



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102892421 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 23

(21) 申请号 201180021695. 6 *A61K 31/723* (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 03. 10 *A61K 31/734* (2006. 01)

(30) 优先权数据 *A61P 1/18* (2006. 01)

61/312, 630 2010. 03. 10 US *A61P 3/00* (2006. 01)

61/357, 658 2010. 06. 23 US *A61P 3/06* (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日 *A61P 3/10* (2006. 01)

2012. 10. 30 *G01N 30/02* (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据 *G01N 30/90* (2006. 01)

PCT/CA2011/000260 2011. 03. 10 *G01N 33/15* (2006. 01)

(87) PCT申请的公布数据

W02011/109900 EN 2011. 09. 15

(71) 申请人 伊诺沃生物公司

地址 加拿大艾伯塔

(72) 发明人 R·J·盖勒 M·莱昂 S·伍德

C·J·劳森

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 刘晓东

(51) Int. Cl.

*A61K 31/736* (2006. 01)

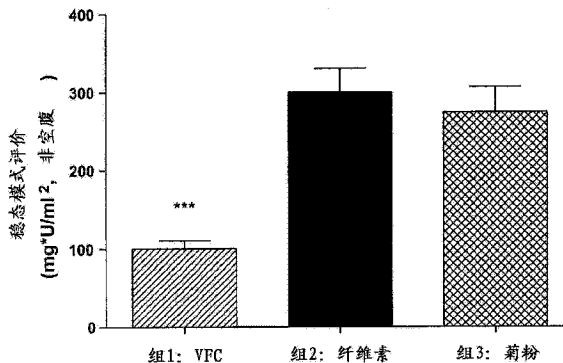
权利要求书 2 页 说明书 57 页 附图 37 页

(54) 发明名称

用于治疗代谢病症的包含葡甘露聚糖、黄原胶和藻酸盐的食物

(57) 摘要

本发明涉及包含葡甘露聚糖、黄原胶和藻酸盐的混合物的饮食补充剂和食物。饮食补充剂用于延迟代谢综合征、I 型糖尿病、II 型糖尿病、胰腺疾病或高脂血症的发病、延缓其进展和 / 或改善其至少一种症状。使用碳水化合物分析的标准方法分析葡甘露聚糖、黄原胶和藻酸盐的混合物，所述方法包括酸水解聚糖接着色谱分离。



1. 用于预防、治疗或改善与代谢性疾病或病症有关的一种或多种症状的药用食物,包括高粘性聚糖膳食纤维组合物,所述高粘性聚糖膳食纤维组合物包括粘性的纤维掺合物或其复合物以及至少一种大量营养素,其中粘性的纤维掺合物或其复合物包括约 48% 到约 90%(w/w) 葡甘露聚糖、约 5% 到约 20%(w/w) 黄原胶和约 5% 到约 30%(w/w) 藻酸盐,所述的大量营养素选自自由蛋白质、碳水化合物和脂肪组成的组,所述药用食物被配制用于预防、治疗或改善与代谢性疾病或病症有关的一种或多种症状。

2. 权利要求 1 的药用食物,其中药用食物被配制用于提供约 10g 到约 100g 高粘性聚糖膳食纤维组合物的日剂量。

3. 权利要求 1 的药用食物,其中药用食物被配制用于提供约 15g 到约 35g 高粘性聚糖膳食纤维组合物的日剂量。

4. 权利要求 1 的药用食物,其中膳食纤维组合物包括约 60% 到约 80%(w/w) 葡甘露聚糖、约 10% 到约 20%(w/w) 黄原胶和约 10% 到约 20%(w/w) 藻酸盐。

5. 权利要求 1 的药用食物,其中代谢性疾病或病症选自自由代谢综合征、I 型糖尿病、II 型糖尿病、胰腺疾病和高脂血症组成的组。

6. 制备药用食物产品的方法,包括向药用食物产品添加有效量的包括葡甘露聚糖、黄原胶和藻酸盐的膳食纤维组合物的步骤。

7. 权利要求 6 的方法,其中药用食物被配制用于预防、治疗或改善与代谢性疾病或病症有关的一种或多种症状。

8. 权利要求 6 的方法,其中膳食纤维组合物包括约 60% 到约 80%(w/w) 葡甘露聚糖、约 10% 到约 20%(w/w) 黄原胶和约 10% 到约 20%(w/w) 藻酸盐。

9. 权利要求 6 的方法,其中药用食物被配制用于提供约 10g 到约 100g 高粘性聚糖膳食纤维组合物的日剂量。

10. 预防、治疗或改善与代谢性疾病或病症有关的一种或多种症状的方法,该方法包括对有此需要的人类受试者给予约 25mg/kg/天到约 1000mg/kg/天的高粘性聚糖膳食纤维组合物,持续有效预防、治疗或改善受试者的与代谢性疾病或病症有关的一种或多种症状的一段时间,所述高粘性聚糖膳食纤维组合物包括纤维掺合物或其复合物,所述纤维掺合物或其复合物包括约 48% 到约 90%(w/w) 葡甘露聚糖、约 5% 到约 20%(w/w) 黄原胶和约 5% 到约 30%(w/w) 藻酸盐。

11. 权利要求 7 或 10 的方法,其中代谢性疾病或病症选自自由代谢综合征、I 型糖尿病、II 型糖尿病、胰腺疾病和高脂血症组成的组。

12. 权利要求 10 的方法,其中有此需要的受试者患有胰岛素抵抗或者处于发展为胰岛素抵抗的风险之中。

13. 权利要求 10 的方法,其中有此需要的受试者患有葡萄糖诱导的器官损伤或者处于发展为葡萄糖诱导的器官损伤的风险之中。

14. 权利要求 10 的方法,其中所述方法包括每天至少一次给予膳食纤维组合物,持续至少两周。

15. 权利要求 10 的方法,其中所述膳食纤维组合物作为药用食物产品给予。

16. 用于改善患有 II 型糖尿病或处于发展为 II 型糖尿病的风险之中的受试者的与胰岛素抵抗的进展有关的至少一种症状的方法,包括对有此需要的哺乳动物受试者给予约

25mg/kg/天到约 1000mg/kg/天的高粘性聚糖膳食纤维组合物,持续至少二周的时间,所述高粘性聚糖膳食纤维组合物包括纤维掺合物或其复合物,包括约 48%到约 90%(w/w) 葡甘露聚糖、约 5%到约 20%(w/w) 黄原胶和约 5%到约 30%(w/w) 藻酸盐。

17. 权利要求 16 的方法,其中膳食纤维组合物包括约 60%到约 80%(w/w) 葡甘露聚糖、约 10%到约 20%(w/w) 黄原胶和约 10%到约 20%(w/w) 藻酸盐。

18. 权利要求 16 的方法,其中所述膳食纤维组合物作为药用食物产品给予。

19. 用于确定包括至少一种聚糖的样品中的成分糖的方法,包括:

(a) 将包括至少一种聚糖的样品用酸水解,以产生水解液;

(b) 用色谱法分离水解液中的水解产物;

(c) 检测步骤 (b) 中分离的水解产物;和

(d) 将在步骤 (c) 中检测到的水解产物与一种或多种参考标准比对,以确定样品的成分糖。

20. 权利要求 19 的方法,其中在步骤 (a) 中使用的酸是三氟乙酸 (TFA)。

21. 权利要求 19 的方法,其中步骤 (a) 的水解进行 48 到 72 小时的时间。

22. 权利要求 19 的方法,其中步骤 (a) 的水解在 95°C到 110°C的温度下进行。

23. 权利要求 19 的方法,其中所述色谱法能够将中性糖类与糖醛酸类分离。

24. 权利要求 23 的方法,其中所述色谱法包括 Dionex 酸色谱法。

25. 权利要求 19 的方法,其中样品包括至少一种膳食纤维。

26. 权利要求 19 的方法,其中样品包括藻酸钠。

27. 权利要求 19 的方法,其中样品包括葡甘露聚糖、黄原胶和藻酸钠。

## 用于治疗代谢病症的包含葡甘露聚糖、黄原胶和藻酸盐的食物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2010 年 3 月 10 日提交的申请号 61/312,630 以及 2010 年 6 月 23 日提交的申请号 61/357,658 的优先权,所述申请的全部内容被并入本文作为参考。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及膳食纤维组合物、包括膳食纤维组合物的药用食物,以及它们用于延迟代谢综合征和 I I 型糖尿病的发病和 / 或降低其严重程度的用途。

[0004] 发明背景

[0005] 肥胖症和代谢综合征作为可以导致 I I 型糖尿病的病况已经变得越来越普遍。内脏肥胖症、血清葡萄糖和胰岛素水平的升高以及高血压和异常脂血症是被统称为代谢综合征的一组临床病况 (E. J. Gallagher 等, *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 37:559-79 (2008))。已经发现这些病况是由于细胞的胰岛素抵抗 (insulin resistance) 增加,并且在很多情况中,这些症状是 II 型糖尿病的前兆。目前的争议在于确定代谢综合征的确切诊断标准,以及没有药物被批准用于代谢综合征的治疗,尽管相关的异常脂血症和高血压已经有特定的药物干预。II 型糖尿病典型地用各种调节血糖的药物来应对,且在更严重的病例中通过胰岛素注射来应对。然而,膳食和体重减轻对于纠正与代谢综合征和 II 型糖尿病二者都有关的许多代谢异常起到重要作用 (Yip 等, *Obesity Res.* 9:341S-347S (2001))。研究表明,患有代谢综合征的患者患有重症冠状动脉病的风险增大 50% (D. E. Møller 等, *Annu. Rev. Med.* 56 :45-62 (2005))。因而,对于这些患病个体而言,体重、空腹胰岛素和葡萄糖的任何降低都有显著的健康利益。

[0006] 已知摄食高血糖指数 (glycemic index) 的食物导致进食过量和肥胖症 (Ludwig 等, *Pediatrics* 103 (3):E26 (1999))。因此,优选用于应对糖尿病性或前驱糖尿病病况的任何药物以及体重减轻都具有低的血糖指数。最优选降低食物的血糖指数的这种药物。

[0007] 碳水化合物摄入的减少对于糖尿病性病况的成功控制也是需要的。膳食建议是有益的,但是糖尿病患者更渴望食物,因为他们经历更频繁的低血糖状态 (Strachan 等, *Physiol. Behav.* 80 (5):675-82 (2004))。另外,降低糖尿病患者的血糖含量的疗法通常涉及体重增加这一不希望的副作用 (Schultes 等, *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 88 (3):1133-41 (2003))。已经报道说可溶性纤维含量高的膳食可以通过提高胰岛素敏感性降低糖尿病风险 (Ylonen 等, *Diabetes Care* 26 :1979-85 (2003))。这可能是源于膳食纤维的可能的血糖调节作用。还有报道说高粘度食物产生比低粘度食物更大的饱腹感 (Marciani 等, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280. :G1227-33 (2001))。

[0008] 因此,需要通过降低血糖水平和促进饱腹感而有助于应对包括糖尿病性病况在内的代谢综合征的膳食纤维组合物。本发明针对这种需求以及其它需求。

[0009] 发明简述

[0010] 在一个方面中,本发明提供药用食物,所述药用食物被配制为用于预防、治疗或改

善与代谢性疾病或病症有关的一种或多种症状。本发明的这一方面的药用食物包括高粘性聚糖膳食纤维组合物以及至少一种大量营养素(macronutrient),所述高粘性聚糖膳食纤维组合物包括粘性的纤维掺合物(“VFB”)或其复合物(“VFC”),包括约48%到约90%(w/w)葡甘露聚糖、约5%到约20%(w/w)黄原胶和约5%到约30%(w/w)藻酸盐,所述的大量营养素选自自由蛋白质、碳水化合物和脂肪组成的组。

[0011] 在另一个方面中,本发明提供制备药用食物产品的方法,包括向药用食物产品添加有效量的膳食纤维组合物的步骤,其中所述膳食纤维组合物包括粘性纤维掺合物(VFB)或其复合物(VFC),包括葡甘露聚糖、黄原胶和藻酸盐。在一些实施方案中,药用食物被配制为用于预防、治疗或改善与代谢性疾病或病症有关的一种或多种症状。在一些实施方案中,添加到药用食物产品中的膳食纤维组合物包括约48%到约90%(w/w)葡甘露聚糖、约5%到约20%(w/w)黄原胶和约5%到约30%(w/w)藻酸盐。

[0012] 在另一个方面中,本发明提供预防、治疗或改善与代谢性疾病或病症有关的一种或多种症状的方法。本发明的这一方面的方法包括对此需要的人类受试者给予约25mg/kg/天到约1000mg/kg/天的高粘性聚糖膳食纤维组合物,持续有效预防、治疗或改善受试者的与代谢性疾病或病症有关的一种或多种症状的一段时间,所述高粘性聚糖膳食纤维组合物包括粘性的纤维掺合物(VFB)或其复合物(VFC),包括约48%到约90%(w/w)葡甘露聚糖、约5%到约20%(w/w)黄原胶和约5%到约30%(w/w)藻酸盐。

[0013] 在又一个方面中,本发明提供改善与患有II型糖尿病或处于发展为II型糖尿病的风险之中的哺乳动物受试者的胰岛素抵抗的进展有关的至少一种症状的方法。本发明的这一方面的方法包括对此需要的哺乳动物受试者给予约25mg/kg/天到约1000mg/kg/天的高粘性聚糖膳食纤维组合物,持续至少两周的一段时间,所述高粘性聚糖膳食纤维组合物包括粘性的纤维掺合物(VFB)或其复合物(VFC),包括约48%到约90%(w/w)葡甘露聚糖、约5%到约20%(w/w)黄原胶和约5%到约30%(w/w)藻酸盐。

[0014] 在又一个方面中,本发明提供用于确定包括至少一种聚糖的样品中的成分糖的方法。本发明的这一方面的方法包括:(a)用酸水解包括至少一种聚糖的样品,以产生水解液;(b)用色谱方法分离水解液中的水解产物;(c)检测在步骤(b)中分离的水解产物;和(d)将步骤(c)中检测到的水解产物与一种或多种参考标准进行比对,以确定样品中的成分糖。

[0015] 附图简述

[0016] 结合附图并参考以下的发明详述可以更容易地理解本发明的前述各个方面以及其许多优点。其中:

[0017] 图1A图示阐明了在Zucker糖尿病大鼠中进行的为期8周的研究中VFC、纤维素或菊粉膳食随时间对体重(g)的影响,如实施例1中所述的;

[0018] 图1B图示阐明了在Zucker糖尿病大鼠中进行的为期8周的研究中VFC、纤维素或菊粉膳食随时间对食物消耗量(g/天)的影响,如实施例1中所述的;

[0019] 图2A图示阐明了在Zucker糖尿病大鼠中进行的为期8周的研究中包含VFC、纤维素或菊粉的膳食随时间对空腹血糖水平(mg/dL)的影响,如实施例1中所述的;

[0020] 图2B图示阐明了在Zucker糖尿病大鼠中进行的为期8周的研究中包含VFC、纤维素或菊粉的膳食随时间对空腹血清胰岛素水平(ng/mL)的影响,如实施例1中所述的;

[0021] 图 2C 图示阐明了在 Zucker 糖尿病大鼠中进行的为期 8 周的研究中包含 VFC、纤维素或菊粉的膳食随时间对非空腹血糖水平 (mg/dL) 的影响,如实施例 1 中所述的;

[0022] 图 2D 图示阐明了在 Zucker 糖尿病大鼠中进行的为期 8 周的研究中包含 VFC、纤维素或菊粉的膳食随时间对空腹稳态模式评价 (Homeostasis Model Assessment, HOMA) 得分 ( $\text{mg}\cdot\text{U}/\text{ml}^2$ ) 的影响,如实施例 1 中所述的;

[0023] 图 3A 图示阐明了在为期 8 周的研究中用 VFC、纤维素或菊粉膳食喂养的、空腹 Zucker 糖尿病大鼠的混合胰岛素敏感指数 (CISI) 得分,如实施例 1 中所述的;

[0024] 图 3B 图示阐明了在为期 8 周的研究中用 VFC、纤维素或菊粉膳食喂养的、非空腹 Zucker 糖尿病大鼠的混合胰岛素敏感指数 (CISI) 得分,如实施例 1 中所述的;

[0025] 图 3C 图示阐明了在为期 8 周的研究中用 VFC、纤维素或菊粉膳食喂养的、非空腹 Zucker 糖尿病大鼠的 HOMA 得分,如实施例 1 中所述的;

[0026] 图 4 图示阐明了在为期 8 周的研究中用 VFC、纤维素或菊粉膳食喂养的、空腹 Zucker 糖尿病大鼠中测量的血清甘油三酯水平,如实施例 1 中所述的;

[0027] 图 5A 图示阐明了在对 Zucker 糖尿病大鼠喂食包含 VFC、纤维素或菊粉的膳食 8 周后对肾小管扩张的影响,以 0-5 的组织学得分为基准,其中 5 分是最严重的,如实施例 1 中所述的;

[0028] 图 5B 图示阐明了在对 Zucker 糖尿病大鼠喂食包含 VFC、纤维素或菊粉的膳食 8 周后对肾小管退化 / 再生的影响,以 0-5 的组织学得分为基准,其中 5 分是最严重的,如实施例 1 中所述的;

[0029] 图 5C 图示阐明了在对 Zucker 糖尿病大鼠喂食包含 VFC、纤维素或菊粉的膳食 8 周后对肾脏肾小球系膜膨胀的影响,以 0-5 的组织学得分为基准,其中 5 分是最严重的,如实施例 1 中所述的;

[0030] 图 6 图示阐明了在为期 8 周的研究结束时喂食 VFC、纤维素或菊粉膳食的 Zucker 糖尿病大鼠中存在的通过用抗大鼠胰岛素抗体染色测定的胰岛胰岛素免疫活性区域的百分比,如实施例 1 中所述的;

[0031] 图 7A 图示阐明了在为期 8 周的研究结束时喂食 VFC、纤维素或菊粉膳食的 Zucker 糖尿病大鼠中存在的胰岛单核炎性细胞浸润的组织学得分,以 0-5 的组织学得分为基准,其中 5 分是最严重的,如实施例 1 中所述的;

[0032] 图 7B 图示阐明了在为期 8 周的研究结束时喂食 VFC、纤维素或菊粉膳食的 Zucker 糖尿病大鼠中存在的胰岛细胞退化的组织学得分,以 0-5 的组织学得分为基准,其中 5 分是最严重的,如实施例 1 中所述的;

[0033] 图 7C 图示阐明了在为期 8 周的研究结束时喂食 VFC、纤维素或菊粉膳食的 Zucker 糖尿病大鼠中存在的胰岛纤维化的数量的组织学得分,以 0-5 的组织学得分为基准,其中 5 分是最严重的,如实施例 1 中所述的;

[0034] 图 8A 图示阐明了在对 Zucker 糖尿病大鼠喂食 VFC、纤维素或菊粉膳食 8 周后对肝性脂肪变性的影响,是通过还原的苏丹黑染色来测量的,以 0-5 的组织学得分为基准,其中 5 分是最严重的,如实施例 1 中所述的;

[0035] 图 8B 图示阐明了在对 Zucker 糖尿病大鼠喂食包含 VFC、纤维素或菊粉的膳食 8 周后对肝微囊泡空泡形成 (vacuolation) 的影响,以 0-5 的组织学得分为基准,其中 5 分是最

严重的,如实施例 1 中所述的;

[0036] 图 8C 图示阐明了在对 Zucker 糖尿病大鼠喂食包含 VFC、纤维素或菊粉的膳食 8 周后对肝大囊泡空泡形成的影响,以 0-5 的组织学得分为基准,其中 5 分是最严重的,如实施例 1 中所述的;

[0037] 图 9 图示阐明了在为期 43 周的研究中 VFC 或纤维素对喂食蔗糖的 Sprague-Dawley 大鼠的体重增加和血清甘油三酯 (TAG) 的影响,如实施例 2 中所述的;

[0038] 图 10A 图示阐明了在为期 3 周的研究时间中 VFC 或对照 (脱脂奶粉) 对所有健康成人研究参与者的血浆 PYY 水平的影响 (V1= 研究开始,第 0 天;V2= 第 14 天;V3= 第 21 天),如实施例 4 中所述的;

[0039] 图 10B 图示阐明了在为期 3 周的研究时间中 VFC 或对照 (脱脂奶粉) 对 BMI<23 的健康成人研究参与者的血浆 PYY 水平的影响 (V1= 研究开始,第 0 天;V2= 第 14 天;V3= 第 21 天),如实施例 4 中所述的;

[0040] 图 10C 图示阐明了在为期 3 周的研究时间中 VFC 或对照 (脱脂奶粉) 对健康成人研究参与者的空腹生长素释放肽 (ghrelin) 水平的影响 (V1= 研究开始,第 0 天;V2= 第 14 天;V3= 第 21 天),如实施例 4 中所述的;

[0041] 图 11A 图示阐明了未颗粒化的 VFB (称为三元混合物 1 (“TM1”) 和经过加工 (例如,颗粒化) 的 **VFC (PGX®)** 在 0.5% (w/w) 浓度时的流动曲线对比,如实施例 6 中所述的;

[0042] 图 11B 图示阐明了未颗粒化的 VFB (称为三元混合物 1 (“TM1”) 和经过加工 (例如,颗粒化) 的 **VFC (PGX®)** 在 0.2% (w/w) 浓度时的流动曲线对比,如实施例 6 中所述的;

[0043] 图 11C 图示阐明了未颗粒化的 VFB (称为三元混合物 1 (“TM1”) 和经过加工 (例如,颗粒化) 的 **VFC (PGX®)** 在 0.1% (w/w) 浓度时的流动曲线对比,如实施例 6 中所述的;

[0044] 图 12A 图示阐明了未颗粒化的 VFB (TM1)、经过加工 (例如,颗粒化) 的 **VFC (PGX®)** 和黄原胶的指数定律 K 对比,如实施例 6 中所述的;

[0045] 图 12B 图示阐明了未颗粒化的 VFB (TM1)、经过加工 (例如,颗粒化) 的 **VFC (PGX®)** 和黄原胶的指数定律  $\eta$  对比,如实施例 6 中所述的;

[0046] 图 13A 图示阐明了在 25°C 测量的 0.1%、0.2% 和 0.5% (w/w) 的魔芋葡甘露聚糖的流动曲线,如实施例 6 中所述的;

[0047] 图 13B 图示阐明了在 25°C 测量的 0.1%、0.2% 和 0.5% (w/w) 的黄原胶的流动曲线,如实施例 6 中所述的;

[0048] 图 13C 图示阐明了在 25°C 测量的 0.1%、0.2% 和 0.5% (w/w) 的藻酸钠的流动曲线,如实施例 6 中所述的;

[0049] 图 14A 图示阐明了包括魔芋葡甘露聚糖、黄原胶和藻酸钠、包含恒定比例 (KM:XG=4.12:1) 的魔芋葡甘露聚糖 (KM) 和黄原胶 (XG) 以及变化量的藻酸钠 (0%、2%、5%、8%、11%、13%、17%、21%、24%、27%、30%、和 33%) 的三元混合物的未加热水溶液 (0.5% 浓度) 在 25°C 测量的流动曲线,如实施例 6 中所述的;

[0050] 图 14B 图示阐明了包括魔芋葡甘露聚糖、黄原胶和藻酸钠、包含恒定比例 (KM:XG=4.12:1) 的魔芋葡甘露聚糖 (KM) 和黄原胶 (XG) 以及变化量的藻酸钠 (0%、2%、5%、8%、11%、13%、17%、21%、24%、27%、30%、和 33%) 的三元混合物的水溶液 (0.5% 浓度) 在加热 1 小时后在 25°C 测量的流动曲线,如实施例 6 中所述的;

[0051] 图 14C 图示阐明了包括魔芋葡甘露聚糖、黄原胶和藻酸钠、包含恒定比例 (KM: XG = 4. 12: 1) 的魔芋葡甘露聚糖 (KM) 和黄原胶 (XG) 以及变化量的藻酸钠 (0%、2%、5%、8%、11%、13%、17%、21%、24%、27%、30% 和 33%) 的三元混合物的水溶液 (0. 5% 浓度) 在加热 4 小时后在 25°C 测量的流动曲线, 如实施例 6 中所述的;

[0052] 图 15A 图示阐明了未加热或被加热 (一小时) 的包含恒定 KM: XG 比例 (4. 12: 1) 和变化量的藻酸盐 (0-33%) 的魔芋葡甘露聚糖、黄原胶和藻酸钠混合物的 0. 5% 水溶液中 K 对藻酸钠的比例的依赖性, 如实施例 6 中所述的;

[0053] 图 15B 图示阐明了未加热或被加热 (一小时) 的包含恒定 KM: XG 比例 (4. 12: 1) 和变化量的藻酸盐 (0-33%) 的魔芋葡甘露聚糖、黄原胶和藻酸钠混合物的 0. 5% 水溶液中  $\eta$  对藻酸钠的比例的依赖性, 如实施例 6 中所述的;

[0054] 图 16A 图示阐明了葡甘露聚糖在 2mg/ml 的载荷浓度和在 I=0. 0 时的表观沉降浓度分布  $g^*(s)$  对  $s$ , 转子速度 45, 000rpm, 温度 =20. 0°C。纵坐标表示为每斯维德贝格 (Svedberg) (S) 的条纹 (fringe) 单位, 横坐标表示为斯维德贝格单位, 如实施例 6 中所述的;

[0055] 图 16B 图示阐明了藻酸钠在 2mg/ml 的载荷浓度和在 I=0. 0 时的表观沉降浓度分布  $g^*(s)$  对  $s$ , 转子速度 45, 000rpm, 温度 =20. 0°C。纵坐标表示为每斯维德贝格 (S) 的条纹单位, 横坐标表示为斯维德贝格单位, 如实施例 6 中所述的;

[0056] 图 16C 图示阐明了黄原胶在 2mg/ml 的载荷浓度和在 I=0. 0 时的表观沉降浓度分布  $g^*(s)$  对  $s$ , 转子速度 45, 000rpm, 温度 =20. 0°C。纵坐标表示为每斯维德贝格 (S) 的条纹单位, 横坐标表示为斯维德贝格单位, 如实施例 6 中所述的;

[0057] 图 17A 图示阐明了未经加工的 / 未颗粒化的 VFB (称为“TM1”) 在离子强度 0-0. 2M 时的表观沉降浓度分布, 如实施例 6 中所述的;

[0058] 图 17B 图示阐明了未经加工的 / 未颗粒化的 VFB (称为“TM1”) 在离子强度 0-0. 01M 时的表观沉降浓度分布, 如实施例 6 中所述的;

[0059] 图 17C 图示阐明了经过加工 / 颗粒化的 **VFC (PGX®)** 在离子强度 0-0. 01M 时的表观沉降浓度分布, 如实施例 6 中所述的;

[0060] 图 17D 图示阐明了经过加工 / 颗粒化的 **VFC (PGX®)** 在离子强度 0-0. 2M 时的表观沉降浓度分布, 如实施例 6 中所述的;

[0061] 图 18A 图示阐明了对于未经加工的 / 未颗粒化的 VFB (TM1) 而言, 离子强度 (以摩尔浓度单位 M 表示) 对沉降系数  $>3. 5S$  的材料的量的影响, 如实施例 6 中所述的;

[0062] 图 18B 图示阐明了对于经过加工 / 颗粒化的 **VFC (PGX®)** 而言, 离子强度 (以摩尔浓度单位 M 表示) 对沉降系数  $>3. 5S$  的材料的量的影响, 如实施例 6 中所述的;

[0063] 图 19A 图示阐明了包含固定的葡甘露聚糖 : 黄原胶比例 (KM: XG=4. 12: 1) 和不同藻酸盐浓度 (从 0% 到 33%) 的未加热混合物的沉降系数分布, 如实施例 6 中所述的 ; 和

[0064] 图 19B 图示阐明了包含固定的葡甘露聚糖 : 黄原胶比例 (KM: XG=4. 12: 1) 和变化的藻酸盐浓度 (从 0% 到 33%) 的加热 (1 或 4 小时) 的混合物的沉降系数分布, 如实施例 6 中所述的。

[0065] 发明详述

[0066] 本发明提供有效延迟代谢性疾病或病症的发病、延缓其进展和 / 或改善其至少一

种症状的营养补充剂、药用食物和方法,所述代谢性疾病或病症例如代谢综合征、I 型糖尿病、II 型糖尿病、胰腺疾病和 / 或高脂血症。

[0067] 如本文中使用的,术语“代谢综合征”是指以下症状中的一种或多种:内脏肥胖症、血清葡萄糖和胰岛素水平的升高,以及高血压和异常脂血症(E. J. Gallagher 等, *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 37 :559-79(2008))。代谢综合征包括同时发生的且与发展为冠状动脉病、中风和 II 型糖尿病风险增加有关的一组症状。代谢综合征的症状包括腰部超重(中央型肥胖症或腹部型肥胖症)、高血压、高甘油三酯、胰岛素抵抗、低 HDL 胆固醇和由高葡萄糖引起的组织损伤。一般认为胰岛素抵抗是代谢综合征的主要原因。

[0068] 如本文中使用的,术语“改善代谢性疾病或病症的至少一种症状”包括减少、减轻或掩蔽疾病或病症的症状的对症治疗,以及用于预防、降低、中止或反转所治疗的病况或症状的严重程度的进展的治疗。因而,术语“治疗”在适当的情况下包括对确定的病况或症状的医学治疗和 / 或预防性治疗。

[0069] 如本文中使用的,术语“治疗”还包括,根据有此需要的受试者的状况,预防代谢性疾病或病症、或预防包括代谢性疾病或病症的发病或与之相关的任何症状的发病在内的与代谢性疾病或病症的病理学有关的一种或多种症状,以及降低代谢性疾病或病症的严重程度或预防与代谢性疾病或病症有关的一种或多种症状的复发。

[0070] 如本文中使用的,术语“药用食物”是指配制为在医师的监督下肠内消耗或给予的且意在用于基于科学原理经医学评价确定为具有特殊营养需要的疾病或病况的特定膳食管理的食物。

[0071] 如本文中使用的,术语“葡甘露聚糖”是指一种水溶性膳食纤维,它具有以大约 3:1 比例的  $\beta$ -(1,4)-连接的-D-甘露糖和  $\beta$ -(1,4)-连接的-D-葡萄糖残基以及各种  $\alpha$ -连接的半乳糖端基。它最通常从魔芋属魔芋根(*Amorphophallus konjac*)分离得到,但是也可以从其它植物来源分离得到。

[0072] 如本文中使用的,术语“黄原胶”表示包含葡萄糖,甘露糖,葡糖醛酸、乙酸和丙酮酸的钾盐或钠盐的杂多糖。

[0073] 如本文中使用的,术语“藻酸盐”是指甘露糖醛酸和古洛糖醛酸的混合聚合物。

[0074] 如本文中使用的,术语“纤维掺合物”是指纤维的混合物。

[0075] 如本文中使用的,术语“粘性的纤维掺合物”(“VFB”)是指葡甘露聚糖、黄原胶和藻酸盐的混合物。

[0076] 如本文中使用的,术语“粘性的纤维复合物”(“VFC”)是指葡甘露聚糖、黄原胶和藻酸盐这三种组分的联锁基质,其中各组分在允许它们相互作用以通过在原始成分之间形成二级和三级相互作用(接头区域和网络)而形成新的成分的意义上是经过加工的(例如,造粒),而不是三种单独的组分的混合物,所述加工阻止了各组分表现出它们在各自纯状态时表现出的性能。

[0077] 药用食物

[0078] 在一个方面中,本发明提供药用食物,所述药用食物被配制为用于预防、治疗或改善与代谢性疾病或病症有关的一种或多种症状,例如代谢综合征、I 型或 II 型糖尿病、外分泌胰腺机能不全(包括患有慢性胰腺炎的患者)和 / 或高脂血症。本发明的这一方面的药用食物包括高粘性聚糖膳食纤维组合物,以及至少一种大量营养素,所述高粘性聚糖膳

食纤维组合物包括粘性的纤维掺合物 (VFB) 或其复合物 (VFC), 包括约 48% 到约 90%(w/w) 葡甘露聚糖、约 5% 到约 20%(w/w) 黄原胶和约 5% 到约 30%(w/w) 藻酸盐, 所述的大量营养素选自自由蛋白质、碳水化合物和脂肪组成的组。

[0079] 如 2006 年 4 月 7 日提交的待决美国专利申请 11/400, 768 和 2007 年 7 月 30 提交的待决美国专利申请 11/830, 615 (所述美国专利申请都被全文并入本文作为参考) 中所述, 已经开发出了高粘性聚糖膳食纤维组合物, 所述高粘性聚糖膳食纤维组合物包括通过将约 48% 到约 90%(w/w) 葡甘露聚糖、约 5% 到约 20%(w/w) 黄原胶和约 5% 到约 30%(w/w) 藻酸盐组合生产的纤维掺合物 (VFB) 或其复合物 (VFC), 其在商业上称为“PolyGlycopleX®”或“PGX®”, 具有非常高的水保持能力和凝胶形成性能。这种纤维组合物的组成部分聚糖组分是彼此互补的且协同地起作用以形成强的相互作用, 产生比现在已知的任何其它聚糖都高三到五倍的粘度水平。如本文中实施例 5 和 6 中所述的, 已经确定的是, 在经过加工 (例如, 颗粒化) 时, 三种组分葡甘露聚糖、黄原胶和藻酸盐通过在原始成分之间形成二级和三级相互作用 (接头区域和网络) 而相互作用以形成新的成分 (复合物 (“VFC”), 而不是三种单独的组分的混合物, 所述相互作用阻止各组分表现出在它们各自在纯状态时表现出的性能。

[0080] 这种高粘性膳食纤维组合物以比其它可溶性纤维所需量更低的重量使胃肠内容物的粘度显著增加。这种高度富集的性能允许这种纤维组合物在比其它可溶性纤维显著更低的剂量产生实质的生理学作用, 由此使得更容易将有意义量的这种材料结合到食物中。

[0081] 在一个实施方案中, 用于生产粘性的纤维掺合物 (VFB) 的聚糖是通过粒化加工过的, 以产生三种组分的联锁基质 (即, 复合物 (VFC))。如本文中使用的“粒化”是指任何其中使小的颗粒聚集在一起成为更大的永久聚集体的尺寸增大过程粒化可以通过在混合设备中的搅拌、通过压紧、挤出或成球作用来实现。可以使用多种网目尺寸将膳食纤维组合物颗粒化。术语“目”是指通过颗粒穿过具有限定尺寸的孔的筛网的能力确定的颗粒尺寸。本文中使用的网目尺寸是 Tyler 筛等价的, 如化学工程手册 (Chemical Engineers Handbook, 第五版, Perry & Chilton, eds.) 的表 21-12 中所述的。膳食纤维组合物 / 复合物的粒化越大 (即, 网目尺寸越小), 则获得期望粘度所需要的时间越长。在一些实施方案中, 使用组合的网目尺寸使膳食纤维组合物 / 复合物粒化, 通过将颗粒化的材料根据颗粒尺寸分离, 然后将根据颗粒尺寸分离的颗粒重新组合, 得到期望的粘度特征。例如, 通过将 30 目 (约 600 微米) 的颗粒、约 40 目 (约 400 微米) 的颗粒和约 60 目 (250 微米) 的颗粒组合获得 30 到 60 的组合网目尺寸

[0082] 包含在药用食物中的粘性膳食纤维掺合物 / 复合物 (VFB/C) 中的葡甘露聚糖、黄原胶和藻酸盐的比例可以是约 48% 到约 90% 的葡甘露聚糖 (例如约 60% 到约 80%, 或约 60% 到约 90%, 或约 65% 到约 75%, 或约 50% 到约 80%, 或约 50% 到约 70%, 或约 70%)、约 5% 到约 20% 的黄原胶 (例如约 10% 到约 20% 或约 11% 到约 13%, 或约 13% 到约 17%, 或约 13%, 或约 17%) 和约 5% 到约 30% 的藻酸盐 (例如约 10% 到约 20% 或约 13% 到约 17%, 或约 13%, 或约 17%)。在一些实施方案中, 包含在药用食物中的膳食纤维组合物中的葡甘露聚糖、黄原胶和藻酸盐的比例是约 70% 葡甘露聚糖、约 13% 到约 17% 黄原胶和约 13% 到约 17% 藻酸盐。

[0083] 在一些实施方案中, 药用食物被配制为向人类受试者提供 1.0g 到 100g 的包括约 48% 到约 90%(w/w) 葡甘露聚糖、约 5% 到约 20%(w/w) 黄原胶和约 5% 到约 30%(w/w) 藻酸盐的

粘性纤维掺合物或其复合物 (VFB/C) 的总日消耗量, 例如每天约 5g 到约 50g VFB/C, 例如每天约 10g 到约 35g VFB/C, 例如每天约 12g 到约 35g VFB/C, 例如每天约 15g 到约 35g VFB/C, 例如每天约 20g 到约 35g VFB/C, 例如每天约 12g 到约 25g VFB/C, 例如每天约 15g 到约 25g VFB/C。在一些实施方案中, 药用食物被配制为用于为人类受试者提供约 25mg/kg/ 天到约 1000mg/kg/ 天的 VFB/C 日剂量, 例如约 50mg/kg/ 天到约 600mg/kg/ 天, 例如约 100mg/kg/ 天到约 500mg/kg/ 天, 例如约 200mg/kg/ 天到约 400mg/kg/ 天。

[0084] 本发明的药用食物产品可以进一步包含另外的组分, 例如蛋白质或氨基酸、碳水化合物、脂质、维生素类、矿物质类和辅助因素、天然或人造的调味剂、染料或其它着色添加剂和防腐剂。术语“维生素类”包括但不限于硫胺素、维生素 B2、烟酸、泛酸、维生素 B6、生物素、叶酸、维生素 B12、硫辛酸、维生素 C、维生素 A、维生素 D、维生素 E 和维生素 K。术语“维生素类”还包括辅助因子和辅酶类, 例如辅酶类包括焦磷酸硫胺素 (TPP)、黄素单核苷酸 (FMM)、黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADP)、辅酶 A (CoA)、磷酸吡哆醛、生物胞素、四氢叶酸、腺苷钴胺、硫辛酰赖氨酸、11-顺式视黄醛和 1, 25-二羟基胆钙化甾醇。术语“维生素类”还包括胆碱、肉毒碱和  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  胡萝卜素。术语“矿物质类”是指人类膳食中需要的无机物质、金属等, 包括但不限于钙、铁、锌、硒、铜、碘、镁、磷、铬、锰、钾等, 及其混合物。矿物质可以是盐、氧化物或螯合盐的形式。

[0085] 在一些实施方案中, 本发明的药用食物进一步包括一种或多种脂质。本发明的这一实施方案中使用的脂质定义为溶解于醇中但不溶解于水中的例如脂肪、油或蜡的物质。如本文中使用的, 术语“脂肪”和“油”可互换地使用且包括脂肪酸。在一些实施方案中, 组合物中使用的脂质包括选自自由奶制品脂肪 (例如, 乳脂、奶油脂肪)、动物脂肪 (例如, 猪油) 或植物性脂肪 (例如, 椰子油、可可脂、棕榈油或人造黄油) 组成的组的脂肪。

[0086] 在一些实施方案中, 用于本发明的药用食物中的脂质包括食用油或油的混合物。这样的油包括植物油 (例如, 菜籽油、大豆油、棕榈油、橄榄油、红花油、向日葵籽油、亚麻子 (亚麻仁) 油、玉米油、棉子油、花生油、胡桃油 (walnut oil)、杏仁油、葡萄子油、月见草油、椰子油、琉璃苣籽油和黑醋栗油); 海产油类 (例如, 鱼油和鱼肝油)、或其混合物。

[0087] 在一些实施方案中, 用于本发明的药用食物中的脂质包括含中链甘油三酯的油类, 例如椰子油、棕榈油和黄油或纯化形式的中链甘油三酯。

[0088] 在一些实施方案中, 本发明的药用食物为患者提供卡路里和营养素的唯一来源。在一些实施方案中, 本发明的药用食物设计为向人类受试者提供膳食中纤维的主要来源。在一些实施方案中, 本发明的药用食物设计为向人类受试者提供膳食中纤维的唯一来源且相应地由医师进行标记和 / 或给予。

[0089] 要作为完整的、平衡的膳食的一部分被消耗的药用食物典型地配制为用于代替一天中的一次或多次正餐, 从而减少从常规食物中吸收的纤维的量。因为药用食物是在医师的监督下给药的, 患者不太可能消耗另外的包含纤维的膳食纤维补充剂。

[0090] 本发明的药用食物用于由在医师的照顾和监督下的患者的选定群体使用的。可以将本发明的药用食物对患有代谢性病况或处于发展为代谢性病况的风险之中的哺乳动物受试者, 例如人类受试者给药, 用于预防、治疗或改善与代谢性疾病或病症有关的一种或多种症状, 所述代谢性疾病或病症例如代谢综合征 (又称为 X 综合征和胰岛素抵抗综合征)、

I 型糖尿病、II 型糖尿病、肥胖症、非酒精性脂肪肝（肝性脂肪变性）、胰腺疾病和高脂血症，如本文中进一步描述的。

[0091] 在一些实施方案中，将本发明的药用食物以每天至少一次给予有此需要的受试者。在一些实施方案中，本发明的药用食物一天给予两次，优选早晨的一次和下午/晚上的一次。药用食物的典型治疗方案是持续至少两周到八周或更长时间。根据诸如所治疗的医学状况和患者的反应等因素，治疗方案可以延长，直到患者体验到疾病或病症的至少一种症状的改善。本发明的药用食物典型地以每天两次给予，作为正餐的替代物或餐间的零食。在一些实施方案中，将本发明的药用食物作为医学上管理的极低卡路里膳食方案的一部分作为唯一的食物来源以每天三到四次给予受试者。极低卡路里膳食的示例性应用是治疗肥胖症以产生快速的体重减轻和减少心血管代谢风险因素。

[0092] 制造药用食物的方法

[0093] 在另一个方面中，本发明提供制备药用食物产品的方法，包括向药用食物产品添加有效量的膳食纤维组合物的步骤，其中所述膳食纤维组合物包括粘性纤维掺合物 (VFB) 其复合物 (VFC)，包括葡甘露聚糖、黄原胶和藻酸盐。在一些实施方案中，制备药用食物产品的方法包括向药用食物产品添加有效量的膳食纤维组合物的步骤，其中所述膳食纤维组合物包括由包含葡甘露聚糖、黄原胶和藻酸盐的粘性纤维掺合物 (VFB) 形成的粘性纤维复合物 (VFC)。

[0094] 在一些实施方案中，药用食物被配制为用于预防、治疗、改善与代谢性疾病代谢性疾病或病症有关的一种多种症状。在一些实施方案中，被加入到药用食物产品中的膳食纤维组合物包括纤维掺合物 (VFB) 或由纤维掺合物（例如，粒化的 VFB）形成的纤维复合物 (VFC)，包括约 48% 到约 90% (w/w) 葡甘露聚糖（例如，约 60% 到约 80%，或约 60% 到约 90%，或约 65% 到约 75%，或约 50% 到约 80%，或约 50% 到约 70%，或约 70%）、约 5% 到约 20% (w/w) 黄原胶（例如，约 10% 到约 20%，或约 11% 到约 13%，或约 13% 到约 17%，或约 13%，或约 17%）和约 5% 到约 30% (w/w) 藻酸盐（例如，约 10% 到约 20% 或约 13% 到约 17%，或约 13%，或约 17%）。在一些实施方案中，包含在膳食纤维组合物中的纤维掺合物中的葡甘露聚糖、黄原胶和藻酸盐的比例或由纤维掺合物形成的纤维复合物中的葡甘露聚糖、黄原胶和藻酸盐的比例是约 70% 葡甘露聚糖、约 13% 到约 17% 黄原胶和约 13% 到约 17% 藻酸盐。

[0095] 在一些实施方案中，被加入到配制用于治疗或预防代谢性疾病或病症的药用食物产品中的、包括粘性纤维掺合物 (VFB) 或其复合物 (VFC) 的膳食纤维组合物的量是药用食物产品的总重量的约 5% 到约 20%。在一些实施方案中，被加入到药用食物产品中的膳食纤维组合物或其复合物 (VFB/C) 的量包括每天约 1g 到 100g，例如每天从 5g 到约 50g，每天约 10g 到 35g，例如每天约 12g 到 35g，例如每天约 15g 到 35g，例如每天约 20g 到 35g，例如每天约 12g 到约 25g，例如每天约 15g 到约 25g，基于每天两次的消耗量。本发明的药用食物产品典型地一天给予至少一次，优选一天给予两次或三次。本发明的药用食物用于口服给予。

[0096] 可以将包括纤维掺合物或其复合物的膳食纤维组合物与包括固体、液体或半固体药用食物产品在内的任何类型的药用食物产品组合。示例性的固体药用食物产品包括但不限于谷物（例如，稻、谷类食物（热的或冷的））、格兰诺拉燕麦片 (granola)、燕麦粥、烘烤制品（面包、饼干、松饼、饼和其它制品）、意大利面制品（包括由稻或其它谷物制成的面

条)、肉(例如,禽肉、牛肉、羊肉、猪肉、海产)、和乳制品(例如,奶、酸奶、乳酪、冰淇淋和黄油)。示例性的液体或半液体药用食物产品包括但不限于代替正餐的饮料、果汁、汤(包括干汤粉)、营养补充剂和果奶。

[0097] 可以在食用药用食物产品之前使用任何适合的方法将包括纤维掺合物或其复合物的膳食纤维组合物加入到药用食物产品中。例如,可以将膳食纤维组合物烘烤到药用食物产品中,可以将膳食纤维组合物与药用食物产品混合或点缀在药用食物产品上。

