



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0000850
(43) 공개일자 2025년01월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/352 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)
A61K 31/661 (2006.01) A61K 31/7048 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) A61P 33/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/352 (2023.05)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2024-0030610
(22) 출원일자 2024년03월04일
심사청구일자 2024년03월04일
(30) 우선권주장
1020230082579 2023년06월27일 대한민국(KR)
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
나병국
경상남도 진주시 진주대로815번길 11, 102동 901호
르후웅지앙
경상남도 진주시 진주대로856번길 6-7, 302호
(74) 대리인
위병갑

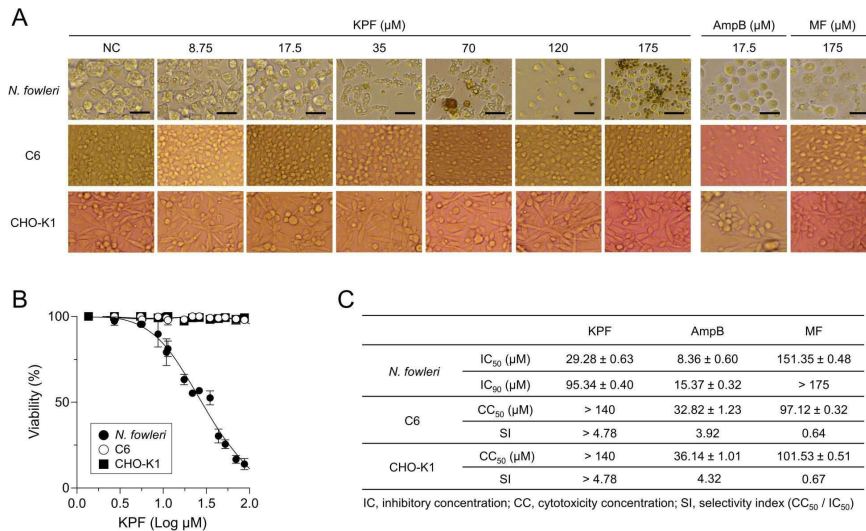
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 캠페롤을 유효성분으로 포함하는 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 캠페롤을 유효성분으로 포함하는 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 캠페롤을 포함하는 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 조성물은 파울러자유아메바의 형태학적 변화를 유도하며, 파울러자유아메바의 생존율을 감소시키고 미세 세포구조의 변화를 유도하는 효과를 가진다. 따라서, 본 발명에 따른 캠페롤은 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/661 (2013.01)
A61K 31/7048 (2013.01)
A61P 25/00 (2018.01)
A61P 33/04 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/30 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)
A61K 2300/00 (2023.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711162329
과제번호	2021R1A2C1091855
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	우리나라 생물자원 추출물에서 난치성 아메바 감염증 특이 치료제 후보물질 발굴
과제수행기관명	경상국립대학교 산학협력단
연구기간	2021.09.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

캄페롤(kaempferol)을 유효성분으로 포함하는, 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 밀테포신(miltefosine) 또는 암포테리신 B(amphotericin B)와 병용 투여 하는 것을 특징으로 하는, 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 아메바성 감염은 파울러자유아메바(*Naegleria fowleri*)로부터 유발된 원발성 아메바 수막뇌염(primary amoebic meningoencephalitis)인 것을 특징으로 하는, 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 파울러자유아메바 사멸 효능이 있는 것을 특징으로 하는, 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 파울러자유아메바의 형태학적 변화를 유도하는 것을 특징으로 하는, 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 형태학적 변화는 파울러자유아메바의 크기 감소 및 식포 감소인 것인, 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조성물은 파울러자유아메바의 생존율을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 조성물은 세포자살을 유도하는 것을 특징으로 하는, 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 조성물은 파울러자유아메바의 미세 세포구조 변화를 유도하는 것을 특징으로 하는, 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 미세 세포구조 변화는 세포소기관의 변형 또는 미토콘드리아의 기능 손상인 것인, 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

캠페롤(kaempferol)을 유효성분으로 포함하는, 밀테포신(miltefosine) 또는 암포테리신 B(amphotericin B)와의 병용투여를 위한 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

캠페롤(kaempferol)을 유효성분으로 포함하는, 아메바성 감염의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 조성물은 밀테포신(miltefosine) 또는 암포테리신 B(amphotericin B)와 병용 투여 하는 것을 특징으로 하는, 아메바성 감염의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 캠페롤을 유효성분으로 포함하는 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 파울러자유아메바(*Naegleria fowleri*)는 토양과 담수 등 다양한 지구환경에 서식하는 자유생활아메바로서 사람에게 기회감염 되어 원발성 아메바 수막뇌염(primary amoebic meningoencephalitis: PAM)을 일으키는 고병원성 원충이다. 파울러자유아메바의 주요 감염부위는 중추신경계이며, 비강 감염 후 심한 두통, 식욕부진, 메스꺼움, 구토, 고열(38~40 ℃), 사지의 기능장애, 뇌막자극의 징후 그리고 뇌염 등의 임상증상이 동반된다. 감염부위의 특수성 때문에 조기 감별진단이 어렵고, 병증의 진행이 매우 빨라 감염 후 10일 이내에 사망하게 되며 사망률은

97% 이상이다.

