[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03805784.0

[51] Int. Cl.
A61K 31/00 (2006.01)
A61K 36/18 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 5/30 (2006.01)
A61P 5/34 (2006.01)
A61P 15/12 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 2 月 1 日

[11] 公开号 CN 1728989A

[22] 申请日 2003.2.10 [21] 申请号 03805784.0
[30] 优先权
[32] 2002. 2.15 [33] DE [31] 10206390.7
[86] 国际申请 PCT/EP2003/001311 2003.2.10
[87] 国际公布 WO2003/068199 德 2003.8.21
[85] 进入国家阶段日期 2004.9.10
[71] 申请人 白奥诺里卡制药股份公司
地址 德国诺伊马克特
[72] 发明人 沃尔夫冈·武特克 胡贝图斯·雅里
福尔克尔·克里斯托弗尔
芭芭拉·施彭格勒
米夏埃尔. A. 波普

[74] 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司
代理人 高龙鑫 王 颖

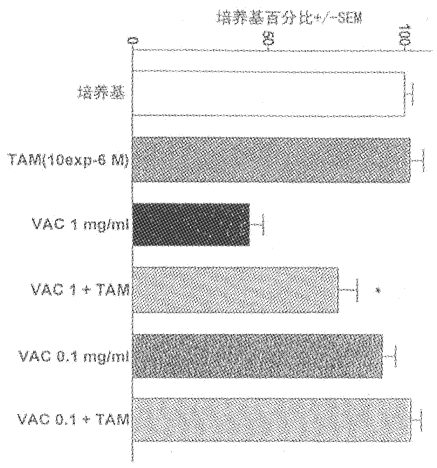
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 13 页

[54] 发明名称

含植物雌激素的提取物选择性调节雌激素受体 β 的应用

[57] 摘要

本发明涉及选择性调节雌激素受体 β 而不产生亲子宫作用的含植物雌激素的提取物在治疗下列临床病症及病理状态中的应用：肥胖症并因此可能影响至代谢综合症，特别是高血压、动脉硬化、心肌梗塞、雄激素过多症；绝经期节欲失调；与释放下丘脑促性腺激素的激素脉冲发生器过度兴奋相关的绝经期热潮红；导致黄体缺乏的类固醇激素合成紊乱，特别是人黄体的黄体酮合成紊乱；与海马神经元中雌激素受体 β 高度表达相关联的阿尔茨海默病。



1.选择性调节雌激素受体β而不产生亲子宫作用的含植物雌激素的提取物在治疗下列临床症状和病理状态中的应用：

*肥胖症并因此可能影响至代谢综合症，特别是高血压、动脉硬化、心肌梗塞、雄激素过多症；

*绝经期节欲失调；

*与释放下丘脑促性腺激素的激素脉冲发生器高度兴奋相关的绝经期热潮红；

*类固醇激素合成紊乱，特别是导致黄体缺乏的人黄体黄体酮合成紊乱；

*与海马神经元中的雌激素受体β过度表达相关联的阿尔茨海默症。

2.根据权利要求1所述的应用，其特征在于，所述提取物被用于标准药物制剂中。

3.根据权利要求2所述的应用，其特征在于，所述药物制剂为滴剂、片剂、膜片、胶囊、颗粒、糖衣丸、栓剂、软膏、霜剂。

4.根据权利要求1至3中任何一项所述的应用，其特征在于，所述提取物来自穗花牡荆、特别是其果实和/或叶，通过乙醇或者CO_2萃取而得。

含植物雌激素的提取物选择性调节雌激素受体β的应用

本发明涉及如权利要求 1 特征部分所述选择性调节雌激素受体β（ER-β）而不产生亲子宫作用的含植物雌激素的提取物的应用。

长期以来就用穗花牡荆（vites agnus castus (monk's pepper, chaste tree）)提取物治疗月经不调、乳腺疼、经前综合症、月经紊乱（原发性或继发性黄体缺乏所致），但是没有把这种提取物用作雌激素替代治疗。

在绝经期由于卵巢功能减弱而导致雌二醇水平下降。这导致增殖性过程减弱，并且导致下丘脑中 GnRH 脉冲发生器活性加强（促性腺激素释放激素脉冲发生器是一种下丘脑中的定时器，并且节律脉冲样地泌出 LH，其中类固醇影响脉冲幅度和频率）。结果刺激出的 LH 泌出在更年期妇女导致令人不安的热充血感，即所谓的“热潮红”。

如果血液中没有足够的雌二醇，骨骼中破骨细胞的活性占优势，从而分解骨体，伴随骨折风险上升。同时血管系统中长期存在斑块形成的风险，从而使梗塞危险上升。

雌激素相关作用对子宫、阴道、乳房组织和肝不利。然而，在这方面，不幸的是，现有技术不能够提供可以在雌激素缺乏时用于器官选择性地预防或治疗的植物药品。

鉴于现有技术，本发明所要解决的技术问题是，提供有雌激素性作用的植物药品，所述植物药品有器官选择性作用，对子宫没有作用或只有很小的作用。

该所要解决的技术问题通过采用权利要求 1 而完成。

用含植物雌激素的提取物，特别是用穗花牡荆提取物，优选地用其果实提取物，本发明首次使之能够达到选择性的 ER-β作用，而不产生亲子宫作用。通过穗花牡荆提取物调节 ER-β的作用，其可以治疗以下临床症状和病理状态：

*肥胖症并因此可能影响至代谢综合症，特别是高血压、动脉硬化、心肌梗塞、雄激素过多症；

*绝经期节欲失调；

*与释放下丘脑促性腺激素的激素脉冲发生器高度兴奋相关的绝经期热潮红

*类固醇激素合成紊乱，特别是导致黄体缺乏的人黄体黄体酮合成紊乱；

*与海马神经元中的雌激素受体β过度表达相关联的阿尔茨海默症。

本发明应用的提取物可以以药学通常剂型使用，例如以滴剂、片剂、膜片、胶囊、颗粒、糖衣丸、栓剂、软膏、霜剂等形式使用。

优选地，穗花牡荆，特别是其果实和/或叶的提取物可以通过乙醇萃取或者用 CO_2 萃取植物或者植物部分制造得到，并且用于本发明所述应用。

为了证明在穗花牡荆（VAC）提取物中存在植物雌激素，本发明人使用了竞争性雌激素受体分析，其中同样结合所述受体的配位体（下文中称之为受体调质）替代了受体上的放射标记雌二醇。一方面使用无放射标记的雌二醇作为受体调质，另一方面使用受试提取物作为受体调质。受体制备物由猪乳房的胞质部分组成，其包含两种雌激素受体亚型，即既含有 ER-α 也含有 ER-β。一个典型试验结果示于图 1 中。

图 1 示出雌二醇（E_2，中空符号代表者）和 VAC 提取物（黑色符号）的替代曲线。纵座标给出雌激素受体上（仍保留的）放射标记雌二醇结合的百分比，上面的横座标标出 E_2 浓度，而下面的横座标体现了 VAC 浓度。将最低试验物质浓度得到的替代定义为 100%。由三次测定计算平均值±SEM。VAC 的 EC_{50} 为 7.8 μg/ml。

