[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 31/202 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780006984.2

[43] 公开日 2009 年 3 月 18 日

[11] 公开号 CN 101389322A

[22] 申请日 2007.2.19
[21] 申请号 200780006984.2
[30] 优先权
[32] 2006.2.28 [33] US [31] 60/777,345
[86] 国际申请 PCT/US2007/004421 2007.2.19
[87] 国际公布 WO2007/100561 英 2007.9.7
[85] 进入国家阶段日期 2008.8.27
[71] 申请人 布里斯托尔—迈尔斯斯奎布公司
地址 美国新泽西州
共同申请人 康乃尔研究基金会有限公司
[72] 发明人 K·莫里斯 S·C·拉姆西
J·C·安东尼 T·J·布伦纳

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 刘 冬 付 磊

权利要求书 2 页 说明书 19 页

[54] 发明名称

二十二碳六烯酸和花生四烯酸在制备用于预防或治疗肥胖症的组合物中的用途

[57] 摘要

本发明涉及新的用于预防或治疗受治疗者的肥胖症的方法。 所述方法包括给予受治疗者治疗有效量的单独的或彼此组合的二十二碳六烯酸(DHA)和花生四烯酸(ARA)。

1. 适量的 DHA 和 ARA 在制备用于预防或治疗受治疗者的肥胖症的组合物中的用途。

2. 权利要求 1 的用途，其中所述受治疗者需要这种治疗或预防。

3. 权利要求 1 的用途，其中所述组合物中 ARA:DHA 的重量比为约 1:3 至约 9:1。

4. 权利要求 1 的用途，其中所述组合物中 ARA:DHA 的重量比约为 2:1。

5. 权利要求 1 的用途，其中所述组合物中 ARA:DHA 的重量比约为 1:1.5。

6. 权利要求 1 的用途，其中所述受治疗者是婴儿。

7. 权利要求 6 的用途，其中在婴儿自出生起直到 1 岁左右的时间内给予婴儿所述组合物。

8. 权利要求 6 的用途，其中所述组合物为婴儿配方奶粉。

9. 权利要求 8 的用途，其中所述婴儿配方奶粉包含 DHA 的量为每 100 kcal 婴儿配方奶粉约 15 mg 至约 60 mg。

10. 权利要求 8 的用途，其中所述婴儿配方奶粉包含 ARA 的量为每 100 kcal 婴儿配方奶粉约 25 mg 至约 40 mg。

11. 适量的 DHA 和 ARA 在制备用于增加受治疗者无脂肪肌肉质量和减少受治疗者脂肪组织的组合物中的用途。

12. 适量的 DHA 和 ARA 在制备用于增加婴儿无脂肪肌肉质量和减少婴儿脂肪组织的组合物中的用途，其中所述组合物中 ARA:DHA 的重量比为约 1:3 至约 9:1。

13. 所述组合物中 ARA:DHA 的重量比约为 2:1。

14. 权利要求 12 的用途，其中所述组合物中 ARA:DHA 的重量比约为 1:1.5。

15. 适量的 DHA 和 ARA 在制备用于在受治疗者骨骼肌中上调

IL-15 表达的组合物中的用途。

16. 适量的 DHA 和 ARA 在制备用于在受治疗者皮下脂肪组织中下调 IL-15 表达的组合物中的用途。

17. 适量的 DHA 和 ARA 在制备用于在受治疗者骨骼肌中上调脂连蛋白表达的组合物中的用途。

18. 适量的 DHA 和 ARA 在制备用于在受治疗者中下调肝瘦蛋白受体表达的组合物中的用途。

19. 适量的 DHA 在制备用于预防或治疗婴儿肥胖症的组合物中的用途。

20. 适量的 ARA 在制备用于预防或治疗婴儿肥胖症的组合物中的用途。

21. 适量的 DHA 在制备用于预防或治疗儿童肥胖症的组合物中的用途。

22. 权利要求 21 的用途，其中所述儿童的年龄介于 1-6 岁之间。

23. 权利要求 21 的用途，其中所述儿童的年龄介于 7-12 之间。

24. 权利要求 21 的用途，所述组合物还包含 ARA。

25. 适量的 ARA 在制备用于预防或治疗儿童肥胖症的组合物中的用途。

二十二碳六烯酸和花生四烯酸在制备用于预防或治疗肥胖症的组合物中的用途

发明背景

(1) 发明领域

[0001] 本发明总的来讲涉及用于预防或治疗肥胖症的方法。

(2) 相关技术的描述

[0002] 在美国，超过25%的成年人以及超过14%的儿童和青少年过于肥胖。肥胖症是一种要考虑多种因素的医学病症，例如体质指数(BMI)和腰围。例如，如果一个人的 BMI 超过 30，并且腰围超过 40 英寸，则就可被视为肥胖。肥胖症还要根据体内脂肪组织的量与无脂肪肌肉的量之比较来确定，脂肪组织是一种起脂肪主要贮存部位作用的特化结缔组织。肥胖症引发多种疾病，降低生命期望，是引起以下疾病的原因之一：高血压、呼吸问题、脑卒中、心脏病、糖尿病、高脂血症、高胆固醇水平、胆囊疾病、痛风、某些癌症类型和骨关节炎。

[0003] 有证据表明肥胖症可追溯自婴儿期直到成年期。Zive, M.M.等, *Infant-feeding Practices and Adiposity in 4-y-old Anglo- and Mexican-Americans* (4 岁英国裔和墨西哥裔美国儿童的婴儿期喂养习惯与肥胖症), Am. J. Clin. Nutr. 55:1104-1108 (1992)。实际上研究发现，肥胖成人中有三分之一曾是肥胖儿童，50%的肥胖青少年在婴儿期就已经肥胖。Mulhins, A.G., *The Prognosis in Juvenile Obesity* (青少年肥胖症的预后), Arch. Dis. Childhood 33:307-314 (1958); Poskitt, E.M.E., *The Fat Child* (肥胖儿童). Clin. Paediatr. Endocrin. 141-158 (1981)。