[0098] 本发明的药用食物以单位剂量包装,带有标签以清楚地表明该产品用于在医师的监督下用于特定的代谢性疾病或病症的控制。

[0099] 预防、治疗或改善与代谢性疾病或病症有关的一种或多种症状的方法

[0100] 在另一个方面中,本发明提供预防、治疗或改善与代谢性疾病或病症有关的一种或多种症状的方法,例如代谢综合征、I型糖尿病、II型糖尿病、肥胖症、非酒精性脂肪肝(肝性脂肪变性)、胰腺疾病和高脂血症。本发明的这一方面的方法包括对有此需要的人类受试者给予有效剂量的包括粘性纤维掺合物(VFB)其复合物(VFC)的高粘性聚糖膳食纤维组合物,所述粘性纤维掺合物(VFB)其复合物(VFC)包括约48%到约90%(w/w)葡甘露聚糖(例如约60%到约80%,或约60%到约90%,或约65%到约75%,或约50%到约80%,或约50%到约70%,或约70%)、约5%到约20%(w/w)黄原胶(例如约10%到约20%,或约11%到约13%,或约13%到约17%,或约13%,或约17%)和约5%到约30%(w/w)藻酸盐(例如约10%到约20%或约13%到约17%,或约13%,或约17%)。在一些实施方案中,纤维掺合物或其复合物中的葡甘露聚糖、黄原胶和藻酸盐的比例是约70%葡甘露聚糖、约13%到约17%黄原胶和约13%到约17%藻酸盐。

[0101] 在一些实施方案中,所述方法包括对有此需要的人类受试者给予膳食纤维组合物,所述膳食纤维组合物包括粘性纤维掺合物(VFB)其复合物(VFC,例如粒化的VFB),包括约48%到约90%(w/w)葡甘露聚糖、约5%到约20%(w/w)黄原胶和约5%到约30%(w/w)藻酸盐,给予的剂量为每天1.0g到100g VFB/C,例如每天约5g到约50g VFB/C,例如每天约10g到约35g VFB/C,例如每天约12g到35g VFB/C,例如每天约15g到35g VFB/C,例如每天约20g到35g VFB/C,例如每天约12g到约25g VFB/C,例如每天约15g到约25g VFB/C。

[0102] 在一些实施方案中,所述方法包括对有此需要的哺乳动物受试者(例如人类受试者)给予膳食纤维掺合物(VFB)或其复合物(VFC),给予的剂量为约25mg/kg/天到约1000mg/kg/天,例如约50mg/kg/天到约600mg/kg/天,例如约100mg/kg/天到约500mg/kg/天,例如约200mg/kg/天到约400mg/kg/天,持续有效预防、治疗或改善与受试者的代谢性疾病或病症有关的一种或多种症状的一段时间。

[0103] 在一些实施方案中,如本文中所述的,将包括纤维掺合物(VFB)或其复合物(VFC)的膳食纤维组合物以药用食物产品的形式给予受试者。在一些实施方案中,将膳食纤维组合物每天至少一次给予有此需要的受试者。在一些实施方案中,将本发明的膳食纤维组合物一天给予两次,优选早晨的一次和下午/晚上的一次。本发明的这一方面的典型治疗方案是持续至少两周到16周或更长时间。根据诸如所治疗的医学状况和患者的反应等因素,治疗方案可以延长,直到患者体验到代谢性疾病或病症的至少一种症状的改善。

[0104] 在一个实施方案中,本发明提供改善与患有II型糖尿病或处于发展为II型糖尿病的风险之中的人类受试者的胰岛素抵抗的进展有关的至少一种症状的方法。本发明的这

一方面的方法包括对有此需要的人类受试者给予约 25mg/kg/天到约 1000mg/kg/天（例如，从 100mg/kg/天到 500mg/kg/天，或从 350mg/kg/天到约 450mg/kg/天）的高粘性聚糖膳食纤维组合物，持续有效改善胰岛素抵抗的进展的至少一种症状（例如血糖水平的降低）的一段时间，所述高粘性聚糖膳食纤维组合物包括纤维掺合物或其复合物（VFB/C），包括约 48% 到约 90%（w/w）葡甘露聚糖、约 5% 到约 20%（w/w）黄原胶和约 5% 到约 30%（w/w）藻酸盐。在一些实施方案中，所述方法包括给予膳食纤维组合物持续至少两周直到 16 周或更长的一段时间。

[0105] 根据美国心脏协会（the American Heart Association）和国家心、肺和血液学会（the National Heart, Lung, and Blood Institute），如果受试者满足以下三个或更多项，则可以诊断为患有代谢综合征：血压等于或高于 130/85mmHg；血糖（葡萄糖）等于或高于 100mg/dL；腰围大（男性：40 英寸以上；女性：35 英寸以上）；低 HDL 胆固醇（男性：低于 40mg/dL；女性：低于 50mg/dL）；或甘油三酯等于或高于 150mg/dL。因此，在一些实施方案中，用于改善与患有 II 型糖尿病或处于发展为 II 型糖尿病的风险之中的人类受试者的胰岛素抵抗的进展有关的至少一种症状的方法包括对受试者给予有效量的 VFB/C 持续有效实现以下目标的一段时间：(1) 使受试者的血糖（葡萄糖）降低到低于 100mg/dL 的水平；(2) 使男性的腰围降低到低于 40 英寸，或女性受试者的腰围降低到低于 35 英寸；和/或 (3) 使甘油三酯水平降低到等于或低于 150mg/dL 的水平。

[0106] 如以下实施例 1-4 中所述的，VFC（例如粒化的 VFB）的效力表现为：与对照组相比，改善哺乳动物受试者的代谢综合征的早期的发展和进展，包括延缓葡萄糖诱导的器官损伤的进展、降低肝脏中的脂肪积累、保护胰腺  $\beta$ -细胞和改善胰岛素敏感性。

[0107] 分析包括至少一种聚糖的样品的方法

[0108] 在又一个方面中，本发明提供确定包括至少一种聚糖的样品（例如包括纤维掺合物或其复合物的膳食纤维组合物）中的成分糖的方法。本发明的这一方面的方法包括：(a) 用酸将包括至少一种聚糖的样品水解，以产生水解液；(b) 用色谱方法分离水解液中的水解产物；(c) 检测在步骤 (b) 中分离的水解产物；和 (d) 将步骤 (c) 中检测到的水解产物与一种或多种参考标准进行比对，以确定样品中的成分糖。

[0109] 在一些实施方案中，样品包括至少一种膳食纤维。在一些实施方案中，样品包括藻酸钠。在一些实施方案中，样品包括纤维掺合物或其复合物，包括藻酸盐、葡甘露聚糖和黄原胶。

[0110] 水解

[0111] 根据本发明的这一方面的方法，用酸水解包括至少一种聚糖的样品以得到水解液。在一些实施方案中，用于水解样品的酸是三氟乙酸（TFA）。

[0112] 在一些实施方案中，样品包括藻酸盐，是一种甘露糖醛酸和古洛糖醛酸的混合聚合物。在这种实施方案中，包括藻酸盐的样品的水解步骤是在适合于 L-古洛糖醛酸以及 D-甘露糖醛酸的释放和保存的条件下进行的。例如，在一个实施方案中，藻酸的最初水解可以用 95% 硫酸在 3°C 下进行 14 小时，或用 80% 硫酸在室温下进行 14 小时来实现，如 Fischer 和 Dorfel 所述的。根据这种实施方案，在搅拌加入到藻酸中之前，将无机酸冷却到 -10 到 -5°C。将粘性物质充分搅拌以避免形成团块。然后用碎冰和水稀释混合物，直到硫酸溶液为约 0.5N。然后将溶液在沸水浴上加热六小时，然后用碳酸钙中和。在过滤和

洗涤硫酸钙沉淀物之后,将亮黄色的滤液洗涤水浓缩,然后通过阳离子交换柱并在减压下浓缩为稀的浆状物。在干燥器中进一步缓慢浓缩并用熔点 191°C 的 D-甘露呋喃醛酸内酯(D-mannofuranurono-lactone) 接种之后,一些内酯从浆状物结晶出来,但是条件是水解的藻酸包含比 L-古洛糖醛酸更多的 D-甘露糖醛酸。在除去晶态的 D-甘露糖醛酸内酯之后,如本文中所述的通过色谱法分离剩余的 D-甘露糖醛酸内酯和 L-古洛糖醛酸。

[0113] 在另一个实施方案中,包括藻酸盐的样品的水解步骤包括使用三氟乙酸(TFA)。TFA 优于矿物质酸之处在于充分的挥发性,以允许通过水解液的冷冻干燥而简单地将其除去。例如,已经证明在 2M TFA 中在 100°C 在氮气下约 8 小时到约 18 小时的水解可以适当地代替在相同条件下在 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 中的水解(Hough 等)。需要指出的是,6-8 小时的水解时间对于由中性糖组成的聚糖的降解来说典型地是足够的,但是显著比例的糖醛酸残基的存在引入了进一步的困难,在于糖苷醛酸(glycosiduronic acid) 键通常比其它配糖键更加耐受酸水解。对于包含大约 16 到 30 摩尔%的糖醛酸的聚糖(例如细菌的荚膜多糖)而言,已经证明在 2M TFA 中在 100°C 在氮气下水解 18 小时在一些情况中是令人满意的(Hough 等)。然而,在存在有对酸降解特别敏感的糖残基(例如 D-核糖、D-木糖或 L-鼠李糖)时,优选水解时间限于 8 小时,并随后对于保持连接于糖醛酸的糖校正分析结果,通过紧密交联凝胶上的凝胶色谱法确定水解液中的双己糖醛酸的比例。

[0114] 在一些实施方案中,包括藻酸盐的样品的水解步骤是通过在约 95°C 到约 110°C 的温度范围将样品与 TFA 温育约 48 到 72 小时的时间段进行的。如实施例 6 中所述的,本发명의发明人确定了用 TFA 水解 72 小时对于糖从包括藻酸盐的样品(例如,包含 VFB/C 的样品)的水解释放是有效的。

[0115] 水解液的色谱分离

[0116] 根据本发明这一方面的方法,然后用色谱法分离水解液中的水解产物,例如薄层色谱法、气相色谱法(GLC)或液相色谱法(LC),包括使用 C18 反相材料。在一些实施方案中,色谱法能够将糖醛酸类与中性糖类分离,例如 Dionex 色谱法。

[0117] 检测通过色谱法分离的水解产物并与一种或多种参考标准比对,以确定样品中的成分糖。适合于检测糖的代表性的检测器包括连接于 HPLC 系统的 Dionex 的脉冲式电流计检测器(Pulsed Amperometric Detector)或蒸发光散射检测器(Evaporative Light Scattering Detector, ELSD)或质谱仪。可以与试验样品平行运行参考标准,例如具有已知组分的样品,来作为对照样品。或者,参考标准可以通过特定色谱法分析的参考标准中的一种或多种特定的成分糖的已知特性(例如,保留时间/峰高/相对面积),如实施例 5 中所述的。

[0118] 在一些实施方案中,本发명의这一方面的方法包括用 TFA 水解包括至少一种聚糖例如藻酸盐的样品;用色谱法例如带有 C18 柱的 HPLC 系统分离水解液中的水解产物;用检测器例如 ELSD 或质谱仪检测水解产物;和将检测到的产物与一种或多种参考标准比对,以确定样品中的成分糖。

[0119] 以下实施例仅用于举例说明现在被认为是实践本发명의最佳方式,但是不应将其看作是对本发명의限制。

[0120] 实施例 1

[0121] 这个实施例描述包括粒化的粘性纤维掺合物(也称为粘性纤维复合物(VFC),商

业上称为 PolyGlycoPlex(PGX®) 的膳食纤维组合物对 Zucker 糖尿病大鼠的胰岛素抵抗、体重、胰腺  $\beta$  细胞生活力和脂质分布的影响。

[0122] 基本原理:选择雄性 Zucker 糖尿病大鼠 (ZDF) (ZDF/Cr1-Lepr<sup>fa/fa</sup>) 作为本研究的动物模型,是因为这个动物模型被认为是优异的成人发病肥胖症伴随 I I 型糖尿病和 / 或较早年龄胰岛素敏感性降低的模型 (C. Daubioul 等, J. Nutr. 132 :967-973 (2002) ; J. M. Lenhard 等, Biochem. & Biophys. Res. Comm. 324 :92-97 (2004) ; J. N. Wilson, Atherosclerosis 4 :147-153 (1984))。ZDF 是缺少瘦素受体的突变种。瘦素是由脂肪组织分泌的用信号通知食欲抑制的蛋白质。因此,在这些突变种大鼠中,没有用于降低食欲或诱导饱腹感的反馈信号。ZDF 大鼠以非常高的速率消耗食物并非常快速地变肥胖。因此,这种模型模拟通过进食过多而肥胖的人。随着 ZDF 大鼠变得肥胖,它们迅速地变得对胰岛素不敏感,正如在人类中观察到的那样 (也称为代谢综合征)。ZDF 大鼠还患有高脂血症,表明这种大鼠模型是良好的人代谢综合征模型。随着时间的推移,ZDF 模型发展出糖尿病,这与在人类中的进展相似,伴随着胰腺  $\beta$  细胞 (分泌胰岛素的细胞) 群体的损失而变得红润 (florid)。蛋白质被过量的葡萄糖糖化,这在 ZDF 和人类中都会引起器官功能的问题,特别是在肾中。高的葡萄糖水平引起蛋白质的糖化,引起糖尿病性肾病和血管损伤。在这个研究中使用未高脂肪喂养的较小龄的 ZDF (五周龄),以确定给予粘性纤维复合物 (VFC) 颗粒是否可以延迟糖尿病的发病和 / 或降低其严重程度。

[0123] 葡萄糖对蛋白质损害的程度标准标示物是糖化血红蛋白 (HbA1c),这个标示物在 ZDF 中是升高的,且是人类用药的最重要的标示物。测量尿中的白蛋白也是糖尿病性肾损伤的标准标示物。糖尿病治疗的 FDA 指南要求血糖控制和减少由高葡萄糖引起的组织损伤。

[0124] 方法

[0125] 纤维增强的大鼠食物

[0126] 将粘性纤维复合物 (VFC) (魔芋 / 黄原胶 / 藻酸盐 (70:13:17) 颗粒 (即,通过造粒加工纤维掺合物以形成复合物,商业上称为 PGX®) 并入到基本的大鼠食物 (D11725 : Research Diets, New Brunswick, New Jersey) 中。用于本研究的替代膳食结合有其它纤维形式,如表 1 中所示。在考虑到每种纤维来源的不同的能量贡献 (VFC 和菊粉膳食提供 3.98kcal/g,纤维素提供 3.90kcal/g) 的情况下,所有的膳食尽可能配制为等能的。

[0127] 选择纤维素作为不能溶解也不能发酵的且被认为是惰性参考化合物的基准纤维 (J. W. Anderson 等, J. Nutr. 124 :78-83 (1994))。菊粉是得自工厂的果糖聚合物,其是水溶性的和不易消化的,且在一些研究中表现出脂肪减少和血糖控制的效力;但是结果是易变的 (参见 P. Rozan 等, Br. J. Nutr. 99 :1-8 (2008))。菊粉中的果糖或葡萄糖单位数 (聚合度 “DP”) 是 99.9%  $\geq$  5,平均 DP  $\geq$  23。

[0128] 表 1:包含 VFB、纤维素或菊粉的三种膳食的组成 (以重量计的成分百分比)

[0129]

	粘性纤维复合物 (VFC) (魔芋/黄原胶/藻 酸盐 (70: 13: 17)) PGX®颗 粒	不溶性纤维 (纤维素)	可溶的非粘性 纤维(菊粉)
研究膳食配方 #	D08012504	D08012507	D08012503
酪蛋白	20%	20%	20%
蛋氨酸	0.3%	0.3%	0.3%
玉米淀粉	50%	50%	50%
麦芽糖糊精	15%	15%	15%
纤维*	5% VFC (PGX®)	5% 纤维素	5% 菊粉
玉米油	5%	5%	5%
盐/矿物质混合物	3.5%	3.5%	3.5%
维生素混合物	1%	1%	1%
重酒石酸氢胆碱	0.2%	0.2%	0.2%
染料	0.1%	0.1%	0.1%

[0130] \*VFC 纤维颗粒在商业上称为 **PolyGlycopleX® (PGX®)** (InnovoBiologic Inc., Calgary, Alberta, Canada), 纤维素 (Research Diets, New Brunswick, New Jersey), 和菊粉 (**Raftiline®** HP, Orafti, Tienen, Belgium)。

[0131] 研究设计

[0132] 从 Charles River (Kingston, New York) 获得 30 只五周龄雄性 ZDF/Cr1-Lepr<sup>fa/fa</sup> 大鼠。将动物在悬挂的丝网笼中单独饲养, 满足最新版 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHEW (NIH) 推荐的规格。所有的研究都得到 Eurofins Institutional Animal Use and Care Committee 的批准。动物房的温度和湿度经过控制, 有 12- 小时照明 / 黑暗循环, 并保持清洁和没有寄生虫。在到达以后使动物适应一周, 并使动物随意进食食物和水。

[0133] 在适应之后, 基于最初的血糖和体重将大鼠随机指定到三个组中的一个组。对每组的大鼠给予一种类型的包含都为 5% (wt/wt) 的 VFC (商业上称为 **PGX®**)、纤维素或菊粉 (**Raftiline®** HP, 得自菊苣的菊粉) 的食物, 如表 1 中所述, 持续 8 周的时间。贯穿 8 周的研究过程进行基本监测程序, 包括每周三次测量食物重量, 每周测量体重, 并收集血样测量葡萄糖和胰岛素。需要指出的是, 非空腹葡萄糖分析在第三周开始, 而空腹分析在第一周开始。在非空腹动物中, 只在最后一个时间点测量胰岛素。为研究增加了非空腹状态的分析是由于观察到在纤维物理上存在于胃肠道中时 VFC 具有更大的稳定葡萄糖水平的作用, 可能是由于 Zucker 大鼠白天和夜晚都不断地进食。在空腹动物中, 贯穿整个研究测量血清

甘油三酯,而在非空腹动物中,只取得终点测量 (IDEXX, North Grafton, Massachusetts)。

[0134] 对于所有的研究,用于测量葡萄糖和胰岛素的血液样品在每天的大约相同时间(上午十时左右 (mid-morning)) 取得。通过间隔一周的两次口服葡萄糖耐量试验和尸检结束研究。

[0135] 测量

[0136] 贯穿 8 周的研究时间进行以下测量:

[0137] 食物摄入:在给予实验食物之前和之后每周测量食物重量 3 次。

[0138] 体重:一周测量一次。

[0139] 血糖和胰岛素:在给予实验食物之前和之后的每隔一周,在整夜空腹之后通过后眼眶放血收集血液。用于测量葡萄糖和胰岛素的血液样品每周取血一次,在一天中的大约相同时间(上午十时左右)取得。小的量使用手持糖度计分析。在取得用于胰岛素分析的样品之后,使 1mL 凝结,取 0.5mL 的血清并分析甘油三酯含量。在使动物得到食物时通过尾部切口收集另外的样品。使用 Bayer Ascensia EliteGlucometer (Bayer Health Care, Tarrytown, New York) 测量血糖。使用 ELISA (Ani Lytics, Gaithersburg, Maryland) 测量胰岛素。

[0140] 口服葡萄糖耐量试验 (OGTT)

[0141] 在第 9 周和第 10 周,通过对在空腹和非空腹大鼠进行的两次口服葡萄糖耐量试验 (OGTT) 结束研究,非空腹 OGTT 最后进行。对于空腹和非空腹 OGTT 二者都取得用于胰岛素分析和葡萄糖测量的基线血样。用于最终的非空腹 OGTT 的最初血样液还如下所述被用于临床化学分析。

[0142] 通过口服葡萄糖处理 (2g/kg 葡萄糖,灌胃法) 诱导空腹和非空腹动物的 OGTT。在葡萄糖加载之后的 30、60、90 和 120 分钟取得血样并分析葡萄糖和胰岛素含量。在第二个葡萄糖耐量试验结束时,通过过量异氟烷将大鼠处死,并取得有关的器官用于组织病理学分析。

[0143] 在整个研究过程中计算稳态模式评价 (Homeostatis ModelAssessment, HOMA) 得分,以 mg 葡萄糖 x 胰岛素 (U/mL<sup>2</sup>) 为单位。这是公认的用于显示胰岛素抵抗改变的可靠方法,越低的 HOMA 得分表示越大的外周胰岛素抵抗的降低。还使用以下公式计算口服葡萄糖耐量试验 (OGTT) 研究的混合胰岛素敏感指数 (CISI) 得分。

$$[0144] \quad CISI = \frac{1000}{\sqrt{(Gluc_{base} \times Ins_{base}) \times (Gluc_{mean} \times Ins_{mean})}}$$

[0145] 这个 CISI 得分考虑了葡萄糖漂移和曲线下面积,较高的得分表示改善的胰岛素敏感性。

[0146] 对于空腹和非空腹 OGTT 二者都取得用于胰岛素分析和葡萄糖测量的基线血样。用于最终的 (非空腹) OGTT 的最初的血样还用于临床化学分析,包括:电解质、血液尿素氮 (BUN)、肌酐、碱性磷酸酶、天门冬氨酸氨基转移酶 (ALT)、丙氨酸转氨酶 (AST) 和胆红素 (直接胆红素 + 间接胆红素) 和血浆胆固醇总量 (分析通过 IDEXX, North Grafton, Massachusetts 进行)。

[0147] 血清甘油三酯:在空腹动物中,贯穿整个研究测量血清甘油三酯,而在非空腹动物中,只取得终点测量 (分析通过 IDEXX, North Grafton, Massachusetts 进行)。

[0148] 临床化学分析：用于最终的非空腹 OGTT 的最初的血样用于临床化学分析，包括：电解质、血液尿素氮 (BUN)、肌酐、碱性磷酸酶、天门冬氨酸氨基转移酶 (ALT)、丙氨酸转氨酶 (AST) 和胆红素 (直接胆红素 + 间接胆红素) 和血浆胆固醇总量 (分析通过 IDEXX, North Grafton, Massachusetts) 进行。

[0149] 组织分析：将一叶肝脏、一个肾和胰腺固定在 10% 中性的、中和福尔马林缓冲剂 (NBF) 中。在 24 小时后将胰腺转移到 70% 乙醇中。对组织进行处理并包埋在石蜡中。肝脏和肾以大约 5 微米切片并用苏木精和曙红 (H&E) 染色。胰腺以大约 5 微米连续切片两次，并将切片用 H&E 染色或用抗大鼠胰岛素的小鼠抗体 (1:300 兔抗大鼠胰岛素, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts) 进行免疫组织化学染色。

[0150] 免疫组织化学：

[0151] 免疫组织化学如下进行。使用同种型对照抗体 (正常的兔 IgG, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota) 来评价非特异性染色和背景染色的总水平。在去石蜡化之后，使用 **Declere®** 溶液 (Cell Marque™ Corporation, Rocklin, California) 在 120°C 持续 15 分钟随后在热的 **Declere®** 溶液中室温持续 5 分钟进行抗原修复。通过在含 3% 过氧化氢的去离子水中温育 10 分钟终止内源性的过氧化物酶活性。将载玻片在 5% 正常山羊血清中温育 20 分钟。然后将载玻片与一次抗体温育 60 分钟，随后在生物素化的山羊抗兔抗体中温育 30 分钟。然后将载玻片在 ABC Elite **Reagent®** (Vector, Burlingame, California) 中温育 30 分钟。最后，将试样在二氨基联苯胺中温育 5 分钟，随后苏木精复染。

[0152] 在尸检之后，将另一个肝叶速冻，包埋在 OCT 中，以 5  $\mu$  M 切片并用苏丹黑染色以分析脂质含量 (游离脂肪酸和甘油三酯)。

[0153] 评价所有用 H&E 染色的载玻片的与在 ZDF 中通常观察到的形态变化有关的形态变化，例如肾中的小管扩张的增加和小管退化的增加、胰岛细胞退化和肝性脂肪变性。基于所发现的严重程度将这些变化以 0 到 5 的比例半定量分级，5 分是最严重的。

[0154] 评价用苏丹黑染色的肝脏载玻片并根据苏丹黑阳性泡的存在以 0 到 5 的比例半定量分级，5 分是最严重的。

[0155] 用抗胰岛素抗体测量免疫组织化学染色的胰腺载玻片上的具有胰岛素阳性细胞的胰岛面积的百分比。这种测量是基于形态测定进行的。由兽医病理学家从每个胰腺手动分出 10 个胰岛。类似地分出这些小岛内的胰岛素染色阳性的区域，并使用 **ImagePro®Plus** 图像软件计算胰岛素阳性的胰岛面积的百分比。

[0156] 统计方法：

[0157] 通过双因素重复测量方差分析 (ANOVA) 来分析不同时间收集的间隔数据。使用如 Motulsky H., Intuitive Biostatistics, NY, University Press (1995) 所述的 Bonferroni 多重比较检验进行的事后比较跟踪显著的作用。

[0158] 通过单因素 ANOVA 分析非空腹大鼠中只在研究结束时测量的胰岛素、胆固醇和血液化学。使用如 Motulsky H., Intuitive Biostatistics, NY, University Press (1995) 所述的 Dunnett's 多重比较检验 (MCT) 进行的事后比较跟踪明显的影响。通过如 Motulsky H., Intuitive Biostatistics, NY, University Press (1995) 中所述的 Kruskal Wallis 检验分析非间隔的或离散的数据 (例如，组织学得分)。使用 Dunnett's MCT 通过事后比较跟踪明显的影响。

**[0159] 结果****[0160] 体重和食物消耗量**

**[0161]** 图 1A 图示阐明了在 Zucker 糖尿病大鼠中进行的为期 8 周的研究中 VFC、纤维素或菊粉膳食随时间对体重 (g) 的影响。如图 1A 中所示,从第一周开始, VFC 治疗的大鼠中相对于喂食纤维素的动物或喂食菊粉的动物的随时间的体重增加显著平缓。在研究开始时,所有的 Zucker 糖尿病大鼠具有相似的体重 (大约 160g)。在随后的三周中,喂食包含纤维素或菊粉的食物的大鼠平均比喂食包含 VFC 的食物的大鼠的体重增加多大约 40g。从第一周到第八周可以观察到喂食 VFC 的大鼠与喂食包含纤维素或菊粉的膳食的大鼠之间的显著性差异 (符号“\*\*\*”表示  $p < 0.001$ , Bonferroni's MCT)。喂食包含菊粉和包含纤维素的膳食的大鼠之间没有观察到显著性差异。

**[0162]** 图 1B 图示阐明了在 Zucker 糖尿病大鼠中进行的为期 8 周的研究中 VFC、纤维素或菊粉膳食随时间对食物消耗量 (g/天) 的影响。如图 1B 周所示,在前三周 VFC 治疗的大鼠的食物消耗量显著降低 (符号“\*”表示在第一周  $p < 0.05$ ; 符号“\*\*\*”表示在第二周  $p < 0.001$ ; 符号“\*\*”表示在第三周  $p < 0.01$ )。VFC 组的食物摄入在研究的其余时间保持较低,但在研究的 4 周之后食物摄入水平不再统计上不同于其它两个组。喂食包含菊粉和包含纤维素的膳食的大鼠之间没有观察到显著性差异。

**[0163]** 喂食包含 VFC 的食物的大鼠典型地进食 20–23g/天 (对溢出量进行校正,相当于大约 70–85kcal/天)。喂食包含纤维素或菊粉的食物的大鼠典型地进食 21–27g/天 (对溢出量进行校正,相当于大约 75–100kcal/天)。

**[0164]** 总起来说,这些结果证明,在 ZDF 大鼠模型中观察到的随时间的体重增加在 VFC 治疗的动物中显著趋缓。

**[0165] 血糖控制:血糖和代谢**

**[0166]** 图 2A–D 图示阐明了在为期 8 周的研究中包含 VFC、纤维素或菊粉的膳食对 ZDF 大鼠的空腹血糖 (图 2A)、空腹血清胰岛素 (图 2B)、非空腹血糖 (图 2C) 和空腹稳态模式评价 (HOMA) 得分 (图 2D) 的随时间的影响。如图 2A 中所示,空腹大鼠的血糖值都没有很大的升高,在 VFC 治疗的大鼠值观察到葡萄糖值的轻微增加 (符号“\*”表示在第三周和第六周时  $p < 0.05$ )。

**[0167]** 如图 2B 所示,在整个研究过程中 VFC 治疗的大鼠的空腹血清胰岛素水平是降低的,且从第五周开始血清胰岛素水平统计学显著的水平降低 (符号“\*\*\*”表示在第四周之后  $p < 0.001$ )。

**[0168]** 如图 2C 所示,在大约第五周开始, VFC 治疗的大鼠的非空腹血糖值与喂食纤维素和菊粉的大鼠相比显著地降低 (符号“\*\*\*”表示在第五周之后  $p < 0.0001$ )。

**[0169]** 如图 2D 所示,从研究的第五周开始 VFC 治疗的大鼠表现出显著降低的 HOMA 得分 (符号“\*”表示  $p < 0.05$ ),其中第 5–7 周 ( $p < 0.05$ ),且第 8 周 (符号“\*\*”表示  $p < 0.01$ )。

**[0170]** 通常,在空腹条件下 (即,在没有进食大约 16 小时之后在早晨进行试验的动物), ZDF 大鼠保持比食物充足 (非空腹) 条件下的大鼠低得多的血糖浓度 (比较图 2A 到图 2C)。如图 1A 所示,对于所有空腹组,观察到的血糖值典型地介于 95mg/dL 到 145mg/dL 之间,这样的数值被认为是或多或少地糖尿病性的,在喂食 VFC、纤维素或菊粉各组之间几乎没有差异。

[0171] 如图 2B 所示,在空腹条件下,与喂食纤维素或菊粉的食物的大鼠相比,喂食包含 VFC 的膳食的大鼠保持更加稳定得多的血清胰岛素浓度。如图 2B 所示,在整个研究过程中 VFC 治疗的大鼠的空腹血清胰岛素水平是降低的,且从第五周开始观察到显著的降低并直到第八周保持显著(在第四周之后  $p < 0.001$ ,如符号“\*\*\*”表示的)。喂食包含菊粉和包含纤维素的膳食的大鼠之间没有观察到显著性差异。

[0172] 通过计算稳态模式评价(HOMA)来评价这项研究过程中空腹大鼠的胰岛素抵抗。如图 2D 中所示,在所有组中,HOMA 得分在这个过程中都是上升的,但是与喂食纤维素或菊粉的大鼠相比,喂食包含 VFC 的膳食的大鼠不那么显著。在第 5、6 和 7 周时观察到 VFC 对纤维素或菊粉的显著性差异( $p < 0.05$ ,如符号“\*”表示的),以及在第 8 周时( $p < 0.01$ ,如符号“\*\*”表示的)。喂食包含纤维素和菊粉的膳食的大鼠之间没有观察到显著性差异。

[0173] 图 3A 图示阐明了在为期 8 周的研究中用 VFC、纤维素或菊粉膳食喂养的、空腹 Zucker 糖尿病大鼠的混合胰岛素敏感指数(CISI)得分。如图 3A 所示,VFC 治疗的动物的为 OGTT 检验而计算的空腹动物的 CISI 得分显著更高( $p < 0.01$ ,由符号“\*\*”表示),进一步证明了这个 VFC 组的胰岛素敏感性与喂食纤维素和菊粉的组相比得到改善。

[0174] 图 3B 图示阐明了在为期 8 周的研究中用 VFC、纤维素或菊粉膳食喂养的、非空腹 Zucker 糖尿病大鼠的混合胰岛素敏感指数(CISI)得分。如图 3B 所示,与喂食纤维素和菊粉的组相比,VFC 治疗的非空腹动物表现出显著更高的 CISI 得分( $p < 0.001$ ,由符号“\*\*\*”),由此具有更高的胰岛素敏感性。在葡萄糖攻击的 30 分钟后观察到葡萄糖水平峰值,且 VFC 组具有与另两个组相比显著更低的峰值。

[0175] 如图 2C 所示,在非空腹(喂食)条件下(即,在之前的 24 小时过程中连续供应食物,且在早晨检验的动物),在所有的试验周的过程中,喂食包含 VFC 的膳食的大鼠与喂食包含纤维素或菊粉的膳食的大鼠相比保持更低的血糖水平。血糖检验在研究的第三周开始且持续直到第八周。如果观察到空腹葡萄糖值非常接近于正常范围,则将喂食状态的动物的葡萄糖测试值添加到研究规程中。不希望束缚于任何特定的理论,认为 VFC 的许多机械作用涉及其与食物的直接接触。

[0176] 尽管在喂食条件下仅在最后一个时间点测量胰岛素,但是观察到类似于空腹动物中在最后一个时间点测量的改善的胰岛素敏感性。如图 2C 中所示,与菊粉或纤维素治疗的动物相比,VFC 治疗的动物的喂食状态血糖反应显著更低( $p < 0.001$ ,由符号“\*\*\*”表示)。喂食包含菊粉或包含纤维素的膳食的大鼠之间没有观察到显著性差异。

[0177] 图 3C 图示阐明了用 VFC、纤维素或菊粉膳食喂养的非空腹 Zucker 糖尿病大鼠在为期 8 周的研究中最后一次抽血的 HOMA 得分。如图 3C 中所示,发现 VFC 治疗组的 HOMA 得分与纤维素和菊粉组相比显著更低( $p < 0.001$ )。正如所指出的那样,较低的 HOMA 得分表示外周胰岛素抵抗的更大降低。

[0178] 脂质分布

[0179] 测量空腹(在整个研究过程中测量)和非空腹(只在 8 周研究结束时测量)动物的血清甘油三酯。图 4 图示阐明了在为期 8 周的研究中用 VFC、纤维素或菊粉膳食喂养的、空腹 Zucker 糖尿病大鼠中测量的血清甘油三酯水平。如图 4 中所示,对于空腹的动物,VFC 治疗的动物表现出与菊粉治疗组和纤维素治疗组相比早和显著的对甘油三酯的作用。在 2-3 周之后,所有组中的血清甘油三酯都降低,表现出纤维素治疗的动物具有与菊粉治疗的

动物和 VFC 治疗的动物相比甘油三酯略有降低的趋势。如以下表 2 中所示,在非空腹动物中,如在研究结束时测量的, VFC 治疗的动物和纤维素治疗的动物之间的血清甘油三酯相似,发现菊粉治疗的动物具有与另两个组相比显著更低的甘油三酯水平。

[0180] 在 8 周研究结束时,在最后的 OGTT 之前从喂食的动物取得基线样品,测量血浆胆固醇。如以下表 2 中所示,动物表现出高胆固醇血症,且与喂食纤维素和菊粉的组相比,VFC 使胆固醇含量显著地降低,降低超过一半。

[0181] 目标器官影响:肝、胰腺和肾的组织学得分

[0182] 尽管上述的葡萄糖和胰岛素的数据表明 VFC 治疗的改善的胰岛素敏感性和血糖控制,仍进行了组织分析以评价 VFC 改善如肾等器官的损害程度的作用。已知肾脏对于糖尿病性肾病特别敏感,糖尿病性肾病可能与高血糖和过度糖化有关。对于所有测量的组织,对损害程度进行评价,作为 VFC 治疗延迟糖尿病进展和 / 或改善与糖尿病有关症状的能力的指示。

[0183] 肾

[0184] 评价所有用 H&E 染色的糖尿病肾组织的载玻片的与在 ZDF 中通常观察到的形态变化有关的形态变化,包括小管扩张的增加和小管退化 / 再生的增加。在喂食包含 VFC 的膳食的 Zucker 糖尿病大鼠 (ZDF) 和喂食包含菊粉或纤维素的食物的 ZDF 大鼠之间有几个肾病理学参数表现出差异。

[0185] 图 5A 图示阐明了在对 Zucker 糖尿病大鼠喂食包含 VFC、纤维素或菊粉的膳食 8 周后对肾小管扩张的影响,以 0-5 的组织学得分为基准,其中 5 分是最严重的。如图 5A 所示,对小管扩张进行打分,在 VFC 治疗的 ZDF 大鼠中没有观察到。相反,在喂食纤维素和菊粉的 ZDF 大鼠中发现存在有小管扩张。图 5A 中所示的得分表明了喂食 VFC 和纤维素或菊粉的组之间治疗效果的显著性 ( $p < 0.001$ , 由符号 “\*” 表示)。在喂食菊粉和纤维素的动物之间没有观察到小管扩张数量的显著性差异。

[0186] 图 5B 图示阐明了在 8 周后包含 VFC、纤维素或菊粉的膳食对 Zucker 糖尿病大鼠的肾小管退化 / 再生的影响,以 0-5 的组织学得分为基准,其中 5 分是最严重的。如图 5B 所示,喂食包含 VFC 的膳食的大鼠表现出平均小管退化 / 再生得分为 0.1, 该得分包括在该组的一只大鼠中的 1 分 (最低的严重程度) 和在另 9 只大鼠中的 0 分 (在正常限度内)。相反,喂食包含纤维素或菊粉的膳食的大鼠的平均得分为 1.0, 如图 5B 中进一步所示的。VFC 对降低小管退化 / 再生的严重程度的治疗效果是显著的 ( $p < 0.01$ , 由符号 “\*\*” 表示), 在喂食 VFC 和喂食纤维素或菊粉的组之间观察到显著性差异。在纤维素或菊粉之间没有观察到显著性差异。

[0187] 图 5C 图示阐明了包含 VFC、纤维素或菊粉的膳食在 8 周后对对 Zucker 糖尿病大鼠的肾脏肾小球系膜膨胀的影响,以 0-5 的组织学得分为基准,其中 5 分是最严重的。如图 5C 中所示,在接受包含 VFC 的膳食的组表现出与包含纤维素或菊粉的膳食相比更低的肾小球系膜膨胀得分。尽管肾小球系膜膨胀得分达到总体的统计显著性 ( $p < 0.05$ ), 但在事后检验中表现出显著性差异的唯一的一对试验组是喂食包含 VFC 和包含菊粉的膳食的组 ( $p < 0.05$ , 由符号 “\*” 表示), 与纤维素膳食相比有强的降低倾向。

[0188] 胰腺

[0189] 图 6 图示阐明了在为期 8 周的研究结束时喂食 VFC、纤维素或菊粉膳食的 Zucker

糖尿病大鼠中的用抗大鼠胰岛素抗体测定的胰岛胰岛素免疫活性区域的百分比。如图 6 所示,与喂食包含纤维素或菊粉的膳食的大鼠相比,喂食包含 VFC 的膳食的大鼠保持更高的胰岛素免疫反应性面积占总胰岛面积的百分比(即,更大的胰  $\beta$ -细胞质量),如通过胰岛素免疫组织化学测量的。ANOVA 分析表现出显著的治疗作用 ( $p < 0.0001$ , 由符号“\*\*\*”表示),而事后检验表现出喂食包含 VFC 和纤维素的膳食的大鼠之间的差异 ( $p < 0.001$ )。在喂食包含菊粉和包含纤维素的膳食的动物之间没有差异。重要的是,这些数据与表现出更低的空腹血清胰岛素浓度(图 2B)和更大的胰岛素敏感性(图 3B)的数据结合,表明喂食包含 VFC 的膳食的 Zucker 糖尿病大鼠保持与喂食包含纤维素或菊粉的膳食的大鼠相比显著更大的胰岛素分泌保存能力。

[0190] 图 7A 图示阐明了在为期 8 周的研究结束时喂食 VFC、纤维素或菊粉膳食的 Zucker 糖尿病大鼠中的胰岛的单核炎性细胞浸润的组织学得分,以 0-5 的组织学得分为基准,其中 5 分是最严重的。如图 7A 占所示,基于岛单核细胞浸润的存在的得分观察到的治疗效果之间没有差异。

[0191] 图 7B 图示阐明了在为期 8 周的研究结束时喂食 VFC、纤维素或菊粉膳食的 Zucker 糖尿病大鼠中的胰岛细胞退化的组织学得分,以 0-5 的组织学得分为基准,其中 5 分是最严重的。如图 7B 所示,在喂食包含 VFC 的膳食的大鼠中不存在胰岛细胞退化的得分,而在喂食含纤维素或菊粉的膳食的大鼠中胰岛细胞退化得分倾向于较高。然而这些差异没有达到统计显著性。

[0192] 图 7C 图示阐明了在为期 8 周的研究结束时喂食 VFC、纤维素或菊粉膳食的 Zucker 糖尿病大鼠中的胰岛纤维化的数量的组织学得分,以 0-5 的组织学得分为基准,其中 5 分是最严重的。如图 7C 所示,在喂食包含 VFC 的膳食的大鼠中胰岛纤维化的得分倾向于比喂食包含纤维素或菊粉的膳食的大鼠更低,然而这些差异没有达到统计显著性。在喂食包含 VFC 的膳食的大鼠中,出血或血铁黄素的存在得分表现出较低得分的倾向,但是结果不是统计显著的(数据未示出)。

[0193] 肝脏

[0194] 图 8A 图示阐明了在对 Zucker 糖尿病大鼠喂食包含 VFC、纤维素或菊粉的膳食 8 周后对肝性脂肪变性的影响,是通过还原的苏丹黑染色来测量的,以 0-5 的组织学得分为基准,其中 5 分是最严重的。如图 8A 所示,喂食包含 VFC 的膳食的大鼠表现出比喂食包含纤维素或菊粉的膳食的大鼠更少的肝性脂肪变性(如通过苏丹黑染色测量的)。基于 0(在正常限度内)到 5(严重)的标准,喂食包含 VFC 的膳食的大鼠的平均得分为 3.4。而喂食包含纤维素的膳食的大鼠的得分为 4.6,而喂食包含菊粉的膳食的大鼠的得分为 4.1。喂食 VFC 的大鼠的组与喂食包含纤维素和菊粉的膳食的大鼠的组之间差异显著 ( $p < 0.01$ , 由符号“\*\*”表示)。喂食包含菊粉和包含纤维素的膳食的大鼠之间没有观察到显著性差异。

[0195] 喂食包含 VFC 的膳食的大鼠还表现出比喂食包含纤维素或菊粉的膳食的大鼠更少的肝细胞微囊泡空泡形成。图 8B 图示阐明了包含 VFC、纤维素或菊粉的膳食在 8 周后对对 Zucker 糖尿病大鼠的肝微囊泡空泡形成的影响,以 0-5 的组织学得分为基准,其中 5 分是最严重的。如图 8B 所示,喂食包含纤维素或菊粉的膳食的所有大鼠都表现出被评价为严重的微囊泡空泡形成得分(平均分 4.6,高)。相反,喂食包含 VFC 的膳食的大鼠的平均得分为 3.2(轻)。Dunnets' MCT 表明在喂食包含 VFC 的膳食的组与喂食包含纤维素的膳食的组之

间有显著性差异 ( $p < 0.001$  由符号“\*\*”表示),但是在喂食包含菊粉和纤维素的膳食的组之间没有显著性差异。

[0196] 图 8C 图示阐明了包含 VFC、纤维素或菊粉的膳食在 8 周后对对 Zucker 糖尿病大鼠的肝大囊泡空泡形成的影响,以 0-5 的组织学得分为基准,其中 5 分是最严重的。如图 8C 所示,在所有治疗组中,大囊泡肝细胞空泡形成通常不如微囊泡肝细胞空泡形成显著,如较低的严重程度得分所反映的(比较图 8B 到 8C)。尽管喂食包含菊粉的膳食的大鼠表现出与喂食包含纤维素的膳食的大鼠相比较低的空泡形成,但这种差异不是统计显著的。在喂食包含 VFC 的膳食的组与喂食包含纤维素和菊粉的膳食的组之间有差异显著 ( $p < 0.001$ , 由符号“\*\*\*”表示)。在喂食包含菊粉和包含纤维素的膳食的组之间没有观察到显著性差异。在接受包含 VFC 的膳食的大鼠中还表现出囊性肝细胞退化和纤维化较低严重程度得分的倾向,但是并没有达到统计显著性(数据未示出)。

[0197] 以下表 2 示出了肝损伤的几个临床化学指标,用于显示 VFC 的真实的治疗效果。通过肝细胞性损伤,甚至在细胞膜完整的情况下,肝酶中的丙氨酸转氨酶 (ALT) 和天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 被释放到血液中。没有明显的肝脏疾病范畴内的 Sprague-Dawley 大鼠的 ALT 水平为 22-48IU/L (IDEXX 参考数据)。表 2 中的数据表明了 ALT 和 AST 水平方面的总体治疗效果。事后检验表明在接受包含 VFC 的膳食的大鼠中血液 ALT 水平低于接受包含纤维素或菊粉的膳食的大鼠 ( $p < 0.05$ ),且接受包含菊粉的膳食的大鼠的血液 ALT 水平显著高于接受包含纤维素的膳食的大鼠 ( $p < 0.05$ )。

[0198] 血液 AST 显示了类似的结果模式,如表 2 中进一步示出的。没有明显的肝脏疾病范畴内的 Sprague-Dawley 的 AST 水平为 33-53IU/L (IDEXX 参考数据)。接受包含 VFC 的膳食的大鼠的平均值为 170IU/L,接受包含纤维素的膳食的大鼠的平均值为 870IU/L,而接受包含菊粉的膳食的大鼠的平均值为 1010IU/L。总体治疗效果是统计显著的 ( $p < 0.0001$ ),尽管喂食包含菊粉和纤维素的膳食的组之间的差异不是显著的,但喂食包含 VFC 的膳食和喂食包含纤维素的膳食的组之间的差异是显著的 ( $p < 0.001$ , Dunnett's MCT)。

[0199] 喂食包含 VFC 的膳食的大鼠的血清碱性磷酸酶水平低于喂食包含纤维素或菊粉的膳食的大鼠,如表 2 中所示的。没有已知肝脏疾病或骨疾病的 Sprague-Dawley 大鼠中的这一参数的正常范围是 0-2671 U/L (IDEXX 参考数据)。如表 2 所示,喂食包含 VFC 的膳食的大鼠的平均血清碱性磷酸酶水平在这一正常范围之内,而喂食包含纤维素或菊粉的膳食的大鼠的平均值都在正常范围以外。喂食包含 VFC 的膳食的组与喂食包含纤维素或菊粉的组之间的碱性磷酸酶的降低是显著的 ( $p < 0.001$ )。VFC 实现的较低的血清碱性磷酸酶水平表明了对胆汁郁积的保护作用,而 ALT 和 AST 的升高表示肝细胞性损伤 (D. S. Pratt 等, Harrison's Principles of Internal Medicine 15th Edition, pp. 1711-1715 (2001)。相反地,球蛋白和胆红素由肝脏清除,其水平的上升反映了肝功能受损。