[0004] 전 세계적으로 PAM의 발병률은 낮지만 PAM에 의한 사망자는 지속적으로 증가하고 있으며, 글로벌 지구 온난화에 의한 지구환경 변화로 파울러자유아메바의 서식지가 점차 확대되어 저수지나 호수, 강, 온천 이외의 수영장과 젖은 토양 등에서도 파울러자유아메바의 서식이 확인되었다. 최근에 외국에서 감염된 국내인이 국내에서 사망한 사례가 보고되기도 하였다. PAM은 높은 사망률에도 불구하고 조기 진단법과 효과적인 치료제가 현재까지 개발되지 않았으며, 현재 암포테리신 B(amphotericin B)와 밀테포신(miltefosine) 등이 사용 가능한 약제로 고려되고 있으나 치료 효과는 불확실하다. 따라서 PAM을 효과적으로 치료할 수 있는 치료제의 개발이 매우 시급한 실정이다.

[0005] 캠페롤(kaempferol)은 케일, 콩, 녹차, 토마토, 시금치, 브로콜리 등 다양한 식물과 식물 유래 식품에서 발견되는 플라보노이드의 일종인 천연 플라보놀로서 항균(anti-microbial), 항산화(antioxidant), 항암(anticancer) 및 피부염증 제어 효능 등을 나타낸다고 보고되었다.

[0006] 본 발명자들은 파울러자유아메바 감염의 예방 또는 치료용 조성물을 개발하기 위하여 연구를 거듭한 결과, 캠페롤과 밀테포신 또는 암포테리신 B를 병용 처리하였을 때, 파울러자유아메바 사멸 효능이 증가한다는 것을 확인하였으며, 캠페롤 및 밀테포신 또는 암포테리신 B를 포함하는 조성물이 파울러자유아메바의 사멸 효능을 증가시키며 파울러자유아메바의 형태학적 변화를 유도하고 파울러자유아메바의 생존율을 감소시키고 미세 세포구조의 변화를 유도한다는 효과가 있다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제10-2391086호(2022.04.22.)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 캠페롤을 포함하는 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[0010] 또한, 본 발명의 다른 목적은 캠페롤(kaempferol)을 유효성분으로 포함하는 밀테포신(miltefosine) 또는 암포테리신 B(amphotericin B)와의 병용투여를 위한 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은 캠페롤을 포함하는 아메바성 감염의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 캠페롤을 포함하는 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 이어서, 본 발명은 캠페롤(kaempferol)을 유효성분으로 포함하는 밀테포신(miltefosine) 또는 암포테리신 B(amphotericin B)와의 병용투여를 위한 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0015] 나아가, 본 발명은 캠페롤을 포함하는 아메바성 감염의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명의 캠페롤을 포함하는 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 조성물은 파울러자유아메바의 형태학적 변화를 유도하며, 파울러자유아메바의 생존율을 감소시키고 미세 세포구조의 변화를 유도하는 효과를 가진다. 따라서,

본 발명에 따른 캠페롤은 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 캠페롤의 파울러자유아메바 사멸 효과를 나타낸 도이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 캠페롤의 apoptosis assay를 나타낸 도이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 캠페롤의 동물세포에서의 세포자살 유도 효과를 나타낸 도이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 캠페롤의 TUNEL assay를 나타낸 도이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 캠페롤의 동물세포에서 DNA 단편화 유도 효과를 나타낸 도이다.
- 도 6은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 캠페롤의 미토콘드리아 전기화학적 변화 분석을 나타낸 도이다.
- 도 7은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 캠페롤의 ATP 생산량 변화를 나타낸 도이다.
- 도 8은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 캠페롤의 파울러자유아메바 내 활성 유해 산소(ROS) 변화를 나타낸 도이다.
- 도 9는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 캠페롤과 밀테포신 또는 암포테리신 B 병용처리의 파울러자유아메바 생존율을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현 예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [0021] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0022] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는(w/w) %, 고체/액체는(w/v) %, 그리고 액체/액체는(v/v) %이다.
- [0024] 일 측면에서, 캠페롤(kaempferol)을 유효성분으로 포함하는 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0025] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 밀테포신(miltefosine) 또는 암포테리신 B(amphotericin B)와 병용 투여 하는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명에서 사용되는 용어 “밀테포신(miltefosine)”은 파울러자유아메바의 미토콘드리아 기능을 억제하여 에너지 생산 과정을 방해하는 약물로 최근 치료목적으로 사용되고 있다.
- [0027] 본 발명에서 사용되는 용어 “암포테리신 B(amphotericin B)”는 항진균제로 일반적으로 진균 감염을 치료하는데 사용되며, 파울러자유아메바 치료제로 사용되고 있으나 인체 독성이 크고 확실한 치료효과는 불명확하다.
- [0028] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 아메바성 감염은 파울러자유아메바(*Naegleria fowleri*)로부터 유발된 원발성 아메바 수막뇌염(primary amoebic meningoencephalitis)인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 파울러자유아메바 사멸 효능이 있는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0030] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 파울러자유아메바의 형태학적 변화를 유도하는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 형태학적 변화는 파울러자유아메바의 크기 감소 및 식포 감소인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 파울러자유아메바의 생존율을 감소시키는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 세포자살을 유도하는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 파울러자유아메바의 미세 세포구조 변화를 유도하는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 미세 세포구조 변화는 세포소기관의 변형 또는 미토콘드리아의 기능 손실인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 일 측면에서, 캠페롤(kaempferol)을 유효성분으로 포함하는 밀테포신(miltefosine) 또는 암포테리신 B(amphotericin B)와의 병용투여를 위한 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0038] 본 발명의 약학 조성물에는 유효성분 이외에 보조제(adjutant)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 당해 기술분야에 알려진 것이라면 어느 것이나 제한 없이 사용할 수 있으나, 예를 들어 프로인트(Freund)의 완전 보조제 또는 불완전 보조제를 더 포함하여 그 면역성을 증가시킬 수 있다.
- [0039] 본 발명에 따른 약학 조성물은 캠페롤을 약학적으로 허용된 담체에 혼입시킨 형태로 제조될 수 있다. 여기서, 약학적으로 허용된 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 포함한다. 본 발명의 약학 조성물에 이용할 수 있는 약학적으로 허용된 담체는 이들로 제한되는 것은 아니지만, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0040] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0041] 제제화할 경우에는 통상 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 그러한 고형 제제는 캠페롤에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 일반적으로 사용되는 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0042] 본 발명에 따른 약학 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식이 예상될 수 있는데, 예를 들면 경구, 정맥, 근육, 피하, 복강내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0043] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 개체의 연령, 체중, 성별, 신체 상태 등을 고려하여 선택된다. 상기 약학 조성물 중 포함되는 캠페롤의 농도는 대상에 따라 다양하게 선택할 수 있음은 자명하며, 바람직하게는 약학 조성물에 0.01 ~ 5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함되는 것이다. 그 농도가 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만일 경우에는 약학 활성이 나타나지 않을 수 있고, 5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 초과할 경우에는 인체에 독성을 나타낼 수 있다.
- [0044] 상기 약학 조성물은 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화될 수 있다.
- [0045] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경질, 연질 캡셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제 등

