

발명의 설명

발명의 명칭: 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획을 포함하는 면역 증진용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물 유래 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획을 유효성분으로 포함하는 면역 증진용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 면역 반응은 우리 몸을 보호하기 위한 자기방어 기작으로, 외부로부터 유입된 다양한 항원 및 체내 불필요한 대사 산물들을 제거 또는 무력화하는 과정을 포함하고, 항상성을 유지하여 질병의 발생을 억제시키는 역할을 수행한다. 체내 면역 반응은 크게 태어날 때부터 가지고 있는 선천 면역(*innate immunity*)과 후천적으로 생활 등에 적응되어 얻어지는 후천 면역(*acquired immunity*)로 구분된다.
- [3] 선천 면역은 자연 면역이라고도 하며, 항원에 대해 비특이적으로 반응하며 특별한 기억 작용은 보이지 않는다. 이러한 선천 면역은 실제로 대부분의 감염을 방어하는데, 선천적인 면역 체계로는 항원의 침입을 차단하는 피부·점액 조직, 강산성의 위산, 혈액에 존재하는 보체(*complement*) 등이 있으며, 세포로는 식균 작용을 담당하는 대식세포(*macrophage*)와 다형핵백혈구(*polymorphonuclear leukocyte*) 및 NK 세포 등이 있다.
- [4] 후천 면역은 적응 면역이라고도 하며, 처음 침입한 항원을 기억하여 다시 침입 시 특이적으로 반응하여 효과적으로 항원을 제거할 수 있다. 이러한 후천 면역은 체액성 면역과 세포성 면역으로 나뉜다. 체액성 면역은 B 림프구가 항원을 인지한 후 분화되어 항체를 분비하고, 이 항체가 주로 감염된 세균을 제거한다. 세포성 면역은 흉선에서 유래한 T 림프구 (T 세포)가 항원을 인지하여 림포카인(*lymphokine*)을 분비하거나 직접 감염된 세포를 죽이는 역할을 하며, 이러한 세포성 면역은 주로 바이러스 또는 세포 내에서 자랄 수 있는 세균에 감염된 세포를 제거하는 기능을 수행한다.
- [5] 면역 반응에 관여하는 세포들 중 대식세포(*Macrophage*)는 세균이나 이물질을 탐식, 제거하는 과정에서 여러 가지 사이토카인을 분비하여 면역현상을 조절하며, 항원에 대한 면역작용의 중추적인 역할을 하는 세포로서, 항원제시와 림프구의 비특이적 면역작용에 관계하며, 종양세포에 대해서는 직접적인 상해활성을 나타낸다. 또한 TLR(*tool like receptor*)에 반응하는 물질(LPS 혹은 천연물)은 대식세포를 활성화하여 T 세포와 B 세포의 증식, 식균 작용, 미생물 감염에 대한 방어 등의 2차 면역반응을 조절할 수 있는 IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 및 TNF- α 와 같은 사이토카인을 생산한다고 알려져 있다. IL-1, IL-6 및 TNF- α 는 대식세포에 의해 유도되는 대표적인 사이토카인으로, 세균감염에 따른 염증반응에 있어서 중추적인 역할을 하며 염증병소에서 그 양이 증가되는 것으로 알려져 있다. IL-6는 IL-1

과 협동적으로 작용하여 T 세포와 B 세포의 분화에 관여한다고 보고되었으며, TNF- α 은 항 바이러스성 작용이 있고, 여러 가지 생체반응에도 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 또한 IL-12는 NK cell의 활성화 및 Th1 type의 면역 반응을 유도하는 사이토카인으로써 세포성 외래물질에 대한 반응성을 높이는 작용을 한다고 알려져 있다.

- [6] NK 세포(natural killer cell)는 숙주에 감염된 세포나 종양 세포를 직접적으로 공격하는 선천성 면역 반응과 사이토카인 분비를 통하여 세포 독성 T 세포 또는 B 세포를 활성화시키는 후천성 면역 반응에 중요한 역할을 한다 (Advances in Immunology, 2014, 137-170). NK 세포는 IFN이나 대식세포에서 유래된 사이토카인에 의하여 활성화되며, 활성화된 NK 세포는 IFN- γ , TNF- α 등의 사이토카인을 분비하여 종양 세포의 세포 사멸을 촉진하거나 다른 면역세포의 활성화에 기여한다. NK 세포의 활성화는 다양한 활성화 및 억제성 수용체가 존재하여 신호전달 균형에 의해 활성이 조절되며, 이러한 조절에 의하여 정상 세포는 공격하지 않고, 감염된 세포를 제거하게 된다 (Cancer Immunol. Immunother. 2014; 63(6): 571-580).
- [7] NK 세포 활성화의 조절은 암 또는 면역질환과 같은 다양한 질병들과 관련이 있음이 알려져 있으며, NK 세포를 이용한 효율적인 면역 증진 방법의 필요성이 대두되고 있다.
- [8] 한편, 천연물은 알칼로이드, 플라보노이드, 테르페노이드 및 사포닌과 같은 저분자 물질과 다당류, 단백질, 탄닌 등과 같은 고분자 물질이 다양하게 혼재되어 있고 낮은 독성을 가지고 있어, 이로부터 유래된 다당체를 활용한 다양한 의약품이나 기능성식품으로의 연구가 활발해지고 있는 추세이나, 고분자 탄수화물이 갖는 약리활성이나 면역증진 활성화에 대해서는 여전히 연구가 필요하다.
- [9] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 특정 종류와 함량의 당으로 구성된 당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물 유래 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획을 대식세포, 비장세포 및 NK 세포에 처리 시 이들의 활성이 현저하게 증가함을 확인하고, 이를 면역 증강제나 항암 면역 조절제로 활용이 가능함을 새롭게 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

기술적 과제

- [10] 본 발명의 목적은 당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물의 다당체 효소처리물 또는 이의 분획을 유효성분으로 포함하는, 면역 증진 또는 항암 면역 조절용 조성물을 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 다른 목적은 당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물의 다당체 효소처리물 또는 이의 분획을 유효성분으로 포함하는, 면역 증진 또는 항암 면역 조절용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물의 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획을 대식세포, 비장세포 또는 NK 세포에 처리하는

단계를 포함하는 시험관 내(*in vitro*), 생체 외 (*ex vivo*), 또는 둘 다에서 세포를 활성화하는 방법을 제공하는 것이다.

- [13] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물의 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획을 유효성분으로 포함하는 조성물의, 면역 증진 또는 항암 면역 조절 용도를 제공하는 것이다.

- [14] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물의 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획을 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 면역 증진 또는 항암 면역 조절 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [15] 상기 과제를 해결하기 위하여,
- [16] 본 발명을 구현하는 본 발명의 양태는 당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물의 다당체 효소처리물 또는 이의 분획을 유효성분으로 포함하는, 면역 증진 또는 항암 면역 조절용 조성물이다.
- [17] 하나의 구체예로서, 상기 면역은 선천면역, 후천면역 또는 이의 조합인 것을 특징으로 한다.
- [18] 다른 구체예로서, 상기 혼합 추출물은 물, 탄소수 1 내지 6개의 직쇄 또는 분지형 알코올, 유기 용매 및 이들의 혼합 용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 추출한 것을 특징으로 한다.
- [19] 상기 구체예 중 어느 하나의 구체예로서, 상기 혼합 추출물은 당귀, 천궁 및 작약을 1~5:1~5:1~5의 중량비로 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [20] 상기 구체예 중 어느 하나의 구체예로서, 상기 혼합 추출물은 참당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물인 것을 특징으로 한다.
- [21] 상기 구체예 중 어느 하나의 구체예로서, 상기 다당체는 에탄올 다당체인 것을 특징으로 한다.
- [22] 상기 구체예 중 어느 하나의 구체예로서, 상기 효소는 펙티나아제를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [23] 상기 구체예 중 어느 하나의 구체예로서, 상기 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획은 중성당, 산성당, 단백질, KDO-유사 물질 및 폴리페놀을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [24] 상기 구체예 중 어느 하나의 구체예로서, 상기 다당체 효소처리물은 71.2 내지 75.4% 중성당, 17.2 내지 17.6% 산성당, 5.1 내지 6.1% 단백질, 3.1 내지 3.3% KDO-유사 물질 및 0.1 내지 0.5% 폴리페놀을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [25] 상기 구체예 중 어느 하나의 구체예로서, 상기 정제 분획은 72.7 내지 75.5% 중성당, 18.8 내지 20.8% 산성당, 1.7 내지 2.5% 단백질, 3.4 내지 3.6% KDO-유사 물질 및 0.3 내지 0.5% 폴리페놀을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [26] 상기 구체예 중 어느 하나의 구체예로서, 상기 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획은 만노오스(Mannose), 람노오스(Rhamnose), 아라비노오스(Arabinose),

자일로스(Xylose), 갈락토오스(Galactose), 글루코오스(Glucose) 및 갈락투론산(Galacturonic acid)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 한다.

