(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년08월30일
(11) 등록번호 10-1893604
(24) 등록일자 2018년08월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/06 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/06 (2013.01)
A23L 33/145 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0109469
(22) 출원일자 2016년08월26일
심사청구일자 2016년08월26일
(65) 공개번호 10-2017-0026266
(43) 공개일자 2017년03월08일
(30) 우선권주장
1020150121081 2015년08월27일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020040078663 A
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 11 항

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
강동호
서울특별시 마포구 광성로6길 16 (신수동)
정세영
서울특별시 동대문구 천장산로11길 17, 204동 1503호 (이문동, 이문삼성래미안아파트)
(74) 대리인
안소영

심사관 : 최승희

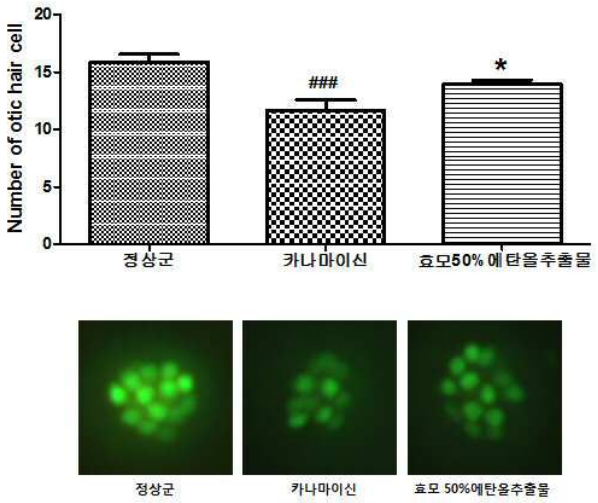
(54) 발명의 명칭 **칸디다 유틸리스 추출물을 포함하는 난청의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 칸디다 유틸리스 추출물을 포함하는 난청의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.

본 발명에 따른 조성물은 소음 및 노화 등의 난청으로 인한 청력 역치의 상승과 유모세포 손상을 효과적으로 억제시킴으로써 난청을 억제할 수 있어 난청의 예방 또는 치료에 유용하며, 또한 경구투여가 용이하여 환자의 복약 순응도를 높일 수 있어 경구 투여용 약학 조성물 또는 건강기능식품으로써 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A23V 2200/30 (2013.01)
A23V 2250/76 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌
Biotechnology Letters, 2003, 제25권, 페이지 887-890*
Brain Research, 1998, 제784권, 페이지 82-90*
Hearing Research, 1994, 제77권, 페이지 81-87*
WO2016033615 A1
WO2013057207 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명 세 서

청구범위

청구항 1

글루타치온을 추출물 내 3 중량% 이상 6 중량% 이하로 포함하는 칸디다 유틸리스 (*Candida Utilis*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 난청의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 난청은 전음성 난청(conductive hearing loss) 또는 감각신경성 난청(sensorineural hearing loss)인 난청의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 난청은 소음성 난청, 노인성 난청, 돌발성 난청, 당뇨병으로 인한 청신경병증, 이독성 난청, 외상성 난청 및 바이러스성 난청으로부터 선택되는 어느 하나인 난청의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 칸디다 유틸리스 (*Candida Utilis*) 추출물은 추출물 총 중량에 대하여 글루타치온을 4 중량% 이상 6 중량% 이하로 포함하는 추출물인 난청의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 칸디다 유틸리스 (*Candida Utilis*) 추출물은 칸디다 유틸리스 에탄올 수용액 추출물인 난청의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

글루타치온을 추출물 내 3 중량% 이상 6 중량% 이하로 포함하는 칸디다 유틸리스 (*Candida Utilis*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 난청의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 난청은 전음성 난청(conductive hearing loss) 또는 감각신경성 난청(sensorineural hearing loss)인 난청의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 난청은 소음성 난청, 노인성 난청, 돌발성 난청, 당뇨병으로 인한 청신경병증, 이독성 난청, 외상성 난청 및 바이러스성 난청으로부터 선택되는 어느 하나인 난청의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 칸디다 유틸리스 (*Candida Utilis*) 추출물은 추출물 총 중량에 대하여 글루타치온을 4 중량% 이상 6 중량% 이하로 포함하는 추출물인 난청의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 10

제6항에 있어서, 상기 칸디다 유틸리스 (*Candida Utilis*) 추출물은 칸디다 유틸리스 에탄올 수용액 추출물인 난청의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 11

제6항에 있어서, 상기 식품은 건강기능식품인 난청의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 칸디다 유틸리스(*Candida Utilis*) 추출물을 포함하는 난청의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 귀는 귓바퀴와 외이도까지를 외이로 분류하고, 고막과 이소골은 중이, 그리고 달팽이관과 청신경을 내이로 분류한다. 소리는 음향학적 에너지로서 귓바퀴와 외이도를 통해 전달되어 고막을 진동시키게 된다. 고막의 진동은 기계적인 에너지로 고막에 붙어있는 3개의 작은 뼈로 이루어진 이소골로 전달된다. 이소골의 마지막 뼈인 등골은 달팽이관에 연결되어, 달팽이관 내의 림프액으로 에너지를 전달시키게 된다. 전달된 에너지는 림프액에 파동을 일으키고 이러한 파동에 의해 달팽이관 내에 있는 유모세포가 자극받게 된다. 유모세포의 움직임으로 이온변화가 일어나면서 유모세포에 붙어있는 청신경으로 신경전달물질이 전달되고, 소리에너지는 청신경에서 전기적인 에너지 형태로 뇌까지 전달되게 된다.

[0003] 외이와 중이는 소리를 전달하는 기관으로서 염증 같은 질병에 감염되었을 때 대부분 치료나 수술로써 회복될 수 있고, 그로 인한 청력손실 역시 치료 후에 개선될 수 있다. 이러한 난청을 전음성 난청(conductive hearing loss)이라 한다.

[0004] 한편, 소리를 감지하는 기관인 달팽이관과 전기적 에너지로 소리를 전달하는 청신경, 그리고 소리의 변별, 이해 등 종합적인 역할을 하는 청각을 담당하는 뇌에 문제가 생겨 발생하는 난청을 감각신경성 난청(sensorineural hearing loss)이라 한다. 대부분의 청력손실은 현재까지 예방 외에 치료방법이 없는 감각신경성 난청에 해당하며, 일단 난청이 발병되면 보청기 등의 보조수단을 이용하거나 아니면 기계적 장치를 체내에 이식하는 방법으로 듣는데 도움을 받고 있다. 감각신경성 난청의 원인으로는 소음, 약물, 노화, 외상, 대사성질병, 바이러스 등이 있다. 이 중 최근 눈에 띄게 증가하는 인자는 소음과 노화로 인한 난청이다. 전세계적인 추세인 사회의 고령화는 노인성 난청을 증가시키고 있고, 소음환경에서 일하는 근로자나 군인 같은 직업적 소음성 난청뿐만 아니라 문화 및 여가생활에 의한 소음성 난청도 증가하고 있다.

