



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111372586 B

(45) 授权公告日 2023.07.25

(21) 申请号 201880074979.3

(74) 专利代理机构 北京聿宏知识产权代理有限公司 11372

(22) 申请日 2018.11.20

专利代理人 吴大建 康志梅

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111372586 A

(51) Int.Cl.

A61K 31/4985 (2006.01)

(43) 申请公布日 2020.07.03

A61K 35/52 (2015.01)

(30) 优先权数据

A61K 36/48 (2006.01)

10-2017-0154820 2017.11.20 KR

A23L 33/10 (2016.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A23L 33/105 (2016.01)

2020.05.20

(56) 对比文件

(86) PCT国际申请的申请数据

CN 1093090 A, 1994.10.05

PCT/KR2018/014275 2018.11.20

WO 9008583 A2, 1990.08.09

(87) PCT国际申请的公布数据

CN 104971086 A, 2015.10.14

W02019/098811 K0 2019.05.23

Chandan Prasad 等.“Distribution and

(73) 专利权人 诺麦塔制药有限公司

metabolism of Cyclo (His-Pro): A new

地址 韩国首尔

member of the neuropeptide family”.

《Peptides》.1982, 第3卷(第3期), 第591-598页.

(72) 发明人 郑会润 李宪钟 李到炫

审查员 周陈林

权利要求书1页 说明书10页 附图2页

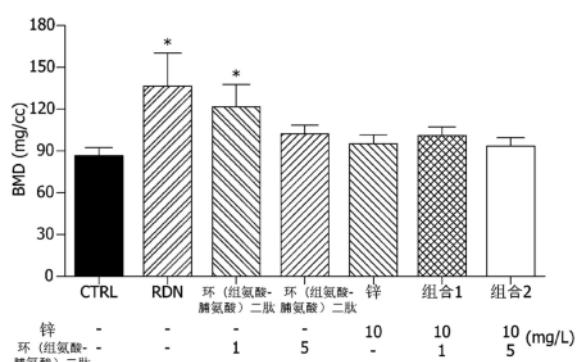
(54) 发明名称

包含CHP的骨丢失疾病的预防、改善或治疗

用组合物

(57) 摘要

本发明涉及包含CHP(环(组氨酸-脯氨酸)二肽)的骨丢失疾病的预防、改善或治疗用组合物，更详细地，涉及包含CHP或含其的前列腺提取物的骨丢失疾病的预防、改善或治疗用组合物。



1. 由环(组氨酸-脯氨酸)二肽或其的药学上可接受的盐和药学上可接受的载体组成的组合物在制备用于预防或治疗由降低的成骨分化引起的骨质丢失疾病的药物中的用途。
2. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于,所述骨质丢失疾病包括选自由骨质疏松症、佩吉特氏病、牙槽骨丢失、骨软化症及肾性骨营养不良组成的组中的一种或多种。
3. 根据权利要求2的用途,其特征在于,由于女性激素的减少和成骨细胞的破坏或其活性的抑制而发生骨质疏松。

包含CHP的骨丢失疾病的预防、改善或治疗用组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及包含CHP(环(组氨酸-脯氨酸)二肽)的骨丢失疾病的预防、改善或治疗用组合物,更详细地,涉及包含CHP或含其的前列腺提取物的骨丢失疾病的预防、改善或治疗用组合物。

背景技术

[0002] 在骨的产生、生长及代谢过程中,骨的形成(bone modeling)和再形成(remodeling)过程起到重要作用。骨的形成从胎生期开始持续到之后骨骼成熟而结束生长的青壮年期为止,从20多岁到30岁出头,形成最大骨量。之后,约30年期间反复去除骨并重新将其补充的骨再形成过程,此时,骨形成和骨吸收相互成对而维持均衡。过这时期之后,骨形成无法充分赶上根据骨吸收的骨丢失,导致最终,一年减少0.3~0.5%左右的骨量,尤其,女性在绝经初期发生相当于一年2~3%的骨丢失。

[0003] 骨组织构成软骨和骨骼系统,以机械功能起到支撑和肌肉附着的作用,起到保护生物器官及骨髓的功能,并为了维持钙和磷离子的恒常性,负责保存它们的功能。骨组织由胶原质、糖蛋白之类的细胞底物和造骨细胞(成骨细胞,osteoblast)、破骨细胞及骨细胞等多种细胞形成。

[0004] 并且,骨组织为利用造骨细胞来形成,并利用破骨细胞来不断反复破坏吸收的动态组织,骨质疏松症为造骨细胞和破骨细胞的平衡被打破,致使骨吸收比骨形成亢进而引起的病症,由于骨组织的钙化减少,骨的致密物质变薄,由此,骨髓腔变宽,随着症状发展,骨变弱,因而即使是小的冲击,也容易骨折。

[0005] 众所周知,对于骨质疏松症而言,相比于其症状本身,因骨的弱化而容易引起的各种骨折,尤其,股骨骨折或脊柱骨折等限制长期活动,从而无法享受健康的生活,最终,成为老年人死亡的15%的原因。骨量受到遗传因素、营养摄取、激素的变化、运动及生活习惯的差异等多种因素的影响,作为骨质疏松症的原因,众所周知的有老龄、运动不足、低体重、吸烟、低钙饮食、绝经、卵巢切除等。尤其,女性从30岁之后开始骨持续减少,当到绝经期时,因激素变化而骨急剧减少。

[0006] 像这样,骨质疏松症虽有程度差异,但对于老年人,尤其,绝经期之后的女性而言是不可避免的症状,在发达国家中,随着人口老龄化,对骨质疏松症及其治疗剂的关心逐渐增加。并且,众所周知,全球与骨疾病治疗相关地,形成约1300亿美元的市场,预计往后会更增加,因而全球各个研究机构和制药公司对开发骨疾病治疗剂进行很多投资,当前,正在活跃地进行骨吸收抑制剂的开发。