[0200] Sprague-Dawley 大鼠的球蛋白的正常范围是 2.8-4.5g/dL (IDEXX 参考数据)。如表 2 所示,接受包含 VFC 的膳食的大鼠的球蛋白浓度平均为 3.4g/dL,而接受包含纤维素和菊粉的膳食的大鼠的平均值分别为 4.0 和 3.9g/dL。纤维类型的影响是显著的 ( $p < 0.001$ ),在喂食包含 VFC 的食物和喂食包含纤维素的食物的组之间有显著性差异 ( $p < 0.001$ , Dunnett's MCT),但是喂食包含菊粉和纤维素的膳食的组之间没有显著性差异。类似地,喂食包含 VFC 的膳食的大鼠表现出平均值为 0.13mg/dL 的总胆红素(直接胆红素

和间接胆红素),如表 2 所示,而喂食包含纤维素和菊粉的膳食的大鼠的平均值分别为 0.19 和 0.18mg/dL。Sprague-Dawley 大鼠的参考范围是 0-0.4mg/dL (IDEXX 参考数据)。治疗效果是统计显著的(单因素方差分析,  $F(2, 28)=4.93, p<0.05$ ),喂食包含 VFC 的膳食的组之间是显著性差异的 ( $p<0.05$ , Dunnett's MCT),但是喂食包含菊粉和纤维素的膳食的组之间没有显著性差异。尽管所有组的球蛋白和胆红素水平都在正常限度之内,但是喂食包含 VFC 的膳食的大鼠表现出两种被分析物的浓度相对于其它组都显著降低 ( $p<0.001$ ),表明改善的肝功能。

[0201] Sprague-Dawley 大鼠的胆红素的正常范围是 0-0.4mg/dL (IDEXX 参考数据)。在治疗组之间没有观察到胆红素的显著性差异。在所有治疗组中,白蛋白(由肝脏合成)结果是类似的。

[0202] 表 2:在非空腹 Zucker 糖尿病大鼠中的研究终止时取得的关键分析物的血浆化学(最终的非空腹 OGTT 的基线测量)

[0203]

膳食	VFC (PGX®)	纤维素	菊粉
胆固醇 (mg/dL)	179.6 ± 6.4***	383.7 ± 23.2	350.8 ± 21.3
天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) (IU/L)	165.9 ± 24.5***	871.4 ± 109.3	1010.1 ± 169.1
丙氨酸转氨酶 (ALT) (IU/L)	93.3 ± 13.3*	299.4 ± 30.9	472.7 ± 77.7*
胆红素 (mg/dL)	0.1 ± 0.0*	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0
碱性磷酸酶 (IU/L)	134.2 ± 7.7***	327.7 ± 46.8	302.3 ± 30.3
球蛋白 (g/L)	3.4 ± 0.1***	4.0 ± 0.1	3.9 ± 0.1
白蛋白 (g/dL)	3.1 ± 0.1	2.9 ± 0.1	2.8 ± 0.1
血液尿素氮 (mg/dL)	10.4 ± 0.6	13.4 ± 0.7	17.0 ± 2.6
甘油三酯 (mg/dL)	276.4 ± 24.6	276.7 ± 43.5	352.6 ± 67.6

[0204] \* 与纤维素组的差异显著 ( $p<0.05$ )

[0205] \*\* 与纤维素组的差异显著 ( $p<0.01$ )

[0206] \*\*\* 与纤维素组的差异显著 ( $p<0.001$ )

[0207] 结果的讨论:

[0208] 在 Zucker 糖尿病大鼠模型中的这项研究证明了包含 VFC 的膳食显著地改善血糖控制,减少肾损伤,保存胰,改善胰岛素敏感性,并由此降低体内的总葡萄糖负荷。另外,在研究过程中观察到,与其它富含纤维的膳食相比,喂食包含 VFC 的膳食的大鼠增重率有大约 10% 的降低。这可能部分是由于研究过程中观察到的食物摄入减少,尽管食物摄入减少仅在研究的前三周是显著的。如在实施例 4 中进一步观察到的, VFC 还增强 GLP-1 和诱导饱腹感的 PYY 的分泌。

[0209] 用于该研究的 VFC 颗粒的量是向大鼠食物加入的 5%VFC。如图 1A 和 1B 中所示, 喂食 VFC 的大鼠的每天食物消耗量平均为大约 22g/天, 其中在 22 克食物中包含 1.1g VFC。假定 Zucker 大鼠的平均体重为约 300g(参见图 1A), 则该研究中的每千克剂量是大约 3.66g/d/kg。假定人为约 60kg, 则这剂量相当于约 219.6g/天/人。使用基于体表面积到体积的从 0.1-0.15 的大鼠剂量到人的剂量转化, 如 Reagan-Shaw 等, FASEB Journal 22 : 659-661(2007) 所述的, 这可以转化为约 22 克到约 33 克 VFC 每天(对于 60kg 的人)或约 366mg/kg/天到约 550mg/kg/天的剂量范围。

[0210] 在该研究中, 空腹 Zucker 糖尿病大鼠(即, 在无食物供应大约 16 小时之后在早晨检验的动物)没有表现出大幅升高的葡萄糖水平, 可能是由于由高胰岛素血症提供的充分的补偿, 所述高胰岛素血症是由于该疾病正开始变得明显而观察到的。在检验之前空腹 16 小时的动物中, 在所有膳食组, 与 VFC 治疗组相比, 纤维素和菊粉治疗组的胰岛素水平更高, 这与 HOMA 和 CISI 得分相结合, 是菊粉和纤维素治疗组具有比 VFC 治疗组更大的外周胰岛素抵抗的指示。因此, 似乎是 VFC 不需要出现在内脏中来改善胰岛素敏感性。尽管不希望束缚于任何特定的理论, 在检验之前空腹 16 小时的用 VFC 治疗的动物中观察到的改善的胰岛素敏感性可能是由于高血糖素原表达的增加(S. P. Massimino 等, J. Nutr. 128 : 1786-1793(1998); R. A. Reimer 等, Endocrinology 137 : 3948-3956(1996)); 或者可能是由于肌肉 GLUT-4 的向上调节(Y. J. Song 等, Clin. Exp. Pharm. Physiol. 27 : 41-45(2000))。

[0211] 因为在检验之前空腹 16 小时的动物只是轻微的高血糖, 从参与研究三周开始, 在非空腹状态(即, 在检验之前持续供应食物)下测量大鼠的血浆葡萄糖。根据测定, 在以非空腹状态检验的动物中, 纤维素和菊粉治疗组的动物是高血糖的, 而 VFC 治疗组的动物的葡萄糖水平降低到接近非糖尿病的水平。非空腹状态的胰岛素水平只在研究结束时测量, 发现 VFC 治疗的动物的胰岛素显著降低, 且 HOMA 和 CISI 得分也显示 VFC 治疗的动物与其它组相比具有改善的胰岛素敏感性。

[0212] 因此, 考虑到 VFC 治疗的动物的空腹和非空腹状态的血清胰岛素都是显著降低的, 且在非空腹状态下检验的 VFC 治疗的动物的血糖显著降低, 似乎是 Zucker 糖尿病大鼠的 VFC 治疗对于延迟糖尿病的早期进展是有效的。

[0213] 除了血糖控制方面的改善之外, 测得到 VFC 治疗的动物还具有与纤维素和菊粉治疗的动物相比减少的器官损伤。糖尿病性肾病是糖尿病的一种临床重要的后遗症, 特别是源于代谢障碍和血液动力学更改的肾小球基底膜的变厚和系膜和小管的膨胀以及小管退化(H. R. Brady 和 B. M. Brenner : Pathogenesis of Glomerular Injury, Harrison's Principles of Internal Medicine 15th ed., E. Braunwald 等, pp. 1572-1580(2001))。有趣的是, 在这项研究中测得到在患有糖尿病早期发病的较年轻的 Zucker 糖尿病大鼠中非常快速地发生显著的器官损伤, 尽管糖尿病是相对轻的。重要的是, 观察到 VFC 治疗的动物在 8 周研究的末期呈现与菊粉或纤维素治疗组相比显著更大的胰  $\beta$  细胞密度。这个数据表明, 为期 8 周喂食包含 VFC 的膳食的 Zucker 糖尿病大鼠保持显著更大的胰岛素分泌保存能力。需要指出的是, 对于提高胰岛素分泌素 GLP-1 的 DPP IV 抑制剂, 已经观察到胰  $\beta$  细胞的保存, 且在使用 DPP IV 抑制剂的一些研究中, II 型糖尿病模型中的胰岛素高于对照, 特别是饭后的胰岛素水平(A. Viljanen 等, J. Clin. Endocrinol. Metab. 94 : 50-55(2009))。

[0214] 在用于这项研究的 Zucker 糖尿病大鼠模型中, 非空腹葡萄糖水平似乎足以引起

肾损伤。测得到在 VFC 治疗组中的肾损伤更少,特别是在肾小球系膜膨胀方面。正常喂养期间的增强的血糖控制和随后减少的组织糖化可能起到减少肾损伤的主要因素的作用。有趣且出乎意料的是,组织学显示 VFC 显著地保护肾免于糖化损伤,表明了总葡萄糖负荷的降低,以及由此的糖化减少。FDA 考虑将减少的糖化作为抗糖尿病作用的主要标志,因为仅血糖的降低不再被认为是药物批准的充分条件。

[0215] 对于 VFC 治疗对血清和肝的脂质分布的影响方面,在 VFC 治疗组中血浆胆固醇显著降低。对血清甘油三酯水平的影响则是更易变的。然而,VFC 治疗组的肝脂肪水平(脂肪变性)和肝脏测量结果(例如血清胆红素、ALT 和 AST)显著降低,表明 VFC 治疗组的肝脏损伤减少。此外,基于组织学分析,还测得到 VFC 治疗的动物具有降低的肝细胞性损伤指数和降低的碱性磷酸酶血清水平,这可以表明 VFC 治疗的动物具有减少的胆汁郁积以及脂肪肝(代谢综合征的一种常见并发症)的减少(A. Viljanen 等, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94 : 50-55(2009))。

[0216] 因此,在 ZDF 中在血糖控制、肾损伤的减少以及胰  $\beta$ -细胞的保存方面证明了应用 VFC 的效力。如在这个实施例中所证明的,VFC 治疗的大鼠具有较少的肾损伤,特别是肾小球系膜膨胀。增强的血糖控制和随后减少的组织糖化可能起到减少肾损伤的主要因素的作用。因此,VFC 可以用作膳食添加剂来帮助改善代谢综合征的早期的发展和进展,包括能够延缓葡萄糖诱导的器官损伤、肝脏的脂质积累,和抑制胰  $\beta$ -细胞损失。

[0217] 实施例 2

[0218] 这个实施例描述了在高蔗糖膳食诱导的肥胖症大鼠模型中进行的用以确定包括颗粒化的粘性纤维掺合物(VFC 颗粒)(也称为纤维复合物 PolyGlycoplex (PGX®))的膳食纤维组合物对胰调节障碍、异常脂血症和肥胖症的作用。

[0219] 基本原理:如实施例 1 中所述,新的水溶性纤维复合物 VFC 颗粒,也称为 **PolyGlycoplex® (PGX®)**(由魔芋甘露聚糖、黄原胶和藻酸盐制成,形成具有高的水保持性能和凝胶形成性能的高粘性聚糖复合物),降低 Zucker 糖尿病大鼠的体重并提高其胰岛素敏感性。然而,在 Zucker 糖尿病大鼠中观察到的 VFC 颗粒的作用相对于血清甘油三酯(TAG)而言是易变的。已经在其它研究中观察到各种纤维降低血清 TAG 水平的变化性,其可以涉及纤维类型和特定的动物模型(W. U. Jie 等, *Biomed. Environ. Sci.* 10 :27-37(1997); A. Sandberg 等, *Am. J. Clin. Nutr.* 60 :751-756(1994); R. Wood 等, *Metab. Clin. Exp.* 56 : 58-67(2007); 和 N. M. Delzenne 等, *J. Nutr.* 129 :1467S-1470S(1999))。例如, Mao-Yu 等的研究表明,由不易消化的纤维引起的 TAG 降低取决于 TAG 升高的严重程度和随时间的稳定性(Z. Mao-Yu 等, *Biomed. Environ. Sci.* 3 :99-105(1990))。

[0220] 进行这个实施例中所述的研究来确定颗粒化的 **VFC (PGX®)**对喂食蔗糖的雄性 Sprague-Dawley 大鼠(是膳食诱导肥胖症(高蔗糖 65%wt/wt)的模型,已知其引起体重增加和肝脏和血清 TAG 水平一致升高,特别是在长期给予的情况下,其近似模拟人 II 型糖尿病)的体重增加、血清甘油三酯(TAG)和肝性脂肪变性的影响(A. M. Gadja 等, *An. LabNews* 13 :1-7(2007); M. Hafidi 等, *Clin. Exp. Hyperten.* 28 :669-681(2006); 和 P. Rozan 等, *Br. J. Nutr.* 98 :1-8(2008))。这个实施例中所述的研究进行 43 周,以捕捉大鼠生命周期的合理部分和使作为这个模型的特征的血清 TAG 水平的一致性升高最大化。

[0221] 方法:

[0222] 纤维增强的大鼠食物

[0223] 将粘性纤维复合物 (VFC) (魔芋 / 黄原胶 / 藻酸盐 (70:13:17) 颗粒 (即, 通过造粒加工纤维掺合物以形成复合物, 商业上称为 **PGX®**) 并入到基本的大鼠食物 (D11725 : Research Diets, New Brunswick, New Jersey) 中。用于这项研究的替代膳食包含以下表 3 中所示的其它纤维形式。选择纤维素为不溶性的基础参考纤维, 其是不可发酵的且被认为是惰性参考化合物 (J. W. Anderson 等, J. Nutr. 124 :78-83(1994))。

[0224] 表 3 : 包含 VFB 或纤维素的三种膳食的组成 (以重量计的成分百分比)

	粘性纤维复合物 (VFC) (魔芋 / 黄原胶 / 藻酸盐 (70:13:17)) PGX® 颗粒	不溶性纤维 (纤维素)
研究膳食配方 #	D08012504	D08012507
酪蛋白	20%	20%
蛋氨酸	0.3%	0.3%
玉米淀粉	50%	50%
麦芽糖糊精	15%	15%
纤维*	5% VFC (PGX®)	5% 纤维素
玉米油	5%	5%
盐 / 矿物质混合物	3.5%	3.5%
维生素混合物	1%	1%
重酒石酸氢胆碱	0.2%	0.2%
染料	0.1%	0.1%

[0226] \*VFC 纤维颗粒在商业上称为 **PolyGlycopleX® (PGX®)** (InnovoBiologic Inc. Calgary, AB, Canada)。

[0227] 动物模型 : 选择雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠是因为蔗糖喂食的大鼠被认为是优异的具有正常遗传背景的高甘油三酯血症模型 (A. M. Gadja 等, An Lab News 13:1-7(2007))。

[0228] 研究设计 : 从 Charles River (Kingston NY) 获得六周龄的雄性 SD 大鼠 30 只。将动物在悬挂的丝网笼中单独饲养, 满足最新版 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHEW (NIH) 推荐的规格。动物房的温度和湿度经过控制, 有 12- 小时照明 / 黑暗循环, 并保持清洁和没有寄生虫。在试验之前使动物适应四天。

[0229] 水 : 过滤的自来水, 通过自动的水分配系统无限制供给。

[0230] 食物 : 在适应之后, 将大鼠随机指定为每组 n=10 的两组之一, 喂食 5% 的纤维素 (wt/wt) 或 5% 的 VFB (wt/wt), 两组的膳食都添加蔗糖 65% (wt/wt)。膳食是近似等能的, 纤维素膳食是 3.90 kcal/g, VFC 膳食是 3.98 kcal/g, 总量是大约 3902 膳食 kcal。对大鼠无限

制喂食含纤维素（开始体重  $214.7 \pm 2.6\text{g}$ ）或 VFB（开始体重  $220.8 \pm 3.5\text{g}$ ）的高蔗糖膳食总共 43 周。

[0231] 研究测量：在整个研究过程中跟踪食物消耗量（每天）、体重（每周），且每周收集血样测量血清甘油三酯（TAG）（通过 IDEXX 分析，NorthGrafton, MA）、血糖（通过 Acensia Elite 糖度计）和血清胰岛素（AniLytics, Gaithersburg, MD）。研究以最终的用于测量血红蛋白糖化和血液尿素氮的血液分析结束。然后如下进行有限的尸检。将一叶肝脏速冻，用于使用苏丹黑组织化学法分析脂质含量。将一叶肝脏在固定后用苏木精和曙红染色。

[0232] 统计方法：在整个研究过程中使用重复测量 ANOVA 分析体重增加的统计学差异，单因素 ANOVA 分析体重增加差异。使用 Bonferroni 校正控制多重比较的  $\alpha$  误差率。使用用于非参数数据的 Kruskal-Wallis 检验测量组织学得分。

[0233] 结果：

[0234] 图 9 图示阐明了颗粒化的 VFC (PGX®) 或纤维素膳食在 43 周研究过程中对喂食蔗糖的 Sprague-Dawley 大鼠的体重增加和血清甘油三酯 (TAG) 的影响（“\*”符号表示  $p < 0.05$ ；“\*\*”符号表示  $p < 0.01$ ；“\*\*\*”符号表示  $p < 0.001$ ）。在喂食 VFC 的组 ( $215 \pm 3\text{g}$ ) 和喂食纤维素的组 ( $221 \pm 3\text{g}$ ) 之间的初始体重没有不同。如图 9 所示，两组都由于富含蔗糖的膳食出现随时间的体重增加，然而，与喂食纤维素的组相比，在喂食 VFC 的组中从研究开始直到第 22 周的体重增加显著衰减 ( $p < 0.05$ )。重复测量表明了对体重增加的显著的治疗效果 ( $p = 0.04$ )，喂食 VFC 的大鼠表现出减少的体重增加。尽管两组之间的最终体重没有显著性差异 ( $p = 0.20$ ，VFC 组的  $660 \pm 22$  对纤维素组的  $645 \pm 26\text{g}$ )，VFC 大鼠在研究结束时保持体重低 7%。喂食 VFC 的大鼠的食物消耗量与喂食纤维素的大鼠相似（数据未示出）。

[0235] 如图 9 中进一步所示的，血清 TAG 水平在研究的早期部分是稳定的，但是在喂食纤维素的组中随时间升高，直到 43 周研究结束。相反，喂食 VFC 的大鼠表现出与喂食纤维素的组显著更低的血清 TAG 水平 ( $p < 0.01$ )。喂食 VFC 的组的基线 TAG 水平并没有显著地不同于喂食纤维素的组的基线 TAG 水平。

[0236] 喂食包含 VFC 的膳食的大鼠表现出比喂食纤维素膳食的大鼠更少的肝性脂肪变性（如通过苏丹黑染色测量的）。通过用苏丹黑染色肝脏组织切片测定脂质含量，对载玻片进行评价并根据苏丹黑阳性泡的存在以 0 到 5 的比例半定量分级，5 分是最严重的。纤维素治疗组的严重程度得分是  $3.9 \pm 0.3$ ，而 VFC 治疗组是  $2.7 \pm 0.4$ ，结果是显著不同的。在喂食 VFC 的大鼠中还观察到与喂食纤维素的大鼠相比强的肝细胞性损伤减少的趋势，尽管差异不是统计显著的（大囊泡空泡形成  $p < 0.07$ ，微囊泡空泡形成  $p < 0.11$ ，数据未示出）。

[0237] 在研究过程中每周监控血糖和胰岛素水平，结果没有改变，对于这种动物模型来说符合预期（A. M. Gadjia 等，An. Lab News 13 :1-7 (2007)）。

[0238] 讨论：

[0239] 正如对于这种膳食诱导的肥胖症模型所预期的，喂食蔗糖的 Sprague-Dawley (SD) 大鼠随时间迅速地体重增加，直到大约 18-25 周，在那以后体重稳定为较慢的增长率。如图 9 所示，在快速体重生长期过程中，与纤维素相比，VFC 颗粒显著地减少体重改变，在研究的随后部分（即，更大的大鼠年龄）的较慢生长期过程中观察到较小的减少。如图 9 中进一步示出的，在较大龄大鼠中的血浆 TAG 只增加到超过基线，且 VFC 显著地缓和 TAG 的这种升高。与这一数据一致，在喂食 VFC 的动物中通过组织形态测定术测量的肝脏脂肪变性与喂

膳食纤维的动物相比显著减少。

[0240] 认为摄食不易消化的纤维的受试者的体重减轻涉及以下因素中的一个或多个：食物摄入减少、饱腹感激素响应改变、纤维引起胃迟缓和 / 或养分吸附导致的养分吸收减少（参见 N. C. Howarth 等, *Nutr. Rev.* 59 :163-169(2001) ; A. Sandberg 等, *Am. J. Clin. Nutr.* 60 :751-756(1994) ; G. Grunberger 等, *Diabet. Metab. Res. Rev.* 23 :56-62(2006) ; 和 J. R. Paxman 等, *Nutr. Res.* 51 :501-505(2008)）。有意思指出的是,在本研究中,几乎没有观察到食物消耗量的减少,因此这个因素可能对于喂食 VFC 的动物中观察到的体重减轻没有贡献。尽管不希望束缚于任何特定的理论,有可能是胃排空减慢和进食的食物的营养吸收减少引起体重减轻,这可能是由于胰高血糖素样蛋白 (GLP-1) 的分泌增加 (N. N. Kok 等, *J. Nutr.* 128 :1099-1103(1998))。

[0241] 肝脏或血浆 TAG 的降低已经是许多膳食纤维研究的主题,且结果差异显著 (W. U. Jie 等, *Biomed. Environ. Sci.* 10 :27-37(1997) ; A. Sandberg 等, *Am. J. Clin. Nutr.* 60 :751-756(1994) ; R. Wood 等, *Metab. Clin. Exp.* 56 :58-67(2007) ; 和 N. M. Delzenne 等, *J. Nutr.* 129 :1467S-1470S(1999) ; P. Rozan 等, *Br. J. Nutr.* 98 :1-8(2008)）。并非所有研究表明 TAG 吸收显著减少,仅观察到纤维类型之间的一些差异。例如,Delzenne 和 Kok 的研究表明,低聚果糖通过减少喂食果糖的大鼠的脂肪形成而减少肝性脂肪变性 (N. M. Delzenne 等, *J. Nutr.* 129 :1467S-1470S(1999))。类似地, Kok 等建议,由低聚果糖纤维诱导的 GLP-1 分泌可能还负责脂肪形成减少和脂肪动员 (N. N. Kok 等, *J. Nutr.* 128 :1099-1103(1998))。尽管不希望束缚于任何特定的理论,有可能是脂肪形成减少和脂肪吸收减少二者在本研究的喂食 VFC 的动物中观察到的 TAG 降低起作用。营养吸收减少解释了观察到的体重增加减少而食物消耗量没有减少。

[0242] 总之,本研究证明了 VFC 颗粒显著地降低喂食蔗糖的 Sprague-Dawley (SD) 大鼠模型的血清 TAG,目前的药物在这种降低方面不是非常有效。肝脏脂肪变性的减少与血清 TAG 的减少平行,且这种性能使得 VFC 颗粒对于治疗患有高脂血症以及包括体重减轻在内的代谢综合征的其它方面的患者而言是有用的食品添加剂。

[0243] 实施例 3

[0244] 这个实施例描述了在超重和肥胖的成年人类受试者中的研究,显示包括颗粒化的粘性纤维复合物 (VFC 颗粒) (也称为纤维复合物 **PolyGlycoPlex (PGX®)**) 的膳食纤维组合物对短期体重减轻和相关危险因素的影响

[0245] 基本原理:根据由世界卫生组织公布的新近的数据,肥胖症已经达到全球流行的比例,超过十亿超重成人患有这种慢性病症 ([www.who.int](http://www.who.int), accessed 3/15/08)。冠状动脉病和中风、胰岛素抵抗、(代谢综合征)、II 型糖尿病、高血压和癌症都是公知的体重超重的医学并发症 (K. Fukioka *Obesity Res* 10 (Supp 12):116S-123S(2002))。另外,新近的流行病学研究证实,成年肥胖症与寿命预期的明显降低相关。这一研究表明,40 岁的男性和女性非吸烟者的寿命由于肥胖症分别平均缩短 7.1 和 5.8 岁 (A. Peeters 等, *Ann. Intern. Med.* 138 :24-32(2003))。考虑到这些后续的危险因素,有许多用于超重 / 肥胖的治疗干预,可以包括手术、药物疗法和改变生活方式例如膳食和锻炼。

[0246] 任何体重控制计划的重要的膳食策略都应包括摄入显著数量的高纤维食物,特别是包含粘性可溶性纤维的食物或食品补充剂 (K. M. Queenan 等, *Nutr. J.* (2007))。据

估计平均每名美国公民每天消耗大约 2.4 克的粘性可溶性纤维——是推荐每天消耗的 5 到 10 克膳食粘性可溶性纤维的量的一半 (T. A. Shamliyan 等, J. Family Practice 55: 761-69 (2006))。

[0247] 由于难以仅通过膳食获得理想量的可溶性纤维,对于能够作为食物成分使用或作为补充剂食用以允许不断地大量摄入可溶性纤维的可溶性纤维浓缩物有明显的需求。颗粒化的 VFC,也称为**PGX® (PolyGlycopleX®)**,是一种新的、高粘性的聚糖复合物,是通过使用称为**EnviroSimplex®**的方法使葡甘露聚糖、黄原胶和藻酸盐反应生产的。得到的聚糖复合物 ( $\alpha$ -D-葡萄糖醛酸- $\alpha$ -D-甘露糖- $\beta$ -D-甘露糖- $\beta$ -D-葡聚糖), ( $\alpha$ -L-古洛糖醛酸- $\beta$ -D-甘露糖醛酸),  $\beta$ -D-葡糖- $\beta$ -D-甘露聚糖, ( $\alpha$ -D-葡萄糖醛酸- $\alpha$ -D-甘露糖- $\beta$ -D-甘露糖- $\beta$ -D-葡萄糖), ( $\alpha$ -L-古洛糖醛酸- $\beta$ -D-甘露糖醛酸),  $\beta$ -D-葡萄糖- $\beta$ -D-甘露聚糖是一种新的实体(如在实施例 5 和 6 者所示的结构分析中显示的),且在目前已知的纤维中具有最高的粘度和水保持能力。

[0248] 这个实施例描述了在超重和肥胖的成年人中进行的为期 14 周的研究,用以考查 VFC 颗粒和适度的生活方式改变对体重减轻、体重指数 (BMI)、以及包括胆固醇、低密度脂蛋白 (LDL) 胆固醇、高密度脂蛋白 (HDL)、甘油三酯、空腹胰岛素、空腹葡萄糖和 2 小时葡萄糖耐量试验在内的心血管代谢危险因素的效力。

[0249] 方法:

[0250] 参与者:总共 29 名定居的成人 (23 名女性;6 名男性,年龄 20 到 65 岁,体重指数 (BMI) 范围为约  $25\text{kg}/\text{m}^2$  到  $36\text{kg}/\text{m}^2$ ) 通过在地方报纸投放的一系列广告而应邀参与。在参与这个计划之前为受试者提供知情同意书。根据 1975 的 Helsinki Declaration 中阐述的伦理标准进行观察分析。

[0251] 人体测量和其它测量:使用标准的医用卷尺对参与者每两周一次评价身高 (cm), 体重 (千克), 和腰-臀测量 (cm)。腰臀测量在一致的解剖学位置进行,在穿着一一次性纸质长袍的受试者的脐上大约 2.2cm 和臀部最大周长处测量。在基线 (开始研究之前) 和其后的每两周使用生物电阻抗检验 (RJA 系统, Michigan, USA) 测定体脂肪百分比。使用阻抗数据的电脑分析以测定体重指数 (BMI) 和体脂肪百分比。

[0252] 膳食和补充:每名志愿者接受医师关于健康饮食、体重减轻和锻炼的全面指导。此外,每两周对该组进行膳食和锻炼方面的咨询会议,持续 14 周。这些演讲的重点不在于卡路里计数,而是主要集中在部分控制和如何遵循和保持低脂肪低血糖指数的膳食。这个计划还包括关于强化总重降低的锻炼的多样性、类型和时间 (例如,强度和心血管有氧训练) 的一般性建议。另外,为受试者提供颗粒化的粘性纤维复合物 (VFC) (魔芋 / 黄原胶 / 藻酸盐 (70:13:17) 颗粒,也称为纤维复合物 PolyGlycopleX (**PGX®**)), 可以将其加入到饮料或食物 (例如,无脂肪酸奶) 中。

[0253] 在每餐前的 5 到 10 分钟随着 500ml 水服用五克的 VFC 颗粒,每天 2-3 次,持续 14 周,日总摄入量为 10 到 15 克颗粒化的 VFC/天。

[0254] 血液收集和实验室生化分析:所有的实验室测量由 British Columbia, Canada 的独立实验室进行。在基线 (开始研究之前),要求受试者在抽血之前空腹十小时,抽血进行以下检验:总胆固醇、甘油三酯、HDL、LDL、葡萄糖、胰岛素和 2 小时胰岛素。还根据实验室确定的标准和程序进行 75 克口服葡萄糖耐量试验。只有出现异常的危险因素的那些受试

者在 14 周使用随后的实验室参数进行再检验。

[0255] 统计分析:使用成对 t 检验进行计算机化统计分析,以便评价治疗前后的几个变量类型,包括身高、体重、BMI、% 体脂肪和各实验室值。对于 p 值 <0.05 的变量认为结果是显著的。

[0256] 结果:

[0257] 体重减轻和其它人体测量:在 14 周的服用 VFC 的过程中,组的体重 ( $-5.79 \pm 3.55\text{kg}$ )、腰围测量值 ( $-12.07 \pm 5.56\text{cm}$ )、% 体脂肪 ( $-2.43 \pm 2.39\%$ ) 和 BMI ( $-2.26 \pm 1.24\text{kg}/\text{m}^2$ ) 都显著降低。全部的结果显示在以下表 4 和 5 中。

[0258] 表 4:组 1:男性和女性合计

[0259]

指标	样本量	第 0 周的平均值 &SD	第 14 周的平均值 &SD	变化 &SD	% 变化
* 腰围	29	$103.58^b \pm 12.78$	$91.51^b \pm 12.95$	$-12.07 \pm 5.56^b$	-11.65
* 臀围	29	$116.30^b \pm 7.67$	$106.83^b \pm 7.44$	$-9.47 \pm 4.15^b$	-8.14
*% 脂肪	29	$40.30 \pm 8.28$	$37.87 \pm 8.88$	$-2.43 \pm 2.39$	-6.02

[0260] \* 相对于第 0 周  $p < 0.05$

[0261] a= 以千克 (kg) 计的体重

[0262] b= 以厘米 (cm) 计的腰围和臀围

[0263] 表 5:所有组合并的 BMI

[0264]

指标	样本量	第 0 周的平均值 &SD	第 14 周的平均值 &SD	变化 &SD	% 变化
* 男性	6	$35.03^c \pm 4.09$	$32.47^c \pm 3.78$	$-2.56^c \pm 1.22$	-7.31
* 女性	23	$33.45^c \pm 7.57$	$31.27^c \pm 8.17$	$-2.18^c \pm 1.26$	-6.52
* 合计	29	$33.78^c \pm 6.96$	$31.52^c \pm 7.43$	$-2.26^c \pm 1.24$	-6.70

[0265] \* 相对于第 0 周  $p < 0.05$

[0266] c= 以  $\text{kg}/\text{m}^2$  计的 BMI

[0267] 类似地,男性和女性都分别显示了检测的体重减轻变量的明显降低,如以下表 6 和表 7 中所示。如以下表 7 所示,男性在 14 周研究结果过程中平均体重减轻  $8.30 \pm 2.79\text{kg}$  (平均 7.43% 的体重减轻)。如以下表 6 所示,女性在 14 周研究结果过程中平均体重减轻  $5.14 \pm 3.49\text{kg}$  (平均 6% 的体重减轻)。

[0268] 表 6:组 1:女性 (n=23)

[0269]

指标	第 0 周的平均值 &SD	第 14 周的平均值 &SD	变化 &SD	% 变化

* 体重	84.29 <sup>a</sup> ±7.85	79.15 <sup>a</sup> ±8.77	-5.14 <sup>a</sup> ±3.49	-6.00
* 腰围	98.98 <sup>b</sup> ±8.99	87.55 <sup>b</sup> ±10.57	-11.43 <sup>b</sup> ±5.71	-12.00
* 臀围	115.19 <sup>b</sup> ±6.73	105.92 <sup>b</sup> ±7.34	-9.27 <sup>b</sup> ±4.29	-8.00
*% 脂肪	43.88±4.52	41.33 <sup>b</sup> ±6.15	-2.55 <sup>b</sup> ±2.63	-6.00

[0270] \* 相对于第 0 周 p<0.05

[0271] a= 以千克 (kg) 计的体重

[0272] b= 以厘米 (cm) 计的腰围和臀围

[0273] 表 7 :组 2 :男性 (n=6)

[0274]

指标	第 0 周的平均值 &SD	第 14 周的平均值 &SD	变化 &SD	% 变化
* 体重	111.81 <sup>a</sup> ±9.18	103.51 <sup>a</sup> ±13.05	-8.30 <sup>a</sup> ±2.79	-7.43
* 腰围	121.13 <sup>b</sup> ±9.65	106.63 <sup>b</sup> ±10.23	-14.50 <sup>b</sup> ±4.59	-12.00
* 臀围	120.57 <sup>b</sup> ±7.62	110.36 <sup>b</sup> ±7.39	-10.21 <sup>b</sup> ±3.63	-8.00
*% 脂肪	26.58±3.01	24.62 <sup>b</sup> ±2.97	-1.97 <sup>b</sup> ±1.15	-7.00

[0275] \* 相对于第 0 周 p<0.05

[0276] a= 以千克 (kg) 计的体重

[0277] b= 以厘米 (cm) 计的腰围和臀围

[0278] 脂质水平 :与研究开始前获得的基线值相比,在服用 VFC 14 周之后,受试者的总胆固醇值平均降低 19.26%(n=17,相对于第 0 周 p<0.05), LDL 胆固醇值平均降低 25.51%(n=16,相对于第 0 周 p<0.05)。如表 8 中所示,还观察到在这项研究中观察到甘油三酯值降低和 HDL 胆固醇值升高的倾向,尽管观察到的差异不是统计显著的。

[0279] 空腹胰岛素和葡萄糖 :在服用 VFC 14 周之后,这项研究的受试者经历了与研究开始前测定的基线测量值相比平均 6.96% 的空腹葡萄糖降低 (n=20,相对于第 0 周 p<0.05)、平均 12.05% 的 2 小时葡萄糖耐量下降 (n=21,相对于第 0 周 p<0.05) 和平均 27.26% 的空腹胰岛素水平降低 (n=17,相对于第 0 周 p<0.05)。

[0280] 表 8 :在使用**VFC (PGX®)**的 14 周试验期间获得的总体实验室数据的概述

[0281]

指标	样本量	第 0 周的平均值& SD	第 14 周的平均值& SD	变化& SD	%变化
*总胆固醇(mmol/L)	17	5.69 ± 1.07	4.60 ± 0.82	-1.09 ± 0.63	-19.26
**甘油三酯 (mmol/L)	17	1.92 ± 0.98	1.52 ± 0.56	-0.40 ± 0.89	-20.97
**HDL (mmol/L)	17	1.48 ± 0.53	1.53 ± 0.77	0.05 ± 0.67	3.33
*LDL (mmol/L)	16	3.40 ± 0.96	2.53 ± 0.64	-0.87 ± 0.56	-25.51
*空腹葡萄糖 (mmol/L)	20	5.75 ± 0.78	5.34 ± 0.49	-0.40 ± 0.65	-6.96
*2 小时葡萄糖 (mmol/L)	21	6.09 ± 2.10	5.35 ± 1.81	-0.73 ± 1.43	-12.05
*空腹胰岛素 (pmol/L)	17	89.41 ± 44.84	65.04 ± 33.21	-24.37 ± 36.29	-27.26
指标	样本量	第 0 周的平均值& SD	第 14 周的平均值& SD	变化& SD	%变化
**2 小时胰岛素 (pmol/L)	17	433.53 ± 270.32	355.76 ± 332.44	-77.76 ± 196.51	-17.94

[0282]

[0283] \* 相对于第 0 周  $p < 0.05$ ; \*\*NS 与基线相比不显著

[0284] 使用自我报告表的效力分析:在研究结束时由参与者完成自我报告表,97.7%的 VFC 使用者记录了产品在控制食物渴望和饥饿两方面都有积极的响应。

[0285] 试验制剂的副作用:VFC 的使用通常得到参与者的良好耐受,有轻微的胃肠 (GI) 症状,占有报告的抱怨的大多数。68%记录了轻的 GI 症状(例如,排气、胃气胀、便秘、便溏)在开始 VFC 的大约三周内消除。32%的参与者发现他们在整个计划过程中有轻的 GI 副作用,但是严重程度不足以使他们停止使用。最近在法国进行的关于 VFC (PGX®) 的耐受性的对照研究,其也证实了这些新近的发现 (I. G. Carabin 等, Nutrition J. 8 :9(2008))。

[0286] 讨论:在这个实施例中描述的医学上监督下的体重减轻研究显示,在为期 14 周的 VFC 颗粒服用以及膳食和身体活动的全面改变对于改变超重和肥胖受试者的心血管代谢危险因素是有益的。总的说来,组的体重 ( $-5.79 \pm 3.55\text{kg}$ )、腰围测量值 ( $-12.07 \pm 5.56\text{cm}$ ) 和体脂肪百分比 ( $-2.43 \pm 2.39\%$ ) 与基线相比有明显降低。此外,这些身体的变化在 14 周的相对段时间跨度内与空腹 LDL ( $-25.51\%$ )、空腹葡萄糖 ( $-6.96\%$ ) 和空腹胰岛素 ( $-27.26\%$ ) 水平平行。

[0287] 需要指出的是,在 14 周的过程中男性表现出的平均体重减轻 ( $-8.30 \pm 2.79\text{kg}$ ) 比女性 ( $-5.14 \pm 3.49\text{kg}$ ) 更多。这一变化可以归因于静止能量消耗的基础性别差异。Dr. Robert Ferraro 等已经表明,在针对年龄、活动和身体结构进行统计校正之后,女性的静止 24 小时能量消耗大约比男性低 5-10%(R. Ferraro 等, *J. Clin. Invest.* 90 : 780-784(1992))。

[0288] VFC 在体重减轻方面的结果 ( $-5.79\text{kg}$ ) 可比得上服用肥胖症治疗药物奥利司他 (**Xenical<sup>®</sup>, Alli<sup>®</sup>**) 的结果。奥利司他是一种减少脂肪吸收的脂肪酶抑制剂 (J. B. Dixon 等, *Aust. Fam. Physician* 35 :576-79(2006))。在一项对照研究中,391 名轻度到中度超重个体在 16 周的时间以 60mg、每天三次的剂量使用药物奥利司他,体重减轻 3.05kg,而安慰剂组为 1.90kg (J. W. Anderson 等, *Ann. Pharmacother.* 40 :1717-23(2006))。

[0289] VFC 使用还引起与轻度到中度肥胖症有关的其它危险因素的降低。总的说来,在 14 周的 VFC 治疗之后观察到总胆固醇水平 ( $-19.26\%$ ;  $-1.09\text{mmol/L}$ ) 和 LDL 胆固醇水平 ( $-25.51\%$ ;  $-0.87\text{mmol/L}$ ) 与基线值相比的显著降低 ( $p < 0.05$ )。VFC 实现的脂质值的降低比得上使用较早的他汀类药物如洛伐他汀 (Mevacor<sup>™</sup>) 的结果。例如,一项研究记录了在洛伐他汀治疗开始的一个月内,胆固醇含量升高患者的总胆固醇和 LDL 胆固醇分别降低 19% 和 27% (W. B. Kannel 等, *Am. J. Cardiol.* 66 :1B-10B(1990))。

[0290] 此外,如实施例 1 和 2 中所述, VFC 的使用不仅降低血脂水平,而且可用于改善早期代谢综合征的发展和进展。内脏肥胖症、血清葡萄糖和胰岛素水平的增加以及高血压和异常脂血症是统称为代谢综合征的一群临床病况 (E. J. Gallagher 等, *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 37 :559-79(2008))。已经有研究表明,患有代谢综合征的患者患有重症冠状动脉病的风险增大 50% (D. E. Mollet 等, *Annu. Rev. Med.* 56 :45-62(2005))。因而,对于这些患病个体而言,体重、空腹胰岛素和葡萄糖的任何降低都有显著的健康利益。

[0291] 在这项为期 14 周的研究中, VFC 使用引起空腹胰岛素水平从  $89.41 \pm 44.84\text{pmol/L}$  到  $65.04 \pm 33.21\text{pmol/L}$  的降低 ( $p < 0.05$ )。空腹胰岛素的降低反映了胰岛素敏感性的改善,且可能部分是由于 GLP-1 活性增加和饭后高血糖降低以及伴随体重减轻发生的胰岛素敏感性改善 (参见 G. Reaven 等, *Recent Prog. Horm. Res.* 59 :207-23(2004))。

[0292] 这些发现与在实施例 1 中所述的 Zucker 糖尿病大鼠研究中获得的结果一致,且提示 VFC 的治疗应用以及生活方式改变对于患有肥胖症和某些心血管代谢危险因素的那些患者有现实利益。与现在用于治疗肥胖症和胆固醇含量升高的其它类型的标准医学干预不同,使用 VFC 涉及最小的副作用。这一有利的安全特征与其治疗效能一起,提示应该将 VFC 作为一线治疗用于超重 / 肥胖、胆固醇含量升高和 / 或胰岛素抵抗的患者。

[0293] 实施例 4

[0294] 这个实施例描述了对表现出与进食脱脂奶粉的对照受试者相比在血浆 PYY 水平升高和在补充粘性纤维复合物 (VFC) 后发生粪便短链脂肪酸 (SCFA) 增加的体重正常的健康成年人进行的研究。

[0295] 基本原理 :

[0296] 有许多的膳食纤维已经表现出具有众多的健康利益,包括增强肠胃饱腹感激素的分泌和改善肠功能 (R. A. Reimer 等, *Endocrinology* 137 :3948-3956(1996) ; Reimer 和 Russell, *Obesity* 16 :40-46(2008) ; P. D. Cani 等, *Br. J. Nutr.* 92 :521-526(2004) ; T. C. Adam

and R. S. Westerer-Plantenga, Br. J. Nutr. 93 :845-851 (2005))。高血糖素样肽-1 (GLP-1) 和肽 YY (PYY) 是涉及减少食物摄入的减食欲肽, 而生长素释放肽作为唯一已知的促进食欲的肽与饥饿有关 (Wren and Bloom, Gastroenterology 132 :2116-2130 (2007))。

[0297] 尽管膳食纤维的这些益处的调节机理尚未完全了解, 短链脂肪酸 (SCFA) 的产生被认为介导这种作用中的一些。SCFA 和主要是乙酸根、丁酸根和丙酸根是通过可发酵的膳食纤维的厌氧发酵在大肠中产生的, 其已经被与饱腹感激素的刺激和血清胆固醇的调节相关联。

[0298] 这项研究的目的是考查健康受试者在食用 **VFC (PGX®)** 或对照 (脱脂奶粉) 21 天之后的肠胃饱腹感激素 GLP-1、PYY 和生长素释放肽的水平以及粪便 SCFA 浓度。

[0299] 方法:

[0300] 受试者: 参与者是健康的、不吸烟的年龄在 18 岁到 55 岁的男性或女性, BMI 在 18.5 到 28.4kg/m<sup>2</sup> 之间 (即, 体重正常)。

[0301] 研究设计: 如下进行随机化的、双盲的、安慰剂对照试验:

[0302] 参与者被随机指定到两个组中:

[0303] 第 1 组 (n=27) 食用试验产品粘性纤维复合物 (VFC) (魔芋 / 黄原胶 / 藻酸盐 (70:13:17)) 颗粒 (即, 通过造粒加工纤维掺合物以形成复合物, 商业上称为 **PGX®**, 由 Inovobiologic Inc., Calgary, CA 供应)。

[0304] 第 2 组 (n=27) 食用对照产品 (脱脂奶粉, 其具有与试验产品相似的颜色和质地)。

[0305] 将对照产品和试验产品与 10g 的由 CRID Pharma, France 供应的商业早餐谷类食品预混合, 并与 135ml 的市售原味酸奶一起包装。由参与者在摄取前将酸奶和预混合产品合并在一起。

[0306] 对于研究的前七天, 参与者服用 2.5g 产品 (试验或对照), 每天两次, 作为两顿正餐的一部分。对于研究的后 14 天, 参与者服用 5g 产品 (试验或对照), 每天两次。在研究过程中, 通知参与者避免进食富含纤维的食物并限制膳食纤维摄入为每天大约 10g。除了预混合产品和酸奶之外, 所有其它食物由参与者根据他们通常的膳食购买和制备。

[0307] 评价: 在四次分开的随访时对参与者进行评价。筛选 (第 0 次随访, 筛选随访, “V0”) 包括身体检查。

[0308] 血样: 在第 1 次随访 (研究的第 0 天) 时收集空腹血样 (基线)。第 2 次随访 = 参加研究的第七天, 在摄取 5g 产品一周之后。第 3 次随访 = 参加研究的第 21 天, 在摄取 10g 产品 2 周之后。在每次随访过程中, 在添加有 Diprotin A (0.034mg/ml 血液; MP Biomedicals, Illkirch, France) 的 EDTA 处理的管中收集血液并在 4°C 以 3000rpm 离心 12 分钟。血浆在 -80°C 储存直到分析。