[0005] 최근 난청의 예방 및 치료에 효과적인 물질을 찾기 위한 연구로서, 항산화제, N-메틸-D-아스파테이트 (N-methyl-D-aspartate, NMDA) 길항제, 세포사멸 억제제, 성장인자 등에 대한 전임상 연구가 보고되고 있으나, 임상실험으로 진행하기에는 한계가 있음을 나타났다. 또한, 현재까지 소음성 난청의 예방 및 치료와 관련하여 승인된 약물은 없으며, 학계에 보고된 바로는 전임상 단계에서의 연구와 임상 단계에서의 Mg, NAC (N-acetylcysteine, NAC) 그리고 엡셀렌(Ebselen)의 약물만이 보고되고 있다. 더욱이, 인체에 독성 또는 위험성이 없이 사용할 수 있는 천연물 내지 천연 소재를 이용한 난청 치료제에 대해서는 개발된 약물을 거의 찾아볼 수 없다.

[0006] 이러한 배경 하에, 식품 또는 약제의 소재로 손쉽게 사용될 수 있는 소재를 이용하여 난청을 예방 또는 치료하기 위한 조성물에 관한 연구 개발이 절실히 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국특허출원 제10-2010-0052556호

(특허문헌 0002) 한국특허출원 제10-2013-0086134호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 칸디다 유틸리스 추출물을 유효성분으로 포함하는 난청의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 칸디다 유틸리스 추출물을 유효성분으로 포함하는 난청의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명자들은 안전성이 우수한 천연 식품 소재를 대상으로 난청을 예방하거나 치료할 수 있는 물질들을 찾기 위해 예의 노력한 결과, 놀랍게도 칸디다 유틸리스 추출물이 난청을 효과적으로 예방 및 치료하여 난청의 예방, 개선 및 치료에 현저한 효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0011] 본 발명은 칸디다 유틸리스(*Candida Utilis*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 난청의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 난청 예방 또는 치료용 약학 조성물은 소음 및 노화 등의 난청으로 인한 청력 역치의 상승과 유모세포 손상을 효과적으로 억제시키는 작용 효과를 가짐으로써 난청, 바람직하게 전음성 난청 및 감각신경성 난청의 예방 또는 치료에 효과적이다.

[0013] 본 발명에 있어서, 칸디다 유틸리스(*Candida Utilis*)란 토룰라 효모(Torula yeast)로써, 식재료로 사용가능하며 인체 투여에 적합한 특성을 지닌다.

[0014] 본 발명에 따른 칸디다 유틸리스(*Candida Utilis*) 추출물은 단백질, 비타민 B 복합체 등의 영양소를 다양하게 포함하여 이들 성분의 시너지 효과를 통해 난청 예방, 개선 및 치료에 현저한 효과를 가지며, 특히 글루타치온을 고함량으로 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 칸디다 유틸리스 추출물은 글루타치온을 3 %, 4 %, 5 % 또는 6% 이상으로 함유하여 난청의 예방 또는 치료에 현저한 효과를 지닐 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 칸디다 유틸리스(*Candida Utilis*) 추출물은 타 균주 추출물과 대비하여 난청의 예방 또는 치료에 현저한 효과를 지닌다.

[0015] 본 발명에 따른 칸디다 유틸리스 추출물은 칸디다 유틸리스 추출물의 통상의 제조 방법에 따라 제조되거나 상업적으로 판매되는 칸디다 유틸리스 추출물을 구매하여 사용할 수 있다.

[0016] 상기 제조방법은 칸디다 유틸리스의 무게에 대하여 약 1 내지 30 배, 바람직하게는 약 10 내지 30 배의 1차 추출용매, 바람직하게는 물, C_1내지 C_4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출함으로써 수행할 수 있다. 상기 추출 용매는 보다 바람직하게 에탄올 수용액, 가장 바람직하게 40 내지 60 중량 % 에탄올 수용액일 수 있다. 위 40 내지 60 중량 % 에탄올 수용액으로 칸디다 유틸리스를 추출하는 경우 가장 우수한 난청의 예방, 치료 및 개선 효과를 가진다.

[0017] 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 ℃ 내지 100 ℃ 등에서 수행될 수 있으나, 이에 국한되지 않는다. 또한, 추출시간은 추출방법에 따라 상이하며, 당업자가 적절한 추출시간을 채택할 수 있으며, 이에 국한되지 않으나, 약 10분 내지 10 일, 바람직하게 30분 내지 1일의 범위에서 단회 또는 복수회로 수행될 수 있다. 바람직하게는 상기 추출은 67 내지 85 ℃에서 약 30 내지 2시간 상기한 40 내지 60 중량 % 에탄올 수용액으로 추출함으로써 수행될 수 있다. 상기 추출을 수행하여 얻어진 추출물은 통상의 방법에 따라 여과하여 불순물을 제거한 액상 형태로 얻거나, 얻어진 액상 형태의 추출물을 통상의 방법에 따라 감압농축 및/또는 건조하여 분말 형태로 얻을 수 있다.

[0018] 또한, 상기 추출공정은 필요에 따라, 유효성분의 함량이 높은 분획을 얻는 단계를 더 포함할 수 있다. 즉, 상기 1차 추출용매로 추출하여 얻어진 추출물을 물에 분산시킨 후, 적절한 2차 추출용매, 예컨대, 수포화 C_1- C_4 의 알콜로 추출하는 단계를 수행함으로써, 생성되는 추출물 중의 유효성분 함량, 바람직하게 글루타치온의 함량을 더욱 높일 수 있다.

[0019] 예컨대, 칸디다 유틸리스 추출물의 제조 방법에 따르면, 통상의 칸디다 유틸리스 배지 성분에 칸디다 유틸리스를 접종하여 배양한 후, 배양액으로부터 균체를 분리하여 물 세척으로 세정한다. 분리한 균체로부터 물, C_1내지 C_4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로 엑기스를 추출하고, 여과, Sludge를 제거한 후, 살균, 덱스트린을 혼합해서 스프레이드라이로 칸디다 유틸리스 추출물을 얻을 수 있다.

