

(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
20. Februar 2003 (20.02.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/014287 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12C 3/08**, (74) **Anwalt:** **ADAM, Holger**; Kraus & Weisert, Thomas-Wimmer-Ring 15, 80539 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/08943 (81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum: 9. August 2002 (09.08.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 101 39 479.9 10. August 2001 (10.08.2001) DE
- (71) **Anmelder** (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **DR. WILLMAR SCHWABE GMBH & CO.** [DE/DE]; Willmar-Schwabe-Strasse 4, 76227 Karlsruhe (DE).
- (72) **Erfinder; und**
- (75) **Erfinder/Anmelder** (nur für US): **ERDELMEIER, Clemens** [DE/DE]; Glogauer Strasse 32, 76139 Karlsruhe (DE). **KOCH, Egon** [DE/DE]; Am Giessbach 11a, 76229 Karlsruhe (DE).
- (84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

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

(54) **Title:** HOPS EXTRACTS, METHOD FOR THE PRODUCTION AND USE

(54) **Bezeichnung:** HOPFENEXTRAKTE, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND VERWENDUNG

(57) **Abstract:** The invention relates to novel hops extracts with an increased content in prenylated chalcones and flavones. The invention also relates to a method for producing the same, to pharmaceutical preparations comprising such hops extracts and to the use of the hops extracts in the prophylaxis and therapy of conditions that are caused by estrogen deficiency or by a dysregulation of the sex hormone metabolism.

(57) **Zusammenfassung:** Beschrieben sind neue Hopfenextrakte mit erhöhtem Gehalt an prenylierten Chalkonen und Flavonen, Verfahren zu ihrer Herstellung, pharmazeutische Zubereitungen umfassend solche Hopfenextrakte sowie die Verwendung dieser Hopfenextrakte zur Prophylaxe und Therapie von Krankheitszuständen, die durch einen Mangel an Östrogenen oder durch Dysregulationen des Geschlechtshormonstoffwechsels hervorgerufen werden.



WO 03/014287 A1

5 Hopfenextrakte, Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung

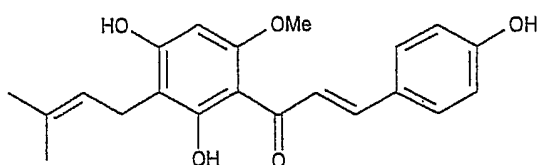
Die vorliegende Erfindung betrifft Hopfenextrakte, Verfahren
zu ihrer Herstellung und die Verwendung von Hopfenextrakten
10 zur Prophylaxe und Therapie von Krankheitszuständen, die
durch einen Mangel an Östrogenen oder durch Dysregulationen
des Geschlechtshormonstoffwechsels, insbesondere des
Östrogenstoffwechsels, hervorgerufen werden.

15 Die größte Bedeutung des Hopfens liegt nach wie vor in seiner
Verwendung bei der Bierherstellung. Aufgrund seiner Bitter-
und Aromastoffe ist er für den Geschmack des Bieres
ausschlaggebend. Darüber hinaus haben diese Stoffe wegen
ihrer antimikrobiellen Eigenschaften eine gewisse Bedeutung
20 bei der Konservierung des Bieres.

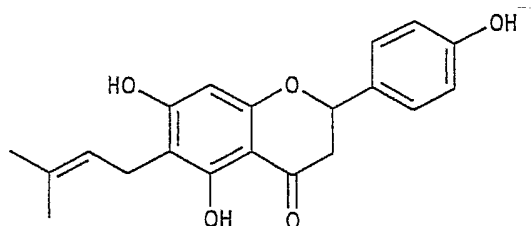
Das zu Beginn der achtziger Jahre vorliegende
wissenschaftliche Erkenntnismaterial zum Hopfen führte zu
einer positiven Monographie durch die Kommission E des
25 damaligen Bundesgesundheitsamtes (Banz. vom 5. Dezember 1985
bzw. 13. März 1990). Damit ist die Verwendung des Hopfens bei
Einschlafstörungen, Unruhe und Angstzuständen grundsätzlich
zugelassen.

30 Der Hopfen besitzt schon seit langer Zeit eine arzneiliche
Bedeutung als mildes Sedativum in der Volksmedizin.
Verantwortlich für diese Wirkung sind wahrscheinlich die
oxidationsempfindlichen α - und β -Bittersäuren. Für diese

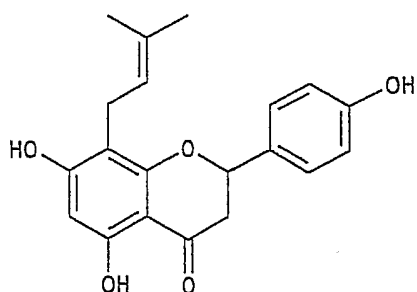
- Inhaltsstoffe wurden in jüngerer Zeit auch Radikalfängereigenschaften sowie die Lipidperoxidation hemmenden Eigenschaften nachgewiesen (M. Tagashira et al., Biosci. Biotech. Biochem. 59, 740-742 (1995)). In der EP
5 0 677 289 A2 werden außerdem pharmazeutische Zusammensetzungen zur Behandlung der Osteoporose beschrieben, die Verbindungen aus der Gruppe der α -Bittersäuren und der α -iso-Bittersäuren enthalten.
- 10 In den letzten Jahren wurden neben den α - und β -Bittersäuren (J. Hölzl, Zeitschrift für Phytotherapie 13, 155-161 (1992)) verstärkt auch die phenolischen Inhaltsstoffe des Hopfens untersucht und es wurden neben dem schon länger bekannten Xanthohumol 1 zahlreiche weitere Verbindungen vom Flavontyp
15 in der Hopfenpflanze gefunden (J. F. Stevens et al., Phytochemistry 44, 1575-1585 (1997), J. F. Stevens et al., J. Chromat. A 832 (1-2), 97-107 (1999)). Es handelt sich hierbei in erster Linie um isoprenylierte Flavonoide wie z. B. 6- oder 8-Prenylnaringenin 2 und 3 sowie Isoxanthohumol 4.
20 Stevens et al. (Phytochemistry 53, 759-775 (2000)) untersuchten auch die Chemotaxonomie von Hopfenarten und -taxa.



