



(72) 발명자

한상익

대구광역시 수성구 천을로23길 21, 101동 1003호
(매호동, 신매역우방유헤)

나지은

경상남도 밀양시 점필재로 20 (내이동)

오성환

경상남도 밀양시 점필재로 20 (내이동)

송유천

경상남도 밀양시 점필재로 20 (내이동)

강항원

경상북도 경산시 성암로1길 37 (옥산동)

남민희

대구광역시 수성구 노변로 11, 101동 1503호 (노변동, 노변대백아파트)

김중배

강원도 원주시 번재길 32, 107동 1404호 (행구동, 효성백년가약아파트)

김사현

서울특별시 광진구 광나루로56길 5, 8동 703호 (구의동, 현대프라임아파트)

박민

강원도 원주시 현충로58번길 29, 105동 1103호 (태장동, 현대아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ9070172012

부처명 농촌진흥청

연구사업명 유색미 이용 알코올 문제 및 위염 경감용 소재개발

연구과제명 유색미 이용 헬리코박터균 억제물질 탐색 및 항균활성 검증

기 여 율 1/1

주관기관 국립식량과학원 기능성 작물부

연구기간 2011.03.01 ~ 2013.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

흑미 추출물 또는 흑미 용매 분획물을 유효성분으로 포함하는 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 헬리코박터 파이로리 감염 질환은 위염, 위궤양, 위십이지장궤양, 소화성 궤양 또는 위암인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 흑미 용매 분획물은 흑미 추출물을 물, 탄소수 1-4의 저급 알코올, 발효주정 또는 이들의 혼합용매를 이용하여 추출한 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

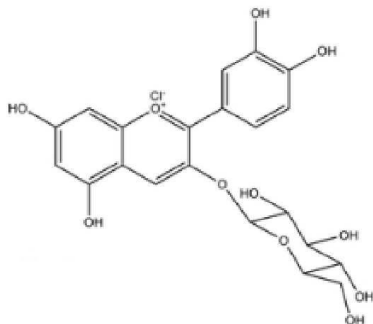
청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 흑미 추출물 또는 상기 흑미 용매 분획물은 헬리코박터 파일로리 유레이즈 억제활성 및 CagA, VacA, SecA의 독소 분비억제 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 흑미 용매 분획물은 하기 화학식 1로 나타내는 시아니딘 3-O-글루코사이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

[화학식 1]



청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 유효성분인 흑미 추출물 또는 흑미 용매 분획물의 함량은 조성물 총 중량에 대비 0.1~50 중량%인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 7

i) 흑미를 분쇄하고, 분쇄한 흑미를 물, 탄소수 1-4의 저급알코올, 발효주정 또는 이들의 혼합용매를 이용하여

추출하는 단계; 및

ii) 상기 추출물을 크로마토그래피를 이용하여 전개액으로 물, 메탄올을 이용하여 로 분리하여 시아니딘 3-0-글루코사이드를 순수 분리 동정하는 단계;

를 포함하는 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 제조 방법.

청구항 8

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항의 흑미 추출물 또는 흑미 용매 분획물을 유효성분으로 포함하는 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 감염 질환의 예방 또는 경감을 위한 건강식품.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 건강식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐 및 음료로 이루어지는 군으로부터 선택되는 형태인 것을 특징으로 하는 건강식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 흑미 추출물을 유효성분으로 포함하는 헬리코박터 파이로리 (*Helicobacter pylori*)균의 감염 질환인 위염, 위궤양, 십이지장 질환 치료 또는 예방용 조성물 및 식품 조성물에 관한 것으로, 특히 본 발명에 따른 흑미 추출물은 헬리코박터 파이로리의 병원성 독소인 CagA, VacA, SecA를 선택적으로 저해하는 것을 특징으로 하며 본 발명의 약학 조성물 및 식품 조성물은 안전성이 보장된 천연식물인 흑미 쌀에서 헬리코박터 파이로리균에 대해 항균활성을 가지는 것을 선택하여 개발한 것으로 내성과 부작용의 위험이 적고 인체 저독성으로 안전한 것을 특징으로 한다.

배경기술

[0002] 현대사회는 경제발전과 더불어 고령화, 삶의 질 향상, 건강 등에 대한 인식이 확산되고 있으며 이를 추구하는 현상은 우리나라 뿐만 아니라 전 세계적인 추세가 되었으며 이러한 현상은 향후 더욱 가속화 될 것으로 예측된다. 하지만 현대인들은 불규칙한 식생활과 과중한 스트레스를 받음으로서 다양한 질병에 노출되어 있고 특히 자극성이 강한 음식을 좋아하는 한국사람들은 위염, 위암, 위궤양, 십이지장 질환 등의 위장질환은 국내 발병율이 높은 실정이다. 따라서 매우 빠른 속도로 변화되고 있는 사회현상과 점차 다양화 되어가는 소비자의 기대를 충족시킬수 있는 새로운 바이오메디컬 소재개발, 기능성 식품소재 개발 및 웰빙소재 개발이 필요한 실정이다.

[0003] 헬리코박터 파이로리 (*Helicobacter pylori*)는 1983년 호주의 마샬 박사와 워렌 박사에 의하여 순수 분리, 배양하는데 성공하여 그 이름이 명명되었고, 많은 논문에서 이 세균이 위염, 위궤양, 십이지장궤양 환자의 위생검사에서 높은 비율로 검출되는 것이 알려지면서, 현재는 위궤양, 위염, 위암 및 십이지장 궤양의 발병인자 중 하나로 인정되고 있다(Gastroenterol. 2009. 136:1863-1873, Lancet. 1995. 345(8964):1525-1528, IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 1994. 61:1-241, N Engl J Med. 2002. 347:1175-1186, PLoS ONE. 2009. 4(3):e4754).

[0004] 상기 헬리코박터 파이로리는 위점막 상피세포간 접합부에 서식하는 그람 음성의 간균으로서 최적의 생육 pH는 7.0 ~ 7.4이며 온도는 30 ~ 37℃의 미호기적 조건에서 성장한다. 헬리코박터 파이로리의 병독인자들을 보면 위에서 분비되는 위액의 강산조건에 생존하기 위해 분비되는 CagA, VacA를 분비하는 단백질인 SecA, 운동성을 유지하기 위해 있는 편모, 위점막 상피세포에 부착을 용이하게 도와주는 외막단백질 등이 알려져 있다. (Trends Microbiol. 2003. 11(3):134-138) 이중 유레아제는 위점막 조직 내의 요소를 암모니아와 이산화탄소로 분해하여 균체 주의를 알칼리화 시킴으로서 위에서 분비되는 강산의 조건을 중화시켜 생존 할 수 있는 조건을 만드는 특성을 갖는다.