[0007] 据最新报告,广泛用作骨质疏松症治疗剂的钙增强材料的效果不显著,且据报告,利用雌激素或降钙素的激素疗法中治疗效果也不显著。尤其,据报告,在包含雌激素或降钙素的激素疗法中,增加骨密度,并减少直肠癌的产生,但报告中也有乳腺癌、心肌梗死、静脉血栓形成等副作用。并且,广泛用作骨质疏松症治疗剂的双膦酸盐作为抑制破骨细胞的骨吸收抑制剂,以新的代替治疗剂备受瞩目,但当进行不正确的口服给药时,还在上呼吸道中

观察到病灶。因此,骨质疏松症为无法仅通过药物的短期给药而治疗,是需要药物的长期给药的疾病,因而急切地需要开发具有新的作用及骨骼结构且因毒性及副作用少而对骨质疏松症的预防及治疗有效的新物质。

[0008] 另一方面,在本发明之前,曾公开包含锌离子及环(组氨酸-脯氨酸)二肽(Cylco-HisPro, CHP)的抗糖尿组合物,但未对CHP的骨丢失疾病的预防、改善或治疗效果公开。

发明内容

[0009] 技术问题

[0010] 本发明的目的在于,提供包含环(组氨酸-脯氨酸)二肽的骨丢失疾病的预防或治疗用药物组合物。

[0011] 本发明的再一目的在于,提供包含环(组氨酸-脯氨酸)二肽的骨丢失疾病的预防或改善用保健食品组合物。

[0012] 本发明的另一目的在于,提供包含前列腺提取物的骨丢失疾病的预防或治疗用药物组合物。

[0013] 本发明的还一目的在于,提供包含前列腺提取物的骨丢失疾病的预防或改善用保健食品组合物。

[0014] 解决问题的方案

[0015] 为了解决上述的问题,本发明提供包含环(组氨酸-脯氨酸)二肽或其的药学上可接受的盐的骨丢失疾病的预防或治疗用药物组合物。

[0016] 本发明还提供包含环(组氨酸-脯氨酸)二肽的骨丢失疾病的预防或改善用保健食品组合物。

[0017] 本发明还提供包含前列腺提取物的骨丢失疾病的预防或治疗用药物组合物。

[0018] 本发明还提供包含前列腺提取物的骨丢失疾病的预防或改善用保健食品组合物。

[0019] 根据本发明的优选的再一实施例,上述骨丢失疾病可以为选自由骨质疏松症、佩吉特氏病(Paget's disease)、牙槽骨丢失、骨软化症及肾性骨营养不良(renal osteodeystrophy)组成的组中的一种以上。

[0020] 根据本发明的优选的另一实施例,上述骨质疏松症可因雌性激素的减少而产生。

[0021] 发明的效果

[0022] 本发明的包含(环(组氨酸-脯氨酸)二肽)或前列腺提取物的骨丢失疾病的预防、改善或治疗用组合物的成骨细胞分化促进及骨密度增进效果优秀,从而对骨丢失疾病的治疗有效。

附图说明

[0023] 图1为分析将CHP(环(组氨酸-脯氨酸)二肽)进行给药而发生的股骨的骨密度的变化来表示的图表。

[0024] 图2为分析将CHP(环(组氨酸-脯氨酸)二肽)进行给药而发生的骨体积比的变化来表示的图表。

[0025] 图3为通过处理CHP(环(组氨酸-脯氨酸)二肽)的成骨细胞的分化促进效果的确认图。

[0026] 图4为表示通过处理CHP(环(组氨酸-脯氨酸)二肽)的碱性磷酸酶(ALP)活性增加效果的图表。

具体实施方式

[0027] 以下,更详细说明本发明。

[0028] 如上所述,本发明人通过卵巢摘除动物模型的骨质疏松症改善效果及成骨细胞的分化促进效果发现环(组氨酸-脯氨酸)二肽对预防、改善或治疗骨丢失疾病有效,并完成本发明。

[0029] 因此,本发明提供包含环(组氨酸-脯氨酸)二肽或前列腺提取物的骨丢失疾病的预防或治疗用药物组合物。

[0030] 本发明还提供包含环(组氨酸-脯氨酸)二肽或前列腺提取物的骨丢失疾病的预防或改善用保健食品组合物。

[0031] 在本发明中,“环(组氨酸-脯氨酸)二肽(Cyclo-HisPro,CH P)”为由作为促甲状腺激素释放激素(thyrotropin-releasing hormone,TRH)的代谢产物的组氨酸脯氨酸(Histidine-Proline)构成的自然产生的环状二肽(dipeptide)或还与促甲状腺激素释放激素代谢过程从头(*d e novo*)在体内合成的生理活性二肽,是指广泛分布于整个脑部和脊髓及胃肠道等的物质。

[0032] 在本发明的组合物中,上述CHP可合成来使用,或可使用市场上销售的。并且,可使用包含CHP的物质,例如,从前列腺提取物纯化来使用。

[0033] 使用术语“纯化的”,CHP可指比前列腺提取物之类的来源于天然的形态更浓缩的形态。纯化的成分可从它们的天然源中浓缩或通过化学合成方法得到。

[0034] 上述“前列腺提取物(prostate extract)”的主要结构成分为锌、CHP、前列腺素前体及花生四烯酸,因包含高浓度的CHP而可合理预测以CHP诱导的骨密度及骨体积比增加效果和成骨细胞分化及骨形成促进效果。

[0035] 在本发明的组合物中,上述“前列腺提取物”可以为牛或猪的前列腺粉末等,优选地,为了提高CHP的含量,能够以去除脂肪的形态使用,但不局限于此。

[0036] 在本发明中,术语“骨丢失”是指破骨细胞和造骨细胞的不均衡引起的骨丢失的症状,“骨丢失疾病”是指均包含与上述症状相关的疾病。因此,均包含破骨细胞的活性过高而使骨丢失,致使骨密度变低,或因造骨细胞的活性降低,从而无法顺畅地生成骨而引起的疾病。上述骨丢失疾病的的具体例有骨质疏松症、佩吉特氏病(Paget's disease)、牙槽骨丢失、骨软化症及肾性骨营养不良(renal osteodystrophy)等,但不局限于此。

