

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2020년 8월 20일 (20.08.2020)



(10) 국제공개번호

WO 2020/166962 A2

(51) 국제특허분류:

A61K 36/87 (2006.01)

A23L 33/105 (2016.01)

A61P 27/16 (2006.01)

PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2020/001964

(22) 국제출원일:

2020년 2월 12일 (12.02.2020)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2019-0015991 2019년 2월 12일 (12.02.2019) KR

(71) 출원인: 아주대학교산학협력단 (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 16499 경기도 수원시 영통구 월드컵로 206, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 정연훈 (CHOUNG, Yun-Hoon); 05507 서울시 송파구 올림픽로 435 #226-504, Seoul (KR).

(74) 대리인: 이처영 등 (LEE, Cheo Young et al.); 06210 서울시 강남구 인주로 430 16층, Seoul (KR).

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

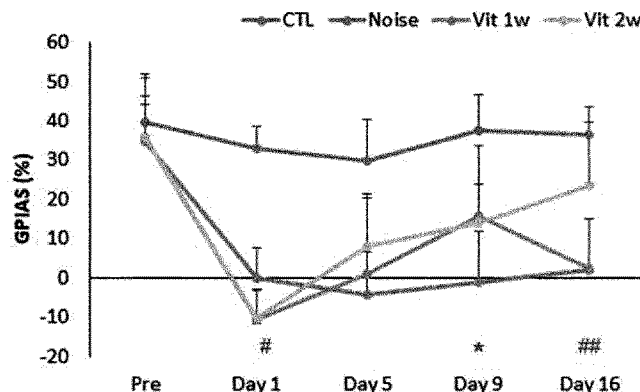
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도로 공개함 (규칙 48.2(g))

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING TINNITUS COMPRISING VITIS VINIFERA LEAF EXTRACT AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: 적포도잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 이명의 예방 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for preventing or treating tinnitus and, more particularly, to a pharmaceutical composition and a food composition for preventing or treating tinnitus, comprising a *Vitis vinifera* leaf extract as an active ingredient. The composition comprising a *Vitis vinifera* leaf extract as an active ingredient of the present invention is excellent in alleviating and improving tinnitus caused by noise and the like, and therefore is very useful as a composition for preventing or treating tinnitus.

(57) 요약서: 본 발명은 이명의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 적포도잎 추출물 (*Vitis vinifera* Leaf Extract)을 유효성분으로 포함하는 이명의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 적포도잎 추출물 (*Vitis vinifera* leaf extract)을 유효성분으로 함유하는 조성물은 소음 등에 의해 유발된 이명의 완화 및 개선 효과가 우수하므로, 이명의 예방 또는 치료용 조성물로 매우 유용하다.



WO 2020/166962 A2

명세서

발명의 명칭: 적포도잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 이명의 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 이명의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 적포도잎 추출물 (*Vitis vinifera* Leaf Extract)을 유효성분으로 포함하는 이명의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 이명(귀울림)은 외부의 소리자극이 없음에도 소리가 들린다고 느끼는 증상이다. 일반적으로 소리가 귀에서 울리는 것으로 묘사되지만 그 소리는 머리의 안쪽이나 바깥쪽에서 느껴지며, 한 귀에서만 나타나거나 양측의 귀 모두에서 나타날 수도 있다. 이명은 뽕뽕거리는 소리나 싹싹 하는 소리, 으르렁거리는 소리, 매미와 같은 소리, 고정된 음을 가진 소리 등으로 나타나게 되며 (Bauer CA, N Engl J Med. 2018 Mar 29;378(13):1224-1231) 이러한 이명은 성인에서 약 10~15%의 유병률을 보인다 (Henry JA, et al., J Speech Lang Hear Res. 2005 Oct;48(5):1204-35). 건강보험심사평가원 자료에 따르면 이명 환자가 2013년 28만 1351명에서 2017년 32만4392명으로 4년 동안 15% 증가했다.
- [4] 이명의 병리생리학적 특성은 충분하게 이해되고 있지 않고, 정확한 발병기전도 알려지지 않고 있다. 이명에 대한 치료법으로는 현재까지 재활을 통한 이명 완화에 초점이 맞춰져 있으며, 현재까지 미 식약청(FDA)에서 승인된 이명 치료제는 없다.
- [5] 이명의 치료는 주로 약물치료가 진행되며 혈류개선-혈관확장제가 가장 많이 처방되며 항우울제나 항불안제, 천연물인 *Ginkgo biloba*를 원료로 한 약제 등을 처방한다. 천연물인 *Ginkgo biloba*를 원료로 한 약제에는, 이명 치료 효과를 위해서 *Ginkgo biloba* 내에서 추출한 EGb 761 성분을 사용해야 하며 3~6개월 동안 하루 160mg 이상의 용량이 투여되어야 한다고 제안되지만 (von Boetticher A, Neuropsychiatr Dis Treat. 2011;7:441-7), 국내 건강보험 심사평가원에서 이명의 치료보조제로 분류되어 있어 건강보험 급여 대상에 해당되지 않는다. 또한, 이명 치료를 위한 천연물은 은행잎에서 추출한 EGb 761 성분이 효과가 있다고 학계에 보고된 바 있으나 대부분의 연구들에서 보여주는 바와 같이 위약수준에 미치지 못한다는 단점이 있다 (Hilton, M., Stuart, E., Cochrane Database Syst Rev. 2004;(2):CD003852).
- [6] 한편, 비티스 비니페라 (*Vitis vinifera*) 잎은 안토시아닌, 플라보노이드 및 유기산을 포함한 많은 폴리 페놀로 구성되어있다 (Bombardelli E, Morazzoni P, Fitoterapia. 1995;66:43-68). 폴리 페놀 중 하나인 프로안토시아니딘은 항산화제

