



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 202131905 A

(43) 公開日：中華民國 110 (2021) 年 09 月 01 日

(21) 申請案號：109137549 (22) 申請日：中華民國 109 (2020) 年 10 月 29 日

(51) Int. Cl. : *A61K31/047 (2006.01)* *A23L33/105 (2016.01)*
A61K8/34 (2006.01) *A61P1/16 (2006.01)*
A61P3/00 (2006.01)

(30) 優先權：2019/10/30 日本 2019-197377

(71) 申請人：日商三得利控股股份有限公司 (日本) SUNTORY HOLDINGS LIMITED (JP)
 日本

(72) 發明人：笠島直樹 KASAJIMA, NAOKI (JP)；船木亜由太 FUNAKI, AYUTA (JP)

(74) 代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：5 項 圖式數：0 共 27 頁

(54) 名稱

TGR5 活化用組成物

(57) 摘要

本發明係以提供一種含有具 TGR5 活化作用，且對 TGR5 之選擇性較高的物質作為有效成分之 TGR5 活化用組成物及使用對 TGR5 之選擇性較高的物質來活化 TGR5 之方法為目的。
 本發明係有關於含有大豆皂醇類的 1 種以上作為有效成分之 TGR5 活化用組成物等。



202131905

【發明摘要】

【中文發明名稱】

T G R 5 活化用組成物

【中文】

本發明係以提供一種含有具 TGR5 活化作用，且對 TGR5 之選擇性較高的物質作為有效成分之 TGR5 活化用組成物及使用對 TGR5 之選擇性較高的物質來活化 TGR5 之方法為目的。

本發明係有關於含有大豆皂醇類的 1 種以上作為有效成分之 TGR5 活化用組成物等。

【指定代表圖】無

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

T G R 5 活化用組成物

【技術領域】

【0001】本發明係有關於一種TGR5活化用組成物。又，本發明係有關於活化TGR5之方法等。

【先前技術】

【0002】TGR5(Transmembrane G protein-coupled Receptor 5)為G蛋白耦合膽酸受體，係表現於骨骼肌、褐色脂肪組織等的多種組織。作為TGR5的生物體內配體，已知有膽汁酸。血液中的膽汁酸可經由與TGR5結合而活化細胞內訊息，而發揮抗肥胖、降血糖作用等。專利文獻1中記載大豆皂素等具有TGR5活化作用。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0003】

[專利文獻1]日本特開2016-27012號公報

【發明內容】

[發明所欲解決之課題]

【0004】受體之促效劑化合物通常期望提高對目標受體之選擇性。這是因為選擇性較低時，其容易結合於目標

以外的受體，而容易發生不易充分獲得期望之效果、會產生副作用等問題之故。對於 TGR5，亦要求具有 TGR5 活化作用，且對 TGR5 之選擇性較高的物質。然專利文獻 1 中並未探討 TGR5 活化劑對 TGR5 的選擇性。

【0005】本發明係以提供一種含有具 TGR5 活化作用，且對 TGR5 之選擇性較高的物質作為有效成分之 TGR5 活化用組成物為目的。又，本發明係以提供一種使用對 TGR5 之選擇性較高的物質來活化 TGR5 之方法為目的。

[解決課題之手段]

【0006】本案發明人等有鑑於上述課題而致力研究的結果發現，大豆皂醇類具有 TGR5 活化作用，且對 TGR5 之選擇性較高。

【0007】亦即，雖非限定於此，惟本發明係有關於以下之 TGR5 活化用組成物等。

[1]一種 TGR5 活化用組成物，其係含有大豆皂醇類的 1 種以上作為有效成分。

[2]如上述 [1] 之 TGR5 活化用組成物，其中大豆皂醇類的 1 種以上為大豆皂醇 A 及 / 或大豆皂醇 B。

[3]如上述 [1] 或 [2] 之 TGR5 活化用組成物，其係飲品、化妝料或準醫藥品。

[4]一種將 1 種以上之大豆皂醇類用來活化 TGR5 的用途。

[5]一種活化 TGR5 之方法，其係投予大豆皂醇類的 1 種

以上。

[發明之效果]

【0008】 根據本發明，係提供一種含有具 TGR5 活化作用，且對 TGR5 之選擇性較高的物質作為有效成分之 TGR5 活化用組成物等。本發明之 TGR5 活化用組成物，由於含有大豆皂醇類的 1 種以上作為有效成分，而具 TGR5 活化作用，且對 TGR5 之選擇性較高。本發明中所使用之大豆皂醇類係自古以來作為飲食品供人攝取之成分，於安全性高且可持續攝取上亦屬有利。又，根據本發明，可提供一種使用對 TGR5 之選擇性較高的物質來活化 TGR5 之方法。

【實施方式】

[實施發明之形態]