正如图 1 所示，VAC 提取物以剂量依赖方式竞争性结合与放射标记雌二醇结合的雌激素受体位点。得到的数据明确地显示，受试提取物含有植物雌激素。

为了更加有力地论证该发现，用人类子宫内膜的受体制备物进行相同的分析。溶液中仍存在两种 ER 亚型。试验结果示于图 2 中。

图 2 示出雌二醇（E_2，中空符号代表者）和 VAC 提取物（黑色符号）替代人子宫内膜制备的 ER 上的放射标记雌二醇的曲线。纵座标给出放射标记雌二醇在雌激素受体上（还保留的）结合的百分比。上面的横座标

给出 E_2 浓度，而下面的横座标给出 VAC 浓度。将最低浓度试验物质得到的替代定义为 100%。由三次测定计算平均值±SEM。VAC 的 EC_{50} 为 12.7 μg/ml。

结果清楚表明，VAC 提取物中的植物雌激素结合在人雌激素受体上，这是在人体中源自 VAC 的化合物产生雌激素样作用的分子级初期效应。

由于可以得到重组受体蛋白，可以进行亚型特异性的 ER 分析（ER-α 或者 ER-β）。其结果以典型的 ER-α 替代曲线示于图 3 中。

图 3 示出用重组人类 ER-α 的分析中，雌二醇（E_2，中空符号代表者）和 VAC 提取物（黑色符号）的剂量/作用曲线。上面的横座标给出 E_2 浓度，而下面的横座标给出 VAC 浓度。与最低浓度的试验物质的结合被定义为 100%。平均值±SEM 由每个浓度值测定三次求得。

尽管 E2 显示出与放射标记的受体配位体存在剂量相关性竞争，但是，VAC 提取物的植物雌激素并不结合 ER-α。因而无法计算 EC_{50}。

用与 ERα 分析中相同的检测结合物，进行下面的 ER-β 分析。一个代表性实验的数据和图示于图 4 中。

图 4 示出在用重组人类 ER-β 的分析中，雌二醇（E2，中空符号代表者）和 VAC 提取物（黑色符号）的剂量/作用曲线。上面的横座标给出 E_2 浓度，下面的横座标给出 VAC 浓度。将最低浓度试验物质得到的替代定义为 100%。平均值±SEM 由每个浓度值测定三次求得。VAC 的 EC_{50} 为 9.9 μg/ml。

与 ER-α 分析相反，本申请人的 VAC 提取物的植物雌激素以剂量依赖方式结合 ER-β。这些数据无疑地证明了本申请人的穗花牡荆提取物的 ER-β 选择性。

下面说明穗花牡荆对人类粒层细胞/黄体细胞和猪黄体细胞的雌激素作用。

卵泡和黄体的类固醇分泌由垂体激素 LH 和 FSH 进行内分泌性调节。附加地通过雌二醇进行局部调节，这称为旁分泌调节。这种局部控制以雌激素受体的表达为先决条件。新的分子生物学研究证实，与 ER-α 相比，粒层细胞表达亚型 ER-β 占有强优势。不同的是，黄体细胞只表达 ER-β。

研究类固醇旁分泌作用的现有检测方法是黄体细胞培养。这样的细胞不能够从人类得到，因为借以取得活体一切的手术介入都要在卵泡期进行，以避免未检查到的妊娠风险。在体外受精的范围内可以得到含在培养物中的粒层/黄体细胞，它们在受体占据和分泌特性方面与黄体细胞极为相同。用这样的人类体外试验方法检验穗花牡荆的雌激素作用。

首先说明雌二醇 17-β（天然存在的雌二醇）与异构体雌二醇 17-α对人类粒层细胞/黄体细胞的黄体酮分泌的影响。数据以图表形式表示于图 5 中。

图 5：17-β雌二醇（1μM）对培养 5 小时的所述细胞产生显著的抑制黄体酮分泌作用，而异构体 17-α雌二醇（同样 1μM）不产生任何作用。*表示与培养基对照有显著差异。

这意味着：

1.在体外抑制黄体酮分泌是雌激素作用。

2.雌二醇 17-β的作用是高度特异性的，因为 17-α雌二醇不能够引起这样的作用。

穗花牡荆在该试验系统中在 5 小时培养后对黄体酮分泌的作用汇总在图 6 中。

如图 6 所示，恰如天然 17-β雌二醇那样，穗花牡荆提取物也抑制人类粒层/黄体细胞的黄体酮分泌。这在药学上被认为具有雌激素作用。*表示与对照（=培养基）有显著差异。横座标上的浓度数为检测组中的相应 VAC 提取物浓度。

因为人类粒层/黄体细胞尽管是优势性表达 ER-β，但不是仅表达 ER-β，用猪黄体细胞，即仅表达 ER-β的细胞重复该试验。相应的结果示于图 7 中。

图 7 显示了穗花牡荆对这些细胞的显著雌激素作用，这也是因为显著地抑制了黄体酮分泌（左侧图，第一培养基对照之后的头三列）。通过测定细胞的存活排除了非特异性细胞毒作用（按照标准方法通过 MTT 染色）（右侧图，第二培养基对照之后的最后三列）。细胞存活性不受穗花牡荆提取物的影响。就是说受抑制的黄体酮分泌是特异性的雌激素作用。

*表示与培养基对照有显著差异。在横座标上的浓度数指得是相应的VAC提取物浓度。

为了加强该推论，用穗花牡荆提取物与抗雌激素的它莫西芬培养细胞。结果示于图8的棒形图中。

在图8中，*表示与培养基对照有显著差异。横座标上的符号表示如下：TAM=它莫西芬；横座标上的浓度数指得是相应的VAC提取物浓度；VAC+TAM 表示带有由最后一个方格指出的浓度的 VAC 提取物与纯VAC提取物加上它莫西芬的复合。

根据图 8 抗雌激素它莫西芬本身对黄体酮分泌没有任何作用。由于在ER上结合了它莫西芬，VAC的内含物能够得到的结合位置减少了，从而降低了所引起的抑制黄体酮分泌的作用。这个发现明确地证明，VAC对黄体酮合成的作用以特异的方式通过雌激素受体促成。

为了检验亲子宫作用进行以下的试验，其数据用图表在图9中示出。

用两种不同浓度的VAC提取物（100 mg/kg 体重= VAC100 而 400 mg/kg 体重= VAC400）与切除卵巢的雌鼠和切除睾丸的雄鼠的饲料混合使用三个月。与雌二醇相反，VAC没有亲子宫作用，甚至阴道上皮也保持没有受到影响。雌二醇的这两个增殖作用在围绝经期和绝经期后雌激素替代治疗或者卵巢切除后妇女的激素替代治疗都是不利的，因为在持续的雌激素给药而缺少促孕素抗调节作用会由于雌二醇的持久的增殖作用不能够除外子宫内膜增生。

在图 9 中纵座标上是鼠的子宫重量。各个棒图代表对照组（仅切除卵巢）、雌二醇阳性对照以及两个不同浓度的VAC提取物的作用。

在图9中，在用VAC治疗的动物没有测定出类似雌二醇的亲子宫作用，这就是说，VAC不对子宫组织产生亲子宫作用。

然而在进一步研究中令人惊喜地发现，VAC可以对其它的器官系统产生雌激素作用。

用计算机辅助断层扫描测定雄鼠和雌鼠的腹脂肪组织和胫旁脂肪组织。在E_2和高剂量穗花牡荆可以看到两个组织部分的减肥。同时用VAC处理的动物的血清瘦素（leptin）水平也下降。试验结果在图10和11中示出。