(Bagchi D, et al., Toxicology. 2000 Aug 7;148(2-3):187-97) 및 영양 보충제, 죽상 동맥 경화 및 심혈관 질환 예방과 같은 다양한 목적으로 사용되어 왔다 (Curin Y, et al., Cardiovasc Hematol Agents Med Chem. 2006 Oct;4(4):277-88).

[7] 이러한, 포도잎 추출물이 항산화 효과를 가진다는 것 (대한민국공개특허 제10-2010-0114349호) 및 적포도잎 추출물의 소음성 난청 치료 효과 (대한민국등록특허 10-1901412)는 알려져 있으나, 이명의 예방 또는 치료 효과를 가진다는 것은 알려져 있지 않다.

[8] 이에, 본 발명자들은 이명 치료를 위한 약물 치료에 혈류개선-혈관확장제를 사용하고 있는 점에 착안하여 이명 치료제를 개발하고자 예의 노력한 결과, 죽상 동맥 경화 및 심혈관 질환 예방과 같은 효과를 보이는 VLE (*Vitis vinifera* Leaf)가 소음 노출에 의해 유발된 이명 증상을 현저하게 완화시키는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[9]

[10] 본 배경기술 부분에 기재된 상기 정보는 오직 본 발명의 배경에 대한 이해를 향상시키기 위한 것이며, 이에 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 있어 이미 알려진 선행기술을 형성하는 정보를 포함하지 않을 수 있다.

[11]

[12] **발명의 요약**

[13] 본 발명의 목적은 이명 증상을 현저히 완화 또는 개선시킬 수 있는 적포도잎 추출물 (*Vitis vinifera* Leaf Extract)을 함유하는 이명의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 이명의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 데 있다.

[14] 본 발명의 다른 목적은 적포도잎 추출물 (*Vitis vinifera* Leaf Extract)을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 이명의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 데 있다.

[15] 본 발명의 또 다른 목적은 이명의 예방 또는 치료를 위한 상기 적포도잎 추출물의 용도를 제공하는 데 있다.

[16] 본 발명의 또 다른 목적은 이명의 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 상기 적포도잎 추출물의 사용을 제공하는 데 있다.

[17]

[18] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 적포도잎 추출물 (*Vitis vinifera* leaf extract)을 유효성분으로 함유하는 이명의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[19] 본 발명은 또한, 적포도잎 추출물 (*Vitis vinifera* Leaf Extract)을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 이명의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[20] 본 발명은 또한, 이명의 예방 또는 치료를 위한 상기 적포도잎 추출물의 용도를 제공한다.

[21] 본 발명은 또한, 이명의 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 상기 적포도잎 추출물의 사용을 제공한다.

[22] 본 발명은 또한, 적포도잎 추출물 (*Vitis vinifera* leaf extract)을 유효성분으로 함유하는 이명의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[23]

도면의 간단한 설명

[24] 도 1은 ABR (Auditory brainstem response), GPIAS (Gap Pre-pulse Inhibition of Acoustic Startle) 측정 및 VLE (*Vitis vinifera* Leaf Extract) 투여 스케줄을 나타낸 것이다.