[0037] 此时,上述骨质疏松症为更年期或绝经期症状中之一,可因雌性激素的减少而产生,或因成骨细胞的破坏或活性的抑制而产生。

[0038] 在本发明中,术语“更年期”通常是指从具有生育能力的时期转换为生育能力消失的时期的时期。上述更年期主要用于提及女性的更年期,但女性的更年期为均包含围绝经期(perimenopause)前后的时期,而不仅包含绝经期(menopause)的范围,通常,相当于40~60岁的年龄层。

[0039] 本发明的包含CHP或前列腺提取物的组合物可促进成骨细胞的分化来促进骨形成,以预防、改善或治疗骨丢失疾病。

[0040] 在本发明的骨丢失疾病的预防、改善或治疗用组合物中，术语“预防”是指抑制或延迟病症或病症的所有行为。在本发明中，是指促进成骨细胞的分化来延迟骨丢失疾病的发病时期或抑制发病。

[0041] 在本发明的骨丢失疾病的预防、改善或治疗用组合物中，术语“改善”是指使病症或病症状态好转或有利变更的所有行为，在本发明中，是指通过促进成骨细胞的分化的作用使骨质疏松症的症状或牙槽骨丢失之类的症状好转。

[0042] 在本发明的骨丢失疾病的预防、改善或治疗用组合物中，术语“治疗”是指使病症或病症的发展延迟、中断或逆转的所有行为，在本发明中，是指通过促进成骨细胞的分化的作用中断、减轻、缓解或去除牙槽骨或骨等的丢失或使其逆转。

[0043] 在本发明的一实施例中，将CHP单独给药到卵巢摘除动物模型，其结果，如图1及图2所示，确认到使股骨的骨密度及骨体积比显著上升。这种CHP的效果比锌盐给药组及将锌盐和CHP混合给药的混合给药组中呈现的效果更显著优秀，由此，可类推CHP不通过现有的众所周知的增加体内锌吸收率的效果增加骨密度。

[0044] 在本发明的再一实施例中，确认到通过CHP处理的成骨细胞分化效果。其结果，如图3所示，可确认CHP处理浓度越增加，成骨细胞的分化及骨形成越得到促进，相比于阴性对照组，促进的增长幅度也变大。尤其，如图4所示，确认到CHP增加碱性磷酸酶的活性来促进成骨细胞的分化和骨形成，观察到2mM的CHP处理组具有与阳性对照组(10nM的hPTH₁₋₃₄)等同或类似的水平的碱性磷酸酶促进活性。在本发明的骨丢失疾病的预防、改善或治疗用组合物中，CHP能够以0.1至5mg/L进行给药，优选地，能够以0.5至3mg/L进行给药。

[0045] 在本发明中，术语“药学上可接受的”是指生理学上接受且当给药到人类时，通常，不发生过敏反应或与其类似的反应，上述盐优选为由药剂学上可接受的游离酸(free acid)形成的酸加成盐。

[0046] 上述药剂学上可接受的盐可以为利用有机酸或无机酸来形成的酸加成盐，上述有机酸例如包含甲酸、乙酸、丙酸、乳酸、丁酸、异丁酸、三氟乙酸、苹果酸、马来酸、丙二酸、富马酸、琥珀酸、琥珀酸单酰胺、谷氨酸、酒石酸、草酸、柠檬酸、乙醇酸、葡萄糖醛酸、抗坏血酸、苯甲酸、邻苯二甲酸、水杨酸、邻氨基苯甲酸、二氯乙酸、氨氧基乙酸、苯磺酸、p-甲苯磺酸或甲磺酸。无机酸例如包含盐酸、溴酸、硫酸、磷酸、硝酸、碳酸或硼酸。优选地，酸加成盐可以为盐酸盐或醋酸盐形态，更优选地，可以为盐酸盐形态。

[0047] 此外，可作为盐的形态还有加巴盐、加巴喷丁盐、普瑞巴林盐、烟酸盐、己二酸盐、半丙二酸盐、半胱氨酸盐、乙酰半胱氨酸盐、蛋氨酸盐、精氨酸盐、赖氨酸盐、鸟氨酸盐或天门冬氨酸盐等。

[0048] 并且，本发明的药学组合物还可包含药学上可接受的载体。药学上接受的载体例如还可包含口服给药用载体或非口服给药用载体。口服给药用载体可包含乳糖、淀粉、纤维素衍生物、硬脂酸镁、硬脂酸等。非口服给药用载体可包含水、适合的油、盐水、水溶性葡萄糖及乙二醇等。并且，还可包含稳定剂及保鲜剂。适合的稳定剂有亚硫酸氢钠、亚硫酸钠或抗坏血酸之类的抗氧化剂。适合的保鲜剂有苯扎氯铵、甲基-或尼泊金丙酯及氯丁醇。作为此外的药学上接受的载体，可将记载于以下文献的内容用作参考(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995)。

[0049] 本发明的药学组合物还能够以任何方法给药到包括人类在内的哺乳动物。例如，

能够以口服或非口服进行给药,非口服给药方法不局限于此,但能够以静脉内、肌肉内、动脉内、骨髓内、硬膜内、心脏内、经皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、肠管、局部、舌下或直肠内的方式进行给药。

[0050] 本发明的药学组合物可根据如上所述的给药途径来以口服给药用或非口服给药用制剂进行剂型化。当进行剂型化时,可使用一种以上的缓冲剂(例如,盐水或磷酸盐缓冲液(PBS))、碳水化合物(例如,葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖等)、抗氧化剂、抑菌剂、螯合剂(例如,乙二胺四乙酸(EDTA)或谷胱甘肽)、填充剂、增量剂、粘合剂、佐剂(例如,氢氧化铝)、悬浮剂、增稠剂、湿润剂、崩解剂或表面活性剂、稀释剂或赋形剂来进行调配。