- [0005] 본 개발은 국내외를 아울러 최초로 연구된 유색미추출물 및 흑미 유래의 안토시아닌에 의한 *H. pylori* 독소 억제 메커니즘을 기반으로 하고 있다. 일부 연구 성과들이 안토시아닌에 의한 *H. pylori* 제균 가능성을 간접적으로 제시하고 있다. 2010년 최근의 보고에 따르면, 흑미겨 추출물 처리를 통하여 화학물질 유래의 염증반응을 억제할 수 있다는 보고가 있으나, 그 원인물질이 안토시아닌일 가능성이 높다고만 언급하고 있다(최선편 외 J Agric Food Chem 2010;58:10007-10015). 이 외에 유색미추출물을 이용한 위장질환 개선 관련 in vitro 연구보고는 없는 것으로 파악되었다. Mongolian gerbil 감염모델에 일본산 흰쌀 추출물을 경구 투여하였을 때, 14주(2주간 감염시킨 후, 12주간 쌀추출물 치료) 후에 염증치료효과와 동시에 *H. pylori* 제균 효과를 보였음을 보고하였다(Satoshi Ishizone 외 Int J Med Sci 2007;4(4):203-208). 이 외에 유색미추출물을 이용한 위장질환 개선 관련 전임상 연구보고는 없는 것으로 파악되었다. 천연물유래의 추출물을 이용하여 *H. pylori*를 억제하기 위한 다양한 시도가 보고되고 있으나, 이들 관련 연구들은 모두 안토시아닌에 의한 억제메커니즘을 구체적으로 증명하지 못하였다. 그 중에서도 안토시아닌의 효능을 메커니즘 분석을 통하여 확인한 연구 보고는 아직까지 없는 것으로 파악되며, 단지 cranberry, optiberry, 등 자색을 띠는 딸기에 안토시아닌이 가장 많이 함유되어 있으며, 해당 추출물 처리시 *H. pylori* 억제효과가 있었다는 간접적인 영향에 대한 보고들만 존재한다(J. Cote 외 Critical Rev Food Sci Nutri 2010;50:666-679, Shirley Zafra-Stone 외 Mol Nutr Food Res 2007;51:675-683, Liisa J Nohynek 외 Nutr Cancer 2006;54(1):18-32.). 이 외에 역시 안토시아닌을 다량 함유한 가공식품인 red wine을 처리하여 *H. pylori*의 독소 중 하나인 VacA를 억제할 수 있다는 연구보고가 있으나, 이 역시 구체적인 메커니즘은 밝히지 못하였다(Paolo Ruggiero 외 World J Gastroenterol 2007 21;13(3):349-354).
- [0006] 현재 헬리코박터 파이로리의 대표적인 치료방법은 메트로니다졸 (Metronidazole), 아목시실린 (amoxicillin)과 같은 항생제에 의존하고 있고, 이러한 약제의 반복사용은 항생제 저항성 증가 및 다양한 부작용을 야기하는 것으로 보고 되고 있으며(Gut. 1998;439(suppl):61S-65S, Gastroenterol. 1999;116:248-253, Aliment Pharmacol Ther. 1999;13:1523-1530, Aliment Pharmacol Ther 1997;11:943-952, Am J Gastroenterol. 1999;94:1751-1759, Aliment Pharmacol Ther. 1999;13:1047-1055), 현재는 다양한 천연물 소재를 이용하여 헬리코박터 파이로리를 억제 할 수 있는 추출물 및 활성성분을 찾기 위한 노력이 지속되고 있다. 포도, 사과 껍질로부터 추출한 다양한 폴리페놀들 (J Appl Microbiol. 2011 Jan;110(1):139-46, J Agric Food Chem. 2010 Jun 23;58(12):7172-9)과 블랙베리 잎에서 분리된 폴리페놀 등이 헬리코박터 파이로리 성장을 억제능을 확인 (Int J Antimicrob Agents. 2009 Jul;34(1):50-9)한바 있고, 이외에도 백리향 (J. Appl. Bacteriol., 1996, 80, 667-672) 이나 다양한 플라보노이드계 화합물들로 부터도 강력한 억제 활성이 보고 되고 있다. (J Gastroenterol. 2008;43(6):441-7; J Nat Prod. 2007 Oct;70(10):1570-7) 또한, 최근까지 발표된 헬리코박터 파이로리 관련 특허 및 보고자료 로는 헬리코박터 파이로리 억제 효능을 가지는 강화순수 추출물의 제조방법 및 이를 유효성분으로 함유하는 제품 (공개번호 10-2012-0053352), 녹조류 추출물을 함유하는 항헬리코박터 조성물 (공개번호 10-2011-0023844), 계피 추출물을 유효성분으로 함유하는 헬리코박터 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강식품 (공개번호 10-2011-0117491), 구절초 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 함유하는 위장관 질환의 예방 및 치료용 조성물 (공개번호 10-2010-0044433) 등이 있다.
- [0007] 최근까지 발표된 흑미 관련 특허 및 보고자료는 면역력 증강을 통한 항아토피 활성을 갖는 슈퍼 C3GHi 흑자미버 (공개번호 2012-0000388), 초크베리 생물활성분획물 C3G 복합체를 유효성분으로 함유하는 동맥경화 및 고혈압 예방 및 치료용 약학적 조성물(공개번호 2011-0133931), 시아니딘-3 배당체 또는 이를 포함하는 흑미 추출물을 함유하는 고지혈증 예방 및 치료용 조성물 (공개번호 10-2003-0061650), 흑미추출물을 이용한 알레르기성 질환 예방 또는 치료용 조성물 및 이들의 치료학적 용도 (공개번호 10-2004-0021843), 흑미 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부미백 화장품 조성물 (공개번호 10-2004-0003013), 안토시아닌을 함유하는 비스테로이드성 항염증제에 의해 유발된 위염 및 위궤양 치료용 조성물 (공개번호 10-2007-0070841), 흑찰거대배아미 추출물을 함유하는 식음료 조성물 (공개번호 10-2010-0099133), 흑미 추출물의 마우스 피부의 염증반응에 대한 보호 효과 (Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010), 흑미 추출물의 항산화 활성 (Journal of health science v.52 no.5, pp.495 - 511, 2006) 등이 있다. 또한 보유색미 미강 발효물의 면역활성 효과 (김동주 et al, 한국식품영양학회지, 24(3), 273-281, 2011) 등이 있다.
- [0008] 지금까지의 흑미의 생리활성 연구는 주로 조추출물을 이용하여 제품의 제조 등에 사용되었고, 항산화 활성에 기초한 염증억제, 미백효과 등의 생리활성 검정이 대부분이고, 조추출물에서 안토시아닌 및 지질성분을 분리하여 흑미의 품종별 폴리페놀류의 함량을 측정하였다.
- [0009] 그러나, 흑미 추출물을 유효성분으로 하는 헬리코박터 파이로리 (*Helicobacter pylori*)를 억제활성을 가지는 추출물 및 유효성분에 대한 물질의 분리, 구조동정된 성분별 함량분석, 생리활성 검정 및 유효성분 최대 생산을

위한 추출조건 등에 대한 연구는 부족한 실정이다.

[0010] 따라서 본 발명은 그동안 선행연구가 이루어지지 않았던 흑미의 추출물의 유효성분이 헬리코박터 파이로리에 의한 위염, 위궤양, 십이지장 궤양 및 위암을 일으키는 인자인 분비독소 (CagA, VacA, SecA), 유레이즈 (urease), 등을 억제함으로써 위염, 위궤양, 십이지장 궤양 및 위암 등에 효과가 있는 건강식품, 약학적 조성물 및 음료 등의 활용에 관한 분야와 흑미의 안토시아닌 등의 헬리코박터 억제활성을 가지는 유효성분을 구명 및 함량을 정량분석 하고, 흑미의 헬리코박터 억제활성을 가지는 유효성분을 분리 하기위한 추출방법, 유효성분을 다량 함유하는 추출물 제조 및 이를 이용한 활용에 관한 분야이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 이에, 본 발명자들은 흑미 유래 기능성 물질을 탐색하던 중 흑미의 추출물이 강한 헬리코박터 파이로리 억제 효과를 보임을 확인하였고, 이 활성인자에 관여하는 물질을 분리, 정제 및 화학구조를 동정하였으며, 각각의 생리활성을 검정한 결과 안토시아닌 중 시아니딘-3-0-글루코사이드 (Cyanidin-3-0-glucoside)가 흑미의 헬리코박터 억제활성을 가지는 유효활성 물질임을 확인하였다. 흑미 추출물 및 시아니딘-3-0-글루코사이드에 의한 *H. pylori* CagA, VacA 독소 분비 억제 메커니즘은 현재까지 국내외에서 보고된 바가 없었다. 본 발명을 통하여 최초로 흑미추출물 및 시아니딘-3-0-글루코사이드가 *H. pylori*의 병원성 인자들의 억제 메커니즘에 관여한다는 사실을 규명하고, 이러한 효능을 가진 물질들을 이용한 위염, 위궤양, 십이지장 궤양 및 위암 등의 식품, 천연물의약품 등의 활용에 관해 본 발명을 완성하였다.

[0012] 이에, 본 발명의 목적은 흑미 추출물 또는 흑미 용매 분획물을 유효성분으로 포함하는 헬리코박터 파이로리 (*Helicobacter pylori*) 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는데에 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물인 흑미 추출물 또는 흑미 용매 분획물을 제조 방법을 제공하는데에 있다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 흑미 추출물 또는 흑미 용매 분획물을 유효성분으로 포함하는 헬리코박터 파이로리 (*Helicobacter pylori*) 감염 질환의 예방 또는 경감을 위한 건강식품을 제공하는데에 있다.

[0015] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 흑미 추출물 또는 흑미 용매 분획물을 유효성분으로 포함하는 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은

[0018] i) 흑미를 분쇄하고, 분쇄한 흑미를 물, 탄소수 1-4의 저급알코올, 발효주정 또는 이들의 혼합용매를 이용하여 추출하는 단계; 및

[0019] ii) 상기 추출물을 크로마토그래피를 이용하여 전개액으로 물, 메탄올을 이용하여 로 분리하여 시아니딘 3-0-글루코사이드를 순수 분리 동정하는 단계;

[0020] 를 포함하는 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 제조 방법을 제공한다.

