

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： 97135292

※申請日期： 97.9.12

※IPC 分類：A61K^{36/35} (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

A61P^{37/02} (2006.01)

西方雪果與發炎

A61P^{29/00} (2006.01)

WOLFBERRIES AND INFLAMMATION

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

瑞士商耐斯泰克公司

NESTEC S.A.

代表人：(中文/英文)

保拉 奈爾森

NELSON, PAULA

住居所或營業所地址：(中文/英文)

瑞士威維市雀巢街55號

AVENUE NESTLE 55, CH-1800 VEVEY, SWITZERLAND

國籍：(中文/英文)

瑞士 SWITZERLAND

三、發明人：(共 6 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 卡琳 威達
VIDAL, KARINE
2. 史堤芬尼 布朗-史柏任
BLUM-SPERISEN, STEPHANIE
3. 大衛 菲利浦
PHILIPPE, DAVID
4. 奧列弗 巴雷夫瑞
BALLEVRE, OLIVIER
5. 彼德 布崔利
BUCHELI, PETER
6. 將官 王
WANG, JUNKUAN

國 籍：(中文/英文)

1. 法國 FRANCE
2. 瑞士 SWITZERLAND
3. 法國 FRANCE
4. 法國 FRANCE
5. 瑞士 SWITZERLAND
6. 瑞士 SWITZERLAND

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家(地區)申請專利：

【格式請依：受理國家(地區)、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 歐洲專利機構；2007年09月12日；07116190.5
- 2.

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

- 1.
- 2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明一般而言係有關發炎領域。特定言之，本發明係有關一種以天然化合物於製備治療發炎之產物上之用途。例如，西方雪果萃取物顯示有抗炎性質。

【先前技術】

發炎是組織對傷害性刺激(如病原體、損害性細胞或刺激物)之複雜生物效應。生物體會除去有害刺激並啟動組織癒合過程，試圖加以保護。然而，不論個體年齡，調節不足之發炎可導致若干疾病。

年齡增長與免疫系統調節失調有關，如：細胞介導之免疫反應顯著下降，伴隨體液免疫機能障礙加劇(例如，對疫苗之反應較低)。此外，年齡增長常常與極輕微發炎狀態有關。因此，尤其許多年長者，罹患可導致發病和死亡之傳染性和非傳染性疾病之風險增加。

基於西方雪果之多重營養物成分(例如玉米黃質、維生素和寧夏枸杞(*Lycium barbarum*)多糖)，其多種健康益處已為吾人所知。

然而，相關技藝上仍需要利用具有抗炎性質之天然化合物。

例如：營養介入法(如：使用n-3 PUFA(多不飽和脂肪酸)不僅減少炎性細胞功能，而且減少細胞介導免疫反應(例如淋巴細胞增殖和NK活性)，其可導致可能不利於寄主防衛性之影響。

【發明內容】

因此，本發明目的在於提供一種替代性天然化合物，其具有抗炎性質而且不會對個體免疫防衛性產生任何不利影響。

本發明者驚訝地發現西方雪果萃取物具有抗炎性質。因此，本發明目的可藉由使用西方雪果萃取物製備治療及/或預防發炎之產物而得以實現。而且發現：免疫反應不受影響。

【實施方式】

因此，本發明之一個實施例為利用包括西方雪果或其一部分及視需要選用之乳或含乳蛋白質載體之主要組合物，於製備治療及/或預防發炎之產物上之用途。

此產物計畫經口或局部投與。

此乳或乳蛋白質可為動物或者植物來源或源自其混合物。較佳地，此乳是牛乳、美洲駝乳、水牛乳、山羊乳、綿羊乳、植物乳，尤指豆漿，或其混合物。乳蛋白質應理解為從一種或多種如上所列乳類型獲得之蛋白質。

較佳地，此主要組合物為可混溶之組合物。

有利地，尤其當主要組合物包括乳或含乳蛋白質載體時，其具有接近完整西方雪果必需活性組分之組成，並在水性系統中有良好穩定性、可混溶性及/或分散性。

此外，尤其當主要組合物包括乳或含乳蛋白質載體時，其以較好的生物利用率和穩定性之形式具有提高之營養價值。其味道和顏色俱佳。其能直接使用、濃縮或乾燥成粉

末，形成日用食物之若干應用或其他營養用途。

如果該主要組合物之製法可以製成可釋放西方雪果必需親脂性及/或親水性生物活性物質成分之主要組合物，即可實現所有此類特色，此製備方法包括以下步驟：i)於乳或含乳蛋白質之液體介質中混合和碾磨西方雪果，ii)視需要選擇性分離不能溶解的纖維，獲得水性懸浮液，iii)由所產生之懸浮液可視需要選擇性進行巴氏殺菌(pasteurising)，iv)處理期間，視需要選擇性添加合成或天然生物活性物質成分，v)進一步視需要選擇性乾燥懸浮液，獲得粉末。

因此，在本發明之一個實施例中，此主要組合物藉由包括如下步驟之方法獲得：i)於乳或含乳蛋白質之液體介質中混合和碾磨西方雪果，ii)視需要選擇性分離不能溶解的纖維，獲得水性懸浮液，iii)由所產生之懸浮液視需要選擇性進行巴氏殺菌(pasteurising)，iv)處理期間，視需要選擇性添加合成或天然生物活性物質成分，v)進一步視需要選擇性乾燥懸浮液，獲得粉末。

此方法之主要優點為天然和經濟效益，能夠改進其天然組合物中(不含有機溶劑殘餘)呈穩定之水溶性和脂溶性化合物形式之多重營養素之釋放。

另一態樣中，本發明提供一種增加西方雪果生物活性化合物在水性體系中之混溶性或分散性、穩定性及之生物利用率之方法，其係使用如上述方法，特定言之使用乳或乳蛋白質、豆漿或來自植物之類乳蛋白質，供萃取和釋放西

方雪果多重營養素功能成分。

如上所述之主要組合物能用於傳送具有改進之生物利用率、混溶性和穩定性西方雪果功能成分之多重營養素。

術語生物活性化合物應理解為當經口投與或局部施用時，具有生物活性或影響健康之分子或成分。

西方雪果可以呈例如：植物果實及其他植物部分之形式使用。果實可呈新鮮、濃縮或乾燥形式，例如：風乾或凍乾物質。以使用乾燥熟果實較佳。

本發明一項較佳實施例中，此主要組合物包括至少一部分西方雪果必需親脂性及/或親水性生物活性物質成分。

此必需親脂性及/或親水性生物活性物質成分較佳地選自由如下組成之群組：脂質、生物鹼、蛋白質、碳水化合物、醣蛋白、類胡蘿蔔素、多酚類化合物，如：類黃酮、維生素、礦物質，或其混合物。

類胡蘿蔔素可由如下組成之群組：胡蘿蔔素類和葉黃質，如：茄紅素、胡蘿蔔素、六氫茄紅素、八氫茄紅素、斑蝥黃、 β -隱黃質、辣椒紅、葉黃素、玉米黃質或彼等呈脂肪酸酯形式之物質，或其混合物。

醣蛋白較佳係選自由阿拉伯半乳聚糖蛋白質組成之群組，特定言之可藉由 β -葡糖基 Yariv 試劑 (beta-Glucosyl Yariv reagent) 檢測之寧夏枸杞多醣和高分子。

類黃酮較佳係選自由如下組成之群組：黃酮(如：芹菜素、木犀草素或香葉木素)、黃酮醇(如：槲黃素、楊梅素、山奈酚)、黃烷酮、花青素(如：天葵素、錦葵色素)或

異黃酮(如：金雀異黃酮、木質異黃酮)，或其混合物。

本發明主要組合物可以於乳或含乳蛋白質載體中至少包含西方雪果必需生物活性物質成分或其一部分，但不包括不能溶解的纖維。此乳載體可呈動物或植物來源之脫脂乳或全乳形式(例如豆漿、果汁或椰子汁等等)。在更佳實施例中，使用牛乳或豆漿，其取決於所需之主要組合物。此含乳載體可為含有乳蛋白質(如：酪蛋白或乳清蛋白)之任何食用液體。

