

(19) SCHWEIZERISCHE EidGENOSSENSCHAFT
EIDGENÖSSISCHES INSTITUT FÜR GEISTIGES EIGENTUM



(11) CH

698 627 B1

(51) Int. Cl.:	A61K	36/67	(2006.01)
	B01D	3/38	(2006.01)
	B01D	11/00	(2006.01)
	A61P	35/00	(2006.01)
	A61P	5/28	(2006.01)
	A61P	5/32	(2006.01)
	A61K	131/00	(2006.01)

Erfolgspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

(12) PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 01289/07

(73) Inhaber:
Alpinia Laudanum Institute of Phytopharmaceutical Sciences AG, Bahnhofstrasse 34 8880 Walenstadt (CH)

(22) Anmeldedatum: 16.08.2007

(72) Erfinder:
Dr. Matthias Heinrich Kreuter, 8880 Walenstadt (CH)
Jingying Yam, 4054 Basel (CH)
Dr. Karin Berger-Büter, 4108 Witterswil (CH)

(24) Patent erteilt: 15.09.2009

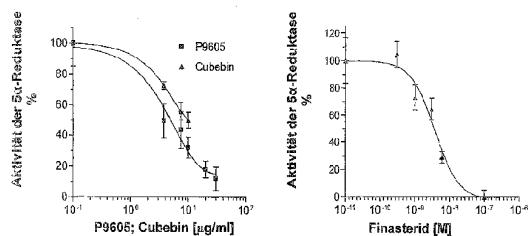
(74) Vertreter:
Patentanwaltsbüro Zink, Birchlistrasse 11 8173 Riedt-Neerach (CH)

(45) Patentschrift veröffentlicht: 15.09.2009

(54) Herstellung und Verwendung von Extrakten oder Extraktivstoffen aus Piper cubeba L. als wirksame Bestandteile in einem Medikament zur Behandlung von Krebserkrankungen.

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Extrakt aus Früchten von Piper cubeba L., welches dadurch gekennzeichnet ist, dass man

- in einem ersten Schritt die Früchte von Piper cubeba L. zur Entfernung der ätherischen Öle entweder
- einer Wasserdampfdestillation unterzieht und das Destillat entfernt oder
- wenigstens einmal mit einer lipophilen Phase extrahiert und diesen lipophilen Extrakt oder diese lipophilen Extrakte entfernt
- in einem zweiten Schritt die so behandelten Früchte wenigstens einmal entweder mit wenigstens einem Alkohol oder mit einem Gemisch aus wenigstens einem Alkohol und Wasser extrahiert, und
- in einem dritten Schritt die extrahierten Fruchtteile entfernt und den so erhaltenen Extrakt gewinnt.



Beschreibung

- [0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Herstellung und die Verwendung von Extraktten oder Extraktivstoffen aus Piper cubeba L. als wirksame Bestandteile in einem Medikament zur Behandlung von Krebserkrankungen.
- [0002] Verwendungen von Piper cubeba L. Zubereitungen sind beispielsweise beschrieben in Hunnius, Pharmazeutisches Wörterbuch, 8. Auflage, 1998, Seiten 1084 bis 1085.
- [0003] Hierin werden volkstümliche Anwendungen, wie die Behandlung von Kopfschmerzen sowie die Verwendung als Diuretikum, Harndesinfizienz und Stomachikum beschrieben.
- [0004] Als Droge wird die unreife Frucht verwendet, aus der auch Kueben-Öl, das ätherische Öl der Kueben, durch Wasserdampfdestillation gewonnen wird.
- [0005] Oleum Cubebae wird in den gleichen Indikationen wie die Früchte eingesetzt.
- [0006] Gemäss J. Seidemann in «World Spice Plants», Springer-Verlag, 2005, Seite 291 wird Piper cubeba L. zur Aromatisierung von Likören, Ingwerbrot und Honigbrot verwendet. Als Produkt dient das ätherische Öl, das aus der unreifen Frucht gewonnen wird.
- [0007] In JP 2000-095 649 A werden Extrakte beschrieben, unter anderem auch aus der Kueben-Frucht, die mittels eines hydrophilen Lösungsmittels, beispielsweise Aceton, Methanol und Ethanol, oder deren Mischungen mit Wasser erhalten werden. Solche Extrakte enthalten somit sowohl das ätherische Öl als auch hydrophile Substanzen.
- [0008] Diese Extrakte sollen als Testosteron-5#-Reduktasehemmer wirken. Dadurch sollen diese Extrakte den Haarwuchs positiv beeinflussen.
- [0009] Diese Extrakte sollen auch zur Behandlung von benigner Prostatahyperplasie dienen.
- [0010] In diesem Dokument werden in Tabelle 1 IC₅₀-Werte aufgeführt, die sich auf die Hemmung der Testosteron-5#-Reduktase beziehen.
- [0011] Der Extrakt aus Kueben hemmt laut dieser Tabelle das Enzym zu 50% bei einer Konzentration von 0,79 mg/ml.
- [0012] Im Rahmen eines Screening-Verfahrens wurde eine Reihe tropischer Arzneipflanzen auf ihre Wirkung gegenüber Tumorzellen in vitro untersucht.
- [0013] Völlig überraschend wurde gefunden, dass ein ethanolischer Extrakt aus unreifen Früchten von Kueben alle getesteten Tumorzellen abtötete.
- [0014] Da in erster Linie das ätherische Öl der Kueben-Früchte medizinisch verwendet wird, war es naheliegend, die Früchte mit einem geeigneten Extraktionsmittel zu extrahieren, um das ätherische Öl zu erhalten.
- [0015] Dies wurde durch erschöpfende Extraktion mit Hexan realisiert.
- [0016] Die so vom ätherischen Öl befreiten Früchte wurden der Vollständigkeit halber zusätzlich mit 90%-igem wässrigem Ethanol extrahiert, um mittelpolare Extraktivstoffe zu erhalten.
- [0017] Sowohl das gewonnene ätherische Öl als auch der ethanolische Sekundäreextrakt wurden anschliessend auf ihre Aktivitäten gegenüber Tumorzellen geprüft.
- [0018] Es wurde wie erwartet festgestellt, dass das gewonnene ätherische Öl alle getesteten Tumorzellen abtötete. Dies deutet darauf hin, dass der beobachtete zytotoxische Effekt unspezifischer Natur ist und damit keinen Antitumor-Effekt darstellt.
- [0019] Völlig überraschend wurde aber gefunden, dass der ethanolische Sekundäreextrakt zwar keine der getesteten Tumorzellen direkt abtötete, aber bei einigen Tumorzellen deren Proliferationsverhalten veränderte.
- [0020] Solche Tumorzellen erwiesen sich als besonders empfindlich gegenüber dem ethanolischen Sekundäreextrakt, die für ihr Wachstum Sexualhormone als Wachstumsfaktoren benötigen. Als Beispiele seien die Brustkrebs-Zelllinie MCF 7 und die Prostatakrebs-Zelllinie LnCAP genannt. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die proliferationshemmende Wirkung nicht primär auf einer Hemmung der Testosteron-5#-Reduktase beruhen kann, da diese für das Wachstum der Brustkrebs-Zelllinie MCF 7 unerheblich ist.
- [0021] Es ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Herstellung eines Extrakttes aus Früchten von Piper cubeba L. zur Verfügung zu stellen.
- [0022] Dieser Extrakt soll frei oder nahezu frei von zytotoxischen ätherischen Ölen sein.
- [0023] Dieser Extrakt soll das Wachstum insbesondere von solchen Tumorzellen hemmen, die für ihr Wachstum Sexualhormone als Wachstumsfaktoren benötigen.
- [0024] Dieser Extrakt soll anti-androgene und/oder anti-östrogene Wirkungen aufweisen.
- [0025] Dieser Extrakt soll die Wirkungen des Sexualhormons Dihydrotestosteron, abgekürzt mit DHT, antagonisieren, insbesondere dessen proliferationssteigernde und anti-apoptotische Wirkung auf Prostatakrebszellen.