이 있는데, 이들 제형은 캠페롤 이외에 희석제(예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0046] 또한, 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제제이며, 주사용 제제의 용매로서 물, 링거액, 등장성 생리식염수 또는 현탁액을 들 수 있다. 상기 주사용 제제의 멸균 고정 오일은 용매 또는 현탁 매질로서 사용할 수 있으며 모노-, 디-글리세라이드를 포함하여 어떠한 무자극성 고정오일도 이러한 목적으로 사용될 수 있다.

[0047] 또한, 상기 주사용 제제는 올레산과 같은 지방산을 사용할 수 있다.

[0049] 일 측면에서, 본 발명은 캠페롤(kaempferol)을 유효성분으로 포함하는 아메바성 감염의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0050] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 밀테포신(miltefosine) 또는 암포테리신 B(amphotericin B)와 병용 투여 하는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0051] 본 발명의 식품 조성물은 유효성분인 캠페롤을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0052] 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 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 상기 약학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등이 있다.

[0053] 또한 상기 식품 조성물은 유효성분인 캠페롤 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0054] 본 발명의 기능성 식품 조성물은, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공될 수 있다. 본 발명에서 '건강기능성 식품 조성물'이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 목적으로 섭취하는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 상기 '식품 첨가물 공전'에 기재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료 제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다. 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 캠페롤을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다. 캡슐 형태의 건강기능식품 중 경질 캡슐제는 통상의 경질 캡슐에 본 발명의 캠페롤을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡슐제는 본 발명의 캠페롤을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡슐기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡슐제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다. 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 캠페롤과 부형제, 결합

제, 봉해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다. 과립 형태의 건강 기능식품은 본 발명의 캠페롤의 부형제, 결합제, 봉해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0056] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 구체적인 실시예를 상세하게 설명하였으나, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서 다른 구성요소를 추가, 변경, 삭제 등을 통하여, 퇴보적인 다른 발명이나 본 발명 사상의 범위 내에 포함되는 다른 실시예를 용이하게 제안할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[0058] <준비에 1> 세포 배양 및 실험재료 준비

[0059] 1-1. 파울러자유아메바 배양

[0060] 본 발명에 사용된 파울러자유아메바(*Naegleria fowleri*)는 Carter NF69 strain(ATCC No. 30215)으로 미국 ATCC 에서 분양받았다. 파울러자유아메바는 5% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS, Gibco, USA)과 1% penicillin/streptomycin(Sigma, USA)이 함유된 Nelson 배지(Nelson and Jones, 1970)에서 배양하여 사용하였다.

[0062] 1-2. 대조군 세포 배양

[0063] 본 발명에 사용된 대조군으로는 C6 rat glial cells(C6, ATCC CCL-107)와 Chinese Hamster Ovary cells(CHO-K1, ATCC CCL-61)를 사용하였다. 세포는 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS, Gibco, USA)과 1% penicillin/streptomycin(Gibco)을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's 배지(DMEM; Gibco)에서 배양하여 사용하였다.

[0065] 1-3. 실험재료 준비

[0066] 본 발명에 사용된 캠페롤(kaempferol)은 Sigma(Cat.No. 60010; USA)에서 순도가 97.0%(HPLC) 이상인 것을 구입하여 사용하였다. 구입한 캠페롤을 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 10 mg/mL로 용해하여 사용하였다.

