(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 109568338 A
(43)申请公布日 2019.04.05

(21)申请号 201910013584.9

(22)申请日 2012.12.13

(30)优先权数据
61/569,805 2011.12.13 US
61/680,721 2012.08.08 US

(62)分案原申请数据
201280069595.5 2012.12.13

(71)申请人 艾玛菲克有限公司
地址 以色列贝尔谢巴

(72)发明人 阿米尔·萨希 阿萨夫·瑟尔特
盖利特·薛泰尔-高德
麦克·丹尼利 欧尔文·梅伦

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
代理人 刘小立 郑霞

(51)Int.Cl.
A61K 33/10(2006.01)
A61K 35/612(2015.01)
A61P 19/10(2006.01)
A61P 5/18(2006.01)
A61K 31/663(2006.01)

权利要求书1页 说明书46页 附图13页

(54)发明名称

用于治疗钙吸收不良和骨代谢紊乱的无定形碳酸钙

(57)摘要

提供了用于治疗钙吸收不良和骨代谢紊乱的无定形碳酸钙。还提供了利用施用包含稳定的无定形碳酸钙的组合物，用于治疗钙吸收不良和与钙吸收不良相关的状况的方法。还提供了利用与骨再吸收抑制剂组合施用所述组合物，用于在骨代谢相关的紊乱、疾病或状况中增加骨矿物质密度的方法。

CN 109568338 A

1.稳定的无定形碳酸钙在制备用于治疗患有与甲状旁腺功能减退症相关的钙吸收不良的口服药物中的用途,其中所述稳定的无定形碳酸钙包含至少一种稳定剂,并且其中所述ACC中元素钙的量是结晶碳酸钙标准剂量中元素钙的50%或更少。

2.根据权利要求1所述的用途,其中所述稳定剂选自由以下组成的组:有机酸、磷酸羟基羧酸酯、或硫酸羟基羧酸酯和带有羟基的有机化合物。

3.根据权利要求2所述的用途,其中所述稳定剂包含选自以下的至少一种组分:磷酸羟基羧酸酯和带有羟基的有机化合物。

4.根据权利要求2所述的用途,其中所述稳定剂包含选自以下的至少一种组分:磷酸化的氨基酸和多元醇。

5.根据权利要求4所述的用途,其中所述磷酸化的氨基酸以寡肽或多肽存在。

6.根据权利要求5所述的用途,其中磷酸化的氨基酸选自磷酸丝氨酸和磷酸苏氨酸。

7.根据权利要求2所述的用途,其中所述稳定剂是选自单糖类、二糖类、三糖类、寡糖类和多糖类的带有羟基的有机化合物。

8.根据权利要求2所述的用途,其中所述稳定剂包括与至少一种碱金属氢氧化物进一步组合的带有羟基的有机化合物。

9.根据权利要求2所述的用途,其中所述稳定剂是羧酸。

10.根据权利要求9所述的用途,其中所述羧酸选自柠檬酸、酒石酸和苹果酸。

11.根据权利要求2所述的用途,其中所述稳定剂包括选自由以下组成的组的至少一种化合物:磷酸化的氨基酸、磷酸化的肽、连同至少一种肽的甲壳质、和连同碱金属氢氧化物的多元醇。

12.根据权利要求1所述的用途,其中所述无定形碳酸钙获自分离的甲壳类动物胃石。

13.稳定的无定形碳酸钙和选自由以下组成的组的至少一种稳定剂:有机酸、磷酸羟基羧酸酯、或硫酸羟基羧酸酯、和带有羟基的有机化合物,在制备用于治疗患有与血浆钙浓度降低至8.8mg/dL以下相关的钙代谢的紊乱的受试者中与甲状旁腺功能减退症相关的钙吸收不良的组合物中的用途,其中所述组合物用于口服施用。

14.根据权利要求13所述的用途,其中(i)所述稳定剂包含选自磷酸化的氨基酸和多元醇的至少一种组分;(ii)所述带有羟基的有机化合物选自单糖类、二糖类、三糖类、寡糖类和多糖类;或(iii)所述稳定剂是羧酸。

15.根据权利要求14所述的用途,其中所述羧酸选自柠檬酸、酒石酸和苹果酸。

16.根据权利要求14的用途,其中所述磷酸化的氨基酸选自磷酸丝氨酸和磷酸苏氨酸。

17.根据权利要求13的用途,其中所述稳定剂包括选自以下的至少一种化合物:磷酸化的氨基酸、磷酸化的肽、连同至少一种肽的甲壳质、和连同碱金属氢氧化物的多元醇,以及带有羟基的有机化合物和与至少一种碱金属氢氧化物组合的带有羟基的有机化合物。

18.根据权利要求13的用途,其中所述无定形碳酸钙获自分离的甲壳类动物胃石。

用于治疗钙吸收不良和骨代谢紊乱的无定形碳酸钙

[0001] 本申请是申请日为2012年12月13日，申请号为201280069595.5，发明名称为“用于治疗钙吸收不良和骨代谢紊乱的无定形碳酸钙”的申请 的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及天然的和合成的无定形碳酸钙的组合物，用于治疗钙吸收 不良和吸收不良相关的紊乱、疾病和状况，以及用于在钙吸收不良和骨代 谢相关的紊乱中增加骨矿物质密度。

[0003] 背景

[0004] 钙被认为是在人体中最重要的矿物质之一。需要钙来维持骨矿物质密 度，钙对神经递质的胞吐作用至关重要，钙参与肌细胞的收缩，钙取代钠 作为心脏的去极化矿物，并参与许多其他生理功能。钙的胃肠道吸收，不 仅取决于膳食钙的可用性，还取决于肠道的吸收能力，肠道的吸收能力受 生理因素诸如钙储备、激素调节或以前膳食钙供给的影响。钙盐(例如碳 酸钙)在胃中的溶解是钙作为钙离子($Ca^{(2+)}$)在近端小肠内的适当的主动和被动吸收的一个步骤。胃酸显著增加难溶性钙盐的溶解和电离。如果不适 当分泌酸，钙盐微溶(离子化)，并随后可不被适当和有效地吸收。萎缩 性胃炎，胃手术，和大剂量、长期使用抗分泌药物显著降低胃酸分泌，并 因此，可处于饮食和补充钙的吸收不良的风险状况中，并由此长期可增加 骨质疏松症的风险(Sipponen等人，Scand J Gastroenterol.2010;45(2):133-8)。

[0005] 钙的胃肠吸收还可在减肥手术后的患者、患有甲状旁腺功能减退症、克罗恩氏病(Crohn’s disease)、囊性纤维化、炎性肠病或乳糜泻(celiac disease)的患者中减少。摄入另外类型的药物，诸如质子泵抑制剂、抗惊 厥药、及长期皮质类固醇的个体，也可发生钙吸收不良。

[0006] 钙的生物利用度取决于其胃肠道吸收和将吸收的钙掺入到骨中。关于 肠道吸收，生理因素，特别是激素，在钙掺入到骨中起主要作用。因此钙 的生物利用度可被定义为由肠道潜在可吸收的并可被用于生理机能，特别 是骨矿化，或以限制骨损失的膳食钙的比例(Gueguen等人，J Am Coll Nutr, 2000卷19号suppl 2 119S-136S)。

[0007] 骨矿物质密度的损失与多种代谢性骨疾病，诸如：骨质减少、骨软化 症、佝偻病、囊性纤维性骨炎、和骨质疏松症相关。有研究表明，膳食钙 的摄入量不足可诱发许多骨相关疾病，诸如骨质疏松症。

[0008] 用于预防和治疗某些类型的骨质损失(包括骨质疏松症)的标准药物 是抗再吸收剂。抗再吸收剂的一个非限制性实例是双膦酸/盐/酯，例如双 膦酸/盐/酯阿仑膦酸/盐/酯(ALN)。ALN的施用减弱骨矿物质密度(BMD) 的下降，因为ALN具有骨再吸收抑制效应。然而，ALN还抑制骨形成且 其的施用与不良症状的风险相关是公认的问题。组合使用几种药物已被建 议用于改善患者的顺应性和治疗效果。

[0009] 如今补充剂中所使用的钙，无论获自天然来源或合成的沉淀物，可包 括有机钙盐和无机钙盐两者。在钙的胃肠道吸收有限的特定条件下，可用 补充剂的标准摄入不足以促

进吸收，导致需要增加摄入的剂量。吸收不良 相关状况中摄入更高钙剂量的需求导致像便秘、肾结石、血管问题和随后 降低的顺应性的不良作用。此外，大多数钙补充剂要求低胃pH以有效地 溶解并通过肠道吸收，并因此其生物利用度在禁食状态中较好。

[0010] 在过去的20年中，出现了对碳酸钙的热力学不稳定的无定形多形体，命名为无定形碳酸钙(ACC)的迅速增加的科学兴趣。在自然界中，ACC 由少数的生物体，主要是发展了用于在瞬时矿物沉积部位中稳定ACC能 力的甲壳类动物和其他无脊椎动物来利用。这些生物体需要用于钙的周期 性松动、吸收和沉淀的特殊有效矿物源。在某些甲壳类动物，诸如淡水螯 虾中，ACC以大量存储于称为胃石的特化的瞬时贮藏器官中。

[0011] 近年来，本发明的一些发明人已公开了，将胃石器官磨碎作为药物和 营养药物钙组合物中有用的细粉的用途(WO 05/115414)。公开了，包含 胃石组分的组合物的每日口服摄入显著改善一系列的状况，诸如骨紊乱、骨折、和癌症(WO 2008/041236)。用于治疗各种紊乱和状况的包含ACC 和磷酸化的肽或氨基酸的药物和营养药物组合物在WO 2009/053967中公 开。

[0012] 对于钙吸收不良、钙吸收不良相关的骨密度损失和骨代谢相关疾病的 有效治疗存在未满足的需要。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明提供了使用包括合成的或天然的稳定ACC的组合物用于治疗 钙吸收不良的方法。本文中第一次公开了，ACC可克服其他类型的钙补充 剂的缺陷，甚至在患有钙吸收不良的患者中的缺陷。

[0015] 此外钙吸收不良的治疗可预防或减少或延缓钙缺乏相关的紊乱、疾病 的发作。根据一些实施方案，与钙缺乏相关的状况包括减肥手术或胃手术 后的患者，患有甲状旁腺功能减退症、维生素D缺乏、肾小管疾病、肾衰 竭、胰腺炎、低蛋白血症和高磷血症的患者。根据另外实施方案，涉及钙 吸收不良的疾病包括克罗恩氏病、囊性纤维化、炎性肠病、乳糜泻、和特 应性胃炎。根据另外的实施方案，钙吸收不良可包括具有增强的骨形成的 受试者和摄入皮质类固醇、质子泵抑制剂、抗惊厥药、利福平和类似的抗 生素、螯合剂、和抗分泌药的个体。

[0016] 与其他钙补充剂相比，稳定的ACC的增强的钙胃肠吸收可延缓或最 小化包括绝经后女性和围绝经期女性、老年男性、儿童、青少年、孕妇和 哺乳期女性的其他人群中起因于钙缺乏的状况和紊乱。

[0017] ACC的增强的钙生物利用度还可延缓或最小化患有钙吸收不良的受 试者中的骨密度损失。本发明提供了包括合成的或天然的稳定ACC的组 合物用于在代谢性骨紊乱、疾病和状况的受试者中增加骨矿物质密度的用 途。本发明的组合物还被用于所述紊乱、疾病或状况，包括骨软化症、骨 佩吉特氏病(Paget's disease of bone)、骨质减少、囊性纤维性骨炎、佝偻 病、骨质疏松症和急性酒精摄入的延缓发生和治疗。

[0018] 在一个方面，本发明提供了在需要治疗钙吸收不良的受试者中治疗钙 吸收不良的方法，包括向所述受试者施用有效量的包含至少一种稳定剂的 稳定的无定形碳酸钙(ACC)。根据一些实施方案，ACC是合成来源的。根据其他实施方案，ACC是天然来源的。

[0019] 根据一些实施方案，稳定剂选自由以下组成的组：有机酸、磷酸羟基 羧酸酯、或硫酸羟基羧酸酯、带有羟基的有机化合物，及其组合。每个可 能性代表了本发明的独立实施

方案。在一些实施方案中，所述稳定剂包含 选自以下的至少一种组分：磷酸羟基羧酸酯或硫酸羟基羧酸酯和带有羟基 的有机化合物。在一些实施方案中，所述稳定剂包含选自以下的至少一种 组分：磷酸化的氨基酸和多元醇。所述氨基酸可以以氨基酸衍生物或寡肽 或多肽存在，且所述多元醇可包括醇或糖类。每个可能性代表了本发明的 独立实施方案。根据一些实施方案，磷酸化的氨基酸选自磷酸丝氨酸和磷 酸苏氨酸。根据一些实施方案，所述稳定剂包括选自单糖类、二糖类、寡 糖类和多糖类的至少一种糖。根据一些实施方案，所述稳定剂包括与至少 一种碱金属氢氧化物进一步组合的带有羟基的有机化合物。根据一些实施 方案，稳定剂是羧酸、优选柠檬酸、酒石酸或苹果酸。在一些实施方案中， 所述稳定剂包括选自以下的至少一种化合物：磷酸化的氨基酸、磷酸化的 肽、连同至少一种肽的甲壳质、和连同碱金属氢氧化物的多元醇。根据一 些示例性实施方案，所述ACC获自分离的甲壳类动物胃石。根据一个实 施方案，所述天然ACC由甲壳质和多肽来稳定。根据另一个实施方案， ACC是合成的，其中所述合成的ACC由选自磷酸丝氨酸和磷酸苏氨酸的 磷酸化的氨基酸来稳定。根据另一个实施方案，所述合成的ACC由磷酸 丝氨酸与柠檬酸组合来稳定。根据还另一个实施方案，所述合成的ACC 由柠檬酸来稳定。根据又另一个实施方案，所述ACC由蔗糖与氢氧化钠 组合来稳定。

[0020] 根据一些实施方案，受试者患有与血浆钙浓度降低至8.8mg/dL以下 相关的钙代谢的紊乱。根据一些实施方案，需要治疗的受试者选自由以下 组成的组：患有甲状旁腺功能减退症、维生素D缺乏、肾小管疾病、肾衰 竭、胰腺炎、低蛋白血症、克罗恩氏病、囊性纤维化、炎性肠病、乳糜泻、 高磷血症、特应性胃炎的患者，肥胖手术或胃手术后的患者，具有增强的 骨形成的受试者，以及获得选自包含以下的组的药物的受试者：皮质类固 醇、质子泵抑制剂、抗惊厥药、利福平和类似抗生素、螯合剂、和抗分泌 药。根据一些实施方案，受试者选自绝经后或围绝经期女性。根据一些实 施方案，所述受试者容易发生骨矿物质密度损失相关的紊乱、疾病和状况。需要钙吸收不良治疗的受试者中与骨密度损失相关的紊乱可以是骨质疏 松症。

[0021] 在另一个实施方案中，本发明提供了包含稳定的无定形碳酸钙(ACC) 的药物组合物，所述稳定的无定形碳酸钙(ACC)包含选自由以下组成的 组的至少一种稳定剂：有机酸、磷酸羟基羧酸酯、或硫酸羟基羧酸酯和带 有羟基的有机化合物，所述药物组合物用于治疗钙吸收不良。根据本发明 的药物组合物还可包含载体、佐剂、稀释剂或赋形剂。

[0022] 在另一个实施方案中，本发明涉及无定形碳酸钙用于治疗钙吸收不良 的用途，所述无定形碳酸钙包含选自由以下组成的组的至少一种稳定剂： 有机酸、磷酸羟基羧酸酯、或硫酸羟基羧酸酯和带有羟基的有机化合物。

[0023] 在另一个实施方案中，本发明涉及无定形碳酸钙在制备用于治疗钙吸 收不良的药剂中的用途，所述无定形碳酸钙包含选自由以下组成的组的至 少一种稳定剂：有机酸、磷酸羟基羧酸酯、或硫酸羟基羧酸酯和带有羟基 的有机化合物。

[0024] 在另一个方面，本发明涉及用于治疗钙吸收不良相关的紊乱、疾病和 状况的包含稳定的无定形碳酸钙(ACC)的组合物，所述稳定的无定形碳 酸钙(ACC)包含至少一种稳定剂。

[0025] 本发明还涵盖包含稳定无定形碳酸钙(ACC)的组合物在制备用于在 钙吸收不良相关紊乱、疾病和状况中治疗(在进食或禁食状态)钙吸收不 良的药剂中的用途，其中将

ACC与至少一种稳定剂精细混合。在一个实 施方案中，当在进食状态施用时，包含稳定ACC的组合物具有优良的胃 肠吸收。在另一个实施方案中，当在禁食状态施用时，包含稳定ACC的 组合物具有优良的胃肠吸收。

[0026] 在另一个方面，本发明提供了用于在骨代谢相关的紊乱、疾病或状况 中增强骨矿物质密度的方法，包括向哺乳类动物受试者施用有效量的包含 包含稳定的无定形碳酸钙(ACC)和至少一种稳定剂的组合物。根据一些 实施方案，ACC是合成来源的。根据其他实施方案，ACC是天然来源的。 根据一些实施方案，稳定剂选自由以下组成的组：有机酸、磷酸羟基羧酸 酯、或硫酸羟基羧酸酯、带有羟基的有机化合物，及其组合。每个可能性 代表了本发明的独立实施方案。在一些实施方案中，所述稳定剂包含选自 以下的至少一种组分：磷酸羟基羧酸酯或硫酸羟基羧酸酯和带有羟基的有 机化合物。在一些实施方案中，所述稳定剂包含选自以下的至少一种组分： 磷酸化的氨基酸和多元醇。所述氨基酸可以以氨基酸衍生物或寡肽或多肽 存在，且所述多元醇可包括醇或糖类。每个可能性代表了本发明的独立实 施方案。根据一些实施方案，磷酸化的氨基酸选自磷酸丝氨酸和磷酸苏氨 酸。根据一些实施方案，所述稳定剂包括选自单糖类、二糖类、寡糖类和 多糖类的至少一种糖。根据一些实施方案，所述稳定剂包括与至少一种碱 金属氢氧化物进一步组合的带有羟基的有机化合物。根据一些实施方案， 稳定剂是羧酸、优选柠檬酸、酒石酸或苹果酸。在一些实施方案中，所述 稳定剂包括选自以下的至少一种化合物：磷酸化的氨基酸、磷酸化的肽、 连同至少一种肽的甲壳质、和连同碱金属氢氧化物的多元醇。根据一些示 例性实施方案，所述ACC获自分离的甲壳类动物胃石。

[0027] 根据一些实施方案，用于增强骨矿物质密度的方法包括施用包含与骨 再吸收抑制剂组合的稳定的ACC的组合物。根据一些实施方案，骨再吸 收抑制剂是双膦酸/盐/酯(bisphosphonate)。根据一些实施方案，双膦酸/ 盐/酯选自阿仑膦酸/盐/酯、利塞膦酸/盐/酯、替鲁膦酸/盐/酯、伊班膦酸/ 盐/酯、唑来膦酸/盐/酯、帕米膦酸/盐/酯、依替膦酸/盐/酯、及其盐和酯。 根据一个实施方案，双膦酸/盐/酯是阿仑膦酸/盐/酯。根据一些实施方案， 与没有钙补充剂或以稳定的ACC补充剂以外的钙补充剂需要的剂量相比， 组合物与较低治疗剂量的双膦酸/盐/酯阿仑膦酸/盐/酯组合施用。根据一些 实施方案，本发明提供了用于在选自以下的骨代谢相关紊乱、疾病或状况 中增强骨矿物质密度的方法：骨质疏松症、骨软化症、骨佩吉特氏病、骨 质减少、囊性纤维性骨炎和佝偻病。在一个特定的实施方案中，本发明提 供了用于在骨质疏松症中增强骨矿物质密度的方法。根据一些实施方案，本发明提供了用于在选自以下的骨代谢相关紊乱、疾病或状况中增强骨矿 物质密度的方法：骨软化症、骨佩吉特氏病、骨质减少、囊性纤维性骨炎、 佝偻病、骨质疏松症和急性酒精摄入，该方法包括与骨再吸收抑制剂组合 施用所述组合物。在一个特定的实施方案中，本发明提供了用于在骨质疏 松症中增强骨矿物质密度的方法，该方法包括与双膦酸/盐/酯阿仑膦酸/盐/ 酯组合施用所述组合物。根据本发明的方法，向选自以下的哺乳动物类受试者施用组合物：绝经后女性、老年男性、儿童、青少年、孕妇和哺乳期 女性。根据一些实施方案，用于增强骨矿物质密度的方法包括施用包含稳 定的ACC的组合物，其中所述受试者选自患有钙吸收不良和钙吸收不良 相关紊乱、疾病和状况的患者。

[0028] 本发明还提供了包含稳定的无定形碳酸钙(ACC)的组合物在制备用 于在骨代谢相关紊乱、疾病或状况中增强骨矿物质密度的药剂中的用途， 所述稳定的无定形碳酸钙

(ACC)包含选自由以下组成的组的至少一种稳 定剂:有机酸、磷酸羟基羧酸酯、或硫酸羟基羧酸酯和带有羟基的有机化 合物。根据本发明的药物组合物还可包含载体、佐剂、稀释剂或赋形剂。

[0029] 在还另一个方面,本发明提供了在患有钙吸收不良的受试者中增强钙 胃肠吸收的方法,包括向所述受试者施用有效量的包含至少一种稳定剂的 ACC。根据一些实施方案,向选自处于禁食状态和处于进食状态的受试者 的所述受试者进行施用。

[0030] 具体地,本申请提供了以下内容:

[0031] 项目1.一种在需要治疗钙吸收不良的受试者中治疗钙吸收不良的方 法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的包含稳定的无定形碳酸钙 (ACC)的组合物,所述稳定的无定形碳酸钙(ACC)包含至少一种稳定 剂。

[0032] 项目2.根据项目1所述的方法,其中所述稳定剂选自由以下组成的 组:有机酸、磷酸羟基羧酸酯、或硫酸羟基羧酸酯和带有羟基的有机化合 物。

[0033] 项目3.根据项目2所述的方法,其中所述稳定剂包含选自以下的至 少一种组分:磷酸羟基羧酸酯和带有羟基的有机化合物。

[0034] 项目4.根据项目2所述的方法,其中所述稳定剂包含选自以下的至 少一种组分:磷酸化的氨基酸和多元醇。

[0035] 项目5.根据项目4所述的方法,其中所述磷酸化的氨基酸以寡肽或 多肽存在。

[0036] 项目6.根据项目5所述的方法,其中磷酸化的氨基酸选自磷酸丝氨 酸和磷酸苏氨酸。

[0037] 项目7.根据项目2所述的方法,其中所述稳定剂是选自单糖类、二 糖类、三糖类、寡糖类和多糖类的带有羟基的有机化合物。

[0038] 项目8.根据项目2所述的方法,其中所述稳定剂包括与至少一种碱 金属氢氧化物进一步组合的带有羟基的有机化合物。

[0039] 项目9.根据项目2所述的方法,其中所述稳定剂是羧酸,优选柠檬 酸、酒石酸或苹果酸。

[0040] 项目10.根据项目2所述的方法,其中所述稳定剂包括选自由以下组 成的组的至少一种化合物:磷酸化的氨基酸、磷酸化的肽、连同至少一种 肽的甲壳质、和连同碱金属氢氧化物的多元醇。

[0041] 项目11.根据项目1所述的方法,其中所述ACC获自分离的甲壳类 动物胃石。

[0042] 项目12.根据项目1所述的方法,其中所述受试者患有与血浆钙浓度 降低至8.8mg/dL以下相关的钙代谢的紊乱。

[0043] 项目13.根据项目1所述的方法,其中所述受试者选自由以下组成的 组:患有甲状旁腺功能减退症、维生素D缺乏、肾小管疾病、肾衰竭、胰 腺炎、低蛋白血症、克罗恩氏病、囊性纤维化、炎性肠病、乳糜泻、高磷 血症、萎缩性胃炎的患者,肥胖手术或胃手术后的患者,具有增强的骨形 成的受试者,以及获得选自包含以下的组的药物的受试者:皮质类固醇、质子泵抑制剂、抗惊厥药、利福平和类似抗生素、螯合剂、和抗分泌药。

[0044] 项目14.根据项目1所述的方法,其中所述受试者容易发生骨矿物质 密度损失相关的紊乱、疾病和状况。

[0045] 项目15.根据项目1所述的方法,其中所述受试者选自绝经后或围绝 经期女性。

[0046] 项目16.一种药物组合物,所述药物组合物包含稳定的无定形碳酸钙 (ACC)和选自由以下组成的组的至少一种稳定剂:有机酸、磷酸羟基羧 酸酯、或硫酸羟基羧酸酯、和带有羟基的有机化合物,所述药物组合物用 于治疗钙吸收不良。

[0047] 项目17.根据项目16所述的药物组合物,还包括载体、佐剂、稀释 剂或赋形剂。

[0048] 项目18.一种用于在骨代谢相关的紊乱、疾病或状况中增强骨矿物质 密度的方法,包括向哺乳类动物受试者施用有效量的包含包含至少一种稳 定剂的稳定的无定形碳酸钙(ACC)的组合物。

[0049] 项目19.根据项目18所述的方法,其中所述稳定剂选自由以下组成 的组:有机酸、磷酸羟基羧酸酯、或硫酸羟基羧酸酯和带有羟基的有机化 合物。

[0050] 项目20.根据项目18所述的方法,其中所述ACC获自分离的甲壳类 动物胃石。

[0051] 项目21.根据项目18所述的方法,其中所述组合物与骨再吸收抑制 剂组合施用。

[0052] 项目22.根据项目21所述的方法,其中所述骨再吸收抑制剂是双膦 酸/盐/酯。

[0053] 项目23.根据项目22所述的方法,其中所述双膦酸/盐/酯选自阿仑膦 酸/盐/酯、利塞膦酸/盐/酯、替鲁膦酸/盐/酯、伊班膦酸/盐/酯、唑来膦酸/ 盐/酯、帕米膦酸/盐/酯、依替膦酸/盐/酯、及其盐和酯。