[0309] 粪便收集: 在基线 (V1, 第 0 天)、在 5g/ 天的产品摄取一周之后 (V2, 第 8±1 天)、在 10g/ 天的产品摄取 2 周之后 (V3, 第 22±2 天) 从受试者取得粪便样品。受试者在每次预定随访之前的 48 小时内收集一个粪便样品。取大约 5g 样品于干冰上带走用于分析。

[0310] 血浆分析:

[0311] GLP-1: 使用得自 LINCO research (Millipore, St. Charles, MO) 的 ELISA 试剂盒定量活性的 GLP-1。根据生产商, 对于 100 μl 样本量的分析灵敏度是 2pM。在 4pM 时的批内分析 CV 是 8%, 批间分析 CV 是 13% (Millipore, St. Charles, MO)。

[0312] PYY 和生长素释放肽：使用得自 Phoenix Pharmaceuticals, Inc. (Burlingame, CA) 的 ELISA 试剂盒定量 PYY 和生长素释放肽。对于 PYY 的分析灵敏度是 0.06ng/ml, 对于生长素释放肽是 0.13ng/ml。两个分析的批内分析 CV 是 <5%, PYY 和生长素释放肽的批间分析 CV 分别为 <14% 和 <9%。

[0313] 胰岛素：使用得自 Millipore (St. Charles, MO) 的 ELISA 试剂盒测量胰岛素。在分析灵敏度为 2  $\mu$  U/ml 时, 批内分析 CV<7%, 批间分析 CV<11.4%。

[0314] 统计分析：结果以平均值  $\pm$  SEM 表示。通过带有 Bonferroni 校正的重复测量 ANOVA [具有时间 (V1、V2、V3) 和膳食作为参数的双因素分析] 分析三次随访的肽水平。使用皮尔逊相关系数计算两个参数之间的相关性。使用公式 [HOMA-IR=空腹胰岛素 ( $\mu$  U/ml) X 空腹葡萄糖 (mmol/l)/22.5] 计算胰岛素抵抗的稳态模型评价。使用 SPSS v 16.0 软件 (SPSS Inc. Chicago IL) 分析数据。

[0315] 粪便分析：根据 Van Nuenen 等, *Microbial Ecology in Health and Disease* 15:137-144 (2003) 进行 SCFA 测量。简而言之, 将粪便样品离心并向澄清的上清液加入甲酸 (20%)、甲醇和 2-乙基丁酸 (内标, 2mg/ml 于甲醇中) 的混合物。使用自动进样器将 0.5ml 样品注射到 Chrompack CP9001 气相色谱仪中的 GC-柱 (Stabilwax-DA, 长度 15m, ID 0.53mm, 膜厚度 0.1mm; Varian Chrompack, Bergen op Zoom, The Netherlands)。通过 Cobas Mira plus 自动分析器 (Roche, Almere, The Netherlands) 酶促测定 L-乳酸根和 D-乳酸根二者。使用微电极测量 pH。通过将一子样品在 110 $^{\circ}$ C 干燥至少 2 天来测量干物质。

[0316] 统计分析：结果表示为平均值  $\pm$  SEM。通过重复测量 ANOVA 分析三次随访的 SCFA, 以随访 (V1、V2、V3) 作为受试者组内因素和治疗作为组间因素。使用 Pearson 相关分析测定 SCFA 和其它测量结果 (饱腹感激素、葡萄糖、胰岛素和 HOMA-IR) 之间的相关性。显著性标准设置为  $P \leq 0.05$ 。

[0317] 结果：

[0318] 54 名受试者 (25 名男性和 29 名女性) 参与研究并完成了所有四次随访 (V0-V3)。没有受试者退出研究, 且产品得到良好耐受。接受对照产品的对照组 (11 名男性、16 名女性) 的平均年龄为 30.9 $\pm$ 10.8, 最初的 BMI 为 22.8 $\pm$ 2.4。接受试验产品 (VFC) 的组平均年龄为 32.3 $\pm$ 10.3, 且最初的 BMI 为 22.7 $\pm$ 2.1。组间的基线临床和生物化学特性没有差异。

[0319] 在 V1、V2 和 V3 时的体重、葡萄糖、胰岛素和 HOMA-IR 得分提供在以下表 9 中。

[0320] 表 9：进食对照或 VFC 的参与者的体重和生化参数

[0321]

	对照组(脱脂奶粉)			试验组(VFC)		
	V1(第0天)	V2(第7天)	V3(第21天)	V1(第0天)	V2(第7天)	V3(第21天)
体重(kg)	64.60 ± 1.57	N/M	64.60 ± 1.52	68.20 ± 1.71	N/M	68.43 ± 1.67
葡萄糖 (mmol/l)	4.60 ± 0.06	4.60 ± 0.07	4.62 ± 0.10	4.67 ± 0.09	4.60 ± 0.08	4.60 ± 0.08
胰岛素 ( $\mu$ U/ml)	5.32 ± 0.85	4.52 ± 0.33	5.19 ± 0.33	5.52 ± 0.56	4.52 ± 0.49	4.61 ± 0.47
HOMA-IR	1.11 ± 0.20	0.93 ± 0.07	1.07 ± 0.07	1.15 ± 0.11	0.96 ± 0.11	0.94 ± 0.10

[0322] 数值表示为平均值  $\pm$  SEM (n=27/组)。N/M=未测量。在包括性别作为重复测量 ANOVA 的协变量时,试验组的 HOMA-IR 的随访问差异是显著的 (p=0.024)。

[0323] 如以上表 9 中所示,对照组和试验组在 V1 和 V3 之间的体重没有显著性差异。随时间或组间的空腹血浆葡萄糖没有不同。尽管试验组(即,摄食 PGX)的 V1 和 V3 之间的空腹胰岛素有 14% 的降低,这与对照组并没有显著性差异。对照组的 HOMA-IR 得分的平均数值和百分率改变是 -0.04 或 -3.6%,而试验组是 -0.21 或 -18.3%。试验组的 HOMA-IR 的百分率降低与对照组相比显著更大 (P=0.03)。重复测量 ANOVA 显示随访效果的 P=0.067。在包括性别作为重复测量分析的协变量时,随访效果是统计显著的 (P=0.024)。在分别分析时,在 V1 和 V3 之间,男性表现出比女性更大的 HOMA-IR 得分降低 (P=0.042)。试验组和对照组之间的男性参与者的 HOMA-IR 降低是相似的(分别为  $0.36 \pm 0.20$  和  $0.31 \pm 0.18$ )。然而,在女性中,对照组的 HOMA-IR 升高 ( $+0.18 \pm 0.17$ ),而试验组降低 ( $0.08 \pm 0.19$ )。

[0324] 在随访过程中或组间的空腹 GLP-1 水平没有显著性差异(数据未示出)。

[0325] 图 10A 图示阐明了在所有健康成年人参与者(n=54)中对照与 VFC 在 V1(第 0 天)、V2(第 14 天)和 V3(第 21 天)时对空腹 PYY 水平的影响。值以平均值  $\pm$  SEM 表示。如图 10A 所示,重复测量分析显示空腹 PYY 水平的随访有统计显著的效果 (P=0.004)。在通过 BMI 层选图 10A 中所示的结果时, BMI < 23 的参与者表现出 PYY 水平的显著性差异作为随访 (P=0.03) 和治疗 (P=0.037) 的效果,如图 10B 所示。方差分析表明在研究结束时试验组具有相对于对照组显著更高的 PYY 水平 (P=0.043)。需要指出的是, PYY 水平升高是有利的,因为它是与减少食物摄入有关的减食欲激素。

[0326] 如图 10C 所示,重复测量 ANOVA 显示空腹总生长素释放肽水平的随访 (P=0.001) 和治疗 (p=0.037) 的显著效果。如图 10C 所示,在对照组和 VFC 治疗试验组分别观察到  $89.7 \pm 20.0$  和  $97.7 \pm 26.6$  pmol/l 的降低。

[0327] 在 V2 时 PYY 与葡萄糖负相关 (r=-0.27, P=0.046)。在 V1 和 V2 时,生长素释放肽和胰岛素之间(分别为 r=-0.28, P=0.038 和 r=-0.31, P=0.022) 以及 V1 和 V2 时的生长素释放肽和 HOMA 之间(分别为 r=-0.27, P=0.052 和 r=-0.28, P=0.041) 也是显著的负相关。

[0328] 粪便 SCFA 和乳酸根:

[0329] 如以下表 10 所示, **VFC (PGX®)** 组的乙酸根浓度显著高于对照组 (P=0.01)。在 V1(基线, p=0.286) 或 V2(p=0.096) 时,组间的乙酸根浓度没有差异,但是在 V3 时

**VFC (PGX®)**组的浓度显著高于对照组 ( $p=0.018$ )。组间的丙酸根、丁酸根、戊酸根、己酸根或乳酸根浓度没有显著的治疗差异。重复测量分析表明,通过在 V3 时进食**VFC (PGX®)**的受试者 ( $P=0.03$ ) 相比对照组为 ( $P=0.06$ ) 的较高的总 SCFA 确定对于总 SCFA 的显著治疗效果,而。对于粪便 pH,随访有显著的效果 ( $0.02$ ), V1 和 V3 之间都是降低的。

[0330] 饱腹感激素、胰岛素和葡萄糖的相关性

[0331] 血浆生长素释放肽、PYY、GLP-1、胰岛素、葡萄糖和 HOMA-IR 的水平分析结果如上述表 9 中所示。如以下表 10 所示,在 V3 时空腹生长素释放肽和丙酸根之间有显著的负相关 ( $r=-0.29; P=0.03$ )。将基线和最后一次随访之间的丙酸根变化计算为 V3-V1,称为  $\Delta$  丙酸根。 $\Delta$  丙酸根与  $\Delta$  胰岛素 ( $r=-0.26; P=0.05$ ) 和  $\Delta$  HOMA-IR ( $r=-0.25; P=0.07$ ) 都是负相关。

[0332] 表 10 :遵循**VFC (PGX®)**或对照产品补充的受试者的短链脂肪酸 (SCFA) 和乳酸根的粪便浓度。

[0333]

	对照			VFC (PGX®)			P-值		
	V1	V2	V3	V1	V2	V3	随访	治疗	随访*治
SCFA (mmol/g 粪便)									
合计	61.1±4.4	59.2±5.0	53.5±5.2+	66.8±4.4	63.5±3.6	66.9±4.7	0.78	0.03	0.48
乙酸根	35.8±2.4	33.2±2.5	30.3±2.7*	39.5±2.4	38.7±2.0	39.9±2.8	0.51	0.01	0.40
丁酸根	10.0±1.1	11.1±1.5	9.5±1.2	12.4±1.3	10.7±0.9	11.6±1.0	0.77	0.26	0.31
丙酸根	11.4±1.2	10.8±1.1	10.2±0.4	10.9±0.8	10.7±0.8	11.5±1.0	0.89	0.85	0.55
戊酸根	3.1±0.3	3.7±0.4	3.0±0.4	3.4±0.3	3.1±0.3	3.3±0.3	0.66	0.98	0.20
己酸根	0.58±0.10	0.49±0.11	0.41±0.11	0.55±0.09	0.41±0.08	0.50±0.12	0.33	0.94	0.60
乳酸根 (mmol/g 粪便)	0.62±0.09	0.74±0.09	0.46±0.07	0.52±0.09	0.48±0.09	0.46±0.07	0.05	0.22	0.12
pH	6.82±0.09	6.71±0.16	6.43±0.25	6.69±0.09	6.68±0.09	6.40±0.08	0.02	0.77	0.88

[0334] 数值表示为平均值 ±SEM (n=27/组)。符号\*表示在随访3 (V3) 时对照和VFC (PGX®)之间的显著性差异。符号+表示在随访3 (V3) 时对照和VFC (PGX®)之间的差

异的趋势 ( $p=0.06$ )。

[0335] 讨论

[0336] 血浆 PYY 水平的分析

[0337] 这个实施例中所述的结果证明了与对照产品相比 VFC 提高空腹 PYY 水平,且在 BMI<23 的参与者中是统计显著的。超重和肥胖的人的 PYY 血浆浓度典型地是降低的 (R. L. Batterham 等, *Nature* 418 :650-654 (2002)), 且这种减弱的 PYY 分泌可以促进肥胖症的发展和 / 或阻碍体重减轻。

[0338] 尽管在这项研究的对照组的参与者也在三周的研究过程中出现了空腹 PYY 的轻微降低, 进食 VFC 的参与者能够保持, 且在 BMI<23 的那些参与者中实际提高他们的 PYY 水平。最近表明益生元的微生物发酵与健康成年人的 GLP-1 和 PYY 产生的增加有关 (P. D. Cani 等, *Am. J. Clin. Nutr.* (2009))。在啮齿类动物中, 短链脂肪酸 (SCFA) 作为膳食纤维微生物发酵的副产物, 已经表现出直接刺激 PYY 分泌 (V. Dumoulin 等, *Endocrinology* 139 :3780-3786 (1998))。魔芋葡甘露聚糖作为 VFC 的起始原料之一, 已经表现出提高人粪便中的乙酸根、丙酸根和丁酸根浓度 (H. L. Chen 等, *J. Am. Coll. Nutr.* 27 :102-108 (2008))。纤维的粘度也表现出独立地影响食物摄入, 这种效果可能是通过改变饱腹感激素释放而介导的。

[0339] 进食包含 VFC 的试验产品的组与进食对照产品的组的第 1 次随访 (第 0 天) 和第 3 次随访 (第 21 天) 之间的空腹生长素释放肽水平都是得到抑制的。因为生长素释放肽刺激食物摄入和促进肥胖 (A. M. Wren 等, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 :5992-5995 (2001) ; M. Tschöp 等, *Nature* 407 :908-913 (2000)), 在进食之前削弱生长素释放肽的渐进升高的化合物是有吸引力的。尽管这项研究中在 VFC 组观察到的 8pmol/l 更大的生长素释放肽降低相对于对照组不是显著不同的, 其它研究已经表明了膳食纤维降低空腹生长素释放肽和进食相关的生长素释放肽 (参见例如, Parnell 和 Reimer, 2009)。尽管对膳食化合物抑制生长素释放肽的机理尚未充分了解, 已经假设了营养素的吸收速率和肠腔的渗透性可以起到一定的作用 (Overduin 等, *Endocrinology* 146 :845-850 (2005))。另外, 关于这一方面, 指出的是 VFC 的粘度比任何现在已知的单独的聚糖大 3-5 倍, 并因此可能改变肠的营养吸收。

[0340] 在这项研究中, 在三周的研究过程中没有检测到两个组之间的空腹 GLP-1 水平的差异。已经使用其它膳食纤维观察到这种 GLP-1 改变的缺少 (T. C. Adam and R. S. Westererp-Plantenga, *Br. J. Nutr.* 93. 845-851 (2005) ; K. S. Juntunen 等, *Am. J. Clin. Nutr.* 78 :957-964 (2003))。

[0341] 尽管参与这项研究的健康受试者的葡萄糖和胰岛素浓度都在正常范围内, 试验组在研究过程中的胰岛素的 14% 降低以及试验组的相对于对照组的 5.3 倍的 HOMA-1R 得分降低可以作为胰岛素灵敏度潜在改善的指示, 这与在实施例 1 和 3 中获得的结果是一致的。总的来说, 这项研究证明了 **VFC (PGX®)** 提高健康参与者的空腹 PYY 水平 (PYY 是一种涉及减少食物摄入的胃肠肽)。

[0342] 粪便 3CFA 水平的分析

[0343] 如上所述, 可发酵的膳食纤维已经表现出减少能量吸收和提高减食欲的胃肠激素的分泌。膳食纤维在远端肠中的微生物发酵生成 SCFA 被认为是在这种调节中起作用。最

近, Cani 等, *Am J Clin Nutr* 90 :1236-1243 (2009) 证明了呼吸氢气排泄 (胃肠微生物发酵的量度) 和血浆 GLP-1 (是一种也减少食物摄入的有力的促胰岛素激素) 之间的显著相关性。本研究基于这些数据证明了进食最多 10g/d 的新功能性纤维复合物 **PGX®** 的受试者的粪便中总 SCFA、特别是乙酸根浓度的显著升高。

[0344] 乙酸根、丙酸根和丁酸根是在远端肠中产生的主要 SCFA。感测肠中 SCFA 的游离脂肪酸受体 (FFAR) 最近被确定为 FFAR2 (也称为 GPR43) 和 FFAR3 (也称为 GPR41)。参见 Ichimura A. 等, *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 89 :82-88 (2009)。FFAR2 在表达 PYY 的肠内分泌细胞中表达, 这与表明 SCFA 刺激 PYY 释放的数据一致 (Ichimura 等, 2009)。在体外, 乙酸根和丙酸根已经表现出抑制 3T3-L1 脂肪细胞通过 FFAR2 活化的脂解作用以及抑制小鼠体内血浆游离脂肪酸 (FFA)。参见 GeH 等, *Endocrinology* 149 :4519-4526 (2008)。FFA 升高已经与胰岛素抵抗和异常脂血症有关。还有证据提示口服给药的丙酸根通过 FFAR 3 增加小鼠中的瘦素 (Ichimura 等, 2009)。已知瘦素在中枢起作用减少食物摄入, 膳食纤维的微生物发酵产生的 SCFA 有可能是部分地通过 FFAR2 和 FFAR3 调节宿主的代谢。

[0345] 这项研究的结果证明了在 **VFC (PGX®)** 补充三周结束时乙酸根和总 SCFA 的显著增加。尽管本申请人的受试者在三周补充过程中体重没有改变, 所考查的最终剂量 (10g/d) 的 **PGX®** 纤维的食用有可能如其它可溶性纤维例如低聚果糖在三个月时间内所表现出的那样可以降低体脂肪质量 (Parnell J. A. 等, *Am J Clin Nutr* 89 :1751-1759 (2009))。丙酸根和生长素释放肽之间的负相关符合与膳食纤维 (特别是具有高粘度的那些例如 **VFC (PGX®)**) 有关的食物摄入的总体减少。胰岛素和 HOMA-IR 的负相关与这种功能性纤维改善总体代谢健康和减少胰岛素抵抗的能力一致。

[0346] 总之, 这个实施例的结果表明在 3 周时间中进食中等剂量的高粘性和可溶性纤维 (**VFC (PGX®)**) 的受试者粪便中的乙酸根增加。SCFA、丙酸根与空腹生长素释放肽、胰岛素和 HOMA-IR 负相关。据本申请人所知这是第一次有报告表明 **VFC (PGX®)** 使粪便 SCFA 浓度升高, 提示 **VFC (PGX®)** 在结肠中的发酵可以引起生理学效果的级联, 可能是通过 FFAR2 和 FFAR3 介导的。

[0347] 实施例 5

[0348] 这个实施例描述了颗粒化的粘性纤维复合物 (VFC) (魔芋 / 黄原胶 / 藻酸盐 (70:13:17)) (即, 通过造粒加工纤维掺合物以形成复合物, 商业上称为 **PGX®**) 的一级结构分析。

[0349] 基本原理:

[0350] 聚糖是由通过其配糖羟基连接的糖 (单糖) 组成的自然存在的聚合物。它们可以是支化的或直链的, 且可以具有从数千道尔顿到超过 2 百万道尔顿的非常高的分子量。使用甲基化分析、水解和色谱法与水解和 NMR 光谱学测定颗粒化的 VFC (70% 魔芋甘露聚糖、17% 黄原胶、13% 藻酸钠) 的一级结构。

[0351] 魔芋葡甘露聚糖是得自魔芋属魔芋的块茎或 Konnyaku 根的部分乙酰化的 (1,4)- $\beta$ -D- 葡甘露聚糖 (Bewley 等, 1985, *Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants*, Academic Press, New York, pp. 289-304)。

[0352] 黄原胶是由野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*) 产生的微生物多糖。它

具有独特性流变学性能和胶体形成性能。黄原胶的结构基于  $\beta$ -(1,4)-连接的葡萄糖单元的纤维素主链,具有与主链的每隔一个葡萄糖单元连接的甘露糖-葡糖醛酸-甘露糖的三糖侧链。一些末端甘露糖单元被丙酮酰化(pyruvylated),且一些内部的甘露糖单元被乙酰化(Andrew T.R., ACS Symposium Series No. 45(1977))。

[0353] 藻酸钠是得自褐海藻(例如,海带属(Laminaria) hyperborea、墨角藻属(Fucus) vesiculosus、叶形藻(Ascophyllum) nodosum)的聚糖的钠盐。其化学结构由(1,4)连接的 $\beta$ -D-聚甘露糖醛酸(polyM)、(1,4)连接的 $\alpha$ -L-聚古洛糖醛酸(poly G)的嵌段以及两种糖醛酸的交替嵌段(poly MG)组成。Grasdalen, H., 等, Carbohydr Res 89: 179-191(1981)。藻酸盐与二价金属阳离子形成强的凝胶,且已经使用“蛋盒”模型来描述凝胶化的这种形式。参见 Grant, G. T., 等, FEBS Lett 32:195-198(1973)。

[0354] 方法:

[0355] 用于这个实施例的所有聚糖都由 InovoBiologic Inc (Calgary, Alberta, Canada) 提供。单独的聚糖是:魔芋葡甘露聚糖(批号 2538 和 2681);黄原胶(批号 2504 和 2505);和藻酸钠(批号 2455, 2638, 和 2639)。通过以下方法产生颗粒化的 VFC(PGX, 批号 900495 和 2029070523):将 70% 魔芋甘露聚糖、17% 黄原胶和 13% 藻酸钠共混,向 VFB 添加 30% 到 60%(w/w) 的水,然后通过施加加热将加入的水干燥掉。在加工(例如,颗粒化)之前取相同三元混合物(未经加工的 VFB)的样品,将其称为三元混合物 #1(TM1,批号 900285、900416 和 1112050809)。

[0356] 1. 甲基化分析

[0357] 基本原理:部分甲基化的糖醇乙酸酯的 GCMS 分析已经被用于揭示聚糖的单糖组分和它们的连接位置(H. Björndal等, Carbohydrate Research 5:433-40(1967))。因此,甲基化分析可以揭示已经通过将三种聚糖(魔芋甘露聚糖、黄原胶和藻酸盐)添加到一起并通过热处理和粒化过程进行加工的过程所产生的新的和出乎意料糖和连接位置。然而,甲基化分析并没有显示糖是如何连接在一起的( $\alpha$  或  $\beta$ )。已知甲基化分析对于分析不发生甲基化且使抗水解的糖醛酸(例如,藻酸钠)是不能令人满意的(Prcival 等, Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides, Academic Press 101(1967))。因为藻酸钠完全由糖醛酸组成(甘露糖醛酸和古洛糖醛酸),需要另外的方法来分析 VFC,包括水解并通过带有脉冲电流计检测的高性能阴离子交换色谱法(HPAEC-PAD)和 <sup>1</sup>H 核磁共振光谱学分析的中性糖和糖醛酸,如下所述。

[0358] 方法:

[0359] 分析了以下表 11 状所示的样品,包括 VFC 的每种单独的组分(魔芋甘露聚糖、藻酸钠、黄原胶)、未颗粒化的 VFB(称为“三元混合物 #1”或“TM1”)和颗粒化的 VFC(称为 PGX®)。取经过称重的单个聚糖和三元混合物,并向 450  $\mu$ g 的每种样品加入几滴二甲亚砜。使用氢氧化钠(NaOH/碘甲烷(MeI))将样品全甲基化,在 2 小时时间内摇动样品然后超声处理总共四次。通过氯仿提取纯化样品,然后用 2M 三氟乙酸(TFA)在 120°C 水解 2 小时并在室温下用在 2M NH<sub>4</sub>OH 中的硼氟化钠(NaBD<sub>4</sub>)还原 2 小时。通过添加甲醇:冰醋酸混合物(90:10)三次随后冷冻干燥将硼氟化物的分解产生的硼酸盐除去。然后使用乙酸酐(100°C, 1 小时)将样品乙酰化。通过提取到氯仿中来纯化乙酰化的样品。

[0360] 甲基化分析的结果:

[0361] 表 11 :通过 GCMS 确定的对应于各样品批次的糖和键的 PMAA 的保留时间 (分钟) (tr= 痕量, nd= 未检出)

[0362]

样品	批号	末端甘露糖或葡萄糖	2-连接的甘露糖	4-连接的甘露糖	4-连接的葡萄糖	3, 4-连接的己糖
魔芋甘露聚糖	2538	12.52	nd	13.78	13.86	nd
藻酸钠	2455	nd	nd	13.78	nd	nd
黄原胶	2504	12.54	13.68	nd	13.85	14.65
未颗粒化的 VFB(TM1)	900285	nd	痕量 (13.65)	13.77	13.85	14.65
未颗粒化的 VFB(TM1)	1112050 809	12.47	痕量 (13.62)	13.74	13.83	痕量 (14.63)
颗粒化的 VFC(PGX®)	2029070 523	12.51	痕量 (13.66)	13.78	13.86	14.65
颗粒化的 VFC(PGX®)	2029070 523	12.48	nd	13.74	13.83	痕量 (14.62)

[0363] “TM1”:三元混合物 #1

[0364] 表 11 提供了对得自七个样品的部分甲基化的糖醇乙酸酯 (PMAA) 进行键分析的重建离子色谱 (未示出) 所观察到的结果的概述。如表 11 所示,藻酸钠的样品只给出了 4-连接的葡萄糖的弱的信号。在各聚糖样品所观察到的信号的比对表明,在魔芋甘露聚糖粉末中发现的组分与所报告的结构一致,也就是,通过 4-位连接的葡萄糖和甘露糖,带有短的末端侧链。除了末端甘露糖和 / 或末端葡萄糖和 4-连接的葡萄糖的强信号之外,黄原胶样品给出了 2-连接的甘露糖的弱的信号。在 14.65 分钟洗脱的信号给出了与 3, 4-连接的支化己糖相一致的碎片图。所有的黄原胶信号与报告的结构一致。在黄原胶中以及在所有的 VFB 和 VFC 样品中在约 14.65 分钟出现的信号与在黄原胶样品中观察到的 3, 4-连接的己糖支化位点一致。

[0365] 总起来说,样品的可归属信号的总体分布包含与魔芋甘露聚糖一致的成分,且还包含可以归属于黄原胶的成分 (支化位点)。这些甲基化结果与以下结论一致。第一,未颗粒化的 VFB(TM1) 和颗粒化的 VFC(PGX®) 二者都包含魔芋甘露聚糖 (4-连接的甘露糖) 和黄原胶 (3, 4-连接的支化葡萄糖)。谱图中的其它甲基化糖可以源于这些生物聚合物的任一种。第二,不存在其它常见的生物聚合物 (例如,没有半乳甘露聚糖、角叉菜胶等的证据)、6-连接的葡萄糖 (淀粉) 等。第三,这些结果中没有证据显示已经形成了新的糖样

结构（例如，没有对应于其它糖的质量，且颗粒化的 VFC 和未颗粒化的 VFB 具有相似的质谱）。第四，这个分析不能鉴定藻酸钠成分，因为无修饰的糖醛酸不发生甲基化（Percival 等，*Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides*, Academic Press 101 (1967)）。藻酸钠的分析使用水解和色谱法及水解和核磁共振光谱学解决，如以下所述的。

[0366] 2. 水解和 GCMS 分析

[0367] 基本原理：

[0368] 黄原胶和藻酸钠都含糖醛酸，也就是葡萄糖醛酸（黄原胶）和甘露糖醛酸和古洛糖醛酸（藻酸钠）。这些结构特征难以鉴定是由于由吸电子的羧基引起的聚糖中糖醛酸的极大的水解耐受性，这使得很难实现酸催化水解的第一阶段，也就是配糖氧原子的质子化（Percival 等，*Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides*, Academic Press 104 (1967)）。这产生的效果是这些聚糖对于攻击很稳定。在较早文献中的藻酸钠水解方法描述了用 90% $H_2SO_4$  处理几个小时，随后在稀释之后煮沸 24 小时（Fischer 等，*Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 302 :186 (1955)）。然而，新近使用了强挥发性的酸三氟乙酸（TFA），发现其水解多糖醛酸苷中的耐受性非常高的键，且优点为具有挥发性易于除去（L. Hough 等，*Carbohydrate Research* 21 :9 (1972)）。

[0369] 这个实施例描述了新的分析方法，用于 VFB 和 VFC（也称为“VFB/C”）的水解和用于通过色谱法和任选使用 NMR 进行所有水解产物（葡萄糖、甘露糖、葡萄糖醛酸、甘露糖醛酸和古洛糖醛酸）的表征。

[0370] 方法：

[0371] GCMS 分析：通过气相色谱法 - 质谱学（GCMS）分离并鉴定部分甲基化的糖醇乙酸酯（PMAA）。GC 分离使用 DB5 柱、在 45°C 柱上注射和以 40°C 1min、然后 25°C /min 到 100°C、然后 8°C /min 到 290°C、最后在 290°C 保持 5 分钟的温度变化程序进行。MS 鉴定以 70eV 的电离电压、以单位分辨率模式在 50-620 道尔顿的质量范围内以扫描模式进行。

[0372] 部分水解条件：

[0373] 水解：对 VFB/C 的三氟乙酸（TFA）水解的条件进行设计，使得聚糖尽可能完全地被水解而对糖不攻击不至于使结果被不需要的降解产物所掩蔽。

[0374] 对 30mg 的表 11 所示样品进行 TFA 水解，将其与 2M TFA 一起放入密封管中并加热到 100°C，保持 1、2、4、8、24、72 小时。在预定时间将样品取出，在冷冻干燥器中将 TFA 蒸发并通过硅胶板（Merck TLC 硅胶 60° F）上的薄层色谱法（TLC）检查样品（溶剂：丁醇：乙醇：水，5:3:2）。使用含硫酸（5%）的甲醇使斑点可视化。测得到将 VFB/C 中的聚糖尽可能完全水解为成分糖而对糖的攻击不至于使结果被不需要的降解产物掩蔽的最佳条件是在 2M TFA 中在 100°C 温育 72 小时，过滤，冷冻干燥两次。结果总结在表 12 中。

[0375] 水解分析的结果：

[0376] 表 12 :TFA 水解的结果

[0377]

样品	批号	TFA 水解液结果
魔芋甘露聚糖	2538	葡萄糖和甘露糖的混合物
藻酸钠	2638	甘露糖醛酸和古洛糖醛酸的混合物
黄原胶	2504	葡萄糖、甘露糖、葡糖醛酸
VFC 颗粒(魔芋/ 黄原胶/藻酸盐 (70: 13: 17))	PGX®批号 2029070523	葡萄糖、甘露糖和糖醛酸

[0378] 色谱法：

[0379] 在确定了从三种聚糖释放成分糖的水解条件之后，开发了能够将两种中性糖（葡萄糖、甘露糖）与糖醛酸（葡糖醛酸、甘露糖醛酸和古洛糖醛酸）分开的色谱方法。

[0380] Dionex 酸色谱法已经广泛用于糖和相关化合物的色谱方法。这种检测方法在过去已经使用的许多方法例如折射率相比更加灵敏。

[0381] 方法：

[0382] 设备：Dionex ICS-3000 复式泵 IC 系统，电化学检测器，Chromeleon 数据系统。

[0383] 材料：水（去离子水且经过过滤）、氢氧化钠（50% 溶液，HPLCElectrochem. 级别）、无水乙酸钠（≥ 99.5%）。

[0384] 表 13：色谱分析条件：

[0385]

仪器	配有 PAD 检测器的 Dionex 液相色谱系统		
柱	Dionex CarboPac PA1 (250 x 4 mm) Dionex CarboPac PA1 Guard (50 x 4 mm)		
洗脱剂	A: 水 B: 含 500 mM 乙酸钠的 100 mM NaOH C: 100 mM NaOH		
梯度	时间	%B	%C
	0	0	15.5
	20	0	15.5
	21	50	0
	32	50	0
	32.5	0	100
	42	0	100
	42.5	0	15.5
	52	0	15.5
流速	1 ml/min		
进样体积	10 $\mu$ l		
柱温	30 $^{\circ}$ C		
运行时间	52 min		

[0386] 样品制备:(浓度 $\sim$ 0.02mg/ml)

[0387] 从在 D<sub>2</sub>O 中的 30mg/ml 的起始浓度制备浓度大约 0.02mg/ml 的样品溶液 (NMR 样品)。将等份 (15  $\mu$ l) 的水解液和标准溶液溶解于去离子水中 (30mg/ml) 并用去离子水稀释到 0.0225mg/ml 用于分析。类似地制备预期得自三种聚糖的每种水解液组分的标准溶液:葡萄糖和甘露糖(得自魔芋葡甘露聚糖和黄原胶)、葡糖醛酸(得自黄原胶)及甘露糖醛酸和古洛糖醛酸(得自藻酸钠)。

[0388] 将样品在 30 $^{\circ}$ C 注射到带有保护柱 (50x4mm) 的 Dionex CarboPacPA1 (250x4mm) 柱上。用由 A: 去离子水、B: 含 50mM 乙酸钠(无水,  $\geq$ 99.5%) 的 100mM NaOH(HPLC Electrochem 级别);和 C:100mM NaOH 形成的溶剂梯度以 1ml/min 的流速对柱进行洗脱,如表 13 所示。

[0389] 色谱分析的结果:

[0390] 表 14 示出了各种纤维样品的水解液的 Dionex 离子色谱法的结果。

[0391] 表 14 :水解液的 Dionex 离子色谱法结果

样品	保留时间(分钟)/高度(nC)/相对面积(%)
标准:	
葡萄糖	13.98min/175.56nC/99.95%
甘露糖	15.22min/56.23nC/99.61%
葡糖醛酸	25.58min/214.36nC/94.79%
甘露糖醛酸	25.75min/327.64nC/97.95%
古洛糖醛酸*	25.13*
试验样品(水解液)	
魔芋甘露聚糖 (批号: 2538)	13.98min/45.26nC/41.05%(葡萄糖)
	15.22min/57.94nC/57.27%(甘露糖)
黄原胶 (批号: 2504)	13.98min/6.49nC/46.99%(葡萄糖)
	15.22min/3.99nC/29.93%(甘露糖)
	25.58min/2.73nC/4.87%(葡糖醛酸)
藻酸钠 (批号: 2638)	13.95min/0.428nC/3.89%(葡萄糖)
	15.23min/0.275nC/1.90%(甘露糖)
	25.13min/7.06nC/14.95%(古洛糖醛酸)
	25.75min/35.03nC/75.37%(甘露糖醛酸)
未颗粒化的 VFB(TM1) 批号 900416	13.98min/15.79nC/40.94%(葡萄糖)
	15.20min/18.76nC/52.42%(甘露糖)
	25.58min/1.44nC/0.83%(葡糖醛酸)
	25.75min/3.09nC/1.96%(甘露糖醛酸)
颗粒化的 VFC (PGX®) 批号 900495	13.98min/15.70nC/40.62%(葡萄糖)
	15.20min/18.76nC/52.50%(甘露糖)
	25.58min/1.42nC/0.82%(葡糖醛酸)
	25.75min/3.15nC/2.03%(甘露糖醛酸)

[0392]

[0393] \* 通过藻酸钠的水解来确定古洛糖醛酸作为标准的应用(假定第二显著的峰是古洛糖醛酸)。

[0394] 表 15: 商用生物聚合物和它们的单糖组分

商用生物聚合物名称	糖分布
淀粉	葡萄糖
角叉菜胶	半乳糖
藻酸钠	甘露糖醛酸、古洛糖醛酸
LBG/瓜尔豆胶	半乳糖、甘露糖
[0395] 魔芋葡甘露聚糖	葡萄糖、甘露糖
象牙果甘露聚糖	甘露糖
黄原胶	葡萄糖、甘露糖、葡糖醛酸
落叶松阿拉伯半乳聚糖	阿拉伯糖、半乳糖
纤维素醚类	葡萄糖
阿拉伯胶 (Arabic 等)	复杂的混合物
VFC (PGX®)	葡萄糖、甘露糖、葡糖醛酸、甘露糖醛酸

[0396] 如表 14 所示,GCMS 分析的结果表明成分糖和糖酸在一个 35 分钟的运行柱被充分分开。如表 14 中进一步看到的,VFB/C 的 TFA 水解给出了其中四种可能的单糖(即,葡萄糖、甘露糖、葡萄糖醛酸和甘露糖醛酸)在 Dionex 分析中可以清楚观察到的独特分布。这些结果与包括魔芋葡甘露聚糖(甘露糖、葡萄糖)、黄原胶(葡萄糖、甘露糖、葡糖醛酸)和藻酸钠(甘露糖醛酸和古洛糖醛酸)的 VFB/C 的组成一致。

[0397] 表 15 示出了各商用生物聚合物的单糖组分,表明了**VFC (PGX®)**具有独特的单糖成分分布。因此,这些结果证明了 TFA 水解和 GCMS 分离可用于将 VFC 与单糖的其它组合加以区别。

[0398] 总起来说,魔芋葡甘露聚糖和黄原胶的 PMAA 的 GCMS 分析证明了从它们的已知一级结构预期的特征性的糖和键的存在。魔芋葡甘露聚糖给出了对应于 4- 连接的葡萄糖、4- 连接的甘露糖和末端葡萄糖和 / 或甘露糖(主要来自侧链)的 GC 峰。黄原胶给出了对应于末端甘露糖和 / 或葡萄糖(来自侧链)和 4- 连接的葡萄糖(在主链中)的强峰,对应于 3,4- 连接的己糖(葡萄糖)的峰,和对应于 2- 连接的甘露糖的弱的峰(3,4- 连接的己糖和 2- 连接的甘露糖都来自侧链)。事实上所有这些峰也都在 TM1 和颗粒化的**VFC (PGX®)**的 PMAA 的 GCMS 分析中被检测到(如表 11 所示),表明它们既包含魔芋葡甘露聚糖又包含黄原胶。在来自黄原胶成分的 2- 连接的甘露糖的位置处洗脱的痕迹峰由于太弱而不能在质谱中明确地指定,但是在约 12.47 和 14.65 分钟的保留时间的信号分别与黄原胶的末端甘露糖和 3,4- 连接的己糖(葡萄糖)一致。重要的是,这些分析没有显示 TM1 或颗粒化的**VFC (PGX®)**中存在有可能来源于其它成分生物聚合物或来源于在加工过程中可能形成的任何新的糖或糖键的有任何另外的出乎意料的糖或糖键。正如所料,TM1 和颗粒化的 VFC 的 PMAA 的 GCMS 分析不能鉴定藻酸钠成分。

[0399] 在 HPAEC-PAD 分析方面,表 14 示出了测量得到的包括期待的 TM1 和颗粒化的 VFC

的水解液组分在内的标准的保留时间,以及 TM1 和颗粒化的 VFC 的水解液的色谱概述。如表 14 所述,在 TM1 和颗粒化的 VFC 的水解液中检测到四种可能的组分(葡萄糖、甘露糖、葡糖醛酸和甘露糖醛酸)。在这个分析中没有检测到第五种成分—古洛糖醛酸,可能是由于混合物中相对低的藻酸钠含量。没有检测到出乎意料的水解液组分。这些结果与得自 PMAA 的 GCMS 分析的结果一致,支持了 TM1 和颗粒化的 VFC 包含化学上没有变化的魔芋葡甘露聚糖和黄原胶的结论。另外,在水解液中检测到甘露糖醛酸提示化学上没有变化的藻酸钠的另外的存在。

[0400] 3. 完整的和部分水解的聚合物、以及单体标准的核磁共振色谱基本原理:

[0401] 核磁共振光谱法(NMR)是用于分析有机分子的重要工具,因为谱图通过分子中质子(氢原子)的位置包含了关于它们的一级结构的大量信息。因此,在基础水平,<sup>1</sup>H NMR 谱的作用在于提供充分水平的一级结构信息,其可以使用关于化学位移和积分的沿用已久的规则来指纹表征标准化合物和所感兴趣的混合物中的未知物的各种特征。碳水化合物在 NMR 中有许多特征,使得 NMR 可用于分析。碳水化合物的 NMR 谱中的两个主要特征是(i)所谓的“端基异构”共振,涉及与糖环的 C1 相连的质子,相对于另一个主要特征,其典型地出现在低场;(ii)与糖环的其余碳相连的质子的“环封皮(ring envelope)”。例如,对于葡萄糖而言, $\alpha$  和  $\beta$  端头共振分别在 5.2 和 4.6ppm,而环质子封皮分别在 3.1 到 3.9ppm。

[0402] 有趣的是,糖醛酸的 NMR 谱略不同于上述的典型的己糖谱,且它们的共振是在比葡萄糖和甘露糖略高场处聚集在一起(3.9–5.6ppm)。Santi 等,12th Int. Electronic Conf on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-12):1–30 (2008)。因此,所感兴趣的聚糖(例如, VFB/C)的水解液的 NMR 谱可用于确定聚合物中结构单元(葡萄糖、甘露糖、糖醛酸等)的指纹图谱。

[0403] 在这个实施例中所述的研究中,使用 NMR 谱指纹表征源于各种聚糖和 VFB 的水解的复杂混合物。需要指出的是,由于物理性质例如粘度等问题,不能在聚合物水平用 NMR 研究完整的聚糖。

[0404] 方法:

[0405] 将单个聚糖和三元混合物的样品在 100°C 用 2M TFA 部分水解 4 小时和 24 小时。将经过过滤的水解液样品(30mg)溶解于 D<sub>2</sub>O(1ml)并冷冻干燥,之后再溶解在 D<sub>2</sub>O 中并置于 NMR 管中。类似地制备预期的两种单糖和三种糖醛酸的标准溶液。

[0406] 使用带有自动调谐宽频带多核探针和运行 Bruker Topspin 软件的可变温度附件的 Bruker 400MHz Advance III 光谱仪在 298.1K 获得水解液和标准溶液的 NMR 谱。对于大多数样品运行 16 次扫描,只有古洛糖醛酸样品进行 256 次扫描。

[0407] NMR 分析的结果:

[0408] 单糖和糖醛酸标准的 <sup>1</sup>H NMR 谱具有良好的分辨率,且它们的特征性化学位移在黄原胶和藻酸钠的水解液、以及在 VFC (PGX®)的水解液中都有发现(数据未示出)。观察到的来自黄原胶的葡萄糖和甘露糖的化学位移可以被分辨为端头共振(4.6–5.2ppm)和糖环共振(3–4ppm)。观察到的来自藻酸钠的甘露糖醛酸和古洛糖醛酸的化学位移比较近,挤在一起(3.6–5.2ppm)。在颗粒化的 VFC (PGX®)水解液中发现的糖醛酸共振明显是黄原胶和藻酸钠的水解液的结果的组合,进一步支持了化学上没有变化的藻酸钠在颗粒化的 VFC (PGX®)中的存在。

[0409] 总起来说,纯的标准、成分水解液和 VFC 水解液的 NMR 谱证明了**VFC (PGX®)**由单糖组分的一级结构特征没有变化的聚糖组成,配糖键没有变化。

[0410] 总的结论:

[0411] 这个实施例中所述的结果证明了颗粒化的**VFC (PGX®)**的一级化学结构与预配制的、未经加工的 / 未颗粒化的 VFB(TM1) 相比基本上没有变化。如这个实施例中所述,通过经典的甲基化方法表明,魔芋葡甘露聚糖和黄原胶组分包含预期的单元和键,且不存在可能通过 VFB/C 组分的混合或加工引入的无法解释的另外的结构成分。

[0412] 因为作为 VFB/C 组分之一的藻酸钠是抗甲基化的,使用包括部分水解、色谱法和 NMR 在内的另外的方法完成结构分析,以便提供进一步的证据来支持 VFB/C 的一级化学结构的性质没有变化。

[0413] 总起来说,这个实施例所述的研究支持了颗粒化的**VFC (PGX®)**的造粒过程没有在化学上改变其一级结构特征的结论。

[0414] 实施例 6

[0415] 这个实施例描述了颗粒化的粘性纤维复合物 (VFC) (魔芋 / 黄原胶 / 藻酸盐 (70:13:17) 颗粒 (即,通过造粒加工纤维掺合物以形成复合物,商业上称为**PGX®**) 的流动特性和大分子性能的分析。在这个实施例中描述的结果证明了在颗粒化的 VFC 的组分之间在聚合物水平发生的建立网络和接合区域 (junction zone) 的相互作用,以形成具有以下命名的新的聚糖:  $\alpha$ -D-葡萄糖醛酸- $\alpha$ -D-甘露糖- $\beta$ -D-甘露糖- $\beta$ -D-葡萄糖), ( $\alpha$ -L-古洛糖醛酸- $\beta$ -D-甘露糖醛酸),  $\beta$ -D-葡萄糖- $\beta$ -D-甘露聚糖。

[0416] 基本原理:

[0417] 进行这个实施例所述的研究来考查包括魔芋甘露聚糖、黄原胶和藻酸钠的三元颗粒化的 VFB/C 混合物是否包含涉及所有三种组分的网络和接合区域,导致经加工的 / 颗粒化的 VFC 具有与未经加工的 / 未颗粒化的 VFB 或单独的魔芋甘露聚糖、黄原胶或藻酸钠组分相比独有的溶液流动特性。通过如下所述的技术研究了处于溶液中的颗粒化的**VFC (PGX®)**中的三种聚糖之间的非共价的大分子相互作用的存在。因为从实施例 5 所述的研究的结果中预期了魔芋葡甘露聚糖和黄原胶之间的二元相互作用,进行了进一步的分析以特异性地探测在可能的三元相互作用中第三种聚糖 (藻酸钠) 的任何参与。

[0418] 1. 流变学测量

[0419] 在第一个研究中,以未经加工的 / 未颗粒化的 VFB (三元混合物 #1,称为“TM1”) 和颗粒化的**VFC (PGX®)**的多个浓度产生流动曲线,并将其与相同浓度的单独的 VFB/C 的各单组分的溶液的流动曲线相比较,以揭示三元混合物的水溶液的流动特性中的协同作用。

