(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105228467 A
(43)申请公布日 2016.01.06

(21)申请号 201480017192.5

(22)申请日 2014.01.22

(30)优先权数据
61/754975 2013.01.22 US
61/754976 2013.01.22 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.09.21

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IL2014/050075 2014.01.22

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/115140 EN 2014.07.31

(71)申请人 利库德有限公司
地址 以色列比尔雪瓦

(72)发明人 T.阿特拉斯曼 Y.布拉特 R.利维 Y.沙罗尼 J.利维 M.泽克哈

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 周蓉 李炳爱

(51)Int.Cl.
A23L 2/08(2006.01)
A23L 1/227(2006.01)
C12P 23/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书11页 附图8页

(54)发明名称

包含经热处理的澄清番茄浓缩物的组合物

(57)摘要

本发明提供包含经热处理的澄清番茄浓缩物(CTC)的治疗组合物,已发现所述浓缩物具有抗炎和促进骨健康的效应。本发明还涉及包含与一种或更多种的类胡萝卜素结合的经热处理的CTC的组合物。

CN 105228467 A

1. 治疗组合物，所述治疗组合物包含经热处理的澄清番茄浓缩物（CTC）。

2. 根据权利要求 1 的治疗组合物，其中总的游离氨基酸的浓度小于 2%w/w。

3. 根据权利要求 1 的治疗组合物，其中游离谷氨酰胺浓度小于 0.1%w/w。

4. 治疗组合物，所述治疗组合物包含经热处理的澄清番茄浓缩物（CTC）和一种或更多种的类胡萝卜素的协同组合。

5. 根据权利要求 4 的治疗组合物，其中总的游离氨基酸的浓度小于 2%w/w。

6. 根据权利要求 4 的治疗组合物，其中游离谷氨酰胺浓度小于 0.1%w/w。

7. 根据权利要求 4-6 中任一项的治疗组合物，其中所述一种或更多种的类胡萝卜素选自番茄红素、八氢番茄红素、六氢番茄红素、β－胡罗卜素和叶黄素，和 / 或它们的衍生物。

8. 根据权利要求 7 的治疗组合物，其中所述类胡萝卜素为番茄红素或它的衍生物。

9. 根据权利要求 4-6 中任一项的治疗组合物，其中所述一种或更多种的类胡萝卜素由番茄油树脂提供。

10. 根据权利要求 4-9 中任一项的治疗组合物，其中在所述组合物中的类胡萝卜素的总浓度为至少 0.1%（w/w）。

11. 根据权利要求 10 的治疗组合物，其中番茄红素的浓度为至少 0.1%（w/w）。

12. 抑制或降低受试者中抗炎介质的生产的方法，所述方法包括向所述受试者给药根据权利要求 1 至 11 中任一项的治疗组合物。

13. 根据权利要求 12 的方法，其中所述抗炎介质选自 NO、TNF-α 和白细胞介素 1。

14. 治疗病理病症的方法，其中 NO、TNF-α 和 / 或白细胞介素 1-β 充当在有这类治疗需要的哺乳动物受试者中的所述病症的调节剂或介质，其中所述方法包括向所述受试者给药根据权利要求 1 至 11 中任一项的治疗组合物。

15. 根据权利要求 14 的治疗方法，其中待治疗的病症为炎症。

16. 根据权利要求 14 的治疗方法，其中待治疗的病症选自类风湿性关节炎、成人型呼吸窘迫综合征（ARDS）、哮喘、鼻炎、特发性肺纤维化、腹膜炎、心血管炎症、心肌缺血、再灌注损伤、动脉粥样硬化、脓毒症、创伤、II 型糖尿病、视网膜病、银屑病、胃肠炎症、肝硬化、腹膜炎和炎性肠病，以及神经变性疾病，包括阿尔茨海默氏病。

17. 改善受试者骨健康的方法，所述方法包括向所述受试者给药根据权利要求 1 至 11 中任一项的治疗组合物。

18. 根据权利要求 17 的方法，其中骨健康的改善包括对骨再吸收的抑制。

19. 根据权利要求 17 的方法，其中所述方法用于治疗选自以下的病症：骨质疏松、关节炎、牙周病、多发性骨髓瘤和转移性癌。

20. 根据权利要求 12 至 19 中任一项的方法，其中所述治疗组合物以药物剂型给药。

21. 根据权利要求 12 至 19 中任一项的方法，其中所述治疗组合物结合在食品或饮料中。

22. 包含 CTC 的治疗组合物，所述组合物具有小于 2%w/w 的总的游离氨基酸浓度。

23. 包含 CTC 的治疗组合物，所述组合物具有小于 0.1%w/w 的游离谷氨酰胺浓度。

24. 包含一种或更多种的类胡萝卜素和 CTC 一起的协同组合的治疗组合物，其中在所述 CTC 内的总的游离氨基酸浓度小于 2%w/w。

25. 包含一种或更多种的类胡萝卜素和 CTC 一起的协同组合的治疗组合物，其中在所

述 CTC 内的游离谷氨酰胺的浓度小于 0.1%w/w。

26. 包含一种或更多种的类胡萝卜素和 CTC 一起的协同组合的治疗组合物，其中所述类胡萝卜素的浓度至少为 0.1%w/w。

27. 根据权利要求 26 的治疗组合物，所述组合物包含浓度为至少 0.1%w/w 的番茄红素。

包含经热处理的澄清番茄浓缩物的组合物

发明领域

[0001] 本发明涉及包含经热处理的番茄衍生的浓缩物的组合物，已发现所述浓缩物具有意料不到的高水平的抗炎活性。本发明还涉及经热处理的番茄衍生的浓缩物与类胡萝卜素的协同组合。

[0002] 发明背景

形成非特异性免疫系统的重要部分的炎症过程的特征在于一系列复杂的化学和细胞变化，其对于面对微生物试剂和其它潜在有害的环境因素的宿主防御而言是重要的。然而，在许多情况下，炎症可被不当地触发，和/或可持续至对宿主变得有害的程度。在这类情况下，可能需要抑制或阻止炎症过程的一个或更多个方面的发展，尤其，在非感染性的炎症疾病的情况下。

[0003] 已显示非常多的不同的化学介质参与炎症过程的发展和控制。许多不同实验室的近期研究已表明一氧化氮(NO)为众多急性和慢性炎症疾病的重要调节剂，所述疾病包括各种类型的关节炎、胃肠疾病、中枢神经系统的炎症和某些形式的哮喘。所以，建议对NO生产的抑制可对于这些炎症疾病的治疗和/或管理提供有用的治疗机理。此外，也已显示对NO合成的抑制在一些本质上主要不是炎症的病症或状态中是有用的。因此，例如，已发现对NO合成的抑制降低进入在锻炼期间的患有2型糖尿病的个体的肢体组织内的葡萄糖吸收。

[0004] NO的体内生产是由一氧化氮合酶(NOS)(包括可诱导的一氧化氮合酶(I-NOS))家族介导的，所述可诱导的一氧化氮合酶是由多种不同的免疫刺激物包括脂多糖(LPS)、干扰素γ和白细胞介素1(IL-1)活化的。

[0005] 通过使用L-N^G-单甲基精氨酸柠檬酸酯(L-NMMA)可在体内和体外均实现对NO的抑制。此外，已显示若干种其它化合物(包括一些天然产物)也抑制NO的生产。后一个群组包括例如叶黄素[Rafi M.M.等人. Mol Nutr Food Res. 2007 Mar;51(3):333-40; Choi, J.S. Nutrition. 2006 Jun;22(6):668-71]和番茄红素[Rafi, M.M. 等人. J Food Sci. 2007 Jan;72(1):S069-74]的化合物。然而，已证明许多天然产物NO抑制剂的功效和效力不是特别地高。因此存在对天然来源的改善的抑制NO生产的组合物的需要。

[0006] 另一种极为重要的炎症介质为肿瘤坏死因子-α(TNF-α)，其为由各种细胞类型(包括巨噬细胞、嗜中性粒细胞和淋巴细胞)产生的细胞因子。TNF-α在炎症过程的早期阶段占据关键位置并且负责刺激其它因子例如核因子-κB的产生，核因子-κB继而引起各种促炎基因的活化。因此，鉴于其关键的促炎作用，TNF-α显然是抗炎剂的一个重要的潜在治疗靶。