[0004] 虽然成人肥胖症可容易地通过 BMI 和腰围测量，但相同的 BMI 和腰围测量法并不适合于婴儿或儿童。研究人员和临床医生一

致认为，身体组成评价方法为婴儿或儿童生长和营养状况提供了要比身高和体重测量法好得多的测量方法，它测量的是体质量(amount of body mass)，表现为脂肪、骨和无脂肪肌肉的量。因此，预防儿童期、青春期或成年期肥胖症发生的最佳方法可能是改进婴儿期的身体组成。

[0005] 因此，提供一种可以改进婴儿和儿童的身体组成从而预防儿童期、青春期或成年期发生肥胖症的组合物将是有益的。另外，为了改进婴儿和儿童的身体组成而提供含有这种组合物的婴儿配方奶粉(infant formula)或营养补充剂(nutritional supplement)也是有益的。

发明概述

[0006] 概括地讲，本发明涉及新的用于预防或治疗受治疗者的肥胖症的方法，该方法包括给予受治疗者治疗有效量的单独的或者彼此组合的 DHA 或 ARA。受治疗者可以是婴儿或儿童。

[0007] 本发明还涉及用于增加受治疗者无脂肪肌肉质量(lean muscle mass)和减少受治疗者脂肪组织的新的方法，该方法包括给予受治疗者治疗有效量的单独的或者彼此组合的 DHA 或 ARA。另外，本发明涉及用于在受治疗者骨骼肌中上调 IL-15 表达的方法，该方法包括给予受治疗者治疗有效量的单独的或者彼此组合的 DHA 或 ARA。本发明另外涉及用于在受治疗者皮下脂肪组织中下调 IL-15 表达的方法，该方法包括给予受治疗者治疗有效量的单独的或者彼此组合的 DHA 或 ARA。

[0008] 此外，本发明涉及用于在受治疗者骨骼肌中上调脂连蛋白表达的方法，该方法包括给予受治疗者治疗有效量的单独的或者彼此组合的 DHA 或 ARA。另外，本发明涉及用于在受治疗者体内下调肝瘦蛋白受体表达的方法，该方法包括给予受治疗者治疗有效量的单独的或者彼此组合的 DHA 或 ARA。

[0009] 预防肥胖症的发生或者治疗肥胖症正是本发明所提供

的多个优势之一。本发明增加体内无脂肪肌肉的量并减少脂肪组织的量。因此，本发明还可预防与肥胖症相关的许多疾病和病症的发生。

优选实施方案详述

[00010] 现在将详细描述本发明的实施方案，其中一个或多个实施例将在下面进行描述。将以阐述本发明而不是限制本发明的方式来提供每个实施例。实际上，对于本领域技术人员显而易见的是，可在不偏离本发明的范围和精神的情况下，对本发明进行多种修改和变化。例如，作为一个实施方案的一部分所说明或描述的特征可用于另一个实施方案，以获得又一个实施方案。

[00011] 因此，本发明欲涵盖这些修改和变化，而这些修改和变化便落入随附权利要求及其等同内容的范围内。本发明的其它目的、特征和方面公开于以下详述中，或者从以下详述中是显而易见的。本领域普通技术人员应当理解的是，本发明的论述仅是示例性实施方案的描述，并无意限制本发明更广泛的方面。

[00012] 本文所用术语“上调”是指对基因表达的正调节作用。

[00013] 术语“下调”是指对基因表达的负调节作用。

[00014] 本文所用术语“表达”是指基因中编码的遗传信息通过转录传到信使RNA (mRNA)、转移RNA (tRNA)或核糖体RNA (rRNA)中。

[00015] 术语“治疗有效量”是指使疾病、病症或者疾病或病症的症状得到改善和医治的量。

[00016] 术语“婴儿”是指不满1岁的新生儿。

[00017] 术语“儿童”是指年龄介于1岁和12岁之间的人。在一些实施方案中，儿童的年龄介于1岁和6岁之间。在其它实施方案中，儿童的年龄介于7岁和12岁之间。

[00018] 本文所用术语“婴儿配方奶粉”是指作为人乳替代品满足婴儿营养需要的组合物。在美国，联邦法规对婴儿配方奶粉的含量

有强制性规定，相关法规颁布于 21 C.F.R 第 100 条、第 106 条和第 107 条。这些法规规定了常量营养物、维生素、矿物质和其它成分水平，力图模拟人乳汁的营养和其它性质。

[00019] 根据本发明，发明人发现了新的用于预防或治疗受治疗者的肥胖症的方法，该方法包括给予受治疗者治疗有效量的二十二碳六烯酸(DHA)和花生四烯酸(ARA)。

[00020] 实际上，本发明的研究显示，DHA 或 ARA 单用或者彼此联用，增加骨骼肌中白介素-15 (IL-15)的表达并且减少皮下脂肪组织中 IL-15 的表达，表明了 DHA 或 ARA 单用或者彼此联用有助于改变婴儿或儿童的身体组成，使其具有较多的无脂肪肌肉和较少脂肪的脂肪组织。

