

【11】證書號數：I379688

【45】公告日：中華民國 101 (2012) 年 12 月 21 日

【51】Int. Cl.：	<i>A61K36/898</i> (2006.01)	<i>A61K31/715</i> (2006.01)
	<i>A61P19/10</i> (2006.01)	<i>A61P29/00</i> (2006.01)
	<i>A61P11/06</i> (2006.01)	<i>A61P35/00</i> (2006.01)
	<i>A61P37/02</i> (2006.01)	

發明

全 16 頁

【54】名稱：可用於促進益菌生長、促進顆粒性白血球集落刺激因子之釋放、調控第一型 T 輔助細胞及 / 或調控第二型 T 輔助細胞之金線連多醣萃取物及醫藥組合物及其應用

ANOECTOCHILUS SPP. POLYSACCHARIDE EXTRACTS AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS FOR STIMULATING GROWTH OF ADVANTAGEOUS BACTERIA, STIMULATING RELEASE OF GRANULOCYTE COLONY-STIMULATING FACTOR, MODULATING T HELPER CELL TYPE I, AND/OR MODULATING T HELPER CELL TYPE II AND USES OF THE SAME

【21】申請案號：098133714 【22】申請日：中華民國 98 (2009) 年 10 月 05 日

【11】公開編號：201113028 【43】公開日期：中華民國 100 (2011) 年 04 月 16 日

【72】發明人：林文川 (TW) LIN, WEN CHUAN；謝長奇 (TW) HSIEH, CHANG CHI；呂廷璋 (TW) LU, TING JANG；蔡新聲 (TW) TSAY, HSIN SHENG；楊麗嬋 (TW) YANG, LI CHAN；林佳潔 (TW) LIN, CHIA CHIEH；王鐘凰 (TW) WANG, CHUNG HUANG

【71】申請人：中國醫藥大學 CHINA MEDICAL UNIVERSITY  
臺中市北區學士路 91 號

【74】代理人：陳翠華

【56】參考文獻：

阮昌庭，臺灣金線連水溶性多醣分子結構特徵，台灣大學，2005/7

吳怡箴，金線連多醣對小鼠免疫反應調節之研究，台北醫學大學，2005/7

審查人員：蔡明秀

[57]申請專利範圍

1. 一種用於促進顆粒性白血球集落刺激因子(Granulocyte Colony-Stimulating Factor, G-CSF)之釋放之金線連多醣萃取物，其係包含金線連之第二型阿拉伯半乳聚醣(type II arabinogalactan)且具約 40 千道爾頓(Dalton)至約 70 千道爾頓之平均分子量。
2. 如請求項 1 之萃取物，其平均分子量為約 50 千道爾頓至約 60 千道爾頓。
3. 如請求項 1 之萃取物，其中該第二型阿拉伯半乳聚醣之平均分子量為約 15 千道爾頓至約 45 千道爾頓。
4. 如請求項 1 之萃取物，其中該第二型阿拉伯半乳聚醣之平均分子量為約 25 千道爾頓至約 35 千道爾頓。
5. 如請求項 1 之萃取物，其係一水溶液。
6. 如請求項 1 之萃取物，其中該金線連係台灣金線連(*Anoectochilus formosanus* Hayata)。
7. 如請求項 1 之萃取物，其更包含澱粉。

(2)

8. 如請求項 1 之萃取物，其中該第二型阿拉伯半乳聚糖之含量為約 20 重量%至約 50 重量%，以萃取物之乾重計。
9. 如請求項 1 之萃取物，其中該第二型阿拉伯半乳聚糖之含量為約 30 重量%至約 40 重量%，以萃取物之乾重計。
10. 如請求項 1 至 9 中任一項之萃取物，其係用於抗發炎及抑制白血球減少。
11. 一種製備如請求項 1 至 10 中任一項之金線連多醣萃取物之方法，包含：a)以水萃取金線連，以獲得一水溶性之金線連萃取液；b)對該金線連萃取液進行一脫脂作用，並收集水相萃取液；以及 c)添加乙醇至該水相萃取液，並收集所產生之沉澱物，其中，以添加乙醇後之總體積計，乙醇之用量為約 65 體積%至約 85 體積%。
12. 如請求項 11 之方法，其中於步驟 b)，以該金線連萃取液之體積計，係添加約 15 體積%至約 35 體積%之乙酸乙酯至該金線連萃取液中，以進行該脫脂作用。
13. 如請求項 11 之方法，其中於步驟 b)，以該金線連萃取液之體積計，係添加約 20 體積%至約 30 體積%之乙酸乙酯至該金線連萃取液中，以進行該脫脂作用。
14. 如請求項 11 之方法，其中該乙醇之用量為約 70 體積%至約 80 體積%。
15. 如請求項 11 之方法，更包含將步驟 c)之該沉澱物溶於水中。
16. 如請求項 11 或 15 之方法，更包含於步驟 c)之後，先進行一乾燥步驟 d)，以乾燥該沉澱物。
17. 一種用於促進顆粒性白血球集落刺激因子之釋放之醫藥組合物，包含一有效量之如請求項 1 至 10 中任一項之萃取物。
18. 如請求項 17 之醫藥組合物，其係用於抗發炎及抑制白血球減少。
19. 一種使用如請求項 1 至 10 中任一項之金線連多醣萃取物在製造藥劑之應用，其中該藥劑係用於促進顆粒性白血球集落刺激因子之釋放。
20. 如請求項 19 之應用，其中該藥劑係用於抗發炎及抑制白血球減少。
21. 如請求項 20 所述之應用，其中該藥劑之用量，以該第二型阿拉伯半乳聚糖計，為每天約 2 毫克/公斤體重至約 25 毫克/公斤體重。
22. 如請求項 20 所述之應用，其中該藥劑之用量，以該第二型阿拉伯半乳聚糖計，為每天約 3 毫克/公斤體重至約 20 毫克/公斤體重。
23. 一種用於促進益菌生長、調控第一型 T 輔助細胞(T helper cell type I, Th1)及/或調控第二型 T 輔助細胞(T helper cell type II, Th2)之金線連多醣萃取物，其係包含金線連之第二型阿拉伯半乳聚糖(type II arabinogalactan)且具約 40 千道爾頓(Dalton)至約 70 千道爾頓之平均分子量，且係以包含以下步驟之方法製得：a)以水萃取金線連，以獲得一水溶性之金線連萃取液；b)對該金線連萃取液進行一脫脂作用，並收集水相萃取液；以及 c)添加乙醇至該水相萃取液，並收集所產生之沉澱物，其中，以添加乙醇後之總體積計，乙醇之用量為約 65 體積%至約 85 體積%。
24. 如請求項 23 之萃取物，其中該益菌係雙叉乳酸桿菌(*Bifidobacterium*)屬之細菌。
25. 如請求項 23 之萃取物，其中該益菌係 *Bifidobacterium breve*。
26. 如請求項 23 之萃取物，其平均分子量為約 50 千道爾頓至約 60 千道爾頓。
27. 如請求項 23 之萃取物，其中該第二型阿拉伯半乳聚糖之平均分子量為約 15 千道爾頓至約 45 千道爾頓。
28. 如請求項 23 之萃取物，其中該第二型阿拉伯半乳聚糖之平均分子量為約 25 千道爾頓至約 35 千道爾頓。
29. 如請求項 23 之萃取物，其係一水溶液。