[0007] 现在转到另一个方面，为了保持健康正常的骨结构，骨持续经受重塑，其中骨被破骨细胞分解并由成骨细胞重新建造。

[0008] 破骨细胞的分化尤其还受RANKL(NFKB配体受体活化剂)影响，其为由成骨细胞产生的细胞因子，与破骨细胞祖细胞结合。对这个过程的抑制将导致破骨细胞活性的降低，从而抑制骨再吸收。

[0009] 用于改变在骨重塑过程中的骨再吸收和新骨产生之间的平衡的替代策略会引起

增加的成骨细胞活性。尽管这种结果可能潜在地以若干种方式实现，一种可能的途径是通过活化在成骨细胞内发信号的抗氧化剂应答元件(ARE/ Nrf2)。

[0010] 骨形成和骨再吸收之间的不平衡可能导致病理病症例如骨质疏松、关节炎、牙周病、多发性骨髓瘤和转移性癌症的发展。对于患有骨质疏松症的个体，骨折代表危及生命的事件，并且当前全球有超过7000万人处于风险之中。

[0011] 在过多的骨再吸收(例如发生在骨质疏松症中)的情况下，能够改变再吸收和新骨的形成(laying down)之间的平衡将是有利的。理想情况下，这将通过使用天然的，无毒物质而实现，所述物质基本上没有不利的影响。本发明的目的之一就是满足这种需要。

[0012] 本发明的一个目的是提供一种天然产物组合物，其可用于抑制一种或更多种关键炎症介质例如NO和TNF-α的生产，作为用于治疗或控制所述介质参与其中的病理状态和过程的手段。

[0013] 本发明的另一个目的是提供具有改善抗炎性质的由番茄衍生的组合物。

本发明的另一个目的为提供用于改善骨健康的天然产物组合物。

[0014] 随着描述的进行，其他目的和目标将会变得显而易见。

发明内容

[0015] 本发明人现已发现被称为澄清番茄浓缩物(CTC)的由番茄衍生的产物的抗炎性质是通过在使用前使所述CTC经受热处理来增强的。

[0016] 术语“CTC”指的是通过将番茄材料(例如榨碎的番茄或番茄汁)分离成果肉和浆液，丢弃所述果肉，和然后浓缩所述浆液至介于约40和80、优选在55° Bx以上的白利糖度(Brix)值所获得的浓缩番茄浆液。浓缩的浆液被称为“CTC”。制备CTC的进一步细节将在下文提供。

[0017] 因此本发明主要涉及包含经热处理的CTC的治疗组合物。

[0018] 尽管可使用若干种不同的加热方案来制备前述的经加热处理的CTC，在一个优选的实施方案中，在90℃下加热CTC(浓度对应于约60Bx)一段介于1和3小时之间的时间。在一个特别优选的实施方案中，经热处理的CTC是通过在90℃下加热CTC 1小时来制备的。

[0019] 在一个优选的实施方案中，本发明的治疗组合物基本上由经热处理的CTC组成。

[0020] 应注意的是，如本公开和所附的权利要求各处所使用的术语“基本上由…组成”指的是以下情况，在其中本发明的组合物，在除了主要活性物质(加热的CTC)以外，还可包含其他化合物、物质和试剂，其实质上不影响本发明的基本的新颖性和创造性特征。

[0021] 在一个优选的实施方案中，包含经热处理的CTC的上文公开的组合物具有小于2% w/w的总的游离氨基酸浓度。同样地，包含经热处理的CTC的所述组合物中的游离谷氨酰胺浓度优选小于0.1% w/w。

[0022] 此外，现已出乎意料地发现，加热的CTC协同地与类胡萝卜素相互作用，从而产生增强的抗炎效应。因此，本发明进一步涉及包含经热处理的CTC和一种或更多种类胡萝卜素的协同组合的治疗组合物。

在该组合组合物的一个优选实施方案中，总游离氨基酸浓度小于2% w/w。同样地，游离谷氨酰胺浓度优选小于0.1% w/w。

[0023] 虽然许多不同的类胡萝卜素可结合在本发明的组合物中，在优选的实施方案中，

所述组合物包含选自番茄红素、八氢番茄红素、六氢番茄红素、β-胡萝卜素和叶黄素和/或它们的衍生物的一种或更多种类胡萝卜素。然而，要认识到，许多其它类胡萝卜素也可以用于制备本发明的协同组合物。

[0024] 在特别优选的实施方案中，本发明的组合物包含加热的CTC和番茄油树脂，其中所述油树脂包含类胡萝卜素番茄红素、八氢番茄红素、六氢番茄红素和β-胡萝卜素。这类番茄油树脂的商业可购得的实例为Lyc-O-Mato®，其由申请人，Be'er Sheva, Israel的LycoRed Ltd.生产并提供。

[0025] 在一个优选的实施方案中，本发明的治疗组合物基本上由经热处理的CTC和一种或更多种类胡萝卜素的协同组合组成。在特别优选的实施方案中，治疗组合物基本上由经热处理的CTC和选自番茄红素、八氢番茄红素、六氢番茄红素、β-胡萝卜素和叶黄素的一种或更多种类胡萝卜素的协同组合组成。在一个特别优选的实施方案中，所述组合组合物包含番茄红素。最优选地，所述组合物基本上由经热处理的CTC和番茄油树脂组成。

[0026] 优选地，在所述组合组合物中类胡萝卜素的总浓度为至少0.1%(w/w)。在另一个优选的实施方案中，其中所述类胡萝卜素包括番茄红素，所述番茄红素的浓度为至少0.1%(w/w)。

[0027] 本发明还涉及一种或更多种的类胡萝卜素(如上文所公开)和具有与上文定义的经热处理的CTC的相似的化学和/或生化组成的改性CTC一起的组合，或仅涉及所述改性CTC。因此，在一个方面中，本发明涉及包含一种或更多种类胡萝卜素与总游离氨基酸浓度小于2%w/w的CTC一起的协同组合的治疗组合物。在另一个实施方案中，本申请涉及一种治疗组合物，其包含至少一种类胡萝卜素与游离谷氨酰胺浓度小于0.1%w/w的CTC一起的协同组合。

[0028] 在另一个方面中，本发明提供用于抑制或降低一种或更多种抗炎介质在受试者中生产的方法，作为用于治疗或管理所述介质参与其中的病理状态和过程的手段，其中所述方法包括向所述受试者给药根据任何上文公开的实施方案的治疗组合物。虽然所述方法可用于抑制许多不同的炎症介质的生产，在一个优选的实施方案中，抗炎介质选自NO、TNF-α和白细胞介素1。

[0029] 在另一方面中，本发明涉及经热处理的CTC在生产用于治疗响应于炎症介质，特别是NO、TNF-α和/或白细胞介素1的抑制的病症的药物中的用途。

[0030] 在另一方面中，本发明涉及经热处理的CTC和一种或更多种类胡萝卜素在生产用于治疗响应于NO、TNF-α和/或白细胞介素1的抑制的病症的药物中的用途。

[0031] 在又一个方面，本发明涉及任何上文所公开的组合物在生产可用于改善骨健康的药物中的用途。在一个优选的实施方案中，所述药物能够抑制骨再吸收，并可用于病症例如(但不限于)骨质疏松症、关节炎、牙周病、多发性骨髓瘤和转移性癌症的预防、治疗或管理。

[0032] 此外，本发明还提供了病理病症的治疗方法，其中NO、TNF-α和/或白细胞介素1充当了在需要这类治疗的受试者中的所述病症的调节剂或介质，其中所述方法包括向所述受试者给药根据上文公开的实施方案中任一个的治疗组合物。在本方法的一个优选的实施方案中，待治疗的病症选自急性炎症、慢性炎症、类风湿性关节炎、成人呼吸窘迫综合征(ARDS)、哮喘、鼻炎、特发性肺纤维化、腹膜炎、心血管炎症、心肌缺血，再灌注损伤、动脉粥样硬化、脓毒症、创伤、II型糖尿病、视网膜病、银屑病、胃肠炎症、肝硬化、腹膜炎和炎性肠