- [27] 상기 구체에 중 어느 하나의 구체에로서, 상기 다당체 효소처리물은 0.7 내지 3.1 몰% 람노오스, 6.3 내지 18.7 몰% 아라비노오스, 4.8 내지 10.6 몰% 갈락토오스, 54 내지 72.8 몰% 글루코오스 및 13.6 내지 15.4 몰% 갈락투론산을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [28] 상기 구체에 중 어느 하나의 구체에로서, 상기 정제 분획은 5.2 내지 7.8 몰% 람노오스, 34.8 내지 35.2 몰% 아라비노오스, 18.6 내지 19.6 몰% 갈락토오스, 22 내지 23.8 몰% 글루코오스 및 16.5 내지 16.7 몰% 갈락투론산을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [29] 상기 구체에 중 어느 하나의 구체에로서, 상기 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획은 대식세포 활성화, 비장세포 활성화, 또는 자연살해세포를 활성화시키는 것을 특징으로 한다.
- [30] 상기 구체에 중 어느 하나의 구체에로서, 상기 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획은 면역 관련 사이토카인이 증가되는 것을 특징으로 한다.
- [31] 상기 구체에 중 어느 하나의 구체에로서, 상기 사이토카인은 IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10, TNF- α , IL-12 및 IL-6으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.
- [32] 상기 구체에 중 어느 하나의 구체에로서, 상기 조성물은 당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물을 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [33] 상기 구체에 중 어느 하나의 구체에로서, 상기 혼합 추출물과 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획은 60~70:30~40의 중량비로 혼합되는 것을 특징으로 한다.
- [34] 상기 구체에 중 어느 하나의 구체에로서, 상기 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획은 조성물 총 중량을 기준으로 0.001 내지 99 중량%로 포함되는 것을 특징으로 한다.
- [35] 상기 구체에 중 어느 하나의 구체에로서, 상기 조성물은 식품 조성물인 것을 특징으로 한다.
- [36] 상기 구체에 중 어느 하나의 구체에로서, 상기 식품 조성물은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽제 또는 음료로 제조되는 것을 특징으로 한다.
- [37] 본 발명을 구현하는 본 발명의 다른 양태는 당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물의 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획을 포함하는 면역 증진 또는 항암 면역 조절용 조성물을 포함하는 건강 보조제이다.
- [38] 본 발명을 구현하는 본 발명의 또 다른 양태는 당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물의 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획을 세포에 처리하는 단계를 포함하는, 시험관 내(*in vitro*), 생체 외(*ex vivo*), 또는 둘 다에서 세포를 활성화하는 방법이다.

[39] 하나의 구체예로서, 상기 세포는 대식세포, 비장세포, NK 세포 또는 이의 조합인 것을 특징으로 한다.

[40]

[41] 본 발명을 구현하는 본 발명의 또 다른 양태는 당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물의 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획을 유효성분으로 포함하는 조성물의, 면역 증진 또는 항암 면역 조절 용도이다.

[42] 본 발명을 구현하는 본 발명의 또 다른 양태는 당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물의 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획을 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 면역 증진 또는 항암 면역 조절 방법이다.

[43]

발명의 효과

[44] 본 발명에 따른 당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물의 다당체 효소처리물 또는 이의 신규 정제 분획을 유효성분으로 포함하는 면역 증진용 조성물은 특정 종류와 함량의 당으로 구성되어 대식세포, 비장세포 및 NK 세포에 처리 시 이들의 활성을 현저히 증가시켜, 면역 증강제 또는 면역 증진용 식품 조성물로 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[45] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 에탄올 다당체 및 이의 효소처리물의 크기 배제 크로마티그래피에 따른 순도를 확인한 결과이다.

[46] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 정제 분획의 오픈 컬럼을 이용한 정제도를 확인한 결과이다.

[47] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획의 대식세포 활성화 효과를 확인한 결과이다.

[48] 도 4는 발명의 일 실시예에 따른 4종 다당체 효소처리물의 대식세포 활성화 효과를 확인한 결과이다.

[49] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획의 비장세포 활성화 효과를 확인한 결과이다.

[50] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 정제 분획 HHE-I의 자연살해세포의 종양세포 살해 효과를 확인한 결과이다. 여기에서 E/T ratio는 비장에서 분리한 NK-세포 (effector cell, E)와 NK cell 감수성으로 알려진 종양세포 Yac-1(target cell, T)의 비율이다.

발명의 실시를 위한 형태

[51] 본원에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다.

- [52] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 출원에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.
- [53] 아울러, 본원의 명세서 전체에 있어서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [54] 이하, 본 발명을 보다 자세히 설명한다.
- [55] 본 발명은 특정 종류와 함량의 당으로 구성된 당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물 유래 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획을 대식세포, 비장세포 및 NK 세포에 처리 시 이들의 활성이 현저하게 증가함을 새롭게 확인하고, 이를 면역 증강제나 항암 면역 조절제로 활용할 수 있음을 발견한 것에 기초한다.
- [56] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 양태는, 당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물의 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획을 유효성분으로 포함하는 면역 증진 또는 항암 면역 조절용 조성물을 제공한다.
- [57] 본 발명에서, 용어 “당귀”는 미나리과에 속하는 다년생 방향성 풀로, 동아시아 지역에서 오래전부터 약용으로 사용되어 왔으며, 특히 당귀의 뿌리 부분이 일반적으로 이용된다. 따라서, 상기 당귀를 건조시킨 뿌리 또한 “당귀”로 혼용되어 지칭되기도 한다.
- [58] 구체적으로 본 발명에서 당귀는 한국에서의 산형과 참당귀(*Angelica gigas* Nakai)로, 이는 중국당귀(*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels)나 일본에서의 산형과 왜당귀(*Angelica acutiloba* (Siebold. & Zucc.) Kitag.) 또는 홋카이도당귀(*Angelica acutiloba* (Siebold. & Zucc.) Kitag. var. *sugiyamae* Hikino) 뿌리와는 구별된다. 참당귀의 뿌리로 만든 당귀는 보혈작용보다는 피를 원활히 순환하게 해주는 활혈작용이 뛰어나며, 항암효과 및 혈압강화 작용이 강하다. 하지만 참당귀와 달리 중국당귀는 기운이 따뜻하고 맛은 달면서도 매우며 일반적으로 참당귀에 비해 단맛이 강하고 매운맛이 약하다. 중국당귀의 효능은 피가 부족할 때 피를 생성해 주는 보혈 작용이며, 중국당귀의 뿌리로 만든 당귀는 보혈작용이 뛰어나나, 참당귀보다 그 작용이 낮다. 약리학적으로 당귀는 관상동맥의 혈류량을 촉진시키고, 적혈구 생성을 왕성하게 하는 것으로 알려져 있다.
- [59] 본 발명에서, 용어 “천궁”은 쌍떡잎식물 이판화군 산형화목 미나리과의 여러해살이풀로, 한국, 일본 등지에 분포한다. 천궁은 진정, 진통, 강장 등에 효능이 있어 두통, 빈혈증, 부인병 등을 치료하는데 쓴다. 9~11월에 근경을 캐어 잎과 줄기를 제거하고 햇볕에 말린후 달여서 복용하거나, 환제나 산제로 하여 사용한다. 구체적으로, 본 발명에서 천궁은 *Cnidium officinale*의 학명을 가지는 천궁일 수 있고, 이는 중국천궁(*Ligusticum chuanxiong* Hort.)과는 구별된다.
- [60] 본 발명에서, 용어 “작약(*Paeonia lactiflora* Pallas)”은 산지에서 자라는 쌍떡잎식물 작약과 작약속의 여러해살이풀로, 꽃이 아름다워 원예용으로 쓴다. 또한, 뿌리는 진통·복통·월경통·무월경·토혈·빈혈·타박상 등의 약재로 쓰인다. 중국에서

는 진과 명시대에 이미 관상용으로 재배되어 그 재배 역사는 모란보다 오래되었다. 송을 거쳐 청시대에는 수십 종류의 품종이 기록되어 있으며, 한국·몽골·동시베리아 등지에 분포한다.

- [61] 본 명세서에서, 상기 작약은 작약(*Paeonia lactiflora*), 백작약(*Paeonia Japonica Miyabe & Takeda*), 적작약(*Paeonia lactiflora* Pall.), 호작약(*Paeonia lactiflora* Pall. var. *hirta* Regel), 및 참작약 (*Paeonia lactiflora* Pall. var. *trichocarpa* (Bunge) Stern)으로부터 선택된 하나 이상을 포함할 수 있으며, 가공법과 관련 없이 제한 없이 이용될 수 있다.
- [62] 상기 당귀, 천궁 및 작약은 상업적으로 판매되는 것을 구입하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 것을 제한 없이 사용할 수 있다.
- [63] 본 발명에서, 용어 "추출물"은 상기 당귀, 천궁 및 작약을 함유하는 혼합 추출물로서, 상기 당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물은 천연, 잡종, 변종식물의 다양한 기관으로부터 추출될 수 있고, 구체적으로는 뿌리, 지상부, 줄기, 잎, 꽃, 열매의 몸통, 열매의 껍질뿐만 아니라 식물 조직 배양물로부터도 추출 가능하다.
- [64] 상기 "혼합 추출물"은 당귀, 천궁 및 작약을 모두 포함하는 혼합 추출물로, 상기 세 개의 물질을 먼저 혼합한 후 함께 추출한 추출물이거나, 또는 각각의 물질을 개별적으로 추출하여 추출물을 제조한 후 그 추출물을 혼합한 추출물일 수 있으며, 그 외 공지된 방법으로 혼합 추출물을 제조할 수 있는 방법으로 제조된 혼합 추출물이면 제한 없이 포함된다.
- [65] 상기 추출물은 각 성분의 분쇄물을 물, 탄소수 1 내지 6의 직쇄 또는 분지형 알코올, 유기 용매 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군에서 선택된 용매로 추출할 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다. 또한 추출 온도는 20°C 내지 100°C의 범위에서 추출할 수 있으며, 추출기간은 약 1시간 내지 10일 동안 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법을 사용하여 추출한 추출물일 수 있으나, 상기 추출 온도, 추출기간이나 추출방법에 제한되지 않는다.
- [66] 상기 추출물의 용매가 물인 경우, 냉수 추출물 또는 열수 추출물을 포함할 수 있다.
- [67] 상기 유기 용매는 특별히 제한되는 것은 아니며, 글리세롤, 에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜 등의 다가 알코올, 메틸아세테이트, 에틸아세테이트, 벤젠, n-헥산, 디에틸에테르, 디클로로메탄, 클로로포름 등의 탄화수소계 용매, 그리고 석유에테르, 메틸아세테이트, 벤젠, 헥산, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 디메틸에테르, 에틸아세테이트 등의 비극성 유기용매 일 수 있다.
- [68] 상기 용매는 유기용매의 수용액도 포함될 수 있으며, 이의 농도는 특별히 제한되지 않으나 1~99%(v/v)일 수 있고, 구체적으로는 1~90%(v/v), 더 구체적으로는 60~98%(v/v), 더욱 구체적으로는 80~95%(v/v), 85~95%(v/v), 더욱 더 구체적으로는 90~95%(v/v)일 수 있다.
- [69] 상기 추출물은 추출액, 추출액의 회석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 또는 이들 조정제물 또는 정제물을 모두 포함할 수 있다.