30. 如請求項 23 之萃取物，其中該金線連係台灣金線連(*Anoectochilus formosanus* Hayata)。
31. 如請求項 23 之萃取物，其更包含澱粉。
32. 如請求項 23 之萃取物，其中該第二型阿拉伯半乳聚糖之含量為約 20 重量%至約 50 重量%，以萃取物之乾重計。
33. 如請求項 23 之萃取物，其中該第二型阿拉伯半乳聚糖之含量為約 30 重量%至約 40 重量%，以萃取物之乾重計。
34. 如請求項 23 至 33 中任一項之萃取物，其係用於增加腸中脂肪酸含量、促進鈣吸收、抗骨質疏鬆、抗過敏、改善氣喘、抑制大腸癌、以及調節免疫功能。
35. 如請求項 23 至 33 中任一項之萃取物，其中於步驟 b)，以該金線連萃取液之體積計，係添加約 15 體積%至約 35 體積%之乙酸乙酯至該金線連萃取液中，以進行該脫脂作用。
36. 如請求項 23 至 33 中任一項之萃取物，其中於步驟 b)，以該金線連萃取液之體積計，係添加約 20 體積%至約 30 體積%之乙酸乙酯至該金線連萃取液中，以進行該脫脂作用。
37. 如請求項 23 至 33 中任一項之萃取物，其中該乙醇之用量為約 70 體積%至約 80 體積%。
38. 如請求項 23 至 33 中任一項之萃取物，更包含將步驟 c)之該沉澱物溶於水中。
39. 如請求項 23 至 33 中任一項之萃取物，更包含於步驟 c)之後，先進行一乾燥步驟 d)，以乾燥該沉澱物
40. 如請求項 38 之萃取物，更包含於步驟 c)之後，先進行一乾燥步驟 d)，以乾燥該沉澱物。
41. 一種用於促進益菌生長、促進顆粒性白血球集落刺激因子之釋放、調控第一型 T 輔助細胞及/或調控第二型 T 輔助細胞之醫藥組合物，包含一有效量之如請求項 23 至 40 中任一項之萃取物。
42. 如請求項 41 之醫藥組合物，其係用於增加腸中脂肪酸含量、促進鈣吸收、抗骨質疏鬆、抗過敏、改善氣喘、抑制大腸癌、以及調節免疫功能。
43. 一種使用如請求項 23 至 40 中任一項之金線連多醣萃取物在製造藥劑之應用，其中該藥劑係用於促進益菌生長、調控第一型 T 輔助細胞及/或調控第二型 T 輔助細胞。
44. 如請求項 43 之應用，其中該藥劑係用於增加腸中脂肪酸含量、促進鈣吸收、抗骨質疏鬆、抗過敏、改善氣喘、抑制大腸癌、以及調節免疫功能。
45. 如請求項 44 所述之應用，其中該藥劑之用量，以該第二型阿拉伯半乳聚糖計，為每天約 2 毫克/公斤體重至約 25 毫克/公斤體重。
46. 如請求項 44 所述之應用，其中該藥劑之用量，以該第二型阿拉伯半乳聚糖計，為每天約 3 毫克/公斤體重至約 20 毫克/公斤體重。

#### 圖式簡單說明

第 1 圖所示為製備本發明金線連多醣萃取物及金線連之第二型阿拉伯半乳聚糖的流程圖；

第 2 圖所示為本發明金線連多醣萃取物之  $\beta$ -葡萄糖基-Yariv 抗原親合性試驗之呈色圖；

第 3A 圖所示為本發明金線連多醣萃取物之單醣組成的分析圖；

第 3B 圖所示為金線連之第二型阿拉伯半乳聚糖之單醣組成的分析圖；

第 4 圖所示為本發明金線連多醣萃取物及金線連之第二型阿拉伯半乳聚糖之分子量的分析圖；

第 5 圖所示為 *Bifidobacterium breve* 的生長曲線圖；

第 6 圖所示為小鼠股骨之微型電腦斷層掃描圖；

第 7A 圖至第 7D 圖所示為小鼠腸內之不同短鏈脂肪酸之濃度的條狀圖；

(4)