[25] 도 2는 청성뇌간반응검사를 통한 소음 노출 전(Pre), 소음 노출 직후 (D 1), VLE 1주 투여 후 (D 9) 및 VLE 2주 투여 후 (D 16)의 청력 역치의 변화를 나타낸 것이다.

[26] 도 3은 GPIAS 분석을 통한 이명에 대한 VLE 치료효과를 검증한 것이다.

[27] 도 4는 이명의 존재와 VLE의 치료 효과에 대한 조직학적 분석 결과를 나타낸 것이다.

[28]

발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예

[30] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[31]

[32] 본 발명에서는 소음에 의해 유도된 이명 동물 모델을 확립한 후, 청성뇌간반응검사 (Auditory brainstem response; ABR test)를 실시하여 소음에 의해 청력이 저하되지 않았음을 확인하였다. 그 다음, 이명 치료 효과를 확인하기 위해, 확립된 이명 동물 모델에 적포도잎 추출물 (*Vitis vinifera* Leaf Extract)을 처리하여 Gap Pre-pulse Inhibition of Acoustic Startle (GPIAS) 분석 및 조직학적 분석을 수행하였다. 그 결과, 소음에 의해 유발된 이명 증상이 적포도잎 추출물 (VLE)에 의해 완화되고, VLE를 지속적으로 투여하였을 때에는 이명 증상에 대한 반응이 점점 더 호전되는 것을 확인하였다.

[33] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 적포도잎 추출물 (*Vitis vinifera* leaf extract)을 유효성분으로 함유하는 이명의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[34] 본 발명의 용어 “추출물”이란, 적포도잎 (*Vitis vinifera* leaf)으로부터 분리하여 얻은 물질을 의미한다

[35] 본 발명에 있어서, 상기 적포도잎 추출물(*Vitis vinifera* leaf extract)은 적포도잎을 물, C1~C4의 알콜 및 물과 C1~C4의 알콜과의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택된 용매로 추출하여 수득된 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 본 발명의 적포도잎 추출물은 물을 용매로 추출하여 수득하는 것을 특징으로 한다.

- [36] 상기 혼합용매는 바람직하게는 약 70% 에탄올 수용액을 사용할 수 있다. 추출은 당 분야에 알려진 추출방법, 예컨대, 냉침, 열수추출, 초음파 추출, 환류 냉각 추출 등의 방법으로 수행될 수 있으나, 이에 국한되지 않는다. 추출 온도는 당업자가 추출 방법에 적절한 다양한 온도 범위를 채택할 수 있으며, 예를 들어, 20°C 내지 100°C 등에서 수행될 수 있으나, 이에 국한되지 않는다. 또한, 추출시간은 추출방법에 따라 상이하며, 당업자가 적절한 추출시간을 채택할 수 있으며, 이에 국한되지 않으나, 약 1시간 내지 10일의 범위에서 단회 또는 복수회로 수행될 수 있다. 바람직하게는 상기 추출은 실온에서 약 2일씩 2~3회 상기한 추출용매로 추출함으로써 수행될 수 있다.
- [37] 본 발명의 적포도잎 건조 추출물은 폴리페놀을 유효성분으로 함유하고 있다.
- [38] 본 발명의 용어 “폴리페놀”은 폴리페놀은 방향족 히드록시기를 2개 이상 가진 화합물로서 생체 내에서 활성산소에 노출되어 손상되는 DNA의 보호나 세포구성 단백질 및 효소를 보호하는 항산화 능력이 커서 다양한 질병에 대한 위험도를 낮춘다. 또한, 이미 널리 알려진 항산화 효과 이외에도 순환부전으로 일어날 수 있는 증상의 개선에 효과적인 제제이다. 혈관에 작용하여 혈관벽의 탄력성을 높이고 모세혈관투과성을 조절하여 순환작용을 촉진하므로 하지정맥부전으로 인한 부기 및 불편함을 없애주는 데 효과적이라고 알려져 있다.
- [39] 적포도는 추출부위에 따라 그 쓰임새가 다를 수 있고, 특히 포도씨의 추출물은 맥관보호(vasoprotection)에 사용되고, 포도잎의 추출물은 하지정맥류(varicose vein)에 특이적으로 사용될 수 있다. 망막과 맥락막순환의 증상 개선 효과를 나타내는 비티스 비니페라 (*Vitis vinifera*)의 seed의 추출물인 엔테론정과 하지정맥류 증상 개선에 효과를 나타내는 비티스 비니페라 (*Vitis vinifera*)의 leaf dry 추출물인 안탁스캡슐은 구별되어 다른 의약품으로 허가되어 사용되고 있다.
- [40] 본 발명에 있어서, 상기 이명은 소음, 약물 또는 노화에 의해 유발되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [41] 본 발명의 용어 "이명 (tinnitus)"은 외부에서도 들리는 타각적 이명(또는 객관적 이명)과 이명 환자 본인만 들리고 외부에서 들리지 않는 자각적 이명(또는 주관적 이명)으로 구분할 수 있다. 또한, 이명은 병에 걸린 개인에 의해 지각되는 방법의 차이를 기초로 하여 말초성 이명과 중추성 이명으로 분류될 수 있다. 말초성(또는 와우성) 이명은 말초 신경계 및 와우로부터 유래하는 것으로 추정되고, 중추성 이명은 청각 피질로부터 유래하는 것으로 추정된다.
- [42] 자각적 이명은 여러 원인이 있을 수 있으나, 원인으로 가장 흔한 경우는 소음에 의한 것으로, 과도하거나 큰 소음에 노출되는 것에서 비롯된다. 자각적 이명은 또한 아스피린과 같은 몇몇 약제들의 부작용으로 발생된다고 알려져 있다. 그 외 노화와 같은 자연적인 청력 장애, 유전적(선천적)인 청력 장애의 부작용으로도 발생할 수 있다.
- [43] 본 발명의 적포도잎 추출물 (*Vitis vinifera* leaf extract)는 소음 등으로 유발된

