



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0010332
(43) 공개일자 2021년01월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/15 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61P 33/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/15 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2020-0079956
(22) 출원일자 2020년06월30일
심사청구일자 2020년06월30일
(30) 우선권주장
1020190086312 2019년07월17일 대한민국(KR)
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
나병국
경상남도 진주시 진주대로815번길 11, 102동 901호(주약동, 주약현대아파트)
르후용지앙
경상남도 진주시 진주대로856번길 6-7, 302호(주약동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

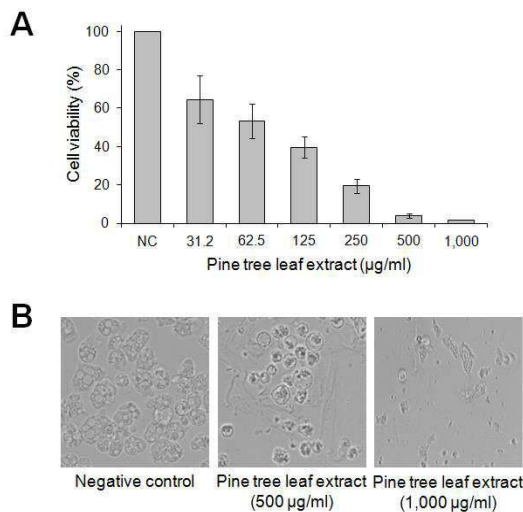
전체 청구항 수 : 총 10 항

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

(57) 요약

본 발명은 솔잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 솔잎 추출물은 파울러자유태아메바의 형태학적 변화가 유도되며 파울러자유태아메바를 효과적으로 사멸할 뿐 아니라, 고농도의 솔잎 추출물을 처리한 경우에도 신경줄기세포 형태의 변화가 없이 높은 정도의 세포 생존율을 유지할 수 있어 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 조성물로 유용하게 사용할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61P 33/04 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

(72) 발명자

강정미

경상남도 진주시 초북로 95, 101동 2201호(초전동, 힐스테이트 초전)

정현숙

광주광역시 북구 설죽로 595, 107동 404호(일곡동, 롯데아파트)

김웅

광주광역시 동구 산수길35번길 22, 301호(계림동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345282373

과제번호 2018R1D1A1B07048097

부처명 의과대학

과제관리(전문)기관명 경상대학교

연구사업명 이공분야기초연구사업

연구과제명 원발성 아메바 수막뇌염 표적 치료제 개발을 위한 원천지식 확보와 치료제 후보물질

발굴 연구

기 여 율 1/2

과제수행기관명 경상대학교 산학협력단

연구기간 2018.06.01 ~ 2021.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1545016999

과제번호 116010033HD020

부처명 농림축산식품부

과제관리(전문)기관명 농림식품기술기획평가원

연구사업명 식품기자재

연구과제명 솔잎착즙분말의 체지방 개선 기전 연구

기 여 율 1/2

과제수행기관명 조선대학교 산학협력단

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

솔잎 추출물을 유효성분으로 포함하는, 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 솔잎 추출물은 물, 메탄올, 에탄올, 헥산, 부탄올, 에틸아세테이트, 클로로포름 및 이의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택되는 용매로 추출하는 것을 특징으로 하는, 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 아메바성 감염은 급성 아메바성 이질, 만성 아메바성 이질, 아메바성 비이질성 대장염, 장내 아메바증, 아메바성 간농양, 아메바성 폐농양 및 아메바성 뇌농양으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 아메바성 감염은 파울러자유아메바로부터 유발된 원발성 아메바 수막뇌염 (primary amoebic meningoencephalitis)인 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

솔잎 추출물을 유효성분으로 포함하는, 아메바성 감염의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 솔잎 추출물은 물, 메탄올, 에탄올, 헥산, 부탄올, 에틸아세테이트, 클로로포름 및 이의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택되는 용매로 추출하는 것을 특징으로 하는, 아메바성 감염의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 아메바성 감염은 급성 아메바성 이질, 만성 아메바성 이질, 아메바성 비이질성 대장염, 장내 아메바증, 아메바성 간농양, 아메바성 폐농양 및 아메바성 뇌농양으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 아메바성 감염의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 아메바성 감염은 파울러자유아메바로부터 유발된 원발성 아메바 수막뇌염(primary amoebic meningoencephalitis)인 것을 특징으로 하는, 아메바성 감염의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 10