第 8A 圖所示為小鼠腸內鈣離子結合蛋白 CaBP-D9k 之 mRNA 的電泳圖；

第 8B 圖所示為小鼠腸內鈣離子結合蛋白 CaBP-D9k 之 mRNA 表現的條狀圖；

第 9A 圖所示為巨噬細胞 RAW 264.7 之細胞內亞硝酸鹽之濃度的條狀圖；

第 9B 圖所示為巨噬細胞 RAW 264.7 之細胞內 G-CSF 之濃度的條狀圖；

第 9C 圖所示為巨噬細胞 RAW 264.7 之細胞內 G-CSF 與一氧化氮之比值的條狀圖；

第 10A 圖所示為經脂多糖刺激之 ICR 小鼠於投予第二型阿拉伯半乳聚糖達 1 小時後之血中 TNF- $\alpha$  濃度的條狀圖；

第 10B 圖所示為經脂多糖刺激之 ICR 小鼠於投予第二型阿拉伯半乳聚糖達 16 小時後之血中 TNF- $\alpha$  濃度的條狀圖；

第 11 圖所示為 EL4 細胞之細胞內 T-bet、GATA-3、甘油醛-3-磷酸脫氫酶之蛋白質之西方點墨法的轉漬圖；

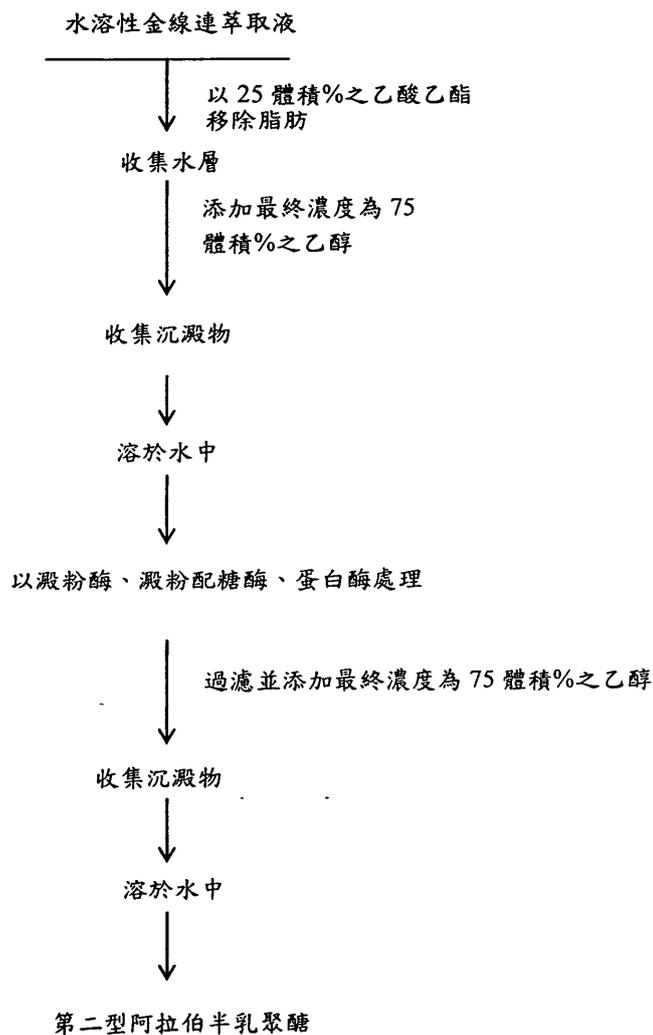
第 12 圖所示為 BALB/c 小鼠之肺臟切片的 HE 染色圖；

第 13 圖所示為 BALB/c 小鼠之大腸的亞甲基藍染色圖；

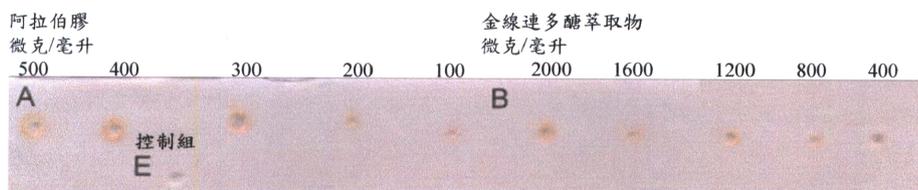
第 14 圖所示為 *Bifidobacterium breve* 之菌液之混濁度的條狀圖；以及

第 15 圖所示為巨噬細胞 RAW 264.7 之細胞內之一氧化氮合成酶、G-CSF 及 TNF- $\alpha$  的 mRNA 電泳圖。

(5)

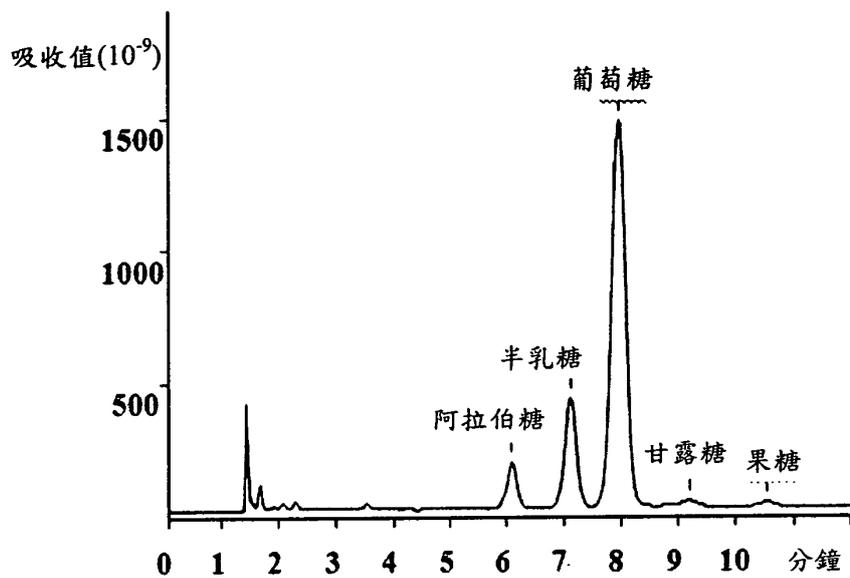


第 1 圖

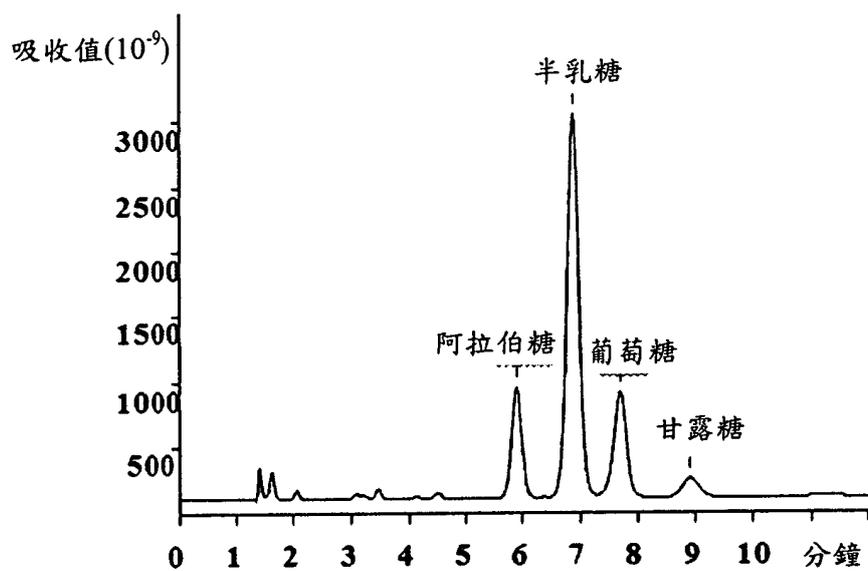


第 2 圖

(6)