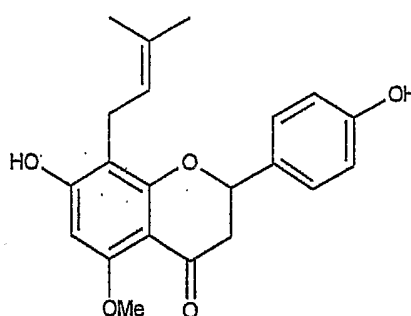
1



2



3



4

Immer wieder wurde beobachtet, dass bei Hopfenpflückerinnen
Menstruationsstörungen auftraten, [die] auf östrogene
10 Substanzen im Hopfen zurückgeführt wurden, ohne dass diese
Effekte aber eindeutig einem oder mehreren Inhaltsstoffen
zugeordnet werden konnten. Inzwischen konnte diese östrogene
Aktivität des Hopfens bestätigt werden. Dabei zeigte sich,
dass 8-Prenylnaringenin 3 im wesentlichen für diese Wirkungen
15 verantwortlich ist (S. R. Milligan et al., J. Clin.
Endocrinol. Metab. 84, 2249-2252 (1999)). Die *in-vitro*
östrogene Aktivität dieser Verbindung zeigte sich an ihrer
relativen Bindungsaffinität an Östrogenrezeptoren und wurde
insbesondere anhand der Stimulation der alkalischen
20 Phosphatase in Ishikawa-Var-I-Zellen getestet. Dabei zeigte
sich, dass 8-Prenylnaringenin wesentlich aktiver war als

bisher bekannte Phytoöstrogene wie Coumestrol, Genistein oder Daidzein, und nur wenig schwächer wirkte als 17 β -Östradiol. Milligan et al. (J.Endocrin.Metabol. 85, 4912-4915 (2000)) berichteten auch über die Bindung verschiedener phenolischer Hopfeninhaltsstoffe an einen von Hefezellen exprimierten humanen Östrogenrezeptor. Dabei zeigte wiederum 8-Prenylnaringenin die stärkste östrogene Aktivität. Schwächere östrogene Eigenschaften zeigten 6-Prenylnaringenin, 6,8-Diprenylnaringenin und 8-Geranylnaringenin. Miyamoto et al. (Planta Med. 64, 516-519 (1998)) konnten zeigen, dass 8-Prenylnaringenin das Uterusgewicht und die Knochendichte bei ovariectomierten Ratten normalisiert. Weiterhin wird in der JP 08 165238 (ref. CA 125:158632) die Östrogen-agonistische Aktivität einer Reihe von 8-prenylierten Flavonderivaten, darunter auch 8-Prenylnaringenin, beschrieben.

In neueren Studien konnte nachgewiesen werden, dass einige Flavonoide des Hopfens, insbesondere Xanthohumol 1, auf den Stoffwechsel von Zellen einwirken können. Sie sind in der Lage, Enzymreaktionen, die bei der Entstehung von Tumorzellen eine wichtige Rolle spielen, positiv zu beeinflussen. Damit können diese Verbindungen als Krebspräventiva angesehen werden (Tagung der deutschen Gesellschaft für Hopfenforschung, Stand der Erkenntnisse zum Hopfeninhaltsstoff Xanthohumol, 24. März 1998, Aschheim). Miranda et al. (Food Chem. Tox.37(4), 271-285 (1999)) berichteten über starke antiproliferative Aktivität von Xanthohumol 1 und Isoxanthohumol 4 an humanen MCF-7 Brustkrebszellen, sowie an HAT-29 Dickdarm- und A-2780 Ovar-Krebszelllinien.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Xanthohumol 1 Knochenschwund hemmend beeinflusst. Seine Verwendung als Therapeutikum gegen Osteoporose ist in der EP 0 679 393 B1

beschrieben. Obwohl die Erfinder östrogene Eigenschaften von Xanthohumol postulieren, werden diese aber nicht demonstriert. Im Gegenteil schlossen S.R. Milligan et al. (Pharm. Pharmacol. Lett 7, 83-86 (1997)) eindeutig aus, dass
5 die Osteoporose-hemmende Aktivität von Xanthohumol auf einer östrogenen Wirkung beruht, da sie entsprechende Aktivitäten weder an der humanen Endometrium-Karzinomzelllinie Ishikawa noch in einem Hefe-Reportergen-Assay (S.R. Milligan et al., J. Clin. Endocrinol. Metabol. 84, 2249-2252 (1999))
10 nachweisen konnten. Entgegen diesen Untersuchungen wird in der vorliegenden Erfindung demonstriert, dass Xanthohumol 1 und Isoxanthohumol 4 mit vergleichbarer Aktivität an die Östrogenrezeptoren alpha und beta binden.

15 Kumai und Okamoto (Toxicology Letters 21, 203-207 (1984)) berichteten über hochmolekulare Kohlehydratfraktionen aus rein wässrigen Hopfenextrakten, die bei mit PMS-Gonadotropin vorbehandelten jungen Ratten das Ovargewicht verringerten. Okamoto und Kumai (Acta Endocrinologica 127, 371-377 (1992))
20 bestätigten diese Befunde aufgrund der Beobachtung von erniedrigten 17 β -Östradiol- und LH-Blutspiegeln, verursacht durch Gabe von rein wässrigem Hopfenextrakt.

In der DE 199 39 350 A1 wird ein Hopfenextrakt mit einem
25 erhöhten Xanthohumolgehalt beschrieben. Dieser Extrakt soll Bier sowie fruchtsafthaltigen Erfrischungsgetränken zugesetzt werden. Über die Anwesenheit von prenylierten Naringeninen in diesem Extrakt ist nichts bekannt. Gemäß dem Ausführungsbeispiel wird das Xanthohumol mit 50 Gew.-%
30 Ethanol aus dem Hopfen extrahiert. Dies führt aber nicht zu einer optimalen Extraktion des Xanthohumols, da dies erst mit hochprozentigem Ethanol (>80% Gew.) mit hoher Wiederfindung in den Extrakt übergeht.

In der WO 83/00701 A1 wird ein Verfahren zur Gewinnung östrogenwirksamer Stoffe aus Hopfen beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass zunächst ein Kohlendioxid-Extrakt aus Hopfen unter Zusatz von Wasser als Schleppmittel hergestellt wird und anschließend daraus die östrogenwirksamen Stoffe mittels Etherextraktion oder chromatographischer Verfahren erhalten werden. Ferner wird die Verwendung dieser Stoffe als Zusatz zu Futtermitteln, für kosmetische Mittel oder als Badezusatz beansprucht. Über die Natur dieser östrogenwirksamen Stoffe werden keinerlei Angaben gemacht.

In der WO 01/30961 A1 wird ein Verfahren zur Gewinnung von stabilen Bierbrauzusätzen beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass der Hopfentreber-Rückstand der Kohlendioxid-Extraktion mit einem polaren Lösungsmittel, vorzugsweise heißem Wasser, extrahiert wird, der Extrakt anschließend angesäuert, mit einem unpolaren Lösungsmittel, vorzugsweise Hexan, gewaschen und - ggf. nach Trocknung - als Brauzusatz verwendet wird. Der übrigbleibende Treber wird verworfen.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Pflanzenextrakte bereitzustellen, die zur Herstellung von Arzneimitteln zur Prophylaxe und Therapie von Krankheitszuständen geeignet sind, die durch einen Mangel an Östrogenen oder durch Dysregulationen des Geschlechtshormonstoffwechsels, insbesondere des Östrogenstoffwechsels, verursacht werden.

30

Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung solcher Extrakte sowie diese

umfassende pharmazeutische Zubereitungen, die zur Behandlung der vorstehend genannten Krankheitszustände geeignet sind.

Diese Aufgaben werden erfindungsgemäß durch den Hopfenextrakt gemäß Patentanspruch 1 und 2, die Verfahren gemäß den Patentansprüchen 3-12, die pharmazeutische Zubereitung gemäß Patentanspruch 13 sowie die Verwendung der Extrakte oder der pharmazeutischen Zubereitung gemäß den Patentansprüchen 14-16 gelöst.

