

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102548570 A

(43) 申请公布日 2012.07.04

(21) 申请号 201080038949.0

A61K 36/33(2006.01)

(22) 申请日 2010.09.01

A61P 9/14(2006.01)

(30) 优先权数据

MI2009A001523 2009.09.02 IT

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012.03.01

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2010/005346 2010.09.01

(87) PCT申请的公布数据

W02011/026606 EN 2011.03.10

(71) 申请人 比奥纳普有限公司

地址 意大利桑塔韦尼里那

(72) 发明人 L·里扎 S·穆纳佛 A·塞莱诺

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 陈润杰 黄革生

(51) Int. Cl.

A61K 36/63(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 2 页

(54) 发明名称

用于治疗痔及相关疾病的组合物

(57) 摘要

本发明涉及药物、营养药、健康食品和医疗器械组合物，其包含来自仙桃叶状枝的多糖以及抗氧化和抗炎植物提取物，以及那些来自橄榄叶、刺山柑芽的提取物、来自红橙、黑稻或来自其他天然来源的花色素苷及它们的组合，用于预防和治疗痔疾病及相关疾病。本发明组合物可以局部或者通过口服途径施用。

1. 仙桃叶状枝提取物和油橄榄叶提取物的组合制剂,用于同时或者分别使用,用于预防和治疗痔病、其并发症和相关疾病。
2. 权利要求 1 的组合制剂,用作肛门黏膜和直肠黏膜的黏膜保护剂,并用于预防或治疗肛门黏膜和直肠黏膜的炎症。
3. 权利要求 1 的组合制剂,其中仙桃提取物含 1-70% w/w 黏液形式的多糖。
4. 权利要求 3 的组合制剂,其中所述多糖通过包括叶状枝挤压、继之以汁离心和上清液超滤的工艺提取,获得富含 MW > 10<sup>4</sup>Da 多糖组分的水溶液。
5. 权利要求 1 的组合制剂,其中所述油橄榄叶提取物如下获得:在室温或者加热至 60-70℃ 用水溶剂或水醇溶剂处理油橄榄叶,任选重复所述提取工艺,然后在 40℃ 真空中除去所述溶剂。
6. 权利要求 5 的组合制剂,其中所述油橄榄叶提取物通过包括将干燥的提取物装载在树脂上并用乙醇:水 50 : 50 (v/v) 洗脱的工艺富集生物酚。
7. 组合物,其含有仙桃叶状枝的提取物和油橄榄叶的提取物,用于预防和治疗痔病、其并发症和相关疾病。
8. 权利要求 7 的组合物,进一步含有来自刺山柑芽的提取物、来自红橙、黑稻或者来自其他天然来源的花色素苷和它们的组合。
9. 权利要求 7 的组合物,进一步含有一种或多种选自以下的成分:局部麻醉剂、抗炎物质,优选选自欧洲七叶树、假叶树或者柏木属提取物;植物甾醇;具有收敛剂作用的物质,优选选自金缕梅树提取物、氧化锌或者菱锌矿;血管收缩剂,优选选自盐酸去氧肾上腺素、硫酸麻黄碱、肾上腺素和盐酸肾上腺素;甾类抗炎剂和它们的组合。
10. 权利要求 7-9 的组合物,其中所述仙桃提取物含有黏液形式的多糖。
11. 权利要求 10 的组合物,其中所述多糖通过包括叶状枝挤压、继之以汁离心和上清液超滤的工艺提取,获得富含 MW > 10<sup>4</sup>Da 多糖组分的水溶液。
12. 权利要求 10-11 的组合物,其中所述仙桃叶状枝多糖的量为 0.5% 至 50% w/w,其他活性物的量为 1% 至 30% (w/w)。
13. 权利要求 7-9 的组合物,其中所述油橄榄叶提取物如下获得:在室温或者加热到 60-70℃ 用水溶剂或者水醇溶剂处理油橄榄叶,任选地重复所述提取工艺,然后在 40℃ 真空中除去所述溶剂。
14. 权利要求 7-13 的组合物,其适合于口服、直肠内或者局部施用。
15. 权利要求 14 的组合物,其为口服溶液、口服悬液、口服乳剂、片剂、胶囊、粉末和用于即时制备口服悬液或者口服乳剂的袋子、乳膏、软膏、泡沫、凝胶、喷雾制剂、栓剂的形式。
16. 权利要求 7-15 的组合物,其选自:
  - i) 具有以下组成的胶囊:

组分	mg/ 胶囊
仙桃叶状枝提取物	200-400mg
油橄榄叶提取物	200-400mg
乳糖	至胶囊装满

ii) 具有以下组成的局部 / 直肠内凝胶：

组分	% w/w
羟乙基纤维素	1.75
仙桃叶状枝提取物	0.5-10
油橄榄叶提取物	0.5-10
丙二醇	10.00
柠檬酸钠	0.30
焦亚硫酸钠	0.50
乙二胺四乙酸二钠	0.10
对羟基苯甲酸甲酯	0.20
对羟基苯甲酸丙酯	0.05
蒸馏水	至 100gr

iii) 具有以下组成的栓剂：

组分	mg/ 栓剂
仙桃叶状枝提取物	200-400mg
油橄榄叶提取物	200-400mg
BHA	0.15mg
BHT	0.15mg
Witepsol S 55	至装满

iv) 具有以下组成的软膏：

组分	% w/w
仙桃叶状枝提取物	100-200mg
油橄榄叶提取物	100-200mg
聚乙二醇 400	55g
聚乙二醇 4000	39.9g
蒸馏水	至 100g