【0009】 本發明之 TGR5 活化用組成物係含有大豆皂醇類的 1 種以上作為有效成分。

於本發明中，TGR5 (Transmembrane G protein-coupled Receptor 5) 較佳為人類 TGR5 (hTGR5)。

大豆皂醇類 (亦可稱大豆皂醇化合物) 係具有活化 TGR5 之作用 (促效劑作用)。大豆皂醇類係具有使 TGR5 而提高細胞內 cAMP 濃度之作用。大豆皂醇類係具有對 TGR5 之選擇性高之特徵。

【0010】 大豆皂醇類係含於大豆 (學名：Glycine max)

等豆科植物等的化合物。大豆皂醇類為三萜系化合物的一種。於本發明中，作為大豆皂醇的1種以上，可僅使用1種化合物，亦可使用2種以上的化合物。於一樣態中，本發明之TGR5活化用組成物可為僅含有大豆皂醇類的1種以上作為有效成分者。

【0011】大豆皂醇類可舉出大豆皂醇A、大豆皂醇B、大豆皂醇C等。大豆皂醇類的1種以上，較佳為大豆皂醇A及/或大豆皂醇B。其中，基於對TGR5之選擇性較高之觀點，較佳為大豆皂醇B。於一樣態中，大豆皂醇類使用大豆皂醇A及大豆皂醇B時，此等之比率不特別限定。大豆皂醇A：大豆皂醇B(重量比)可為例如1：99～99：1、10：90～90：10或10：90～30：70。

【0012】就用以獲得大豆皂醇類的來源、製法不特別限制。富含大豆皂醇類的植物或其部位，已知有大豆(尤為大豆種子(大豆))、紅豆(學名：Vigna angularis)(尤為紅豆種子(赤小豆))、葛根等。可由此等植物，以週知方法萃取出大豆皂醇類並予以純化而調製。大豆皂醇類亦可藉由將大豆皂苷類以週知方法水解而得。大豆皂醇類亦可使用市售品。

【0013】於本發明中，只要可發揮本發明之效果，則亦可使本發明之組成物含有源於富含大豆皂醇類的1種以上之植物的原料。源於富含大豆皂醇類的1種以上之植物的原料，可使用例如生大豆種子或大豆種子藉由冷凍乾燥等而經乾燥者、將大豆種子藉由熱水或有機溶劑進行萃取

而得的液體(萃取液)經濃縮或冷凍乾燥者，或將萃取液之乾燥物以管柱等純化，並將大豆皂醇類高純度化而得者等。此種源於含有大豆皂醇類的1種以上之植物的原料亦可使用市售品，也可由大豆等植物以週知方法來調製。

【0014】若具有活化(促效劑)作用的物質結合於TGR5，則細胞內的環狀腺苷單磷酸鹽(cAMP)濃度會上升。經由此cAMP濃度的上升，可活化目標基因的轉錄而發揮各種作用。TGR5的活化可藉由採報導基因分析的活性評估、或TGR5訊息下游之基因表現的解析來確認。

於一樣態中，本發明之TGR5活化用組成物可使用於提升細胞內cAMP濃度。

【0015】已有人報導，若活化TGR5，則可促進肌肉細胞的分化，或對於使TGR5於骨骼肌專一性地高表現之小鼠，可增加肌肉量(Sasaki et al., J. Biol. Chem.(2018) 293(26), 10322-10332)。從而，TGR5的活化可達肌肉量的增加。藉由肌肉量增加，可獲得抑制肌力降低、維持肌力、回復肌力、提升肌力等效果。

此外，TGR5的活化，在例如骨骼肌或褐色脂肪細胞中，可經由細胞內cAMP濃度的上升而提升粒線體活性，而促進熱產生、改善能量代謝、增加脂肪酸氧化。從而，經由TGR5的活化，可獲得促進熱產生、預防或改善肥胖等效果。又，透過肌肉量增加、粒線體活性上升，可望獲致提升運動機能、提升持久力、抑制疲勞等效果。

【0016】腸管內分泌細胞在L細胞中之TGR5的活化可

促進糖代謝。從而，經由TGR5的活化，可獲得降血糖效果。又，有人報導膽汁酸經由TGR5的活化，可亢進消化道運動並由此發揮改善便秘之作用(Alemi et al., Gastroenterology. 2013 Jan ; 144(1) : 145-154.)。除上述以外，有人報導TGR5活化亦可抑制酒精性脂肪肝(Iracheta-Vellve A et al., Hepatol Commun. 2018 Oct 15 ; 2(11) : 1379-1391)。本發明之TGR5活化用組成物，藉由活化TGR5，可望發揮如上述之作用。

【0017】大豆皂醇類經由活化TGR5，可望發揮抑制肌肉量減少、維持、回復或增加肌肉量、抑制肌力降低、維持、回復或提升肌力、提升運動機能、提升持久力、抑制疲勞、預防或改善運動障礙症候群或肌少症、預防或改善肥胖、降血糖、促進熱產生、改善能量代謝、亢進消化道運動、預防或改善酒精性脂肪肝、預防或改善代謝症候群等效果。