可以視需要選擇性添加植物油至液體介質。

西方雪果可在此乳或含乳蛋白質液體介質中，依大約1:1至1:1000，較佳為1:5至1:50之間之各比率混合和碾磨。此混合和碾磨步驟可於1至95℃之間進行，介於20至80℃之間較佳，介於40至80℃之間更佳。然後，至少部分除去不能溶解的纖維，獲得水性懸浮液。

此可藉由任何常規方法實現。產生之主要組合物可進一步地藉由相關技藝上熟知之技術進行巴氏殺菌及/或乾燥成粉末。獲得之主要組合物也可呈液體或凝膠形式。

本發明因此提供一種具有類似完整果實之重要營養素組成之主要組合物，其具有良好穩定性、混溶性和生物利用率。如果選擇粉末形式，此類組合物可在水性體系中高度分散。在該情況下，例如，此粉末可分散於冷水或熱水中。同樣可添加至乳中。

此組合物可另外包含一種或多種乳化劑、穩定劑、抗氧化劑及其他添加劑。較佳係使用與食物相容之乳化劑，

如：磷脂，例如卵磷脂、聚氧乙烯山梨醇酐單硬脂酸酯或-三硬脂酸酯、單月桂酸酯、單棕櫚酸酯、單油酸酯或三油酸酯、單酸或二酸甘油酯。

也可使用已知用於食物、化妝品或藥品之任何類型穩定劑。

可使用已知用於食物、化妝品或者藥品之任何類型抗氧化劑。

可進一步使用已知用於食物、化妝品或者藥品之添加劑、香料和著色劑。

根據主要組合物預定最終用途，可添加乳化劑、穩定劑、抗氧化劑和添加劑。

此組合物可進一步地包含合成或天然生物活性物質成分，如胺基酸、脂肪酸、維生素、礦物質、類胡蘿蔔素、多酚等等，其可在巴氏殺菌及/或乾燥之前，較佳係藉由乾式或濕式混合法添加此組合物中。

利用本發明製備之產物可以是食物補充劑、作為藥劑或用於藥劑中之補充劑、或作為乳油或用於乳油中之補充劑。

在本發明之較佳實施例中，此產物預定應用與/或施用至人或寵物。

此產物可投與至任何年齡之個體，特定言之嬰兒、幼童、青少年、成人及/或老年人。然而，西方雪果似乎特別適合成年人和老年人。

如本發明之較佳實施例，利用本發明製備之產物可供人

食用或作為食品。該食品經腸內服用(即本發明之目的，包括口服)或非經腸式使用。

因此，此主要組合物可能是用於口服之食物添加劑，如：用在營養組合物、食品補充劑、寵畜食物、化妝品製劑或藥物製劑中。此主要組合物也可用於局部施用產物之添加劑，如：化妝品或藥品中。

因此，利用本發明製備之產物可以是營養完全配方、乳製品、冷藏或耐貯飲料、用於哺乳母親之產品、液體飲料、湯、食物補充劑、膳食代替物、營養棒、糕餅、乳或發酵乳產物、優酪乳、以乳為主之粉末、腸內營養品、嬰兒配方、嬰兒營養品、菜泥、穀物產品或以發酵穀物為主之產品、霜淇淋、糖果、甜點、餅乾、蛋糕、巧克力、卡布奇諾、咖啡、餐廚用品，如：蛋黃醬、番茄糊或沙拉醬汁、寵畜食物或寵畜飲料。在較佳實施例中，供人食用之食品組合物中可補充上述主要組合物。此主要組合物，較佳係呈粉末形式，以一定數量分散在以上食物或飲料中，以便每日攝取如上所述生物活性物質營養素，其取決於預期效果和標靶組織。個體為獲得有益效果而食用之主要組合物或食品的數量還將依賴其體型大小、類型以及年齡決定。

如果此產品是用於口服之營養補充劑，其可呈膠囊、明膠囊、軟膠囊、錠劑、糖衣機、藥丸、糊劑或軟錠劑、膠質或可飲用溶液或乳液、糖漿或凝膠。主要組合物劑量可由習此相關技藝之人士依計畫目的而改變，但是通常介於

0.1至100 wt%之主要組合物之間。此補充劑也可包括增甜劑、穩定劑、抗氧化劑、添加劑、調味劑及/或著色劑。化妝品目的之補充劑可另外包含針對皮膚之活性化合物。

在另一個實施例中，如果本發明之產品是藥品組合物，其可用於預防性處理及/或治療性處理。

在治療用途中，其投藥量應足以至少部分治療或預防疾病和其併發症之症狀。實現此目的之適當數量即定義為"治療有效劑量"。用於此目的之有效量將取決於習此相關技藝之人士所熟知之許多因素，如：疾病嚴重程度和患者體重和一般狀態。在預防用途中，投與容易罹患或有罹患某疾病風險之患者之本發明組合物投藥量應足以至少部分降低發展成該疾病之風險。此數量即定義為"預防有效劑量"。此外，精確數量取決於患者之許多特殊因素，如：患者健康狀態和體重。

如果本發明化合物作為藥品組合物投與，其較佳係使用醫藥可接受載體投與，載體性質依投與方式而不同，例如：經腸、經口和局部(包括眼科)途徑。所需調配物可使用許多賦形劑製備，包括例如：藥物級甘露糖醇、乳糖、澱粉、硬脂酸鎂、糖精鈉、纖維素、碳酸鎂。

應理解，習此相關技藝之人士將依據其本身知識，考量給藥途徑，選擇適當成分和蓋倫劑型，使活性化合物得以針對所需組織，例如：皮膚、結腸、胃、眼睛、腎或肝。

本發明亦有關包括如上述主要組合物之化妝品組合物。其可配製成例如：洗劑、洗髮精、乳霜、防曬品、日曬後

用乳霜、抗老化乳霜及/或軟膏。能局部使用之此組合物亦包括可被用於化妝品之脂肪或油，例如"CTFA工作,化妝品成分手冊，華盛頓(CTFA work, Cosmetic Ingredients Handbook, Washington)"中所提及者。還可能添加其他化妝品活性成分。此組合物另外包括結構劑和乳化劑。還可添加其他賦形劑、著色劑、香料或不透明劑至組合物中。應理解：此化妝品將含習此相關技藝之人士熟知之不同成分的混合物，以確保此物質快速滲透至皮膚並預防在儲存期間降解。

應理解：本發明原理同樣適用為可促進目前使用之藥物之佐劑療法。因為本發明化合物容易與食物一起投與，因此可採用包含高數量此物質之特別臨床食物。

投與寵物或人時，如上所述食物、營養補充劑、化妝品或藥品。特定言之，可藉由至少部分減輕發炎而改進健康。

可使用本發明製備之產品治療之發炎選自由如下組成之群組：急性發炎，如：膿毒病、傳染、燒傷和慢性發炎，如：炎性腸病、克羅恩氏病(Crohn's disease)、潰瘍性結腸炎、壞死性小腸結腸炎、皮膚發炎，如：紫外線或化學引起之皮膚發炎、濕疹、反應性皮膚、乾癬、白斑病、粉刺、腸炎綜合症、肝炎、酒精性肝硬化、過敏反應、特異性反應、骨炎、類風濕關節炎、全身性狼瘡、葛氏-索氏(Gougerot-Sjögren)綜合症、萊特氏綜合症(Reiter's syndrome)、脊髓灰質炎、皮膚炎、甲狀腺炎、巴澤多

(Basedow)病、橋本病、I型糖尿病、愛迪生氏病(Addison's disease)、自體免疫肝炎、乳糜瀉、比爾默病(Biermer's disease)、多發性硬化、肌無力、腦脊髓炎、眼睛發炎、肥胖有關之發炎、年齡有關之極輕微發炎、布勞(Blau)綜合征、阿茲海默氏病、心臟血管疾病、動脈粥樣硬化、新陳代謝綜合症、齒齦炎和牙周病。