[0054] 项目24.根据项目23所述的方法,其中所述双膦酸/盐/酯是阿仑膦酸 /盐/酯。

[0055] 项目25.根据项目18和21的任一项所述的方法,其中所述骨代谢相 关的紊乱、疾病和状况选自骨软化症、骨佩吉特氏病、骨质减少、囊性纤 维性骨炎、佝偻病、骨质疏松症和急性酒精摄入。

[0056] 项目26.根据项目25所述的方法,其中所述疾病是骨质疏松症。

[0057] 项目27.根据项目25所述的方法,其中所述所述受试者选自绝经后 女性、老年男性、儿童、青少年、孕妇和哺乳期女性。

[0058] 项目28.根据项目18所述的方法,其中所述受试者选自患有钙吸收 不良的患者。

[0059] 项目29.一种药物组合物,所述药物组合物包含稳定的无定形碳酸钙 (ACC),所述稳定的无定形碳酸钙(ACC)包含选自由以下组成的组的 至少一种稳定剂:有机酸、磷酸羟基羧酸酯、或硫酸羟基羧酸酯和带有羟 基的有机化合物,所述药物组合物用于在骨代谢相关的紊乱、疾病和状况 中增强骨矿物质密度。

[0060] 项目30.根据项目29所述的药物组合物,所述药物组合物用于与骨 再吸收抑制剂组合使用。

[0061] 项目31.一种用于在患有钙吸收不良的受试者中增加钙胃肠吸收的方 法,包括向所述受试者施用有效量的包含稳定的无定形碳酸钙(ACC)的 组合物,所述稳定的无定形碳酸钙(ACC)包含至少一种稳定剂。

[0062] 项目32.根据项目31所述的方法,其中所述受试者选自处于禁食状 态和处于进食状态的受试者。

[0063] 本发明的所有上述和其他特征和优点将通过其实施方案的以下说明 性和非限制性描述,并参考附图来进一步理解。

[0064] 附图简述

[0065] 图1:与结晶碳酸钙比较,向大鼠施用无定形碳酸钙(ACC)后提高 了钙水平

[0066] 结果是平均值±SEM。学生t-检验(Student's t-test):*$p<0.05$

[0067] 图2:在进食的绝经后女性中,与结晶碳酸钙(CCC)比较,无定形 碳酸钙(ACC)施用后的钙吸收比例增加了2.1倍/女性

[0068] 配对t-检验:$p<0.01$

[0069] 图3:在进食的绝经后女性中,当分析两个分离的组时,与结晶碳酸 钙(CCC)比较,无定形碳酸钙(ACC)施用后的钙吸收比例增加了1.9 倍

[0070] 结果是平均值±SEM。学生t-检验:$^{*}p<0.05$

[0071] 图4:在一个禁食的绝经后女性中,与结晶碳酸钙(CCC)比较,无 定形碳酸钙(ACC)施用后的钙吸收比例增加了4.6倍

[0072] 图5A-5E:来自每个处理组的代表性股骨远端和第4椎骨横截面的三 维重建。

[0073] 用于以下的结节状骨区(Tubercular bone region):假处理(Sham)(图 5A);结晶碳酸钙(CCC)(图5B);无定形碳酸钙(ACC)(图5C);CCC+ 阿仑膦酸盐(ALN)(图5D);和ACC+ALN(图5E)。比例尺表示1.5mm 距离。

[0074] 图6A-6D:由μCT得到的各组的小梁骨矿物质密度(Tb.BMD)和来 自总骨组织体积的骨体积(BV/TV)。

[0075] 图6A:股骨远端的Tb.BMD。

[0076] 图6B:第4腰椎的Tb.BMD。

[0077] 图6C:股骨远端的BV/TV。

[0078] 图6D:第4腰椎的BV/TV。

[0079] 百分比表示从CCC处理的组(对照)的增加。

[0080] 图7A-7E:来自每个处理组的代表性股骨远端和第4脊椎横截面的三 维重建。

[0081] 用于以下的结节状骨区:假处理(图7A);对照(图7B);胃石(Gast) (图7C);无定形碳酸钙(ACC)(图7D);和柠檬酸盐(图7E)。比例尺 表示1.5mm距离。

[0082] 图8A-8B:由μCT得到的各组的小梁骨矿物质密度(Tr.BMD)。

[0083] 图8A:股骨远端的Tr.BMD。

[0084] 图8B:第4腰椎的Tr.BMD。

[0085] 单因素ANOVA:$p<0.001$。字母表示Fishers LSD事后比较。

[0086] 图9A-9B:由μCT得到的各处理组的来自总骨组织的小梁骨体积 (BV/TV)。

[0087] 图9A:股骨远端的BV/TV。

[0088] 图9B:第4腰椎的BV/TV。

[0089] 单因素ANOVA:$p<0.001$。字母表示Fishers LSD事后比较。

[0090] 图10A-10G:腰椎的力学微结构性质。

[0091] 极限承载力(图10A);极限承载力的能量(UF)(图10B);韧性(图 10C);屈服能量(Energy to yield)(图10D);骨小梁模式因子(TBPf) (Trabecular Bone Pattern factor)(图10E);结构模型指数(SMI)(图10F); 各向异性度(DA)(图10G)。

[0092] 单因素ANOVA:$p<0.01$。字母表示Fishers LSD事后比较。棒表示 SEM。

[0093] 发明详述

[0094] 本发明公开了包含稳定的无定形碳酸钙(ACC)的组合物的以前未知 的用途。发现,相比于通常市售的钙补充剂,根据本发明的基于无定形碳 酸钙的组合物是优良钙源。现已发现,包含ACC的组合物具有令人惊奇 地高的钙生物利用度,包括在胃肠道和骨中更

高的吸收能力。因此，ACC 的使用有益于钙吸收不良相关的紊乱、疾病和状况(进食和禁食状态两者，甚至在禁食状态下更大的优势)和骨损失相关的紊乱和状况。

[0095] 如本文所用的术语“治疗”，是指施用ACC并增强钙在胃肠道和骨中 的吸收。

[0096] 如本文所用的术语“延缓发生”或“预防”是指延缓骨疾病的发展，延缓症状的发展和/或降低将要或预期发展的此类症状的严重程度。

[0097] 术语“稳定的ACC”在本文中用以指示碳酸钙长时间段被保持在无定 形状态，例如，从数周至数年，经所述时间段不超过5％转化成结晶形式。根据本发明，ACC的结晶通过添加选自以下的一种或更多种稳定剂来抑 制：有机或无机成分，诸如磷酸化的氨基酸，其他有机酸、肽类、盐类、 糖类、或脂类。所述盐可包括，例如，选自镁、钾、锶、和钠的阳离子，和选自碳酸盐、磷酸盐、硫酸盐、氯化物、溴化物、氟化物、柠檬酸盐、 延胡索酸盐、苹果酸盐或其他有机阴离子的阴离子；术语阴离子和阳离子 被用于仅仅描述盐的组成，并不暗示有关所述分子的溶解度或pH的任何 事。

[0098] 如本文所用的术语“稳定剂(stabilizer)”或“稳定剂(stabilizing agent)” 可互换使用，并且是指保持碳酸钙在无定形状态的任何物质。

[0099] 如本文所用的术语“钙吸收不良”是指膳食钙跨胃肠道的吸收异常。如本文所用的术语“骨损失”是指在受试者中骨细胞或组织的任何减少、 骨量的减少、骨矿物质的减少、或骨矿物质密度的减少。

[0100] 如本文所用的术语“有效量”是指包含稳定的ACC的组合物以治疗 钙吸收不良、钙吸收不良和矿物质骨密度相关的疾病、紊乱和状况，并以 适用于任何医学或营养治疗的合理利益/风险比率提高矿物质骨密度的足 够量。

[0101] 在一个实施方案中，本发明提供了包含稳定的ACC和足以维持ACC 在无定形状态的量的稳定剂的合成的(人工的)组合物。稳定剂选自，但 不限于，有机酸、磷酸羟基羧酸酯、或硫酸羟基羧酸酯和带有羟基的有机 化合物。根据一些实施方案，所述稳定剂包含选自以下的至少一种组分：磷酸羟基羧酸酯、或硫酸羟基羧酸酯，诸如磷酸烯醇丙酮酸、磷酸丝氨酸、 磷酸苏氨酸、硫酸丝氨酸(sulfoserine)或硫酸苏氨酸(sulfothreonine)和 选自单糖类、二糖类、三糖类、寡糖类和多糖类，例如蔗糖、甘露糖、葡 萄糖的带有羟基的有机化合物。包含带有羟基的有机化合物的稳定剂可还 包含至少一种碱金属氢氧化物，诸如氢氧化钠、氢氧化钾和类似的氢氧化 物。在本发明的一些实施方案中，所述稳定剂选自磷酸化的氨基酸和多元 醇。磷酸化的氨基酸可以以寡肽和多肽存在。在本发明的其他实施方案中， 稳定剂是有机酸、优选羧酸。羧酸优选地选自柠檬酸、酒石酸或苹果酸。

[0102] 在本发明的一个实施方案中，ACC由磷酸丝氨酸(P-Ser)或磷酸苏 氨酸(P-Thr)来稳定。在另一个实施方案中，稳定的ACC包括蔗糖和氢 氧化钠的组合。在本发明的还另一个实施方案中，ACC由柠檬酸来稳定。 在本发明的又另一个实施方案中，ACC由磷酸丝氨酸和柠檬酸的组合来稳 定。在本发明的优选的实施方案中，将包含包含痕量的一种或更多种稳定 剂的稳定的ACC的人工组合物施用至需要增加或改进钙吸收的人。

[0103] 在另一个实施方案中，本发明提供了包含以分离的螯虾胃石存在的稳 定的ACC的天然组合物。磨碎的胃石包括ACC、主要由甲壳质和多肽组 成的有机物质、和盐。有机物质中存在的组分稳定ACC并阻止其结晶。

[0104] 在一个方面，本发明提出的高钙生物利用度与稳定分子不相关。在另 一个方面，

本发明要求保护,高钙生物利用度仅与碳酸钙的无定形状态相 关。

[0105] 在另一个方面,本发明提供了用于治疗患有钙吸收不良和钙吸收不良 相关的紊乱、疾病和状况的患者中的钙吸收不良的组合物,所述组合物包 含稳定的ACC,所述稳定的ACC包含至少一种稳定剂。在另一个方面, 提供了用于在患有钙吸收不良的受试者中增强钙胃肠吸收的方法,所述方 法包括向所述受试者施用有效量的包含稳定的无定形碳酸钙的组合物,所 述稳定的无定形碳酸钙包含至少一种稳定剂。

[0106] 根据一些实施方案,与钙缺乏相关的状况包括肥胖手术或胃手术后的 患者,患有甲状旁腺功能减退症、维生素D缺乏、肾小管疾病、肾衰竭、 胰腺炎、低蛋白血症、和高磷血症的患者。根据另外的实施方案,涉及钙 吸收不良的疾病包括克罗恩氏病、囊性纤维化、炎性肠病、乳糜泻、和特 应性胃炎。根据另外的实施方案,钙吸收不良可包含具有增强的骨形成的 受试者和摄入皮质类固醇、质子泵抑制剂、抗惊厥药、利福平和类似的抗 生素、螯合剂、和抗分泌药物的个体。

[0107] 降低的钙胃肠吸收还可导致骨矿物质密度损失。在另一个方面,本发 明提供了用于在患有钙吸收不良相关的紊乱、疾病和状况的患者中增加矿 物质骨密度的组合物,所述组合物包含稳定的ACC,所述稳定的ACC包 含至少一种稳定剂。本发明还提供了用于在患有钙吸收不良的受试者中治 疗骨密度损失的组合物,所述组合物包含稳定的ACC,所述稳定的ACC 包含至少一种稳定剂。与其他钙补充剂相比,稳定的ACC的增强的钙胃 肠吸收可在包括绝经后女性和围绝经期女性、老年男性、儿童、青少年、 孕妇和哺乳期女性的人群中延缓或最小化起因于钙缺乏的状况和紊乱。

[0108] 在又另一个方面,本发明提供了用于在骨代谢相关的紊乱、疾病和状 况中增强骨矿物质密度的组合物,所述组合物包含稳定的ACC,所述稳定 的ACC包含至少一种稳定剂。根据本发明的一个实施方案,骨代谢相关 的紊乱、疾病和状况选自:骨软化症、骨佩吉特氏病、骨质减少、囊性纤 维性骨炎、佝偻病、骨质疏松症和急性酒精摄入。根据一些实施方案,所 述组合物可与用于预防和治疗骨损失的其他药剂组合施用。预防和治疗骨 损失的药剂选自骨再吸收抑制剂,包括双膦酸/盐/酯(双膦酸的盐)、雌激 素受体调节剂、雄激素受体调节剂、降钙素制品、α-降钙素基因相关肽制 品、依普黄酮制品、促蛋白合成类固醇制品、抗RANKL(NF-κB配体的 受体活化剂)抗体以及类似物。用于预防或治疗骨矿物质密度损失的双膦 酸/盐/酯的一个非限制性实例是双膦酸/盐/酯阿仑膦酸/盐/酯。包含ACC的 组合物与骨再吸收抑制剂的组合使用提供了对增加骨矿物质密度的累加 效应。不希望受任何特定理论的束缚,由ACC提供的累加效应可归因于 高生物利用度及其诱导骨形成的效应。与ALN与结晶碳酸钙组合施用相 比,由于观察到的累加效应,ACC与骨再吸收抑制剂组合施用允许降低骨 再吸收抑制剂的治疗剂量。在一些实施方案中,本发明提供了用于在骨代谢相关的紊乱中增强骨矿物质密度的方法,包括施用与双膦酸/盐/酯组合 的包含稳定的ACC的组合物,所述稳定的ACC包含至少一种稳定剂。在 本发明的上下文中,术语组合治疗包括以单一剂量形式或单独的剂量形式 施用两种或更多种活性成分。单独的剂量形式可同时地或顺序地或完全独 立地用单独的治疗方案来施用。例如,ACC可每日施用,而双膦酸/盐/酯 可较不频繁地施用。

[0109] 在一些实施方案中,与没有钙补充剂或以稳定的ACC补充剂以外的 钙补充剂需要的剂量相比,所述组合物与较低治疗剂量的双膦酸/盐/酯组 合施用。在一些实施方案中,

双膦酸/盐/酯是阿仑膦酸/盐/酯。在一些实施 方案中，与没有钙补充剂或以稳定的ACC补充剂以外的钙补充剂需要的 剂量相比，所述组合物与较低治疗剂量的阿仑膦酸/盐/酯组合施用。在一 些实施方案中，与ALN组合的所述组合物被用于在骨质疏松症中增强骨 矿物质密度。

[0110] 在又另一个方面，本发明提供了用于治疗骨矿物质密度损失相关的紊 乱的组合物，所述组合物包含稳定的ACC，所述稳定的ACC包含至少一 种稳定剂。根据本发明的一个实施方案，骨矿物质密度损失相关的紊乱、疾病和状况选自骨软化症、骨质减少、囊性纤维性骨炎、佝偻病、骨质疏 松症和急性酒精摄入。

[0111] 在还另一个方面，本发明提供了用于骨矿物质密度损失相关的紊乱的 延缓发生或预防的组合物，所述组合物包含稳定的ACC，所述稳定的ACC 包含至少一种稳定剂。根据本发明的一个实施方案，骨矿物质密度损失相 关的紊乱、疾病和状况选自骨软化症、骨质减少、囊性纤维性骨炎、佝偻 病、骨质疏松症和急性酒精摄入。

[0112] 根据本发明的方法，包含稳定的ACC的组合物用于在易感骨矿物质 密度减少或发生骨代谢相关紊乱的受试者，诸如绝经后女性和老年男性中 的使用是特别有利的。在另一个方面，本发明的组合物向需要摄入高水平 钙的受试者诸如儿童、青少年及在怀孕和哺乳期的女性施用。在又一个方 面，本发明的组合物向患有钙吸收不良的受试者施用。

[0113] 在一个方面，本发明涉及包含稳定的ACC的组合物在制备用于在患 有钙吸收不良相关的紊乱、疾病和状况的患者中治疗钙吸收不良的药剂中 的用途，所述稳定的ACC包含至少一种稳定剂。

[0114] 在还另外的方面，本发明涉及包含稳定的ACC的组合物在制备用于 在骨代谢相关紊乱、疾病或状况中增强骨矿物质密度的药剂中的用途，所 述稳定的ACC包含至少一种稳定剂。在一些实施方案中，所述药剂与骨 再吸收抑制剂组合使用。在又另外的方面，所述组合物用于制备用于治疗 骨矿物质密度损失相关的疾病、紊乱和状况的药剂。在还另外的方面，本 发明涉及包含ACC的组合物在制备用于预防骨矿物质密度损失相关疾病、 紊乱和状况和钙吸收不良相关的状况的药剂中的用途。在还另外的方面， 本发明的组合物被用于在容易发生代谢性骨紊乱、疾病和状况的人群中增 加钙吸收。在一个实施方案中，本发明涉及口服施用包含稳定的ACC的 组合物，所述组合物当在进食状态下施用时，具有优良胃肠生物利用度。 在另一个实施方案中，本发明涉及在禁食状态下口服施用包含稳定ACC 的组合物，以达到更有效的胃肠生物利用度。

[0115] 已提供支持以下概念的证据：作为ACC施用时，不管稳定分子或机 制，无定形碳酸钙单独促进钙的较高生物利用度。在本发明的一个重要的 实施方案中，当在进食状态下施用时，合成的ACC具有优良的胃肠生物 利用度。在本发明的另一个重要的实施方案中，当在禁食状态下施用时， 合成的ACC具有优良的胃生物利用度。在本发明的还其他重要的实施方 案中，当在进食状态下施用时，来自天然来源的ACC具有优良的胃生物 利用度。在本发明的另外重要的实施方案中，当在禁食状态下施用时，来 自天然来源的ACC具有优良的胃生物利用度。根据一些实施方案，无论 受试者是否处于禁食状态或进食状态下，向需要此治疗的受试者进行施用 包含至少一种稳定剂的稳定ACC。

[0116] 本发明的组合物可以优选地以各种口服形式口服施用，所述口服形式 包括，但不限于，片剂、胶囊、丸剂、粉剂、颗粒剂、酏剂、酊剂、混悬 剂、糖浆剂、乳剂和凝胶形式。

[0117] 在口服施用是以片剂或胶囊的形式的情况下,组合物组分可与无毒的 药学上可接受的惰性载体或赋形剂诸如乳糖、淀粉、蔗糖、葡萄糖、改性 的糖、改性淀粉、甲基纤维素及其衍生物、甘露糖醇、山梨糖醇、和其他 还原性和非还原性糖、硬脂酸镁、硬脂酸、硬脂酰富马酸钠、山嵛酸甘油 酯、无定形硅胶或其他干燥剂材料以及类似物组合。

[0118] 本发明的组合物可以以从0.5g至约5g的每日剂量施用。根据另外的 实施方案,本发明的组合物可以以从1.5g至约20g的每日剂量施用。本 发明的组合物可以以包含从0.15g至约1.5g的范围的元素钙的每日剂量 施用。根据另外的实施方案,本发明的组合物可以通常以包含从0.5g至 约6g的范围的元素钙的每日剂量施用。

[0119] 对于以液体形式口服施用,组合物组分可以与无毒的药学上可接受的 惰性载体诸如乙醇、甘油、水以及类似物组合。当希望或需要时,还可将 适合的粘合剂、润滑剂、崩解剂和着色剂和调味剂掺入至混合物中。

[0120] 根据本发明的组合物的特殊益处是其被证实对于口服施用的低毒性 和高安全性。因此,在本发明的其他方面,本发明的组合物有利地用作医 疗食品。

[0121] 本发明人进行了旨在评估包含稳定的ACC的钙源的生物利用度的实 验。来自ACC的钙的生物利用度,以钙胃肠吸收和对骨矿化过程的钙可 用性(骨吸收性)两种方式来评估。评估了一般健康人群和患有或易患钙 吸收不良的人群中的钙胃肠吸收。降低的钙胃肠吸收是骨密度损失的原因 之一。因此,还评估了患有钙吸收不良的人群中的钙骨吸收性。使用稳定 的ACC可有益于在患有或易患钙吸收不良的受试者中提高钙胃肠吸收和 增加骨矿物质密度。还评估了在易患骨损失相关的紊乱和状况的人群,例 如绝经后的女性中的钙胃肠吸收。

[0122] 发现对骨矿化过程的增强的钙可用性增加骨矿物质密度并积极影响 其他骨参数。如下文例证,评估了包含不同稳定剂的稳定的ACC对各种 骨参数的效应。还评估了骨质疏松大鼠模型中ACC对骨矿物质密度和其 他骨参数的效应。基于无定形碳酸钙的组合物还与骨抗再吸收的药剂,诸 如阿仑膦酸/盐/酯双膦酸/盐/酯组合,并评价了它们对骨比例(bone fraction) 参数的相互效应。

[0123] 生物利用度测量包括基于用于评估各种药物和补充剂的广泛报道的 生物利用度模型,通过血清和尿取样评估胃肠道中来自稳定的ACC源的 钙吸收,并基于用于评估各种药物和补充剂的广泛报道的骨质疏松预防和 治疗模型,评估来自稳定的ACC源的钙对骨矿物质密度和其他骨参数的 效应。在患有钙吸收不良的患者,例如患有甲状旁腺功能减退症的患者和 摄入皮质类固醇的个体以及患有骨矿物质密度相关紊乱的人群中评估了 稳定的ACC的生物利用度。来自ACC源的钙的增强的生物利用度允许单 独或与用于治疗骨损失的标准药剂组合使用ACC用于治疗和预防各种钙 吸收不良和代谢性骨相关的疾病、病患和状况。现已一般性地描述了本发 明,通过参考通过说明来提供并非意在限制本发明的以下实施例将更容易 地理解本发明。

实施例

[0124] 试验1:来自ACC源的钙的胃肠吸收。

[0125] 本实验的目的是在大鼠放射性同位素标记模型中评价包含稳定的无 定形碳酸钙(ACC)的钙源的胃肠吸收。

[0126] 使二十六只2月龄雄性Wistar大鼠，体重240±15g，口服施用包含 本质上以^{45}Ca标记的ACC(无定形碳酸钙)或CCC(结晶碳酸钙)的单 一明胶胶囊，随后测量血清中的钙吸收比例以及钙排泄。

[0127] 图1呈现血清钙浓度的变化，如通过对施用的剂量标准化放射性读数 来计算的。接受ACC的大鼠中的C_{max}值比CCC组中的那些C_{max}值显著更 高(高达40％)(图1和表1)。

[0128] 表1:口服施用放射性碳酸钙制剂后血清中钙的药代动力学参数

[0129]

化合物	C_{max}(μg/mL)	T_{max}(h)	AUC_{∞}(μg×h/mL)
CCC	5.8 ± 0.07^{a}	3.0 ± 0.3^{a}	109.7 ± 6.4^{a}
ACC	8.1 ± 0.8^{b}	2.8 ± 0.2^{a}	134.5 ± 7.0^{b}

[0130] 不同上标字母代表统计学显著($p<0.05$)，如通过ANOVA确定的

[0131] 药代动力学分析表明，ACC的胃肠道吸收比CCC的胃肠道吸收显著 更高(曲线下面积，AUC值分别高22.5％、和20％，$P<0.05$)，而达到最 大浓度所需的时间(T_{max})在组之间没有显著差异(表1)。

[0132] 在图1中呈现的保留值表明，接受包含CCC的胶囊的大鼠保留所接 受的剂量的48.5±1.3％。另一方面，接受ACC胶囊的大鼠分别保留所接 受的剂量的61.4±2.0％和60.6±2.1％。与CCC处理的组的保留相比，这 相应于保留显著增加了26.6％($p<0.05$)。

[0133] 实验细节

[0134] 动物

[0135] 所有的动物都根据the Israel Animal Welfare Act在the Ben-Gurion University Animal Care and Use program的监督下来处理。五十一只二月龄 雄性Wistar大鼠(Harlan-Teklad,Jerusalem,Israel)，体重240±15g，随机 安置在控制环境的房间中的不锈钢笼内(23℃温度，12:12h光:暗周期)。将大鼠随意喂食营养物质足够的实验室大鼠饲料颗粒(Koffolk, Petah-Tikva,Israel)，并自由饮水48h。在实验开始前四天，将正常饮食换 成了包含0.24±0.05％钙的低钙饮食(0.675±0.05％磷酸盐)，具体地通过将分别含有0.01％钙(0.3％磷酸盐;Harlan-Teklad)和1％钙(0.8％磷酸盐; Koffolk)的两种类型食物混合来制备。将两种类型食物分别在研磨机中磨 碎，以产生2种粉末，将其分别以4:1的比例干混合直到细均质化。将均 质化的粉末挤压，以形成新的食物颗粒。

[0136] 胶囊施用前十七小时，将大鼠称重，并取血液样品(基线)。然后将 大鼠放入单独的代谢笼中，并剥夺食物和水，直到胶囊施用后3小时。给 药后三和24小时，将～10g低钙食物颗粒(0.01％钙;Harlan-Teklad)分别 给予各大鼠。胶囊施用后3小时，蒸馏水被允许开始自由采食。

[0137] 向动物施用明胶胶囊

[0138] 用以丙二醇(Biolab)1:4(v:v)稀释的异氟烷(Minrad)轻度镇静每 只大鼠30秒。使用不锈钢大鼠施用注射器(Harvard Apparatus)向各实验 大鼠用灌胃法施用包含特定的碳酸钙制剂(即CCC、ACC或ACC-C;对 于每组n＝17)的单一胶囊。

[0139] 动物血液取样和化学分析

[0140] 胶囊施用(时间0)前17h和施用后2、3、6、10、24和34h，从每 只大鼠的尾静脉取120-150μl血液样品。使用台式离心机(Hettich Zentrifugen,Bach,Switzerland)以3000g

将血液样品立即离心10分钟。将 上清液血清的重复样品(30μl)转移到包含闪烁液(Zinsser Analytic, Berkshire,UK)的塑料瓶中,并使用液体闪烁计数器(Tri-Carb 2100TR, PerkinElmer,Boston,MA)测量放射性。根据每只大鼠接受的测量的放射性 和具体的放射剂量将来自给定剂量的血浆放射性标准化[(血清cpm×100)/ (总cpm×样品体积)]。