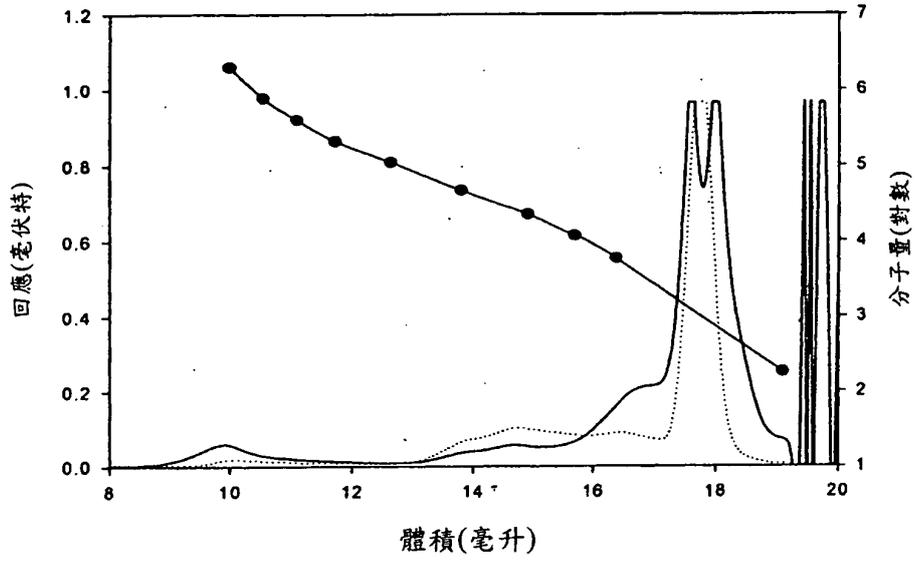


第 3A 圖

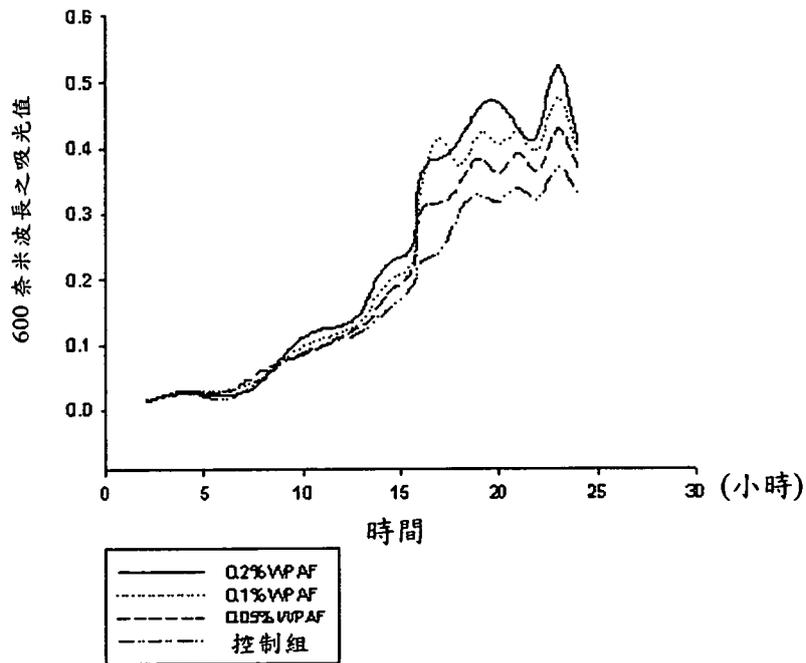


第 3B 圖

(7)

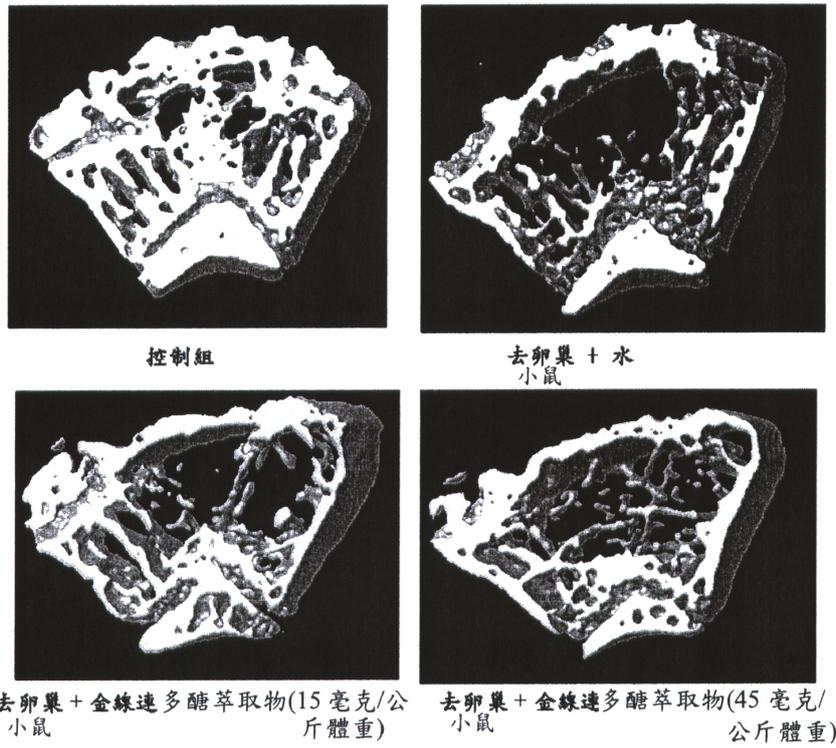


第 4 圖

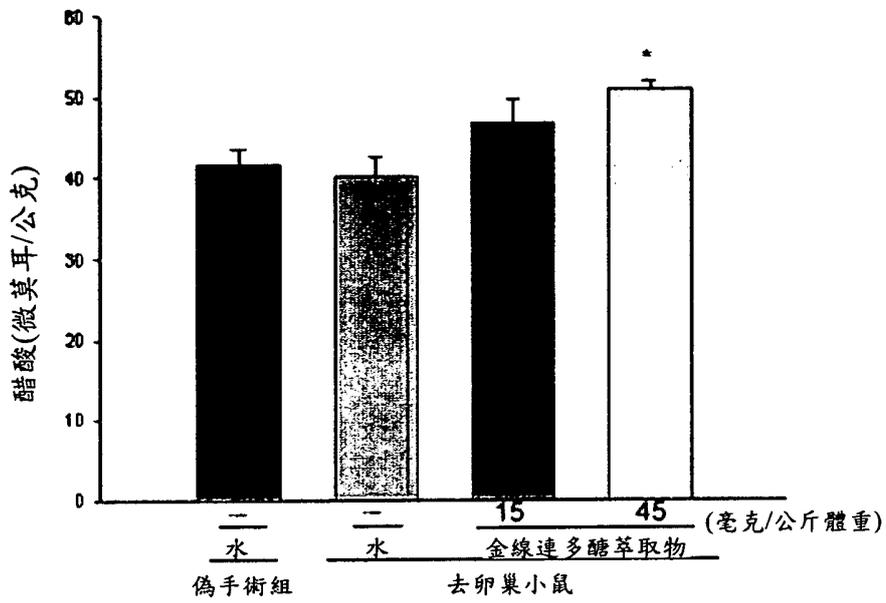


第 5 圖

(8)