## 用于治疗痔及相关疾病的组合物

### 发明领域

[0001] 本发明涉及新的药物、营养药 (nutraceutical)、健康食品和医疗器械组合物, 用于预防或治疗痔、其并发症以及相关疾病。

[0002] 更具体而言, 本发明涉及用于口服使用或者局部应用的组合物, 包含来自仙桃 (*Opuntia ficus indica*) 叶状枝提取物的多糖与以下的组合: 来自橄榄叶的提取物 (油橄榄 (*Olea europaea*) 皮质激素类 (corticoids)) 和任选的局部麻醉剂、血管收缩剂、收敛物质和 / 或具有抗氧化或抗炎作用的植物提取物, 以及那些来自刺山柑 (*Capparis Spinosa*) 芽的提取物、来自红橙 (redoranges)、黑稻 (black rice) 或来自其他天然来源的花色素苷 (anthocianoside) 及它们的组合, 可用于预防和治疗痔疾病及相关疾病。

### [0003] 发明背景

[0004] 痔是在成年人子宫中存在的肛管的解剖学血管穴管状结构, 其通过血液流入和流出 (deflow) 完成流体和气体节制, 由于动脉流入增加其体积 (关闭肛管腔), 由于静脉流出减小其体积 (重新打开肛管腔)。

[0005] 痔疾病在于部分肛管表皮下滑: 直肠黏膜下滑, 推动内痔向外, 最终推动外痔向外。

[0006] 痔可能具有遗传性或体质性发病机理, 然而, 其发展原因还不清楚。可能地, 鉴于该病在若干家族成员中复发, 因此有时涉及遗传因素。便秘会使痔更严重, 由于硬便和强烈的排便努力会对肛管产生刺激作用。

[0007] 在怀孕期间, 女性身体的一些重要变化会促进痔和下肢静脉曲张形成或者恶化: 事实上, 怀孕期间女性体重增加, 对静脉丛 (venous complex) 具有负面影响 (事实上, 怀孕期间子宫体积增加, 挤压腹部, 妨碍了血液回流)。

[0008] 怀孕期间, 便秘 (可在怀孕期开始或者恶化) 通常会引起痔病发病。

[0009] 在患便秘的人群中, 痔常常与肛管末端发生的肛裂、裂口或者溃疡有关, 因为强烈的排便努力会导致该区域的组织损伤。

[0010] 痔病非常普遍, 在北美和欧洲两地影响了一百万至一千万人 (Holzheimer RG, Eur J Med Res, 26 JAN 2004;9(1):18-36, Hemorrhoidectomy: indications and risks)。通常通过严格的饮食和行为规则, 并通过药物处理来治疗痔病。大多数患痔病的人都能带病生活, 归功于严格的饮食习惯和生活方式、卫生和 / 或含类固醇 (由于其抗炎作用) 和局部麻醉剂的产品的局部应用。

[0011] 根据需要, 饮食和行为规则可添加局部应用作用于疼痛和肿胀的含类固醇产品 (乳膏、软膏、药膏、泡沫和栓剂) 和 / 或减轻痒感和疼痛的局部麻醉剂的药物治疗。然而, 这些产品推荐用于短期治疗, 因为用这些物质长期治疗可能会导致刺激应用部位, 特别是在直肠和肛门黏膜水平。

[0012] 当辅以适当药物治疗的健康和均衡饮食无效并出现了病理学并发症时, 将进行手术治疗 (痔切除术、haemorrhoidopexy 或痔上黏膜环切术 (prolapsectomy)), 但是这可能继之以术后并发症以及出血、龟裂、瘘、脓肿、肛周感染、尿潴留、粪便和尿液失禁。

[0013] 考虑到痔病的广泛性,特别是在孕妇中和产后早期,并且鉴于其并发症和相关病理学的范围,寻找可靠和有效的治疗以预防和治疗这种疾病,同时避免患者为了解决疾病及相关症状经历重复的药物和手术治疗,仍然是有重大意义的。

## 发明内容

[0014] 目前鉴定了能降低痔病及其并发症的炎症组分特征的新药物、皮肤美容剂(dermocosmetic)、营养药、健康食品和医疗器械组合物。这些组合物还具有黏膜保护作用,因此其甚至能保护肛门黏膜和直肠黏膜免于粪便中存在物质的刺激性作用,所述物质在疾病的急性期引起疼痛并使得其容易或者加快复发。

[0015] 这些组合物的特征在于,含有来自仙桃叶状枝提取物的多糖,以及具有抗氧化和/或抗炎作用的油橄榄叶提取物,和任选的与刺山柑芽提取物、来自红橙、黑稻或者来自其他天然来源的花色素苷和它们的组合,用于预防和治疗痔病、其并发症和相关疾病。

[0016] 如本文中所用的术语“医疗器械”指的是根据 Directive 93/42/EEC Annex IX 分类的“活性医疗器械 (Active medical device)”(I 类)。

[0017] 仙桃(胭脂仙人掌属植物(Nopalea))是属于仙人掌科(Cactaceae)的植物,其原产于墨西哥和美国西南部,但甚至在自播的地中海植物中也广泛分布。

[0018] 自古以来都将果实和嫩叶状枝(嫩枝(tender))用于饮食用途或者用于制备酒精饮料。

[0019] 在大众医药中,植物以多种方式使用:果实被认为是收敛剂,由于维生素 C 丰富,因此被海员用于预防坏血病;嫩叶状枝用作泥敷剂,烘箱加热的作为润滑剂;叶状枝浆用在并发的伤口和溃疡上是极好的抗炎、上皮再形成和愈合疗法:其是在乡村传统中至今仍使用的一种古老的西西里岛传统疗法;花煎剂具有利尿特性。

[0020] 最近观察到:1)仙桃果实具有明显的抗氧化特性(Tesoriere 等人,“添加仙桃果实降低了健康人中的氧化应激:与维生素 C 的比较研究”,Am J Clin Nutr. 2004 年 8 月;80(2):391-395);2)仙桃提取物在酒精宿醉(alcohol hangover)治疗中是有效的(Wiese J 等人,“仙桃对酒精宿醉症状的作用”,Arch Intern Med. 2004 年 6 月 28 日;164(12):1334-1340);3)仙人掌属(Opuntia)叶状枝中的高多糖成分浓度,基本上由半乳糖、阿拉伯糖和其他糖的多聚物形成,具有消耗脂肪和糖配体的特性(如此使得它们不可能被吸收),导致有利于糖-脂质代谢和代谢综合征;4)在实验动物模型中已证实,仙桃叶状枝黏液和果胶具有胃保护作用(Vazquez-Ramirez R. 等人,“通过口服施用仙桃黏液逆转酒精诱导的慢性胃炎大鼠的胃粘膜改变”,World J. Gastroenterol. 2006 年 7 月 21 日;12(27):4318-4324)。