10

Die vorliegende Erfindung beruht unter anderem auf dem überraschenden Befund, dass aus Hopfendroge nach Entfernung von lipophilen und hydrophilen Ballaststoffen Extrakte erhalten werden, welche die phloroglucinolartigen Hopfenbittersäuren nach wie vor enthalten, gleichzeitig freie und/oder gebundene Chalkone und Flavone wie Xanthohumol, Isoxanthohumol sowie 6- und 8-Prenylnaringenin dagegen in angereicherter Form enthalten. Insbesondere überraschend ist die Tatsache, dass der Gehalt an 6- und 8-Prenylnaringenin von der Temperatur der Wasservorextraktion abhängt (s. Beispiel 3) und bis zu ca. einem Faktor 2 gesteigert werden kann.

20

Figur 1 veranschaulicht die Abhängigkeit der Konzentration der analysierten Inhaltsstoffe von der Temperatur der Wasservorextraktion.

25

Ein solcher Extrakt kann durch ein- bis mehrmalige Extraktion mit einem C₅-C₇-Alkan oder mit überkritischem CO₂ (Entfettungsstufe), nachfolgende Extraktion des verbleibenden Drogenrückstandes mit Wasser und daran anschließende Extraktion des übrig bleibenden Drogenrückstandes mit einem mittelpolaren Lösungsmittel ausgewählt aus der Gruppe

30

bestehend aus Alkoholen, wässrigen Alkoholen, Ketonen, wässrigen Ketonen, Estern und ggf. nachfolgende Flüssig-Flüssig-Verteilung erhalten werden. Überraschenderweise gehen die Hopfenbittersäuren nicht vollständig, sondern nur zu
5 einem Teil in den lipophilen Extrakt über, während auf der anderen Seite die Chalkone und Flavone bei der Wasserextraktion nahezu vollständig im Drogenrückstand verbleiben. Dadurch ist es möglich, einen Hopfenextrakt zu erhalten, der alle pharmakologisch relevanten Inhaltsstoffe
10 (Bittersäuren, Chalkone, Flavone) in einem ausgeglichenen Verhältnis enthält. Durch diese günstige Zusammensetzung aus mehreren therapeutischen Wirkprinzipien ist dieser Extrakt in idealer Weise bei Krankheitszuständen einsetzbar, die durch einen Mangel an Östrogenen oder durch andere hormonelle
15 Dysregulationen verursacht werden.

Die erfindungsgemäßen Hopfenextrakte sind zur Prophylaxe und Behandlung von mit dem Klimakterium oder der Postmenopause bei Frauen einhergehenden Beschwerden geeignet, wobei die
20 Symptome unter anderem Hitzewallungen, Depressionen, Angstzustände, geistige Verwirrtheit, Schlaflosigkeit sowie mit der Postmenopause zusammenhängende ernsthafte Gesundheitsprobleme wie Osteoporose, Herz-Kreislauf-erkrankungen, Schlaganfall, Demenz und Tumorerkrankungen
25 umfassen. Andere Erkrankungen, die auf einer Dysregulation des Geschlechtshormonstoffwechsels beruhen und mit dem erfindungsgemäßen Extrakt behandelt werden können, sind z.B. Amenorrhoe, anovulatorische Zyklen, Menometrorragie, premenstruelle Beschwerden und postpartale Depressionen.
30 Desgleichen können diese Extrakte zur Behandlung Geschlechtshormon-abhängiger Krankheiten beim Mann verwendet werden, wie z.B. der benignen Prostatahyperplasie oder dem Prostatakarzinom.

Die überraschend hohe östrogene Aktivität der erfindungsgemäßen Hopfenextrakte wurde sowohl mit einem kompetitiven Rezeptorbindungsassay für die humanen Östrogenrezeptoren alpha und beta als auch in einem rekombinanten Hefe-Assay im Vergleich zur Aktivität von 17 β -Östradiol nachgewiesen. Im Gegensatz dazu zeigen herkömmliche Standard-Hopfenextrakte bei gleicher Dosierung wesentlich schwächere oder keinerlei Aktivität.

10

Figur 2 zeigt die Aktivität eines Vergleichsextraktes und zweier erfindungsgemäßer Hopfenextrakte in einem Hefe-Reporterassay.

15 Erfindungsgemäß wird ein Hopfenextrakt mit einem gegenüber herkömmlichen, insbesondere wässrig-alkoholischen Extrakten erhöhtem Gehalt an freien und/oder gebundenen Chalkonen und Flavonen, insbesondere 6- und 8-Prenylnaringenin, Xanthohumol und Isoxanthohumol bereitgestellt, der gleichzeitig noch α - und eventuell β -Bittersäuren (Humulon bzw. Lupulon und dessen
20 Derivate) enthält.

Weiter wird erfindungsgemäß ein Verfahren zur Herstellung dieser Hopfenextrakte bereitgestellt, umfassend die Schritte:

25

- (a) ein- oder mehrmaliges Extrahieren einer Hopfendroge mit einem C₅-C₇-Alkan oder überkritischem CO₂ und Abtrennen des Drogenrückstandes von der Extraktionslösung;
- (b) ein- oder mehrmaliges Extrahieren des Drogenrückstandes
30 aus Schritt (a) mit Wasser und Abtrennen des Drogenrückstandes;

(c) ein- oder mehrmaliges Extrahieren des Drogenrückstandes aus Schritt (b) mit einem Lösungsmittel ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Alkoholen, wässrigen Alkoholen, Ketonen, wässrigen Ketonen und Estern sowie Filtrieren
5 der erhaltenen Extraktionslösung; und

(d) Entfernen des Lösungsmittels aus den in Schritt (c) erhaltenen vereinigten Extraktlösungen und Trocknen des erhaltenen Rückstands.

10 Das Verhältnis Droge zu Lösungsmittel liegt bei jedem Extraktionsschritt im Bereich von etwa 1 : 7 bis etwa 1 : 12.

Die Extraktion mit einem C₅-C₇-Alkan oder überkritischem CO₂ in Schritt (a) wird vorzugsweise ein-, zwei- oder dreimal,
15 insbesondere dreimal, durchgeführt.

Die Extraktion mit überkritischem CO₂ ist besonders bevorzugt.

20 Das C₅-C₇-Alkan in Schritt (a) ist vorzugsweise ein C₅-C₇-n-Alkan aus der Gruppe bestehend aus n-Pentan, n-Hexan und n-Heptan, wobei n-Heptan ganz besonders bevorzugt ist.

Die Extraktion in Schritt (b) wird vorzugsweise bei einer
25 Temperatur zwischen 60 und 95°C, vorzugsweise bei 90°C, durchgeführt wobei die Extraktionsdauer eine oder mehrere Stunden betragen kann.

Das Lösungsmittel in Schritt (c) ist vorzugsweise ausgewählt
30 aus der Gruppe bestehend aus Ethanol, wässrigem Ethanol, Methanol, wässrigem Methanol, Aceton, wässrigem Aceton und Ethylacetat, wobei 80 bis 96% (g/g) Ethanol, 74 bis 99% (g/g)

Methanol bzw. 60 bis 99% (g/g) Aceton bevorzugt ist und 92% (g/g) Ethanol besonders bevorzugt ist.

