【19】中華民國　　【12】專利公報　（B）

【11】證書號數：I448294
【45】公告日： 中華民國 103 (2014) 年 08 月 11 日
【51】Int. Cl.：　*A61K36/074 (2006.01)*　*B01D11/04 (2006.01)*
發明　全 13 頁

【54】名　稱：增強免疫活性之樟芝子實體水萃取物及其製備方法
WATER EXTRACT OF ANTRODIA CAMPHORATA FOR IMMUNOSTIMULATORY EFFECT AND PREPARATION METHOD THEREOF

【21】申請案號：098107047　【22】申請日： 中華民國 98 (2009) 年 03 月 04 日
【11】公開編號：201032816　【43】公開日期： 中華民國 99 (2010) 年 09 月 16 日

【72】發 明 人： 吳永昌 (TW) WU, YANG CHANG；呂美津 (TW) LU, MEI CHIN；張芳榮 (TW) CHANG, FANG RONG；杜英齊 (TW) DU, YING CHI；吳東穎 (TW) WU, TUNG YING
【71】申 請 人： 高雄醫學大學　KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY
高雄市三民區十全一路 100 號
【74】代 理 人： 蔡清福

【56】參考文獻：
TW　200819136
徐銘豊，樟芝(Antrodia camphorata) 液態培養生產(1→3)-β-D-glucan 多醣體之研究探討，2006/11/7 揭示牛樟芝多醣體 (子實體或菌絲體)可萃取出抗腫瘤與免疫調節物質屬習知技術
Toxicology and Applied Pharmacology, vol.201(2004), p186-193, 2006/11/7 揭示牛樟芝多醣體萃取方法包括先經熱水萃取後再經乙醇萃取之多醣體萃取物具抗腫瘤功效
Nutrition and Cancer, vol.57(1), 2007, p111-121 揭示使用乙醇萃取樟芝子實體粉末之含多醣體萃取物與 PI3K/Akt 蛋白表現有關
Agricultural and Food Chemistry, vol.56 ,2008, p865-874 揭示經熱水及乙醇萃取牛樟芝菌絲萃取物與 p38/MAPKs 蛋白表現有關
複方中草藥調節免疫及樟芝子實體抑制腫瘤之研究，2007 揭示經熱水萃取樟芝子實體之萃取物具有活化免疫調節活性，抑制腫瘤

審查人員：俞樹生

[57]申請專利範圍

1. 一種樟芝子實體水再取物的備方法，包括下列步驟：(a)研磨一樟芝子實體成一粉狀；(b)水煮、迴流萃取該粉狀的樟芝子實體，過濾及離心，獲得一樟芝子實體水萃取物；(c)以乙酸乙酯萃取該樟芝子實體水萃取物，獲得一樟芝子實體乙酸乙酯萃取物及一第一樟芝子實體殘留物；(d)以乙醇萃取該第一樟芝子實體殘留物，獲得一樟芝子實體乙醇萃取物及一第二樟芝子實體殘留物；以及(e)以水萃取該第二樟芝子實體殘留物，獲得一樟芝子實體水再萃取物。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述的製備方法，其中，該樟芝子實體水再萃取物的 ^{1}H 核磁共振圖譜在化學偏移 δ 3.0-5.5 之醣類化合物特徵訊號比例最高，而且在化學偏移 4.44、4.46、4.91、5.00 及 5.15ppm 處呈現多醣體結構中異位性碳原子(anomeric carbon)上氫的特徵訊號。

3. 一種根據申請專利範圍第 1 項所述的製備方法所製備出的樟芝子實體水再萃取物，其係對一樟芝子實體進行研磨、並水煮迴流萃取、過濾及離心而獲得一樟芝子實體水萃取物，再依序以乙酸乙酯、乙醇及水對該樟芝子實體水萃取物進行萃取，依序獲得一樟芝子實體乙酸乙酯萃取物、一樟芝子實體乙醇萃取物及該樟芝子實體水再萃取物。
4. 如申請專利範圍第 3 項所述的樟芝子實體水再萃取物，其中該樟芝子實體水萃取物經由活化一訊息傳導路徑，而誘發一樹突細胞之成熟。
5. 如申請專利範圍第 4 項所述的樟芝子實體水再萃取物，其中該訊息傳導路徑之蛋白表現係選自 PI3K/Akt、p38/MAPKs 及其組合。
6. 如申請專利範圍第 4 項所述的樟芝子實體水再萃取物，其中該 樹突細胞之成熟進一步促進 T 細胞增升級干擾素 γ 的分泌，並趨化輔助性 T 細胞反應。
7. 如申請專利範圍第 3 項所述的樟芝子實體水再萃取物，其中該樟芝子實體水萃取物經由抑制細胞凋亡作用促進一樹突細胞之活性。
8. 一種萃取自一樟芝子實體的樟芝子實體水再萃取物，其係對該樟芝子實體進行研磨、並水煮迴流萃取、過濾及離心而獲得一樟芝子實體水萃取物，再依序以乙酸乙酯、乙醇及水對該樟芝子實體水萃取物進行萃取，依序獲得一樟芝子實體乙酸乙酯萃取物、一樟芝子實體乙醇萃取物及該樟芝子實體水再萃取物，該樟芝子實體水再萃取物具有下列 ^{1}H 核磁共振圖譜特徵：化學偏移 4.44、4.46、4.91、5.00 及 5.15ppm 處呈現多醣體結構中異位性碳原子(anomeric carbon)上氫的特徵訊號。