[0141] 动物粪便和尿液取样和分析)

[0142] 在顺应阶段的17h饥饿阶段期间(基线)和实验的整个34h期间收 集粪便和尿液以评估钙。将尿液的样品(500μL)转移至装有闪烁液的塑 料小瓶中。将粪便在70℃的烘箱中干燥过夜。将样品在研钵中粉碎,直至 细均质化。将粪便样品(200mg)放入到5ml的1N NaOH溶液(Gadot, Netanya,Israel)中,80℃下温育3小时,并以3600g离心10分钟。将上 清液的两份重复样品(30μL)转移到包含闪烁液的塑料瓶中。使用液体闪 烁计数器测量尿液和粪便样品的放射性。保留值通过减去来自给定剂量的 粪便和尿液中测量的放射性来计算[(摄入量-粪便和尿液排泄物)/(摄入量 ×100%)]。

[0143] 动物样品的药代动力学计算

[0144] 使用WinNonlin 5.2软件(Pharsight,Mountain View,CA)进行了单个 大鼠的钙浓度对时间数据的非房室模型分析(non-compartmental analysis)。

[0145] 统计分析

[0146] 使用Statistica 6.1软件(StaSoft,Tulsa,OK)对保留值、药代动力学结 果和溶解性结果进行单因素方差分析(ANOVA)分析。

[0147] 使用Prism 5软件进行配对t-检验和学生t检验。

[0148] p值<0.05被认为是显著。

[0149] 上述试验的结果证实,在动物模型中,稳定的ACC比CCC具有较高 的胃肠吸收。

[0150] 试验2:甲状旁腺功能减退症中的胃肠钙吸收

[0151] 进行了旨在评估包含稳定的无定形碳酸钙(ACC)的钙源在治疗钙吸 收不良中的胃肠生物利用度的实验。进行随机化、两阶段、适应性然后交 叉开放标签的研究(a randomized,two phase,adaptive then crossover open-label,study),在原发性甲状旁腺功能减退症的管理中将无定形碳酸钙(ACC)补充剂与市售的结晶钙补充剂(CCS)比较。

[0152] 试验的第一阶段的主要目的是以下概念的证明,与结晶钙补充剂 (CCS)相比,用较小剂量的来自ACC的元素钙的治疗可维持目标血清钙 (对白蛋白修正)值(7.0-10.0mg/dL)。在第一阶段的第二个目的是评估 足够的ACC剂量。进一步的次要目的是确定食物对ACC吸收的效应。

[0153] 试验的第二阶段的主要目的是检验以下假设:与CCS相比,用较小剂 量的来自ACC的元素钙的治疗可维持目标血清钙(对白蛋白修正)值 (7.0-10.0mg/dL)。在第一阶段的第二个目的是检验以下假设:与CCS相 比,用较小剂量的来自ACC的元素钙的治疗不引起患有甲状旁腺功能减 退症的受试者中高钙尿症的增加。进一步的次要目的是检验以下假设:与CCS相比,用较小剂量的来自ACC的元素钙的治疗降低与高钙摄入相关 的副作用。

[0154] 选择研究人群

[0155] 研究人群包括二十(20)名患有原发性甲状旁腺功能减退症的受试者, 每个阶段10名受试者。

[0156] 实验产品

[0157] 本研究中使用的稳定的无定形碳酸钙是由Amorphical Ltd.提供的被低 浓度磷酸丝氨酸和柠檬酸盐(在最终产品中小于0.5%)稳定的合成的ACC。磷酸化的丝氨酸和有机柠檬酸是无毒的、自然界中丰富的,并甚至作为独 立的膳食补充剂摄入,口服时无报道的不良作用。

[0158] 表2总结了根据碳酸钙的美国药典参数评估的ACC化学分析,使用 电感耦合等离子体原子发射光谱(ICP-AE)、紫外线(UV)光谱,烧失量 (LOI)和火焰光度计。除非另有规定,测量值的精确度为±10%。

[0159] 表2:Amorphical ACC的化学分析。

[0160]

分析	USP要求	ACC分析结果
烧失量(LOI)	N/A	14.8%
乙醇残留量	N/A	0.034%
酸不溶性	小于0.2%	小于0.0002%
钙	N/A	32.5%
氯化物	N/A	1.36%
钠	N/A	1.85%

[0161]

磷	N/A	0.143%
硫	N/A	<0.1%
铁	小于1,000 ppm	9.5 ppm
碱金属*	小于10,000 ppm	475 ppm
钡**	通过燃烧测试	20 ppm
汞	小于0.5 ppm	小于1 ppm***
氟化物	小于0.005%	0.001%
铅	小于3 ppm	小于5 ppm***
重金属	小于0.002%	痕量(小于0.002%)
砷(总)	小于3 ppm	小于3 ppm
结晶碳酸钙	小于5%	小于1%

[0162] *不包括钠。

[0163] **根据USP不能进行(在电感耦合等离子体(ICP)中进行)。

[0164] ***在ICP测量中的干扰阻止更低浓度的分析。

[0165] 对照产品-标准护理

[0166] 患有甲状旁腺功能减退症的患者的治疗包括通过施用钙和维生素D纠 正低血钙(Cusano等人,2012;Fong&Kahn,2012)。口服补充剂以元素钙 (1-2g,每日3次)和用于直接治疗术后甲状旁腺功能减退症的骨化三醇 (0.25-1μg,每日2或3次)开始。处于严重和/或长期低钙血症的风险中 的患者,以2g,每日3次的剂量的元素钙和以0.5μg每日3次剂量的骨 化三醇来开始。存在几种类型的钙补充剂。其可以或不以处方获得。所有 这些钙补充剂都减轻神经和肌肉性能,并促进正常的心脏功能(Straub, 2007):

[0167] -碳酸钙(Tums extra strength,Cal-plus,钙尔奇,Os-Cal 500)-在所 有可用的钙补充剂的制剂中,碳酸钙是具有40%元素钙的最浓缩的钙补充 剂之一。存在许多市售的制剂。元素钙的每日总剂量需要被滴定,以尽量 减少维生素D的每日剂量,并保持患者无症

状。离子化的钙在酸性环境中 吸收最好;400mg元素钙等于1g碳酸钙。

[0168] -柠檬酸钙(Citracal,Cal-Cytrate 250)-210mg的元素钙等于1g柠 檬酸钙。

[0169] -葡萄糖酸钙(Kalcinate)-对于IV使用可获得。经5-10分钟慢慢 地输注;10mL葡萄糖酸钙包含约90mg元素钙;1000mg葡萄糖酸钙等 于90mg元素钙。

[0170] 在本研究中,对照组中的患者继续摄入其常规钙补充剂,并因此以标 准的护理来治疗。

[0171] 剂量和施用

[0172] 阶段1

[0173] 合格的受试者接受ACC片。本研究试验产品的每一剂量由50mg或 200mg的来自每片中的ACC的元素钙组成。

[0174] 阶段II

[0175] 合格的受试者以交叉研究设计接受ACC片。对照组用标准护理来治 疗(通过获取其定期钙补充剂)。本研究试验产品的每一剂量由50mg或 200mg的来自每片中的ACC的元素钙组成。

[0176] 表3:研究处理的剂量

[0177]

组	处理
试验产品	药片,每个包含50 mg或200 mg的来自ACC的元素钙,用于口服使用。
对照产品	标准护理。

[0178] ACC的作用机制和效应还有待揭示。因此,剂量和有利吸收条件(进 食/禁食)的选择基于本研究的第一阶段的结果。尽管最终剂量必须专门为 每个患者确定,预期,确定将允许两个公式之间容易转换的ACC和CCS 之间的转换系数将是有可能的。

[0179] 在对照组中的钙剂量根据每个和每一位患者的已知病史和用药常规 来确定。

[0180] 片剂施用在整个治疗期间由受试者每日进行3次。IP施用被记录在到 临床研究中心(CRC)的每次就诊的病例报告表(CRF),IP施用记录中。具有未使用的药片的资料袋在就诊天返回CRC单位,计数并记录在CRF 中。

[0181] 分配受试者以治疗

[0182] 将受试者根据随机列表随机分配到治疗组之一。使用模块随机进行随 机化。

[0183] 盲法

[0184] 这是一个开放标签的研究。受试者、研究者和参与受试者的评估、监 测、分析和数据管理的任何人员对受试者制剂分配并非未知。发起人负责 准备、分发和标记试验产品IP。

[0185] 研究设计

[0186] 研究由两个阶段组成:

[0187] 阶段I

[0188] 登记了以前诊断并长期治疗原发性甲状旁腺功能减退症的十(10)个 受试者。每天CCS摄入量逐渐被减少量的来自ACC的元素钙代替。五(5) 个受试者在用餐前摄入ACC,且其他五(5)个受试者在用餐后摄入ACC。在整个阶段密切监测治疗的安全性和效力。

[0189] ACC的吸收使用对白蛋白(CA)值测试校正的每周血清钙来评估。在阶段I的筛选和结束时测试尿液中钙的排泄量。

[0190] 阶段II-登记了以前诊断并长期治疗原发性甲状旁腺功能减退症的十 (10)个新受试者。

[0191] 将受试者随机分配至以下治疗之一持续6周：

[0192] 1.标准护理-研究之前常规使用的同样的元素钙制剂和剂量。

[0193] 2.ACC-来自ACC的元素钙的既定剂量(基于本研究的第一阶段发 现的转换系数和进食/禁食条件)。

[0194] 与常规每日剂量的维生素D(1-αD3)一起施用两种制剂。

[0195] 在治疗结束时,各组接受替代制剂持续另一个6周。

[0196] ACC的优良吸收使用每周的血液测试,以计算血清钙值进行评估。在 每个治疗的筛选和结束时测试尿液中钙的排泄量。

[0197] 以下是研究程序的详细描述：

[0198] 将合格的受试者治疗如下：

[0199] 阶段I

[0200] I-第-21(+/-17)天筛选:诊断为原发性甲状旁腺功能减退症(参见4.1 节的定义),并在本研究开始之前用钙和维生素D补充剂治疗至少1年， 且没有重大的肾脏或肝脏疾病的受试者,被邀请至CRC。在诊所中,受试 者都接受会见,将其病史和其目前药剂都记录并且他们签署了知情同意书 (ICF)。受试者涉及进行抽血化验血清钙、P、肌酐和白蛋白水平。进行 白蛋白校正钙(Ca)的计算。受试者被指示要进行24小时尿液收集用于 Ca、P和肌酐。受试者被要求填写食品和药剂日记连续3天,以评估其日 常饮食中钙的摄入量。育龄女性进行尿妊娠试验。符合所有纳入标准,并 无任何排除标准的合格的受试者入选本研究。

[0201] 受试者通过电话或现场告知其是否有资格进入本研究。

[0202] I-第0天:合格的受试者到达CRC,在那里询问其自从上次就诊以后 其医疗状况的任何变化。进行血液测试,以确定血清钙、P和白蛋白基线 值。进行在基线的CA计算。

[0203] 受试者接受一包ACC片,每片包含50mg或200mg元素钙(根据钙 补充剂的每日总量,14天的供应量+5备用片)。用ACC代替CCS根据以 下公式来计算：

[0204] NTDC＝ITDC-[0.1×ITDC(mg CCS)]+[0.05×ITDC(mg ACC)]

[0205] *ITDC-最初每日总钙摄入量(mg)

[0206] **NTDC-新的每日总钙摄入量(mg)

[0207] 最初的每日总摄入元素钙的10％(以mg)被5％的来自ACC的元素 钙代替(以mg,从最初的每日总摄入量计算)。每天摄入的维生素D保持 不变。

[0208] 由医师专门为每个受试者进行每天片剂的数量的计算(根据钙补充剂 的每日剂量)。

[0209] 受试者根据其单独计算的NTDC被指示每天服用ACC片的量：

[0210] 1.五个受试者被指示早餐后、午餐后和晚餐后服用片剂。

[0211] 2.五个受试者被指示早餐前、午餐前和晚餐前服用片剂。

[0212] 受试者被指示在试验过程中继续其常规药剂摄入。

[0213] I-第3(±1)天:受试者到达CRC并测试其血清钙、P和白蛋白水平。进行CA的计算以排除低血钙(Ca<7.0mg/dL)。如果CA值在所期望的目 标范围(7.0-10.0mg/dL)中,受试者继续服用在I-第0天指示的钙剂量。如果CA值低于7.0mg/dl或在10.0mg/dl以上,根据医师的决定,做出钙 摄入量的改变。

[0214] I-第7(±1)天:受试者到达CRC,并测试其血清钙、P和白蛋白水 平。进行CA的计算:

[0215] a.转换系数0.5:

[0216] 如果CA=基线,则20%(以mg,从初始的每日总摄入量计算)的元 素钙,被10%(以mg,从初始的每日总摄入量计算)的来自ACC的元素 钙代替。

[0217] NTDC=ITDC-[0.2×ITDC(mg CCS)]+[0.1×ITDC(mg ACC)]

[0218] b.转换系数0.75:

[0219] 如果CA<基线,则10%(以mg,从初始的每日总摄入量计算)的元 素钙,被7.5%(以mg,从初始的每日总摄入量计算)的来自ACC的元素 钙代替。

[0220] NTDC=ITDC-[0.1×ITDC(mg CCS)]+[0.075×ITDC(mg ACC)]

[0221] CA<7.00mg/dl强制结束治疗。

[0222] c.转换系数0.25:

[0223] 如果CA>基线,则10%(以mg,从初始的每日总摄入量计算)的元 素钙,被2.5%(以mg,从初始的每日总摄入量计算)的来自ACC的元素 钙代替。

[0224] NTDC=ITDC-[0.1×ITDC(mg CCS)]+[0.025×ITDC(mg ACC)]

[0225] 询问受试者自从最后一次就诊后,可能发生的任何副作用或AE和并 行用药的改变。询问受试者与血清钙水平的变化相关的症状和病征(手足 抽搐、面部抽搐、感觉异常、肌肉酸痛、心律失常、抑郁)。受试者接受 有关ACC新剂量的指示并被提醒根据其单独计算的NTDC)一天在早晨、在中午和晚上,餐前或餐后(基于其初始分配)服用的片剂的量。提醒受 试者在试验过程中继续其常规药物的摄入。

[0226] I-第10(±1)天:受试者到达CRC,并测试其血清钙、P和白蛋白水 平。进行CA的计算以排除低血钙(Ca<7.0mg/dL)。如果CA水平在期望 的目标范围(7.0-10.0mg/dL)内,则受试者继续服用在I-第7天指示的钙 剂量。如果CA水平低于7.0mg/dL或高于10.0mg/dL,则根据医师的决定 做出钙摄入量的改变。

[0227] I-第14(±1)天:受试者到达CRC,并测试其血清钙、P和白蛋白水 平。进行CA的计算以排除低血钙(Ca<7.0mg/dL)。如果转换公式(a-c, I-第7天)都不导致血清钙值在期望的目标范围(7.0-10.0mg/dL)内,该 研究被终止。

[0228] 询问受试者自从最后一次就诊后,可能发生的任何副作用或AE和并 行用药的改变。询问受试者与血清钙水平的变化相关的症状和病征(手足 抽搐、面部抽搐、感觉异常、肌肉酸痛、心律失常、抑郁)。

[0229] CCS的初始日常补充的50%基于I-第7天发现的转换系数(公式a-c) 被ACC代替:

[0230] a.转换系数0.5:50%(以mg,从初始的每日总摄入量计算)的元素 钙,被25%(以mg,从初始的每日总摄入量计算)的来自ACC的元素钙 代替。

[0231] NTDC=ITDC-[0.5×ITDC(mg CCS)]+[0.25×ITDC(mg ACC)]

[0232] b.转换系数0.75:50%(以mg,从初始的每日总摄入计算量)的元 素钙,被37.5%

(以mg,从初始的每日总摄入计算量)的来自ACC的元 素钙代替。

[0233] NTDC＝ITDC-[0.5×ITDC(mg CCS)]+[0.375×ITDC(mg ACC)]

[0234] c.转换系数0.25:50％(以mg,从初始的每日总摄入计算量)的元 素钙,被12.5％(以mg,从初始的每日总摄入计算量)的来自ACC的元 素钙代替。

[0235] NTDC＝ITDC-[0.5×ITDC(mg CCS)]+[0.125×ITDC(mg ACC)]

[0236] 受试者接受一包ACC片,每片包含50mg或200mg元素钙(根据其 单独计算的NTDC,14天的供应量+5备用片)。受试者接受有关ACC新 剂量的指示并被提醒根据其单独计算的NTDC一天在早晨、在中午和晚上, 餐前或餐后(基于其初始分配)服用的片剂的量。提醒受试者在试验过程 中继续其常规药物的摄入。

[0237] I-第21(±1)天:受试者到达CRC,并测试其血清钙、P和白蛋白水 平。进行CA的计算以排除低血钙(Ca<7.0mg/dL)。询问受试者自从最后 一次就诊后,可能发生的任何副作用或AE和并行用药的改变。询问受试 者与血清钙水平的变化相关的症状和病征(手足抽搐、面部抽搐、感觉异 常、肌肉酸痛、心律失常、抑郁)。如果CA水平低于7.0mg/dL或高于10.0 mg/dL,将受试者排除在本研究之外(基于医师的决定)。如果CA水平在 期望的目标范围(7.0-10.0mg/dL)内,基于I-第7天发现的转换系数(公 式a-c),进行ACC对CCS的日常补充的完全代替:

[0238] a.转换系数0.5:100％(以mg)的元素钙初始每日总摄入量被50％ 的来自ACC的元素钙代替(以mg,从初始的每日总摄入量计算)。

[0239] NTDC＝ITDC-[ITDC(mg CCS)]+[0.5×ITDC(mg ACC)]

[0240] b.转换系数0.75:100％(以mg)的元素钙初始每日总摄入量被75％ 的来自ACC的元素钙代替(以mg,从初始的每日总摄入量计算)。

[0241] NTDC＝ITDC-[ITDC(mg CCS)]+[0.75×ITDC(mg ACC)]

[0242] c.转换系数0.25:100％(以mg)的元素钙初始每日总摄入量被25％ 的来自ACC的元素钙代替(以mg,从初始的每日总摄入量计算)。

[0243] NTDC＝ITDC-[ITDC(mg CCS)]+[0.25×ITDC(mg ACC)]

[0244] 受试者接受有关ACC新剂量的指示并被提醒根据其单独计算的 NTDC在早晨、在中午和晚上,餐前或餐后(基于其初始分配)一天服用 的片剂的量。提醒受试者在试验过程中继续其常规药物的摄入。

[0245] 受试者接受容器以在其下次预定的就诊之前进行24小时尿液收集。

[0246] I-第27(±1)天通过电话:提醒受试者进行24小时尿液收集。

[0247] I-第28(±1)天-结束阶段I:受试者到达CRC,并测试其血清钙、P 和白蛋白水平。进行CA的计算。受试者提供24小时的尿液收集的容器用 于Ca、P和肌酐以测试钙尿。询问受试者自从最后一次就诊后,可能发生 的任何副作用或AE和并行用药的改变。询问受试者与血清钙水平的变化 相关的症状和病征(手足抽搐、面部抽搐、感觉异常、肌肉酸痛、心律失常、抑郁)。

[0248] 在决定是否开始阶段II计划的研究的交叉部分之前,检查阶段I的结 果。总结阶段I的数据,通过接受的ACC代替CCS的量显示对每个受试 者、每个组和整体上的CA水平之间。

[0249] 阶段II

[0250] 登记了以前诊断并长期治疗原发性甲状旁腺功能减退症的十(10)个 新受试者。

[0251] 将受试者随机分配至以下治疗之一持续6周：

[0252] 1.标准护理(CCS)-研究之前常规使用的同样的元素钙剂量。

[0253] 2.ACC-来自ACC的元素钙的既定剂量(基于本研究的阶段I中发现 的转换系数和进食/禁食条件)。

[0254] 与常规每日剂量的维生素D(1-αD3)一起施用两种制剂。

[0255] 在治疗结束时，各组接受替代的制剂持续另一个6周。

[0256] ACC的优良吸收使用每周的血液测试，以计算血清CA值进行评估。在每个治疗的筛选和结束时测试尿液中钙的排泄量。

[0257] I-第-21(+/-17)天筛选：诊断为原发性甲状旁腺功能减退症，并在本 研究开始之前用钙和维生素D补充剂治疗至少1年，且没有重大的肾脏或 肝脏疾病的受试者，被邀请至CRC。在诊所中，受试者都接受会见，将其 病史和其目前药剂都记录并且他们签署了知情同意书(ICF)。受试者涉及 进行抽血化验血清钙、P、肌酐和白蛋白水平。进行CA的计算。受试者被 指示要进行24小时尿液收集用于Ca、P和肌酐水平。要求受试者填写食 品和药剂日记连续3天，以评估其日常饮食中钙的摄入量。育龄女性进行 尿妊娠试验。符合所有纳入标准，并无任何排除标准的合格的受试者入选 本研究。

[0258] 受试者通过电话或现场告知其是否有资格进入本研究。

[0259] II-第0天：合格的受试者到达CRC，在那里询问其自从上次就诊以后 其医疗状况的任何变化。进行血液测试，以定义血清钙、P和白蛋白基线 值。进行在基线的CA计算。

[0260] 将受试者随机分配至以下治疗之一：

[0261] 1.标准护理(CCS)-研究之前常规使用的同样的元素钙剂量。

[0262] 2.ACC-来自ACC的元素钙的既定剂量(基于本研究的阶段I发现的 转换系数和进食/禁食条件)。

[0263] 被分配到ACC治疗组的受试者，接受具有ACC片剂的容器，每片包 含200mg元素钙(35天供应量+5备用片)。分配给CCS治疗组的受试者 继续服用其常规钙补充剂。

[0264] 钙补充剂的确切剂量对各受试者根据已知的病史来确定。

[0265] 指示受试者在试验过程中继续其常规药物的摄入。

[0266] II-第3(±1)天：受试者到达CRC，并测试其血清钙、P和白蛋白水 平。进行CA的计算以排除低血钙(Ca<7.0mg/dL)。如果CA值在期望的 目标范围(7.0-10.0mg/dL)内，则受试者继续服用在II-第0天指示的钙 剂量。如果CA水平低于7.0mg/dL或高于10.0mg/dL，则根据医师的决定 做出钙摄入量的改变。

[0267] II-第7(±1)天：受试者到达CRC，并测试其血清钙、P和白蛋白水 平。进行CA的计算。询问受试者自从最后一次就诊后，可能发生的任何 副作用或AE和并行用药的改变。询问受试者与血清钙水平的变化相关的 症状和病征(手足抽搐、面部抽搐、感觉异常、肌肉酸痛、心律失常、抑 郁)。如果必要进行ACC或CCS的摄入量调整。

[0268] 提醒受试者根据其分配指示服用钙补充剂。

[0269] 提醒受试者在试验过程中继续其常规药物的摄入。

[0270] II-第10(±1)天：受试者到达CRC，并测试其血清钙、P和白蛋白水 平。进行CA的计算以排除低血钙(Ca<7.0mg/dL)。如果CA值在期望的 目标范围(7.0-10.0mg/dL)内，则受试

者继续服用在II-第7天指示的钙 剂量。如果CA水平低于7.0mg/dL或高于10.0mg/dL，则根据医师的决定 做出钙摄入量的改变。

[0271] II-第14(±1)天：受试者到达CRC，并测试其血清钙、P和白蛋白水 平。进行CA的计算。询问受试者自从最后一次就诊后，可能发生的任何 副作用或AE和并行用药的改变。询问受试者与血清钙水平的变化相关的 症状和病征(手足抽搐、面部抽搐、感觉异常、肌肉酸痛、心律失常、抑 郁)。

[0272] 提醒受试者根据其分配指示服用钙补充剂。

[0273] 提醒受试者在试验过程中继续其常规药物的摄入。

[0274] II-第21(±1)天：受试者到达CRC，并测试其血清钙、P和白蛋白水 平。进行CA的计算。询问受试者自从最后一次就诊后，可能发生的任何 副作用或AE和并行用药的改变。询问受试者与血清钙水平的变化相关的 症状和病征(手足抽搐、面部抽搐、感觉异常、肌肉酸痛、心律失常、抑 郁)。

[0275] 提醒受试者根据其分配指示服用钙补充剂。

[0276] 提醒受试者在试验过程中继续其常规药物的摄入。

[0277] 受试者接受容器以在其下次预定的就诊之前进行24小时尿液收集。

[0278] II-第34(±1)天通过电话：提醒受试者进行24小时尿液收集。

[0279] II-第35(±1)天：受试者到达CRC，并测试其血清钙、P和白蛋白水 平。进行CA的计算。受试者提供24小时的尿液收集的容器用于Ca、P 和肌酐以测试钙尿。询问受试者自从最后一次就诊后，可能发生的任何副 作用或AE和并行用药的改变。询问受试者与血清钙水平的变化相关的症 状和病征(手足抽搐、面部抽搐、感觉异常、肌肉酸痛、心律失常、抑郁)。

[0280] 以前被分配到CCS治疗组的受试者，接受一包ACC片剂，每片包含 200mg元素钙(35天供应量+5备用片)。指示以前分配到ACC治疗组的 受试者恢复其正常的CCS补充。

[0281] 用于各受试者的钙补充剂的确切剂量由已知的病史来确定。

[0282] 提醒受试者在试验过程中继续其常规药物的摄入。

[0283] II-第38(±1)天：受试者到达CRC，并测试其血清钙、P和白蛋白水 平。进行CA的计算以排除低血钙(Ca<7.0mg/dL)。如果CA水平在期望 的目标范围(7.0-10.0mg/dL)内，则受试者继续服用在II-第35天指示的 钙剂量。如果CA水平低于7.0mg/dL或高于10.0mg/dL，则根据医师的决 定做出钙摄入量的改变。

[0284] II-第42(±1)天：受试者到达CRC，并测试其血清钙、P和白蛋白水 平。进行CA的计算。询问受试者自从最后一次就诊后，可能发生的任何 副作用或AE和并行用药的改变。询问受试者与血清钙水平的变化相关的 症状和病征(手足抽搐、面部抽搐、感觉异常、肌肉酸痛、心律失常、抑 郁)。如果必要进行ACC或CCS的摄入量调整。