[0020] 또한, 식품 원료 등으로 사용될 수 있는 칸디다 유틸리스 추출물, 바람직하게 건조 칸디다 유틸리스 추출물을 구매하여 사용할 수도 있다.

[0021] 본 발명에서 "난청(hearing loss)"이란 청각이 저하 또는 상실된 모든 상태를 의미하며, 전음성 난청(conductive hearing loss) 및 감각신경성 난청(sensorineural hearing loss)을 포함한다. 일실시양태에 따르면 상기 난청은 소음, 약물, 노화, 외상, 바이러스 등의 다양한 원인에 의해 발생하는 감각신경성 난청일 수 있

다. 또한, 상기 난청은 소음성 난청, 노인성 난청, 돌발성 난청, 당뇨병으로 인한 청신경병증, 이독성 난청, 외상성 난청, 바이러스성 난청을 포함할 수 있다.

[0022] 본 발명의 칸디다 유틸리스 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물의 총 중량에 대하여 0.1 내지 80 중량%로 칸디다 유틸리스 추출물을 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0023] 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있으며, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화될 수 있다.

[0024] 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 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제, 기타 약제학적으로 허용가능한 첨가제를 포함한다.

[0025] 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.

[0026] 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.

[0027] 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 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있으나 이에 국한되지 않는다.

[0028] 본 발명의 약학 조성물에 함유되는 칸디다 유틸리스 추출물의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 연령, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들면, 칸디다 유틸리스 추출물은 1일 1 내지 2000 mg/kg으로, 바람직하게는 10 내지 2000 mg/kg의 용량으로 투여할 수 있으며, 상기 투여는 하루에 한번 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다.

[0029] 본 발명의 약학조성물은 랫트, 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로, 예를 들면, 경구, 복강 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내(Intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0030] 본 발명은 또한 칸디다 유틸리스 유효성분으로 추출물을 포함하는 난청의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 포함한다.

[0031] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품으로서 사용될 수 있다. 상기 "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.

[0032] 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.

[0033] 상기 "식품 첨가물 공전"에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류들을 들 수 있다.

[0034] 본 발명의 식품 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 칸디다 유틸리스 추출물을 0.01 내지 95 중량%, 바람직하게는 1 내지 80 중량% 로 포함할 수 있다. 본 발명의 식품 조성물에 함유되는 칸디다 유틸리스 추출물은 상기 약학 조성물의 제조에서 언급된 추출방법과 동일한 방법으로 얻어질 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명의 식품 조성물은 난청의 예방 및/또는 개선을 목적으로, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.

[0036] 예를 들어, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 칸디다 유틸리스 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.

[0037] 캡슐 형태의 건강기능식품 중 경질캡슐제는 통상의 경질캡슐에 칸디다 유틸리스 추출물, 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물 또는 그의 입상물 또는 제피한 입상물을 충진하여 제조할 수 있으며, 연질캡슐제는 칸디다 유틸리스 추출물 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물을 젤라틴 등 캡슐기제에 충진하여 제조할 수 있다. 상기 연질캡슐제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0038] 환 형태의 건강기능식품은 칸디다 유틸리스 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.

[0039] 과립형태의 건강기능식품은 칸디다 유틸리스 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 5.0 %이하이고 또 45호체를 통과하는 것은 전체량의 15.0 %이하일 수 있다.

[0040] 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 5 개정판, p33-48, 1989).

[0041] 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.

발명의 효과

[0042] 본 발명에 따른 칸디다 유틸리스 추출물은 소음, 노화 등 다양한 원인에 의한 청력 역치의 상승과 유모세포 손상 등을 효과적으로 억제시킴으로써 난청을 예방, 개선 및 치료할 수 있어 난청의 예방 또는 치료에 유용하며, 또한 경구투여가 용이하여 환자의 복약 순응도를 높일 수 있어 경구 투여용 약학 조성물 또는 건강기능식품으로써 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 칸디다 유틸리스 추출물에서 글루타치온을 확인한 결과를 나타낸다.

도 2은 카나마이신으로 유발된 이독성 모델에서 칸디다 유틸리스 에탄올 수용액 추출물 처리에 따른 이독성에 의한 청각병증 치료 효과를 측정한 결과를 나타낸다.

도 3은 소음노출 후 클릭 자극음에서 청성유발전위를 이용한 청력역치 측정 시 칸디다 유틸리스 추출물의 효과를 측정한 결과를 나타낸다 (contorl: 미처리 대조군, HM: 칸디다 유틸리스 추출물 처리 실험군).

도 4는 소음노출 후 8 kHz TB 자극음에서 청성유발전위를 이용한 청력역치 측정시 칸디다 유틸리스 추출물의 효과를 측정한 결과를 나타낸다 (contorl: 미처리 대조군, HM: 칸디다 유틸리스 추출물 처리 실험군).

도 5는 소음노출 후 16 kHz TB 자극음에서 청성유발전위를 이용한 청력역치 측정시 칸디다 유틸리스 추출물의 효과를 측정한 결과를 나타낸다 (contorl: 미처리 대조군, HM: 칸디다 유틸리스 추출물 처리 실험군).

도 6은 소음노출 후 중기반응을 이용한 Pa 잠복기 측정 시 칸디다 유틸리스 추출물의 효과를 측정한 결과를 나타낸다 (contorl: 미처리 대조군, HM: 칸디다 유틸리스 추출물 처리 실험군).

도 7은 가나마이신 처리로 otic hair cell을 손상 시킨 5 dpf 제브라피쉬에 칸디다 유틸리스 추출물 처리 후 otic hair cell의 개선 효과를 측정한 결과를 나타낸다 (normal :정상군, contorl: 가나마이신 처리 대조군, HM 0.5: 칸디다 유틸리스 추출물 0.5 ug/ml 처리 실험군, HM 1: 칸디다 유틸리스 추출물 1 ug/ml 처리 실험군).

도 8은 살리실레이트 처리로 otic hair cell을 손상 시킨 5 dpf 제브라피쉬에 칸디다 유틸리스 추출물 처리 후

otic hair cell의 개선 효과를 측정한 결과를 나타낸다 (normal :정상군, contorl: 살리실레이트 처리 대조군, HM 1: 칸디다 유틸리스 추출물 1 ug/ml 처리 실험군, HM 10: 칸디다 유틸리스 추출물 10 ug/ml 처리 실험군, HM 100: 칸디다 유틸리스 추출물 100 ug/ml 처리 실험군).