솔잎 추출물을 유효성분으로 포함하는, 아메바성 감염의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 솔잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 아메바성 감염 (amebiasis)의 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 (Visvesvara et al., 2007). 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 진행정도가 매우 빨라서 감염 후 10일 이내에 사망하게 되며 사망률은 98% 이상이다 (Grace et al., 2015; Cope and Ali, 2016). 전 세계적으로 원발성 아메바 수막뇌염 (primary amoebic meningoencephalitis: PAM)의 발병률은 낮지만 PAM에 의한 사망자는 지속적으로 보고되고 있으며, 글로벌 지구 온난화에 의한 지구환경 변화로 파울러자유아메바의 서식지가 점차 확대되어 저수지나 호수, 강, 온천 이외의 수영장과 젖은 토양 등에서도 파울러자유아메바의 서식이 확인되었다. 우리나라와 유사한 지리 및 기후 조건을 가지고 있는 일본의 경우에도 1996년 PAM 환자가 최초로 보고되었으며 (Sugita et al., 1999), 환경 표본조사 결과 온천 및 공장 배수 등에서 파울러자유아메바가 검출되었고 최근에는 가정용 수도물을 통한 감염 또한 확인되었다 (Mahittikorn et al., 2015). 우리나라의 경우 현재까지 PAM에 의한 공식 사망자는 보고되지 않았으나 PAM의 특성상 조기 진단이 어렵고 정확한 진단은 부검에 의해서만 확인할 수 있다는 점과 유교사상에 기인한 부검에 대한 정서적인 거부감을 고려하면 우리나라에서도 PAM에 의한 사망자는 있는 것으로 추정된다. PAM의 높은 사망률에도 불구하고 PAM의 조기 진단법과 효과적인 치료법은 현재까지 개발되지 않았다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0005] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1906766호
(특허문헌 0002) 한국공개특허 제10-2013-0094132호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 이에 본 발명자들은 기존 치료제가 전무하던 원발성 아메바 수막뇌염의 조기 진단과 치료제 개발을 위해 다년간 다양한 연구를 진행하던 중 솔잎 추출물에 높은 항아메바 효과가 있으며, 특히 파울러자유아메바 (*Naegleria fowleri*)에 대한 높은 항아메바 효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0007] 따라서 본 발명의 목적은 솔잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 솔잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 아메바성 감염의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 솔잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 솔잎 추출물은 물, 메탄올, 에탄올, 헥산, 부탄올, 에틸아세테이트, 클로로포름 및 이의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택되는 용매로 추출할 수 있다.
- [0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 아메바성 감염은 급성 아메바성 이질, 만성 아메바성 이질, 아메바성 비이질성 대장염, 장내 아메바증, 아메바성 간농양, 아메바성 폐농양 및 아메바성 뇌농양으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 아메바성 감염은 파울러자유아메바로부터 유발된 원발성 아메바 수막뇌염(primary amoebic meningoencephalitis)일 수 있다.
- [0014] 또한, 본 발명은 솔잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 아메바성 감염의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 솔잎 추출물은 물, 메탄올, 에탄올, 헥산, 부탄올, 에틸아세테이트, 클로로포름 및 이의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택되는 용매로 추출할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 아메바성 감염은 급성 아메바성 이질, 만성 아메바성 이질, 아메바성 비이질성 대장염, 장내 아메바증, 아메바성 간농양, 아메바성 폐농양 및 아메바성 뇌농양으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 아메바성 감염은 파울러자유아메바로부터 유발된 원발성 아메바 수막뇌염(primary amoebic meningoencephalitis)일 수 있다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명에 따른 솔잎 추출물은 파울러자유아메바의 형태학적 변화를 유도하며 파울러자유아메바를 효과적으로 사멸할 뿐 아니라, 고농도의 솔잎 추출물을 정상세포(신경줄기세포)에 처리한 경우에도 신경줄기세포의 형태 변화가 없이 높은 정도의 세포 생존율을 유지하여 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 조성물로 유용하게 사용할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 본 발명의 술잎 추출물 제조방법을 나타낸 모식도이다.