图 10 示出雌二醇和两个不同 VAC 浓度对胫旁脂肪组织的作用，图示为胫区的 CT 照像中脂肪组织面积相对于对照组的百分比。

图 11 示出雌二醇和两个不同 VAC 浓度对血清瘦素水平的影响，在纵座标上以 ng/ml 为单位表示。

从图 10 和 11 可见，给予 VAC 后，胫旁脂肪含量下降和血清瘦素浓度下降。

同样地，用计算机辅助断层扫描观察了雄鼠和雌鼠胫骨干骺端上骨密度变化。图中示出，给予 VAC 与未给药对照动物相比，其骨密度下降明显地少。

用导管在卵巢切除的雌鼠膀胱中引入 1 毫升生理盐水，在 1 分钟内导致膀胱内压力上升。用 E2 替代治疗三个月的动物中，该压力上升比安慰剂对照处理动物高三倍，用 VAC 处理的动物稍弱，而雌二醇处理的动物仍然显著。该试验的结果示于图 12 和 13 中。

在图 12 中，纵座标上以 mmHg 为单位表示膀胱内压，测量了对照、作为阳性对照的雌二醇和两个不同 VAC 浓度下的最大膀胱内压。

相对照，图 13 的纵座标以 mmHg x 秒为单位表示了所测量的对照、作为阳性对照的雌二醇和两个不同 VAC 浓度的压力测量曲线（AUC）。

鉴于此，因此可以用 VAC 提取物制造药品来治疗以下病症而无亲子宫作用：

*肥胖症并因此可能影响至代谢综合症，特别是高血压、动脉硬化、心肌梗塞、雄激素过多症；

*绝经期节欲失调；

*与释放下丘脑促性腺激素的激素脉冲发生器高度兴奋相关的绝经期热潮红；

*类固醇激素合成紊乱，特别是导致黄体缺乏的人黄体的黄体酮合成紊乱；

*与海马神经元中雌激素受体 β 过度表达相关联的阿尔茨海默病。

文献

1) Hrabovszky E, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Hajszan T, Carpenter CD, Liposits Z, Petersen SL

Detection of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid and 1251-estrogen binding sites inluteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. Endocrinology 2000Sep ; 141 (9) : 3506-9

2) Hosokawa K, Ottander U, Wahlberg P, Ny T, Cajander S, Olofsson IJ. Dominant expression and distribution of oestrogen receptor beta over oestrogen receptor alpha in the human corpus luteum. Mol Hum Reprod 2001 Feb ; 7 (2) :137-45

3) Taylor AH, Al-Azzawi F. Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. JMol Endocrinol 2000 Feb ; 24(1) : 145-55

4) Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Niisson S, Gustafsson JA 1997 Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta.Endocrinology138 : 863-870

5) Saunders PT, Maguire SM, Gaughan J, Millar MR, 1997 Expression of oestrogen receptor beta (ER beta) in multiple rat tissues visualised by immunohistochemistry. J Endocrinol 154 :R13-R16

6) Mäkelä S, Strauss L, Kuiper G, Valve E, Salmi S, Santti R, Gustafsson JA, 2000 Differential expression of estrogen receptors alpha and beta in adult rat accessory sex glands and lower urinary tract. Mol Cell Endocrinol 164 : 109-116

