



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **333290**

(13) **B1**

NORGE

(51) **Int Cl.**

A61K 31/19 (2006.01)

A61K 36/00 (2006.01)

A61K 36/889 (2006.01)

A61P 13/08 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20054847	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2004.03.15 PCT/CU2004/00004
(22)	Inng.dag	2005.10.20	(85)	Videreføringsdag	2005.10.20
(24)	Løpedag	2004.03.15	(30)	Prioritet	2003.03.20, CU, 62/03
(41)	Alm.tilgj	2005.10.20			
(45)	Meddelt	2013.04.29			
(73)	Innehaver	Laboratorios Dalmer SA, Avenida 25, No.15819, entre 158 y 162, Reparto Cubanacan, Playa, CU-12100 HABANA, Cuba			
(72)	Oppfinner	Abilio Melquiades Laguna Granja, 2da No.11007 entre 9 y 11, Reparto Casino Deportivo, Cerro, CU-13400 HABANA, Cuba Eduardo Antonio Rodriguez Leyes, Dolores No. 274 entre Lawton y Armas, Lawton, CU-13800 HABANA, Cuba Rosa Maria Mas Ferreiro, Calle 206 No-2113 entre 23 y 21, Reparto Atabey, Playa, CU-12100 HABANA, Cuba Daisy Carbajal Quintana, Calle 208 No. 935 entre 19 y 21A, Reparto Atabey, Playa, CU-12100 HABANA, Cuba Maria de Lourdes Arruzazabala Valmanã, Calle H No. 15010 entre 7 y D, Altahabana, Boyeros, CU-10800 HABANA, Cuba Vivian Molina Cuevas, Calle 170 Edif C-2 Apto 25 entre Ira y 5ta, Reparto Flores, Playa, CU-12100 HABANA, Cuba Victor Luis Gonzalez Canavaciolo, Calle 174 Edif. DBE 2 Apto 4 entre Ira y 5ta, Reparto Flores, Playa, CU-12100 HABANA, Cuba			
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua, 0306 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Farmasøytisk sammensetning for behandling og forebygging av prostatisk hyperplasi og prostatitt ved å anvende frukter av roystonea regia kongepalme.			
(56)	Anførte publikasjoner	BADAMI R.C. ET AL., "Fatty acids of Roystonea Regia kernel and shell oils", Journal of the Oil Technologist, vol. 11, no. 4, 1979, side 100 US 6019976 A			
(57)	Sammendrag				

Oppfinnelsen vedrører en ny farmasøytisk sammensetning og en fremgangsmåte for å fremstille det samme fra fruktene av kongepalmen (*Roystonea regia*) for å forebygge og/eller behandle benign prostatisk hyperplasi (BPH) og prostatitt samt alopeci og hirsutisme. Den oppfinneriske sammensetning omfatter en blanding av frie fettsyrer og/eller esterene derav, innenfor et område på mellom 8 og 28 karbonatomer, spesielt mellom 8 og 18 karbonatomer, og, mer spesielt, mettede, rettkjedede frie fettsyrer med 8, 10, 12, 14, 16 og 18 karbonatomer og mono umettede frie fettsyrer med 16:1 og 18:1 karbonatomer. Den oppfinneriske fremgangsmåte for å fremstille den ovennevnte sammensetning omfatter tørkingen og knusingen av fruktene, med valgfri basisk hydrolyse, og deretter, selektiv ekstraksjon i organiske løsningsmidler.

Foreliggende oppfinnelse er relatert til den farmasøytiske Industri, og angår spesielt en ny farmasøytisk sammensetning som angitt i krav 1 og dens fremstillingsprosedyre fra fruktene av kongepalmen (*Roystonea regia*) som angitt i krav 3-7, hvor sammensetningen er egnet for å forebygge og/eller behandle benign

5 prostatisk hyperplasi (BPH) og prostatitt. Den oppfinneriske sammensetning består av en blanding av frie fettsyrer og/eller esterne derav som angitt i krav 1. Både fettsyrer og/eller esterne er innenfor et område på mellom 8 og 18 karbonatomer. Mer spesielt består blandingen av mettede, rettkjedede fettsyrer med 8, 10, 12, 14, 16 og 18 karbonatomer og monoumettede fettsyrer med 16:1 og 18:1

10 karbonatomer. De frie fettsyrer er anrikt fra esternes hydrolyse.

Denne sammensetning oppnås fra kongepalmefruktene som i begynnelsen tørkes og males, dette vegetabiliske materiale underkastes en moderat basisk hydrolyse for å oppnå et forsåpet produkt, underkastes en selektiv faststoff/væske-ekstraksjon med organiske løsningsmidler, eller en selektiv ekstraksjon av

15 blandingen av fettsyrer som angitt i krav 3. Begge prosedyrer fører til sammensetninger med farmakologiske egenskaper som ligner ekstraktet oppnådd uten forutgående forsåpning.