[00021] IL-15 是一种在骨骼肌组织中表达高、并且对骨骼肌蛋白具有合成作用的细胞因子。它刺激骨骼肌纤维蛋白合成，并且抑制蛋白质降解(Quinn, L.S.,等, *Interleukin-15: A Novel Anabolic Cytokine for Skeletal Muscle* (白介素-15：骨骼肌的新的合成代谢细胞因子), Endocrinol. 136:(8)3669-3672 (1995))。还有研究表明，给予 IL-15 抑制白脂肪组织沉积，可能对这类组织具有直接作用(Alvarez, B.等, *Effects of Interleukin-15 (IL-15) on Adipose Tissue Mass in Rodent Obesity Models: Evidence for Direct IL-15 Action on Adipose Tissue* (啮齿动物肥胖症模型中白介素-15 (IL-15)对脂肪组织质量的作用：IL-15 对脂肪组织的直接作用的证据), Biochimica et Biophysica Acta 1570:33-37 (2002))。

[00022] 本发明方法可以通过刺激肌肉生长并且抑制脂肪组织生长而改变身体组成，因此可用于治疗肥胖症(出处同上)。实际上，有人提出 IL-15 受体的改变可能是造成某些肥胖症类型的原因(出处同上)。因此，DHA 或 ARA 单用或者彼此联用对 IL-15 表达的作用，可用于改变婴儿和儿童的身体组成，可能防止生命稍后期内发生肥胖症。

[00023] 本发明还显示出增加骨骼肌中脂连蛋白受体-2的表达。脂连蛋白是唯一由脂肪组织产生和分泌的蛋白质激素，它调节脂质和葡萄糖的代谢。它通过全长脂连蛋白介导激活蛋白激酶(AMPK)和过氧化物增殖物激活受体(PPAR)-α配体活性的增加，以及脂肪酸氧化和葡萄糖摄取的增加。骨骼肌中脂连蛋白表达的增加可增加骨骼肌的脂肪酸氧化。

[00024] 激素水平与体质指数和肥胖负相关。因此，有研究指出脂连蛋白表达的增加可预防或治疗肥胖症(Haluzik，M.等，*Adiponectin and Its Role in the Obesity-Induced Insulin* (脂连蛋白及其在肥胖诱导的胰岛素中的作用), Physiol. Res. 53:123-129 (2004))。由于本发明指出DHA或ARA单用或者彼此联用增加了骨骼肌中脂连蛋白受体-2的表达，从而提高了脂连蛋白的水平，本发明的方法用于改变身体组成并且预防或治疗肥胖症。

[00025] 本发明另还指出补充单独的或者彼此组合的DHA或ARA减少肝瘦蛋白受体的表达。瘦蛋白是一种由参与能量代谢和体重调节的白脂肪组织所产生的激素。瘦蛋白起着循环因子的作用，将饱感信号传送至下丘脑，从而抑制食欲。本发明还指出瘦蛋白增加能量消耗，这可由耗氧量增加、体温升高和脂肪组织减少而测得。因此，在编码瘦蛋白的肥胖(ob)基因中没有任何遗传缺陷的个体，循环瘦蛋白水平增加与脂肪组织较少有关。

[00026] 数据表明肝脏是可溶性循环瘦蛋白受体(sOb-R)的主要来源，它隔离游离瘦蛋白并限制瘦蛋白的作用。本发明的方法显示出单独或者彼此组合的DHA或ARA，可以下调肝脏中瘦蛋白受体的表达。通过下调瘦蛋白受体的表达，使更多的瘦蛋白保持在循环中，从而有助于脂肪组织的减少。

[00027] 在本发明中，给予婴儿和儿童单独的或者彼此组合的DHA或ARA后显示出改变身体组成使之具有较多的无脂肪肌肉量和较少的脂肪组织量。DHA和ARA是长链多不饱和脂肪酸(LCPUFA)，

之前已有研究显示有助于婴儿的健康和成长。准确地讲，研究表明DHA和ARA支持婴儿大脑、眼睛和神经的发育和维持(Birch，E.等，*A Randomized Controlled Trial of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation of Formula in Term Infants after Weaning at 6 Weeks of Age* (六周断奶足月儿中配方奶粉补充长链多不饱和脂肪酸的随机对照实验), Am. J. Clin. Nutr. 75:570-580 (2002)。Clandinin，M.等, *Formulas with Docosahexaenoic Acid (DHA) and Arachidonic Acid (ARA) Promote Better Growth and Development Scores in Very-Low-Birth-Weight Infants (VLBW)* (具有二十二碳六烯酸(DHA)和花生四烯酸(ARA)的配方奶粉更好地促进极低出生体重儿(VLBW)的生长和发育水平), Pediatr. Res.51:187A-188A (2002))。在母乳喂养婴儿中主要通过母乳获取DHA和ARA。然而，在配方奶粉喂养的婴儿中，饮食中必须补充DHA和ARA。

[00028] 虽然有研究显示DHA和ARA有益于婴儿大脑、眼睛和神经的发育，但是之前没有研究显示DHA和ARA对预防或治疗肥胖症具有任何作用。DHA和ARA对预防和治疗肥胖症的积极作用是令人吃惊和预料不到的。

[00029] 在本发明的一些实施方案中，受治疗者需要预防或治疗肥胖症。受治疗者可能由于遗传体质、饮食、生活方式、疾病、病症等而存在肥胖风险。在某些实施方案中，受治疗者是婴儿或儿童。在这些实施方案中，婴儿或儿童可能需要预防或治疗肥胖症。

[00030] 本发明中，DHA和ARA的给予形式并不是关键的，只要是给予受治疗者治疗有效量即可。在一些实施方案中，通过以下剂型给予受治疗者DHA和ARA：片剂、丸剂、包胶囊剂(encapsulation)、囊片剂、软胶囊剂、胶囊剂、油滴剂或小药囊剂。在另一个实施方案中，将DHA和ARA加到食品或饮品中食用。食品或饮品可以是儿童营养品，例如改良配方乳品(follow-on formula)、成长奶(growing up milk)或奶粉，或者产品可以是婴儿营养品，例如婴儿配方奶粉。