- 도 2는 술잎 추출물의 파울러자유아메바 사멸효과를 확인한 결과이다.
- 도 3은 술잎 추출물의 신경줄기세포 (NSC) 사멸 효과를 확인한 결과이다.
- 도 4는 술잎 추출물의 파울러자유아메바 사멸효과를 전자현미경으로 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 본 발명자들은 기존 치료제가 전무하던 원발성 아메바 수막뇌염의 조기 진단과 치료제 개발을 위해 다년간 다양한 연구를 진행하던 중 술잎 추출물에 높은 항아메바 효과가 있으며, 특히 파울러자유아메바 (*Naegleria fowleri*)에 대한 높은 항아메바 효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0023] 따라서, 본 발명은 술잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0025] 본 발명에 따른 술잎 추출물은 당업계에 공지된 추출 및 분리하는 방법을 사용하여 천연으로부터 추출 및 분리하여 수득한 것을 사용할 수 있으며, 본 발명에서 정의된 ‘추출물’은 적절한 용매를 이용하여 술잎으로부터 추출한 것이며, 예를 들어, 술잎의 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함한다.
- [0026] 상기 술잎으로부터 추출물을 추출하기 위한 적절한 용매로는 약학적으로 허용되는 유기용매라면 어느 것을 사용해도 무방하며, 물 또는 유기용매를 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 예를 들어, 정제수, 메탄올 (methanol), 에탄올 (ethanol), 프로판올 (propanol), 이소프로판올 (isopropanol), 부탄올 (butanol) 등을 포함하는 탄소수 1 내지 4의 알코올, 아세톤 (acetone), 에테르(ether), 벤젠 (benzene), 클로로포름 (chloroform), 에틸아세테이트 (ethyl acetate), 메틸렌클로라이드 (methylene chloride), 헥산 (hexane) 및 시클로헥산 (cyclohexane) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있다.
- [0027] 추출 방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법 중 어느 하나를 선택하여 사용할 수 있다. 또한, 목적하는 추출물은 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있으며, 통상의 정제 방법을 이용하여 정제될 수도 있다. 본 발명의 술잎 추출물의 제조방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다.
- [0028] 예를 들면, 본 발명의 조성물에 포함되는 술잎 추출물은 상기한 열수 추출 또는 용매 추출법으로 추출된 1차 추출물을, 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조할 수 있다.
- [0029] 또한 상기 1차 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (silica gel column chromatography), 박층크로마토그래피 (thin layer chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피 (high performance liquid chromatography) 등과 같은 다양한 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제된 분획을 얻을 수도 있다.
- [0030] 따라서 본 발명에 있어서 술잎 추출물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그들의 희석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이다.
- [0031] 또한, 본 발명에 따른 아메바성 감염은 급성 아메바성 이질, 만성 아메바성 이질, 아메바성 비이질성 대장염, 장내 아메바증, 아메바성 간농양, 아메바성 폐농양 및 아메바성 뇌농양으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니지만 가장 바람직하게는 파울러자유아메바로부터 유발된 원발성 아메바 수막뇌염 (primary amoebic meningoencephalitis: PAM)일 수 있다.
- [0032] 본 발명의 술잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물의 총 중량에 대하여 0.1 내지 80 중량%로 술잎 추출물을 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0033] 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있으며, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의