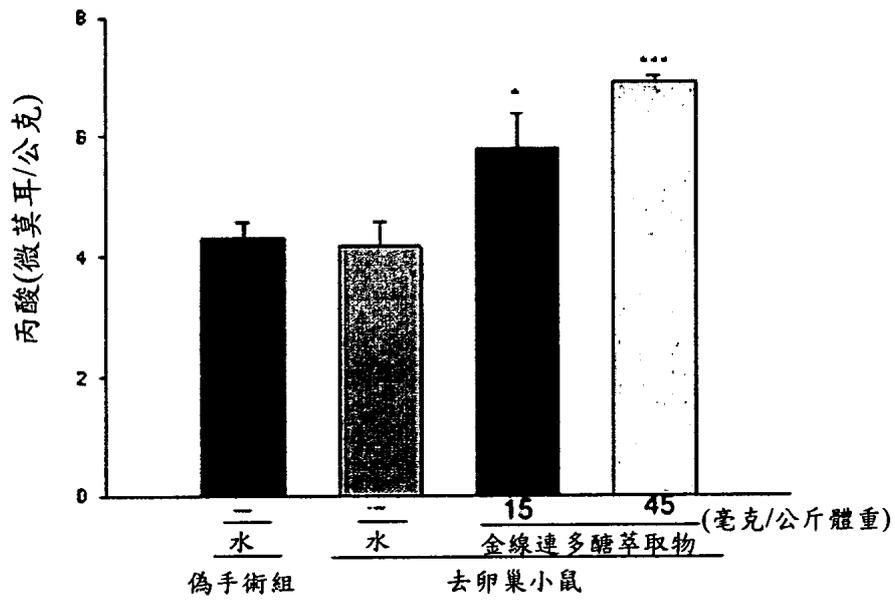


第 6 圖

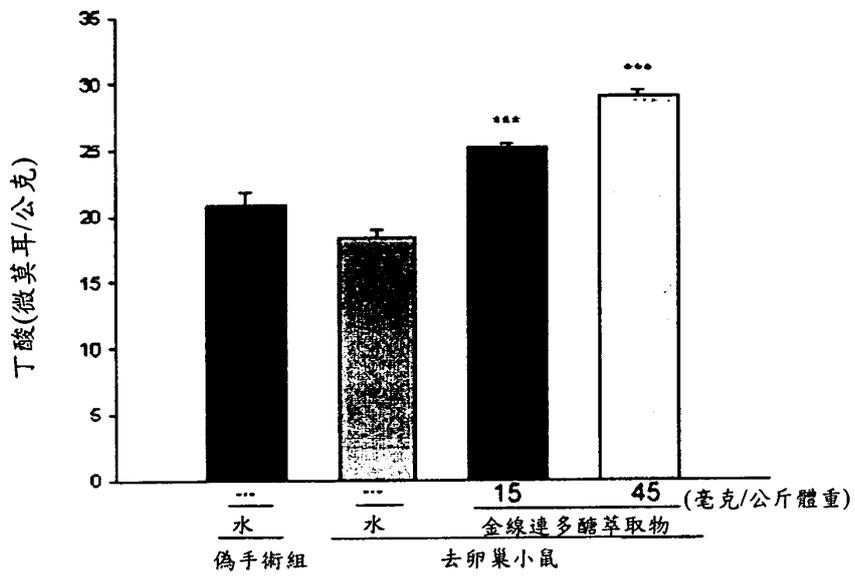


第 7A 圖

(9)