本發明之TGR5活化用組成物可使用於藉由活化TGR5，而得到如上述之效果者。於一樣態中，本發明之TGR5活化用組成物可使用於例如抑制肌肉量減少、維持、回復或增加肌肉量；抑制肌力降低、維持、回復或提升肌力；提升運動機能或提升持久力等。於一樣態中，本發明之TGR5活化用組成物可使用於例如抑制疲勞、預防或改善運動障礙症候群或者肌少症、預防或改善肥胖、降血糖、促進熱產生、改善能量代謝、亢進消化道運動、預防或改善酒精性脂肪肝、預防或改善代謝症候群等。

於本發明中，預防係包含防止發病、延緩發病、降低發病率、減輕發病的風險等。狀態或疾病的改善係包含使對象由狀態或疾病恢復健康、減輕狀態或疾病的症狀、使狀態或疾病的症狀好轉、延緩或防止狀態或疾病的惡化等。

【0018】 本發明之 TGR5 活化用組成物可適用於治療用途(醫療用途)或非治療用途(非醫療用途)任一種。

本發明之 TGR5 活化用組成物能以例如飲食品、化妝料、醫藥品、準醫藥品、飼料等形態提供，但不限定於此等。本發明之 TGR5 活化用組成物，其本身可為飲食品、化妝料、醫藥品、準醫藥品、飼料等，亦可為使用於此等之添加劑等的製劑、素材。本發明之 TGR5 活化用組成物，就其一例，能以製劑形態提供，但非限定於本形態。亦可將該製劑以組成物、或以包含該製劑之組成物提供。

於一樣態中，本發明之 TGR5 活化用組成物可為口服用組成物或非口服用組成物，較佳為口服用組成物。口服用組成物可舉出飲食品、口服用醫藥品、口服用準醫藥品、飼料，較佳為飲食品。非口服用組成物可舉出非口服用醫藥品、非口服用準醫藥品、化妝料。

【0019】 本發明之 TGR5 活化用組成物，只要不損及本發明之效果，則除了上述之大豆皂醇類以外，亦可含有任意之添加劑、任意之成分。此等添加劑及成分可依據組成物之形態等來選擇，可使用一般能使用於飲食品、化妝料、醫藥品、準醫藥品、飼料等者。任意之添加劑或成分

可使用1種，亦可組合使用2種以上。

作為任意之添加劑或成分的一例，可舉出支鏈胺基酸(纈胺酸、白胺酸、異白胺酸等)等各種胺基酸及其鹽；胺基酸的代謝產物(例如 β -羥基- β -甲基丁酸(HMB等))及其鹽(HMBCa等)；源自乳之蛋白質(酪蛋白蛋白質、乳清蛋白質等)、源自大豆之蛋白質、源自米之蛋白質、源自魚肉之蛋白質、源自小麥之蛋白質、源自豌豆之蛋白質、膠原蛋白等蛋白質；咪唑胥肽、乳胥肽、大豆胥肽、膠原蛋白胥肽等胥肽；硫酸軟骨素及其鹽、蛋白聚糖及其鹽等黏多糖或含有此等之鯊魚軟骨萃取物；維生素D、維生素B1、維生素B6、維生素B12、維生素E、維生素C等維生素類；鈣、鎂等礦物質類；槲皮素及其配醣體、原花青素、源於天草之多酚、核桃多酚、葡萄籽多酚、葡萄糖胺及其鹽、肌酸、葉酸、檸檬酸、 γ -穀維素等。

又，作為任意之添加劑或成分的一例，可舉出於製劑化中所摻混之賦形劑、黏合劑、乳化劑、張力劑(等滲壓劑)、緩衝劑、助溶劑、防腐劑、安定化劑、抗氧化劑、著色劑、凝固劑、包衣劑、香料等。

【0020】擬將本發明之TGR5活化用組成物作成飲食品時，可對大豆皂醇類的1種以上摻混可使用於飲食品之成分(例如上述任意成分等的飲食品素材、視需求使用之添加劑等)，而作成各種的飲食品。飲食品不特別限定，可舉出例如一般的飲食品、健康食品、機能性標示食品、特定保健用食品、病患用飲食品、食品添加劑、健康補助

食品、此等之原料等。飲食品之形態亦不特別限定，可舉出固態、半流動狀、流動狀等。飲食品可作成錠劑、被覆錠劑、細粒劑、顆粒劑、散劑、丸藥、膠囊劑、乾糖漿劑、嚼錠劑等口服用固形製劑；內服液劑、糖漿等口服用液體製劑的各種製劑形態。