[0021] Trombetta 等人(Trombetta D. 等人,“仙桃叶状枝多糖对大鼠皮肤创伤的愈合作用”,Phytomedicine, 13(2006) 352-358)观察到,来自仙桃叶状枝提取物的多糖具有皮肤愈合作用,其作用于细胞基质并调节层粘连蛋白沉积(laying down)。

[0022] 现已出乎意料地发现:提取自仙桃叶状枝的多糖与油橄榄叶提取物以协同方式产生了抗炎作用,且该作用通过添加刺山柑芽提取物、来自红橙、黑麦或者来自其他来源的花色素苷和它们的组合而增强,其中仙桃和油橄榄提取物方便地组合用于预防和治疗痔病、其并发症和相关疾病。

[0023] 根据本发明实施方案,以组合制剂的形式提供仙桃和油橄榄提取物,用于同时或者分别使用,以预防和治疗痔病、其并发症和相关疾病,特别用于肛门和直肠黏膜的黏膜保护,以及预防或治疗其炎症。

[0024] 根据本发明,仙桃叶状枝的多糖可以是黏液形式,通过挤压工艺或者通过室温用水处理获得。备选地,在挤压工艺后,离心叶状枝汁,将上清液进行超滤,得到富含 MW > 10<sup>4</sup>Da 多糖组分的水溶液,可以将其浓缩,然后干燥。仙桃叶状枝提取物中的多糖含量为 1% 至 70%。

[0025] 油橄榄叶可以在室温或者在 60–70°C、用水性或水醇溶剂 (10–80% 乙醇) 提取。可以重复水醇提取,以获得更高的生物酚 (biophenol) 浓度。在提取工艺的最后,在 40°C 真空中去除水溶剂。

[0026] 此外,将干燥的提取物装载在树脂上、优选苯乙烯树脂上,用乙醇 : 水 50 : 50 (v/v) 洗脱,可获得更高的生物酚浓度。

[0027] 油橄榄叶提取物含有酚 (对羟基苯乙醇、3,4-二羟基苯乙醇 (hydroxytyrosol) 和它们的衍生物)、肉桂酸、类黄酮 (以及芹菜配基、木犀草素和它们的糖苷衍生物、芦丁、槲皮素)、木酚素、类裂环烯醚萜 (以及 oleurosid、橄榄苦苷和它们的衍生物、橄榄酸),且其特征在于多酚类的特定含量:2–40% (w/w) 的类黄酮 (芹菜配基、木犀草素和它们的衍生物)、0.5–10% (w/w) 的橄榄苦苷和 1–30% (w/w) 的 3,4-二羟基苯乙醇及衍生物。

[0028] 本发明还涉及用于口服施用、局部或直肠应用的药物、皮肤美容剂、营养药、健康食品和医疗器械组合物,包含来自仙桃叶状枝提取物的多糖,以及具有抗氧化和 / 或抗炎作用的油橄榄叶提取物,和任选地刺山柑芽提取物、来自红橙、黑麦或来自其他天然来源的花色素苷和它们的组合,用于预防和治疗痔病、其并发症和相关的疾病。

[0029] 根据本发明,术语“组合”和“组合制剂”用于指所考虑的提取物或活性物的固定和治疗组合二者。在第一种情况 (固定组合) 中,提取物或活性物与媒介、赋形剂或可用于所建议应用的其他成分一起包含于同一组合物中;在第二种情况 (治疗组合) 中,可以将活性成分以分别的组合物施用或应用,以及通过不同的施用途径,以得到组合的治疗效果。

[0030] 由所考虑的活性物或提取物的组合所致的协同作用允许有利地降低与痔病伴随的炎症组分,并且由于所考虑的组合物还具有黏膜保护作用,它们同时能保护直肠黏膜,导致在更高等级的治疗安全性下快速解决症状,这在重复治疗的情况下,通常对于局部治疗和特别地对于怀孕或者产后妇女以及老年人群治疗是非常重要的因素。

[0031] 这允许实施有效且安全靶向治疗,适合于预防或治愈痔病及其并发症以及肛裂,甚至与用于相同疾病的其他药物或手术疗法组合。

[0032] 因此,本发明的目的是提供药物、皮肤美容剂、营养药、健康食品和医疗器械口服或者局部 (直肠) 组合物,包含在固定或治疗组合中的来自仙桃叶状枝提取物的多糖,以及油橄榄叶提取物,和任选的刺山柑芽提取物、来自红橙、黑稻或者来自其他天然来源的花色素苷和它们的组合,用于预防和治疗痔病、其并发症和相关疾病 (例如肛裂)、用于预防所述疾病的复发并用于保护直肠黏膜免于粪便中可能存在的一些食物组分的刺激性作用。

[0033] 附图简述

[0034] 本发明的其他特征和优点从以下作为非限制性实例给出的几个实施方案的描述、参考附图将更加显而易见,其中,关于要求保护的组合物,

[0035] - 图 1 表示体外黏膜粘附模型的方案；

[0036] - 图 2 图示了在体外黏膜粘附模型中、在上皮直肠黏膜细胞上，仙桃叶状枝提取物与透明质酸的黏膜粘附百分比值（处理后凝集素结合的抑制百分比）的比较。

[0037] - 图 3 图示了在用促炎物质处理的 Caco2 细胞上，来自仙桃叶状枝提取物的多糖和用油橄榄叶提取物测定的 ICAM-1 炎症标志物抑制百分比值。