[0021] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 흑미 추출물 또는 흑미 용매 분획물을 유효성분으로 포함하는 헬

리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 감염 질환의 예방 또는 경감을 위한 건강식품을 제공한다.

발명의 효과

[0022] 본원 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다.

[0023] (i) 본 발명의 흑미 추출물 또는 흑미유래 시아니딘 3-O-글루코사이드 흑미 분획물의 유효성분은 헬리코박터 파이로리의 생육 억제활성, 헬리코박터 파이로리 유레이즈 억제활성 및 CagA, VacA, SecA의 독소 분비억제 활성을 나타낸다.

[0024] (ii) 본 발명의 흑미 추출물 또는 흑미 용매 분획물은 흑미 유래의 안전한 천연소재 이므로 인체에 안전성, 저독성 및 항생제 남용에 의한 내성균 발생을 억제하는 안전한 헬리코박터 파이로리 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 건강식품, 음료 및 첨가물로 유용하게 이용 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 흑미 추출물 처리시 헬리코박터 파이로리의 생육억제 사진이다.

도 2는 흑미 추출물(BRE)의 처리농도별 KATO III 세포의 독성을 나타내는 그림이다.

도 3은 흑미 추출물(BRE)의 처리농도별 KATO III 세포의 세포사멸인자에 대한 웨스턴 브랏팅 결과이다.

도 4는 *H. pylori*에 감염된 KATO III(위암세포)의 세포흑미 추출물 처리시 세포독성 결과이다.

도 5는 *H. pylori*에 감염된 KATO III(위암세포)에 흑미 추출물을 처리시 세포사멸 회복에 대한 웨스턴 블랏팅 결과이다.

도 6은 흑미 추출물 처리시 *H. pylori* 분비 독소 (CagA, VacA)의 분비 억제 효과에 대한 웨스턴 블랏팅 결과이다.

도 7은 흑미 추출물 처리시 *H. pylori* 분비 독소 (CagA, VacA)의 분비억제효과에 대한 RT-PCR 결과이다.

도 8은 흑미 추출물에서 분리한 안토시아닌 및 안토시아닌 종류별 헬리코박터 파이로리에 처리시 분비 독소 (CagA, VacA)의 억제 효과에 대한 RT-PCR 결과이다.

패널(a) 내지 패널(d)는 각각 (a) *cagA*, (b) *vacA*, (c) *secA* and (d) 16s rRNA (internal control)의 mRNA 발현량을 측정한 것이다. 각 RT-PCR 레인에 대하여 라인(lane) M; 100bp DNA 래더(ladder), 라인 1; Cyanidine-3-O-glucoside (100 μ M), 라인 2; Peonidin-3-O-glucoside (100 μ M), 라인 3; Pelargonidin-3-O-glucoside (100 μ M), 라인 4; Delphinidin-3-O-glucoside (100 μ M), 라인 5; Malvidin-3-O-glucoside (100 μ M), and 라인 6; black rice extract.(400 μ g/ml)의 조건으로 실시하였다.

도 9는 *H. pylori* 감염모델 (전임상) 확인 및 흑미 추출물 처리시 헬리코박터 파이로리 억제활성의 Immunohistochemistry (면역조직화학) 염색 사진이다.

도 10은 *H. pylori* 감염모델 (전임상) 흑미 추출물 처리시 위장 염증 억제효과 검정 결과이다.

도 11은 *H. pylori* 감염모델(전임상)에 흑미추출물을 처리후 실시한 혈액학적 분석결과이다.

도 12는 *H. pylori* 감염모델 (전임상) 흑미 추출물 처리시 다른 장기(신장, 간)의 조직 독성 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 흑미 추출물 또는 흑미 용매 분획물을 유효성분으로 포함하는 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0027] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 흑미 추출물 또는 흑미 용매 분획물을 유효성분으로 포함하는 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 헬리코박터 파이로리 감염 질환은 위염, 위궤양, 위십이지장궤양, 소화성 궤양 또는 위암에 효과적이다.

[0028] 본 명세서에서, 용어 “흑미 추출물”은 흑미 종자에서 부터 추출하여 얻은 것을 의미한다. 추출물은 당업계에

공지된 통상적인 추출용매, 바람직하게는, (a) 물, (b) 탄소수 1-4의 무수 또는 함수 저급 알코올 (예: 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 노말-프로판올, 이소-프로판올 및 노말-부탄올 등), (c) 상기 저급 알코올과 물과의 혼합용매, (d) 아세톤, (e) 에틸 아세테이트, (f) 클로로포름, (g) 1,3-부틸렌글리콜, (h) 헥산, (i) 디에틸에테르, 또는 (j) 부틸아세테이트를 이용하여 얻을 수 있다.

[0029] 본 명세서에서, 용어 “흑미 용매 분획물”은 상기 추출 시 이용하였던 용매와 다른 용매를 이용하여 상기 흑미 추출물로부터 본 발명에서 목적으로 하는 활성을 가지는 분획하여 얻은 활성 분획물(fraction)을 의미한다. 흑미 용매 분획물을 얻기 위하여 사용되는 용매는 당업계에서 통상적으로 이용되는 어떠한 추출용매도 가능하며, 바람직하게는, (a) 탄소수 1-4의 무수 또는 함수 저급 알코올 (예: 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 노말-프로판올, 이소-프로판올 및 노말-부탄올 등), (b) 상기 저급 알코올과 물과의 혼합용매, (c) 아세톤, (d) 에틸 아세테이트, (e) 클로로포름, (f) 1,3-부틸렌글리콜, (g) 헥산, (h) 디에틸에테르, 또는 (i) 부틸아세테이트이다.

[0030] 본 명세서에서 사용되는 용어 “추출물”은 상술한 바와 같이 당업계에서 조추출물(crude extract)로 통용되는 의미를 갖지만, 광의적으로는 상술한 용매 분획물도 포함한다.

[0031] 본 발명의 흑미 추출물 또는 흑미 용매 분획물은 상술한 용매를 이용하여 얻은 것뿐만 아니라, 여기에 정제과정을 추가적으로 적용하여 얻은 것도 포함한다. 예컨대, 상기 추출물을 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외여과막을 통과시켜 얻은 분획, 다양한 크로마토그래피 (크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 등, 추가적으로 실시된 다양한 정제 방법을 통해 얻어진 분획도 본 발명의 흑미 추출물 또는 분획물에 포함되는 것이다.

[0032] 본 발명의 흑미 추출물 또는 분획물은 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조될 수 있다.

[0033] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸 히드록시벤조에이트, 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.

[0034] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 바람직하게는 비경구 투여, 보다 바람직하게는 도포에 의한 국부 투여 (topical application) 방식으로 적용된다.

[0035] 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 조성물에 포함된 생리활성물질인 흑미추출물 및 분획물의 투여량은 성인 기준으로 0.001-100 mg/kg, 바람직하게는 0.1-100 mg/kg, 보다 바람직하게는 5-50 mg/kg 범위 내이다.

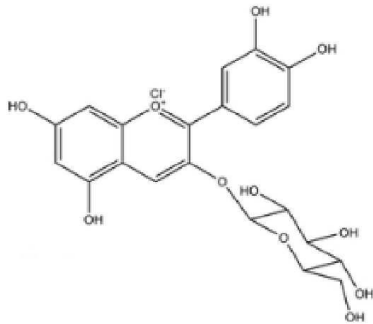
[0036] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0037] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 흑미 추출물로부터 수득하는 상기 흑미 용매 분획물은 흑미 추출물을 물, 탄소수 1-4의 저급 알코올, 발효주정 또는 이들의 혼합용매를 이용하여 추출할 수 있다.

[0038] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 흑미 추출물 또는 상기 흑미 용매 분획물은 헬리코박터 파일로리 유레이즈 억제활성 및 CagA, VacA, SecA의 독소 분비억제 활성을 나타낸다.

[0039] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 흑미 용매 분획물은 하기 화학식 1로 나타내는 시아니딘 3-0-글루코사이드를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0040] [화학식 1]



[0041]

[0042] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 유효성분인 흑미 추출물 또는 흑미 용매 분획물의 함량은 조성물 총 중량에 대비 0.1~50 중량%을 차지한다.