[0051] 用于口服给药的固体制剂包含片剂、丸剂、散剂、颗粒剂、液剂、凝胶剂、糖浆剂、浆料剂、悬浮液或胶囊剂等,这种固体制剂在本发明的药学组合物中混合一种以上的赋形剂,例如,淀粉(包含玉米淀粉、小麦淀粉、大米淀粉、马铃薯淀粉等)、碳酸钙(Calcium carbonate)、蔗糖(Sucrose)、乳糖(Lactose)、葡萄糖、山梨糖醇、甘露糖醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇、纤维素、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠及羟丙基甲基-纤维素或明胶等来进行调配。例如,可将活性成分和固体赋形剂进行调配之后,将其进行粉碎,并添加适合的助剂,之后,加工成颗粒混合物,以获取片剂或糖衣片剂。

[0052] 除了单纯赋形剂之外,还使用硬脂酸镁、滑石之类的润滑剂。用于口服的液态制剂有悬浮剂、内服溶液剂、乳剂或糖浆剂等,除了作为常用的单纯稀释剂的水或液体石蜡之外,可包含多种赋形剂,例如,湿润剂、甜味剂、芳香剂或保鲜剂等。

[0053] 并且,根据情况,可添加交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、海藻酸或海藻酸钠等作为崩解剂,还可包含抗凝集剂、润滑剂、湿润剂、香料、乳化剂及防腐剂等。

[0054] 当以非口服进行给药时,本发明的药学组合物可与适合的非口服用载体一同以注射剂、经皮给药剂及鼻腔吸入剂的形态通过本领域中公知的方法来进行剂型化。对于上述注射剂而言,必须要进行灭菌,需要从细菌及真菌之类的微生物的污染中得到保护。对于注射剂而言,适合的载体的例不局限于此,但可以为包含水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇及液态聚乙二醇等)、它们的混合物和/或植物油的溶剂或分散介质。更优选地,作为适合的载体,可使用汉克斯溶液、林格氏溶液、包含三乙醇胺的磷酸盐缓冲液(PBS, phosphate buffered saline)或注射用灭菌水、10%乙醇、40%丙二醇及5%葡萄糖之类的等渗溶液等。为了从微生物污染中保护上述注射剂,还可包含对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等多种抗菌剂及抗真菌剂。并且,大部分情况下,上述注射剂还可包含糖或氯化钠之类的等渗剂。

[0055] 经皮给药剂包含软膏剂、霜剂、乳剂、凝胶剂、外服溶液剂、糊剂、擦剂、气溶胶剂等形态。在上面中,经皮给药是指将药学组合物局部给药到皮肤来使包含在药学组合物的有效量的活性成分向皮肤内传递。

[0056] 对于吸入给药剂而言,根据本发明使用的化合物可使用适合的推进剂,例如,二氯氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他适合的气体来从加压包或烟雾器中以气溶胶喷剂形态便利地进行传递。对于加压气溶胶而言,投药单位可提供传递已计量的量的阀来确定。例如,用于吸入器或吹入器的明胶胶囊及盒能够以包含化合物及乳糖或淀粉之类的适合的粉末基剂的粉末混合物的方式进行剂型化。非口服给药用剂型记载于作为所有制药化学中通常公知的处方书的文献(Remington's Pharmaceutical Science, 15th

Edition, 1975. Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 18042, Chapter 87:B1 aug, Seymour) 中。

[0057] 当以有效量包含环(组氨酸-脯氨酸)二肽或前列腺提取物时,本发明的药学组合物可提供优选的骨丢失疾病的预防、改善或治疗效果。在本发明中,术语“有效量”是指与阴性对照组相比呈现其以上的反应的量,优选地,对预防、改善或治疗骨丢失疾病充分的量。本发明的药学组合物可包含0.01至99.9%的环(组氨酸-脯氨酸)二肽或前列腺提取物,余量可由药学上可接受的载体占据。包含在本发明的药学组合物的环(组氨酸-脯氨酸)二肽或前列腺提取物的有效量可根据组合物产品化的形态等而不同。

[0058] 本发明的药学组合物的总有效量能够以单次给药量(single dose)给药到患者,可通过以多次给药量(multiple dose)长时间给药的分次治疗方法(fractionated treatment protocol)来进行给药。本发明的药学组合物可根据疾病的程度来改变有效成分的含量。例如,以环(组氨酸-脯氨酸)二肽为基准,可分一次至多次来进行给药,以便于每天每1kg体重以优选为0.001至100mg,更优选为0.01至10mg的量进行给药。但是,对于上述环(组氨酸-脯氨酸)二肽或前列腺提取物的容量而言,不仅是药学组合物的给药途径及治疗次数,还考虑患者的年龄、体重、健康状态、性别、疾病的重症度、饮食及排泄率等多种因素而确定对患者的有效给药量,因而考虑到这一点,只要是本发明所属技术领域的普通技术人员,就可以确定上述环(组氨酸-脯氨酸)二肽或前列腺提取物的根据用于预防、治疗或改善骨丢失疾病的特定的用途的适当的有效给药量。作为本发明的药学组合物,只要呈现本发明的效果,其剂型、给药途径及给药方法就不受特别限制。

[0059] 本发明的骨丢失疾病的预防或治疗用药物组合物可单独或与手术、放射治疗、激素治疗、化学治疗或使用生物学反应调节剂的方法并用使用。

[0060] 本发明的骨丢失疾病的预防或治疗用药物组合物还能够以包含环(组氨酸-脯氨酸)二肽或前列腺提取物的外用剂的剂型提供。在这方面,本发明的组合物可以为骨丢失疾病的预防或改善用医药外品组合物及包含上述组合物的医药外品。

[0061] 上述外用剂可直接适用于皮肤或口腔内。当将本发明的骨丢失疾病的预防或治疗用药物组合物用作外用剂时,还可包含脂肪物质、有机溶剂、溶剂、浓缩剂及凝胶剂、软化剂、抗氧化剂、悬浮剂、稳定剂、发泡剂(foaming agent)、芳香剂、表面活性剂、水、离子型乳化剂、非离子型乳化剂、填充剂、金属离子螯合剂、螯合剂、保鲜剂、维生素、阻隔剂、湿润剂、必要油、染料、颜料、亲水性活性剂、亲油性活性剂或脂质小囊等皮肤外用剂中通常使用的任意其他成分之类的皮肤科学领域中通常使用的助剂。并且,上述成分能够以皮肤科学领域中通常使用的量进行导入。

