(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 05 174 T2** 2004.07.15

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 181 030 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 05 174.9**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP00/04976**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 940 292.6**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/74695**
(86) PCT-Anmeldetag: **31.05.2000**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **14.12.2000**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **27.02.2002**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **10.09.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.07.2004**

(51) Int Cl.[7]: **A61K 35/78**

(30) Unionspriorität:
MI991244 03.06.1999 IT

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Indena S.p.A., Mailand/Milano, IT

(72) Erfinder:
BOMBARDELLI, Ezio, I-20141 Milano, IT;
MORAZZONI, Paolo, I-20139 Milano, IT

(74) Vertreter:
Zumstein & Klingseisen, 80331 München

(54) Bezeichnung: **TANACETUM PARTHENIUM EXTRAKT**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft einen Tanacetum parthenium-Extrakt, der im Wesentlichen frei von α-ungesättigten γ-Lactonen ist, und pharmazeutische und kosmetische Zusammensetzungen, die den Tanacetum parthenium-Extrakt, der im Wesentlichen frei von Parthenolid ist, enthalten.

TECHNISCHER HINTERGRUND

[0002] Die Extrakte von Tanacetum parthenium, eine Pflanze, die zu der Familie Asteracee/Komposite gehört, auch bekannt unter den Namen Altamisa, Crisanthemum, Leucanthemum, Pyrethrum parthenium oder unter dem üblichen Namen "Mutterkraut", wurden traditionell bei der Behandlung von Migräne, Schwindel, Arthritis, Menstrualstörungen, Fieber, Zahnschmerz, Magenbeschwerden und Insektenbissen verwendet. Die Extrakte von Tanacetum parthenium enthalten zusätzlich zu flüchtigen Ölen verschiedener Beschaffenheit (Mono- und Sesquiterpen-Komponenten) Flavonoide, Tannine, Pyrethrin, auch Terpenoide der Familie der Sesquiterpenlactone, die unter den Namen Germacranolide, Guaianolide und Eudesmanolide bekannt sind. Die Verbindungen werden durch eine α-ungesättigte γ-Lactonstruktur charakterisiert und umfassen insbesondere die Verbindungen, die unter den Namen Parthenolid, 3-β-Hydroxy-parthenoid, Costunolid, 3-β-Hydroxy-costunolid, Artemorin, 8-α-Hydroxyestafiatin und Chrysanthemonin bekannt sind.
[0003] Das Vorliegen der Sesquiterpenlactone wird als die Grundbedingung für die pharmakologische Wirkung der Extrakte angesehen (J. Pharm. Parmacol. 1992, 44: 391–395).
[0004] Die Aufmerksamkeit richtete sich insbesondere auf Parthenolid, von dem angenommen wird, dass es ein fundamentaler Wirkbestandteil des Extrakts ist, aber auch hauptverantwortlich für allergische Reaktionen ist, die manchmal nach Behandlung mit den Extrakten von Tanacetum parthenium auftreten (Arch. Dermatol. Forsch. 1975, 251 (3): 235–44; ibidem 1976, 255 (2): 111–21; Contact Dermatitis, 1988, 38 (4): 207– 8; Am. J. Contact Dermatol. 1998–9 (1): 49–50; Br. J. Dermatol. 1995, 132 (4): 543–7).
[0005] Die Extrakte von Tanacetum parthenium, die Parthenolid enthalten, werden in WO 94 06800; EP 0 553 658; WO 92 11857; GB 2 166 952; EP 98 041; WO 98 39018 offenbart.

OFFENBARUNG DER ERFINDUNG

[0006] Es wurde nun gefunden, dass Tanacetum parthenium-Extrakte, die im Wesentlichen frei von α-ungesättigten γ-Lactonen sind, insbesondere von Parthenolid, interessante pharmakologische Eigenschaften zusammen mit einem deutlich verminderten Risiko für allergische Reaktionen aufweisen.
[0007] Die erfindungsgemäßen Extrakte können deshalb zweckmäßigerweise als Wirkbestandteile für die Herstellung von pharmazeutischen oder oralen kosmetischen Zusammensetzungen verwendet werden.
[0008] "Im Wesentlichen frei von α-ungesättigten γ-Lactonen" und "im Wesentlichen frei von Parthenolid" bedeutet hierin einen Extrakt mit einem Gewichtsgehalt von Parthenolid unter 0,2%, vorzugsweise unter 0,1%, bevorzugter unter 0,09% und besonders bevorzugt unter 0,07%.
[0009] Der erfindungsgemäße Extrakt ist erhältlich durch ein Verfahren, das umfasst:

a) Extrahieren der Pflanze (oberirdische Teile) mit Aceton, Alkoholen oder Gemischen von diesen Lösungsmitteln mit Wasser;
b) Extrahieren des Materials von Schritt a) mit Kohlenwasserstoffen;
c) Extrahieren der Nicht-Kohlenwasserstoff-Phase mit einem unpolaren Lösungsmittel;
d) Behandeln des Extrakts mit dem unpolaren Lösungsmittel, vorher eingedampft und erneut in Wasseralkoholischer Lösung gelöst, mit einem stark basischen Harz;
e) Eluieren des Harzes mit Alkoholen und Entfernen der eluierten Lösung;
f) Behandeln des Harzes mit alkoholischen oder Wasseralkoholischen Lösungen von Säuren, Einengen der Lösung und Extrahieren des erhaltenen Rückstands mit einem unpolaren Lösungsmittel;
g) Eindampfen des unpolaren Lösungsmittels von Schritt f) zur Gewinnung eines Rückstandes, der zu dem Rückstand aus der Verdampfung des Kohlenwasserstoffextrakts von Schritt b) und zu der acetonischen oder alkoholischen Phase, die nach der Extraktion mit dem unpolaren Lösungsmittel von Schritt c) erhalten wurde, gegeben wird;
h) Eindampfen und Trocknen.

[0010] Parthenolid und die anderen verwandten Sesquiterpenlactone können in dem stark basischen Harz entfernt werden, was überraschenderweise nicht das Öffnen des Lactonrings verursacht, welcher erkanntermaßen empfindlich auf basische Hydrolyse ist: die Flavonkomponenten mit sauren Hydroxygruppen werden deshalb durch das Harz beibehalten im Gegensatz zu Parthenolid und verwandten Verbindungen, die daraus entfernt werden können.
[0011] Die bevorzugten Lösungsmittel für die verschiedenen Extraktionsschritte werden im nachstehenden

angeführt:

Schritt a):	Aceton, Methanol, Ethanol oder Gemische davon mit Wasser;
Schritt b):	Hexan, n-Pentan, Petrolether, Ligroin;
Schritt c):	Methylenchlorid, Chloroform, Essigsäureethylester, vorzugsweise Methylenchlorid;
Schritt f):	Essigsäureethylester.

[0012] "Alkoholische oder Wasser-alkoholische Lösungsmittel" bedeutet vorzugsweise Methanol oder Methanol mit Wasser, dessen Prozentsätze im Bereich von 10 bis 80 Volumenprozent liegen.
[0013] Basische Harze, die gemäß der Erfindung verwendet werden können, sind kommerziell erhältlich, beispielsweise unter den eingetragenen Namen Relite 2A®, Relite 3A2®, Dowex 2®.
[0014] Alternativ kann der erfindungsgemäße Extrakt ausgehend von den üblichen Extrakten, die kommerziell erhältlich sind, durch Behandlung mit stark basischen Harzen, gegebenenfalls vorher Extrahieren der lipophilen Komponenten davon mit Kohlenwasserstoff-Lösungsmitteln, die mit dem Harz nachteilig in Wechselwirkung treten könnten, erhalten.
[0015] Der Gehalt an α-ungesättigten γ-Lactonen oder an Parthenolid in dem Endextrakt wird durch HPLC bestimmt.
[0016] In der beigefügten Figur wird das typische HPLC-Profil des durch das vorstehend beschriebene Verfahren erhältlichen Extrakts gezeigt.
[0017] Der erfindungsgemäße Extrakt hat günstige pharmakologische Eigenschaften zusammen mit einem deutlich verminderten Risiko des Induzierens allergischer Reaktionen. Die Konservierung der pharmakologischen Eigenschaften, die für die üblichen Extrakte von Tanacetum parthenium charakteristisch sind, trotz der fast vollständigen Entfernung der Sesquiterpenlactone ist noch überraschender im Hinblick auf die bis jetzt berichteten Dokumente bezüglich der Beziehung zwischen Bioaktivität und Zusammensetzung von bekannten Extrakten (J. Pharm. Pharmacol. 1992, 44: 391–395).
[0018] Insbesondere haben die erfindungsgemäßen Extrakte mit einem Gehalt an Parthenolid unter 0,2% Antithrombozyten-, entzündungshemmende, analgetische, Antimigränewirkungen.
[0019] Die Erfindung betrifft deshalb auch die pharmazeutischen Zusammensetzungen, die als Wirkbestandteil eine wirksame Menge des Tanacetum parthenium-Extrakts der Erfindung in Anmischung mit geeigneten Trägern enthalten.
[0020] Insbesondere werden die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen 10 bis 500 mg Extrakt enthalten und werden 3–4-mal am Tag in Abhängigkeit von der Verschreibung des Arztes verabreicht. Der bevorzugte Verabreichungsweg ist der orale, jedoch andere Wege, wie der örtliche und parenterale, wären auch denkbar.
[0021] Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen sind besonders für die Therapie und Prophylaxe von Migräneanfällen verwendbar.
[0022] Die erfindungsgemäßen Extrakte können auch als Wirkbestandteile für orale kosmetische Formulierungen verwendet werden.
[0023] Die Erfindung wird in den nachstehenden Beispielen genauer beschrieben.