[0285] 提醒受试者根据其分配指示服用钙补充剂。

[0286] 提醒受试者在试验过程中继续其常规药物的摄入。

[0287] II-第45(±1)天：受试者到达CRC，并测试其血清钙、P和白蛋白水 平。进行CA的计算以排除低血钙(Ca<7.0mg/dL)。如果CA值在期望的 目标范围(7.0-10.0mg/dL)内，则受试者继续服用在II-第42天指示的钙 剂量。如果CA水平低于7.0mg/dL或高于10.0mg/dL，则根据医师的决定 做出钙摄入量的改变。

[0288] II-第49(±1)天：受试者到达CRC，并测试其血清钙、P和白蛋白水 平。进行CA的计

算。询问受试者自从最后一次就诊后，可能发生的任何 副作用或AE和并行用药的改变。询问受试者与血清钙水平的变化相关的 症状和病征(手足抽搐、面部抽搐、感觉异常、肌肉酸痛、心律失常、抑 郁)。

[0289] 提醒受试者根据其分配指示服用钙补充剂。

[0290] 提醒受试者在试验过程中继续其常规药物的摄入。

[0291] II-第56(±1)天：受试者到达CRC，并测试其血清钙、P和白蛋白水 平。进行CA的计算。询问受试者自从最后一次就诊后，可能发生的任何 副作用或AE和并行用药的改变。询问受试者与血清钙水平的变化相关的 症状和病征(手足抽搐、面部抽搐、感觉异常、肌肉酸痛、心律失常、抑 郁)。

[0292] 提醒受试者根据其分配指示服用钙补充剂。

[0293] 提醒受试者在试验过程中继续其常规药物的摄入。

[0294] 受试者接受容器以在其下次预定的就诊之前进行24小时尿液收集。

[0295] II-第69(±1)天通过电话：提醒受试者进行24小时尿液收集。

[0296] II-第70(±1)天-结束阶段II：受试者到达CRC，并测试其血清钙、P 和白蛋白水平。进行CA的计算。受试者提供24小时的尿液收集的容器用 于Ca、P和肌酐以测试钙尿。询问受试者自从最后一次就诊后，可能发生 的任何副作用或AE和并行用药的改变。询问受试者与血清钙水平的变化 相关的症状和病征(手足抽搐、面部抽搐、感觉异常、肌肉酸痛、心律失 常、抑郁)。

[0297] 非预期就诊可在本研究期间的任何时间以受试者的要求或由研究者 认为必要时来进行。记录非预期就诊的日期及原因。所有的评估是任选的，由研究者酌情进行。

[0298] 如果受试者提前停止参与研究(在第7.4节规定的原因)，则发生早期 停止就诊，并类似于终止就诊(阶段I的第28日，阶段II的第70日)。

[0299] 本研究程序总结于表4和5。

[0300] 阶段I

[0301] 表4：阶段I程序计划表。

[0302]

	天									
评估/ 评价	(-21) (±21)	*(-2) (±2)	0 (±1)	3 (±1)	7 (±1)	10 (±1)	14 (±1)	21 (±1)	27 (±1)	28 (±1)
CRC 电话		X							X	

[0303]

CRC 就诊	X		X	X	X	X	X	X		X
血清 CA 测试	X		X	X	X	X	X	X		X
血清白蛋白测试	X		X	X	X	X	X	X		X
血清 P 测试	X		X	X	X	X	X	X		X
24 h 尿液收集: Ca 测试	X									X
24 h 尿液收集: 肌酐测试	X									X
24 h 尿液收集: P 测试	X									X
妊娠测试**	X									
食品和药物日记	X									
与异常血清 Ca 水平相关的症状和病征: 调查表					X		X	X		X
IP 供应			X				X			
不良作用					继续					

[0304] *告知患者其有资格参加本研究

[0305] **用于育龄女性

[0306] 阶段II

[0307] 表5:阶段II程序计划表。

[0308]

	天															
评估/评价	-21 ±21	*-2 ±2	0 ±1	3 ±1	7 ±1	10 ±1	14 ±1	21 ±1	34 ±1	35 ±1	38 ±1	42 ±1	45 ±1	49 ±1	56 ±1	69 ±1	70 ±1
CRC 电话		X							X							X	
CRC 就诊	X		X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X		X
血清 CA 测试	X		X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X		X
血清白蛋白测试	X		X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X		X
血清 P 测试	X		X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X		X
24 h 尿液收集: Ca 测试	X									X							X
24 h 尿液收集: 肌酐测试	X									X							X
24 h 尿液收集: P 测试	X									X							X
妊娠测试**	X																
食品和药物日记	X																
与异常血清 Ca 水平相关的症状和病征: 调查表					X		X	X		X		X		X	X		X
IP 供应			X							X							
不良作用						继续											

[0309] *告知患者其有资格参加本研究

[0310] **用于育龄女性

[0311] 研究前(筛选)程序

[0312] 筛选时对每个受试者进行以下筛选评估：

[0313] -签署知情同意表

[0314] -受试者病史

[0315] -受试者目前用药

[0316] -受试者面谈

[0317] -妊娠测试(育龄女性)

[0318] -食品和药物日记,持续3天

[0319] -符合纳入/排除标准

[0320] 给药前程序

[0321] 对每个受试者进行以下评估：

[0322] -受试者血液测试用于计算血清CA值、P和白蛋白

[0323] -24小时尿液收集用于钙、P和肌酐

[0324] 研究测试

[0325] 血液测试

[0326] 从第0天开始为每个CRC就诊的各受试者进行血液测试:阶段I:第 0、3、7、10、14、21、28天。

[0327] 阶段II:第0、3、7、10、14、21、35、38、42、45、49、56、70天。

[0328] 24小时尿液收集测试

[0329] 在以下进行24小时尿液收集测试：

[0330] 阶段I:研究结束(第28天)

[0331] 阶段II:第35天和研究结束(第70天)

[0332] 与低血钙相关的症状和病征

[0333] 在以下CRC就诊期间,询问问题列表,目的是鉴定与低血钙相关的 症状和病征：

[0334] 阶段I:第7、14、21、28天

[0335] 阶段II:第7、14、21、35、42、49、56、70天

[0336] 研究措施

[0337] 血液测试-白蛋白校正的钙(ca)的计算、磷和白蛋白血清水平

[0338] 钙和白蛋白

[0339] 低血钙的初始评估通常基于对白蛋白浓度校正的血清总钙的测量。正 常CA值范围从8.5mg/dL至10.2mg/dL。患有甲状旁腺功能减退症的受试 者中,期望的目标CA值为7.0-10.0mg/dL。

[0340] 血清总钙和白蛋白之间的关系由以下规则确定:对于每1-g/dL下降的 血清白蛋白浓度,血清总钙浓度下降了0.8mg/dL。该规则假设正常白蛋白 等于4.0mg/dL且正常钙为10.0mg/dL。

[0341] 计算:钙(校正的,mmol/L)＝钙(测量的,mmol/L)+{(40-白蛋 白(g/L))x 0.02}

[0342] 磷(P)：

[0343] 血清磷测试测量血液中的磷酸盐的量。正常值范围从2.4-4.1mg/dL。

[0344] 24小时尿液收集测试

[0345] 对于24小时尿液收集，必须收集经24小时时间段的所有的尿液。尿 液样品必须包括开始收集24小时后的最后尿液。

[0346] 钙：

[0347] 测试结果可反映饮食摄入：

[0348] 表6:尿液中的钙

[0349]

饮食中钙的低量:	50-150毫克(mg)/24-小时样品	1.25-3.75毫摩尔(mmol)/天
饮食中钙的平均量:	100-250mg/24-小时样品	2.5-7.5mmol/天
饮食中钙的高量:	250-300mg/24-小时样品	6.2-7.5mmol/天

[0350] 尿液钙水平>300mg/24小时或>体重的4mg/kg/24小时被认为是高 钙尿症。

[0351] 肌酐：

[0352] 肌酐清除率测试对经24小时收集的尿液样品进行。其被用于确定肾 小球滤过率，这有助于测量肾功能如何。

[0353] 表7:尿液中的肌酐

[0354]

肌酐清除率:	男性(小于 40 岁): 107-139 毫升/分钟 (mL/min)或 1.8-2.3 毫升/秒(mL/sec)
	女性(小于 40 岁): 87-107 mL/min 或 1.5-1.8 mL/sec 肌酐清除率值通常随着年龄的增长而下降 (对于 20 岁后每 10 年，正常值下降 6.5 mL/min)。

[0355] *正常成人尿液钙/肌酐比值为<220mg/g。

[0356] 磷：

[0357] 磷酸根尿液测试测量经24小时收集的尿液的样品中的磷酸根的量(24 小时尿液测试)。磷酸根是包含矿物磷的带电的离子。

[0358] 表8:尿液中的磷酸盐

[0359]

成人:	0.4-1.3克(g)/24-小时尿液样品	13-42毫摩尔(mmol)/天
钙-和磷酸盐-限制膳食:	小于1.0g/24-小时尿液样品	小于32mmol/天

[0360] 测量尿液中的磷酸盐的测试的结果本身很少有用。其应通常与其他测 试的结果一起进行解释。通常同时测量钙和磷酸盐水平。

[0361] 评估与低血钙相关的症状和病征

[0362] 要求受试者回答问题:是否存在与低血钙相关的症状和病征(手足抽 搐、面部抽搐、感觉异常、肌肉疼痛、心律不齐、和抑郁)。

[0363] 将受试者的回答记录在CRF中。

[0364] 治疗的安全性

[0365] 钙、P和白蛋白血清水平

[0366] 正常CA值范围从8.5mg/dL至10.2mg/dL。患有甲状旁腺功能减退症 的受试者中，期望的目标CA值为7.0-10.0mg/dL。低血钙的初始评估通常 根据以下公式，基于对白蛋白浓度校正的血清总钙的测量:钙(校正的， mmol/L)＝钙(测量的，mmol/L)+{(40-白蛋白(g/

L))x 0.02}

[0367] 血清磷测试测量血液中的磷酸盐的量。正常值范围从2.4-4.1mg/dL。

[0368] 尿液钙、P和肌酸酐测试

[0369] 尿液钙水平>300mg/24小时或>体重的4mg/kg/24小时被认为是高 钙尿症。

[0370] 正常尿液肌酐水平在男性(小于40岁)中为107-139毫升/分钟(mL/min) 或1.8-2.3毫升/秒(mL/sec),且在女性(小于40岁)中为87-107mL/min或 1.5-1.8mL/sec。肌酐清除率值通常随着年龄的增长而下降(对于20岁后每 10年,正常值下降6.5mL/min)。

[0371] 尿液钙测量与肌酸酐相关地表示。

[0372] 尿液钙(mg/dL):尿液肌酐(mg/dL)比例的正常参考区间为<0.14。

[0373] 正常磷水平是0.4-1.3克(g)/24小时尿液样品。

[0374] 并发症

[0375] 记录与低血钙相关的症状和病征(手足抽搐、面部抽搐、感觉异常、 肌肉酸痛、心律失常、抑郁)。

[0376] 统计分析

[0377] 这是两阶段前瞻性研究,其中在患有甲状旁腺功能减退症的受试者中 评价ACC作为CCS的代替物。效力通过代替较大剂量的CCS的较小剂量 的ACC能够提供患有甲状旁腺功能减退症的受试者需要的补充钙的程度 来评价。安全性由不良事件(AE),包括与尿钙排泄相关的那些AE来评 价。统计计划和分析由TechnoSTAT Ltd.进行。

[0378] 设计注意事项

[0379] 这是两阶段研究,其中第一阶段评价患有甲状旁腺功能减退症的受试 者中从CCS至ACC的预定的转换系数。在此阶段取决于受试者响应、以 及因此此阶段的适应性特性,逐渐增大比例的CCS被ACC所代替。

[0380] 如果试验的第一阶段证明了转换系数的安全性,则开始第二阶段。第 二阶段包括以新招募的受试者的交叉试验;新招募的受试者即没有参加试 验的第一阶段的受试者。这些受试者的每个是以CCS对照或ACC治疗1:1 比例模块随机化的。在交叉的第二组中各受试者接受他或她在第一组没有 接受的替代的制剂。

[0381] 每个受试者参与阶段I的研究持续时间为从筛选(第-21天)直至结束 (第28天)的49天,且每个受试者参与阶段II的研究持续时间为从筛选 (第-21日)直至结束(第70天)的91天。

[0382] 对于阶段I和阶段II,去CRC就诊分别发生在第0(基线)、3、7、 10、14、21和28天(结束阶段I),和在第0(基线)、3、7、10、14、21、 35、38、42、45、49和70天(结束阶段II)。

[0383] 血液和尿液测试和临床调查在受试者去诊所就诊时进行。

[0384] 分析设置

[0385] 安全性人群

[0386] 安全性人群由在两个研究阶段中作为试验程序的部分施用ACC或 CCC的所有患者组成。

[0387] 效力人群

[0388] 效力人群由没有可能影响结果的重大违规条目的阶段II受试者组成，对于其存在关于血清CA水平的基线和至少一些治疗后的数据。可能影响 结果的违规条目的程度由

对结果未知的评审人(即盲审)来确定。

[0389] 缺失值处理:仅观察到的数据被使用;丢失数据不估算。

[0390] 终点

[0391] 安全性

[0392] 产品相关的不良事件的总发生率。

[0393] 收集和记录所有不良事件和严重不良事件。

[0394] 主要效力

[0395] -阶段I中:实现血清CA和尿液钙水平正常化的来自ACC的元素钙 剂量的变化

[0396] -阶段II中:血清CA和尿液钙水平

[0397] 次要效力

[0398] 次要效力终点包括:

[0399] -与钙水平相关的副作用

[0400] -与低钙血症相关的症状

[0401] -血清磷水平

[0402] 数据分析

[0403] 概述

[0404] 对安全性人群进行安全性和受试者处置(subject disposition)分析。对 效力人群进行效力分析。分析并单独呈现阶段I和II结果。

[0405] 数据总结于表中,列出均值、标准差中位数、最小值、最大值和对于 连续数据的受试者的编号,或在适当时在表中列出用于分类数据的计数和 百分比。表以研究组、随着时间的推移和整体展示。在阶段I中,研究组 由餐前或餐后摄入ACC组成。在阶段II中,研究组由CCS或ACC组成。

[0406] 进行所有的统计分析并使用SAS®系统创建数据附录。评估不顺应性、放弃、和可能的协变量,诸如年龄和性别的效应,以确定对来自本研究的 结果的普遍适用性的影响。

[0407] 受试者处置

[0408] 将受试者处置制成表;将登记、暴露(exposed)、过早结束和完成受 试者的数目进行总结。

[0409] 准备放弃的名单,包括中止的原因、和中止的时间。

[0410] 安全性

[0411] 安全性分析性质是描述性和叙事性的,SAE和AE使用MedDRA编码 并以身体系统、优先项、研究组、严重性和与程序的相关性制成表。如适 当,指示“正常”值和“异常”值之间的变化的描述性统计和转变分析表 被提供用于实验室测试。

[0412] 主要效力分析:阶段I

[0413] 以数字和图表总结阶段I数据,对每个受试者、每个组和接受的ACC 代替CCS的量的钙水平之间的整体的关系。对于组和整体的每个个体, ACC和血清CA水平随着时间的推移,通过转移表以数字和图表描述。

[0414] 主要效力分析:阶段II

[0415] 随着时间的推移的血清CA水平对每个组以及随着时间的推移对于平 行配对时间

点(D0、D35;D3、D38;D7、D42;D10、D45;D14、D49; D21、D56)的组之间的差异以数字和图表总结。取决于差的分布,在平行 时间点各组之间的CA水平差异通过配对t-检验或Wicoxon Sign-rank检验 进行比较。

[0416] 二次分析

[0417] 与变化相关的副作用是血清钙水平,以及与低血钙相关的症状在阶段 I和阶段II两者中以组来描述。血清磷水平随着时间的推移在阶段I和阶 段II中由组以及阶段II中平行时间点下的组之间的差异来描述。对于两个 阶段,转移表以组来提供。

[0418] 中期分析

[0419] 在两个研究阶段的任何一个中不存在形式上计划的中期分析。然而, 持续监测包括血清CA和磷水平的安全性数据。在决定是否开始阶段II计 划的研究的交叉部分之前,检查阶段I的结果。

[0420] 数据管理

[0421] 将调查数据记录在纸质CRF上。仅对登记的受试者填写CRF(不是 筛选失败)。通过他/她在CRF上的签名,研究者证明,对每例患者收集的 数据是准确、完整和清晰的。

[0422] 在本临床调查中产生的所有数据根据TechnoSTAT标准程序进行管理。数据及其他研究文件在完成调查后存档最少6年。

[0423] 安全性

[0424] 不良事件的定义

[0425] 不良事件是与IP的使用时间上相关的任何不良医学迹象(包括异常的 实验室发现)、症状或疾病,无论认为是否与IP相关。新状况或已有状况 的恶化被认为是AE。被认为是临床上显著的所有异常发现必须被记录为 不良事件。

[0426] 由首席研究者认为显著的急性医疗状况(其从研究开始时的48小时 内被评估)(诸如发麻、嘴周围麻木、痉挛、焦虑、肌肉收缩、癫痫发作、 喘鸣、精神异常、恶心、呕吐、食欲不振、便秘、胃痛、口渴、口干和增 加排尿)的病例,被记录在病例报告表(CRF)内且将受试者排除在本实 验之外。

[0427] 在所有情况下,应尽可能识别AE的病因并且通过记录在CRF内通知 发起人。

[0428] 不良事件与IP的关系定义如下:

[0429] 表9:不良事件与IP的关系

[0430]

最有可能相关的:	遵循来自研究IP施用的合理时间顺序,并不能由患者的临床数据的已知特征合理地解释
可能相关的:	遵循来自研究IP施用的合理时间顺序, 但可由患者的临床状态产生
可能不相关的:	时间相关使得研究IP不可能与观察到的事件有任何合理的相关。
不相关的:	未观察到研究IP的关系。

[0431] 严重不良事件(SAE)是以下的任何不良事件:

[0432] -导致死亡。

[0433] -导致危及生命的疾病或伤害。

[0434] -导致身体结构或身体机能的永久性损伤

[0435] -需要住院治疗或延长现有住院治疗。

[0436] -导致内科或外科干预,以防止对身体结构或身体机能的永久性损害

[0437] -导致胎儿窘迫、胎儿死亡、先天畸形或出生缺陷。

[0438] 不良事件强度的定义

[0439] 以下定义应由调查医师使用以描述不良事件的强度。

[0440] 以下是应被用于描述不良事件强度的唯一定义。仅一个严重性定义应 被用于每个不良事件(例如,“轻度-中度”是不可接受的)。

[0441] 表10:不良事件的强度

[0442]

强度	定义
轻度	容易耐受的不良经验
中度	足够令人不安以干扰日常活动的不良经验。
重度	阻止正常的日常活动的不良经验。

[0443] 异常实验室值

[0444] 如果满足以下任一条件,临床实验室异常被记录:

[0445] -实验室异常在重复测试中存在

[0446] 异常的度需要主动管理(例如剂量变化、中断治疗、更频繁的随访评 估等)。

[0447] 正常实验室值是:

[0448] -血清钙(白蛋白校正的):7.0mg/dL至10.0mg/dL

[0449] -血清磷:2.4mg/dL至4.1mg/dL

[0450] -尿液钙:>300mg/24小时

[0451] -尿液肌酐:40mg/dL至300mg/dL

[0452] -尿液磷酸盐:0.4-1.3克(g)

[0453] 记录和处理不在正常参考范围内的异常的实验室结果。

[0454] 记录不良事件

[0455] 对于每个不良事件,所有以下详细内容应记录在受试者的CRF:

[0456] -不良事件的完整描述。

[0457] -发病的日期和时间。

[0458] -解决的日期和时间。

[0459] -由调查医师根据在第16.2节的定义评估的事件的严重性。

[0460] -与研究IP的关系由调查医师进行评估。

[0461] -采取的行动(如有)。

[0462] -任何进一步随访的结果和详细内容。

[0463] 预期的副作用(不良事件)

[0464] 以下是ACC试验产品可能的不良事件的列表。列表是基于来自使用 天然ACC的先前经验和与摄入钙的晶形相关的效应:

[0465] -嗳气

[0466] -排气

[0467] -便秘

[0468] -恶心

[0469] -呕吐

[0470] -食欲不振

[0471] -增加的排尿

[0472] -肾损害

[0473] -混乱

[0474] -不规则的心脏节律。

[0475] 试验3:在摄入皮质类固醇的个体中的骨钙吸收

[0476] 进行了旨在评价包含稳定的无定形碳酸钙(ACC)的钙源在患有钙吸 收不良相关的疾病、紊乱和状况的受试者中用于骨矿化的生物利用度的实 验。进行了多中心前瞻性、随机化、平行、双盲、主动控制的研究(a multicenter prospective,randomized,parallel,double-blind,active controlled study),将无定形碳酸钙(ACC)与结晶碳酸钙(CCC)对用皮质类固醇 长期治疗的患者的骨矿物质密度的效应进行比较。

[0477] 试验的主要目的是,与CCC相比,评估用来自ACC的钙治疗对暴露 于皮质类固醇长期治疗的患者中的骨矿物质密度的保持的效力。次要目的 是,与CCC相比,评价ACC对研究期间骨折的盛行的效应。进一步的次 要目标是,与CCC相比,评价ACC对骨代谢生物标志物的效应。试验的 又进一步的目的是评价ACC在该人群中的安全性谱。

[0478] 选择研究人群

[0479] 研究人群包括采取连续长期皮质类固醇治疗的六十(60)名受试者, 每个治疗组三十(30)名受试者。

[0480] 实验产品的描述

[0481] 本研究中使用的稳定的无定形碳酸钙是通过由Amorphical Ltd.提供的 低浓度磷酸丝氨酸和柠檬酸盐(在最终产品中小于0.5%)稳定化的、合成 的ACC,如上文所公开。

[0482] 对照产品的描述

[0483] 对照产品在每个胶囊中包含500mg的结晶碳酸钙(200±5mg元素钙) 和167mg的蔗糖。在对照产品中的元素钙水平等于治疗组中的元素钙水 平,以与结晶碳酸钙相比,评价无定形碳酸钙的效应。

[0484] 剂量和施用

[0485] 合格的受试者随机接受两种治疗方法之一。本研究补充剂的各剂量由 在每个胶囊中667mg的ACC或500mg的CCC组成。

[0486] 表11:研究治疗的剂量

[0487]

组	治疗
试验产品	包含 667 mg ACC 的用于口服使用的片(200 mg 元素钙)
对照产品	包含 500 mg CCC 和 167 mg 的蔗糖的用于口服使用的片 (200 mg 元素钙) 。

[0488] 剂量的选择是基于对于年龄19-50的受试者,元素钙的推荐的每日摄 入量(1000mg/天)。对照中的钙剂量等于ACC产品中的元素钙水平。

[0489] 分配受试者以治疗

[0490] 将受试者根据随机列表随机分配到治疗组之一。在中心内使用模块随 机化进行

两个研究组的每个的随机化。

[0491] 盲法

[0492] 在临床试验中施用的口服钙治疗是盲法的。受试者、研究者和参与受 试者的评估、监测、分析和数据管理的任何人员对受试者制剂分配是盲法 的，发起人除外，发起人负责准备、分发和标记试验产品。盲法的标签由 不盲法的发起人在给药前固定到小瓶。

[0493] 随机化程序

[0494] 本研究是双盲法并因此CRC工作人员和受试者对整个研究的代码分 配保持盲法。在施用前，对每个受试者分配了单独的数字，并根据预定的 计算机生成的随机化列表来处理。计算机生成的算法被用于将受试者分配 到治疗组。治疗组合物由发起人制备并在运输之前将标签固定到小瓶。指 示医院药剂师根据群组分配列表将产品分配至CRC。

[0495] 研究设计

[0496] 将当前正在开始长期(≥6个月)糖皮质类固醇治疗的六十(60)名患 者随机分配到2组中的一个(n＝30)。治疗组中的患者接受无定形碳酸钙 (ACC)且主动控制组中的那些接受结晶碳酸钙(CCC)。当需要时，基 于医师的决定，将两种制剂都补充维生素D。整个试验中评价安全性参数。

[0497] 常规地评价由于各种医疗状况向CRC住院的患者。由于其医疗状况 正在开始用糖皮质类固醇长期治疗的受试者被视为试验的候选人并被邀 请至CRC用于筛选。

[0498] 筛选(第-7天)-受试者签署知情同意书(ICF)。进行化学和血液学测 试：测量了钠、钾、血红蛋白、沉降速率、白细胞钙(总的、白蛋白校正 的)、磷酸盐、碱性磷酸酶、肌酐、和白蛋白。此外，测试了血清PTH、25-羟基维生素D、和促甲状腺激素(TSH)。测量了钙和肌酐的尿排泄。一般健康状况由病史和体格检查来检查。符合所有纳入标准和无任何排除标准的合格的受试者入选本研究。

[0499] 受试者通过电话或现场告知其是否有资格进入本研究。

[0500] 第1次就诊(第0天)-合格的受试者被邀请到CRC。进行在基线的 DEXA扫描。测量腰椎(L2-4)、股骨颈和全身的BMD。记录现有骨折的 迹象。测量了白蛋白、钙(Ca)、磷和肌酐(Cr)的血清水平、以及尿中 的Ca和Cr。测量了骨代谢的生化标志物(血清骨钙素(OCN)、P1NP(总 原胶原1型N-端前肽)、骨型碱性磷酸酶(BAP)和I型胶原交联N-端肽 (NTX)的尿水平)。受试者随机接受片剂包，每个胶囊包含以制剂之一 (ACC或CCC)的200mg元素钙(用于42天供应量的210片+20备用片， 共230片)。指示受试者每天服用5粒胶囊，持续前6周(0-42天)，餐后， 早上2片和晚上3片。为了尽量减少钙相关的副作用的风险，经常服用钙 的受试者，被指示在整个试验中停止其钙补充剂的摄入。建议受试者基于 医师的决定服用维生素D3补充剂。要求受试者保持每天写日记来记录其 糖皮质类固醇的使用。