도 9는 알록산 처리로 otic hair cell을 손상 시킨 5 dpf 제브라피쉬에 칸디다 유틸리스 추출물 처리 후 otic hair cell의 개선 효과를 측정한 결과를 나타낸다 (normal :정상군, contorl: 알록산 처리 대조군, HM 1: 칸디다 유틸리스 추출물 1 ug/ml 처리 실험군, HM 10: 칸디다 유틸리스 추출물 10 ug/ml 처리 실험군, HM 100: 칸디다 유틸리스 추출물 100 ug/ml 처리 실험군).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 시험예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예 및 시험예에 한정되는 것은 아니다.

[0045] **실시예 1. 칸디다 유틸리스 에탄올 수용액 추출물의 제조**

[0046] YM broth (Yeast extract: 3.0 g, Malt extract: 3.0 g, Peptone: 5.0 g, Dextrose: 10.0 g, Distilled water: 1.0 L) 에 *Candida utilis*를 1000:1 로 접종 후 진탕배양기에서 26 ℃, 150 rpm의 조건으로 칸디다 유틸리스의 정지상인 OD 600 2.0 부근까지 배양하였다. 배양 후 4 ℃에서 보관하여 *Candida utilis*를 침전시킨 후 상층액은 제거하고 침전물을 열풍건조기에서 건조하였다.

[0047] 건조된 칸디다 유틸리스를 막자사발에 넣고 갈아준 뒤, 갈아준 칸디다 유틸리스를 1g에 80℃에서 가열한 50% 에탄올을 25 ml 부어주었다. 1시간 동안 80℃에서 가열한 후에 얼음을 이용하여 10분간 식혀주었다. 2000 rpm으로 20분간 원심분리한 후 상층액을 분리 후 농축하였다.

[0048] **실시예 2. 칸디다 유틸리스 추출물의 글루타치온 함량 확인**

[0049] 칸디다 유틸리스 추출물(*Candida Utilis*)은 일본 KOHJIN LIFE SCIENCES CO., LTD 사에서 제조한 추출물을 구매하여 사용하였다. 상기 칸디다 유틸리스 추출물(*Candida Utilis*)의 성분 분석을 위하여 글루타치온(glutathione)의 포함 여부 및 함량을 확인하였다.

[0050] 상기 글루타치온 분석을 위하여 HPLC 기기는 시마즈 LC-20A(Shimadzu, Japan)를 사용하였고, 컬럼은 RP-Amide 16 (150x4.6 mm, 5 μm; Sigma, USA)을 사용하였다. UV 215 nm 검출파장에서 이동상은 50 mM $NaClO_4$ 0.1% H_3PO_4 에 유속 1.0 mL/min 으로 하였으며, 컬럼 온도는 40 ℃로 샘플은 10 μl 주입하여 분석을 수행하였다. 상기 HPLC 수행 조건을 정리하면 다음과 같다.

[0051]

기기	시마즈 LC-20A HPLC
컬럼	RP-Amide 16 column (150x4.6 mm, 5 μm; Sigma, USA)
검출기	UV 215nm
이동상	50 mM $NaClO_4$ 0.1% H_3PO_4
유량	1 mL/min
컬럼 온도	40 ℃
주입	10 ㎕

[0052] 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0053] 도 1에서 확인되는 바와 같이, 칸디다 유틸리스 추출물(*Candida Utilis*)이 글루타치온을 함유하고 있음이 확인되었으며, 추출물 내 글루타치온의 함량을 확인한 결과 추출물 총 중량에 대하여 5 중량 %이상으로 글루타치온이 포함된 것이 확인되었다.

[0054] **실시예 3. 카나마이신으로 유발된 이독성 모델에서 칸디다 유틸리스 에탄올 수용액 추출물의 효과**

[0055] 수정 7일 후(7 day post fertilization)의 제브라피쉬 치어(zebrafish larvae)를 24 웰에 위치시킨 후 20 μM 카나마이신에 30분 노출시킨 후, 0.03% 해수염 용액(sea salt solution) 또는 10 μg/mL 실시예 1에서 제조된 칸디다 유틸리스 에탄올 수용액 추출물로 교체하고 노출시간이 최종 12시간이 되도록 하였다. Otic hair cell의 관찰을 위해 형광현미경(Olympus 1×70, Olympus, Japan)을 사용하였으며, 형광현미경 관찰 전에 0.1% YO-PRO-1을 30분 동안 염색하였다. 형광현미경을 통해 획득한 Otic hair cell의 수를 카운팅하여 데이터를 분석하여, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0056] 도 2에 나타낸 바와 같이, 20 μM 카나마이신 그룹에 비해 10 μg/mL 칸디다 유틸리스 에탄올 수용액 추출물에

노출된 제브라피쉬의 otic hair cell의 수가 유의적으로 증가한 것으로 나타났다. 이를 통해 이독성에 의한 청각병증에서 칸디다 유틸리스 에탄올 수용액 추출물에 의한 치료 효과를 확인하였다.

[0057] **실시예 4. 소음노출 후 칸디다 유틸리스 추출물의 청력 개선 효과 확인 - 클릭(click) 자극음 사용**

[0058] 소리의 유무에 대한 감각에 있어서 칸디다 유틸리스 추출물의 효과를 확인하기 위해 청성유발전위를 이용한 소음 노출 후 청력역치 측정 실험을 수행하였다.

[0059] 청성유발전위(auditory brainstem response, ABR) 측정법은 소리자극이 청신경에서 전기적인 신호로 전달될 때, 상기 전기적인 에너지를 측정하여 소리에 대한 반응을 평가하는 방법이다. 소리가 외이와 중이 그리고 달팽이관을 거쳐 청신경에 도달했을 때의 반응은 외이, 중이, 달팽이관의 상태를 모두 반영하는 것으로 이는 뇌까지 소리 에너지가 도달하는 실제적인 소리 에너지를 반영하는 것이다. 청력역치라 함은 겨우 들을 수 있는 소리의 최소 감각지점을 말하는 것으로 정상 마우스의 경우 평균적으로 20 dB의 작은 소리에서도 반응이 관찰된다.

[0060] 실시예 2의 칸디다 유틸리스 추출물 100 mg/kg 투여할 마우스와 미처리 대조군 마우스를 각각 8마리씩 두 그룹으로 나누어 평가하였다. 소음은 110 dB 백색소음으로 1시간 동안 노출시켰으며, 칸디다 유틸리스 추출물은 소음 노출 24시간 후부터 14일 동안 매일 같은 시간에 경구투여하였다. 청력역치는 칸디다 유틸리스 투여 14일째에 평가하였다. 청성유발전위 검사를 위하여 케타민(4.57 mg/kg)과 실라진(0.43 mg/kg)을 마우스에게 근육 주사하여 마취시킨 뒤 체온 37±0.5 ℃를 유지시키면서 평가하였다. 청성유발전위 검사시 자극음은 광대역 자극음인 클릭(click)음으로 90 dB부터 점차적으로 5 dB씩 소리를 낮춰가며 평가했으며 반응이 나오는 가장 작은 소리를 역치로 하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0061] 도 3에서 확인되는 바와 같이, 대조군에 비해 칸디다 유틸리스 추출물(HM)을 투여한 그룹의 청력역치가 현저하게 감소하여, 칸디다 유틸리스 추출물(HM)이 난청 예방 및 치료에 효과가 있음을 확인하였다.