형태로 제제화될 수 있다.

- [0034] 상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 당업계에서 통상적으로 사용되는 것들, 예컨대 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, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함하나 이에 국한되지 않는다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제, 기타 약제학적으로 허용가능한 첨가제를 포함한다.
- [0035] 본 발명의 약학 조성물이 경구용 고형 제제로 제제화된 경우 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로스 (sucrose) 또는 락토즈, 젤라틴 등을 포함할 수 있으며, 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제 등을 포함하나 이에 국한되지 않는다.
- [0036] 본 발명의 약학 조성물이 경구용 액상 제제화된 경우 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 포함하며, 물, 리퀴드 파라핀 등의 희석제, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 포함하나 이에 국한되지 않는다.
- [0037] 본 발명의 약학 조성물이 비경구용 제제화된 경우 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제를 포함하며, 비수성 용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르류 등을 포함하나 이에 국한되지 않는다. 좌제의 기제로는 위템솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있으나 이에 국한되지 않는다.
- [0038] 본 발명은 또한 솔잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 아메바성 감염의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0039] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품으로서 사용될 수 있다. 상기 "건강기능식품"이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제672호에 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.
- [0040] 본 발명의 식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 "식품 첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0041] 상기 "식품 첨가물 공전"에 기재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류들을 들 수 있다.
- [0042] 또한, 본 발명의 식품 조성물은 아메바성 감염의 예방 및/또는 개선을 목적으로, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.
- [0043] 예를 들어, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 솔잎 추출물, 부형제, 결합제, 붕해제, 및 다른 첨가제와의 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 수 있으며, 필요에 따라 적당한 제피제로 제피할 수도 있다.
- [0044] 캡슐 형태의 건강기능식품 중 경질캡슐제는 통상의 경질캡슐에 솔잎 추출물, 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물 또는 그의 입상물 또는 제피한 입상물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질캡슐제는 솔잎 추출물 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물을 젤라틴 등 캡슐기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질캡슐제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.
- [0045] 환 형태의 건강기능식품은 솔잎 추출물, 부형제, 결합제, 붕해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 적당한 제피제로 제피를, 또는 전분, 탈크 또는 적당한 물질로 환의를 입힐 수도 있다.
- [0046] 과립형태의 건강기능식품은 솔잎 추출물, 부형제, 결합제, 붕해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다. 과립형태의 건강기능식품은 12호 (1680 μ

m), 14호 (1410 μ m) 및 45호 (350 μ m) 체를 써서 다음 입도시험을 할 때에 12호체를 전량 통과하고 14호체에 남는 것이 전체량의 5.0 %이하이고 또 45호체를 통과하는 것은 전체량의 15.0 %이하일 수 있다.

[0047] 상기 부형제, 결합제, 봉해제, 활택제, 교미제, 착향제 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함한다 (대한약전 해설편, 문성사, 한국약학대학협회의, 제 5 개정판, p33-48, 1989).

[0048] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한이 없다. 본 발명의 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 음료, 껌, 비타민 복합제, 드링크제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0050] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0052] <실시예 1> 실험재료 및 실험방법

[0053] <1-1> 파울러자유아메바 배양

[0054] 본 발명에 사용한 파울러자유아메바는 Carter NF69 strain으로 미국 ATCC에서 분양받았다 (ATCC No. 30215). 파울러자유아메바는 5% 우태아혈청 (fetal bovine serum; FBS, Gibco, USA)과 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Sigma, USA)이 함유된 Nelson 배지 (Nelson and Jones, 1970)에서 배양하며 연구에 사용하였다.

[0056] <1-2> 솔잎 열수추출물의 제조방법

[0057] 솔잎은 전라남도 곡성지역 (해발 350 m 이상)에서 자란 건강한 적송 (*Pinus densiflora*)을 선택하여 영양상태가 좋은 가지 부분을 채취한 후 싱싱하고 푸른 잎만 선별하여 사용하였다. 선별한 솔잎은 멸균 증류수로 수 차례 세척하고 탈수기로 수분을 완전히 제거하였다. 수분이 완전히 탈수된 솔잎을 대형 녹즙기 (인화정밀, 삼광무력공사, 명신상사와 그린녹즙기의 부품을 이용하여 자체 조립한 녹즙기)를 이용하여 착즙하였다. 이때 솔잎 이외의 다른 어떠한 첨가물도 첨가하지 않았다.

[0058] 솔잎 착즙액은 동결건조기 (SFDTs 10K, 대한민국)를 이용하여 -50℃에서 예비 동결건조한 후 -70 내지 -85℃에서 진공펌프를 이용하여 수분을 완전히 제거하였다. 제조한 솔잎 착즙분말은 믹서기로 분쇄하여 미세한 분말로 제조하였다. 본 발명에 사용한 솔잎 착즙분말 열수추출물은 초음파세척기 (Powersonic410, 화선테크, 대한민국)를 이용하여 60℃에서 16시간 동안 추출하였다 (도 1 참조).