- [0026] Diese Ziele werden mit der vorliegenden Erfindung erreicht.
- [0027] Die Erfindung ist durch die Merkmale in den unabhängigen Ansprüchen gekennzeichnet.
- [0028] Bevorzugte Ausführungsformen werden in den abhängigen Ansprüchen definiert.
- [0029] Im folgenden Teil werden mögliche Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung beschrieben.
- [0030] Dabei wird auch Bezug auf die Figuren genommen.

- Fig. 1a zeigt den anti-proliferativen Effekt des gemäss Beispiel 1 hergestellten Extraktes auf LNCap- und PC-3-Zellen.
- Fig. 1b zeigt den anti-proliferativen Effekt der Reinsubstanz Cubebin auf LNCap- und PC-3-Zellen.
- Fig. 2 zeigt die Hemmung der DNA-Synthese von LNCap-Zellen durch den gemäss Beispiel 1 hergestellten Extrakt.
- Fig. 3 zeigt den anti-androgenen Effekt des gemäss Beispiel 1 hergestellten Extraktes auf die androgen-abhängige Zellproliferation auf LNCap-Zellen.
- Fig. 4 zeigt den anti-androgenen Effekt des gemäss Beispiel 1 hergestellten Extraktes auf die DNA-Synthese von LNCap-Zellen.
- Fig. 5 zeigt den anti-östrogenen Effekt des gemäss Beispiel 1 hergestellten Extraktes auf die DNA-Synthese von MCF-7-Zellen.
- Fig. 6a zeigt den hemmenden Effekt des gemäss Beispiel 1 hergestellten Extraktes und der Reinsubstanz Cubebin auf die Aktivität der 5#-Reduktase Typ II.
- Fig. 6b zeigt den hemmenden Effekt des bekannten 5#-Reduktase-Inhibitors «Finasterid» auf die Aktivität der 5#-Reduktase Typ II.
- Fig. 7a zeigt, dass TNF-# die Apoptose der Tumorzellen in Abhängigkeit von der Dosis induziert, und dass dieser Effekt durch DHT bei den Tumorzellen komplett aufgehoben wird.
- Fig. 7b zeigt, dass die anti-apoptotische Wirkung von DHT durch den gemäss Beispiel 1 hergestellten Extrakt aufgehoben wird.
- Fig. 8 zeigt, dass sowohl der gemäss Beispiel 1 hergestellte Extrakt als auch die Reinsubstanz Cubebin die Sekretion des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) in Abhängigkeit von der jeweiligen Dosis hemmen.
- Fig. 9 zeigt, dass der gemäss Beispiel 1 hergestellte Extrakt die durch DHT induzierte Sekretion des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) stark inhibiert.
- Fig. 10 zeigt, dass die Androgenrezeptor-Dichte in LNCap-Zellen sowohl durch die Behandlung mit dem gemäss Beispiel 1 hergestellten Extrakt als auch durch die Behandlung mit der Reinsubstanz Cubebin dosisabhängig zunehmend reduziert wird.

- [0031] Die nachfolgenden Beispiele illustrieren die vorliegende Erfindung.

Beispiel 1 (Herstellung eines Flüssig-Extraktes)

[0032] 110 g unreife, getrocknete Früchte von Piper cubeba L. mit einer Mahlfeinheit von 0,1 mm bis 0,9 mm wurden bei einer Temperatur zwischen 10°C und 20°C während 8 Stunden mit 0,5 Litern Hexan unter Rühren extrahiert. Die mit den ätherischen Ölen und hochlipophilen Stoffen beladene Hexanphase wurde anschliessend abgetrennt. Dieser Vorgang wurde nochmals durchgeführt, wobei die Extraktionszeit auf 2 Stunden begrenzt wurde.

[0033] Die so entölten Früchte wurden nun im Vakumschrank bei einer Temperatur von 40°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Man erhielt 92 g entölt Drogenmaterial.

[0034] Anschliessend wurden die so behandelten Früchte bei einer Temperatur zwischen 20°C und 30°C während 2 Stunden mit einem Gemisch aus 90 Gewichtsteilen Ethanol und 10 Gewichtsteilen Wasser unter Rühren extrahiert.

[0035] Das Gewichtsverhältnis von Droge zu Extraktionsmittelgemisch betrug 1:5.

[0036] Die so extrahierte Droge wurde mittels Schichtenfiltration abgetrennt. Man erhielt 380 g dunkelbraunen Flüssigextrakt mit einem Trockensubstanzgehalt von 1,92 m/m %, entsprechend einer Extraktivstoffausbeute von 7,3 g absolut aus 92 g entölt Früchten.

[0037] Dieser Extrakt wird im folgenden Teil mit P9605 bezeichnet.

[0038] Dieser Extrakt enthält 20 m/m % an Cubebin, bezogen auf den Trockensubstanzgehalt.

Beispiel 2 (Herstellung eines Trockenextraktes)

[0039] Ein gemäss Beispiel 1 gewonnener Flüssigextrakt wurde in einen Verdampfer bei einer Temperatur von 40°C zudosiert, und die Einengung wurde unter Vakuum (300 mbar bis 20 mbar) und erhöhter Temperatur (40°C bis 55°C) gestartet.

[0040] Während der Destillation wurde der verbleibende Teil des Fluidextraktes kontinuierlich in den Verdampfer so lange zudosiert, bis die gesamte Menge des Fluidextraktes eingezogen und bis im erhaltenen Spissumextrakt ein Trockensubstanzgehalt von 30 bis 40 m/m % erreicht war.