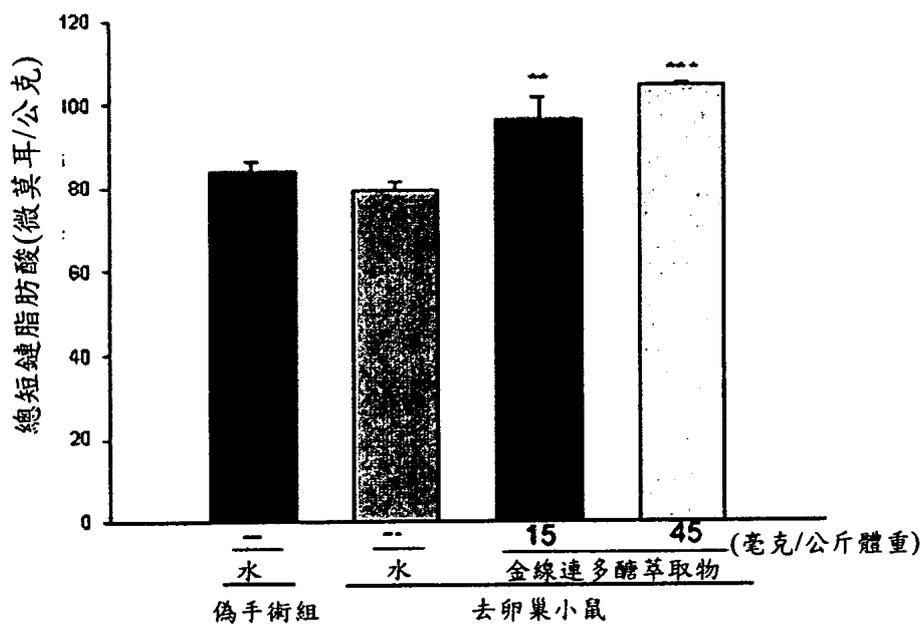


第 7B 圖

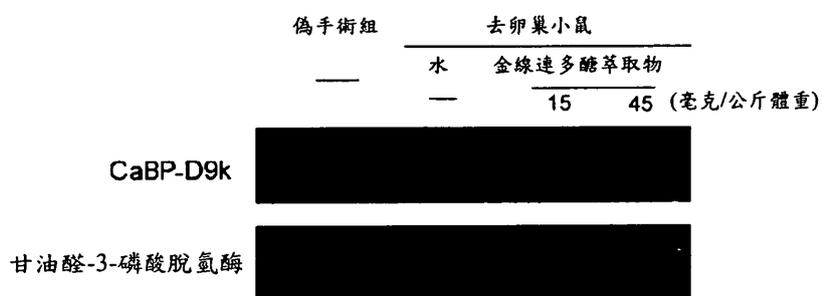


第 7C 圖

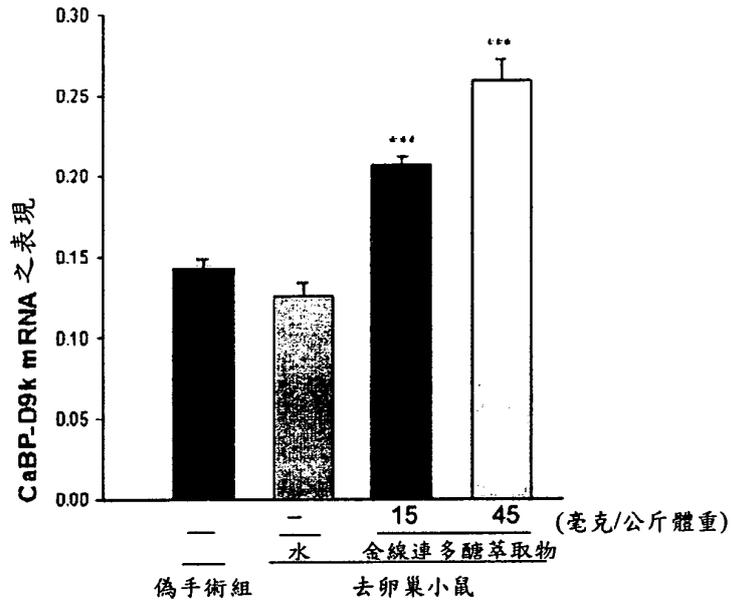
(10)