本發明者已經研究本發明主要組合物抗炎效果之分子機轉。在不希望受限於理論下，本發明者目前相信：在人腸上皮細胞中，其藉由巨噬細胞(圖1)和TNF- α -或LPS引起之NF- κ B活化(圖2)途徑，而抑制LPS介導產生促炎細胞素。在預臨床研究中，使用本發明主要組合物之膳食補充法已在老鼠急性腸炎模式中證明其強力抗炎性質(圖3至10)。另外，本發明主要組合物在老年小鼠肝臟中能進一步減少促炎性細胞素(如：TNF- α)之表現(圖11)。此外，使用本發明主要組合物之膳食補充法可在衰老小鼠中加強抗原特異性體液免疫反應和細胞介導之免疫反應(分別為圖12和13)。因此，本發明主要組合物在減少之發炎狀態時顯示有益效果。同時，本發明主要組合物進一步能夠支援免疫系統。

因此，利用本發明製備之產品可用於減少發炎狀態，同時加強免疫系統。

因此，本發明主要組合物有潛力使受損之免疫和發炎反應恢復回穩衡狀態。憑此雙重效果，本發明主要組合物例如：適用在針對老年人、臨床和寵物營養之產品中。

特定言之，本發明主要組合物有利於在老化期間保持免

疫功能，同時減少與年齡有關之極輕微發炎狀態。

本發明主要組合物還可用於臨床產品，以控制急性炎症或慢性發炎。

因此，在本發明一個實施例中，利用本發明製備之產品係用來改進受損之免疫反應。也可用來加強抗原特異性體液免疫反應及/或加強細胞介導之免疫反應。

另外，此主要組合物及/或本發明之產品可用於治療或預防與氧化壓力相關之病變。本發明者已顯示，本發明主要組合物及/或產品之應用可極大幅增加抗氧化劑基因，如：GPX-1、CAT1和SOD2(圖9)。因此，本發明主要組合物及/或產品可提供對抗氧化壓力的保護，例如：由自由基、(如： $\cdot\text{O}_2^-$ ，過氧化物陰離子)； H_2O_2 、過氧化氫； $\cdot\text{OH}$ 、羥基； ROOH 、有機過氧化物； $\text{RO}\cdot$ 、烷氧基； $\text{ROO}\cdot$ 、過氧自由基； HOCl 、次氯酸； OONO^- ，過氧亞硝酸根；及/或 $\text{NO}\cdot$ 所引起之壓力。

習此相關技藝之人士咸了解，可在不脫離原始揭露之本發明範圍內，自由組合本文所敘述之任何特色。

自以下實例和圖示，可進一步了解本發明之優點和特徵。

實例1:

包含西方雪果和乳之主要組合物(LWB，乳-西方雪果)製法

取西方雪果(40 g)和全乳(300 g)加至1公升容器中。混合物保持靜置10分鐘並在氮蒙氣下，以Polytron均質器(KINEMATICA公司分散和混合技術，PT3000)，於26000

rpm下處理15分鐘。在Polytron均質器處理期間，藉由水浴維持混合物溫度在80-85°C，然後冷卻至室溫。所得混合物在2000 g下離心10分鐘。丟棄固體殘渣。凍乾液相(306 g橙黃色乳)。最後磨碎乾燥產物，產生54 g橙黃色粉末，其與西方雪果粉末相比，顯示具有很好之水分散性和改良之玉米黃質穩定性。

實例2

試劑

由J. Wang (FS, Lipids & Bioactives)提供由NRC (雀巢研究中心 (Nestlé Research Center; Lausanne))製造之批號N°WB03A1506H之如上所述乳-西方雪果(LWB)粉末和西方雪果萃取物粉末(批號N°WB03A1506H)。來自大腸桿菌血清型055:B5(LPS)係購自Sigma藥廠(St. Louis, MO)。遵循倫理委員會批准後，自不同健康供體產後20日內收集人母乳(HM)。鑰孔戚血藍蛋白(KLH)購自Sigma藥廠。

細胞培養

小鼠單核細胞/巨噬細胞細胞系RAW 264.7(來自美國ATCC, Manassas, Virginia, USA之TIB-71)維持於37°C下，5% CO₂/空氣培養箱中已補充10%加熱失活之FCS (Amimed)和1%青黴素/鏈黴素(英國Paisley市Invitrogen公司)之DME培養基(DMEM，瑞士Amimed, Bioconcept, Allschwili)中。使用胰蛋白酶/EDTA(美國Sigma藥廠(St. Louis, MO, USA))傳代培養細胞。人結腸腺癌細胞系HT-29純系34細胞(亦即使用NF- κ B報導子基因穩定轉染之HT-29

細胞)維持於37°C之5% CO₂/空氣培養箱中之包含1%穩定L-穀胺醯胺之高葡萄糖(4.5 g/l)並補充10%加熱失活(56°C下1小時)之FCS、1%青黴素/鏈黴素(Sigma藥廠(St Louis, MO))、500µg/ml G418(Invitrogen)和100µg/ml諾黴素(Normocin)(Invivogen)之DMEM(瑞士Bioconcept藥廠(Allschwill, Switzerland))中。每2日更換培養基，直至細胞單層到達90%匯合度。使用胰蛋白酶/EDTA(Sigma)傳代培養細胞。

LPS介導IL-6表現之定量法

於37°C之5% CO₂/空氣培養箱中，在含標準培養基之96平底孔板中，依10⁴個細胞/孔接種RAW 264.7細胞。培養3日後(即細胞到達80%匯合度)，在有或無LWB樣本(0.1-1%最後濃度)下，在標準培養基中，使用或不使用0.5 µg/ml大腸桿菌(E. coli) LPS (055:B5, Sigma藥廠)，刺激細胞24小時。然後收集細胞培養物上清液並用於定量IL-6產量。如製造商指示，藉由ELISA(法國Murine IL-6 Eli-pair, Diaclone, Besançon)計算細胞培養上清液中介白素-6(IL-6)濃度。

NF-κB活性

在含維持培養基之96平底孔板中，以10⁴個細胞/孔接種HT-29純系34細胞。培養3-4日後(即細胞到達80%匯合度)，在磷酸鹽緩衝生理食鹽水溶液(PBS)(Sigma藥廠)中洗滌細胞，然後，在有或無LWB樣本下，在包含1%青黴素/鏈黴素之DMEM中，使用或不使用LPS(10 ng/ml+5%人乳)

或重組體TNF- α (10 ng/ml;英國R&D systems, Oxon), 刺激細胞24小時。然後收集細胞培養上清液並存儲在+4°C O/N, 直至分析NF- κ B活性。活化NF- κ B後, HT-29純系34細胞在培養物上清液中分泌鹼性磷酸酶(SEAP)。依製造商指示(美國Applied Biosystems, Bedford), 使用螢光檢測方法(Phospha-Light™ System)測定SEAP釋放量。簡言之, 在白色96孔平底聚丙烯孔板(Greiner)中, 由細胞培養物上清液與來自Phospha-Light™ System之反應緩衝液培養20分鐘, 並使用Spectrafluor Plus分光光度計(Tecan 8634 Hombrechtikon, Switzerland)測定螢光。結果以用相對螢光單位來表示(RLU)。

TNBS引起之結腸炎模式

TNBS結腸炎模式為藉由化學產物(150毫克/公斤劑量之三硝基苯磺酸(TNBS))引起之急性發炎模式。在引發結腸炎之前七天直至殺死期間之動物, 每組十隻小鼠, 接受包含1% LWB(50 mg)之食物飼養。在投與TNBS後1至4天之間, 藉由胃管灌食法給與50 mg LWB, 以彌補與急性腸炎有關之較低食物攝取。每隻動物均分析體重減少量、宏觀得分、組織學得分、COX-2、pSTAT3、促炎性和抗氧化劑基因表現及抗氧化劑效力。遵循Wallace(Wallace等人, 1989)和Ameho(Ameho等人, 1997)之得分標準, 完成宏觀和組織學評分。在急性發炎條件下, 由COX-2(環加氧酶之可誘導形式, 72kDa蛋白質)負責誘導生物合成前列腺素。Stat3為許多細胞活素之鍵控信號分子; 尤其為作為IL-6之