[0041] Man erhielt 20,0 g Spissumextrakt von dunkelbrauner Farbe, freifließend und von homogener Konsistenz. Der Spissumextrakt wies einen Trockensubstanzgehalt von 36,5 m/m % auf, was einem Extraktivstoffgehalt von 7,3 g entspricht.

[0042] Dieser konzentrierte Spissumextrakt wurde mit 7,8 g einer wässrigen 40 m/m % Gummi arabicum Lösung homogen vermischt und anschließend in einem Trockner unter Vakuum bei einem Druck von 150 mbar bis 10 mbar und einer Temperatur von 40°C bis 55°C getrocknet.

[0043] Man erhielt 10,4 g an ockerbraunem Trockenextrakt mit einem Gehalt an 30 m/m % an Gummi arabicum als Hilfsstoff.

Beispiel 3 (Herstellung einer Trockenextrakt-Ölsuspension)

[0044] Ein gemäss Beispiel 1 gewonnener Flüssigextrakt wurde in einen Verdampfer bei einer Temperatur von 40°C zudosiert, und die Einengung wurde unter Vakuum (300 mbar bis 20 mbar) und erhöhter Temperatur (40°C bis 55°C) gestartet.

[0045] Während der Destillation wurde der verbleibende Teil des Fluidextraktes kontinuierlich in den Verdampfer so lange zudosiert, bis die gesamte Menge des Fluidextraktes eingezogen und bis im erhaltenen Spissumextrakt ein Trockensubstanzgehalt von 10 bis 20 m/m % erreicht war.

[0046] Man erhielt 54,0 g Spissumextrakt von dunkelbrauner Farbe, freifließend und von homogener Konsistenz. Der Spissumextrakt wies einen Trockensubstanzgehalt von 15,7 m/m % auf, was einem Extraktivstoffgehalt von 7,3 g entspricht.

[0047] Dieser dünnflüssige Spissumextrakt wurde mit 6,8 g Mittelkettiger Triglyceride (Ph. Eur.) und 0,5 g Soja-Lecithin (ÖAB 90) vermischt und in einen Verdampfer bei einer Temperatur von 40°C zudosiert. Die Einengung dieses Gemisches wurde unter Vakuum (300 mbar bis 40 mbar) und erhöhter Temperatur (40°C bis 50°C) so lange durchgeführt, bis im erhaltenen Spissumextrakt ein Trockensubstanzgehalt von 70 bis 80 m/m % erreicht war.

[0048] Man erhielt einen dickflüssigen Spissumextrakt, der anschließend in einem Trockner unter Vakuum bei einem Druck von 150 mbar bis 10 mbar und einer Temperatur von 40°C bis 55°C getrocknet wurde, bis ein Trockensubstanzgehalt von 99,5 m/m % erreicht war.

[0049] Man erhielt 14,9 g an dunkelbrauner Trockenextrakt-Ölsuspension mit einem Gehalt an 49 m/m % an Mittelkettigen Triglyceriden und 3,36 m/m % Soja-Lecithin als Hilfsstoffe.

Beispiel 4 (Hemmung der Zellproliferation)

[0050] Mit dem gemäss Beispiel 1 hergestellten Flüssigextrakt P9605 wurden Zellproliferationstests durchgeführt. Als Kontrolle wurde ein typischer Inhaltsstoff der Kubeben-Früchte, das Lignan Cubebin, mitgeführt.

[0051] Zur Messung der Hemmung der Zellproliferation wurde dieser Extrakt zu LNCap- und zu PC-3-Zellen zugegeben. Die so behandelten Zellen wurden während 4 Tagen in 10% FBS Kulturmedium kultiviert.

[0052] Zum Vergleich wurde das reine Lignan Cubebin, das im erfindungsgemäss hergestellten Extrakt gemäss Beispiel 1 zu 20 m/m % der Trockenmasse enthalten ist, ebenfalls zu LNCap- und zu PC-3-Zellen zugegeben. Die so behandelten Zellen wurden während 4 Tagen in 10% FBS Kulturmedium kultiviert.

[0053] Dabei wurde gemäss T. Lindl, Zell- und Gewebekultur, 4. überarbeitete Auflage, 2000, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, vorgegangen.

[0054] Alle erhaltenen Daten sind in Prozent zur Lösungsmittelkontrolle (Test ohne Extrakt und ohne Cubebin) angegeben; es sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 4 Experimenten mit 3-facher Wiederholung angegeben.

[0055] Aus den in den Fig. 1a und 1b gezeigten Daten ist ersichtlich, dass sowohl der erfindungsgemäss hergestellte Extrakt als auch die Reinsubstanz Cubebin einen anti-proliferativen Effekt sowohl bei LNCap- als auch PC-3-Zellen in Abhängigkeit von der jeweiligen Dosis zeigen.

[0056] Die Hemmung ist bei den LNCap-Zellen stärker ausgeprägt als bei den PC-3-Zellen.

[0057] Wie aus den Fig. 1a und 1b ersichtlich ist, ist die Hemmwirkung des gemäss Beispiel 1 hergestellten Extraktes P9605 um ein Mehrfaches stärker als dies durch seinen Gehalt an Cubebin erklärbar wäre. Der Extrakt enthält lediglich 20 m/m % an Cubebin, weist aber eine gleichstarke (LNCap) oder stärkere Hemmwirkung (PC-3) auf.

Beispiel 5 (Hemmung der DNA Synthese)

[0058] Mit dem gemäss Beispiel 1 hergestellten Flüssigextrakt P9605 wurden DNA-Synthesetests durchgeführt.

[0059] Zur Messung der Hemmung der DNA Synthese wurde der erfindungsgemäss hergestellte Extrakt zu LNCap Zellen zugegeben. Die so behandelten Zellen wurden während 4 Tagen in 10% FBS Kulturmedium kultiviert.

[0060] Anschliessend wurde die Menge an eingebautem ^3H -Thymidin gemessen.

[0061] Dabei wurde gemäss T. Lindl, Zell- und Gewebekultur, 4. überarbeitete Auflage, 2000, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, vorgegangen.

[0062] Alle erhaltenen Daten sind in Prozent zur Lösungsmittelkontrolle (Test ohne Extrakt) angegeben; es sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 4 Experimenten mit 3-facher Wiederholung angegeben.

[0063] Aus den in Fig. 2 gezeigten Daten ist ersichtlich, dass der erfindungsgemäss hergestellte Extrakt die DNA-Synthese in Abhängigkeit der jeweiligen Dosis hemmt.

Beispiel 6 (Anti-androgener Effekt auf die Zellproliferation)

[0064] Der anti-androgene Effekt auf die androgenabhängige Zellproliferation des gemäss Beispiel 1 hergestellten Flüssigextraktes P9605 wurde bestimmt.