[0060] <1-3> 항아메바 활성 분석

[0061] 솔잎 열수추출물의 항아메바효과 (아메바 사멸 효과)는 MTT assay를 이용하여 분석하였다. Nelson 배지에서 배양한 파울러자유아메바 영양형을 96-웰 마이크로플레이트 (well microplate)에 접종 (10^5 cells/ well)한 후 37℃ 배양기에서 배양하였다. 배양된 파울러자유아메바에 솔잎 열수추출물을 다양한 농도 (1~1,000 μ g/ml)로 처리한 후 37℃ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 솔잎 열수추출물을 첨가하지 않고 동일한 조건에서 배양한 파울러자유아메바를 대조군으로 사용하였다. 배양상층액을 100 μ l 제거한 후 20 μ l의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT; 5 mg/ml)를 첨가하고 37℃에서 4시간 반응하였다. 각 well에서 MTT 용액을 제거하고 150 μ l의 dimethylsulfoxide (DMSO)를 첨가한 다음 37℃에서 30분 동안 추가 반응한 후 Multiskan FC microplate reader (Thermo, Finland)를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0063] <1-4> 솔잎 열수추출물의 신경줄기세포(neural stem cell)에 대한 세포독성 분석

[0064] 솔잎 열수추출물의 정상세포독성 측정을 위한 대조군으로 사람 신경줄기세포 (neural stem cells; NSC)를 사용하였다. NSC는 경상대학교 의과대학 해부학교실에서 분양받았다. NSC는 10% FBS (Gibco), 1% 페니실린 (Sigma)과 1% 스트렙토마이신 (Sigma)을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco)을 이용하여 배

양하였다.

[0065] NSC를 96-웰 마이크로플레이트 (well microplate)에 접종 (2×10^4 cells/well)한 후 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양된 NSC에 솔잎 열수추출물을 다양한 농도 (1~1,000 μg/ml)로 처리한 후 37℃ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 솔잎 열수추출물을 첨가하지 않고 동일한 조건에서 배양한 NSC를 대조군으로 사용하였다. 배양 후 배양상층액을 100 μl 제거한 다음 20 μl의 MTT (5 mg/ml)를 첨가하고 37℃에서 4시간 반응하였다. 각 well에서 MTT 용액을 제거하고 150 μl의 DMSO를 첨가한 다음 37℃에서 30분 동안 추가 반응한 후 Multiskan FC microplate reader(Thermo)를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0067] <1-5> 전자현미경 관찰

[0068] 솔잎 열수추출물의 항아메바효과 기전을 분석하기 위한 일환으로 솔잎 열수추출물을 처리한 파울러자유아메바의 미세 세포구조 변화를 관찰하였다. Nelson 배지에서 배양한 파울러자유아메바 영양형을 75 cm² 세포배양 플라스크에 접종 (10^7 cells/well)한 후 37℃ 배양기에서 배양하였다.

[0069] 배양된 파울러자유아메바에 솔잎 열수추출물 (500 μg/ml)을 처리한 후 37℃ 배양기에서 24시간과 48시간 동안 배양하였다. 이때 솔잎 열수추출물을 첨가하지 않고 동일한 조건에서 배양한 파울러자유아메바를 대조군으로 사용하였다. 파울러자유아메바의 형태학적인 변화를 광학현미경으로 관찰한 후 파울러자유아메바를 원심분리하여 수집한 후 멸균 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 3회 세척한 후 파울러자유아메바를 고정액 (2.5% glutaraldehyde, pH 7.4)으로 일차 고정하였다. 고정 후 OsO₄ 용액으로 후고정한 후에탄올로 탈수한 다음 Exoxy 소지에 포매하고 초박절기 (Ultracut E Ultramicrotome)를 이용하여 70 nm 두께의 초박 절편을 제작하였다. 절편은 전자염색 후 FEI (Tecnai 12) 전자현미경으로 관찰하였다.