[0062] **실시예 5. 소음노출 후 칸디다 유틸리스 추출물의 청력 개선 효과 확인 - 8 kHz TB 자극음 사용**

[0063] 칸디다 유틸리스 추출물의 청력 개선 효과를 확인하기 위해 소음 노출 후 청력역치를 8 kHz 자극음으로 측정함으로써 청력역치 측정 실험을 수행하였다.

[0064] 청성유발전위 검사시 자극음은 8 kHz TB로 70 dB부터 점차적으로 5 dB씩 소리를 낮춰가며 평가한 것을 제외하고는 실시예 4와 동일하게 실험을 수행하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0065] 도 4에서 확인되는 바와 같이, 칸디다 유틸리스 추출물(HM) 투여 그룹의 경우 대조군에 비해 청력 역치가 현저히 감소하는 것을 확인하였다. 클릭 자극음을 사용했을 때의 검사 결과와 마찬가지로 칸디다 유틸리스 추출물(HM)을 투여한 그룹의 경우 청력역치 개선 효과가 높게 나타나, 칸디다 유틸리스 추출물(HM)이 난청 예방 및 치료에 효과가 있음을 확인하였다.

[0066] **실시예 6. 소음노출 후 칸디다 유틸리스 추출물의 청력 개선 효과 확인 - 16 kHz TB 자극음 사용**

[0067] 칸디다 유틸리스 추출물의 청력 개선 효과를 확인하기 위해 소음 노출 후 청력역치를 16 kHz 자극음으로 측정함으로써 청력역치 측정 실험을 수행하였다.

[0068] 청성유발전위 검사시 자극음은 16 kHz TB로 70 dB부터 점차적으로 5 dB씩 소리를 낮춰가며 평가한 것을 제외하고는 실시예 4와 동일하게 실험을 수행하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0069] 도 5에서 확인되는 바와 같이, 칸디다 유틸리스 추출물(HM) 투여 그룹의 경우 대조군에 비해 청력 역치가 감소하는 것으로 나타났다. 클릭 자극음, 8 kHz TB를 사용했을 때의 검사 결과와 마찬가지로 칸디다 유틸리스 추출물(HM)을 투여한 그룹의 경우 청력역치 개선 효과가 높게 나타나, 칸디다 유틸리스 추출물(HM)이 소음성 난청 예방 및 치료에 효과가 있음을 확인하였다.

[0070] **실시예 7. 소음노출 후 중기반응 잠복기 분석을 통한 칸디다 유틸리스 추출물 추출물의 청력 개선 효과 확인**

[0071] 칸디다 유틸리스 추출물의 소음성 난청 치료 효과를 비교하기 위해 소음 노출 후 전기생리학적 평가 시 중기반응 검사 결과에서 Pa의 잠복기(latency)를 측정하였다.

[0072] 중기반응(Auditory Middle Latency Response, AMLR) 검사는 소리자극 후 20~30 ms 사이에 나타나는 반응으로 positive 반응의 꼭지점을 Pa라 명한다. 청력 손상이 있는 경우 Pa 잠복기가 지연되는 경향을 보인다. 중기반응은 청각영역의 중뇌 근처로써 청각의 중추기능을 평가하는 방법이다.

[0073] 실시예 2의 칸디다 유틸리스 추출물 100 mg/kg 투여할 마우스와 미처리 대조군 마우스를 각각 8마리씩 두 그룹

으로 나누어 평가하였다. 소음은 110 dB 백색소음으로 1시간 동안 노출시켰으며, 칸디다 유틸리스 추출물을 소음 노출 24시간 후부터 14일 동안 매일 같은 시간에 경구투여하였다. 중기반응 검사는 추출물 투여 후 14일째 평가하였다. 중기반응 검사를 위하여 케타민(4.57 mg/kg)과 실라진(0.43 mg/kg)을 마우스에게 근육 주사하여 마취시킨 뒤 체온 37±0.5 ℃를 유지시키면서 평가하였다. 중기반응 검사시 자극음은 클릭(click)으로 90 dB에서 평가하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0074] 도 6에서 확인되는 바와 같이, 대조군(control)은 소음 노출 후 잠복기가 지연되어 소음으로 인한 손상이 있음을 확인하였고, 칸디다 유틸리스 추출물(HM) 투여 그룹은 대조군보다 유의적으로 잠복기가 개선되어, 칸디다 유틸리스 추출물(HM)이 소음으로 인한 청각 중추 손상에 개선 효과가 있음을 확인하였다.

[0075] **실시예 8. 가나마이신 처리로 otic hair cell을 손상 시킨 제브라피쉬 모델에서 칸디다 유틸리스 추출물 처리 후 개선 효과 확인**

[0076] 칸디다 유틸리스 추출물 처리에 따른 청각 세포 치료 효과를 비교하기 위해, 5 dpf 제브라피쉬에 가나마이신 노출로 otic hair cell을 손상 시킨 후 칸디다 유틸리스 추출물 처리하고 otic hair cell을 평가하였다.

[0077] 제브라피쉬 알과 성어를 분리하기 위한 망을 설치한 수조에 암컷과 수컷을 1:1 비율로 넣고 12시간 후에 zebrafish embryo를 수집하였다. 채취 후에 0.03% sea salt solution을 사용하여 3회 세척하여 이물질 등을 제거하고 28.5 광주기(14 light/10 dark)가 설정된 인큐베이터에서 사육하였다. Otic hair cell이 손상된 zebrafish 모델을 만들기 위하여 5 dpf (day post fertilization)의 zebrafish larvae를 96 well에 위치시킨 후 가나마이신 20 μM에 30분 동안 노출하였다. 0.03% sea salt solution으로 세척한 후 칸디다 유틸리스 추출물 (HM) 0.5 ug/ml 처리 실험군과 1 ug/ml 처리 실험군에 칸디다 유틸리스 추출물을 12시간 동안 처리하였다. 0.03% sea salt solution으로 세척한 후 otic hair cell을 형광염색하기 위해 30분 동안 Yo-pro에 노출시켜 염색하였다. 이후 형광현미경으로 otic hair cell을 촬영하여 otic hair cell의 개수로 평가하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0078] 도 7에서 확인되는 바와 같이, 대조군(control)은 가나마이신 노출 후 otic hair cell의 개수가 감소하여 청각 세포 손상이 있음을 확인하였고, 칸디다 유틸리스 추출물(HM) 투여 그룹은 대조군보다 유의적으로 otic hair cell의 개수가 증가하여 세포 손상이 개선되어, 칸디다 유틸리스 추출물(HM)이 가나마이신으로 인한 청각 세포 손상에 개선 효과가 있음을 확인하였다.

