



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I756495 B

(45)公告日：中華民國 111 (2022) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：107141816

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 11 月 23 日

(51)Int. Cl. : A61K31/661 (2006.01)

A61P19/08 (2006.01)

A61P19/10 (2006.01)

(30)優先權：2017/12/07 美國

62/595,697

(71)申請人：休斯生物科技股份有限公司 (中華民國) HUGHES BIOTECHNOLOGY CO., LTD
(TW)

臺北市信義區基隆路一段 420 號 12 樓之 2

(72)發明人：王上達 WANG, SHANG-TA (TW)；許宸 HSU, CHEN (TW)；蘇南維 SU, NAN-WEI
(TW)

(74)代理人：陳豫宛

(56)參考文獻：

US 2002/0111466A1

審查人員：蔡明秀

申請專利範圍項數：17 項 圖式數：6 共 30 頁

(54)名稱

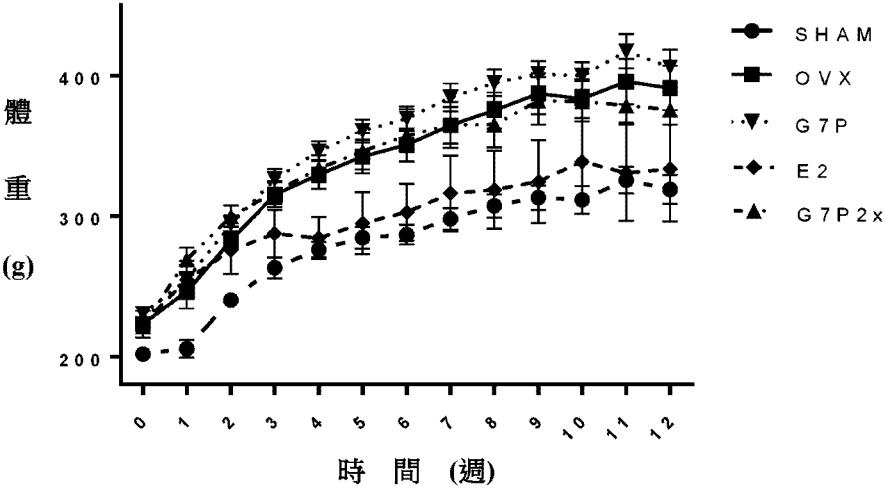
用以治療或預防與骨量減少相關疾病、改善骨骼結構及提高骨骼生物力學強度之方法

(57)摘要

本發明提供一種用以治療或預防與骨量(bone mass)減少相關疾病之方法，其包含：對需要此治療的使用者施用一組合物，該組合物包含一有效量之金雀異黃酮磷酸酯衍生物。本發明亦提供一種改善骨骼結構(architecture)及骨骼生物力學強度之方法，其包含：對需要此治療的使用者施用一組合物，該組合物包含一有效量之金雀異黃酮磷酸酯衍生物。本發明對需要此治療的使用者施用包含有效量之金雀異黃酮磷酸酯衍生物之組合物可有效提高口服生物可利用率，以減少更年期婦女的症狀及併發症的風險，提高骨礦物質含量、骨密度及骨骼生物力學強度，並減緩骨質疏鬆症。

The present invention provides a method for treatment or prevention of a disease associated with a decrease in bone mass comprising administering to a subject in need of such treatment a composition comprising an effective amount of genistein phosphate conjugate. The present invention also provides a method of improving bone architecture and bio-mechanical strength of bone comprising administering to a subject in need of such treatment of a composition comprising an effective amount of genistein phosphate conjugate. The present invention administering to a subject in need of such treatment a composition comprising an effective amount of genistein phosphate conjugate can effectively increase the oral bioavailability so as to reduce the symptoms and the risk of complications of menopausal women, increase bone mineral content, bone density and bio-mechanical strength of bone, and slow down osteoporosis.

指定代表圖：



【圖1】



I756495

【發明摘要】

【中文發明名稱】用以治療或預防與骨量減少相關疾病、改善骨骼結構及提高骨骼生物力學強度之方法

【英文發明名稱】METHOD FOR TREATMENT OR PREVENTION OF A DISEASE ASSOCIATED WITH A DECREASE IN BONE MASS AND METHOD OF IMPROVING BONE ARCHITECTURE AND BIO-MECHANICAL STRENGTH OF BONE

【中文】

本發明提供一種用以治療或預防與骨量(bone mass)減少相關疾病之方法，其包含：對需要此治療的使用者施用一組合物，該組合物包含一有效量之金雀異黃酮磷酸酯衍生物。本發明亦提供一種改善骨骼結構(architecture)及骨骼生物力學強度之方法，其包含：對需要此治療的使用者施用一組合物，該組合物包含一有效量之金雀異黃酮磷酸酯衍生物。本發明對需要此治療的使用者施用包含有效量之金雀異黃酮磷酸酯衍生物之組合物可有效提高口服生物可利用率，以減少更年期婦女的症狀及併發症的風險，提高骨礦物質含量、骨密度及骨骼生物力學強度，並減緩骨質疏鬆症。

【英文】

The present invention provides a method for treatment or prevention of a disease associated with a decrease in bone mass comprising administering to a subject in need of such treatment a composition

comprising an effective amount of genistein phosphate conjugate. The present invention also provides a method of improving bone architecture and bio-mechanical strength of bone comprising administering to a subject in need of such treatment of a composition comprising an effective amount of genistein phosphate conjugate. The present invention administering to a subject in need of such treatment a composition comprising an effective amount of genistein phosphate conjugate can effectively increase the oral bioavailability so as to reduce the symptoms and the risk of complications of menopausal women, increase bone mineral content, bone density and bio-mechanical strength of bone, and slow down osteoporosis.

【指定代表圖】圖1。

【代表圖之符號簡單說明】無。

【特徵化學式】無。

【發明說明書】

【中文發明名稱】用以治療或預防與骨量減少相關疾病、改善骨骼結構及提高骨骼生物力學強度之方法

【英文發明名稱】METHOD FOR TREATMENT OR PREVENTION OF A DISEASE ASSOCIATED WITH A DECREASE IN BONE MASS AND METHOD OF IMPROVING BONE ARCHITECTURE AND BIO-MECHANICAL STRENGTH OF BONE

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種用以治療或預防與骨量減少相關疾病之方法，以及改善骨骼結構及骨骼生物力學強度之方法。特別係關於用金雀異黃酮磷酸酯衍生物治療或預防絕經後骨質疏鬆症之方法。

【先前技術】

【0002】 在正常成人中，骨再吸收及骨生成兩者係受嚴格控制，因此，總骨量僅會有少許變化。然而，對於患有與骨量減少相關疾病的患者而言，骨再吸收及骨生成之間會失去平衡，而發生骨量減少及骨組織退化，與骨量減少相關的代表性疾病包括骨質疏鬆症。研究指出，骨質疏鬆症的流行病學絕大多數發生於絕經後婦女，而此類骨質疏鬆症稱為絕經後骨質疏鬆症。

【0003】 治療或預防絕經後骨質疏鬆症的方式相當多，例如服用膳食補充劑或藥物。然而，最廣泛的治療或預防方式為雌激素替代療法(estrogen replacement therapy，ERT)。ERT雖可有效延緩骨密度流失，但也會增加