이명을 효과적으로 완화 또는 개선시킬 수 있다.

- [44] 일 실시예에서, 본 발명의 적포도잎 건조 추출물은 동결건조하여 분말형태로 사용 및 보관하였다. 상기 파우더는 물에 녹여서 120mg/kg의 농도로 각 마우스에 투여한 후 소음에 의해 유발된 이명을 GPIAS (Gap Pre-pulse Inhibition of Acoustic Startle)로 분석하였다. 그 결과, VLE를 투여한 실험군 모두 대조군에 비해 GPIAS 값이 현저하게 증가하는 것을 확인하였으며, VLE를 지속적으로 투여하였을 때에는 이명 증상에 대한 반응이 점점 더 호전되는 것을 확인할 수 있었다 (도 3). 또한, 조직학적 분석을 통해 VLE 투여에 의한 이명 치료 효과를 검증하였다(도 4). 이는 소음으로 인해 생긴 이명 증상이 VLE로 인해 완화되었음을 의미한다.
- [45] 상기와 같이 본 발명의 적포도잎 추출물 (*Vitis vinifera* leaf extract)은 소음성 이명의 예방, 개선 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [46] 본 발명은 다른 관점에서, 적포도잎 추출물(*Vitis vinifera* leaf extract)을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 이명의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.
- [47] 본 발명은 또 다른 관점에서, 이명의 예방 또는 치료를 위한 상기 적포도잎 추출물의 용도에 관한 것이다.
- [48] 본 발명은 또 다른 관점에서, 이명의 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 상기 적포도잎 추출물의 사용에 관한 것이다.
- [49] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용된 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [50] 본 발명의 약학적 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.
- [51] 상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 당업계에서 통상적으로 사용되는 것들, 예컨대 락토즈, 덱스트로즈, 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.

- [52] 본 발명의 약학적 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.
- [53] 본 발명의 약학적 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.
- [54] 본 발명의 약학적 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 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있으나 이에 국한되지 않는다.
- [55] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [56] 본 발명의 약학적 조성물에 함유되는 적포도잎 추출물의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 연령, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들면, 적포도잎 추출물은 1일 1 내지 2000mg/kg으로, 바람직하게는 10 내지 2000mg/kg의 용량으로 투여할 수 있으며, 상기 투여는 하루에 한번 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다.
- [57]
- [58] 본 발명은 또 다른 관점에서, 적포도잎 추출물(*Vitis vinifera* leaf extract)을 유효성분으로 포함하는 이명의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.
- [59] 본 발명에 있어서, 상기 적포도잎 추출물(*Vitis vinifera* leaf extract)은 적포도잎을 물, C1~C4의 알콜 및 물과 C1~C4의 알콜과의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택된 용매로 추출하여 수득된 것을 특징으로 할 수 있다.
- [60] 본 발명에 있어서, 상기 이명은 소음, 약물 또는 노화에 의해 유발되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [61] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품으로서 사용될 수 있다. 본 발명에서 용어 "건강기능식품"이라 함은 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.