De således oppnådde blandinger er lik den aktive ingrediens inneholdt i forskjellige farmasøytiske formuleringer for behandlingen av BPH og prostatitt, samt andre

20 sykdommer, slik som alopesi og hirsutisme.

Den foreliggende oppfinnelse angår den farmasøytiske industri, siden den oppnådde farmasøytiske sammensetning dessuten kan anvendes i farmasøytiske formuleringer, som legemidler anvendt mot BPH, prostatitt, alopesi og hirsutisme.

Tidligere teknikk

25 Prostata er en kjertel lokalisert umiddelbart under blæren, og BPH er en sykdom tilstedeværende hos mer enn 50 % av mennene eldre enn 50 år. BPH består av forstørrelsen av kjertelens muskelfibere og eptielstruktur, som kan forårsake en urinveisobstruksjon som hyppig krever kirurgi for å forbedre symptomene på urinretensjon, slik som urinveisforstyrrelser, inkludert nykturi (Madsen og Bruskewitz, Curr Opinion Nephrol Hipert 4: 455-459, 1995). Frem til inngrepet har spesielt den

30 transuretrale reseksjon vært den vanlige behandling for pasientene som lider av denne patologi, men nylig har mange andre muligheter dukke opp (Oesterling, New Engl. J. Med 332: 99-109, 1995; Geller et al, J. Clin. Endocrinol Metab. 80, 745-

756, 1995), som inkluderer ikke-invasive kirurgiske prosedyrer og forskjellige legemiddelbehandlinger, som inhibitorene av 5α -reduktaseenzymet (Boyle et al. *Urology*; 48:398-405, 1996), antagonistene av de alfa-adrenergiske reseptorer og fytoterapiekstrakter.

- 5 Mannlige kjønnshormoner, hovedsakelig testosteron, spiller en svært viktig rolle i denne sykdommens patologiske etiologi, som transformeres via 5α -reduktase til sitt mer aktive derivat, dihydrotestosteron (DHT), som binder til androgene reseptorer, og således fremmer proteinsyntesen og følgelig cellulær vekst. Følgelig kunne en økt aktivitet av 5α -reduktase føre til BPH, siden pasienter som lider av slik patologi
10 viser DHT-nivåer økt i 4- til 6-ganger.

Den eksakte årsak til BPH er ukjent, men avhenger tydelig av testiklenes nærvær og dens frekvens øker med alderen. Androgenet involvert i prostatavekst er DHT, som dannes i prostata fra testosteron, dannes gjennom en reaksjon katalysert gjennom enzymet 5α -reduktase. Gjennomførte studier har demonstrert at
15 prostataveksten er direkte relatert til økningen av DHT-nivåer. På den andre side, øker østradiolproduksjon sammenlignet med androgener i menn eldre enn 50 år, og det er funnet at østrogener virker synergistisk med DHT for å indusere prostata hyperplasi i eksperimentelle modeller.

Symptomene på BPH er assosiert med obstruksjonen eller irritasjonen av urinrøret,
20 hvilket er forstyrrende for pasienten. Blant disse symptomer er de følgende inkludert: nykturi, dysuri, redusert volum og styrke på urinstrøm, følelse av ufullstendig tømning og urinretensjon. De fleste av symptomene starter gradvis, men når lidelsen utvikler seg forverres symptomene, som nødvendiggjør administrasjonen av en farmakologisk terapi.

25 Derfor har α -adrenergiske antagonistene, som alfuzosin, doxazosin, terazosin, etc. (Chapple, *Eur. Urol* 29, 129-144, 1996) og flere planteekstrakter blitt vidt anvendt for å behandle BPH. For tiden er fytoterapiprodukter vanlige i Europa og USA, og representerer 80 % av alle legemidler foreskrevet for behandlingen av BPH.

Spesielt er ekstrakter fra fruktene av Saw palmetto (*Sabal serrulata*, syn. *Serenoa repens*) og fra røttene av *Urtica dioica* populære. Dobbeltblinde, kontrollerte kliniske forsøk har blitt utført for å sammenligne effektene av Saw palmetto-ekstrakter og finasterid, en potent inhibitor av 5α -reduktasen, som viser en lignende virkning mellom begge behandlingene etter 6 måneder med terapi (Carraro et al, Pros-

tate 29, 231-240, 1996; Marks et al Journal of Urology 163: 1451-1456, 2000). På den andre side, har et ekstrakt fra røttene av *Urtica dioica* blitt anvendt klinisk for å behandle BPH. Noen histologiske og biologiske data demonstrerte effekten av rotekstrakter på veksten av androgenavhengige prostataceller.

