

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 31/353 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780030479.1

[43] 公开日 2009 年 8 月 12 日

[11] 公开号 CN 101505745A

[22] 申请日 2007.6.13

[21] 申请号 200780030479.1

[30] 优先权

[32] 2006.6.15 [33] US [31] 60/813,948

[86] 国际申请 PCT/US2007/013820 2007.6.13

[87] 国际公布 WO2007/146306 英 2007.12.21

[85] 进入国家阶段日期 2009.2.16

[71] 申请人 玛尔斯有限公司

地址 美国弗吉尼亚州

[72] 发明人 S·弗伦奇 A·P·伊纳姆达

I·A·麦唐纳 S·T·弗兰西斯

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 梁 谋 林 森

权利要求书 3 页 说明书 33 页 附图 4 页

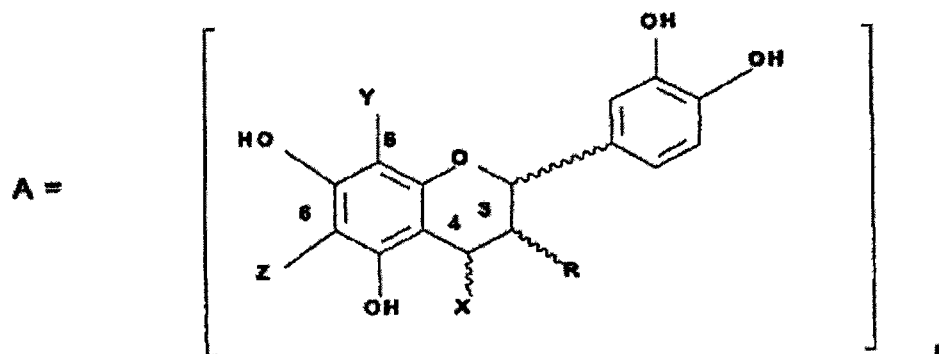
[54] 发明名称

改善认知功能的方法和组合物

[57] 摘要

本发明涉及用于(i)增强执行认知功能(例如决策、计划、工作记忆、多任务处理、判断、数值问题解决、阅读理解)和/或(ii)增加脑血管系统中的血流的组合物,及其使用方法,包括给予其需要受治疗者某些多酚,例如黄烷醇、原花青素,或其药理学上可接受的盐或衍生物。

1. 一种在其需要受治疗者中增强执行认知功能的方法, 包括给予所述受治疗者含有有效量的至少一种化合物的组合物, 所述化合物选自儿茶素、表儿茶酸、具有式 A_n 的化合物、其药学上可接受的盐及其衍生物:



其中

n 为 2-18 的整数;

R 和 X 各自具有 α 或 β 立体化学;

R 为 OH 、 O -糖或 O -没食子酸基;

C -4、 C -6 和 C -8 的取代基分别为 X 、 Z 和 Y , 单体单元的键合发生在 C -4、 C -6 或 C -8;

当任何 C -4、 C -6 或 C -8 不与另一个单体单元键合时, X 、 Y 和 Z 为氢或糖; 和

所述糖任选在任何位置例如经由酯键被酚性部分取代。

2. 权利要求 1 的方法, 其中 R 为 OH 。

3. 权利要求 2 的方法, 其中所述受治疗者为人。

4. 权利要求 2 的方法, 其中所述受治疗者为兽医动物。

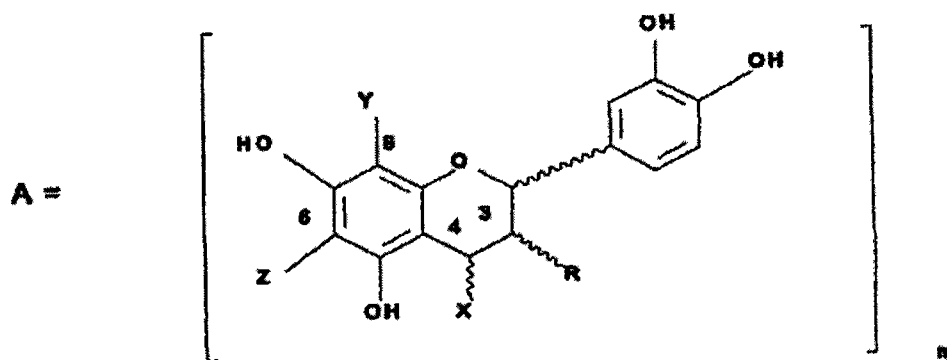
5. 权利要求 3 的方法, 其中所述化合物为儿茶素。

6. 权利要求 3 的方法, 其中所述化合物为表儿茶酸。

7. 权利要求 3 的方法, 其中所述化合物为 A_n 且 n 为 2-12。

8. 权利要求 3 的方法, 其中所述化合物为 A_n 且 n 为 2-10。

9. 权利要求3的方法, 其中n为2。
10. 权利要求3的方法, 其中所述组合物为药物组合物。
11. 权利要求3的方法, 其中所述组合物为食品。
12. 权利要求3的方法, 其中所述组合物为饮料。
13. 权利要求3的方法, 其中所述组合物为糖食。
14. 权利要求11的方法, 其中所述化合物作为可可提取物提供。
15. 权利要求11的方法, 其中所述化合物作为可可成分提供。
16. 权利要求3的方法, 其中所述人选自: 参与竞赛项目的人、向听众演讲的人或集会演讲人和从事娱乐职业的人。
17. 权利要求3的方法, 其中所述人选自: 进行复杂决策和/或多个任务处理的人、搬运人员、建筑人员和保卫人员。
18. 权利要求3的方法, 其中所述人为罹患认知能力衰退的老年个体。
19. 权利要求3的方法, 其中所述人为健康人。
20. 一种对其需要健康受治疗者增加脑血管系统血流的方法, 包括给予所述受治疗者含有有效量的至少一种化合物的组合物, 所述化合物选自儿茶素、表儿茶酸、具有式A_n的化合物、其药学上可接受的盐及其衍生物:



其中

- n 为 2-18 的整数;
- R 和 X 各自具有 α 或 β 立体化学;
- R 为 OH、O-糖或 O-没食子酸基;

C-4、C-6 和 C-8 的取代基分别为 X、Z 和 Y，单体单元的键合发生在 C-4、C-6 或 C-8；

当任何 C-4、C-6 或 C-8 不与另一个单体单元键合时，X、Y 和 Z 为氢或糖；和

所述糖任选在任何位置例如经由酯键被酚性部分取代。

改善认知功能的方法和组合物

发明领域

(001) 本发明涉及用于(i)增强执行认知功能(例如决策、计划、工作记忆、多任务处理、判断、数值问题解决、阅读理解)和/或(ii)增加脑血管系统中的血流的组合物,及其使用方法,包括给予其需要受治疗者某些本文所述的多酚化合物。

发明背景

(002) 黄烷醇和原花青素由于其广泛的生物活性(例如美国专利号 6,297,273)已吸引了医学和营养学领域的大量注意。申请人现已发现,给予本文所述的化合物导致执行认知功能增强和/或脑血管系统中的血流增加。

(003) 磁共振成像(MRI)是基于核磁共振(NMR)原理的一种成像技术,核磁共振是用于获得有关分子的显微化学和物理信息的光谱技术。MRI 主要用于医学环境,产生高质量的人体内图像。MRI 系统还可以成像几乎是机体任何部分的血流。这使得可进行显示体内动脉系统但不显示动脉系统周围组织的研究。在许多情况下,MRI 系统可在没有血管放射医学中需要的造影剂注射的情况下执行此工作。

(004) 已知脑血管系统中的血流和血氧(统称为血液动力学)的改变密切相关/伴随神经活性(即大脑活动/功能)。因此,可通过使用成像技术作图脑血液动力学的改变研究大脑活动/功能。功能性磁共振成像(fMRI)是一种这样的基于核磁共振(MR)的技术,用于确定大脑功能。其通过血氧水平依赖性造影(“BOLD”)作用检测大脑活动的改变。BOLD 作用基于氧合血红蛋白的分布而改变。在脑细胞活动时,它们消耗局部毛细血管内的红细胞中的血红蛋白携带的氧。该氧利用导致

通向大脑活动增加的区域的血流增加,这使氧血红蛋白和脱氧血红蛋白的相对浓度产生局部改变。因此,通过 BOLD 反应检测的氧化改变由于脑血流(CBF)、脑血量(CBV)和脑氧消耗代谢率(CMRO₂)增加的复杂相互作用而产生。因此,BOLD 信号改变与血流变化良好关联,即 BOLD 反应增加指示血流增加,而血流增加又可对应于认知功能增强,例如才智敏锐性和/或能力增强。

(005) 动脉自旋标记(ASL)是另一种非侵入性的基于磁共振(MR)的成像技术,该技术以绝对单位(即 ml 血液/100 克组织/分钟)提供生理相关的 CBF 检测。基于 ASL 的成像有可能通过为 BOLD 反应基础的相同区域性神经血管偶联进行;然而,其提供了血流自身改变而不是血氧改变的定量检测。

(006) 应用以上脑成像技术(fMRI BOLD 响应和 ASL)得以实现本文描述的本发明。

(007) 执行认知功能在众多复杂任务的实施中起关键作用,所述复杂任务例如为决策、计划、工作记忆、多任务处理、判断、数值问题解决和阅读理解。因此,在本领域需要增强执行认知功能和/或增加脑中的血流的方法。

发明概述

(008) 本发明涉及用于(i)增强执行认知功能和/或(ii)增加脑血管系统中的血流的组合物,及其使用方法,包括给予其需要受治疗者本文所述的某些多酚化合物。

(009) 在一个方面,本发明涉及含有本发明化合物的组合物,例如药物、食品、食品添加剂或膳食增补剂。所述组合物任选可以包含另外的认知增强剂/改善剂,或者可以联合另外的认知增强剂/改善剂一起给予。含有上述组合物以及用于增强/改善智力认知和/或治疗/预防与智力认知衰退相关的病症的标签和/或说明书的包装产品也在本发明的范围内。

(0010) 又一方面,本发明涉及增加脑部某些区域中的大脑活动(例如通过使用 fMRI BOLD 响应评价)的方法,包括给予其需要受治疗者本发明的化合物。这些活动的脑部区域的非限制性实例包括右背外侧前额叶皮质、顶叶皮质和前扣带。