[0067] 본 발명에 사용된 밀테포신(miltefosine)은 Sigma(Cat.No. M5571; USA, 순도 $\geq$ 98%)에서 구입한 것을 사용하였으며, 암포테리신 B(amphotericin B)는 Gibco(Cat. No. 15290018; USA)에서 구입한 것을 사용하였다.

[0069] <실험예 1> 캠페롤의 항 파울러자유아메바 효능 확인

[0070] 1-1. 형태학적 변화 및 생존율 분석

[0071] 캠페롤의 파울러자유아메바 사멸 효능을 확인하기 위하여, 파울러자유아메바에 다양한 농도의 캠페롤(8.75, 17.5, 35, 70, 120 및 175 μ M)을 처리하여 파울러자유아메바의 형태학적 변화 및 생존율을 측정하였다.

[0072] 준비예 1-1에서 배양한 파울러자유아메바 영양형을 96-well microplate에 접종(10^5 cells/well)한 후 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 배양하였다. 대조군으로는 준비예 1-2에서 배양한 C6 세포와 CHO-K1 세포를 96-well microplate에 접종(2×10^4 cells/well)한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 사용하였다. 배양된 파울러자유아메바에 다양한 농도(8.75, 17.5, 35, 70, 120 및 175 μ M)의 캠페롤을 처리한 후 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 캠페롤을 첨가하지 않은 군은 0.1% DMSO만 처리하여 배양한 파울러자유아메바를 사용하였다. 또한, 양성대조군으로는 밀테포신(miltefosine)과 암포테리신 B(amphotericin B)를 사용하였다. 배양 후 파울러자유아메바의

형태학적 변화는 광학현미경으로 관찰하였다. 파울러자유아메바의 생존율은 CellTiter-Blue[®] Cell viability assay(Promega, USA)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 분석하였으며, IC₅₀(Inhibitory Concentration 50), IC₉₀(Inhibitory Concentration 90), CC₅₀(cytotoxicity concentration 50), SI(CC₅₀/IC₅₀, selective index)은 GraphPad Prism 9.1.0 software(GraphPad Software, USA)로 계산하였다. 분석한 형태학적 변화 및 생존율을 도 1에 나타내었다.

[0073] 도 1(A)에서 보듯이, 캠페롤을 파울러자유아메바에 처리하여 형태학적 변화를 측정한 결과, 파울러자유아메바에서 세포 형태의 변화와 세포 크기의 축소를 관찰하여, 형태학적 변화와 사멸이 유도되었다는 것을 확인하였다. 반면, 대조군 세포는 형태적 변화가 나타나지 않았다.

[0074] 도 1(B)에서 보듯이, 캠페롤을 파울러자유아메바에 처리하여 생존율을 측정한 결과, 파울러자유아메바의 생존율이 농도의존적으로 감소한다는 것을 확인하였다. 반면, 대조군 세포는 생존율이 변화되지 않았다.

[0075] 도 1(C)에서 보듯이, 파울러자유아메바와 대조군 세포에 대한 사멸 농도를 분석한 결과, 파울러자유아메바에 대한 캠페롤의 IC₅₀은 $29.28 \pm 0.63 \mu\text{M}$ 이었고 IC₉₀은 $95.34 \pm 0.40 \mu\text{M}$ 으로 나타났다. 반면, 대조군 세포에 대한 CC₅₀은 >140이었으며, SI는 >4.78로, 세포독성을 나타내지 않았다. 또한, 캠페롤은 밀테포신보다 효과적으로 파울러자유아메바를 사멸하였으며, 암포테리신 B는 캠페롤 보다 우수한 파울러자유아메바 사멸효과를 나타냈지만 동물세포에 대해 강한 독성을 나타냈다.

[0076] 이를 통해, 캠페롤은 파울러자유아메바에 특이적으로 형태학적 변화를 유도하고 생존율을 감소시켜 파울러자유아메바 사멸 효능이 우수하다는 것을 확인하였다.

[0078] 1-2. 세포자살 분석

[0079] 캠페롤의 항 파울러자유아메바 효능이 세포자살(apoptosis)과 연관이 있는지 확인하기 위하여, apoptosis assay 및 TUNEL assay를 실시하였다.

[0080] Apoptosis assay는 Apoptosis/Necrosis detection kit(Abcam, UK)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 수행하였다. 준비예 1-1에서 배양한 파울러자유아메바를 96-well microplate(black/clear bottom)에 접종(5×10^4 cells/well)하고 IC₅₀(8.4 $\mu\text{g/mL}$)과 IC₉₀(27.3 $\mu\text{g/mL}$) 농도의 캠페롤을 처리한 후 37 °C에서 24시간 또는 48시간 동안 배양하였다. 캠페롤을 처리하지 않은 군은 0.1% DMSO만 처리하여 동일한 조건에서 배양한 파울러자유아메바를 사용하였다. 배양 후, green apopxin, cytochalcein 및 7-aminoactinomycin D(7-AAD)를 처리하고 실온에서 2시간 동안 추가 배양하였다. 배양 후, 파울러자유아메바는 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 3회 세척하여 형광현미경(EVOS M5000 Imaging System, Thermo Fisher Scientific, USA)으로 관찰하였다(Apopxin: Ex/Em=490/525 nm, 7-ADD: Ex/Em=550/650 nm: CytoCalcein Violet 450: Ex/Em=405/450 nm). 분석한 apoptosis assay 결과를 도 2에 나타내었으며, 캠페롤이 동물세포에서 세포자살을 유도하는지 분석한 결과를 도 3에 나타내었다.