[0071] <실시예 2> 솔잎 열수추출물의 파울러자유아메바에 대한 항아메바 효과

[0072] 파울러자유아메바에 솔잎 열수추출물을 다양한 농도 (31.2, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 μg/ml)로 첨가하여 반응시킨 후 파울러자유아메바의 생존률을 분석한 결과 파울러자유아메바의 생존률은 솔잎 열수추출물의 양에 비례하여 크게 감소하였다 (도 2A 참조).

[0073] 또한, 현미경을 이용하여 파울러자유아메바의 형태를 관찰한 결과, 솔잎 열수추출물 처리 시 파울러자유아메바의 형태학적 변화가 유도되며 파울러자유아메바가 사멸함을 알 수 있었다 (도 2B 참조).

[0075] <실시예 3> 솔잎 열수추출물의 대조군 세포독성 분석 결과

[0076] 정상세포에 대한 솔잎 열수추출물의 세포독성효과 분석을 위해 사람 신경줄기세포 (neural stem cells; NSC)에 다양한 농도 (31.2, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 μg/ml)의 솔잎 열수추출물을 첨가하여 반응시킨 후 NSC의 생존률을 분석한 결과 NSC는 고농도 (1,000 μg/ml)의 솔잎 열수추출물 처리하였을 경우 생존률이 약 45% 감소하였으나 500 μg/ml 이하의 솔잎 열수추출물 처리 시 생존률은 75% 이상이었다 (도 3A 참조).

[0077] 현미경을 이용하여 NSC의 형태를 관찰한 결과 또한 솔잎 열수추출물 처리 시 NSC의 형태학적 변화는 나타나지 않았으며 고농도 (1,000 μg/ml)의 솔잎 추출물을 처리한 경우에도 세포 형태의 변화는 관찰되지 않았다 (도 3B 참조).

[0079] <실시예 4> 솔잎 열수추출물을 처리한 파울러자유아메바의 전자현미경 분석 결과

[0080] 파울러자유아메바에 솔잎 열수추출물 (500 μg/ml)을 첨가하여 반응시킨 후 파울러자유아메바의 미세 세포구조 변화를 투과전자현미경 (Transmission Electron Microscope)으로 분석한 결과 정상 대조군 파울러자유아메바와는 명확하게 차이가 나는 비정상적인 세포구조의 변화가 관찰되었다 (도 4 참조).

[0082] 상기 실시예에 따라 본 발명에 따른 솔잎 추출물은 파울러자유아메바의 형태학적 변화를 유도하며 파울러자유아

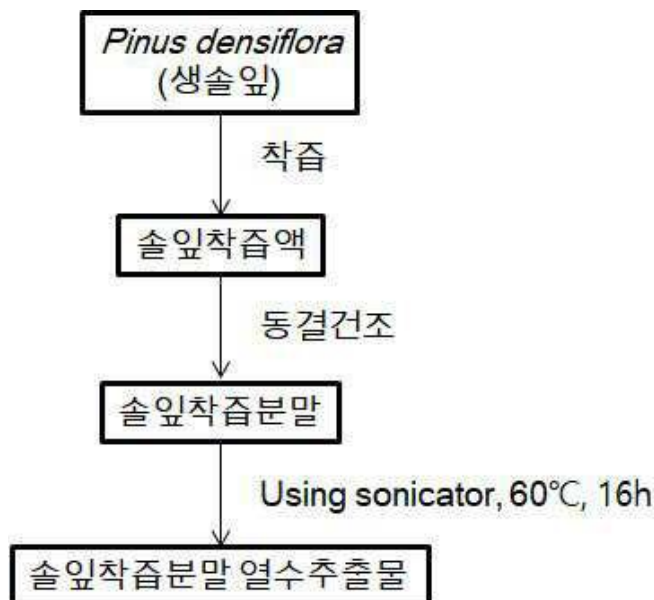
메바를 효과적으로 사멸할 뿐 아니라, 고농도의 솔잎 추출물을 정상세포 (신경줄기세포)에 처리한 경우에도 신경줄기세포의 형태 변화가 없이 높은 정도의 세포 생존율을 유지하므로, 아메바성 감염의 예방 또는 치료용 조성물로 유용하게 사용할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0084]