圖式簡單說明

第 1 圖為樟芝、靈芝及姬松茸子實體水萃取物分別刺激未成熟的樹突細胞後的 CD86 及 HLA-DR 表現比較圖。

第 2 圖為樟芝子實體水萃取物、靈芝子實體水萃取物及姬松茸子實體水萃取物的多醣體含量比較圖。

第 3 圖為本發明實施例的樟芝子實體水萃取物及其後續的有機溶劑萃取物及水再萃取物的製備方法流程圖。

第 4 圖為樟芝子實體各種萃取物分別刺激未成熟的樹突細胞後的 CD86 及 HLA-DR 表現比較圖。

第 5 圖為樟芝子實體各種萃取物的多醣體含量柱狀圖。

第 6 圖(A)至第 6 圖(D)分別為(A)樟芝子實體水萃取物、(B)樟芝子實體乙酸乙酯萃取物、(C)樟芝子實體乙醇萃取物及(D)樟芝子實體水再萃取物的 ^{1}H 核磁共振圖譜。

第 6 圖(E)為樟芝子實體水再萃取物 ^{1}H 核磁共振圖譜的局部放大圖。

第 7 圖為以多粘菌素 B 預先處理樹突細胞、再以脂多醣體或樟芝子實體水萃取物誘導的 CD86 及 HLA-DR 表現比較圖。

第 8 圖為脂多醣體的 ^{1}H 核磁共振圖譜。

第 9 圖為不同濃度的樟芝子實體水萃取物誘導樹突細胞產生介白素-12 能力比較圖。

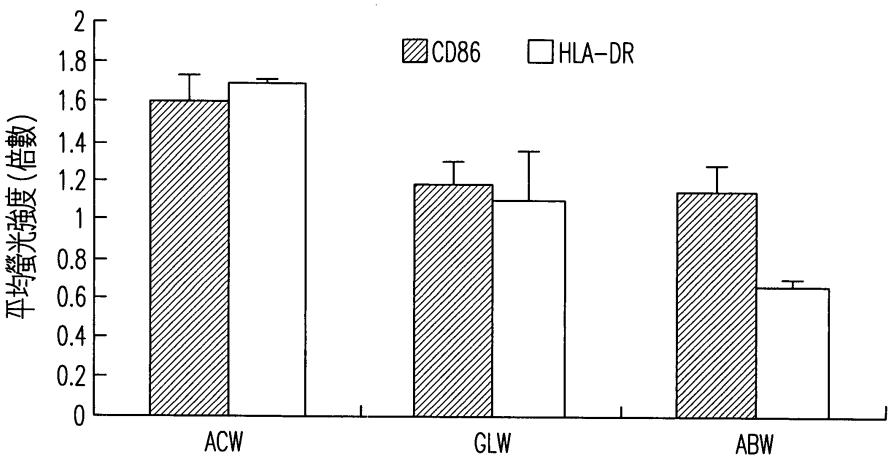
第 10 圖為未成熟的樹突細胞受不同濃度的樟芝子實體水萃取物刺激後的遷移能力比較圖。

第 11 圖(A)為樟芝子實體水萃取物刺激樹突細胞、活化 T 細胞的曲線圖。

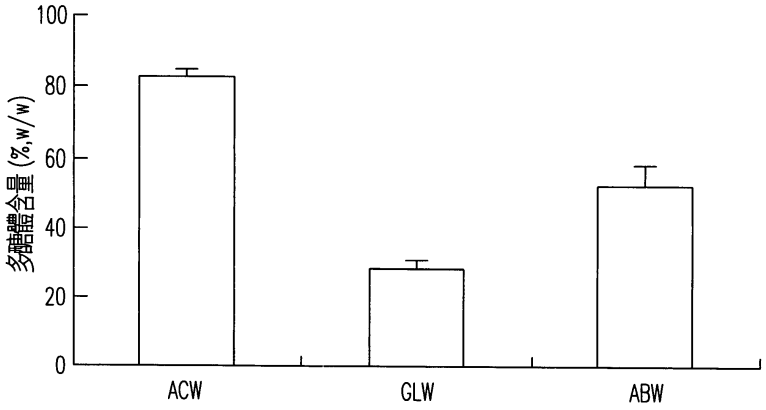
第 11 圖(B)為以不同濃度的樟芝子實體水萃取物刺激樹突細胞、活化輔助性 T 細胞而產生干擾素-γ 的比較圖。