[0038] - 图 4 图示了在用促炎物质处理的 Caco2 细胞上，来自仙桃叶状枝提取物的多糖和用油橄榄叶提取物测定的 IL-8 炎症标志物抑制百分比值。

#### [0039] 发明详述

[0040] 本发明提供了用于口服施用或者用于局部或直肠内应用的药物、皮肤美容剂、营养药、健康食品和医疗器械组合物，用于治疗痔病和相关疾病（以及肛裂），并用于预防所述疾病的复发，其包含提取自仙桃叶状枝的多糖，任选地支撑在达 50% (w/w) 的麦芽糖糊精上，与以下物质处于固定或组合疗法中：具有抗氧化和抗炎作用的油橄榄叶提取物、任选的刺山柑芽提取物、来自红橙、黑麦或者来自其他天然来源的花色素苷和它们的组合，用于预防和治疗所述疾病。

[0041] 作为非限制性实例，可用于所要求保护的组合物的来自油橄榄叶提取物的活性物可以包含：酚（以及对羟基苯基乙醇、3,4-二羟基苯乙醇和它们的衍生物）、肉桂酸、类黄酮（以及芹菜配基、木犀草素和它们的糖苷衍生物、芦丁、槲皮素）、木酚素、类裂环烯醚萜（以及 oleurosid、橄榄苦苷和它们的衍生物、橄榄酸）。

[0042] 所要求保护的组合物可以是液体、固体或半固体，能经口施用（例如口服溶液、口服悬液、口服乳剂、片剂、粉末以及可以即时制备口服溶液、悬液或乳剂的片剂）或者能局部应用（例如乳膏、软膏、泡沫、栓剂、凝胶、喷雾）。

[0043] 此外，这些组合物可以包含通常用于制备口服或局部组合物的防腐剂、离子和非离子缓冲剂以及添加剂。

[0044] 此外，所要求保护的组合物可以包含可用于治疗所述病理的其他天然组分，如局部麻醉剂和血管收缩剂（例如来自欧洲七叶树 (*Aesculus hippocastanum*) 提取物的类黄酮，其具有抗炎和血管收缩作用，和七叶皂苷，其是来自欧洲七叶树的活性成分，具有血管保护、抗水肿 (anti-edemigenous) 和抗氧化作用并能稳定血管抵抗力和通透性，目前用于局部和全身产品中；来自假叶树 (*Ruscus aculeatus*) 的提取物，富含与那些七叶树 (*hippocastanum*) 中发现的物质类似的物质，在几个临床研究中观察到其能产生静脉张力 (venotonic)、血管收缩和抗炎作用；以及来自柏木属 (*Cupressus*) 的生物酚和类黄酮提取物，其具有抗炎和血管收缩作用）。与典型的 phlebotonic 药物不同（含可的松产品的主要禁忌症，除怀孕外，有出血痔，特别是当滴血时；在该情况下，可的松可延迟愈合过程，因此最好使用不含可的松的产品），这些物质很少产生不期望的作用。

[0045] 用于液体组合物、悬液或乳剂的最常用的溶剂是水或者含可用于口服或局部用途的组分的水溶液。

[0046] 局部组合物可以含有表面活性剂（例如单硬脂酸甘油酯）、脂肪物质（作为栓剂基料）、软膏基料（例如硬脂酸、硬脂醇或羊毛脂）、悬浮剂（例如滑石、硅酸酐）、抗微生物防腐剂（例如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯或对羟基苯甲酸丁酯）、润滑剂（例如硬脂酸钙、硬脂酸镁、硬脂酸铝、硬脂酰酸 (stearyl acid)、硬脂酸、鲸蜡醇、棕榈酸、淀粉或

PEG) 和具有轻微杀菌作用的物质 (例如薰衣草提取物或迷迭香提取物) 以及它们的组合。

[0047] 来自仙桃叶状枝提取物的多糖

[0048] 几个研究组 (D. McGarvie, H. Parolis, “仙桃黏液的甲基化分析” Carbohydrate Research, (1981) 88 :305-314 ;M. S. Karawya 等人,“仙人掌属、酸豆属和榅桲属的黏液和果胶”, Planta Medica(1980) 增刊 :68-75 ;M. E. Malainine 等人,“仙桃叶状枝和刺棘的结构和形态学 :纤维素提取和表征”, Carbohydrate polymers (2003) 51 :77-83) 分析了来自仙桃叶状枝的黏液的化学结构和组成。

[0049] 认为黏液由 1,4- $\alpha$ -D- 吡喃半乳糖基糖醛酸和 1,2- $\beta$ -L- 吡喃鼠李糖基残基组成, 在所有吡喃鼠李糖基残基的 4 位连接有 1,6- $\beta$ -D- 吡喃半乳糖基残基的短链。大多数半乳糖残基在 0-3 或者 0-4 处分支, 其主要携带呋喃阿拉伯糖基和吡喃木糖残基。

[0050] (D. McGarvie, H. Parolis, “仙桃黏液的甲基化分析”, Carbohydrate Research, (1981) 88 :305-314)。

[0051] 通过简单的挤压工艺 (D. Trombetta 等人,“来自仙桃叶状枝的多糖在大鼠皮肤创伤愈合中的作用”, Phytomedicine (2006) 13 :352-358) 或者通过用水处理 (R. Vázquez-Ramírez 等人,“通过口服施用仙桃黏液逆转酒精诱导的慢性胃炎大鼠的胃粘膜改变”, World J Gastroenterol (2006) 12 (27) :4318-4324), 分离来自仙桃叶状枝提取物的黏液。

[0052] 仙桃叶状枝的提取工艺

[0053] 洗涤仙桃叶状枝, 并切成约 10cm<sup>2</sup> 的片段, 然后使用水力锻压机挤压。

[0054] 将通过叶状枝挤压获得的汁在 5000g 离心 15 分钟, 并超滤上清液。以该方式, 获得了富含具有 MW > 10<sup>4</sup>Da 的多糖组分的水溶液。然后在低压和 35-40°C 浓缩该水溶液, 随后通过喷雾干燥或者冷冻干燥进行干燥。