- 5 Virkningsmekanismen til Saw palmetto er ikke fullstendig klarlagt, og synes å inkludere mer enn en enkelt mekanisme. Således har undersøkelser vist at den kan utøve en ikke-konkurrerende hemming av alfa-adrenerge reseptorer, som antyder en mekanisme lignende tamsulosin. Andre forfattere anser at Saw palmetto tillater den epiteliale kontraksjon, muligens på grunn av kjertelruptur, som
10 antyder en mekanisme lignende finasterid som involverer hemmingen av 5 α -reduktaseenzymet, som synes å være en fundamental mekanisme (Niederprum et al, Annals N.Y. Acad Sci, 768, 227-30, 1995).

Den androgene alopeci er vanlig hos både menn og kvinner og er androgen-avhengig, siden hårløshet er direkte relatert til nivåene av 5 α -reduktaseenzymet, er
15 det hårløst-relaterte androgen DHT, produsert fra testosteron gjennom virkningen av dette enzym. Således har økte nivåer av 5 α -reduktaseenzym blitt detektert i den frontale sone hos hårløse menn (Bingham KD et al, J. Endocrinology 57, 111, 1973), mens menn med syndromet med mangel på 5 α -reduktaseenzym ikke rammes av hårtap (Ebling FJ, Clin Endocrinol Metab 319, 1986).

- 20 Hårtap har blitt demonstrert som et vidt fordelt trekk som kan starte så tidlig som etter puberteten, det er derfor det er nødvendig å utvikle produkter for å forebygge hårløshet hos både menn og kvinner.

Som kjent hemmer lipidekstraktene fra *Saw palmetto* produksjonen av DHT-hormonet ved å blokkere 50 % av DHTs bindingssteder til reseptorene og dets inntreden i kjernene i prostatacellene, som sterkt hemmer aktiviteten av 5 α -reduktaseenzymet. Derfor har ekstraktene av fruktene til slike arter blitt anvendt i behandlingen av alopeci (WO9702041, USA 6,019,976 og WO9833472).
25

Ekstraktet fra *Saw palmetto* anvendt kommersielt for å behandle BPH er en blanding av fettsyrer, inneholdende steroler og høymolekylære alkoholer, oppnådd fra
30 plantefrukt ifølge forskjellige rapporterte metoder (EPO541853, EPO492305, EPO250953, US patent 6 039 950, Cristoni, Fitoterapia 68, 355, 1997; DeSwafel Nat Prod Letters 7, 223, 1996). Få forfattere har imidlertid rapportert en metode så enkel og økonomisk som den krevd i den foreliggende oppfinnelse for oppnåelsen

av fruktene av en *Arecaceae*, i det foreliggende tilfellet, fruktene av *Roystonea regia*.

Redegjørelse for oppfinnelsen

Fremgangsmåten for oppnåelsen av sammensetningen, gjenstand av den foreliggende oppfinnelse, er basert på tørkingen av de modne frukter av *Roystonea regia*. Tørre frukter males opp for å oppnå et fint pulver, med en partikkelstørrelse < 5000 μm . Dette pulver underkastes senere valgfritt for basisk hydrolyse utført med alkaliske, jordalkaliske og organiske hydroksider, spesielt med lavmolekylære hydroksider, og mer spesielt med natrium-, kalium-, kalsium- eller ammoniumhydroksider; etterfulgt av en selektiv ekstraksjon i organiske løsningsmidler eller superkritisk med CO_2 .

Det hydrolyserte eller ikke hydrolyserte vegetabiliske materiale ekstraheres i en konvensjonell fast stoff/væskeekstraktor, hvori fettsyrene og/eller esterene separeres fra andre komponenter til stede i frukter gjennom en selektiv ekstraksjon i det adekvate løsningsmiddel, som alkoholer mellom 1 til 3 karbonatomer og hydrokarboner mellom 5 til 8 karbonatomer. Blant slike løsningsmidler er metanol, etanol, 2-propanol, heksan, pentan, isopentan, heptan og oktan inkludert.

Det oppnådde utbytte er mellom 5 og 20 %. Sammensetningen av den oppnådde blanding av syrer inkluderer mettede syrer med 12, 14, 16 og 18 karbonatomer, samt de umettede med 16:1 og 18:1 karbonatomer, hvis kvalitative og kvantitative sammensetning er rapportert i tabell 1.

Tabell 1. Sammensetning av fettsyrene til stede i lipidekstraktet av *Roystonea regia*

	Komponent	Relativ prosent i blandingen av syrer
25	Kaprylsyre (C8:0)	< 3,0
	Kaprinsyre (C10:0)	< 3,0
	Laurinsyre (C12:0)	3,0 – 40,0
	Myristinsyre (C14:0)	4,0 – 15,0
	Palmitinsyre (C16:0)	10,0 – 80,0
30	Palmitoleinsyre (C16:1)	0,15 – 20,0

Stearinsyre (C18:0)	0,1 – 5,0
Oleinsyre (C18:1)	3,0 – 50,0 *

* kvantifisert som totalen av den kromatografiske topp hvor oleinsyren eluerer (60 – 70 % av toppen), linsyre (25 – 40 % av toppen) og linolensyre (< 10 % av den kromatografiske topp)

En samlet vurdering av substansen oppnådd fra *Roystonea regia*-frukter ifølge den foreliggende oppfinnelse viser at slik sammensetning er svært sikker og godt tolerert, en relevant fordel støttet gjennom resultatene av toksisitetstestene utført i gnagere, som ikke viste noen substansrelatert toksisitet.