第 12 圖(A)及(B)分別為樟芝子實體水萃取物刺激樹突細胞後的訊息傳導路徑蛋白表現圖譜，其中第 12 圖(A)包括 Bax、Bcl-2、p65 及 Actin，而第 12 圖(B)包括 p-ERK、ERK、p-p38、p-38、p-JNK、JNK、p-AKt 及 Actin。

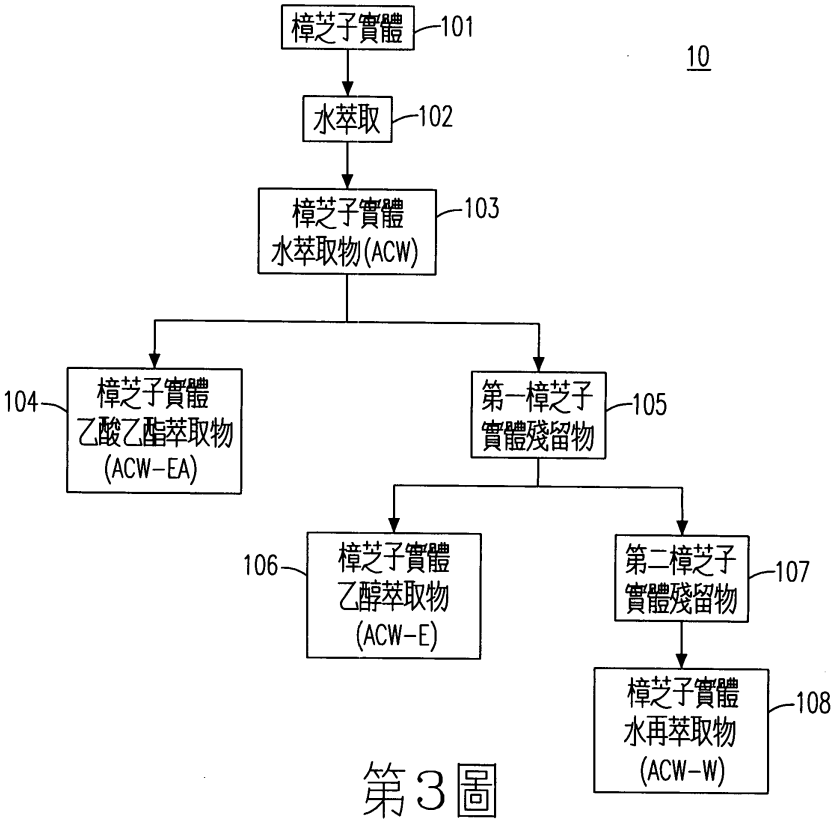
第 13 圖(A)及(B)分別為樹突細胞受訊息傳導路徑蛋白抑制劑抑制後再以樟芝子實體水萃取物處理樹突細胞的(A)CD86 及(B)介白素-12 表現比較圖。