[0081] 도 2에서 보듯이, 캠페롤을 처리하지 않은 파울러자유아메바는 cytochalcein에 의해 염색되었으나, IC₅₀ 및 IC₉₀ 농도의 캠페롤을 처리한 파울러자유아메바는 cytochalcein에 의해 염색되지 않고, 세포자살을 표지하는 apopxin에 의해 염색되었다. 또한, 세포괴사(necrosis)를 의미하는 7-ADD 염색은 관찰되지 않았다.

[0082] 도 3에서 보듯이, 캠페롤은 C6 세포에서 세포자살을 유도하지 않았으며, 암포테리신 B는 약한 세포자살을 유도하였다.

[0083] TUNEL assay는 TUNEL fluorescein isothiocyanate(FITC) assay kit(Abcam, UK)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 수행하였다. 준비예 1-1에서 배양한 파울러자유아메바(10^6 cells/well)를 6-well plate(Thermo Fisher Scientific, USA)에 접종하고 IC₅₀(8.4 $\mu\text{g/mL}$)과 IC₉₀(27.3 $\mu\text{g/mL}$) 농도의 캠페롤을 처리한 후 37 °C에서 12시간 또는 24시간 동안 배양하였다. 캠페롤을 처리하지 않은 군은 0.1% DMSO만 처리하여 동일한 조건에서 배양한 파울러자유아메바를 사용하였다. 세포는 회수한 후 3.7% 포르말데히드(formaldehyde)로 실온에서 20분 동안 고정하였으며, 고정 후 파울러자유아메바는 PBS로 2회 세척하고 70% 에탄올에 30분 동안 처리하였다. 처리 후, TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP end-labeling)과 PI(propidium iodide)로 제조사의 방법

에 따라 염색하고 형광현미경(EVOS M5000 Imaging System, Thermo Fisher Scientific, USA)으로 관찰하였다(TUNEL: Ex/Em= 490/525 nm, PI: Ex/Em=550/650 nm). 분석한 TUNEL assay 결과를 도 4에 나타내었으며, 캠페롤이 동물세포에서 DNA 단편화를 유도하는지 분석한 결과를 도 5에 나타내었다.

[0084] 도 4에서 보듯이, 캠페롤을 처리하지 않은 파울러자유아메바는 TUNEL 및 PI에 의해 염색되지 않았으나, IC₅₀ 및 IC₉₀ 농도의 캠페롤을 처리한 파울러자유아메바는 TUNEL 및 PI에 의해 염색이 되었다. 이는 캠페롤을 처리한 파울러자유아메바는 DNA 단편화가 유도되었다는 것을 의미한다.

[0085] 도 5에서 보듯이, 캠페롤은 C6 세포에서 DNA 단편화를 유도하지 않았다.

[0086] 이를 통해, 캠페롤은 파울러자유아메바의 세포자살을 유도하여 캠페롤이 파울러자유아메바 사멸 효능이 있으며, 동물세포의 세포자살을 유도하지 않아 특이적으로 파울러자유아메바를 사멸한다는 것을 확인하였다.

[0088] 1-3. 미토콘드리아 기능 분석

[0089] 캠페롤을 처리한 파울러자유아메바에서 미토콘드리아의 변화 및 기능 저하를 분석하기 위하여, 미토콘드리아의 전기화학적 변화 분석 및 ATP 생산량 변화 분석을 실시하였다.

[0090] 미토콘드리아의 전기화학적 변화 분석은 JC-1 mitochondrial membrane potential assay kit(Abcam, UK)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 수행하였다. 준비예 1-1에서 배양한 파울러자유아메바를 96-well microplate(black/clear bottom)에 접종(5×10^4 cells/well)하고 IC₅₀(8.4 μ g/mL)과 IC₉₀(27.3 μ g/mL) 농도의 캠페롤을 처리한 후 37 °C에서 24시간 또는 48시간 동안 배양하였다. 캠페롤을 처리하지 않은 군은 0.1% DMSO만 처리하여 동일한 조건에서 배양한 파울러자유아메바를 사용하였다. 파울러자유아메바는 PBS로 3회 세척하여 JC-1(1 μ M)을 처리하고 실온에서 30분 동안 반응한 후, 형광현미경(EVOS M5000 Imaging System, Thermo Fisher Scientific, USA)으로 관찰하였다(JC-1 aggregate: Ex/Em=490/525 nm, JC-1 monomer: Ex/Em=550/650 nm). 미토콘드리아 전기화학적 변화 분석 결과를 도 6에 나타내었다.

[0091] 도 6에서 보듯이, 캠페롤을 처리하지 않은 파울러자유아메바의 경우 정상적인 미토콘드리아의 막전이가 유지됨에 따라 JC-1 aggregate가 정상적으로 형성되었다. 반면, 캠페롤을 처리한 파울러자유아메바의 미토콘드리아는 막전이의 손상으로 인해 monomer 형태의 JC-1이 관찰되었다.