促炎性細胞活素之鍵控信號分子。

用於評價衰老小鼠免疫調節之試驗設計

沒有特異性病原體之雄性 C57BL/6J 小鼠(4 周大)係購自法國 Charles River Laboratories Inc. 公司。小鼠生活於常規環境下(12 小時光照/黑暗週期, 22°C, 56% 濕度)並自由飲水和攝取半合成性 Kliba 3434 飼料。每個籠關 5 隻小鼠, 直至 5 個月大, 然後每個籠關 1 隻老鼠。動物之所有條件和處理均經過雀巢公司(Nestlé)和州倫理委員會批准並獲瑞士聯邦獸醫顧問同意。在 21 個月大時, 老鼠隨機分成 2 組, 每組 10 隻。無補充劑之對照組小鼠(H₂O, 每個年齡群 n=10)和補充 LWB 之小鼠(LWB, 每個年齡群 n=10)接受半合成性飼料(AIN-93)。LWB 以 0.5%(w/v) 溶液供應於飲用水中, 其新鮮製備並每隔一天更換。實驗期間(44 日), 所有小鼠容許隨意飲水及攝食。進行相同試驗設計兩次, 並亦使用 8 個月大小鼠(每個年齡群 n=8)進行試驗。試驗活體內 T 細胞依賴性體液反應(產生抗原-特異性抗體)時, 在實驗第 15 天, 藉由皮下注射(100 μ l)含於 1% Alum(丹麥 Frederikssund 市 Brenntag Biosector 公司)中之 100 μ g 惰性抗原 鑰孔戚血藍蛋白(KLH, Sigma 藥廠)免疫接種衰老之小鼠。採用 DTH 反應用作活體內細胞免疫測量值。在誘發前及誘發後 24 小時至 8 天, 測定耳朵厚度(耳朵腫脹), 以決定其產生 DTH 反應之能力。簡言之, 在使用 KLH(即實驗第 22 天)免疫接種後 7 天, 藉由注射回憶性抗原 KLH(10 μ l 之 0.5 μ g/ml)至每一隻小鼠右耳, 誘發 DTH 反應。僅用媒劑

(生理食鹽水=PBS)注射左耳，並充當每一隻動物之組內對照組。誘發後24小時，並在接下來7天期間，測量未誘發之耳朵(左耳)和已誘發之耳朵(右耳)。使用以下公式：耳朵厚度之 Δ -[已誘發之耳朵(右耳，KLH)厚度-未誘發之耳朵(左耳，PBS)厚度]，以耳朵膨脹程度，亦即耳朵厚度變化表示DTH反應(KLH-PBS)，其中耳朵厚度之 Δ =[誘發後耳朵厚度-誘發前耳朵厚度]。在實驗第0、15、29天時收集血樣，及於第44天經由心臟穿刺收集血樣。在實驗第44天殺死老鼠。在屍體解剖中，取出肝臟，取一小份立即於液態氮中凍結。樣本存儲於-80℃直至進一步分析。

KLH特異性IgG2a抗體濃度定量法

由ELISA測定血清中之KLH特異性IgG2a抗體之數量。簡言之，用KLH(50 μ l/孔，100 ng /ml)塗覆微量滴定板，並在37℃下培養3小時。在37℃下使用ELISA緩衝液阻斷游離結合位置1小時。然後添加樣本，並在+4℃下培養一夜。由已結合之抗體在37℃下與來自Southern Biotechnologies (美國Birmingham)之生物素共軛羊抗小鼠IgG2a(γ 2a鏈特異性)振盪反應1小時。在添加來自KPL之TMB過氧化物酶受質後，分析板在450 nm下讀數。抗KLH IgG2a抗體濃度係以OD_{450nm}平均值表示。

基因表現

取肝樣本移入1 ml RNA溶胞緩衝液(德國Düren市Macherey-Nagel公司)並使用設定在動力6之Ribolyzer均質器(美國Hybaid, Waltham, MA)均質化20秒。使用自商品購

買之套組(德國Düren市Macherey-Nagel公司NucleoSpin RNA II套組)提取RNA。使用Ribogreen RNA Quantitation套組(美國Molecular Probes; Eugene, Oregon)定量RNA, 並使用Agilent RNA 6000 Nano LabChip套組(美國Agilent Technologies, Palo Alto)分析RNA品質。遵循製造商指示(瑞士Applied biosystems, Biosystems; Rokeutz), 使用Multiscribe反轉錄酶反轉錄總RNA (2 µg)。定製之具有48個TaqMan探針(負載量: 在反應槽(technical monoplicates)中, 每一卡片承載8個樣本)之低密度基因陣列(LDA)係購自Applied Biosystems(美國Foster市)並依製造商指示使用。使用相對定量法 $\Delta\Delta C_t$ 方法與SDS2.2.2軟體(Applied Biosystems)計算基因表現。產生之循環閾值(C_t)輸入至MS Excel(美國微軟(Microsoft))進一步分析。簡言之, 首先計算 ΔC_t 值(即標靶基因 C_t 值-GAPDH管家基因 C_t 值), 然後使用下式: $2^{-\Delta C_t} \times 10^6$ 計算相對mRNA表現。

一般統計分析

由平均值 $\pm$ SEM或SD及史都登氏(Student)-t試驗(不配對)或適當時藉由雙向方差分析, 分析數據。小於5%概率值即視為顯著。

結果:

A)證明乳-西方雪果抗炎性質之活體外實驗

乳-西方雪果(LWB)溶液於活體外抑制鼠科巨噬細胞細胞系受LPS介導之促炎性細胞素IL-6釋放(圖1)及抑制人腸上皮細胞受LPS介導之NF- κ B活化作用(圖2)。

B)證明乳-西方雪果抗炎和加強免疫效果之活體內實驗

a.病理性急性炎

使用LWB之膳食補充法，在鼠科急性腸炎模式中證明其強力抗炎性質。口服1% LWB可改善體重損失(圖3)、宏觀和組織學損害(圖4和5)、明顯減少COX-2和pSTAT3表現程度(圖6和7)。另外，與對照組相比，促炎性基因(如：TNF α 、IL-6和IL-1 β)和蛋白質(如：結腸中之KC)之表現減少(圖8)。同時，LWB在結腸中誘發強力增加抗氧化劑基因(如：GPX-1、CAT1和SOD2(圖9)，並在血漿中提高抗氧化劑防禦性(圖10)。

b.與生理年齡有關之極輕微發炎

使用LWB (0.5%於飲用水中)之膳食補充法誘發衰老小鼠肝臟中與發炎有關之基因表現下降至成年小鼠所觀察到之程度(圖11:例如用於編碼TNF- α 之基因)。

c.衰老小鼠之免疫提高效果

使用LWB (0.5%於飲用水中)之膳食補充法改進衰老小鼠體液反應(圖12)和細胞介導之免疫反應(圖13)。

【圖式簡單說明】

圖1顯示：在鼠科巨噬細胞細胞系中，藉由LWB抑制LPS介導之IL-6產生(RAW細胞)。

圖2顯示：在人腸內上皮細胞系中，藉由LWB抑制LPS介導之NF- κ B活化(使用NF- κ B報導子基因穩定轉染之HT-29)。

圖3顯示：投與TNBS之後減少之體重。平均值+/- SEM

圖 4A 顯示：由個體數值和中位數值指示之宏觀得分評價。

圖 4B 顯示：由平均值 $\pm$ SEM 指示之宏觀得分評價。

圖 5A 顯示：由個體數值和中位數值指示之組織學得分評價。

圖 5B 顯示：由平均值 $\pm$ SEM 指示之組織學得分評價。

圖 6A 顯示：由個體數值和中位數值指示有關對照蛋白(肌動蛋白)之 COX-2 比率。

圖 6B 顯示：由平均值 $\pm$ SEM 指示之有關對照蛋白(肌動蛋白)之 COX-2 比率。

圖 7A 顯示：由個體數值和中位數值指示之 pSTAT3 表現。

圖 7B 顯示：由平均值 $\pm$ SEM 指示之 pSTAT3 表現。

圖 8A 顯示：TNF α 促炎性基因之表現。

圖 8B 顯示：IL-6 促炎性基因之表現。

圖 8C 顯示：在未補充和有補充 LWB 之鼠科急性腸炎模式中之 KC 蛋白質。

圖 8D 顯示：IL-1 β 促炎性基因之表現。

圖 9A 顯示：在未補充和有補充 LWB 之鼠科急性腸炎模式中之 GPX-1 抗氧化劑基因之表現。

圖 9B 顯示：在未補充和有補充 LWB 之鼠科急性腸炎模式中之 CAT1 抗氧化劑基因之表現。

圖 9C 顯示：在未補充和有補充 LWB 之鼠科急性腸炎模式中之 SOD2 抗氧化劑基因之表現。

圖 10A 顯示：由個體數值和中位數指示之抗氧化劑能力。

圖 10B 顯示：由平均值 $\pm$ SEM 指示之抗氧化劑能力。

圖 11 顯示：與在正常衰老小鼠 (H20) 和成年小鼠 (CTRL) 之肝臟中所觀察到之濃度相比，已補充 LWB 之衰老老鼠肝臟中編碼 TNF- α 之基因表現。