- [70] 상기 추출물은 당귀, 천궁 및 작약을 1~100:1~100:1~100의 중량비로 포함될 수 있다. 상기 당귀, 작약 및 천궁은, 구체적으로는 1~30: 1~30: 1~30의 중량비, 더욱 구체적으로는 1~10:1~10:1~10의 중량비, 더욱 구체적으로는 1~5:1~5:1~5의 중량비, 더욱 구체적으로는 0.8~1.2: 0.8~1.2: 0.8~1.2의 중량비로 포함될 수 있다. 일 구체예로서, 상기 혼합 추출물은 참당귀, 천궁 및 작약을 1:1:1의 중량비로 포함하는 혼합 추출물일 수 있다.
- [71] 본 발명의 추출물에는 면역을 증진 또는 강화시키는 공지된 천연물의 추출물 또는 공지된 성분을 선택적으로 추가할 수 있다.
- [72] 본 발명에서, 용어 "다당체"는 상기 당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물에 용매를 가하여 침전시킨 것으로서 여기에서 다당체는 폴리사카라이드(polysaccharide)라고도 불리며, 하나 이상의 다당체를 포함할 수 있다.
- [73] 본 발명에서 상기 다당체는 추출물에 용매를 처리하여 침전시켜 수득한 다당체 그 자체로 정제하지 않고 수득한 것을 말하며, 조다당체 또는 GHHW-P와 혼용되어 사용될 수 있다.
- [74] 본 발명에서 상기 다당체를 얻는 방법은 특별히 제한되지 않으며, 당해기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 수행될 수 있다. 상기 방법의 비제한적인 예로는, 본 발명의 당귀, 천궁 및 작약 추출물에 소정의 용매를 처리하여 상기 추출물로부터 수득한 다당체일 수 있으며, 구체적으로는 본 발명의 당귀, 천궁 및 작약 추출물에 유기용매를 첨가하여 생성된 다당체일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.
- [75] 본 발명에서 상기 다당체를 얻는 데 사용되는 용매의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 용매의 비제한적인 예로는, 물, 탄소수 1 내지 6개의 직쇄 또는 분지형 알코올, 유기용매 또는 이들의 혼합용매일 수 있으며, 이들은 단독으로 사용되거나 1종 이상 혼합하여 사용될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 유기용매는 디클로로메탄, 디에틸에테르, 클로로포름 및 에틸 아세테이트로 이루어진 군에서 선택된 1 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [76] 구체적으로는 상기 다당체는 에탄올 다당체일 수 있으며, 보다 구체적으로는 90~95% 에탄올 다당체일 수 있다.
- [77] 본 발명에서 용어, 상기 "다당체 효소처리물"은 추출물에 용매를 처리하여 침전시켜 수득한 다당체에 효소를 처리하여 수득한 것을 의미하는 것으로서, 여기에서 효소는 펙티나아제를 포함할 수 있다.
- [78] 일 예로, 본 발명의 다당체 효소처리물은 당귀, 천궁 및 작약 혼합 열수 추출물에 에탄올을 처리하여 침전시킨 다당체에 펙티나아제를 처리한 효소처리물을 포함하는 것으로서, 동일한 다당체라 하더라도 펙티나아제를 제외한 나머지 효소, 예컨대 셀룰라아제, 프로테아제, 또는 아밀라아제 등을 처리한 효소처리물은 면역 증진 활성이 미미하여 다른 효소처리물은 포함하지 않는 것이 특징일 수 있다.

- [79] 상기 다당체 효소처리물은 에탄올 다당체에 효소를 처리하여 비활성 분획인 H G region을 제거함으로써 면역 증진 활성을 증가시킨 것에 특징이 있다.
- [80] 상기 용어, “정제 분획”은 추출물에 용매를 처리하여 침전시켜 수득한 다당체에 효소를 처리하여 수득한 다당체 효소처리물을 정제를 통해 수득한 분획을 의미하는 것으로서, 포함하는 구성당의 분자량에 따라 정제된 분획을 의미하고, 상기 정제 분획은 다당체 분획, 효소처리물 분획, 다당체 효소처리물 분획, 정제된 다당체 분획, 정제 다당체 분획 등과 혼용되어 사용될 수 있으며, 구체적으로는 HHE-I, HHE-II, HHE-III를 포함할 수 있고, 보다 구체적으로는 HHE-I을 포함할 수 있다.
- [81] 상기 정제 분획 HHE-I, HHE-II, HHE-III은 추출물에 용매를 처리하여 침전시켜 수득한 다당체에 효소를 처리하여 수득한 효소처리물을 정제를 통해 수득한 분획으로, 분자량에 따라 분획할 수 있다.
- [82] 구체적으로, 상기 정제 분획 HHE-I은 HHE-II와 HHE-III 대비 분자량이 높은 분획이며, 상기 HHE-II는 HHE-I 대비 분자량이 낮고 HHE-III 대비 분자량이 높은 분획이다. 상기 HHE-III은 가장 분자량이 낮은 분획으로 작은 형태의 글루칸, 저분화된 HG, 단백질, 폴리페놀 등으로 구성되어 있는 것이 특징이다.
- [83] 상기 다당체 효소처리물과 정제 분획 HHE-I, HHE-II, HHE-III은 동일한 다당체에서 수득한 것이나, 이를 구성하는 당의 종류나 함량이 상이할 수 있다. 상기 본 발명의 다당체 효소처리물은 중성당, 산성당, 단백질, KDO-유사 물질 및 폴리페놀을 포함할 수 있으며, 구체적으로는 HHE-0일 수 있고, 보다 71.2 내지 75.4% 중성당, 17.2 내지 17.6% 산성당, 5.1 내지 6.1% 단백질, 3.1 내지 3.3% KDO-유사 물질 및 0.1 내지 0.5% 폴리페놀을 포함할 수 있다.
- [84] 상기 본 발명의 정제 분획은 중성당, 산성당, 단백질, KDO-유사 물질 및 폴리페놀을 포함할 수 있으며, 구체적으로는 HHE-I일 수 있고, 보다 구체적으로는 70 내지 77% 중성당, 18 내지 22% 산성당, 1.5 내지 3% 단백질, 3 내지 3.8% KDO-유사 물질 및 0.3 내지 0.6% 폴리페놀을 포함할 수 있다.
- [85] 일 예로, 상기 정제 분획 HHE-I은 72.7 내지 75.5% 중성당, 18.8 내지 20.8% 산성당, 1.7 내지 2.5% 단백질, 3.4 내지 3.6% KDO-유사 물질 및 0.3 내지 0.5% 폴리페놀을 포함할 수 있다.
- [86] 상기 용어 중성당(neutral sugar)은 중성의 성질을 가지는 당을 의미하며, 70 내지 77%, 구체적으로는 70 내지 76%, 72 내지 76%, 72.7 내지 75.5%, 73 내지 75%, 또는 73.5 내지 75%로 포함될 수 있고, 보다 구체적으로는 74 내지 74.5%, 보다 더 구체적으로는 74.1%로 포함될 수 있다.
- [87] 상기 용어 산성당(uronic acid)은 당산(Sugar acid)이라고도 하며 카복실기로 한 쪽 또는 두 쪽 끝이 치환된 단당류를 말한다. 본 발명에서 상기 산성당은 17 내지 22%로 포함될 수 있고, 구체적으로는 18 내지 20%, 18.8 내지 20.8%, 또는 19 내지 20%로 포함될 수 있고, 보다 구체적으로는 19.5 내지 20%, 보다 더 구체적으로는 19.8%로 포함될 수 있다.