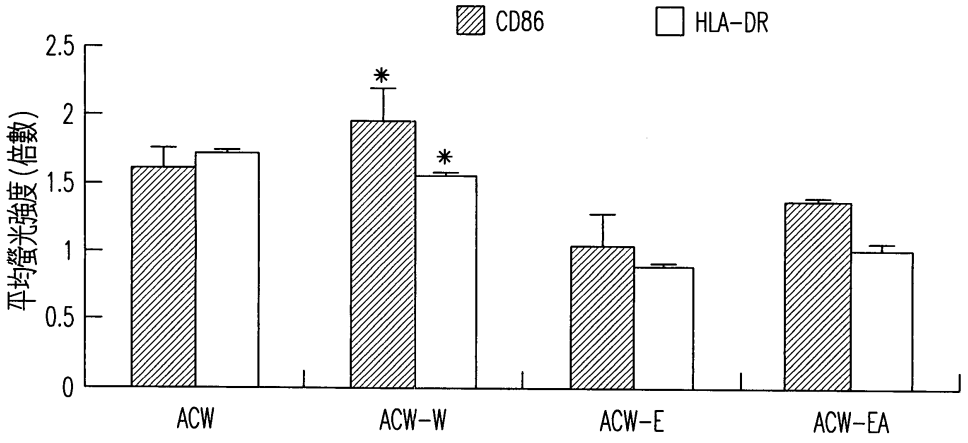
第1圖



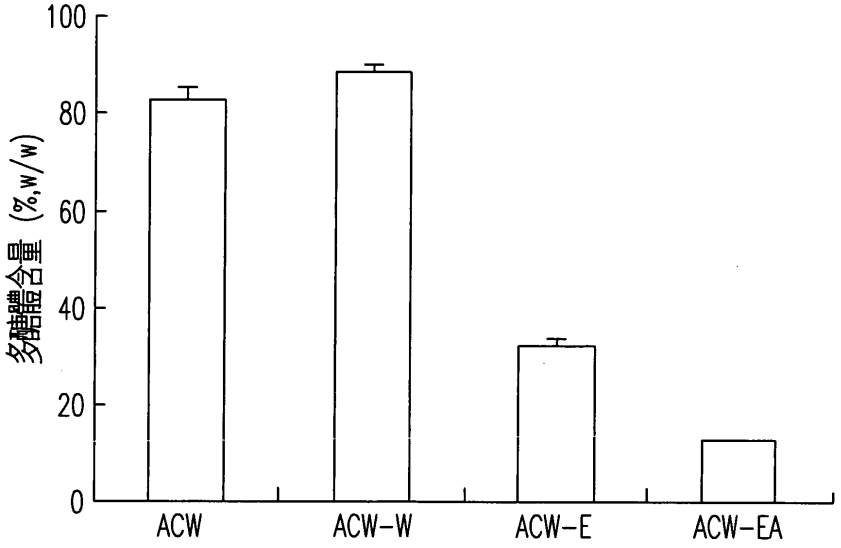
第2圖


樟芝子實體
101
10
水萃取
102
樟芝子實體
水萃取物(ACW)
103
104
樟芝子實體
乙酸乙酯萃取物
(ACW-EA)
第一樟芝子
實體殘留物
105
106
樟芝子實體
乙醇萃取物
(ACW-E)
第二樟芝子
實體殘留物
107
樟芝子實體
水再萃取物
(ACW-W)
108

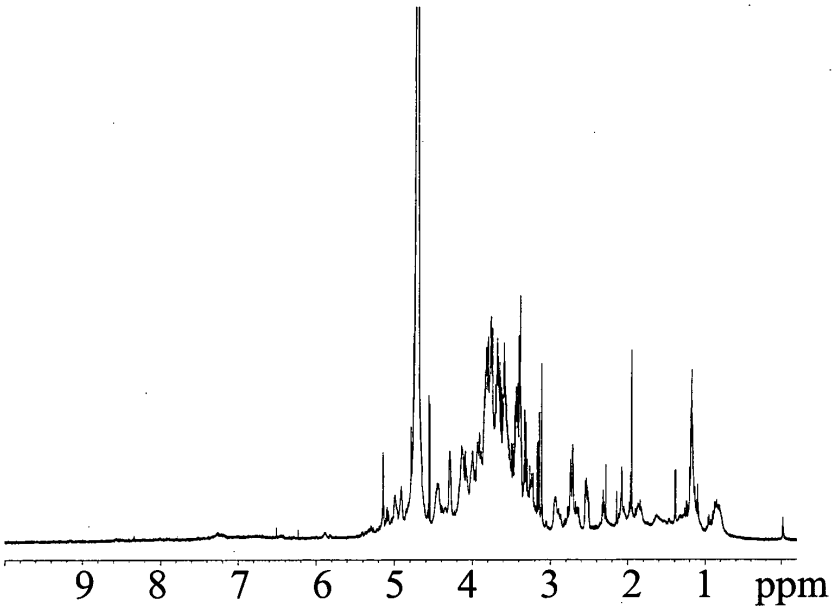
第3圖


CD86
HLA-DR
平均螢光強度(倍數)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
ACW
ACW-W
ACW-E
ACW-EA