[00031] 在某些实施方案中，受治疗者是婴儿。在这些实施方案

中，可以将单独或者彼此组合的 DHA 或 ARA 补充进婴儿配方奶粉中再喂给婴儿。

[00032] 在一个实施方案中，用于本发明的婴儿配方奶粉营养全面，含有合适类型和适当含量的脂质、糖、蛋白质、维生素和矿物质。脂质或脂肪的含量通常可在约 3 g/100 kcal 至约 7 g/100 kcal 间变化。蛋白质的含量通常可在约 1 g/100 kcal 至约 5 g/100 kcal 间变化。糖的含量通常可在约 8 g/100 kcal 至约 12 g/100 kcal 间变化。本领域可以使用任何的蛋白质来源，例如脱脂奶、乳清蛋白、酪蛋白、大豆蛋白、水解蛋白、氨基酸等。本领域可以使用任何糖来源，例如乳糖、葡萄糖、玉米糖浆干品、麦芽糖糊精、蔗糖、淀粉、大米糖浆干品(rice syrup solid)等。本领域可以使用任何脂质来源，例如植物油，如棕榈油、油菜油、玉米油、大豆油、棕榈油精、椰子油、中链甘油三酯油、高油酸向日葵油、高油酸红花油等。

[00033] 可以方便地利用市售婴儿配方奶粉。例如 Enfalac、Enfamil®、Enfamil®早产儿配方奶粉、含铁 Enfamil®、Lactofree®、Nutramigen®、Pregestimil®和 ProSobee® (可购自 Mead Johnson & Company, Evansville, IN, U.S.A.)可以补充适当水平的单独的或者彼此组合的 DHA 或 ARA，并用于实施本发明的方法。另外，含有有效水平 DHA 和 ARA 的 Enfamil® LIPIL®是市售的，可以用于本发明。

[00034] 本发明的方法需要给予单独的或者彼此组合的 DHA 或 ARA。在该实施方案中，ARA:DHA 的重量比通常为约 1:3 至约 9:1。在本发明的一个实施方案中，该比例为约 1:2 至约 4:1。在又一个实施方案中，该比例为约 2:3 至约 2:1。在一个具体实施方案中，该比例约为 2:1。在本发明的另一个具体实施方案中，该比例约为 1:1.5。在其它实施方案中，该比例约为 1:1.3。在又一个实施方案中，该比例约为 1:1.9。在一个具体实施方案中，该比例约为 1.5:1。在另一个具体实施方案中，该比例约为 1.47:1。

[00035] 在本发明的某些实施方案中，DHA 的水平介于脂肪酸

重量的约 0.0%和 1.00%之间。因此，在某些实施方案中，ARA 单用就可以治疗或减轻肥胖症。

[00036] DHA 的水平可约为 0.32% (重量)。在一些实施方案中，DHA 的水平可约为 0.33% (重量)。在另一个实施方案中，DHA 的水平可约为 0.64% (重量)。在另一个实施方案中，DHA 的水平可约为 0.67% (重量)。在又一个实施方案中，DHA 的水平可约为 0.96% (重量)。在另一个实施方案中，DHA 的水平可约为 1.00% (重量)。

[00037] 在本发明的一些实施方案中，ARA 的水平介于脂肪酸重量的 0.0%和 0.67%之间。因此，在本发明的某些实施方案中，DHA 单用就可以治疗或减轻肥胖症。在另一个实施方案中，ARA 的水平可约为 0.67% (重量)。在另一个实施方案中，ARA 的水平可约为 0.5% (重量)。在又一个实施方案中，DHA 的水平可介于约 0.47%和 0.48% (重量)之间。

[00038] 在本发明的一个实施方案中，DHA 的有效量通常为约 3mg/kg 体重/天至约 150 mg/kg 体重/天。在本发明的一个实施方案中，DHA 的有效量为约 6 mg/kg 体重/天至约 100 mg/kg 体重/天。在另一个实施方案中，DHA 的有效量为约 15 mg/kg 体重/天至约 60 mg/kg 体重/天。

[00039] 在本发明的一个实施方案中，ARA 的有效量通常为约 5mg/kg 体重/天至约 150 mg/kg 体重/天。在本发明的一个实施方案中，ARA 的有效量在约 10 mg/kg 体重/天至约 120 mg/kg 体重/天之间变化。在另一个实施方案中，ARA 的有效量在约 15 mg/kg 体重/天至约 90 mg/kg 体重/天之间变化。在又一个实施方案中，ARA 的有效量在约 20 mg/kg 体重/天至约 60 mg/kg 体重/天之间变化。

[00040] 用于本发明婴儿配方奶粉的 DHA 含量通常在约 2mg/100 千卡(kcal)至约 100 mg/100 kcal 之间变化。在另一个实施方案中，DHA 的含量在约 5 mg/100 kcal 至约 75 mg/100 kcal 之间变化。在又一个实施方案中，DHA 的含量在约 15 mg/100 kcal 至约 60 mg/100

kcal之间变化。

[00041] 用于本发明婴儿配方奶粉的 ARA 含量通常在约4mg/100千卡(kcal)至约 100 mg/100 kcal之间变化。在另一个实施方案中，ARA 的含量在约 10 mg/100 kcal 至约 67 mg/100 kcal之间变化。在又一个实施方案中，ARA 的含量在约 20 mg/100 kcal 至约 50 mg/100 kcal之间变化。在一个具体实施方案中，ARA 的含量在约 25 mg/100 kcal 至约 40 mg/100 kcal之间变化。在一个实施方案中，ARA 的含量约为 30 mg/100 kcal。