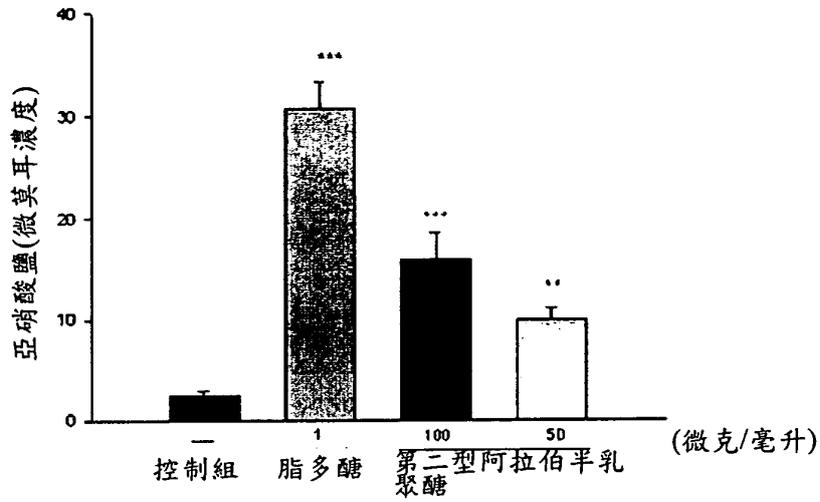
第 7D 圖



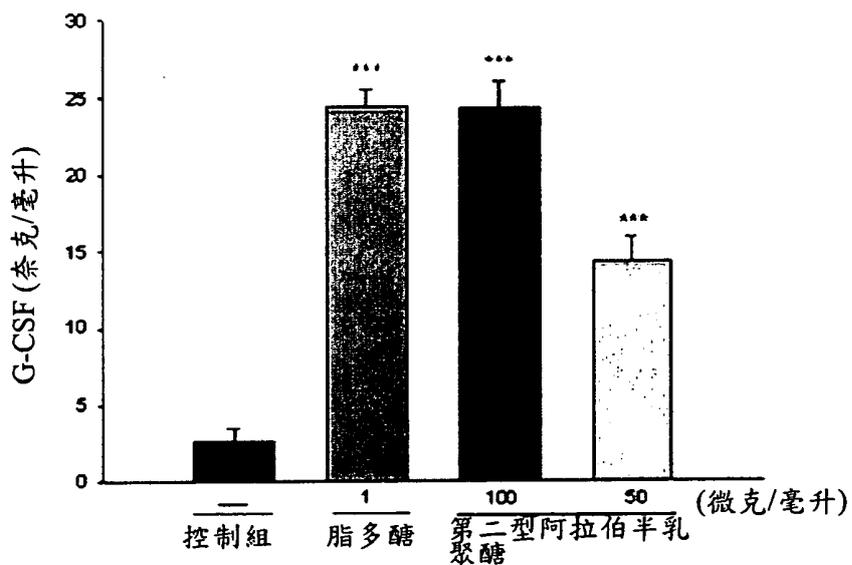
第 8A 圖



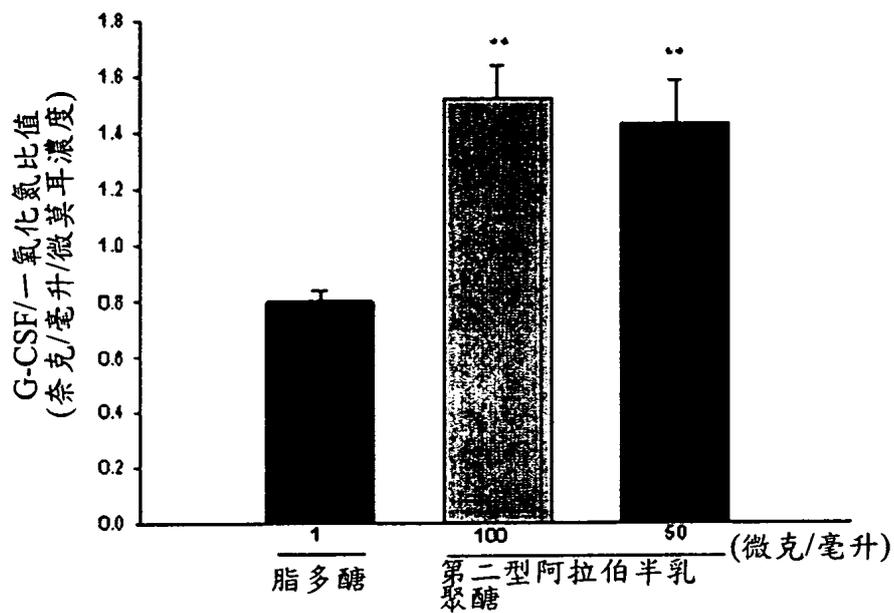
第 8B 圖



第 9A 圖

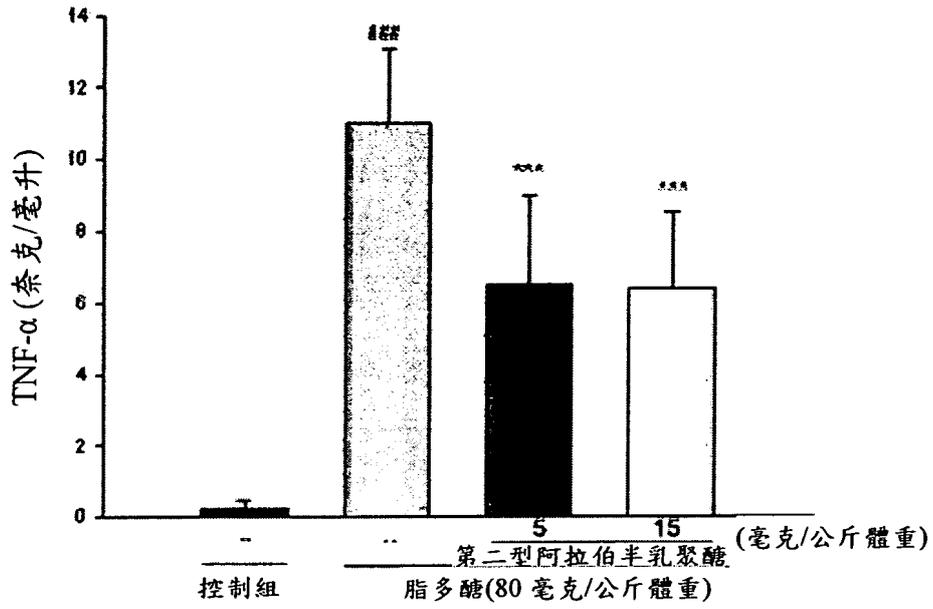


第 9B 圖



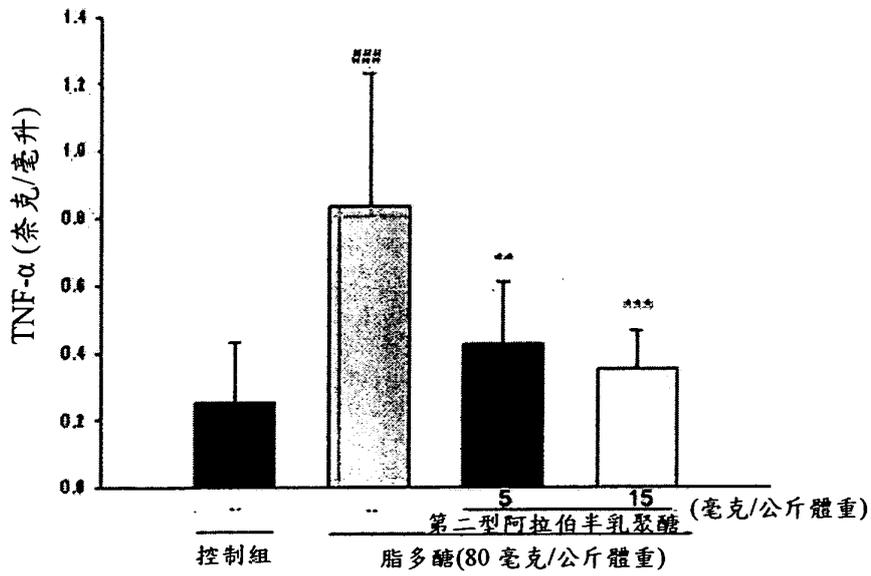
第 9C 圖

(13)