圖 12 顯示：在衰老老鼠中之抗原 (KLH) 特異性抗體反應。

圖 13 顯示：在衰老老鼠中之細胞介導免疫延滯型過度敏感 (DTH) 反應。

五、中文發明摘要：

本發明一般而言係有關發炎領域。特定言之，本發明係有關一種以天然化合物於製備治療或預防發炎之產物上之用途。例如，西方雪果萃取物顯示具有抗炎性質。本發明之一個實施例係有關一種以包括西方雪果或其一部分之主要組合物於製備治療或預防發炎之產物上之用途。

六、英文發明摘要：

The present invention relates in general to the field of inflammation. In particular the present invention relates to the use of natural compounds for the preparation of a product to treat or prevent inflammation. For example an extract of wolfberry was shown to have anti-inflammatory properties. One embodiment of the present invention relates to the use of a primary composition comprising wolfberries or a part thereof for the preparation of a product to treat or prevent inflammation.

十、申請專利範圍：

1. 一種包括西方雪果及/或其一部分之主要組合物用於製備治療及/或預防發炎之產物之用途。
2. 如請求項1之用途，其中此主要組合物進一步包括乳或含乳蛋白質載體。
3. 如請求項1至2中任一項之用途，其中此主要組合物及/或產品不包含不能溶解的纖維。
4. 如請求項1至2中任一項之用途，其中此產品預定供經口、局部、腸及/或非經腸式投藥；及/或其中此產物可為食物補充劑、作為藥劑或用於藥劑中之補充劑、作為乳油或用於乳油中之補充劑；及/或其中此產品預定應用至人或寵物。
5. 如請求項1至2中一項之用途，其中此產品預定用於或用作食品供人食用，例如作為營養完全配方、乳製品、冷藏或耐貯飲料、用於哺乳母親之產品、液體飲料、湯、食物補充劑、膳食代替物、營養棒、糕餅、乳或發酵乳產品、優酪乳、以乳為主之粉末、腸內營養產物、嬰兒配方、嬰兒營養品、菜泥、穀物產品或以發酵穀物為主之產品、霜淇淋、糖果、甜點、餅乾、蛋糕、巧克力、卡布奇諾、咖啡、餐廚用品(如：蛋黃醬、番茄糊或沙拉醬料)、寵畜食物或寵畜飲料。
6. 如請求項1至2中一項之用途，其中此產品是錠劑、膠囊、藥丸、溶液、懸浮液、糖漿、粉末、凝膠、乳劑、乾式口服補充物、濕式口服補充物、沐浴精、牙膏、洗

髮精、漱口劑、口紅或者個人衛生用品。

7. 如請求項1至2中任一項之用途，其中此主要組合物包括至少一部分西方雪果之親脂性及/或親水性生物活性物質成分，其中此必需親脂性及/或親水性生物活性物質成分較佳係選自由如下組成之群組：脂質、生物鹼、蛋白質、碳水化合物、醣蛋白、類胡蘿蔔素、多酚類化合物，如：類黃酮、維生素、礦物質，或其混合物。
8. 如請求項7之用途，其中此醣蛋白係選自由阿拉伯半乳聚糖蛋白質組成之群組，特定言之可藉由 β -葡糖基 Yariv 試劑(beta-Glucosyl Yariv reagent)檢測之寧夏枸杞(*Lycium barbarum*)多醣和高分子，或其混合物；及/或其中類黃酮選自由如下組成之群組：黃酮(如：芹菜素、木犀草素或香葉木素)、黃酮醇(如：槲黃素、楊梅素、山奈酚)、黃烷酮、花青素(如：天葵素、錦葵色素)或異黃酮(如：金雀異黃酮、木質異黃酮)，或其混合物；及/或其中類胡蘿蔔素選自由如下組成之群組：胡蘿蔔素和葉黃質，如：茄紅素、胡蘿蔔素、六氫茄紅素、八氫茄紅素、斑蝥黃、 β -隱黃質、辣椒紅、葉黃素、玉米黃質或彼等呈脂肪酸酯形式之物質，或其混合物。
9. 如請求項1至2中任一項之用途，其中此乳來自於動物或植物，或其混合物，可為牛乳、美洲駝乳、水牛乳、山羊乳、綿羊乳、植物合成乳，尤指豆漿，或其混合物。
10. 如請求項1至2中任一項之用途，其中藉由包括如下步驟之方法製得此主要組合物：i)於乳或者含牛乳蛋白質之

液體介質中混合和碾磨西方雪果，ii)視需要選擇性分離不能溶解的纖維，獲得水性懸浮液，iii)由所產生之懸浮液視需要選擇性進行巴氏殺菌(pasteurising)，iv)處理期間，視需要選擇性添加合成或天然生物活性物質成分，v)進一步視需要選擇性乾燥懸浮液，獲得粉末。

11. 如請求項1至2中一項之用途，其中此發炎選自由如下組成之群組：急性發炎，如：膿毒病、傳染、燒傷和慢性發炎，如：發炎性腸病、克羅恩氏病(Crohn's disease,)、潰瘍性結腸炎、壞死性小腸結腸炎、皮膚發炎，如：紫外線或化學引起之皮膚發炎、濕疹、反應性皮膚、乾癬、白斑病、粉刺、腸炎綜合症、肝炎、酒精性肝硬變、過敏反應、特異性反應、骨炎、類風濕關節炎、全身性狼瘡、葛氏-索氏(Gougerot-Sjögren's)綜合症、萊特氏綜合症(Reiter's syndrome)、脊髓灰質炎、皮膚炎、甲狀腺炎、巴澤多(Basedow)病、橋本病、I型糖尿病、愛迪生氏病(Addison's disease)、自體免疫肝炎、乳糜瀉、比爾默病(Biermer's disease)、多發性硬化、肌無力、腦脊髓炎、眼睛發炎、肥胖有關之發炎、年齡有關之極輕微發炎、布勞(Blau)綜合征、阿茲海默氏病、心臟血管疾病、動脈粥樣硬化、新陳代謝綜合症、齒齦炎和牙周病。