- [62] 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.
- [63] 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.
- [64] 본 발명의 식품 조성물은 이명, 특히 소음성 이명의 예방 및/또는 개선을 목적으로, 조성물 총 중량에 대하여 적포도잎 추출물을 001 내지 95 중량%, 바람직하게는 1 내지 80 중량% 포함할 수 있다.
- [65] 또한, 본 발명의 식품 조성물은 난청의 예방 및/또는 개선을 목적으로, 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.
- [66] 예를 들어, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 적포도잎 추출물 또는 부형제, 결합제, 붕해제, 및 다른 첨가제와의 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축성형 할 수 있다. 또한, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수 있으며, 필요에 따라 적당한 제피제로 제피할 수도 있다.
- [67] 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질캡셀제는 통상의 경질캡셀에 적포도잎 추출물 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물 또는 그의 입상물 또는 제피한 입상물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질캡셀제는 적포도잎 추출물 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물을 젤라틴 등 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.
- [68] 환 형태의 건강기능식품은 적포도잎 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.
- [69] 과립형태의 건강기능식품은 적포도잎 추출물, 부형제, 결합제, 붕해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다. 과립형태의 건강기능식품은 12호(1680 μm), 14호(1410 μm) 및 45호(350 μm) 체를 써서 다음 입도시험을 할 때에 12호체를 전량 통과하고 14호체에 남는 것이 전체량의 50% 이하이고 또 45호체를 통과하는 것은 전체량의 150% 이하일 수 있다.
- [70] 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향제 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함한다(대한약전 해설편, 문성사, 한국약학대학협의회, 제 5개정판, p33-48,

1989).

[71]

[72] [실시예]

[73] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[74]

[75] 실시예 1: 적포도잎 추출물 (*Vitis vinifera* Leaves Extract (VLE)) 제조

[76] 적포도잎 추출물(*Vitis vinifera* leaf extract)은 Finzelberg GmbH & Co.에서 구입하였다. 또는, 적포도잎을 물, C1~C4의 알콜 또는 물과 C1~C4의 알콜과의 혼합용매 등의 용매로 추출하여 수득된 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 물을 용매로 추출하여 수득할 수 있다.

[77] 상기 혼합용매는 바람직하게는 약 70% 에탄올 수용액을 사용할 수 있다. 추출은 당 분야에 알려진 추출방법, 예컨대, 냉침, 열수추출, 초음파 추출, 환류 냉각 추출 등의 방법으로 수행될 수 있다. 추출 온도는 예를 들어, 20°C 내지 100°C 등에서 수행될 수 있다. 또한, 추출시간은 추출방법에 따라 상이하며, 약 1시간 내지 10일의 범위에서 단회 또는 복수회로 수행될 수 있다. 바람직하게는 상기 추출은 실온에서 약 2일씩 2~3회 상기한 추출용매로 추출함으로써 수행될 수 있다.

[78] 추출한 후 적포도잎 추출물을 물에 120mg/kg이 되도록 용해하였다.

[79]

[80] 실시예 2: 소음 유도 이명 동물 모델

[81] 8주령의 수컷 Sprague-Dawley 랫트 (250 - 300 g)를 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 및 12시간의 명암 조건 (8시 ~ 20시 lighting)과 습도가 조절된 조건에서 사육하였으며, 물과 음식은 자유롭게 섭취시켰다.

[82] 실험군은 대조군 (Control group), 소음 노출군 (Noise group), 소음 노출 후 *Vitis vinifera* Leaves dry Extract (VLE)를 1주간 투여한 군 (Vit 1w group), 소음 노출 후 VLE를 2주간 투여한 군 (Vit 2w group)으로 나누었다. VLE는 수돗물 (tap water)을 이용하여 120mg/kg의 농도로 만든 뒤 oral zonde를 이용하여 경구투여하였으며, 소음 노출군에서는 수돗물을 경구투여하였다.

[83] 소음을 주는 기간은 총 1일로 하였으며, 랫트는 112dB (bandwidth 100Hz) 음압의 16kHz의 협대역 잡음 (narrow-band noise)에 4시간 동안 노출시켰다. 소음 노출은 음원장치 (Sine Random Generator Type 1027, Bruel & Kjaer, 덴마크)와 증폭장치 (R300 plus amplifier, Inter-M, Korea), 스피커 (#84234xx, ElectroVoice, USA)와 차폐장치를 이용하였다.