[0420] 表 16 :用于流变学研究的样品

[0421]

样品	批号
颗粒化的 VFC (PGX®)	2029070523
颗粒化的 VFC (PGX®)	900495
未颗粒化的 VFB (TM1)	1112050809
未颗粒化的 VFB (TM1)	900416
藻酸钠	2638
藻酸钠	2639
黄原胶	2504
黄原胶	2505
魔芋葡甘露聚糖	2538
魔芋葡甘露聚糖	2681

[0422] 样品制备：

[0423] 研究了去离子蒸馏水的溶液中的单个聚糖和三元混合物。将准确称重的样品以在 100g 水中 0.1g、0.2g 和 0.5g 的浓度（分别为 0.1%、0.2% 和 0.5%）在 25°C 分散，并允许在搅拌下水合 2 小时，其中将经过称重的水置于磁力搅拌器上并建立旋涡，然后将已经称重到万分位的样品慢慢地倾倒在旋涡的中心。在二小时之后，用高速搅拌器（IKA 剪切搅拌机（15K rpm）剪切溶液 1 分钟以确保所有的颗粒材料已经完全混合。然后进一步搅拌样品 1 小时，这样就可以考虑适用于分析。

[0424] 流动曲线测量：

[0425] 使用 C14 DIN 53019 同心圆柱体测量系统，用 Bohlin Gemini Rheometer 在  $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$  的温度测量溶液的流动特性。以从 0.1Pa 递升到 10Pa 的一系列恒定施加的剪切应力测量稳态剪切速率。最初使用  $\log$  粘度对  $\log$  剪切速率表征流动特性。

[0426] 结果：

[0427] 图 13A、13B 和 13C 图示阐明了在 25°C 测量的魔芋葡甘露聚糖、黄原胶和藻酸钠分别在 0.1%、0.2% 和 0.5% w/w 时的流动曲线。图 13A-C 中所示的单独的聚糖溶液的流动曲线表明黄原胶是最强的增粘剂（图 13B），随后是魔芋葡甘露聚糖（图 13A），最后是藻酸钠（图 13C）。在不同批号的单个聚糖样品的溶液之间的流动特性几乎没有差异。黄原胶溶液还具有横跨数十剪切速率的最广泛的剪切稀化区域，其中对数坐标图是线状的。

[0428] 图 11A-C 图示阐明了浓度为 0.5% (w/w)（图 11A）、0.2% (w/w)（图 11B）和 0.1% (w/w)（图 11C）的未经加工的 / 未颗粒化的 VFB (TM1) 和颗粒化的 VFC (PGX®) 的流动曲线对比。

[0429] 通过将各流动曲线拟合粘度  $\eta$  和 D 之间的指数定律相互关系进一步研究图 11A-C 中所述的数据，如下所述：

$$[0430] \quad \eta = K D^{n-1}$$

[0431] 其中 K 是稠度指数（给定总体的厚度数值），且  $\eta$  是流动特性指数（表示与牛顿

行为的偏离),二者分别衍生自指数定律流体的粘度对剪切速率的线性对数坐标图的截距和斜率。 $K$ 值表示总体的稠度且 $\eta$ 表示与牛顿行为的偏离( $\eta=1$ )。牛顿流体的 $\eta$ 值为1,且随着 $\eta$ 降低到低于1,液体变得更加剪切稀化。

[0432] 如图 11A-C 所示,所有的未经加工的 / 未颗粒化的 VFB(TM1) 和颗粒化的 VFC (PGX®)样品都给出了在各浓度的非常相似的流动曲线,表明在加工中或在预混合的预先老化中低水活度影响了混合物的性能。需要指出的是,加工是在比热处理稀释溶液条件低得多的总体水活度的条件下进行的。VFB/C 混合物的流动曲线最接近黄原胶的流动曲线;它们符合指数定律且表现出广泛剪切稀化行为,但是在各浓度的粘度大小和剪切稀化程度实际上比单独的黄原胶高。这由 VFB/C 混合物和黄原胶的溶液之间的指数定律  $K$  和  $\eta$  值的差明确显示,如图 12A 所示。

[0433] 图 12A 图示阐明了未经加工的 / 未颗粒化的 VFB(TM1)、颗粒化的 VFC (PGX®)和黄原胶的指数定律  $K$  对比。如图 12A 所示,未经加工的 / 未颗粒化的 VFB(TM1) 和颗粒化的 VFB (PGX®)样品在各浓度都给出了非常相似的  $K$  值,且  $K$  值随浓度的增加而增加。需要指出的是,在浓度范围内,较高的  $K$  值对应于更大的粘度,且较低的  $\eta$  值对应于更大的剪切稀化程度。

[0434] 图 12B 图示阐明了未经加工的 / 未颗粒化的 VFB(TM1)、颗粒化的 VFC (PGX®)和黄原胶的指数定律  $\eta$  对比。如图 12B 所示,所有 VFC 样品在各浓度的  $\eta$  值也都是相似的,但是似乎表明可能的  $\eta$  最小值或剪切稀化程度最大值在 0.30 到 0.35% 的范围内存在。

[0435] 基于用于产生颗粒化的 VFC (70% 魔芋葡甘露聚糖、17% 黄原胶和 13% 藻酸钠) 的比例,如果聚糖之间没有相互作用的话,预期混合物的流动特性大致类似于 100% 魔芋葡甘露聚糖的流动特性。然而,已知魔芋葡甘露聚糖是三元混合物中占主导地位的聚糖,而黄原胶和藻酸钠都是次要组分,未经加工的 / 未颗粒化的 VFB(TM1) 和颗粒化的 VFC (PGX®)溶液的流动特性提供了这些混合物中的聚糖之间相互作用的明确指示。

[0436] 总结:

[0437] 将图 11 中所示的颗粒化的 VFC (PGX®)的流动曲线与图 13A-13C 中所示的各组分的流动曲线进行对比,这些结果提示在颗粒化的 VFC 的聚糖之间发生了相互作用,产生了比对于在未经加工的 / 未颗粒化的 VFB(TM1) 或颗粒化的 VFC (PGX®)中存在的特定三元组合物所预期的更大的粘度和剪切稀化行为的程度。颗粒化的 VFC (PGX®)样品的总体流动特性最接近于黄原胶的流动特性,但是令人惊讶的是,颗粒化的 VFC (PGX®)的粘度事实上高于单独的黄原胶的粘度。这在图 12A 和 12B 中显示,其强调了较高的  $K$  值,以及在大约 0.45% 浓度以下时颗粒化的 VFC (PGX®)与黄原胶相比较低的  $\eta$  对比值。考虑到在未经加工的 / 未颗粒化的 VFB(TM1) 和颗粒化的 VFC (PGX®)中的黄原胶含量仅为 17%,且其余的 83% 包括不那么强的增粘剂魔芋甘露聚糖和藻酸钠,这些结果提供了在颗粒化的 VFC (PGX®)样品中的聚糖之间发生了相互作用的明确指示。

[0438] 2. 藻酸钠浓度和 / 或热处理的影响研究

[0439] 进行了另外的实验来确定藻酸钠的不同浓度以及热处理对 VFB/C 的流动特性和大分子性能的影响,如下所述。

[0440] 方法:

[0441] 制备魔芋葡甘露聚糖、黄原胶和藻酸钠的混合物。混合物包含恒定比例的魔芋葡甘露聚糖 (KM) 和黄原胶 (XG) (KM:XG=4.12:1) 和不同量的藻酸钠 (A0 到 A33) (0%、2%、5%、8%、11%、13%、17%、21%、24%、27%、30% 和 33%)。所有的样品首先制备为两种 (魔芋葡甘露聚糖和黄原胶) 或三种 (魔芋葡甘露聚糖、黄原胶和藻酸盐) 纤维组合的干燥混合物。每个样品 (混合物) 称重精确到万分位 (干燥的), 使用手腕式振荡器充分地混合, 并在  $-19^{\circ}\text{C}$  保持备用。如下制备各组合物的 0.5% 的单一浓度的水溶液: 将 5.0g 的每种样品 (混合物) 在磁力搅拌器的搅拌下 (即, 首先在去离子水中建立旋涡, 随后将样品慢慢地倾倒在旋涡的中心中) 加入到 1kg 去离子水中并允许水化四小时直到均质。将混合物的水溶液保持在  $5^{\circ}\text{C}$ , 直到所有样品的制备完成。

[0442] 热处理

[0443] 然后取每种溶液的 20ml 等分试样并如下处理: (i) 在环境温度 ( $22^{\circ}\text{C}$ ) 温育 (未加热), 或 (ii) 在带有恒温控制器的烘箱中在  $90^{\circ}\text{C}$  加热 (样品处于密封容器中以避免蒸发损耗并按时摇动以确保完全水合) 一小时 (A0H 到 A33H) 或四小时 (A0H4 到 A33H4)。

[0444] 在 0.5% 的单一浓度测量包括魔芋葡甘露聚糖、黄原胶和藻酸钠、包含恒定比例 (KM:XG=4.12:1) 的魔芋葡甘露聚糖 (KM) 和黄原胶 (XG) 和不同量的藻酸钠 (0%、2%、5%、8%、11%、13%、17%、21%、24%、27%、30% 和 33%) 的混合物的水溶液在  $25^{\circ}\text{C}$  的流动曲线。如上所述, 溶液是未加热的、加热 1 小时或加热 4 小时。

[0445] 结果:

[0446] 未加热的双组分混合物 (A=0) 和三元混合物的流动曲线 (在  $25^{\circ}\text{C}$  测量的) 如图 14A 中所示。加热 1 小时的两组分混合物和三元混合物的流动曲线 (在  $25^{\circ}\text{C}$  测量的) 如图 14B 所示。加热 4 小时的两组分混合物和三元混合物的流动曲线 (在  $25^{\circ}\text{C}$  测量的) 如图 14C 所示。

[0447] 如图 14A 所示, 对于未加热的混合物, 粘度似乎是随着藻酸钠的含量的增加而降低, 如对于两种较强的增粘剂 (KM 和 XG) 被较弱增粘剂藻酸钠所代替的情况所预期的。

[0448] 如图 14B 所示, 对于加热 1 小时的混合物, 具有增加的藻酸钠含量的三元混合物保持比未加热的含相同比例藻酸盐的混合物 (如图 14A 中所示) 较高的粘度水平。如图 14C 所示, 加热 4 小时的混合物的粘度与在加热 1 小时后观察到的结果相似。这些结果表明加热包括藻酸钠的三元混合物引起聚糖之间的三重相互作用。

[0449] 图 15A 和 15B 举例说明了对于含恒定 KM:XG 比例 (4.12:1) 和不同量 (0 — 33%) 藻酸盐的魔芋葡甘露聚糖、黄原胶和藻酸钠的混合物的 0.5% 水溶液而言,  $K$  和  $\eta$  二者对混合物中藻酸钠比例的依赖性。图 15A 图示阐明了在未加热和加热的三元混合物中指数定律  $K$  值对藻酸盐含量的依赖性。没有经过热处理的三元混合物的溶液的流动曲线符合指数定律, 且主要表现出粘度随藻酸钠含量的增加而降低。如图 15A 所示, 对于未加热的溶液, 指数定律  $K$  值表现出随藻酸钠含量增加而有小的最初升高, 但是随后有大的降低。似乎是在约 3 到 5% 藻酸钠含量时出现最大的  $K$  值。如图 15B 所示, 随着混合物中藻酸钠含量的增加,  $\eta$  值升高 (朝向牛顿行为变化)。这表明从魔芋葡甘露聚糖和黄原胶 (不含藻酸钠) 的高粘性和剪切稀化的二元混合物向显著较低粘性和较少剪切稀化的含 33% 藻酸钠的三元混合物的进展。这些结果表明藻酸钠起到较弱增粘剂的作用。

[0450] 如图 15A 和图 15B 所示, 预期在两种较强的增粘剂 (魔芋葡甘露聚糖和黄原胶) 被

较弱的较少剪切稀化的增粘剂（藻酸钠）替代时，超过约 5% 藻酸钠的 K 值下降和  $\eta$  值增加。如图 15A 所示，加热 1 小时的溶液提供了类似的数据，表明在藻酸钠含量低于约 5% 时由于热处理引起的 K 值的最初下降，但是在 11% 和更高时，K 值下降与对于未加热的溶液所观察到的结果相比不那么剧烈。最大值的 K 值出现在三元混合物中含 8% 到 11% 的略较高藻酸钠含量的加热处理过的溶液中。如图 15B 所示，加热处理的溶液的  $\eta$  值在这个藻酸钠含量范围内保持较低且没有变化。对于加热四小时的有限数目的溶液，K 值和  $\eta$  值与只加热 1 小时的相同溶液类似（数据未示出）。

[0451] 结果小结：

[0452] 总的说来，这些结果表明了三元溶液的热处理显著地提高大分子相互作用的总体水平。与在加工处理前后的流动特性相似的加工期间的情况相反，这些样品的稀释溶液经过热处理，且由新混合的组分构成。因为包含 0% 到约 5% 藻酸钠的粉末混合物的溶液的 K 值在加热处理后实际上是下降的，这一较高水平的相互作用不太可能是由于魔芋葡甘露聚糖和黄原胶之间的相互作用增强引起的。相反，似乎是热处理增强了藻酸钠与魔芋葡甘露聚糖和黄原胶中的一种或二者的相互作用。

[0453] 总的说来，这些数据提示，在混合物的热处理之后，藻酸钠恢复和加强了魔芋葡甘露聚糖和黄原胶之间的相互作用，或本身参与了与溶液中的另外两种聚糖的相互作用。因此，这些结果提示，可以将藻酸钠以超过 8% 到 20% 的水平加入到葡甘露聚糖和黄原胶中并结合热处理，这样不会显著地损害二元混合物的流变学。

[0454] 3. 在分析超速离心机中的沉降

[0455] 基本原理：

[0456] VFC(魔芋/黄原胶/藻酸盐 (70:13:17)) 颗粒(即,通过造粒加工纤维掺合物以形成复合物,商业上称为**PGX®**),也称为**PolyGlycopleX®**( $\alpha$ -D-葡萄糖醛酸- $\alpha$ -D-甘露糖- $\beta$ -D-甘露糖- $\beta$ -D-葡萄糖),( $\alpha$ -L-古洛糖醛酸- $\beta$ -D-甘露糖醛酸), $\beta$ -D-葡萄糖- $\beta$ -D-甘露聚糖(**PGX®**)的出乎意料高的粘度促使本申请人研究魔芋葡甘露聚糖、黄原胶和藻酸盐的混合物的水动力学性能,如它们在分析超速离心机中的沉降速度行为所显示的,以便寻找可能为这些宏观观察结果提供分子基础的分子水平的相互作用。在这项研究中,使用分析超速离心机中的沉降速度的技术作为研究其中葡甘露聚糖作为主要组分且补充有黄原胶和藻酸盐的混合物的性能的工具。

[0457] 方法：

[0458] 聚糖

[0459] 用于研究的所有的聚糖都是由 InovoBiologic Inc, (Calgary, Alberta, Canada) 供应,其中魔芋葡甘露聚糖,批号 2538;黄原胶,批号 2504;和藻酸钠,批号 2455/2639。以单独的聚糖和作为包括颗粒化的 VFC(在本研究中称为“**PGX®**”)和未颗粒化的 VFB(在本研究中称为“TM1”)的三元混合物形式对聚糖进行研究。将样品溶解于除去离子的蒸馏水中,然后渗析到 pH ~ 6.8、离子强度 0.0001M、0.001M、0.01M、0.1M 和 0.2M 的磷酸盐-盐酸盐缓冲液的溶液中。通过添加 NaCl 补充离子强度 >0.05M。

[0460] 分析超速离心

[0461] 使用分析超速离心机中的沉降速度的技术作为相互作用研究的探针。这种自由溶液方法 (free-solution method) 优于其它方法之处在于它实际上不需要可

能会破坏或妨碍相互作用现象的柱、膜材料、其它分离介质或固定化 (S. E. Harding Analytical Ultracentrifugation Techniques and Methods, pp. 231-252, Cambridge: Royal Society of Chemistry (2005))。使用装备有 Rayleigh 干涉光学器件的 Beckman XL-I 超离心机。使用 CCD 摄像机系统捕捉数据。最初的扫描以 3000rpm 的低转子速度进行, 以监控非常高分子量的微粒 (没有检测到) 的存在, 之后调整转子速度到 45000rpm。将沉降系数  $s$  校正到在 20.0°C 时水的密度和粘度的标准条件, 以获得  $s_{20,w}$ 。以二分钟间隔进行扫描, 运行时间为 ~ 12 小时。基于 Claverie 等, Biopolymers 14:1685-1700 (1975) 的有限元分析方法, 使用“最小二乘  $g(s)$ ”SEDFIT 算法 (Dam & Schuck, Methods in Enzymology 384:185 (2003)) 根据沉降系数分布  $g(s)$  对  $s$  的分布来分析数据 (参见, 例如, S. E. Harding, Carbohydrate Research 34:811-826 (2005))。沉降系数分布的改变的分析用于确定相互作用的存在。对于对照和混合物都使用 2.0mg/ml 或 0.5% (在 100g 水中的 0.5g) 的总负载浓度。

[0462] 结果和讨论

[0463] 反应物的完整性

[0464] 首先通过分析超速离心机分别表征魔芋葡甘露聚糖、黄原胶和藻酸盐, 以建立它们的分子完整性。

[0465] 图 16 图示阐明了葡甘露聚糖 (图 16A)、藻酸钠 (图 16B) 和黄原胶 (图 16C) 在 2mg/ml 的负载浓度和在  $I=0.0$  时的表观沉降浓度分布  $g^*(s)$  对沉降系数 ( $s$ )。转子速度为 45000rpm, 温度为 20.0°C。纵坐标表示为每斯维德贝格 (S) 的条纹单位, 横坐标表示为斯维德贝格单位。

[0466] 图 17 图示阐明了未经加工的 / 未颗粒化的 VFB(TM1) 在离子强度 0-0.2M 时 (图 17A)、TM1 在离子强度 0-0.01M 时 (图 17B)、颗粒化的 **VFC (PGX®)** 在离子强度 0-0.01M 时 (图 17C) 和颗粒化的 **VFC (PGX®)** 在离子强度 0-0.2M (图 17D) 的表观沉降浓度分布。转子速度为 45000rpm, 温度为 20.0°C。

[0467] 图 18 图示阐明了未经加工的 / 未颗粒化的 VFB(TM1) (图 18A) 或颗粒化的 **VFC (PGX®)** (图 18B) 的离子强度 (以摩尔浓度单位 M 表示) 对沉降系数  $>3.5S$  的材料的量的影响。为了便于对数刻度,  $I=0.00$  时的值表示在  $I=0.00001M$  处。

[0468] 在所有情况中对表观沉降系数分布进行单模绘图 (图 16A、B、C)。在这些条件下, 魔芋葡甘露聚糖的表观重量平均沉降系数  $s_{20,w}$  为 ~ 1.6S, 藻酸盐为 ~ 1.3S, 黄原胶为 ~ 3.5S, 其中  $1S=10^{-13}s$ 。

[0469] 复合物形成和添加的电解质的影响

[0470] 然后对用于对照的相同的总负载浓度 (2mg/ml) 的以下三元混合物生成沉降系数分布绘图: 未经加工的 / 未颗粒化的 / 未加热的 VFB(TM1) (图 17A, B) 和颗粒化的 / 经加热的 **VFC (PGX®)** (图 17C, D), 直到 10S 的最大值。作为本申请人的相互作用标准, 本申请人估计将表观沉降系数大于对照中的最大沉降物质 (黄原胶) 的表观沉降系数的材料 (即在  $>3.5S$  时沉降的材料) 的数值认为是相互作用产物。

[0471] 表 17 示出了沉降材料  $>3.5S$  的浓度。在所有情况中的超速离心池载荷浓度是 2.0mg/ml。

[0472] 表 17: 沉降材料  $>3.5S$  的浓度

[0473]

样品	c>3.5S(条纹单位)
葡甘露聚糖	0
藻酸盐	0
黄原胶	0.1 ± 0.1
TM1(未经加工的/ 未颗粒化的 VFB)	3.4 ± 0.1
PGX®(颗粒化的 VFC)	0.8 ± 0.1

[0474] 表 17 示出了 TM1 和颗粒化的 VFC 混合物二者的沉降材料的浓度与单独的组分相比都有明确的增加, 尽管仍有相当比例的未反应材料, 特别是在低沉降系数 (~ 2S)。图 18 和表 18 还示出了离子强度增加对较高沉降材料的出现的影响。

[0475] 表 18 示出了离子强度对 TM1( 未经加工的 / 未颗粒化的 VFB) 的影响的结果。在所有情况中的超速离心池载荷浓度是 2.0mg/ml。

[0476] 表 18 :离子强度对 TM1( 未颗粒化的 VFB) 的影响

[0477]

离子强度 (M)	c>3.5S( 条纹单位 )
0.0	3.4±0.1
0.0001	3.2±0.1
0.001	3.4±0.1
0.01	0
0.05	0
0.1	0
0.2	0

[0478] 表 19 示出了离子强度对PGX® ( 颗粒化的 VFC) 的影响的结果。在所有情况中的超速离心池载荷浓度是 2.0mg/ml。

[0479] 表 19 :离子强度对PGX® ( 颗粒化的 VFB) 的影响

[0480]

离子强度 (M)	c>3.5S( 条纹单位 )
0.0	0.8±0.1
0.0001	2.8±0.1

0.001	2.7±0.1
0.01	0
0.05	0
0.1	0
0.2	0

[0481] 可以看出,对于颗粒化的和未颗粒化的混合物二者,在直到 0.01M 的离子强度观察到显著量的较高沉降材料,在该离子强度以上,这种材料的出现得到抑制(图 18A、B)。图 18A 图示阐明了对于未经加工的 / 未颗粒化的 VFB(TM1) 而言,离子强度(以摩尔浓度单位 M 表示)对沉降系数 >3.5S 的材料的量的影响。图 18B 图示阐明了对于经过加工(例如,颗粒化的)VFC(PGX)而言,离子强度(以摩尔浓度单位 M 表示)对沉降系数 >3.5S 的材料的量的影响。

[0482] 三元混合物的沉降系数分布

[0483] 包含固定的葡甘露聚糖:黄原胶比例和变化浓度的藻酸盐(从 0% 到 33%)的混合物的沉降系数分布。混合物不经加热(0)或加热处理 1 小时(H1)或 4 小时(H4)。

[0484] 从以 5mg/ml (0.5%) 的总负载浓度在去离子的蒸馏水中的样品测定沉降系数分布。未加热的样品的结果示出在图 19A 中。经过加热处理的样品的结果示出在图 19B 中。如图 19A 和 B 所示,在没有藻酸盐的存在下,对于没有加热的(A0)或加热处理 1 小时的样品(A0H1)或加热处理 4 小时的样品(A0H4)而言,对于二元的、葡甘露聚糖占主要地位的葡甘露聚糖:黄原胶混合物没有观察到显著的相互作用产物,沉降系数分布基本上与葡甘露聚糖对照相似(参见 Abdelhameed 等, Carbohydrate Polymers, 2010)。然而在藻酸盐存在下,情况则变得不同。如图 19A 所示,基于较高沉降系数材料的出现,未加热的三元混合物在 13%、17%、21%、直到 24% 的藻酸盐含量时表现出某种相互作用,但是在藻酸盐浓度超过 27% 时没有观察到明显的影响。对于经过热处理的样品,如图 19B 所示,在藻酸盐浓度超过约 8% 时观察到复合物,这与流变学测量结果一致。需要指出的是,经过热处理 1 小时的一些较高藻酸盐含量的样品,例如 A21H1 (21% 藻酸盐混合物、加热 1 小时)、A24H1、A27H1、A30H1,以及所有包含藻酸盐且经过四小时处理的样品在热处理过程之后形成凝胶,且不能通过沉降速度法进行分析。这暗示了在原始溶液中强度足以使它们形成凝胶状态的相互作用的存在。相反,在未加热的样品中的分子间相互作用不足以促进这种凝胶化现象。

[0485] 结论

[0486] 葡甘露聚糖、黄原胶和藻酸盐的混合物表现出相互作用产物的存在,其在添加适量的电解质之后消除。这些观察结果与三元混合物内部的可以通过包含使离子强度超过 0.01M 的支持电解质来抑制的相互作用一致。所述相互作用不是化学计量的,因为有相当比例的材料在较低沉降系数(<3.5S,在本申请人研究的条件下)时沉降。

[0487] 4. 用氯化钙对 VFC 和藻酸钠进行的对比处理

[0488] 基本原理:

[0489] 颗粒化的 VFC (PGX®) 在水中产生高粘性的溶液,但是不形成内聚性凝胶。上

述的结果与三种组分（魔芋甘露聚糖、黄原胶和藻酸盐）在聚合物水平形成复合物的相互作用一致。为了确定是否可以从 VFC 分离藻酸盐，进行了实验来检验是否可以通过钙离子从溶液中的 VFC 分离藻酸盐。已知藻酸盐具有钙介导的沉淀和凝胶化特性（K. Clare, "Algin," Whistler R. L. and BeMiller J. N. Eds., Industrial Gums, Academic Press 116(1993); A. Haug 等, Acta Chem. Scand. 19 :341-351(1965)）。取决于钙添加的模式，纯的藻酸钠溶液强烈地且瞬时地与加入的钙离子反应，形成沉淀物或凝胶（Clare 等. (1993); Haug 等. (1965)）。因此，在典型的凝胶反应中，将不溶性钙盐例如无水磷酸二钙加入到藻酸钠溶液中，随后加入缓慢释放大分子酸例如葡萄糖酸- $\delta$ -内酯(glucono delta-lactone)引起  $Ca^{++}$  离子缓慢被释放，以形成均匀的凝胶。然而，如果  $Ca^{++}$  离子是迅速加入的，如在氯化钙的情况中，则发生瞬时的沉淀。已知藻酸盐大分子的聚古洛糖醛酸片段最强烈地与  $Ca^{++}$  离子结合（Kohn 等, Acta Chemica Scandinavica 22:3098-3102(1968)），但是如果这些片段由于与另外两种聚糖中的一种或两种发生相互作用而变得不易受影响，则藻酸钙沉淀可能受到限制。

[0490] 方法：

[0491] 将未经加工的 VFB(TM1) 和经过加工的 / 颗粒化的 **VFC (PGX®)** 在除去离子的蒸馏水中的 0.5% 溶液（在 100g 水中的 0.5g）的等分试样稀释到 0.1、0.05 和 0.01%w/w。在每个浓度，加入 5ml 的 10%CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 溶液并充分混合到溶液以实现 0.5% 的  $Ca^{2+}$  离子浓度。还对以下溶液进行相同的  $Ca^{2+}$  离子添加：(1) 包含与未经加工的 VFB(TM1) 和经过加工的 / 颗粒化的 **VFC (PGX®)** 溶液相同藻酸盐浓度的单独的藻酸钠的对照溶液的平行系列；(2) 与未经加工的 VFB(TM1) 和经过加工的 / 颗粒化的 **VFC (PGX®)** 的 0.5% 溶液相同藻酸钠浓度（以在 100g 水中克数表示）和相同的两种聚糖的相对比例的魔芋甘露聚糖或黄原胶与藻酸钠的二元混合物的溶液。使溶液静置 30 分钟，然后肉眼检查沉淀物的存在与否。

[0492] 结果：

[0493] 结果如下表 20 中所示。

[0494] 表 20 : 样品浓度和结果

	% VFC(颗粒化的 PGX®) (批号 900495)	钙沉淀 (Y/N)	藻酸钠% (批号 2638)	钙沉淀 (Y/N)
[0495]	0.5	N	0.075	Y
	0.1	N	0.015	Y
	0.05	N	0.0075	Y
	0.01	N	0.001	N

[0496] 如表 20 中概述的结果所示，显然在 0.5% $Ca^{++}$  离子的存在下、在低至至少 0.0075% 的水平出现藻酸钙沉淀，而在颗粒化的 **VFC (PGX®)** 溶液中在低至等效的藻酸盐水平时没有沉淀的迹象。这一发现与 VFB/C 组分在溶液中相互作用以形成接合区域和网络（即，聚糖结构的二级和三级水平）相一致，所述相互作用阻止了各组分表现出它们在纯状态时表现

出的性能。在相应的藻酸钠溶液中形成了藻酸钙沉淀,除了包含的藻酸盐不足以被 0.5%Ca<sup>++</sup> 离子沉淀的最稀的溶液之外。

[0497] 总的结论:

[0498] 在颗粒化的**VFC (PGX®)**中的藻酸盐行为的这项研究中,证实了在通过加入氯化钙迅速引入钙离子时没有发生沉淀或凝胶化。在平行的对照实验中,将氯化钙加入到递减浓度的藻酸钠的纯溶液中,即使在极低的藻酸盐浓度时仍产生了藻酸钙的瞬时沉淀物。这些结果提示,在魔芋葡甘露聚糖和黄原胶的存在下,溶液中通常强烈地结合 Ca<sup>++</sup> 离子的藻酸盐大分子中的聚古洛糖片段在 VFB/C 溶液中较少量可用于(或完不能用于)藻酸钠的这种相互作用。这可能是由于大分子的这些片段由于选择性的与另外两种聚糖中的一种或两种的相互作用而不易受 Ca<sup>++</sup> 离子影响或不能被 Ca<sup>++</sup> 离子接近。在将 Ca<sup>++</sup> 离子加入到魔芋葡甘露聚糖或黄原胶与藻酸钠的二元溶液中时观察到了藻酸钙沉淀,这提示需要另外两种聚糖同时存在才能发生与藻酸钠的相互作用。

[0499] 总的结果的讨论:

[0500] 实施例 5 中所述的 VFB/C 的一级结构分析结果表明,在造粒之后,存在于颗粒化的 VFC 中的成分聚糖的一级结构保持没有变化,而在包括热量输入的加工之前(TM1)或之后(颗粒化的 VFC)都没有发生共价相互作用。然而,这个实施例中所述的大分子结合的分析结果揭示确实发生了非共价相互作用,产生了在 VFB/C 中在大分子水平产生的新的聚糖复合物。流变学研究明确表明了未经加工的/未颗粒化的 VFB(TM1)和颗粒化的**VFC (PGX®)**二者的溶液粘度都比对于混合物中的单独的聚糖的增粘行为的组合所预期的显著更高。VFC 在溶液中的总的流动特性最接近单独的黄原胶的流动特性,但是 VFC 的粘度甚至比黄原胶更高。考虑到在这个实施例中考查的 VFC 的实施方案(70%KM、17%黄原胶、13%藻酸钠)只包含 17%的最强的增粘剂(黄原胶)和 83%的的两种较弱的增粘剂(魔芋甘露聚糖(70%)和藻酸钠(13%)),预期其在水中的流动特性与魔芋甘露聚糖相似。然而,测定到 VFC 的溶液流动特性实际上更接近单独的黄原胶的流动特性,且其粘度甚至比黄原胶更高。

[0501] 在实验室中制备的包含不同藻酸盐含量的三元混合物的溶液的流变学和沉降性能的进一步研究证实了三重的相互作用,且这种三重相互作用通过对溶液的热处理而增强,特别是在混合物的藻酸钠含量大于约 5%时。另外, Ca<sup>++</sup> 离子添加实验表明了另外两种聚糖的同时存在对于防止藻酸钙沉淀是必要的。

[0502] 这些结果证明了,在溶液中,藻酸钠与魔芋葡甘露聚糖和黄原胶相互作用以建立网络和接合区域,从而形成具有以下命名的新的聚糖: $\alpha$ -D-葡萄糖醛酸- $\alpha$ -D-甘露糖- $\beta$ -D-甘露糖- $\beta$ -D-葡萄糖), ( $\alpha$ -L-古洛糖醛酸- $\beta$ -D-甘露糖醛酸),  $\beta$ -D-葡萄糖- $\beta$ -D-甘露聚糖。

[0503] 如实施例 1-4 中所述,已经测得到颗粒化的**VFC (PGX®)**的给药可用于预防、治疗或改善有此需要的受试者的与代谢性疾病或病症有关的一种或多种症状,例如代谢综合征、I 型糖尿病、II 型糖尿病、胰腺疾病或高脂血症。