[0055] 仙桃叶状枝提取物多糖组分的分析证实 : 存在阿拉伯糖、鼠李糖、木糖、半乳糖和半乳糖醛酸 (D. McGarvie, H. Parolis, “仙桃黏液的甲基化分析”, Carbohydrate Research, (1981) 88 :305-314)。NMR (核磁共振) 指出了来自仙桃叶状枝的多糖的典型结构。仙桃叶状枝提取物中的多糖含量为 1-70% w/w。

[0056] 油橄榄叶提取物

[0057] 油橄榄叶提取物具有生物酚的特征组成, 含有简单酚 (对羟基苯基乙醇、3,4-二羟基苯乙醇及衍生物)、类黄酮 (芹菜配基、木犀草素和它们的糖苷) 和类裂环烯醚萜 (橄榄苦苷及衍生物)。

[0058] 使用水溶剂或者含 10-80% v/v 乙醇的水醇溶剂从橄榄叶中提取生物酚 (Lee O. H. 等人,“评价橄榄叶的富含酚提取物和馏分及它们的抗氧化活性”, Bioresource Technol (2009) 印刷版之前的电子版; Mylonaki S. 等人,“施用水 / 醇溶剂系统和反应曲面法优化橄榄 (油橄榄) 叶酚类物质的提取”, Anal Bioanal Chem. (2008) 392 (5) :977-85)。提取工艺一般在室温进行, 以避免活性物质的改变或者降解, 但在一些情况下, 提取工艺可以在达 60-70°C 的温度进行。从植物基质中提取生物酚, 甚至可以使用微波 (Japón-Lujan R, Luque de Castro MD, “橄榄树的小枝 : 补充橄榄叶的生物酚来源”, J Agric Food Chem. (2007) 55 (11) :4584-8)、超声 (Vassiliki T Papoti, Maria Z. Tsimidou, “取样参数对橄榄 (油橄榄) 叶自由基清除能力的影响”, J Agric Food Chem 2009, 57, 3470-3477) 或

者超热液体提取法 (Japón-Luján R, Luque de Castro MD, “橄榄叶中橄榄苦苷和相关生物酚的超热液体提取”, J Chromatogr A. (2006) 1136 (2) :185–91) 进行, 其极大地降低了溶剂与植物基质的接触时间 (从 3 小时降低到 10 分钟)。

[0059] 从油橄榄叶提取生物酚

[0060] 将油橄榄叶干燥、切割, 然后在温室用乙醇 / 水 50 : 50 (v/v) 溶液提取 12 小时。提取工艺以 1 : 5 (g/ml) 药物 : 溶剂比率进行。当提取完成时, 除去提取物, 使叶在相同条件下经历第二次水醇提取工艺。然后混合提取物, 在 40℃ 真空中浓缩除去溶剂。最后, 为了增加生物酚浓度, 将提取物吸附在苯乙烯树脂上, 然后用乙醇 / 水 50 : 50 (v/v) 溶液洗脱生物酚。

[0061] 所得提取物含有: 2–40% 的类黄酮 (芹菜配基、木犀草素和它们的衍生物)、0.5–10% 的橄榄苦苷, 以及 1–30% 的 3,4- 二羟基苯乙醇和衍生物。

[0062] 获得要求保护的药物或营养药组合物的方法是本领域已知的。仙桃提取的多糖可以占总组合物的 0.5–50%, 而其他活性物可以占 1–30% (w/w 或 w/v)。

[0063] 要求保护的物质分别应用于饮食领域, 因为它们是安全的, 甚至是对于纤弱的患者种类, 以及老年人群、儿童或者怀孕妇女。

[0064] 要求保护的组合物可以含有来自天然来源、具有收敛剂作用的物质 (以及金缕梅 (*Hamamelis virginiana*) 提取物、氧化锌或者菱锌矿)、血管收缩剂 (例如盐酸去氧肾上腺素、硫酸麻黄碱、肾上腺素和盐酸肾上腺素)、甾族抗炎剂 (例如氢化可的松)、植物甾醇类 (例如 flavio 木酚素、肠木酚素 (*enterolignans*)、香豆雌酚、雌马酚 (*equol*)、 $\beta$ -谷甾醇、人参皂苷)、局部麻醉剂 (例如 5–20% 苯佐卡因、1–4% 苯甲醇、0.25–1% 地步卡因、0.5–5% 利多卡因、约 1% 丙吗卡因、0.5–1% 丁卡因) 和它们的组合。优选地, 以它们的水溶性形式 (例如酯或盐) 使用所述组分。

[0065] 本发明包括所述组合物的用途, 用于治疗和预防痔病复发, 向受治疗者施用治疗有效量的如上定义的组合物, 任选地以及刺山柑芽提取物、来自红橙、黑麦或者来自其他天然来源的花色素苷和它们的组合, 用于预防和治疗所述疾病。

[0066] 本发明组合物的非限制性实例报道在下表中。

[0067] 实施例 1 : 组合物

[0068] 1. 硬胶囊 :

[0069]

组分	mg/ 胶囊
仙桃叶状枝提取物	200–400mg
油橄榄叶提取物	200–400mg
乳糖	至胶囊装满

[0070] 2. 凝胶 :

[0071]

组分	% w/w

羟乙基纤维素	1.75
仙桃叶状枝提取物	0.5-10
油橄榄叶提取物	0.5-10
丙二醇	10.00
柠檬酸钠	0.30
焦亚硫酸钠	0.50
乙二胺四乙酸二钠	0.10
对羟基本甲酸甲酯	0.20
对羟基苯甲酸丙酯	0.05
蒸馏水	加至 100g

[0072] 3. 栓剂：

[0073]

组分	mg/ 栓剂
仙桃叶状枝提取物	200-400mg
油橄榄叶提取物	200-400mg
BHA	0.15mg
BHT	0.15mg
Witepsol S 55	至装满

[0074] 4. 软膏：

[0075]