- 10 Den foreliggende oppfinnelses mål vil bli beskrevet i detalj, og refererer til de følgende eksempler.

Eksempel 1

Friske frukter 5 kg av *Roystonea regia* tas, og plasseres i en ovn ved kontrollert temperatur 45 °C i 7 dager. I en pulveriseringsmølle males tørre frukter til en partikkelstørrelse mellom 1500 og 2000 µm, og 1000 g slikt pulver tas og plasseres i en røreverksreaktor og underkastes alkalisk hydrolyse. Senere ekstraheres produktet med 10 l heksan, oppvarming opp til 55 °C og konstant omrøring i 36 timer. Deretter filtreres produktet og inndampes til tørrhet ved 50 °C ved å anvende vakuum. Vekten av det oppnådde ekstrakt er 98,5 g, og tabell 2 viser dets sammensetning bestemt gjennom gasskromatografi.

Tabell 2. Sammensetning av fettsyrene til stede i lipidekstraktet av *Roystonea regia*

Komponent	Relativ prosent i blandingen av syrer
Kaprylsyre (C8:0)	1,0
25 Kaprinsyre (C10:0)	1,0
Laurinsyre (C12:0)	5,7
Myristinsyre (C14:0)	4,4
Palmitinsyre (C16:0)	75,1
Palmitoleinsyre (C16:1)	1,9

Stearinsyre (C18:0)	1,9
Oleinsyre (C18:1)	9,1

Eksempel 2

5 Friske frukter 10 kg av *Roystonea regia* plasseres i en ovn ved kontrollert temperatur 45 °C i 7 dager. I en pulveriseringsmølle males tørre frukter til en partikkelstørrelse < 1500 µm, og 1500 g slikt pulver tas og underkastes alkalisk hydrolyse. Senere ekstraheres produktet ved 60 °C i 48 timer i en Soxhlet-ekstraktor inneholdende 10 l etanol. Deretter fjernes den organiske løsning, filtreres og inndampes til tørrhet ved 50 °C ved å anvende vakuum. Det oppnådde ekstrakt veies 10 og analyseres ved gaskromatografi, dets sammensetning er vist i tabell 3.

Tabell 3. Sammensetning av fettsyrene til stede i lipidekstraktet av *Roystonea regia*

Komponent	Relativ prosent i blandingen av syrer
Kaprylsyre (C8:0)	1,0
15 Kaprinsyre (C10:0)	1,0
Laurinsyre (C12:0)	3,2
Myristinsyre (C14:0)	5,5
Palmitinsyre (C16:0)	27,1
Palmitoleinsyre (C16:1)	18,5
20 Stearinsyre (C18:0)	0,3
Oleinsyre (C18:1)	43,4

Eksempel 3

Friske frukter 5 kg av *Roystonea regia* tas og plasseres i en ovn ved kontrollert temperatur 45 °C i 7 dager. I en pulveriseringsmølle males tørre frukter til en partikkelstørrelse mellom 1500 og 1800 µm, og 1000 g slikt pulver tas og underkastes alkalisk hydrolyse. Senere ekstraheres produktet i en røreverksreaktor inneholdende 10 l heptan ved 60 °C, med konstant omrøring, i 50 timer. Deretter fjernes løsningsmidlet og inndampes til tørrhet ved 65 °C ved å anvende vakuum. Det oppnådde ekstrakt veies og analyseres ved gasskromatografi, som viser sammensetningen sammenfattet i tabell 4.

Tabell 4. Sammensetning av fettsyrene til stede i lipidekstraktet av *Roystonea regia*

Komponent	Relativ prosent i blandingen av syrer
Kaprylsyre (C8:0)	1,0
Kaprinsyre (C10:0)	1,0
Laurinsyre (C12:0)	3,16
Myristinsyre (C14:0)	12,7
Palmitinsyre (C16:0)	13,0
Palmitoleinsyre (C16:1)	1,7
Stearinsyre (C18:0)	2,3
Oleinsyre (C18:1)	36,6

Eksempel 4

Friske frukter 5 kg av *Roystonea regia* tas og plasseres i en ovn ved kontrollert temperatur 45 °C i 7 dager. I en pulveriseringsmølle males tørre frukter til en partikkelstørrelse mellom 1000 og 1800 µm, og 1000 g slikt pulver tas og behandles med ammoniumhydroksid for å fukte alt pulveret. Senere ekstraheres pulveret i en røreverksreaktor inneholdende 10 l heksan ved 55 °C med konstant omrøring i 36 timer. Deretter fjernes løsningsmidlet og inndampes til tørrhet ved 50 °C ved å anvende vakuum. Det oppnådde ekstrakt veies og analyseres ved gasskromatografi, som viser sammensetningen sammenfattet i tabell 5.