(0011) 另一方面,本发明涉及增加通向脑部的血流的方法(例如使用 ASL 检测),包括给予其需要受治疗者本发明的化合物。

附图简述

(0012) 图 1: 显示了字母-数字任务的平均反应时间($\pm$ SEM)。反应时间对所有受治疗者进行平均。

(0013) 图 2(a): 显示了‘转换’对基线情境的‘高黄烷醇’的任务相关活性。高度和空间范围的统计参数作图以 $P < 0.05$ (校正过的)为阈值。

(0014) 图 2(b): 显示了用于在‘转换’和‘非转换’情境(‘转换’对基线 $>$ ‘非转换’对基线)之间比较的‘高黄烷醇’的任务相关活性。高度和空间范围的统计参数作图以 $P < 0.05$ (校正过的)为阈值。

(0015) 图 3: 显示了在摄入急性剂量的高黄烷醇饮料和低黄烷醇饮料后经过灰质($n = 4$)的平均脑血流反应的时程($\pm$ SEM)。

(0016) 图 4(a-d): 显示了补充黄烷醇/原花青素的可可饮料对“认知要求成套”测验的作用: (a)三正确测验; (b)七错误测验; (c)快速视觉信息处理任务(RVIP); 和(d)心理疲劳。

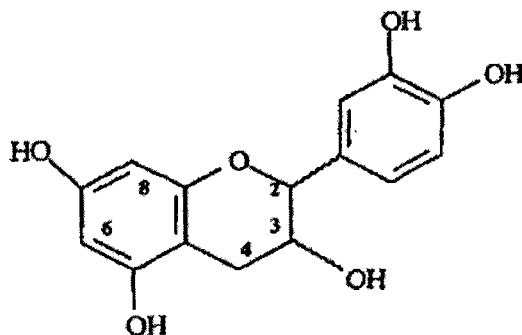
发明详述

(0017) 将本申请中引用的所有专利、专利申请和参考文献都并入本文作为参考。对于任何不一致的情况,以本文公开内容为准。

(0018) 本发明涉及用于(i)增强执行认知功能,和/或(ii)增加脑血管系统中的血流的组合物、产物和方法,它们各自包括给予其需要受治疗者本文所述的某些多酚化合物。用于本发明的化合物包括某些

黄烷醇(黄烷-3-醇)、原花青素或其药学上可接受的盐或衍生物。这样的化合物当为天然来源时,可以可可组分的形式包含在组合物中,例如可可粒或其碎屑、巧克力浆、可可固体(例如部分或完全脱脂的)、可可提取物或其级分。

(0019) 本文使用的术语“黄烷醇”或“黄烷-3-醇”是指下式的单体:

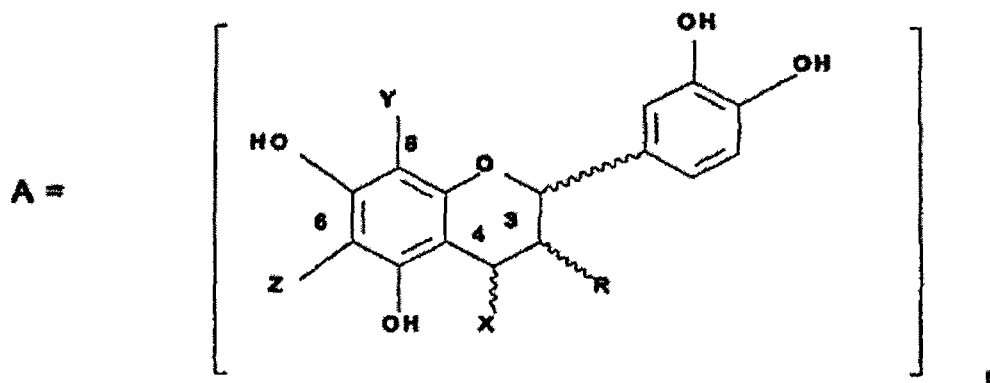


(0020) 术语“原花青素”是指以上所示单体的寡聚物。

(0021) 术语“可可组分”是指来源于可可豆的组分,例如可可粒或其碎屑、巧克力浆、可可固体(例如部分或完全脱脂的蛋糕或粉末)、含黄烷醇和/或原花青素的可可提取物或其级分。

(0022) 在某些实施方案中,本发明涉及黄烷醇(例如(-)-表儿茶酸和(+)-儿茶素),以及含有有效量的黄烷醇(例如(-)-表儿茶酸和(+)-儿茶素)的组合物,或其药学上可接受的盐或衍生物(包括氧化产物、甲基化衍生物和葡萄糖苷酸酯衍生物)。该衍生物可如下所述制备。

(0023) 在其它实施方案中,本发明涉及具有下式 A_n 的化合物、含有有效量的该化合物的组合物或其药学上可接受的盐或衍生物(包括氧化产物、甲基化衍生物和葡萄糖苷酸酯衍生物):



其中

n 为 2-18 的整数;

R 和 X 各自具有 α 或 β 立体化学;

R 为 OH 或 O -糖或 O -没食子酸基;

C -4、 C -6 和 C -8 的取代基分别为 X 、 Z 和 Y ，单体单元的键合发生在 C -4、 C -6 或 C -8;

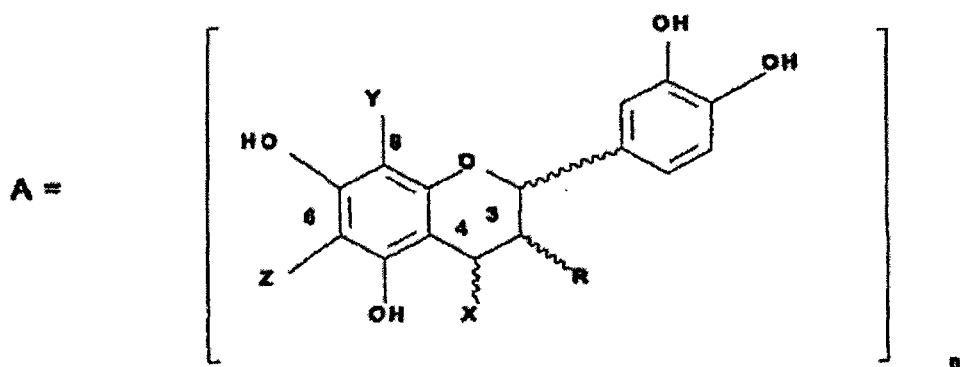
当任何 C -4、 C -6 或 C -8 不与另一个单体单元键合时， X 、 Y 和 Z 独立地为氢或糖; 和

所述糖任选在任何位置例如经由酯键被酚性部分取代。

(0024) 式 A_n 中的单体单元可经由 $4 \rightarrow 6\alpha$; $4 \rightarrow 6\beta$; $4 \rightarrow 8\alpha$; 和/或 $4 \rightarrow 8\beta$ 键键合。所述糖优选为单糖或二糖。所述糖可选自葡萄糖、半乳糖、鼠李糖、木糖和阿拉伯糖。酚性部分可选自咖啡酸、肉桂酸、香豆酸、阿魏酸、没食子酸、羟基苯甲酸和芥子酸。衍生物可以包括酯，例如没食子酸酯; 用糖部分如单糖或二糖部分(例如 β -D-葡萄糖)衍生的化合物，葡糖苷酸酯和甲基化衍生物，以及氧化产物。在某些实施方案中，酯衍生物不是没食子酸的酯。氧化产物可如在美国专利号 5,554,645 中所公开的制备，该专利的相关部分在此引入作为参考。酯，例如没食子酸的酯，可以使用已知的酯化反应制备，例如在美国专利号 6,420,572 中所述，该专利的公开内容在此引入作为参考。甲基化衍生物，例如 3'-O-甲基-、4'-O-甲基-和 3'-O,4'-O-二甲基-衍生物可例如 Cren-Olive 等, 2002, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 821-830 和 Donovan 等, *Journal of Chromatography B*, 726 (1999) 277-283 所述制

备, 所述文献的公开内容在此引入作为参考。葡糖苷酸酯产物可如在 Yu 等, “A novel and effective procedure for the preparation of glucuronides,” *Organic Letters*, 2(16) (2000) 2539-41 中和在 Spencer 等, “Contrasting influences of glucuronidation and O-methylation of epicatechin on hydrogen peroxide-induced cell death in neurons and fibroblasts,” *Free Radical Biology and Medicine* 31(9)(2001) 1139-46 中所述制备, 所述文献在此引入作为参考。应当指出的是, 该公开内容适用于本文提及的所有式。

(0025) 在另一个实施方案中, 本发明涉及具有式 A_n 的化合物、含有有效量的该化合物的组合物或其药学上可接受的盐或衍生物(包括氧化产物、甲基化衍生物和葡萄糖苷酸酯衍生物):



其中

n 为 2-18 的整数;

R 和 X 各自具有 α 或 β 立体化学;

R 为 OH;

C-4、C-6 和 C-8 的取代基分别为 X、Z 和 Y，单体单元的键合发生在 C-4、C-6 或 C-8；和

当任何 C-4、C-6 或 C-8 不与另一个单体单元键合时，X、Y 和 Z 为氢。

(0026) 可用于本发明的产品和方法的化合物的实例包括本文所述的式 A_n 的化合物，其中整数 n 为 3-18；2-12；3-12；2-5；4-12；5-12；4-10；或 5-10。在某些实施方案中，整数 n 为 2-4，例如 2 或 3。

该公开内容适用于本文的式 A_n 的任何化合物。

使用方法

(0027) 本发明涉及(i)增强执行认知功能和/或(ii)增加脑血管系统中的血流的方法。

(0028) 本文使用的“执行认知功能”被定义为较高级的认知能力，其在管理(如“执行”)其它认知功能如注意力、语言和记忆方面起作用。执行认知功能的实例包括决策、多任务处理、工作记忆、进行复杂数值计算、阅读理解。

(0029) 本文使用的“增强认知功能”被定义为至少一种执行认知功能的可检测改善。本领域技术人员将选择已知的检测认知功能改善的方法，例如在实施例中描述的方法。

(0030) 本文使用的“认知能力衰退”被定义为健康受治疗者(例如老年/衰老的受治疗者)的认知能力退化，即本文使用的“认知能力衰退”不是指神经退化性疾病。

(0031) 本文使用的“健康”受治疗者是未患/还没有诊断为神经退化性疾病的受治疗者。

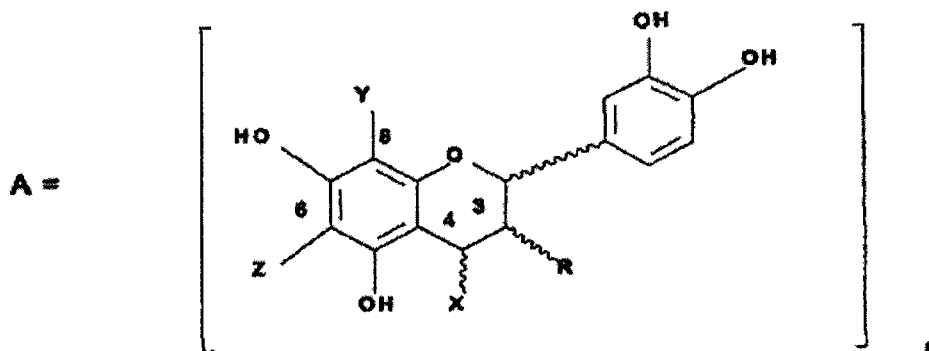
(0032) 本文使用的“增加血流”是指传递入组织中的血液量增加，该量可以毫升(ml)血液/100 ml 组织/分钟表示。增加脑中的血流是指单位时间进入单位体积脑中的血量增加。