[0062] 当本发明的组合物提供为外用剂时,不局限于此,但可以为液剂、软膏、贴片、凝胶、乳霜或喷雾剂等剂型。根据本发明的一实例,本发明的医药外品可包含含牙膏、漱口水及口腔喷雾剂的口腔管理产品、软膏剂、口罩、湿泡剂、贴附剂及经皮吸收剂等。

[0063] 当处理本发明的环(组氨酸-脯氨酸)二肽时,促进成骨细胞的分化,当将上述有效成分适用于口腔管理产品时,促进成骨细胞的分化,从而对牙槽骨疾病的预防或改善有效。因此,上述医药外品组合物可以为用于骨丢失预防或改善的口腔管理用组合物。

[0064] 当将本发明的组合物用作医药外品组合物时,可直接添加环(组氨酸-脯氨酸)二肽或前列腺提取物或与其他医药外品成分一同按照通常的方法适当地使用。有效成分的混

含量可根据使用目的(预防、健康或治疗性处置)而适合地确定。

[0065] 本发明的医药外品组合物及医药外品中可适用本发明的药学组合物及保健食品组合物的内容。

[0066] 在本发明中,术语“保健食品”均包含“功能性食品”及“健康食品”的含义。

[0067] 在本发明中,术语“功能性食品(functional food)”为与特定保健用食品(food for special health use,FoSHU)相同的术语,是指除了供给营养之外,还以有效呈现生物调节功能的方式加工的医学、医疗效果高的食品。

[0068] 在本发明中,术语“健康食品(health food)”是指比普通食品更积极维持健康或具有增进效果的食品,健康补助食品(health supplement food)是指健康补助目的的食品。根据情况,功能性食品、健康食品、健康补助食品这些术语会混用。上述食品可制备成片剂、胶囊、粉末、颗粒、液体、丸等多种形态,以得到对改善或恢复骨丢失疾病有用的效果。

[0069] 作为这种功能性食品的具体例,可利用上述组合物来突出农产品、畜产品或水产品的特性并变形的同时制备储存性好的加工食品。

[0070] 本发明的保健食品组合物还可制备成营养补助剂(nutritional supplement)、食品添加剂(food additives)及饲料等形态,将包括人类或家畜在内的动物作为摄食对象。

[0071] 上述类型的食品组合物可根据本领域中公知的常规方法来制备成多种形态。作为普通食品,不局限于此,但可在饮料(包含含酒精饮料)、果实及其加工食品(如水果罐头、瓶装罐头、果酱、酸果酱等)、鱼类、肉类及其加工食品(如火腿、香肠咸牛肉等)、面包类及面类(如乌冬面、荞麦面、方便面、意大利面、通心面等)、果汁、各种饮料、饼干、麦芽糖、乳制品(如黄油、芝士等)、食用植物油脂、人造黄油、植物蛋白、软罐头食品、冷冻食品、各种调味料(如大酱、酱油、酱汁等)等中添加环(组氨酸-脯氨酸)二肽或前列腺提取物来进行制备。

[0072] 并且,作为营养补助剂,不局限于此,但可在胶囊、片剂、丸等中添加环(组氨酸-脯氨酸)二肽或前列腺提取物来进行制备。

[0073] 并且,作为保健食品,不局限于此,但例如,可进行液态化、颗粒化、胶囊化及粉末化来摄取,以便于可将上述环(组氨酸-脯氨酸)二肽或前列腺提取物制备成茶、果汁及饮料的形态来进行饮用(健康饮料)。并且,为了以食品添加剂的形态使用上述环(组氨酸-脯氨酸)二肽或前列腺提取物,可制备成粉末或浓缩液形态来使用。并且,可将上述环(组氨酸-脯氨酸)二肽或前列腺提取物和众所周知对骨丢失疾病的预防或改善有效的公知的活性成分一同混合来以组合物的形态进行制备。

[0074] 当本发明的食品组合物利用为健康饮料组合物时,上述健康饮料组合物可如同通常的饮料包含多种调味剂或天然碳水化合物等作为追加成分。上述的天然碳水化合物可以为葡萄糖、果糖之类的单糖、麦芽糖、蔗糖之类的二糖、糊精、环糊精之类的多糖、木糖醇、山梨糖醇、赤藓糖醇等的糖醇。甜味剂可使用索马甜、甜叶菊提取物之类的天然甜味剂、糖精、阿斯巴甜之类的合成甜味剂等。在本发明的组合物每100mL中,通常,上述天然碳水化合物的比例为约0.01~0.04g,优选为约0.02~0.03g。

[0075] 环(组氨酸-脯氨酸)二肽或前列腺提取物可作为骨丢失疾病的预防或改善用食品组合物的有效成分包含,其量为对得到上述预防或改善效果有效的量,例如,在总组合物总重量中,优选为0.01至100重量百分比,但不特别局限于此。本发明的食品组合物可与环(组氨酸-脯氨酸)二肽或前列腺提取物、众所周知对骨丢失疾病的预防或改善有效的其他活性

成分一同混合来进行制备。

[0076] 除了上述之外,本发明的保健食品可包含多种营养剂、维生素、电解质、风味剂、着色剂、果胶酸、果胶酸的盐、海藻酸、海藻酸的盐、有机酸、保护性胶体增粘剂、pH调节剂、稳定剂、防腐剂、甘油、乙醇或碳酸化剂等。此外,本发明的健康食品可包含用于制备天然果汁、果汁饮料或蔬菜饮料的果肉。这种成分可独立或混合使用。这种添加剂的比例不太重要,但本发明的组合物每100重量份通常在0.01~0.1重量份的范围内进行选择。

[0077] 以下,通过实施例更详细说明本发明。只是,本发明可进行多种变更,可具有多种形态,以下描述的特定实施例及说明仅有助于理解本发明,本发明不局限于特定的公开形态。应当被理解为本发明的范围包括包括在本发明的思想及技术范围的所有变更、等同技术方案乃至代替技术方案。