Tabell 5. Sammensetning av fettsyrene til stede i lipidekstraktet av *Roystonea regia*

Komponent	Relativ prosent i blandingen av syrer
Kaprylsyre (C8:0)	1,0
Kaprinsyre (C10:0)	1,0
Laurinsyre (C12:0)	19,7
5 Myristinsyre (C14:0)	9,7
Palmitinsyre (C16:0)	14,8
Palmitoleinsyre (C16:1)	0,2
Stearinsyre (C18:0)	3,8
Oleinsyre (C18:1)	49,8

10 **Eksempel 5**

For å vurdere effekten av lipidekstraktet fra *Roystonea regia*-frukter ble OF1 hann, albinomus som veier mellom 30 og 40 g tilpasset laboratoriebetingelser i 7 dager, med kontrollert temperatur ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) og fuktighet. Etter tilpasningsperioden ble dyrene vilkårlig fordelt i forskjellige eksperimentelle grupper. Ekstraktet fra

15 *Roystonea regia* ble suspendert i et Tween-20/H₂O-vehikkel og behandlinger ble administrert oralt (5 ml/kg), kontrolldyr behandles med vehiklet. Det avleirede testosteron ble løst i vegetabilsk olje og injisert ved intramuskulær (i.m.) rute ved 100 mg/kg, som en enkelt dosering. Dyr ble vilkårlig fordelt i de følgende grupper: 1) negativ kontroll 2) positiv kontroll (dyr injisert med testosteron og oralt

20 administrert med vehiklet) 3, 4 og 5) dyr injisert ved intramuskulær (i.m.) rute med testosteron og oralt behandlet med ekstraktet av *Roystonea regia*-frukter ved henholdsvis 200, 400 og 800 mg/kg og 6) dyr injisert med testosteron og oralt administrert med ekstraktet av *Saw palmetto*-frukter ved 400 mg/kg.

Så snart doseringsperioden var avsluttet (14 dager) ble mus avlivet, deres abdo-

25 men åpnet gjennom et snitt i den ventrale midlere linje, prostataene separert og veid. Sammenligningen mellom behandlede og kontrollgrupper ble gjort ved Mann Whitney U-testen. Tabell 6 viser resultatene.

Som observert frembrakte avleiret testosteron (100 mg/kg) im injisert en

signifikant økning i prostatavekt og prostatavekt til kroppsvektforhold

30 sammenlignet med den negative kontrollgruppe.

Tabell 6. Effekt av lipidekstraktet fra *Roystonea regia*-frukter på mus med induisert prostata hyperplasi (PH)

Behandling	Doser (mg/kg)	n	BW	PW	PW/BW	% I
Kontroll -		10	36,0 ± 0,7	25,7 ± 3,2	0,72 ± 0,09	-
Kontroll +		10	35,5 ± 0,68 35,5 ± 0,68	54,7 ± 3,8 +++	1,55 ± 0,12+++	-
<i>Roystonea regia</i>	200	10	35,4 ± 0,77	38,7 ± 2,6 **55,1	1,09 ± 0,08 *	55,4
<i>Roystonea regia</i>	400	9	33,7 ± 1,2	32,3 ± 1,2 **77,2	0,96 ± 0,03 **	71,8
<i>Roystonea regia</i>	800	11	33,6 ± 0,7	26,6 ± 1,9 *** 96,6	0,78 ± 0,04 ***	92,7
<i>Saw palmetto</i>	400	8	34,3 ± 0,84	36,6 ± 2,5 ** 62,1	1,06 ± 0,06 **	59,0

BW kroppsvekt (g), PW prostatavekt (mg), % I prosent hemming, +++ p<0,001 Sham vs kontroll, Mann Whitney U-test, * p< 0,05, ** p< 0,01, ***p<0,001 sammenligning vs kontroll.

- 5 Den orale behandling med den oppfinneriske sammensetning (200-800 mg/kg) i 2 uker hemmet signifikant og doseavhengig økningen av prostatastørrelse induisert med testosteron og oppnår en prosentvis hemming på 92,7 % med den høyeste dose (800 mg/kg), som også hemmet signifikant og doseavhengig økningen av forholdet av prostatavekt/kroppsvekt, som når en prosentvis hemming på 96,6 %
- 10 med 800 mg/kg. På den andre side, hemmet behandling med gjentatte doser av *Saw palmetto* (400 mg/kg) prostataforstørrelse med 62 % og reduserte forholdet av PW/BW med 59 %, og blir mindre effektiv enn ekstraktet av *Roystonea regia*-frukter, som ved en lignende dose frembrakte en hemming på henholdsvis 77 og 72 %.
- 15 Resultatene oppnådd i dette eksperiment demonstrerer virkningen av lipidekstraktet av *Roystonea regia*-frukter på PH i mus, og viser en doseavhengig reduksjon

av prostatastørrelse, som når en prosentvis hemming på 96,6 %, ved 400 mg/kg oppnås en prosentvis hemming større enn den induisert med en lignende dose *Saw palmetto*.