(0033) 在某些实施方案中，本发明提供(i)增强执行认知功能的方法和/或(ii)增加通向脑血管系统的血流的方法，它们各自包括给予其需要哺乳动物(例如人)或兽医动物有效量的黄烷醇，例如表儿茶酸或儿茶素(例如(-)-表儿茶酸或(+)-儿茶素)，或其药学上可接受的盐或衍生物(包括氧化产物、甲基化衍生物和葡萄糖苷酸酯衍生物)。

(0034) 术语“兽医动物”是指由兽医看护或照看的任何动物，包括陪伴动物(宠物)和家畜，例如猫、狗和马(例如赛马)。

(0035) 在某些实施方案中，本发明提供(i)增强执行认知功能的

方法和/或(ii)增加通向脑血管系统的血流的方法,它们各自包括给予其需要哺乳动物(例如人)或兽医动物组合物,所述组合物含有效量的具有下式 A_n 的化合物、或其药学上可接受的盐或衍生物(包括氧化产物、甲基化衍生物和葡萄糖苷酸酯衍生物):



其中

n 为 2-18 的整数;

R 和 X 各自具有 α 或 β 立体化学;

R 为 OH 或 O -糖或 O -没食子酸基;

C -4、 C -6 和 C -8 的取代基分别为 X 、 Z 和 Y , 单体单元的键合发生在 C -4、 C -6 或 C -8;

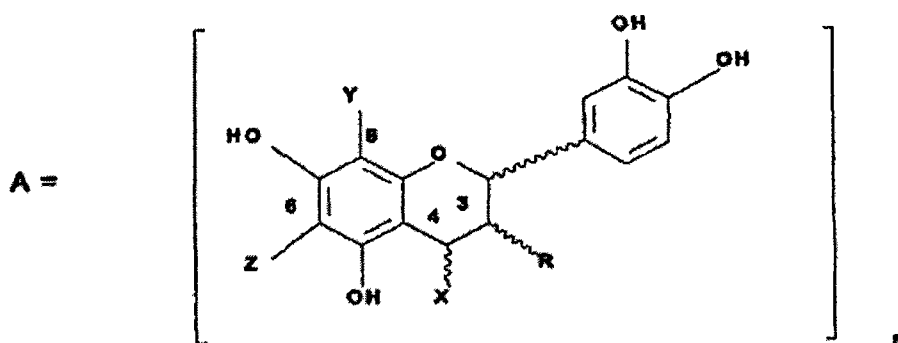
当任何 C -4、 C -6 或 C -8 不与另一个单体单元键合时, X 、 Y 和 Z 独立地为氢或糖; 和

所述糖任选在任何位置例如经由酯键被酚性部分取代。

(0036) 例如, 以上方法可涉及化合物 A_n 或其药学上可接受的盐或衍生物(包括氧化产物、甲基化衍生物和葡萄糖苷酸酯衍生物)的用途, 其中 R 为 OH , 当任何 C -4、 C -6 或 C -8 不与另一个单体单元键合时, X 、 Y 和 Z 为氢。适宜的糖的实例如上所述。酚性部分的实例如上所述。衍生物的实例如上所述。

(0037) 在某些实施方案中, 本发明提供(i)增强执行认知功能的方法和/或(ii)增加脑血管系统中的血流的方法, 它们各自包括给予其需要哺乳动物(例如人)或兽医动物组合物, 所述组合物含有效量的具有式 A_n 的化合物、或其药学上可接受的盐或衍生物(包括氧化产物、

甲基化衍生物和葡糖苷酸酯衍生物):



其中

n 为 2-18 的整数;

R 和 X 各自具有 α 或 β 立体化学;

R 为 OH;

C-4、C-6 和 C-8 的取代基分别为 X、Z 和 Y, 单体单元的键合发生在 C-4、C-6 或 C-8; 和

当任何 C-4、C-6 或 C-8 不与另一个单体单元键合时, X、Y 和 Z 为氢。

(0038) 可用于本发明的产品和方法的化合物的实例包括本文所述的化合物, 其中整数 n 为 3-18; 2-12; 3-12; 2-5; 4-12; 5-12; 4-10; 或 5-10。在某些实施方案中, 整数 n 为 2-4, 例如 2 或 3。该公开内容适用于本文的式 A_n 的任何化合物。

(0039) 尽管任何人或兽医动物都可以由本文所述方法获益, 但要理解的是, “其需要受治疗者” 是迫切需要增强认知功能的受治疗者或所从事的职业(或执行的任务)需要持续利用执行认知功能的受治疗者。需要增强认知功能和/或增加脑血流的受治疗者的实例对本领域技术人员显而易见, 例如即将参与竞争项目的受治疗者(例如参加考试、在运动/竞技项目中竞争、参加求职面谈的那些受治疗者); 向听众/集会演讲的人(例如教育工作者、政治家、直播电视-新闻主播、记者); 娱乐人士(例如电影演员和现场秀表演者); 和从事涉及紧张的心理过程周期的任务的那些受治疗者。还包括所执行任务需要复杂决策

和多任务处理的受治疗者,例如高级商务人员;运输人员(例如公共汽车司机、机车司机、航线飞行员、船长/指挥官);建筑人员(例如高风险建筑如桥梁、高层建筑物、高山上的公路和铁路);保卫人员(例如战舰指挥官、战斗机驾驶员、海军舰艇驾驶员)。此外,出现认知衰退但在临床上还没有被诊断为神经退化性疾病的老年/衰老个体(例如>65岁,例如>75岁)也将由本文所述的组合物和方法获益。

(0040) 本发明化合物可以可可组分形式口服给药,例如可可粒或其碎屑、巧克力浆、可可固体(例如部分和完全脱脂的可可固体,例如可可固体为可可粉)、可可提取物或其级分,或者可以独立于可可组分加入。可制备可可组分,使得可通过改变如例如在美国专利号6,194,020和6,599,553中所述的传统加工步骤来保持可可多酚(CP)含量。

(0041) 在某些实施方案中,本发明的化合物可以与其它认知增强剂组合给药,和/或给予以增强对其它认知增强剂的反应性。认知增强剂的实例包括:代谢底物(例如葡萄糖、酮、补充氧)、生物碱(例如可可碱、咖啡因)、维生素、氨基酸、矿物质、微量营养素、植物提取物或其衍生物、草本或草药添加剂(例如银杏、人参)。

(0042) 因此,以下用途在本发明范围内。如上定义的黄烷醇或其药学上可接受的盐或衍生物(包括氧化产物、甲基化衍生物和葡糖苷酸酯衍生物)在药物、食品、营养或膳食补充剂生产中用于增强执行认知功能和/或增加脑血管系统中的血流的用途。如本文定义的式 A_n 化合物或其药学上可接受的盐或衍生物(包括氧化产物、甲基化衍生物和葡糖苷酸酯衍生物)在药物、食品、营养或膳食补充剂生产中用于增强执行认知功能和/或增加脑血管系统中的血流的用途。

(0043) 有效量可由本领域技术人员使用本文提供的指引和本领域的一般知识确定。例如,有效量可以为例如在哺乳动物体内达到生理学上的相关浓度。这样的生理相关浓度可为至少20纳摩尔(nM),优选至少约100 nM,更优选至少约500 nM。在一个实施方案中,在

哺乳动物如人的血液中的达到至少约 1 微摩尔。本文定义的化合物可以约 35 mg/天、40 mg/天或 50 mg/天(例如至约 1000 mg/天)给药,或者以约 75 mg/天(例如至约 1000 mg/天)给药,或者以约 100-150 mg/天(例如至约 900 mg/天)给药,或者以约 300 mg/天(例如至约 500 mg/天)给药。然而,可以使用高于以上示例的量,因为使用量范围的上限不是限制因素。所述量可如在 Adamson, G.E.等, *J. Ag. Food Chem.*; 1999; 47 (10) 4184-4188 中所述检测。

(0044) 可以持续给予某个治疗方案,即有效的时间段,例如每天 1 次、每月 1 次、每 2 个月 1 次、1 年 2 次、每年 1 次,或者在某些其它方案中,由熟练的开业医生根据需要确定这样的时间。给药可持续至少增强执行认知功能和/或增加脑血管系统中的血流所需的时间段。组合物可每日 1 次给药,优选每天 2 次或 3 次给药,例如早晨和晚上,以保持哺乳动物体内的有效化合物水平。为获得最有益的结果,组合物可给予至少 7 天,或者至少 14 天,或者至少 30 天,或者至少 45 天,或者至少 60 天,或者至少 90 天。这些方案可根据需要定期重复。

组合物和制剂

(0045) 本发明的化合物可作为食品(包括宠物食品)、食品添加剂或膳食增补剂或药物给予。

(0046) 在此使用的“食品”为含蛋白质、碳水化合物和/或脂肪的物质,其在生物体内用于维持生长、修复和维持生命的过程,并提供能量。食品也可包含增补物质,例如矿物质、维生素和调味品。参见 Merriam-Webster's Collegiate Dictionary, 第 10 版, 1993。术语食品包括适合于人或动物消费的饮料。在此使用的“食品添加剂”由 FDA 在 21 C.F.R. 170.3(e)(1)中定义,并包括直接和间接添加剂。在此使用的“膳食增补剂”为用于补充饮食的产品(烟草除外),其具有或包含一种或多种以下膳食成分:维生素、矿物质、草本或其它植物性药材、

氨基酸、通过增加每天总摄取量补充膳食的人用膳食物质，或者浓缩物、代谢物、组分、提取物或这些成分的组合。在此使用的“药物”为药用药物。参见 Merriam-Webster's Collegiate Dictionary, 第 10 版, 1993。药物也可称作药剂。以上组合物可如本领域所知制备。