12. 如請求項1至2中任一項之用途，其中此產品同時加強免疫系統，以改進受損之免疫反應、加強抗原特異性體液免疫反應及/或加強細胞介導之免疫反應。

13. 如請求項1至2中任一項之用途，其中此產品預定用於嬰

兒、幼童、青少年、成年人及/或老年人。

14. 如請求項1至2中任一項之用途，其中此產品預定用於維持免疫功能及/或減輕發炎狀態。

15. 如請求項1至2中任一項之用途，其係治療或預防與氧化壓力有關之病變。

十一、圖式：

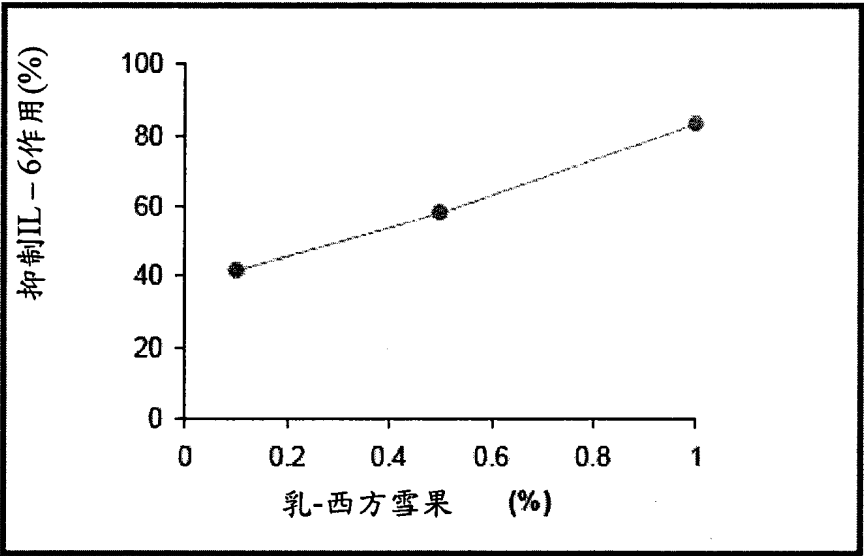


圖 1

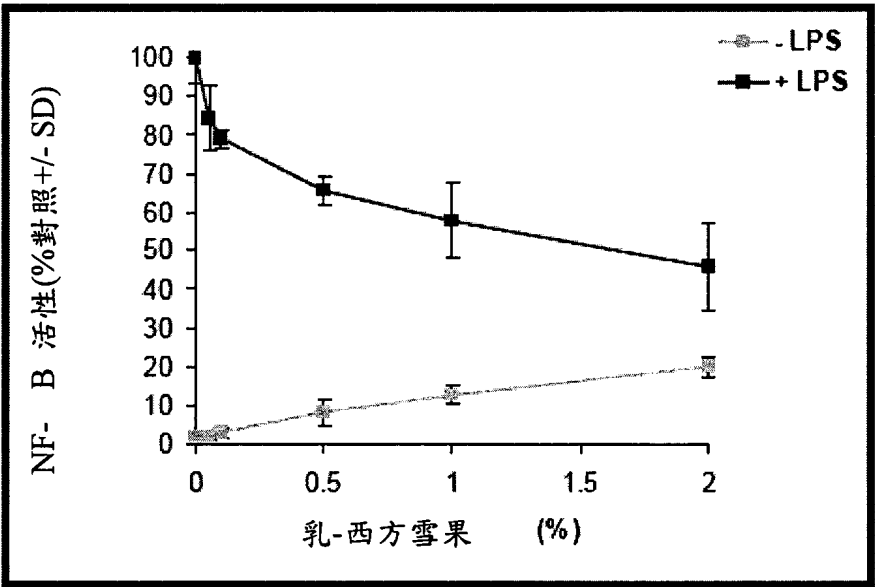


圖 2

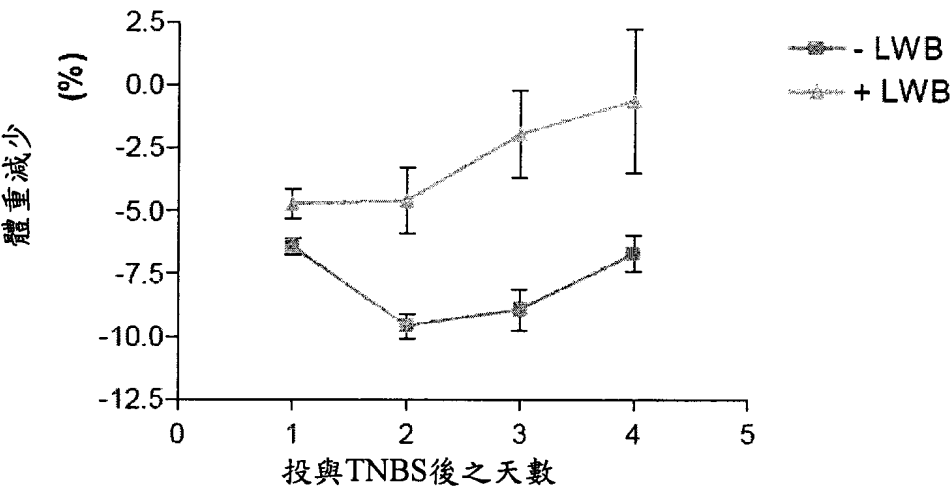


圖 3

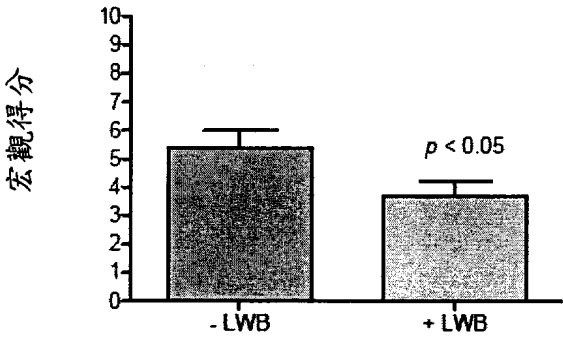


圖 4A

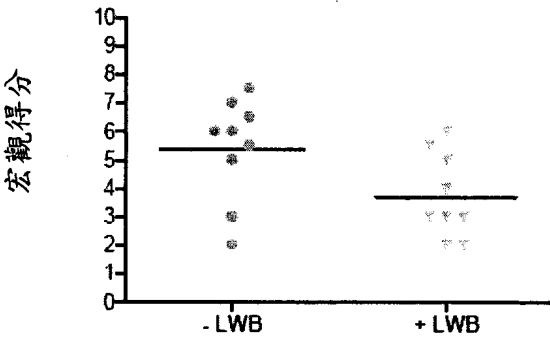


圖 4B