[0043] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은

[0044] i) 흑미를 분쇄하고, 분쇄한 흑미를 물, 탄수소 1-4의 저급알코올, 발효주정 또는 이들의 혼합용매를 이용하여 추출하는 단계; 및

[0045] ii) 상기 추출물을 크로마토그래피를 이용하여 전개액으로 물, 메탄올을 이용하여 로 분리하여 시아니딘 3-O-글루코사이드를 순수 분리 동정하는 단계;

[0046] 를 포함하는 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 제조 방법을 제공한다.

[0047] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 흑미 추출물 또는 흑미 용매 분획물을 유효성분으로 포함하는 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 감염 질환의 예방 또는 경감을 위한 건강식품을 제공한다.

[0048] 본 발명의 조성물은 위염, 위궤양 및 십이지장궤양 등의 위염, 위궤양, 위십이지장궤양, 소화성 궤양 또는 위암의 개선을 목적으로 건강기능식품에 첨가될 수 있다. 본 발명의 흑미 용매 분획물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 흑미 용매 분획물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다.

[0049] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 건강식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐 및 음료로 이루어지는 군으로부터 선택되는 형태로 제조 가능하다.

[0050] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 유효성분으로서 흑미 추출물 또는 분획물뿐만 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 텍스트린, 사이클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.

[0051] 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 유효인 추출물 또는 분획물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

[0052] 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에는 본 발명의 흑미 용매 분획물은 원료에 대하여 15 중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간

의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0053] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0054] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01~0.20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0055] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0056] 1. 실시예 1: 흑미 추출물의 제조

[0057] 농촌진흥청 국립식량과학원 기능성작물부에서 수확한 흑미를 도정하여 현미를 분쇄한 5kg을 추출용매인 발효주정 20L을 가하여 실온에서 24시간 교반하여 추출한 후, 어드반텍 번호 2 종이여지로 여과 후 여액을 감압농축기를 이용하여 농축하여 진한 적갈색의 점액상의 흑미 추출물을 제조하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다. 또한 상기 추출물을 이용하여 역상 실리카겔 컬럼크로마토그래피 (400g, 70~230 메쉬, Merk)를 수행하였으며, 이동상 용매로는 물, 메탄올 (100:1 ~ 1:1 혼합비) 혼합용매를 순차적으로 사용하여 적색의 추출물을 얻고 이를 정제하여 시아니딘 3-O-글루코사이드를 각각 3.5 g 을 얻었다. 순수분리한 흑미 유래 시아니딘 3-O-글루코사이드는 역상 TLC 패턴은 도 1에 나타내었다.

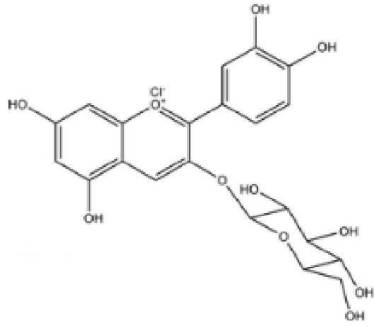
[0058] 2. 실험예 1: 흑미 추출물의 시아니딘 3-O-글루코사이드 화합물 구조 분석

[0059] 상기 실시예 1에서 얻은 물질을 GC-MS/Ms 분석기 (Gas chromatography mass-mass chromatography)를 사용하여 표준물질과 비교하여 검출시간, 분자량 및 분자의 딸이온 등을 통해 분자구조를 결정하였으며 또한, 핵자기공명 분광기(Nuclear Magnetic Resonance)를 이용하여 탄소와 수소의 상관관계를 분석한 결과 시아니딘-3-O-글루코사이드 화합물로 동정하였다. 분리한 시아니딘 3-O-글루코사이드의 화학구조는 표 1에 나타내었다.[일반미(남평벼) 및 흑미(조생흑찰외 3종)의 발효주정 추출물의 헬리코박터 파이로리의 억제활성 (처리농도 0.1, 1, 10 mg/disk)]

표 1

샘플명	헬리코박터 파이로리 (ATCC****)
	Clear zone (mm)
공용매(DMSO)	생성안됨
남평벼(일반미)	생성안됨
조생흑찰(흑미)	18
신토흑미(흑미)	16
흑진주(흑미)	16
보석흑찰(흑미)	15

[0061] [화학식 1]



[0062]

[0063] 화합물 명: 시아니딘 3-O-글루코사이드

[0064] 1) 물성 : 적색파우더

[0065] 2) 분자량 : 449

[0066] 3) 분자식 : $C_{21}H_{21}O_{11}^{+}$

[0067] **3. 실험예 2: 흑미의 시아니딘 3-O-글루코사이드 최적추출법 확인**

[0068] 80%(w/v) 발효주정과, 0.1%(w/v) 시트르산을 첨가하여 안토시아닌 색소가 함유된 흑미 추출물을 안정화하고, PH 3이하에서 $-5^{\circ}\text{C} \sim 5^{\circ}\text{C}$ 하에서 압소에 저장하며 감압농축한 후 천연식용색소 시아니딘 3-O-글루코사이드가 포함된 흑미 추출물을 제조하였다

[0069] **4. 실험예 3: *H. pylori* 배양**

[0070] 면양혈액배지 또는 Brucella 배지를 사용하여 *H. pylori* (ATCC 49503) 균주를 배양하였으며, 항균활성 실험을 위해서는 Mueller-hinton broth 또는 Mueller-Hinton agar 배지를 사용하였음. 세균은 100% 습도를 유지하는 10% CO_2 배양기에서 3일 동안 배양하였다.

[0071] **5. 실험예 4: 헬리코박터 파이로리 억제활성 검정에 대한 것(paper disk법)**

[0072] 준비된 여러 가지 흑미를 다양한 농도로 paper disk에 적용하여 도 1에 기재된 바와 같이 *H. pylori* 억제활성을 검사하였다. 도 1에서 보여지듯이 흑미 추출물들은 헬리코박터 파이로리에 대하여 특이적인 억제활성을 보였다.

[0073] **6. 실험예 5: 흑미추출물의 세포독성 검정**

[0074] 위장관 세포주인 KATO III에 흑미추출물을 처리하여 48시간에 걸쳐 세포 독성 검사를 실시하였음. 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 기반으로 하여 흑미추출물 처리에 의한 세포사멸(necrosis, apoptosis를 모두 포함한 세포사멸) 유도 여부를 검사하였다.

[0075] ① 위장관 세포주인 KATO III에 흑미추출물을 처리하여 48시간에 걸쳐 세포 독성 검사를 실시한 결과, 흑미추출물은 세포사멸(necrosis, apoptosis를 모두 포함한 세포사멸)을 유도하지 않는다는 결과를 얻었다. 흑미추출물은 세포독성을 유발하지 않는 것으로 확인할 수 있었다(도 2).

[0076] ② 위장관 세포주인 KATO III에 흑미추출물을 처리하여 세포 독성 검사를 실시한 결과, 흑미추출물은 세포사멸(apoptosis)과 관련된 단백질의 활성이나 발현에 관여하지 않는다는 결과를 얻었다. 흑미추출물은 세포독성을 유발하지 않는 것으로 판단된다(도 3).

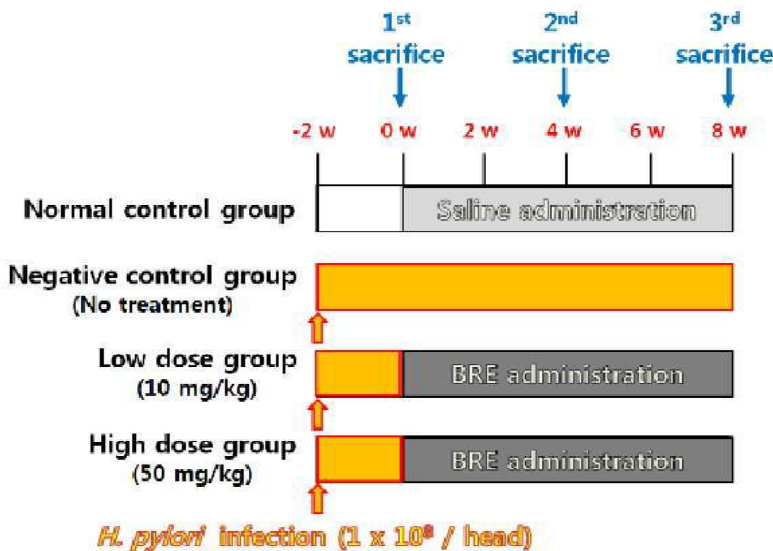
[0077] **7. 실험예 6: 흑미추출물에 의한 *H. pylori* 감염 세포의 세포사멸의 억제활성 검정**

[0078] *H. pylori*에 감염시킨 KATO III 세포주(세포 1개 당 세균 200개 비율로 감염)에 흑미추출물을 처리한 뒤에 세균 감염에 의하여 유발된 세포사멸(apoptosis)의 억제 여부를 검사하였으며(caspase-8, -3, -7, PARP에 대한 western blotting 실시), 세포 사멸 억제 단백질들의 발현 변화를 검사하였다.(survivin, XIAP에 대한 western blotting 실시)

[0079] ① 위장세포주인 KATO III에 *H. pylori*를 감염시킨 후, 흑미추출물을 처리하여 세포사멸(necrosis, apoptosis를 모두 포함한 세포사)에 미치는 영향을 살펴본 결과, 흑미추출물 처리 후 48시간이 경과하면 약 58%의 세포사멸 억제효과가 있는 것으로 판단된다(도 4).

