

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
21. September 2006 (21.09.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/097074 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
Nicht klassifiziert

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2006/000428

(22) Internationales Anmeldedatum:
9. März 2006 (09.03.2006)

CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2005 012 832.7 17. März 2005 (17.03.2005) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: SCHREZENMEIR, Jürgen [DE/DE]; Bonin-
strasse 3, 24114 Kiel (DE).

(74) Anwalt: PÖHNER, W.; Röntgenring 4, Postfach 63 23,
97070 Würzburg (DE).

(84) Bestimmungsstaaten (*soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.*

(54) Title: MEDICAMENT CONSISTING OF PLANT EXTRACTS AS A LIPASE INHIBITOR

(54) Bezeichnung: ARZNEIMITTEL AUS PFLANZENEXTRAKTEN ALS LIPASEINHIBITOR

(57) Abstract: The invention relates to a lipase inhibitor consisting of: cardamom and/or marjoram and/or thyme and/or chilli (*Capsicum frutescens*) and/or evening primrose and/or oregano leaves (*oreganum vulgare*) and/or chamomile leaves (*Chamomilla recutita*) and/or nutmeg (*Myristica fragrans*) and/or apple pomace and/or corn germs and/or almond and/or hazelnut and/or walnut and/or pumpkin germs and/or *Cuphea wrightii* and/or evening primrose and/or common flax (*Linum usitatissimum*) and/or cotton burdock (*Arctium lappa* L.) and/or flax and/or *Helianthus annuus* germs (sunflower) and/or marigold (*Calendula officinalis*) and/or *Echinops banaticus* and/or *Mallotus philippinensis* and/or rape and/or sesame and/or black cumin and/or *Cynoglossum officinale* and/or *Lapachotea* and/or *Arctostaphylos uva-ursi* and/or stone flower (*Flor de piedra*) and/or Propolis and/or *Primula Veris* and/or *Magnolia officinalis* and/or celery (*Apium graveolens*).

(57) Zusammenfassung: Lipase-Inhibitor bestehend aus: Cardamom und/oder Majoran und/oder Thymian und/oder Chili (*Capsicum frutescens*) und/oder Abendprimel und/oder Oreganoblätter (*oreganum vulgare*) und/oder Kamilleblätter (*Chamomilla recutita*) und/oder Muskatnuss (*Myristica fragrans*) und/oder Apfelmus (pomace) und/oder Kornkeim und/oder Mandel und/oder Haselnuss und/oder Walnuss und/oder Kürbiskeim und/oder *Cuphea wrightii* und/oder Abendprimel und/oder Öflachs (*Linum usitatissimum*) und/oder große Klette (*Arctium lappa* L.) und/oder Flachs und/oder Keime des *Helianthus annuus* (sunflower) und/oder Ringelblume (*Calendula officinalis*) und/oder *Echinops banaticus* und/oder *Mallotus philippinensis* und/oder Raps, und/oder Sesam und/oder schwarzer Kümmel und/oder *Cynoglossum officinale* und/oder *Lapachotea* und/oder *Arctostaphylos uva-ursi* und/oder Steinblume (*Flor de piedra*) und/oder Propolis und/oder *Primula Veris* und/oder *Magnolia officinalis* und/oder Sellerie (*Apium graveolens*).

WO 2006/097074 A2

Arzneimittel aus Pflanzenextrakten als Lipaseinhibitor

5 Die exzessive Aufnahme von Fett kann zahlreiche Erkrankungen verursachen, wie z. B. Fettleibigkeit (Adipositas), hohe Blutfette und Typ 2 Diabetes, als zentrale Erscheinungen des metabolischen Syndroms. Erhöhte Triglycerid und Glukosewerte im Blut nach der Nahrungsaufnahme sind mit einer Insulinresistenz assoziiert, die eine zentrale Bedeutung in der Entwicklung des metabolischen Syndroms darstellt. Eine Möglichkeit der Reduzierung des postprandialen Triglyceridspiegels ist die Senkung der Aktivität der Enzyme, die das Nahrungsfett hydrolysieren. Die Bauchspeicheldrüsenlipase (e. c. 3.1.1.3) ist wesentlich für den Abbau und die Absorption der durch Nahrungsaufnahme zugeführten Fetten im Intestinaltrakt. Aus diesem Grunde führt deren Verringerung zu einer Vermeidung oder zumindest einer Verzögerung der intestinalen Verdauung der Nahrungsfette und demzufolge zu einer Verringerung der Bluttriglyceride. Die Fettleibigkeit ist ein wichtiger Risikofaktor für den Typ-2-Diabetes. Es ist allgemein anerkannt, dass eine Gewichtsreduktion die Blutzuckerkontrolle verbessert und zur Reduzierung des kardiovaskulären Risikofaktors beiträgt. Im allgemeinen wird es als schwierig angesehen, eine Gewichtsreduzierung zu erreichen und das verringerte Gewicht beizubehalten. Tetrahydrolipstatin (THL, Orlistat, Xenical) ist ein käuflich erwerbbarer Lipaseinhibitor, der erhalten wird aus *Streptomyces toxystricini*. Nach oraler Verabreichung verhindert Orlistat den Fettabbau, indem die aktiven Abschnitte der pankreatischen Lipase (Bauchspeicheldrüse -Lipase) blockiert werden. In klinischen Versuchen führte Orlistat zu einer Gewichtsreduktion und zu einer Verbesserung des postprandialen (nach Nahrungsaufnahme) Fettprofils (reduziert wurden die postprandialen Triglyceride, sowie das Nüchtern-LDL-Cholesterin und das Gesamtcholesterin sowie das Verhältnis LDL zu HDL). Auch konnte das Auftreten von Typ 2 Dia-