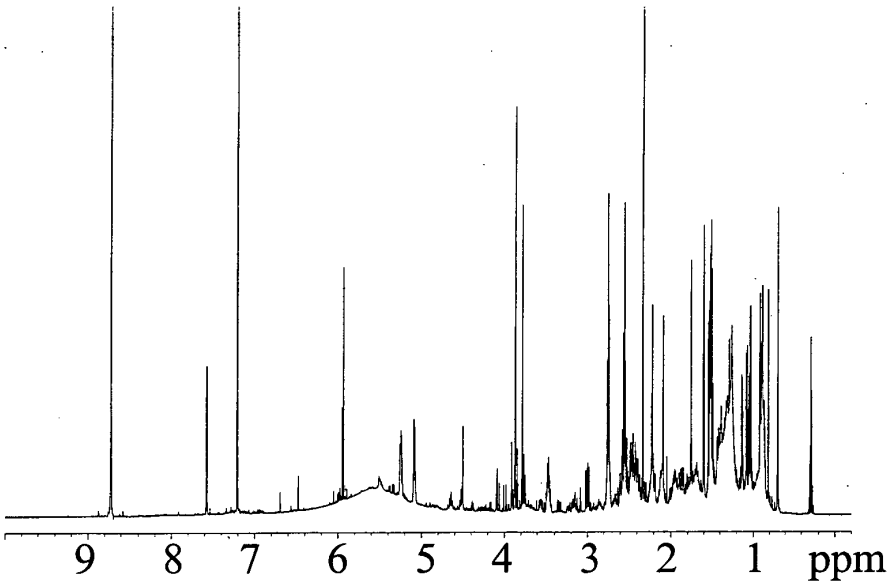
第4圖



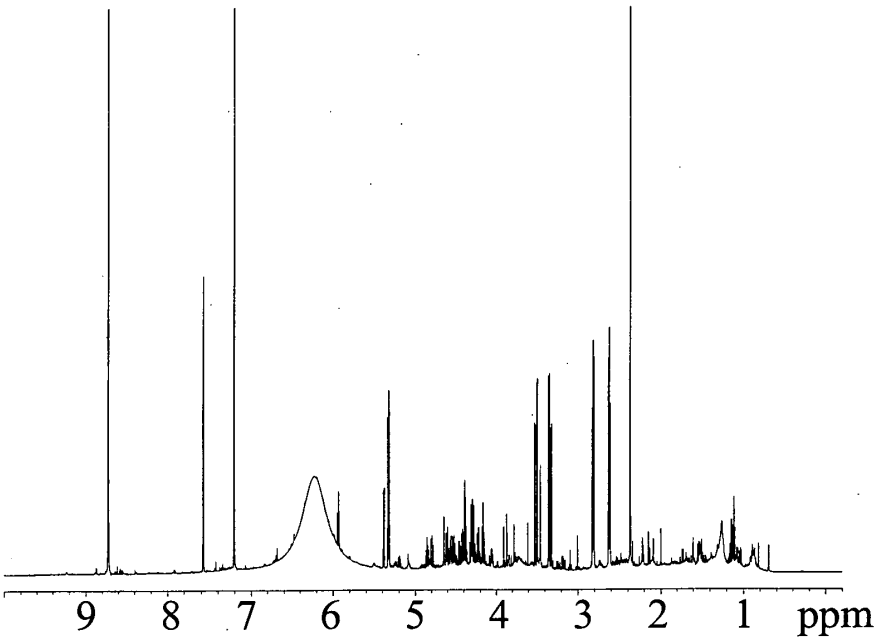
第5圖



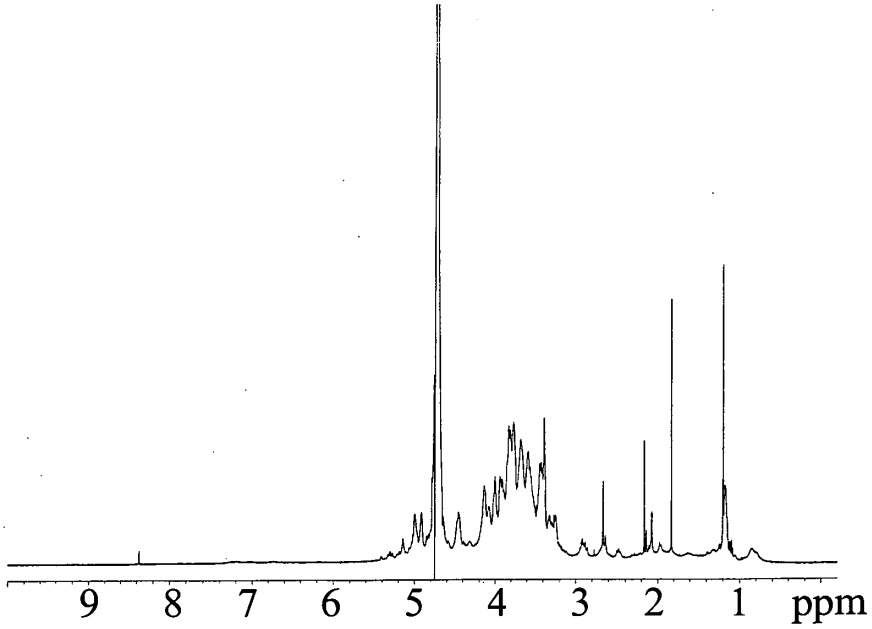
第6圖(A)