[00042] 可以应用本领域已知标准技术制备补充了用于本发明的含 DHA 油和含 ARA 油的婴儿配方奶粉。例如，婴儿配方奶粉中正常存在的油(例如高油酸向日葵油)，可用等量的 DHA 和 ARA 代之。

[00043] ARA 和 DHA 的来源可以是本领域已知的任何来源，例如海产油、鱼油、单细胞油(single cell oil)、蛋黄脂质、脑脂质等。DHA 和 ARA 可以是天然形式，前提条件是 LCPUFA 来源中的其余物质不会对婴儿造成任何实质性的有害作用。或者，DHA 和 ARA 可以使用精炼形式。

[00044] LCPUFA 源可以含有或者不含二十碳五烯酸(EPA)。在一些实施方案中，用于本发明的 LCPUFA 几乎不含或不含 EPA。例如，在某些实施方案中，本文所用的婴儿配方奶粉含有不超过约 20mg/100 kcal 的 EPA；在一些实施方案中不超过约 10 mg/100 kcal EPA；在其它实施方案中不超过约 5 mg/100 kcal EPA；在又一个实施方案中基本不含 EPA。

[00045] DHA 和 ARA 的来源可以是单细胞油，参见美国专利号 5,374,657、5,550,156 和 5,397,591，这些专利公开的内容通过引用全部结合到本文中。

[00046] 在本发明的一个实施方案中，将单独或者彼此组合的 DHA 或 ARA 补充到从婴儿自出生到 1 岁左右的婴儿饮食中。在一个具体实施方案中，婴儿可以是早产儿。在本发明的另一个实施方案中，

将单独或者彼此组合的DHA或ARA补充到从受治疗者自出生到2岁左右的受治疗者饮食中。在其它实施方案中，将单独或者彼此组合的DHA或ARA补充到受治疗者终生的受治疗者饮食中。因此，在具体实例方案中，受治疗者可以是儿童、青少年或成人。

[00047] 在一个实施方案中，本发明的受治疗者是年龄介于1岁和6岁之间的儿童。在另一个实施方案中，本发明的受治疗者是年龄介于7岁和12岁之间的儿童。在具体实例方案中，给予年龄介于1岁和12岁之间的儿童DHA可有效治疗或预防肥胖症。在其它实施方案中，给予年龄介于1岁和12岁之间的儿童DHA和ARA可有效治疗或预防肥胖症。

[00048] 在本发明的某些实施方案中，单独或者彼此组合的DHA或ARA，可有效治疗或预防动物受治疗者的肥胖症。动物受治疗者可以是需要这种预防或治疗的动物。动物受治疗者通常为哺乳动物，可以是驯养动物、农用动物、动物园动物、运动用动物或宠物类动物，例如狗、马、猫、牛等。

[00049] 本发明还涉及单独或者彼此组合的DHA或ARA在制备治疗或预防肥胖症的药物中的用途。在该实施方案中，可以使用单独的或者彼此组合的DHA或ARA，以制备用于治疗或预防任何人或动物新生儿的肥胖症的药物。在一些实施方案中，动物需要治疗或预防肥胖症。

[00050] 以下实施例描述了本发明的多个实施方案。考虑到本文所公开的发明的说明书或实践，在本申请权利要求范围内的其它实施方案对本领域技术人员而言是显而易见的。说明书连同实施例一起仅是示例性的，都在所附权利要求书限定的本发明的范围和精神内。在实施例中；除非另有说明，否则所有的百分比都以重量计。

实施例1

[00051] 本实施例描述了DHA和ARA补充成分在改进身体组成

方面的结果。

[00052] 方法

[00053] 动物

所有动物研究均在位于美国德克萨斯州圣安东尼奥(San Antonio, TX)的美国西南生物医药研究基金会(Southwest Foundation for Biomedical Research，SFBR)进行。动物方案得到SFBR和美国康乃尔大学(Cornell University)实验动物管理与使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee，IACUC)批准。动物特征概述于表1。

表1. 新生狒狒特征

动物数量	14
性别	10只雌性，4只雄性
分娩时的妊娠期(天)	181.8 ± 6.2
出生体重(g)	860.3 ± 150.8
12周体重(g)	1519.1 ± 280.7
体重增加(g)	658.8 ± 190.4

[00054] 14只怀孕狒狒在妊娠约182天时自然分娩。将新生狒狒在出生24小时内转移到育婴室，随机分成三个饮食组。将动物放在密封培育箱内关养直到2周龄，然后转移到受控的育婴室内单独的不锈钢笼中。房间温度维持在76°F-82°F的温度之间，12小时光暗周期。喂食实验配方奶粉，直到生命的第12周。

[00055] 饮食

[00056] 将动物分成三组，每组使用三种实验配方奶粉中的一种，其中LCPUFA浓度见表2。

表2. 配方LCPUFA组成

	C	L	L3
DHA (%，重量/重量)	0	0.42±0.02	1.13±0.04
DHA (mg/100 kcal)	0	21.3±1.0	62.8±1.9
ARA (%，重量/重量)	0	0.77±0.02	0.71±0.01
ARA (mg/100 kcal)	0	39.4±0.9	39.2±0.7

[00057] 目标浓度单位如括号中所示，制备超额饲料以备分析和

制备中可能发生变化和/或贮存中可能损失时使用。对照(C)和 L (即中等 DHA 配方奶粉)分别为市售婴儿配方奶粉 Enfamil®和 Enfamil LIPIL®。配方 L3 与 L 具有相等的 ARA 浓度，DHA 浓度的设定为 L 的三倍。

[00058] 配方奶粉由 Mead Johnson & Company (Evansville，IN) 按即食形式提供。将各种奶粉密封在铁罐中，铁罐用两种不同的颜色作标记，使研究人员不知内情。每日四次，于 07:00、10:00、13:00 和 16:00 时供给动物 1 盎司配方奶粉，头两晚还额外喂食。自第 3 天起，提供共 4 盎司给新生狒狒；当它们吃完全部后，则按每天 2 盎司的增量，增加供给。新生狒狒头 7-10 天为人工喂养直到独立进食为止。