[84] 이명 분석은 Gap Pre-pulse Inhibition of Acoustic Startle (GPIAS) 측정 장치를 이용하여 실험 시작 전, 소음 노출 후 1일, 5일, 9일, 16일 차에 시행하였다.

각각의 랫트들은 음향학적으로 개방된 울타리의 챔버 안에 위치시켰다. 챔버의 울타리는 창살모양의 구멍이 뚫려있어 소리가 통과할 수 있으며 챔버의 바닥은 놀람 반사를 인지할 수 있는 가속도계 센서가 부착되어 있다. 모든 이명 측정은 방음실 내에서 실행하였다.

- [85] GPIAS 과정은 랫트 마다 gap 자극 20회, no-gap 자극 20회를 실시하였다. 자극의 순서는 무작위로 진행되었으며 동물에게 가해지는 주 자극펄스 사이의 시간간격 (inter-stimulus interval, ISI) 또한 17 ~ 23 sec의 범위 내에서 무작위로 선택되었다. 배경음은 16kHz의 협대역 잡음 (narrow-band noise)을 60 dB SPL로 노출되도록 설정하였으며, gap 자극시 무음 간격은 50ms로 설정하였다. 놀람 반사 (Startle Reflex, SR)를 위한 주 자극 펄스음은 백색 잡음 (white noise)를 110 dB SPL로 50ms 동안 주었다.
- [86]
- [87] 실시예 3: 이명 동물 모델의 청성뇌간반응검사
- [88] 소음에 노출 전·후로 GPIAS 측정시 청력의 저하는 GPIAS 측정값의 신뢰성을 떨어뜨리기 때문에 청력의 저하 유무를 확인하기 위해 청성뇌간반응검사 (Auditory brainstem response; ABR test)를 실시하였다.
- [89] 이는 줄레틸 50을 이용한 마취 후에 시행하였다. 8kHz, 16kHz, 32kHz의 tone burst음을 주어 wave V의 파형이 나오는 최소자극 음 크기 (dB)를 청력역치로 하였다.
- [90] 소음에 노출시키기 전의 청력 역치값은 대조군과 3가지 실험군 모두 8, 16, 32kHz에서 15dB SPL 미만으로 나타났다.
- [91] 소음 노출 1일 후, 16kHz에서 소음 노출군에서는 18.0 ± 6.9 dB SPL, 소음 노출 후 VLE를 1주간 투여한 군 (Vit 1w group)에서는 17.8 ± 7.1 dB SPL, 소음 노출 후 VLE를 2주간 투여한 군 (Vit 2w group)에서는 18.8 ± 5.0 dB SPL으로 측정되었다 또한, 32kHz에서 소음 노출군에서는 14.2 ± 4.2 dB SPL, Vit 1w 군에서는 13.8 ± 4.7 dB SPL, Vit 2w 군에서는 16.3 ± 5.6 dB SPL으로 측정되었다.
- [92] 1주간 VLE를 경구 투여한 후, 16kHz에서 Noise 군에서는 15.2 ± 5.9 dB SPL, Vit 1w 군에서는 12.8 ± 2.6 dB SPL, Vit 2w 군에서는 20.0 ± 6.6 dB SPL으로 측정되었으며, 32kHz에서 Noise 군에서는 12.8 ± 4.2 dB SPL, Vit 1w 군에서는 11.9 ± 2.5 dB SPL, Vit 2w 군에서는 16.6 ± 5.1 dB SPL으로 측정되었다.
- [93] 따라서, 소음 노출 이후에도 평균 20 dB SPL 이하의 청력 역치 값을 유지하여 청력 손실은 없는 것으로 확인되었다 (도 2).
- [94]
- [95] 실시예 4: 적포도잎 추출물 (*Vitis vinifera* Leaf Extract)에 의한 이명 치료 효과
- [96] 실시예 2 및 실시예 3의 청성뇌간반응검사 (Auditory brainstem response; ABR test), GPIAS (Gap Pre-pulse Inhibition of Acoustic Startle) 및 *Vitis vinifera* Leaves dry Extract (VLE) 투여의 스케줄은 도 1에 도식하였다.
- [97] 실시예 2의 4가지 실험군에서, 소음에 노출되기 전 랫트들의 평균 GPIAS 값은

대조군에서 $39.7 \pm 12.3\%$, Noise 군에서 $34.8 \pm 9.2\%$, Vit 1w 군에서 $35.8 \pm 15.0\%$, Vit 2w 군에서 $35.7 \pm 10.7\%$ 으로 나타났다. 4 그룹간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

[98] 그 다음, 소음 노출 1일 후, VLE를 3일, 1주, 2주간 투여 후 4 그룹간에 평균 GPIAS 값을 비교하였다.