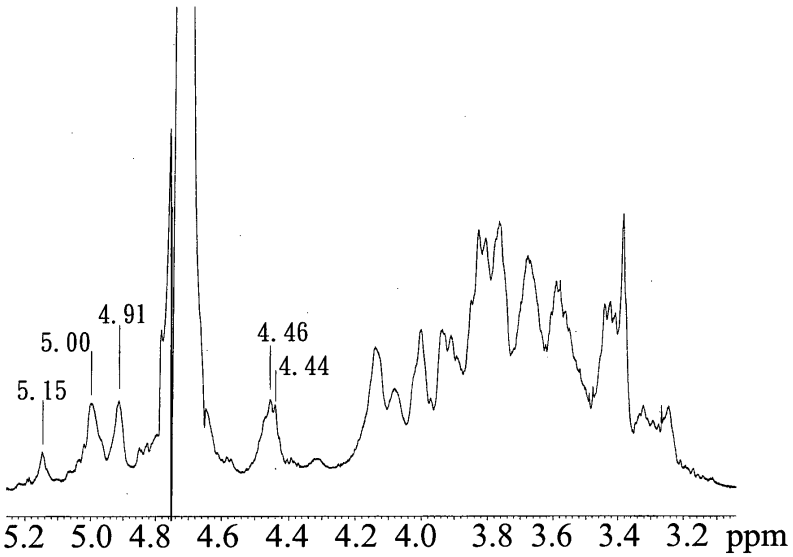
第6圖(B)



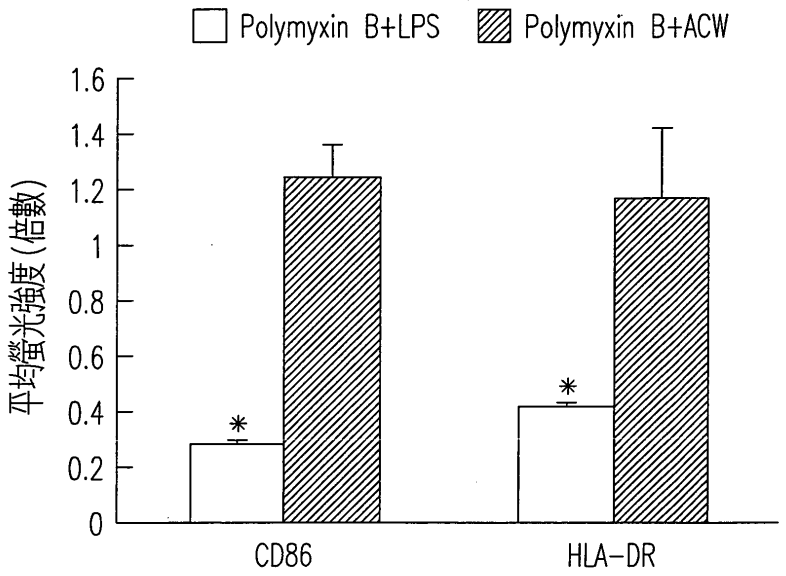
第6圖(C)


9
8
7
6
5
4
3
2
1
ppm

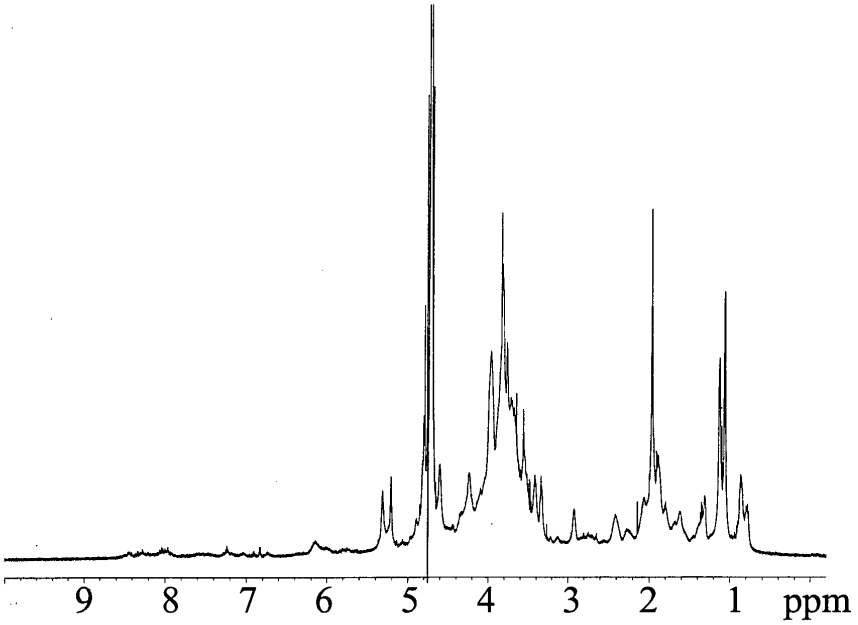
第6圖(D)


5.15
5.00
4.91
4.46
4.44
5.2
5.0
4.8
4.6
4.4
4.2
4.0
3.8
3.6
3.4
3.2
ppm

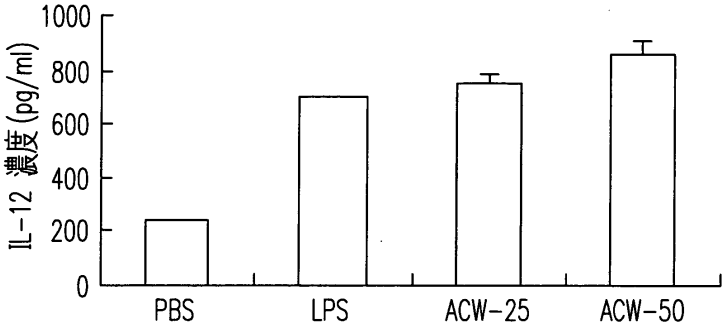
第6圖(E)