BEISPIEL 1 – HERSTELLUNG DES EXTRAKTS

[0024] Zwei Kilogramm Tanacetum parthenium werden bei 50– 60°C mit 20 l 70%igem wässerigen Methanol extrahiert. Der Extrakt wird im Vakuum zu etwa 1 l auf konzentriert und mit einem gleichen Volumen Methanol verdünnt. Die erhaltene Lösung wird mit 3 × 2 Litern n-Hexan extrahiert. Der Hexanextrakt wird unter Vakuum zur Trockne eingedampft unter Gewinnung von etwa 30 g Rückstand (Extrakt H). Die Wasser-methanolische Lösung wird dann mit 2 × 0,5 l Methylenchlorid extrahiert. Die organische Phase wird unter Vakuum zur Trock-

ne eingedampft unter Gewinnung von etwa 70 g Rückständen (Extrakt DCM). Die Wasser-methanolische Phase (Extrakt HM) wird verworfen. Der DCM-Extrakt wird in 0,6 l 90%igem Methanol gelöst und unter Rühren mit 0,6 1 stark basischem Harz (Relite 2A®) für drei– vier Stunden behandelt. Die Suspension wird unter Vakuum filtriert und das Harz wird mit etwa 2 l 90%igem Methanol gewaschen. Die methanolische Lösung, enthaltend Parthenolid und seine verwandten Verbindungen, wird entfernt. Das basische Harz wird dann unter Rühren für eine Stunde mit 0,6 l Methanol, enthaltend 65 ml konzentrierte Chlorwasserstoffsäure, behandelt. Das Harz wird unter Vakuum filtriert und mit weiteren 2,5 l. Methanol gewaschen. Das Filtrat und die Waschlaugen werden vereinigt, unter Vakuum zu etwa 200 ml aufkonzentriert und mit 3 × 200 ml Essigsäureethylester extrahiert. Der erhaltene Extrakt (E. A.), enthaltend die Flavonkomponenten Tanetin und verwandte Verbindungen, wird unter Vakuum zur Trockne eingedampft unter Gewinnung von etwa 4 g eines Rückstands. Die Rückstände der Extrakte H und E. A. werden mit dem Extrakt HM vereinigt. Die erhaltene Lösung wird unter Vakuum zur Trockne eingedampft und der feste Rückstand wird unter Vakuum bei 50°C zum Konstantgewicht getrocknet. Etwa 490 g Extrakt an departhenolisiertem T. parthenium werden erhalten, was laut HPLC-Analyse (Säule Zorbax SB C18; Elutionsmittel H_2O + 0,01% TFA; B : MeCN + 0,01% TFA; Gradient A. B: 90%-10% : 10%–90%; Fluss 1 ml/min) einen Parthenolidgehalt unter 0,07% zeigte.

BEISPIEL 2 – PHARMAKOLOGISCHE WIRKUNG

[0025] Ein experimentelles Modell von Nitroglycerininduzierter neuronaler Stimulation in der Ratte, beschrieben in Brain Research 1995, 682: 167–181; ibidem 1995 695, 37–44, und in Neuropharmacol. 1997, 36(10); 1417–1424, wurden verwendet.

[0026] Nitroglycerin (ein Vasodilatator, der üblicherweise zum Behandeln von kardiovaskulären Störungen verwendet wird) kann als ein Diagnosewerkzeug bei der Untersuchung von Migränekopfschmerz verwendet werden, da seine Verabreichung eine spontanartige Attacke bei Migränepatienten verursacht. Die Nitroglycerin-induzierte Attacke erfolgt nicht sofort, sondern um einige Stunden verzögert und ist typischerweise mit Begleitsymptomen, wie Erbrechen und Lichtphobie, begleitet. Die vasodilatatorische Wirkung von organischen Nitraten, einschließlich Nitroglycerin, erwächst aus dem Metabolismus zu Stickoxid, von dem auch berichtet wird, dass es als Neurotransmitter bei SNC eine Rolle spielt. Neuronale Stimulierung aktiviert schnell die Transkription von verschiedener Protooncogenase, welche aufgrund ihrer schnellen und vorübergehenden Induktion zwischenfrühe Gene genannt wurden. Unter ihnen ist c-fos das am gründlichsten Untersuchte und das codierte Protein Fos wird zu dem Kern translokalisiert, wo es für einige Stunden vorherrscht, und kann immunostöchiometrisch nachgewiesen werden.