[0065] Dabei wurde der erfindungsgemäss hergestellte Extrakt zu LNCap-Zellen zugegeben. Die so behandelten Zellen wurden während 6 Tagen in 10% CSS Kulturmedium kultiviert.

[0066] Diese Kultivierung erfolgte einmal ohne die Hinzugabe von Dihydrotestosteron, abgekürzt mit DHT, und einmal mit der Hinzugabe von 1 nM DHT.

[0067] Anschliessend wurde der Einfluss des erfindungsgemäss hergestellten Extraktes auf die Zellproliferation der Tumorzellen anhand des DNA-Gehaltes bestimmt.

[0068] Alle erhaltenen Daten sind in Prozent zur Lösungsmittelkontrolle (Test ohne Extrakt) angegeben; es sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 4 Experimenten mit 3-facher Wiederholung angegeben.

[0069] Aus den in Fig. 3 gezeigten Daten ist ersichtlich, dass der erfindungsgemäss hergestellte Extrakt den stimulierenden Effekt von DHT auf die Zellproliferation der Tumorzellen dosisabhängig übersteuert und darüber hinaus die basale Proliferation der Zellen absenkt.

[0070] Es ist bekannt, dass DHT die Zellproliferation steigert; siehe den Kontrollwert bei null.

Beispiel 7 (Anti-androgener Effekt auf die DNA-Synthese)

[0071] Der anti-androgene Effekt auf die DNA-Synthese des gemäss Beispiel 1 hergestellten Flüssigextraktes P9605 wurde bestimmt.

[0072] Dabei wurde der erfindungsgemäss hergestellte Extrakt zu LNCap Zellen zugegeben. Die so behandelten Zellen wurden während 6 Tagen in 10% CSS Kulturmedium kultiviert.

[0073] Diese Kultivierung erfolgte einmal ohne die Hinzugabe von Dihydrotestosteron, abgekürzt mit DHT, und einmal mit der Hinzugabe von 1 nM DHT.

[0074] Anschliessend wurde die Menge an eingebautem ^3H -Thymidin gemessen.

[0075] Dabei wurde gemäss T. Lindl, Zell- und Gewebekultur, 4. überarbeitete Auflage, 2000, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, vorgegangen.

[0076] Alle erhaltenen Daten sind in Prozent zur Lösungsmittelkontrolle (Test ohne Extrakt) angegeben; es sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 4 Experimenten mit 3-facher Wiederholung angegeben.

[0077] Aus den in Fig. 4 gezeigten Daten ist ersichtlich, dass der erfindungsgemäss hergestellte Extrakt den stimulierenden Effekt von DHT auf die DNA-Synthese der Tumorzellen dosisabhängig übersteuert und darüber hinaus die basale DNA-Synthese der Zellen absenkt.

[0078] Es ist bekannt, dass DHT die DNA-Synthese steigert; siehe den Kontrollwert bei null.

Beispiel 8 (Anti-östrogener Effekt auf die DNA-Synthese von Brustkrebszellen)

[0079] Der anti-östrogene Effekt auf die DNA-Synthese von Brustkrebszellen des gemäss Beispiel 1 hergestellten Flüssigextraktes P9605 wurde bestimmt.

[0080] Dabei wurden MCF-7 Zellen während 3 Tagen in 10% CSS Kulturmedium, welchem unterschiedliche Konzentrationen von Östradiol zugegeben wurden, kultiviert.

[0081] Diese Kultivierung erfolgte einmal ohne die Hinzugabe von erfindungsgemäss hergestelltem Extrakt und einmal mit der Hinzugabe von 10 µg/ml an Extrakt.

[0082] Anschliessend wurde die Menge an eingebautem ^3H -Thymidin gemessen.

[0083] Dabei wurde gemäss T. Lindl, Zell- und Gewebekultur, 4. überarbeitete Auflage, 2000, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, vorgegangen.

[0084] Alle erhaltenen Daten sind in DPM (radioaktiver Zerfall pro Minute; degradation per minute) angegeben; es sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 4 Experimenten mit 3-facher Wiederholung angegeben.

[0085] Aus den in Fig. 5 gezeigten Daten ist ersichtlich, dass der erfindungsgemäss hergestellte Extrakt die Stimulation der DNA-Synthese von Brustkrebszellen durch Östradiol komplett oder nahezu komplett unterbindet.

[0086] Es ist bekannt, dass Östradiol die DNA-Synthese von Brustkrebszellen steigert; siehe den Kontrollwert bei null.

Beispiel 9 (Inhibition der 5#-Reduktase Typ II Aktivität)

[0087] Die Inhibition der 5#-Reduktase Typ II Aktivität mittels des gemäss Beispiel 1 hergestellten Flüssigextraktes P9605 wurde bestimmt.

[0088] Der Assay wurde mit einem Homogenat aus HEK293 Zellen durchgeführt, welche die 5#-Reduktase Typ II überexprimieren (Reichert W., Hartmann R.W. und Jose J.; 2001, Journal Enzyme Inhibition, Vol. 16, 47–53).

[0089] Der Einfluss des erfindungsgemäss hergestellten Extraktes und der Reinsubstanz Cubebin auf die Aktivität der 5#-Reduktase Typ II wurde mittels der Bestimmung der Umwandlung von ^3H -Testosteron zu ^3H -DHT bestimmt.

[0090] Als Kontrollsubstanz diente der bekannte 5#-Reduktase-Inhibitor «Finasterid».

[0091] Alle erhaltenen Daten sind in Prozent zur Lösungsmittelkontrolle (Test ohne Extrakt) angegeben; es sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 4 Experimenten mit 3-facher Wiederholung angegeben.

[0092] Aus den in Fig. 6a gezeigten Daten ist ersichtlich, dass sowohl der erfindungsgemäss hergestellte Extrakt als auch die Reinsubstanz Cubebin einen hemmenden Effekt auf die Aktivität der 5#-Reduktase Typ II zeigen.

[0093] Die Hemmung ist beim Extrakt stärker als bei der Reinsubstanz Cubebin.

[0094] Der Extrakt hemmt mit einem IC₅₀-Wert von 3,6 µg/ml, während die Reinsubstanz Cubebin mit einem IC₅₀-Wert von 9,9 µg/ml hemmt.

[0095] Der Verlauf der Dosis-Wirkungskurve des Extraktes und der Reinsubstanz Cubebin sind analog zum Verlauf der Dosis-Wirkungskurve des bekannten 5#-Reduktase-Inhibitors «Finasterid» (Fig. 6b).

Beispiel 10 (Steigerung von Apoptose)

[0096] Die Induktion von Apoptose mittels des gemäss Beispiel 1 hergestellten Flüssigextraktes P9605 wurde bestimmt.