病，和神经变性疾病，诸如例如阿尔茨海默氏病（AD）。

[0033] 在一个优选的实施方案中，待治疗的病症为炎症。

[0034] 在另一个方面中，本发明涉及改善受试者中骨健康的方法，其包括向所述受试者给药如上文所公开的治疗组合物。

[0035] 在该方面的一个优选的实施方案中，骨健康的改善包括对骨再吸收的抑制。改善骨健康的方法可用于患有会对其有反应的任何病症或疾病的受试者，所述病症或疾病包括但不限于骨质疏松症、关节炎、牙周病、多发性骨髓瘤和转移性癌症。

[0036] 在上文所述的方法的优选实施方案中，所述受试者为哺乳动物受试者和更优选地为人受试者。

[0037] 尽管在上文公开的方法中，所述治疗组合物可以通过任何便利的方式给药，在一个优选实施方案中，所述组合物以药物剂型给药。然而，在另一优选的实施方案中，所述治疗组合物结合在食品或饮料中。

[0038] 本发明的所有上述和其它特征以及优点将通过本发明的优选实施方案的以下说明性和非限制性的实施例进一步被理解。

[0039] 附图简述

图 1 通过图表比较通过常规、非加热的 CTC（图 1A）的处理对由腹膜巨噬细胞生产 NO 的抑制与由经热处理的 CTC（图 1B）的处理引起的对 NO 生产的抑制。

[0040] 图 2 通过图表说明不同的加热时间（0 - 120 分钟）对经热处理的 CTC 抑制腹膜巨噬细胞生产 NO 的能力的影响。

[0041] 图 3 通过图表说明在五个单独批次的 CTC 中各自的葡萄糖浓度（加热前和加热后两者）。

图 4 通过图表说明在五个单独批次的 CTC 中各自的果糖浓度（加热前和加热后两者）。

图 5 显示经热处理的 CTC 对 LPS- 刺激的巨噬细胞生产 TNF 的抑制作用。各组的三条柱中的第一条代表用刚经过热处理的 CTC 所获得的抑制作用，而第二条和第三条柱分别代表用在室温下或 40℃下贮存 6 个月的经热处理的 CTC 所获得的结果。

[0042] 图 6 通过图表比较由仅番茄油树脂（Lyc-O-Mato）和仅加热的 CTC 与番茄油树脂和加热的 CTC 的组合引起的对腹膜巨噬细胞生产 NO 的抑制。

[0043] 图 7 通过图表表示由仅叶黄素和仅加热的 CTC 与叶黄素和加热的 CTC 的组合引起的对腹膜巨噬细胞生产 NO 的抑制。

[0044] 图 8 通过图表表示由仅 β - 胡萝卜素和仅加热的 CTC 与 β - 胡萝卜素和加热的 CTC 的组合引起的对腹膜巨噬细胞生产 NO 的抑制。

[0045] 图 9 通过图表说明 Lyc-O-Mato 和加热的 CTC 的组合对在角叉菜诱导的大鼠爪炎症模型中白细胞介素 1-B 的生产的抑制作用。

[0046] 图 10 通过图表比较加热的 CTC 和非加热的 CTC 抑制 RANKL- 诱导的破骨细胞分化的能力，如通过抗酒石酸盐酸性磷酸酶（TRAP）活性测得的。结果表明加热的 CTC 明显比非加热的 CTC 更有效。

[0047] 图 11 通过图表比较仅番茄红素与仅 CTC 以及与番茄红素和 CTC 的加成对 RANKL- 诱导的破骨细胞分化的抑制的影响，如通过 TRAP 测得的。

[0048] 图 12 通过图表比较加热的 CTC 对抗氧化剂应答元件（ARE）在 MC3T3 成骨细胞中

的剂量依赖性活化，而在非加热的 CTC 的情况中没有看到这类活化。

[0049] 优选实施方案的详述

如上文所公开的，本发明提供仅包含经热处理的 CTC 或包含与一种或更多种类胡萝卜素结合的经热处理的 CTC 的组合物。被称为 CTC 的部分可通常（但不排除其它情况）按照以下方法来制备：

步骤 1：洗涤番茄并根据它们的颜色和质量分类。

[0050] 步骤 2：榨碎洗净的番茄；这时采样粗榨碎的番茄用于测量番茄红素含量和糖含量。

[0051] 步骤 3：通过 4-6 和 12 mm 的网筛分粗榨碎的番茄。

[0052] 附加步骤 3.1：向所保留的固体添加水，进一步在 0.6 和 0.8 mm 的网上筛分以除去果皮颗粒。

[0053] 步骤 4：从步骤 3 获得的淤浆进一步在 1.5 至 4 mm 的网上筛分。

[0054] 步骤 5：来自步骤 4 和 3.1 的淤浆汇集在一起，并存储在一个容器内；此时取样并分析该淤浆。

[0055] 步骤 6：将淤浆转移至较大的储存罐。

[0056] 步骤 7：将所述淤浆加热至 80-85° C 并取样。

[0057] 步骤 8：一旦温度达到 80-85° C，在卧式离心机（滗析器）中将水相与固体分离。

[0058] 步骤 9：将固体材料（果肉）装在放置在随后被取样并标记的金属桶内的层压袋里。然后将含果肉的桶冷冻并储存在冷冻的条件下。

[0059] 步骤 10：取样水相（来自滗析器的浆液）。

[0060] 步骤 11：过滤浆液并在真空下脱气以消除过多的泡沫。

[0061] 步骤 12：将浆液暂时储存在大的容器中。

[0062] 步骤 13：将浆液离心并将泥渣送回至步骤 5。

[0063] 步骤 14：将浆液在蒸发器中在真空下浓缩至期望的 Bx 值。

上述方案仅为用于生产 CTC 的方法的一个实例，并且也可使用各种其它方法，只要不偏离本发明的范围。然而，该方法的关键阶段可概括如下：将榨碎的番茄分成两个部分 - 浆液和果肉 -。将番茄浆液浓缩至介于 40 至 80，优选高于 55° Bx 的白利糖度值。由澄清番茄浓缩物组成的该产物通常称为 CTC。

[0064] 关于 CTC 的制备和性质的进一步信息可在共同拥有的 WO 99/60868（并入本文）中找到。

[0065] 如上文所解释的，本发明的 CTC 经受热处理。虽然若干种不同的加热方案可用于制备前述的经热处理的 CTC，但在一个优选的实施方案中，在 90℃下加热 CTC（浓度相当于约 60Bx）一段介于 1 和 3 小时之间的时间。在特别优选的实施方案中，通过在 90℃下加热 CTC 1 小时来制备经热处理的 CTC。

[0066] 存在于被给药于有这类治疗需要的受试者的组合物中的加热的 CTC 的优选每日量在 100 至 500 mg 的范围内。

[0067] 施用于有这类治疗需要的受试者的含经热处理的 CTC 和类胡萝卜素两者的组合物中的总类胡萝卜素的优选每日量在 2 至 20 mg 的范围内。

[0068] 优选地，在含经热处理的 CTC 和类胡萝卜素两者的组合物中，类胡萝卜素以至少

0.1%的浓度存在。在本发明的一个优选的实施方案中，所述组合组合物(即，含有加热的CTC和类胡萝卜素两者的那些组合物)包含以至少0.1%的浓度存在的番茄红素。

[0069] 本发明的组合物可被配制用于全身或局部使用。在全身用药的情况中，经热处理的CTC可结合在口服剂型例如片剂、囊片剂(caplet)、胶囊剂、糖浆剂、酏剂、液体等。

[0070] 在其它优选的实施方案中，本发明的组合物可以局部给药，例如在皮肤或粘膜上(例如作为乳膏剂，洗剂，软膏等)。将本发明的含经热处理的CTC的组合物结合在各种不同剂型中的合适方法的其它细节可以从为技术人员已知的任何标准参考著作获得，其包括例如Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co, Easton, Pa, USA (1980)。