【0021】擬將本發明之TGR5活化用組成物作成化妝料時，可對大豆皂醇類的1種以上摻混化妝料可容許之載體、添加劑等。化妝料之製品形態不特別限定。

【0022】擬將本發明之TGR5活化用組成物作成醫藥品或準醫藥品時，可對大豆皂醇類的1種以上摻混藥理學上可容許之賦形劑等，而作成各種劑形的醫藥品或準醫藥品。醫藥品或準醫藥品之投予形態可為口服投予或非口服投予。基於更充分獲得本發明效果之觀點，投予形態較佳為口服投予。劑形只要採用適於投予之劑形即可。口服用醫藥品或口服用準醫藥品之劑形可舉出例如錠劑、被覆錠劑、細粒劑、顆粒劑、散劑、丸藥、膠囊劑、乾糖漿劑、嚼錠劑等口服用固形製劑；內服液劑、糖漿等口服用液體製劑。非口服用醫藥品或非口服用準醫藥品之劑形可舉出注射劑、點滴、軟膏劑、洗劑、貼附劑、栓劑、鼻噴劑、經肺劑(吸入劑)等。醫藥品亦可為非人類動物用醫藥。

【0023】擬將本發明之TGR5活化用組成物作成飼料時，可對大豆皂醇類的1種以上摻混可使用於飼料的成分而作成飼料。飼料可舉出例如供牛、豬、雞、羊、馬等食用之家畜用飼料；供兔子、天竺鼠、大鼠、小鼠等食用之

小動物用飼料；供犬、貓、小鳥等食用之寵物食品等。

【0024】擬將本發明之TGR5活化用組成物作成飲品、化妝料、醫藥品、準醫藥品、飼料等時，其製造方法不特別限定，可使用大豆皂醇類的1種以上，根據一般方法來製造。

於本發明之TGR5活化用組成物的製造時，大豆皂醇類可使用經純化之化合物，亦可使用上述源於富含大豆皂醇類的1種以上之植物的原料。大豆皂醇類能以源於含有該化合物之植物的原料之形態含於組成物。

【0025】就本發明之TGR5活化用組成物，可於包裝、容器或說明書等標示用途、有效成分的種類、上述之效果、使用方法(例如攝取方法、投予方法)等的1種或2種以上。本發明之TGR5活化用組成物可附加有具有TGR5活化作用、或此作用所產生之作用之意旨的標示。於一樣態中，本發明之TGR5活化用組成物可附加例如「抑制肌肉減少」、「維持肌肉」、「增加肌肉」、「改善肌肉」、「抑制肌力降低」、「維持肌力」、「增加肌力」、「改善肌力」、「支援肌肉生長力」、「改善步行機能」、「維持步行機能」、「改善運動機能」、「維持運動機能」、「維持因年齡增長而衰弱的肌肉」及「維持因年齡增長而衰弱的肌力」等的1種或2種以上的標示。

【0026】於一樣態中，本發明之TGR5活化用組成物可附加例如「抗肥胖」、「預防肥胖」、「改善肥胖」、「縮減腰圍」、「維持腰圍」、「保持苗條的身材」、

「抑制體脂肪累積」、「降低體脂肪」、「抑制內臟脂肪的累積」、「降低內臟脂肪」、「抑制肝臟中的脂肪累積」、「降低肝臟中的脂肪」、「減少體重」、「減量」、「減肥」、「燃燒脂肪」、「消耗脂肪」、「代謝脂質」、「粒線體機能」、「產生熱」、「基礎代謝」、「代謝機能」、「代謝力」、「預防代謝症候群」、「改善代謝症候群」等的1種或2種以上之機能的標示。

又，於另一樣態中，本發明之TGR5活化用組成物可附加例如「抑制飯後血糖值上升」、「穩定飯後血糖值的上升」、「降低血糖值」、「供予注意血糖值者」、「供予注意飯後血糖值者」、「改善血糖值易上升之體質」等的1種或2種以上的標示。

【0027】本發明之TGR5活化用組成物中之大豆皂醇類的含量可依據該組成物之形態等適宜設定。例如，大豆皂醇類的總含量，於組成物中可為0.0001～95重量%、0.001～90重量%或0.01～90重量%。於一樣態中，將本發明之TGR5活化用組成物作成飲食品、醫藥品、準醫藥品等的口服用組成物時，大豆皂醇類的總含量，於組成物中較佳為0.01重量%以上，更佳為0.2重量%以上；又較佳為20重量%以下，更佳為10重量%以下。於一樣態中，大豆皂醇類的總含量，於本發明之TGR5活化用組成物中較佳為0.01～20重量%，更佳為0.2～10重量%。上述總含量，當大豆皂醇類化合物含有2種以上時，係彼等的合計量。大豆皂醇類的含量可依循週知方法來測定，例如可採用