Der erfindungsgemäße Hopfen(trocken)extrakt ist
5 gekennzeichnet durch einen Gehalt an α -Bittersäuren von mindestens 0,5%, vorzugsweise mindestens 0,8% und insbesondere mindestens 1%, an Xanthohumol von mindestens 2%, vorzugsweise mindestens 3% und insbesondere mindestens 4% und an prenylierten Flavonen von mindestens 0,5%, vorzugsweise
10 mindestens 0,7%. Die prenylierten Flavone umfassen vorzugsweise 6-Prenylnaringenin, 8-Prenylnaringenin und Isoxanthohumol. Xanthohumol ist im Sinne der vorliegenden Erfindung nicht zu den prenylierten Flavonen zu zählen. Die Prozentangaben beziehen sich auf das Gewicht des
15 Hopfentrockenextraktes.

Die erhaltenen Extrakte können zusammen mit üblichen pharmazeutisch verträglichen Hilfsstoffen zu pharmazeutischen Zubereitungen wie Kapseln, Filmtabletten und Dragees
20 verarbeitet werden. Als pharmazeutische Hilfsstoffe werden übliche Füll-, Binde-, Spreng-, Schmier- und Überzugsmittel für Filmtabletten und Dragees sowie Öle und Fette als Füllmassen für Weichgelatine kapseln verwendet.

25 Die erfindungsgemäßen Extrakte können zur Prophylaxe und Therapie von Krankheitszuständen verwendet werden, die durch einen Mangel an Östrogenen oder durch andere hormonelle Dysregulationen verursacht werden, wie insbesondere klimakterische Beschwerden, geschlechtshormonabhängige
30 Krebserkrankungen, benigne Prostatahyperplasie, Osteoporose, Alzheimerische Krankheit und Herz-Kreislaferkrankungen. Im Falle der geschlechtshormonabhängigen Krebserkrankungen können die erfindungsgemäßen Extrakte insbesondere zur

Prophylaxe und Therapie von Brustkrebs, Gebärmutterkrebs und Prostatakrebs verwendet werden.

Die Dosierung der erfindungsgemäßen Extrakte liegt im Bereich
5 von 0.005 g bis 2 g Extrakt 1 bis 4 mal täglich, vorzugsweise
im Bereich von 0.02 g bis 1 g 1 bis 2 mal täglich. Die
Dosierung im Einzelfalle ist abhängig vom Krankheitsbild und
den individuellen Umständen des Patienten und kann von dem
behandelnden Fachmann entsprechend den jeweiligen
10 Bedürfnissen angepasst werden.

Die nachstehend angegebenen Beispiele erläutern die Erfindung
und sind nicht beschränkend aufzufassen. Alle Prozentangaben
beziehen sich auf das Gewicht, falls nichts anders angegeben
15 ist.

Vergleichsbeispiel: Herstellung eines 96% (g/g)
Ethanolextraktes ohne vorherige Entfettung

20 50 g der Hopfendroge (Sorte "Hallertauer Magnum") wurden mit
500 g 96% (g/g) Ethanol versetzt und mit dem Ultraturrax
zerkleinert. Es wurde 1 h bei 60°C extrahiert. Anschließend
wurde über einen Seitz 1500 Filter filtriert. Die Droge wurde
noch weitere 2 Male auf dieselbe Weise extrahiert. Die
25 vereinigten Extraktlösungen wurden am Rotationsverdampfer vom
Ethanol befreit und über Nacht im Vakuumtrockenschrank bei
50°C getrocknet. Aus der Trockenmasse wird der Gehalt an
charakteristischen Inhaltsstoffen per nachstehender HPLC-
Methode ermittelt. Diese HPLC-Methode wird zur Bestimmung der
30 Inhaltsstoffe auch bei den weiteren Beispielen angewendet.

Säule	LiChrospher 100 5 μ m. 250 x 4 mm
Eluens	A: 1000 ml bidest Wasser/ 3 ml Phosphorsäure (85%)/ 2 ml Triethylamin B: 1000 ml Acetonitril / 3 ml Phosphorsäure (85%) / 2 ml Triethylamin / 60 ml bidest Wasser
Gradient	40% B auf 70% B in 30 min; 70% B auf 100% B in 10 min
Fluß	1,2 ml/min
Detektion	Diodenarray

Ausbeute (96% (g/g) Ethanol-Extrakt): 18,38 g => 36,8%

5

HPLC-Gehalt an Hopfen α -Bittersäuren: 19,8%

HPLC-Gehalt an Hopfen β -Bittersäuren: 4,2%

HPLC-Gehalt an Xanthohumol: 1,3%

HPLC-Gehalt an 6- und 8-Prenylnaringeninen,

10 sowie an Isoxanthohumol: unterhalb der Nach-
weisgrenze (< 0,01%)

Beispiel 1a: Herstellung eines Hopfenextraktes (Extraktion mit

15 CO₂ und anschließend Wasservorextraktion bei 90°C)

Serielle Extraktion mit überkritischem CO₂, Wasser und 92%
(g/g) Ethanol:

20 80,6 g einer Hopfendroge (Sorte „Hallertauer Magnum“), die
zuvor mit überkritischem CO₂ vorextrahiert worden war
(Bedingungen: Vermahlung auf 10 mm Korngröße, Extraktion mit
CO₂ bei 250 bar/50°C, Abtrennung des Extraktes mit einer
Ausbeute von 30%), wurden mit 960 g Wasser zunächst 5 Min. am
25 Ultra-Turrax, dann unter Rühren 1 Stunde bei 90°C extrahiert.

Anschließend wurde der Wasserextrakt über ein Seitz Supra Filter 1500 abfiltriert. Der noch leicht feuchte Drogenrückstand wurde dann mit je 2 mal 800 g 92% (g/g) Ethanol jeweils 1 Stunde bei 60°C extrahiert. Es wurde dann
5 über Seitz Supra 1500 abfiltriert und die Extraktlösung am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 55-65°C von Ethanol befreit und im Trockenschrank bei 60°C getrocknet.

10 Ausbeuten:

Rückstand aus Wasserextraktion: 18,96 g (23,5%)

Rückstand aus 92% (g/g) EtOH-Extraktion: 9,83 g (12,2%)

HPLC-Gehalte (bezogen auf den 92% (g/g) EtOH-Extrakt):

HPLC-Gehalt an Hopfen α -Bittersäuren: 2%

15 HPLC-Gehalt an Hopfen β -Bittersäuren: 0,5%

HPLC-Gehalt an Xanthohumol 5,83%

HPLC-Gehalt an 6-Prenylnaringenin 0,63%

HPLC-Gehalt an 8-Prenylnaringenin 0,21%

HPLC-Gehalt an Isoxanthohumol 0,42%

20

Beispiel 1b: Herstellung eines Hopfenextraktes (Extraktion mit CO₂ und anschließend Wasservorextraktion bei 90°C)

Serielle Extraktion mit überkritischem CO₂, Wasser und 92%
25 (g/g) Ethanol:

504,26 g einer Hopfendroge (Sorte „Hallertauer Magnum“), die zuvor mit überkritischem CO₂ vorextrahiert worden war (Bedingungen: Vermahlung auf 10 mm Korngröße, Extraktion mit
30 CO₂ bei 250 bar/50°C, Abtrennung des Extraktes mit einer Ausbeute von 30%), wurden mit 6 kg Wasser zunächst 5 Min. am Ultra-Turrax, dann unter Rühren 1 Stunde bei 90°C extrahiert. Anschließend wurde der Wasserextrakt über ein Seitz Supra

Filter 1500 abfiltriert. Der noch leicht feuchte Drogenrückstand wurde dann mit je 2 mal 5 kg 92% (g/g) Ethanol jeweils 1 Stunde bei 60°C extrahiert. Es wurde dann über Seitz Supra 1500 abfiltriert und die Extraktlösung am
5 Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 55-65°C von Ethanol befreit und im Trockenschrank bei 60°C getrocknet.