(0047) 所述组合物可以包含载体、稀释剂或赋形剂。根据预定用途，可以选择载体、稀释剂或赋形剂，以适于人或兽医用途，适于食品、添加剂、膳食增补剂或药物用途。组合物任选含有另外的认知增强剂/改善剂。另根据用途，本领域技术人员可以选择本发明化合物的纯度。例如，当用于制备药物剂型时，化合物应为商业上尽可能纯的化合物，而在制备食品、添加剂或增补剂时，可以使用纯度较低的化合物或化合物的混合物(例如植物提取物)。

(0048) 本发明的化合物可以为“分离的和纯化的”，即其可与其一起天然存在的化合物分离(例如当化合物为天然来源时)，或者其可以合成制备，在任一种情况下都使污染化合物和/或杂质的水平不显著影响或减损化合物的有效性。例如，“分离的和纯化的 B2 二聚体”与同其一起(例如在可可豆中)天然存在的 B5 二聚体分离，达到商业上可行的可用纯化和分离技术可实现的程度。这样的化合物特别适合于药物用途。

(0049) 化合物也可以纯度较低，即“基本上纯”，也就是说，其可具有通过可用的纯化、分离和/或合成技术可达到的最高程度的均一性，但不需要与类似化合物分离。本文使用的“类似化合物”是具有相同聚合程度的化合物。例如，“基本纯的二聚体”是指二聚体的混合物(例如 B2 和 B5，因为其应存在于可可提取物级分中)。尽管不太适于药物用途，但这样的“基本上纯”的化合物可用于食品、食品添加剂和膳食增补用途。

(0050) 在某些实施方案中，本发明的化合物为至少 80%纯、至少 85%纯、至少 90%纯、至少 95%纯、至少 98%纯或至少 99%纯，这类化合物尤其适于药物用途。

(0051) 包含本发明化合物的、任选地与另一种认知增强剂/改善剂相结合的药物可以通过口服给药。本文使用的“口服给药”包括经由口给药，并包括舌下和颊服给药。本领域技术人员将能确定合适的给药方式，以最大化本发明化合物的递送。因此，适宜于每种经口给药形式的剂型在本发明范围之内，包括固体、液体和半固体剂型，如片剂、胶囊、明胶胶囊(软明胶胶囊)、多剂量或单位剂量粉末或颗粒、乳剂、混悬剂、浆糊剂或凝胶剂。持续释放剂型也在本发明范围内。合适的药学可接受的载体、稀释剂或赋形剂通常是本领域已知的，并可易于由本领域的技术人员确定。例如，片剂可以包含有效量的本发明化合物和任选的载体，如山梨糖醇、乳糖、纤维素或磷酸二钙。

(0052) 包含本文描述的化合物和可选的另一种认知增强剂/改善剂的食物可适宜于人或兽医用途，并且包括宠物食品。所述食物可以不是糖食，例如为饮料(例如可可味饮料)。糖食，例如识别标准(SOI)和非 SOI 巧克力，如乳质的、甜的和半甜巧克力，包括黑巧克力、低脂巧克力和糖果(可以是巧克力包裹的糖果)，也在本发明范围内。其它实例包括焙烤产品(例如杏仁巧克力饼、烘烤点心、曲奇饼、饼干)、调味品、格兰诺拉麦片棒、太妃软糖、代餐棒、涂抹食品、糖浆、饮料粉混合物、可可或巧克力味饮料、布丁、米粉糕、拌饭(rice mix)、鲜味酱等。如有需要，食物可为巧克力或可可味的。食物可以为巧克力和糖果棒，例如含有坚果(例如花生、胡桃、杏仁和榛子)的格兰诺拉麦片棒。食物被设计成传送有效量的本文所述化合物。

(0053) 用于本发明的化合物可为天然来源，例如来源于可可豆或本领域技术人员已知的另一个天然来源，或者合成制备。本领域技术人员可以基于用途和/或利用度或成本选择天然的或合成的多酚。

(0054) 化合物可以可可组分的形式包含在组合物中。例如，化合物可以可可成分的形式包含在组合物中，例如包含在巧克力中的巧克力浆，或者可以独立于可可成分加入，例如作为提取物、提取物级分、分离的和纯化的单独化合物、合并的提取物级分或合成制备的化

合物。提取和纯化可如在授予 Romanczyk 等的美国专利号 5,554,645 和 6,670,390 以及授予 Hammerstone 等的美国专利号 6,627,232 中所述进行, 所述每个专利均在此引入作为参考。

(0055) 可可黄烷醇和/或原花青素可通过含有这些化合物的可可成分或通过包含巧克力在本发明的组合物中提供, 所述巧克力可以为奶质的、甜的和半甜的, 优选为黑巧克力和低脂巧克力。可可成分可以使用传统可可加工步骤制备, 但优选使用在授予 Kealey 等的美国专利号 6,015,913 中描述的方法制备。或者, 为增强可可多酚的水平, 可以使用由发酵因子为 275 以下的可可豆制备的巧克力浆和可可固体。这些成分具有的可可多酚含量高于使用传统可可加工方法(例如用烘烤和完全发酵的豆)可获得的含量。巧克力可使用常规技术由上述成分制备, 或者在巧克力生产过程中使用用于保存可可多酚的改良方法, 如在公开为 WO99/45788 的国际申请号 PCT/US99/05414 及其美国对应专利美国专利号 6,194,020 中所述, 该专利的相关部分在此引入作为参考。由以下的至少一种非传统方法制备的巧克力在本文被称为“具有保存量的可可多酚的巧克力”: (i)由发酵不足或未发酵的可可豆制备可可成分; (ii)在可可成分生产过程中保存可可多酚; 和(iii)在巧克力生产过程中保存可可多酚。这样的非传统方法可用于制备含其它可可组分的产品(食品, 例如饮料, 膳食增补剂), 该产品设计成包含增强水平的黄烷醇和/或原花青素。

(0056) 还可以使用合成原花青素, 其通过本领域已知的方法和例如在美国专利号 6,420,572; 6,156,912; 和 6,864,377 中所述制备, 所述每个专利的相关部分都在此引入作为参考。

(0057) 在一次服用(就食品而言)或单次剂量(就药物或膳食增补剂而言)中, 可以提供每日有效量的本发明化合物。例如, 糖食(例如巧克力)可以包含至少约 100 mg/次服用(例如 150-200、200-400 mg/次服用)。

(0058) 包含本发明化合物和任选的另一认知增强剂/改善剂的

膳食增补剂可以使用本领域已知的方法制备，并且可以包含例如营养素，如磷酸二钙、硬脂酸镁、硝酸钙、维生素和矿物质。

(0059) 另外在本发明范围内的是制品，如包装产品，其包含本发明组合物(例如，食品、膳食增补剂、药物)和标签，该标签指明本发明化合物的存在或提高的含量，或指导组合物的使用，以增强执行认知功能和/或增加脑血管系统中的血流。该包装产品可以包含用于增强执行认知功能和/或增加脑血管系统中的血流的所述组合物和说明书。标签和/或使用说明书可以涉及在本申请中描述的任何使用方法。

(0060) 本发明还涉及制造包含本文描述的任何组合物的制品的方法、包装该组合物以得到制品的方法，以及指示、指导或促进组合物/制品用于本文所描述的任何用途的方法。上述指示、指导或促进包括广告。

(0061) 在以下非限制性实施例中进一步描述本发明。

实施例

实施例 1: 可可黄烷醇对健康年轻人中针对认知任务的 fMRI 应答的作用

方法

对象

(0062) 16名介于18-30岁的女性青年受治疗者根据以下排除标准参与研究：没有偏头痛、中风、高血压、糖尿病或任何神经性疾病或血管病史，且不使用烟草产品。所有受治疗者都具有正常视觉和色觉，没有诵读困难，惯用右手，它们的第一语言使用‘罗马’字母表。受治疗者平均每日的咖啡因摄取由它们对膳食调查表的回答估计，她们全部被分类为低咖啡因使用者(<120 mg/天)。指导所有受治疗者戒除酒精和咖啡因，或者在每次fMRI检测随访前12小时戒除使用任何药物。当地的医学院研究伦理委员会批准了本研究，所有受治疗者在参加研究前都提供了书面知情同意。

(0063) 每名受治疗者都进行2次fMRI期,其间隔至少14天重复。受治疗者以双盲平衡方式随机接收高黄烷醇可可饮料(在1次fMRI期前5天,每支饮料含150 mg 黄烷醇/原花青素)和低黄烷醇可可饮料(在另一次fMRI期之前5天,每支饮料含13 mg 黄烷醇/原花青素)。这些在后文将被称为‘高黄烷醇’和‘低黄烷醇’。受治疗者在每次扫描前5天于设定时间每天饮用1支饮料,最后1支饮料在fMRI扫描前约1.5小时饮用。

研究设计

(0064) 预先培训受治疗者执行以下两项任务:奇-偶判断的数字任务和需要辅音-元音判断的字母任务。在字母任务中,受治疗者根据展示的字母为辅音(G、K、M、R)还是元音(A、E、O、U)学习响应单字母刺激。培训受治疗者按左键响应元音,按右键响应辅音。在数字任务中,培训受治疗者对分别使用左键和右键响应为奇数(3、5、7、9)或偶数(2、4、6、8)的数字做出响应。

(0065) 一旦受治疗者熟悉了字母和数字任务的规则,就对她们进行在fMRI研究中执行的字母-数字对任务培训。字母-数字对任务由在计算机屏幕上同时显示的字母和数字组成(对于fMRI扫描,使用投影仪和屏幕)。字母-数字对为红色或蓝色。当字母-数字对以红色呈现时,指示受治疗者注意字母,并按培训(即应用分类为元音或辅音的规则)通过按压适宜的键做出响应。如果字母-数字对是蓝色的,则她们以类似方式响应数字(奇-偶判断)。

(0066) 在该研究中,‘转换’任务的定义是两组规则之间的改变,一组规则用于字母(辅音-元音判断),一组规则用于数字(奇偶判断)。为建立含有‘转换’和‘非转换’情境的范式,字母-数字对被分类为组块,一个组块5个字母-数字对,全部相同的颜色为‘非转换’组块。在红色和蓝色刺激之间交替变换(并因此重建任务判断)的5个字母-数字对的组块为‘转换’组块。组块内每个字母-数字对之间的