罹患腫瘤的風險。有鑑於對腫瘤風險的擔憂，對於尋求替代ERT療法的絕經後婦女其使用大豆異黃酮的情況顯著增加。

【0004】金雀異黃酮(Genistein)是一種在大豆中以高濃度存在的植物雌激素，是大豆異黃酮中最具生理活性的化學結構，並且是用於減少絕經症狀的膳食補充劑中的成分。早期研究認為金雀異黃酮具有預防絕經後婦女更年期症狀及併發症的潛力。然而，近期的長期臨床試驗則指出金雀異黃酮在預防更年期症狀及併發症，尤其是骨質流失方面，其功效並不顯著。

【0005】Alekel等人於「用於減少骨質流失之大豆異黃酮(SIRBL)研究：絕經後婦女的3年隨機對照試驗(美國臨床營養學期刊，2010；91:218-30)」(Alekel et al., “The Soy Isoflavones for Reducing Bone Loss (SIRBL) Study: a 3-y randomized controlled trial in postmenopausal woman”, American Journal of Clinical Nutrition 2010;91:218-30)中，研究了從大豆中萃取二種劑量之異黃酮 (80及120 mg/d)對於有一定風險之絕經後婦女的腰椎及股骨近端之骨密度的3年影響，前述大豆萃取物中金雀異黃酮、木質素異黃酮(daidzein)、黃豆素異黃酮(glycitein)三者不配糖苷 (aglycone) 形式的比例為1.3：1.0：0.3，結果顯示大豆異黃酮萃取物並未顯現出骨保護 (bone-sparing)效果，惟在股骨頸處有輕微的效果。Levis等人於「大豆異黃酮預防更年期骨質流失及更年期症狀(內科醫學檔案，2011；171(15):1363-1369)」(Levis et al., “Soy Isoflavones in the Prevention of Menopausal Bone Loss and Menopausal Symptoms”, Archives Internal Medicine 2011;171(15):1363-1369)中，研究了同樣大豆異黃酮萃取物對於預防骨質流失及更年期症狀的影響，結果指出每日施用200 mg大豆異黃酮為期2年

並不能預防骨質流失及更年期症狀。Turner等人於「金雀異黃酮作為每日一次口服補充劑對絕經後骨質流失大鼠模型之脛骨並無有益效果(更年期期刊, 2013年6月; 20(6): 677-686)」(Turner et al., “Genistein delivered as a once daily oral supplement had no beneficial effect on the tibia rat models for postmenopausal bone loss”, Menopause. 2013 Jun; 20(6): 677–686)中, 研究了以3.2 mg/kg B.W.金雀異黃酮作為卵巢摘除大鼠之每日口服補充劑的長期(5個月)影響, 結果顯示此般治療對大鼠的骨量、骨密度或骨結構並無影響。如上所述, 金雀異黃酮預防骨質流失的功效並不顯著, 即使施用高於FDA建議用量(40~50 mg)亦是如此。因此, 本領域亟需一種用於治療骨質疏鬆症及促進骨生長的新穎組合物或方法, 而本發明可滿足此般及其他需求。

【發明內容】

【0006】為克服前述缺陷, 本發明之主要目的在於提供一種用以治療或預防與骨量(bone mass)減少相關疾病之方法, 其包含: 對需要此治療的使用者施用一組合物, 該組合物包含一有效量之金雀異黃酮磷酸酯衍生物。

【0007】於一較佳實施例, 該組合物之金雀異黃酮磷酸酯衍生物之該有效量係約0.5 mg/kg B.W./day至約2.5 mg/kg B.W./day。於一較佳實施例, 該組合物之金雀異黃酮磷酸酯衍生物之該有效量係約0.86 mg/kg B.W./day至約1.73 mg/kg B.W./day。前述該組合物之金雀異黃酮磷酸酯衍生物之該有效量係根據體表面積標準化法 (body-surface-area normalization)獲得, 適用人類之有效量範圍由下式定義:

人類金雀異黃酮磷酸酯衍生物之日劑量

$$= \text{大鼠金雀異黃酮磷酸酯衍生物之有效日劑量} \times \frac{\text{人類體表面積常數}}{\text{大鼠體表面積常數}}$$

【0008】 於一較佳實施例，該組合物係口服施用。

【0009】 於一較佳實施例，該組合物係每日至少施用一次。

【0010】 於一較佳實施例，該組合物於24小時內施用1至6次，以使金雀異黃酮磷酸酯衍生物之日劑量為約0.5 mg/kg B.W.至約2.5 mg/kg B.W.。

【0011】 於一較佳實施例，該組合物係丸劑、錠劑、膠囊劑、顆粒劑、糖漿劑、小瓶劑、或滴劑的形式。

【0012】 於一較佳實施例，該組合物進一步包含一或多種藥學上可接受之佐劑、載體及/或賦形劑。

【0013】 於一較佳實施例，該疾病是原發性骨質疏鬆症。

【0014】 於一較佳實施例，該原發性骨質疏鬆症是因老化、絕經、或卵巢摘除後所導致之骨質疏鬆症。

【0015】 於一較佳實施例，該使用者是哺乳動物。

【0016】 於一較佳實施例，該哺乳動物是人類。

【0017】 於一較佳實施例，該人類是女性。

【0018】 本發明之另一目的在於提供一種改善骨骼結構(architecture)之方法，其包含：對需要此治療的使用者施用一組合物，該組合物包含一有效量之金雀異黃酮磷酸酯衍生物。

【0019】 本發明之另一目的在於提供一種提高骨骼生物力學強度之方法，其包含：對需要此治療的使用者施用一組合物，該組合物包含一有效

量之金雀異黃酮磷酸酯衍生物。

【0020】 於一較佳實施例，該骨骼是股骨。

【0021】 如上所述，與先前技術相比，本發明可減少更年期婦女的症狀及併發症的風險，提高骨礦物質含量、骨密度及骨骼生物力學強度，並藉由對需要此治療的使用者施用包含有效量之金雀異黃酮磷酸酯衍生物之組合物以減緩骨質疏鬆症。

【圖式簡單說明】

【0022】 圖1，係本發明實施例體重增加之線圖。

【0023】 圖2，係本發明實施例子宮重量之長條圖。

【0024】 圖3，係本發明實施例近端股骨之骨礦物質密度(BMD)水平之長條圖。

【0025】 圖4，係本發明實施例近端股骨之骨體積/總體積之長條圖。

【0026】 圖5，係本發明實施例近端股骨之三維微米級電腦斷層掃描(3D μ -CT)圖譜。

【0027】 圖6，係本發明實施例大鼠遠端股骨切片之蘇木精-伊紅(H&E)染色圖。

【實施方式】

【0028】 有關本發明之詳細說明及技術內容，現就配合圖式說明如下。再者，本發明中之圖式，為說明方便，其比例未必照實際比例繪製，該等圖式及其比例並非用以限制本發明之範圍，在此先行敘明。

【0029】 除非另有定義，否則本文所用所有技術和科學術語與本發明所屬技術領域中具有普通知識者通常理解之含義相同。如在本申請中全文

所用，以下用語具有以下含義。

【0030】 除非另有說明，本文所述之「或」表示「和/或」之意。本文中所稱之「包含或包括」意指不排除一或多個其他組件、步驟、操作和/或元素的存在或添加至所述之組件、步驟、操作和/或元素。相似地，本文所述之「包含」、「包括」、「含有」、「囊括」、「具有」也可互相代換而不受限制。本文所述之「一」意指該物的語法對象為一或一個以上(即，至少為一)。