5 betes durch Orlistat reduziert werden. Die Anwendung von Orlistat führt zu unerwünschten Nebeneffekten wie öligem und fettem Stuhl. Eine sanftere Lipasehemmung wird erreicht durch Anwendung von pflanzlichen Extrakten und deren aktive Wirkstoffe, die in einer zeitli-

5 che Verzögerung anstelle einer kompletten Unterbindung der Fettabsorption resultieren und auf diese Weise öligen oder fetten Stuhl vermeiden können.

Systematisch kann dies durch Wirkstoffe erzielt werden, die selbst resorbiert oder während der Verdauung inaktiviert werden und somit

10 aus dem Reaktionsgewicht mit dem Lipase-Colipase-Fett-komplex entzogen werden.

Die Verabreichung von Lipaseinhibitoren werden als nützliche Medikation für Patienten mit Symptomen des metabolischen Syndroms erachtet. Zusätzlich kann ein lipasehemmender Pflanzenextrakt oder

15 hiervon isolierte Bestandteile als Nahrungszusätze verwendet werden.

Aus mehreren Patenten ist die Anwendung von Pflanzenextrakten als mögliche Inhibitoren für die Lipase im Verdauungstrakt genannt.

20 Es handelt sich hierbei um japanische Anmeldungen mit den folgenden Nummern: JP 2003 026 585, JP 2002 275 077, JP 2002 047 194.

In mehreren Veröffentlichungen wurden die positiven Effekte von

25 Pflanzenextrakten auf das postprandiale Lipidprofil beschrieben, nämlich um folgende Substanzen wie Zylokaria Paliurus, Weintraubenkernen, Salbei, Cassia mimosoides, L. var. Nomame Makine und Alpinia officinarum.

Darüber hinausgehend hat sich die Erfindung die Ermittlung weiterer

30 Pflanzen zur Aufgabe gemacht, die als Lipase-Inhibitoren einsetzbar sind.

Zur Lösung dieser Aufgabe werden Extrakte oder Essenzen der nachfolgenden Stoffe sowie deren Mischung hiervon genannt.

- 5
- Cardamom
Majoran
Thymian
Chili (*Capsicum frutescens*)
- 10
- Abendprimel
Oreganoblätter (*oreganum vulgare*)
Kamilleblätter (*Chamomilla recutita*)
Muskatnuss (*Myristica fragrans*)
Apfelmus (pomace)
- 15
- Kornkeim
Mandel
Haselnuss
Walnuss
Kürbiskeim
- 20
- Cuphea wrightii (e)
Abendprimel
Ölflachs (*Linum usitatissimum*)
große Klette (*Arctium lappa* L) (e)
Flachs (e)
- 25
- Keime des *Helianthus annuus* (sunflower) (e)
Ringelblume (*Calendula officinalis*)(e,h)
Echinops banaticus
Mallotus philippinensis (e)
Raps, (e)
- 30
- Sesam (e)
schwarzer Kümmel (m)
Cynoglossum officinale
Lapachotea (e)
Arctostaphylos uva-ursi
- 35
- Steinblume (*Flor de piedra*)
Propolis
Primula Veris
Magnolia officinalis
Sellerie (*Apium graveolens*)
- 40

Beschreibung der Herstellung der Extrakte

a) CO₂ Extrakte:

Hochdruckextraktion mit überkritischem Carbondioxyd. Enthält kein Wasser, keinen Zucker und keine Proteine.

5 Cardamom:

Benutzter Teil der Pflanze: Samen mit Kapseln from *Elettaria cardamomum*.

Das Rohmaterial wurde aus Guatemala bezogen.