- [88] 상기 단백질의 함량은 1.5 내지 3%로 포함될 수 있고, 구체적으로는 1.5 내지 7% 또는 1.5 내지 6.8%일 수 있으며, 구체적으로는 1.7 내지 2.5%, 또는 2 내지 2.5%로 포함될 수 있고, 보다 구체적으로는 2.1%로 포함될 수 있다.
- [89] 상기 용어 KDO(ketodeoxy-octonate)-유사 물질(KDO-like material)은 ketodeoxy-octonate에 해당하는 모든 물질을 의미하며, 일 예로 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid를 포함할 수 있다. 여기에서 KDO는 8탄당으로, G(-)균의 LPS(Lipopolysaccharide)를 구성하는 구성성분 중 하나이다. KDO를 측정하여 어느 정도로 면역 활성을 낼 수 있는지를 확인할 수 있다. 구체적으로, KDO의 함량은 3 내지 4% 나 3 내지 3.8%로 포함될 수 있고, 구체적으로는 3 내지 3.7%, 3 내지 3.6%, 또는 3.4 내지 3.6%로 포함될 수 있고, 보다 구체적으로는 3.5%로 포함할 수 있다.
- [90] 상기 용어 폴리페놀은 식물에서 발견되는 방향족 알코올 화합물의 일종으로서 분자 하나에 페놀 그룹이 두 개 이상 있는 작용기로 여러 개의 수산기를 갖고 있는 것이 특징이다. 상기 폴리페놀은 본 발명의 조성물에 0.1 내지 1% 또는 0.3 내지 0.6%로 포함될 수 있고, 구체적으로는 0.3 내지 0.5%, 또는 0.35 내지 0.45%로 포함될 수 있고, 보다 구체적으로는 0.4%로 포함할 수 있다.
- [91] 상기 정제 분획에 포함된 중성당, 산성당, 단백질, KDO-유사 물질 및 폴리페놀은 Phenol-H₂SO₄ 분석법, Uronic acid 분석법, KDO 분석법, Bradford 분석법, 폴리페놀 분석법 등으로 분석할 수 있으며, 공지된 방법이라면 제한 없이 해당 방법을 이용하여 분석할 수 있다.
- [92] 상기 본 발명의 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획은 만노오스(Mannose), 람노오스(Rhamnose), 아라비노오스(Arabinose), 자일로스(Xylose), 갈락토오스(Galactose), 글루코오스(Glucose) 및 갈락투론산(Galacturonic acid)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [93] 상기 다당체 효소처리물은 0.7 내지 3.1 몰% 람노오스, 6.3 내지 18.7 몰% 아라비노오스, 4.8 내지 10.6 몰% 갈락토오스, 54 내지 72.8 몰% 글루코오스 및 13.6 내지 15.4 몰% 갈락투론산을 포함할 수 있다.
- [94] 상기 정제 분획은 5 내지 8 몰% 람노오스, 25 내지 40 몰% 아라비노오스, 15 내지 25 몰% 갈락토오스, 20 내지 25 몰% 글루코오스 및 15 내지 20 몰% 갈락투론산을 포함할 수 있다.
- [95] 일 예로, 상기 정제 분획은 5.2 내지 7.8 몰% 람노오스, 34.8 내지 35.2 몰% 아라비노오스, 18.6 내지 19.6 몰% 갈락토오스, 22.0 내지 23.8 몰% 글루코오스 및 16.5 내지 16.7 몰% 갈락투론산을 포함할 수 있다.
- [96] 상기 다당체 효소처리물이나 정제 분획에 포함된 구성당은 일 예로 PMP component sugar method 방법으로 분석할 수 있고, 공지된 방법이라면 제한 없이 해당 방법으로 분석할 수 있다.
- [97] 상기 본 발명의 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획은 대식세포 활성화, 비장세포 활성화, 또는 자연살해세포를 활성화시키는 것이 특징일 수 있다.

- [98] 상기 용어, 대식세포(Macrophage)는 세균이나 이물질을 탐식, 제거하는 과정에서 여러 가지 사이토카인을 분비하여 면역현상을 조절하며, 항원에 대한 면역작용의 중추적인 역할을 하는 세포로서, 항원제시와 림프구의 비특이적 면역작용에 관계하며, 종양세포에 대해서는 직접적인 상해활성을 나타낸다. 또한 2차 면역반응을 조절할 수 있는 IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 및 TNF- α 와 같은 사이토카인을 생산한다고 알려져 있다. 그 중, IL-12는 NK cell의 활성화 및 Th1 type의 면역 반응을 유도하는 사이토카인으로써 세포성 외래물질에 대한 반응성을 높이는 작용을 한다고 알려져 있다.
- [99] 상기 용어, NK 세포(natural killer cell)는 숙주에 감염된 세포나 종양 세포를 직접적으로 공격하는 선천성 면역 반응에 중요한 역할을 하는 세포로, IFN이나 대식세포에서 유래된 사이토카인에 의하여 활성화되며, 활성화된 NK 세포는 IFN- γ , TNF- α 등의 사이토카인을 분비하여 종양 세포의 세포 사멸을 촉진하거나 다른 면역세포의 활성화에 기여한다. 특히, NK 세포 활성화의 조절은 암 또는 면역질환과 같은 다양한 질병들과 관련이 있음이 알려져 있다.
- [100] 상기 본 발명의 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획은 면역 관련 사이토카인의 분비를 증진시킬 수 있으며, 구체적으로는 IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10, TNF- α , IL-12 및 IL-6으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 분비능을 증진시킬 수 있고, 보다 구체적으로는 다당체 대비 사이토카인 IL-10의 분비능이나, IFN- γ 의 분비능이 증가된 것일 수 있다.
- [101] 본 발명의 일 실시예에서는, 0.7 내지 3.1 몰% 람노오스, 6.3 내지 18.7 몰% 아라비노오스, 4.8 내지 10.6 몰% 갈락토오스, 54 내지 72.8 몰% 글루코오스 및 13.6 내지 15.4 몰% 갈락투론산을 포함하는 다당체 효소처리물이 구성당 종류나 함량을 다르게 포함하는 다당체 대비 우수한 면역 증진 활성을 가지는 것을 확인하였다.
- [102] 특히, 5.2 내지 7.8 몰% 람노오스, 34.8 내지 35.2 몰% 아라비노오스, 18.6 내지 19.6 몰% 갈락토오스, 22.0 내지 23.8 몰% 글루코오스 및 16.5 내지 16.7 몰% 갈락투론산을 포함하는 정제 분획 HHE-I이 상기의 구성당 종류나 함량을 다르게 포함하는 다당체, 다당체 효소처리물, 그리고 정제 분획 HHE-II 및 HHE-III 대비 현저히 우수한 IL-10과 IFN- γ 분비능을 가져 매우 우수한 면역 증진 활성과 항암 면역 조절능을 가지는 것을 확인하였다.
- [103] 상기 본 발명의 조성물은 당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물 유래 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획에 당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물을 추가로 포함할 수 있다.
- [104] 본 발명에서, 용어 "혼합"은 본 발명에서 제조된 당귀, 천궁 및 작약 추출물과 상기 추출물에 각각 소정의 용매를 처리하여 수득하고 여기에 효소를 처리하거나 거기에 추가로 분자량에 따라 정제한 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획을 혼합하는 것을 의미하며, 그 혼합하는 비는 특별히 제한되지 않는다.

- [105] 상기 조성물은 상기 각 식물의 추출물과 그 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획을 병용함으로써, 한가지 식물의 추출물이나 다당체 만을 포함할 경우, 또는 추출물에 다당체를 포함하는 경우와 비교하여 현저히 우수한 효과를 얻을 수 있다. 또한, 상기 조성물은 상기 당귀, 천궁 및 작약 외의 식물 추출물, 그 다당체 만을 포함하는 경우 또는 추출물에 다당체만을 포함하는 경우와 비교하여, 현저히 우수한 면역 증강 또는 강화 효과를 나타낼 수 있다.
- [106] 상기 혼합물이 추출물과 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획을 혼합할 때, 상기 추출물과 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획은 약 40~80:20~60의 중량비로 포함될 수 있고, 구체적으로는 45~75:25~55로 포함될 수 있으며, 보다 구체적으로는 50~70:30~50의 중량비, 보다 더 구체적으로는 60~70:30~40 중량비로 포함될 수 있으며, 보다 더 구체적으로는 65:35의 중량비로 포함될 수 있으나 이에 제한된 것은 아니다.
- [107] 상기 당귀, 천궁 및 작약의 추출물 유래 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획이나 이를 포함하는 조성물은, 전체 조성물 총 중량을 기준으로, 0.0001~99 중량%로 포함될 수 있으며, 구체적으로는 전체 조성물 총 중량을 기준으로 30~80 중량%, 더욱 구체적으로는 35~70 중량%, 더욱 구체적으로는 40~65 중량%로 포함될 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.
- [108] 본 발명에서 용어, “개선”은 본 발명의 당귀, 천궁 및 작약의 추출물 유래 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획을 조성물에 적용하여, 면역 증진, 면역 증강, 또는 면역 강화시키는 것을 의미한다.
- [109] 본 발명에서 용어, “항암 면역 조절”은 종양세포에 대한 NK 세포 활성화를 통한 항암 면역 조절을 의미한다.
- [110] 상기 용어 암은 정상적인 세포 사멸 균형이 깨지는 경우 세포가 과다 증식하게 됨으로써 생기는 질병을 일컫는다. 이러한 비정상적 과다 증식 세포들은, 경우에 따라 주위 조직 및 장기에 침입하여 종괴를 형성하고, 체내의 정상적인 구조를 파괴하거나 변형시키게 되는데, 이러한 상태를 암이라고 한다.
- [111] 상기 암의 종류는 뇌척수종양, 뇌종양, 두경부암, 폐암, 유방암, 흉선종, 중프종, 식도암, 대장암, 간암, 위암, 췌장암, 담도암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 생식세포종, 난소암, 자궁 경부암, 자궁 내막암, 대장암, 림프종, 급성 백혈병, 만성 백혈병, 다발성 골수종, 육종, 악성 흑색종 및 피부암을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [112] NK 세포는 표면에 존재하는 다양한 면역 수용체를 통해 암세포와 정상세포를 구분할 수 있으므로, 암세포에 대하여 선택적인 세포 독성을 보인다. 많은 연구를 통해 NK 세포가 암세포를 제거하는데 핵심적인 역할을 함이 규명되었으며, 암환자의 경우 NK세포의 수나 활성화에 결함이 있음이 보고되었다 (Hanyang Med Rev 2013: 59-64). 따라서, NK 세포의 활성화 증가는 암세포의 제거를 통하여 암의 예방, 개선 또는 치료로 이어질 수 있다.