【0031】 本文揭示涉及一種用以治療或預防與骨量減少相關疾病之方法，其包含：對需要此治療的使用者施用一組合物，該組合物包含一有效量之金雀異黃酮磷酸酯衍生物。更進一步地，本文揭示亦涉及一種改善骨骼結構之方法，其包含：對需要此治療的使用者施用一組合物，該組合物包含一有效量之金雀異黃酮磷酸酯衍生物。更進一步地，本文揭示亦涉及一種提高骨骼生物力學強度之方法，其包含：對需要此治療的使用者施用一組合物，該組合物包含一有效量之金雀異黃酮磷酸酯衍生物。

【0032】 本發明亦提供一種組合物，其可在具有顯著較小有害副作用的額外益處下，用於但不限於治療和/或預防骨骼疾病及，前述骨骼疾病例如：絕經後骨質疏鬆症、原發性骨質疏鬆症、或骨密度、骨量及骨礦物質含量之流失；本發明亦提供一種組合物，其可在具有顯著較小有害副作用的額外益處下，改變骨骼結構及骨骼生物力學強度。較佳地，該原發性骨質疏鬆症是因老化、絕經、或卵巢摘除後所導致之骨質疏鬆症。

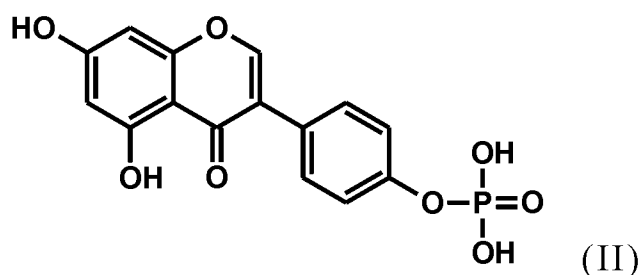
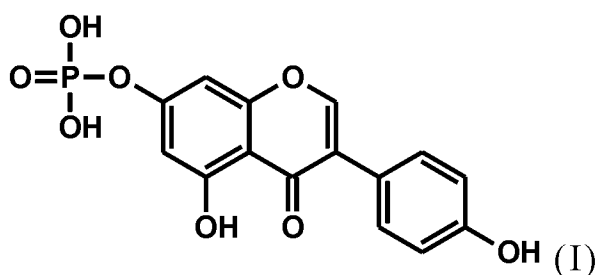
【0033】 本文所述之「使用者」係指哺乳動物及非哺乳動物，其處於風險中或已被確診患有導致骨質流失之病症且受益於本文所述之方法及組合

物者。前述哺乳動物包括但不限於：人類、非人靈長類動物、綿羊、狗、鼠類嚙齒動物(如：小鼠、大鼠等)、天竺鼠、貓、兔、牛、馬；前述非哺乳動物包括但不限於：雞、兩棲類動物及爬行類動物。較佳地，該使用者是人類；更佳地，該人類係女性。

【0034】 本文所述之「治療」定義為，相較於該使用者施用金雀異黃酮磷酸酯衍生物之前的同一症狀而言，當使用者施用金雀異黃酮磷酸酯衍生物後維持或減少一已存在病症之症狀。本文所述之「預防」定義為延遲使用者骨骼疾病(如：骨質流失)發病。

【0035】 本文所述之「金雀異黃酮磷酸酯衍生物(Genistein phosphate conjugate, *P*-GEN)」係一種水溶性且高生物可利用性之化合物。於本發明中，該金雀異黃酮磷酸酯衍生物包括：金雀異黃酮7-氧-磷酸酯(genistein 7-*O*-phosphate, G7P, 下式(I))及金雀異黃酮4'-氧-磷酸酯(genistein 4'-*O*-phosphate, G4'P, 下式(II))。於一較佳實施態樣中，該金雀異黃酮磷酸酯衍生物係經枯草芽胞桿菌變種納豆菌(*Bacillus subtilis* var. natto, 存於臺灣生物資源保存及研究中心，編號BCRC 80517)將金雀異黃酮(genistein)進行生物轉化而得，製備方法可參Hsu等人發表於食物研究國際期刊之研究(2013, 第53篇487-495頁)(Hsu et al., Food Research International 53 (2013) 487-495)。於一較佳實施態樣中，該金雀異黃酮磷酸酯衍生物係一種有效之藥理介入，用以預防及治療骨質流失。於一較佳實施態樣中，該金雀異黃酮磷酸酯衍生物係用於延緩骨密度、骨量及骨礦物質含量之流失，並保持骨骼結構，以維持骨骼力學強度，如：最大負荷能量及彈性係數等。於一較佳實施態樣中，該金雀異黃酮磷酸酯衍生物係一種有效之藥理介入，用以

預防及治療骨質流失相關疾病，如：原發性骨質疏鬆症。前述骨骼更佳係包括脛骨及股骨。



【0036】於一較佳實施態樣中，本發明所述之方法之該金雀異黃酮磷酸酯衍生物該有效量係約0.5 mg/kg B.W./day至約2.5 mg/kg B.W./day，例如但不限於：0.5 mg/kg B.W./day、0.6 mg/kg B.W./day、0.7 mg/kg B.W./day、0.8 mg/kg B.W./day、0.9 mg/kg B.W./day、1.0 mg/kg B.W./day、1.1 mg/kg B.W./day、1.2 mg/kg B.W./day、1.3 mg/kg B.W./day、1.4 mg/kg B.W./day、1.5 mg/kg B.W./day、1.6 mg/kg B.W./day、1.7 mg/kg B.W./day、1.8 mg/kg B.W./day、1.9 mg/kg B.W./day、2.0 mg/kg B.W./day、2.1 mg/kg B.W./day、2.2 mg/kg B.W./day、2.3 mg/kg B.W./day、2.4 mg/kg B.W./day或2.5 mg/kg B.W./day。於一更佳實施態樣中，本發明所述之方法之該金雀異黃酮磷酸酯衍生物該有效量係約0.86 mg/kg B.W./day至約1.73 mg/kg B.W./day，例如但不限於：0.86 mg/kg B.W./day、0.88 mg/kg B.W./day、0.90 mg/kg B.W./day、0.92 mg/kg B.W./day、0.94 mg/kg B.W./day、0.96 mg/kg B.W./day、0.98 mg/kg B.W./day、1.00 mg/kg B.W./day、1.02 mg/kg B.W./day、1.04 mg/kg B.W./day、1.06 mg/kg B.W./day、1.08 mg/kg B.W./day、1.10 mg/kg B.W./day、1.12 mg/kg B.W./day、1.14 mg/kg B.W./day、1.16 mg/kg B.W./day、1.18 mg/kg B.W./day、1.20 mg/kg B.W./day。

B.W./day、1.22 mg/kg B.W./day、1.24 mg/kg B.W./day、1.26 mg/kg
 B.W./day、1.28 mg/kg B.W./day、1.30 mg/kg B.W./day、1.32 mg/kg
 B.W./day、1.34 mg/kg B.W./day、1.36 mg/kg B.W./day、1.38 mg/kg
 B.W./day、1.40 mg/kg B.W./day、1.42 mg/kg B.W./day、1.44 mg/kg
 B.W./day、1.46 mg/kg B.W./day、1.48 mg/kg B.W./day、1.50 mg/kg
 B.W./day、1.52 mg/kg B.W./day、1.54 mg/kg B.W./day、1.56 mg/kg
 B.W./day、1.58 mg/kg B.W./day、1.60 mg/kg B.W./day、1.62 mg/kg
 B.W./day、1.64 mg/kg B.W./day、1.66 mg/kg B.W./day、1.68 mg/kg
 B.W./day、1.70 mg/kg B.W./day、1.72 mg/kg B.W./day或1.73 mg/kg
 B.W./day。於該些方面中，施用可以係通過口服施用、注射(包括肌肉注射
 或皮下注射)、透皮或經皮途徑或通過鼻腔授予施用。於一較佳實施態樣中，
 本發明之方法的施用策略係經口服施用。於一較佳實施態樣中，本發明之
 方法的施用策略係每日至少施用一次。