[0097] Als Vorversuch wurde zur Messung der Induktion der Apoptose der Tumor-Nekrose-Faktor TNF-# alleine sowie in Kombination mit 100 nM Dihydrotestosteron, abgekürzt mit DHT, zu LNCap-Zellen zugegeben. Die so behandelten Zellen wurden während 2 Tagen in 10% FBS Kulturmedium kultiviert.

[0098] Die Apoptose der Zellen wurde mittels Anwendung eines kommerziellen Apoptose-Immuno-Assay-Kits gemessen, bei dem spezifisch die DNA- und Histon-Fragmente, die als Mono- und Oligonucleosome vorliegen, detektiert werden.

[0099] Aus den in Fig. 7a gezeigten Daten ist ersichtlich, dass TNF-# die Apoptose der Tumorzellen in Abhängigkeit von der Dosis induziert.

[0100] Dieser Effekt wird durch DHT bei den Tumorzellen komplett oder nahezu komplett aufgehoben.

[0101] Analoge Versuche wurden mit DHT alleine sowie in Kombination mit 10 µg/ml des erfindungsgemäss hergestellten Extraktes durchgeführt.

[0102] Aus den in Fig. 7b gezeigten Daten ist ersichtlich, dass die anti-apoptotische Wirkung von DHT durch den erfindungsgemäss hergestellten Extrakt aufgehoben wird.

Beispiel 11 (Inhibition der Sekretion des Prostata-spezifischen Antigens)

[0103] Die Inhibition des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) mittels des gemäss Beispiel 1 hergestellten Flüssigextraktes P9605 wurde bestimmt.

[0104] Dabei wurden in einem Versuch LNCap-Zellen während 2 Tagen in 10% CSS Kulturmedium, welchem unterschiedliche Konzentrationen entweder des erfindungsgemäss hergestellten Extraktes oder der Reinsubstanz Cubebin zugegeben wurden, kultiviert.

[0105] Anschliessend wurde die sekretierte PSA-Menge im Zellüberstand mittels eines Immuno-Assays gemessen. Zusätzlich wurde die DNA-Menge bestimmt.

[0106] In Fig. 8 wird das Verhältnis der Menge PSA zur Menge DNA in Prozent angegeben.

[0107] Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 4 Experimenten mit 3-facher Wiederholung angegeben.

[0108] Aus den in Fig. 8 gezeigten Daten ist ersichtlich, dass sowohl der Extrakt als auch die Reinsubstanz Cubebin die Sekretion des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) in Abhängigkeit von der jeweiligen Dosis hemmen.

[0109] In einem zweiten Versuch wurden LNCap-Zellen während 2 Tagen in 10% CSS Kulturmedium, welchem unterschiedliche Konzentrationen von Dihydrotestosteron, abgekürzt mit DHT, zugegeben wurden, kultiviert.

[0110] Diese Kultivierung erfolgte einmal ohne die Hinzugabe von erfindungsgemäss hergestelltem Extrakt und einmal mit der Hinzugabe von 10 µg/ml an Extrakt.

[0111] Anschliessend wurde die sekretierte PSA Menge im Zellüberstand mittels eines Immuno-Assays gemessen. Zusätzlich wurde die DNA-Menge bestimmt.

[0112] In Fig. 9 wird das Verhältnis der Menge PSA zur Menge DNA in Prozent angegeben.

[0113] Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 4 Experimenten mit 3-facher Wiederholung angegeben.

[0114] Aus den in Fig. 9 gezeigten Daten ist ersichtlich, dass die durch DHT induzierte Sekretion des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) durch den erfindungsgemäss hergestellten Extrakt stark inhibiert wird.

Beispiel 12 (Bildung von Androgenrezeptoren)

[0115] Die Beeinflussung der Bildung von Antrogenrezeptoren mittels des gemäss Beispiel 1 hergestellten Flüssigextraktes P9605 wurde bestimmt.

[0116] Dabei wurden in einem Versuch LNCap-Zellen während 2 Tagen in 10% FBS Kulturmedium, welchem unterschiedliche Konzentrationen entweder des erfindungsgemäss hergestellten Extraktes oder der Reinsubstanz Cubebin zugegeben wurden, kultiviert.

[0117] Anschliessend wurde die Änderung der Androgenrezeptor-Menge mittels Westernblot-Analyse bestimmt.

[0118] In Fig. 10 sind die Banden des Androgenrezeptors gezeigt.

[0119] Die Androgenrezeptor-Dichte in LNCap-Zellen wird sowohl durch die Behandlung mit dem erfindungsgemäss hergestellten Extrakt als auch durch die Behandlung mit der Reinsubstanz Cubebin dosisabhängig zunehmend reduziert.

Schlussfolgerungen

[0120] Anhand der Beispiele 1 bis 3 wird aufgezeigt, durch welche Kombinationen von Verfahrensschritten sich Extrakte aus Kubeben-Früchten herstellen lassen, die frei oder nahezu frei von ätherischem Öl sind, neue Eigenschaften aufweisen und die Ziele der vorliegenden Erfindung erreichen.

[0121] Die Beispiele 4 bis 12 demonstrieren die Antitumoraktivität der erfindungsgemäss hergestellten Extrakte und illustrieren die Wirkmechanismen, die der Aktivität gegenüber hormonabhängigen Tumorzellen zugrunde liegen. Diese Beispiele zeigen das hohe therapeutische Potenzial der erfindungsgemäss hergestellten Extrakte, insbesondere zur Therapie von malignen Erkrankungen, deren Progression von weiblichen oder männlichen Sexualhormonen beeinflusst wird.