[0071] 在其它优选的实施方案中，将本发明的组合物制备成食品添加剂，其适合于直接结合在食品或饮料中。

[0072] 出于说明的目的并且为了更具体地解释和描述本发明，提供以下实施例。然而，本发明不限于在这些实施例中公开的具体实施方案。

[0073] 实施例1

使用经热处理的CTC对 NO的生产的抑制

方法和材料：

巨噬细胞的分离和细胞的培养－从收获前4天已被给予1.5 ml的巯基乙酸盐培养基(4％)的腹膜内注射的6-8周龄雄性ICR小鼠(Harlan，以色列)腹膜腔收集腹膜巨噬细胞。用PBS洗涤腹膜巨噬细胞三次和，如果需要，进行红细胞的低渗裂解，得到90-95％的纯度。通过使用FITC缀合的大鼠抗小鼠F4/80 (MCA497F) (Serotec，Oxford，England)通过在FACS上的流动显微荧光测定法(Becton Dickinson，Mountain View，CA)的FACS分析鉴定巨噬细胞。针对每个试样，分析10,000个光散射门控的活细胞。在含有10％FCS、2mM L-谷氨酰胺；100 U/ml青霉素；100 μg/ml链霉素(Beit-Haemek，以色列)的RPMI 1640培养基中在96孔板内(1×10^6细胞/孔)在37℃下在5％ CO_2气氛中培养腹膜巨噬细胞。在存在或不存在加热的CTC下用LPS(1 μg/ml)刺激细胞。

[0074] 向对照物添加适当体积的DMSO(0.1-0.2％)并且相对于它的对照物计算在各试管内的百分比抑制。

如上文所述地制备澄清番茄浓缩物(CTC)和，因为它可溶于水，被直接加入在期望稀释度的温热培养基中。

除非另有说明，在本研究中所使用的经热处理的CTC指的是指经一个小时加热至90℃的CTC。

[0075] NO生产分析－通过使用格里斯(Griess)试剂和亚硝酸钠作为标准物测定亚硝酸盐水平来确定在细胞培养物上清液中的NO水平，如在Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., 和 Tannenbaum, S. R. (1982) *Anal Biochem.* 126: 131-138中描述的。

[0076] 统计分析－数据表示为平均值±SEM。使用Student的配对双尾t检验确定组间比较的统计学意义。

[0077] 结果

A. CTC或加热的CTC对NO生产的剂量依赖性抑制。

[0078] 如图1所示，在加入1mg/ml的LPS 1 h前经24 h将不同稀释度的CTC或经热处理的CTC加入巨噬细胞，引起剂量依赖性抑制，这在经热处理的CTC的情况中显著有效得多。

[0079] 如图1A所示，由(未处理的)CTC产生的抑制首先在1:200稀释度时观察到并引起16±4%抑制，而100%的最大抑制通过1:25稀释度的CTC实现。

[0080] 由经热处理的CTC产生的抑制(图1B)比在相同浓度下的非加热的CTC所引起的抑制要显著得多。即使以1:8000的稀释度(数据未示出)，也检测到3.5±1.5％的轻微抑制。以1:2000的稀释度，观察到的抑制大于20％，同时看到功效的剂量依赖性增加，直至上升至1:200的稀释度，在该点处观察到对NO生产的最大(100％)的抑制。

[0081] 实施例2

最佳热处理条件的确定

为了调查产生抗炎功效的最大增加所需的加热时间的长度，在加入巨噬细胞之前将CTC经不同的持续时间加热至90℃。如在图2中所示的，针对所有检验的不同的CTC稀释度，1 h的培养足以实现对NO生产的最大抑制。

[0082] 实施例3

经热处理的CTC的特征描述

测定经热处理的CTC的某些关键成分的浓度，并与未经热处理的常规CTC中的所述成分的水平比较。

[0083] A) 氨基酸

使用反相HPLC方法测定在CTC试样(加热的和未加热的)中的各种游离氨基酸的浓度。使用Zorbax Eclipse XDB-C8柱用于分离Fmoc衍生的氨基酸，在其中乙酸盐缓冲液/乙腈梯度用作流动相，流速为1.5 ml/min。使用265 nm UV探测器探测并量化洗脱的组分。

[0084] 如下制备CTC试样(加热和未加热的)：将1克的CTC稀释在0.2摩尔的碱溶液(通过将16.8 g的碳酸氢钠溶解在一升的水中制备)中。然后将0.5 ml的稀释的CTC转移至干净的小瓶中，向其中加入0.5 ml的标准氨基酸溶液(通过将20至40 mg的各氨基酸标准物溶解在前述的碱溶液中，至100 ml的最终体积来制备)。将九毫升的Fmoc溶液(通过将40毫克的Fmoc-OnSU溶解在100ml的75％丙酮/25％水混合物中来制备)加入小瓶中，然后在室温下轻轻地搅拌30分钟。为了阻止外消旋化和二肽的形成，在Fmoc反应完成后的两小时内分析如上述所制备的试样。

[0085] 使用与CTC试样一样的方式处理的游离氨基酸的标准溶液建立校准曲线，并用于推导出CTC试样中的所述氨基酸的浓度。

[0086] 从典型的HPLC运行获得的结果如下：

	Gln	Glu	Ala	Phe	Ile	Leu	总计
在加热的CTC中的游离氨基酸	0.05%	0.53%	0.35%	0.12%	0.01%	0.01%	1.07%
在未加热的CTC中的游离氨基酸	0.89%	0.52%	0.32%	0.13%	0.02%	0.01%	1.88%

这些结果表明，在加热后，CTC中测得的游离氨基酸的总量减少(在加热的CTC中的1.07%相对于在未加热的CTC中的1.88%)。此外，这种减少多数归因于游离谷氨酰胺浓度从在未加热的CTC中的0.89%水平显著下降至在加热的CTC中的0.05%。

[0087] B) 糖 - 葡萄糖和果糖

使用HPLC技术测量在CTC试样(加热的和未加热的)中的葡萄糖和果糖的浓度。

针对在五个单独批次的CTC(加热前和加热后)中的葡萄糖和果糖分析所获得的结果分别在图3和图4中示出。各个图的前面一组柱表示加热的CTC获得的结果,而后一组表示非加热的CTC获得的结果。可从这些图看出,加热CTC试样导致这些试样的葡萄糖浓度下降约35%,并且果糖浓度下降约10%。

[0088] 实施例4

使用经加热处理的CTC抑制 TNFα 的生产

进行进一步的研究以确定由加热的CTC对TNF-α 生产的剂量依赖性抑制。

[0089] 如上文所描述地制备加热的澄清番茄浓缩物(CTC)。在加热的CTC的存在下用LPS刺激巨噬细胞,并且在用加热的CTC处理后测量TNF-α 生产水平(如下文所述)。

[0090] TNF-α 生产分析-使用 ELISA试剂盒(Biolegend Inc., San Diego, CA)量化TNF-α 的浓度。

[0091] 在所述加热的CTC新鲜制备和在室温(25℃)下或在40℃的加速贮存温度下贮存6个月后的两种情况下,用加热的CTC的指定浓度观察到TNFα 生产抑制。

[0092] 本研究的结果总结在图5中。如在该图中所示的,向巨噬细胞添加不同稀释度的经热处理的CTC引起剂量依赖性抑制。由加热的CTC产生的轻微抑制首先在 1:2000的稀释度时观察到并且在1:1000的稀释度时要显著得多。发现功效的剂量依赖性增加,直至上升到1:200的稀释度,在该点处观察到对TNFα 生产的最大(80%)抑制。

[0093] 另外,可从该图中显示的柱状图(各组的三条柱中的第一条柱)看到,在所检验的加热的CTC的所有稀释度下,在室温(25℃;各组中的第二条柱)下或在40℃的加速贮存温度(各组中的第三条柱)下贮存6个月后,没有观察到对TNFα 生产的抑制的损失。

[0094] 实施例5

使用经热处理的CTC和类胡萝卜素的协同组合抑制 NO生产 方法和材料:

巨噬细胞的分离和细胞的培养-从收获前4天已被给予1.5 ml的巯基乙酸盐培养基(4%)的腹膜内注射的6-8周龄雄性ICR小鼠(Harlan,以色列)腹膜腔收集腹膜巨噬细胞。用PBS洗涤腹膜巨噬细胞三次和,如果需要的话,进行红细胞的低渗裂解,得到90-95%的纯度。通过使用FITC缀合的大鼠抗小鼠F4/80 (MCA497F)(Serotec,Oxford,England)通过在FACS上的流动显微荧光测定法(Becton Dickinson,Mountain View,CA)的FACS分析鉴定巨噬细胞。针对每个试样,分析10,000个光散射门控的活细胞。在含有10% FCS、2mM L-谷氨酰胺;100 U/ml青霉素;100 μg/ml链霉素(Beit-Haemek,以色列)的RPMI 1640培养基中在96孔板内(1×10^6 细胞/孔)在37℃下在5% CO_2气氛中培养腹膜巨噬细胞。在存在或不存在Lycomato或CTC和它们的组合下用LPS(1 μg/ml)刺激细胞。