【0037】於一替代實施態樣中，待施用的該有效量可取決於任何數量的變因，該變因包括但不限於：物種、品種、大小、身高、體重、年齡、使用者的總體健康狀況、製劑類型、型量、方法或施用策略、或骨質疏鬆症的嚴重程度。

【0038】於一較佳實施態樣中，本發明之方法包括一或多個可口服遞送劑量單位，該劑量單位包括金雀異黃酮磷酸酯衍生物的量約0.5 mg至約15 mg，及一或多種藥學上可接受之佐劑、載體、及/或賦形劑。

【0039】本文所述之「賦形劑」係指作為將該金雀異黃酮磷酸酯衍生物遞送至一個體(於本文中或稱使用者)的載劑，其包括與該組合物之金雀

異黃酮磷酸酯衍生物一起配製的任何物質。該賦形劑可有助於潤滑性、流動性、崩解性、味道，並可賦予某種形式的抗菌功能或允許該組合物形成具有所需形狀和稠度的可口服遞送劑量單位。

【0040】 本文所述之「佐劑」係指一物質，當其添加至包含該金雀異黃酮磷酸酯衍生物的該組合物時，可增進或改良該金雀異黃酮磷酸酯衍生物的作用。

【0041】 本文所述之「可口服遞送劑量單位」係指治療組合物之劑量單位，其旨在經由一個體的口腔施用至該個體的胃腸道。於一較佳實施態樣中，該劑量單位可以係丸劑、錠劑、膠囊劑、散裝粉末劑、顆粒劑、溶液劑、糖漿劑、懸浮液劑、小瓶劑、或滴劑的形式。本發明之方法可以係單位劑量的定期施用，例如：一劑量單位施用一日一次至一日多次、每餐一次、或每四小時或其他間隔單位一次。

【0042】 本文所述之「單位劑量」係指該組合物中該金雀異黃酮磷酸酯衍生物的量，其旨在用於一單次施用於治療一個體之量。於一較佳實施態樣中，本發明之該組合物中該金雀異黃酮磷酸酯衍生物的單位劑量係約 1 mg 至約 350 mg，例如但不限於：1.0 mg、1.5 mg、2.0 mg、2.5 mg、3.0 mg、3.5 mg、4.0 mg、4.5 mg、5.0 mg、5.5 mg、6.0 mg、6.5 mg、7.0 mg、7.5 mg、8.0 mg、8.5 mg、9.0 mg、9.5 mg、10.0 mg、10.5 mg、11.0 mg、11.5 mg、12.0 mg、12.5 mg、13.0 mg、13.5 mg、14.0 mg、14.5 mg、15.0 mg、20 mg、30 mg、40 mg、50 mg、60 mg、70 mg、80 mg、90 mg、100 mg、120 mg、140 mg、150 mg、160 mg、180 mg、200 mg、220 mg、240 mg、250 mg、260 mg、280 mg、300 mg、320 mg、340 mg、或 350

mg。

【0043】於一替代實施態樣中，由於該金雀異黃酮磷酸酯衍生物具有高溶解度，因此，本發明之該組合物係配製用以注射於該使用者。關於注射，該組合物可被配製於水溶液中(如：水或酒精)，或配置於生理相容的緩衝液中(如：漢克(Hanks)緩衝液、林格(Ringer)緩衝液、或生理鹽水緩衝液)。該溶液可含有配製劑，如：懸浮劑、穩定劑、及/或分散劑。注射製劑亦可製備成固體形式製劑，其可在欲使用前之短時間內轉化為適於注射的液體形式製劑，例如在使用前藉由合適的載體(如滅菌之水、鹽溶液或酒精)構成。

【0044】於一較佳實施態樣中，本發明之方法係於24小時內施用該組合物1至6次，以使金雀異黃酮磷酸酯衍生物之日劑量為約0.5 mg/kg B.W.至約2.5 mg/kg B.W.。此外，本發明之該組合物可以摻入食品、藥物、或其他可飲用、可攝取或可食用之組合物中。

【0045】本文所述之「骨骼結構(Bone architecture)」係指骨骼的整體形狀和幾何形狀，以及分化為骨小樑及皮質骨的情形。描述骨骼結構的參數可以係皮質厚度、骨量(bone mass)、骨礦物質密度(bone mineral density, BMD)、骨小樑體積及骨小樑數目。本文所述之「骨骼生物力學強度(Bio-mechanical strength of bone)」係指一種力學性質，其與許多強度標準相關，例如：測試期間的變形率、密度、骨骼不同區域的變化等。生物力學測試的程度評估可以係最大負荷(maximal load)、最大負荷能量(maximal energy)、斷裂承受負荷(fracture load)及楊氏模數(Young's modulus)或彈性係數(E)等。

【0046】 本文所述之「骨小樑(Trabecular bone)」係構成骨骼的內層，其特徵在於格子狀基質網絡(或稱小樑)使其具有海綿狀外觀。本文所述之「皮質骨(Cortical bone)」係構成骨骼的皮質或外殼。皮質骨的密度比充滿骨小樑的髓質骨區大很多，約佔人體骨骼重量80%。然而，骨生成及骨再吸收(或稱骨重塑)的不平衡對骨小樑(如：喪失連接性)及皮質骨(如：皮質變薄或有孔隙)具有影響。

【0047】 本文所述之「卵巢摘除大鼠模型(ovariectomized rat model)」其最常用於絕經後骨質疏鬆症的研究中。卵巢摘除術後，初期時骨再吸收開始超過骨生成，導致骨質流失。此後不久，骨重塑達到穩定狀態，即骨再吸收及骨生成呈平衡。

【0048】 下文中，將進一步以詳細說明及實施例描述本發明，然而，應理解這些實施例僅用於幫助可更加容易理解本發明，而非用以限制本發明之範圍。

實施例

A. 方法

(1)實驗動物

【0049】 實驗使用12週齡韋斯(Wistar)雌性大白鼠。所有實驗大鼠均購自臺灣樂斯科生物科技公司(BioLASCO)。飼養於臺北醫學大學實驗動物中心，動物室維持在溫度21-24 °C、相對濕度30-70%、12小時明暗交替的自動光照。於實驗期間，給予動物充足的飲用水及餵食標準飼料。大鼠飼養及手術皆遵照「臺北醫學大學實驗動物照護及使用委員會(IACUC)」規定。