[0504] 尽管已经举例说明和描述了说明性实施方案,应该理解,可由其产生多种变化而不脱离本发明的主旨和范围。

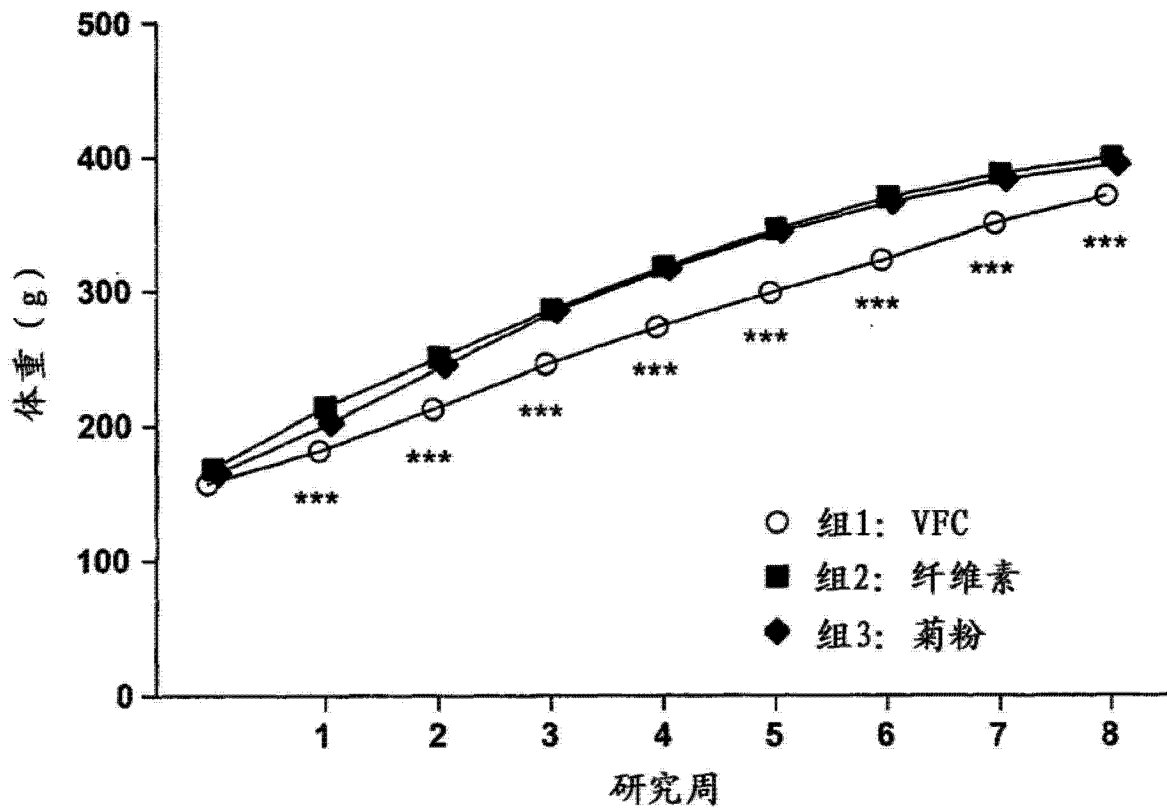


图 1A

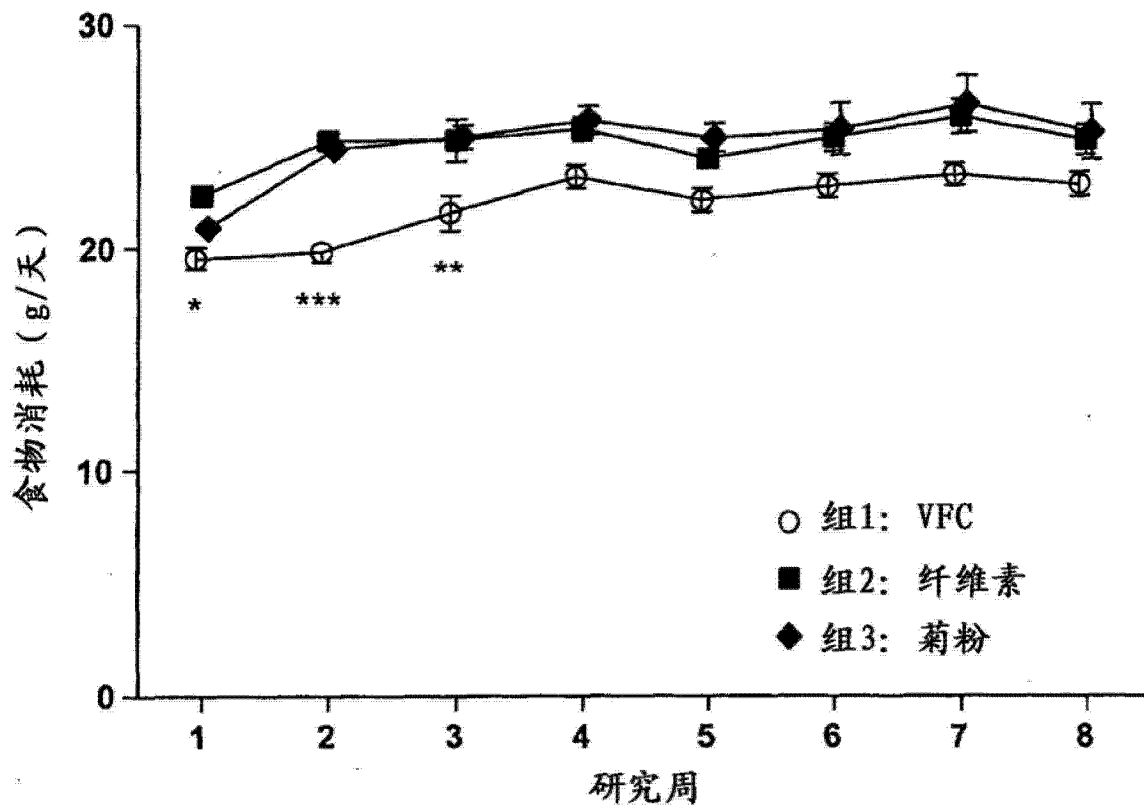


图 1B

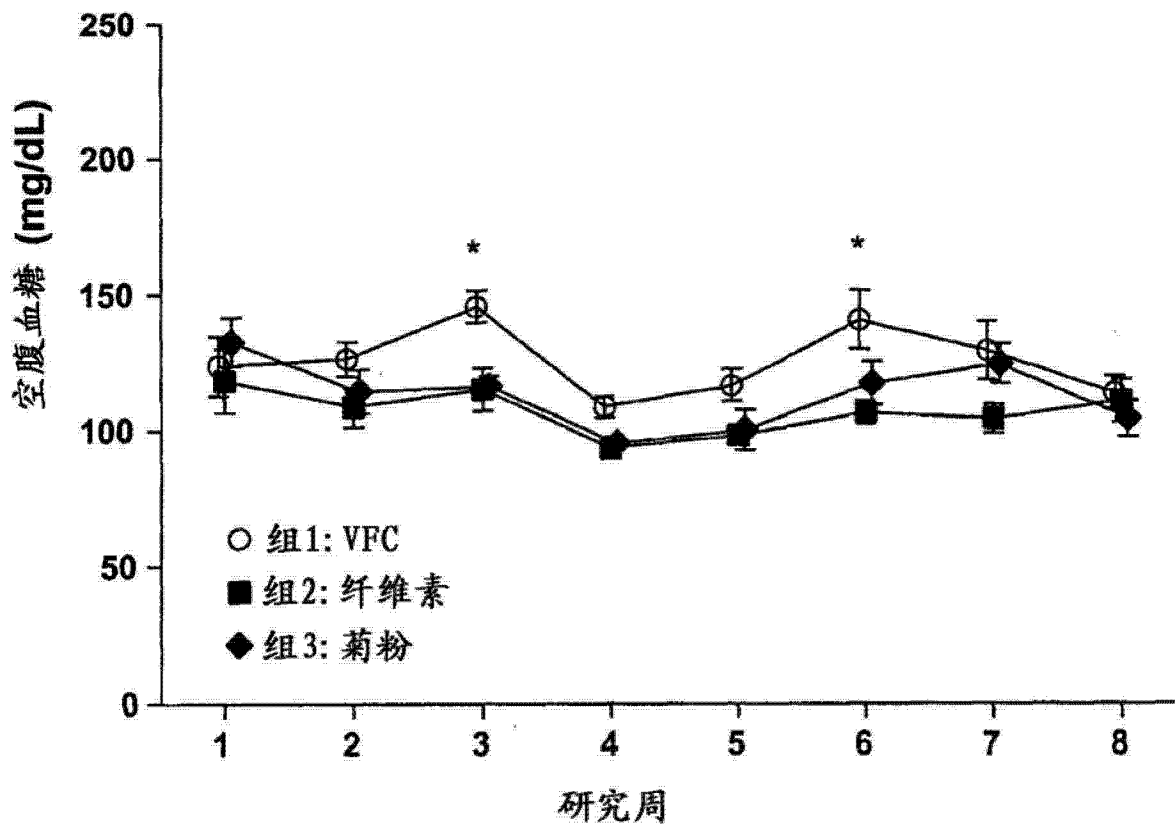


图 2A

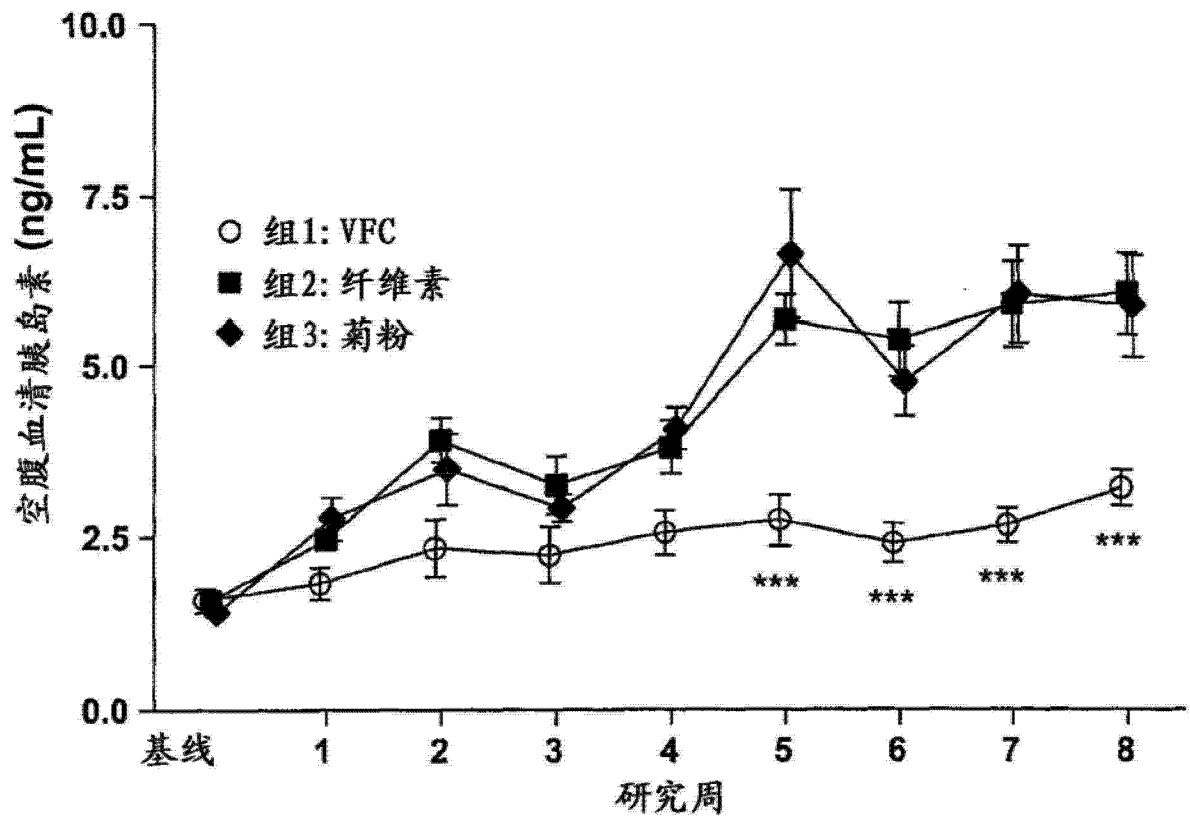


图 2B

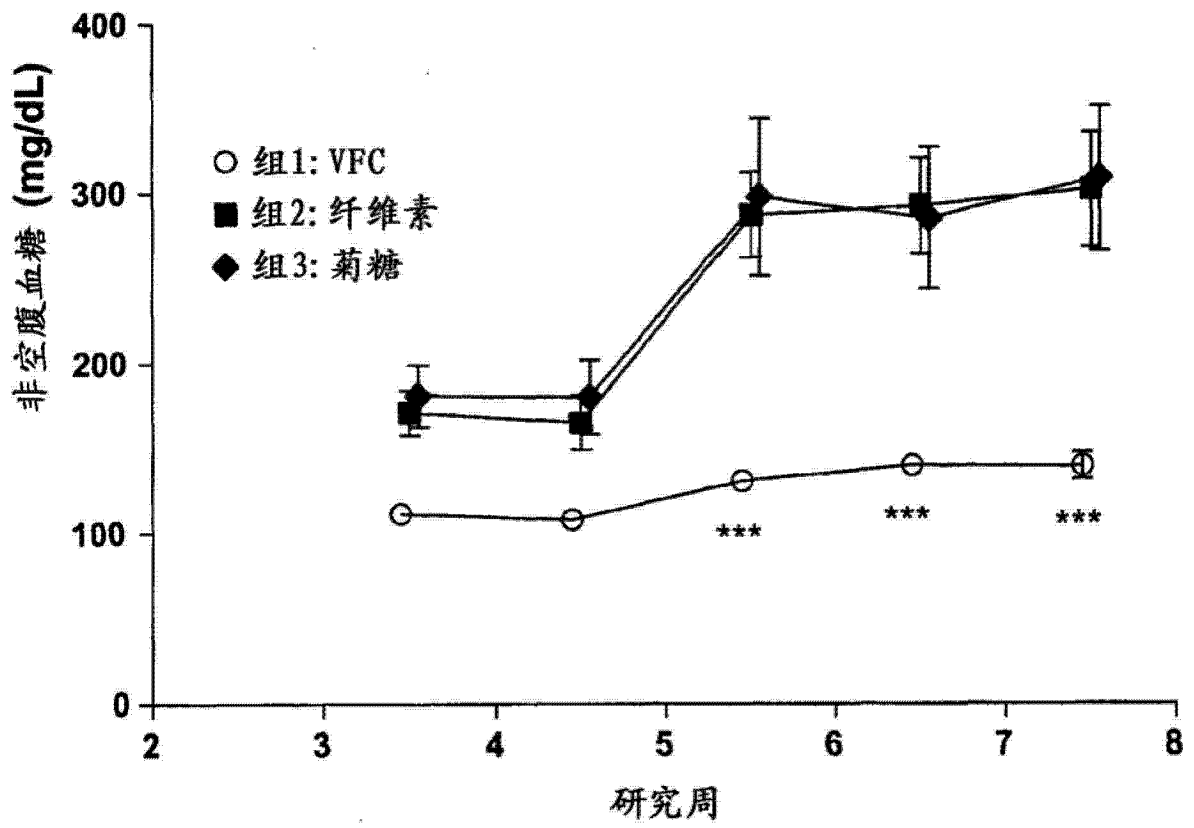


图 2C

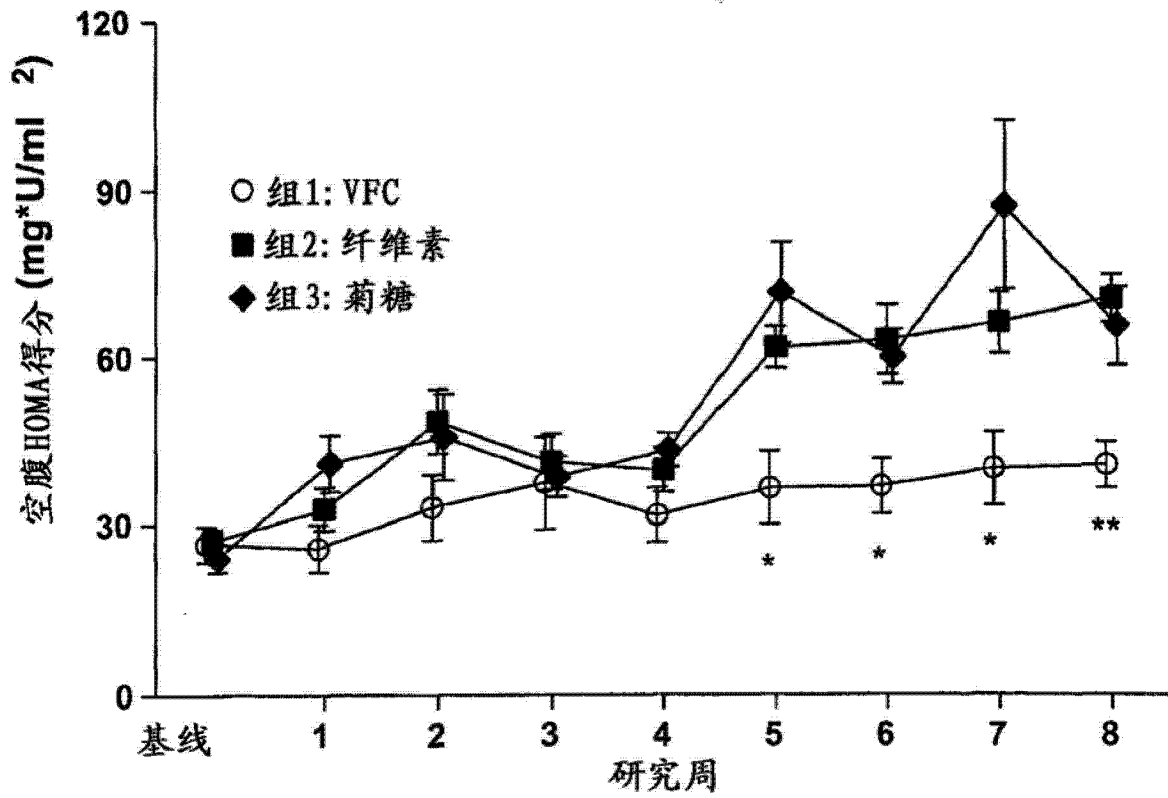


图 2D

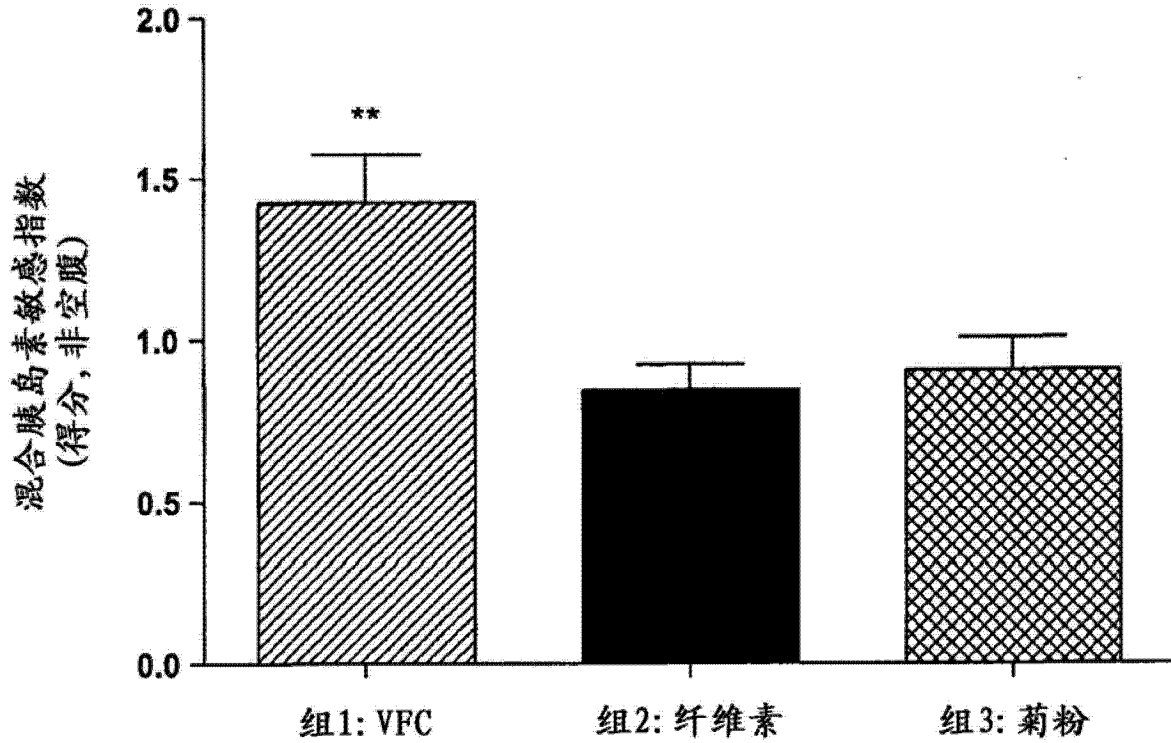


图 3A

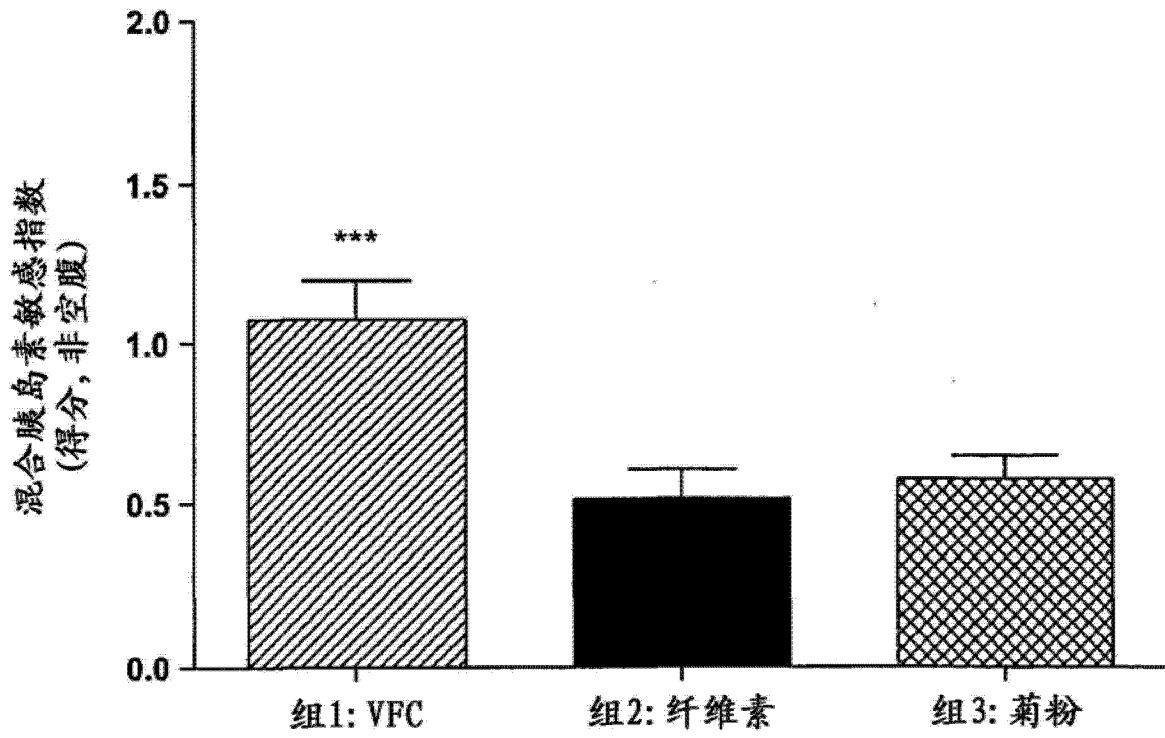


图 3B

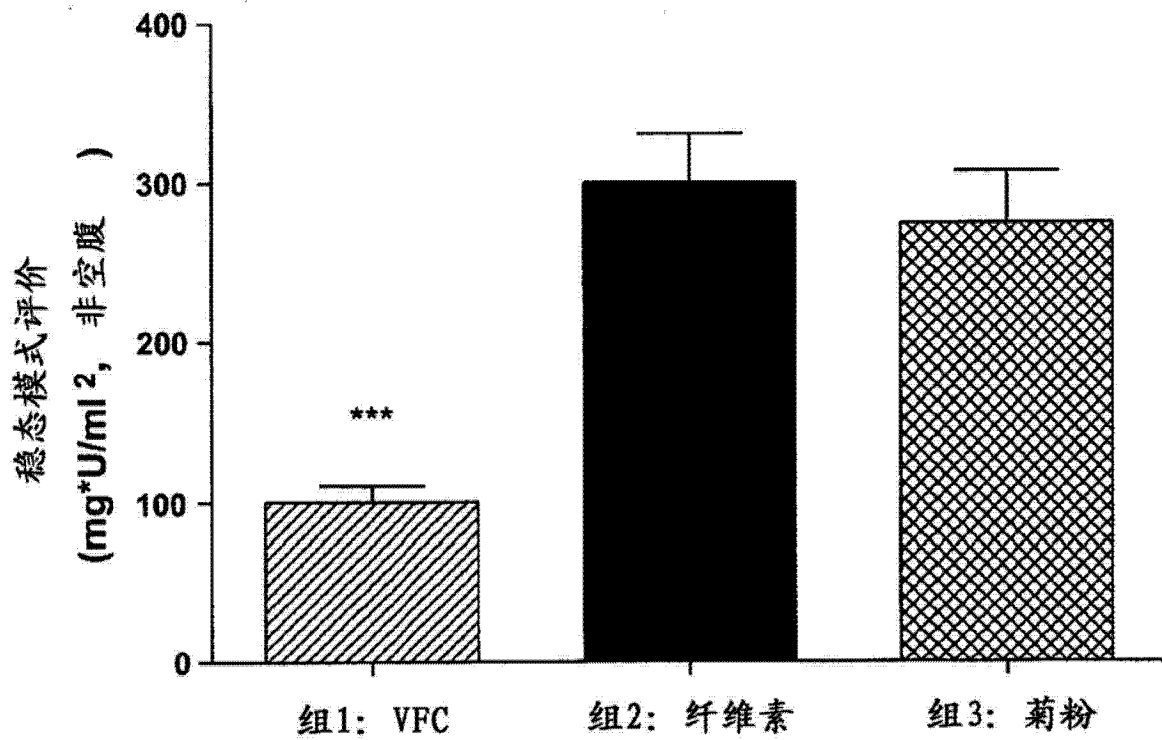


图 3C

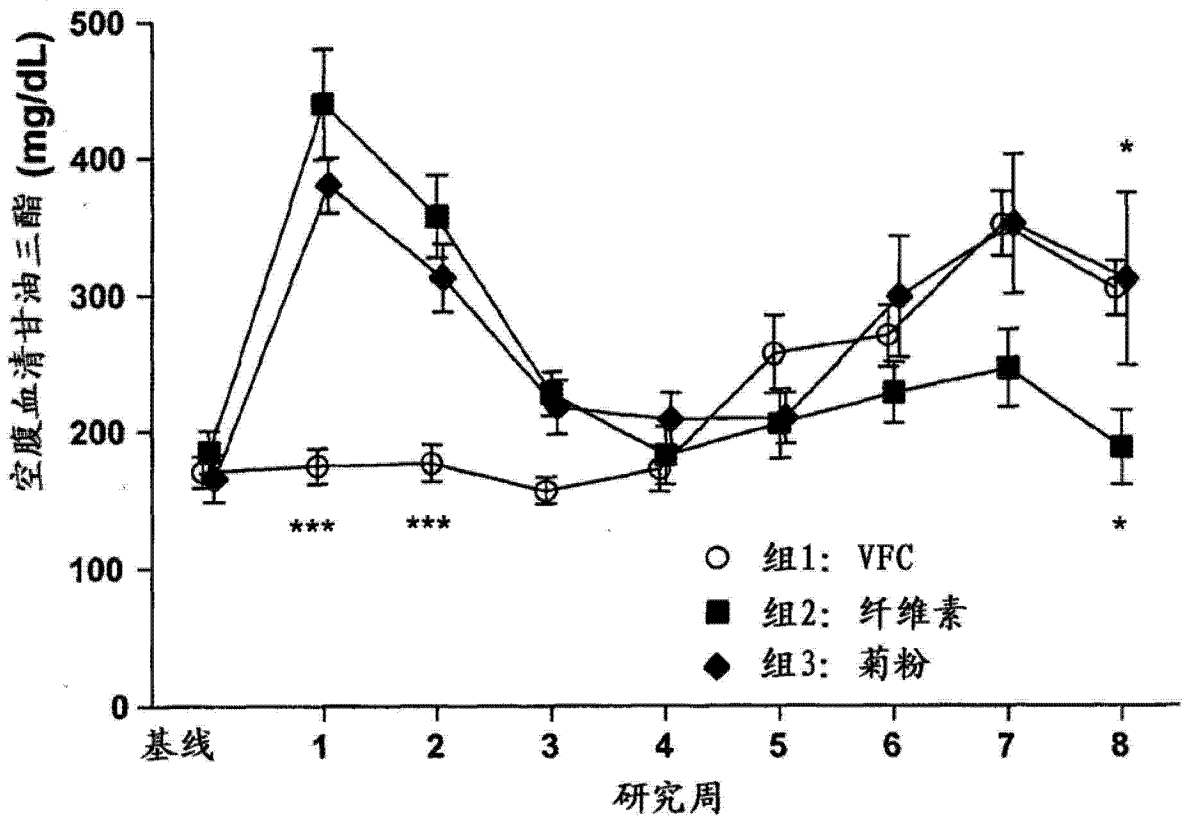


图 4

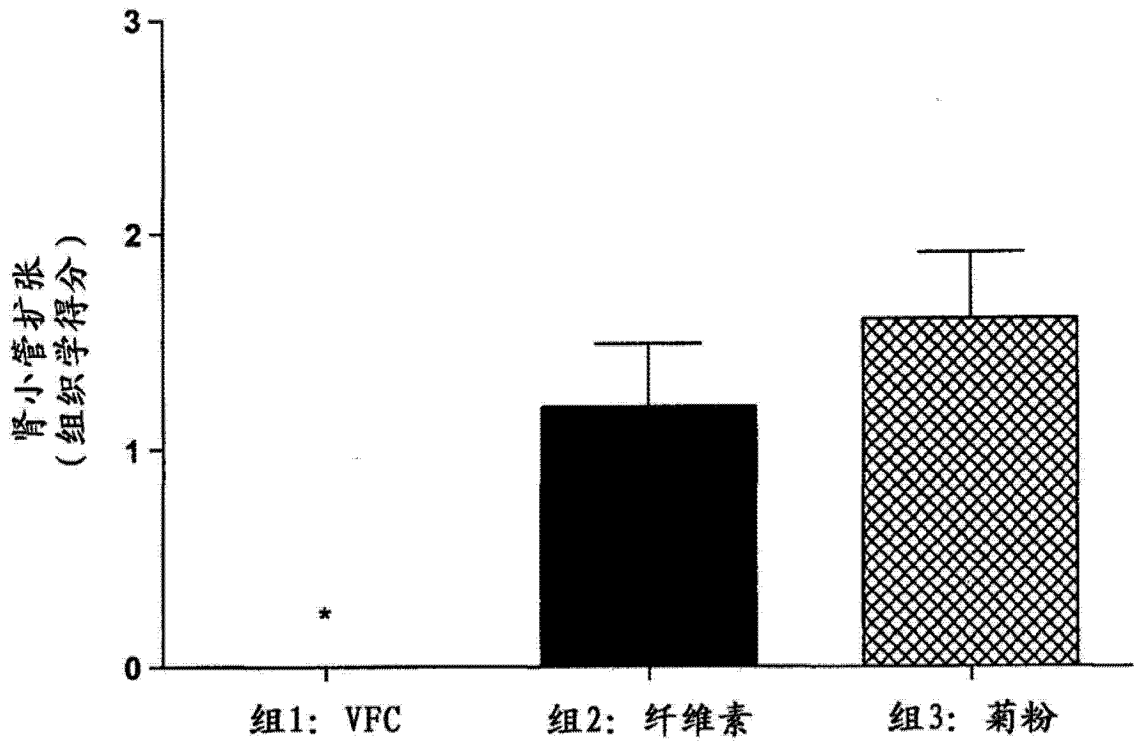


图 5A

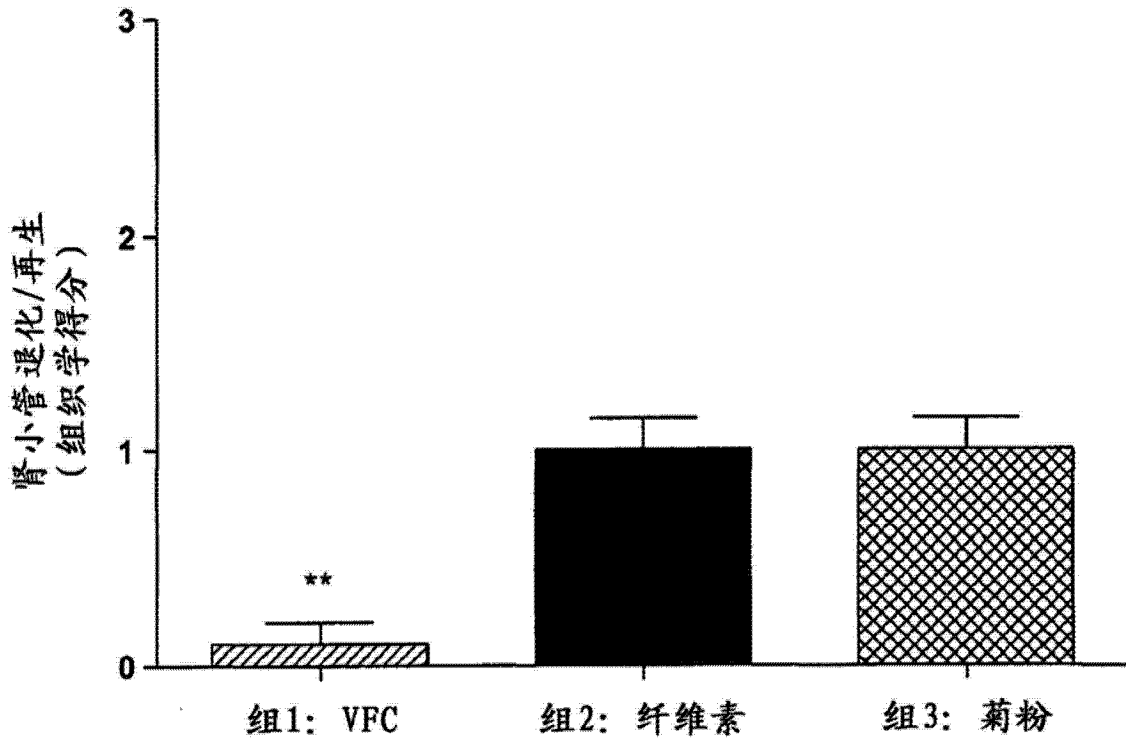


图 5B

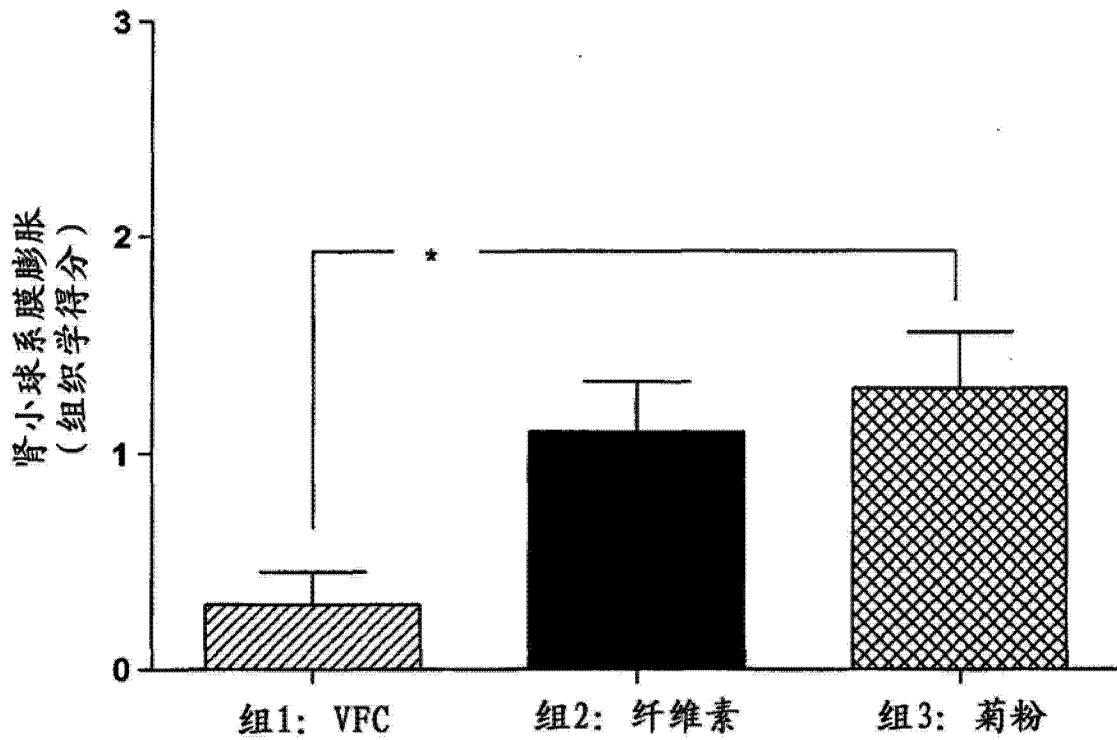


图 5C

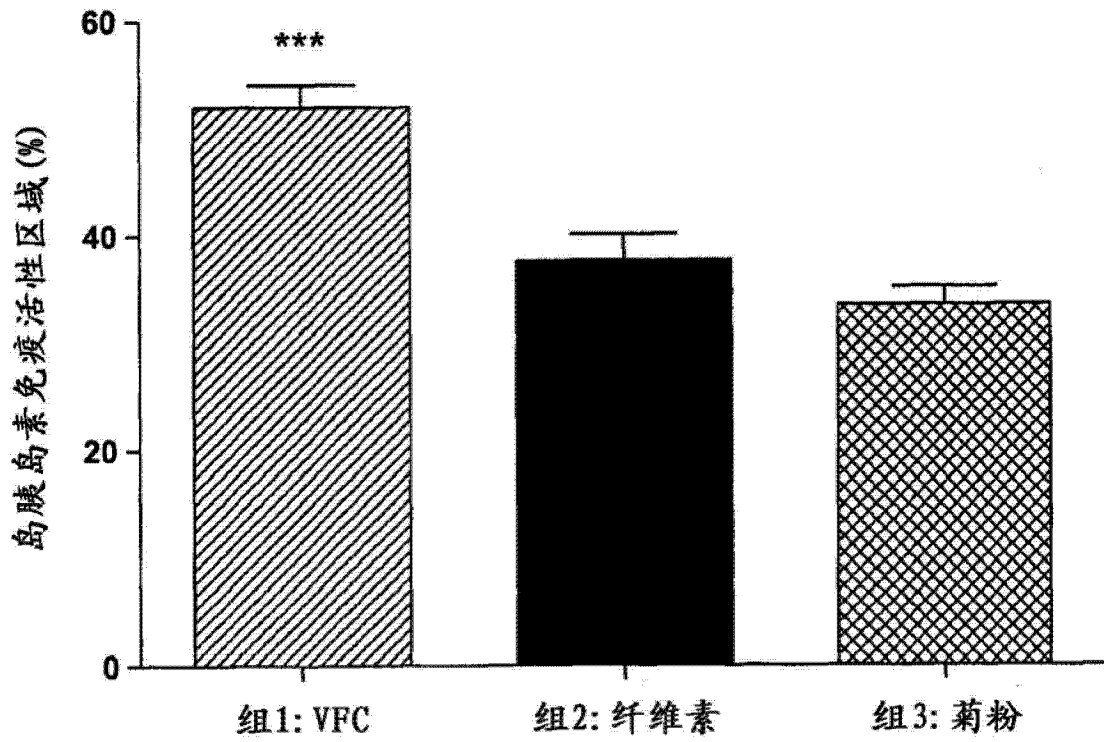


图 6

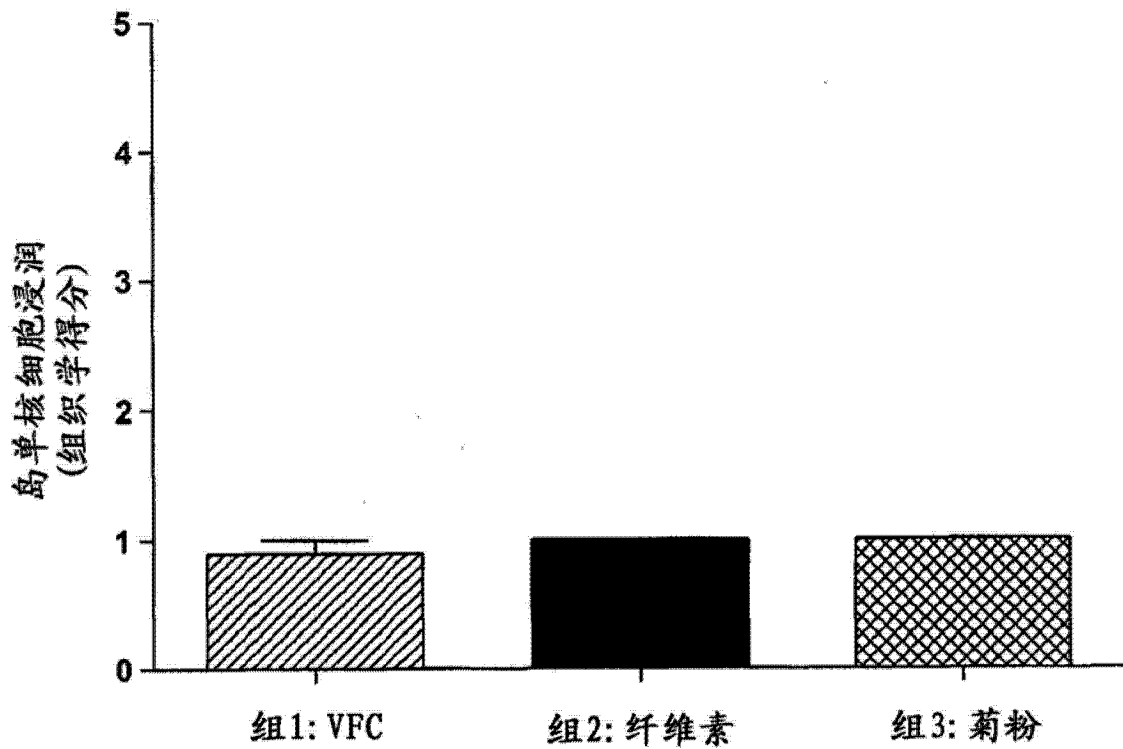


图 7A