[0080] ② *H. pylori*에 감염시킨 KATO III 세포주(세포 1개 당 세균 200개 비율로 감염)에 흑미추출물을 처리한 결과, 세균감염에 의하여 유발된 세포사멸(apoptosis)이 억제되는 경향을 나타내었으며(caspase-8, -3, -7, PARP), 세포 사멸억제 단백질들(survivin, XIAP)의 발현이 증가하는 경향이 관찰되었다. 이를 통하여 흑미추출물은 *H. pylori* 감염에 의하여 유도되는 세포사멸을 억제시키는 효과를 가지는 것으로 판단된다(도 5).

[0081] 8. 실험예 7: 흑미추출물을 이용한 *H. pylori* 감염동물 치료와 관련된 전임상 실험



[0082] 흑미추출물 투여 2주 전에 Mongolian gerbil에게 1 x 10⁹ 썸의 *H. pylori*를 경구를 통하여 감염시킨 후, 고농도 (50 mg/kg)와 저농도(10 mg/kg)로 제균을 시도하였다. 주 3회 썸 총 8주간 경구를 통하여 *H. pylori*에 감염된 동물에게 흑미추출물을 투여하였다.

[0083] 1) Anti-*H. pylori* 항체를 이용하여 흑미추출물 처리에 의한 *H. pylori* 제균 여부를 조직면역화학염색을 통하여 검사하였고, 2) H&E 염색을 실시하여 세균 감염 후 동반되는 염증 개선 효과를 검사하였으며, 3) 세균 감염시 동물의 혈액내에서 증가하였던 면역세포의 수치 변화를 측정하였고, 4) 마지막으로 정상 실험동물에게 흑미추출물을 8주간 반복 투여한 뒤에 H&E 염색을 실시하여 간독성 및 신독성을 유발하는지 검사하였다.

[0084] 9. 실험예 8: 흑미 추출물 처리시 *H. pylori* 분비 독소 (Cag A, Vac A)의 분비억제효과

[0085] 흑미 추출물 처리시 *H. pylori* 분비 독소 (Cag A, Vac A)의 분비억제효과에 대한 웨스턴 블랏팅 결과 및 RT-PCR 결과를 확인하였다(도 6, 도 7 및 도 8).

[0086] ① 웨스턴 블랏팅 실험 결과 *H. pylori* 배양액에 다양한 농도(0 ~ 1600 µg/ml)의 흑미추출물을 처리하였다(컨트롤, 100, 200, 400, 800, 1600 µg/ml). 도 6에서 보여지듯이, 도 6의 패널 (A)에서는 CagA, VacA 독소의 분비가 억제되는 경향을 보였으며, 패널 (B)에서는 CagA, VacA 독소가 분비되지 못하여 세균 내에 축적되는 경향을 보여준다. 패널 (C)의 경우 분비된 다른 단백질에서는 정량적 변화가 관찰되지 않았다. 패널 (D)는 세균 내 다른 단백질에서는 정량적 변화가 관찰되지 않았다.

[0087] ② RT-PCR 실험 결과 도 7에서 보여지듯이, *H. pylori* 배양액에 흑미 추출물을 첨가하였을 때, *cagA*, *vacA*, 등의 독소 단백질 유전자의 전사(transcription)가 억제되는 경향을 관찰할 수 있었다(패널 A). 이러한 영향으로 인하여 독소 단백질의 발현이 억제되는 것으로 판단할 수 있다. 또한, CagA와 VacA 독소의 분비에 관여하는 분비체계(type IV, Va secretion system)를 조절하는 효소 유전자인 *secA*의 전사 역시 억제되는 경향을 보였다(패널 B, 패널 C). 대조군으로 설정한 UDP-galactose 4-epimerase를 비롯한 다른 유전자들의 전사에는 영향이 없었다(패널 D).

[0088] 이로써, 흑미추출물은 *H. pylori* 독소 단백질의 발현은 물론, 독소 단백질의 분비 까지도 억제시킬 수 있는 물질인 것으로 판단된다.

[0089] **10. 실험예 9: 흑미 분획물 처리시 *H. pylori* 분비 독소 (Cag A, Vac A)의 분비억제효과**

[0090] 도 8에서 보여지듯이, 흑미 추출물에서 분리한 안토시아닌 및 안토시아닌 종류별 *H. pylori*에 처리시 분비 독소 (CagA, VacA)의 억제 효과에 대한 RT-PCR 결과를 판단하였다.

[0091] 라인 6은 흑미 추출물을 처리한 결과로 Cag A 및 Vac A의 발현을 억제하는 효과가 있음을 확인할 수 있었으며, 흑미 추출물 중 분획물에 포함되는 시아니딘-3-O-글루코사이드를 처리하였을 때에는 Vac A 및 Sec A mRNA의 발현량이 감소되었다.

[0092] **11. 실험예 10: *H. pylori* 감염모델 (전임상) 확인 및 흑미 추출물 처리시 헬리코박터 파이로리 억제활성의 면역조직화학 (Immunohistochemistry) 실험**

[0093] 흑미추출물 투여 2주 전에 Mongolian gerbil에게 1×10^9 씩의 *H. pylori*를 경구를 통하여 감염시킨 후, 고농도 (50 mg/kg)와 저농도(10 mg/kg)로 제균을 시도하였다. 주 3회 씩 총 8주간 경구를 통하여 *H. pylori*에 감염된 동물에게 흑미추출물을 투여하였으며, 위 그림과 같은 치료효과를 확인하였다. (붉은색 화살표는 anti-*H. pylori* 항체에 대한 양성반응을 나타냄) 흑미추출물은 *H. pylori* 제균에 있어서 탁월한 효과를 가지는 것으로 판단된다. 고농도에서는 물론, 저농도 치료군에서도 *H. pylori* 제균이 가능하였다.

[0094] **12. 실험예 11: *H. pylori* 감염모델 (전임상) 흑미 추출물 처리시 위장 염증 억제효과 검증**

[0095] *H. pylori* 감염 후, 치료를 시행하지 않은 그룹에서는 세균감염에 따른 재반증상인 조직탈락, 출혈, 등의 조직병리학적 염증 소견이 관찰되었으나, 흑미추출물을 투여하여 치료를 시도한 그룹에서는 조직탈락 및 출혈이 현저하게 감소한 결과를 살펴볼 수 있었다(도 10). 이로써, 흑미추출물은 세균 감염에 의하여 유도되는 염증에도 개선 효과를 가지는 것으로 판단된다.