Extraktkonsistenz: ölige Flüssigkeit

10 Extrakt enthält 72 % ätherische Öle

Andere Bestandteile:

α -Pinen, β -Pinen, β -Myrcen, 1,8 Cineol, Linalool, α -Terpineol, Linalylacetat, Terpinylacetat

15 Majoran:

Benutzter Teil der Pflanze: Blätter des Oregano Majorana

Extraktkonsistenz: ölige Flüssigkeit

Extrakt enthält 80 % ätherische Öle

Andere Bestandteile:

20 Sabinen, cis and trans Sabinenhydrate, Terpinen-4-ol, Sabinenhydratacetat

Thymian

25 Benutzter Teil der Pflanze: Blätter des Thymus vulgaris. Das Rohmaterial wurde aus Deutschland bezogen. Im weiteren siehe oben Cardamom.

Chili (*Capsicum frutescens*):

Benutzter Teil der Pflanze: Schote

30 Das Rohmaterial wurde aus Indien bezogen

Der Extrakt wurde mit Sonnenblumenöl standardisiert

Extraktkonsistenz: Im übrigen wie oben

Abendprimel:

Benutzter Teil der Pflanze: Samen

Extraktstabilisierung mit Tocopherol

5 Extraktkonsistenz: ölige Flüssigkeit

Oreganoblätter

Extraktkonsistenz: ölige Flüssigkeit

10 Bestandteile 0.18% Terpinen, 2.6% p-Cymen, 0.07% Limonen, 62%
Carvacrol, 1.5% Caryophyllen, 0.33% Thymol, 0.49% 1.8 Cineol,
0.17% γ -Terpinen, 0.2% β -Terpinen, 1.5% 4-Terpineol, 0.58% α -
Terpineol, 23.2% Thymochinone

Kamillenblätter

15 Extraktkonsistenz: ölige Flüssigkeit

20-25% Bisabolol

5-20% Bisabololoxiden

1.0-3.0% Natricin

20 Muskatnuss

Rohmaterial aus Indonesien bezogen

Extraktkonsistenz: ölige Flüssigkeit

Bestandteile: 19-24% Myristicin

1-3% Safrol

25

b) Die nachfolgenden Extrakte wurden wie folgt hergestellt:

10g Pulver des Rohmaterials wurden aufgelöst in

e) 50 ml reinem Ethanol bei 37 °C.

30 w) In Wasser von 37 °C

h) In Wasser von 95 °C

m) In 60%igem Ethanol bei 37 °C

und anschließend in einem Schüttelwasserbad für 2 Stunden inkubiert. Danach wurde das Extrakt in eine Magnetprüher für 30 Minuten gerührt und bei 6000 Upm für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel durch einen Speedrac concentrator entfernt.

5

Apfelmus (pomace) (e):

Extraktkonsistenz: viskose Flüssigkeit

10

Kornkeime (e):

Extraktionskonsistenz: viskose Flüssigkeit

Almond (e):

Extraktionskonsistenz: viskose Flüssigkeit

15

Haselnuss (e):

Extraktionskonsistenz: viskose Flüssigkeit

Walnuss, sort S (e):

20

Extraktionskonsistenz: viskose Flüssigkeit

Kürbiskeim (e):

Extraktionskonsistenz: viskose Flüssigkeit

25

Cuphea wrightii (e):

Extraktionskonsistenz: viskose Flüssigkeit

Abendprimel (e):

30

Benutzter Teil der Pflanze: Samen

Extraktionskonsistenz: viskose Flüssigkeit

Öflachs (165) (e)

Extraktionskonsistenz: viskose Flüssigkeit

Öflachs (162) (e)

5 Extraktionskonsistenz: viskose Flüssigkeit

große Klette (e)

Benutzter Teil der Pflanze: Wurzel

Extraktionskonsistenz: viskose Flüssigkeit

10

Flachs (e)

Extraktionskonsistenz: viskose Flüssigkeit

Keime des Helianthus annuus (sunflower) (e):

15 Extraktionskonsistenz: viskose Flüssigkeit

Ringelblume (Calendula officinalis) (e,h):

Extraktionskonsistenz: viskose Flüssigkeit

20

Echinops banaticus (154:e, 152:e):

Extraktionskonsistenz: viskose Flüssigkeit

Mallotus philippinensis (e):

Extraktionskonsistenz: viskose Flüssigkeit

25

Raps (e)

Extraktionskonsistenz: viskose Flüssigkeit

Sesam (e)

30

Extraktionskonsistenz: viskose Flüssigkeit

schwarzer Kümmel (m):

Cynoglossum officinale (157,e):5 Lapachotea (e)

Benutzter Teil der Pflanze: Innere Rinde des Taheebo Baumes (Tabebuia impetiginosa)

Extraktkonsistenz: viskose Flüssigkeit

10

c) Weitere Extraktionen:

Arctostaphylos uva-ursi:

Benutzter Teil der Pflanze: Blätter des Arctostaphylos uva-ursi

15 Extraktionsflüssigkeit: Wasser

Extraktionskonsistenz: Pulver,

Inhaltsstoff Arbutin

Steinblume (Flor de piedra):

20 Benutzter Teil der Pflanze:

Extraktionsflüssigkeit: 69% Ethanol (v/v)

Extraktkonsistenz: flüssig

Trocknungsrest: 1.0%

25 Propolis:

Propolis ist ein Mischprodukt verschiedener Materialien welche Bienen von Pollen und Baumrinden zusammensammeln sowie Sekrete der Bienen selbst.