(2) 卵巢摘除術及假手術

【0050】 對於卵巢摘除大鼠，按照FDA指南及骨質疏鬆症動物模型，在舒泰50 (Zoletil 50，為替來他明(Tiletamine) 20-40 mg/kg + 唑拉西泮(Zolazepam) 5-10 mg/kg之混合劑)及若朋(Rompun)的麻醉下，於大鼠12週齡時進行雙側卵巢摘除手術。對於假手術(sham surgery)，其係設置為對照組，在舒泰50 (Zoletil 50，為替來他明(Tiletamine) 20-40 mg/kg + 唑拉西泮Zolazepam) 5-10 mg/kg之混合劑)及若朋(Rompun)的麻醉下，於大鼠12週齡時進行手術切開而不移除卵巢。卵巢摘除術後，將24隻卵巢摘除大鼠隨機分為4組，即每組6隻大鼠。手術經過2週後，依據個別大鼠所屬之組別，每天一次定時口服施予不同組別之試驗樣品及水。大鼠每周秤重一次作為施用劑量的基礎並記錄體重，連續12週。最後於大鼠犧牲時，檢查大鼠的卵巢以確認卵巢摘除術是否成功，卵巢摘除失敗大鼠之數據將被剔除不採用。

(3) 實驗期

【0051】 根據FDA指南及先前的研究，骨結構於卵巢摘除術後12週內明顯改變(1995年美國FDA指南及骨質疏鬆症動物模型(FDA Guidelines and Animal Models for Osteoporosis 1995)；國際實驗病理學期刊2009，90(5)，512-519(International Journal of Experimental Pathology 2009, 90(5), 512-519))。

(4) 劑量

【0052】 FDA指出，每日攝取25 g大豆蛋白(相當於40-50 mg異黃酮)以及低飽和脂肪及膽固醇的飲食可以減輕心臟疾病。市售大豆異黃酮膳食

補充劑的劑量範圍大多落在40至60 mg/day之間。因此，將人體內40 mg/day之G7P視為參考劑量。根據體表面積標準化法(body-surface-area normalization)，大鼠G7P的劑量由下式定義：

$$\text{大鼠G7P之日劑量} = \frac{\text{異黃酮每日建議量}}{\text{一般人體重}} \times \frac{\text{人類體表面積常數}}{\text{大鼠體表面積常數}} \times \frac{\text{G7P分子量}}{\text{金雀異黃酮分子量}}$$

於一實施態樣，上式中之異黃酮每日建議量為40 mg/day、一般人類女性體重為60 kg、人類體表面積常數為37、大鼠體表面積常數為6、G7P分子量(MW)約為350、金雀異黃酮分子量約為270。將前述數值代入後可得以下內容：

$$\text{大鼠G7P之日劑量} = \frac{40 \text{ mg/day}}{60 \text{ kg}} \times \frac{37}{6} \times \frac{350}{270} = 5.33 \text{ mg/kg/day}$$

因此，實施例中使用大鼠G7P之日劑量為5.33 mg/kg/day。

(5)樣品施用及分組

【0053】將總共30隻大鼠分為以下5組(即“SHAM”、“OVX”、“G7P”、“G7P2X”、“E2”)。

a. SHAM組：假手術，設定為控制組，通過口服胃管灌食法餵食滅菌水；

b. OVX組：卵巢摘除術，設定為負控制組，通過口服胃管灌食法餵食滅菌水；

c. G7P組：卵巢摘除術，通過口服胃管灌食法施用G7P溶液5.33 mg/kg B.W.每日一次，此劑量相當於成人用量之大豆異黃酮40 mg/day；

d. G7P2X組：卵巢摘除術，通過口服胃管灌食法施用G7P溶液10.66 mg/kg B.W.每日一次，此劑量相當於成人用量之大豆異黃酮80

mg/day；

e. E2組：卵巢摘除術，設定為正控制組，通過管餵食法施用17- β 雌二醇(17- β estradiol) 200 μ g/kg B.W.每日一次。

(6)骨質指標檢測

【0054】在實驗期的第0、3、6、9及12週時，利用動物電腦斷層掃描儀系統SkyScan 1176對大鼠右腿的股骨頭(caput femoris)進行活體微米級電腦斷層掃描(micro-CT scan)，動物以氣體麻醉後上機，以獲得三維透視影像。所獲得的三維透視影像再以軟體進行骨質之數據分析，以獲得骨質指標數據。所分析的指標包括骨礦物質密度及骨質佔總體積百分比(bone volume/total volume, BV/TV, %)。

(7)大鼠犧牲及動物樣本採集

【0055】在犧牲大鼠後，取下脛骨和股骨供骨密度及骨應力檢測。並且取下子宮除去週遭脂肪秤重並記錄。

(8)骨骼力學分析

【0056】剔除左腳股骨周圍軟組織後，利用生物力學測定儀(RT1-TST, Royalty Tec.Ins. Ltd)測定。先用電子游標尺量股骨的長度，訂出中間位置，作為骨應力儀進行股骨垂直物理性力量壓縮時，必須對準的刻度標準。股骨用生理食鹽水保持溼潤，固定於測試臺上，進行三點彎曲(three-point bending)測試。骨應力儀馬達轉速設定在0.05 mm/sec，從股骨被壓縮到斷裂後，由此測試系統得到骨力學分析的參數如下：

1. 最大負荷(maximal load)：即紀錄的最大重量換算成力，其單位為牛頓；

2. 最大負荷能量(maximal energy): 為紀錄圖曲線下的面積積分, 單位為焦耳(mJ)
3. 斷裂承受負荷(fracture load);
4. 楊氏模數或彈性係數 (Young's Modulus or Elastic Modulus; E)。

(9)組織病理學觀察

【0057】剔除右腳股骨頭周圍軟組織後，以多聚甲醛(para-formaldehyde)進行組織固定，而後進行酸性脫鈣，再以石蠟包埋成蠟塊，以組織切片機進行切片(縱切；圓形切面)，厚度為2 μm ，黏著於玻片上後進行H&E染色，最後固定玻片進行骨組織病理學之觀察。

(10)統計分析

【0058】動物試驗數據以一般線性模式進行變方分析，再以Student's t檢定各組間之差異，數據以平均值 $\pm$ 標準偏差(Mean $\pm$ SD)表示。

B. 結果

(1)體重改變

【0059】卵巢摘除大鼠因手術後缺乏雌激素之分泌，會導致其內分泌失調，進而產生類似更年期後之症候群。此模式可模擬更年期後婦女生理之情形，因此本實施例選用此一模式做為骨質疏鬆試驗之平台。一般而言，生物體在長期缺乏雌激素分泌的情形下，會造成體重上升。如圖1所示，在所有卵巢摘除大鼠的組別亦可觀察到相同之情形。卵巢摘除大鼠之體重於卵巢摘除手術後2週後有明顯的增加，與假手術(SHAM)組有顯著之差異。此外，卵巢摘除大鼠的體重隨實驗時間經過而增加，最重之G7P組在手術

後12週之體重約為400 g左右。餵食雌激素之大鼠組別(即E2組)體重於第3週開始較其他有經過卵巢摘除手術之各組別(即，OVX組、G7P組、G7P2X組)輕，直至第12週的體重皆較低，顯示口服餵食高劑量的雌激素可抑制缺乏雌激素所導致的體重上升，而餵食G7P (即G7P組及G7P2X組)則無助於降低肥胖程度。

(2)對子宮發育之影響

【0060】 文獻指出，卵巢摘除後生物體之子宮會因雌激素分泌不足而快速萎縮。實驗結束時各組子宮的重量如圖2所示。卵巢摘除手術後12週，卵巢摘除大鼠的子宮重量明顯低於假手術大鼠。具體而言，卵巢摘除大鼠的子宮重量幾乎是正常子宮重量值的四分之一，顯示卵巢摘除手術成功完成。此外，實驗中所口服餵食之樣品對已萎縮的子宮之重量及外觀並無任何顯著之影響。