[0096] **13. 실시예 12 :*H. pylori* 감염모델(전임상)에 흑미추출물을 처리후 실시한 혈액학적 분석결과**

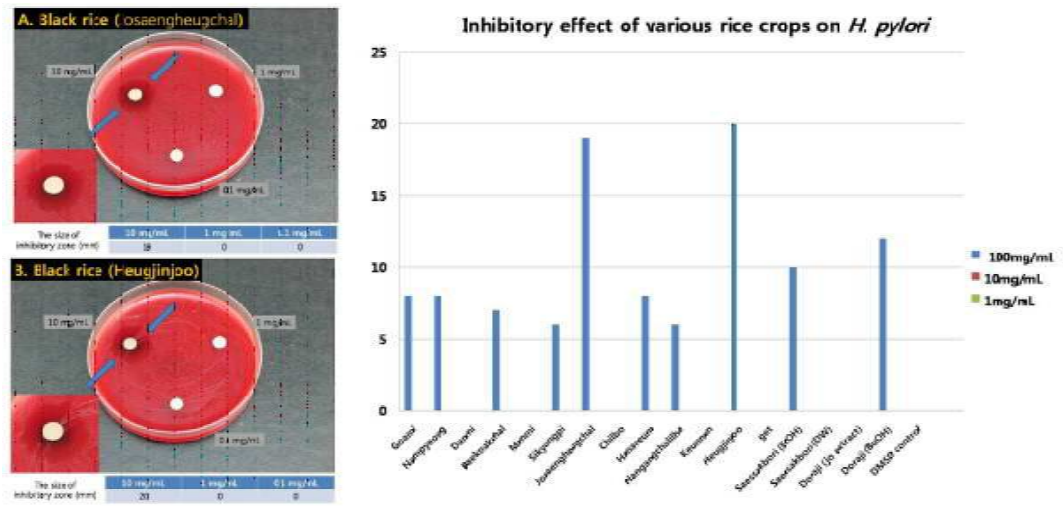
[0097] 도 11에서 보여지듯이 일반적으로 생체 내에서 세균 감염증 발생할 경우, 혈액 내에서 호중구(neutrophil)를 비롯한 면역세포들의 수치가 급증하는 경향을 보이는데, *H. pylori*에 감염된 Mongolian gerbil에서도 동일한 증상을 살펴볼 수 있었다. 그러나 흑미추출물을 8주간 투여한 결과, 호중구(neutrophil)를 비롯한 면역세포들의 수치가 정상범위로 회복되는 경향을 확인할 수 있었음. 흑미추출물은 *H. pylori* 제균 효과를 가지는 것으로 판단된다.

[0098] **14. 실시예 13: *H. pylori* 감염모델(전임상)에 흑미추출물을 처리시 간독성 및 신독성 분석 결과**

[0099] 도 12에서 보여지듯이, 정상 Mongolian gerbil에게 두 가지 농도(50 mg/kg, 10 mg/kg)의 흑미추출물을 주 3회 씩 8주간 반복 투여를 실시한 결과, Mongolian gerbil에서 간독성 및 신독성이 나타나지 않았다. 본 실시예의 판단 결과 흑미추출물은 인체에 적용하여도 안전한 물질인 것으로 판단된다.

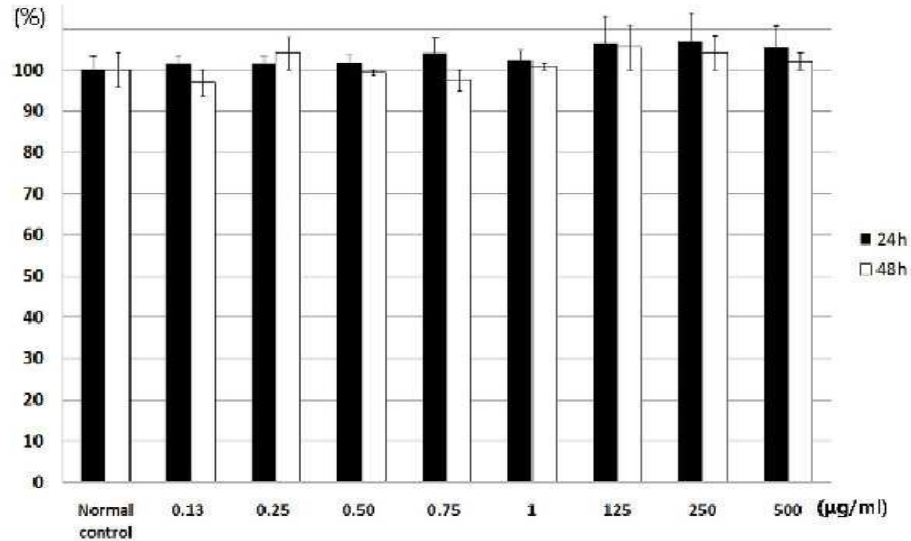
도면

도면1

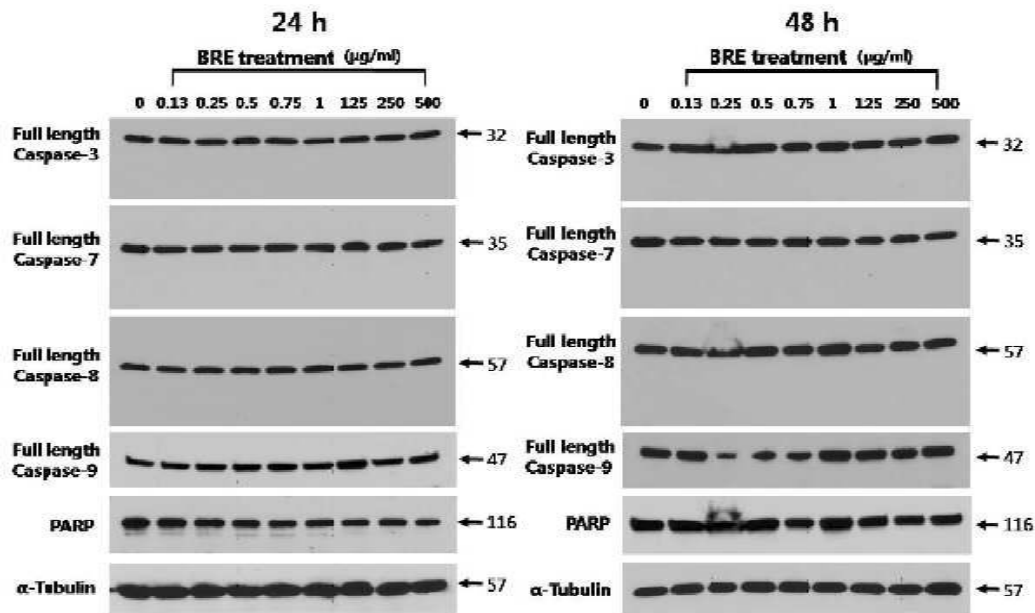


도면2

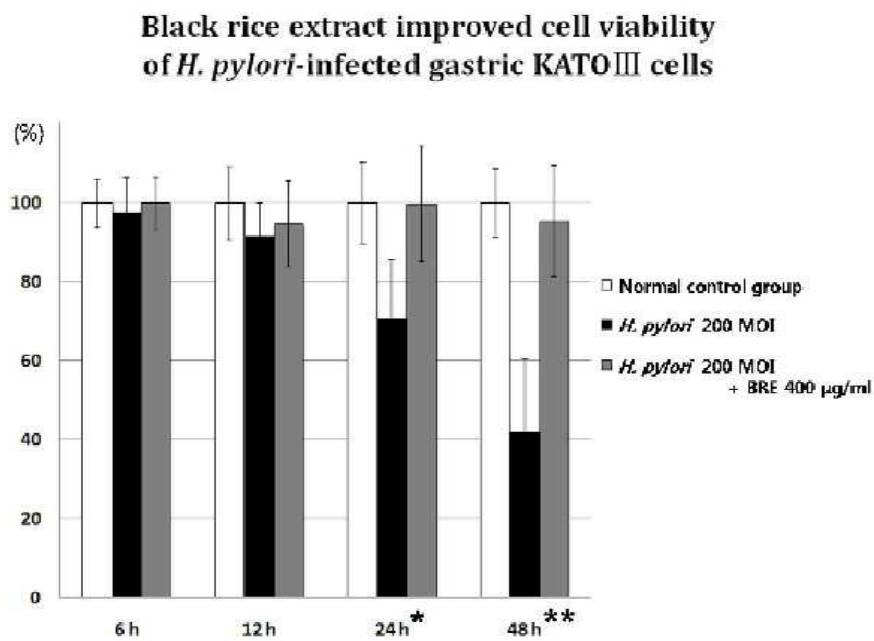
Black rice extract has no cytotoxicity on KATOIII cells