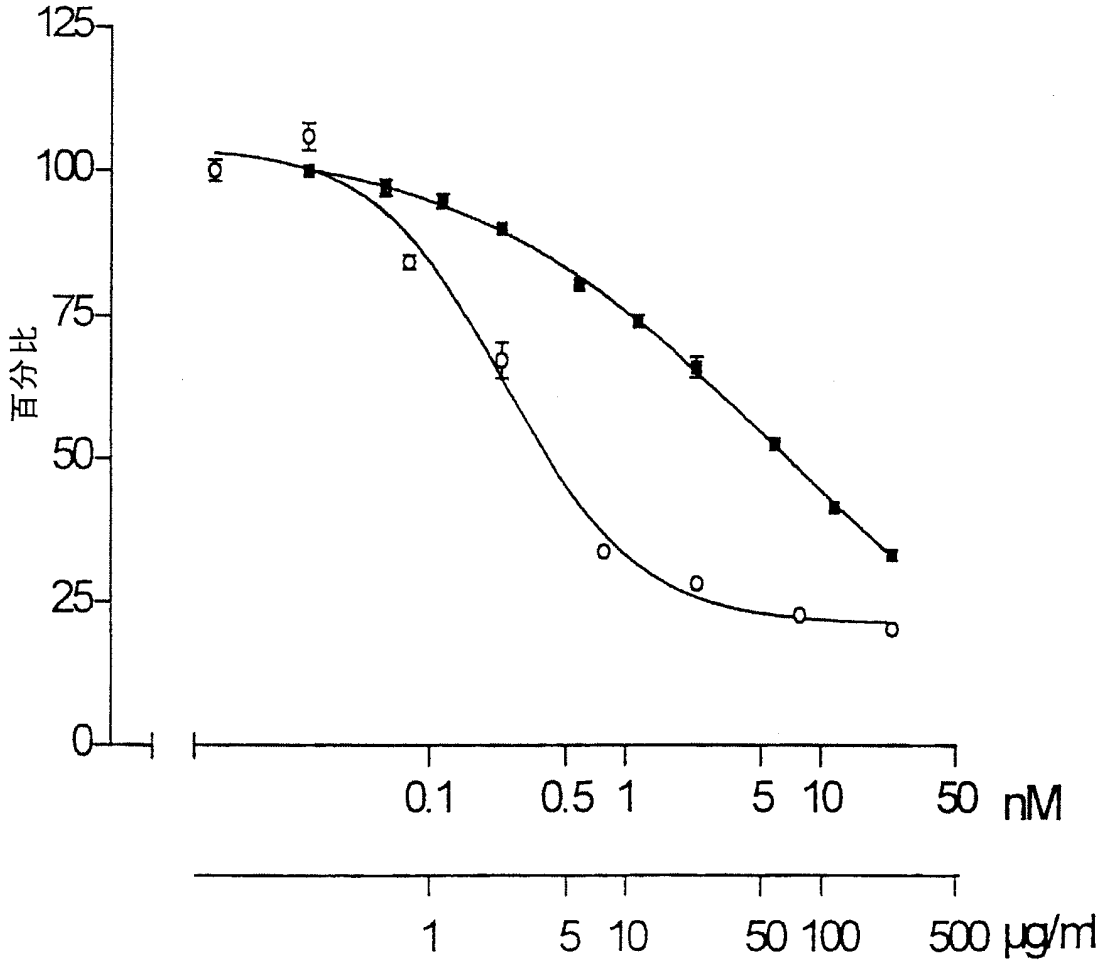


图1

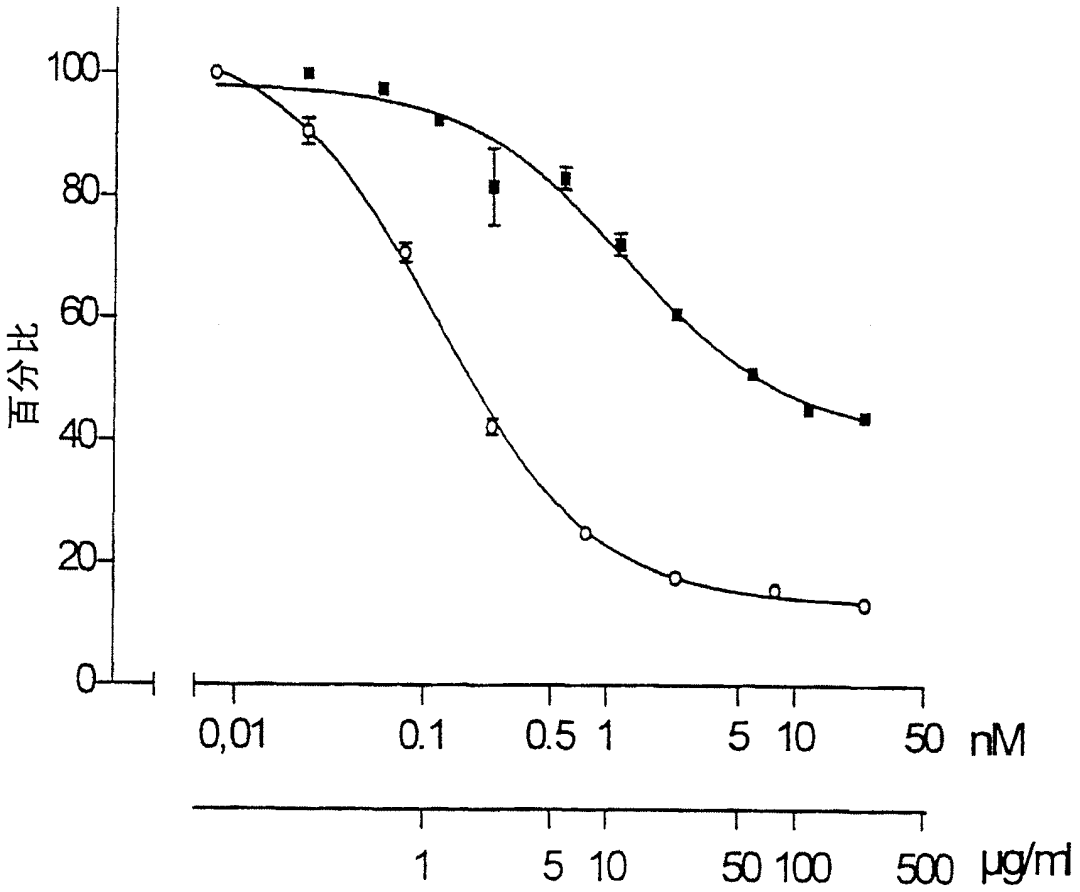


图2

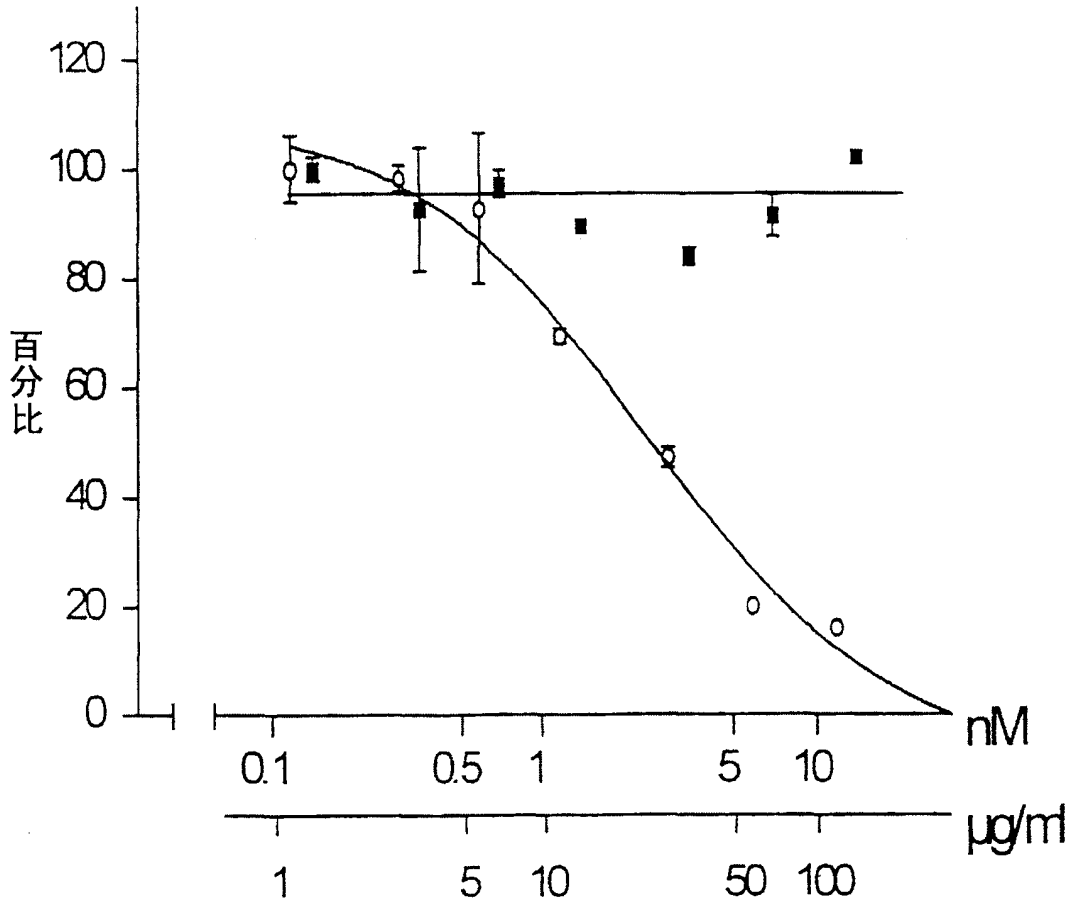


图3