[0501] 第2次就诊(第42±3天)-询问受试者可能发生的任何副作用或AE。询问受试者自从其最后一次就诊CRC后发生的任何骨折事件。受试者与 CRC的代表完成TSQM问卷。受试者接受另外的片剂包，每个片剂包含 与在先前就诊中已接受的相同制剂(ACC或CCC)的200mg元素钙(总 210片，42天供应量+20备用片)。提醒受试者每天服用5片，持续下一个 6周(第42-84天)，餐后，早上2片和晚上3片。为了尽量减少钙相关的 副作用的风险，经常服用钙的受试者，被提醒在整个试验中停止其钙补充 剂的摄入。建议受试者基于医师的决定服用维生素D3补充剂。要求受试 者保持每天写日记来记录其糖皮质类固醇的使用。

[0502] 第3次就诊-(第84±3天)-进行DEXA扫描。测量腰椎(L2-4)、股 骨颈和全身的BMD。测量了白蛋白、钙(Ca)、磷和肌酐(Cr)的给药前 血清水平、以及尿中的Ca和Cr。还测量了骨代谢的生化标志物。询问受 试者可能发生的任何副作用或AE。询问受试者自从其最后一次就诊CRC 后发生的任何骨折事件。受试者接受另外的片剂包,每个片剂包含与在第 0天接受的相同制剂的200mg元素钙(总210片,42天供应量+20备用片)。 指示受试者每天服用5片,持续下一个6周(第84-126天),餐后,早上 2片和晚上3片。为了尽量减少钙相关的副作用的风险,经常服用钙的受 试者,被提醒在整个试验中停止其钙补充剂的摄入。建议受试者基于医师 的决定服用维生素D3补充剂。要求受试者保持每天写日记来记录其糖皮 质类固醇的使用。

[0503] 第4次就诊-(第126±3天)-询问受试者可能发生的任何副作用或AE。 询问受试者自从其最后一次就诊CRC后发生的任何骨折事件。受试者接 受另外的片剂包,每个片剂包含与在先前就诊中接受的相同制剂(ACC或 CCC)的200mg元素钙(总210片,42天供应量+20备用片)。提醒受试 者每天服用5片,持续下一个6周(第126-168天),餐后,早上2片和晚 上3片。为了尽量减少钙相关的副作用的风险,经常服用钙的受试者,被 提醒在整个试验中停止其钙补充剂的摄入。建议受试者基于医师的决定服 用维生素D3补充剂。要求受试者保持每天写日记来记录其糖皮质类固醇 的使用并在下次就诊时将其带来。

[0504] 第5次就诊-(第168±1天)-进行DEXA扫描。测量腰椎(L2-4)、股 骨颈和全身的BMD。测量了白蛋白、钙(Ca)、磷和肌酐(Cr)的给药前 血清水平、以及尿中的Ca和Cr。还测量了骨代谢的生化标志物。询问受 试者自从其最后一次就诊CRC后发生的任何骨折事件。受试者与CRC的 代表完成TSQM问卷。询问受试者可能发生的任何副作用或AE。

[0505] 结果量度

[0506] -骨矿物质密度(BMD)的保持-BMD由双能X-射线吸光测定法 (DEXA)扫描定义。DEXA结果呈现为Z值(将特定扫描的结果,与相 同的年龄、体重、种族和性别下的其他人的结果比较)。小于-1.5的Z值增 加老化以外的因素造成骨质损失的担心。

[0507] -骨折患病率-每次就诊时记录骨折事件。

[0508] -增加骨形成标志物

[0509] -减少骨再吸收标志物

[0510] -评估钙副作用:

[0511] 安全性分析

[0512] 安全性分析性质是描述性和叙事性的。不论是否与研究治疗相关,安 全性终点是不良事件(AE)和严重不良事件(SAE)。还包括了血清钙水 平和尿钙和肌酐水平。

[0513] 效力分析

[0514] 主要效力终点是BMD的保持,通过由DEXA扫描计算的Z值。如果 原始值分布大致正常,通过对原始值的独立组t检验测试假设。如果数据 基本上偏离正常,使用对数变换以标准化数据。如果应用后者后,数据仍 然偏离正常,使用非参数的Wilcoxon秩和检验。如果Z值在治疗中相对 于对照是显著较小的,则试验被认为是成功的。

[0515] 以下是本研究的次要效力终点:

[0516] -减少骨折的频率

[0517] -TSQM(用于药物的治疗满意度问卷)域:14项心理测验学上稳健和 验证的问卷,

由四个量表组成:有效性量表、副作用量表、方便和全局满 意度量表。

[0518] 试验4:易发生骨质疏松症的人群中的钙胃肠道吸收。

[0519] 本研究的目的是评价易发生骨质损失相关的紊乱的人群中对来自 ACC源的钙的胃肠吸收。试验是对绝经后女性进行的使用双稳定钙同位素 技术的临床研究。

[0520] 具有从更年期不超过5年的十个绝经后女性(表12中的人口数据), 被纳入研究。所有受试者展示18-29的BMI,表面上是健康的,并未患有 任何严重内科疾病或代谢性骨紊乱。排除标准包括,基于食物日记摄入, 通过结合饮食(来自补充剂和食品)具有估计的每日钙的摄入量>1100mg、 血清中由值<20ng/ml展示的维生素D缺乏、高钙血症、肾结石、炎性肠 病、吸收不良、慢性腹泻、过去一个月内使用抗生素的女性,和患有消化 道、肝、肾、或炎症疾病的女性。在过去的6个月内服用口服类固醇、抗 惊厥药、双膦酸/盐/酯类、雌激素化合物、降钙素、或特立帕肽的女性, 也被排除在研究之外。在由the Ethical Committee of Sourasky Medical Center,Tel-Aviv,Israel批准方案后,书面知情同意获自每个女性。

[0521] 表12:参加本研究的10名女性的人口数据

[0522]

变量	
年龄,y	55±3.2
身高,cm	159.3±3.7
体重,kg	66.8±5.1
BMI,kg/cm^2	26.2±1.9
PTH,pg/ml	30.3±13.2
FSH,miu/ml	65.2±29.3
25-OHD,ng/ml	29.9±6.7

[0523] 结果是平均值±S.D

[0524] 吸收比例分析表明,所有10个受试者当施用ACC代替CCC时,显 示钙吸收的显著升高。

[0525] 获自在早餐后接受胶囊的9个女性的结果的配对t-检验分析,显示 ACC的钙吸收比例的显著升高。对于每个女性,与CCC相比,来自ACC 的钙的相对吸收的平均增加为2.1倍(p<0.01;图2)。

[0526] 作为两个分开的治疗组总体上,当与CCC相比,女性施用ACC时, 存在钙吸收比例升高1.9倍(P<0.05;图3)。

[0527] 在禁食过夜后空腹接受胶囊的十名女性中的一个显示钙吸收比例的 4.6倍升高(图4)。

[0528] 实验细节

[0529] 胶囊和$CaCl_2$溶液配制和标记

[0530] ACC(Amorphical Ltd.)通过在32%HCl中溶解其适当的量连同 $^{44}CaCO_3$(浓缩至96.1%,CMR,Moscow,Russia)本质地来标记,之后,将 其再沉淀返回至包含以15mg ^{44}Ca/处理标记的192mg元素钙的ACC粉末 (600mg粉末)。总体而言,制备3批^{44}ACC,并送至扇形磁热电离质谱 (MAT261;Finnigan,Bremen,Germany)以44:42摩尔比分析,并用原子 吸收测量钙含量(Analytical Research Services,Ben-Gurion University, Beersheva,Israel)。

进行另外的测试评估每个批次的无定形含量:X射线衍 射(XRD;The Nanotechnology Institution,Ben-Gurion University)、定量偏 振光谱(QPS)、偏光显微镜(POM)和干燥度。CCC(Zifroni Chemicals Suppliers Ltd.,Rishon-Lezion,Israel)通过用$^{44}CaCO_3$(浓缩至96.1％,CMR, Moscow,Russia)均质化其适当的量本质地来标记,以达到包含以15mg ^{44}Ca/处理标记的192mg元素钙的CCC粉末(480mg粉末)。为匹配ACC 胶囊中的体积,将蔗糖(每处理120mg;FAGRON Gmbh&Co.KG, Rotterdam,The Netherlands)添加至每个胶囊。制备一批^{44}CCC,并送至扇 形磁热电离质谱(MAT261;Finnigan,Bremen,Germany)以44:42摩尔比分析。

[0531] i.v.同位素$^{42}CaCl_2$溶液制备方案由Concept for Pharmacy Ltd.Kfar-Saba,Israel在层流通风橱下进行以确保无菌。将适当量的$^{44}CaCO_3$(浓缩至96.1％, CMR,Moscow,Russia)溶解在37％HCl中并与0.45％NaCl混合。用10N 的NaOH调整pH至5.5。将溶液通过0.22μ过滤器灭菌压入无菌容器中。将单独的剂量(1.5mg ^{42}Ca/剂量)转移入无菌小瓶中供以后使用。使用前, 将等份送至无菌和热原检测(Aminolab,Nes-Ziona,Israel),并通过原子吸 收(Analytical Research Services,Ben-Gurion University,Beersheva,Israel)测量钙含量。本研究中的所有i.v.溶液是无菌的并无热原的。

[0532] 尿液收集和分析

[0533] 每个胶囊施用后,进行24小时的尿液收集用于测量钙、钠、钾、尿 素、肌酐和稳定同位素分析。遵循先前公布的方法(Yergey等人,1994) 在Baylor College of Medicine Houston,Texas,USA进行钙的吸收分析。草 酸铵被用于沉淀尿液样品中的钙同位素(Yergey等人1980)。然后提取的 钙的量被用于钙同位素比率测量。使用扇形磁热电离质谱(MAT 261; Finnigan,Bremen,Germany)确定该量。

[0534] 人样品的药代动力学计算

[0535] 如(Yergey等,1994)中描述的计算膳食钙的吸收比例(α_{24h})。简言 之,比率α_{24h}是用于两个标签的血浆消失曲线下的面积的比率的算术有效 表示。

[0536] 统计分析

[0537] 如试验1中所述进行方差的统计分析。

[0538] 上述试验的结果证实,稳定的ACC比CCC在易发生骨相关的紊乱的 两类人模型中具有较高的胃肠吸收。由于结晶钙的吸收是有限的,并且过 量的钙可能导致不良作用,在当需要较高的钙摄取以维持骨矿物质密度的 情况下,这种增强的吸收可以是有益的。

[0539] 试验5:在骨矿物质密度损失相关的紊乱中阻止或延缓骨质损失。

[0540] 本试验的目的是评价来自包含各种稳定剂(P-Ser、柠檬酸或蔗糖)的 ACC源的钙,对于在骨质疏松大鼠模型(卵巢切除;OVX)中由股骨和脊 椎骨矿物质密度(BMD)评估的骨矿化过程的可用性。

[0541] 在本研究中,测试了四组大鼠(3组卵巢切除的和1组假处理)。将动 物根据表13进行处理。

[0542] 表14显示了试验期间大鼠的平均食物摄入量和体重。与假处理相比, 在三组OVX组观察到显著的体重增加。尽管事实是,与假处理相比,所 有OVX组中食物摄入量较低。

[0543] 表13:根据处理分配大鼠

[0544]

组	处理
假处理 (n=10)	含有 1%元素钙的标准实验室饮食(Altromin Spezialfutter GmbH & Co, #1320P Seelenkamp, Germany)，自由采食。
OVX ACC (P-Ser) (n=10)	富含来自由 0.0275%磷酸丝氨酸稳定的合成的 ACC(ACC_PS, SOP PSC002, Amorphical Ltd.)的 1%元素钙的低钙饮食(TD.95027, Harlan Inc, Jerusalem, Israel)，自由采食。
OVX ACC (CIT) (n=10)	富含来自由 0.0275%柠檬酸稳定的合成的 ACC(ACC_CIT, SOP PCA001, Amorphical Ltd.)的 1%元素钙的低钙饮食(TD.95027, Harlan Inc, Jerusalem, Israel)，自由采食。
OVX ACC (SUC) n=10)	富含来自由蔗糖和氢氧化钠稳定的合成的 ACC(ACC SUC, SOP SUC001, Amorphical Ltd.)的 1%元素钙的低钙饮食(TD.95027, Harlan Inc, Jerusalem, Israel)，自由采食。

[0545] OVX＝卵巢切除;ACC＝无定形碳酸钙;PS＝磷酸丝氨酸;CIT＝柠檬酸盐;SUC＝蔗糖

[0546] 表14:大鼠在实验开始和结束时的平均食物摄入和总体重

[0547]

	假处理	OVX		
		ACC_P-Ser	ACC_CIT	ACC_SUC
大鼠体重(第 0 天)	258 (16)	245 (15)	244 (11)	255 (14)
大鼠体重(第 90 天)	299 (29)	337 (18)	341 (16)	357 (22)
*体重增加(%)	23.7^{a}	36.1^{b}	41.2^{b}	40.7^{b}
*平均食物摄入	$17.2\ (1.0)^{a}$	$14.0\ (0.8)^{b}$	$14.5\ (0.5)^{bc}$	$15.5\ (0.7)^{c}$

[0548] 每周记录值。体重增加表示从实验开始至结束重量的增加比率。值表示为平均值(SD)。

[0549] 单因素ANOVA:$P<0.001$。字母代表Tukey事后比较检验。

[0550] 在该模型中如预期的,OVX组的股骨的显微CT扫描揭示了小梁骨矿 物质密度(Tb.BMD)和其他形态参数,即:骨体积/组织体积(BV/TV)、小梁骨数量(Tb.N)、小梁骨厚度(Tb.Th)的显著减少;且小梁骨间距(Tb.Sp) 显著升高。此外,3个OVX组与假处理动物在所有股骨微结构拓扑学和方 位参数即:小梁骨因子(TBPf)、结构模型指数(SMI)和各向异性的程度 (DA)方面显著不同(表15)。

[0551] 4-L脊椎显微CT扫描结果显示,与所有其他OVX组相比,假处理组 仅在BMD、BV/TV和Tb.N参数方面显著较高,且在TBPf和SMI微结构 参数方面显著较低(表15)。

[0552] 不同于小梁骨BMD,在股骨和脊椎两者的骨皮质BMD(Ct.BMD) 方面,所有组之间没有观察到差异(表15)。

[0553] 在由显微CT测试的所有参数中,在ACC+P-Ser、ACC+CIT和 ACC+SUC组之间在股骨和脊椎两者中未观察到差异(表6),表明稳定 ACC的化合物本身对BMD或另外的骨形态或微结构参数无效应。

[0554] 表15:通过显微CT研究的形态和微结构拓扑和方位参数

[0555]

		假处理	OVX		
			ACC+P-Ser	ACC+CIT	ACC+SUC
(A) 股骨	*Tb. BMD, g/cm^3	305 (43)^a	120 (26)^b	112 (20)^b	116 (27)^b
	Ct. BMD, g/cm^3	775 (79)^a	771 (32)^a	761 (84)^a	743 (55)^a
	*Tb. BV/TV, %	55 (7.5)^a	22 (3.7)^b	21 (3.6)^b	22(3.6)^b
	*Tb. N, mm^{-1}	4.5 (0.3)^a	2.0 (0.3)^b	2.0 (0.3)^b	2.1 (0.3)^b
	*Tb. Sp, m	145 (15)^a	583 (67)^b	621 (125)^b	613 (92)^b
	*Tb. Th, m	121 (1)^a	109 (6)^b	105 (6)^b	104 (6)^b
	*TBPf, mm^{-1}	-11.4 (4.0)^a	5.20 (1.6)^b	5.99 (1.7)^b	4.60 (1.7)^b
	*SMI	-0.84 (0.8)^a	1.40 (0.1)^b	1.46 (0.2)^b	1.32 (0.2)^b
	*DA	1.46 (0.1)^a	1.64 (0.2)^b	1.82 (0.2)^b	1.61 (0.2)^b
(B) 脊椎	*Tb. BMD, g/cm^3	235 (41)^a	107 (37)^b	124 (39)^b	130 (29)^b
	Ct. BMD, g/cm^3	652 (50)^a	687 (35)^a	663 (41)^a	669 (48)^a
	*Tb. BV/TV, %	42 (6.6)^a	22 (5.1)^b	24 (5.4)^b	25 (5.3)^b
	*Tb. N, mm^{-1}	3.6 (0.5)^a	2.1 (0.4)^b	2.1 (0.9)^b	2.2 (0.4)^b
	Tb. Sp, m	221 (34)^a	335 (53)^a	297 (48)^a	333 (57)^a
	Tb. Th, m	117 (5)^a	105 (7)^a	107 (10)^a	111 (6)^a
	*TBPf, mm^{-1}	-0.99 (3.5)^a	7.04 (2.5)^b	5.85 (2.8)^b	5.73 (1.7)^b
	*SMI	0.41 (0.5)^a	1.51 (0.3)^b	1.56 (0.7)^b	1.40 (0.2)^b
	DA	2.03 (0.3)^a	2.64 (0.7)^a	2.36(0.4)^a	2.13 (0.4)^a

[0556] (A)股骨远端干骺端。(B)第4腰椎。

[0557] 小梁骨矿物质密度(Tb.BMD)、皮质BMD(Ct.BMD)、小骨梁体积/组织体积(Tb.BV/TV)、小骨 梁数量(Tb.N)、小骨梁间距(Tb.Sp)、小骨梁厚度(Tb.Th)、小梁骨模式因子(TBPf)、结构模型 指数(SMI),各向异性度(DA)。

[0558] 值相应于平均值(±SD)。

[0559] 单因素ANOVA:*P<0.001。字母代表Tukey事后比较检验。

[0560] 实验细节

[0561] 动物

[0562] 将具有247±14g的平均体重的四十只16-17周龄雌性Sprague Dawley 大鼠(Harlan Inc.,Jerusalem,Israel)群养在14个笼子里(2-3只大鼠/笼子),并在控制室内条件(21±2℃和12-小时暗-光周期)下适应。在7天适应期 间,大鼠饲以包含1%元素钙的标准实验室饮食(#2018SC大鼠饲料,Harlan Inc.Jerusalem,Israel),和自由采食去离子水。

[0563] 7天适应阶段后,大鼠使用腹腔内(IP)注射包含氯胺酮(Fort Dodge AH Ltd.Overland Park,USA)和甲苯噻嗪(EuroVet AH Ltd.Bladel,UK)的 麻醉剂溶液(0.1ml/100g)来麻醉。

[0564] 将大鼠随机分配并根据其分配的四组操作:假处理(假处理-卵巢切除 的;用含有来自CCC的1%元素钙的标准实验室饮食喂养),且其他三组 使用根据Lasota和Danowska-Klonowska(2004)Rocz Akad Med Bialymst 49 Suppl 1:129-131的双侧背侧方法来切除卵巢(OVX),并分为OVX-ACC+ PS、OVX-ACC+CIT和OVX-ACC+SUC。操作后,对大鼠提供与适应阶 段相同的条件下的7天恢复期,自由采食标准实验室饮食和包含1.5ml/400 ml安乃近(Vitamed Ltd.,Binyamina,Israel)和1mg/kg恩氟沙星(Buyer Ltd. Leverkusen,

Germany)的去离子水。

[0565] 实验处理

[0566] 在恢复期结束时,将大鼠根据组的分配,在如上述相同的控制室内条 件下进行群养(2只大鼠/笼)。在整个处理期间(90天)提供自由采食的 分配的食物颗粒(表13中描述的)和去离子水。每周记录食物摄入和体 重(表14中描述的)。对于动态组织形态学分析,荧光染料钙黄绿素(20 mg/kg体重,Sigma-Aldrich,Israel)在第76和86天时IP注射至所有大鼠。 第90天时,将大鼠在代谢笼中单独饲养,并剥夺食物和水18小时。从各 代谢漏斗收集尿,并保存在-80℃用于未来在试验结束(时间90)时分析 骨再吸收生化标志物。在尿取样后立即,提取血清样品用于评价90天的 形成生化标志物。通过CO_2处死所有大鼠。将右股骨和第4腰椎切下,包 裹上浸有生理盐水缓冲液的纱布垫,并保存在-80℃用于测量骨显微CT扫 描。将第五腰椎储存在与右股骨相同的条件下用于机械测试。将右胫骨解 剖并立即放置在4℃下3.7%甲醛溶液(F1636,Sigma-Aldrich,Israel)中 24h用于结构和动态组织形态学测量。

[0567] 微型计算机断层扫描(μCT)扫描

[0568] 右股骨和第4腰椎的小梁骨和皮质骨微结构以μCT扫描仪(Skyscan 1174,Kartuizersweg Kontich,Belgium)进行分析。扫描仪对于骨矿物质密 度(BMD)的校准根据制造商说明书使用具有0.25和0.75g/cm^3密度的指 定的大鼠模型杆(Skyscan,Kartuizersweg Kontich,Belgium)进行。

[0569] 扫描分析之前,将股骨和第4腰椎从-80℃中取出,放置在塑料中(根 据制造商指导)。每个股骨的远端区域以13.8μm的各向同性分辨率扫描小 梁骨和皮质骨参数。使用Skyscan Nrecon软件(版本1.6.4,Skyscan)应 用改进的算法进行重建。将感兴趣的体积(VOI)设置到生长板下0.8mm, 并远端延伸1.5mm。在VOI内的小梁骨和皮质段,使用扫描仪配有的CTan 分析软件(版本1.11Skyscan),通过每～5片描绘椭圆形轮廓来提取。小梁 骨和皮质BMD、骨体积(BV/TV,%)、小梁骨数量(Tb.N)、小梁骨厚度 (Tb.Th,μm)、小梁骨间距(Tb.Sp,μm)连同小梁骨模式因子(TBPf) 和结构模型指数(SMI)的微结构参数一起,由CTan分析仪软件(版本 1.11 Skyscan)自动计算。

[0570] 来自每只大鼠的第4腰椎以13.8μm各向同性分辨率进行扫描且将 VOI设置为覆盖从椎体的中心的1.25mm厚横截面,用于在与以上描述的 用于股骨的相同程序中评价小梁骨和皮质骨参数。

[0571] 试验6:在代谢性骨相关的紊乱中增加骨矿物质密度

[0572] 本发明人进行了旨在评价无定形碳酸钙(ACC)在代谢性骨紊乱,并 特别是如卵巢切除(OVX)的大鼠模型中呈现的骨质疏松症中对骨矿物质 密度和骨比例的效应的研究,其中ACC与用于骨质疏松症的标准药剂组 合施用。在本试验中,测试了五组大鼠(4组OVX和1组假处理)。操作 后,将所有大鼠留下未处理(用标准实验室饮食喂养)以发展骨质疏松,为期2个月。在诱导期结束时,将动物用来自两种不同钙来源:无定形碳 酸钙(ACC)或结晶碳酸钙(CCC)(表16)的粒料形式的特殊食物混合 物来处理。原子吸收仪(Varian AA240,Palo Alto,CA,USA)证实了来自两 种混合物的颗粒包含～1%元素钙,除了在原始食物颗粒中发现的量外(22 IU维生素D/g),并无添加的维生素D。此外,将动物根据其组分配用盐水或2μg/kg阿仑膦酸盐(ALN)i.v注射(3次/周),如表16所述。

[0573] 表16:根据处理分配大鼠

[0574]

	组	处理
假处理	假处理	自由采食包含来自 CCC(Socal®沉淀碳酸钙)的 1%元素钙的低钙饮食(TDK95027, Harlan Inc.)并皮下注射盐水(0.9% NaCl, 100μl/100g b.w) 3 次\周。

[0575]

OVX	CCC	自由采食包含来自 CCC(Socal®沉淀碳酸钙)的 1%元素钙的低钙饮食(TDK95027, Harlan Inc.)并皮下注射盐水(0.9% NaCl, 100μl/100g b.w) 3 次\周。
	ACC	自由采食包含来自合成的无定形碳酸钙 [由 Mr. Oren Meiron, Amorphical 提供的 ACC (1%PS & 2%柠檬酸盐)]的 1%元素钙的低钙饮食(TDK95027, Harlan Inc.)并皮下注射盐水(0.9% NaCl, 100μl/100g b.w) 3 次\周。
	CCC+ALN	自由采食包含来自 CCC(Socal®沉淀碳酸钙)的 1%元素钙的低钙饮食(TDK95027, Harlan Inc.)并皮下注射阿仑膦酸盐(2μg/kg，为 100μl/100g b.w) 3 次\周。
	ACC+ALN	自由采食包含来自合成的无定形碳酸钙 [由 Mr. Oren Meiron, Amorphical 提供的 ACC (1%PS & 2%柠檬酸盐)]的 1%元素钙的低钙饮食(TDK95027, Harlan Inc.)并皮下注射阿仑膦酸盐(2μg/kg，为 100μl/100g b.w) 3 次\周。

[0576] OVX＝卵巢切除;CCC＝结晶碳酸钙;ACC＝无定形碳酸钙;ALN＝阿仑膦酸盐;PS＝磷酸丝氨酸

[0577] 表17显示了大鼠在试验期间的平均食物摄入量和体重。与假处理相 比,在所有OVX大鼠中观察到显著的体重增加。尽管事实是,食物摄入 在所有群体中是相似的。

[0578] 表17:大鼠的平均食物摄入和总体重

[0579]

	假处理	OVX			
		CCC	ACC	CCC+ALN	ACC+ALN
大鼠体重(第 0 天)	258 (16)	244 (18)	240 (21)	243 (14)	244 (16)
大鼠体重(第 60 天)	289 (14)	326 (19)	323 (26)	325 (15)	327 (17)
大鼠体重(第 180 天)	319 (18)	359 (23)	360 (36)	353 (18)	355 (29)
体重增加(%)	24.5[a]	47.5[b]	50.3[b]	46[b]	45.4[b]
平均食物摄入 (g/天)	12.7 (0.73)	12.9 (0.34)	12.7 (0.82)	12.7 (0.72)	13.3 (1.4)

[0580] 每周记录值。体重增加表示从实验的开始到结束时重量的增加比率。将值表示为平均值(SD)。单 向ANOVA:$p<0.05$。字母表示Fishers LSD事后比较检验。