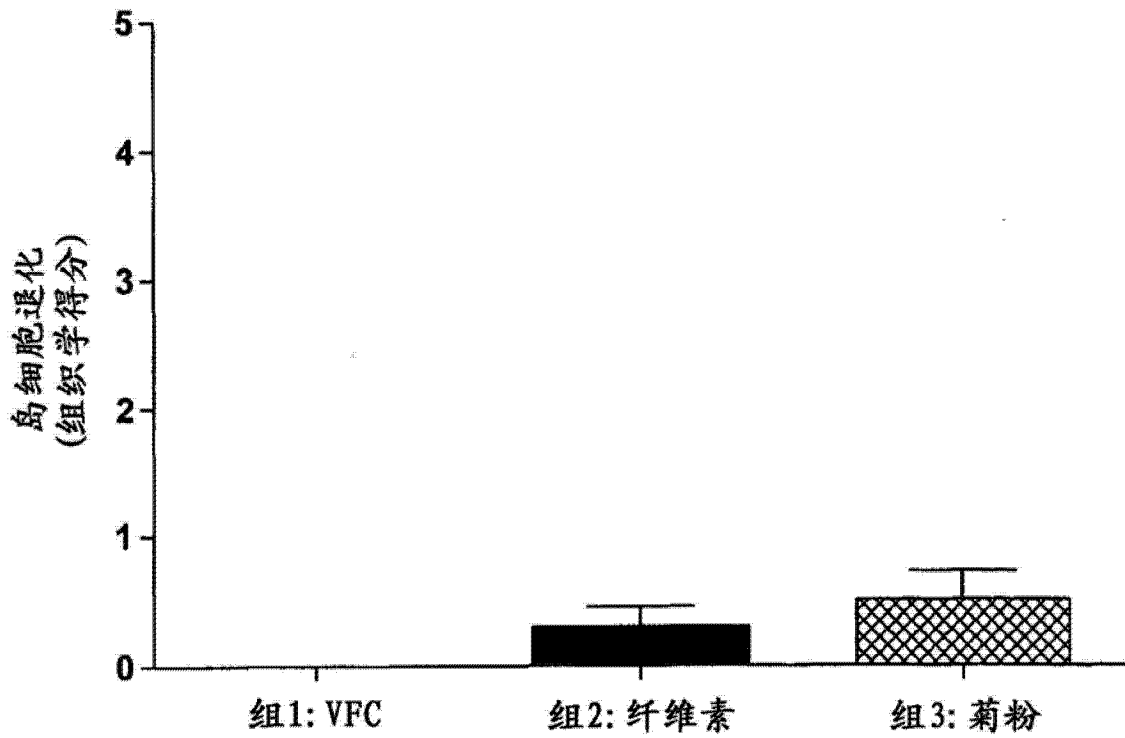


图 7B

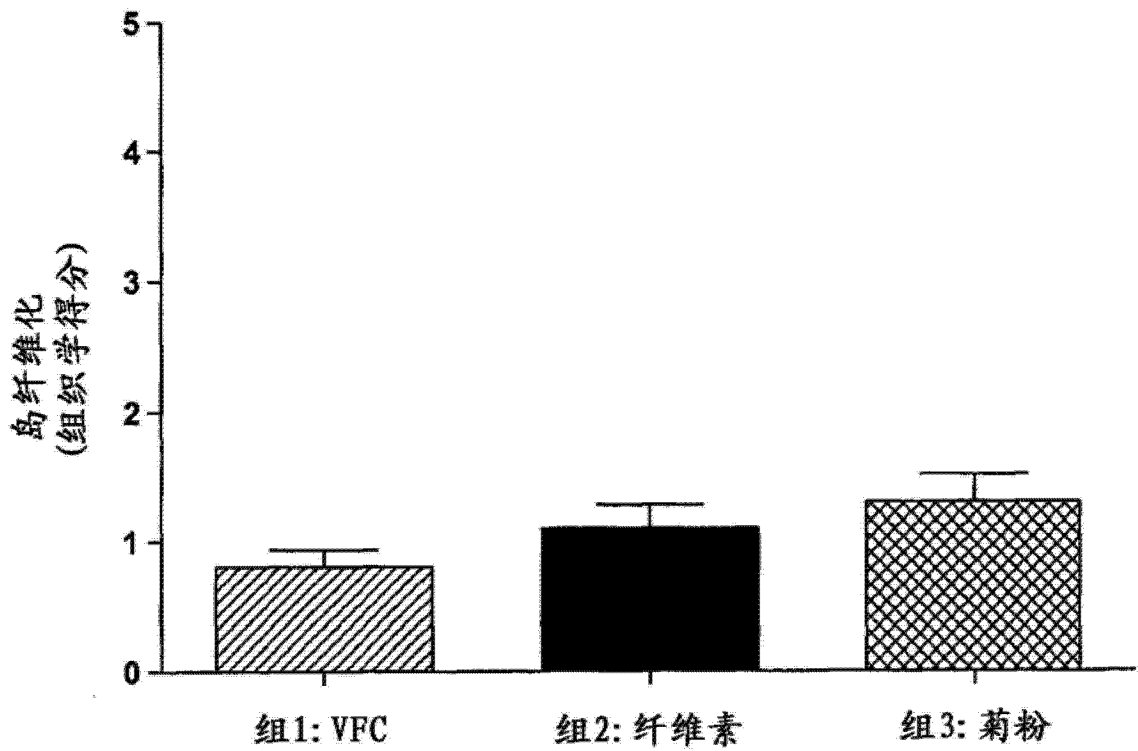


图 7C

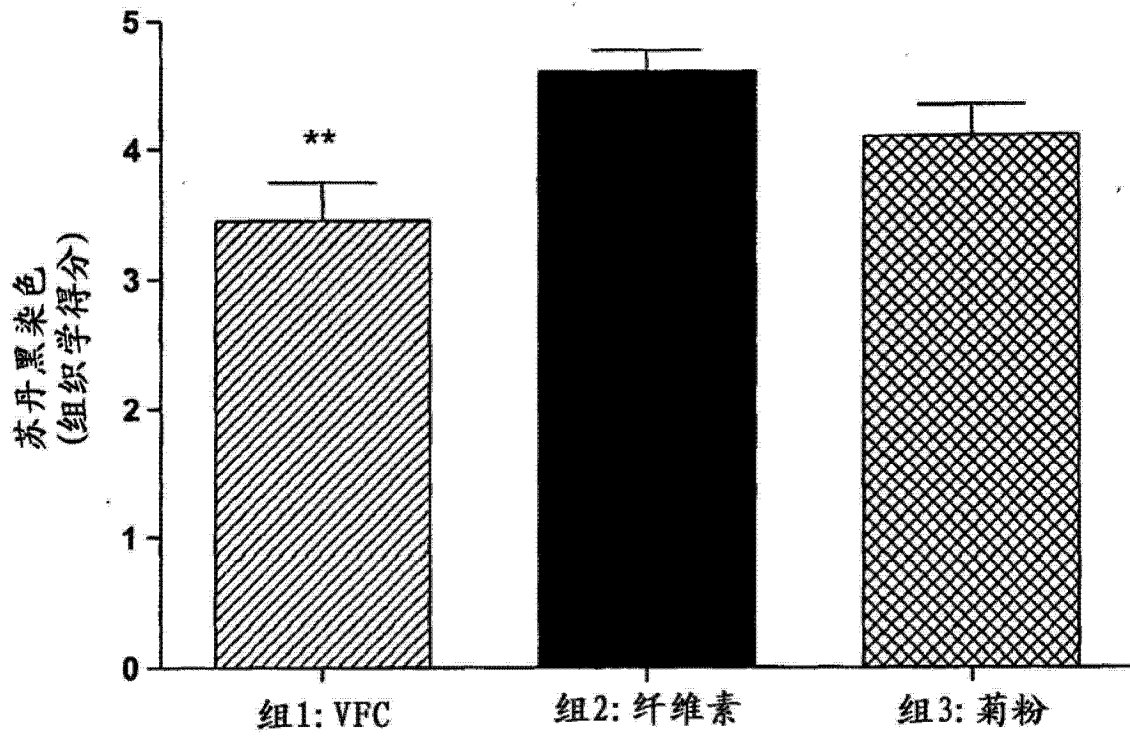


图 8A

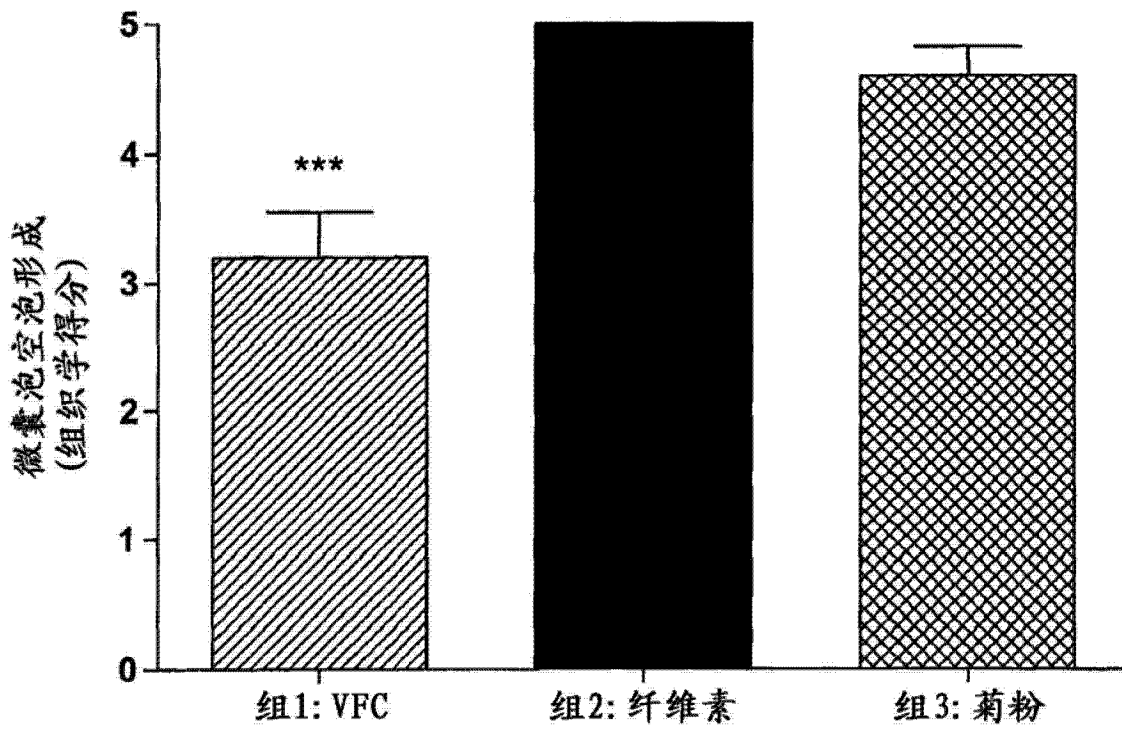


图 8B

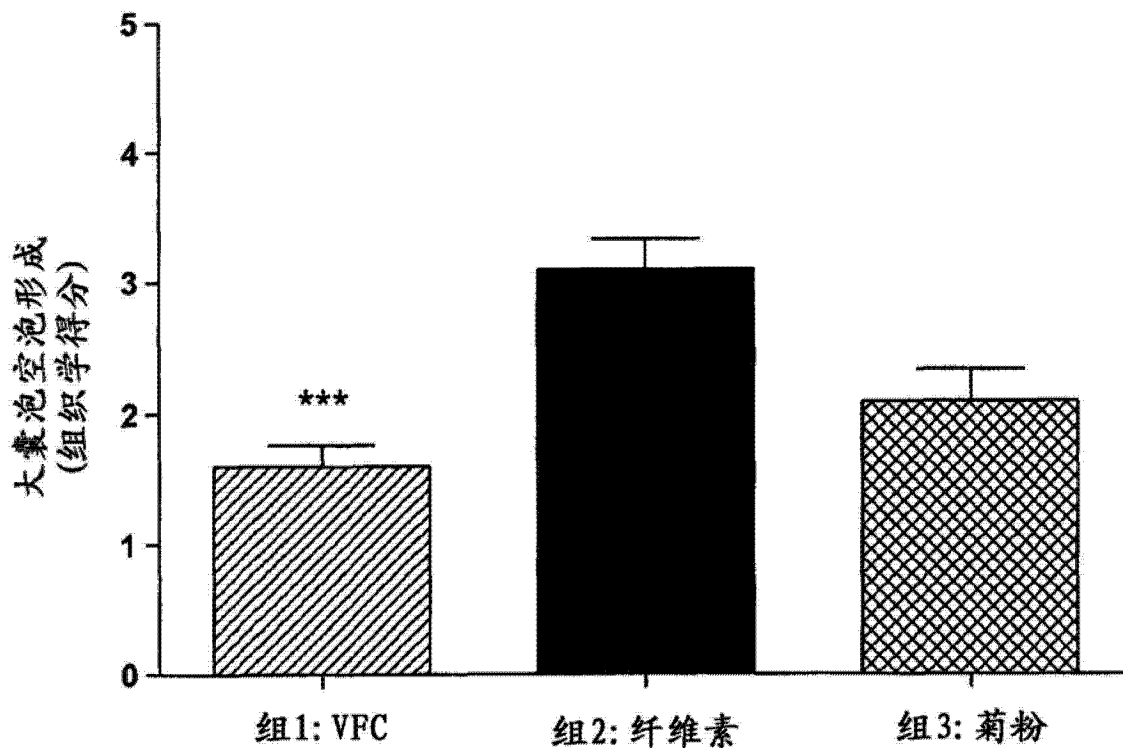


图 8C

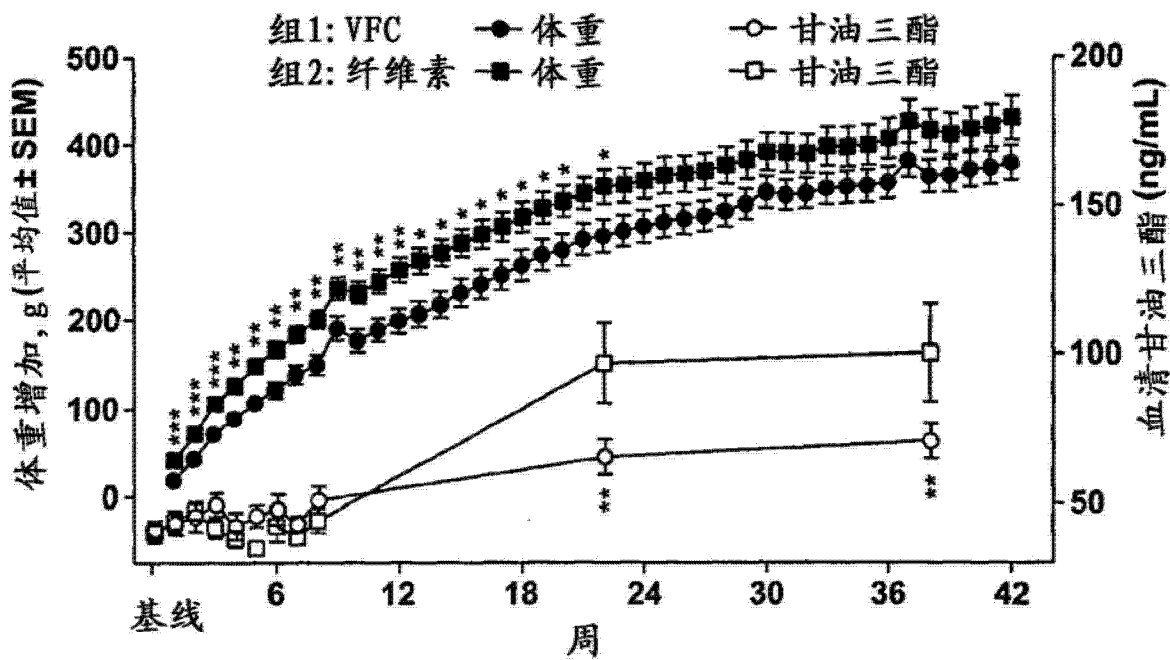


图 9

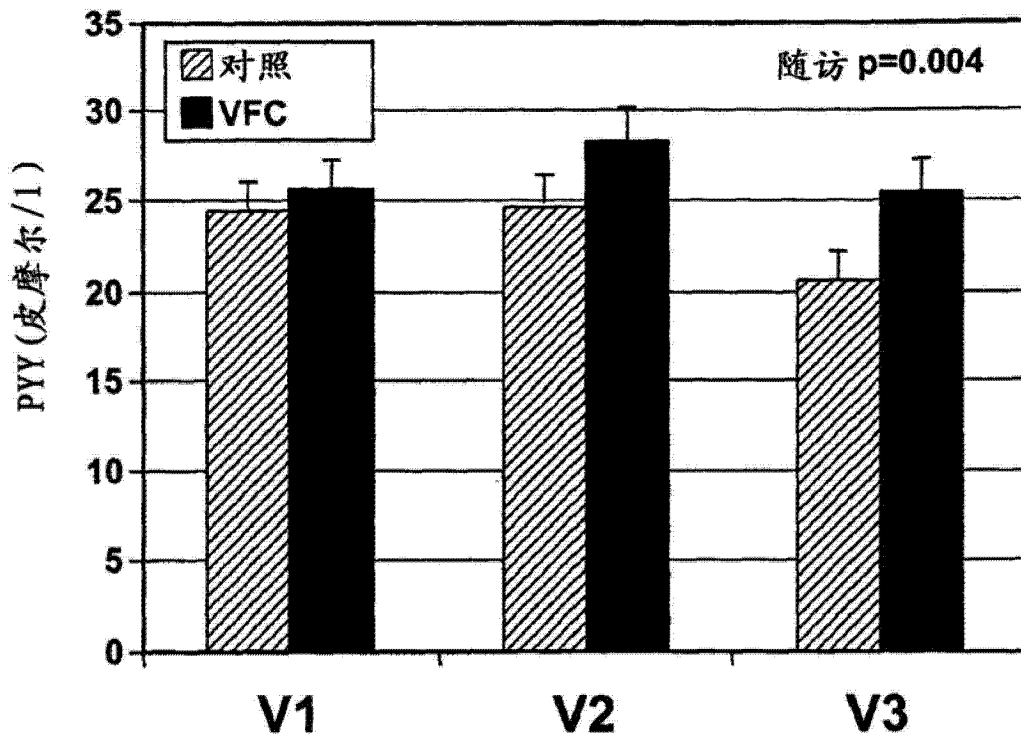


图 10A

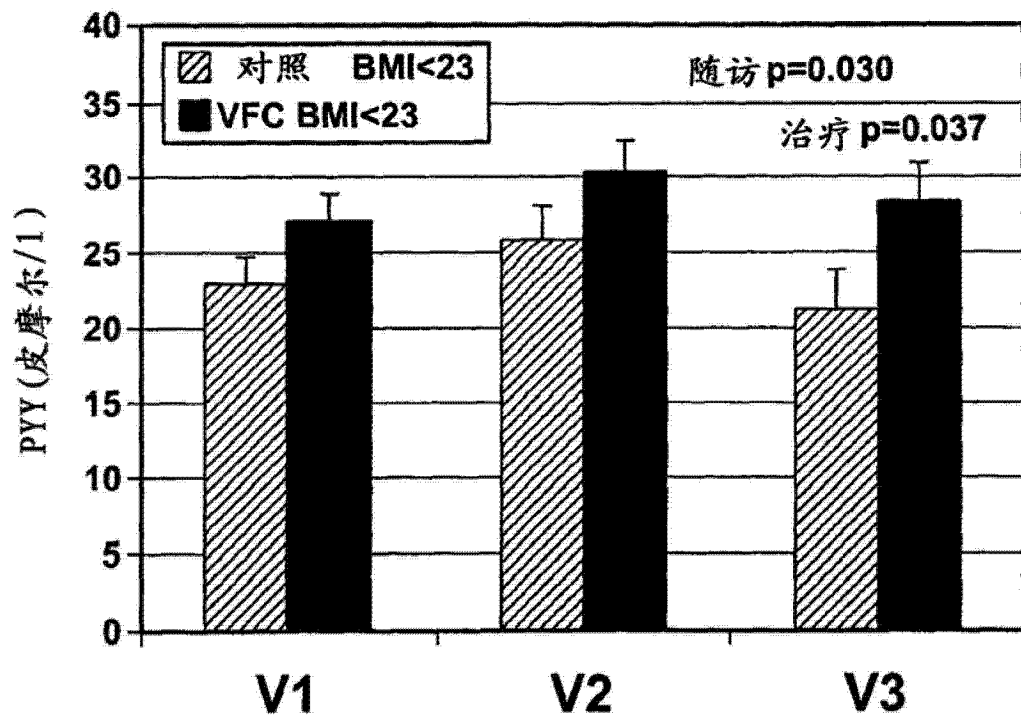


图 10B

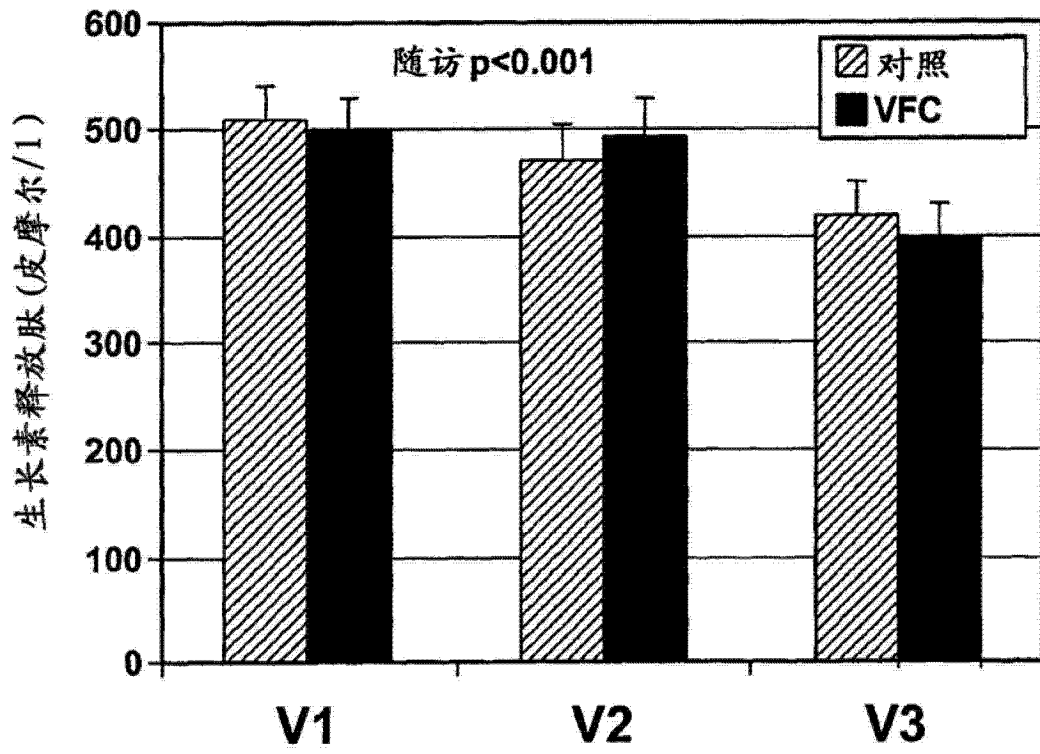


图 10C

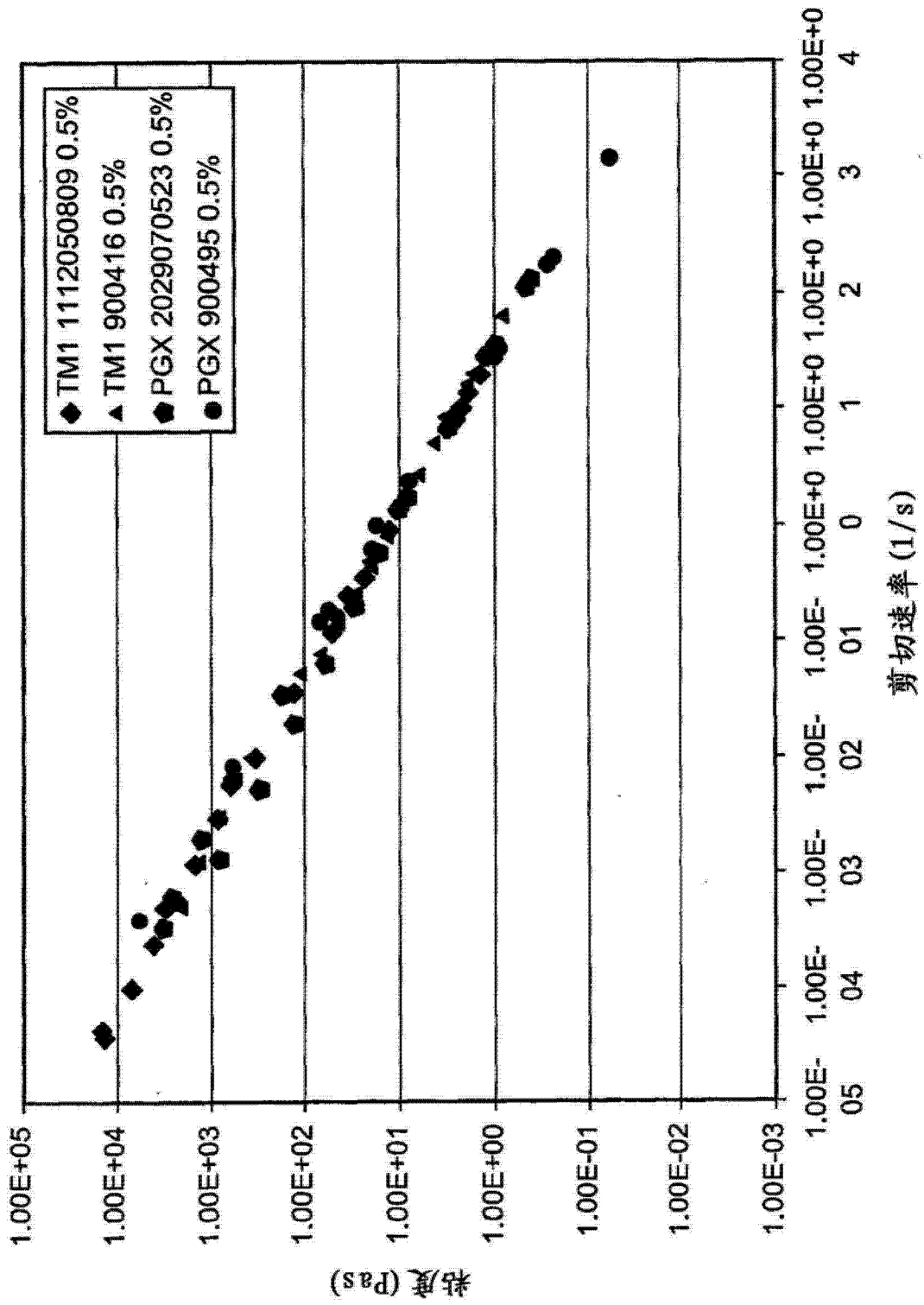


图 11A

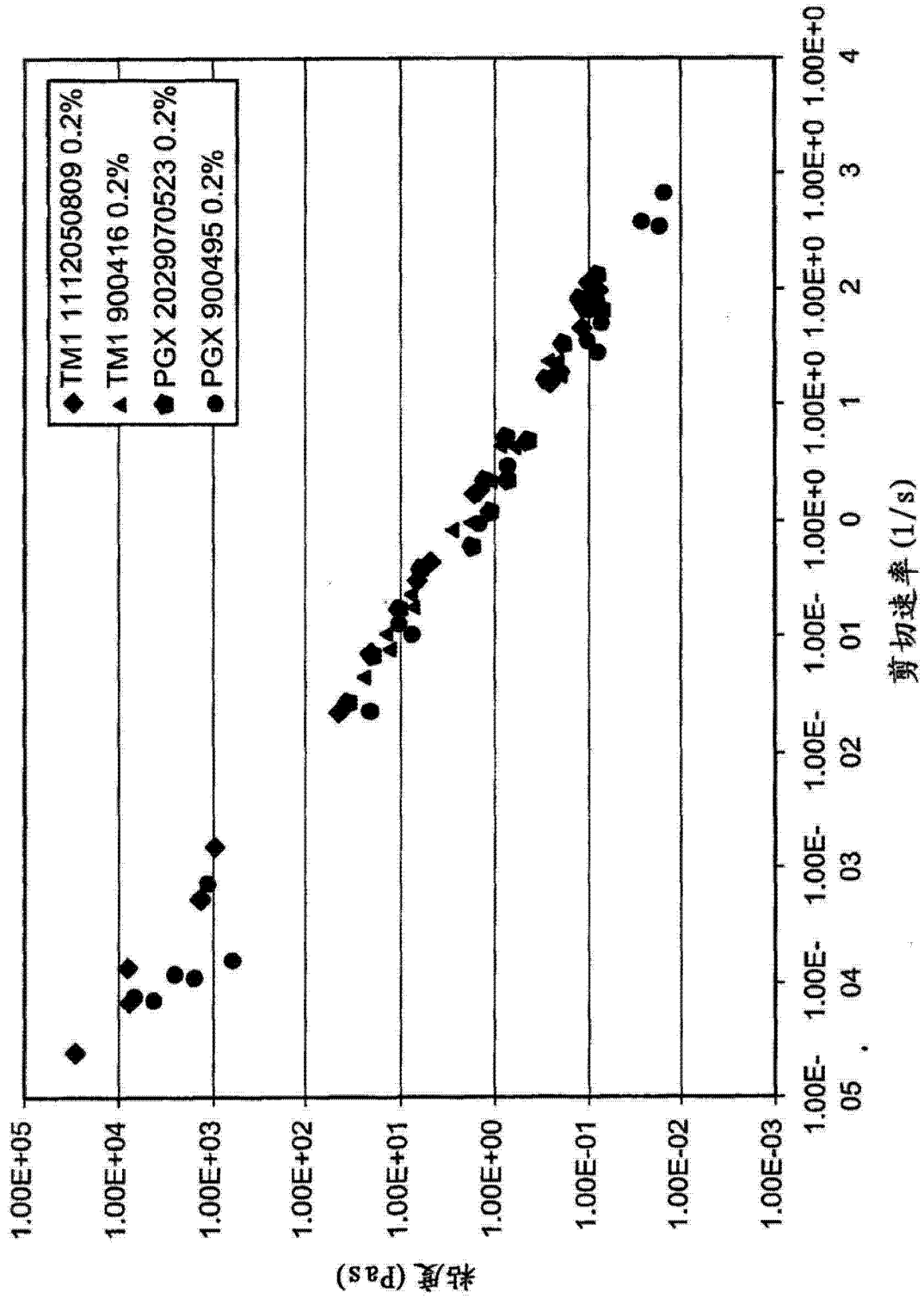


图 11B

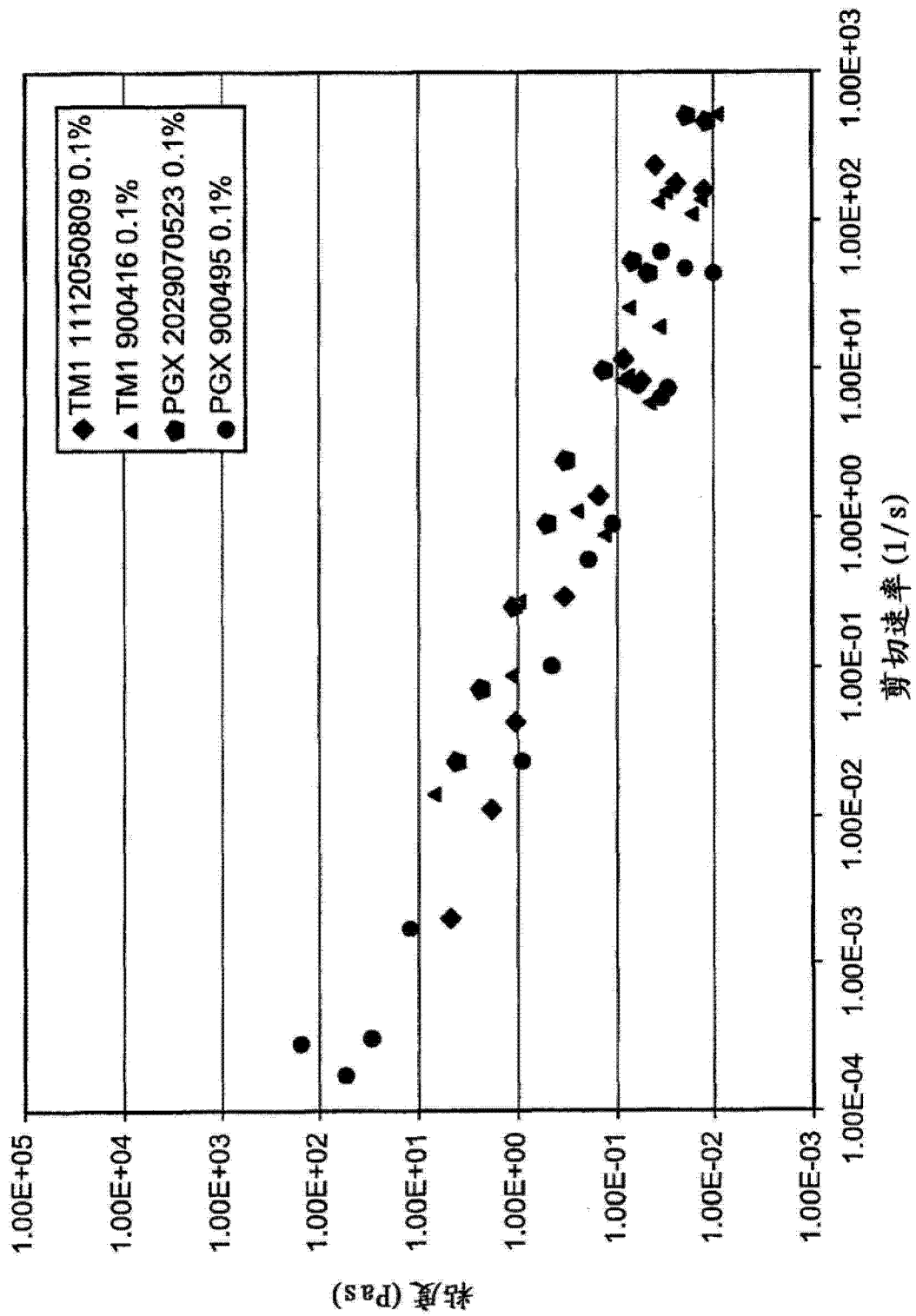


图 11C

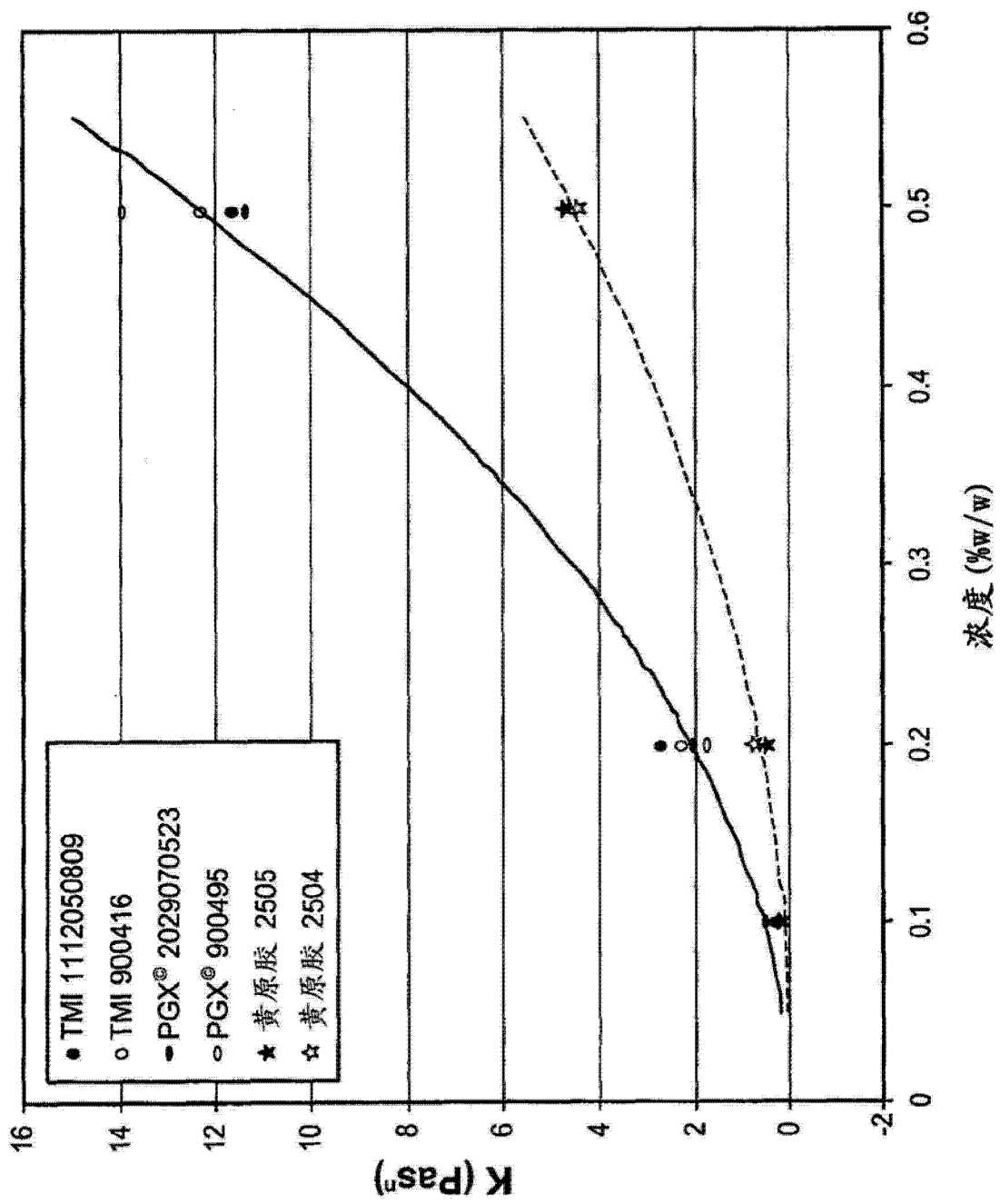


图 12A

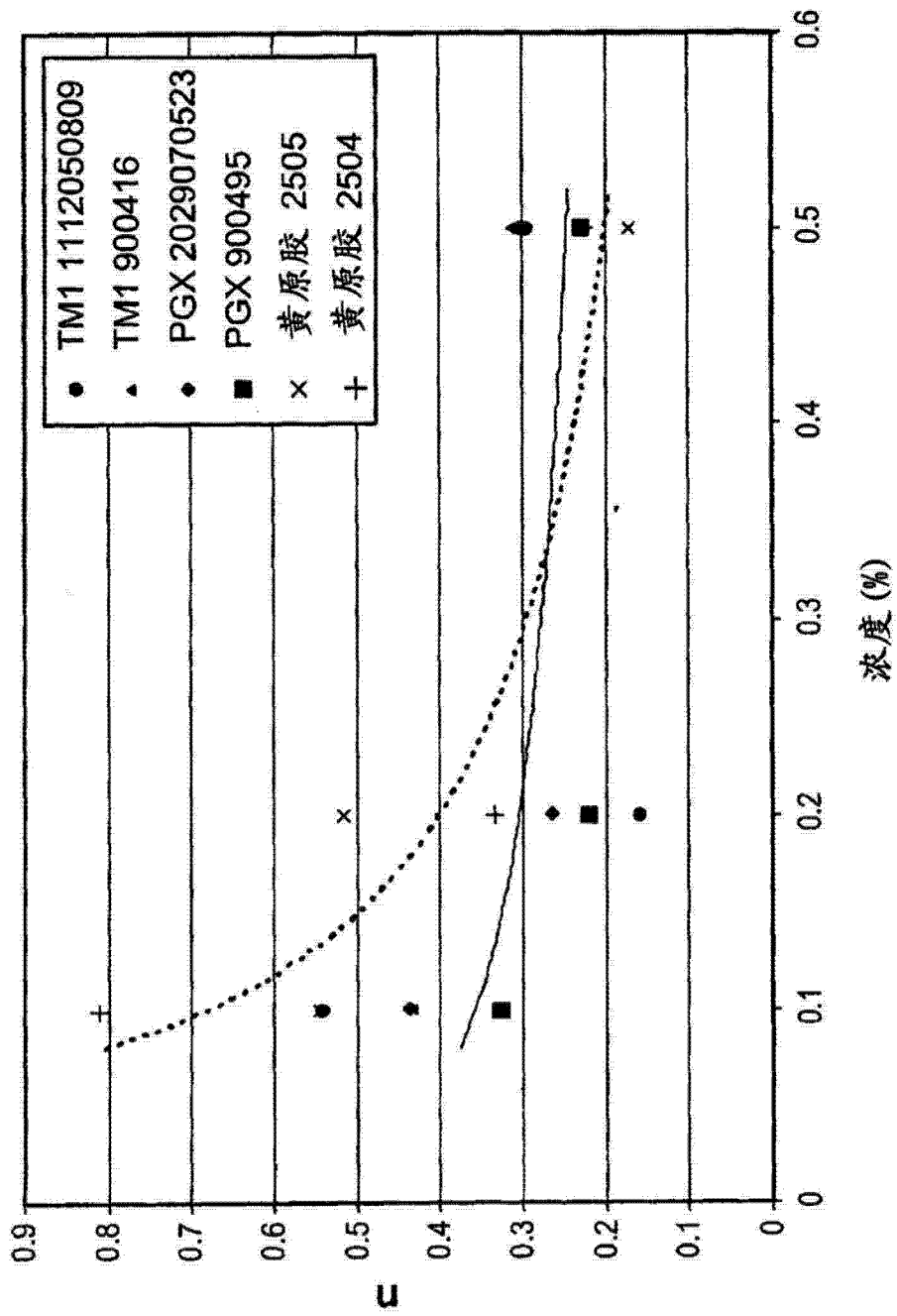


图 12B

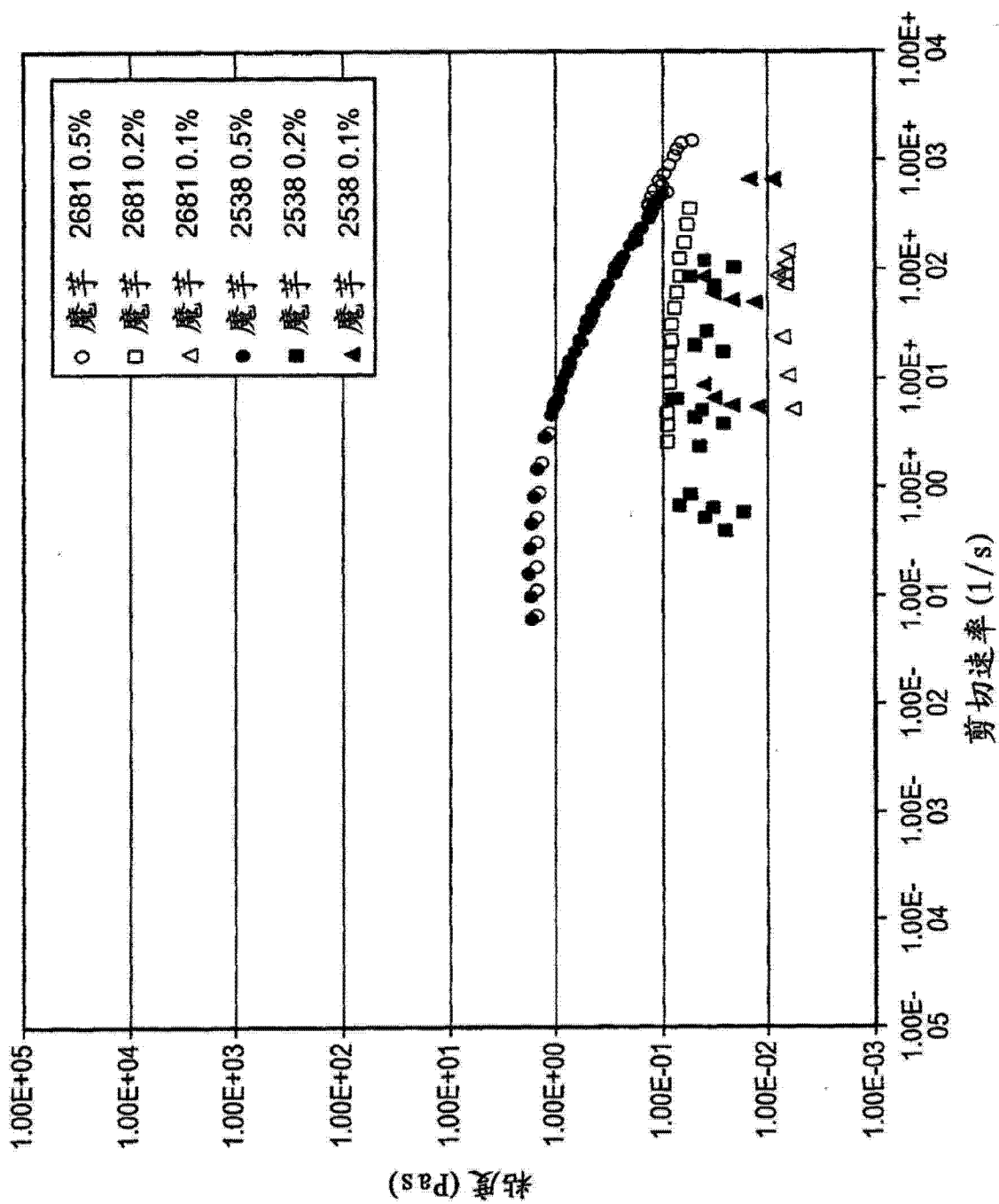


图 13A

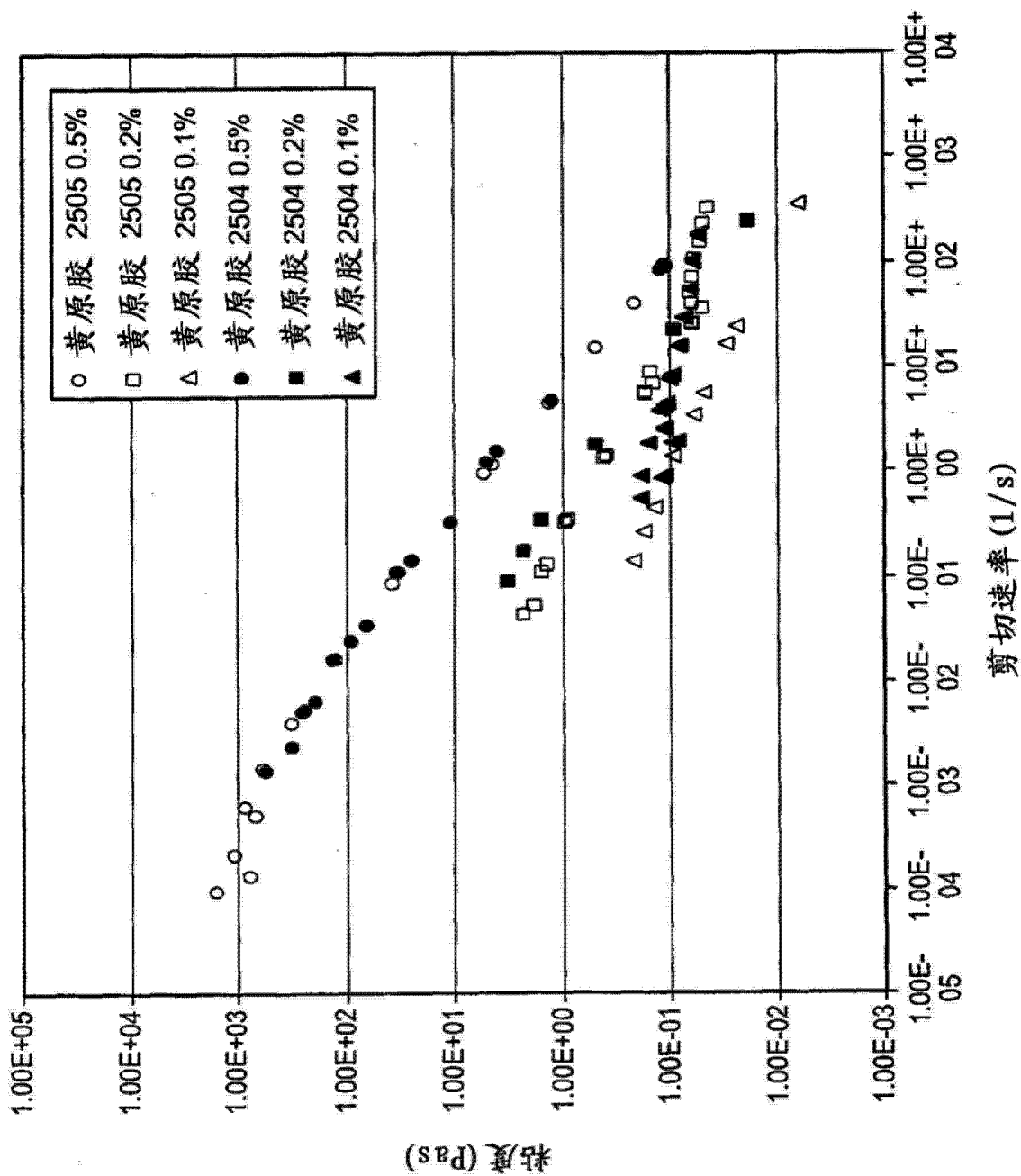


图 13B

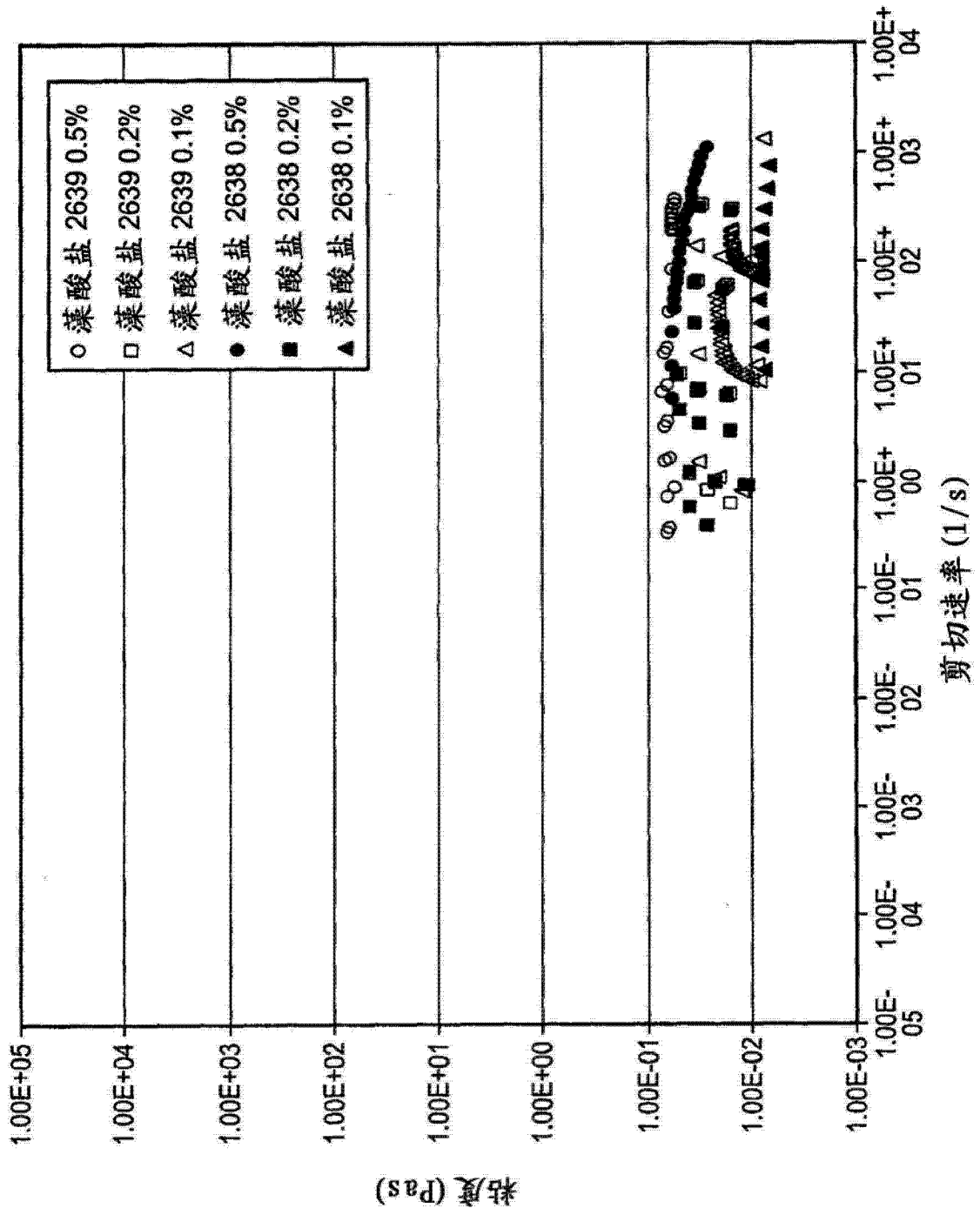