[00059] 生长

[00060] 用体重测量法评价新生动物的生长，每周记录 2-3 次。每周获取每只动物的头围和顶臀长数据。在第 12 周尸体剖检时，记录器官重量。

[00061] 取样

[00062] 在 84.57±1.09 天时，将动物麻醉，通过放血处以安乐死。血液收集在装有 EDTA 的 Vacutainer 管中，通过离心分离出红细胞(RBC)和血浆。摘出眼球和一个脑半球，立即解剖。由经验丰富的神经学专家解剖中枢神经系统(CNS)结构，称重，放入液氮中快速冷冻后，保存在-80℃下直到进行整体分析。摘出视网膜和 1 克左室和右肝叶样品，按类似方法处理。

[00063] 从骨骼肌、皮下脂肪组织和内脏脂肪组织及肝脏中收集组织，分离后用于 DNA 微阵列表达分析。

[00064] 分析

[00065] 采用 Bligh 和 Dyer 方法，从组织匀浆中提取总脂质。用氢氧化钠和 14%三氟化硼(BF_3)的甲醇溶液，制备脂肪酸甲酯(FAME)，按前述方法用 H_2 载气，通过气相色谱法进行分析(HP 5890；BPX-70 柱，SGE，Austin，TX)。用共价加合物化学电离串联质谱仪测定脂肪

酸(FA)结构，然后用十七酸甲酯为内标，用从等重 FAME 混合物得到的响应因子进行定量。FA 浓度用 14-24 个碳原子脂肪酸总量的重量百分比表示。

[00066] 统计分析

[00067] 数据用平均值±SD 表示。用方差分析(ANOVA)进行统计学分析，以检验 12 周所测量的平均等效假设(hypothesis of equivalent mean)，用 Tukey 校正以检验多重比较。用随机系数回归模型，测定随时间发生的配方奶粉消耗、体重、头围和顶臀长变化，对 LCPUFA 组(L、L3)与对照(C)进行比较。运用适于 Windows 9.1 的 SAS (SAS Institute，Cary，NC)进行分析，分析表明显著性为 $p<0.05$。

[00068] 结果

[00069] 生长

[00070] 随着时间的推移，配方奶粉消耗在 LCPUFA 组与 C 组之间没有显著差异($p=0.64$)。同样地，随着时间的推移，体重(BW，$p=0.47$)、头围($p=0.68$)、顶臀长(CRL，$p=0.38$)或 BW/CRL 之比($p>0.50$)也无显著变化(数据未提供)。在 12 周内，这些人体测量法的数据没有显著差异。对于脑、肝、胸腺、脾、心脏、肺、右肾或胰腺等器官重量(用体重(BW)百分比表示)，在 12 周内都没有显著差异，也没有变化的趋势。

[00071] 肝脏和心脏脂肪酸

[00072] 增加配方奶粉 DHA 显著增加肝脏 DHA 浓度；L 组和 L3 组的 DHA 分别比 C 组高 2.2 倍和 3.6 倍。与 DHA 不同，饮食 ARA 增加 L 组的肝水平；由 L 组至 L3 组 ARA 降低 14.3%。相对于 L 和 L3，C 组中 ARA 延伸产物肾上腺酸(AdrA)的浓度显著较高(0.99 ± 0.13%)。对于二十二碳五烯酸(DPA) (n-6)也发现了相似但不明显的趋势，C组动物中的水平最高，接着是L组和L3组。与对照相比，LCPUFA动物的DPA n-3浓度下降2倍。与L3相比，C组和L组的DPA n-6/DHA显著提高 4.6 倍和 14 倍。LCPUFA 组中，DPA 的增加被总的单不饱

和脂肪酸(MUFA)和亚油酸(LA，18:2n-6)的减少抵消，而不是被总饱和脂肪酸(SFA)的减少抵消。

[00073] 至于肝脏 DHA 和心脏 DHA，在 L 组和 L3 组分别增加了 2.8 倍和 3.9 倍，而 DPAn-3 明显下降。DHA 的增加似乎以 SFA 为代价，尽管从 C 组到 L 组再到 L3 组，SFA 的减少并没有达到统计显著性。亚油酸从 C 组到 L 组降低，但是 L 组和 L3 组没有不同。

[00074] **RBC 和血浆脂肪酸**

[00075] 与对照相比，L 组和 L3 组的补充明显提高 RBC DHA 3.8 倍和 4.6 倍。血浆中观察到类似趋势，对于 LCPUFA 补充组 L 和 L3，DHA 增加 4.6 倍和 7.5 倍。虽然对于 RBC，从 C 组至 L 组 ARA 显著增加，但是从 L 组到 L3 组 ARA 水平则降低。对于 ARA 血浆浓度，存在一致但不明显的趋势，从 C 组(5.36±1.00)适度增加至 L 组(10.06±0.99)，L3 为中间水平(7.79±0.84)。AdrA 是一种微量成分，在 RBC 和血浆中都不对饮食有反应，而与 C 组和 L 组相比，L3 组则显著降低。对照 RBC 中，DPAn-6 浓度显著较高。RBC 和血浆测量中与 L 组和 L3 组相比，C 组的 DPAn-3 水平较高。与 L3 组相比，对照组和 L 组动物的 DPA n-6/DHA 之比明显较高，大约 4 倍和 10 倍。