Ausbeuten:

10 Rückstand aus Wasserextraktion: 105,9 g (21%)
Rückstand aus 92% (g/g) EtOH-Extraktion: 69,37 g (13,8%)
HPLC-Gehalte (bezogen auf den 92% (g/g) EtOH-Extrakt):
HPLC-Gehalt an Hopfen α -Bittersäuren: 1%
HPLC-Gehalt an Hopfen β -Bittersäuren: 0,5%
15 HPLC-Gehalt an Xanthohumol 4,41%
HPLC-Gehalt an 6-Prenylnaringenin 0,49%
HPLC-Gehalt an 8-Prenylnaringenin 0,15%
HPLC-Gehalt an Isoxanthohumol 0,6%

20

Beispiel 2: Herstellung eines Hopfenextraktes (Extraktion mit CO₂ und anschließend Wasservorextraktion bei 60°C)

Serielle Extraktion mit überkritischem CO₂, Wasser und 92%
25 (g/g) Ethanol:

80,36 g einer Hopfendroge (Sorte „Hallertauer Magnum“), die zuvor mit überkritischem CO₂ vorextrahiert worden war (Bedingungen: Vermahlung auf 10 mm Korngröße, Extraktion mit
30 CO₂ bei 250 bar/50°C, Abtrennung des Extraktes mit einer Ausbeute von 30%), wurden mit 964 g Wasser zunächst 5 Min. am Ultra-Turrax, dann unter Rühren 1 Stunde bei 60°C extrahiert. Anschließend wurde der Wasserextrakt über ein Seitz Supra

Filter 1500 abfiltriert. Der noch leicht feuchte Drogenrückstand wurde dann mit je 2 mal 800 g 92% (g/g) Ethanol zunächst 5 Min. am Ultra-Turrax, dann unter Rühren jeweils 1 Stunde bei 60°C extrahiert. Es wurde dann über
5 Seitz Supra 1500 abfiltriert und die Extraktlösung am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 55-65°C von Ethanol befreit und im Trockenschrank bei 60°C getrocknet.

10 Ausbeuten:

Rückstand aus Wasserextraktion: 17,91 g (22%)

Rückstand aus 92% (g/g) EtOH-Extraktion: 9,95 g (12,4%)

HPLC-Gehalte (bezogen auf den 92% (g/g) EtOH-Extrakt):

HPLC-Gehalt an Hopfen α -Bittersäuren: 1,58%

15 HPLC-Gehalt an Hopfen β -Bittersäuren: 0%

HPLC-Gehalt an Xanthohumol 6,1%

HPLC-Gehalt an 6-Prenylnaringenin 0,4%

HPLC-Gehalt an 8-Prenylnaringenin 0,09%

HPLC-Gehalt an Isoxanthohumol 0,21%

20

Beispiel 3: Herstellung eines Hopfenextraktes (Extraktion mit n-Heptan und anschließend Wasser bei 90°C)

25 247,6 g Hopfendroge (Sorte „Hallertauer Magnum“) wurden mit dem 7-fachen Gewicht zunächst 5 Min. am Ultra-Turrax, dann unter Rühren 1 Stunde mit n-Heptan extrahiert. Nach Abfiltrieren der heptanischen Extraktlösung über Seitz Supra 1500 wurde noch ein zweites Mal in der gleichen Weise
30 extrahiert. Danach wurde der erhaltende Drogenrückstand im Vakuumtrockenschrank vom Heptan befreit. Der trockene Drogenrückstand (205 g) wurde sodann mit der 12-fachen Gewichtsmenge Wasser versetzt und während 1 Stunde bei 90°C

gehalten. Danach wurde erneut abfiltriert und der noch leicht feuchte Drogenrückstand mit der 10-fachen Gewichtsmenge 92% (g/g) Ethanol unter Rühren zweimal bei 60°C extrahiert. Es wurde dann über Seitz Supra 1500 abfiltriert und die
5 Extraktlösung am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 55-65°C von Ethanol befreit und im Trockenschrank bei 60°C getrocknet.

Ausbeuten:

10 Heptanextrakt: 26,4 g (10,7%)
Wasserextrakt: 41,1 g (16,6%)
92% (g/g) Ethanolextrakt: 52,0 g (21,0%)
HPLC-Gehalte (bezogen auf den 92% (g/g) EtOH-Extrakt):
alpha-Bittersäuren: 0,86%
15 beta-Bittersäuren: 0,05%
Xanthohumol: 3,3%
6-Prenylnaringenin: 0,45%
8-Prenylnaringenin: 0,13%
Isoxanthohumol: 0,25%

20

Beispiel 4: Abhängigkeit des Gehaltes an 6-Prenyl-, 8-Prenylnaringenin und Isoxanthohumol von der Temperatur der Wasservorextraktion

25

Extraktion: Ca. 80 g einer mit CO₂ vorextrahierten Hopfendroge wurden mit dem 12-fachen Gewicht an Wasser zunächst 5 Min. am Ultra-Turrax, dann unter Rühren 1 Stunde bei 60, 70, 80, 90 und 95°C extrahiert. Anschließend wurde
30 der Wasserextrakt über ein Seitz Supra Filter 1500 abfiltriert. Der noch leicht feuchte Drogenrückstand wurde dann mit je 2 mal 800 g 92% (g/g) Ethanol zunächst 5 Min. am Ultra-Turrax, dann unter Rühren jeweils 1 Stunde bei 60°C

extrahiert. Es wurde dann über Seitz Supra 1500 abfiltriert und die Extraktlösung am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 55-65°C von Ethanol befreit und im Trockenschrank bei 60°C getrocknet.

5

Die in der Figur 1 graphisch dargestellten Ergebnisse zeigen eine deutliche Abhängigkeit der Konzentration der analysierten prenylierten Inhaltsstoffe von der Temperatur der Wasservorextraktion.