间隙为 3 秒,产生的总组块长为 15 秒;这之后接 12 秒的固定十字架(基线情境)。所述组块交替提供(即‘转换’组块、‘非转换’组块、‘转换’组块、‘非转换’组块等)。在组块内呈现字母-数字对有助于增加转换代价,并因此也增加 fMRI BOLD 响应程度,而组块之间的 12 秒间隔使 BOLD 响应回到基线。

(0067) 在 fMRI 研究之前,通过进行 5 个组块的‘转换’和‘非转换’试验,培训受治疗者至胜任任务的水平(出错率低于 5%)。在 fMRI 研究当中,在研究中进行 20 个组块的‘转换’试验和 20 个组块的‘非转换’试验,使得总研究时程为 18 分钟。

fMRI 扫描

(0068) 使用 3.0 T 特制扫描仪,其带有 TEM 头线圈和插入头梯度线圈。使用 MBEST 采集顺序,以 30 ms 回波时间(TE)和 1.9 kHz 梯度开关频率,获得 T_2^* -加权冠状位回波平面图像(EPI),其具有 128×64 矩阵尺寸、3 mm 平面分辨率和 9 mm 层厚。每 3 秒获得 16 张连续的冠状位层($TR=3$ s)。在整个研究中,记录受治疗者反应时间和错误率数据。此外,监测受治疗者的心率。在 fMRI 研究之后,获得 64 层 EPI 组,以帮助解剖定位。

fMRI 数据处理

(0069) 使用 SPM99 (Friston KJ 等, Neuroimage 1995; 2:166-172) (统计参数图, Wellcome Department of Imaging Neuroscience, UK) 处理 fMRI 数据。运动修正扫描仪的原始数据,对第一个数据集组(volume)重排所有功能层,对标准 EPI 模板空间标准化。应用 8 mm FWHM (半最大值全宽)空间平滑和 128 s 高通截止滤波。

(0070) 在 SPM99 中建立模仿该范式的一般线性模型设计矩阵。以 12 s 盒函数建模‘转换’和‘非转换’组块。然后用正则血液动力学响应函数及其时间导数卷积范式时程。形成‘转换’情境和‘非转

换’情境对基线的统计参数图(SPM)。另外，还以修正过的显著性水平 $P < 0.05$ 进行两种活动情境之间(即‘转换’对基线和‘非转换’对基线)的直接比较，各自的活动对基线比较(‘转换’对基线和‘非转换’对基线)用作掩盖。

脑血流(CBF)检测和分析

(0071) 在针对 4 名受治疗者(24-31 岁)的该初始研究中，我们评价了黄烷醇对脑血流作用的时程。使用 EPISTAR (回波-平面 MR 成像和信号靶向交替射频)动脉自旋标记序列(ASL)对 5 个多层轴向 7 mm 层获得脑血流(CBF)图。应用弥散加权($b=5 \text{ mm}^2/\text{s}$)抑制动脉内自旋。使用双曲正割脉冲标记，标签和对照层为 9 cm 宽，反转时间(TI)为 1400 ms。EPISTAR 序列以 3 秒重复时间(TR)介于标签和对照图像之间执行，获得总共 60 个标签和对照对。每名受治疗者都在于两个单独的场合摄入高黄烷醇可可饮料(450 mg 黄烷醇)或低黄烷醇可可饮料之前和之后 2、4 和 6 小时，进行 CBF 成像。在该研究中，与 fMRI 研究相反，仅于 1 个时机食用单剂饮料。每个 CBF 检测之后获得用于分割脑组织类型和灰质区域的 T_1 图。(CBV 常用于指血量)。

(0072) 首先使用由 T_1 图产生的掩盖将脑血流数据分割入灰质区和白质区。然后将灰质 CBF 图进一步分割成由大血管供给的区域(Yen Y-F 等, *Magn Reson Med* 2001: 47:921-928; 该文献在此引入作为参考)。然后计算白质区和灰质区的平均脑血流值。本文提供了整个灰质灌注值。

结果

任务转换范式的行为结果

(0073) 观察到响应时间的强转换代价。每名受治疗者在数字上对‘转换’情境比对‘非转换’情境减慢，对字母任务和数字任务均如此，由一个任务规则向另一个的固定转换说明困难。各组对‘转换’

和‘非转换’组块的平均反应时间示于图 1。对于‘低黄烷醇’，转换代价的显著性为 $p = 5 \times 10^{-6}$ ，对于‘高黄烷醇’， $p = 1 \times 10^{-6}$ 。两种饮料之间的转换代价没有显著差异($p = 0.30$)。平均转换代价为 224 ± 25 毫秒(ms)。

(0074) 还研究了在 fMRI 研究的 40 个组块的‘转换’和‘非转换’实验当中受治疗者由于变得疲劳或由于学习效果而改善会产生或多或少的错误的概率。反应时间响应的分析揭示，在 fMRI 任务当中，没有发生显著的疲劳/学习效果($p = 0.74$)。另外随机化饮料顺序，对第一个和第二个扫描任务之间的反应时间响应进行比较，这又揭示没有显著差异($p = 0.73$)。

任务转换范式的心率结果

(0075) 检测针对低和高黄烷醇可可饮料的‘转换’和‘非转换’情境的平均心率，如在表 1 中所示。进行成对 t-检验，以确定‘转换’和‘非转换’情境之间心率的任何差异；对于两种饮料，‘转换’情境相比于‘非转换’情境心率有显著增加(‘低黄烷醇’：‘转换’ > ‘非转换’ $p = 0.01$ ；‘高黄烷醇’：‘转换’ > ‘非转换’ $p = 0.0009$)。在低和高黄烷醇饮料之间没有发现心率的显著差异。

(0076) 表 1: 低和高黄烷醇饮料响应于‘转换’和‘非转换’情境的平均心率($\pm$ SEM)(心跳/分钟)。

	低黄烷醇	高黄烷醇
转换	66.8 ± 2.6	67.6 ± 2.6
非转换	63.0 ± 2.5	64.2 ± 3.0

任务转换范式的 fMRI 结果

(0077) 图 2a 显示了转换任务对基线情境于 $P < 0.05$ 的修正概率的组统计参数图。‘转换’和‘非转换’对基线情境揭示，在中和后前额叶皮质(包括背外侧前额叶皮质(DLPFC))、顶叶皮质、前扣带皮质

(ACC)和小脑中有活动。然而,‘非转换’在图 2a 中没有提供,‘非转换’对基线情境显示出与‘转换’对基线情境相似的面积。

(0078) 先前已表明,以上概述的脑区域与任务转换相关(Lewis PA 等, *Curr Opin Neurobiol* 2003; 13:250-255; Sohn MH 等, *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13448-53; Swainson R 等, *J Cogn Neurosci* 2003; 15:785-99)。此外,除任务转换以外的许多认知神经成像研究也已发现了类似的活动模式。这些活动模式包括工作记忆(Cabeza 等, *Neuroimage* 2002; 16:317-330; Postle B 等, *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:12959-12964)、记忆恢复(Thompson-Schill SL 等, *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:14792-14797; Wagner AD 等, *Neuroimage* 2000; 14:1337-1347)和算术问题解决任务(Anderson JR 等, *Psychonom Bull Rev* 2003; 10:241-261; Dehaenae S 等, *Science* 1999; 284:970-974)。所有这些任务都证实了强前额叶-顶叶相互联系(Petrides M 等, *J Comp Neurol* 1984; 228: 105-116; Schwartz ML 等, *J Comp Neurol* 1984; 226:403-420),提示这两个区域可在高水平认知中起互补作用。

(0079) 图 2b 显示了活动区域的组统计图,其表明在‘转换’任务当中的 BOLD 响应相对于‘非转换’任务显著增加。由该比较可以看出,那些对‘转换’情境优先活动的脑区域大部分位于右半球、背外侧前额叶和顶叶皮质,以及前扣带皮质和小脑。

(0080) 图 2a 显示了‘转换’情境相对于静止基线的区域。这些全部都是脑中与进行转换任务相关的那些部分,所以对任务转换是非专有的,因为它们可包括与任务的不同方面(如对按键的运动反应)相关的区域。

(0081) 参看图 2a-b,图 2b 显示了对于‘转换’情境比对‘非转换’情境大的区域。因此,这可被视为(‘转换’情境相对于静止基线)-(‘非转换’情境相对于静止基线)。这是重要的情境,因为不重要的任务方面,如对按键的运动反应,在‘转换’和‘非转换’情境中均存在,所以通过由‘转换’扣除‘非转换’除去与运动按键反应

相关的那些脑区域。在‘转换’减‘非转换’情境中，只有纯粹与任务转换相关的那些区域才被观察到。

(0082) 在任务转换中，一般认为，前扣带皮质(ACC)检测任务环境中的冲突(Gehring WJ 和 Knight RT, *Nat Neurosci* 2000; 3:516-20)，右前皮质所起的作用涉及不相关(在前)的反应的抑制(Aron 等, *Trends Cogn Sci* 2004;8:170-7)以及新载入工作记忆中的信息的主动维持(Goldman-Rakic PS, *Annu Rev Neurosci* 1988; 11:137-156)。已广泛表明，右后顶叶皮质负责空间或视觉注意力(Rushworth MFS 等, *J Neurosci* 2001; 21: 5262-5271)，而小脑被认为在转换任务中主要以定时的不规律性活动，与其作为内部定时系统的作用相一致(Ivry RB, *Curr Opin Neurobiol* 1996; 6:851-7)。

(0083) ‘低黄烷醇’和‘高黄烷醇’情境之间的 BOLD 信号改变的统计学比较揭示，对于活动(‘转换’和‘非转换’)对基线情境以及‘转换’对基线情境与‘非转换’对基线情境的比较，‘高黄烷醇’产生显著较高的 BOLD 信号改变。表 2 显示了在摄入‘低’和‘高’黄烷醇饮料后选定的目标区域的‘转换’ BOLD 响应相对于基线的平均信号改变百分率。

(0084) 表 2: 在摄入重复剂量的‘低’和‘高’黄烷醇饮料后‘转换’情境的 BOLD 响应相对于基线的平均信号改变百分率($\pm$ SEM)。高黄烷醇饮料显示出 BOLD 响应显著增加。

(0085)

	低黄烷醇	高黄烷醇
背外侧前额叶皮质(DLPFC)	2.3 ± 0.2	3.0 ± 0.2
顶叶皮质	2.1 ± 0.3	2.5 ± 0.2
前扣带皮质(ACC)	1.7 ± 0.1	2.1 ± 0.3