组分	% w/w
仙桃叶状枝提取物	100-200mg
油橄榄叶提取物	100-200mg
聚乙二醇 400	55g
聚乙二醇 4000	39.9g

蒸馏水	至 100g
-----	--------

[0076] 实施例 2 :体外测定来自仙桃叶状枝的多糖的黏膜粘附

[0077] 为了评估来自仙桃叶状枝的多糖的黏膜粘附能力,在悬浮的肠上皮 Caco2 细胞上使用由 Patel 所述的体外黏膜粘附测定法 (Patel D. e altri, “预测口腔生物粘附剂的体外黏膜模型”, J Control Release, 1999, 61 (1-2) :175-183)。在该测试中,将黏膜粘附(所测试物质在结合黏膜细胞方面的粘附能力)测定为结合凝集素 - 膜糖蛋白抑制的函数,其通过黏膜粘附物质所致的细胞表面隐匿来测定。

#### [0078] 材料和方法

[0079] 用生物素化的凝集素和链霉抗生物素过氧化物酶处理黏膜细胞,产生了黄颜色样品;用黏膜粘附物质预处理黏膜细胞(在用凝集素处理前,30℃,15分钟)会隐匿凝集素结合位点,降低最终的黄色着色强度。

[0080] 凝集素是一些豆科 (Leguminosae) 植物(直生刀豆 (Canavaliaensiformis)) 中含有的蛋白质,具有与膜糖蛋白的糖昔和甘露糖昔结合的高度倾向性;生物素(维生素 H)在与加至细胞悬液中的链霉抗生物素过氧化物酶结合后与凝集素键合,获得复合物蛋白质 - 葡萄糖 - 凝集素 - 生物素 - 链霉抗生物素过氧化物酶。

[0081] 通过将邻苯二胺盐酸盐 (o-pd) 和过氧化氢加入到细胞悬液中, o-pd 被复合物蛋白质 - 葡萄糖 - 凝集素 - 生物素 - 链霉抗生物素过氧化物酶氧化成 2,3- 二氨基吩嗪,样品变成黄色(图 2)。

[0082] 1 分钟后加入  $H_2SO_4$  1M 封闭反应。在分光荧光计读取颜色强度,其与细胞膜上凝集素与糖昔残基之间的结合成比例。

[0083] 在 37℃ 和 95 : 5% 空气 :CO<sub>2</sub> 条件下,将 Caco2 细胞维持在具有 10% 胎牛血清、100U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的极限必需培养基 (MEM) 中。每 2-3 天更换一次培养基。处理前 24 小时,将细胞胰酶消化,使用血细胞计数器计数,在 1500rpm 离心 5 分钟,并重悬于 2ml 0.05M TBS (Tris 缓冲盐水) (pH 4) 中。

[0084] 将来自仙桃叶状枝的多糖和透明质酸(由于其黏膜粘附特性,用作参照物质)以 0.5% w\l v 溶解在 0.9% NaCl 溶液中,然后将这些溶液用于 Caco2 细胞测试的预处理。将结果表示为测试物质与黏膜细胞结合的百分比,其与与对照相比的样品着色降低百分比成反比。

[0085] 整个实验重复 5 次。通过单因素 ANOVA、然后通过 Bonferroni post hoc 检验进行结果的统计学分析。

#### [0086] 结果

[0087] 如图 3 中所述,用 Caco2 悬浮细胞体外黏膜粘附测定获得的结果显示:仙桃多糖黏膜粘附百分比为 48%,显著高于用透明质酸钠观察到的结果(黏膜粘附 29%)。

#### [0088] 结论

[0089] 体外黏膜粘附测定的结果显示:仙桃叶状枝多糖在 Caco2 细胞上具有强烈的黏膜粘附特征。该作用导致在口服施用或者局部直肠应用后形成了一层,该层能保护肠黏膜和直肠黏膜免于由食物引入的、可能在粪便中存在的一些物质的刺激性作用。该作用可用于痔病症状缓解和复发的预防。

[0090] 实施例 3 :体外评价仙桃叶状枝多糖和油橄榄叶提取物的抗炎活性

[0091] 为了评估仙桃叶状枝多糖和油橄榄叶提取物的抗炎活性, 使用 Caco2 细胞体外测试。

[0092] 由于其形态学和生物化学特征即典型的肠细胞 (intestinalenterocyte)), 选择 Caco2 肠细胞, 其广泛用于研究胃肠道功能 (Sambuy Y. 等人, “Caco-2 细胞系作为肠屏障模型 :细胞和培养基相关因素对 Caco-2 细胞功能特征的影响”, Cell Biol Toxicol. 2005 ; 21(1) :1-26 ; Navarro-PeránE. 等人, “表儿茶素 -3- 没食子酸酯的抗炎和抗癌性质通过叶酸周期中断、腺苷释放和 NF- $\kappa$  B 抑制来介导”, Inflamm Res. 2008 年 10 月 2 日)。

[0093] 用促炎物质刺激 Caco2 细胞。然后, 根据细胞间粘附分子 ICAM-1 和白细胞介素 -8(IL-8) 炎症标志物产生, 测定仙桃叶状枝多糖和油橄榄叶提取物降低肠上皮炎症的能力。ICAM-1 是参与保留 T 细胞于发炎上皮处的重要因子, 是一种显著的 CD4T 和 CD8 的共同刺激信号 (Ramakers JD ealtri, “花生四烯酸而不是二十碳五烯酸和油酸, 活化了 NF- $\kappa$  B 并提高 Caco2 细胞中 ICAM-1 的表达”, Lipids 2007 ;42(8) :687-98)。

[0094] 在炎症疾病期间, IL-8 由单核细胞、成纤维细胞、内皮细胞和上皮细胞产生, 其对于 T 淋巴细胞和嗜中性粒细胞招募是非常重要的 (VavrickaSR 等人, “hPepT1 转运胞壁酰二肽, 活化 NF- $\kappa$  B 并刺激人结肠 Caco2/bbe 细胞中 IL-8 分泌”, Gastroenterology 2004 ; 127(5) :1401-9)。