[99] 소음 노출 직후 평균 GPIAS 값은 Noise 군은 $-0.2 \pm 7.8\%$, Vit 1w 군은 $-10.6 \pm 7.8\%$ 로 Noise 군이 유의하게 높았으나 ($p = 0.013$), VLE를 1주일간 투여한 후에는 Noise 군이 $-1.0 \pm 12.8\%$, Vit 1w 군이 $15.9 \pm 7.9\%$ 로 Vit 1w 군이 유의하게 높아졌다 ($p = 0.026$). 하지만, VLE 투여를 중단하였을 경우 Noise 군 $2.1 \pm 13.1\%$, Vit 1w 군 $2.3 \pm 12.8\%$ 로 두 그룹간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

[100] 반면에 Noise 군과 Vit 2w 군간의 소음 노출 직후 평균 GPIAS 값은 Noise 군이 $-0.2 \pm 7.8\%$, Vit 2w 군이 $-10.3 \pm 7.1\%$ 로 Noise 군이 유의하게 높았으나 ($p = 0.016$), VLE를 1주일간 투여한 후에는 Noise 군이 $-1.0 \pm 12.8\%$, Vit 2w 군이 $14.2 \pm 19.4\%$ 로 Vit 2w 군이 높아지는 경향을 보여주었으며 ($p = 0.054$), VLE 투여를 지속하였을 경우 Noise 군 $2.1 \pm 13.1\%$, Vit 2w 군 $23.6 \pm 15.9\%$ 로 Vit 2w 군이 유의하게 높아졌다 ($p = 0.002$) (도 3).

[101] 이후 VLE를 투여한 두 실험군 모두 대조군에 비해 GPIAS 값이 현저하게 증가됨을 확인하였다. 이는 소음으로 인해 생긴 이명 증상이 VLE로 인해 완화되었음을 의미한다. 특히적으로, 이명 유도 후 VLE 투여를 1주 후 중단하였을 때, 이명을 다시 인지하는 양상을 보였으며, VLE를 지속적으로 투여하였을 때에는 이명 증상에 대한 반응이 점점 더 호전되는 것을 확인할 수 있었다.

[102]

[103] 실시예 5: 적포도잎 추출물 (*Vitis vinifera* Leaf Extract)에 의한 이명 치료 효과의 조직학적 분석

[104] *Vitis vinifera* Leaves dry Extract (VLE)의 이명 치료 효과 확인을 위한 조직학적 분석을 위해 H&E 염색을 진행하였다. 실시예 2의 대조군 (Control group), 소음 노출군(Noise group), 소음 노출 후 VLE를 2주간 투여한 군 (Vit 2w group)을 이용하였다.

[105] 유모세포(Hair cell, HC)의 형태 및 개수는 각 군간에서의 차이가 없었으나, 나선 신경절 신경세포(Spiral ganglion neuron, SGN)에서는 대조군에 비해 Noise 군의 핵의 크기가 작아지는 형태를 보였다. 이에 비해 VLE 2w 군에서의 핵의 형태는 대조군과 유사하였다(도 4).

[106]

산업상 이용가능성

[107] 본 발명의 적포도잎 추출물 (*Vitis vinifera* leaf extract)을 유효성분으로 함유하는

조성물은 소음 등에 의해 유발된 이명의 완화 및 개선 효과가 우수하므로, 이명의 예방 또는 치료용 조성물로 매우 유용하다.