图 13C

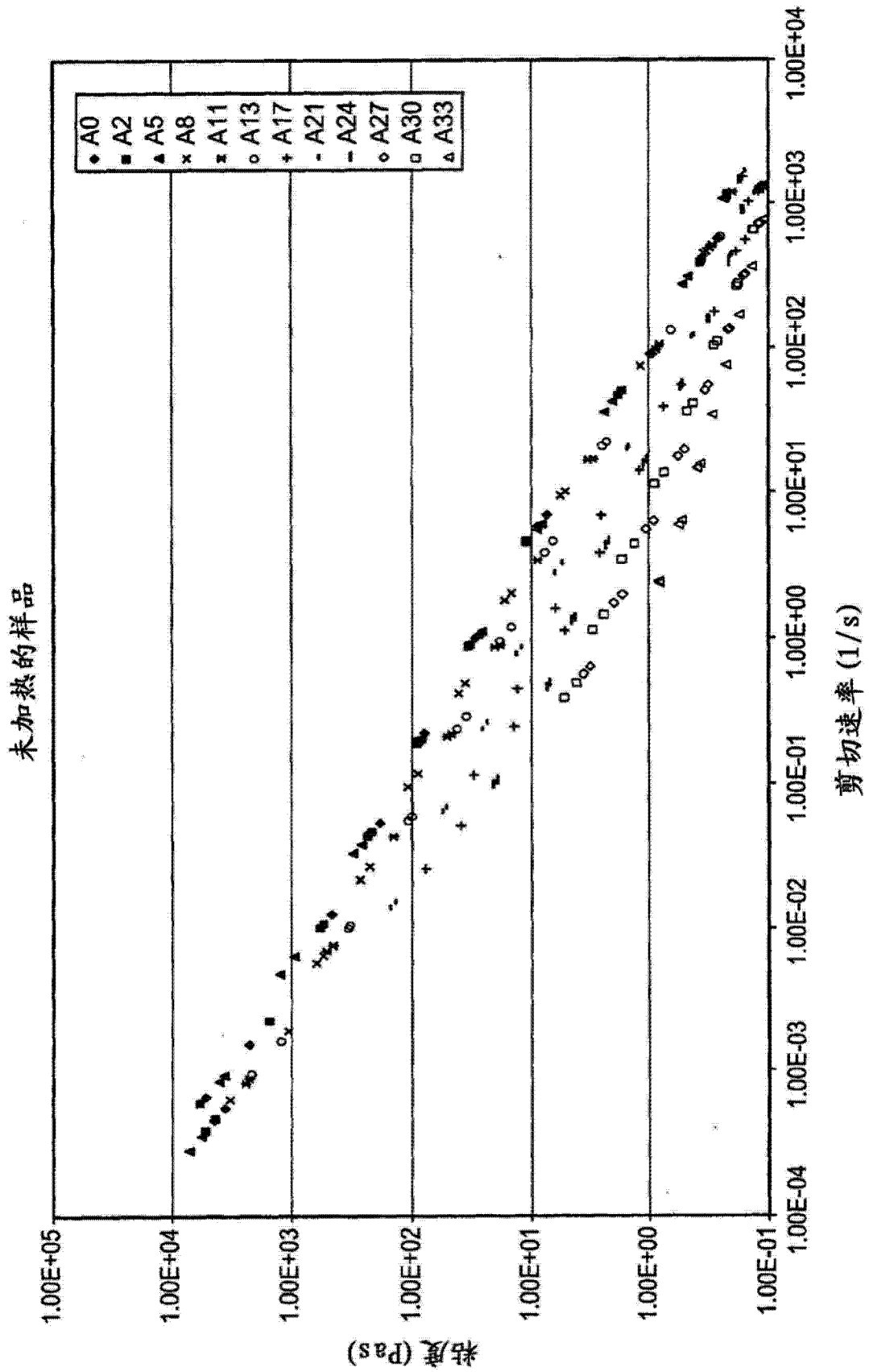


图 14A

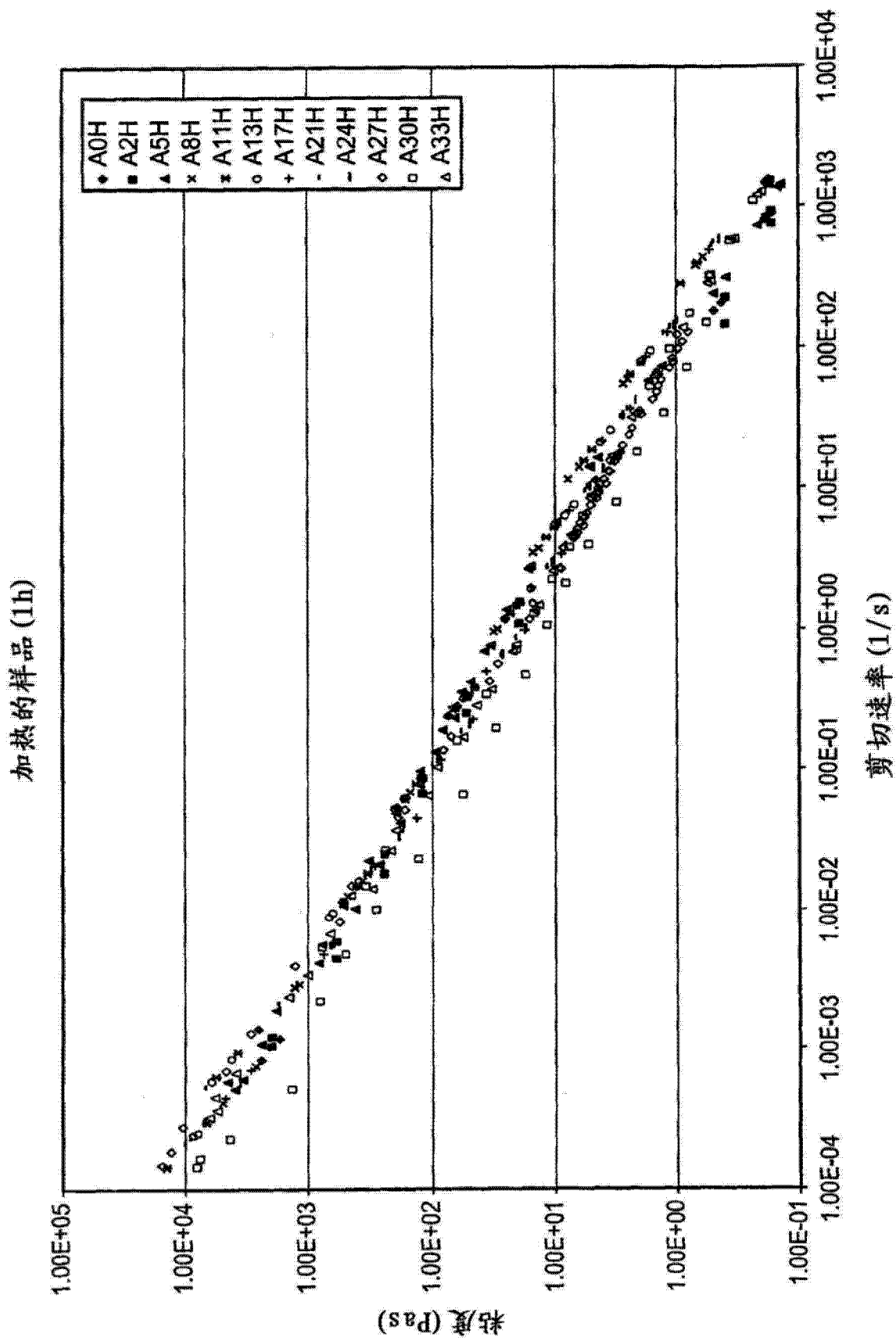


图 14B

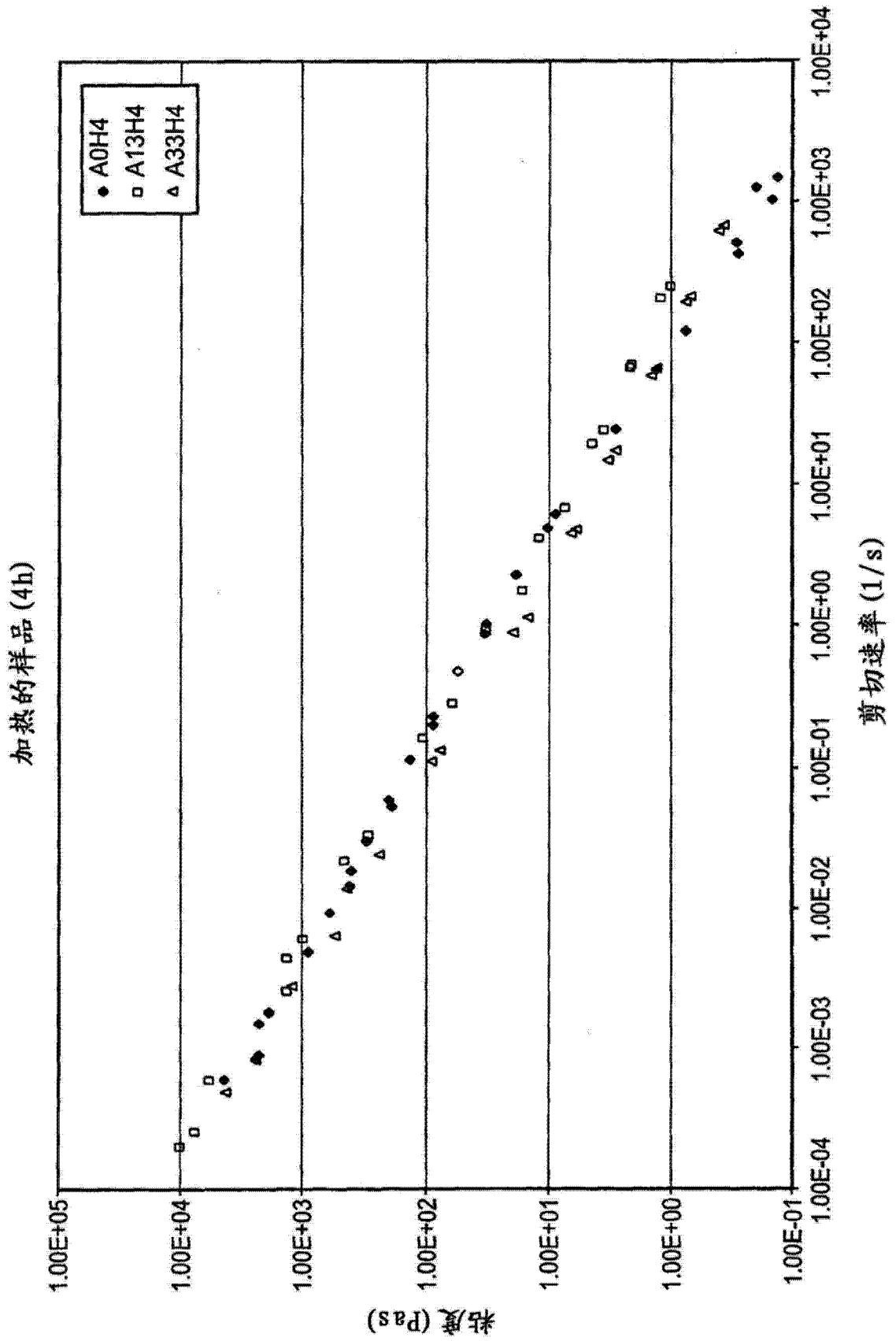


图 14C

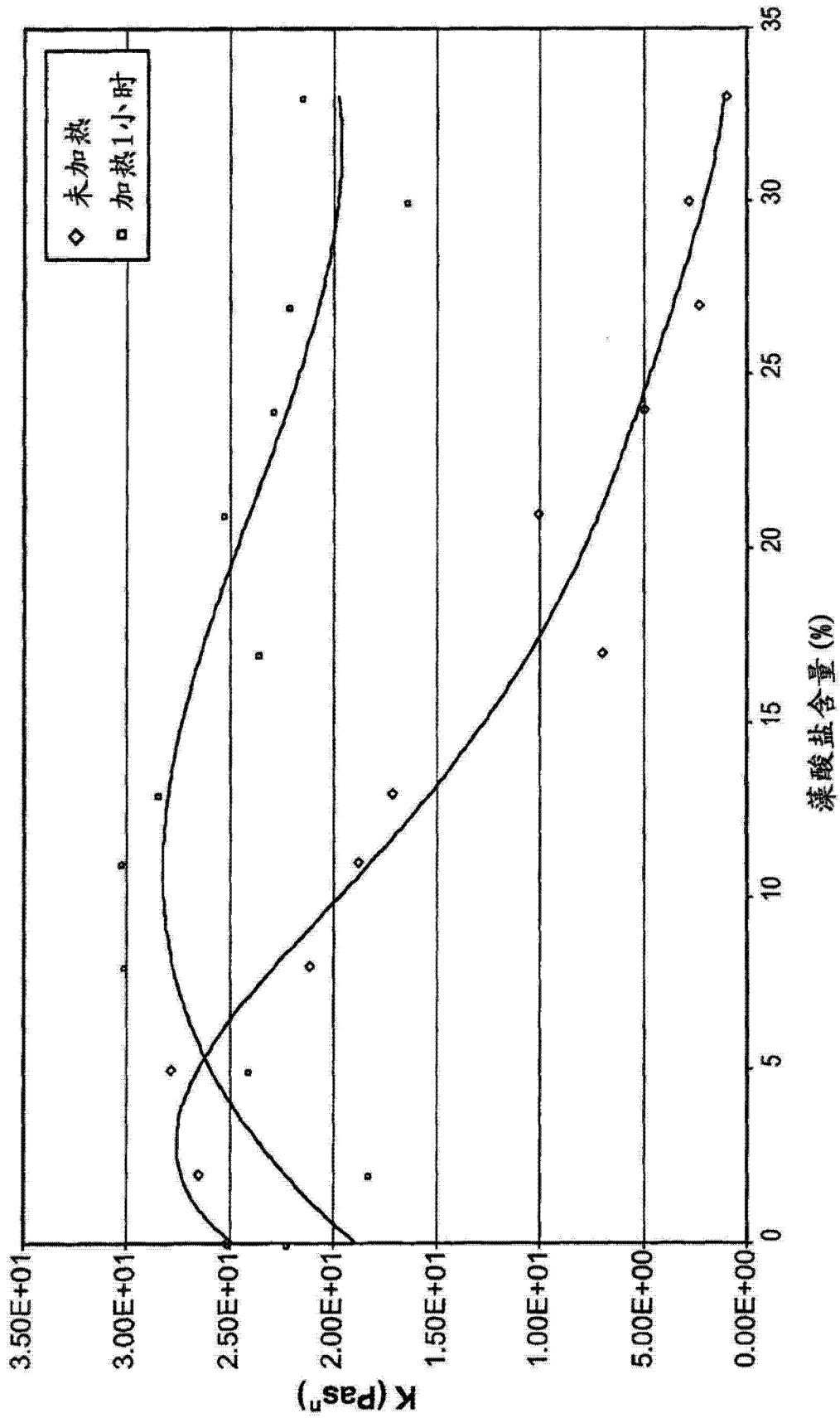


图 15A

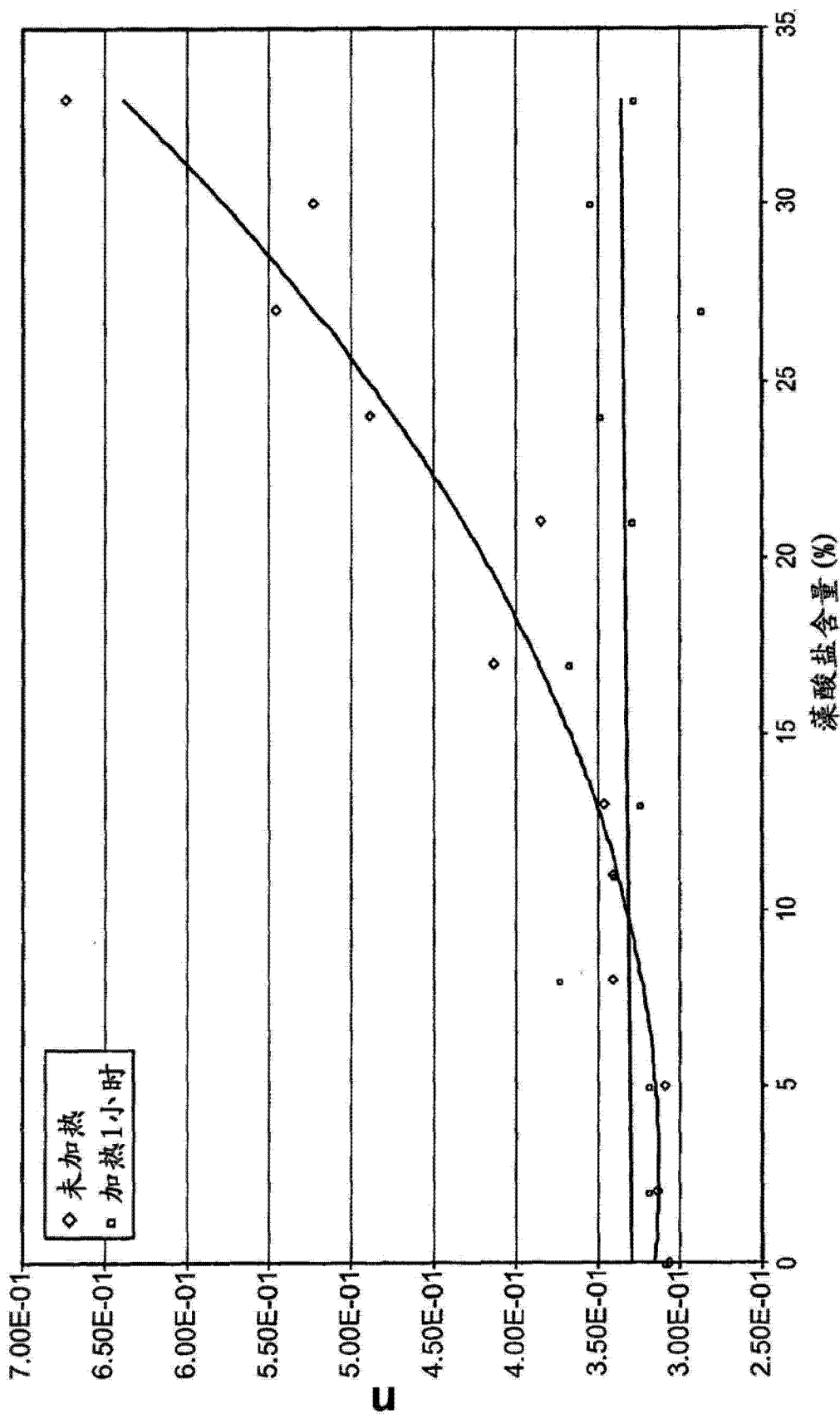


图 15B

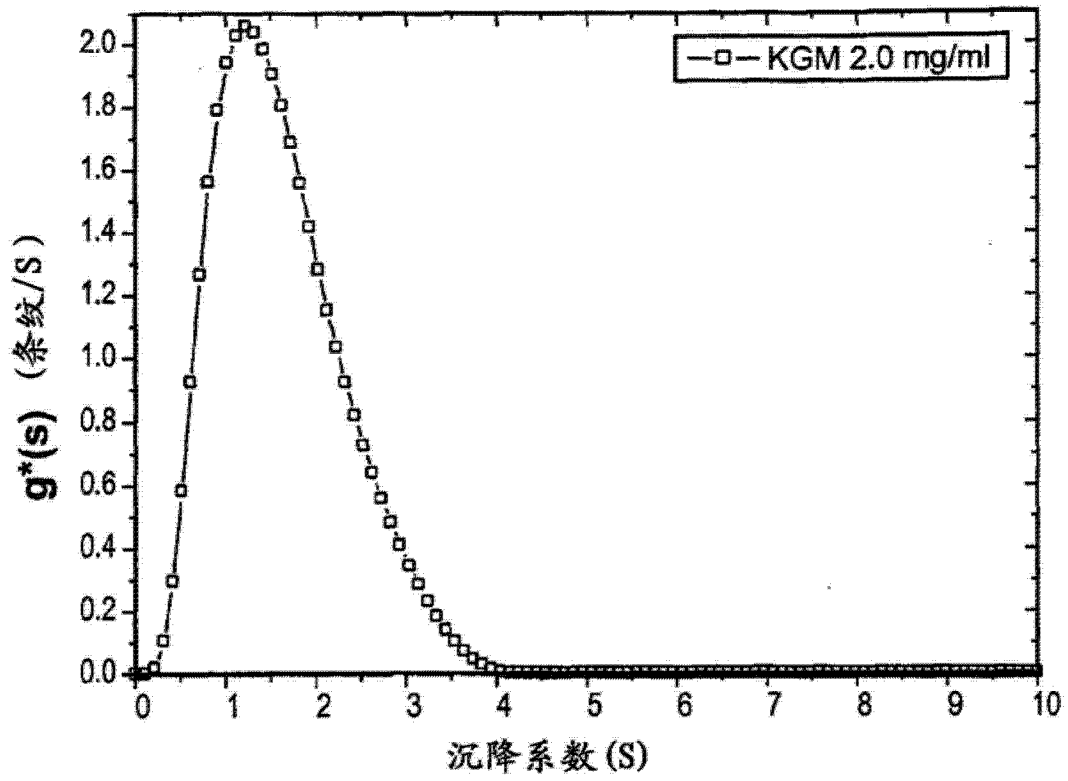


图 16A

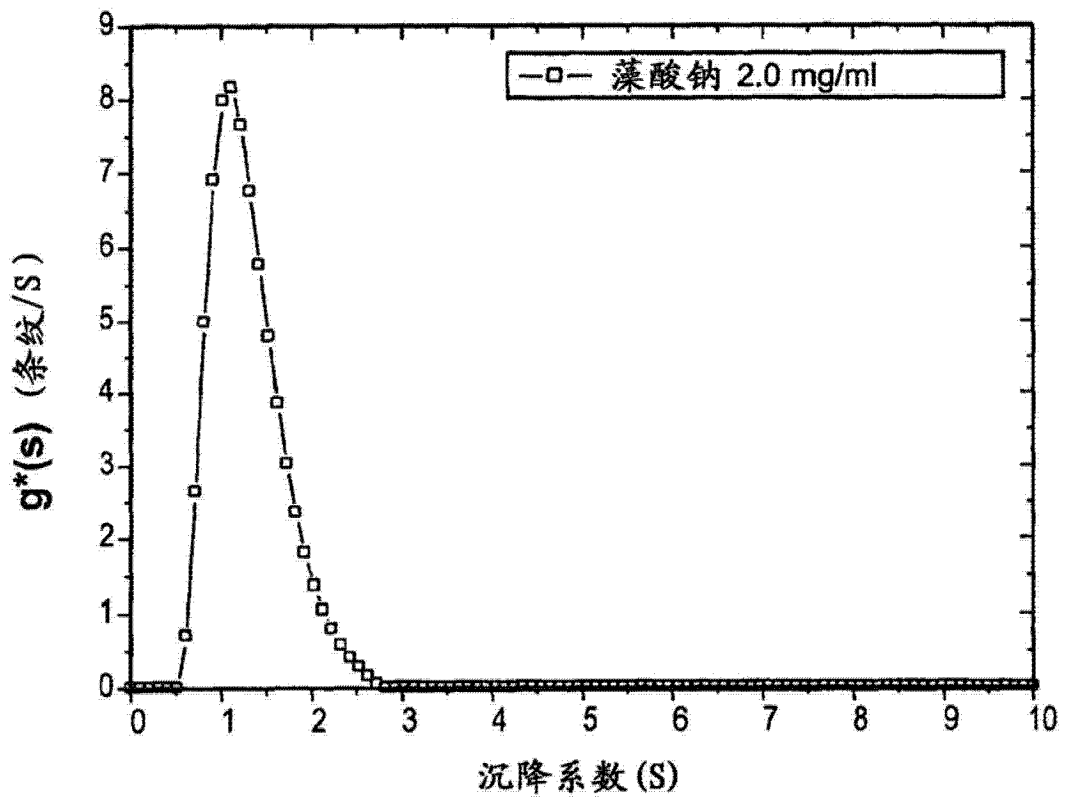


图 16B

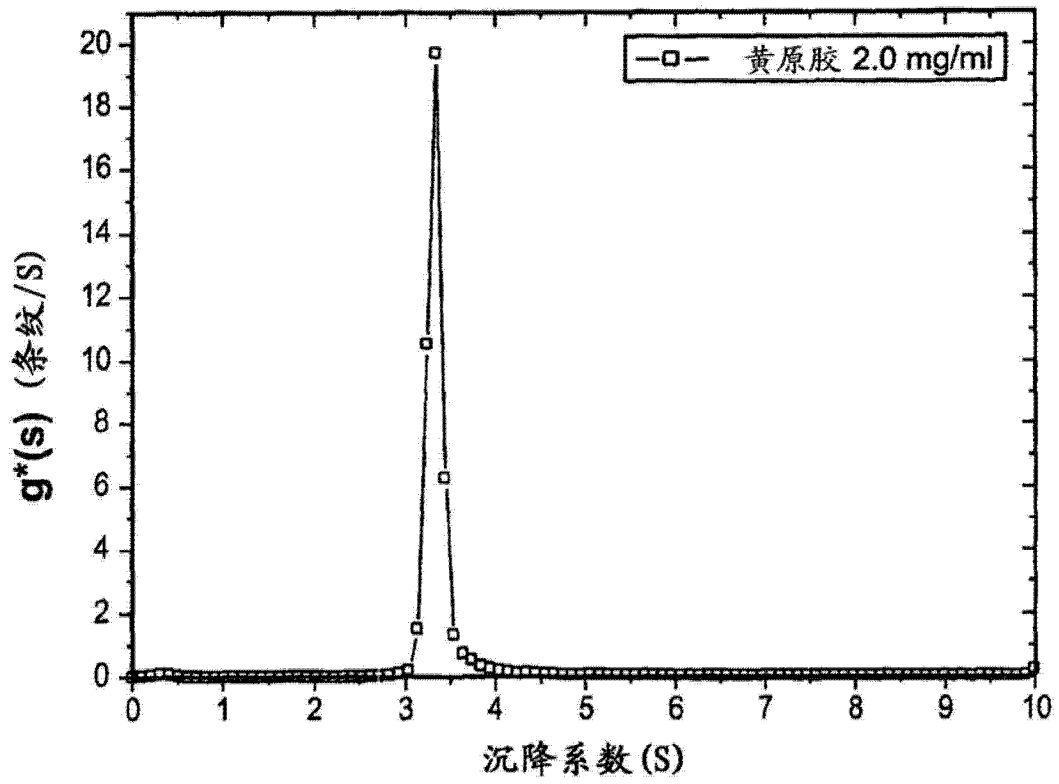


图 16C

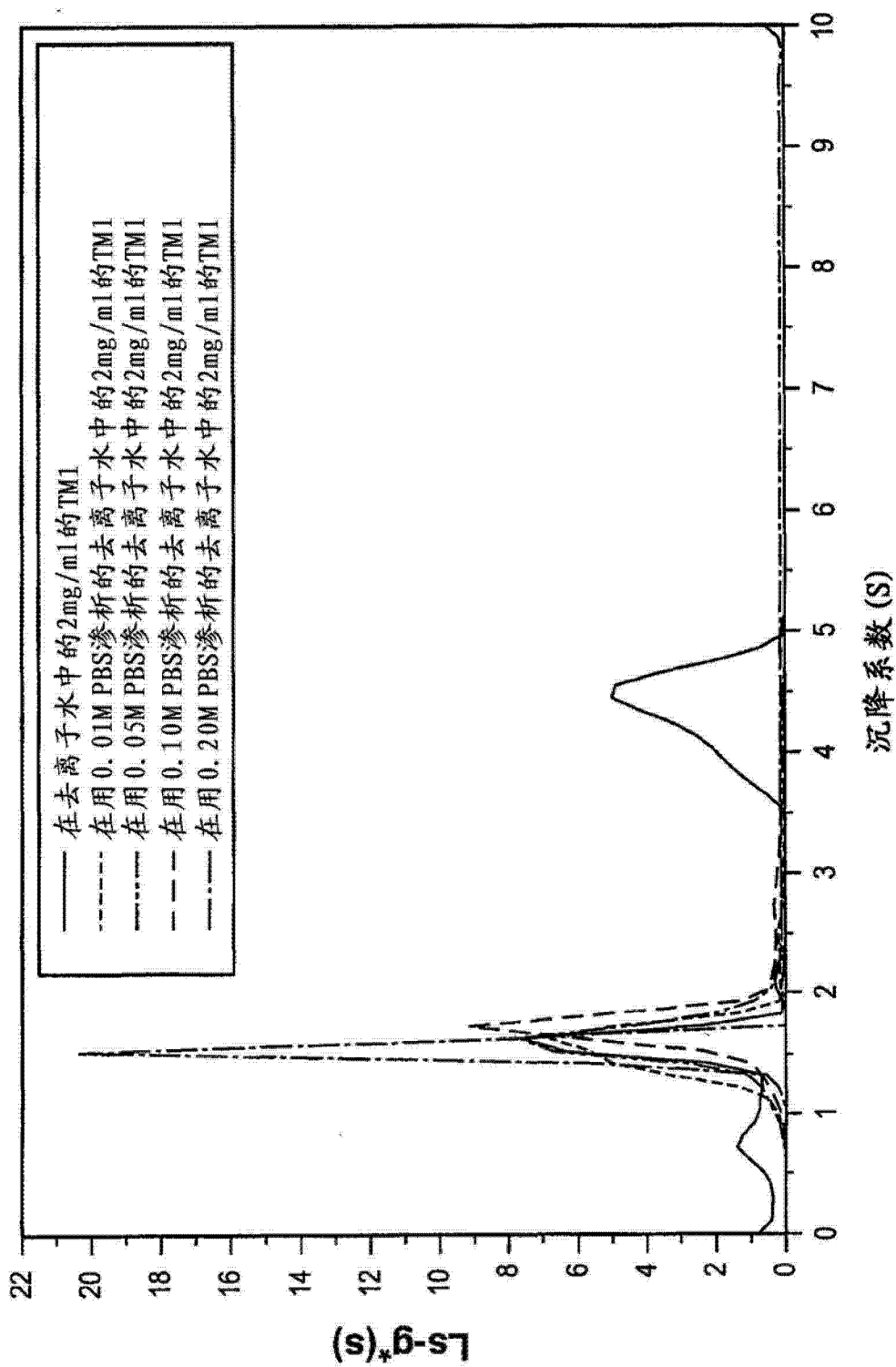


图 17A

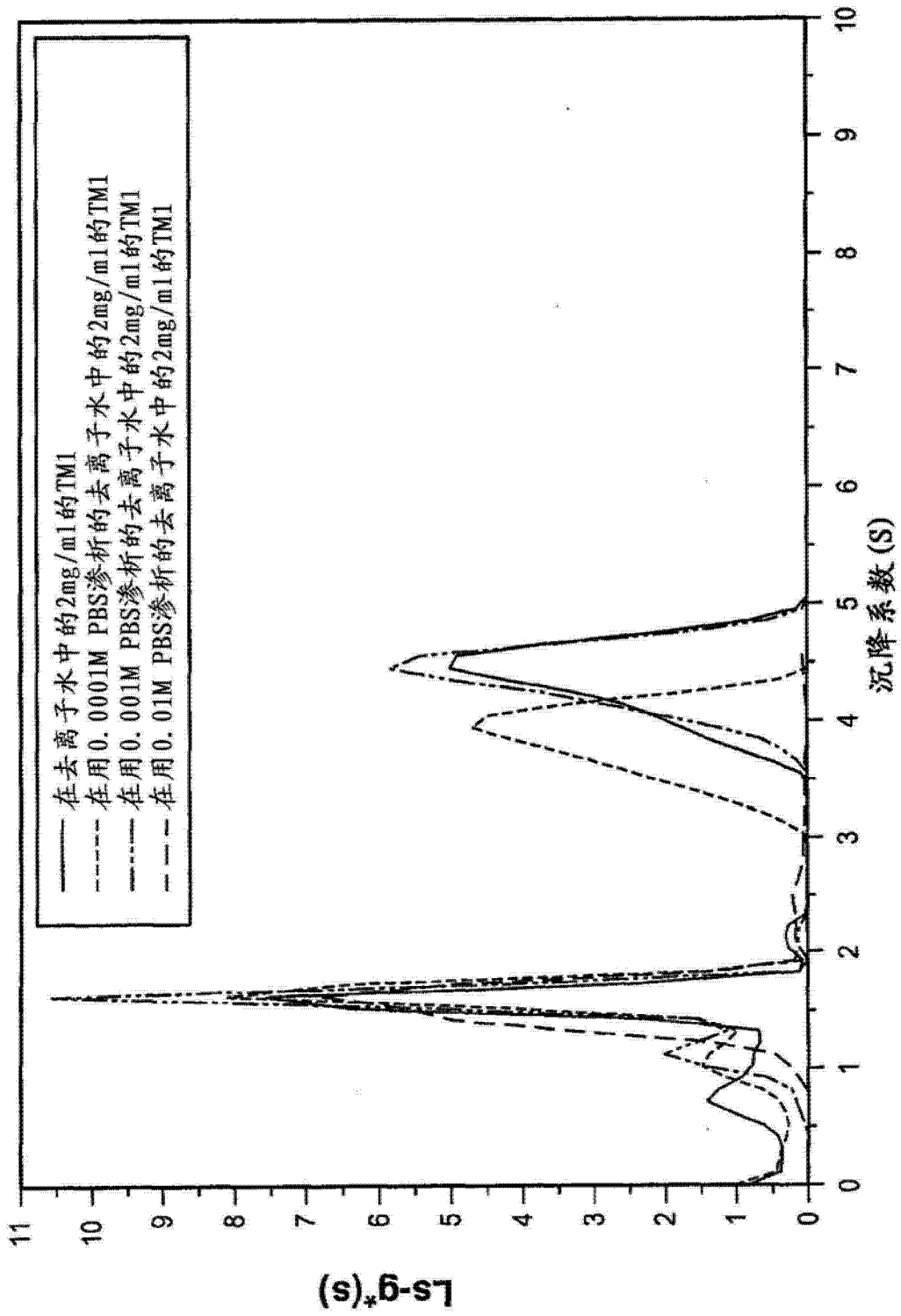


图 17B

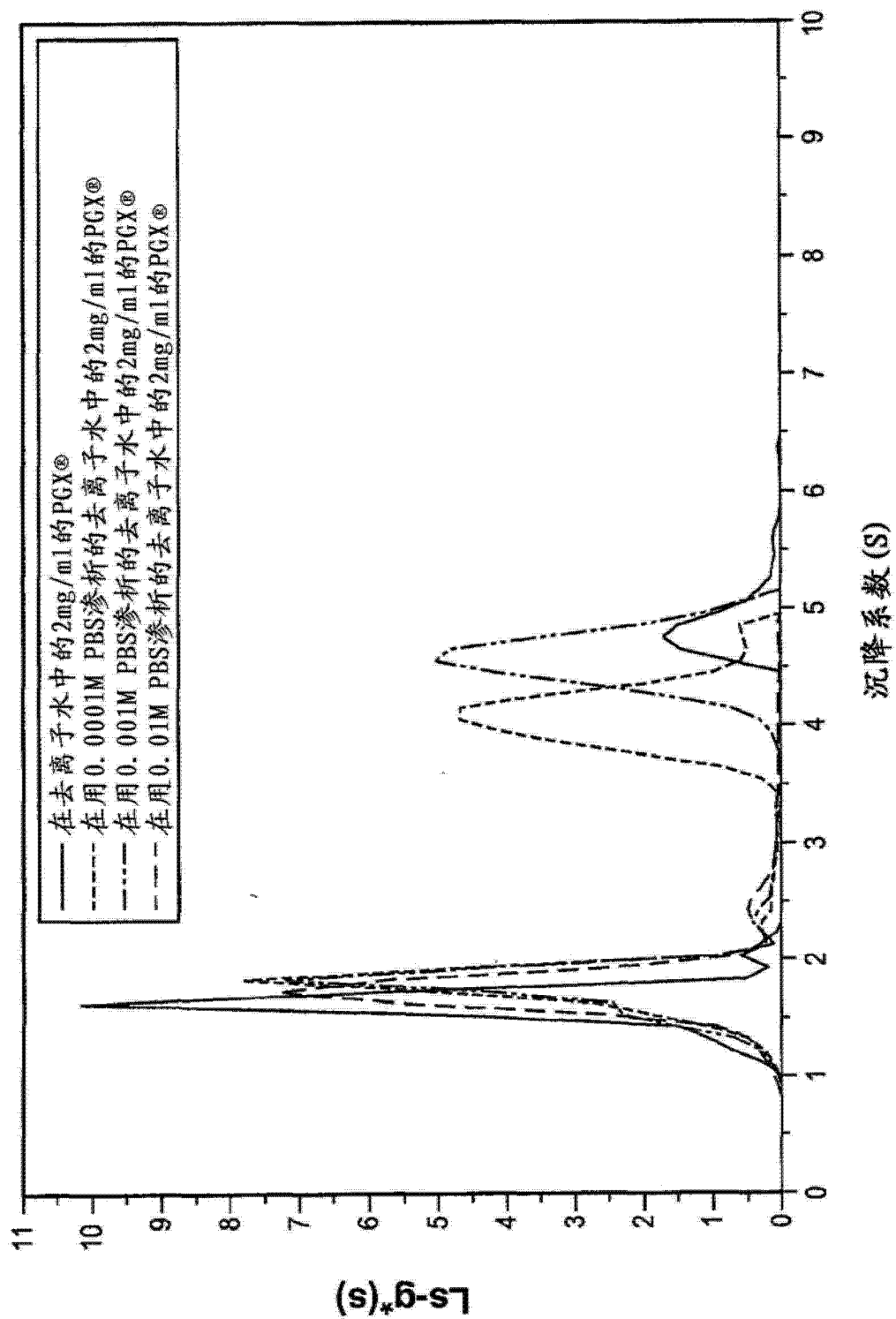


图 17C

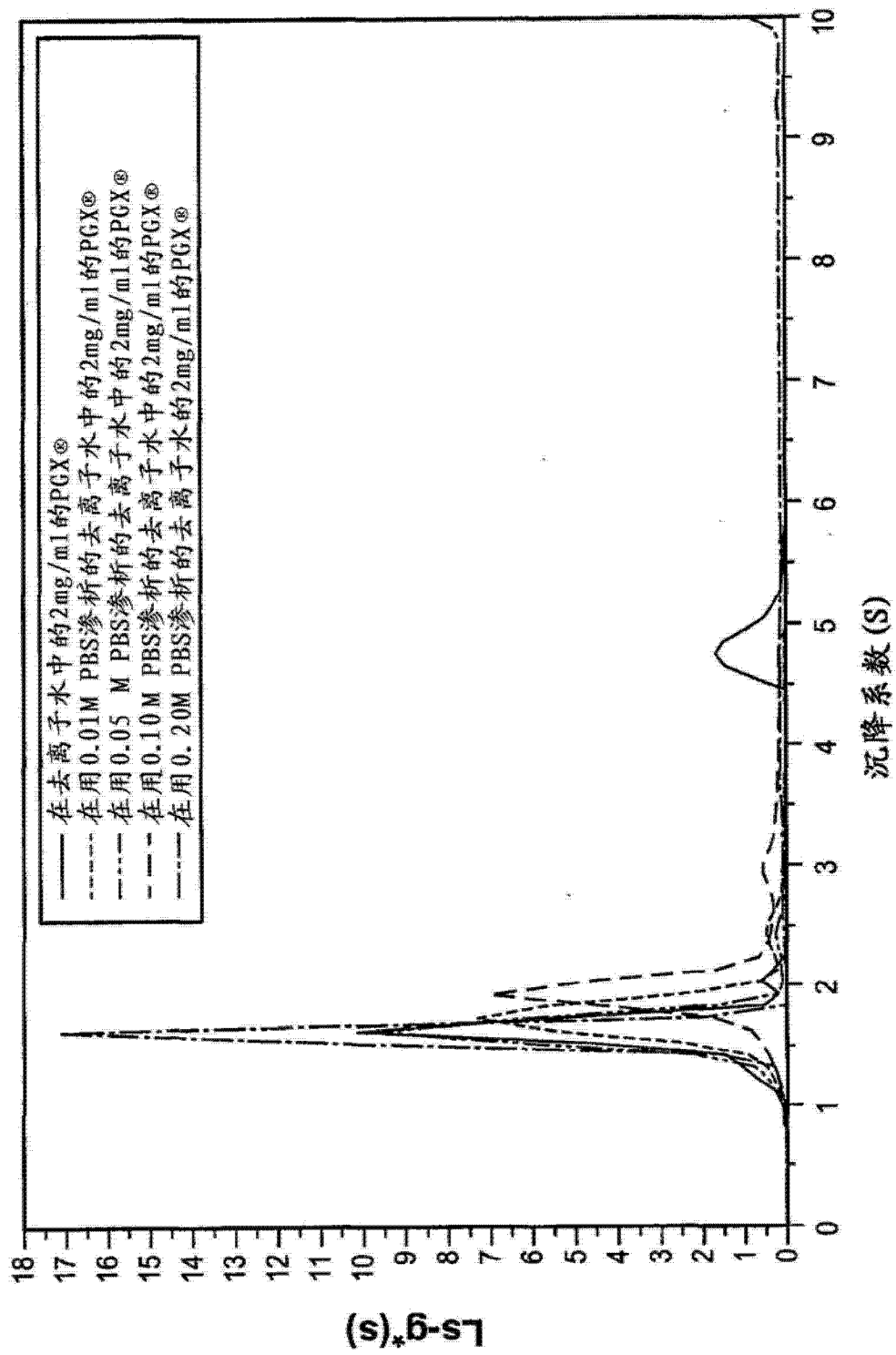


图 17D

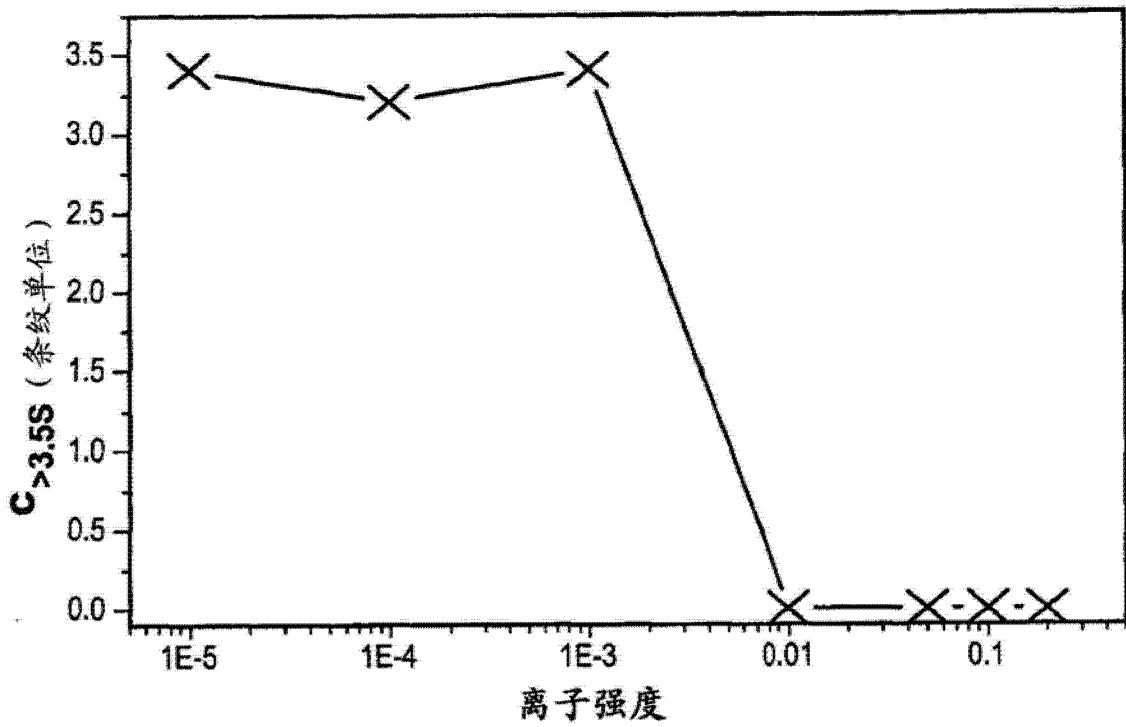


图 18A

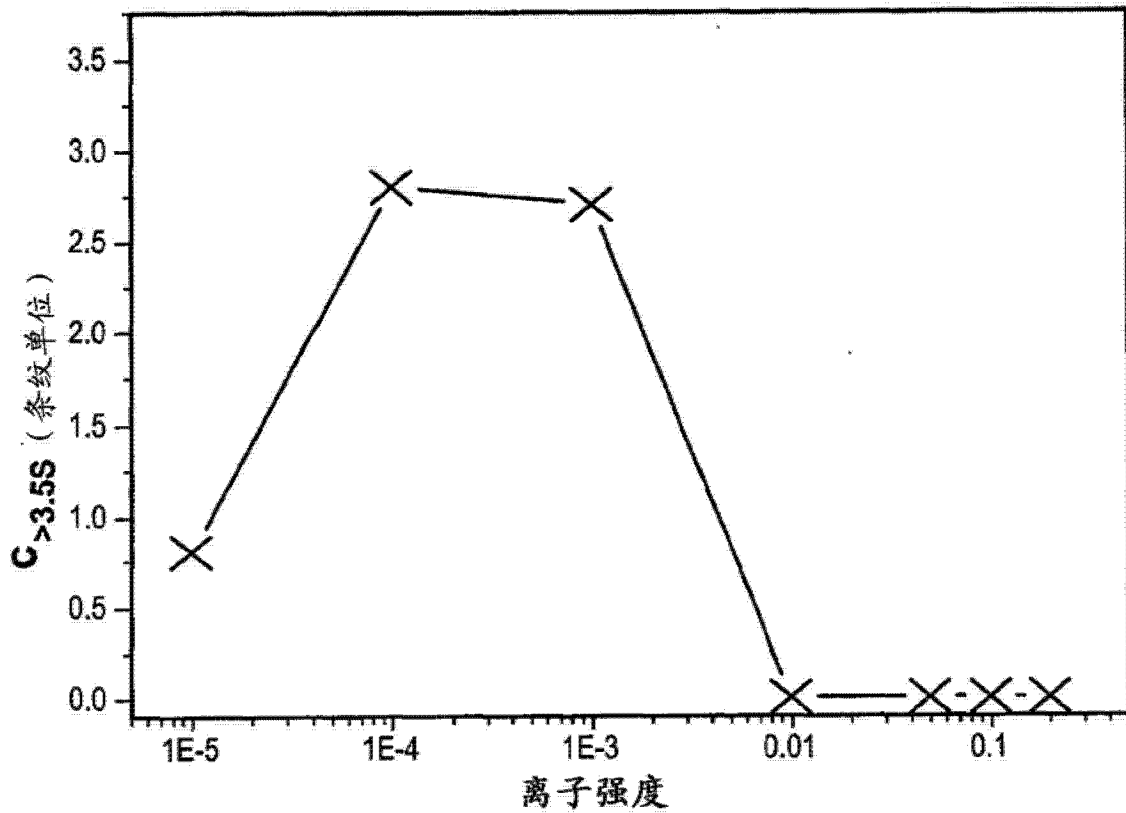


图 18B

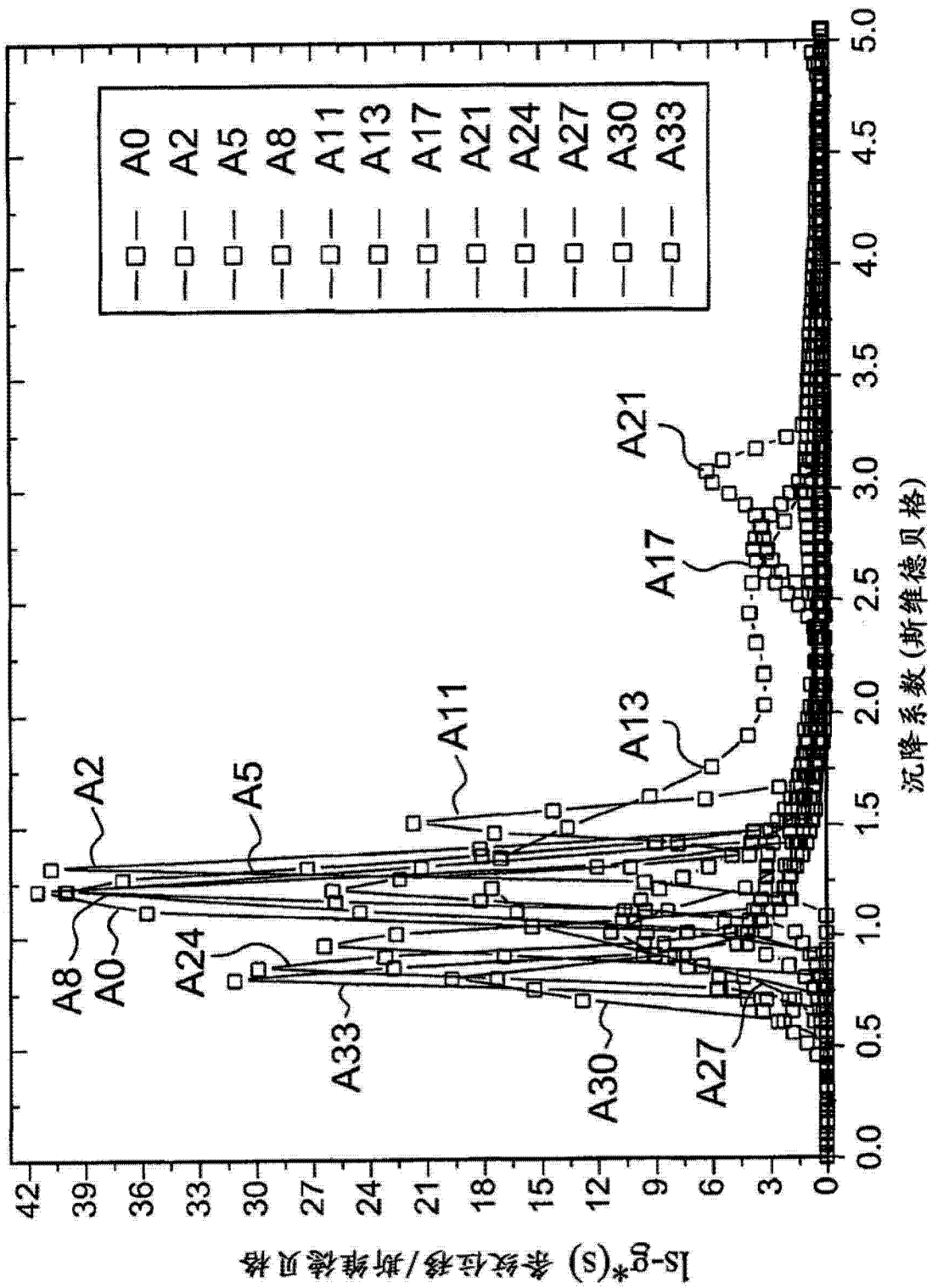


图 19A

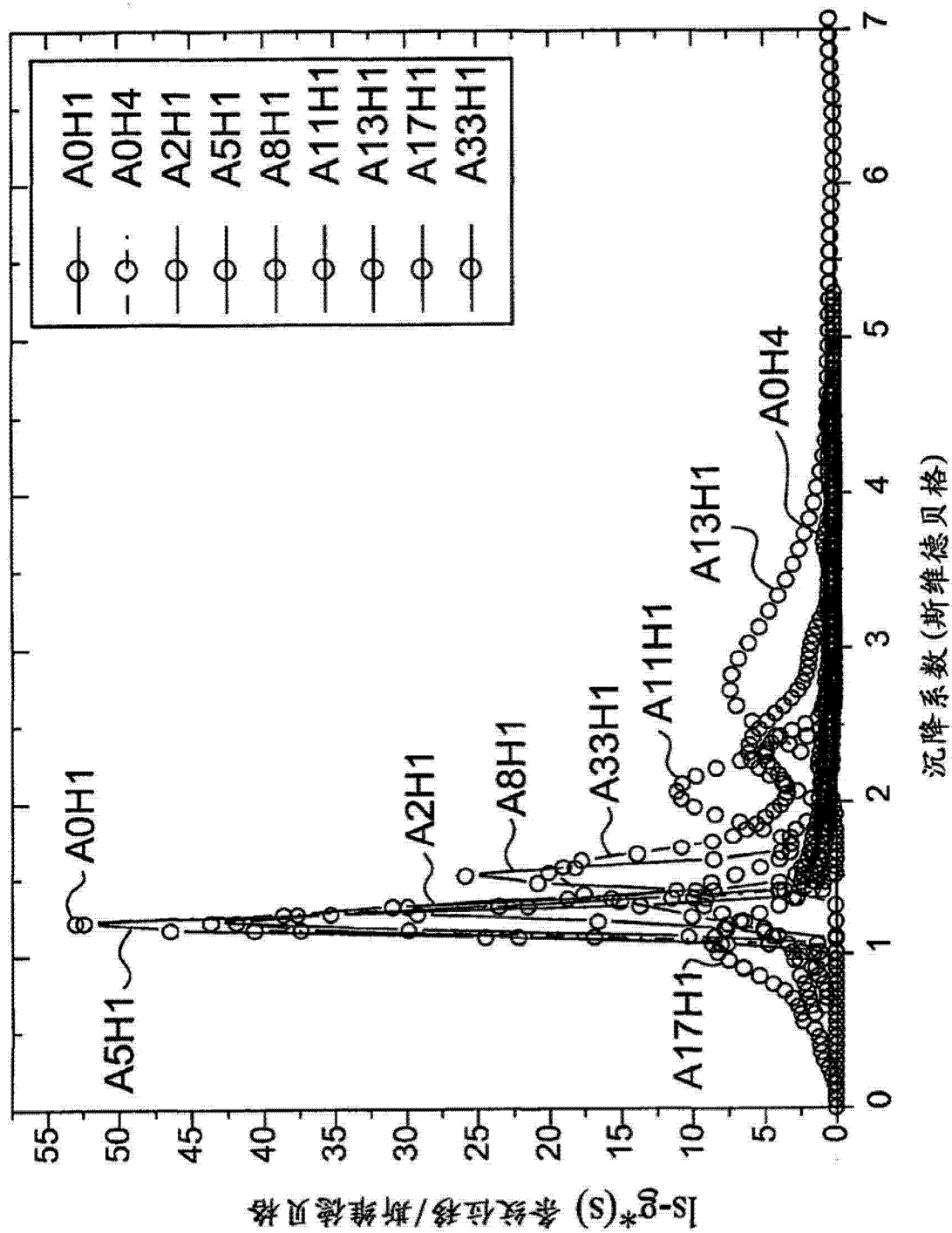


图 19B