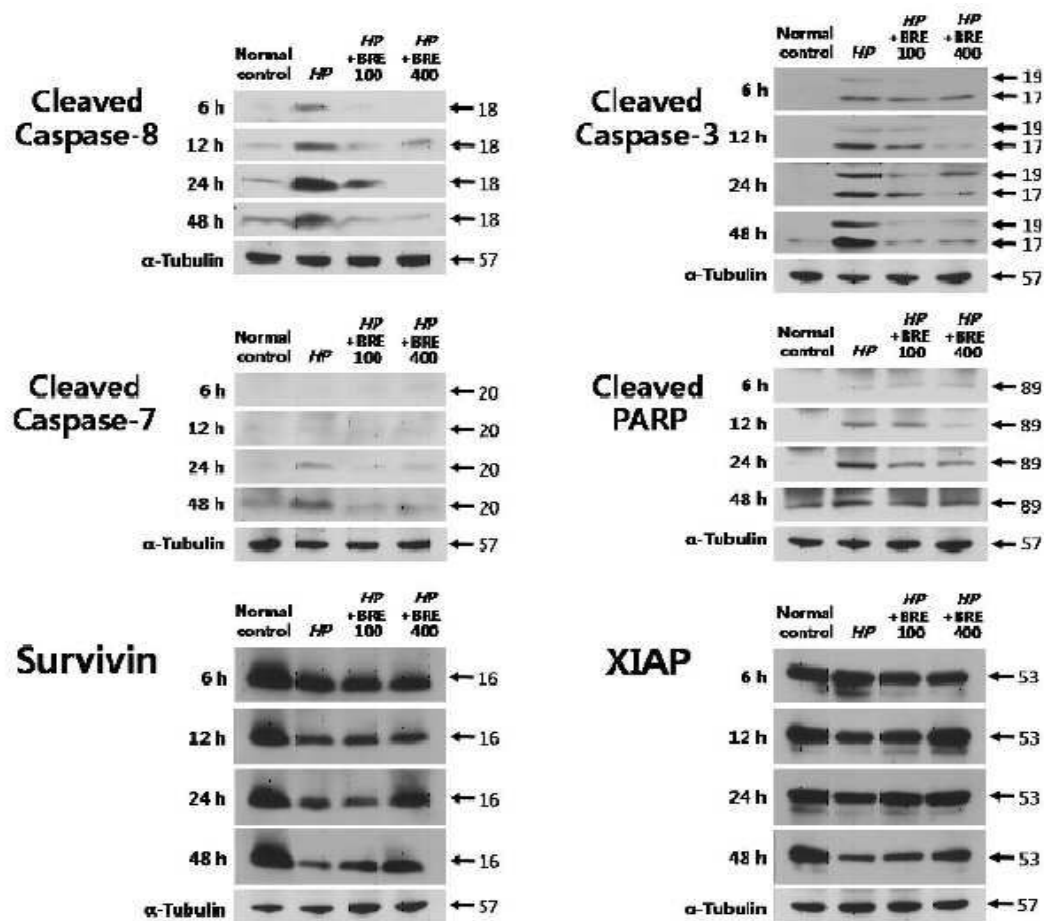
도면3



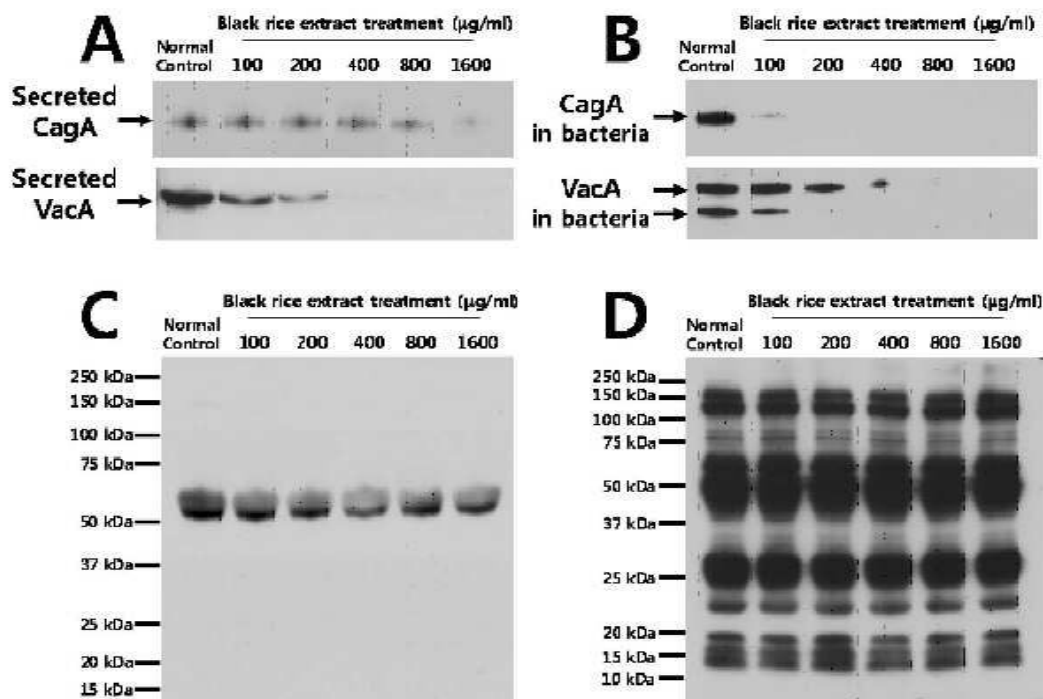
도면4



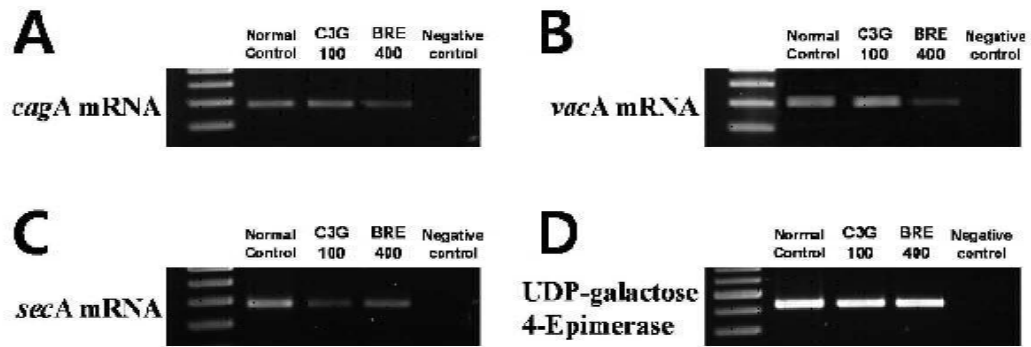
도면5



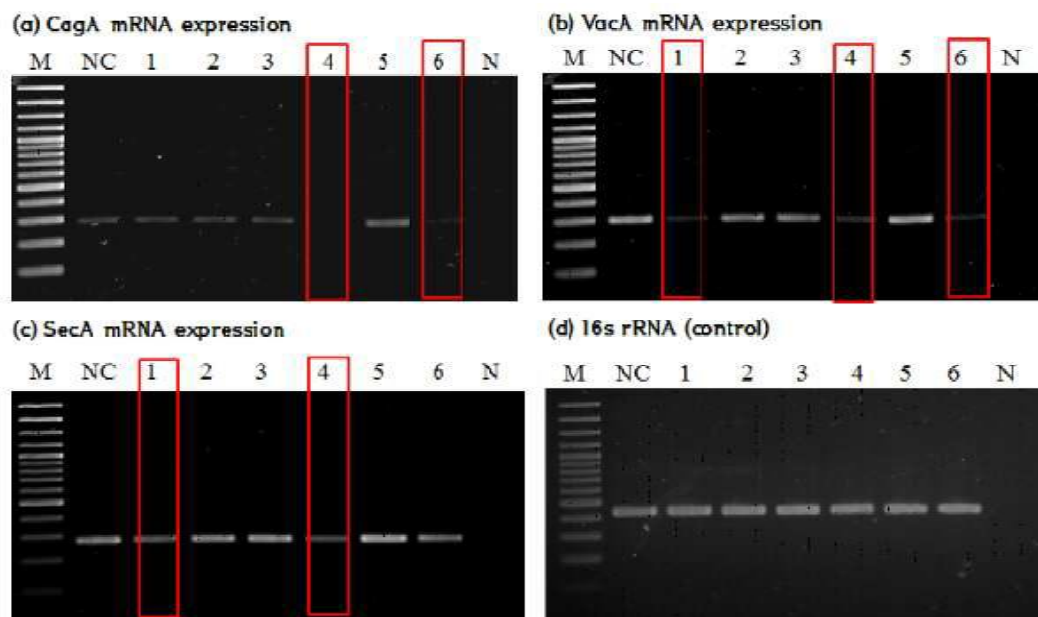