Extraktionsflüssigkeit: Propylene glycol

30 Extraktionskonsistenz: flüssig

Primula Veris:

Benutzter Teil: Blätter und Wurzel der Primula Veris

Extraktionsflüssigkeit: 50% Ethanol (v/v)

Extraktkonsistenz: Pulver

5

Magnolia officinalis:

Benutzter Teil der Pflanze: Rinde

Extraktionsflüssigkeit: Alkohol und Wasser

Extraktionskonsistenz: Pulver

10

Sellerie (Apium graveolens):

Benutzter Teil der Pflanze: Knolle

Extraktionsflüssigkeit: unbekannt

Extraktionskonsistenz: ölige Flüssigkeit

15

Inhaltsstoff 9% Sellerieöl

Die lipasehemmenden Substanzen in den Pflanzenextrakten konnten bis jetzt noch nicht identifiziert werden.

20

Beschreibung der Aufbereitung und der Verfahren zur Bestimmung der Enzymaktivitäten.

25

Vorbereitung der Testlösung

Zur Vorbereitung der Testlösung aus extrahiertem Pulver und flüssigem Material, werden 200 mg des extrahierten Materials in 1 ml eines geeigneten Lösungsmittels aufgelöst und intensiv verrührt. Nach Zentrifugieren bei 3400 Umdrehungen für 5 Minuten wird der erhaltene flüssige Bestandteil als Testlösung genutzt. Zum Anpassen des Verhältnisses zwischen der Konzentration der festen Bestandteile und der Enzymmasse im letzten Versuch wurde die Testlösung im

30

Verhältnis 1:200 verdünnt um die alkalische Phosphatase zu bestimmen.

5 Zur Zubereitung der Testlösung aus CO₂-Auszügen und Ölharzen werden 100 µl öligen Flüssigkeitsextrakt in 900 µl eines geeigneten Enzympuffers gelöst und mit Ultraschall bei 100 Watt für 5 Minuten behandelt.

10 **Pankreatische Lipase (Bauchspeicheldrüsenlipase)**

Zwei Lipasebestimmungen wurden durchgeführt um die Aktivität der pankreatischen Lipase in vitro zu ermitteln:

15 1. Das Assay für die Bestimmung der Lipaseaktivität besteht aus

- 200 µl von einem 50 mM/L BICIN-Puffer (pH 8,0), der 1 % technisches Gummi arabicum enthält.

- 50 µl Pflanzenextraktlösung und

20 - 25 µl einer 0,35 mM/L pankreatischen Lipaselösung

Diese Mischung wurde für 20 Minuten bei 37° inkubiert.

Die letzte Messung der pankreatischen Lipaseaktivität wird einem Autoanalyser für klinische Chemie (Konelab, Kone) durchgeführt, unter Verwendung eines Lipasekolorimetertestes mit einer Diacylglycerol mit Methylresorufin in dritter Position als Substrat und Colipase und Gallensalze als wesentliche Co-Faktoren. Dieses Verfahren ist für die pankreatische Lipase spezifisch und basiert auf der Spaltung des Methylresorufin vom Substrat durch die Enzyme.

30 Zur Bestimmung der pankreatischen Lipaseaktivität im Autoanalyser wurde folgendes Pipettierschema gewählt:

- 5
1. 60 µl Reagenz 1: Colipase und Cholat
 2. 2 µl Testlösung + 10 µl Waschlösung
 3. 180 Sekunden Inkubation
 4. 40 µl Reagenz 2: Colorimetrisches Substrat und Cholat
 5. 120 Sekunden Inkubation

Die Lipaseaktivität wurde bestimmt anhand von 12 Messpunkten nach 83 Sekunden. Das Methylresorufin wurde fotometrisch bei 75 Nanometern gemessen.

10

2. Die Lipaseinhibition unter dem Einfluss von Pflanzenextrakten wurde mit einer zweiten Lipaseaktivitätsmessmethode bestimmt, indem die Freisetzung der freien Fettsäure während der Hydrolyse aus Triolein durch das Enzym gemessen wird.

15

Um das Inkubationsgemisch herzustellen, wird ein gebrauchsfertige Lösung (Reagenz R1) verwendet. R1 besteht aus:

26 mmol/L Tris Puffer, pH 9,2
19 mmol/L Natriumdesoxycholat
0,1 mmol/L Calciumchlorid
0,3 mmol/L Triolein
300 KU/L Colipase

20

Die Inkubationsmischung setzt sich wie folgt zusammen:

25

50 µL 26 mmol/L Tris Puffer, pH 9,2
50 µL 9,7 mmol/L Triolein Emulsion in R1
50 µL 0.134 mol/L pancreatische Lipase in 26 mmol/L Tris Puffer pH 9,2

30

50 µL Testlösung

1 % Methylzellulose in 26 mmol/L Tris buffer (pH 9.2) wurde bei der Untersuchung der CO₂ Auszüge benutzt.