[0092] ATP 생산량의 변화는 ATP assay kit(Abcam, UK)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 수행하였다. 파울러자유아메바는 IC₅₀(8.4 μ g/mL)과 IC₉₀(27.3 μ g/mL) 농도의 캠페롤을 처리한 후 37 °C에서 24시간 또는 48시간 동안 배양하였다. 캠페롤을 처리하지 않은 군은 0.1% DMSO만 처리하여 동일한 조건에서 배양한 파울러자유아메바를 사용하였다. 파울러자유아메바는 회수 후, ATP assay buffer(100 μ l)에 현탁하고 파쇄하였다. 상층액은 ATP reaction mixture와 혼합하고 실온에서 30분 동안 반응한 후, Multiskan FC spectrophotometer(Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 분석하였다. 분석한 결과를 도 7에 나타내었다.

[0093] 도 7에서 보듯이, ATP 생산량의 변화를 분석한 결과 캠페롤을 처리한 파울러자유아메바에서 ATP의 생산도 크게 감소하여, 캠페롤이 파울러자유아메바 미토콘드리아의 ATP 생산 저해를 유도했다는 것을 확인하였다.

[0094] 이를 통해, 캠페롤이 파울러자유아메바의 생리학적 변화 및 기능 저하를 유도하였다는 것을 확인하였다.

[0096] 1-4. 활성 유해 산소 분석

[0097] 캠페롤을 처리한 파울러자유아메바에서 세포사멸과 미토콘드리아의 기능 저하를 유발하는 기전을 분석하기 위하여, 파울러자유아메바 내 활성 유해 산소(reactive oxygen species; ROS)를 분석하였다.

[0098] 파울러자유아메바 내 ROS 생성 정도 분석은 DCFDA/H2DCFDA-Cellular ROS assay kit(Abcam, UK)를 이용하여 수행하였다. 준비예 1-1에서 배양한 파울러자유아메바를 96-well microplate(black/clear bottom)에 접종(5×10^4 cells/well)하고 IC₅₀(8.4 μ g/mL)과 IC₉₀(27.3 μ g/mL) 농도의 캠페롤을 처리한 후 37 °C에서 12시간 또는 24시간 동안 배양하였다. 캠페롤을 처리하지 않은 군은 0.1% DMSO만 처리하여 동일한 조건에서 배양한 파울러자유아메바를 사용하였다. 배양 후, 파울러자유아메바를 PBS로 여러 회 세척하고 2',7'-dichlorofluorescein

diacetate(DCFDA) 용액(20 μ M)을 처리하여 45분 동안 암배양하였다. 그 후, 파울러자유아메바는 PBS로 3회 세척하여 형광현미경(EVOS M5000 Imaging System, Thermo Fisher Scientific, USA)으로 관찰하였다(Ex/Em=490/525 nm). 파울러자유아메바 내 ROS 생성 정도 분석 결과를 도 8에 나타내었다.

[0099] 도 8에서 보듯이, 캠페롤을 처리한 파울러자유아메바 내 ROS 생산은 대조군 파울러자유아메바에 비해 크게 증가하였다.

[0100] 이를 통해, 캠페롤은 파울러자유아메바 내 ROS 생산을 증가시켜 세포 사멸 기전을 촉진시키고 미토콘드리아 기능을 손상시켜, 파울러자유아메바의 사멸을 유도하는 것을 확인하였다.

[0102] <실험예 2> 기존 치료제의 항 파울러자유아메바 효능 증대 확인

[0103] 파울러자유아메바 감염증인 원발성 아메바 수막뇌염(primary amoebic meningoencephalitis; PAM) 치료에 임상적으로 사용해 온 치료제인 밀테포신(miltefosine) 또는 암포테리신 B(amphotericin B)와 캠페롤의 병용 처리시 항 파울러자유아메바 효능을 비교하기 위하여, 밀테포신 또는 암포테리신 B와 캠페롤 병용 처리하여 파울러자유아메바의 생존율을 측정하였다.

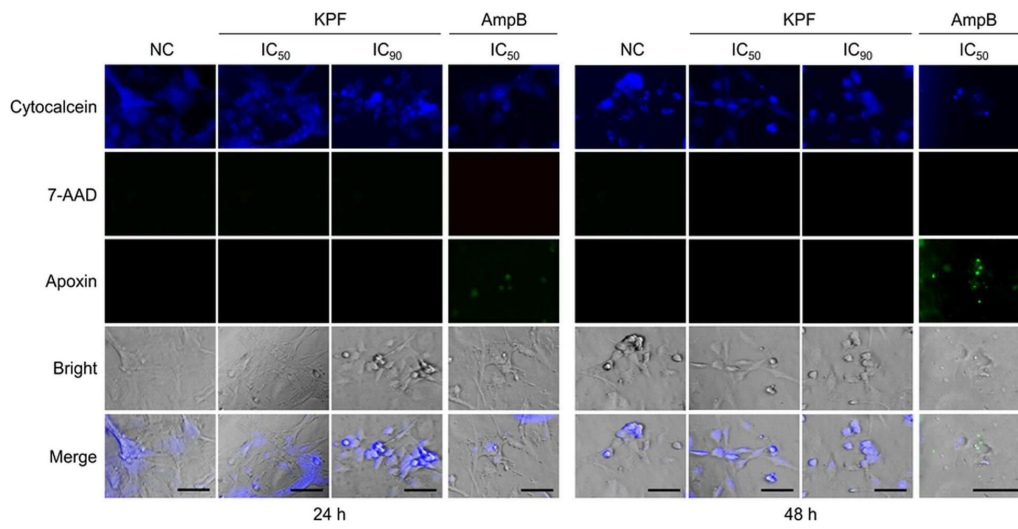
[0104] 준비예 1-1에서 배양한 파울러자유아메바 영양형을 96-well microplate에 접종(10^5 cells/ well)한 후 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 배양하였다. 배양한 파울러아메바에 준비예 1-3에서 준비한 IC₅₀ 농도의 캠페롤 및 밀테포신 또는 암포테리신 B를 혼합하여 처리한 후, 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 대조군으로는 동일 농도의 캠페롤, 밀테포신 또는 암포테리신 B를 단독 처리한 파울러아메바를 사용하였다. 배양 후 파울러자유아메바의 생존율은 CellTiter-Blue[®] Cell viability assay(Promega, USA)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 분석하였다. 분석한 결과를 도 9에 나타내었다.