10

Beispiel 5: Prüfung der Hopfenextrakte auf östrogene Aktivität

15 Zur Prüfung von individuellen Extraktinhaltsstoffen, einem Vergleichsextrakt und einem erfindungsgemäßen Extrakt auf Wechselwirkungen mit dem humanen Östrogenrezeptor alpha (ER- α) bzw. beta (ER- β) wurde ein kompetitiver Rezeptorbindungsassay durchgeführt. Dabei wird zunächst
20 radioaktiv markiertes Östradiol an den humanen Östrogenrezeptor gebunden und anschließend mit der zu untersuchenden Testsubstanz behandelt. Ein der östrogenen Potenz der Probe entsprechender Anteil an markiertem Östradiol wird dabei verdrängt. Überschüssiges Östradiol wird
25 nach Bindung des Komplexes an Hydroxylapatit herausgewaschen. Die Östrogenrezeptor ER- α und ER- β wurden käuflich als rekombinante humane Rezeptoren erworben. Die Testansätze bestanden jeweils aus 1000 μ l TEDG-Puffer (10 mM Tris, 1.5 mM EDTA, 10% Glycerol, pH 7,5), 5 μ l Rezeptor (200 nM), 10 μ l
30 3H-Östradiol und 10 μ l Ethanol (Kontrollwert), 10 μ l Diethylstilöströl (100 mM, Positivkontrolle) oder 10 μ l Extrakt bzw. Extraktinhaltsstoff. Die Ansätze werden vorsichtig durchmischt und für ca. 16 Stunden bei

Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wird 250 μ l Hydroxylapatit (HAP) zugefügt, um die Proteine zu adsorbieren. Während einer Inkubationsphase von 15 Minuten werden die Ansätze alle fünf Minuten mit der Hand
5 durchmischt. Der Niederschlag wird bei 10.000 rpm für einige Sekunden scharf abzentrifugiert und der Überstand wird abpipettiert. Das Pellet wird dreimal mit je 1000 μ l TEDG Puffer gewaschen und zur Messung mit 1000 μ l Ethanol versetzt, aufgeschlämmt und in ein Szintillationsvial
10 überführt. Nach Zugabe von 9 ml Szintillatorflüssigkeit (Ready Safe, Beckmann) erfolgt eine Messung über das gesamte ^3H -Fenster in einem Beckmann Beta-Counter.

Die Charakterisierung der Bindungskapazitäten der
15 Testsubstanzen erfolgt über die Bestimmung der ED_{50} -Werte aus den Dosis-Wirkungskurven der Östradiolverdrängung. Die Ergebnisse sind in der Tab. 1 zusammengestellt und demonstrieren für alle untersuchten Inhaltsstoffe potente Wechselwirkungen mit beiden Östrogenrezeptoren.
20 Überraschenderweise erwies sich der erfindungsgemäße Extrakt als wesentlich stärker wirksam als anhand der Aktivitäten der einzelnen Inhaltsstoffe zu erwarten wäre. Im Gegensatz dazu zeigte der Vergleichsextrakt eine Aktivität an beiden Rezeptoren, die mindestens 10fach unterhalb der des
25 erfindungsgemäßen Extraktes lag.

Tab. 1: Bindung von Extraktinhaltsstoffen, einem
erfindungsgemäßen Extrakt und einem Vergleichsextrakt an den
30 humanen Östrogenrezeptor-alpha ($\text{ER-}\alpha$) bzw. Östrogenrezeptor-beta ($\text{ER-}\beta$)

Substanz	ED ₅₀ [pg/ml]		Relative Potenz		<u>Rel. Potenz ER-α</u> Rel. Potenz ER- β
	ER- α	ER- β	ER- α	ER- β	
17 β -Östradiol	507	400	1	1	1
8-Prenylnaringenin	4.6x10 ⁴	1.0x10 ⁵	1.1x10 ⁻²	4.0x10 ⁻³	2.72
6-Prenylnaringenin	1.6x10 ⁶	4.6x10 ⁵	3.2x10 ⁻⁴	8.7x10 ⁻⁴	0.37
Isoxanthohumol	2.0x10 ⁶	8.5x10 ⁵	2.5x10 ⁻⁴	4.7x10 ⁻⁴	0.54
Xanthohumol	2.0x10 ⁶	1.2x10 ⁶	2.5x10 ⁻⁴	3.3x10 ⁻⁴	0.78
Erfindungsgemäßer Extrakt	3.9x10 ⁵	2.7x10 ⁵	1.3x10 ⁻³	1.5x10 ⁻³	0.87
Vergleichsextrakt	4.0x10 ⁶	4.3x10 ⁶	1.3x10 ⁻⁴	9.4x10 ⁻⁵	1.33

Die Prüfung von Extrakten auf östrogene Eigenschaften erfolgte außerdem mit einem Reporter-gen-Assay unter Verwendung von Hefezellen (*Saccharomyces*). Die Zellen sind stabil mit dem humanen α -Östrogenrezeptor und einem Expressionsplasmid, das ein Östrogenresponse-Element und das Gen für das Enzym β -Galaktosidase enthält, transfiziert. Alle Proben wurden in einer Konzentration von 20 mg/ml in DMSO gelöst und unverdünnt oder nach Verdünnen mit DMSO im Verhältnis 1/10, 1/100 oder 1/1000 in einem Volumen von 1 μ l zu 100 μ l Kulturmedium in 96-Well Flachboden-Mikrotiterplatten gegeben. Anschließend wurden 100 μ l Hefesuspension und das chromogene Substrat Chlorphenolrot- β -D-Galactopyranosid zugefügt. Auf jeder Platte wurden zur Kontrolle Wells vorbereitet, in die nur Kulturmedium bzw. das Lösungsmittel eingefüllt wurde oder die die Standardkonzentrationen von 17 β -Östradiol enthielten. Die Hefezellen wurden 72 h bei 32°C inkubiert und dann wurde die Absorption des Mediums bei 540 nm in einem Mikrotitrierplatten-Photometer gemessen. Die Proben wurden teilweise zweifach geprüft.

Ergebnisse:

Probe	Aktivität
96% (g/g) Ethanol-Extrakt gemäß Vergleichsbeispiel	inaktiv
92% (g/g) Ethanol-Extrakt gemäß Beispiel 1a	aktiv
92% (g/g) Ethanol-Extrakt gemäß Beispiel 2	aktiv

- 5 Die Ergebnisse des Assays sind in Figur 2 dargestellt. Als "aktiv" werden hierbei jene Extrakte bezeichnet, deren Aktivität im Vergleich zur 17 β -Östradiol-Standardkurve signifikant oberhalb der Background-Werte (entspricht etwa 10% der maximalen Stimulation) lag.