- [113] 본 발명에서 구체적인 일 구현예에서는, 본 발명의 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획이 종양세포에 대하여 NK 세포 활성화 효과를 가짐을 확인한 바, 상기 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획을 유효성분으로 포함하는 조성물은 항암 면역 조절을 위한 용도로서 유용하게 사용될 수 있음을 시사한다.
- [114] 상기 조성물은 당귀, 천궁 및 작약의 추출물 유래 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획을 면역 증진, 면역 개선, 증강, 강화 또는 항암 면역 조절시키기 위한 목적으로 식품 조성물에 첨가될 수 있으며, 상기 식품 조성물은 건강기능식품 조성물일 수 있다.
- [115] 상기 식품 조성물은 식품학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다.
- [116] 본 발명의 식품 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강 식품(health food) 및 식품 첨가제(food additives)등의 모든 형태를 포함하여, 상기 유형의 식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다.
- [117] 당귀, 천궁 및 작약의 추출물의 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획을 식품 첨가물로 사용할 경우, 당귀, 천궁 및 작약의 추출물의 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 당귀, 천궁 및 작약의 추출물의 다당체는 원료 조성물 중 0.0001~90 중량%, 바람직하게는 0.001~50 중량%의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하로도 사용될 수 있다.
- [118] 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 건강식품을 모두 포함할 수 있다.
- [119] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 중량부 당 일반적으로 약 0.001~50 중량부, 구체적으로는 약 0.01~30 중량부 사용될 수 있다.
- [120] 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. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01~30 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다. 그밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 과육의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01~30 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이며, 이들 성분들은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

- [121] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 양태는, 당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물의 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획을 유효성분으로 포함하는 면역 증진 또는 항암 면역 조절용 조성물을 포함하는 건강 보조제를 제공한다.
- [122] 상기 용어, “당귀”, “천궁”, “작약”, “혼합 추출물”, “다당체”, “효소처리물”, “정제 분획”, “면역 증진” 및 “항암 면역 조절”은 상기에서 설명한 바와 같다.
- [123] 상기 용어 “건강 보조제”는 건강을 위한 보조 역할을 하는 물질로 공지된 범위를 모두 포함할 수 있다.
- [124] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 양태는, 당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물의 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획을 세포에 처리하는 단계를 포함하는, 시험관 내(*in vitro*), 생체 외(*ex vivo*), 또는 둘 다에서 세포를 활성화하는 방법을 제공한다.
- [125] 상기 용어, “당귀”, “천궁”, “작약”, “혼합 추출물”, “다당체”, “효소처리물”, “정제 분획”, “면역 증진” 및 “항암 면역 조절”은 상기에서 설명한 바와 같다.
- [126] 상기 용어, 세포는 대식세포, 비장세포, NK 세포 또는 이의 조합일 수 있다.
- [127] 본 발명에서 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획의 처리는 당업계에서 통상적인 방법에 따라 수행될 수 있으며, 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획의 처리 농도는 1 내지 100 μ m, 1 내지 90 μ m, 1 내지 80 μ m, 1 내지 70 μ m, 1 내지 60 μ m 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [128] 본 발명의 “시험관 내(*in vitro*)”는 살아있는 생명체 내부가 아니라 시험관과 같이 제어가 가능한 환경에서 수행되는 실험 과정을 말한다. 상기 시험관 내부의 환경에서는 다양한 변인을 용이하게 통제할 수 있어 효율적으로 결과를 확인할 수 있다.
- [129] 본 발명의 “생체 외(*ex vivo*)”는 생물체에서 분리한 세포 또는 조직을 체외 환경에서 실험하는 과정을 말한다. 상기 생체 외 실험을 통해 생체와 유사한 반응을 유지하면서 정밀 조작이 가능하다.
- [130] 본 발명의 구체적인 일 구현예에서 상기 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획은 대식세포, 비장세포, NK 세포에 처리되어 상기 세포와 관련된 다양한 사이토카인의 분비량을 증가시키는 것을 확인한 바, 이는 시험관 내(*in vitro*) 또는 생체 외(*ex vivo*)에서 본 발명의 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획이 대식세포, 비장세포 및 NK 세포를 활성화할 수 있음을 시사한다.
- [131]

- [132] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 양태는, 당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물의 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획을 유효성분으로 포함하는 조성물의, 면역 증진 또는 항암 면역 조절 용도를 제공한다.
- [133]
- [134] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 양태는, 당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물의 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획을 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 면역 증진 또는 항암 면역 조절 방법을 제공한다.
- [135] 상기 혼합 추출물, 다당체 효소처리물 및 정제 분획은 전술한 바와 같다.
- [136] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 대상에게 본 발명의 조성물을 도입하는 것을 말하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.
- [137] 본 발명에 있어서 상기 개체는 인간 또는 비-인간류를 포함할 수 있고, 보다 구체적으로는 인간을 포함한 포유동물, 보다 더 구체적으로는 인간, 개, 쥐(rat), 토끼, 고양이, 말, 또는 소 등을 포함할 수 있으나, 본 발명의 조성물의 투여에 의해 면역 증진 또는 항암 면역 조절이 증강될 수 있는 개체라면 제한 없이 포함될 수 있다.
- [138]
- [139] 이하 본 발명을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 명백할 것이다.
- [140]
- [141] **실시예 1: 당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물, 이의 다당체, 다당체 효소처리물 및 이의 정제 분획 제조**
- [142] **1-1: 참당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물 제조**
- [143] 참당귀(*Angelica gigas*)의 뿌리, 천궁(*Cnidium officinale*)의 근경, 작약(*Paeonia lactiflora*)의 뿌리 각각을 음건하고 세절하여 혼합한 후, 각각의 생약재 총 무게의 10 배의 증류수를 가한 뒤 95 °C에서 4 시간 동안 열탕추출하여 추출물을 수득하였다. 이때, 상기 참당귀, 천궁 및 작약은 1:1:1 중량비로 혼합된 것이며, 상기 열탕 추출한 것을 감압 농축 및 여과함으로써, 참당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물을 얻었다.
- [144] **1-2: 혼합 추출물의 에탄올 다당체 제조**
- [145] 상기 실시예 1-1에서 제조한 혼합 추출물의 에탄올 다당체(HHW-P)를 제조하였다. 상기 에탄올 다당체 HHW-P는 에탄올로 침전시켜 수득한 다당체 그 자체로 정제하지 않고 바로 수득한 조다당체이다.

- [146] 구체적으로, 상기 실시예 1-1에서 제조된 혼합 열수 추출물을 취하여, 거기에 95 % 에탄올을 첨가하고 25 °C 이하에서 16 시간 동안 정치한 후, 원심분리하여 침전된 에탄올 다당체를 수득하였다.
- [147] **1-3: 에탄올 다당체에서 다당체 효소처리물과 이의 정제 분획 3중 정제**
- [148] **1-3-1: 에탄올 다당체의 순도 확인**
- [149] 상기 실시예 1-2에서 수득한 에탄올 다당체(HHW-P)의 순도를 확인하여 에탄올 다당체 내에 혼합된 물질이 있는지 확인하였다.
- [150] 구체적으로, 텍스트란(dextran) 소재 다공성 레진이 프리-패킹(pre-packing)된 Superdex 75 GL 컬럼이 장착된 리프랙티브 인덱스 디텍터-HPLC(refractive index detector-HPLC)를 이용하여 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)를 수행하였다.
- [151] 그 결과, 도 1a에서 확인할 수 있듯이, 상대적으로 고분자량에 해당하는 14분대에 피크가 가장 먼저 검출되었으며, 그 다음으로 상대적으로 저분자량에 해당하는 30분 이후의 피크가 검출되는 것을 확인하였다.
- [152] 이러한 결과는 참당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물의 에탄올 다당체 HHW-P는 다양한 물질이 혼재된 크루드(crude)한 상태임을 나타내는 것으로서, 상기 혼합 추출물의 에탄올 다당체에서 실제로 활성을 가지는 활성 본체(active moiety)를 확인할 필요가 있다. 이를 위해 상기에서 수득한 에탄올 다당체에 효소를 처리한 효소처리물과 이를 정제한 정제 분획을 각각 수득하였다.
- [153] **1-3-2: 다당체의 효소처리물 수득**
- [154] 상기 실시예 1-3-1에서 수득한 혼합 추출물의 에탄올 다당체 HHW-P를 NaOH를 사용하여 탈에스터화 후, HCl을 이용하여 펙티나아제(Pectinase)인 폴리갈락트로나제(polygalacturonase)의 최적 반응 pH인 6으로 조정하였다. 그 후, 폴리갈락트로나제를 처리하여 50°C에서 72시간 동안 반응 후 가열을 통해 효소 반응을 종결하고, 원심분리하여 침전된 효소와 반응액을 분리하였다. 그런 다음 3일 동안 dialysis tubing bag (MW-cut off: 14,000 Da)을 이용하여 투석함으로써 효소 반응을 통해 생성된 저분자 단편을 제거하고, 이어서 농축 및 동결건조를 통하여 다당체 효소처리물 HHE-0을 수득하였다. 이어서 효소의 종류만 셀룰라아제(cellulase), 알파-아밀라아제(α -Amylase), 프로테아제(Protease)로 각각 바꾸어 동일한 방법으로 다당체 효소처리물 HHE-C(HHW-P + cellulase), HHE- α (HHW-P + α -Amylase), HHE-pro(HHW-P + Protease)를 각각 수득하였다.
- [155] 효소처리가 정상적으로 작동하였는지 확인하고자 다당체 효소처리물의 elution pattern을 HPLC를 이용한 size exclusion chromatography 상에서 확인하였다. 그 결과, 도 1b에서 확인할 수 있는 바와 같이, HHE-0이 효소처리 전에 비해 저분자획분이 상대적으로 증가한 것이 확인되었다. 이러한 결과는 다당체에 효소를 처리한 것이 정상적으로 작동된 것을 나타낸다.
- [156] **1-3-3: 정제 분획 3중 수득**