[0105] 도 9에서 보듯이, 캠페롤, 밀테포신 또는 암포테리신 B를 단독 처리한 파울러자유아메바에 비하여 캠페롤 및 밀테포신, 캠페롤 및 암포테리신 B를 병용 처리한 파울러자유아메바의 생존율이 감소하였다. 캠페롤과 밀테포신을 병용 처리하였을 경우, 밀테포신 단독 처리한 경우에 비하여 생존율이 43.1% 감소하였다. 캠페롤과 암포테리신 B를 병용 처리한 경우, 암포테리신 B를 단독 처리한 경우에 비하여 생존율이 13.8% 감소하였다.

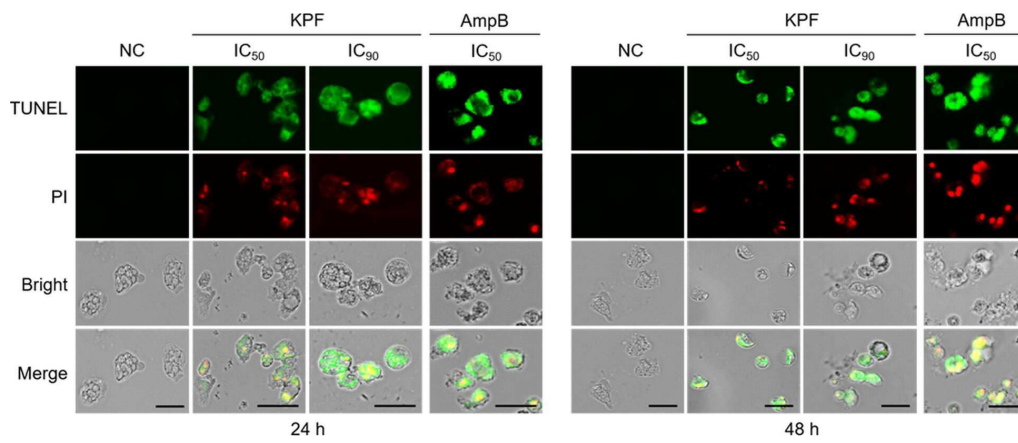
[0106] 이를 통해, 캠페롤과 기존 치료제인 밀테포신 또는 암포테리신 B를 병용 처리하였을 경우, 기존 치료제의 항 파울러자유아메바 효능이 상승되는 것을 확인하였다.

[0108] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예, 실험예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시 예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구 범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