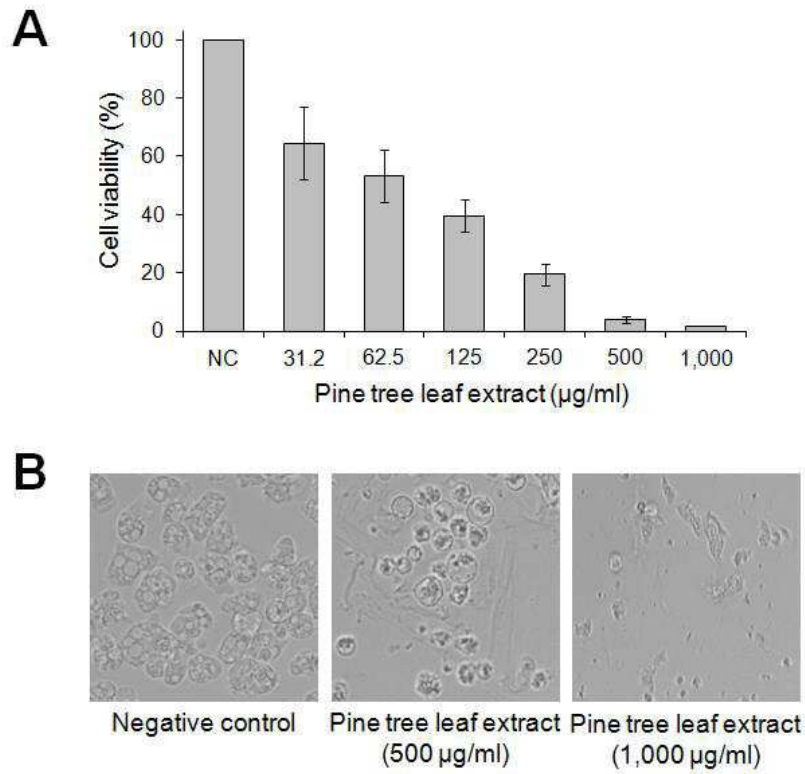
이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

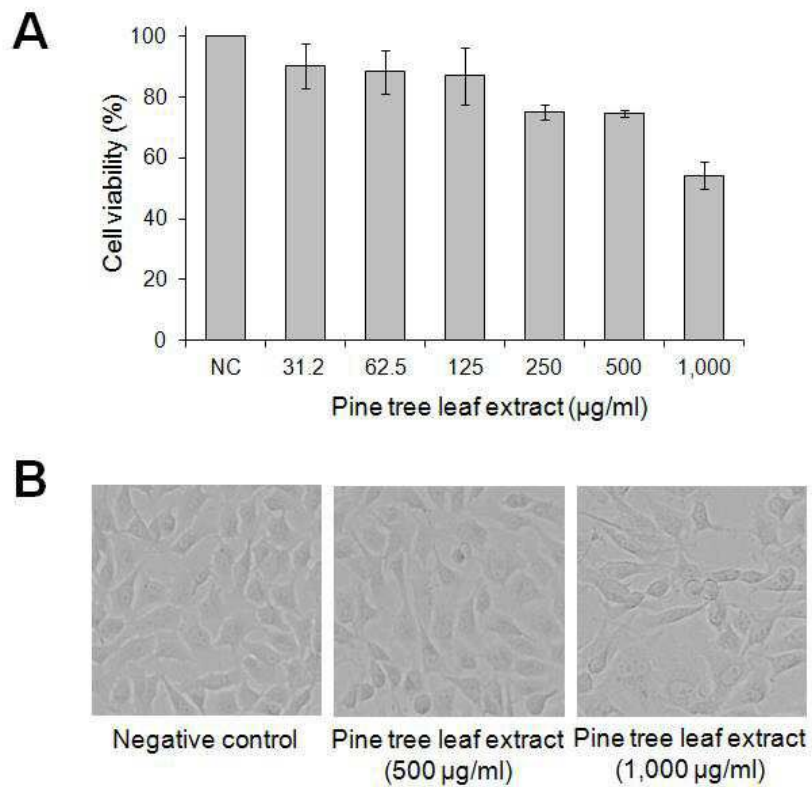
도면1



도면2



도면3



도면4