[0122] Betrachtet man die Wirkstärke (IC_{50} : 3,6 µg/ml) der erfindungsgemäss hergestellten Extrakte gegenüber der humanen 5#-Reduktase im Vergleich zu der in JP 2000-095 649 A (IC_{50} : 790 µg/ml) angeführten Aktivität, so zeigt sich, dass die erfindungsgemäss hergestellten Extrakte eine etwa 200-fach höhere Aktivität aufweisen und somit auch für die Behandlung der Prostatahyperplasie vollkommen neuen Möglichkeiten eröffnen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines Extraktes aus Früchten von *Piper cubeba* L., dadurch gekennzeichnet, dass man
 - in einem ersten Schritt die Früchte von *Piper cubeba* L. zur Entfernung der ätherischen Öle entweder
 - einer Wasserdampfdestillation unterzieht und das Destillat entfernt oder
 - wenigstens einmal mit einer lipophilen Phase extrahiert und diesen lipophilen Extrakt oder diese lipophilen Extrakte entfernt,
 - in einem zweiten Schritt die so behandelten Früchte wenigstens einmal entweder mit wenigstens einem Alkohol oder mit einem Gemisch aus wenigstens einem Alkohol und Wasser extrahiert, und
 - in einem dritten Schritt die extrahierten Fruchtteile entfernt und den so erhaltenen Extrakt gewinnt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die unreifen Früchte von *Piper cubeba* L. verwendet werden, und unmittelbar vor der Extraktion gemahlen und in gemahlener Form extrahiert werden, insbesondere mit einer Mahlfeinheit von 0,1 mm bis 0,9 mm.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, dass im ersten Schritt als lipophile Phase entweder überkritisches CO₂ oder ein gerader oder verzweigter Kohlenwasserstoff mit 4 bis 9 Kohlenstoffatomen, insbesondere Hexan oder Isopentan, verwendet wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass im ersten Schritt pro Gewichtsteil zu extrahierende Früchte von 1 bis 20 Gewichtsteile, insbesondere von 6 bis 12 Gewichtsteile, an lipophiler Phase eingesetzt werden.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass im ersten Schritt die Extraktion mit der lipophilen Phase bei einer Temperatur von 0°C bis 50 °C, insbesondere von 5°C bis 15°C, und während einer Zeit von 2 bis 4 Stunden erfolgt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass im zweiten Schritt der Alkohol ein Alkohol mit 1 bis 5 Kohlenstoffatomen ist, insbesondere Ethanol, und dass das Gemisch aus wenigstens einem Alkohol und Wasser aus 50 bis 90 m/m % Alkohol und 50 bis 10 m/m % Wasser, vorzugsweise aus 80 bis 90 m/m % Alkohol und 20 bis 10 m/m % Wasser, besteht, wobei Ethanol bevorzugt ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass im zweiten Schritt pro Gewichtsteil zu extrahierende Früchte von 1 bis 20 Gewichtsteile, insbesondere von 6 bis 12 Gewichtsteile, an wenigstens einem Alkohol oder einem Gemisch aus wenigstens einem Alkohol und Wasser eingesetzt werden.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass im zweiten Schritt die Extraktion mit wenigstens einem Alkohol oder mit einem Gemisch aus wenigstens einem Alkohol und Wasser bei einer Temperatur von 20°C bis 60°C und während einer Zeit von 2 bis 4 Stunden erfolgt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass man den im dritten Schritt erhaltenen Extrakt nach der Zugabe eines Hilfsstoffes, insbesondere eines Trocknungshilfsstoffes, beispielsweise Mannitol, zuerst auf eine Konzentration an Alkohol zwischen 0,1 und 10 m/m %, insbesondere 5 m/m %, zu einem Spissumextrakt konzentriert und dann trocknet, beispielsweise durch Sprühtrocknung, Bandtrocknung oder Schaufeltrocknung.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass der im dritten Schritt erhaltene Extrakt frei oder nahezu frei von #-Cubeben (#-cubebene) und #-Cubeben (#-cubebene) ist.
11. Verwendung eines Extraktes, welcher gemäss dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10 erhalten worden ist, als wirksamer Bestandteil in einem Medikament, welches zur Behandlung wenigstens einer Krankheit, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Krebserkrankungen, insbesondere Prostatakrebs, Hodenkrebs, Brustkrebs, Gebärmutterkrebs, einschliesslich deren Metastasen, und benigner Prostatahyperplasie geeignet ist.
12. Verwendung eines Extraktes, welcher gemäss dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10 erhalten worden ist, wobei dieser Extrakt die Wirkungen des Sexualhormons Dihydrotestosteron, abgekürzt mit DHT, antagonisiert, insbesondere dessen proliferationssteigernde und anti-apoptotische Wirkung auf Prostatakrebszellen, als wirksamer Bestandteil in einem Medikament, welches zur Behandlung von Prostatakrebs, einschliesslich dessen Metastasen- oder von benigner Prostatahyperplasie, geeignet ist.
13. Medikament zur Behandlung wenigstens einer Krankheit, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Krebserkrankungen, insbesondere Prostatakrebs, Hodenkrebs, Brustkrebs, Gebärmutterkrebs, einschliesslich deren Metastasen, und benigner Prostatahyperplasie, dadurch gekennzeichnet, dass es einen Extrakt oder Extraktivstoffe aus Piper cubeba L. als wirksame Bestandteile enthält, wobei dieser Extrakt oder diese Extraktivstoffe anti-androgene und/oder anti-östrogene Wirkungen aufweisen und wobei die wirksamen Bestandteile in einem Extrakt enthalten sind, welcher gemäss dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10 erhalten worden ist.
14. Verwendung eines Extraktes, welcher gemäss dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10 erhalten worden ist, wobei dieser Extrakt die Wirkungen des Sexualhormons Dihydrotestosteron, abgekürzt mit DHT, antagonisiert, insbesondere dessen proliferationssteigernde und anti-apoptotische Wirkung auf Prostatakrebszellen, zur Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung von Prostatakrebs, einschliesslich dessen Metastasen, oder von benigner Prostatahyperplasie.