- [157] 상기 실시예 1-3-2에서 수득한 다당체 효소처리물 HHE-0을 이용하여 정제 과정을 통해 정제 분획을 수득하고자 하였다. 구체적으로, swelling된 Sephadex G-75 resin을 open column (diameter: 2.5 cm, length: 90 cm)에 packing 하고 50 mM ammonium formate buffer (pH 5.5)를 이용하여 레진을 평형화한 후, 앞서 수득한 에탄올 조당체 효소처리물을 HHE-0을 로딩하여 100개의 분획으로 분리하고, 이들의 중성당, 산성당, 단백질, KDO와 같은 화학적 특성을 분석하여 분자량이 상이한 3종의 정제된 정제 분획으로 분리하였다.
- [158] 상기 3종의 정제 분획을 HHE-I, HHE-II 및 HHE-III라 각각 명명하였으며, 이를 도 2에 나타내었다.
- [159] 그 결과, 도 2에서 확인할 수 있듯이, GPC의 경우 고분자량의 물질일수록 앞에, 저분자량 물질일수록 뒤에 나타나는 것을 감안하면, 3개 정제 분획의 peak pattern을 보면 고분자 분획인 HHE-I 부터 저분자 분획 HHE-III으로 갈수록 Main peak가 뒷쪽 저분자쪽으로 가고 있음을 확인할 수 있으며, 이를 통해 HHE-1, HHE-2, HHE-3이 분자량 별로 잘 분획되었음을 확인할 수 있다. 또한, HHE-I의 경우 main peak가 좌우 대칭인 sharp한 single peak를 보이고 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 정제 분획 3종 중에서 HHE-I이 HHE-II와 HHE-III 대비 가장 우수한 정제도를 가지며 고분자량의 피크를 나타내는 결과이다.
- [160] 이후, 정제 분획 3종의 다양한 특성과 면역증진 활성을 확인하기 위한 양의 수득을 위하여, 상기 과정을 10회 이상 반복 수행하였다.
- [161] 실시예 2: 5종의 다당체, 다당체 효소처리물 및 정제 분획의 화학적 및 구성당 조성 분석
- [162] 상기 실시예 1에서 분리 또는 정제한 다당체, 다당체 효소처리물 및 이의 정제 분획까지 총 5종(HHW-P, HHE-0, HHE-I, HHE-II, HHE-III)에 대하여 화학적 조성 및 구성당 조성을 각각 확인하여 표 1과 표 2에 나타내었다.
- [163] 2-1. 화학적 조성 분석
- [164] 화학적 조성은 중성당, 산성당, KDO-유사물질, 단백질 및 폴리페놀로 조성을 확인하였으며, 구체적인 화학적 조성 확인 방법은 다음과 같다.
- [165] 구체적으로, 다당의 일반 성분 분석을 위해 갈락토오스를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric method로 중성당 함량을 측정하였으며(Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith FAJN.(1951). A colorimetric method for the determination of sugars. Nature, 168(4265): 167. 참조), 산성당은 갈락투론산을 표준물질로 하여 m-hydroxydiphenyl method로 측정하였다(Blumenkrantz N, Gustav AH. New method for quantitative determination of uronic acids. Analytical Biochemistry 54 (1973): 484-489. 참조).
- [166] 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (Kdo) 함량은 thiobarbituric acid 법으로 분석하였다. 구체적으로 KDO는 매우 약한 결합을 갖고 있기 때문에 0.4N의 묽은 황산을 가하여 가열함으로써 당을 가수분해하고 0.04M HIO₄를 가하여 hydroxyl(-OH)기가 환원되면서 개환시켜, 이로 인해 Malondialdehyde가 형성되도록

하였다. 이후 2% Na_2SO_3 /0.5M HCl를 넣어 탈색시키고 이 상태에서 TBA(2-thiobarbituric acid)를 넣어 malondialdehyde와 결합하여 적색을 나타내는 chromogen을 형성시킨 다음, 그 후 DMSO를 넣어 chromogen의 비색반응을 안정화시켜 주어 KDO 유사물질임을 확인하였다.

[167] 단백질을 Bovine serum albumin (BSA)를 표준물질로 하여 Bradford method로 분석하였다. 구체적으로, Coomassie dye ligand가 단백질의 (+) charge 부분(Arginine, Lysine, Histidine)을 띤 부분에 결합하여 푸른색을 나타내도록 하여 확인하였다.

[168] 마지막으로 phenolic compound 함량은 gallic acid를 표준물질로 하여 Folin-Ciocalteu method로 정량 및 분석하였다. 구체적으로, 스탠다드와 샘플을 각각 제조하고, ep.tube에 standard를 0 / 200/ 400/ 600/ 800/ 1000 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 미리 제조한 후, mL ep.tube를 STD용, Sample용으로 각각 3반복씩 준비하고 IW 790 μL 를 모든 ep.tube에 넣은 다음, 10 μL 의 STD 및 Sample을 넣어주었다. 이후 500 μL 의 Folin-ciocalteu 시약을 모든 ep.tube에 넣어주고 1분간 방치한 후, 150 μL 의 20% sodium carbonate를 넣은 뒤 Vortexing 하자마자 뚜껑을 열고 2시간 암실에서 방치하였다. 그 후 200 μL 씩 취하여 파장 750nm에서 측정하여 폴리페놀을 확인하였다.

[169] 그 결과는 하기 표 1과 같다.

[170]

[171] [표1]

Chemical Properties (%)	HHW-P	HHE-0	HHE-I	HHE-II	HHE-III
Neutral sugar	77.9 $\pm$ 1.9	73.3 $\pm$ 2.1	74.1 $\pm$ 1.4	64.1 $\pm$ 2.3	29.6 $\pm$ 1.0
Uronic acid	14.4 $\pm$ 4.6	17.4 $\pm$ 0.2	19.8 $\pm$ 1.0	16.2 $\pm$ 0.2	17.5 $\pm$ 0.4
Protein	2.3 $\pm$ 0.7	5.6 $\pm$ 0.0	2.1 $\pm$ 0.4	15.0 $\pm$ 0.1	43.1 $\pm$ 2.4
Polyphenol	0.7 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.0	1.8 $\pm$ 0.1
KDO-like material	4.7 $\pm$ 0.1	3.2 $\pm$ 0.1	3.5 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.0	8.1 $\pm$ 1.7

[172]

[173] 그 결과, 상기 표 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 에탄올 다당체 HHW-P는 77.9 $\pm$ 1.9%의 중성당과 14.4 $\pm$ 4.6%의 산성당으로 이루어져 대부분이 당으로 이루어져 있음을 확인할 수 있었다. 이와 비교하기 위하여, 1종의 다당체 효소처리물과 3종의 정제 분획의 화학적 조성을 확인한 결과, 표 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 화학적 조성에서 HHE-0은 중성당이 73.3 $\pm$ 2.1%, 산성당이 17.4 $\pm$ 0.2%, 단백질

이 5.6%, 폴리페놀이 0.4% 및 KDO-유사 물질이 $3.2 \pm 0.1\%$ 로 다당체와 그 분포가 확연히 상이한 것을 확인할 수 있었다

- [174] 또한, 정제 분획에서 HHE-I은 중성당이 $74.1 \pm 1.4\%$, HHE-II는 $64.1 \pm 2.3\%$, HHE-III은 $29.6 \pm 1.0\%$ 로 다당체 대비 감소되었고, 산성당은 HHE-I이 $19.8 \pm 1.0\%$, HHE-II는 $16.2 \pm 0.2\%$, HHE-III은 $17.5 \pm 0.4\%$ 로 정제 분획 모두 다당체 대비 증가되었으며, HHE-II보다는 HHE-I과 HHE-III가 증가된 것을 확인하였다. 특히하게도 단백질과 폴리페놀은 HHE-I의 경우는 다당체와 유사한 정도로 증가되지 않고 오히려 감소된 것으로 확인된 반면, HHE-III은 단백질과 폴리페놀이 다당체 대비 크게 증가하여, HHE-I, HHE-II, HHE-III이 에탄올 다당체를 정제한 정제 분획이라도 다당체와 화학적 조성이 완전히 다름을 확인할 수 있었다.