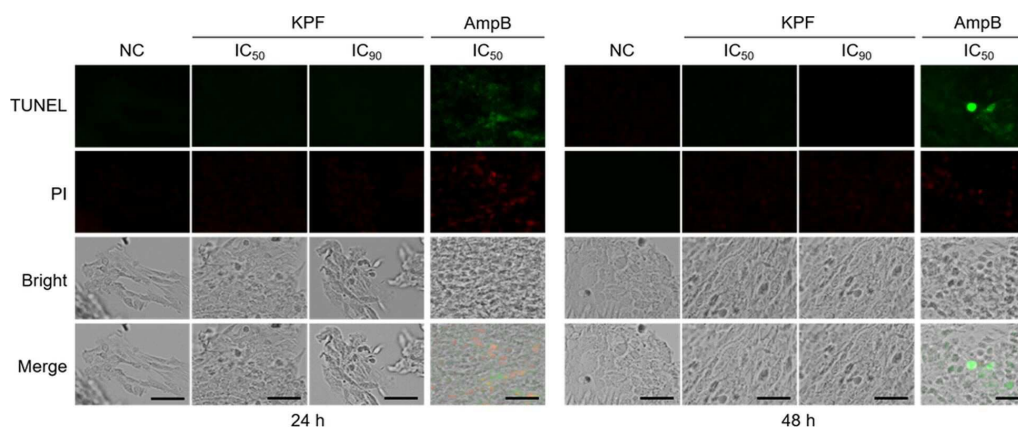
도면3



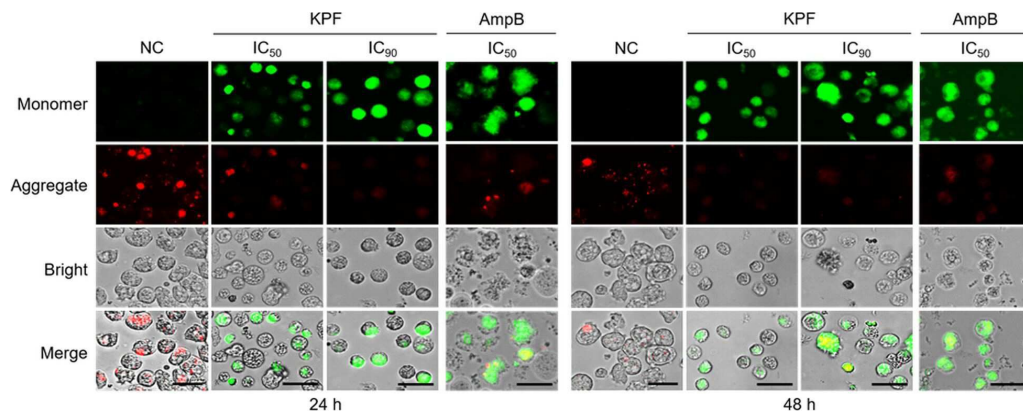
도면4



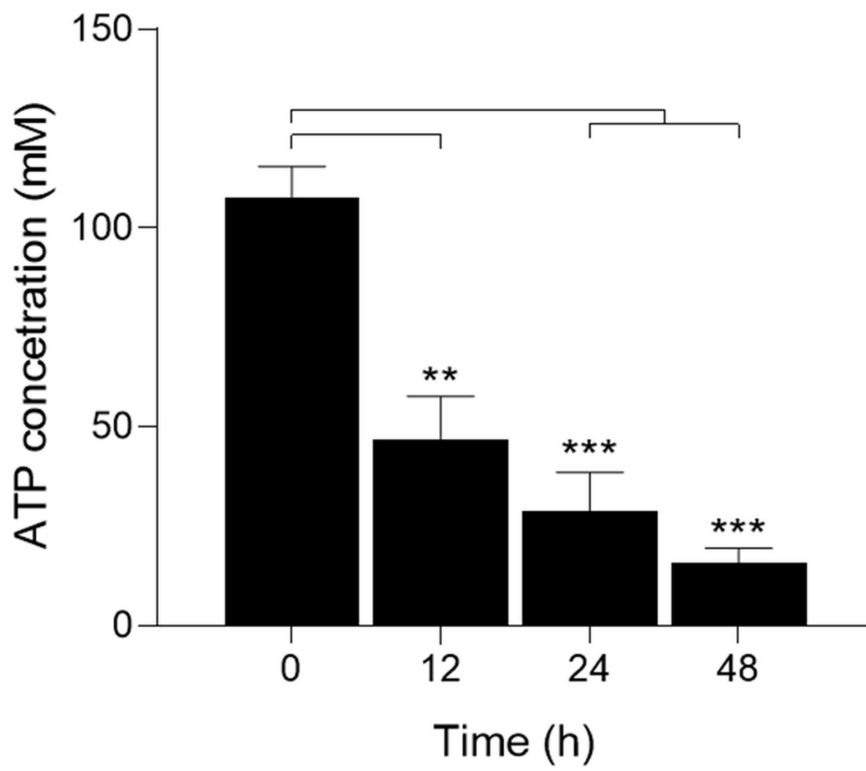
도면5



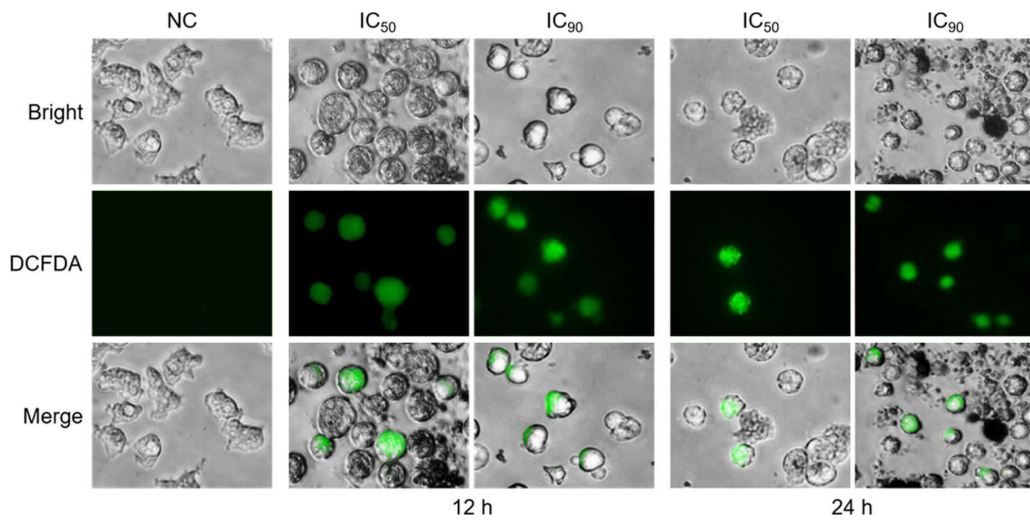
도면6



도면7



도면8



도면9