[0095] 在一些实验中,将Lyc-o-Mato溶解在DMSO中(至5mM的最终浓度)。使混合物涡旋并在37℃下的水浴中培养(伴随摇晃)10分钟和然后在超声波仪浴中超声处理三次,每次15秒。使用该储备溶液,通过向温热的培养基添加所述储备溶液的适当体积来制备期望的浓度。

[0096] 在萃取后如下测定在溶液中的番茄红素浓度:向1 ml的番茄红素溶液(在预先加热的培养基中以20uM的浓度新鲜制备的)添加0.5 ml异丙醇+含0.025%BHT的1.5己烷/二氯甲烷(1:5 V/V)。使溶液涡旋并且通过 3000 rpm离心10分钟使相分离。

[0097] 进行光谱分析以测量番茄红素的含量(471 nm的吸收峰)。

[0098] 在其它实验中，纯化的 β－胡萝卜素或黄体素与加热的 CTC 组合使用。相对于 Lyc-O-Mato 如上文所述地制备各种这些类胡萝卜素的储备溶液和稀释液。

[0099] 向对照物添加适当体积的 DMSO(0.1-0.2%) 并且相对它的对照物计算在各试管中的百分比抑制。

如上文所述地制备澄清番茄浓缩物 (CTC) 并且，由于其可溶于水，以期望稀释度直接添加到温热的培养基中。

除非另有说明，本研究中所使用的经热处理的 CTC 指的是经一个小时的时间加热至 90℃的 CTC。

[0100] NO 生产分析－通过使用格里斯试剂和亚硝酸钠作为标准物测定亚硝酸盐水平来确定在细胞培养物上清液中的 NO 水平，如在 Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., 和 Tannenbaum, S. R. (1982) *Anal Biochem.* 126: 131-138 中描述的。

[0101] 统计学分析－数据用平均值 ±SEM 表示。使用 Student 的配对双尾 t 检验确定组间比较的统计学意义。

[0102] 结果

Lycomato和加热的 CTC的组合对 NO生产的协同抑制。

[0103] 如图 6 中所示，存在通过在 1:4000 至 1:1000 稀释度范围内的加热的 CTC 和 0.2 μM Lyc-O-mato 的组合对经 LPS 处理的巨噬细胞产生 NO 的协同抑制。图中的各对柱中的第一条柱表示仅用加热的 CTC 获得的结果，而各对中的第二条柱表示用指定稀释度的加热的 CTC 和 0.2 μM Lycomato 的组合获得的结果。示出的结果为三次单独实验的平均值，且每次实验重复三次。

[0104] 最大的协同效应是通过1:4000的CTC稀释度与0.2 μM Lycomato的组合获得的，其引起 28.1±6% 抑制。仅加热的 CTC(1:4000) 引起 4.9±2.1% 抑制并且 0.2 μM lycomato 引起可忽略的抑制。由此该组合的效应比各成分的加和效应高 5.7 倍。

叶黄素和加热的 CTC的组合对 NO生产的协同抑制。

[0105] 如在图 7 中所示的，在 1:1000 至 1:7000 稀释度范围内的加热的 CTC 与 1 μM 和 2 μM 两者的叶黄素的组合引起对经 LPS 处理的巨噬细胞生产 NO 的协同抑制。所示的结果为三次单独实验的平均值。

[0106] 会注意到，最大的协同效应是通过叶黄素(在检验的两种浓度下)与在 1:2000 至 1:5000 稀释度范围内的加热的 CTC 一起的组合获得的。

[0107] β-胡萝卜素与加热的 CTC的组合对 NO生产的协同抑制

如图 8 所示，在 1:1000 至 1:7000 稀释度范围内的加热的 CTC 与 0.5 μM 和 1 μM 两者的 β－胡萝卜素的组合引起对经 LPS 处理的巨噬细胞生产 NO 的协同抑制。示出的结果为三次单独实验的平均值。

[0108] 会注意到，在0.5 μM β－胡萝卜素的情况中，最大的协同效应是通过与在1:2000至 1:7000 稀释度范围内的加热的 CTC 的组合获得的。

[0109] 这些结果明确表明，关于它们抑制炎症的能力，在加热的 CTC 和类胡萝卜素之间存在协同的相互作用。

[0110] 实施例 6

使用经热处理的CTC和类胡萝卜素的协同组合抑制 NO白细胞介素 1-β 的生产

使用角叉菜－诱发的爪炎症模型以调查经热处理的CTC和番茄油树脂(Lyc-O-Mato; Lycored Ltd., Israel)的组合对促炎细胞因子IL1-β 的生产的影响。方法：

通过口服途径向实验室大鼠(单独地或一起)给药Lyc-O-Mato和经热处理的CTC(如上文所述制备),每天一次,持续7天。双氯芬酸(在激发前两小时腹腔内给药)使用作为阳性对照物。

[0111] 在第8天,将角叉菜溶液注射在大鼠的左爪内。在该注射后,由产生ROS和促炎细胞因子的嗜中性粒细胞的流入介导的炎症在经处理的爪子中发展。使用标准 ELISA试剂盒测量促炎细胞因子－白细胞介素-1β 在发炎的组织内的分泌量。

[0112] 结果：

可从图9看到,3 mg/kg Lyc-O-Mato(番茄油树脂)与5 mg/kg加热的CTC一起的组合引起IL-1β 在发炎的组织内的分泌量的显著和统计学上有意义的下降。该下降的幅度与由二氯芬酸阳性对照物引起的相似。

[0113] 实施例7

加热的CTC和加热的 CTC和类胡萝卜素的组合对骨健康的积极作用

成骨细胞和破骨细胞两者均参与骨重塑。本发明人已发现加热的CTC通过至少两种互补机理改善骨健康：

1. 减少破骨细胞的分化。

[0114] 2. 刺激抗氧化剂应答元件(ARE/Nrf2)在成骨细胞内发信号。

[0115] 体外研究CTC对RANKL-介导的破骨细胞分化和活化的抑制效应。

[0116] 方法：

1. 破骨细胞分化

用含有或不含指定稀释度的CTC(非加热的或加热的)的RANKL 20 ng/ml培养来自小鼠单核细胞－巨噬细胞系RAW 264.7－破骨细胞－前体谱系的细胞3天并染色用于TRAP活性(破骨细胞分化的标记)。从在仅RANKL的存在下获得的活性计算百分比抑制。如在图9中所表明的添加LycoMato(相当于1 μM 番茄红素)。数据为3次实验(各重复进行3次)的代表。

[0117] 2. 测量抗氧化剂应答元件(ARE/Nrf2)在成骨细胞内发信号

MC3T3-E1小鼠成骨细胞的培养物用于本研究。仅CTC(加热的和非加热的),或与番茄红素(6,14')氧化产物一起加入细胞内并且测量ARE报道基因转录活性,根据在共同拥有的WO 2007/043046中所描述的方法。

[0118] 本研究的结果总结在图10-12中。

[0119] 如图10中所示,加热和非加热的CTC均引起对RANKL-介导的破骨细胞分化的剂量相关的抑制,如通过TRAP所测得的。然而,加热CTC试样导致CTC在抑制破骨细胞分化中的效力显著增加。

[0120] 图11呈现的结果显示由经热处理的CTC和番茄红素的组合引起破骨细胞分化的抑制。对在图中所示的各种处理结果的比较表明番茄红素和经热处理的CTC之间的协同作用。

图12呈现的结果显示通过用加热的CTC的处理刺激剂量相关的ARE在培养的MC3T3

成骨细胞内发信号。还可观察到非加热的 CTC 在这种模型中没有作用。

[0121] 虽然出于说明的目的已描述了本发明的具体实施方案，但应理解，在实践中技术人员可在许多修改、改变和改编的情况下实施本发明，而不背离本发明的精神或超出权利要求的范围。