Polymyxin B+LPS
Polymyxin B+ACW
平均螢光強度(倍數)
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
*
*
CD86
HLA-DR

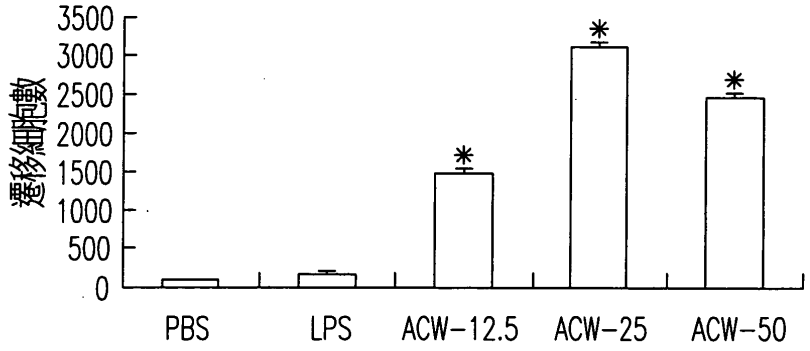
第7圖


9
8
7
6
5
4
3
2
1
ppm

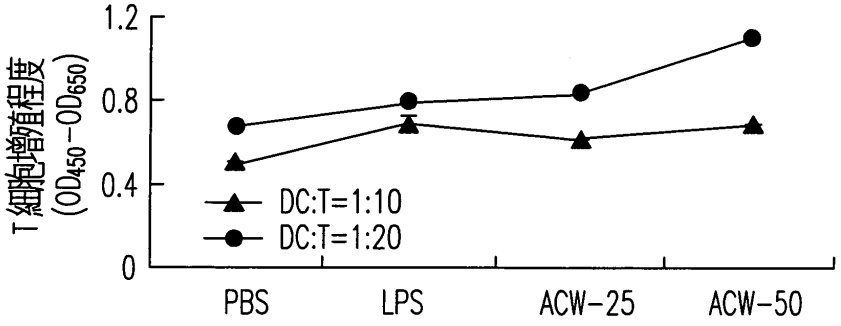
第8圖


IL-12 濃度(pg/ml)
1000
800
600
400
200
0
PBS
LPS
ACW-25
ACW-50

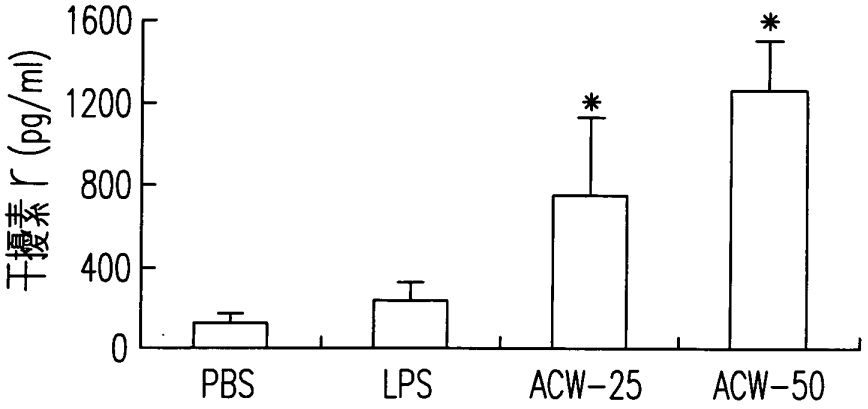
第9圖


遷移細胞數
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
PBS
LPS
ACW-12.5
ACW-25
ACW-50