[0079] **실시예 9. 살리실레이트 처리로 otic hair cell을 손상 시킨 제브라피쉬 모델에서 칸디다 유틸리스 추출물 처리 후 개선 효과 확인**

[0080] 칸디다 유틸리스 추출물 처리에 따른 청각 세포 치료 효과를 비교하기 위해 5 dpf 제브라피쉬에 살리실레이트 노출로 otic hair cell을 손상 시킨 후 칸디다 유틸리스 추출물 처리하고 otic hair cell을 평가하였다.

[0081] 시험은 실시예 7과 동일하게 진행했으며, 대조군은 살리실레이트만 5 mM로 48시간 처리했으며, 칸디다 유틸리스 처리군은 그룹별 살리실레이트 5 mM과 칸디다 유틸리스 추출물 1 ug/ml, 10 ug/ml, 100 ug/ml 처리를 동시에 48시간 동안 노출하였다. 노출 후 0.03% sea salt solution으로 세척한 후 otic hair cell을 형광염색하기 위해 30분 동안 Yo-pro에 노출시켜 염색하였다. 이후 형광현미경으로 otic hair cell을 촬영하여 otic hair cell의 개수로 평가하였다. 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0082] 도 8에서 확인되는 바와 같이, 대조군(control)은 살리실레이트만 노출 후 otic hair cell의 개수가 감소하여 청각 세포 손상이 있음을 확인하였고, 칸디다 유틸리스 추출물(HM) 동시 처리 그룹은 대조군보다 유의적으로 otic hair cell의 개수가 증가하여 세포 손상이 개선되어, 칸디다 유틸리스 추출물(HM)이 살리실레이트로 인한 청각 세포 손상 억제 효과가 있음을 확인하였다.

[0083] **실시예 10. 알록산 처리로 otic hair cell을 손상 시킨 제브라피쉬 모델에서 칸디다 유틸리스 추출물 처리 후 개선 효과 확인**

[0084] 칸디다 유틸리스 추출물 처리에 따른 청각 세포 치료 효과를 비교하기 위해 5 dpf 제브라피쉬에 알록산 노출로 otic hair cell을 손상 시킨 후 칸디다 유틸리스 추출물 처리하고 otic hair cell을 평가하였다.

[0085] 시험은 실시예 8과 동일하게 진행했으며, 대조군은 알록산 600 uM로 72시간 처리했으며, 칸디다 유틸리스처리군은 알록산 처리 후 칸디다 유틸리스 추출물 1 ug/ml, 10 ug/ml, 100 ug/ml 처리를 12시간 동안 노출하였다. 노출 후 0.03% sea salt solution으로 세척한 후 otic hair cell을 형광염색하기 위해 30분 동안 Yo-pro에 노출시켜 염색하였다. 이후 형광현미경으로 otic hair cell을 촬영하여 otic hair cell의 개수로 평가하였다. 그 결

과를 도 9에 나타내었다.

[0086] 도 9에서 확인되는 바와 같이, 대조군(control)은 알록산 노출 후 otic hair cell의 개수가 감소하여 청각 세포 손상이 있음을 확인하였고, 칸디다 유틸리스 추출물(HM) 동시 처리 그룹은 대조군보다 유의적으로 otic hair cell의 개수가 증가하여 세포 손상이 개선되어, 칸디다 유틸리스 추출물(HM)이 알록산으로 인한 청각 세포 손상을 개선시켜주는 효과가 있음을 확인하였다.

[0087] 상술한 바와 같이, 칸디다 유틸리스 추출물은 난청으로 인한 유모세포의 손상을 보호하고, 청신경에서 측정되는 청력역치를 감소시켜 난청의 예방과 치료에 유용하였으며, 특히 칸디다 유틸리스 에탄올 수용액 추출물이 현저한 효과를 나타내었다. 따라서, 칸디다 유틸리스 추출물은 난청의 예방 및 치료를 위한 용도로 사용될 수 있다.

[0088] **[제제예]**

[0089] 실시예 1 또는 실시예 2의 칸디다 유틸리스 추출물을 사용하여 아래와 같은 제형을 제조하였다. 그러나, 하기 제제예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 이에 의해 본 발명의 내용이 제한되는 것은 아니다.

[0090] **제제예 1. 정제의 제조**

[0091] 칸디다 유틸리스 추출물.....200 mg

[0092] 유당 .....100 mg

[0093] 전분 .....100 mg

[0094] 스테아린산 마그네슘 .....적량

[0095] 통상의 정제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 타정하여 정제를 제조하였다

[0096] **제제예 2. 액제의 제조**

[0097] 칸디다 유틸리스 추출물..... 1000 mg

[0098] CMC-Na.....20 g

[0099] 이성화당.....20 g

[0100] 레몬향.....적량

[0101] 정제수를 가하여 전체 1000 ㎖로 맞추었다. 통상의 액제의 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 갈색병에 충전하고 멸균시켜 액제를 제조하였다.

[0102] **제제예 3. 캡슐제의 제조**

[0103] 칸디다 유틸리스 추출물 .....300 mg

[0104] 결정성 셀룰로오스.....3 mg

[0105] 락토오스.....14.8 mg

[0106] 마그네슘 스테아레이트.....0.2 mg

[0107] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0108] **제제예 4. 주사제의 제조**

[0109] 칸디다 유틸리스 추출물.....300 mg

[0110] 만니톨.....180 mg

[0111] 주사용 멸균 증류수.....2974 mg

[0112] $Na_2HPO_4 12H_2O$.....26 mg

[0113] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ㎖) 상기의 성분 함량으로 제조하였다.