HPLC法等。

【0028】本發明之TGR5活化用組成物能以對應其形態的適當方法攝取或投予。本發明之TGR5活化用組成物較佳為經口服投予或口服攝取。

本發明之TGR5活化用組成物的攝取量(亦可稱投予量)不特別限定，只要是如可獲得TGR5活化效果的量(有效量)即可，只要依據投予形態、投予方法、體重等適宜設定即可。例如以人類(成人)為對象使其口服投予或攝取時，作為大豆皂醇類的總攝取量，每日較佳為5mg以上，更佳為10mg以上，再更佳為20mg以上；又較佳為500mg以下，更佳為200mg以下，再更佳為100mg以下。就其一樣態，以人類(成人)為對象使其口服投予或攝取時，作為大豆皂醇類的總攝取量，每日較佳為5~500mg，更佳為10~200mg，再更佳為20~100mg。較佳將上述量分作例如1日1次或2~3次而使其口服投予或攝取。以人類(成人)為對象獲得TGR5活化效果為目的而使其攝取本發明之TGR5活化用組成物時，較佳為以按每日每體重60kg，大豆皂醇類的總攝取量達上述範圍的方式使對象口服攝取或對其投予本發明之組成物。

【0029】於一樣態中，本發明之TGR5活化用組成物較佳考量其形態、投予方法等而含有如可獲得本發明期望之效果的量，亦即有效量的上述大豆皂醇類。就其一樣態，例如本發明之TGR5活化用組成物為飲食品、口服用醫藥品等的口服用組成物時，在該組成物之成人每人每日

每體重 60kg 的攝取量中，大豆皂醇類的總含量較佳為 5～500mg，更佳為 10～200mg，再更佳為 20～100mg。

【0030】投予或攝取本發明之 TGR5 活化用組成物的對象(以下簡稱為投予對象)較佳為哺乳動物(人類或非人類哺乳動物)，更佳為人類。本發明中的投予對象較佳為需要或希望 TGR5 活化的對象。又，於一樣態中，本發明中的投予對象亦可舉出需要或希望增加肌肉量、抑制肌肉量減少、維持或回復肌肉量的對象；需要或希望增加肌力、抑制肌力降低、維持或提升肌力的對象；需要或希望提升運動機能或提升持久力的對象等。

【0031】本發明亦包含以下之活化 TGR5 之方法、用來活化 TGR5 的用途。

一種活化 TGR5 之方法，其係投予大豆皂醇類的 1 種以上。

一種將 1 種以上之大豆皂醇類用來活化 TGR5 的用途。

上述方法可為治療性方法或非治療性方法。上述使用可為治療性使用或非治療性使用。

若對對象投予大豆皂醇類的 1 種以上，則可活化對象的 TGR5。大豆皂醇類可使用於活化對象的 TGR5。

於上述方法及使用中，只要使用可獲得期望之作用的量(亦可稱為有效量)的大豆皂醇類即可。大豆皂醇類、對象、投予方法、投予量、該等之較佳樣態等係與上述之 TGR5 活化用組成物相同。大豆皂醇類可直接投予，亦可作成包含其之組成物來投予。例如，亦可投予上述之本發

明之 TGR5 活化用組成物。

【0032】本發明亦包含一種將 1 種以上之大豆皂醇類用來製造 TGR5 活化用組成物的用途。TGR5 活化用組成物及其較佳樣態係與上述相同。

本說明書中所記載的所有學術文獻及專利文獻係載入本說明書以作為參照。

[實施例]

【0033】以下根據實施例更詳細地說明本發明，惟本發明之範圍非受其所限定。

【0034】

< 實施例 1 >

受試物質的 TGR5 活化作用係藉由螢光酵素分析來評估。

此評估體系中，人類 TGR5 (hTGR5) 的活化係以 TGR5 下游訊息之 cAMP response element binding protein (CREB) 的轉錄活化來判定。隨著細胞內 cAMP 濃度的增加，CREB 與 CRE (cAMP-responsive element) 的結合經活化，誘導螢光酵素基因的轉錄，而能夠藉由螢光酵素活性的定量來評估 CREB 的活化。

【0035】此外，為評估受試物質對 TGR5 之選擇性，除了使 hTGR5 強制表現之細胞 (亦稱 hTGR5 強制表現細胞) 外，亦與 hTGR5 同樣地針對替代 hTGR5 而使 G 蛋白耦合型受體之類升糖素胜肽 -1 (GLP-1) 受體 (GLP1R) 強制表現之細

胞(亦稱 hGLP1R 強制表現細胞)進行螢光酵素分析。
hGLP1R 強制表現細胞未表現 hTGR5。

GLP1R 及 TGR5 均為 G 蛋白耦合型受體，若 GLP1R 經活化則細胞內 cAMP 會上升。若藉由添加受試物質而於 hTGR5 強制表現細胞中使螢光酵素活性上升，則判斷為該物質具有 TGR5 活化作用。又，將受試物質添加於 hTGR5 強制表現細胞及 hGLP1R 強制表現細胞，hTGR5 強制表現細胞中的螢光酵素活性上升，相對於 hGLP1R 強制表現細胞中的螢光酵素活性上升愈大，可謂受試物質對 TGR5 之選擇性愈高。