Eksempel 6

- 5 For å vurdere effekten av lipidekstraktet fra *Roystonea regia*-frukter ble Sprague Dawley-hannrotter som veier mellom 250 og 270 g tilpasset laboratoriebetingelser i 7 dager, med kontrollert temperatur ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) og fuktighet. Etter tilpasningsperioden ble dyrene vilkårlig fordelt i forskjellige eksperimentelle grupper.

- 10 Ekstraktet fra *Roystonea regia*-frukter ble suspendert i et Tween-20/H₂O-vehikkel og behandlinger ble administrert oralt (5 ml/kg), kontrolldyr administreres med vehiklet. Testosteronpropionat ble løst i vegetabilsk olje og injisert gjennom subkutan sc rute ved 4 mg/kg i 14 dager.

- 15 Musene ble vilkårlig fordelt i 6 eksperimentelle grupper: 1) negativ kontroll + (vegetabilsk olje), 2) positiv kontroll (vehikkel) + testosteron; 3, 4 og 5) (dyr injisert (im) med testosteron og oralt behandlet med ekstrakt fra fruktene av *Roystonea regia* ved henholdsvis 50, 200 og 400 mg/kg, og 6) (dyr injisert (im) med testosteron og oralt administrert med ekstraktet av *Saw palmetto*-frukter ved 400 mg/kg. Så snart doseringsperioden var avsluttet (2 uker) ble rotter avlivet og blødd tomme, abdomen åpnet gjennom et snitt i den ventrale midlere linje, prostataene 20 separert og veid. Sammenligningen mellom behandlede og kontrollgrupper ble gjort gjennom Mann Whitney U-testen. Tabell 7 viser resultatene. Som observert frembrakte avleiret testosteron (100 mg/kg) im-injisert en signifikant økning i prostatavekt og prostatavekt til kroppsvektforhold sammenlignet med den negative kontrollgruppe.

- 25 **Tabell 7. Effekt av lipidekstraktet fra *Roystonea regia*-frukter på rotter med induisert prostata hyperplasi (PH)**

Behandling	Doser (mg/kg)	n	BW	PW	% I	PW/BW	% I
Kontroll -	0	10	354,7 ± 6,9	576,03 ± 51,4	-	1,6 ± 0,15	-
Kontroll +	0	10	339,5 ± 6,5	916,07 ± 34,4 +++	-	2,7 ± 0,12 +++	-
R regia	50	9	322,5 ± 10,2	895,4 ± 34,6	6	2,7 ± 0,11	0
R regia	200	9	335,3 ± 6,4	838,05 ± 30,9	23	2,5 ± 0,09	19
R regia	400	10	342,4 ± 6,4	776,01 ± 35,4 *	41	2,2 ± 0,11 *	45

BW kroppsvekt (g), PW prostatavekt (mg), % I prosent hemming, +++ p<0,0001
Sham vs kontroll, * p< 0,05, ** p< 0,01, *** sammenligning vs kontroll, Mann

5 Whitney U-test

Som observert økte subkutan injeksjon med testosteron 4 mg/kg i 14 dager signifi-
kant prostatavekten og forholdet av prostatavekt/kroppsvekt, sammenlignet med
den negative kontroll. Den orale dosering med ekstraktene av *Roystonea regia* og
Saw palmetto (400 mg/kg) frukter i 2 uker hemmet signifikant økningen av prosta-
tastørrelse induisert med testosteroninjeksjon og oppnår en prosentvis hemming på
10 henholdsvis 41 og 58 %. Ved 400 mg/kg minsket ekstraktet fra *Roystonea regia*-
frukter også signifikant prostatavekt/kroppsvektsforholdet og oppnår en hemming
på 45 %.

Resultatene oppnådd i denne studie indikerer virkningen av behandlingen med
15 ekstraktet av *Roystonea regia*-frukter ved 400 mg/kg i 14 dager for rotter behand-
let med testosteron, og frembringer en hemming av prostatastørrelsen med hensyn
til kroppsvekt lignende for begge behandlinger (45 %), fordelaktig for den po-
tensielle terapeutiske anvendelse av ekstrakt av kongepalmefruktene.

Eksempel 7

For å vurdere effekten av ekstraktet av *Roystonea regia*-frukter ble Sprague Dawley-hannrotter som veier mellom 250 og 270 g tilpasset laboratoriebetingelser i 7 dager, med kontrollert temperatur ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) og fuktighet. Etter tilpasningsperioden ble dyrene vilkårlig fordelt i forskjellige eksperimentelle grupper. Testosteronpropionat ble løst i vegetabilsk olje og administrert gjennom subkutan rute ved daglige doser på 3 og 4 mg/kg i 14 dager.