CH 698 627 B1

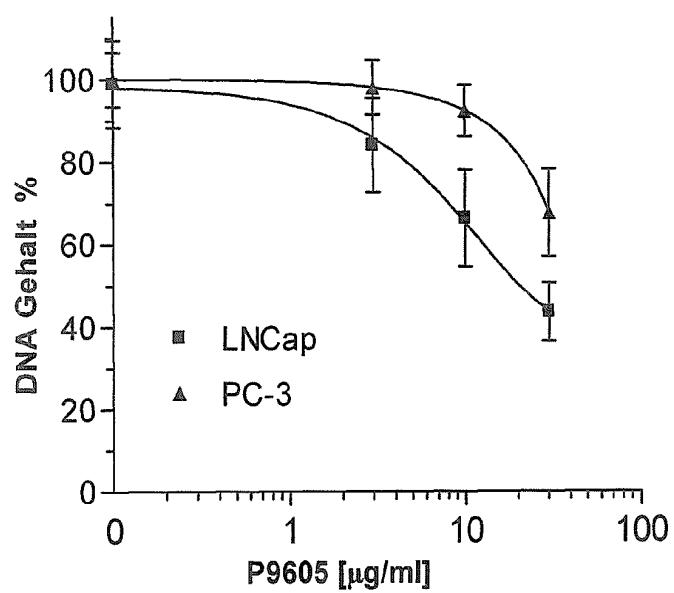


Fig. 1a

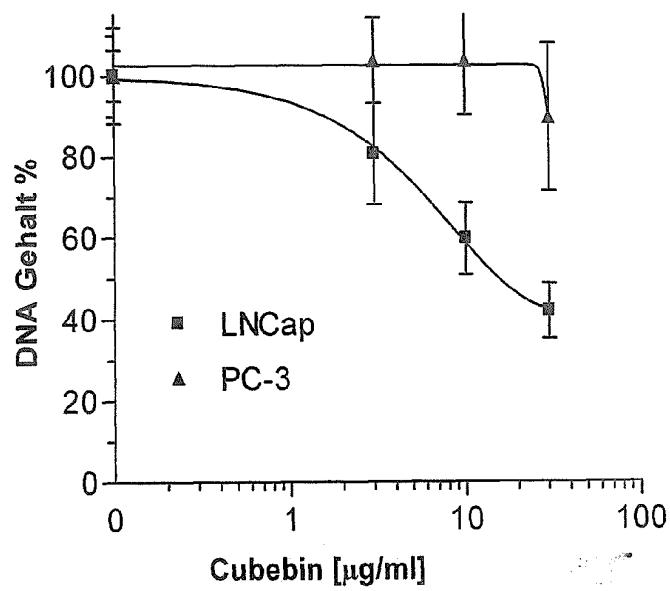


Fig. 1b

CH 698 627 B1

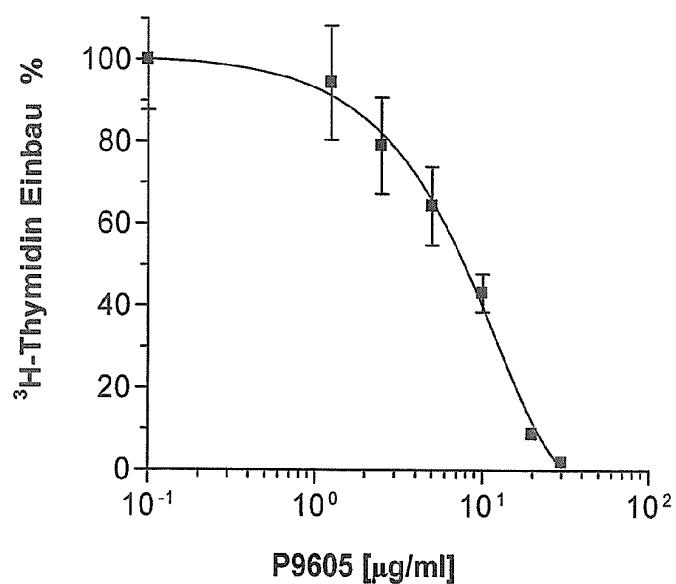


Fig. 2

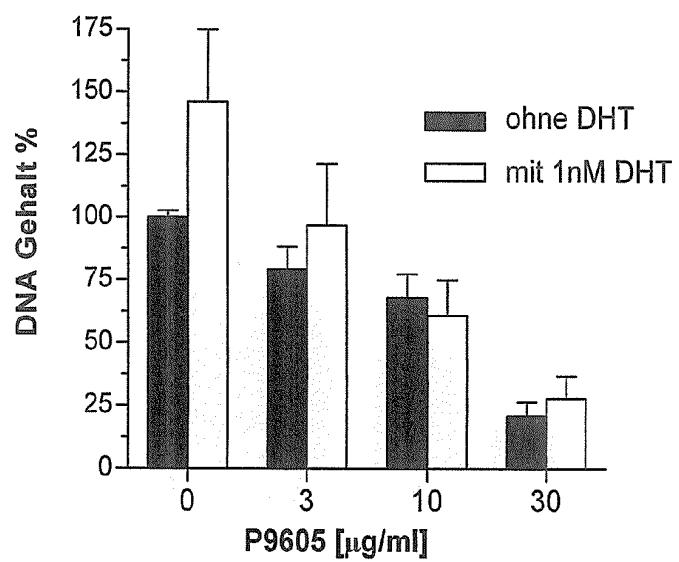


Fig. 3

CH 698 627 B1

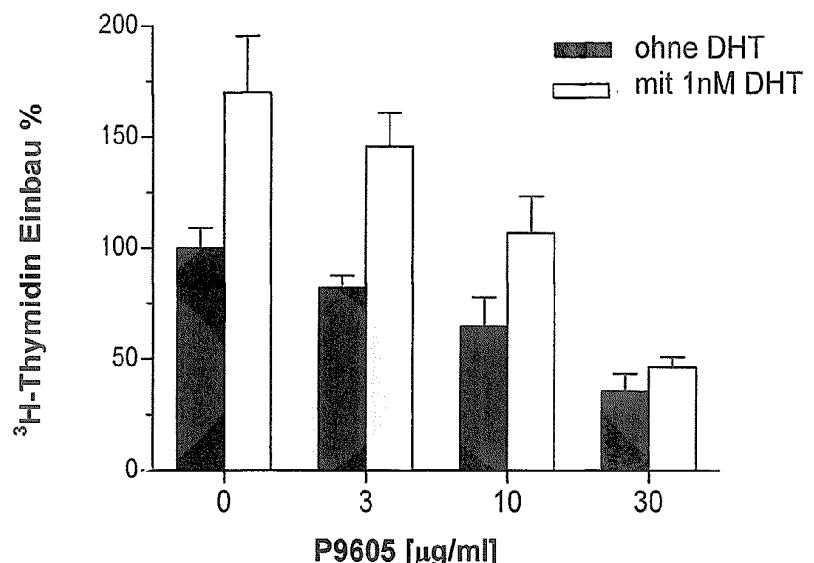


Fig. 4