脑血流(CBF)时程结果

(0086) 图 3 显示了在摄入低和高黄烷醇饮料后经过灰质的平均

脑血流响应的时程。可以看出, 响应于高黄烷醇饮料的脑血流增加, 脑血流响应的峰值发生在摄入后约 2 小时, 在约 6 小时后 CBF 回到基线。应当指出的是, 在该研究中给予急性剂量的黄烷醇, 与在 fMRI 研究中给予的重复剂量相反。

(0087) 先前已进行了 ASL 研究来检测高碳酸血症的作用, 高碳酸血症诱导脑血管舒张和 CBF 增加。这些研究已表明, CBF 响应于呼吸保持由 30% 增加至 87%, 这导致 PaCO_2 瞬时增加 (Li TQ 等, *Neuroimage* 1999; 10:562-9; Li TQ 等, *Neuroimage* 1999; 9:243-9; Kastrup A 等, *AJNR Am J Neuroradiol* 1999; 20:1233-8)。吸入 5% CO_2 作为血管扩张刺激物的直接作用已显示出约 87% 的整体 CBF 增加 (Kastrup A 等, *Magn Reson Imaging* 2001; 19:13-20)。在此显示的于摄入高黄烷醇饮料后 2 小时的 60% CBF 改变与这些作用相似。

实施例 2: 评价可可多酚的行为作用

方法

研究设计

(0088) 研究遵循双盲、安慰剂控制、平衡交叉设计, 检验可可饮料中多剂量多酚的认知作用。参与者 ($N = 30$; 13 名男性和 17 名女性, 平均年龄 21.93 岁, SEM 0.61, 范围 18-35 岁) 为健康成人, 针对适宜的、潜在受损的相关健康状况和膳食因素对他们进行了筛选。研究参与者 5 次随访实验室。第一次随访包括其中受试者熟悉程序的练习日, 该次随访还用于确保所有的表现分都在成套测试的规范之内。随后的随访由间隔不低于 3 天进行的 4 个研究日组成, 以确保情境之间的完全消除, 其中受试者随机分配给指示处理顺序的拉丁方单元。

(0089) 参与者在首个测验任务之前至少 12 小时和整个早晨戒除咖啡因和酒精, 直至完成最后一个测验任务。提供日记, 以便让参与者记录每个研究日的首个测验任务之前 24 小时食用的所有食品和

饮料。建议参与者在每个研究日之前的 24 小时避免高类黄酮含量的食品 and 饮料。

治疗

(0090) 参与者于分次接受 3 种饮料，其含有：1) 36.4 mg 可可多酚(对照)，2) 469.3 mg 可可多酚(中等 CP)，3) 902.2 mg 多酚(高 CP)。在每种情况下，治疗都由与 200 ml 热水混合的 2 袋粉末组成。饮料不仅含 33%可可粉，还含有以下的物质：无脂肪奶粉(59.0%)；纤维(5.6%)；乳化剂(0.8%)；纤维素胶(0.55%)；黄原胶(0.55%)；人工和天然香草(0.1%)；和三氯蔗糖(0.1%)。饮料容许在 5 分钟内饮用。

(0091) 每个治疗或对照袋的组成如下：

(0092) 表 3：

		CP 组成	
		高 CP	对照
		%	%
单体		24.8	27
	表儿茶酸	18.6	10.1
	儿茶素	6.2	16.9
二聚体		18.3	22.2
三聚体		14.2	7.9
四聚体		12.7	5.3
五聚体		9.8	3.9
六聚体		8.3	5.7
七聚体		3.8	4.7
八聚体		3	5
九聚体		4.3	11.9
十聚体		0.8	6.4
总计		100	100

(0093) 表 4:

	高 CP 产品	对照产品
包装编码	852	217
包装尺寸, g	31	31
mg CP	451.1	18.2
卡路里	118.7	117.2
总脂肪, g	1.4	1.5
饱和脂肪, g	0.8	0.8
胆固醇, mg	4.4	4.9
钠, mg	105.1	155.0
总碳, g	17.1	16.5
食用纤维, g	3.0	3.9
糖, g	9.4	9.2
蛋白质, g	9.4	9.4
mg 咖啡因	18.3	21.2
mg 可可碱	336.5	327.4

(0094) 表 5:

矿物质

	高 CP 产品	对照产品
	mg/g	mg/g
钠, mg	105.1	155.0
钾, mg	530.1	644.8
钙, mg	243.7	241.2
铁, mg	1.9	2.9
磷, mg	280.2	265.4
镁, mg	85.9	78.4

锌, mg	1.6	1.6
铜, mg	0.4	0.4
锰, mg	0.6	0.6

(0095) 为控制微量/大量营养物质和生物碱, 每次食用 2 袋; 对于高 CP 饮料, 给予 2 袋高 CP 产品; 对于中等 CP, 给予 1 袋高 CP 产品和 1 袋对照产品; 对于对照 CP, 给予 2 袋对照产品。

评价

认知要求成套测试

(0096) 在该研究中, 我们进行我们的 ‘认知要求成套测试’ (CDB)。参与者接受 3 种含以下物质的饮料: (i) 36.4 mg 可可多酚(对照), (ii) 469.3 mg 可可多酚(中等 CP), 和(iii) 902.2 mg 可可多酚(高 CP)。研究日包括由连续 3 (2 分钟)、连续 7 (2 分钟)、快速视觉信息处理任务(RVIP, 5 分钟)和智力要求视觉模拟量程(1 分钟)组成的 CDB。在来实验室时取唾液样品以分析咖啡因水平。在每个研究日, 参与者执行每个任务 1 次, 以减轻练习影响。这之后是基线期, 之后立即为该日的治疗, 其至多允许 5 分钟。饮料食用结束代表 T=0。允许 90 分钟时间段的吸收, 此后参与者紧接着连续进行 6 次 CDB, 之后第 2 次唾液采样, 用于测定咖啡因水平。(在 CDB 中的)这些任务的目标是评价治疗对持续认知要求的影响。由于参与者在约 1 小时的时间段内重复完成 3 次这样的测验, 该阶段中的总体认知量增加。

(0097) 连续减法

(0098) 这些任务评价给予的干预和 ‘智力要求’ 之间的相互作用。

(0099) 使用修改的计算机化形式的连续 7 测验(Haskell, C.F.等, *Psychopharmacology*, 2005, 179:813-825)。初始的口头连续 7 测验以多种形式出现, 包括作为用于痴呆的最低智力状态检验的组成部分。其

已用于评价低血糖当中的认知损伤,还已用于研究血糖水平增加和认知能力之间的关联 (Kennedy D. O. 和 Scholey, A. B., *Psychopharmacology*, 2000, 149:63-71; Scholey, A, B,等, *Physiology & Behavior*, 2001, 73:585-592)。

(00100) 在本研究中,使用 2 分钟时程的测验执行计算机版本的连续减法。对于连续 7 任务,标准指示屏告知参与者由给出数字以 7 倒数,使用数字小键盘尽可能快而准地输入每个响应。参与者还被口头告知,如果他们出错,则他们应由新的错误数字进行减法。在计算机屏幕上呈现介于 800 和 999 之间的随机开始数字,其通过输入第一个响应被清除。经数字小键盘输入每 3 位数字响应,每个数字在屏幕上以星号代表。按压回车键发出每个响应结束的信号,3 个星号由屏幕上消失。记录该任务的减法总数和错误总数。对于不正确的响应,如果随后的响应相对于新数字为正确的,则随后的响应被记录为正值。

(00101) 连续 3 任务与连续 7 相同,只是其包含连续减 3。

(00102) 快速视觉信息处理任务

(00103) 该任务已广泛用于研究精神药物干涉的认知作用。参与者监测一连串数字,目标是 3 个连续奇数或 3 个连续偶数。数字以 100 个/分钟的速率呈现,参与者通过尽可能快地按压响应键对发现目标串做出反应。该任务是连续的,并持续 5 分钟,每分钟提供 8 个正确的目标串。记录该任务的正确发现的目标串的百分率、正确发现的平均反应时间和误报数。

(00104) 主观量表(智力要求视觉模拟量表)

(00105) 在每组任务结束时,要求参与者通过对终点标记“一点也不”和“极度”的 100 mm 线定位,表示他们的心理疲劳程度。

结果

(00106) 结果示于图 4(a-d)。结果表明了补充黄烷醇/原花青素的

可可饮料对认知效力/能力的某些方面的有益作用。

实施例 3: 评价可可多酚对非智力要求任务的急性行为作用

方法

(00107) 该研究允许调查独立于智力要求情境的可可多酚作用,并允许评价可可多酚作用是否仅限于智力要求情境。

(00108) 在参与研究之前,志愿者签署知会同意表,并完成医学健康调查表。所有参与者都报告他们健康良好,且远离社交药品和药物,避孕药丸除外。有烟瘾者被排除在研究之外。

(00109) 将 30 名参与者招募到研究中,并告知研究目标是研究含活性成分(其中一种可能是咖啡因)的可可饮料的认知和情感作用。参与者在首个测验任务前至少 12 小时和整个早晨戒除咖啡因和酒精,直至完成最后一个测验任务。提供日记,以便让参与者记录每个研究日的首个测验任务之前 24 小时和整个研究随访中所食用的所有食品和饮料。建议参与者在每个研究日之前的 24 小时避免高类黄酮含量的食品和饮料。这要求限制类黄酮膳食,以允许监测血浆黄烷醇水平的急性改变。

唾液咖啡因水平

(00110) 使用唾液收集器获得唾液样品。在基线评价之后立即取样,以便证实整夜依从禁戒,之后立即执行每个治疗后评价任务,以证实情境之间的均一咖啡因吸收。立即将唾液样品冷冻在-20°C,直至融化,以用于使用 Emit 系统(Syva, Palo Alto, USA)进行内部分批分析。这是一种预期用于检测为代谢物的咖啡因的酶免疫测定,基于咖啡因和酶标记药物之间对抗体结合位点的竞争。

血浆黄烷醇水平

(00111) 临基线评价之前和临治疗后 90 分钟时间段之前,取 2 ml 静脉血样,用于测定黄烷醇水平。这些血样使用含 EDTA 的 monovette

通过静脉穿刺采集。然后将样品保持在冰上，直至于 5°C 温度以 3,000 rpm 离心 10 分钟。使用 Gilson 移液管将 1485 µl 产生的血浆量取入琥珀管中。还制备了新鲜的抗坏血酸溶液(570 mM/100.4 mg/ml)，保持在冰上，并避光。然后将 15 µl 该溶液加至 1485 µl 血浆，混合，并储存于-70°C。遗憾的是，由于技术难度，不可能分析这些样品。

评价

成套认知药物研究(CDR)