Ekstraktet av *Roystonea regia*-frukter ble suspendert i et Tween-20/H₂O-vehikkel og behandlinger ble administrert oralt (5 ml/kg), kontrolldyr administreres med vehiklet.

Rottene behandlet med testosteron 3 mg/kg ble fordelt i 5 eksperimentelle grupper: 1) negativ kontroll + (vegetabilsk olje), 2) positiv kontroll (vehikkel) + testosteron; 3,4) *Roystonea regia*-ekstrakter ved 50 og 200 mg/kg + testosteron; 5) Saw palmetto 200 mg/kg + testosteron. I tur og orden ble dyr behandlet med testosteron 4mg/kg fordelt i 6 eksperimentelle grupper: 1) negativ kontroll + (vegetabilsk olje), 2) positiv kontroll (vehikkel) + testosteron; 3, 4, 5) *Roystonea regia*-ekstrakter ved 50, 200 og 400 mg/kg + testosteron; 6) Saw palmetto 400 mg/kg + testosteron. Alle orale behandlinger ble administrert i 14 dager. Tabell 8 og 9 viser resultatene.

20

Tabell 8. Effekt av lipidekstraktet fra *Roystonea regia*-frukter på rotter med indusert prostata hyperplasi (PH)

Doser Behandling

Behandling	Doser (mg/kg)	n	BW	PW
Kontroll -	0	9	507,0 ± 35	1,43 ± 0,09
Kontroll +	0	8	886,0 ± 78,8 ++	2,69 ± 0,26 +++

Roystonea regia	50	10	684,8 ± 34,7 *	2,05 ± 0,11*
Roystonea regia	200	10	693,1 ± 36,5*	2,11 ± 0,13 ^a
Saw Palmetto	200	10	710,0 ± 43,3 t	2,08 ± 0,14 ^a

BW kroppsvekt (g), PW prostatavekt (mg), ++ p<0,01; +++ p<0,001 sammenligning vs Sham; *p<0,05; ^a: p=0,05 sammenligning vs kontroll (Mann Whitney U-test)

5 **Tabell 9. Effekt av lipidekstraktet fra *Roystonea regia*-frukter på rotter med induisert prostata hyperplasi (PH)**

Behandling	Doser (mg/kg)	n	BW	PW	BW/PW	% I
Kontroll -	0	10	354,7±6,90	576,03±51,4	1,6 ± 0,15	-
Kontroll +	0	10	339,5±6,50	916,07±34,4++ +	2,7 ± 0,12 +++	-
Roystonea regia	50	9	322,5±10,2	895,40±34,6	2,7 ± 0,11	6,0
Roystonea regia	500	9	335,3±6,40	838,05±30,9	2,5 ± 0,09	22,9
Roystonea regia	400	10	342,4± 6,40	776,01±35,4 *	2,2 ± 0,11 *	41,2
Saw palmetto	400	10	328,5± 6,80	720,1±41,8 **	2,2 ± 0,12 *	57,6

BW kroppsvekt (g), PW prostatavekt (mg), % I prosent hemming, ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$ sammenligning vs Sham;* $p < 0,05$; $p < 0,01$, t: $p = 0,06$ sammenligning vs kontroll (Mann Whitney U-test)

Eksempel 8

- 5 Kaniner med en kroppsvekt mellom 4 og 5 kg ble anvendt i studien. Ved grunnlinje og etter behandling med ekstraktet av *Roystonea regia*-frukter ble hårveksten til hver kanin målt. Hårmåling ble gjort før, under og etter den orale behandling med ekstraktet av *Roystonea regia*-frukter, med et 4 uker intervall mellom hver måling. Etter sedasjon av hvert dyr ble et dorsalt område på omtrent en kvadrat tomme
10 barbert og håret på et slikt område ble veid.

- Barberte kaniner ble fordelt i 4 grupper med 5 kaniner i hver, kaninene i gruppe 1 mottok en gang om dagen en daglig administrasjon av ekstraktet av *Roystonea regia* 400 mg, mens kaniner i gruppe 2 mottok en gang om dagen en dagelig administrasjon av vehikkel. I tur og orden mottok kaninene i gruppe 3 en dagelig administrasjon av ekstraktet av *Roystonea regia* 400 mg fordelt i to doser på 200 mg,
15 og kaniner i gruppe 4 mottok vehikkel fordelt i to doseringer, som gruppe 3.

- Endringene i vekten av hårveksten fra de indikerte forekomstsområder ble sammenlignet ved å anvende en spredningsanalyse for mellomgruppesammenligninger og Wilcoxon-testen for parrede enkle for innen-gruppen-enderinger. Endringene ble
20 ansett som signifikant forskjellige for $p < 0,05$.