[0114] **제제예 5. 건강기능성 음료의 제조**

[0115] 칸디다 유틸리스 추출물 ..... 100 mg

[0116] 구연산 ..... 1000 mg

[0117] 올리고당 ..... 100 g

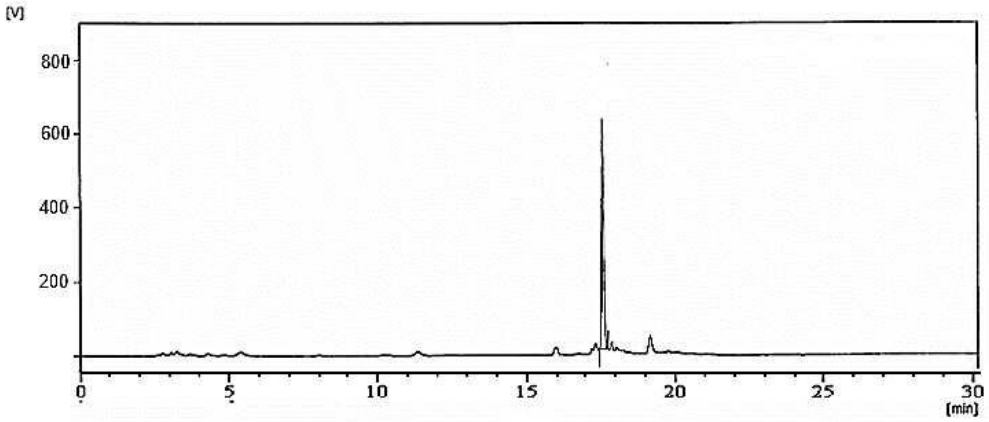
[0118] 매실농축액 ..... 2 g

[0119] 정제수를 가하여 전체 ..... 900 mL

[0120] 통상의 건강기능성 음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하여 건강 기능성 음료를 제조하였다.

도면

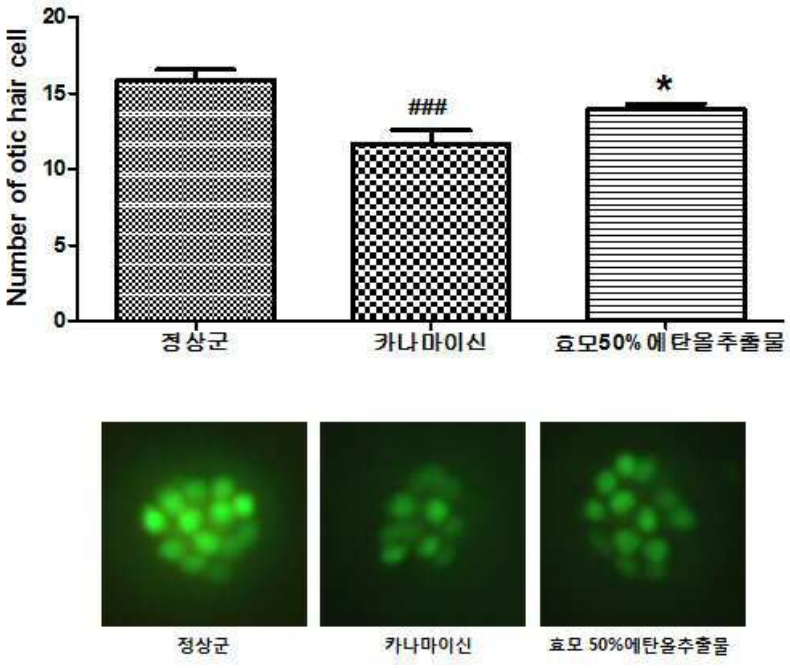
도면1



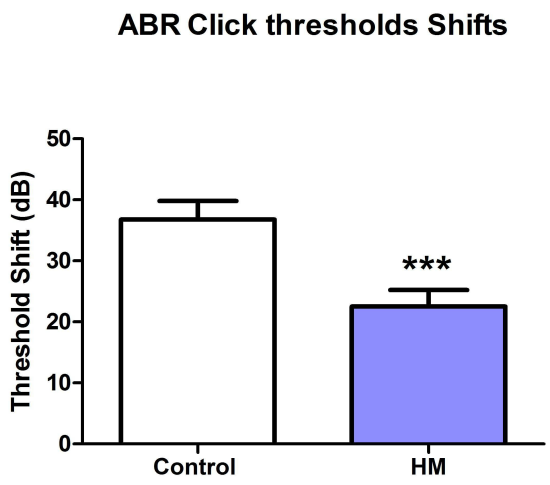
Peak Table

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	17.397	2830.848	620.294	100.0	100.0
Total		2830.848	620.294	100.0	100.0