5 Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37° in einem Wasserbad wurde die Reaktion durch Beigabe von 3 ml einer Chloroform-Heptan-Methanol-Mischung (50:49:1) gestoppt. Die freigesetzten freien Fettsäuren wurden aus dem Reaktionsgemisch durch intensives Rühren für 10 Minuten extrahiert. Nach Zentrifugieren (3400 Umdrehungen, 10 Minuten) wird ein 2 ml Rest werden aus der Chloroformphase gewonnen und 1 ml aus einem Kupferreagenz (94 ml
10 reines Wasser, 6ml 1 N NaOH, 6,45 mmol/L pro Cu(NO₃)₂, 0,1 mol/L Triethanolamin, 33 % (w/v) NaCl) wird zugegeben. Diese Mischung wurde intensiv für 10 Minuten gerührt und bei 3400 Umdrehungen für 10 Minuten zentrifugiert. Aus dem flüssigen Überstand wurden 1 ml
15 entnommen und ein 1 ml Chloroform bei 0,1 % Bathocuproin und 0,05 (w/v) 3-Tert-butyl-4-hydroxyanisol wurden hinzugegeben. Der fette Säure- Kupfer- Bathocuproin-Komplex wird schließlich fotometrisch bei 480 nm in einem Standardfotometer bestimmt.

20 Um sicherzustellen, dass der Rückgang der Lipaseaktivität nicht auf einen unspezifisches Enzymhemmer bzw. Denaturierung des Enzymkomplexes zurückzuführen ist, wurden die Aktivität der α -Amylase und der alkalischen Phosphatase zusätzlich bestimmt. Eine Hemmung der α -Amylase kann sich auswirken als eine Verringerung
25 des postprandialen Blutzuckerspiegels und wird als zusätzlicher positiver Effekt für Diabetes-Patienten betrachtet.

α -Amylase

30 Die Amylaseaktivitätsmessung unter dem Einfluss der Pflanzenextrakte wurden wie folgt durchgeführt:

Der Inkubationsmix für die Bestimmung der Amylaseaktivität besteht aus insgesamt 250 μL :

- 5
- 200 μL 50 mM/L MOPSO Puffer (pH 8,0) mit 1 % Gummi arabium
 - 25 μL Pflanzenextrakt Lösung und
 - 25 μL einer 0,35 mM/L α -Amylase Lösung

10

Diese Mischung wurde für 20 Minuten bei 38°C inkubiert. Die abschließliche Messung der pankreatischen Lipaseaktivität wird durchgeführt in einem Autoanalyser für chemische Chemie (Konelab, Kone).

Prinzip der chemischen Reaktion:

- 15
1. Ethylen-p-Nitrophenol-(Glucose)₇ $\rightarrow$
Ethylen-(Glucose)₃₋₄ + p-Nitrophenol-(Glucose)₂₋₄
 2. p-Nitrophenol-(Glucose)-Reste $\rightarrow$ p-Nitrophenol ($\lambda = 405 \text{ nm}$) + Glucose

20

Das Pipettenverfahren im Autoanalyser zur Bestimmung der α -Amylaseaktivitäten wurde wie folgt durchgeführt:

- 25
1. 120 μL Reagenz: Substrat + α -Glucosidase
 2. 300 Sekunden Inkubation
 3. 3 μL Testlösung
 4. 180 Sekunden Inkubation

Die α -Amylaseaktivität wird bestimmt durch Messung von 5 Punkten in 120 Sekunden.

Alkalische Phosphatase

Die Alkalische-Phosphatase-Aktivitätsmessung unter dem Einfluss von Pflanzenextrakten wurde wie folgt durchgeführt:

5 Der Inkubationsmix für die Bestimmung der Lipaseaktivität bestand aus

- 200 µL einer 50 mM/L HEDTA Puffer (pH 8,0) enthaltend,
- 25 µL Pflanzenextrakttestlösung und
- 25 µL einer 0,014 mM/L alkalische Phosphatase Lösung

10

Die Mischung wurde inkubiert für 20 Minuten bei 22°C.

Die abschließende Messung der pankreatischen Lipaseaktivität wurde durchgeführt in einem Autoanalyser für klinische Chemie (Kone-lab, Kone).