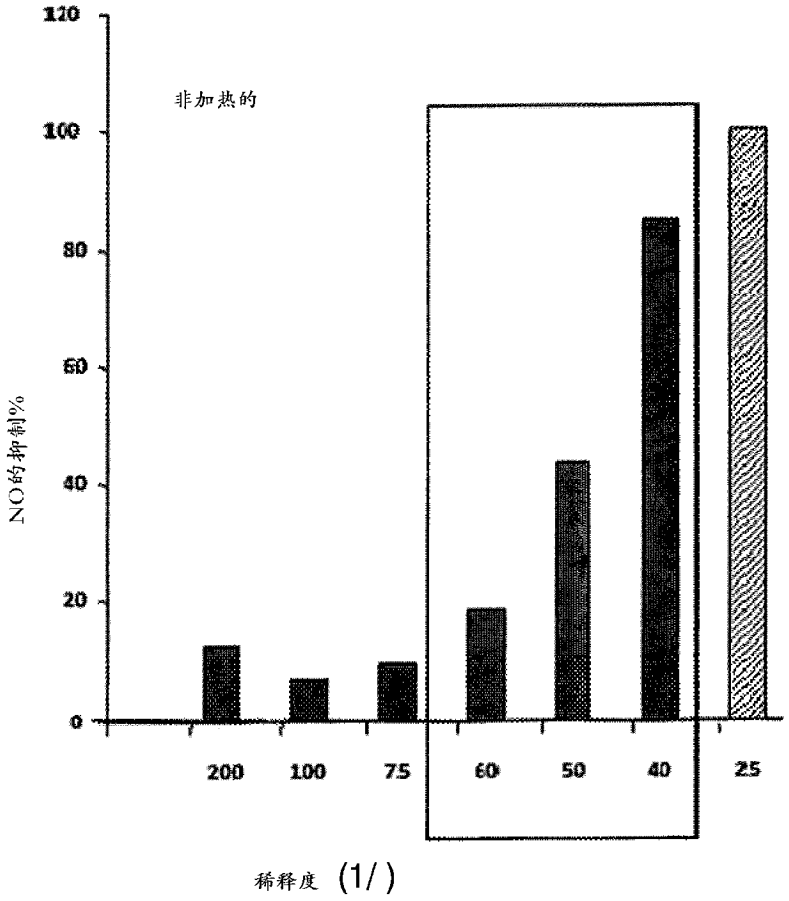


图 1A

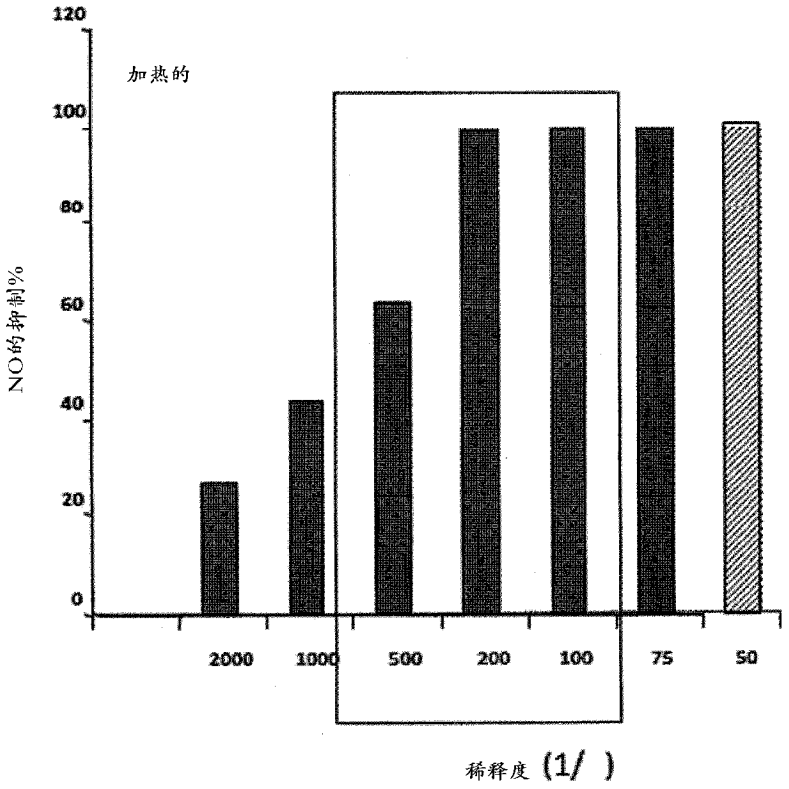

加热的
NO的抑制%
120
100
80
60
40
20
0
2000
1000
500
200
100
75
50
稀释度 (1/)

图 1B

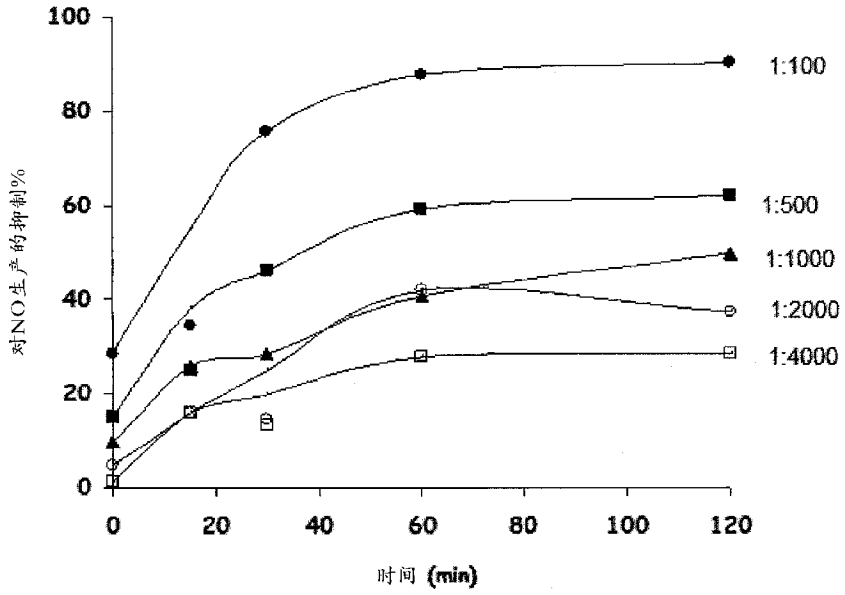

对NO生产的抑制%
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
120
时间 (min)
1:100
1:500
1:1000
1:2000
1:4000

图 2

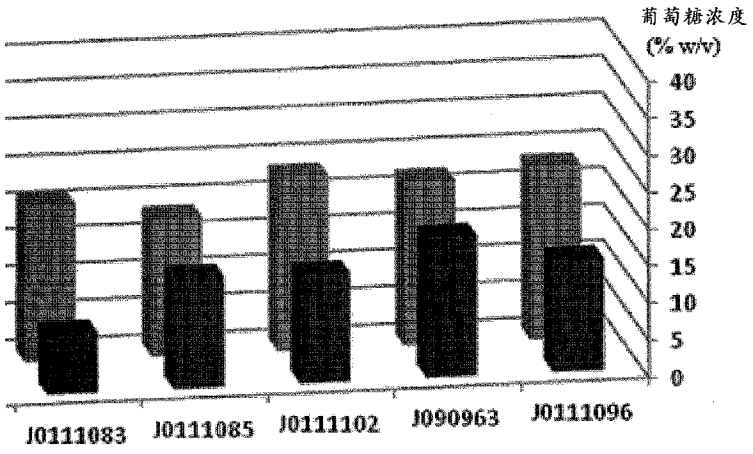

葡萄糖浓度
(% w/v)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
J0111083
J0111085
J0111102
J090963
J0111096