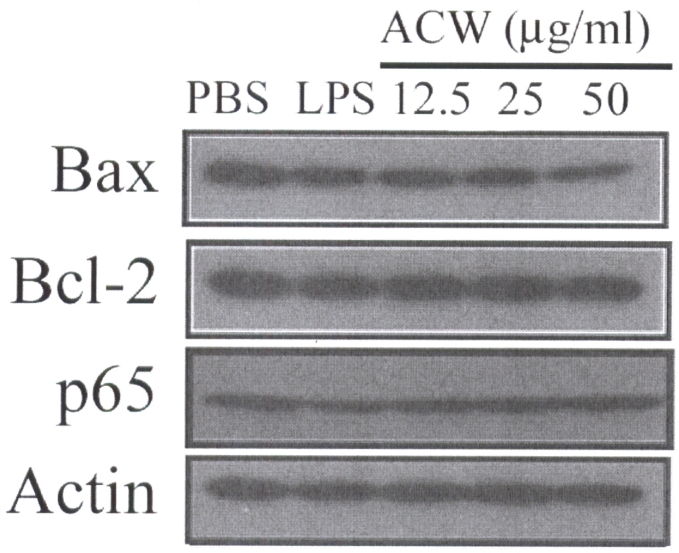
第10圖


T細胞增殖程度
(OD450-OD650)
1.2
0.8
0.4
0
DC:T=1:10
DC:T=1:20
PBS
LPS
ACW-25
ACW-50

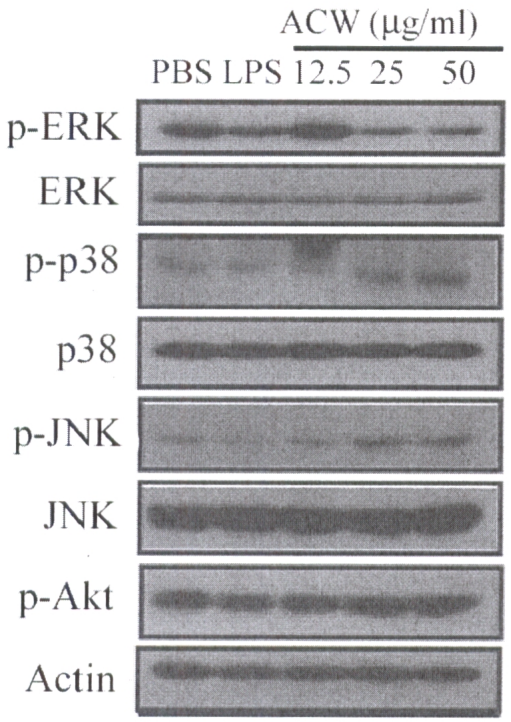
第11圖(A)


干擾素γ (pg/ml)
1600
1200
800
400
0
*
*
PBS
LPS
ACW-25
ACW-50

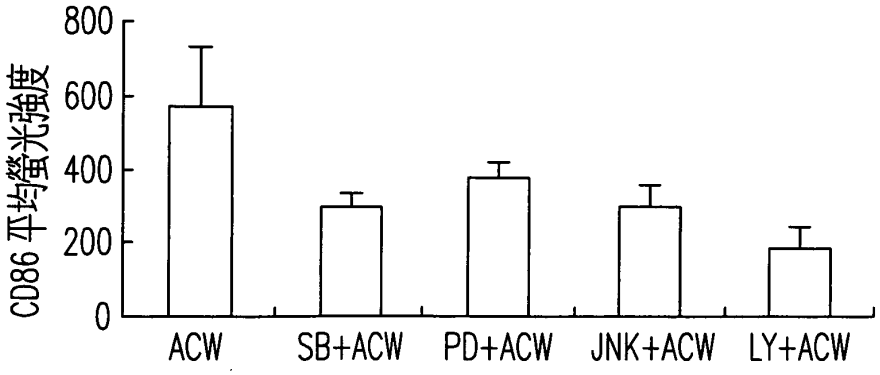
第11圖(B)


ACW (μg/ml)
PBS LPS 12.5 25 50
Bax
Bcl-2
p65
Actin

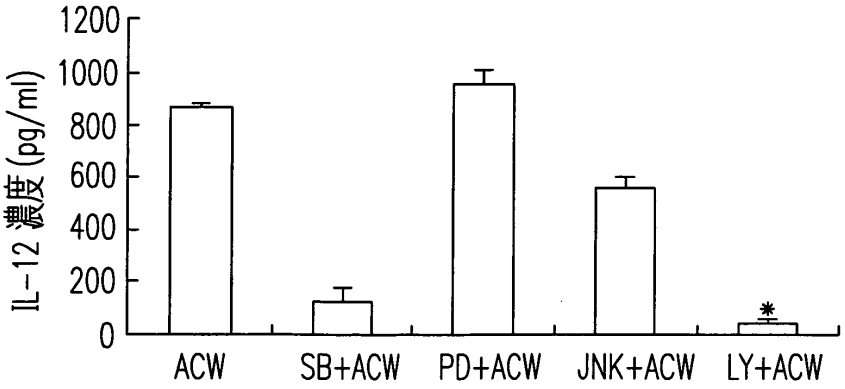
第12圖(A)


ACW (μg/ml)
PBS LPS 12.5 25 50
p-ERK
ERK
p-p38
p38
p-JNK
JNK
p-Akt
Actin

第12圖(B)


CD86 平均螢光強度
800
600
400
200
0
ACW
SB+ACW
PD+ACW
JNK+ACW
LY+ACW

第13圖(A)


IL-12 濃度(pg/ml)
1200
1000
800
600
400
200
0
ACW
SB+ACW
PD+ACW
JNK+ACW
LY+ACW
*

第13圖(B)