[175] **2-2 구성당 조성 분석**

- [176] 다음으로, 구성당 조성에 대하여도 PMP (1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolone) 표지를 활용한 HPLC 분석법으로 확인하였으며, 구성당은 람노오스, 프럭토오스, 아라비노오스, 자일로오스, 만노오스, 갈락토오스, 글루코오스, 글루쿠론산 및 갈라투론산으로 확인하였다. 구체적인 확인 방법은 다음과 같다.

- [177] 구체적으로, Sample을 1mg/mL로 용해한 후, 500 μ L를 cap tube에 옮겨 N₂ flushing으로 말리고, 2 M trifluoroacetic acid (TFA) 1mL을 넣은 후, teflon tape으로 감싸 90분간 121°C에서 반응하였다. Sample을 식힌 후, N₂ flushing하여 건조한 후, 200 μ L의 methanol을 첨가하고 N₂ flushing하여 건조하였다. 10개 기준으로 0.3 M NaOH 100 μ L + 0.5 M PMP 120 μ L (in MeOH) PMP(MW 174.2): 130mg/1.5mL로 한 후, 70°C에서 100분 동안 반응하고, 충분히 식혀 100 μ L의 0.3 M HCl로 중화하였다. 이 후 N₂ flushing 후, Water/chloroform을 각각 0.5mL씩 넣은 후 흔들어주었다. 2500 rpm에서 5분간 원심분리 하여, 물층(위)을 회수하고, 2mL ep-tube에 옮긴 후, chloroform을 넣고 원심분리를 3번 반복한 후, 0.45 μ m filter로 여과하였다. 마지막으로 각각의 구성당을 HPLC로 측정하여 하기 표 2에 그 결과를 나타내었다.

[178]

[179] [표2]

Chemical properties(%)	HHW-P	HHE-0	HHE-I	HHE-II	HHE-III
Component sugar(PMP)	(Mole%)				
Mannose	-	-	-	-	3.2±0.4
Rhamnose	2.1±1.4	1.9±1.2	6.5±1.3	2.8±0.4	8.2±0.0
Glucuronic acid	-	-	-	-	-
Galacturonic acid	13.9±2.0	14.5±0.9	16.6±0.1	14.9±0.1	25.8±1.4
Glucose	68.2±4.0	63.4±9.4	22.9±0.9	47.9±0.0	27.2±0.6
Galactose	2.7±3.4	7.7±2.9	19.1±0.5	6.9±0.1	19.7±0.3
Xylose	2.4±0.3	-	-	-	-
Arabinose	13.2±8.0	12.5±6.2	35.0±0.2	27.5±0.3	15.8±0.1
Fucose	-	-	-	-	-

[180]

[181] 그 결과, 상기 표 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 구성당 조성 분석 결과에서는 에탄올 다당체인 HHW-P의 경우, 68.2±4.0%의 글루코오스, 13.9±2.0%의 갈락투론산, 13.2±8.0%의 아라비노오스, 2.1±1.4%의 람노오스를 포함하고, 그 외 갈락토오스를 2.7±3.4%, 자일로오스를 2.4±0.3%로 적게 포함하고 있음을 확인하였다.

[182] 반면, 구성당 조성에서 HHE-0은 람노오스 1.9±1.2 몰%, 글루쿠론산 14.5±0.9 몰%, 글루코오스 63.4±9.4 몰%, 갈락토오스 7.7±2.9 몰% 및 아라비노오스 12.5±6.2몰% 포함함을 확인하여, 다당체 HHW-P와는 조성이 매우 상이함을 확인하였다.

[183] 또한 정제 분획에서는, HHE-I의 경우 아라비노오스 35.0±0.2 몰%, 글루코오스 22.9±0.9 몰%, 갈락토오스 19.1±0.5 몰%, 갈락투론산 16.6±0.1 몰%, 람노오스 6.5±1.3 몰%를 포함하며, 다당체 대비 글루코오스의 함량은 현저히 적고, 람노오스, 갈락투론산, 갈락토오스 및 아라비노오스의 함량은 크게 증가한 것을 확인하여, 마찬가지로 정제 분획도 다당체와 구성당 조성이 완전히 상이함을 확인하였다.

[184] 특히, HHE-II와 HHE-III 정제 분획은 포함하고 있는 구성당의 종류는 HHE-I과 크게 다르지는 않으나, 함량에 있어서는 차이가 있었다. 구체적으로, HHE-II는 HHE-I과 비교하여 람노오스 함량은 다당체 정도로 적고, 갈락투론산과 갈락토오스 아라비노오스 모두 적은 함량으로 포함하였다. 이와 달리 글루코오스는 HHE-I 보다 현저히 많았다. HHE-III의 경우는 HHE-I과 비교하여, 람노오스 함량은 더

많았고, 이는 갈락투론산과 갈락토오스, 글루코오스도 유사하였다. 반면, 아라비노오스의 함량은 HHE-I 대비 50% 정도로 매우 적었다. 이러한 결과를 통해, 동일한 혼합 추출물에서 수득한 다당체 효소처리물에서 정제 과정을 거쳐 수득하였어도, 포함하고 있는 구성당의 종류와 함량이 차이가 있음을 확인하였으며, 그 중에서도 HHE-I 분획이 HHE-II 및 HHE-III 분획 대비 분자량이 높은 구성당을 다수 포함함을 확인하였다.

- [185] 실시예 3: 5종의 다당체, 다당체 효소처리물 및 이의 정제 분획의 면역증진 및 항암 면역 조절효과 확인
- [186] 상기 실시예 1에서 수득한 5종의 에탄올 다당체와 다당체의 효소처리물 및 이의 정제 분획의 면역증진 효과를 확인하기 위하여, 대식세포, 비장세포 및 NK-cel 1 활성화 정도를 확인 및 비교하였다.
- [187] 3-1: 대식세포 활성화 확인
- [188] 상기 5종 다당체, 다당체 효소처리물 또는 정제 분획(HHW-P, HHE-0, HHE-I, HHE-II, HHE-III)의 대식세포 활성화를 사이토카인 IL-6, IL-12 및 TNF- α 분비능으로 확인하였다.
- [189] 구체적으로, BALB/c 마우스에서 복강 유래 대식세포를 회수한 후 다양한 농도로 용해된 상기 5종을 각각 대식세포와 함께 처리하여 24시간 동안 상등액에 분비된 사이토카인을 ELISA 키트로 측정하였다.
- [190] 그 결과, 도 3에서 확인할 수 있듯이, 5종 다당체, 다당체 효소처리물 또는 정제 분획 모두 1~1000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 사이에서 독성학적으로 특별한 유의차는 확인되지 않았다.
- [191] 그 다음으로, 배양 상등액에 분비된 사이토카인을 ELISA 키트로 측정한 결과, 에탄올 다당체 HHW-P는 IL-6, IL-12 및 TNF- α 분비에 있어 어떠한 영향도 미치지 않는 것으로 확인된 반면, 에탄올 다당체에 효소처리한 다당체 효소처리물 HHE-0이나 상기 효소처리물을 정제하여 수득한 3종의 정제 분획 HHE-I, HHE-II 및 HHE-III은 모두 3종의 사이토카인 분비 효과가 낮은 농도인 10 $\mu\text{g/mL}$ 이상부터 나타나 에탄올 다당체가 거의 활성이 없는 것과 달리 매우 낮은 농도에서도 대식세포 활성화가 나타나는 것을 확인하였다.
- [192] 특히, 정제 다당체 분획 중에서도 HHE-I은 HHE-II와 HHE-III 대비 3종의 사이토카인에 모두에 대하여 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도 이상부터는 분비능이 나타났으며, HHE-I나 HHE-III가 일부 농도에서 효과가 없는 것과 달리, 10 내지 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 모두 3종 사이토카인에 대하여 우수한 분비능이 있음을 확인할 수 있었다.
- [193] 이를 통해, 다양한 물질이 혼재되어 있어 크루드한 형태를 나타내는 에탄올 다당체와 달리, 효소처리물이나 이를 정제하여 수득한 정제 분획이 매우 낮은 함량에서도 효과적으로 면역 증진 활성을 나타냄을 확인할 수 있으며, 그 중에서도 정제 분획 HHE-I이 다른 정제 분획 대비 면역 증진 활성에서 보다 우수함을 확인할 수 있다.