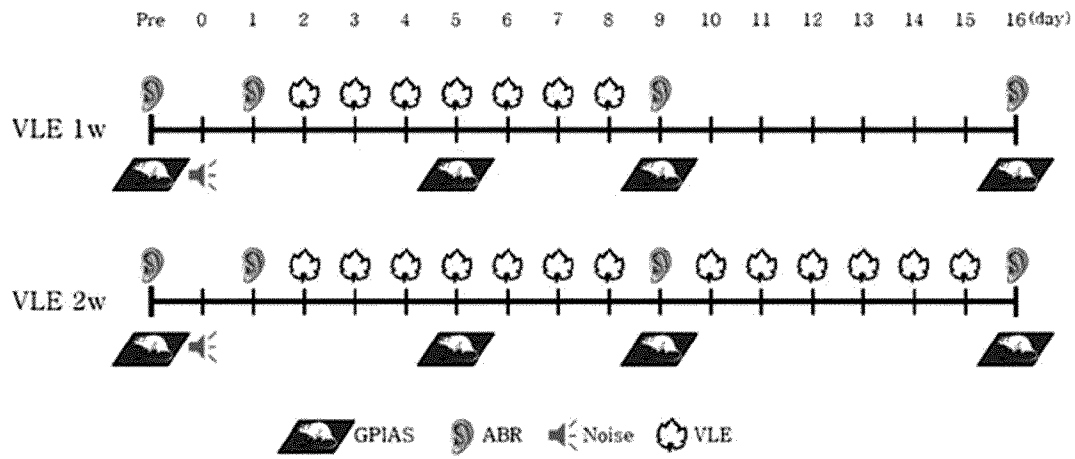
[108]

[109] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

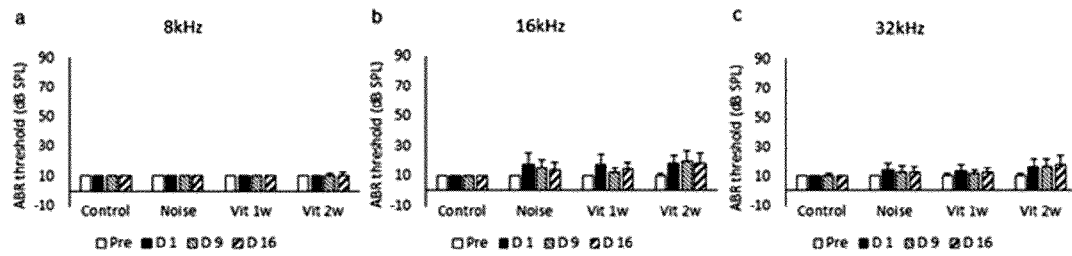
청구범위

- [청구항 1] 적포도잎 추출물 (*Vitis vinifera* leaf extract)을 유효성분으로 함유하는 이명의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 적포도잎 추출물 (*Vitis vinifera* leaf extract)은 적포도잎을 물, C1~C4의 알콜 및 물과 C1~C4의 알콜과의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택된 용매로 추출하여 수득된 것을 특징으로 하는 약학 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 이명은 소음, 약물 또는 노화에 의해 유발되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.
- [청구항 4] 적포도잎 추출물 (*Vitis vinifera* leaf extract)을 유효성분으로 함유하는 이명의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 적포도잎 추출물 (*Vitis vinifera* leaf extract)은 적포도잎을 물, C1~C4의 알콜 및 물과 C1~C4의 알콜과의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택된 용매로 추출하여 수득된 것을 특징으로 하는 식품 조성물.
- [청구항 6] 제4항에 있어서, 상기 이명은 소음, 약물 또는 노화에 의해 유발되는 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

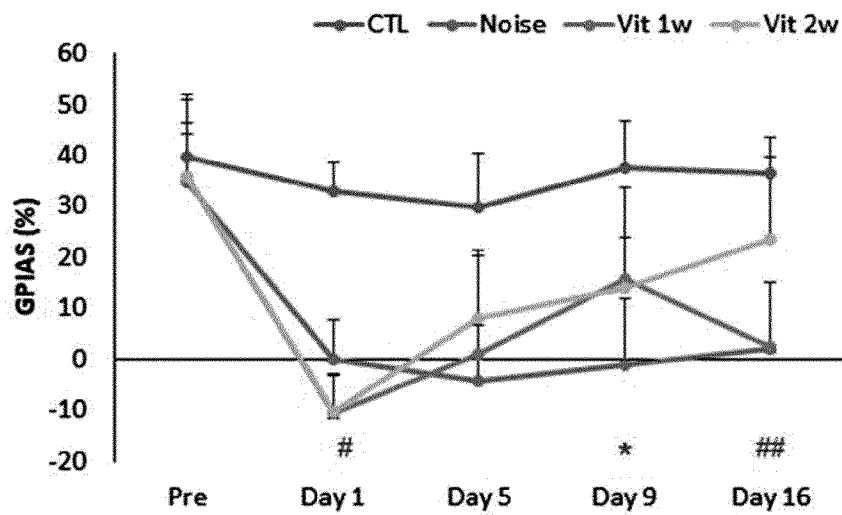
[도1]



[도2]



[도3]



[도4]