图 3

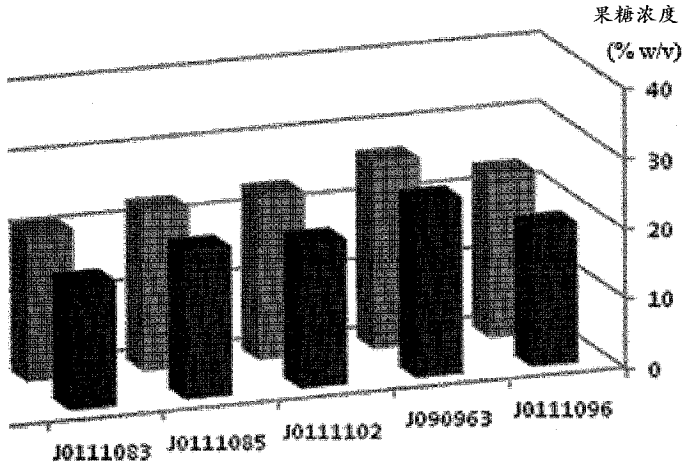

果糖浓度
(% w/v)
40
30
20
10
0
J0111083
J0111085
J0111102
J090963
J0111096

图 4

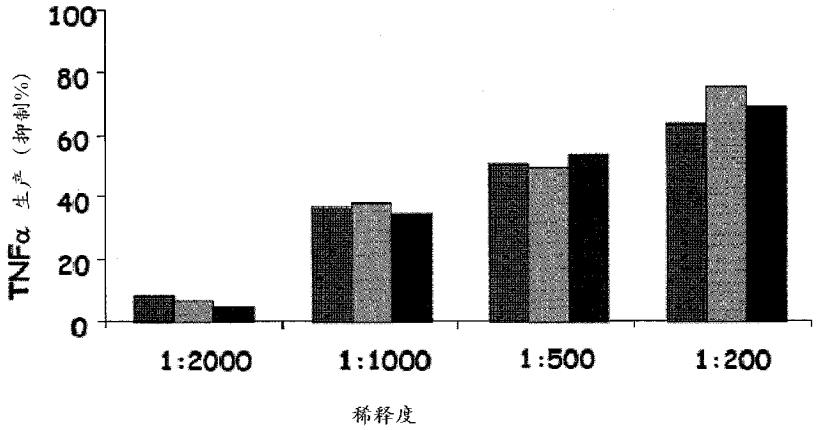

100
80
60
40
20
0
TNFα 生产（抑制%）
1:2000
1:1000
1:500
1:200
稀释度

图 5

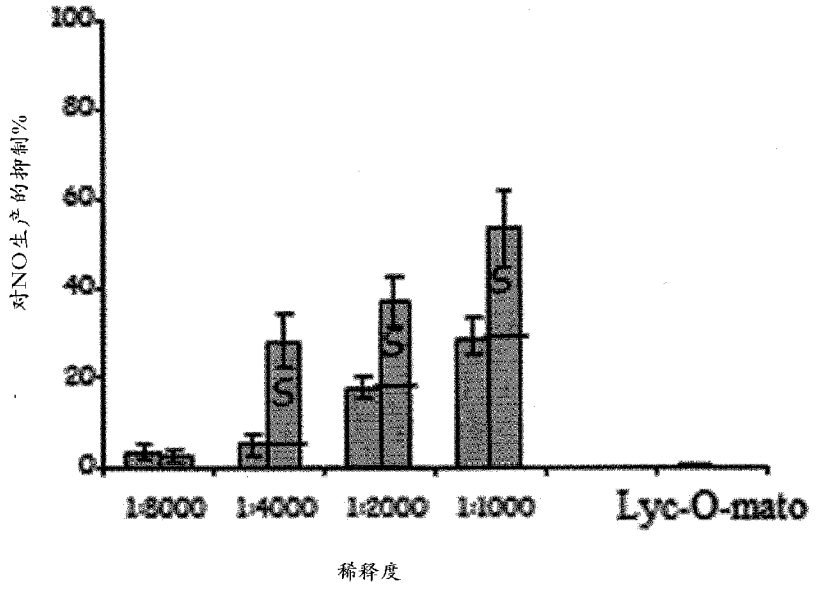

对NO生产的抑制%
100
80
60
40
20
0
1:8000
1:4000
1:2000
1:1000
Lyc-O-mato
稀释度

图 6

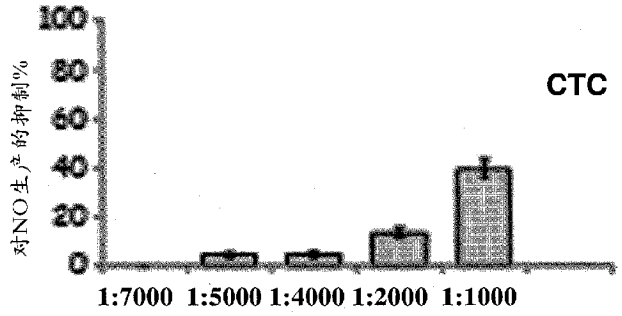

对NO生产的抑制%
100
80
60
40
20
0
CTC
1:7000 1:5000 1:4000 1:2000 1:1000

图 7A

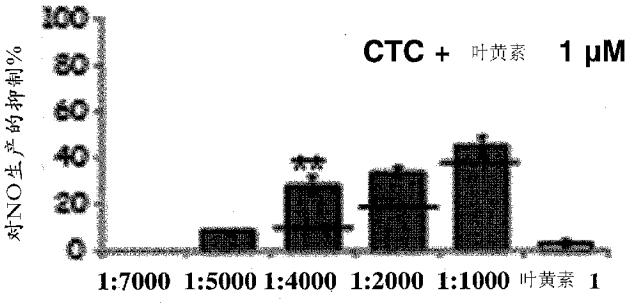

对NO生产的抑制%
100
80
60
40
20
0
CTC + 叶黄素 1 μM
1:7000 1:5000 1:4000 1:2000 1:1000 叶黄素 1

图 7B

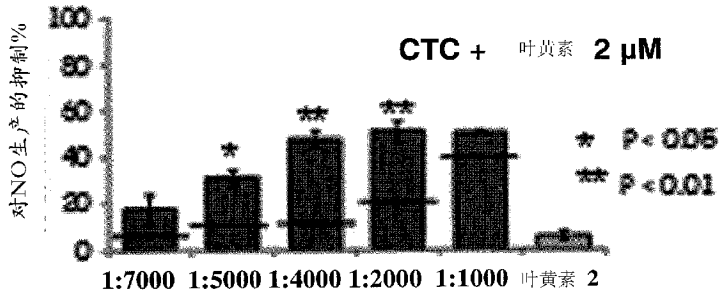

对NO生产的抑制%
100
80
60
40
20
0
CTC + 叶黄素 2 μM
* P< 0.05
** P < 0.01
1:7000 1:5000 1:4000 1:2000 1:1000 叶黄素 2

图 7C

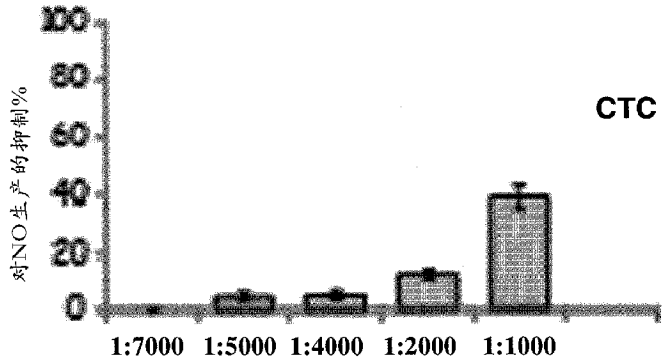

对NO生产的抑制%
100
80
60
40
20
0
CTC
1:7000 1:5000 1:4000 1:2000 1:1000

图 8A

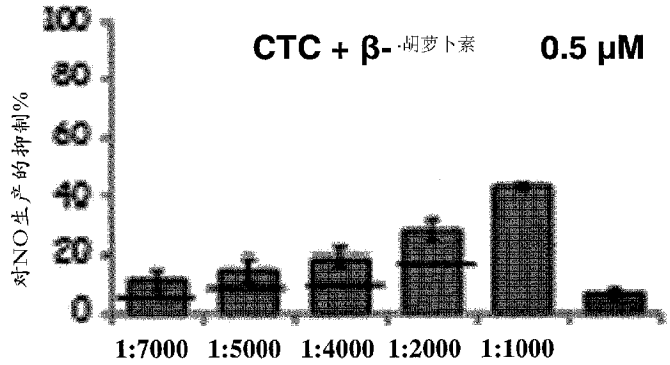

对NO生产的抑制%
100
80
60
40
20
0
CTC + β-胡萝卜素 0.5 μM
1:7000 1:5000 1:4000 1:2000 1:1000