[00076] **视网膜脂肪酸**

[00077] 由饮食 LCPUFA 所致的视网膜 DHA 的变化没有达到显著性，虽然 L 组和 L3 组平均比 C 组大，但变化的量类似于上述报告。ARA 浓度不受配方奶粉组成影响。与最高补充组 L3 相比，对照的 DPAn-6 浓度显著较高。DPAn-3 水平随饮食 LCPUFA 增加而增加，与 C 组相比，L3 组显著增加。对于 C 组和 L 组，DPAn-6/DHA 指数比高 DHA 配方奶粉组 L3 高出 3.6 倍。

[00078] **CNS 脂肪酸**

[00079] 用较高水平的配方奶粉 DHA，显著增加大脑皮质中央前回，即初级运动皮质区中的 DHA 浓度。与对照相比，在 L 组和 L3 组中，补充分别提高 DHA 水平 24%和 43%，L 组和 L3 组之间的差异

在统计上有显著性。与对照相比，补充 LCPUFA 还分别显著增加 L 组和 L3 组额叶皮质中的 DHA 30%和 41%，然而 L 和 L3 之间的差异是临界显著性的(p=0.10)。

[00080] 配方奶粉 DHA 增加基底节区苍白球和尾状核以及中脑区上丘和下丘的 DHA，然而在 L 组和 L3 组之间未检测出差异。在豆状核和杏仁核中无显著性趋势与这一模式一致。在所有 CNS 区域内，DPAn-6 从 C 组到 L 组到 L3 组显著并始终下降。

[00081] 除了两个 CNS 区域外，饮食处理对 ARA 水平几乎没有影响。L 配方奶粉组中，苍白球和上丘中的 ARA 水平最高，但是在额外的配方奶粉 DHA 中则显著下降 10%。

[00082] 在所有脑区中对于 n-3 充分指数(sufficiency indices)都获得类似结果。与高配方奶粉 DHA 组 L3 相比，C 组所有 CNS 区域的 DPAn-6/DHA 之比显著提高。在额叶、苍白球、尾状核和下丘中，L 组和 L3 组显著不同。与 L3 组相比，C 和 L 组始终分别提高 2 倍至 5 倍。

[00083] 身体组成

[00084] 研究结果表明，在出生后早期几周内，以 0.33% DHA/0.67% ARA 和 1.00% DHA/0.67% ARA 的水平补充，在与未补充对照组相比时，增加骨骼肌中 IL-15 的表达，并降低皮下脂肪组织中 IL-15 的表达。DHA 和 ARA 对 IL-15 表达的作用表明骨骼肌和脂肪组织代谢之间相互影响。补充 DHA 和 ARA 可促进脂肪组织脂质贮存库的动员，同时还有利地影响骨骼肌蛋白的合成和分泌。另外，补充 DHA 和 ARA 增加骨骼肌中脂连蛋白的表达，降低肝瘦蛋白受体的表达。结果见表 3。

表 3.[1]

		实验组		
组织	基因	对照	L1	L3
骨骼肌	脂连蛋白受体 2	9.029	9.256	9.827
骨骼肌	白介素-15	2.987	3.047	3.533
皮下脂肪组织	白介素-15	6.44	5.669	3.556
肝	脂肪酸去饱和酶-1	7.479	6.40	6.278
肝	脂肪酸去饱和酶-2	4.453	3.606	3.619
肝	固醇辅酶 A 去饱和酶	5.622	4.324	3.727
肝	固醇调节元件结合蛋白-2	4.362	4.349	3.407
肝	瘦蛋白受体	6.295	5.792	5.746

[1] 数值是 Log 2 基础数值。因此，log 2 水平的 2 倍变化表示线性水平的 4 倍变化。例如，与 L3 组相比，对照组中皮下脂肪组织中 IL-15 表达的线性水平近 8 倍(6.444 与 3.556 = 2.888)。

[00085] 讨论

[00086] 本项研究表明，将 DHA 从 0 (C)增加至 0.33% (L)，能增加所研究的所有组织的 DHA 水平，虽然在本项研究中，在视网膜、豆状核和杏仁核中的增加没有达到统计显著性。

[00087] 膳食 DHA 0.3% (重量/重量)使 CNS 所有区域内的组织 DHA 与母乳喂养的新生儿所观察的水平一致，但大脑皮质各叶除外，其中与对照相比，DHA 增加，但只是母乳喂养水平的 87%-90%。一个合理的假设是，较高的 DHA 水平可进一步增加皮质 DHA 至母乳喂养水平。本发明的数据显示，中央前回 DHA 从 C 组到 L 组增加了 24%，从 C 组到 L3 增加了 43%。从 L 组至 L3 组另外增加的 19%具有统计显著性，这表明 L3 配方奶粉中较多的 DHA，有效增加中央前回 DHA。虽然本研究没有包含母乳喂养对照组，但是增加幅度类似于与母乳喂养相对于足孕比较有关的增加。本发明的发明人注意到，中央前回 DHA 增加的幅度小于 2 倍，虽然 L 组和 L3 组间饮食中 DHA 的含量翻了 3 倍。这一发现表明，在与已报导的最高母乳水平相似的膳食 DHA 水平下，灵长类脑中组织脂肪酸浓度在响应膳食脂肪酸增加时达到平衡(在大鼠中得到证实)。

[00088] 基底核是一套整合与协调来自与执行功能和运动协调有关的额叶皮质信号的 CNS 器官。上丘是控制眼球急动的脑干结构，还具有皮质输入，下丘与声音定位有关。总的来说，在 L 组和 L3 组之间，这些 CNS 区域的 DHA 没有显著差异。仅在苍白球内，L 组和 L3 组 DHA 的潜在生物学重要性上具有非显著性差异(11%)；在其它组织中，DHA 增加不超过 4%，或者略有降低。从这一观察部分看，可以推断该项灵长类研究适度必要的统计检验力没有限制检验差异的能力。这些结果与大脑皮质 DHA 对适度膳食 DHA 水平最为敏感的结论是一致的。鉴于 DHA 在人 CNS 中在生命头 2 年里增加，以及大脑皮质是数量上最多的 CNS 区域，远在婴儿期以后 DHA 的需求也可能是十分重要的。