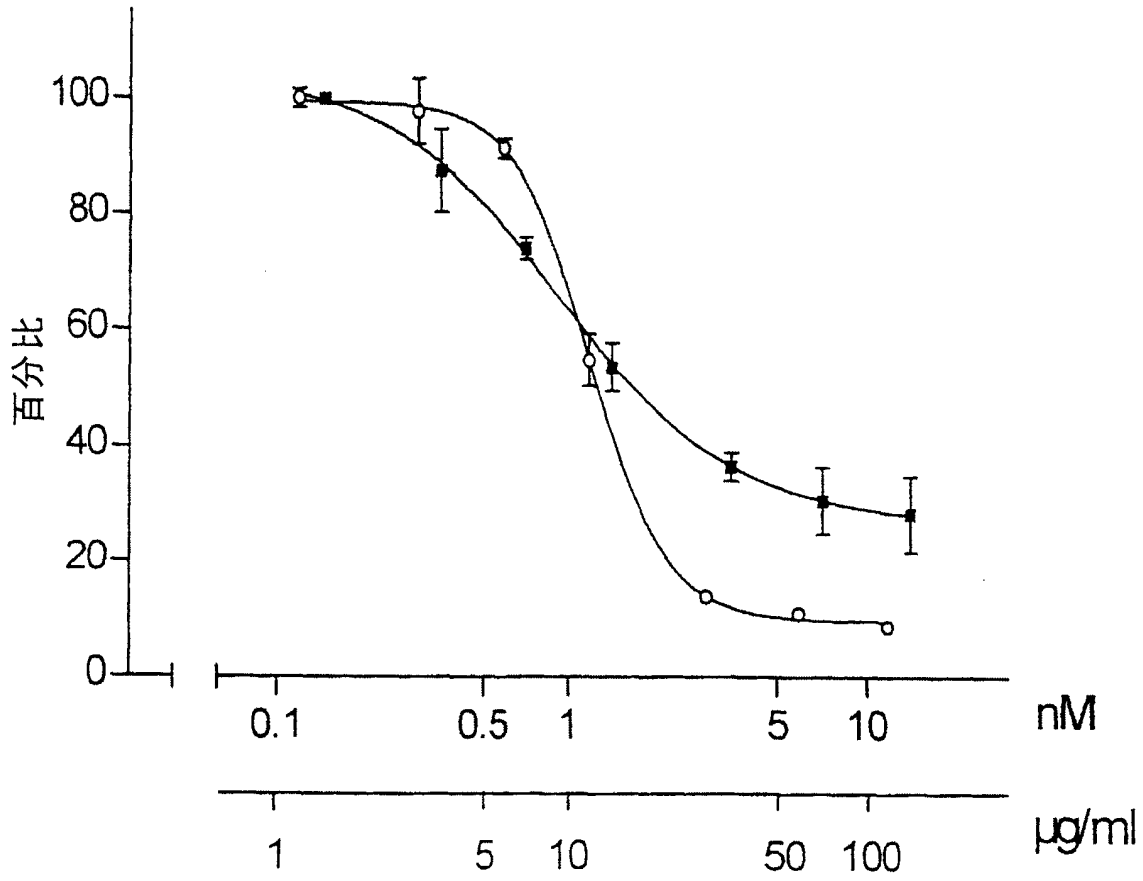


图4

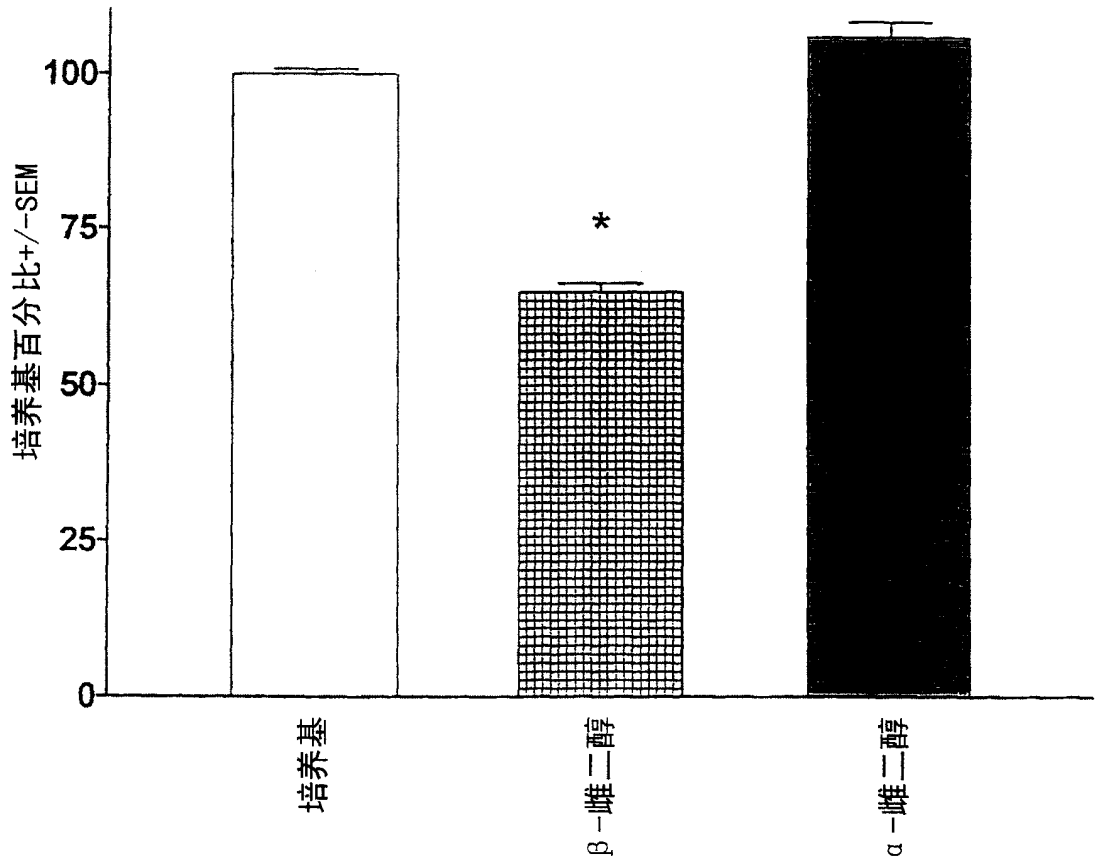


图5

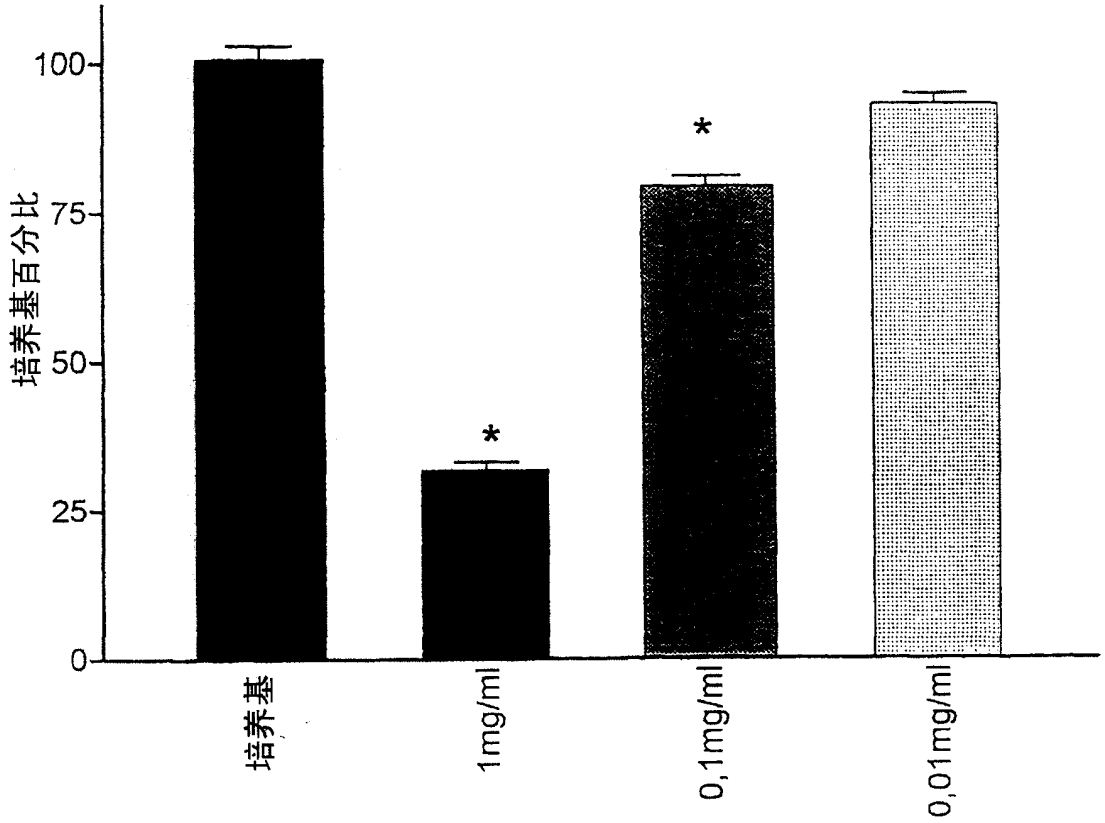
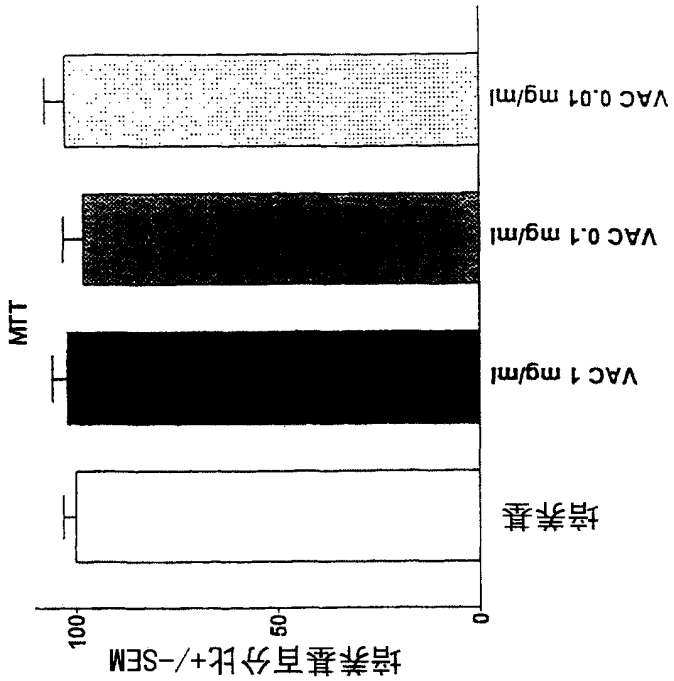


