도 5a는 심근경색 동물모델에 경구투여 시에 소맥에서 분리 정제된 전분의 뇌경색 억제 효과를 나타낸 도이며,
- [0236] 도 5b는 심근경색 동물모델에 경구투여 시에 소맥에서 분리 정제된 총 식이섬유의 뇌경색 억제 효과를 나타낸 도이고,
- [0237] 도 5c는 심근경색 동물모델에 경구투여 시에 식이섬유를 구성하는 아라비노자일란과 베타-글루칸 및 아라비노자일란을 구성하는 아라비노스, 자일로스의 심근경색 억제 효과를 나타낸 도이며,
- [0238] 도 6는 뇌경색 동물모델에 경구투여 시에 소맥에서 분리 정제된 전분의 뇌경색 억제 효과를 나타낸 도이고,
- [0239] 도 7a는 물-미로 검사에서 건망증 유발 동물모델에 경구투여 시에 소맥에서 분리 정제된 전분의 기억력 감퇴 억제 효과를 나타낸 도이며,
- [0240] 도 7b는 물-미로 검사에서 건망증 유발 동물모델에 경구투여 시에 소맥에서 분리 정제된 총 식이섬유의 기억력 감퇴 억제 효과를 나타낸 도이고,
- [0241] 도 8a는 물-미로 검사에서 혈관성 치매 동물모델에 경구투여 시에 소맥조추출물 (HY6228)의 치매 억제 효과를 나타낸 도이며,
- [0242] 도 8b는 물-미로 검사에서 혈관성 치매 동물모델에 경구투여 시에 소맥에서 분리 정제된 총식이섬유 (TDF)와 전분의 치매 억제 효과를 나타낸 도이고,
- [0243] 도 8c는 물-미로 검사에서 혈관성 치매 동물모델에 경구투여 시에 아라비노자일란의 치매 억제 효과를 나타낸 도이다.