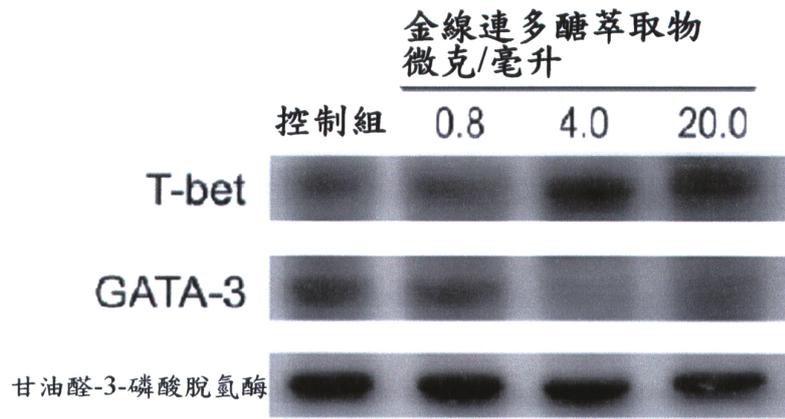
第 10A 圖

16 小時

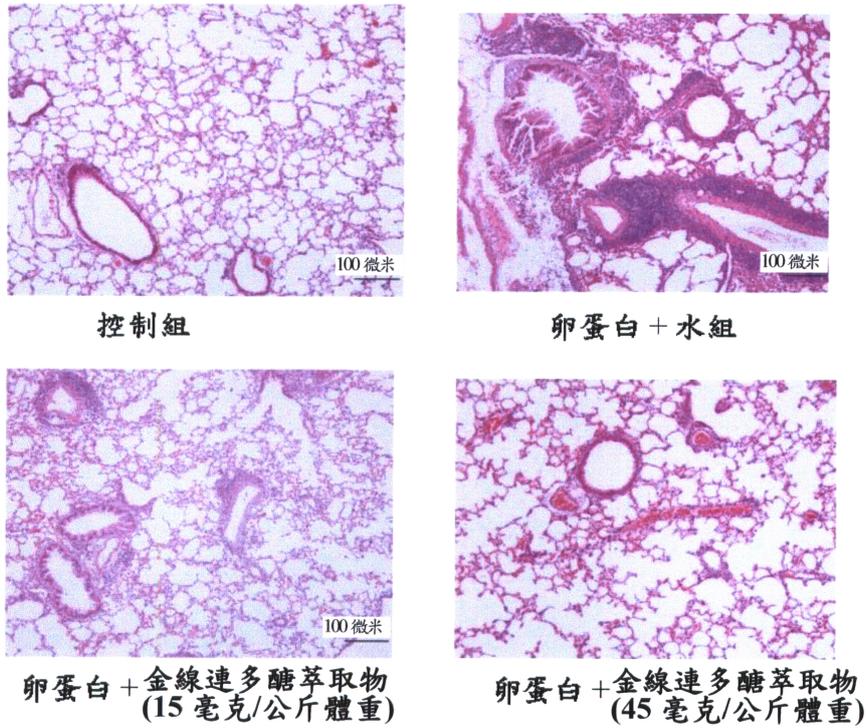


第 10B 圖

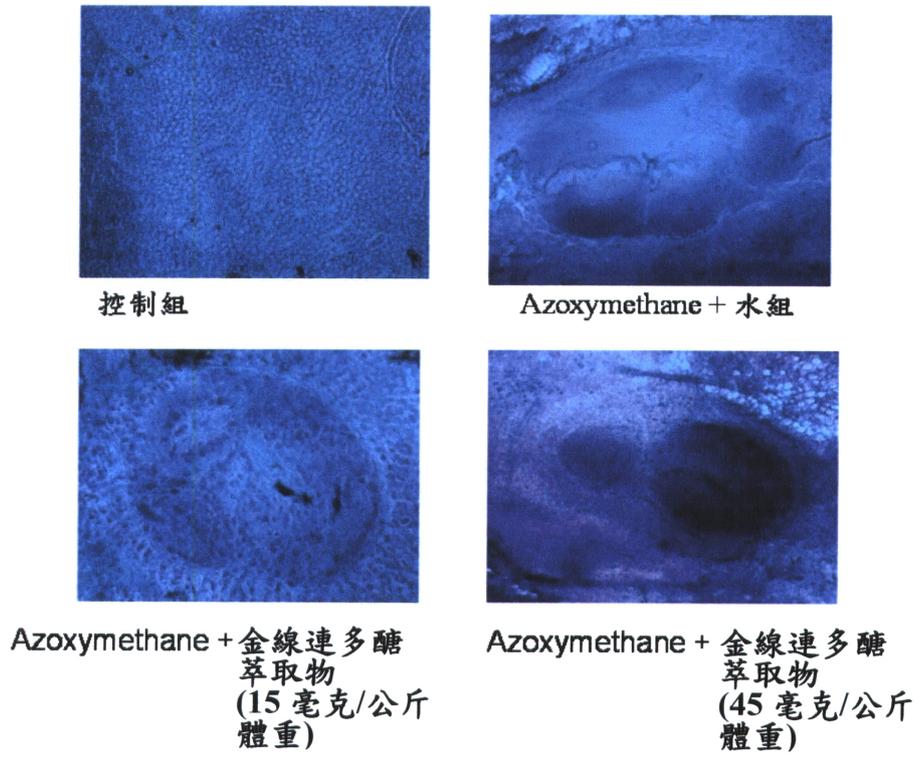
(14)



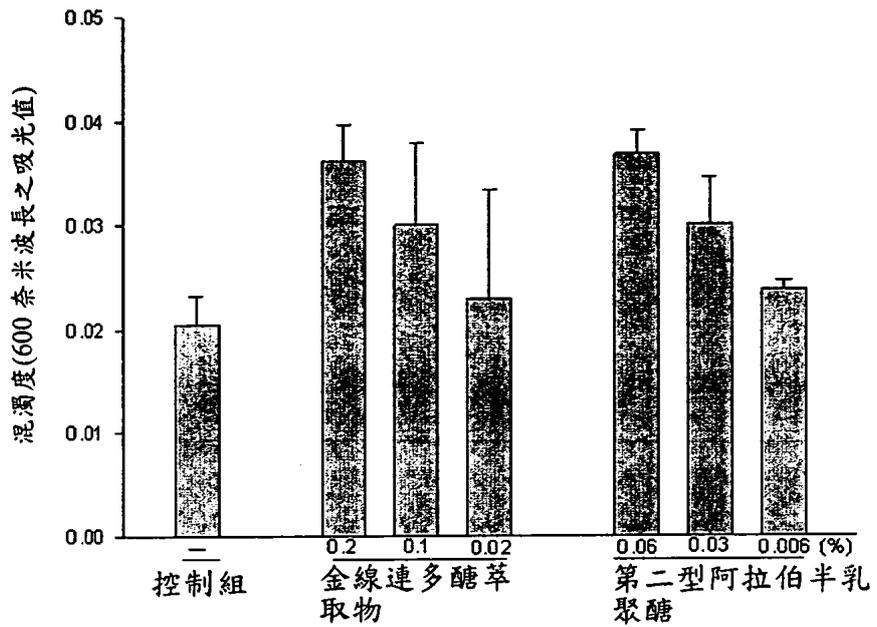
第 11 圖



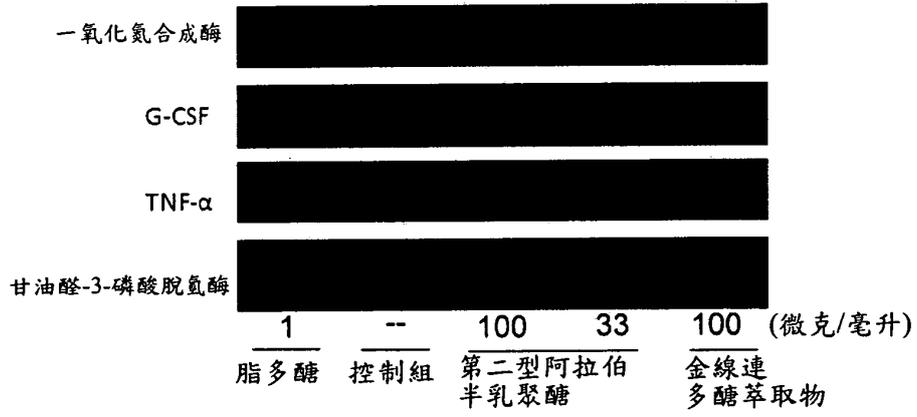
第 12 圖



第 13 圖



第 14 圖



第 15 圖