[0581] 来自各组的代表性股骨远端和第4腰椎的显微CT(μCT)三维微结构 示意重建在图5中来呈现。股骨干骺端小梁骨以及椎体的重建使得能够区 分四个不同的组:与所有其他组相比具有观察到的最高小梁骨区的包括假 处理的第一组(图5A),具有最低的小梁骨区的包括OVX-CCC的第二组 (图5B),与CCC相比具有小梁骨区中度增加的包括OVX-ACC和OVX-CCC+ALN的第三组(图5C和5D),以及,与第三组相比,具有小 梁骨区的另外增加的包括OVX-ACC+ALN的第四组(图5E)。

[0582] 在四组之间观察到的差异还反映在图6和表18呈现的小梁骨矿物质 密度(BMD)和在股骨干骺端和第4腰椎的形态测定分析中。

[0583] 如图6A-6B中所示,与所有四个OVX组相比,假处理组的小梁骨股 骨BMD显著更高。在OVX组内,与CCC处理的组的小梁骨BMD相比, ACC处理的组(图6A-6B)的小梁骨股骨和脊椎BMD分别高22%和39%。与CCC处理的组的小梁骨BMD相比,CCC+ALN处理的组的小梁骨股骨 和脊椎BMD分别高49%和72%。与CCC处理的组的小梁骨BMD相比, ACC+ALN处理的组的小梁骨股骨和脊椎BMD分别高75%和105%,以及 代替CCC将ACC添加至ALN分别在股骨和脊椎中增加了26%和33%的 BMD,表示ACC与ALN组合对BMD值有积极加性效应。

[0584] 不同于小梁骨BMD,在股骨和脊椎两者的皮质骨BMD(Ct.BMD) 观察到,所有组间无差异(表18)。

[0585] 表18:通过μCT扫描获得的微结构形态测定分析

[0586]

		假处理	OVX			
			CCC	ACC	CCC+ALN	ACC+ALN
(A) 股骨	Tb. N, mm^{-1}	4.1 (0.7)	1.5 (0.3)	1.7 (0.1)	2.3 (0.3)	2.5 (0.3)
	Tb. Sp, μm	167 (41)	682 (93)	584 (95)	360 (64)	323 (47)
	Tb. Th, μm	111 (9)	110 (10)	112 (7)	102 (11)	105 (7)
	Ct. BMD, g/cm^3	750 (32)	756 (30)	750 (67)	741 (58)	771 (27)
	TBPf, mm^{-1}	-7.0 (6.4)	7.6 (1.7)	6.1 (1.0)	7.3 (1.8)	6.3 (1.2)
	SMI	0.12 (0.2)	1.66 (0.2)	1.50 (0.1)	1.63 (0.2)	1.55 (0.1)
(B) 脊椎	Tb. N, mm^{-1}	3.60 (0.7)	1.75 (0.5)	2.05 (0.7)	2.54 (0.3)	2.73 (0.3)
	Tb. Sp, μm	199 (38)	374 (87)	352 (101)	268 (42)	251 (37)
	Tb. Th, μm	110 (17)	98.4 (5.3)	107 (13)	100 (11)	109 (13)
	Ct. BMD, g/cm^3	750 (32)	756 (30)	750 (67)	741 (58)	771 (27)
	TBPf, mm^{-1}	-0.7 (5.8)	8.5 (3.2)	6.8 (2.3)	4.8 (1.8)	4.4 (1.9)
	SMI	0.61 (0.8)	1.62 (0.3)	1.56 (0.2)	1.28 (0.2)	1.22 (0.3)

[0587] (A)股骨远端干骺端。(B)第4腰椎。Tb.N表示在mm^{-1}区域内的小梁骨数目,Tb.Sp表示小梁 骨之间的平均距离,Tb.Th表示小梁骨的平均厚度,TBPf表示小梁骨模式因子且SMI代表结构模 型指数。将值表示为平均值(SD。

[0588] 与假处理相比,在所有切除卵巢的组中,股骨远端干骺端和第4脊椎 的形态测定分析显示显著减少了小梁骨比例(BV/TV)。与CCC组相比, ACC在OVX组的股骨和脊椎中,分别呈现显著高34%和23%的小梁骨比 例。CCC+ALN组也获得了类似的结果,与CCC相比,其呈现股骨37% 的增加,且脊椎46%的增加。与CCC相比,ACC与ALN组合导致股骨增 加56%,且脊椎增加71%,以及与ALN+CCC组相比,股骨和脊椎分别增 加19%和25%,再次表示ACC与ALN组合对BV/TV值的增加的加性效 应(图6C-6D)。

[0589] 与假处理相比,在所有切除卵巢的组中,在股骨和脊椎两者中还观察 到小梁骨数目(Tb.N)的显著减少。与CCC组相比,在OVX组的股骨和 脊椎中,ACC呈现高平均17%的小梁骨数量。与CCC相比,在CCC+ALN 组获得了较高的结果,其在股骨和脊椎中呈现平均50%的增加。与CCC 相比,ACC与ALN组合导致在股骨和脊椎中增加了平均62%,并且与 ALN+CCC组相比,在股骨和脊椎中增加了平均13%,表示ACC与ALN 组合对Tb.N值的增加有加性效应(表18)。

[0590] 与假处理相比,在所有卵巢切除组中,在股骨和脊椎两者中观察到小 梁间距

(Tb.Sp)的显著增加。与CCC组相比,在OVX组的股骨和脊椎 中,ACC呈现低平均11％的间距数。与CCC组相比,CCC+ALN组获得 了较低的结果,其在股骨和脊椎中呈现减少平均38％。与CCC相比,ACC 与ALN组合导致在股骨和脊椎中相似减少54％,且与ALN+CCC组相比, 在股骨和脊椎中减少平均16％,还支持ACC与ALN组合的加性效应(表 18)。

[0591] 小梁骨厚度(Tb.Th)的分析揭示所有研究组之间中在股骨中无变化, 且在脊椎中仅轻微变化,显示与CCC相比,在假处理组中小梁骨厚度仅 增加了12％,与CCC组相比,在ACC组中增加了9％,与单独CCC相比, 在ALN处理后仅增加2％,且与假处理组类似,ACC与ALN组合的小加 性效应由Tb.Th值11％的增加来反映(表18)。

[0592] 拓扑学和取向参数的微结构分析:小梁骨模式因子(TBPf)和结构模 型指数(SMI)揭示,卵巢切除干预导致股骨和脊椎两者中TBPf和SMI 值增加。在股骨中,ACC处理比CCC+ALN导致TBPf和SMI值较大的减 少,CCC+ALN在该区域仅对这些参数有轻微效应。然而,在脊椎中,与 CCC+ALN相比,ACC处理导致TBPf和SMI值的较小减少。与CCC处 理相比,ACC+ALN处理导致TBPf和SMI值在股骨中平均加性减少12％, 且在脊椎中减少37％(表18)。

[0593] 实验细节

[0594] 动物

[0595] 将具有246±17g的平均体重的五十三只16周龄雌性Sprague Dawley 大鼠(Harlan Inc.,Jerusalem,Israel)群养在26个笼子里(2-3只大鼠/笼), 并在控制室内条件(21±2℃和12小时暗-光周期)下适应。在7天适应期 间,大鼠饲以包含1％元素钙的标准实验室饮食(#2018SC大鼠饲料, Harlan Inc.Jerusalem,Israel),和自由采食去离子水。

[0596] 对于施用不同钙源,制备特殊的食物颗粒。包含0.02％钙的低钙啮齿 类粒料(大鼠饲料#TD95027Harlan Inc.,Jerusalem,Israel)被精细地磨碎, 并分别与两种不同的钙源混合。CCC混合物包含来自结晶碳酸钙(Socal®沉淀碳酸钙)的1％元素钙,且ACC混合物包含来自稳定的无定形碳酸钙 (包含1％磷酸丝氨酸和2％柠檬酸盐;Amorphical Ltd., Beer-Sheva,Israel) 的1％元素钙。每一混合物分别制粒并室温下保持在密封袋中。

[0597] 7天适应阶段后,大鼠使用腹腔内(IP)注射包含氯胺酮(Fort Dodge AH Ltd.Overland Park,USA)和甲苯噻嗪(EuroVet AH Ltd.Bladel,UK) 的麻醉剂溶液(0.1ml/100g)来麻醉。

[0598] 将大鼠随机分配并根据其分配的五组操作:假处理(假处理-卵巢切除 的;N＝9),且其他四组通过根据Lasota和Danowska-Klonowska(2004)Rocz Akad Med Bialymst 49Suppl 1:129-131的双侧背侧方法来切除卵巢 (OVX),并分为OVX-CCC(n＝10)、OVX-ACC(n＝10)、OVX-CCC+ALN (n＝12)和OVX-ACC+ALN(n＝12)。操作后,对大鼠提供3天恢复期,期间 其用包含1.5ml/400ml安乃近(Vitamed Ltd.,Binyamina,Israel)和1mg/kg 恩氟沙星(Buyer Ltd.Leverkusen,Germany)的去离子水来处理。将动物在 与适应阶段相同的条件下留下未处理,自由采食标准实验室饮食2个月以 发展骨质疏松。

[0599] 2个月后,大鼠根据如表16中描述的其分配开始处理4个月的阶段。在整个处理阶段,提供分配的补充粒料和去离子水自由采食。每周记录食 物摄入和体重(表17)。在处理阶段结束时,通过CO_2处死所有大鼠。将 右股骨和第4腰椎切下,包裹上浸有生理盐水缓冲液的纱布垫,并保存在 -80℃用于测量骨显微CT扫描。

[0600] 微型计算机断层扫描(μCT)扫描

[0601] 右股骨和第4腰椎的小梁骨和皮质骨微结构以μCT扫描仪(Skyscan 1174,Kartuizersweg Kontich,Belgium)进行分析。扫描仪对于骨矿物质密 度(BMD)的校准根据制造商说明书使用具有0.25和0.75g/cm^{3}密度的指 定的大鼠模型杆(Skyscan,Kartuizersweg Kontich,Belgium)进行。

[0602] 扫描分析之前,将股骨和第4腰椎从-80℃中取出,放置在塑料中(根 据制造商指导)。每个股骨的远端区域以13.8μm的各向同性分辨率扫描小 梁骨和皮质骨参数。使用Skyscan Nrecon软件(版本1.6.4,Skyscan)应 用改进的算法进行重建。将感兴趣的体积(VOI)设置到生长板下0.8mm, 并远端延伸1.5mm。在VOI内的小梁骨和皮质段,使用扫描仪配有的CTan 分析软件(版本1.11Skyscan),通过每～5片描绘椭圆形轮廓来提取。小梁 骨和皮质BMD、骨体积(BV/TV,%)、小梁骨数量(Tb.N)、小梁骨厚度 (Tb.Th,μm)、小梁骨间距(Tb.Sp,μm)连同小梁骨模式因子(TBPf) 和结构模型指数(SMI)的微结构参数一起,由CTan分析仪软件(版本 1.11Skyscan)自动计算。

[0603] 来自每只大鼠的第4腰椎以13.8μm各向同性分辨率进行扫描且将 VOI设置为覆盖从椎体的中心的1.25mm厚横截面,用于在与以上描述的 用于股骨的相同程序中评价小梁骨和皮质骨参数。

[0604] 上述试验的结果证实,稳定的ACC比CCC对骨矿物质密度和其他骨 参数具有更高效应。此外,与CCC相比,ACC与用于治疗骨质损失的标 准药剂组合施用导致加性效应,允许减少双膦酸/盐/酯剂量,并证实,高 度生物可利用的ACC可单独或与保守的药物治疗一起被用于增加骨矿物 质密度并治疗代谢性骨紊乱、疾病和状况。

[0605] 试验7:阻止或延缓代谢性骨紊乱的发病

[0606] 本发明人进行了旨在评价与结晶碳酸钙(CCC)相比,来自稳定的无 定形碳酸钙(ACC)的钙对预防骨代谢性紊乱和特别是如在卵巢切除 (OVX)的大鼠模型中呈现的骨质疏松症的效应的研究。

[0607] 在本研究中,测试了五组大鼠(4组切除卵巢的和1组假处理)。OVX 动物用来自四种不同钙源的粒料的形式的特殊食物混合物来喂养:商品化 结晶碳酸钙作为对照(混合物A),天然ACC(胃石粉)(混合物B),合 成的ACC(包含微量的磷酸丝氨酸)(混合物C),和商品化结晶柠檬酸钙 (混合物D)。将假处理组施用与对照相同的食物。原子吸收仪(Varian AA240,Palo Alto,CA,USA)证实了来自所有四种混合物的颗粒包含 ～0.5%元素钙,并且如表19所述的,除了在原始食物颗粒中发现的量外(22 IU维生素D/g),无添加的维生素D。

[0608] 表19:如通过原子吸收测量的,钙源和专门化的粒料的元素钙含量(% 重量)

[0609]

	碳酸盐 (混合物 A)	胃石 (混合物 B)	ACC (混合物 C)	柠檬酸盐 (混合物 D)
钙源中% Ca^{2+}	34.54	28.1	33.0	18.3
粒料中% Ca^{2+}	0.54	0.54	0.53	0.55

[0610] 钙的来源获自:商品化结晶$CaCO_3$(碳酸盐),来自澳大利亚螯虾红 螯螯虾(Cherax quadricarinatus)的胃石粉(胃石),合成的稳定的无定形 碳酸钙(ACC)和来自商品化补充剂的柠檬酸钙(柠檬酸盐)。将值表示 为平均值。

[0611] 表20显示了试验期间大鼠的平均食物摄入量和体重。与假处理相比, 在所有OVX大鼠中观察到显著的体重增加。尽管事实是,食物摄入量在 所有组之间是相似的。

[0612] 表20:在实验的开始和结束时大鼠的平均食物摄入量和总体重

[0613]

	假处理	OVX			
		对照	胃石	ACC	柠檬酸盐
大鼠体重(第0天)	253 (3.5)	249 (3.3)	249 (5.2)	251 (4)	253 (4.7)
大鼠体重(第90天)	310 (8.3)	345 (5.8)	370 (6.4)	359 (4.2)	354 (5.6)
重量增加(%)	22.5^{a}	38.5^{b}	48.5^{b}	43^{b}	40^{b}
平均食物摄入	15.2 (0.07)	15.2 (0.07)	15.2 (0.07)	15.1 (0.02)	15.2 (0.05)

[0614] 每周记录值。体重增加表示从实验开始至结束时重量的增加比率。值表示为平均值(SD)。单因素 ANOVA:P<0.05。字母代表Fisher-LSD事后比较检验。

[0615] 来自各组的代表性股骨远端和第4腰椎的μCT三维微结构示意重建在 图7中来呈现。股骨干骺端小梁骨以及椎体的重建使得能够区分三个不同 的组:具有观察到的最高小梁骨区的包括假处理的第一组(图7A),与假 处理相比,具有最低的小梁骨区的包括OVX对照和柠檬酸盐的第二组(图7B和7E),以及与假处理相比,具有小梁骨区中度减少的包括OVX胃石 和ACC的第三组(图7C和7D)。

[0616] 在三组之间观察到的差异还反映在图8、图9和表21中呈现的小梁骨 矿物质密度(BMD)和在股骨干骺端和第4腰椎的形态测定分析中。

[0617] 如图8A中所示,与以下所有四个OVX组相比,假处理组的小梁骨股 骨BMD显著更高:对照、胃石、ACC和柠檬酸盐,分别具有64%、45%、 50%和63%的显著差异。与所有四个OVX组相比,假处理组的小梁骨脊 椎BMD方面还获得了可比较的值,图8B中呈现的。在OVX组内,与对 照组的小梁骨BMD相比,胃石和ACC(图8A和8B)的小梁骨股骨和脊 椎BMD分别在股骨中显著高56%和38%,且在脊椎中显著高38%和32%。 与对照相比,观察到柠檬酸盐的小梁骨股骨和脊椎BMD无显著差异。在 胃石和ACC组之间的比较揭示胃石比ACC有利的在小梁骨股骨BMD的 13%的统计学差异,且在小梁脊椎BMD中无差异。

[0618] 不同于小梁骨BMD,在股骨和脊椎两者的皮质骨BMD(Ct.BMD) 观察到,所有组间无差异(表21)。

[0619] 表21:通过μCT扫描获得的形态测定分析和皮质骨矿物质密度(Ct. BMD)

[0620]

		假处理	OVX			
			对照	胃石	ACC	柠檬酸盐
(A) 股骨	**Tb. N, mm^{-1}	6.1^{a} (0.9)	2.2^{b} (0.6)	3.5^{c} (0.6)	3.3^{c} (0.5)	2.4^{b} (0.5)
	**Tb. Sp, μm	111^{a} (28)	248^{b} (83)	158^{c} (46)	209^{d} (74)	226^{bd} (47)
	*Tb. Th, μm	31.5^{ac} (5.3)	29.0^{b} (0.8)	33.6^{a} (3.5)	30.9^{cb} (1.4)	29.1^{b} (2.0)
	Ct. BMD, g/cm^{3}	963 (51)	980 (57)	983 (62)	952 (53)	970 (53)
(B) 脊椎	**Tb. N, mm^{-1}	3.98^{a} (0.67)	1.57^{b} (0.33)	2.29^{c} (0.25)	2.24^{c} (0.34)	1.59^{b} (0.22)
	**Tb. Sp, μm	153^{a} (28)	254^{b} (74)	197^{c} (54)	229^{bc} (36)	262^{b} (60)
	Tb. Th, μm	84.6 (7.3)	87.5 (6.4)	83.8 (20.3)	93.5 (6.9)	86.6 (8.5)
	Ct. BMD, g/cm^{3}	933 (55)	950 (50)	959 (56)	961 (57)	943 (68)

[0621] (A)股骨远端干骺端。(B)第4腰椎。Tb.N表示在mm^{-1}区域内的小梁骨数目,Tb.Sp表示小梁 骨之间的平均距离,Tb.Th表示小梁骨的平均厚度。单因素ANOVA:*p<0.05,**p<

0.01。字母代表 Fisher-LSD事后比较检验。

[0622] 与假处理相比，在所有切除卵巢的组中，股骨远端干骺端和第4椎体 的形态测定分析(图9和表21)显示显著减少了小梁骨比例(BV/TV)和 其数量(Tb.N)。与假处理相比，对照组在股骨远端显著降低了平均65％(图9A和表21A)且在脊椎中降低了60％(图3和表3B)。然而，与假 处理相比，OVX胃石和ACC组分别在股骨远端中降低了平均41％和49％，在脊椎中降低了40％和41％。与对照相比，在OVX组的股骨中，胃石和 ACC分别呈现显著高平均65％和49％的小梁骨比例和小梁骨数量。在胃石 和ACC组的腰椎中也获得了类似的结果，与对照相比，分别高平均48％ 和47％。在柠檬酸盐和对照之间没有观察到小梁骨比例和其数量方面的显 著差异。

[0623] 在胃石和ACC组的股骨之间的比较揭示，在骨比例、小梁骨厚度和 小梁骨间距方面的显著差异。根据图9A和表21A中呈现的结果，与ACC 相比，胃石组的股骨显示显著高16％的骨比例，高9％的小梁骨厚度和低 24％的小梁骨间距。与ACC相比，在胃石的脊椎中还观察到了显著高12％ 的小梁骨厚度，但在胃石和ACC之间的形态测定参数的剩余部分没有观 察到显著差异(图9B和表21B)。

[0624] 各组之间在微结构方面的差异还着重在表22A呈现的近端胫骨的未脱 钙结构组织形态测定分析中。根据表22A呈现的结果，与假处理相比，所 有OVX组，即对照、胃石、ACC和柠檬酸盐呈现显著更低的小梁骨比例 和缩小的小梁骨值(分别平均55％、19％、32％和55％)。此外，与假处理 相比，小梁骨间距在所有OVX组中显著较高，对照高130％、胃石高30％、ACC高60％和柠檬酸盐高148％(表22A)。与对照相比，在OVX组内， 胃石和ACC分别呈现显著高平均80％和50％的小梁骨比例和小梁骨数量， 且低44％和31％的小梁骨间距。与对照相比，柠檬酸盐组呈现显著高13％ 的小梁骨厚度。在胃石和ACC组之间的结构组织形态学参数的比较揭示 在骨比例、小梁骨数量和小梁骨间距方面的显著差异。根据表22A，与ACC 相比，胃石组分别呈现高19％和21％的骨比例和小梁骨数量，且与ACC 相比，低20％的小梁骨间距值。

[0625] 表22:来自胫骨近端的未脱钙的切片的组织形态测定分析

[0626]

			OVX			
		假处理	对照	胃石	ACC	柠檬酸盐
(A) 结构	**BV/TV, %	28.5^{a} (4.1)	12.8^{b} (2.1)	23^{c} (3.3)	19.4^{d} (2.8)	12.8^{b} (1.4)
	**Tb. N, mm^{-1}	5.6^{a}	2.5^{b}	4.5^{c}	3.7^{d}	2.3^{b}

[0627]

		(0.6)	(0.5)	(0.4)	(0.8)	(0.3)
	**Tb. Sp, μm	128[a] (25)	296[b] (44)	166[c] (15)	205[d] (43)	318[b] (42)
	*Tb. Th, μm	51.2[ab] (6.2)	47.1[a] (6.0)	51.6[ab] (7.1)	54.8[b] (7.7)	53[b] (9.9)
(B) 动态	**BFR/BS, μm²/μm/天	0.145[a] (0.026)	0.164[a] (0.021)	0.214[b] (0.025)	0.206[b] (0.027)	0.159[a] (0.019)
	**MS/BS, %	8.04[a] (1.53)	8.31[a] (1.42)	11.61[b] (1.36)	11.09[b] (1.18)	8.25[a] (1.44)
	MAR, μm/天	1.26 (0.26)	1.30 (0.19)	1.34 (0.25)	1.29 (0.21)	1.40 (0.20)

[0628] (A)从4μm染色的切片(MacNeal)分析结构参数。(B)从用钙黄绿素荧光染料双标记的未脱钙 的切片分析动态参数。使用BIOQUANT图像分析软件(Bioquant OSTEO,版本7.20.10)计算所有 的值。单因素ANOVA:*p<0.05,**p<0.01。字母代表Fisher-LSD事后比较检验。

[0629] 动态组织形态测定分析的结果列于表22B中。根据结果,与假处理相 比,在OVX对照组和柠檬酸盐组的向骨表面的骨形成率(bone formation rate to bone surface,BFR/BS)和向骨表面矿化表面(mineralizing surface to bone surface,MS/BS)方面没有观察到显著差异。在另一方面,与假处理 相比,OVX胃石和ACC的骨形成率高53%和50%,且与假处理相比,OVX 胃石和ACC的MS/BS分别呈现44%和38%的相似升高。与对照相比,在 OVX组内,胃石和ACC分别呈现显著高38%和35%的骨形成率,和显著 高40%和33%的MS/BS。OVX柠檬酸盐组与对照没有呈现显著不同,但 来自胃石的28%的和来自ACC的26%的统计学上较低的骨形成率。OVX 柠檬酸盐组的MS/BS与对照的MS/BS相似,且比胃石组和ACC组的分别显著低29%和26%。

[0630] 矿物质沉积率(MAR)揭示,与假处理相比,在所有OVX组中无显 著差异,且与对照相比,OVX胃石、ACC和柠檬酸盐的无差异。表23呈 现了,EIA试剂盒在实验结束时(第90天)由每组的血清骨钙素(OC) 形成标志物和尿脱氧吡啶啉(DPD)再吸收标志物评估骨转换。评价了两 种标志物的基线,随后随机化(在第0天,数据未显示)。

[0631] 表23:在第90天时评估每个组的血清骨钙素(OC)形成标志物和尿 脱氧吡啶啉(DPD)再吸收标志物

[0632]

	假处理	OVX			
		对照	胃石	ACC	柠檬酸盐
*DPD (nmol/mmol Cr)	13.75[a] (5.44)	36.65[be] (31.16)	29.823[bd] (16.56)	22.59[ad] (11.09)	43.55[e] (22.97)
OC (ng/ml)	10.0[a] (4.8)	14.8[a] (6.4)	14.72[a] (8.7)	12.7[a] (6.8)	15.7[a] (8.4)

[0633] 单因素ANOVA:*p<0.05。

[0634] 在第90天时,与假处理相比,在所有OVX组中观察到显著较高的 DPD水平,ACC组除外,ACC组呈现与假处理无显著差异,且与对照组 (39%)、和柠檬酸盐组(48%)相比显著较低的DPD水平。胃石组与对 照相比呈现较低的水平(19%),且与ACC组相比较高的水平(32%)。来 自胃石的DPD水平不比柠檬酸盐统计上低,但呈现31%的差异。在血清 OC标志

物方面,在任何组之间没有观察到显著变化。

[0635] 来自第五腰椎的机械强度分析的结果示于图10。根据结果,与假处理 相比,OVX对照、胃石和柠檬酸盐的机械强度性质分别显著降低了平均 41%、40%和40%。然而,与假处理相比,ACC组的机械强度值显著降低 了平均17%。这些差异在评估的大多数参数上是统计学显著的,除了极限 承载力参数无统计学差异(图10D)。与对照相比,在OVX组内,ACC组在每个测试的参数中呈现显著更高的值:极限承载力(图10A)、极限承载 力的能量(图10B)、韧性(图10C)和屈服能量(图10D)分别高平均 37%、49%、29%和65%。这些差异还反映在OVX ACC与胃石和柠檬酸 盐组相比的较高值中,分别高平均42%和37%。OVX胃石和柠檬酸盐组 与对照或其之间在测试的任何机械强度参数方面没有呈现任何统计学差 异。

[0636] 第4腰椎的显微CT分析显示,小梁骨模式因子(TBPf)在假处理组 比在OVX-对照、OVX-胃石和OVX-柠檬酸盐组低得多(平均91%)。然 而,假处理组的TBPf比对OVX-ACC组测量的TBPf低(61%)。在OVX 组内,OVX-ACC组的TBPf比OVX-对照、OVX-柠檬酸盐和OVX-胃石组 的TBPf显著低平均33%(图10E;$p<0.001$)。结构模型指数(SMI)评估 指出相同趋势,与OVX-对照、OVX-胃石和OVX-柠檬酸盐组相比,在假 处理组中显著降低(平均43%)。然而,假处理组的SMI比对OVX-ACC 组测量的SMI更低(30%)。此处,对OVX-ACC组获得的值比对OVX-对照和OVX-柠檬酸盐组测量的值显著更低(平均14%)。同时,对 OVX-ACC组获得的SMI值相对于对OVX-胃石组测量的指数减少了(图 10F;$P<0.001$)。与OVX-对照、OVX-胃石和OVX-柠檬酸盐组相比,测量 的最后一个微结构参数,即各向异性度(DA),在假处理组中降低了平均22%。在假处理和OVX-ACC组之间,或所有OVX组之间没有观察到DA 的显著差异,虽然OVX-ACC显示比对其他OVX组测量的低的值(图10G; $P<0.001$)。