[0095] 肠上皮炎症由白细胞介素 -1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 和干扰素 - $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 诱导, 其是两种最有效的促炎物质 (Garat C. 等人, “细胞内 IL-1Ra 1 型通过抑制 p38 促细胞分裂原活化的蛋白激酶和 NF- $\kappa$  B 途径而抑制 Caco-2 肠上皮细胞中 IL-1- 诱导的 IL-6 和 IL-8 生成”, Cytokine. 2003 年 7 月 ;23(1-2) :31-40)。

#### [0096] 材料和方法

[0097] 将来自仙桃叶状枝和来自油橄榄叶提取物的多糖稀释成 100mg/ml。根据该溶液, 获得用于细胞培养处理的后续稀释。

[0098] 在 37°C 和 95 : 5% 空气 : CO<sub>2</sub> 条件下, 将细胞维持在具有 10% 胎牛血清、100U/ml 青霉素和 100  $\mu$  g/ml 链霉素的极限必需培养基 (MEM) 中。每 2-3 天更换培养基。处理前 24 小时, 将细胞胰酶消化, 使用血细胞计数器计数, 然后接种在 96 孔板中 (用于 ELISA 测试) 和 100mm 培养皿中 (用于蛋白质印迹)。

[0099] 然后, 将细胞用 IL-1 $\beta$  (10ng/ml) 和 IFN- $\gamma$  (200U/ml) 的混合物、用来自仙桃叶状枝的多糖和 / 或用油橄榄叶提取物以 200  $\mu$  g/ml 处理 48 小时。

[0100] 通过蛋白质印迹测定 ICAM-A 的表达水平, 通过 ELISA 测试测定 IL-8。结果表达为在用来自仙桃叶状枝的多糖和 / 或用油橄榄叶提取物处理的细胞中相对于用 IL-1 $\beta$  和 IFN- $\gamma$  处理的细胞中, 炎症标志物抑制的百分比。

#### [0101] -蛋白质印迹

[0102] 处理后 48 小时, 从细胞中提取蛋白质, 上样在 4-12% 聚丙烯酰胺凝胶上, 转移到硝酸纤维素膜, 并用 ICAM-1 的单克隆抗体孵育。通过放射自显影图的密度分析定量蛋白质表达, 并将数值表示为对应于信号强度的任意密度单位。

[0103] 用作为上样对照参照蛋白质的  $\alpha$  - 微管蛋白的水平归一化结果。

#### [0104] -ELISA

[0105] 用能够通过抗原 - 抗体结合特异识别蛋白质的 ELISA 试剂盒（酶联免疫吸附测定）测量处理后 48 小时收集的无细胞上清液中的 IL-8。通过用酶标记的多克隆抗体识别并结合复合物。在添加底物后计算酶活性，估计其可能与测试抗原的量成比例。数值报告为 pg/ml ± SEM。

#### [0106] 结果

[0107] 在 Caco2 细胞上进行的蛋白质印迹获得的结果显示：来自仙桃叶状枝的多糖和油橄榄叶提取物分别产生了 27% 和 33% 的抑制百分比（图 3 和图 4）。

[0108] 通过 ELISA 测定的在相同细胞培养中抑制 IL-8 表达的能力，发现来自仙桃叶状枝的多糖为 26%，油橄榄叶提取物为 24%（图 4）。

[0109] 此外，在两个实验中，用来自仙桃叶状枝的多糖和油橄榄叶提取物的组合处理 Caco2 细胞，表现出 ICAM-1 (76%) 和 IL-8 (70%，图 3 和 4) 二者抑制百分比的协同效应。

#### [0110] 结论

[0111] 体外测试显示：油橄榄叶提取物在来自仙桃叶状枝提取物的多糖的抗炎症作用中产生意外的协同效应，特别是在降低 Caco2 细胞中通过使用抗炎物质诱导的炎症标志物 ICAM-1 和 IL-8 二者的表达中的协同效应。