Experimentelle Verfahren

[0027] Fünfundzwanzig männliche Sprague-Dawley-Ratten, aufgeteilt in 5 Tiergruppen, wurden jeweils verwendet. Zwei Gruppen von Tieren (Kontrolle und Nitroglycerin) wurden mit Träger allein (0,5% Carboxymethylcellulose, 10 ml/kg) injiziert, während die anderen 3 Gruppen oral für 3 Tage mit einem Tanacetum parthenium-Extrakt, der im Wesentlichen frei von Parthenolid ist (TPPDE), bei Dosen von 100 und 200 mg/kg bzw. mit regulärem Tanaceutum parthenium-Extrakt (TPRE) bei den gleichen Dosierungen behandelt.

[0028] Eine Stunde nach der letzten Verabreichung wurden alle Tiere, ausgenommen die Kontrollgruppe, subcutan mit 10 ml/kg Nitroglycerin behandelt.

[0029] Vier Stunden nach Verabreichung von Nitroglycerin wurden die Ratten mit Natriumpentobarbital anästhesiert und mit Fixativ durch die aszendierende Aorta durchtränkt. Die Hirne wurden schnell entfernt und in dem gleichen Fixativum über Nacht nachfixiert. Bereiche durch das gesamte Hirn wurden bei 50 µm an einem Gefrierscheibenmikrotom geschnitten. Die Bereiche wurden seriell in sechs Wells, die kalte phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) enthalten, gesammelt und zur Immunohistochemie als frei-schwimmende Bereiche verarbeitet.

[0030] Die Ergebnisse werden in der nachstehenden Tabelle angeführt.

TABELLE: Anzahl an immunoreaktiven Neuronen (Mittelwert ± Standardabweichung) in dem paraventrikulären Kern des Hypothalamus (PVH), Lokus coeruleus (LC) und parabrachialem Kern (PBN) 4 Wochen nach Nitroglycerinverabreichung.

Behandlung	PVH	LC	PBN
Kontrolle	95,4 ± 43,1	47,0 ± 21,2	27,3 ± 15,2
Nitroglycerin	574,2 ± 298,5	334,3 ± 61,4	231,3 ± 89,4
TPPDE (100) + Nitroglycerin	378,5 ± 182,9*	200,5 ± 43,4*	140,7 ± 64,6*
TPPDE (200) + Nitroglycerin	123,4 ± 74,5**	87,5 ± 24,5**	71,6 ± 28,6**
TPRE (200) + Nitroglycerin	569,7 ± 288,3	321,2 ± 49,1	228,3 ± 87,5

* $p < 0,03$ Test auf TPPDE (100) + Nitroglycerin gegen Nitroglycerin-Kontrollgruppe
** $p < 0,001$ Test auf TPPDE (200) + Nitroglycerin gegen Nitroglycerin-Kontrollgruppe

Patentansprüche

1. Extrakte von Tanacetum parthenium mit einem Gehalt an α-ungesättigten γ-Lactonen unter 0,2%, erhältlich durch ein Verfahren, das umfasst:
a) Extrahieren der Pflanze (oberirdische Teile) mit Aceton, Alkoholen oder Gemischen von diesen Lösungsmitteln mit Wasser;
b) Extrahieren des Materials von Schritt a) mit Kohlenwasserstoffen;
c) Extrahieren der Nicht-Kohlenwasserstoff-Phase mit einem unpolaren Lösungsmittel;
d) Behandeln des Extrakts mit dem unpolaren Lösungsmittel, vorher eingedampft und erneut in Wasseralkoholischer Lösung gelöst, mit einem stark basischen Harz;
e) Eluieren des Harzes mit Alkoholen und Entfernen der eluierten Lösung;
f) Behandeln des Harzes mit alkoholischen oder Wasseralkoholischen Lösungen von Säuren, Einengen der Lösung und Extrahieren des erhaltenen Rückstands mit einem unpolaren Lösungsmittel;
g) Eindampfen des unpolaren Lösungsmittels von Schritt f) zur Gewinnung eines Rückstandes, der zu dem Rückstand aus der Verdampfung des Kohlenwasserstoffextrakts von Schritt b) und zu der acetonischen oder alkoholischen Phase, die nach der Extraktion mit dem unpolaren Lösungsmittel von Schritt c) erhalten wurde, gegeben wird;
h) Eindampfen und Trocknen.

2. Extrakt nach Anspruch 1 mit einem Gehalt an Parthenolid unter 0,2%.

3. Extrakt nach Anspruch 1 oder 2 mit einem Gehalt an α-ungesättigten γ-Lactonen unter 0,1%.

4. Pharmazeutische Zusammensetzungen, die den Extrakt von Ansprüchen 1–3 in Anmischung mit geeigneten Trägern enthalten.

5. Orale kosmetische Zusammensetzungen, die als Wirkstoff die Extrakte von Ansprüchen 1–3 in Anmischung mit geeigneten Trägern enthalten.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG.