도면

도면1



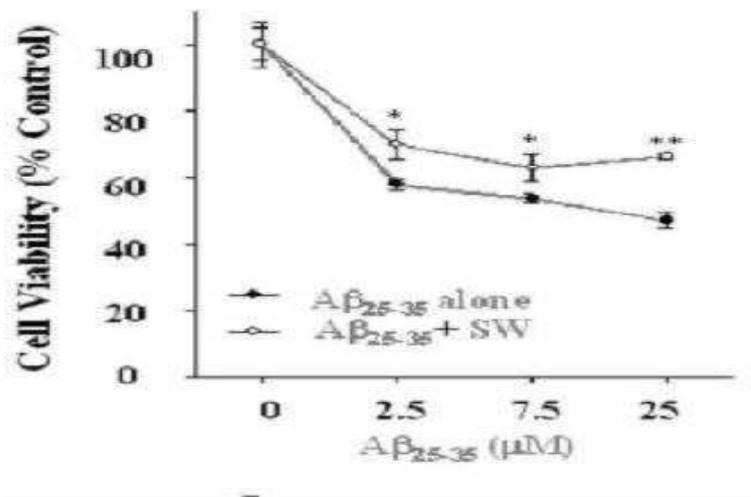
도면2a



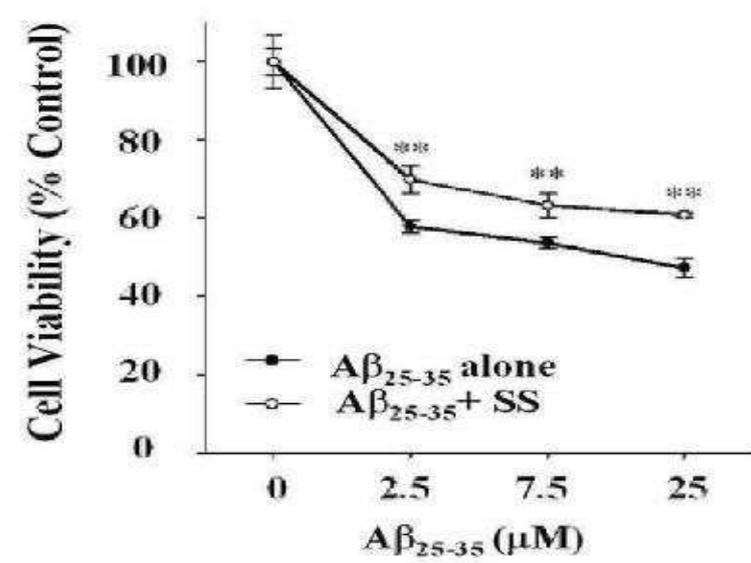
도면2b



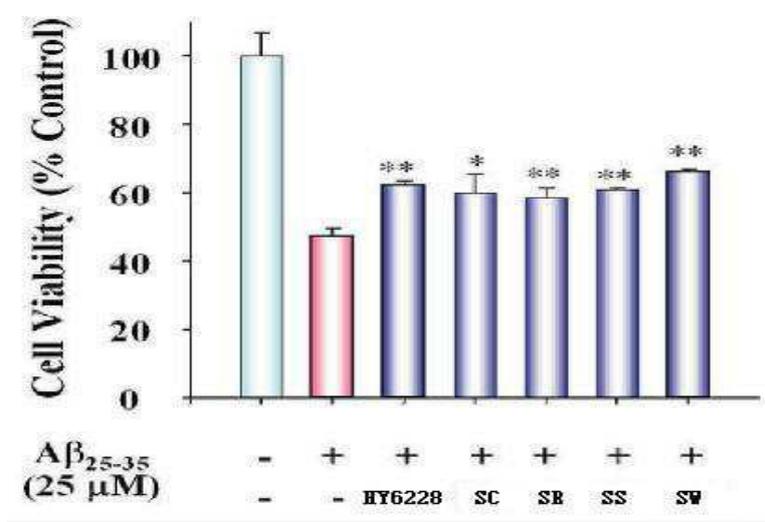
도면3a



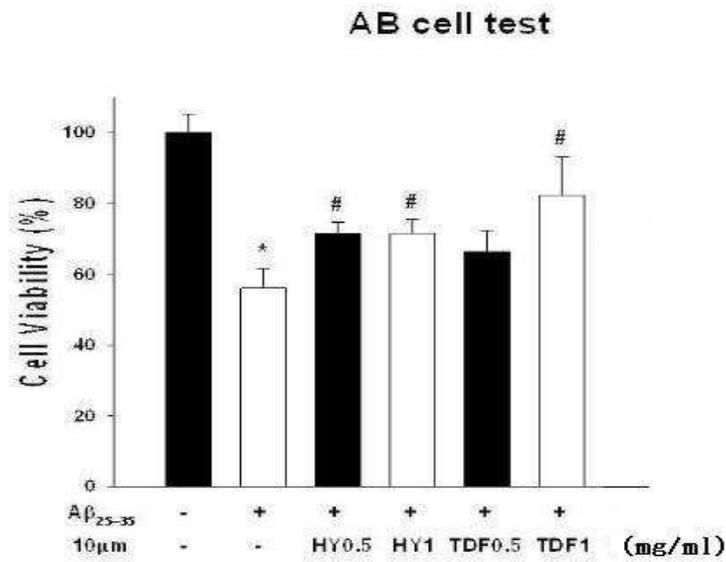