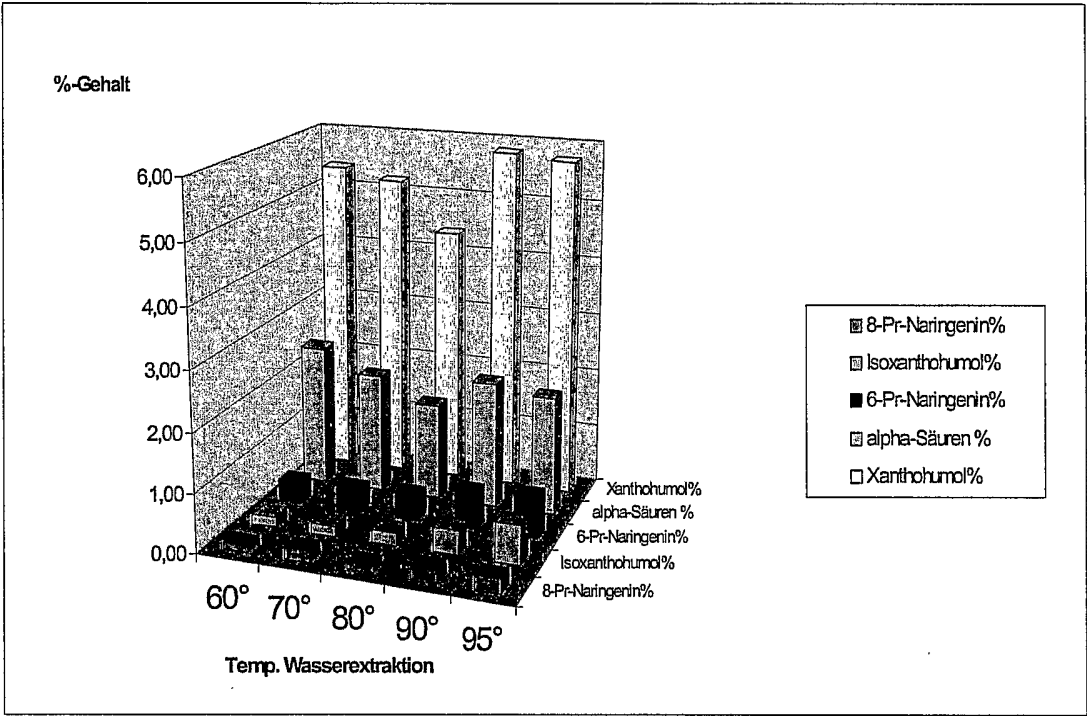
PATENTANSPRÜCHE

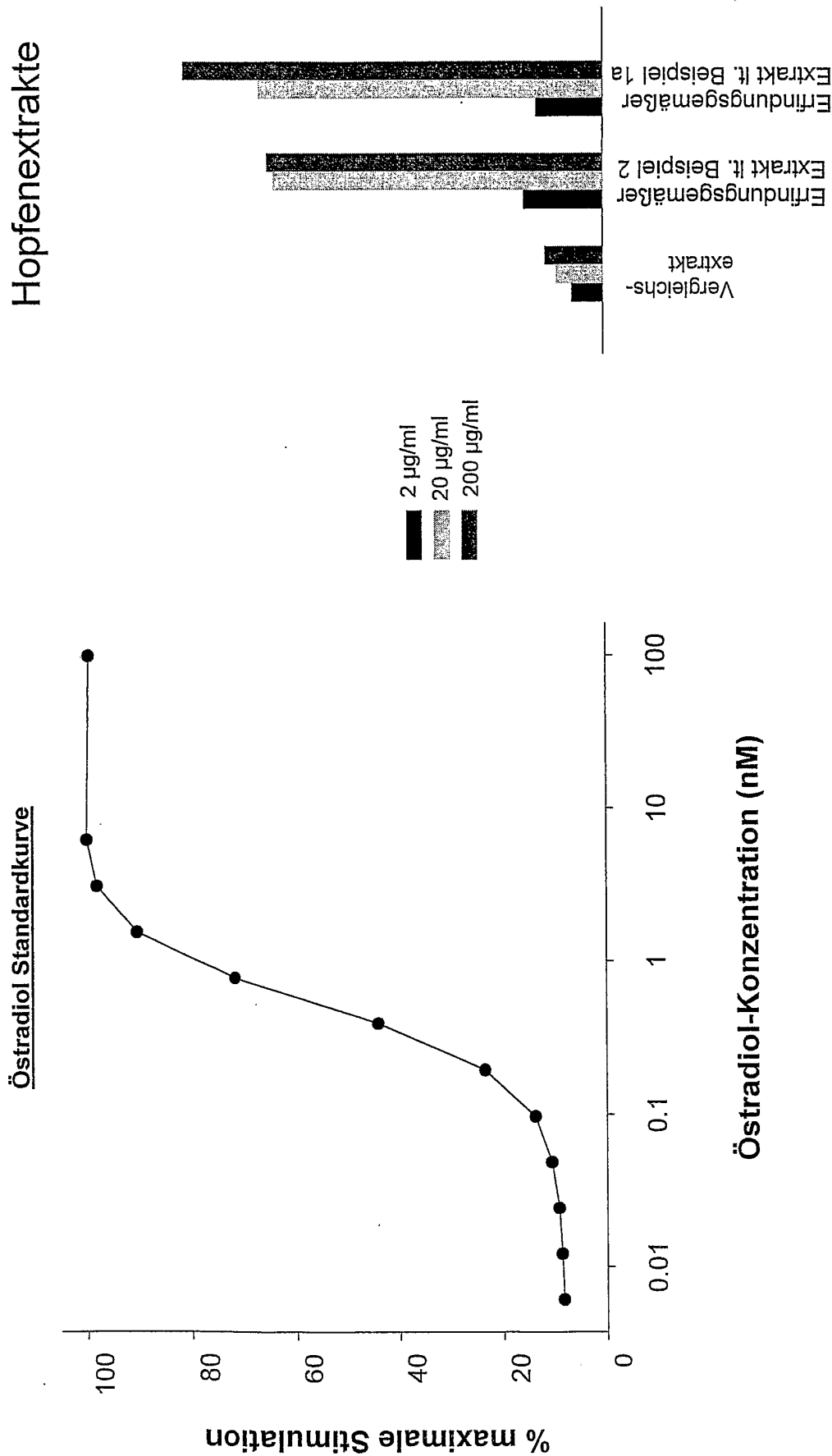
1. Hopfenextrakt, gekennzeichnet durch einen Gehalt an α -
5 Bittersäuren von mindestens 0,5%, an Xanthohumol von
mindestens 2% und an prenylierten Flavonen ausgewählt aus
der Gruppe umfassend 6-Prenylnaringenin, 8-
Prenylnaringenin und Isoxanthohumol von mindestens 0,5%.
- 10 2. Hopfenextrakt nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch einen
Gehalt an α -Bittersäuren von mindestens 0,8%, an
Xanthohumol von mindestens 3% und an prenylierten
Flavonen ausgewählt aus der Gruppe umfassend 6-
Prenylnaringenin, 8-Prenylnaringenin und Isoxanthohumol
15 von mindestens 0,7%.
3. Verfahren zur Gewinnung eines Hopfenextrakts, umfassend
die Schritte:
 - 20 (a) ein- oder mehrmaliges Extrahieren einer Hopfendroge mit
einem C₅-C₇-Alkan oder überkritischem CO₂ und Abtrennen
des Drogenrückstandes von der Extraktionslösung;
 - (b) ein- oder mehrmaliges Extrahieren des Drogenrückstandes
aus Schritt (a) mit Wasser und Abtrennen des
25 Drogenrückstandes;
 - (c) ein- oder mehrmaliges Extrahieren des Drogenrückstandes
aus Schritt (b) mit einem Lösungsmittel ausgewählt aus
der Gruppe bestehend aus Alkoholen, wässrigen Alkoholen,
Ketonen, wässrigen Ketonen und Estern sowie Filtrieren
30 der erhaltenen Extraktionslösung; und
 - (d) Entfernen des Lösungsmittels aus den in Schritt (c)
erhaltenen vereinigten Extraktlösungen und Trocknen des
erhaltenen Rückstands.