도면6



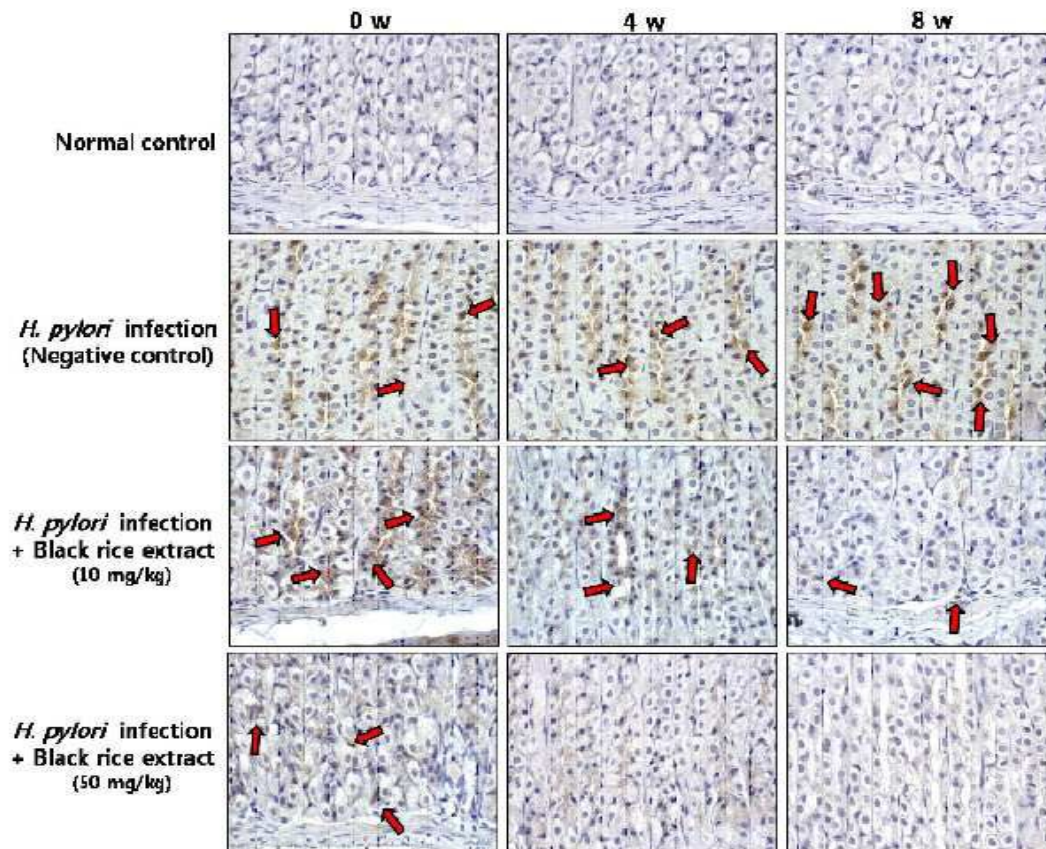
도면7



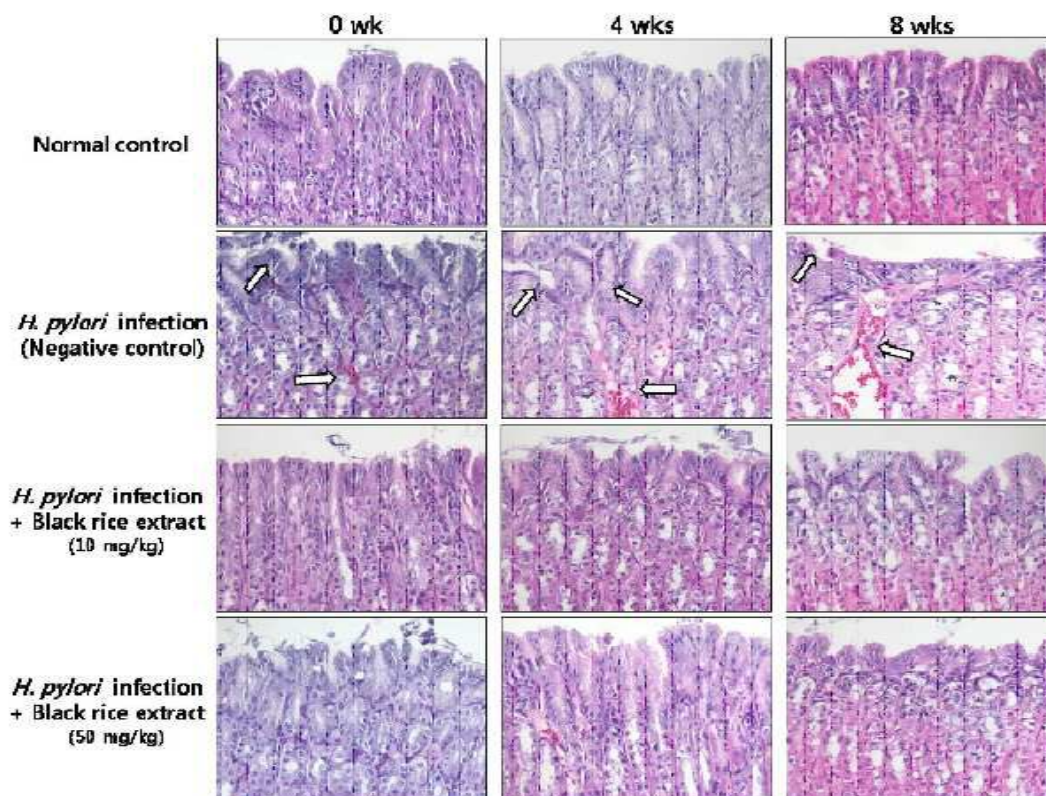
도면8



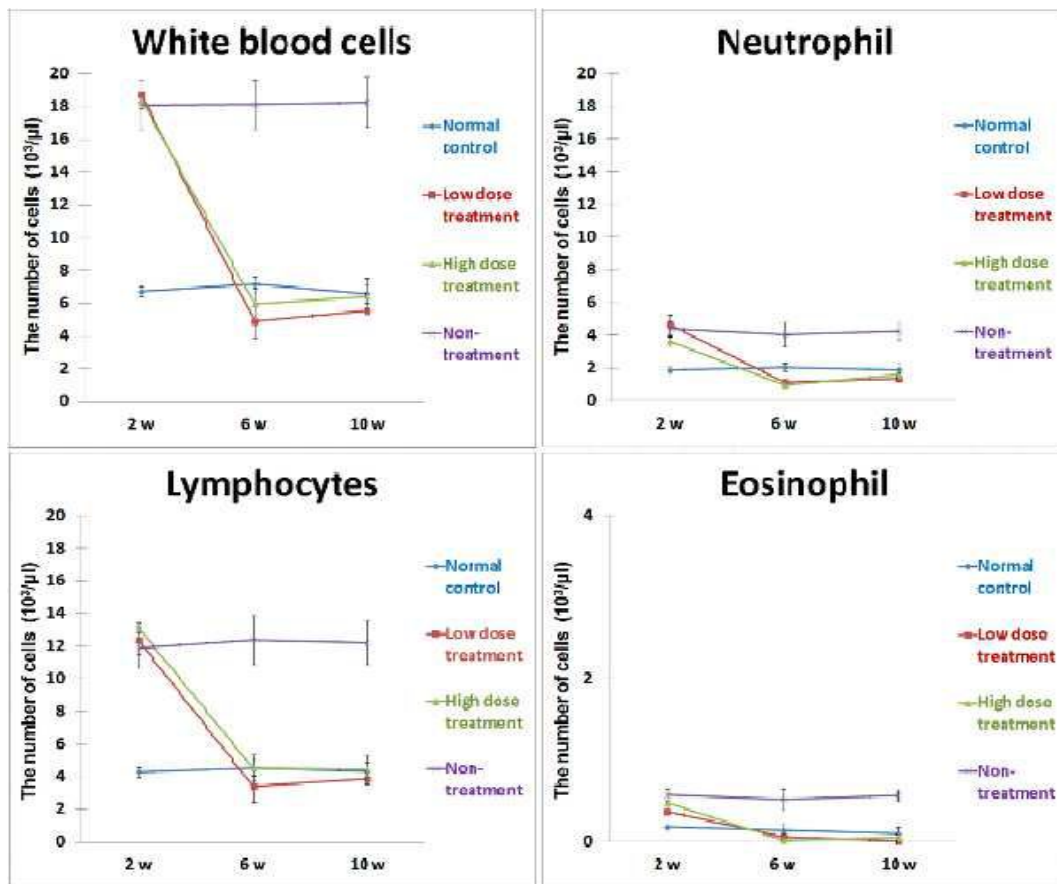
도면9



도면10



도면11



도면12