- [194] 그 다음으로, 다당체 효소처리물에서 효소의 종류를 달리한 경우의 대식세포 활성화 및 사이토카인 생산능을 확인 및 비교하였다.
- [195] BALB/c 마우스에서 복강 유래 대식세포를 회수한 후 에탄올 다당체 HHW-P, 실시예 1-3-2에서 제조한 4종의 다당체 효소처리물 HHE-0, HHE-C, HHE- α , HHE-pro를 각각 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 대식세포와 함께 처리하여 24시간 동안 상등액에 분비된 사이토카인을 ELISA 키트로 측정하였다.
- [196] 그 결과, 에탄올 다당체와 4종의 다당체 효소처리물에서 독성학적인 유의차는 확인되지 않았다. 아울러 배양 상등액에 분비된 사이토카인을 ELISA 키트로 측정한 결과, HHE-0이 에탄올 다당체 HHW-P 및 다른 효소 처리물들 대비 전 농도 구간에서 현저히 우수한 IL-6 분비 효과가 있음을 확인하였다(도 4).
- [197] **3-2: 비장세포 증식능 및 사이토카인 발현능 확인**
- [198] 다음으로, 상기 5종 다당체, 다당체 효소처리물 또는 정제 분획 (HHW-P, HHE-0, HHE-I, HHE-II, HHE-III)에 대하여 비장세포 활성화를 비장세포 증식능, IL-10 및 IFN- γ 사이토카인 발현 정도로 확인하였다
- [199] 구체적으로, BALB/c 마우스에서 비장세포를 회수한 후 다양한 농도로 용해된 상기 5종을 각각 비장세포와 함께 처리하여 96시간 동안 상등액에 분비된 사이토카인을 ELISA 키트로 측정하였다.
- [200] 그 결과 도 5에서 확인할 수 있듯이, 5종의 다당체, 다당체 효소처리물 또는 정제 분획 모두 10~1000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 사이에서 독성학적으로 특별한 유의차는 확인되지 않았다.
- [201] 사이토카인 측정에 있어서는, 다당체나 정제 분획 HHE-II와 HHE-III과 비교하여, HHE-I이 IL-10과 IFN- γ 에 대해 뚜렷한 분비능을 나타내는 것을 확인하였으며, 조다당체와 HHE-II 및 HHE-III이 모두 50 pg/mL 미만의 분비능을 가지거나 아예 분비능이 없는 것과 달리, HHE-I은 IL-10에서는 약 150 pg/mL 정도의 분비능을 가지고 있어 다당체나 다른 정제 분획 대비 약 100~150% 이상의 IL-10 분비능을 가지고 있었으며, 유사하게 IFN- γ 에서도 300 pg/mL 로 조다당체나 다른 정제 분획 대비 약 150~300% 이상의 IFN- γ 분비능을 가지는 것을 확인할 수 있었다.
- [202] 이러한 결과를 통해 참당귀, 천궁 및 작약 혼합 열수 추출물을 펙티나아제 효소로 처리할 경우, 면역 활성 효능이 증대되는 것을 알 수 있으며, 특히, 참당귀, 천궁 및 작약 혼합 열수 추출물 유래 다당체의 활성 본체는 정제 분획 HHE-I인 것을 확인할 수 있었다.
- [203] 이에, 추가적으로, 면역 활성 효능이 우수하였던 HHE-I에 대하여 자연살해세포 활성화 효과를 확인하였다.
- [204] **3-3: 자연살해세포의 종양세포 살해 효과 확인**
- [205] 앞선 대식세포 및 비장세포 활성화에 관한 결과를 통해 확인된 활성 본체 HHE-I 정제 분획에 대하여, 자연살해세포의 종양세포 살해 효과를 확인하였다.
- [206] 구체적으로, 0.5, 5 및 50 mg/kg 의 시료를 BALB/c 마우스의 미정맥에 투여함으로써 유도하였으며, 세포 회수 3일 전과 1일 전 총 두 번에 걸쳐 HHE-I 정제 분획

을 정맥주사 하였다. 실험 당일 마우스를 희생하여 비장으로부터 세포를 획득한 후에 MHC class I 분자가 결합되어 있는 혈액암 세포주 YAC-1 cell과 함께 배양하여 자연살해세포의 세포 용혈효과를 비교 및 분석하였다.

- [207] 그 결과 도 6에서 확인할 수 있는 바와 같이, 농도 의존적으로 HHE-I 정제 분획의 자연살해세포 활성화 효과를 확인할 수 있었으며, 특히 이러한 효과는 5 및 50 mg/kg을 투여한 실험군에서 PBS만을 투여한 음성대조군 대비 약 2배 이상의 효과를 나타내는 것으로 확인할 수 있었다. 여기에서 E/T ratio는 비장에서 분리한 NK-세포(effector cell, E)와 NK cell 감수성으로 알려진 종양세포 Yac-1(target cell, T)의 비율로서, NK-cell 활성화는 특정 E/T ratio에서 비율이 잘 맞아야 활성이 잘 나타나기도 하고 그렇지 않기도 하므로, 2종의 서로 다른 비율에서 확인하여 그 효과를 확인하였다.
- [208] 이를 통해, 정제 분획 HHE-I은 대식세포와 비장세포의 면역활성을 대변하는 사이토카인 분비를 유도할 뿐만 아니라, 생체 내 투여 시 종양세포에 특이적인 활성을 나타내는 것으로 알려진 자연살해세포의 암세포 상해효과를 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.
- [209]
- [210] 이로써 본 발명의 참당귀, 천궁 및 작약의 혼합 추출물의 에탄올 다당체를 효소 처리한 효소처리물을 정제한 정제 분획에서 특정 종류와 함량으로 된 구성당으로 이루어진 정제 분획 HHE-I이 선천면역을 포함한 면역 증진제로서의 활용이 가능하며, 특히 종양세포에 대한 항암 면역 조절능을 가지는 것을 확인하였다.
- [211] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

- [청구항 1] 당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물의 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획을 유효성분으로 포함하는, 면역 증진용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 면역은 선천면역, 후천면역 또는 이의 조합인 것인, 면역 증진용 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 혼합 추출물은 물, 탄소수 1 내지 6개의 직쇄 또는 분지형 알코올, 유기 용매 및 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 추출한 것인, 면역 증진용 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 혼합 추출물은 당귀, 천궁 및 작약을 1~5:1~5:1~5의 중량비로 포함하는 것인, 면역 증진용 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 혼합 추출물은 참당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물인 것인, 면역 증진용 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 다당체는 에탄올 다당체인 것인, 면역 증진용 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 효소는 펙티나아제를 포함하는 것인, 면역 증진용 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획은 중성당, 산성당, 단백질, KDO-유사 물질 및 폴리페놀을 포함하는 것인, 면역 증진용 조성물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 다당체 효소처리물은 71.2 내지 75.4% 중성당, 17.2 내지 17.6% 산성당, 5.1 내지 6.1% 단백질, 3.1 내지 3.3% KDO-유사 물질 및 0.1 내지 0.5% 폴리페놀을 포함하는 것인, 면역 증진용 조성물.
- [청구항 10] 제8항에 있어서,
상기 정제 분획은 72.7 내지 75.5% 중성당, 18.8 내지 20.8% 산성당, 1.7 내지 2.5% 단백질, 3.4 내지 3.6% KDO-유사 물질 및 0.3 내지 0.5% 폴리페놀을 포함하는 것인, 면역 증진용 조성물.
- [청구항 11] 제1항에 있어서,
상기 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획은 만노오스(Mannose), 람노오스(Rhamnose), 아라비노오스(Arabinose), 자일로스(Xylose), 갈락토오스(Galactose), 글루코오스(Glucose) 및 갈락투론산(Galacturonic acid)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 것인, 면역 증진용 조성물.
- [청구항 12] 제11항에 있어서,

- 상기 다당체 효소처리물은 0.7 내지 3.1 몰% 람노오스, 6.3 내지 18.7 몰%의 아라비노오스, 4.8 내지 10.6 몰% 갈락토오스, 54 내지 72.8 몰% 글루코오스 및 13.6 내지 15.4 몰% 갈락투론산을 포함하는 것인, 면역 증진용 조성물.
- [청구항 13] 제11항에 있어서,
상기 정제 분획은 5.2 내지 7.8 몰% 람노오스, 34.8 내지 35.2 몰%의 아라비노오스, 18.6 내지 19.6 몰% 갈락토오스, 22 내지 23.8 몰% 글루코오스 및 16.5 내지 16.7 몰% 갈락투론산을 포함하는 것인, 면역 증진용 조성물.
- [청구항 14] 제1항에 있어서,
상기 효소처리물 또는 이의 정제 분획은 대식세포 활성화, 비장세포 활성화, 또는 자연살해세포를 활성화시키는 것이 특징인, 면역 증진용 조성물.
- [청구항 15] 제1항에 있어서,
상기 효소처리물 또는 이의 정제 분획은 면역 관련 사이토카인을 증가시키는 것이 특징인, 면역 증진용 조성물.
- [청구항 16] 제15항에 있어서,
상기 사이토카인은 IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10, TNF- α , IL-12 및 IL-6으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것인, 면역 증진용 조성물.
- [청구항 17] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물을 추가로 포함하는 것인, 면역 증진용 조성물.
- [청구항 18] 제17항에 있어서,
상기 혼합 추출물과 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획은 60~70:30~40의 중량비로 혼합되는 것인, 면역 증진용 조성물.
- [청구항 19] 제1항에 있어서,
상기 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획은 조성물 총 중량을 기준으로 0.001 내지 99 중량%로 포함되는 것인, 면역 증진용 조성물.
- [청구항 20] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 식품 조성물인 것인, 면역 증진용 조성물.
- [청구항 21] 제20항에 있어서,
상기 식품 조성물은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽제 또는 음료로 제조되는 것인, 면역 증진 또는 항암 면역 조절용 조성물.
- [청구항 22] 제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 건강 보조제.
- [청구항 23] 당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물의 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획을 세포에 처리하는 단계를 포함하는, 시험관 내(*in vitro*), 생체 외(*ex vivo*), 또는 둘 다에서 세포를 활성화하는 방법.
- [청구항 24] 제23항에 있어서,
상기 세포는 대식세포, 비장세포, NK 세포 또는 이의 조합인 것인, 시험관 내(*in vitro*), 생체 외(*ex vivo*), 또는 둘 다에서 세포를 활성화하는 방법.

- [청구항 25] 당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물의 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획을 유효성분으로 포함하는 조성물의, 면역 증진 용도.
- [청구항 26] 당귀, 천궁 및 작약 혼합 추출물의 다당체 효소처리물 또는 이의 정제 분획을 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 면역 증진 방법.