[0637] 实验细节

[0638] 动物

[0639] 将具有250±16g的平均体重的一百零一只16-17周龄雌性Sprague Dawley大鼠(Harlan Inc.,Jerusalem,Israel)群养在33个笼子里(~3只大 鼠/笼子),并在控制室内条件(21±2℃和12-小时暗-光周期)下适应。在 7天适应期间,大鼠饲以包含1%元素钙的标准实验室饮食(#2018SC大 鼠饲料,Harlan Inc.Jerusalem,Israel)和自由采食去离子水。7天适应阶段 后,将大鼠在代谢笼中单独饲养,并剥夺食物和水18h。从各代谢漏斗收集尿,并保存在-80℃用于未来分析在基线时(时间0)骨再吸收生化标志 物。

[0640] 对于施用不同钙源,制备包含特殊的食物颗粒。包含0.02%钙的低钙 啮齿类粒料(大鼠饲料#TD95027Harlan Inc.,Jerusalem,Israel)被精细地 磨碎,并分别与四种不同的钙源混合。对照混合物包含来自商品化补充剂 的碳酸钙(混合物A),胃石混合物包含从澳大利亚鳖虾红鳖鳖虾收获的胃 石粉(混合物B)(Ben's farm,Beer Tzofar,Israel),ACC混合物包含稳定的 无定形碳酸钙和P-丝氨酸(P-Ser)(混合物C)(Batch#ETS001,Amorphical Ltd.,Beer-Sheva,Israel)和柠檬酸盐混合物包含来自商品化补充剂的柠檬酸钙(混合物D)。每一混合物分别制粒并室温下保持在密封袋中。

[0641] 在尿液取样后立即,大鼠使用腹腔内(IP)注射包含氯胺酮(Fort Dodge AH Ltd.Overland Park,USA)和甲苯噻嗪(EuroVet AH Ltd.Bladel,UK)的 麻醉剂溶液(0.1ml/100g)来麻醉。从大鼠的尾部抽取血液(大约180μl) 并使用台式离心机(Hettich Zentrifugen,Bach,Switzerland)以3000g离心 10分钟用于血清提取。血清样品储存在-80

℃下用于未来分析在基线时(时 间0)骨形成的生化标志物。

[0642] 将大鼠随机分配并根据其分配的五组操作:假处理(假处理-卵巢切除 的)用混合物A喂食,且其他四组使用根据Lasota和Danowska-Klonowska (2004)Rocz Akad Med Bialymst 49Suppl 1:129-131的双侧背侧方法来切除 卵巢(OVX),并分为OVX对照(用混合物A喂食)、OVX胃石(用混合 物B喂食)、OVX ACC(用混合物C喂食)和OVX柠檬酸盐(用混合物D喂食)。操作后,在与适应阶段相同的条件下对大鼠提供7天恢复期,自 由采食标准实验室饮食和包含1.5ml/400ml安乃近(Vitamed Ltd., Binyamina,Israel)和1mg/kg恩氟沙星(Buyer Ltd.Leverkusen,Germany) 的去离子水。

[0643] 实验处理

[0644] 在恢复期结束时,将大鼠根据组的分配,在如上述相同的控制室内条 件下群养在47只笼子中(2只大鼠/笼)。在整个处理期间(90天)提供自 由采食的分配的补充剂颗粒和去离子水。每周记录食物摄入和体重(表2)。 对于动态组织形态学分析,荧光染料钙黄绿素(20mg/kg体重, Sigma-Aldrich,Israel)在第76和86天时IP注射至所有大鼠。第90天时,将大鼠在代谢笼中单独饲养,并剥夺食物和水18h。从各代谢漏斗收集尿, 并保存在-80℃用于未来在试验结束(时间90)时分析骨再吸收生化标志 物。在尿取样后立即,提取血清样品用于评价第90天的形成生化标志物 并以如在第0天时描述的相同方式保存。通过CO_2处死所有大鼠。将右股 骨和第4腰椎切下,包裹上浸有生理盐水缓冲液的纱布垫,并保存在-80℃ 用于测量骨显微CT扫描。将第五腰椎储存在与右股骨相同的条件下用于 机械测试。将右胫骨解剖并立即放置在4℃下3.7%甲醛溶液(F1636, Sigma-Aldrich,Israel)中24h用于结构和动态组织形态学测量。

[0645] 微型计算机断层扫描(μCT)扫描

[0646] 右股骨和第4腰椎的小梁骨和皮质骨微结构使用μCT扫描仪(Skyscan 1174, Kartuizersweg Kontich,Belgium)进行分析。扫描仪对于骨矿物质密 度(BMD)的校准根据制造商说明书使用具有0.25和0.75g/cm^3密度的指 定的大鼠模型杆(Skyscan, Kartuizersweg Kontich,Belgium)进行。

[0647] 扫描分析之前,将股骨和第4腰椎从-80℃中取出,转移至用70%乙醇 浸泡的新纱布垫中,并放置在装有70%乙醇的塑料瓶中(根据制造商指导)。 每个股骨的远端区域以13.8μm的各向同性分辨率扫描小梁骨和皮质骨参 数。使用Skyscan Nrecon软件(版本1.6.4,Skyscan)应用改进的算法进 行重建。将感兴趣的体积(VOI)设置到生长板下0.5mm,并远端延伸1.5 mm。在VOI内的小梁骨和皮质段,使用扫描仪配有的CTan分析软件(版 本1.11Skyscan),通过每～5片描绘椭圆形轮廓来提取。小梁骨和皮质 BMD、骨体积(BV/TV,%)、小梁骨数量(Tb.N)、小梁骨厚度(Tb.Th, μm)、小梁骨间距(Tb.Sp,μm)由CTan分析仪软件(版本1.11Skyscan) 自动计算。

[0648] 来自每只大鼠的第4腰椎以13.8μm各向同性分辨率进行扫描且将 VOI设置为覆盖从椎体的中心的2.0mm厚横截面。在椎体中评价小梁骨 和皮质骨参数,设置覆盖2-mm厚横截面的VOI,在颅生长板下0.14mm 开始。除了对股骨远端研究的相同的小梁骨和皮质骨参数外,还在椎体中 测量了拓扑学参数:即小梁骨模式因子(TBPf)和结构模型指数(SMI);和小梁取向参数,各向异性度(DA)。

[0649] 组织形态测定

[0650] 将右胫骨从甲醛溶液中取出,并通过乙醇梯度脱水,使用二甲苯 (24250521,Bio-Lab Ltd.Haifa,Israel)清洁,并用80%甲基丙烯酸甲酯 (MMA;M5599,Sigma Aldrich,Rehovot,Israel)+20%邻苯二甲酸二丁酯 (DBP;61-5062,Merck Ltd.,Hohenbrunn,Germany)在4℃下渗透3天。然后 将标本转移至MMA+DBP+过氧化苯甲酰(617008,Merck Ltd, Hohenbrunn,Germany)溶液中在4℃下渗透另外6天。渗透过程后,将标本 在温度梯度(从38℃至50℃历时4天)下包埋在MMA+DBP+2.5%过氧 化苯甲酰中。使用与碳化钨刀(Disposable blade;TC65,Rhenium Inc. Bet-Nekufa,Israel)连接的Lecia RM 2025切片机(Lecia Instruments Ltd, Petach Tikva,Israel),从每个样品切割正中矢状(4μm)未脱钙切片。大部 分切片用McNeal's tetrachrome染色用于结构组织形态测定。其余切片保留 未染色用于动态组织形态测定。

[0651] 使用与配备荧光光源的显微镜(Nikon Optiphot 2,Kingston,England) 连接的半自动分析系统(Bioquant OSTEO,版本7.20.10,BIOQUANT Image Analysis Corporation Nashville,USA)获得胫骨近端干骺端的结构和动态组 织形态测定两者的测量。

[0652] 组织形态学参数诸如骨体积(BV/TV,%)、小梁骨数量(Tb.N)、小 梁骨厚度(Tb.Th,μm)、小梁骨间距(Tb.Sp,μm)、骨形成率/骨样品 (BFR/BS)、矿化表面/骨表面(MS/BS)和矿物质沉积率(MAR)使用 BIOQUANT图像分析软件(Bioquant OSTEO,版本7.20.10)来计算。

[0653] 评价骨转换生化标志物

[0654] 血清骨钙素(OC)浓度由EIA试剂盒(#BT-490,Biomedical Technologies Inc.Stoughtone,USA)按照1:10血清稀释来确定。

[0655] 尿脱氧吡啶啉(DPD)浓度由商品化EIA试剂盒(#8007,Qudiel Inc.San Diego,USA)按照1:50稀释来确定。将DPD水平对肌酸酐水平标准化 (#8009,Qudiel Inc.San Diego,USA)。

[0656] 第5腰椎的机械强度

[0657] 机械性质(极限承载力、极限承载力的能量、韧性和屈服能量)获自 第5腰椎体(L5)的耐压试验。通过使用卡尺测量椎体高度和尾径和颅径 的平均值进行材料性质的计算。横截面面积(CSA)和骨体积(BV)通过 μCT扫描所覆盖的包括小梁骨和皮质壳两者的整个骨来获得。

[0658] 统计分析

[0659] 结果在本文中表示为平均值±SEM。使用STATISTICA6.1软件(StaSoft, Tulsa,OK)进行单因素ANOVA和Fisher-LSD事后比较检验。p值<0.05被 认为是显著。

[0660] 上述试验的结果证实,在易发生骨质疏松症的研究组中,稳定的ACC 比CCC对骨矿物质密度和其他骨参数具有更高的效应。ACC的优良生物 利用度允许其用于阻止或延缓代谢性骨紊乱、疾病和状况的发作的用途。

[0661] 虽然本发明的实施方案通过举例的方式已被描述,但应理解,本发明 可以进行许多变化、修改和改编,并不超出权利要求书的范围。

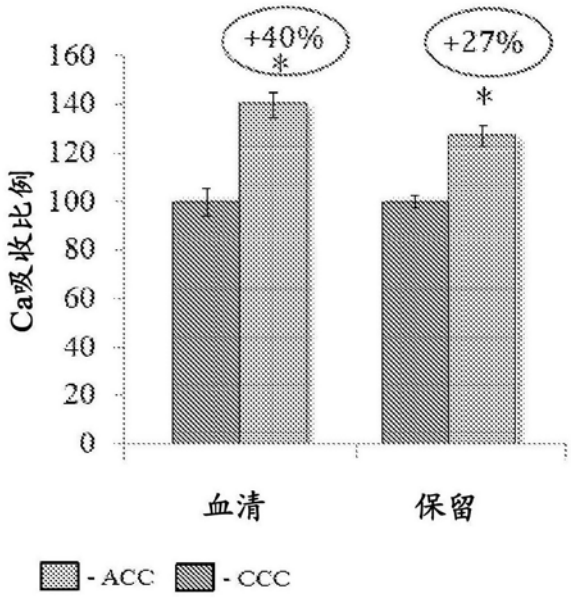

+40%
*
+27%
*
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Ca吸收比例
血清
保留
- ACC
- CCC

图1

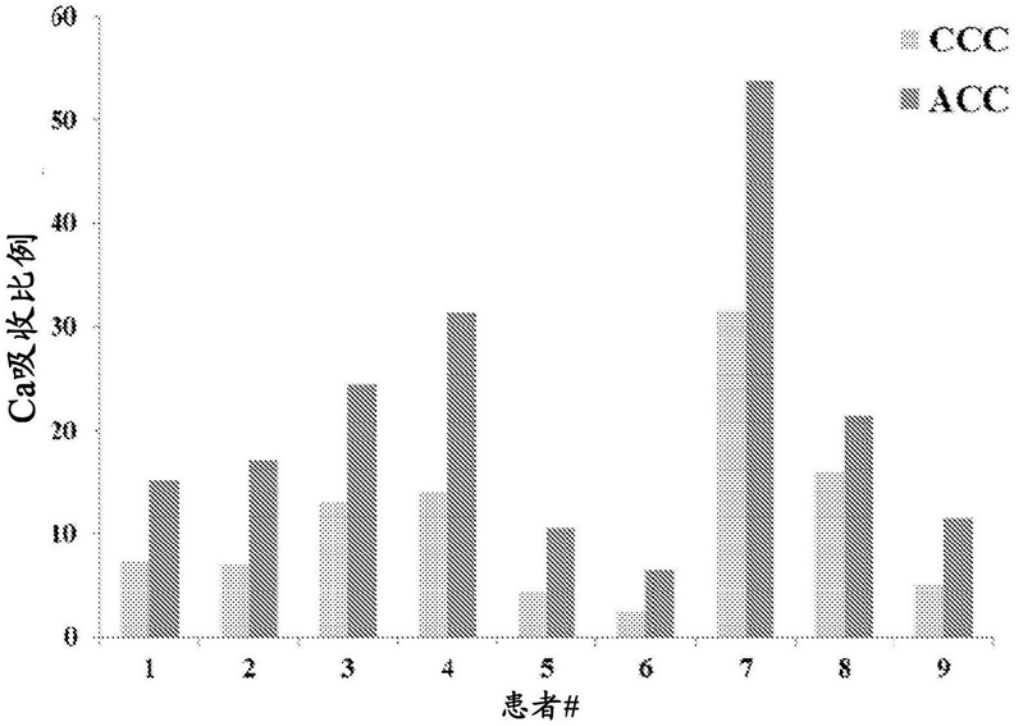

60
50
40
30
20
10
0
Ca吸收比例
CCC
ACC
1
2
3
4
5
6
7
8
9
患者#

图2

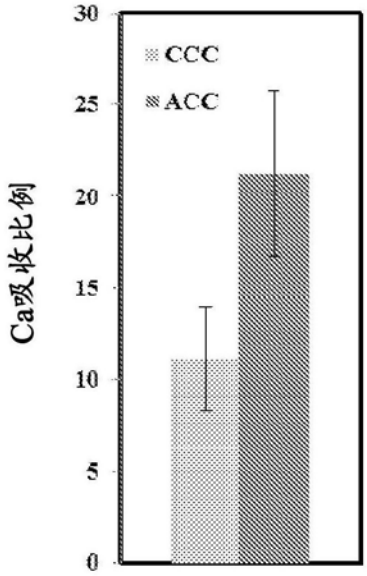

30
25
20
15
10
5
0
CCC
ACC
Ca吸收比例

图3

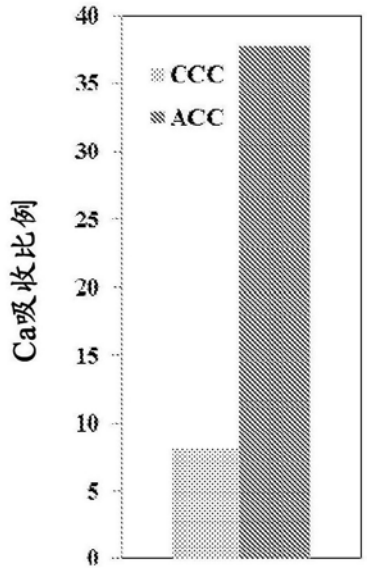

40
35
30
25
20
15
10
5
0
CCC
ACC
Ca吸收比例

图4

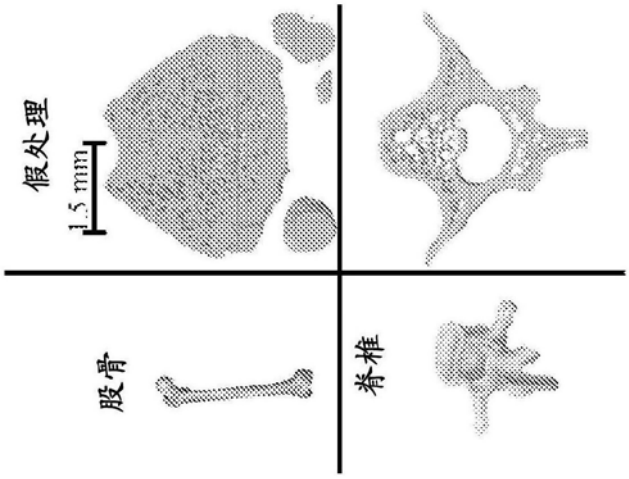


图5A

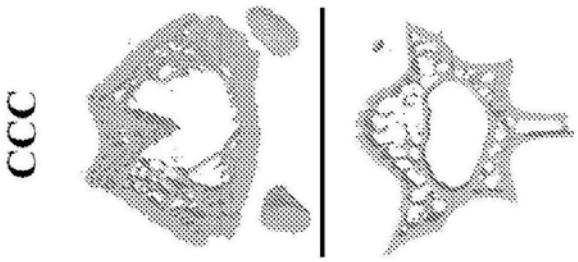


图5B

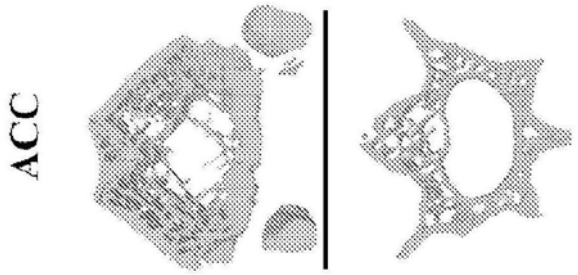


图5C

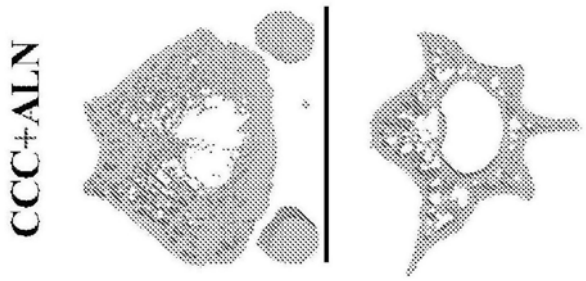

CCC+ALN

图5D

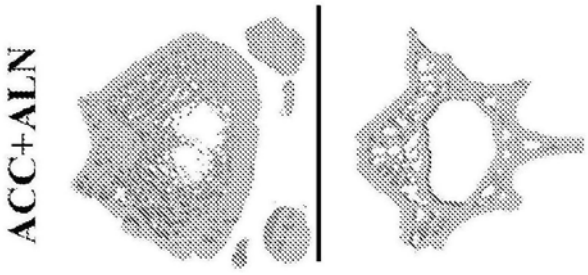

ACC+ALN

图5E

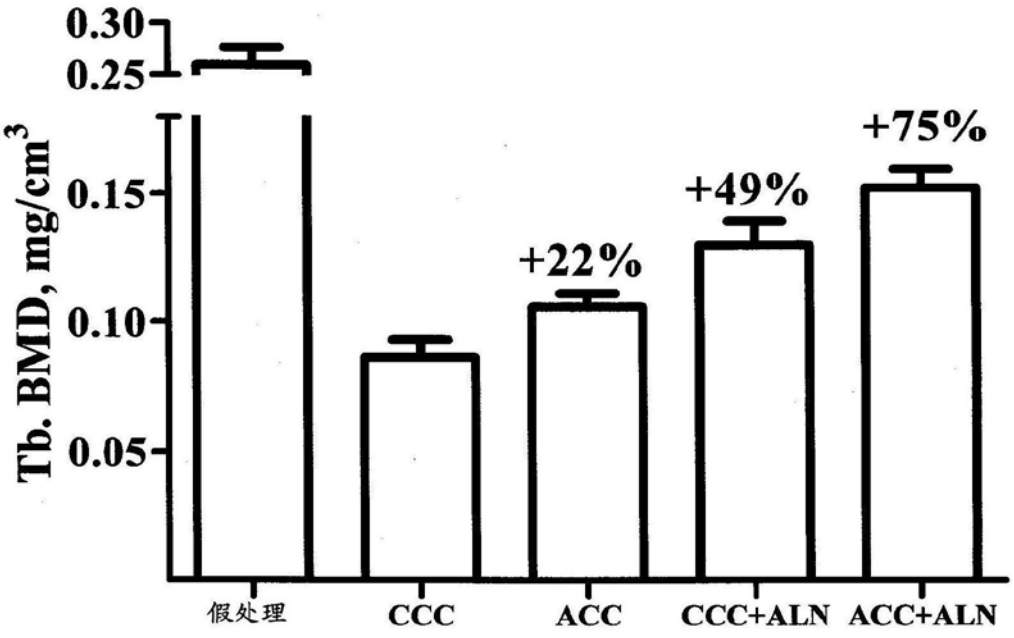

0.30
0.25
0.15
0.10
0.05
Tb. BMD, mg/cm3
+22%
+49%
+75%
假处理
CCC
ACC
CCC+ALN
ACC+ALN

图6A

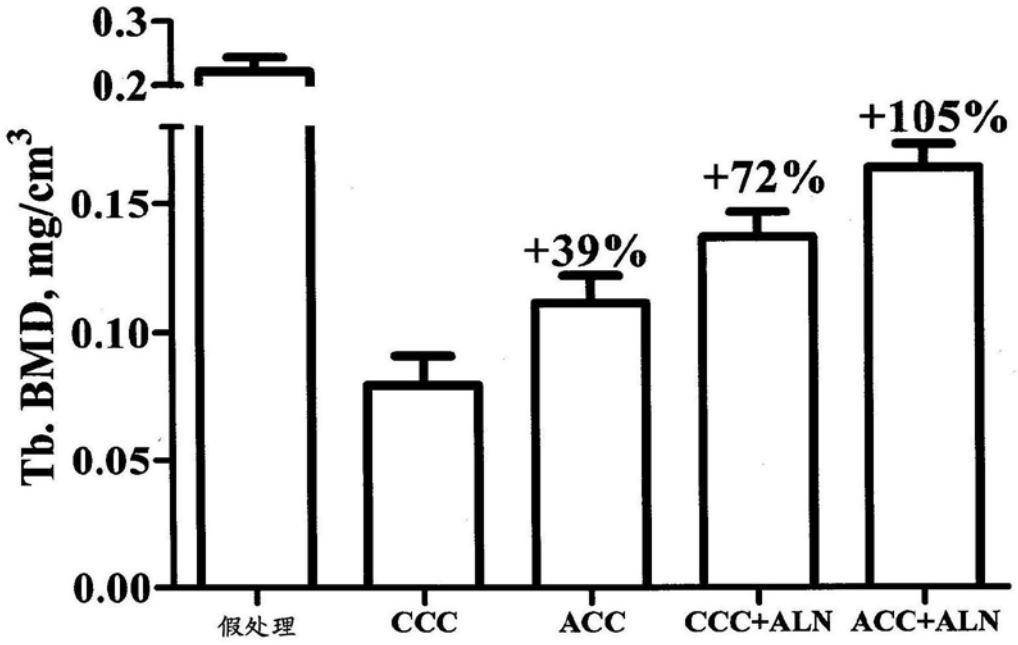

0.3
0.2
0.15
0.10
0.05
0.00
Tb. BMD, mg/cm3
+39%
+72%
+105%
假处理
CCC
ACC
CCC+ALN
ACC+ALN