图 8B

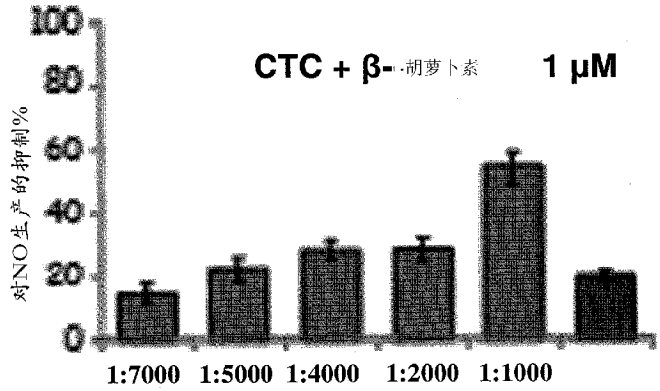

CTC + β-胡萝卜素 1 μM
对NO生产的抑制%
100
80
60
40
20
0
1:7000
1:5000
1:4000
1:2000
1:1000

图 8C

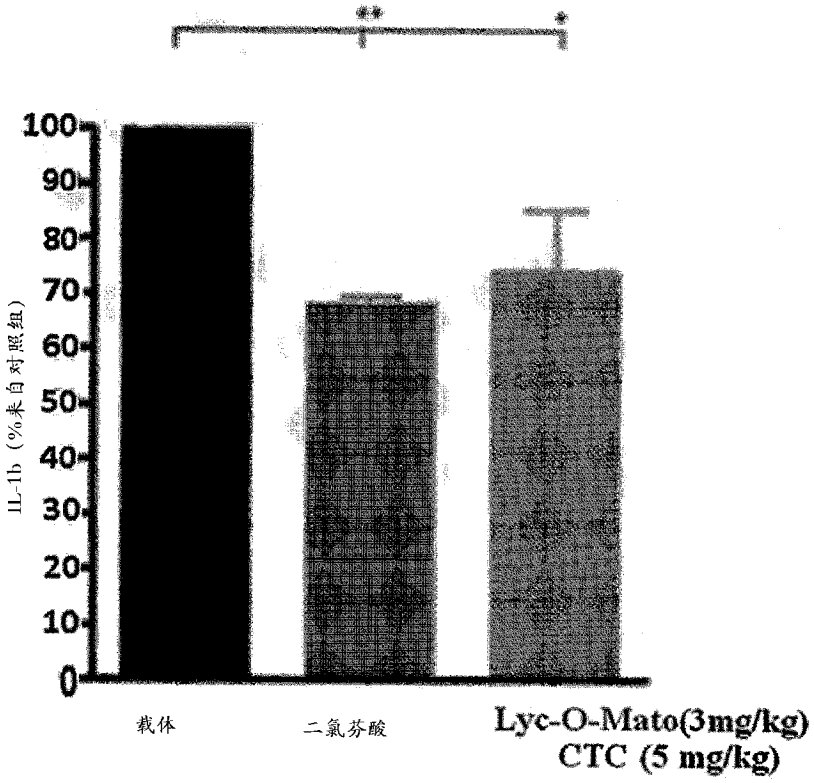

**
*
IL-1b（%来自对照组）
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
载体
二氯芬酸
Lyc-O-Mato(3mg/kg)
CTC (5 mg/kg)

图 9

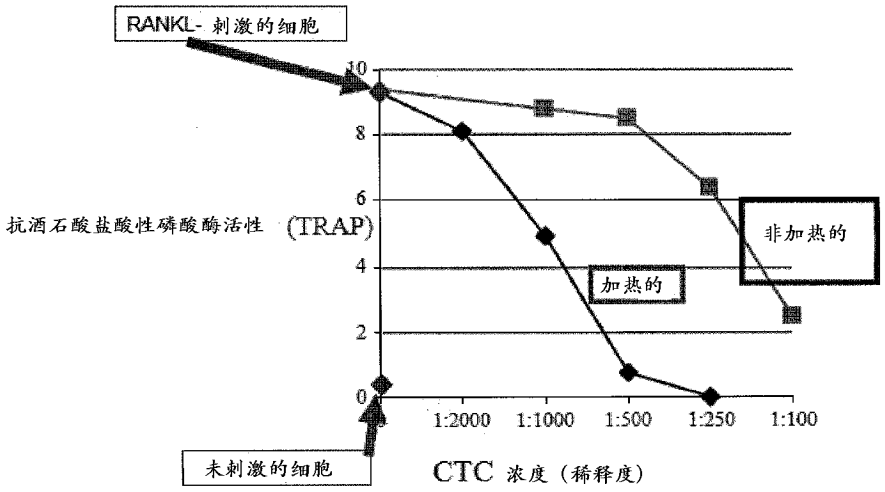

RANKL- 刺激的细胞
抗酒石酸盐酸性磷酸酶活性 (TRAP)
10
8
6
4
2
0
非加热的
加热的
未刺激的细胞
1:2000
1:1000
1:500
1:250
1:100
CTC 浓度（稀释度）

图 10

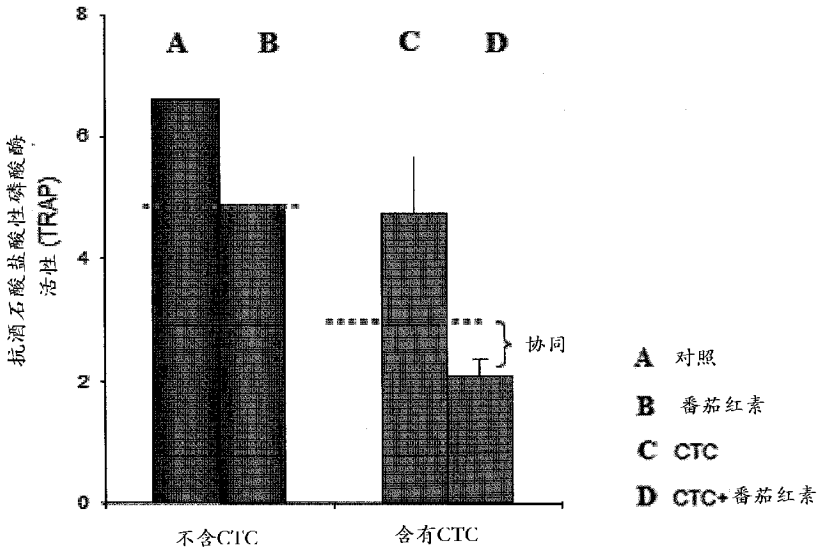

A
B
C
D
抗酒石酸盐酸性磷酸酶活性 (TRAP)
8
6
4
2
0
协同
不含CTC
含有CTC
A 对照
B 番茄红素
C CTC
D CTC+番茄红素

图 11

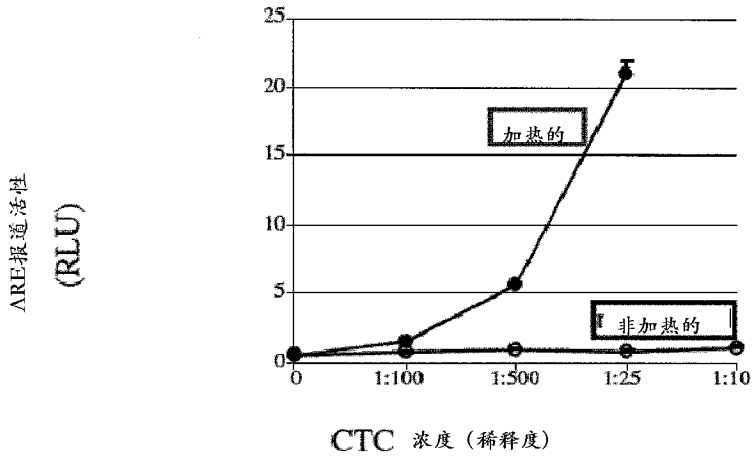

ARE报道活性
(RLU)
25
20
15
10
5
0
加热的
非加热的
0
1:100
1:500
1:25
1:10
CTC 浓度（稀释度）

图 12