도면3b



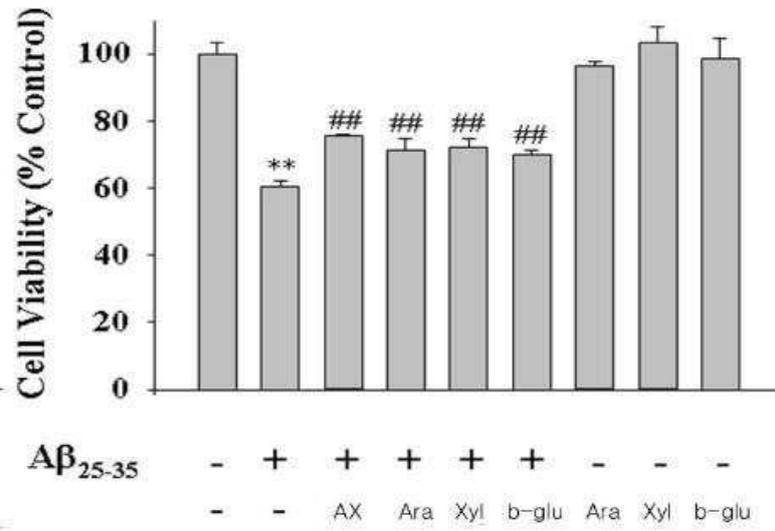
도면3c



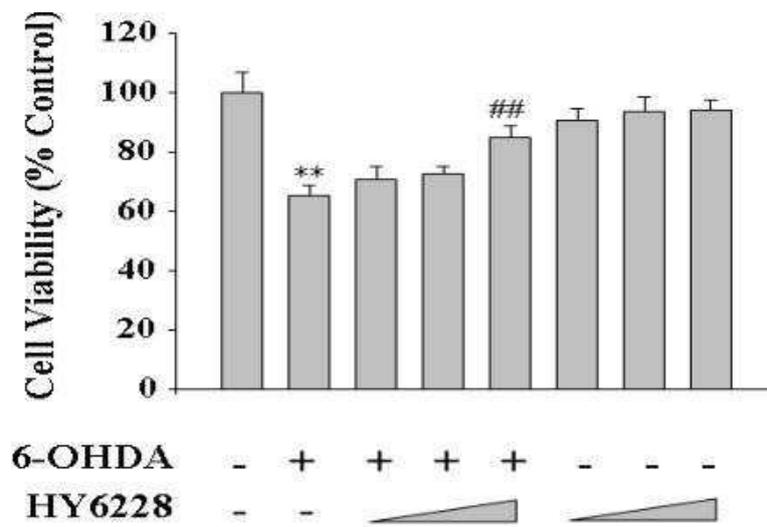
도면3d



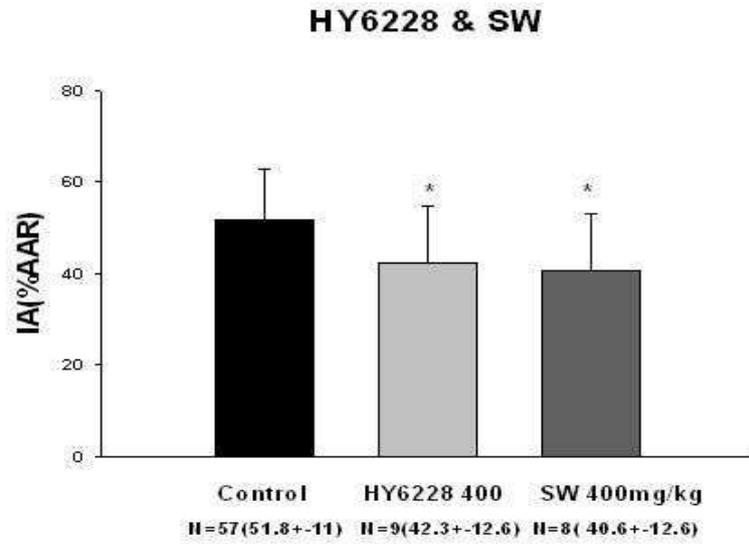
도면3e