15

Reaktionsgleichung

2-Amino-2-methyl-1-propanol + 4-Nitrophenylphosphatester →
(2-Amino-2-methyl-1-Propanoö) Phosphat + 4-Nitrophenoxid
(λ= 409 nm)

20

Das Pipettenverfahren im Autoanalyser zur Bestimmung der Aktivität der Alkalinen Phosphatase war wie folgt:

25

1. 150 µL Reagenz
2. 300 sec. Inkubation
3. 3µL Testlösung
4. 120 sec. Inkubation

30

Die Aktivität der alkalische Phosphatase wurde bestimmt mittels 5 Messpunkten in 22 Sekunden.

Verifizierung im Tierversuch

5 Zur weiteren Überprüfung und Verifizierung der in vitro gefundenen Ergebnisse wurde im Tierexperiment die Triglycerid senkende Wirkung überprüft.

10 Dazu wurde ein Lipidbelastungstest bei Ratten mit Triton WR-1339 zur Inhibierung der Triglyceridelimination aus dem Blut durchgeführt und der postprandiale Anstieg der Plasmatriglyceridwerte über vier Stunden hinweg gemessen. Dabei wurden die folgenden Testsubstanzen verwendet:

Proteine und Peptide

- 15 - Protamin: stark basisches Kernprotein (von 32 AS 21x Arg), aus Fischsperma gewonnen, Triglycerid senkend (Tsujita et al., 1996)
- Peptid (D4 Globin Digest): enzym. Hydrolysat aus bovinem Erythrozytenglobin, Triglycerid senkend (Kagawa et al., 1996, 1998)
- 20 - VVYP: f32-35 der β -Kette bovinen Härmoglobins, Triglycerid senkend (Kagawa et al., 1996, 1998)
- LVYP: f73-76 bovinen β -Caseins

Extrakte

- 25 - Ethanolische Extrakte
 - Blätter von *Tabebuia impetiginosa* (Lapacho)
 - *Arctium lappa* L (Klette)
 - Samen von *Linum usitatissimum* (Lein)
 - Samen von *helianthus annuus* (Sonnenblume)
 - *Calendula officinalis* (Ringelblume)
- 30 - Oleoresin
 - Samen von *Carum carvi* (Kümmel)

- CO₂-Extrakte
 - Frucht mit Schale von *Elettaria cardamomum* (Kardamom)
 - Blätter von *Thymus vulgaris* (Thymian)
- Propolis (Bienenkittharz)

5 Orlistat als Positivkontrolle

10 Als Ergebnis wurde der Anstieg der postprandialen Triglyceridwerte im Plasma von Ratten nach Gabe der Testsubstanzen erfasst. Dabei zeigte sich, dass weder für Protamin, Peptid D4 noch für die Tetrapeptide ein die Triglyceride senkender Effekt gefunden wurde. Ebenso war auch bei einigen Extrakten in diesem Versuch keine gewünschte Wirkung feststellbar. Dazu zählen Leinsamen, Sonnenblume, Ringelblume und Propolis.

15 Bei anderen Extrakten konnte jedoch eine teilweise sehr deutliche Reduzierung der Triglyceride beobachtet werden; dazu zählt Kümmel mit einer Reduzierung um 3 % $\pm$ 9 %, Thymian mit einer Verminderung um 7 % $\pm$ 7 %, die Klette mit einer Verringerung um 12 % $\pm$ 6 %, Kardamon mit einer Verkleinerung um 13 % $\pm$ 7 % und insbesondere herausragend der Lapachoteeextrakt mit einer signifikanten Absenkung um 16 % $\pm$ 7 %. Im Versuch wurde nicht differenziert, welche Inhaltsstoffe der Extrakte die insgesamt beobachtete Wirkung vermitteln. Hier ist noch ein thematischer Raum für die Durchführung weiterer Versuche im Tierbereich, und es ergeht ein Hinweis auf die

20

25 Erfordernisse von Humanstudien.

Generell konnte mit diesem Tierversuch nachgewiesen werden, dass von den in vitro als erfindungsgemäß wirksam gekennzeichneten Wirkstoffen tatsächlich auch einige eine gleiche Wirkung in einem

30

Tierversuch zeigten. Ebenso wurde deutlich, dass diese Wirkung keinesfalls linear übertragbar ist und in einzelnen Fällen sogar von anderen Einflüssen überlagert wird, die im Extremfall zu einer Inver-

5 tierung der Wirkung führen können. Aus diesem Versuch ist jedoch abzuleiten, dass eine weitere Überprüfung der hier als schützenswert im Sinne einer spezifischen Lipasehemmung aufgeführten Stoffe sinnvoll ist und sehr konkrete Ergebnisse erwarten lässt. Im Folgenden sollen weitere Einzelheiten und Merkmale der Erfindung anhand von zwei Beispielen näher erläutert werden. Diese sollen die Erfindung jedoch nicht einschränken sondern nur erläutern. Es zeigt in schematischer Darstellung:

10 **Figur 1** Anstieg der postprandialen Triglyceridwerte im Plasma von Ratten nach Gabe der Testsubstanzen

Figur 2 Postprandiale Triglyceridwerte in Rattenplasma nach einem Lipidleistungstest.