[0078] 准备例

[0079] 以下实施例中使用的锌盐从凯普泰克集团公司(Captek Softgel International)购买使用,CHP(环(组氨酸-脯氨酸)二肽)从巴亨公司购买使用。用作阳性对照组的hPTH₁₋₃₄(副甲状腺激素₁₋₃₄)从托克里斯购买。当培养成骨细胞时,购买吉布科公司的MEM α 、无添加抗坏血酸(no ascorbic acid)的培养基和HyClone公司的胎牛血清(FBS)来使用,用于分化的 β -甘油磷酸酯(β -glycerophosphate)和抗坏血酸从西格玛奥德里奇购买。为了测定碱性磷酸酶(ALP)活性,使用赛默公司的1-STEPTM NBCT/BCIP溶液。

[0080] 实施例1:利用根据CHP或锌盐及混合给药的卵巢摘除动物模型的骨质疏松症改善效果的测定

[0081] 1-1.实验动物的设计及实验物质处理组成

[0082] 为了测定根据CHP、锌盐或它们的混合给药的卵巢摘除动物模型的骨质疏松症改善效果,购买20周龄的SD雌鼠(SLC/中央实验动物(株),韩国首尔))来在规定的条件(温度:22±2℃、相对湿度:55±10%、一个周期:12小时)下进行饲养。将7只作为一个组来在笼子中自由供给水和饲料,实验之前经过一周的驯化来用于实验中。适应期间结束之后,分为七个组,并如下列表1中所示,通过饮水进行CHP或锌盐或混合给药,在阳性对照组中,一周一次将利塞膦酸盐(risedronate)进行皮下给药。

[0083] 表1

| 组 | CHP (mg/L) | 锌盐 (mg/L) | 利塞膦酸盐 (mg/kg) |
|------------------|---------------|--------------|------------------|
| 卵巢切除对照组 | - | - | - |
| CHP 给药组 1 | 1 | - | - |
| CHP 给药组 2 | 5 | - | - |
| 锌盐给药组 | - | 10 | - |
| 混合给药组 1 | 1 | 10 | - |
| 混合给药组 2 | 5 | 10 | - |
| 阳性对照组 (利塞膦酸盐) | - | - | 10 |

[0084]

[0085] 1-2.微型CT(Micro CT)的测定

[0086] 将CHP、锌盐或它们的混合给药进行六周之后,利用微型CT来分析卵巢摘除动物模型的骨质疏松症改善效果。有关卵巢摘除动物的骨密度,利用微型CT(美国马萨诸塞州珀金埃尔默QuantumFX(QuantumFX、Perkin Elmer、Massachusetts、USA))来实施骨CT扫描,从而测定股骨生长板2mm前面3mm范围。并且,测定骨体积比(bone volume fraction,BV/TV,%)。将股骨的骨密度的测定结果示于图1中,并将骨体积比示于图2中。

[0087] 根据实验结果,如图1所示,可观察将1mg/L的CHP进行给药的组相比于卵巢切除组,股骨的骨密度显著增加,与阳性对照组(利塞膦酸盐)相似。并且,如图2所示,在将1mg/L的CHP进行给药的组中,以与作为阳性对照组的利塞膦酸盐相似的水平,骨体积比(BV/TV)得到恢复。

[0088] 有关上述实验结果,通过卵巢摘除对照组和CHP、锌盐、CHP和锌盐的混合处理及利塞膦酸盐处理实验组之间的t检验(t-test)实施比较验证来验证其显著性,呈现统计学上显著差异(*p<0.05)。

[0089] 因此,可知通过将1mg/L的CHP进行给药来增加骨密度及骨体积比,以呈现治疗骨质疏松症的效果。

[0090] 实施例2:根据CHP的MC3T3-E1成骨细胞分化促进及骨形成促进功效的测定

[0091] 2-1.MC3T3-E1成骨细胞培养条件

[0092] 利用10%的胎牛血清、包含1%的青霉素/链霉素的MEM α 、无添加抗坏血酸的培养基来在37℃温度且5%的CO₂条件的培养箱中培养MC3T3-E1细胞。为了向造骨细胞的分化,在上述基本培养基组成中添加10mM的β-甘油磷酸酯和50μg/μl的抗坏血酸来使用。

[0093] 2-2.通过CHP或阳性对照组hPTH₁₋₃₄处理的MC3T3-E1成骨细胞的分化诱导

[0094] 以500μl将1×10⁵个MC3T3-E1细胞播种(seeding)于24孔板中,并培养24小时,直到细胞装满为止。为了分化为造骨细胞,用分化培养基更换培养基,并如表2中所示,在阳性对照组中,处理10nM的hPTH₁₋₃₄,在试验组中,处理0.5、1、2mM的CHP。此时,在作为对于分化的阴性对照组的未分化组中使用非分化培养基的基本培养基。在处理hPTH₁₋₃₄的阳性对照组中,处理6小时之后,将培养基更换为分化培养基。每48小时更换培养基,并将各个浓度的CHP和hPTH₁₋₃₄处理共14天。

[0095] 表2

| 组 | 10mM 的 β -甘油磷酸酯、 50 μ g/ μ l 的抗坏血酸 | 10nM 的 hPTH ₁₋₃₄ (6 小时之后清洗) | CHP |
|----------------------------------|---|---|-------|
| 未分化组 (No differentiation) | - | - | - |
| 阴性对照组 (Control) | + | - | - |
| 阳性对照组 (hPTH ₁₋₃₄) | + | + | - |
| 试验组 1 (0.5mM 的 CHP) | + | - | 0.5mM |
| 试验组 2 (1mM 的 CHP) | + | - | 1mM |
| 试验组 3 (2mM 的 CHP) | + | - | 2mM |