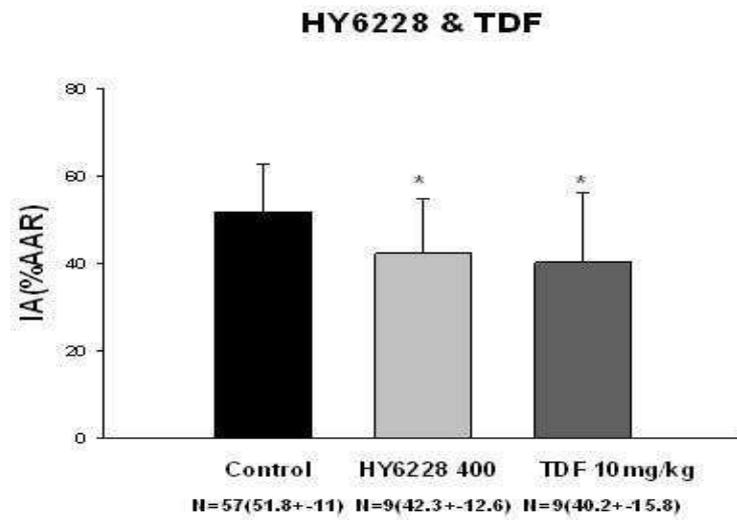
도면4



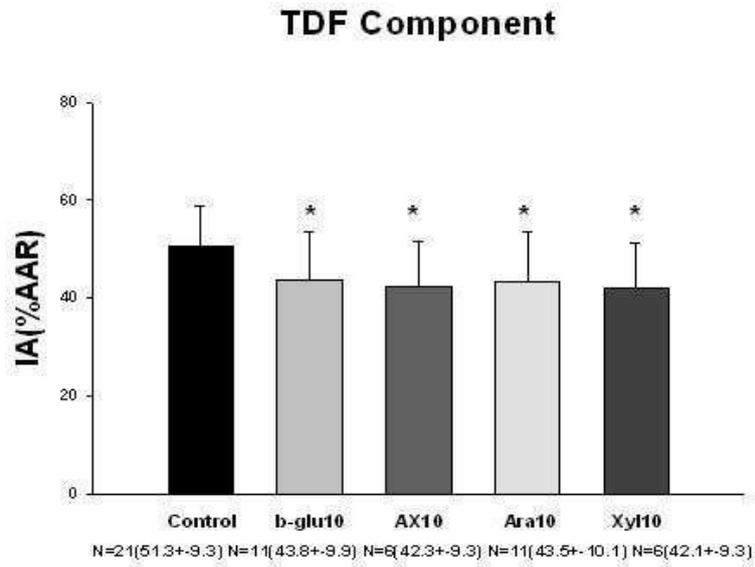
도면5a



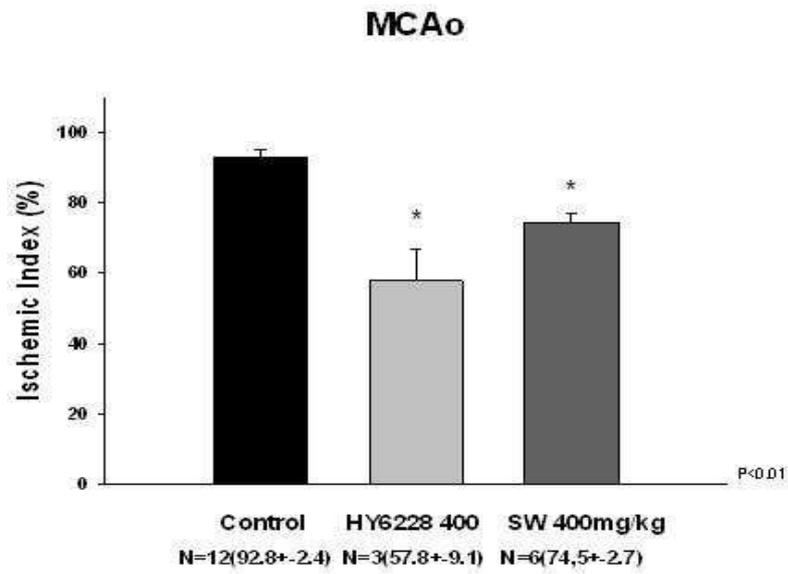
도면5b



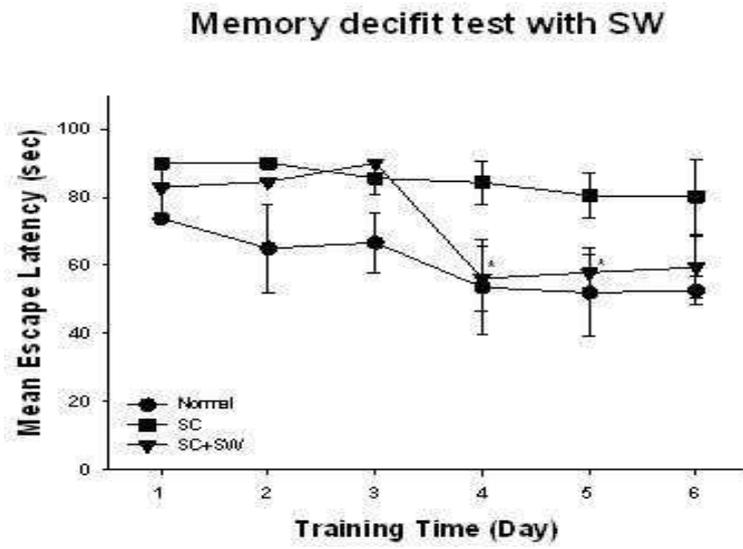