(3)對骨礦物質密度(BMD)及骨體積之影響

【0061】 各組別於第12週之骨礦物質密度如圖3所示。結果顯示，假手術(SHAM)組之骨礦物密度隨試驗時間經過正常成長，至第12週達到 1.14 g/cm^2 左右。而OVX組則只有約 0.03 g/cm^2 。顯而易見地，G7P組、G7P2X組及E2組的所有骨礦物質密度水平均顯著高於OVX組，顯示口服施用G7P (即G7P組及G7P2X組)能夠抑制骨礦物質流失，並維持試驗中的骨礦物質密度，並產生與口服餵食 $200 \text{ } \mu\text{g/kg B.W. 17-}\beta\text{雌二醇}$ (即E2組)相似的效果。

【0062】 如圖4所示，各組中以OVX組的BV/TV最低。此外，G7P組、G7P2X組及E2組的BV/TV均高於OVX組且具有統計學上顯著差異，其中G7P2X組的BV/TV略高於G7P組及E2組。顯示口服施用G7P在卵巢摘除手

術後可維持骨體積，並與口服餵食雌激素(即E2組)產生基本上相同的效果。

(4) 對成骨效應及骨小樑發育之影響

【0063】 圖5為 μ CT造影之骨結構3D圖，不同編號代表各組中的不同隻試驗動物個體。圖中可觀察出SHAM組接近股骨頭處有緻密的骨小樑結構分布，所在分布範圍也較其他組別廣泛，3D圖中可觀察出其骨小樑網絡結構相當完整。而與SHAM組相比，OVX組有明顯的骨小樑流失情形，於股骨頭處已幾乎無骨小樑之交聯網絡。G7P與G7P2X組所觀察到之骨小樑數量明顯較OVX組多，且其結構也較完整，顯示口服施用G7P可延緩骨再吸收之效果，G7P為一有效之抑制骨質流失的口服膳食補充劑。與G7P組相比，作為正控制組之E2組可觀察到其骨小樑網絡涵蓋的範圍較G7P組來的大，但組織較為疏鬆不緊密。因此，口服G7P (對應G7P組及G7P2X組)和雌激素(對應E2組)均可維持股骨的骨小樑結構，但E2組中所保留之股骨結構與G7P組於型態上有相當大之差異性。

【0064】 組織病理學觀察的結果如圖6所示。SHAM組的骨組織中，可明顯地觀察出含有豐富的礦物質(深紅色處)以及緻密的骨小樑網絡(粉紅色處)，生長板下也可觀察出有一定數量的成骨細胞，顯示其具有旺盛之造骨活性。而OVX組之大鼠，則可發現骨組織中有許多空洞，礦物質流失相當嚴重，骨小樑組織也較為分散，呈片段狀，組織中無法觀察到明顯的造骨活性存在。G7P組與G7P2X組則可觀察出骨礦物質的保留情況良好，骨小樑的緻密度也較高，於生長板周遭可以觀察出很明顯的成骨細胞作用，也有較少的蝕骨細胞，其抑制骨質流失的作用於組織切片觀察上可達到與E2組類似的程度，顯示口服G7P可作為有效的雌激素替代療法，延緩骨質

疏鬆的發生。於本實施例中，餵食大鼠5.33 mg/kg B.W./day的G7P延緩了骨質疏鬆症的發生，而餵食10.66 mg/kg B.W./day則呈現出更佳的效果。

【0065】 因此，根據體表面積標準化法，利用下式計算人類G7P的較佳劑量範圍：

$$\begin{aligned} \text{人類G7P之日劑量} &= \text{大鼠劑量} 5.33 \text{ mg/kg B.W./day} \times \frac{6}{37} = \text{人類劑量} 0.86 \text{ mg/kg B.W./day} \\ \text{人類G7P2X之日劑量} &= \text{大鼠劑量} 10.66 \text{ mg/kg B.W./day} \times \frac{6}{37} \\ &= \text{人類劑量} 1.73 \text{ mg/kg B.W./day} \end{aligned}$$

上式中，人類體表面積常數為37、大鼠體表面積常數為6。所得之人類G7P的較佳日劑量範圍係約0.86 mg/kg B.W./day至約1.73 mg/kg B.W./day。

(5)對骨應力之影響

【0066】 骨質的流失會造成其機械強度的劇烈改變，增加骨折或碎裂的風險，包括其最大負荷外力以及骨骼的彈性都會隨之降低。本實施例之SHAM組、OVX組、G7P組、G7P2X組及E2組於第12週的生物力學測試數據如表1所示。口服餵食G7P的試驗組別(即G7P組及G7P2X組)可以顯著提升卵巢摘除大鼠的股骨最大負荷能量，也能夠大幅提昇彈性係數至與假手術(SHAM)組相同的水準，呈現無統計上顯著差異。顯見G7P的施用延緩了骨質疏鬆症的發生，對於治療或預防與骨量減少相關疾病的應用上有相當大之潛力。

表1

	OVX 組	SHAM 組	G7P 組	G7P2X 組	E2 組
最大負荷能量 (mJ)	61.2 ± 7.5	63.6 ± 2.3	74.4 ± 6.8*	82.7 ± 22.8	76.1 ± 20.3
剛性 Stiffness (N/mm)	320.4 ± 18.0	343.1 ± 22.9	326.2 ± 43.2	319.1 ± 6.1	307.6 ± 55.1
施加負荷 (N)	173.7 ± 14.8	171.7 ± 8.7	186.5 ± 5.9	197.5 ± 20.6	176.8 ± 12.1
張力 Strain (MPa)	16.8 ± 3.3	14.1 ± 2.1	15.4 ± 1.9	18.9 ± 4.3	20.2 ± 7.5

Elastic modulus (MPa)	14.9 ± 2.6	23.3 ± 1.2**	21.8 ± 2.6**	22.8 ± 6.1*	15.9.9 ± 7.4
-----------------------	------------	--------------	--------------	-------------	--------------

^a 數據以平均值±標準偏差(Mean ± SD)表示(n=6)。
* 與 OVX 組相比 p<0.05 。
**與 OVX 組相比 p<0.01 。

【0067】 綜上所述，本發明對需要此治療的使用者施用包含有效量之金雀異黃酮磷酸酯衍生物之組合物，可以治療或預防與骨量減少相關疾病，即提高骨礦物質含量、骨密度及骨骼生物力學強度，並延緩骨質疏鬆症的發生。

【0068】 以上已將本發明做一詳細說明，惟以上所述者，僅惟本發明之一較佳實施例而已，當不能以此限定本發明實施之範圍，即凡依本發明申請專利範圍所作之均等變化與修飾，皆應仍屬本發明之專利涵蓋範圍內。

【符號說明】 無。

【生物材料寄存】 無。

【發明申請專利範圍】

【第1項】一種用以製備治療或預防原發性骨質疏鬆症之組合物之用途，其包含：對需要此治療或預防的使用者施用該組合物，該組合物包含一有效量之金雀異黃酮7-氧-磷酸酯，且該有效量係約0.5 mg/kg B.W./day至約2.5 mg/kg B.W./day。

【第2項】如申請專利範圍第1項所述之用途，其中，該組合物之金雀異黃酮7-氧-磷酸酯之該有效量係約0.86 mg/kg B.W./day至約1.73 mg/kg B.W./day。