15

Die Figuren zeigen im Einzelnen:

20 In **Figur 1** ist tabellenmäßig die Auswirkung der den Ratten etwa 0,05 Stunden nach der Nahrungsaufnahme verabreichten Substanzen in Bezug auf den Triglyceridwert verzeichnet. Dabei wird unterschieden zwischen den Proteinen und Peptiden sowie den Extrakten von natürlichen Wirkstoffen. Signifikant ist, dass die Proteine und Peptide in dieser Versuchskonfiguration nicht zu der gewünschten Reduzierung sondern teilweise zu einer deutlichen Erhöhung der Triglyceridwerte führten. Dies gilt auch für einige natürliche Wirkstoffe. Andere natürliche Substanzen sind jedoch in der gewünschten Richtung wirksam. Insbesondere Signifikant ist hier die Wirkung des Lapachotees aus der inneren Rinde des Taheebo-Baumes (*Tabe*
25
30 *buia impetiginosa*).

In **Figur 2** sind die Kurven der Triglyceridwerte in Abhängigkeit von der Einwirkzeit nach der Nahrungsaufnahme aufgetragen. Erwartungsgemäß sind die Triglyceridwerte bei der Gabe von Orlistat am niedrigsten. Für die bereits in Figur 1 aufgeführten, positiv wirkenden Extrakte konnte jedoch auch in diesem Versuchszeitraum von vier Stunden eine wunschgemäße Reduzierung der Triglyceride erreicht werden. Als wirksam nachgewiesen sind die Klette, der Lapachotee und das Kardamom. Der vergleichsweise besonders geringe Anstieg der Triglyceridwerte bei der Gabe von Orlistat entspricht den Erwartungen und weist nach, dass der Tierversuch in der durchgeführten Spezifikation für die Erfindung relevant ist.

Patentansprüche

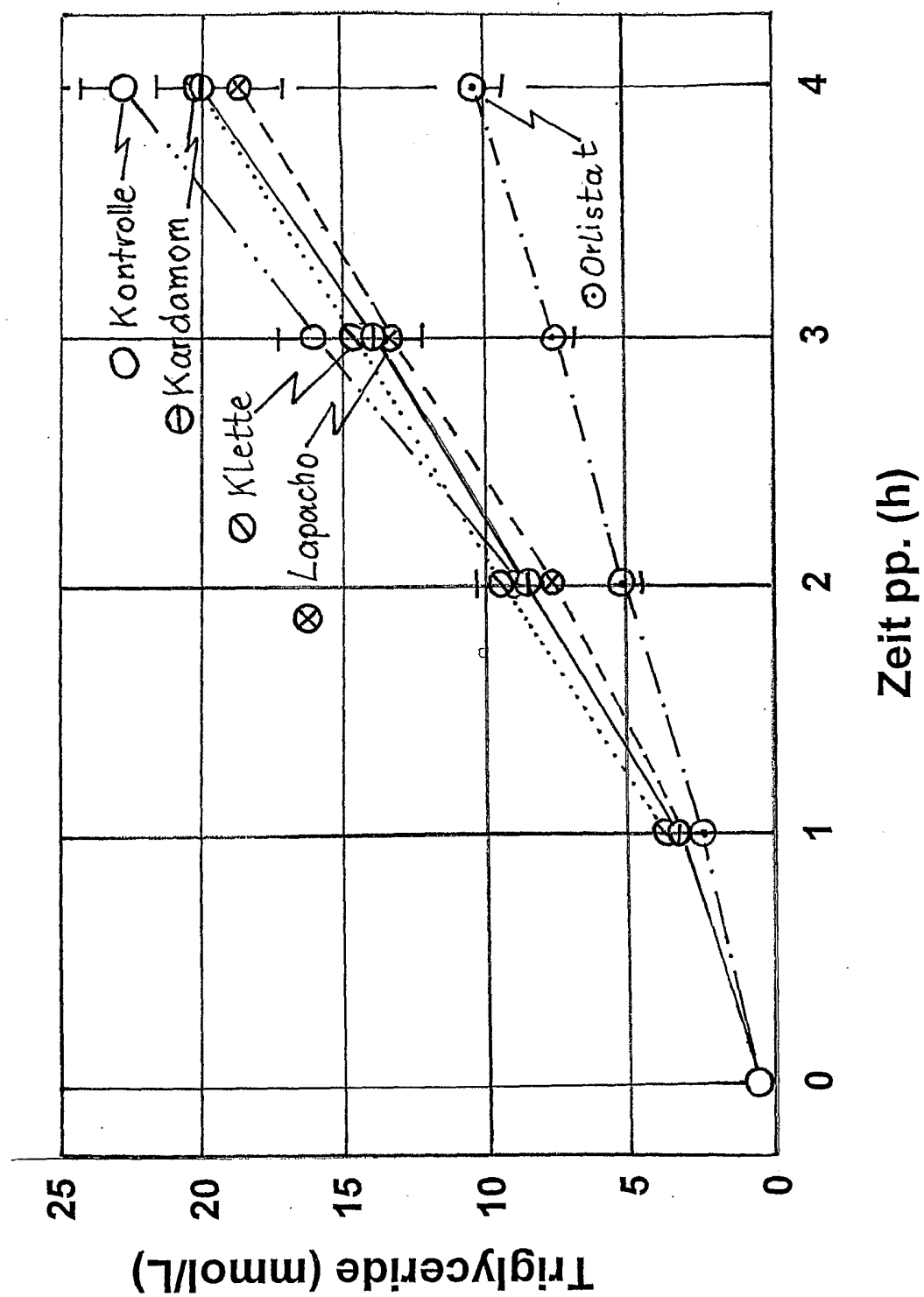
1. Verwendung der nachfolgenden Stoffe, Stoffextrakte oder Stoff-
5 essenzen als Einzelkomponente oder als Gemisch zur Herstel-
lung eines oral zu applizierenden Arzneimittels, das als Lipase-
Inhibitor wirkt:
- 10 Cardamom und/oder
Majoran und/oder
Thymian und/oder
Chili (*Capsicum frutescens*) und/oder
Abendprimel und/oder
Oreganoblätter (*oreganum vulgare*) und/oder
15 Kamilleblätter (*Chamomilla recutita*) und/oder
Muskatnuss (*Myristica fragrans*) und/oder
Apfelmus (pomace) und/oder
Kornkeim und/oder
Mandel und/oder
20 Haselnuss und/oder
Walnuss und/oder
Kürbiskeim und/oder
Cuphea wrightii und/oder
Abendprimel und/oder
Öflachs (*Linum usitatissimum*) und/oder
25 große Klette (*Arctium lappa* L) und/oder
Flachs und/oder
Keime des *Helianthus annuus* (sunflower) und/oder
Ringelblume (*Calendula officinalis*) und/oder
Echinops banaticus und/oder
30 Mallotus philippinensis und/oder
Raps, und/oder
Sesam und/oder
schwarzer Kümmel und/oder
Cynoglossum officinale und/oder
35 Lapachotea und/oder
Arctostaphylos uva-ursi und/oder
Steinblume (*Flor de piedra*) und/oder
Propolis und/oder
Primula Veris und/oder
40 Magnolia officinalis und/oder
Sellerie (*Apium graveolens*)