도면5c



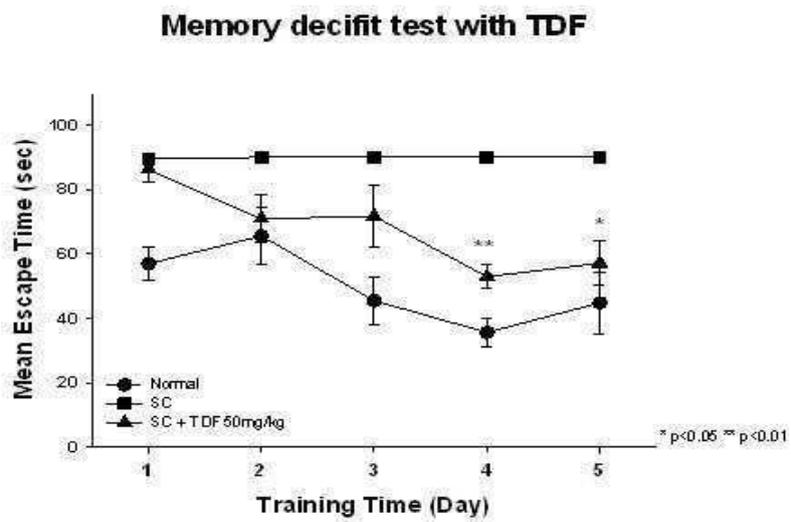
도면6



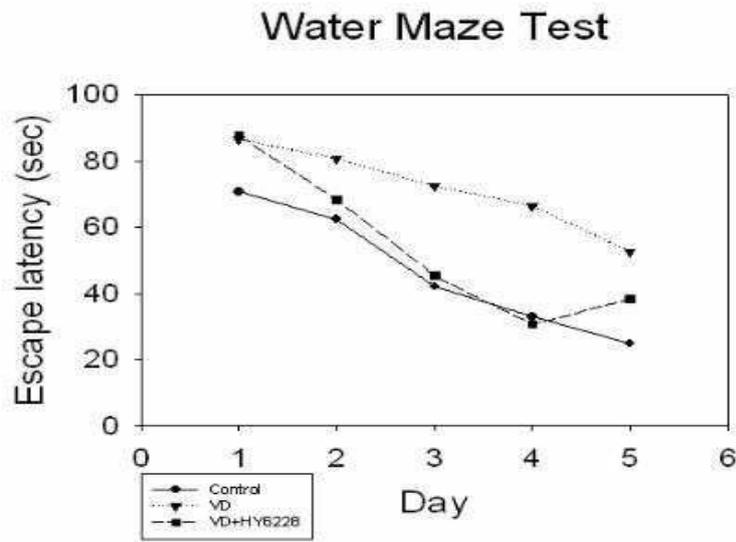
도면7a



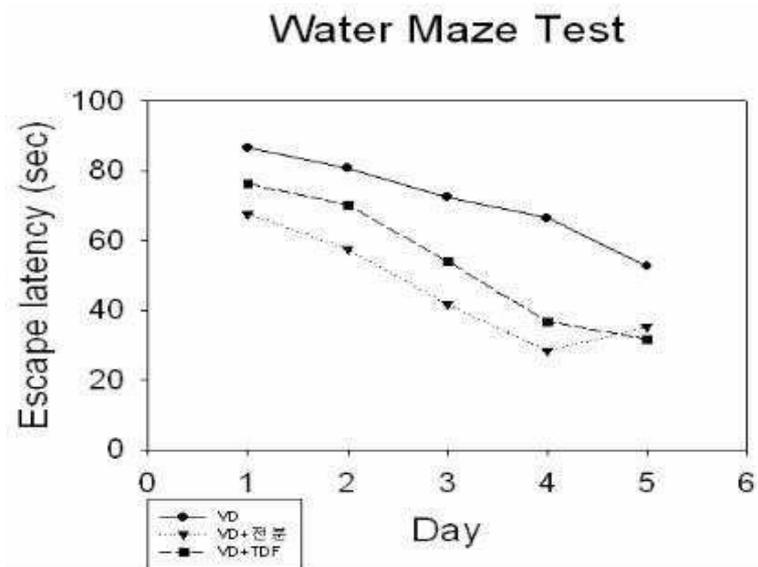
도면7b



도면8a



도면8b



도면8c