图6B

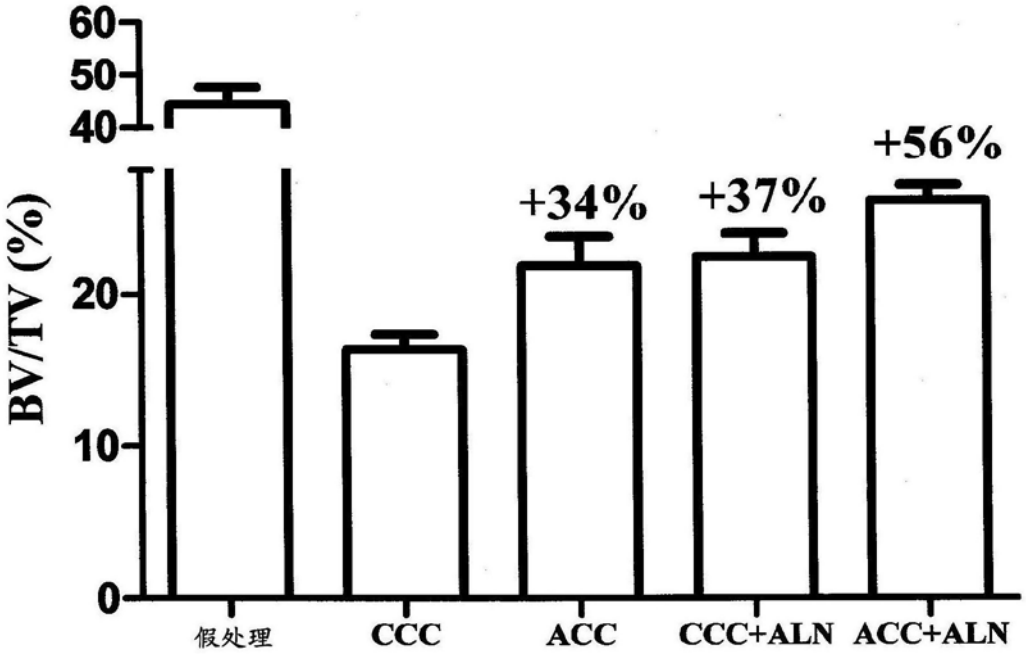

60
50
40
20
10
0
BV/TV (%)
+34%
+37%
+56%
假处理
CCC
ACC
CCC+ALN
ACC+ALN

图6C

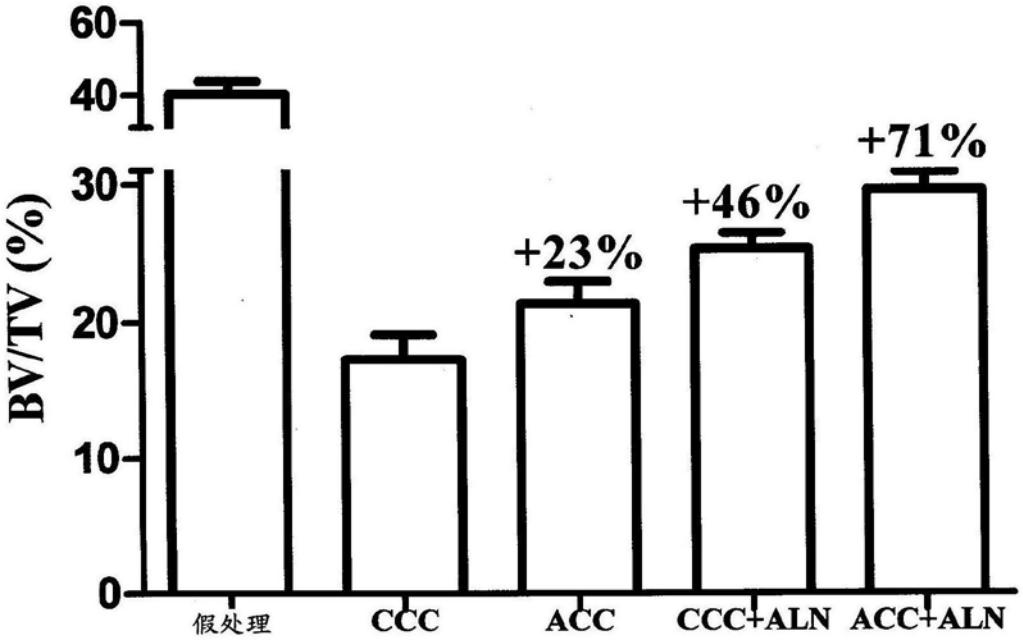

60
40
30
20
10
0
BV/TV (%)
+23%
+46%
+71%
假处理
CCC
ACC
CCC+ALN
ACC+ALN

图6D

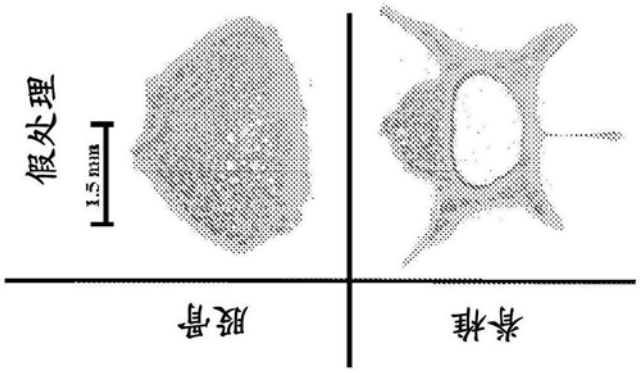

假处理
1.5 mm
胫骨
脊椎

图7A

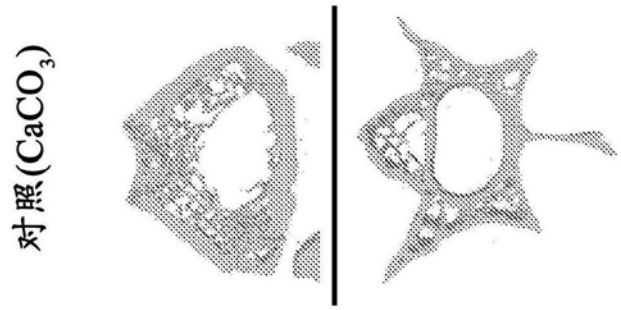

对照($CaCO_3$)

图7B

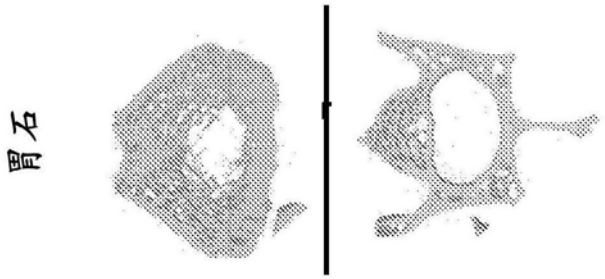


图7C

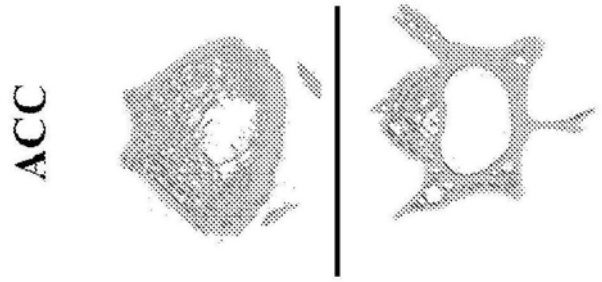


图7D

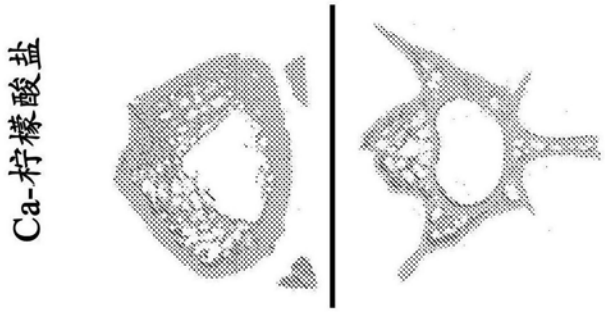


图7E

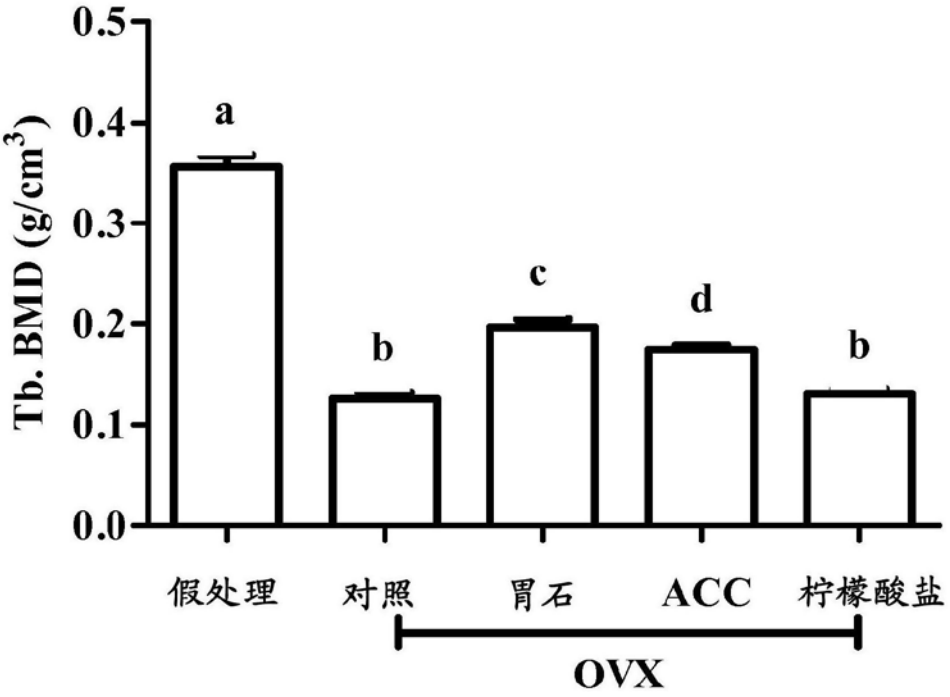

0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
Tb. BMD (g/cm3)
a
b
c
d
b
假处理
对照
胃石
ACC
柠檬酸盐
OVX

图8A

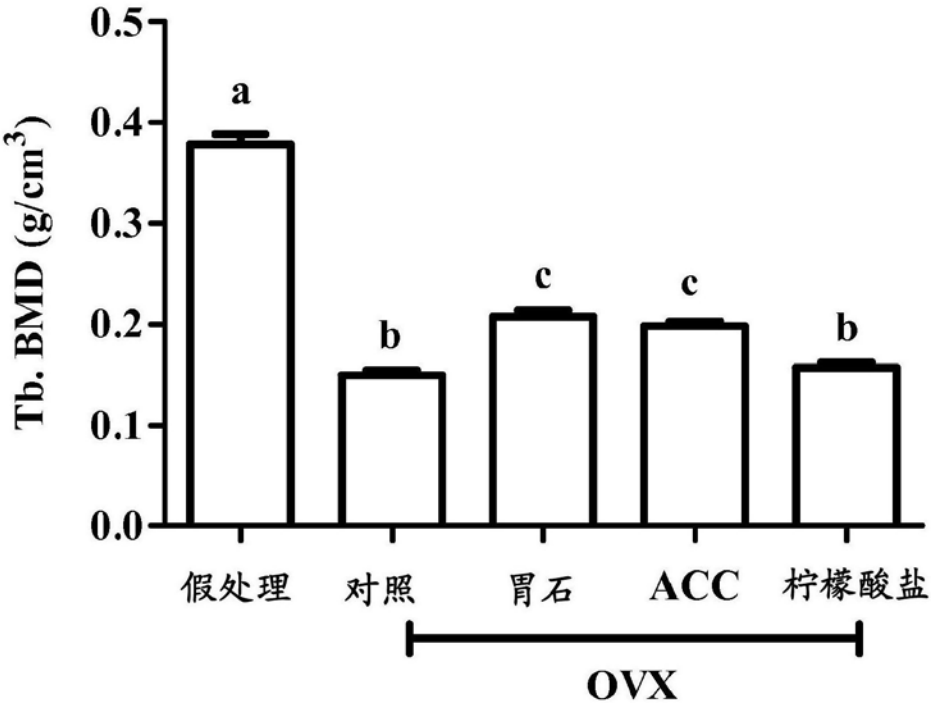

0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
Tb. BMD (g/cm3)
a
b
c
c
b
假处理
对照
胃石
ACC
柠檬酸盐
OVX

图8B

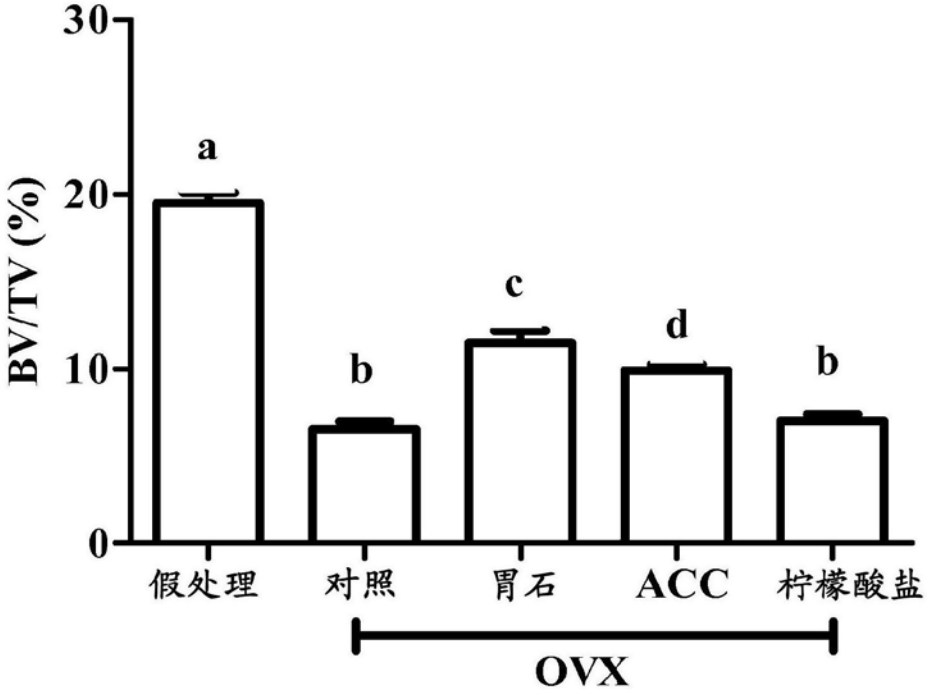

30
20
10
0
BV/TV (%)
a
b
c
d
b
假处理
对照
胃石
ACC
柠檬酸盐
OVX

图9A

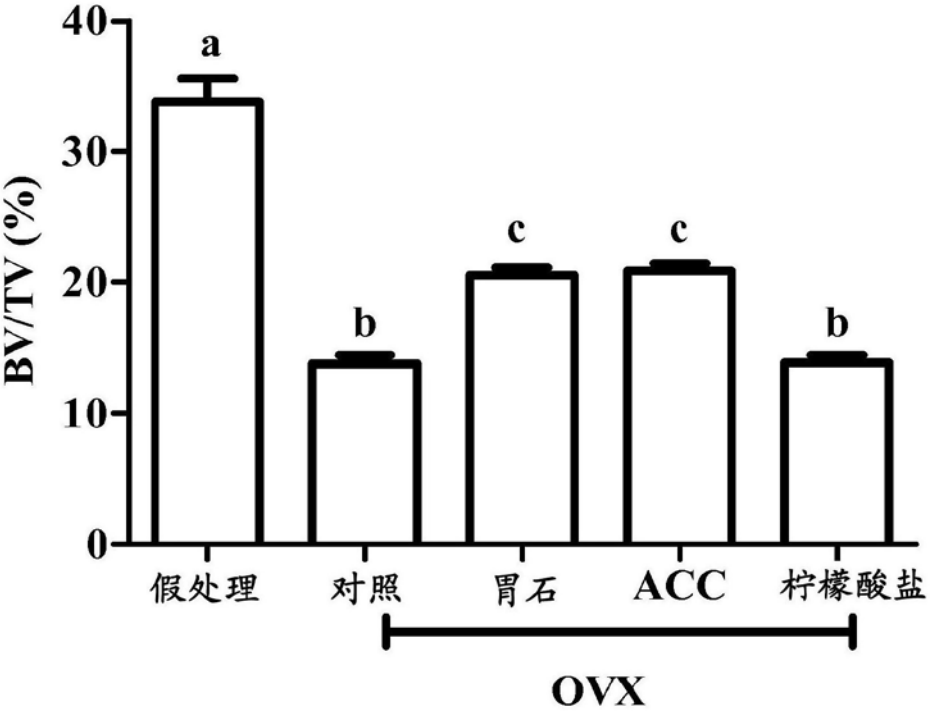

40
30
20
10
0
BV/TV (%)
a
b
c
c
b
假处理
对照
胃石
ACC
柠檬酸盐
OVX

图9B

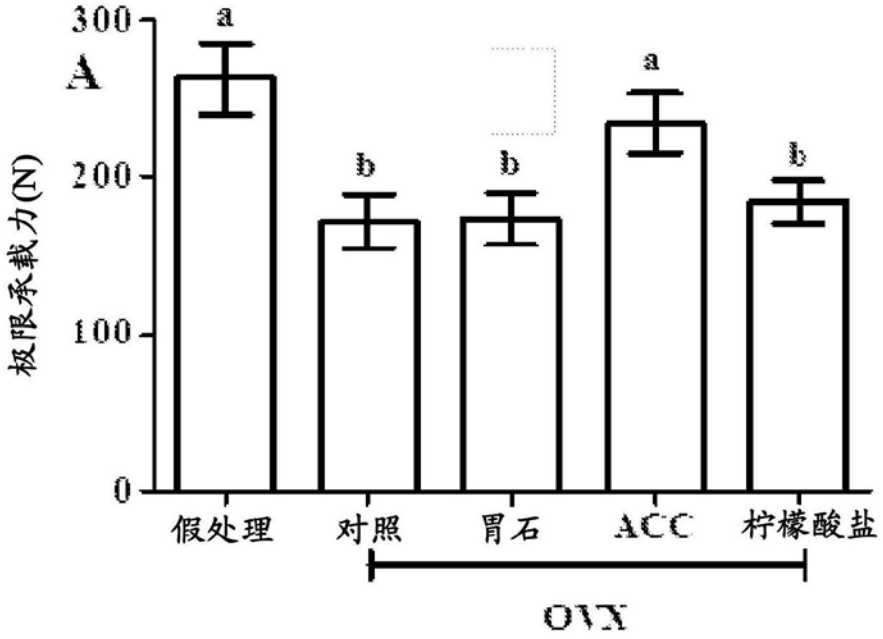

A
极限承载力(N)
300
200
100
0
a
b
b
a
b
假处理
对照
胃石
ACC
柠檬酸盐
OVX

图10A

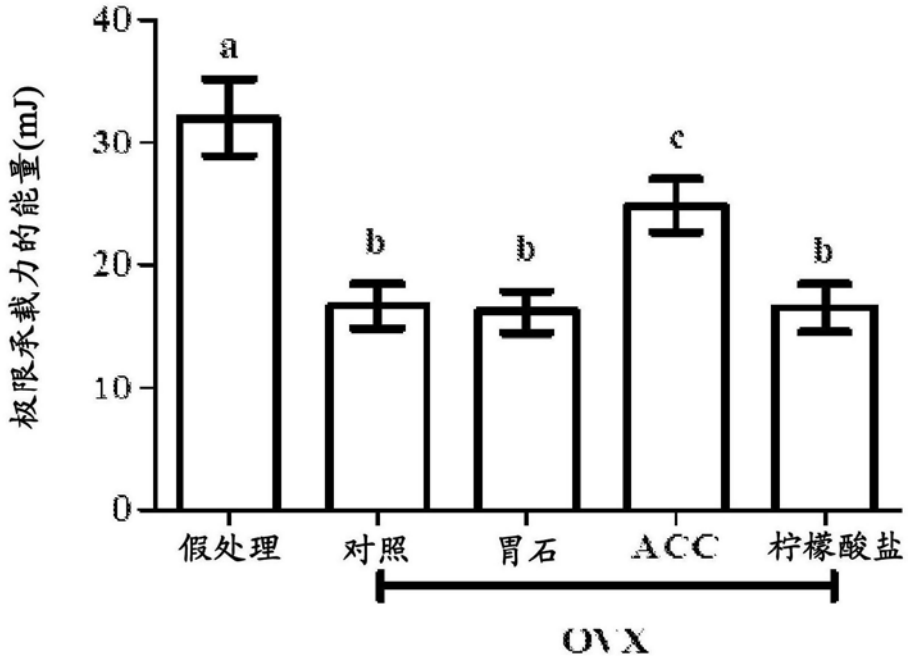

极限承载力的能量(mJ)
40
30
20
10
0
a
b
b
c
b
假处理
对照
胃石
ACC
柠檬酸盐
OVX

图10B

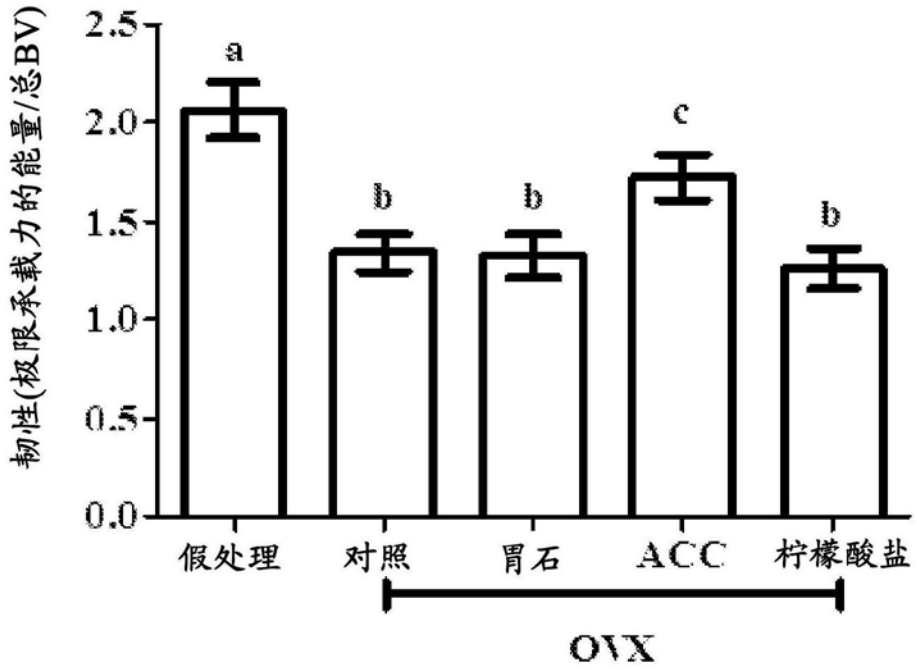

韧性(极限承载力的能量/总BV)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
a
b
b
c
b
假处理
对照
胃石
ACC
柠檬酸盐
OVX

图10C

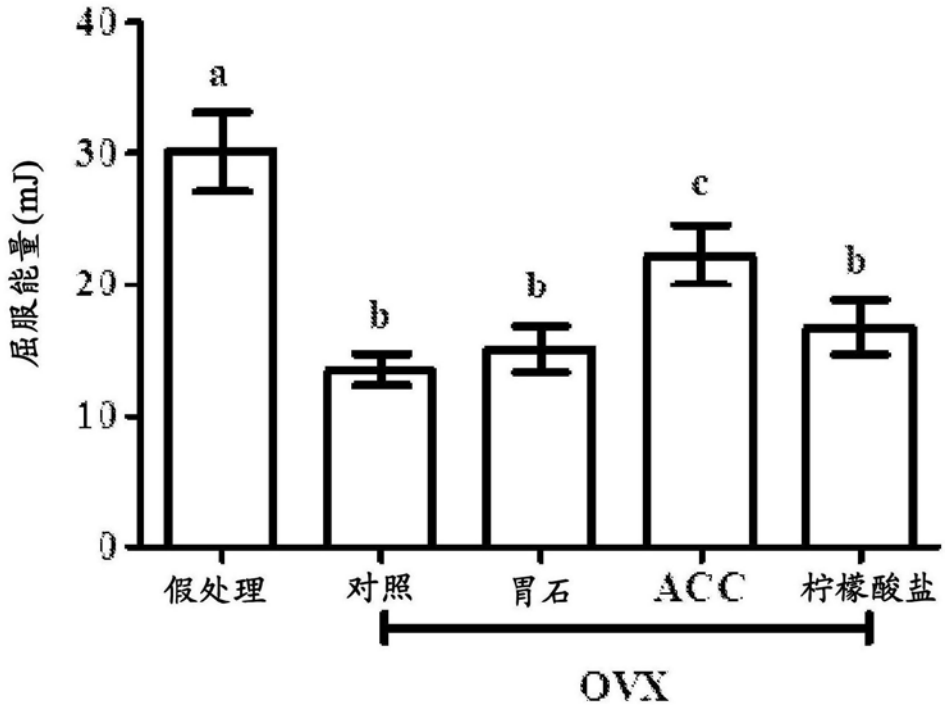

屈服能量(mJ)
40
30
20
10
0
a
b
b
c
b
假处理
对照
胃石
ACC
柠檬酸盐
OVX

图10D

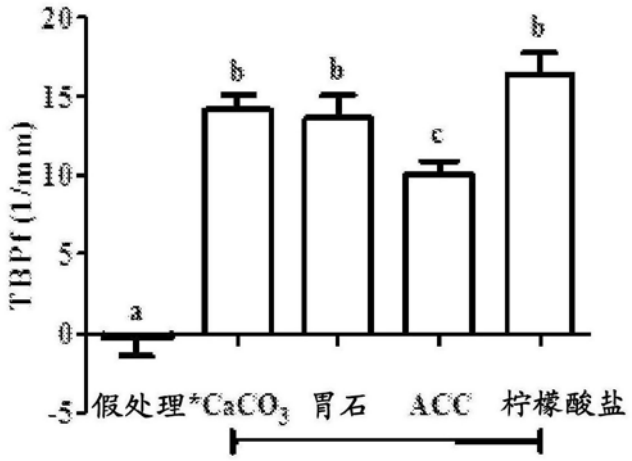

TBPf (1/mm)
20
15
10
5
0
-5
a
b
b
c
b
假处理
*CaCO3
胃石
ACC
柠檬酸盐

图10E

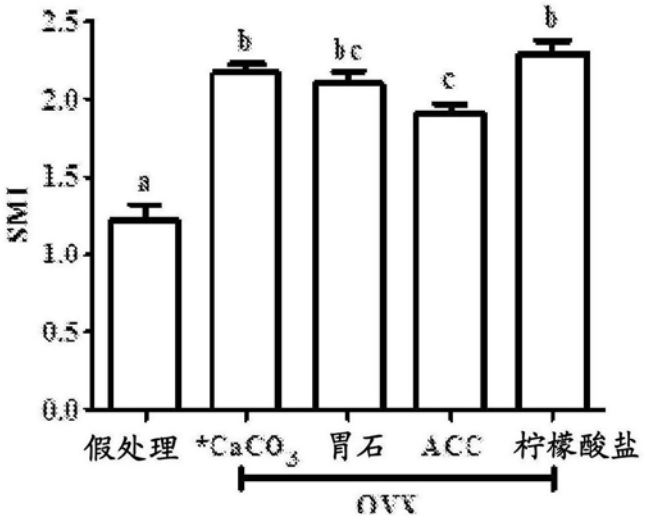

SMI
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
a
b
bc
c
b
假处理
*CaCO3
胃石
ACC
柠檬酸盐
OVX

图10F

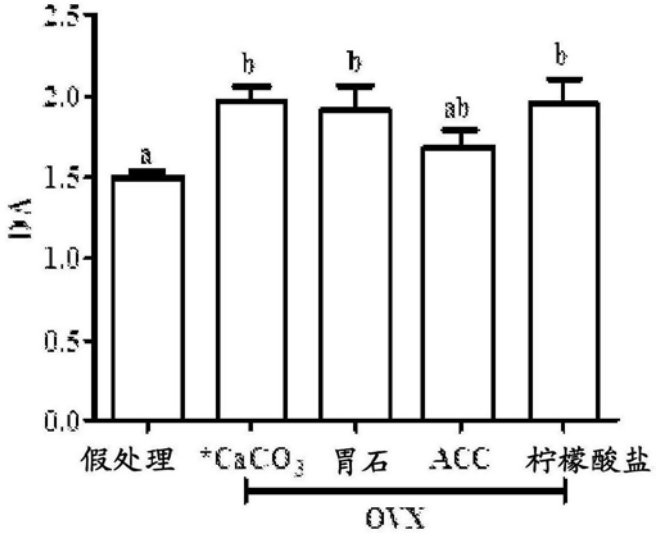


图10G