【0036】

(表現載體的製作)

hTGR 表現載體 (pTGR5) 係依以下程序製作。

作為源自人類之 TGR5 基因的鹼基序列，係參照 NM_001077191，設計編碼人類 TGR5 之人工基因，而合成出 DNA。對真核生物用表現載體 pcDNA3.1(+)(Invitrogen(註冊商標)，Thermo Fisher Scientific 公司)，利用該載體的選殖位置 BamHI、EcoRI 插入合成之 DNA 而製成 hTGR 表現載體(質體)。轉形之宿主係使用 E.coli K12(dam+ dcm+ tonA)，調製成質體。所建構之 hTGR 表現載體係命名為 pTGR5。

【0037】 CRE 反應性螢光酵素表現載體 (pCRE/Luc) 係使用 Promega 公司製 pGL4.29[luc2P/CRE/Hygro]。此質體係保持與 cAMP response element (CRE) 連結之螢光酵素基

因的載體。

【0038】 將 pTGR5 及 pCRE/Luc 此 2 種質體導入大腸菌 JM109，培養轉形之大腸菌，並將足以實驗的量之質體純化。與將經純化之質體用於轉形的質體共同以多種限制酶進行處理並進行電泳，由此比較其酵素處理片段，並確認同一圖型，而確認經純化之質體與原本的載體維持同一構造(未顯示結果)。於以下實驗中，係使用上述中經純化之質體。

【0039】

(hTGR 強制表現細胞的製作)

於以下試驗中，DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)係使用 DMEM(High-glucose)(FUJIFILM Wako Pure Chemical 股份有限公司)。PBS(Phosphate Buffered Salts)係使用 Takara Bio 股份有限公司製品。

將 HEK293 細胞(人類胎兒腎細胞株，ATCC：CRL-2828)，在 DMEM-10%FBS(DMEM 中添加有 10% 胎牛血清(FBS)(Funakoshi 股份有限公司))的培養基中，使用 T75 燒瓶進行繼代培養。去除培養基，以 PBS(-)溶液 10mL 洗淨細胞。對細胞添加 1mL 的胰蛋白酶液(0.25% 胰蛋白酶-EDTA(NACALAI TESQUE 股份有限公司)以 PBS 溶液稀釋 10 倍者)，靜置約 30 秒，剝離細胞後加入 10mL 的培養基並回收細胞。將回收之細胞移至 50mL 離心管，以室溫、1000rpm 進行離心 3 分鐘。將所得團粒以 2mL 的培養基疏鬆開來，將其一部分以 0.2% 台盼藍稀釋 10 倍，使用血球計算

盤量測細胞數。在新的 T75 燒瓶中以細胞數成為 6×10^6 個 / 25mL 的方式分注培養基及細胞懸浮液，於恆溫箱內 (37°C 、 $5\% \text{CO}_2$) 培養約 22 小時，並將本細胞使用於質體導入。

【0040】 對 HEK293 細胞的質體導入係依以下程序進行。

在 1.5mL 試管中取 X-tremeGENE(註冊商標)(Roche 公司) $45\mu\text{L}$ ，添加室溫之 OptiMEM(註冊商標) I Reduced Serum Medium(Thermo Fisher Scientific 公司) $705\mu\text{L}$ 並迅速倒轉混合 2 次後，將液體快速離心 (spin down) 而得到 X-tremeGENE 稀釋液。於室溫下靜置 5 分鐘後，將質體 (hTGR5 表現載體 (pTGR) ($5\mu\text{g}$) 及 CRE 反應性螢光酵素表現載體 (pCRE/Luc) ($5\mu\text{g}$)) 添加於上述 X-tremeGENE 稀釋液 ($750\mu\text{L}$) 並迅速倒轉混合 2 次後，進行快速離心，於室溫下靜置 25 分鐘。於此 25 分鐘的期間，將上述播種 HEK293 細胞之 F75 燒瓶的培養基取代為 15mL 的 DMEM+5% FBS (無抗生素)。於室溫下靜置 25 分鐘後，將添加有上述之質體的 X-tremeGENE 稀釋液 $765\mu\text{L}$ 緩緩地添加 (滴加) 於燒瓶中的 HEK293 細胞，並緩緩地混合，在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 條件下培養 5 小時。去除培養基，以 PBS(-) 溶液 10mL 洗淨細胞。對細胞添加 1mL 的胰蛋白酶液 (0.25% 胰蛋白酶-EDTA 以 PBS 溶液稀釋 10 倍者)，靜置約 30 秒，剝離細胞後加入 10mL 的培養基並回收細胞。將回收之細胞移至 50mL 離心管，以室溫、1000rpm 進行離心 3 分鐘。將所得團粒以 2mL 的培養