图6


MTT
培养基百分比+/-SEM
0
50
100
培养基
VAC 1 mg/ml
VAC 0.1 mg/ml
VAC 0.01 mg/ml

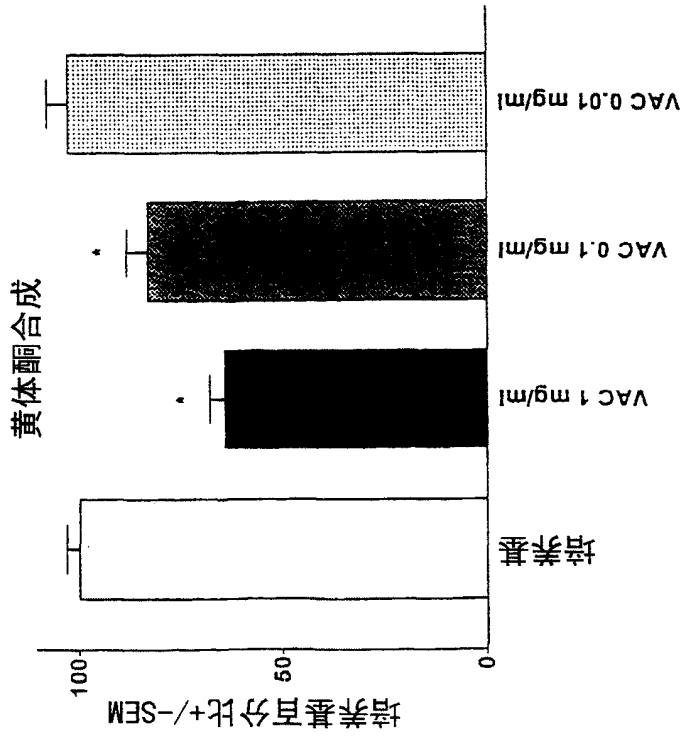

黄体酮合成
培养基百分比+/-SEM
0
50
100
培养基
VAC 1 mg/ml
VAC 0.1 mg/ml
VAC 0.01 mg/ml
*
*

图7

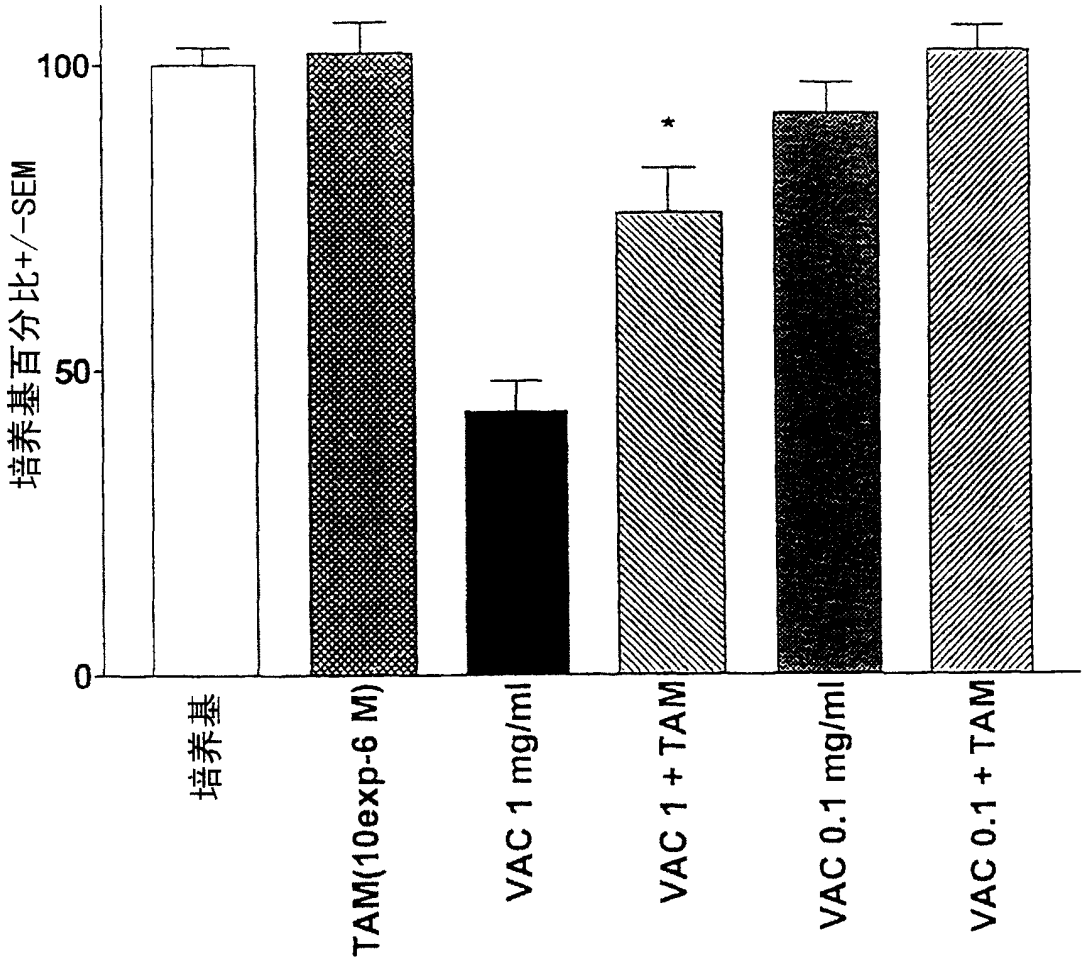

培养基百分比+/-SEM
100
50
0
*
培养基
TAM(10exp-6 M)
VAC 1 mg/ml
VAC 1 + TAM
VAC 0.1 mg/ml
VAC 0.1 + TAM