[0112] 实验数据显示：来自仙桃叶状枝提取物的多糖具有黏膜粘附作用和抗炎作用。后者被油橄榄叶提取物以协同方式非常意外地增强。

[0113] 这些作用都可以用于预防和治疗痔病、其并发症和相关疾病。

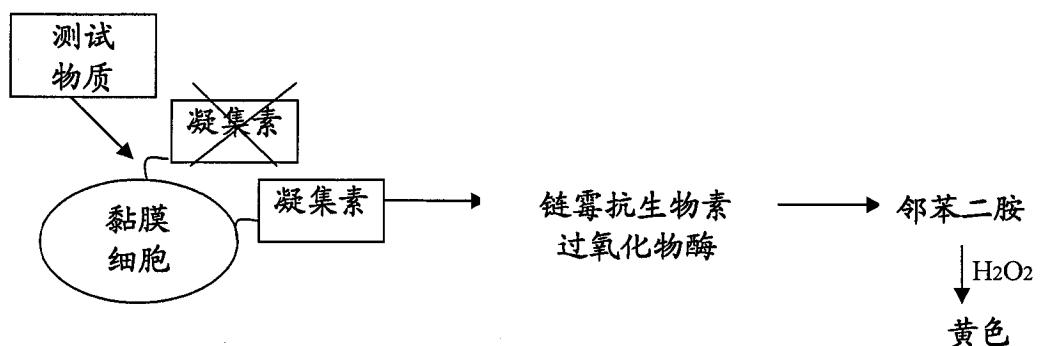


图 1

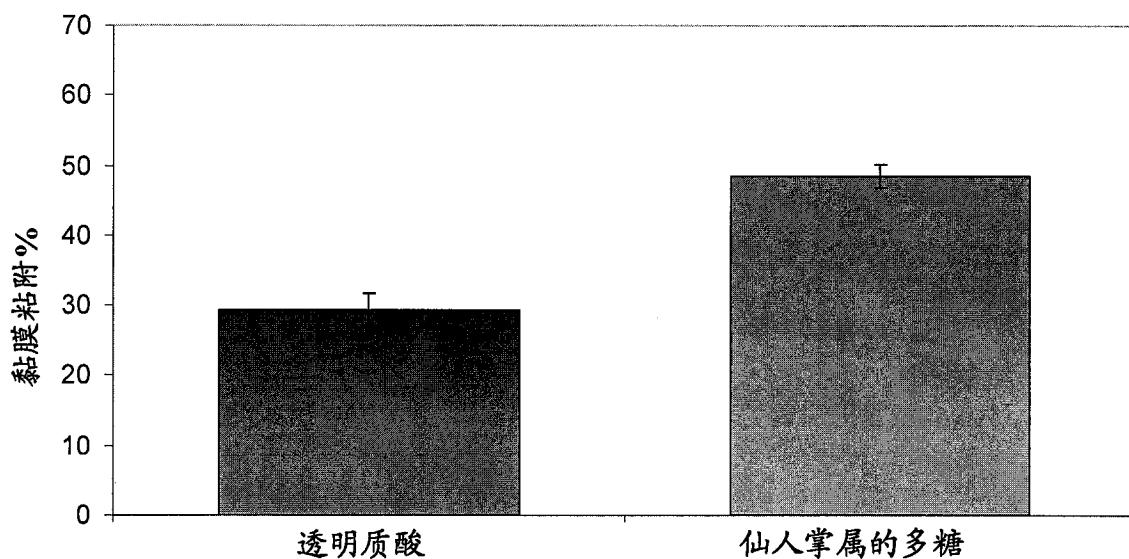


图 2

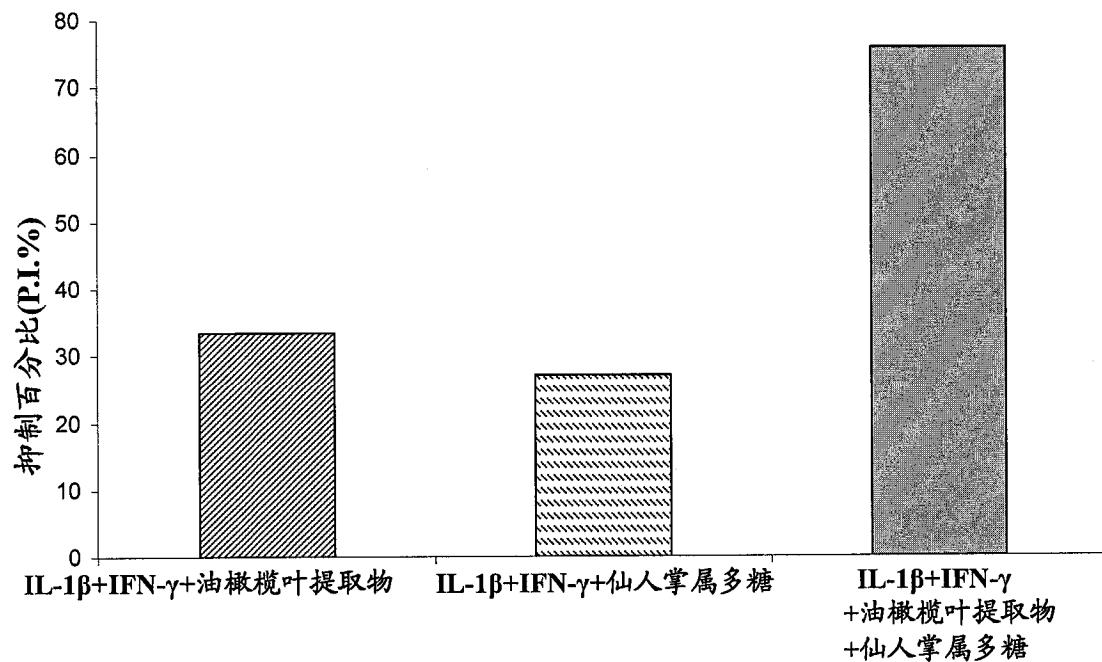
**ICAM-1**

图 3

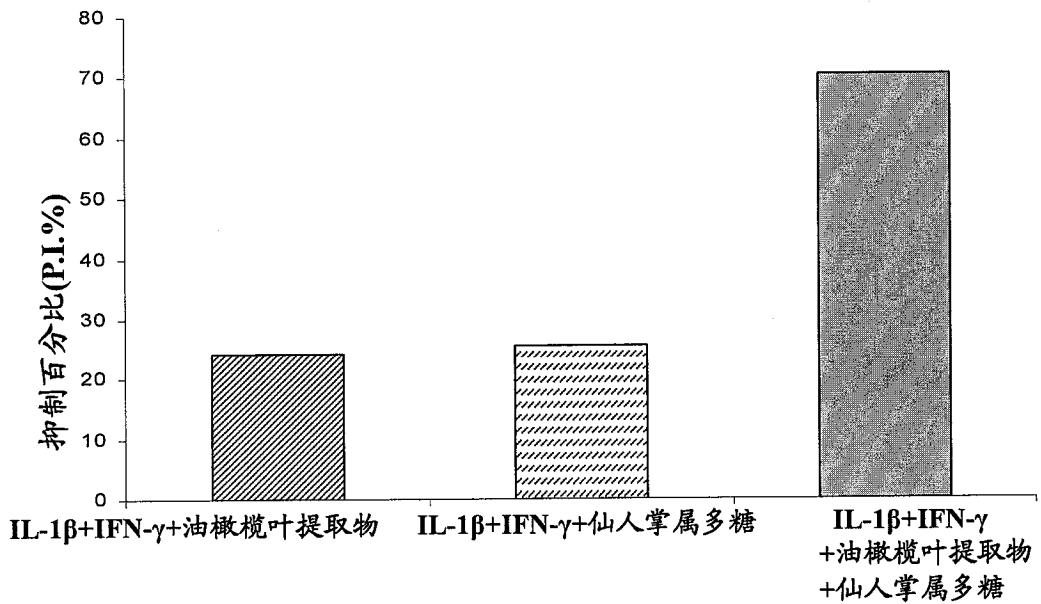
**IL-8**

图 4