基疏鬆開來，將其一部分以0.2%台盼藍稀釋10倍，使用血球計算盤量測細胞數。將細胞懸浮於種菌培養基(DMEM (不含FBS，含有青黴素/鏈黴素(FUJIFILM Wako Pure Chemical股份有限公司)))中，以75 μ L/井孔播種於96井孔白色透明孔板(Corning公司，Corning 96井孔白透明底部平底細胞培養表面處理聚苯乙烯微孔板)，於恆溫箱內(37 $^{\circ}$ C、5%CO₂)進行培養，而形成hTGR強制表現細胞。

【0041】

(hGLP1強制表現細胞的製作)

將表現人類GLP1受體(hGLP1R)基因之載體導入HEK293細胞，而製成強制表現hGLP1R的細胞。

hGLP1R表現載體係使用GLP1R (NM_002062) Human Untagged Clone(ORIGENE公司)。此表現載體係對載體pCMV6-XL5插入hGLP1R之基因，而具有表現hGLP1R之構造。

除使用上述之hGLP1R表現載體來替代hTGR5表現載體(pSTW01)以外，係以與上述同樣的方法對HEK293細胞導入hGLP1R表現載體，而得到hGLP1R強制表現細胞。

【0042】

(受試物質)

受試物質係使用大豆皂醇A、大豆皂醇B。又，為了比較，而使用大豆皂素(J-OIL MILLS股份有限公司製SAPONIN B-50)。

大豆皂醇 A 及大豆皂醇 B 係依下列方法調製。使 SAPONIN B-50(J-J-OIL MILLS 股份有限公司製)以 20 倍量在 2N 鹽酸水溶液中於 100°C 下反應 2 小時，而將皂素的糖鏈切斷。反應結束後，將反應液冷卻至室溫，以氫氧化鈉水溶液予以中和。將其反應液進行抽吸過濾，對殘渣以大量的蒸餾水洗淨，重複抽吸過濾，確認氫氧化鈉未殘留，加以乾燥而得到大豆皂醇粗區分(純度 50%：大豆皂醇 A 及 B 之合計)。藉由使用矽膠、己烷與乙酸乙酯之混合液的管柱層析法將此大豆皂醇粗區分進一步純化，而分別得到大豆皂醇 A(純度 99% 以上)及大豆皂醇 B(純度 99% 以上)。使用所得之大豆皂醇 A 及大豆皂醇 B。

【0043】

(螢光酵素活性的測定)

播種 hTGR 強制表現細胞並培養 24 小時後，添加受試物質(最終濃度：20 µg/mL)，進而培養 5 小時。受試物質(大豆皂醇 A、大豆皂醇 B 或大豆皂素)係使其溶解於二甲基亞砷(DMSO)而添加。又，添加 DMSO(使最終濃度為 0.1%)替代受試物質，而作為陰性對照組。於培養後以 75 µL/well 添加 Dual-Glo(註冊商標)Luciferase Assay System (Promega 公司)所附之 Dual-Glo Luciferase Assay Reagent，於室溫下保溫 10 分鐘後，使用多模式微量盤分析儀 FlexStation 3(MOLECULAR DEVICES 公司)測定發光強度。以發光強度作為螢光酵素活性。於此評估體系中，係使用海腎螢光酵素作為內標準。

【0044】為評估對hTGR5之選擇性，而使用hGLP1R強制表現細胞來替代hTGR5強制表現細胞，並與上述同樣地進行螢光酵素的發光測定。

【0045】為替代受試物質，作為陽性對照組係使Lithocholic acid(東京化成工業股份有限公司)溶解於DMSO並予以添加於hTGR5強制表現細胞及hGLP1R強制表現細胞(最終濃度3.3 μ M)，以上述方法測定發光強度。作為其他的陽性對照組，係使Tauro lithocholic Acid Sodium Salt(FUJIFILM Wako Pure Chemical股份有限公司)溶解於DMSO並予以添加於hTGR5強制表現細胞及hGLP1R強制表現細胞(最終濃度3.3 μ M)，以上述方法測定發光強度。就hTGR5強制表現細胞及hGLP1R強制表現細胞，添加任一種陽性對照組時，與陰性對照組(DMSO)相比均確認發光強度較強。

【0046】

(結果)

(TGR5活化作用)

添加有大豆皂醇A、大豆皂醇B或大豆皂素的hTGR5強制表現細胞，其比起陰性對照組發光強度均明顯較強，顯示大豆皂醇A、大豆皂醇B及大豆皂素具有hTGR5活化作用。

【0047】

(對hTGR5的選擇性)