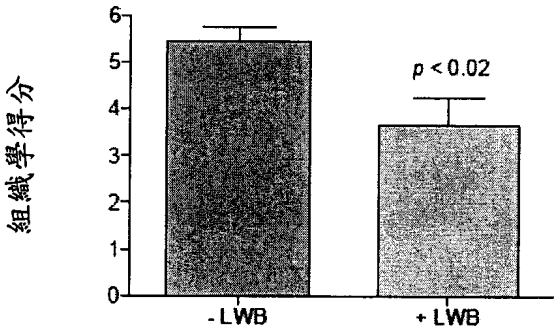


圖 5A

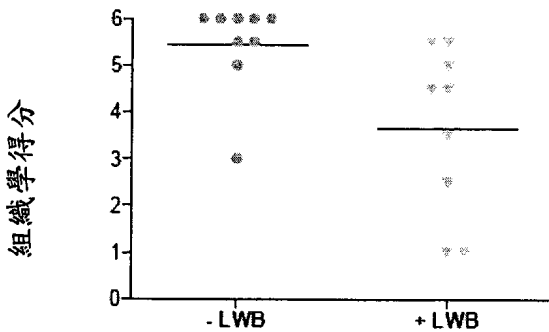


圖 5B

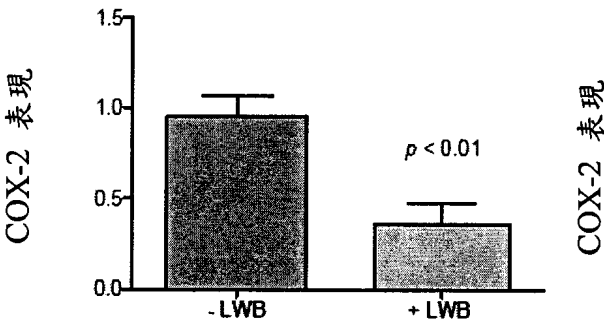


圖 6A

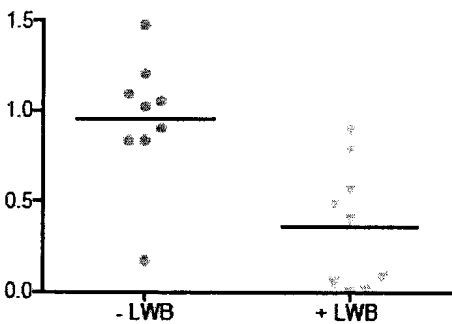


圖 6B

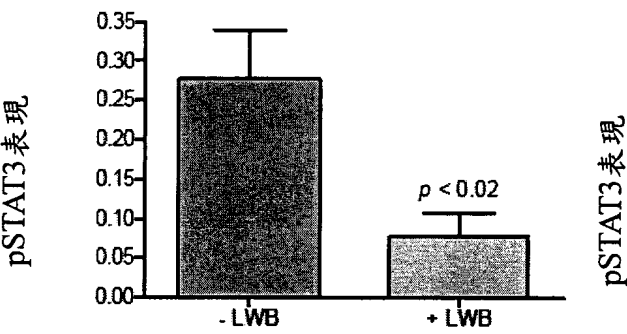


圖 7A

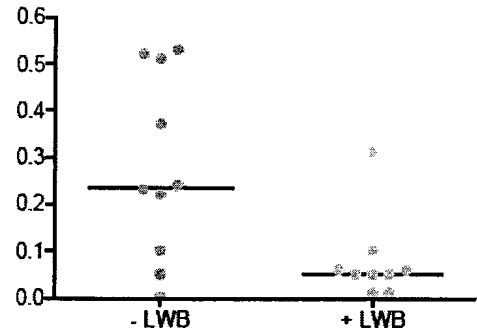


圖 7B

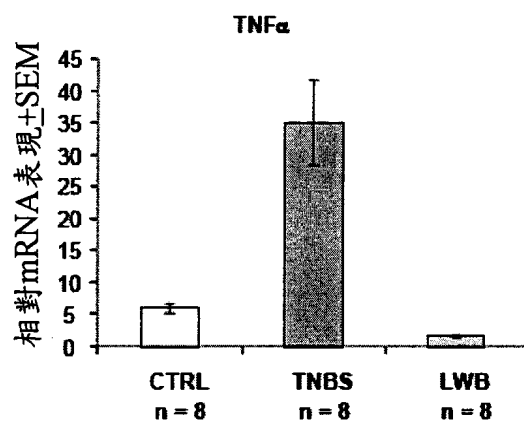


圖 8A

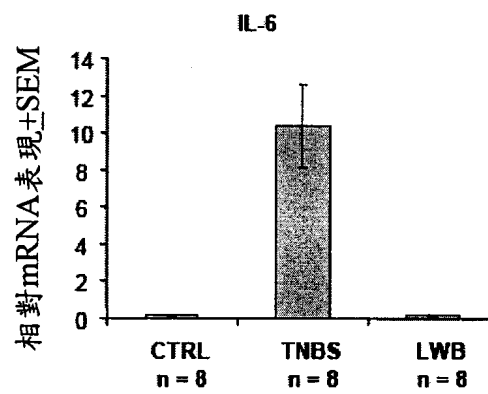


圖 8B

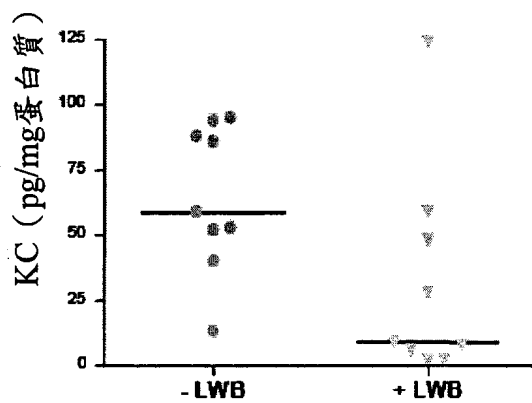


圖 8C

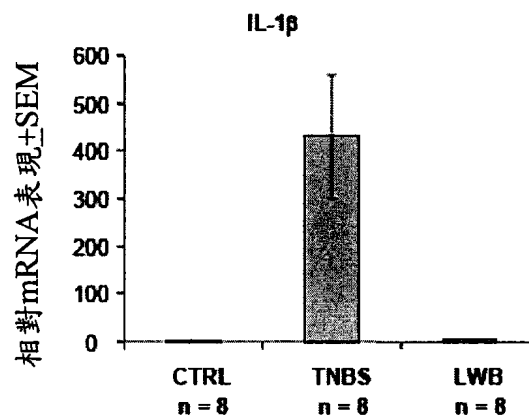


圖 8D