图8

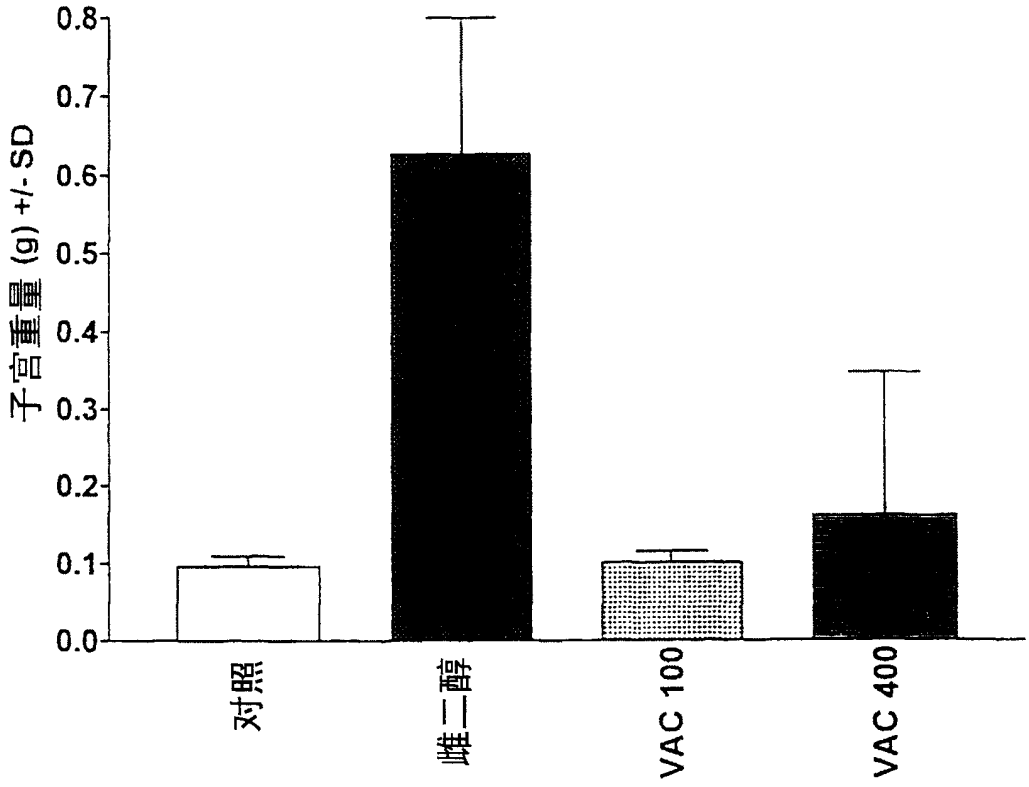


图9

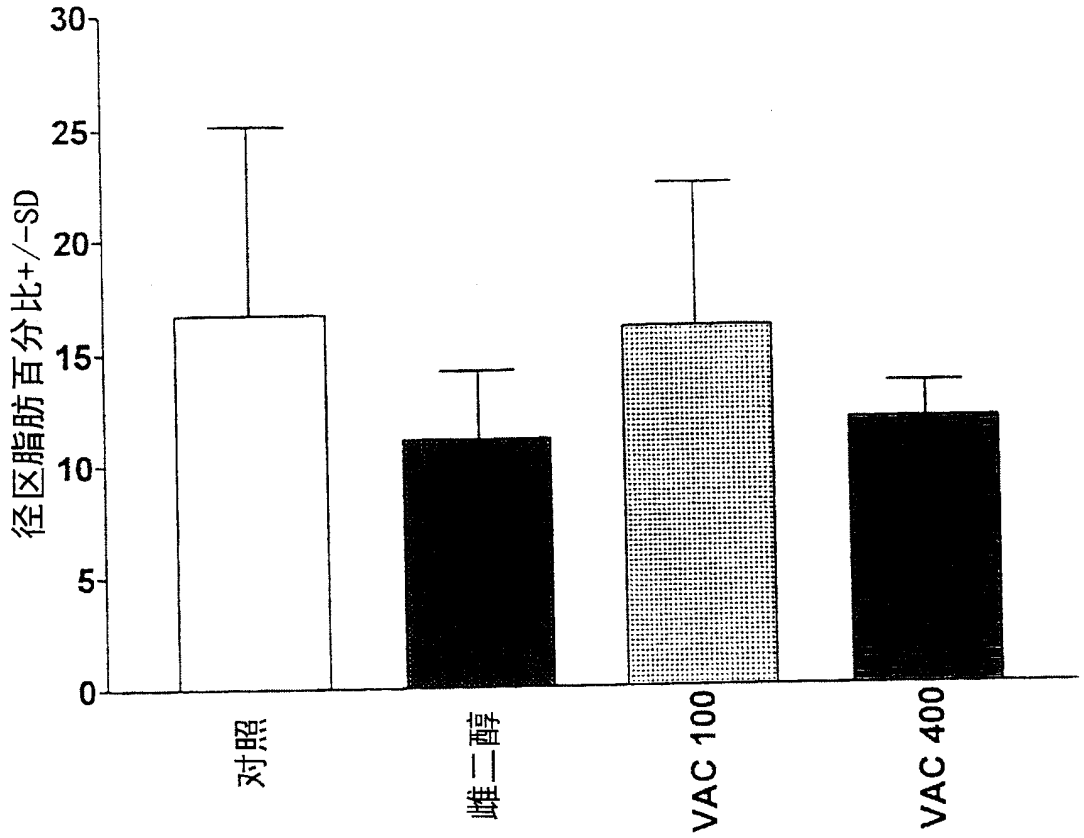


图10

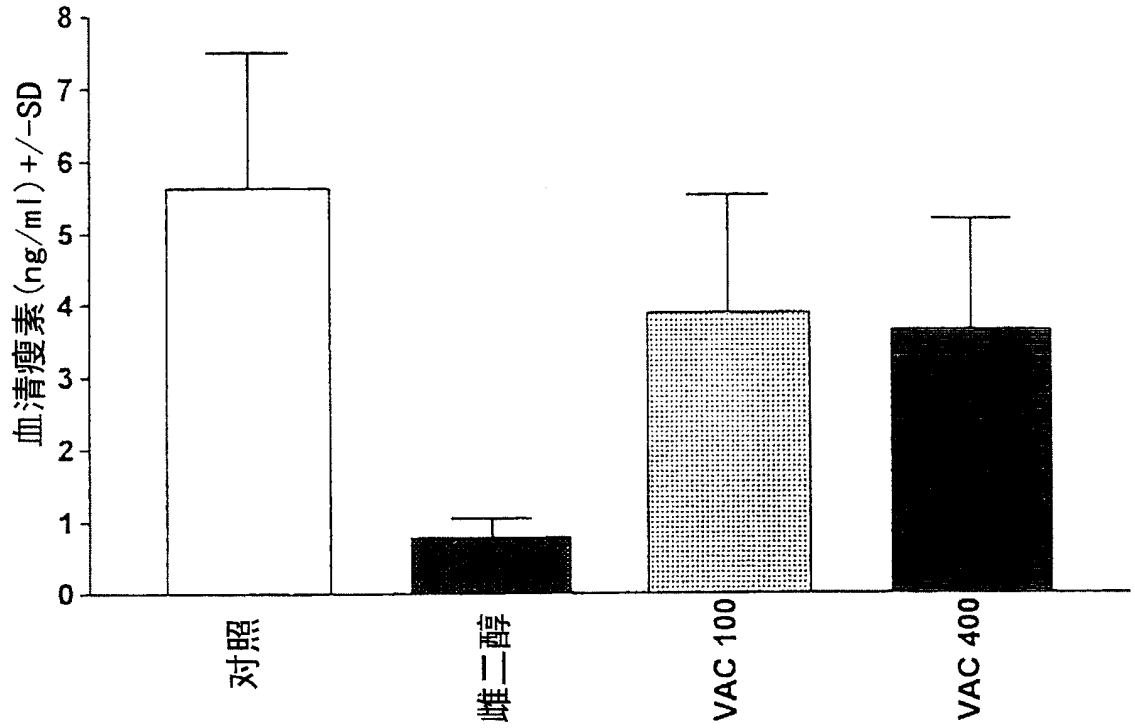


图11