將對hTGR5強制表現細胞添加DMSO之陰性對照組的

發光強度設為1時添加有受試物質之hTGR5強制表現細胞的發光強度之比(添加有受試物質之細胞的發光強度/陰性對照組的發光強度)係作為添加有受試物質之hTGR5強制表現細胞的螢光酵素活性(Luc-hTGR5)。

將對hGLP1R強制表現細胞添加DMSO之陰性對照組的發光強度設為1時添加有受試物質之hGLP1R強制表現細胞的發光強度之比(添加有受試物質之細胞的發光強度/陰性對照組的發光強度)係作為添加有受試物質之hGLP1R強制表現細胞的螢光酵素活性(Luc-hGLP1R)。

受試物質對TGR5之選擇性的評估係由hTGR5強制表現細胞的螢光酵素活性(Luc-hTGR5)相對於添加有受試物質之hGLP1R強制表現細胞的螢光酵素活性(Luc-hGLP1R)之比(Luc-hTGR5/Luc-hGLP1R)來評估。

【0048】將hTGR5強制表現細胞的螢光酵素活性(Luc-hhTGR5)相對於添加有受試物質之hGLP1R強制表現細胞的螢光酵素活性(Luc-hGLP1R)之比(Luc-hTGR5/Luc-hGLP1R)示於表1。此螢光酵素活性之比(Luc-hTGR5/Luc-hGLP1R)愈大，意指對hTGR5之選擇性愈高。

【0049】

[表 1]

	螢光酵素活性之比 (Luc-hTGR5/Luc-hGLP1R)
大豆皂醇A	1.60
大豆皂醇B	2.88
大豆皂素	0.13

【0050】由以上顯示，大豆皂醇A及大豆皂醇B係具有TGR5活化作用。又，就大豆皂醇A及大豆皂醇B，上述螢光酵素活性之比(Luc-hTGR5/Luc-hGLP1R)與大豆皂素相比明顯較高。從而，大豆皂醇A及大豆皂醇B，與大豆皂素相比對hTGR5之選擇性較高。

【0051】茲示出調製本發明之TGR5活化用組成物時之配方例的一例，惟本發明並非限定於此等。配方例中，大豆皂醇可使用例如大豆皂醇A及大豆皂醇B的混合物、大豆皂醇A或大豆皂醇B等。作為大豆皂醇A及大豆皂醇B的混合物，可使用例如大豆皂醇A：大豆皂醇B的重量比為1：99～99：1的混合物。下述之配方例僅為一例，例如亦可使用其他蛋白質來替代下述蛋白質。對於下述胜肽、胺基酸等亦同樣地可使用其他的胜肽、胺基酸等。

【0052】

< 配方例1 > 錠劑

大豆皂醇	67g
葡萄糖胺	500g
鯊魚軟骨萃取物	167g
蔗糖脂肪酸酯	90g
氧化矽	90g
澱粉	87g

將此等混合，以單發式壓錠機進行壓錠而製造直徑9mm、重量300mg的錠劑。

【0053】

< 配方例 2 > 錠劑

大豆皂醇 67g

支鏈胺基酸(BCAA) 333g

 β -羥基- β -甲基丁酸(HMB)鈣 133g

蔗糖脂肪酸酯 90g

氧化矽 90g

澱粉 253g

維生素 D 0.03g

蛋白聚糖 33g

將此等混合，以單發式壓錠機進行壓錠而製造直徑 9mm、重量 300mg 的錠劑。

【0054】

< 配方例 3 > 顆粒劑

大豆皂醇 5g

大豆蛋白質 350g

乳蛋白質 350g

大豆胜肽 50g

乳胜肽 50g

槲皮素配醣體 5g

葡萄籽多酚 5g

糊精 154g

增黏劑 30g

蔗糖素 0.5g

香料 0.5g

將以上粉體均勻混合後添加10%的羥丙基纖維素·乙醇溶液800mL，依常用方法予以攪和、擠出並乾燥而得到顆粒劑。

【0055】

< 配方例4 > 飲劑

DL-酒石酸鈉 0.10g

琥珀酸 0.01g

液糖 800.00g

檸檬酸 12.00g

維生素C 10.00g

大豆皂醇 0.50g

膠原蛋白 40.00g

環糊精 5.00g

乳化劑 5.00g

香料 15.00g

氯化鉀 1.00g

硫酸鎂 0.50g

摻合以上成分，加水調成一升。此飲劑係每次飲用100mL以上。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種TGR5活化用組成物，其係含有大豆皂醇(Soyasapogenol)類的1種以上作為有效成分。

【請求項2】如請求項1之TGR5活化用組成物，其中大豆皂醇類的1種以上為大豆皂醇A及/或大豆皂醇B。

【請求項3】如請求項1或2之TGR5活化用組成物，其係飲食品、化妝料或準醫藥品。

【請求項4】一種將1種以上之大豆皂醇類用來活化TGR5的用途。

【請求項5】一種活化TGR5之方法，其係投予大豆皂醇類的1種以上。