【第3項】如申請專利範圍第1項所述之用途，其中，該組合物係口服施用。

【第4項】如申請專利範圍第1項所述之用途，其中，該組合物係每日至少施用一次。

【第5項】如申請專利範圍第4項所述之用途，其中，該組合物於24小時內施用1至6次，以使金雀異黃酮7-氧-磷酸酯之日劑量為約0.5 mg/kg B.W.至約2.5 mg/kg B.W.。

【第6項】如申請專利範圍第3項所述之用途，其中，該組合物係丸劑、錠劑、膠囊劑、顆粒劑、糖漿劑、小瓶劑、或滴劑的形式。

【第7項】如申請專利範圍第1項所述之用途，其中，該組合物進一步包含一或多種藥學上可接受之佐劑、載體及/或賦形劑。

【第8項】如申請專利範圍第1項所述之用途，其中，該原發性骨質疏鬆症是因老化、絕經、或卵巢摘除後所導致之骨質疏鬆症。

【第9項】如申請專利範圍第1項所述之用途，其中，該使用者是哺乳動物。

【第10項】如申請專利範圍第9項所述之用途，其中，該哺乳動物是人類。

【第11項】如申請專利範圍第10項所述之用途，其中，該人類是女性。

【第12項】一種用以製備改善骨骼結構(*architecture*)之組合物之用途，其包含：對需要此治療的使用者施用一組合物，該組合物包含一有效量之金雀異黃酮7-氧-磷酸酯，且該有效量係約0.5 mg/kg B.W./day至約2.5 mg/kg B.W./day。

【第13項】如申請專利範圍第12項所述之用途，其中，該使用者是人類。

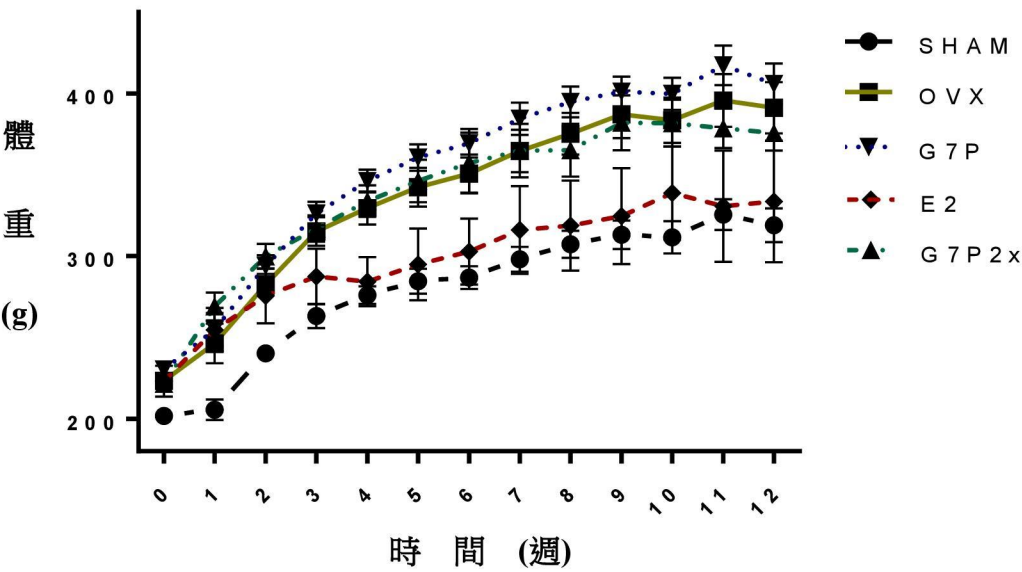
【第14項】一種用以製備提高骨骼生物力學強度之組合物之用途，其包含：對需要此治療的使用者施用一組合物，該組合物包含一有效量之金雀異黃酮7-氧-磷酸酯，且該有效量係約0.5 mg/kg B.W./day至約2.5 mg/kg B.W./day。。