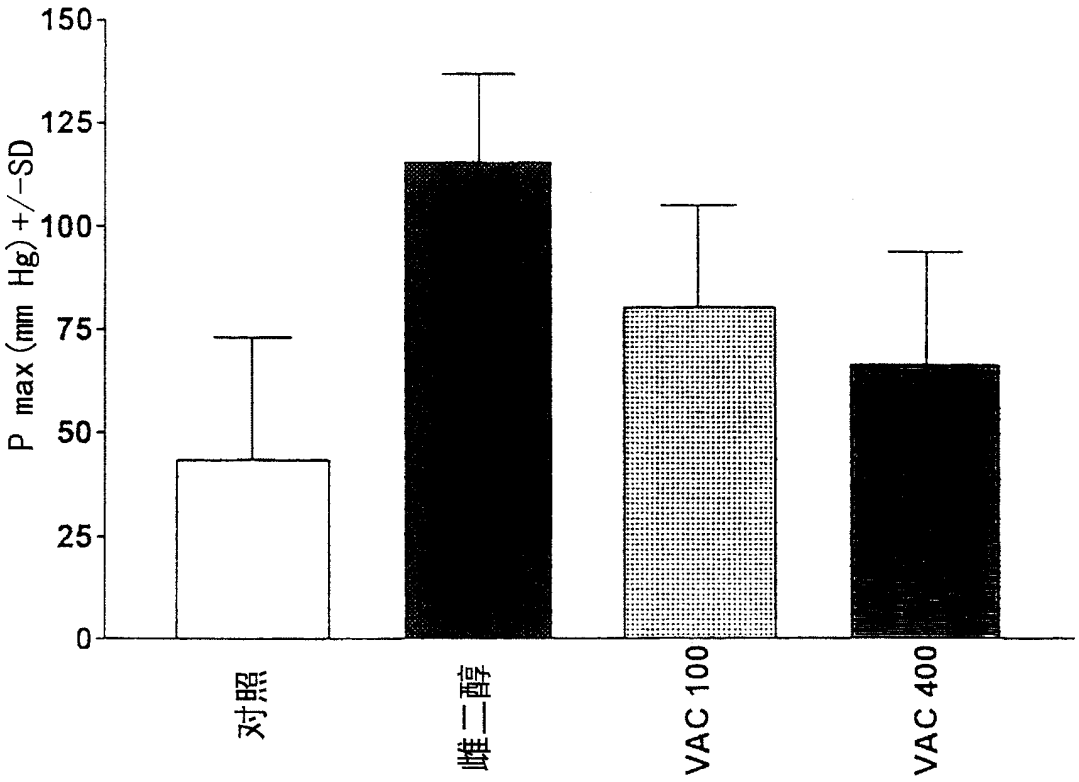


图12

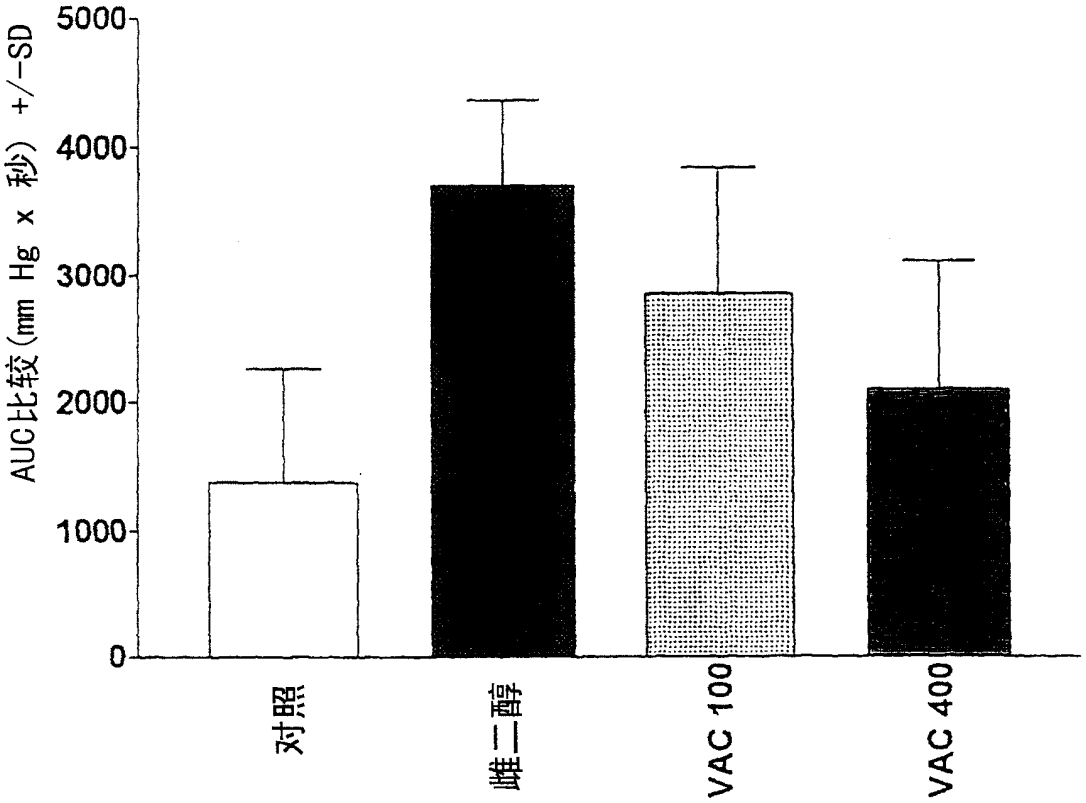

AUC比较(mm Hg x 秒) +/-SD
5000
4000
3000
2000
1000
0
对照
雌二醇
VAC 100
VAC 400

图13