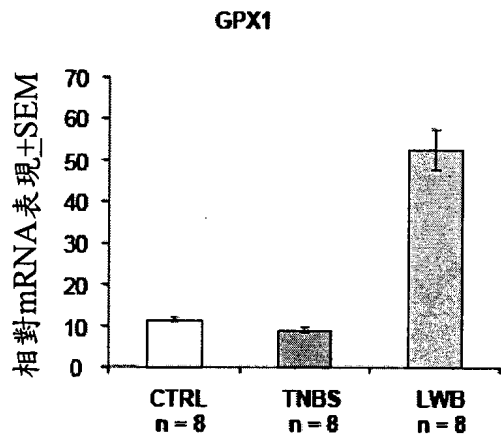


圖 9A

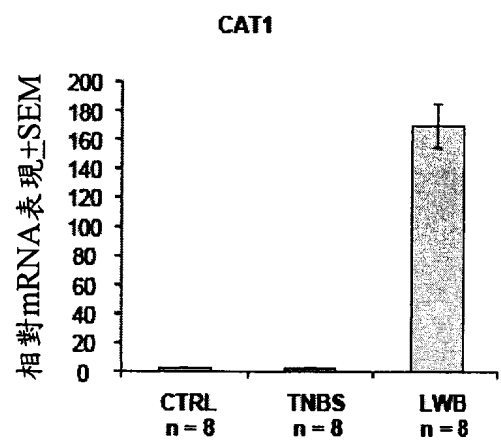


圖 9B

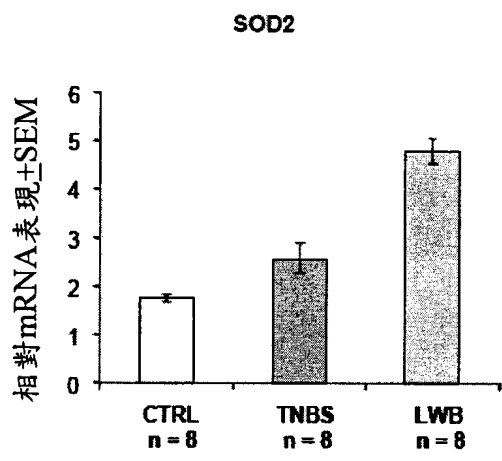


圖 9C

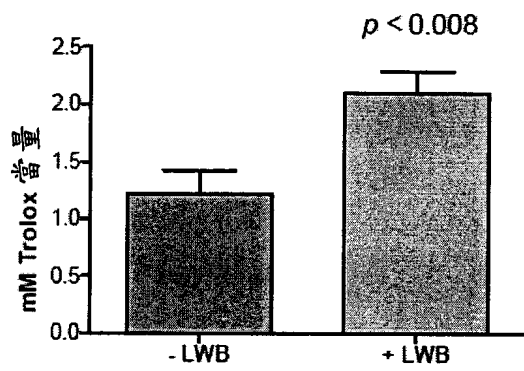


圖 10A

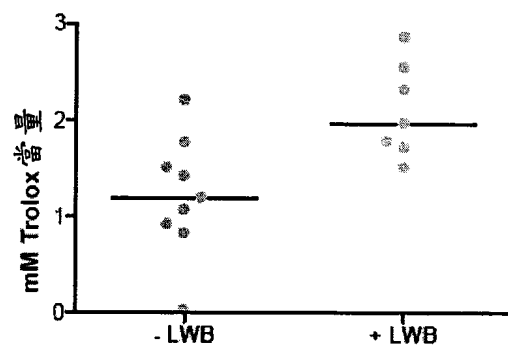


圖 10B

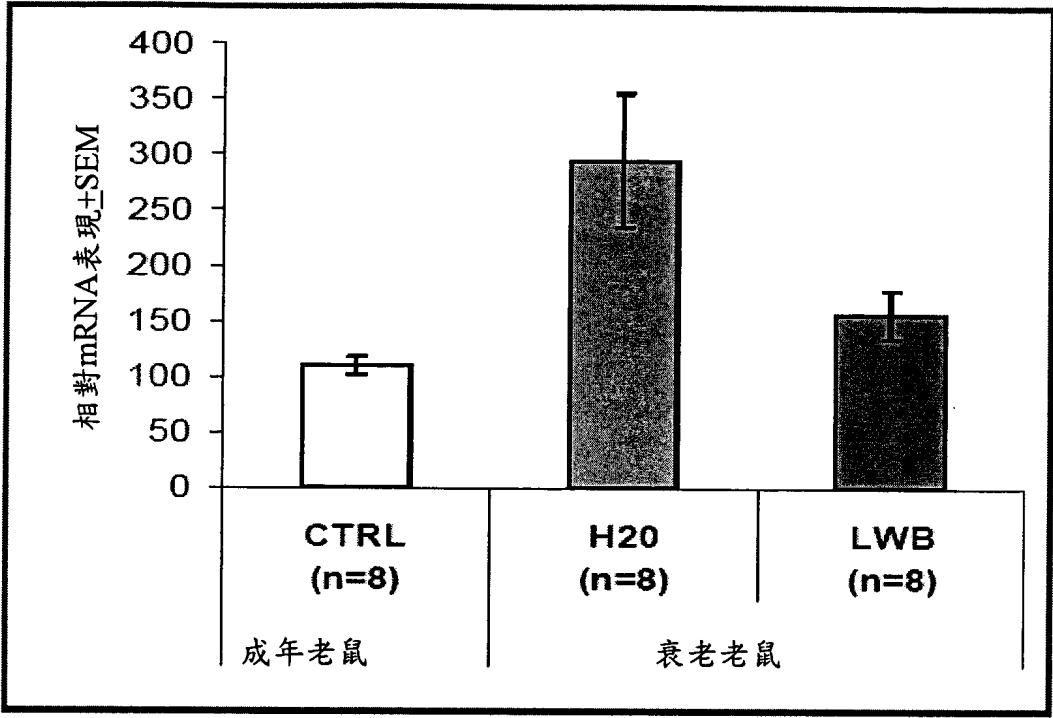


圖 11

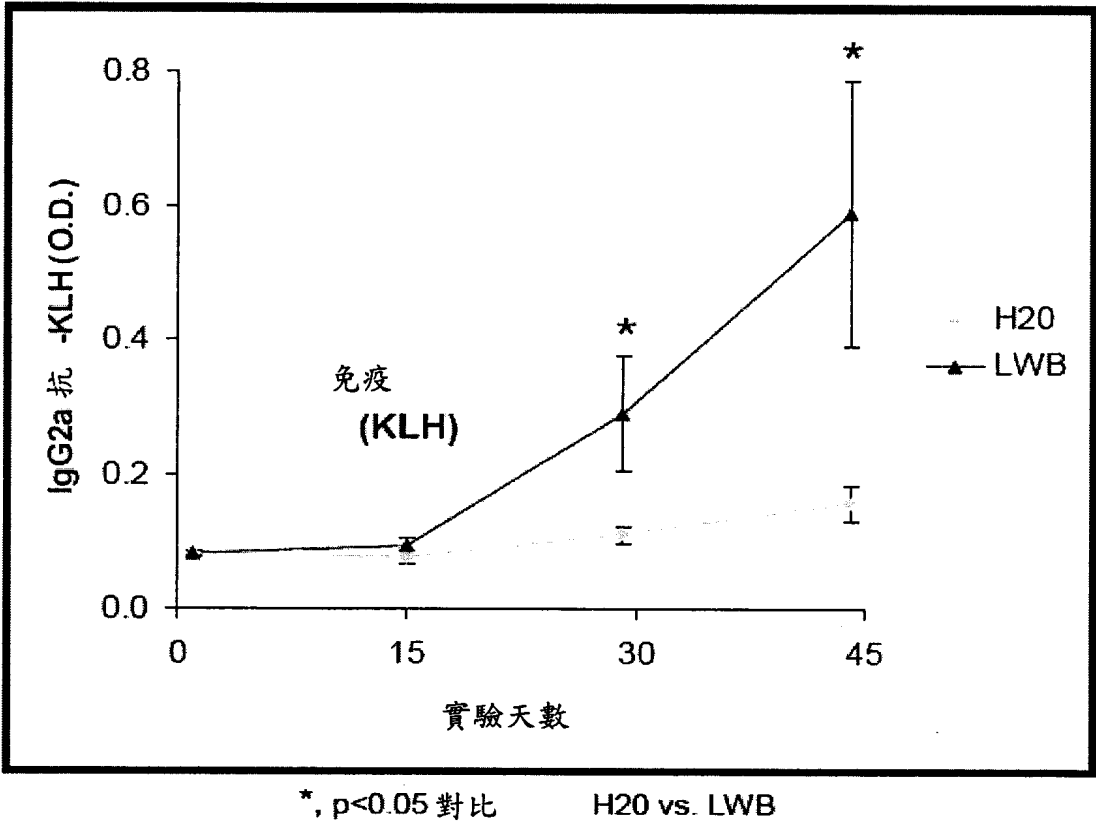
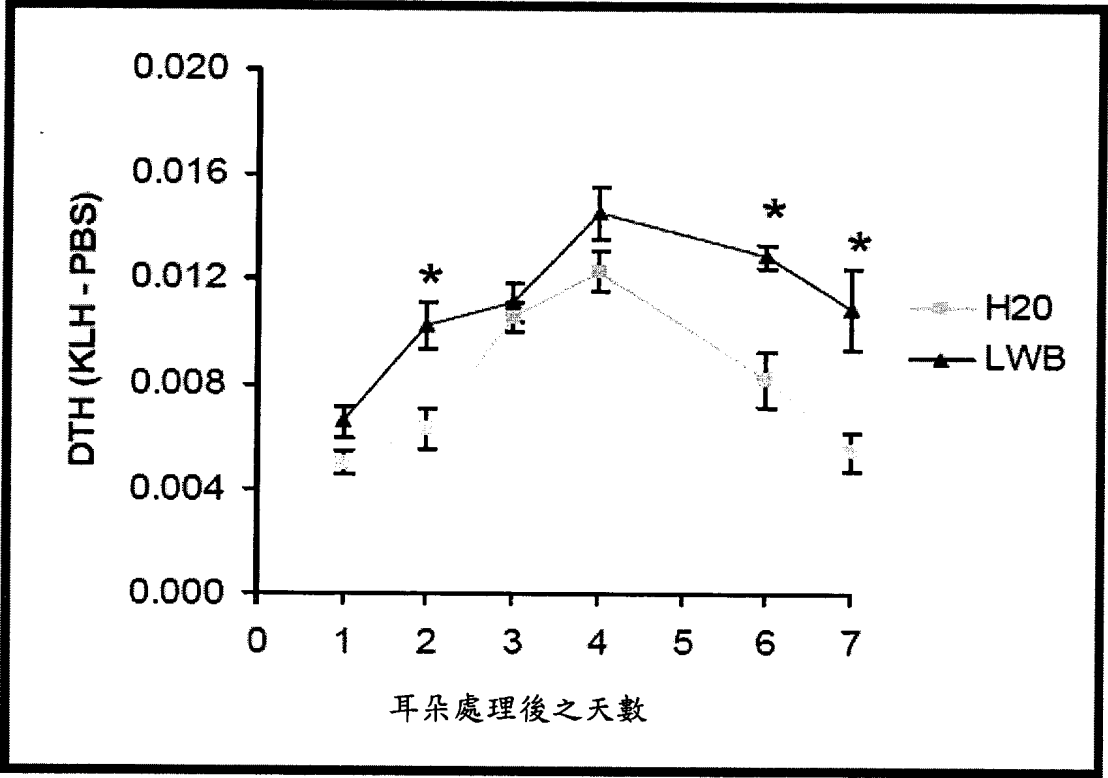


圖 12



*, p<0.05 對比 H2O vs. LWB

圖 13

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)