Resultatene av denne studie demonstrerer at hårveksten til kaninene fra grupper 1 og 3 var signifikant høyere enn hårvekst på kaninene fra grupper 2 og 4, og også høyere enn den initielle hårvekt, som demonstrerer at ekstrakt fra *Roystonea regia* kunne anvendes for å behandle alopesi.

Patentkrav

1. Farmasøytisk sammensetning oppnådd fra de grønne eller modne frukter av *Roystonea regia*, som inneholder en blanding av de primære fettsyrer med 8 til 28 karbonatomer, inklusive de følgende fettsyrer: kaprylsyre (C8:0), kaprinsyre
5 (C10:0), laurinsyre (C12:0), myristinsyre (C14:0), palmitinsyre (C16:0), palmitoleinsyre (C16:1), stearinsyre (C18:0) og oleinsyre (C18:1) (som inkluderer oleinsyre selv, linol- og linolensyre), samt en blanding av esterene av slike fettsyre hvor de frie fettsyrer er anriktet fra esternes hydrolyse.
2. Farmasøytisk sammensetning som inneholder en blanding av de primære
10 fettsyrer og esterene derav, ifølge krav 1, som har den følgende sammensetning av fettsyrer:

blanding av fettsyrer til stede i lipidekstraktet av *Roystonea regia*-frukter:

	Kaprylsyre (C8:0)	< 3,0
	Kaprinsyre (C10:0)	< 3,0
15	Laurinsyre (C12:0)	3,0 – 40,0 %
	Myristinsyre (C14:0)	4,0 – 15,0 %
	Palmitinsyre (C16:0)	10,0 – 80,0 %
	Palmitoleinsyre (C16:1)	1,5 – 20,0 %
	Stearinsyre (C18:0)	0,1 – 5,0 %
20	Oleinsyre (C18:1)	3,0 – 50,0 %.

3. Fremgangsmåte for fremstilling av den farmasøytiske sammensetning oppnådd fra *Roystonea regia* ifølge krav 1 og 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten inkluderer tørkingen, malingen og siktingen av *Roystonea regia*-frukter, og en ytterligere separasjon av ekstraktet fra
25 andre komponenter gjennom en fast stoff/væske-ekstraksjon i organiske løsningsmidler som hydrokarboner med 5 til 8 karbonatomer, alkoholer med 1 til 3 karbonatomer, samt blanding av dem, med eller uten en forutgående basisk hydrolyse ved å anvende hydroksider eller alkalier.
4. Fremgangsmåte for fremstilling ifølge krav 3,
30 k a r a k t e r i s e r t v e d at den inkluderer tørkingen av *Roystonea regia*-frukter ved en temperatur mellom 10 og 100 °C i en tid som strekker seg fra 1 til 1000 timer, og videre maling i en passende mølle, som tillater oppnåelsen av en

partikkelstørrelse < 6000 µm. Ekstraksjonstiden for komponentene i det aktive ekstrakt strekker seg fra 1 til 50 timer og temperaturen fra 0 til 70 °C.

5. Fremgangsmåte for fremstilling ifølge krav 3 og 4,
k a r a k t e r i s e r t v e d anvendelsen av alkalihydroksider eller
5 jordalkalihydroksider og organisk for den basiske hydrolyse, spesielt de med lav
molekylvekt og mer spesielt natrium-, kalium-, kalsium- eller
ammoniumhydroksider.
6. Fremgangsmåte for fremstilling ifølge krav 3 og 4,
k a r a k t e r i s e r t v e d anvendelsen av hydrokarboner som pentan, heksan,
10 heptan eller oktan for fremstilling av ekstraktet inneholdende blandingen av
fettsyrer.
7. Fremgangsmåte for fremstilling ifølge krav 3 og 4,
k a r a k t e r i s e r t v e d anvendelsen av alkoholer som metanol, etanol, n-
propanol og 2-propanol for fremstilling av ekstraktet inneholdende blandingen av
15 fettsyrer.
8. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 1 og 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d dens anvendelse som medikament i behandlingen
og/eller forebyggingen av BPH, prostatitt, alopeci og hirsutisme.
9. Farmasøytisk sammensetning med eller uten en forsåpning, ifølge krav 1 og
20 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d dens anvendelse som medikament i behandlingen
og/eller forebyggingen av BPH, prostatitt, alopeci og hirsutisme.
10. Farmasøytisk sammensetning med eller uten en forsåpning ifølge krav 1, 2,
8 og 9,
25 k a r a k t e r i s e r t v e d dens anvendelse, ved dagelige doser fra 50 til 1000
mg, spesielt formulert ved doser mellom 150 og 1000 mg, for administrasjon som
faste orale former (kapsler, myke gelkapsler, tabletter) eller væsker (emulsjoner),
som suppositorier eller som tinkturer, lotioner eller sjampoer med lokal virkning i
behandlingen og/eller forebyggingen av BPH, prostatitt, alopeci og hirsutisme.