(00112) 已有 500 多个欧洲和北美药物试验使用了 CDR 系统，已表明其对于由多种物质造成的认知改善以及损伤敏感。

(00113) 使用改良形式的成套测试，其类似于先前已发现对由于摄入众多营养品所致的认知功能改善敏感的成套测试。从系统中选择计算机控制的任务与在每一测验期提供的并行形式的测验一起执行。显像借助于便携电脑的彩色显示器，除了写词回忆测验外，所有的反应都由双键(YES/NO)反应盒记录。

(00114) 整个测试的选择占时约 20 分钟，并按以下顺序执行：

(00115) 单词显示：频率和具体性匹配的 15 个词，按顺序显示于显示器上，供参与者记忆。刺激持续 1 秒，刺激之间的间隔时间也是 1 秒。

(00116) 即刻单词回忆：让参与者在 60 秒内写下尽可能多的单词。记录该任务的正确和错误数。

(00117) 图像显示：以每 3 秒钟 1 幅的速度、1 秒刺激时程在显示器上顺序显示 20 幅照片，供参与者记忆。

(00118) 简单反应时间：告知参与者每次在显示器上显示单词‘YES’时尽可能快地按下‘YES’反应键。提供 50 个刺激，刺激之间的间隔在 1 秒至 3.5 秒之间随机变化。反应时间以毫秒记录。

(00119) 数字警觉任务：随机选择目标数字，并持续显示于显示屏右侧。以每分钟 80 个的速度在屏幕中央显示一系列数字，并要求

参与者每次在系列中的数字与目标数字匹配时尽可能快地按下‘YES’键。该任务持续3分钟，有45个刺激-目标匹配。任务测量为准确率(%)、反应时间(毫秒)和误报数。

(00120) 选择反应时间：在显示器上显示单词‘NO’或单词‘YES’，并要求参与者尽可能快地按下相应按键。有50个试验，其中刺激单词以相同几率随机选择，刺激之间的间隔在1秒至3.5秒之间随机变化。记录反应时间(毫秒)和准确率(%)。

(00121) 空间工作记忆：屏幕上显示一座房子的图像，其9个窗户中有4个亮着灯。指示参与者记住亮灯窗户的位置。在接下来的36张房子图片中，其中一个窗户亮灯，参与者判断其是否与原始图片中的其中一个亮灯窗户相匹配。参与者尽可能快的按下‘YES’或‘NO’反应键做出反应。平均反应时间以毫秒记，对原始和新(干扰)刺激的反应准确性以百分比记。

(00122) 数字工作记忆：顺序显示5个数字供参与者记忆。这之后为一列30个探测数字，参与者判断其中每个数字是否在原始数列中，并尽可能准而快地按下‘YES’或‘NO’反应键。使用不同的刺激和探测数字再重复两次。平均反应时间以毫秒记，对原始和新(干扰)刺激的反应准确性以百分比记。

(00123) 延迟的单词回忆：再次令参与者在60秒内写下尽可能多的单词。记录该任务的正确和错误数。

(00124) 延迟的单词识别：原始单词加上15个干扰单词以随机顺序每次显示一个。对于每一个词，参与者通过尽可能准而快地按下‘YES’或‘NO’键，来表示她是否认为该词包括在原始词列中。平均反应时间以毫秒记，对原始和新(干扰)刺激的反应准确性以百分比记。

(00125) 延迟的图像识别：原始图像加上20幅干扰图像以随机顺序每次显示一幅。对于每一张图像，参与者通过尽可能准而快地按下‘YES’或‘NO’反应键，来表示其是否认为该图在原始图列中。

平均反应时间以毫秒记，对原始和新(干扰)刺激的反应准确性以百分比记。

(00126) 下表指示每个任务评价哪个阶段的信息处理：

(00127) **表 6：水平 I：注意力**

选择、评价和响应于适宜的环境信息的能力

任务	认知状态和过程评价
简单反应时间	警觉 集中力 信息处理的主要阶段
选择反应时间	如上，加 刺激物辨别 响应组织
数字警觉	强烈警觉 保持集中 忽视干扰的能力

(00128) **表 7：水平 II：短期或工作记忆**

临时储存与正在进行的任务相关的信息的能力

任务	认知状态和过程评价
数字扫描	数字序列的默读复述 工作记忆的语音回路子系统
空间工作记忆	临时保留空间信息的能力 工作记忆的视觉-空间子回路

(00129) **表 8：水平 III：长期或情景的二级记忆**

在任何要求的时间段内牢记、储存和追溯信息的能力

任务	认知状态和过程评价
单词回忆	储存和回忆口头信息的能力

	无暗示追溯单词的能力 情景的二级口头回忆
单词识别	辨别新单词与先前提供的单词的能力(速度和敏感度) 情景的二级口头识别
图片识别	辨别新图片信息与先前提供的图片信息的能力 情景的二级非口头的视觉识别

(00130) Bond-Lader 视觉模拟量表(Bond A.和 Lader M., 1974, The use of analogue scales in rating subjective feelings, *British Journal of Psychology*, 47:211-218)。

(00131) 该检测由 16 个视觉模拟量表组成, 终点以反义词停住: 警觉-倦怠、平静-兴奋、强壮-虚弱、模糊-清楚、协调-笨拙、无精打采-精力旺盛、满意-不满、骚乱-稳定、反应缓慢-才思敏捷、紧张-放松、专注-恍惚、无能-精通、幸福-悲伤、敌对-友好、有趣-无聊、孤僻-合群。这些组合在一起形成 3 种“情绪”因子: ‘警觉’、‘平静’和‘满足’。

(00132) 精神运动警惕性任务(Dinges D. F.和 Powell J. W., 1985, Microcomputer analyses of performance on a portable, simple visual RT task during sustained operations. *Behavior Research, Methods, Instruments and Computers*, 17:652:655)。

(00133) 精神运动警惕性任务(PVT)是一种简单的便携式反应时间任务, 用于评价持续注意力。告知受治疗者一出现刺激物(LED-数字计数器)就用他们的惯用手的拇指按压按钮。在本研究中, 单次 PVT 实验的时程有 10 分钟。还在反应时间任务之前和之后使用 10 点量表用该装置对睡意评级。

治疗

(00134) 参与者于独立接受 3 种饮料, 其含有: 1) 36.4 mg 可可多酚(对照), 2) 469.3 mg 可可多酚(中等 CP), 3) 902.2 mg 多酚(高 CP)。

在每种情况下,治疗都由与 200 ml 热水混合的 2 袋粉末组成。对照治疗由 2 袋对照 CP 组成, 469.3 mg 剂量由 1 个对照袋加 1 个高 CP 袋组成, 902.2 mg 剂量由 2 个高 CP 袋组成。2 个袋的营养信息可见于实施例 2 的表 3-5。饮料容许在 5 分钟内饮用。

(00135) 每名参与者均被要求参加总共 4 个研究日, 这些研究日间隔不少于 3 天进行, 以确保情境之间的完全消除。测验在一套实验室中进行, 参与者在视觉上彼此隔离。第一阶段的第 1 天到达实验室时, 使用拉丁方设计将参与者随机分配给治疗方案, 所述设计平衡了 3 个研究有效日之间的治疗顺序。第一天包括完成 4 次成套测验。实施该测验是为了控制练习效果和使得熟悉成套测验和随后随访的程序。练习日数据不纳入任何分析中。

(00136) 3 个有效研究日的每一个均包含 4 个相同测验期。第一个是给药前测验期, 其建立该日的基线性能。这之后立即摄入该日的治疗品。其余的测验期于食用该日治疗品后 90 分钟、3 小时和 6 小时开始。每个测验期持续约 30 分钟, 包括完成成套 CDR 测验、Bond-Lader 视觉模拟情绪量表、10 分钟 PVT 和用唾液收集器产生唾液样品。另外, 给药前测验期和给药后 90 分钟测验期还包括在完成成套 CDR 测验前取 2 ml 静脉血浆样品。

(00137) 分析唾液咖啡因水平, 以评价对咖啡因戒除的依从性。

(00138) 在主要统计分析之前, 对给药前基线数据进行独立的、单因素的、重复的检测 ANOVA, 以确定治疗前的任何偶然性性能基线差异。

(00139) 使用 SPSS 12.0.1 分析单独任务结果记录的‘由基线的改变’。

(00140) 通过双因素重复检测 ANOVA [时间(给药后 1.5、3 和 6 小时)×治疗(469.3 mg CP/902.2 mg CP/对照)]分析每个检测的数据。