4. Verfahren gemäß Anspruch 3, wobei in Schritt (a) ein-, zwei- oder dreimal extrahiert wird.
- 5 5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3 oder 4, wobei das Lösungsmittel in Schritt (a) ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus n-Pentan, n-Hexan und n-Heptan.
6. Verfahren gemäß Anspruch 5, wobei das Lösungsmittel in
10 Schritt (a) n-Heptan ist.
7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3 bis 6, wobei die Extraktion in Schritt (b) zwischen 60 und 95°C, vorzugsweise bei etwa 90°C erfolgt.
- 15 8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3 bis 7, wobei das Lösungsmittel in Schritt (c) ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Methanol, wässrigem Methanol, Ethanol, wässrigem Ethanol, Aceton, wässrigem Aceton und
20 Ethylacetat.
9. Verfahren gemäß Anspruch 8, wobei das Lösungsmittel in Schritt (c) ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus 80-96% (g/g) Ethanol, 74-99% (g/g) Methanol und 60-99%
25 (g/g) Aceton.
10. Verfahren gemäß Anspruch 8 oder 9, wobei das Lösungsmittel in Schritt (c) 92% (g/g) Ethanol ist.
- 30 11. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das Lösungsmittel in Schritt (a) n-Heptan ist und das Lösungsmittel in Schritt (c) 92% (g/g) Ethanol ist.

12. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das Lösungsmittel in Schritt (a) überkritisches CO₂ ist und das Lösungsmittel in Schritt (c) 92% (g/g) Ethanol ist.
- 5 13. Pharmazeutische Zubereitung, umfassend einen Extrakt gemäß Anspruch 1 oder 2 und übliche pharmazeutische verträgliche Hilfsstoffe.
- 10 14. Verwendung eines Extrakts nach Anspruch 1 oder 2 oder einer pharmazeutischen Zubereitung nach Anspruch 13 zur Prophylaxe und Therapie von Krankheitszuständen, die durch einen Mangel an Östrogenen oder durch eine Dysregulation des Geschlechtshormonstoffwechsels, insbesondere Östrogenstoffwechsels verursacht werden.
- 15 15. Verwendung nach Anspruch 14, wobei die Krankheitszustände aus der Gruppe bestehend aus klimakterischen Beschwerden, geschlechtshormonabhängigen Krebserkrankungen, benigner Prostatahyperplasie, Osteoporose, Alzheimerscher
- 20 Krankheit und Herz-Kreislaufferkrankungen ausgewählt sind.
- 25 16. Verwendung nach Anspruch 15, wobei die geschlechtshormonabhängigen Krebserkrankungen aus der Gruppe bestehend aus Brustkrebs, Prostatakrebs und Gebärmutterkrebs ausgewählt sind.

FIGUR 1





FIGUR 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/08943

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12C3/08 C12C3/10 A61K35/78

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, FSTA, BIOSIS, COMPENDEX

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 199 39 350 A (PLANTEXTRAKT GMBH & CO KG) 22 February 2001 (2001-02-22) cited in the application	1-4, 7-10, 12-16
Y	the whole document	5,6,11
X	US 5 972 411 A (SCHULZE WILLIAM G ET AL) 26 October 1999 (1999-10-26) column 12, line 39-64	1,2
X	US 4 490 405 A (HARTL ALFONS ET AL) 25 December 1984 (1984-12-25) examples 4,6	1,2
Y	US 3 891 781 A (BAUER KURT ET AL) 24 June 1975 (1975-06-24) column 5, line 37-57	5,6,11
	-/--	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 October 2002

Date of mailing of the international search report

31/10/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Koch, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/08943

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MIRANDA ET AL.: "Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (<i>Humulus lupulus</i>) in human cancer cell lines" FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY, vol. 37, no. 4, 1999, pages 271-285, XP002216477 abstract -----	14-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP02/08943

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
See supplemental sheet further data PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of I.1

Although Claims 14-16 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.

Continuation of I.1

PCT Rule 39.1(iv) – method for treatment of the human or animal body by therapy.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/08943

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19939350 A	22-02-2001	DE 19939350 A1	22-02-2001
US 5972411 A	26-10-1999	AU 733954 B2	31-05-2001
		AU 6795098 A	22-10-1998
		BR 9807919 A	22-02-2000
		EP 0975736 A1	02-02-2000
		NZ 338078 A	26-10-2001
		WO 9844087 A1	08-10-1998
US 4490405 A	25-12-1984	DE 3103617 A1	05-08-1982
		AT 13556 T	15-06-1985
		DE 3263815 D1	04-07-1985
		EP 0057435 A2	11-08-1982
US 3891781 A	24-06-1975	DE 2244065 A1	14-03-1974
		AT 335950 B	12-04-1977
		AT 772473 A	15-08-1976
		AU 475855 B	02-09-1976
		AU 6015973 A	13-03-1975
		BE 804533 A1	06-03-1974
		CA 1014876 A1	02-08-1977
		CS 168671 B2	29-06-1976
		DD 110051 A5	05-12-1974
		FR 2198994 A1	05-04-1974
		GB 1410450 A	15-10-1975
		JP 49066896 A	28-06-1974
		JP 57022548 B	13-05-1982

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/08943

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12C3/08 C12C3/10 A61K35/78

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12C

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, FSTA, BIOSIS, COMPENDEX

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 199 39 350 A (PLANTEXTRAKT GMBH & CO KG) 22. Februar 2001 (2001-02-22) in der Anmeldung erwähnt	1-4, 7-10, 12-16
Y	das ganze Dokument	5,6,11
X	US 5 972 411 A (SCHULZE WILLIAM G ET AL) 26. Oktober 1999 (1999-10-26) Spalte 12, Zeile 39-64	1,2
X	US 4 490 405 A (HARTL ALFONS ET AL) 25. Dezember 1984 (1984-12-25) Beispiele 4,6	1,2
Y	US 3 891 781 A (BAUER KURT ET AL) 24. Juni 1975 (1975-06-24) Spalte 5, Zeile 37-57	5,6,11
	--- -/--	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

15. Oktober 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

31/10/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Koch, J

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/08943

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	MIRANDA ET AL.: "Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (<i>Humulus lupulus</i>) in human cancer cell lines" FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY, Bd. 37, Nr. 4, 1999, Seiten 271-285, XP002216477 Zusammenfassung -----	14-16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/08943

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. —
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. ☐ Ansprüche Nr. —
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr. —
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. —
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.1

Obwohl die Ansprüche 14-16 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

Fortsetzung von Feld I.1

Regel 39.1(iv) PCT - Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/08943

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 19939350	A	22-02-2001	DE	19939350 A1	22-02-2001
US 5972411	A	26-10-1999	AU	733954 B2	31-05-2001
			AU	6795098 A	22-10-1998
			BR	9807919 A	22-02-2000
			EP	0975736 A1	02-02-2000
			NZ	338078 A	26-10-2001
			WO	9844087 A1	08-10-1998
US 4490405	A	25-12-1984	DE	3103617 A1	05-08-1982
			AT	13556 T	15-06-1985
			DE	3263815 D1	04-07-1985
			EP	0057435 A2	11-08-1982
US 3891781	A	24-06-1975	DE	2244065 A1	14-03-1974
			AT	335950 B	12-04-1977
			AT	772473 A	15-08-1976
			AU	475855 B	02-09-1976
			AU	6015973 A	13-03-1975
			BE	804533 A1	06-03-1974
			CA	1014876 A1	02-08-1977
			CS	168671 B2	29-06-1976
			DD	110051 A5	05-12-1974
			FR	2198994 A1	05-04-1974
			GB	1410450 A	15-10-1975
			JP	49066896 A	28-06-1974
			JP	57022548 B	13-05-1982