【第15項】如申請專利範圍第14項所述之用途，其中，該使用者是人類。

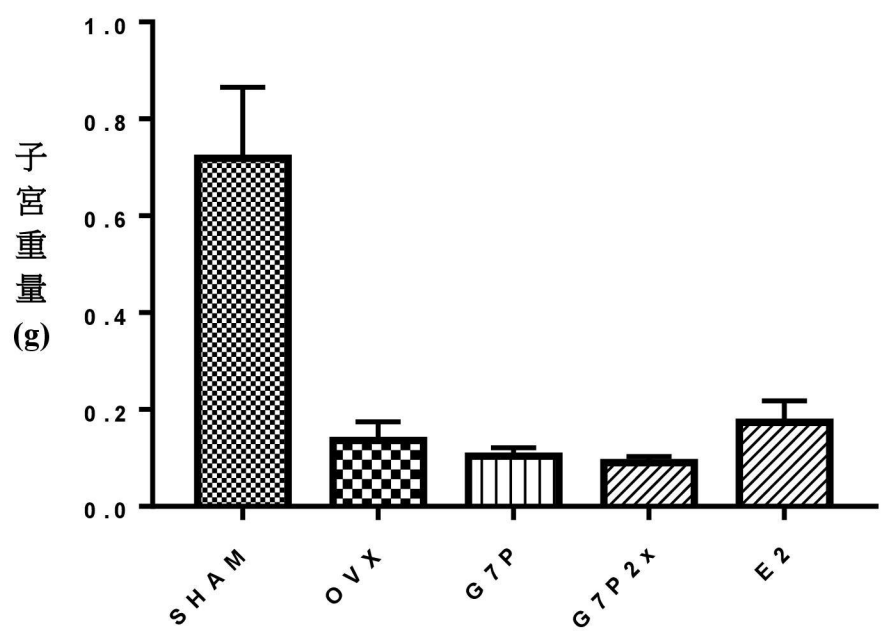
【第16項】如申請專利範圍第15項所述之用途，其中，該人類是女性。

【第17項】如申請專利範圍第14項所述之用途，其中，該骨骼是股骨。

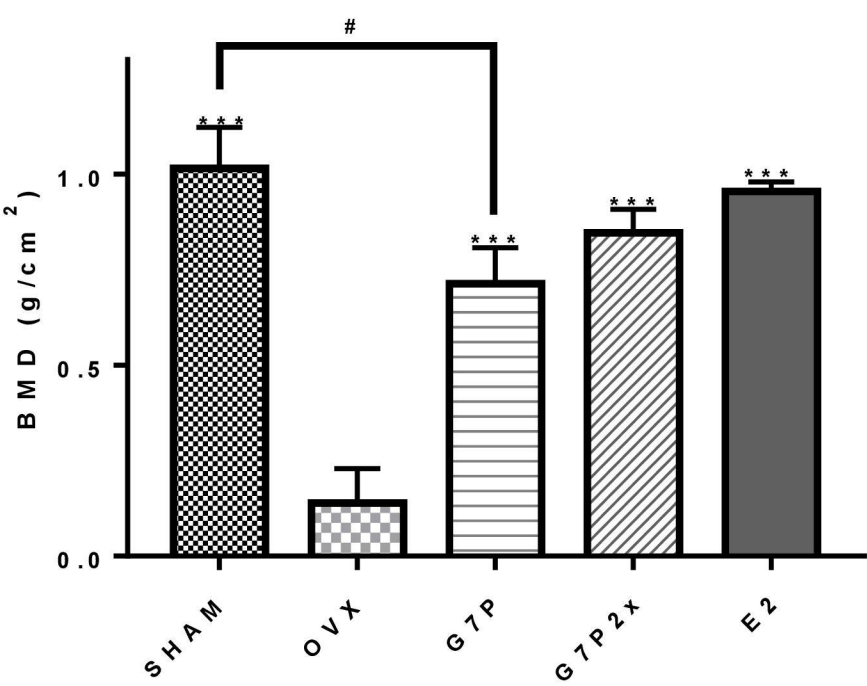
【發明圖式】



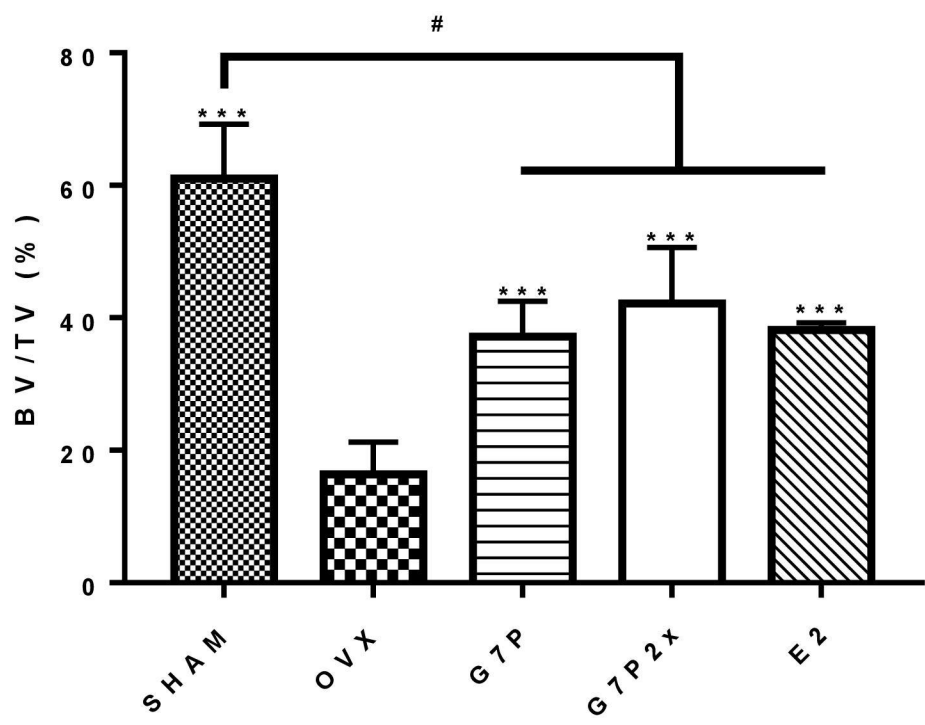
【圖1】



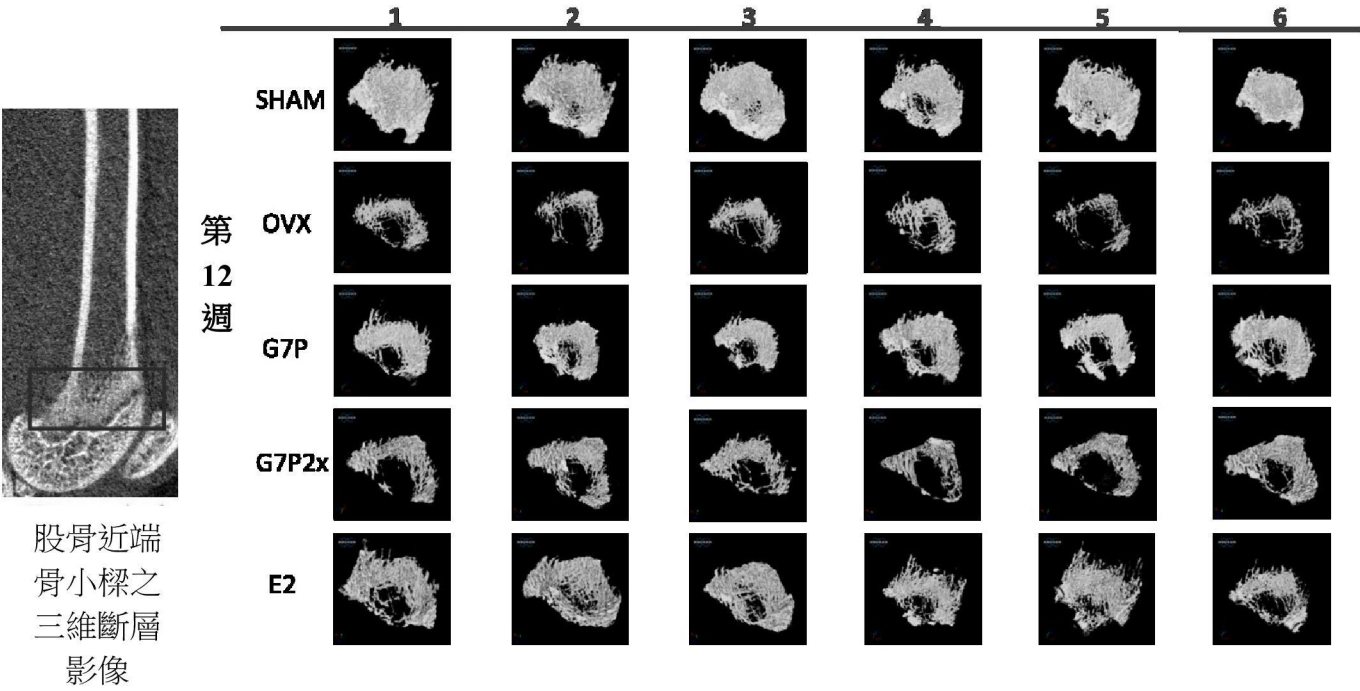
【圖2】



【圖3】

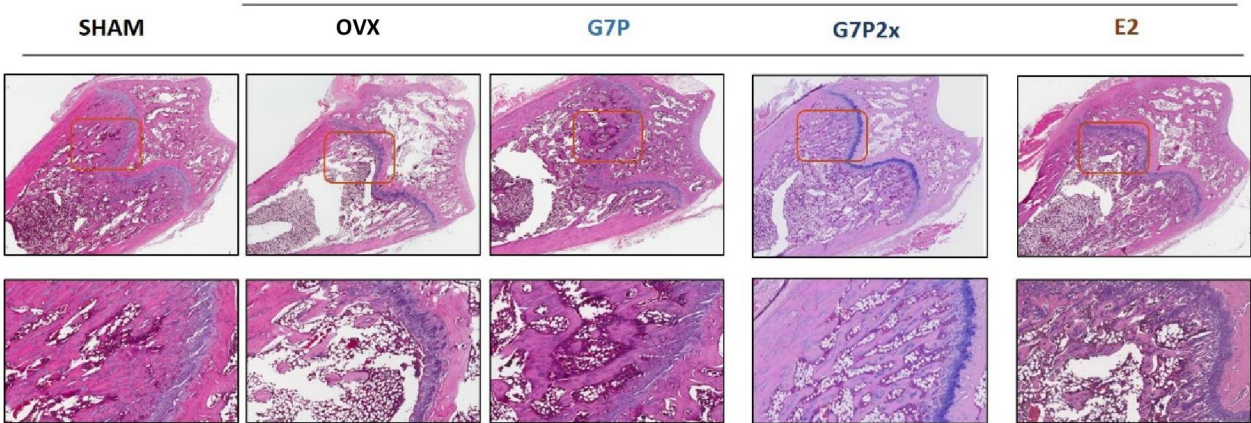


【圖4】



【圖5】

經卵巢摘除手術



【圖6】