结果

(00141) 测定平均给药前基线和由每种情境的每个检测的基线记分的改变连同 F-值和治疗效果的概率。

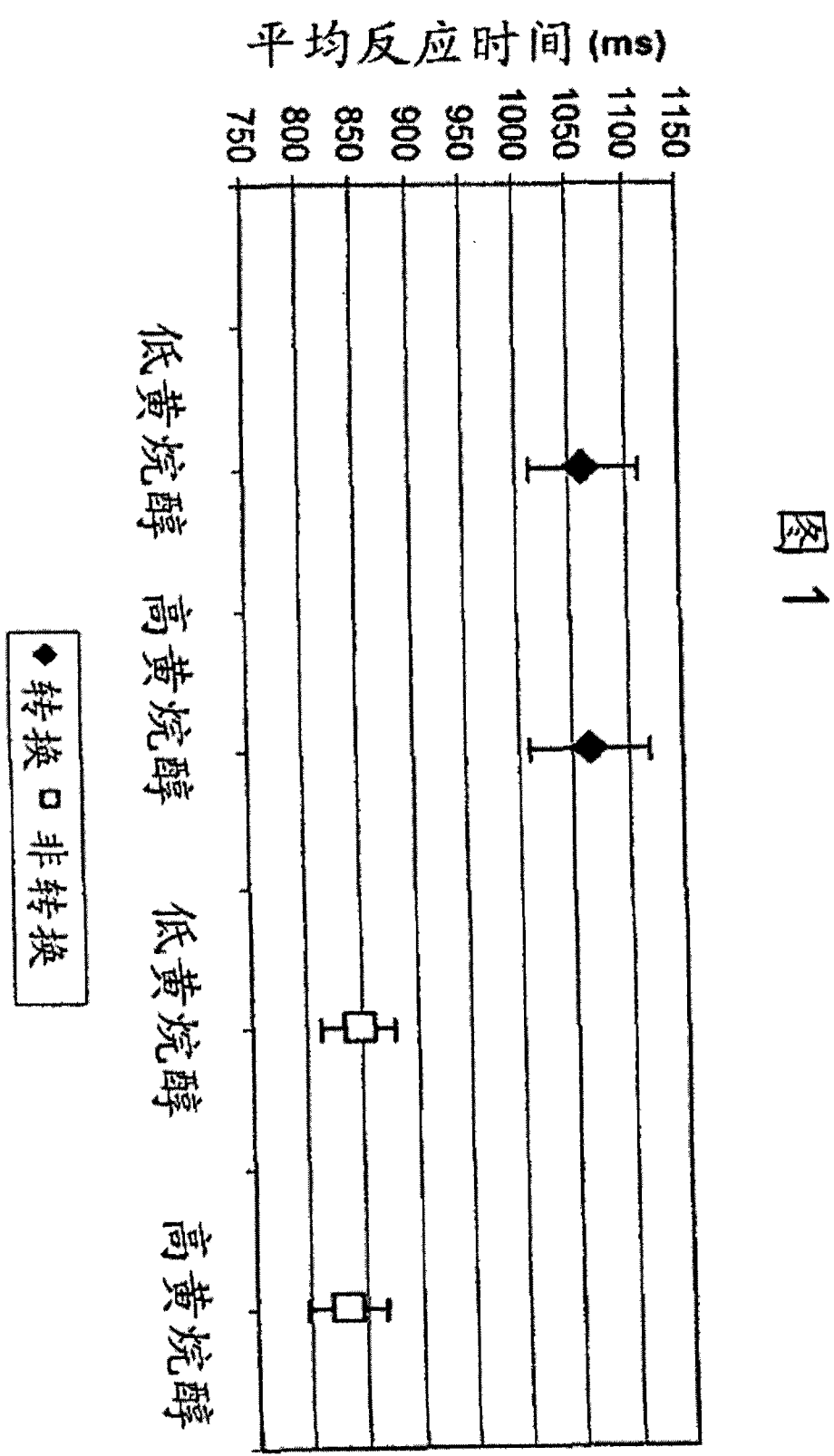
(00142) 在分析由基线数据的改变之前, 对每个结果检测的全部 3 种情境(对照、469.3 mg CP、902.2 mg CP)的平均给药前原始基线记分进行单因子、重复检测的 ANOVA。任何检测都没有显著的基线差异。

(00143) 唾液分析证实, 坚持咖啡因戒除指示具有平均基线咖啡因值 0.79 $\mu\text{g/ml}$ (业已报道, 过夜咖啡因戒除的水平刚好在 1 $\mu\text{g/ml}$ 之下—Evans 和 Griffith, 1999, Caffeine withdrawal: a parametric analysis of caffeine dosing conditions. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 289:285-294)。治疗后的唾液咖啡因水平分析揭示, 治疗情境之间没有显著差异。

治疗后记分

(00144) 任何检测都没有显著的治疗后差异。

(00145) 由 CDR 成套评价组成的任务就它们检测的能力而言是范围广泛的, 但它们是简单的任务, 不需要很多精力。该研究的结果表明, 在实施非智力要求任务的过程中, 本发明的化合物没有作用。



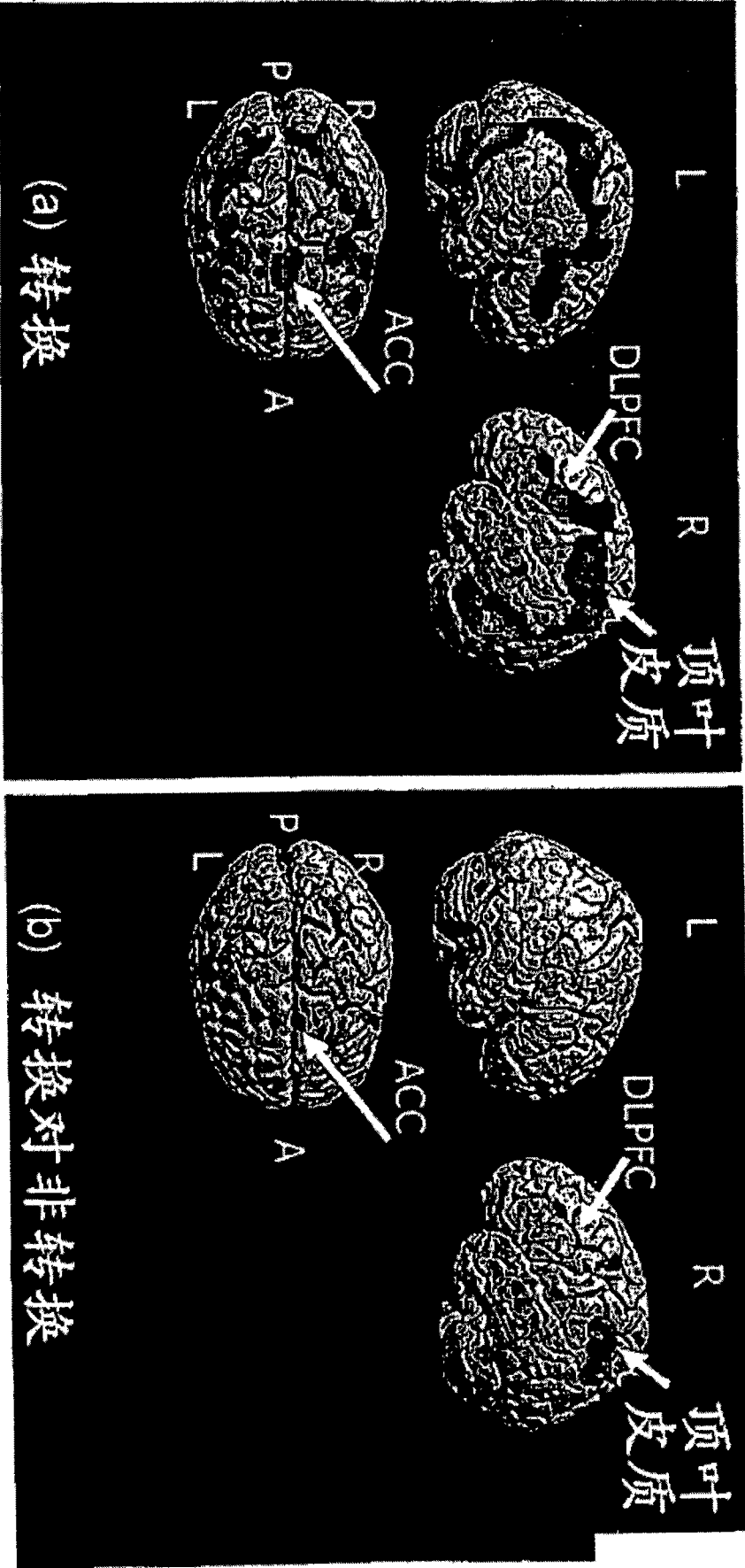


图 2

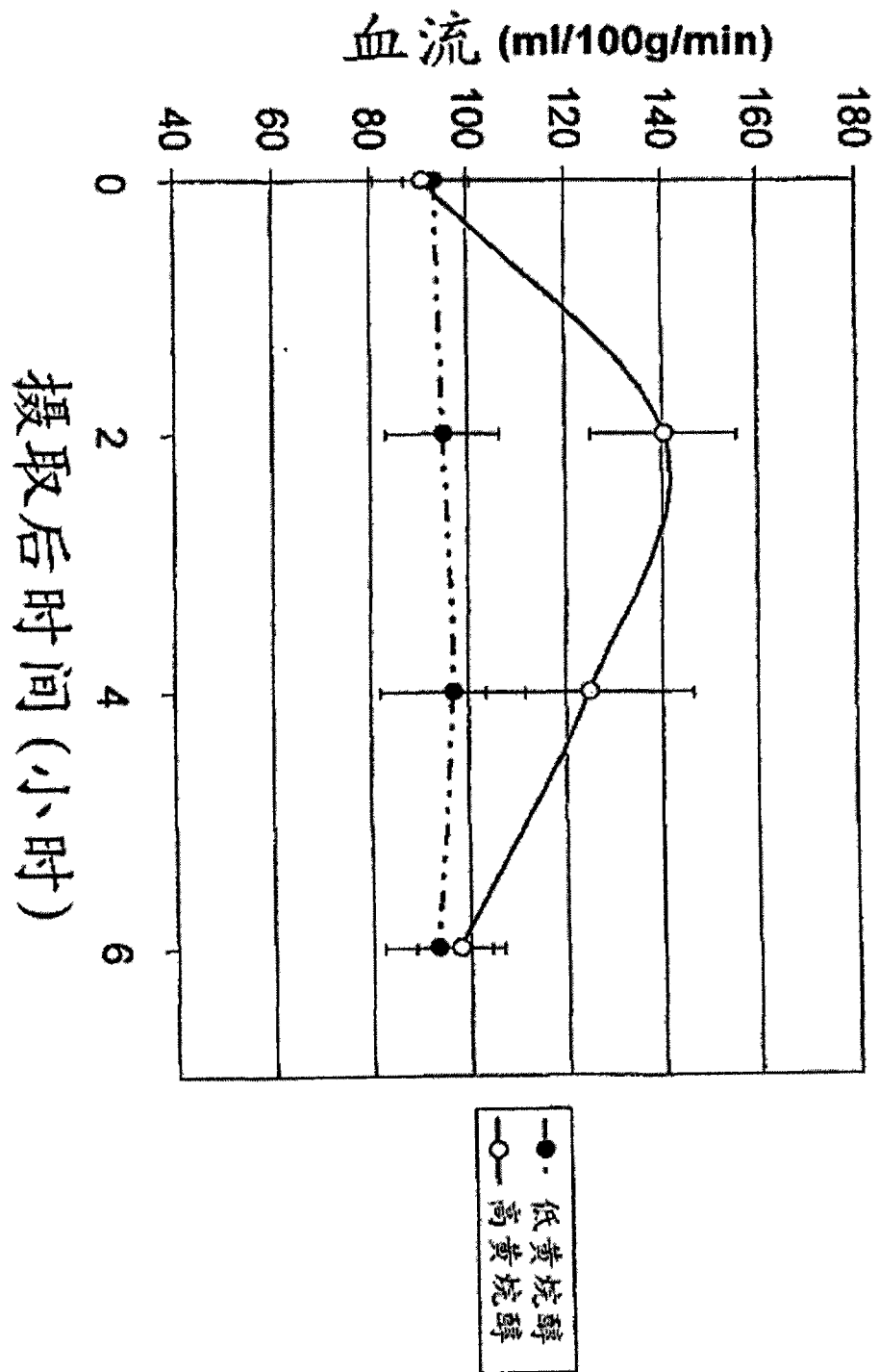


图 3