[0096] [0097] 2-3. 碱性磷酸酶(ALP, Alkaline phosphatase)活性的测定

[0098] 分化第14天,去除培养基,并利用磷酸盐缓冲液来清洗一次之后,利用4%的PFA(多聚甲醛)来在常温条件下固定5分钟。放入500 μ l的1-STEP™ NBCT/BCIP溶液,并在常温条件下,反应1小时。利用蒸馏水来进行清洗之后,在常温条件下进行干燥,并通过显微镜观察细胞的着色程度。接着,在各个孔中放入二甲基亚砜(DMSO),并在晃动之后,测定525nm中的吸光度。

[0099] 根据实验结果,如图3所示,确认到处理CHP的组的着色比阴性对照组(Control)更显著增加,可确认随着CHP的浓度变高,增长幅度变大。尤其,可确认2mM的CHP的结果为与阳性对照组(10nM的hPTH₁₋₃₄)相似的水平(图4)。这可被解释为随着碱性磷酸酶活性因CHP而增加,CHP促进成骨细胞的分化和骨形成。由此可判断CHP对治疗骨健康和骨质疏松症有功效。

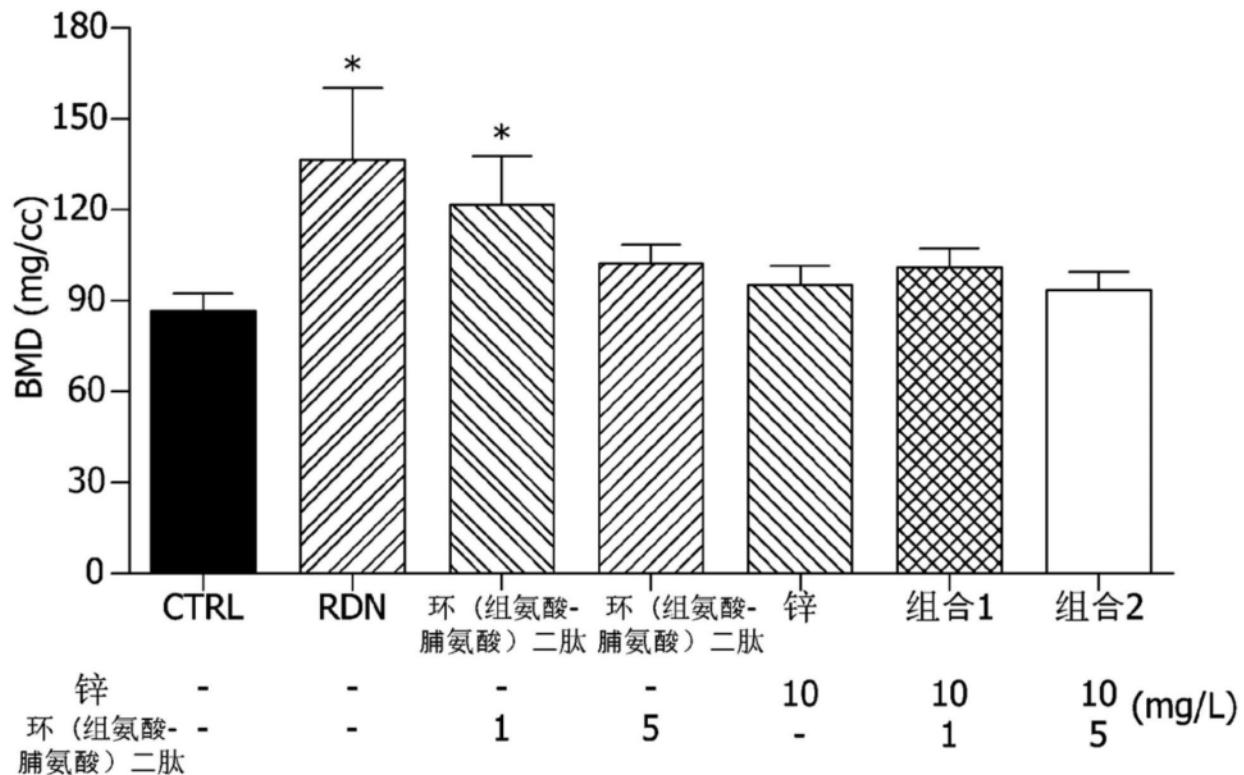


图1

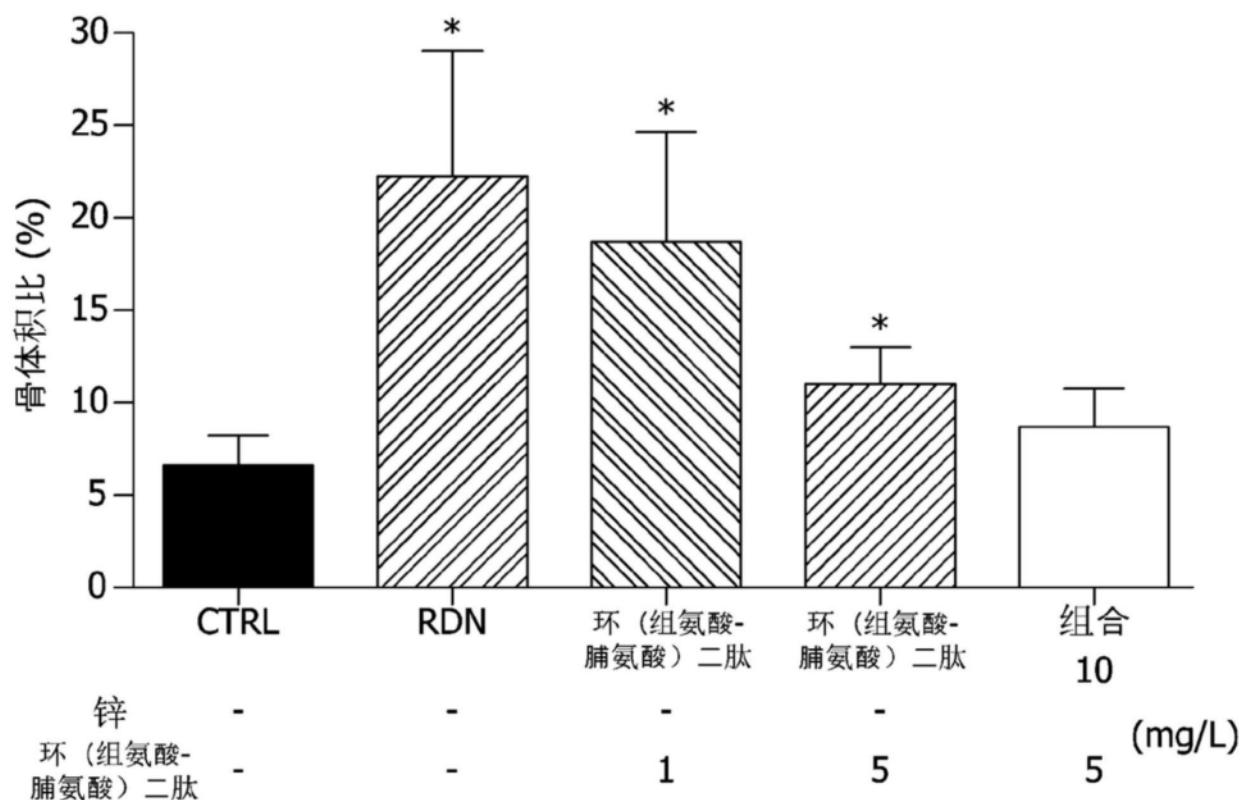


图2

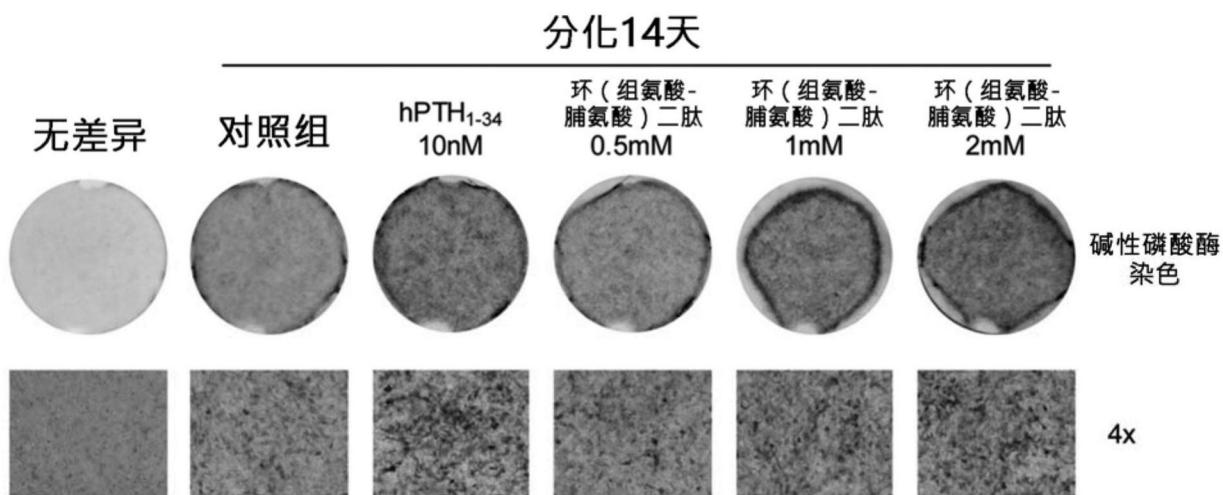


图3

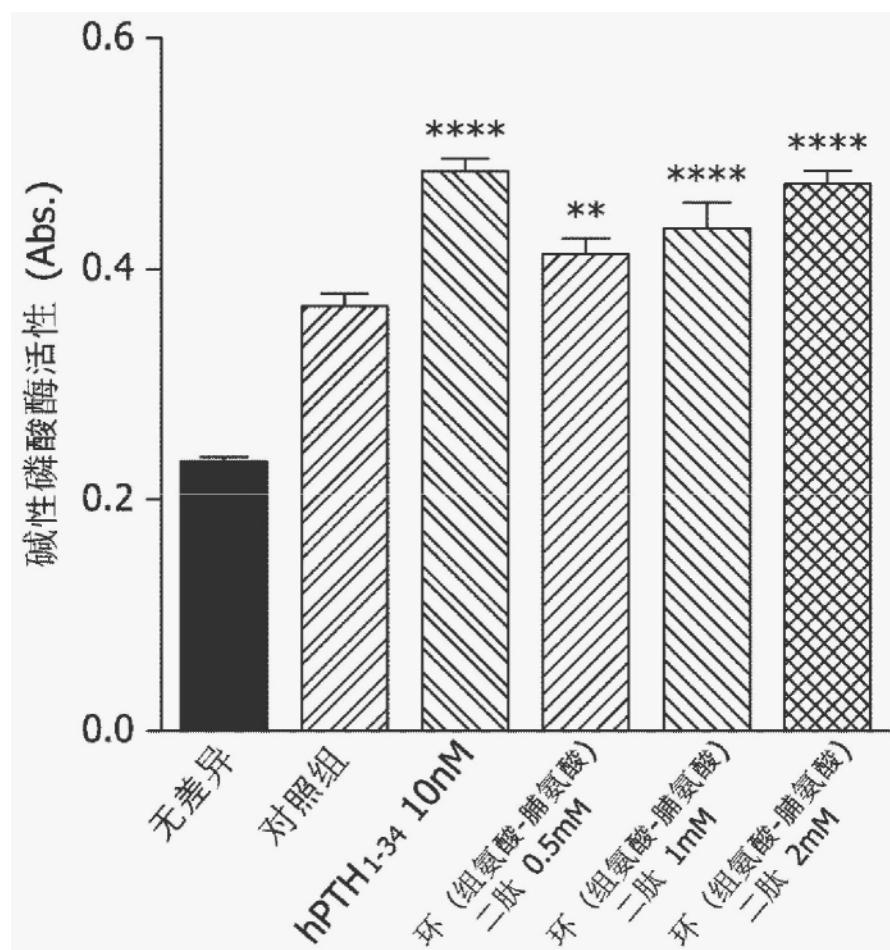


图4