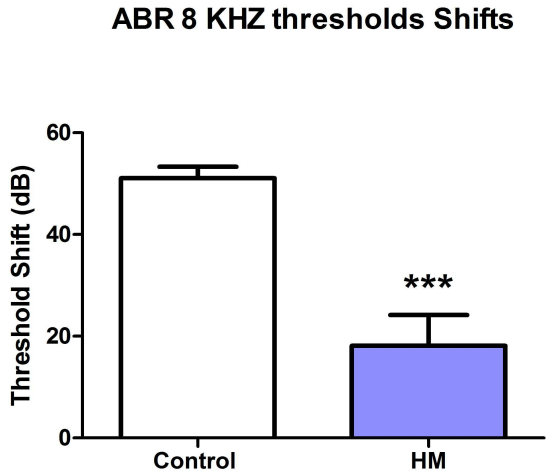
도면2



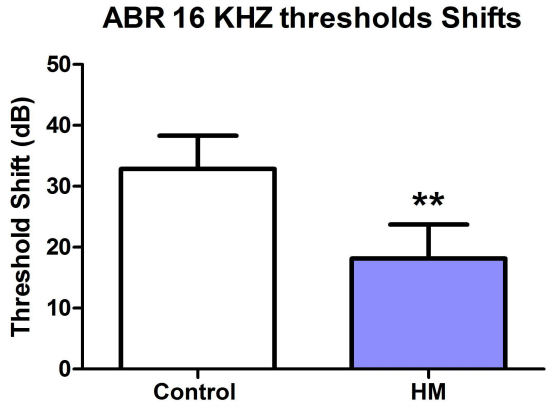
도면3


ABR Click thresholds Shifts
Threshold Shift (dB)
50
40
30
20
10
0
***
Control
HM

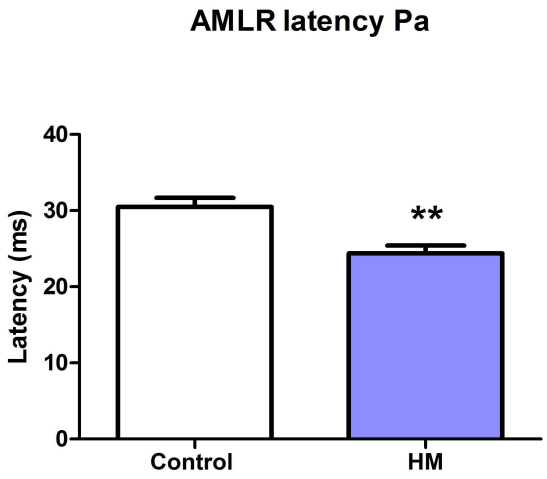
도면4


ABR 8 KHZ thresholds Shifts
Threshold Shift (dB)
60
40
20
0
***
Control
HM

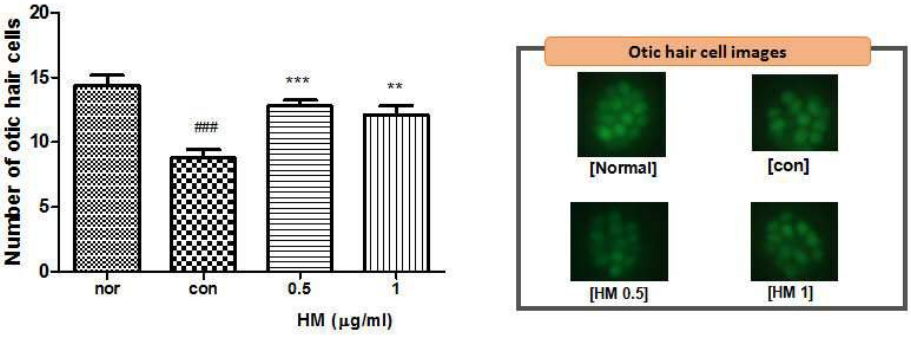
도면5


ABR 16 KHZ thresholds Shifts
Threshold Shift (dB)
50
40
30
20
10
0
**
Control
HM

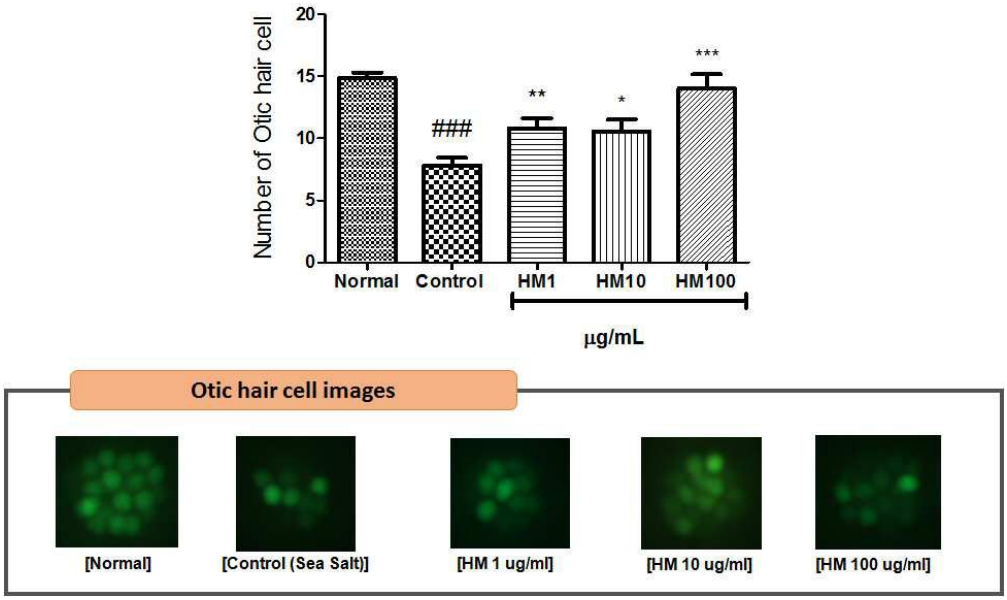
도면6


AMLR latency Pa
Latency (ms)
40
30
20
10
0
**
Control
HM

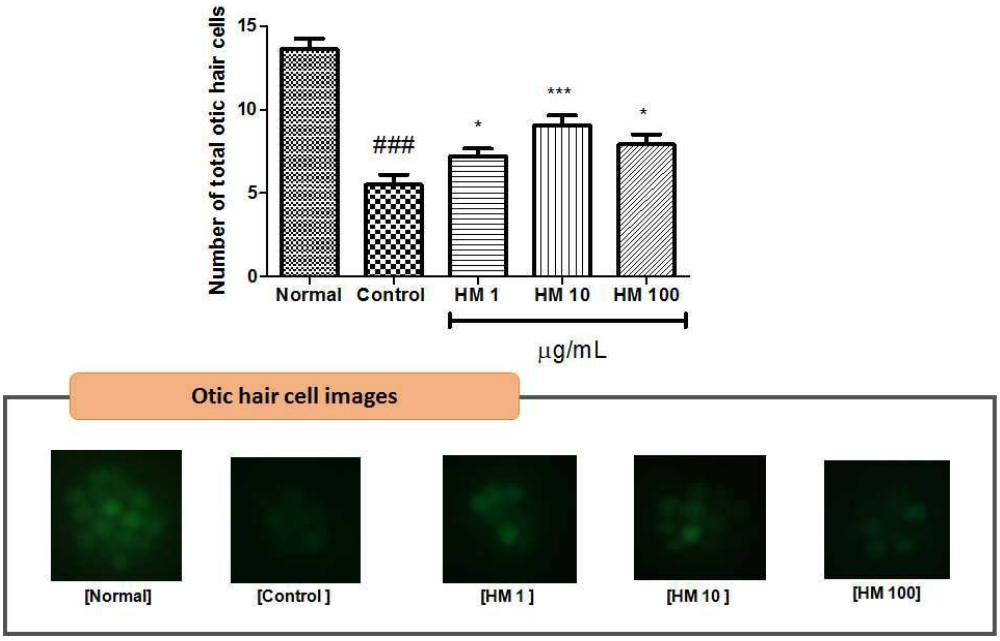
도면7


Number of otic hair cells
20
15
10
5
0
###
***
**
nor
con
0.5
1
HM (μg/ml)
Otic hair cell images
[Normal]
[con]
[HM 0.5]
[HM 1]

도면8


Number of Otic hair cell
20
15
10
5
0
###
**
*
***
Normal
Control
HM1
HM10
HM100
μg/mL
Otic hair cell images
[Normal]
[Control (Sea Salt)]
[HM 1 ug/ml]
[HM 10 ug/ml]
[HM 100 ug/ml]

도면9


Number of total otic hair cells
15
10
5
0
###
*
***
*
Normal
Control
HM 1
HM 10
HM 100
μg/mL
Otic hair cell images
[Normal]
[Control]
[HM 1]
[HM 10]
[HM 100]