[00089] 人和狒狒的母乳均含有 n-3 LCPUFA EPA 和 DPA，其浓度占 DHA 浓度相当大的比重。成人中，这些 LCPUFA 比α-亚麻酸(ALA)更有效地转化成 DHA。美国婴儿配方奶粉含有含量可以忽略不计的 EPA 和 n-3 DPA，因为 n-3 LCPUFA 来源(获自海藻寇氏隐甲藻(*Crypthecodinium cohnii*)的油)不含这些 LCPUFA。可以规定以 DHA 水平比现有配方奶粉 DHA 水平高，并且更类似于 L3 配方奶粉的 DHA 水平，来弥补这些少量的 n-3 LCPUFA。的确，本研究发现，n-3 DPA 在大多数组织中在响应中等 DHA 时下降，但是在 L3 DHA 水平下反弹。视网膜是例外，其中当 DHA 增加时 n-3 DPA 增加。在 CNS 中 EPA 为痕量水平。

[00090] 在肝脏、RBC 和血浆中，L 组中 ARA 显著升高，而在 L3 组达到中间值；在心脏中发现等同但非显著性的模式。先前有数据表明组织中特别是 CNS 中的 ARA 浓度对于配方奶粉 ARA 比对于 DHA 更为不应，本发明的结果与此一致。在大脑皮质、视网膜、豆状核、尾状核和杏仁核中没有观察到变化。然而，在上丘中与对照相比，以及在苍白球中与 L 组相比，L3 组 ARA 均降低。

[00091] DPAn-6 (Osbond acid)是 ARA 的延伸和 4-5 去饱和产物，

在实验性 n-3 脂肪酸缺乏时始终增加，并且还在其它正常灵长类中在响应 DHA 补充时下降。DHA 增加时，DPAn-6 在所有组织中均下降，在一些组织例如大脑皮质中，L3 DPAn-3 值是 C 值的百分之几。这种降低以及随着 DHA 增加，促使 DPA/DHA 之比从 L 组到 L3 组降低。

[00092] 这些结果表明，在大多数组织中，DHA 对膳食处理比 ARA 更敏感。它们显示，浓度比现有市售婴儿配方奶粉所含浓度高的 DHA，使大脑皮质的 DHA 增加，而在基底核和边缘系统(limbic system)中，不增加 DHA 水平。

[00093] 数据还为以下假设提供支持：浓度以比现有配方奶粉所用浓度高，但尽管如此仍在已知人乳汁浓度范围内的配方奶粉 DHA，使 CNS 组织组成正常化，接近母乳喂养的组成。组织组成的变化本身并不能证明饮食组成的变化，不应当与证实与功能结果改进有关的功效联系在一起。

[00094] 这些数据还证实 DHA 和 ARA: (1)相互调节骨骼肌和脂肪组织中的 IL-15 表达，这有助于增加肌肉质量，并且对抗过度肥胖的倾向；(2)降低肝瘦蛋白受体的表达，从而促进更大地满足循环瘦蛋白的作用；和(3)增加骨骼肌脂连蛋白受体的表达，这样便增加了脂肪酸氧化和胰岛素敏感性。

[00095] 补充 DHA 和 ARA 还降低肝从头合成 LCPUFA，从头合成 LCPUFA 是通过负调节固醇调节元件结合蛋白-2 (SREBP2)配合抑制固醇辅酶 A 去饱和酶(δ-9 去饱和酶)、脂肪酸去饱和酶(δ-5 去饱和酶)和脂肪酸去饱和酶-2 (δ-6 去饱和酶)介导的。抑制固醇辅酶 A 去饱和酶(SCD)会抑制 ω-9 脂肪酸在膜内的蓄积以维持适当的磷脂膜组成。这是胎儿和新生儿正常生长所必需的。负调节 SCD 与由 DHA 和 ARA 抑制脂肪酸从头合成是一致的。最终结果可能是减少甘油三酯和脂肪细胞的棕榈油酸(palmitoleate)组分。本研究中，增加 DHA 水平导致更多地抑制 SCD mRNA 水平，这表明 DHA 水平越高，抑制从头生成脂肪越有效，也越有利于促进甘油三酯和脂蛋白组成。

[00096] 所有这些作用的最终结果导致了降低从头生成脂肪并提高脂肪酸氧化，改进胰岛素敏感性并改进瘦蛋白响应性，最终使代谢环境不利于肥胖症的发生。

[00097] 本说明书引用的所有参考文献，包括但不限于所有论文、出版物、专利、专利申请、简报、教科书、报告、手稿、手册、书籍、互联网邮件、杂志文章、期刊等，都通过引用全部结合到本说明书中。本文对参考文献的论述仅仅用于概述其作者提出的主张，不得解释为任何参考文献构成了现有技术。申请人保留对所引用参考文献的准确性和相关性提出异议的权利。

尽管使用专业术语、装置和方法描述了本发明的优选实施方案，但这些描述仅用于说明目的。使用的词语为描述性词语，而不是限制性的。要理解的是，在不偏离所附权利要求书陈述的本发明的精神或范围的情况下，本领域普通技术人员可作出改变和变化。另外，应当理解的是，多个实施方案的方面可整体地或部分地互换。例如，虽然根据已例举的方法，提出了生产用于销售的无菌液体营养补充剂的方法，但是也包括其它用法。因此，所附权利要求书的精神和范围不应局限于本发明所包括的优选形式的描述中。