2. Verwendung der nachfolgenden Stoffe, Stoffextrakte oder Stoff-
essenzen als Einzelkomponente oder Gemisch

- 5 Cardamom und/oder
Majoran und/oder
Thymian und/oder
Chili (*Capsicum frutescens*) und/oder
Abendprimel und/oder
Oreganoblätter (*oreganum vulgare*) und/oder
Kamilleblätter (*Chamomilla recutita*) und/oder
10 Muskatnuss (*Myristica fragrans*) und/oder
Apfelmus (pomace) und/oder
Kornkeim und/oder
Mandel und/oder
Haselnuss und/oder
15 Walnuss und/oder
Kürbiskeim und/oder
Cuphea wrightii und/oder
Abendprimel und/oder
Ölflachs (*Linum usitatissimum*) und/oder
20 große Klette (*Arctium lappa* L.) und/oder
Flachs und/oder
Keime des *Helianthus annuus* (sunflower) und/oder
Ringelblume (*Calendula officinalis*) und/oder
Echinops banaticus und/oder
25 Mallotus philippinensis und/oder
Raps, und/oder
Sesam und/oder
schwarzer Kümmel und/oder
Cynoglossum officinale und/oder
30 Lapachotea und/oder
Arctostaphylos uva-ursi und/oder
Steinblume (*Flor de piedra*) und/oder
Propolis und/oder
Primula Veris und/oder
35 Magnolia officinalis und/oder
Sellerie (*Apium graveolens*)
als Lipase-Inhibitoren.

Proteine/Peptide		Extrakte	
Substanz	Anstieg pp. [TG] in % der Kontrolle	Substanz	Anstieg ppa. [TG] in % der Kontrolle
Orlistat	33 ± 2	Orlistat	44 ± 4
Peptid D4	102 ± 10	Lapachotee	82 ± 7
Protamin	113 ± 11	Kardamom	87 ± 7
WYP	117 ± 16	Klette	88 ± 6
LVYP	129 ± 10	Thymian	93 ± 7
		Kümmel	97 ± 9
		Propolis	101 ± 10
		Ringelblume	104 ± 6
		Sonnenblume	108 ± 8
		Leinsamen	117 ± 12

Figur 1

Figur 2