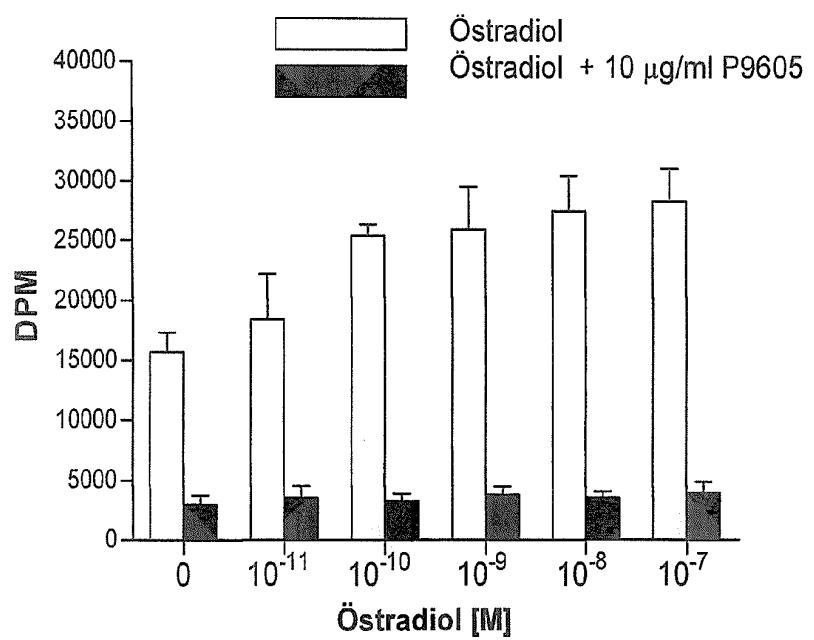


Fig. 5

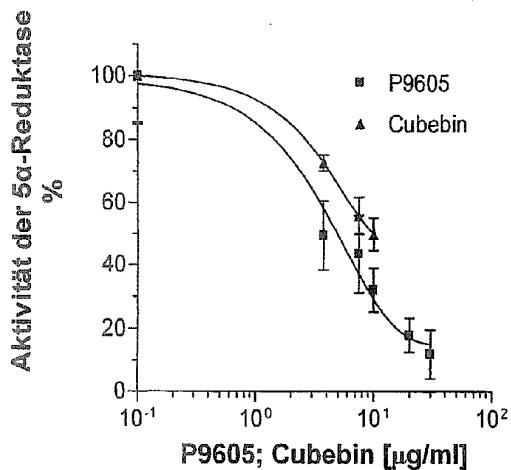


Fig. 6a

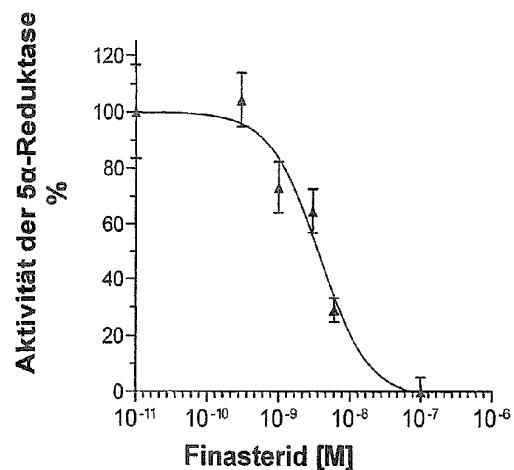


Fig. 6b

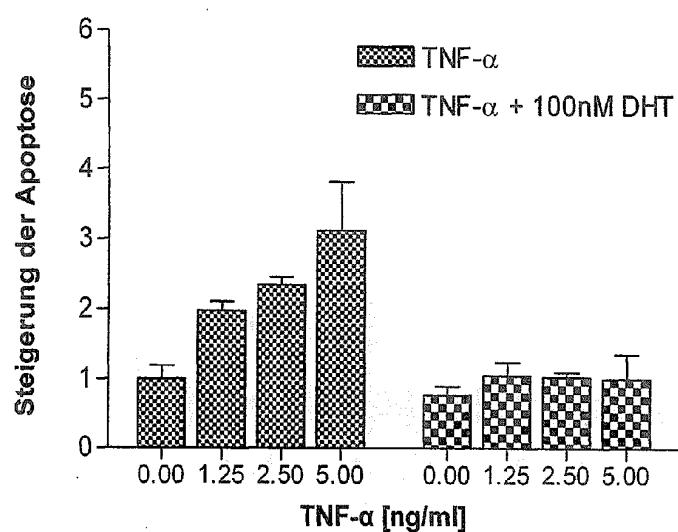


Fig. 7a

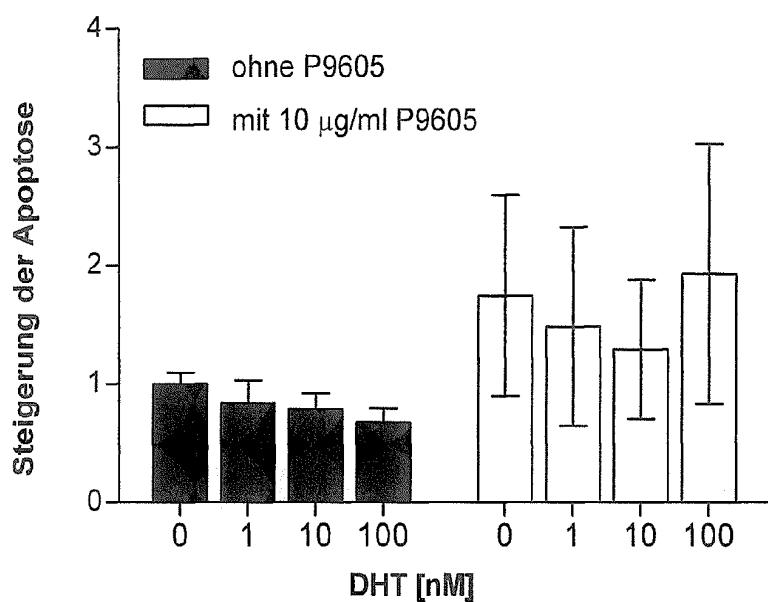


Fig. 7b

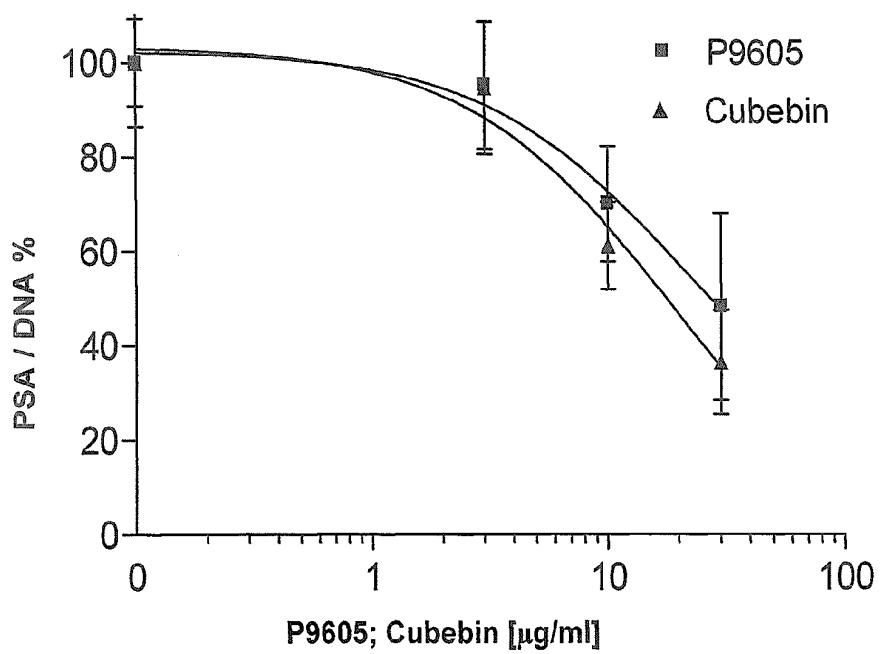


Fig. 8

CH 698 627 B1

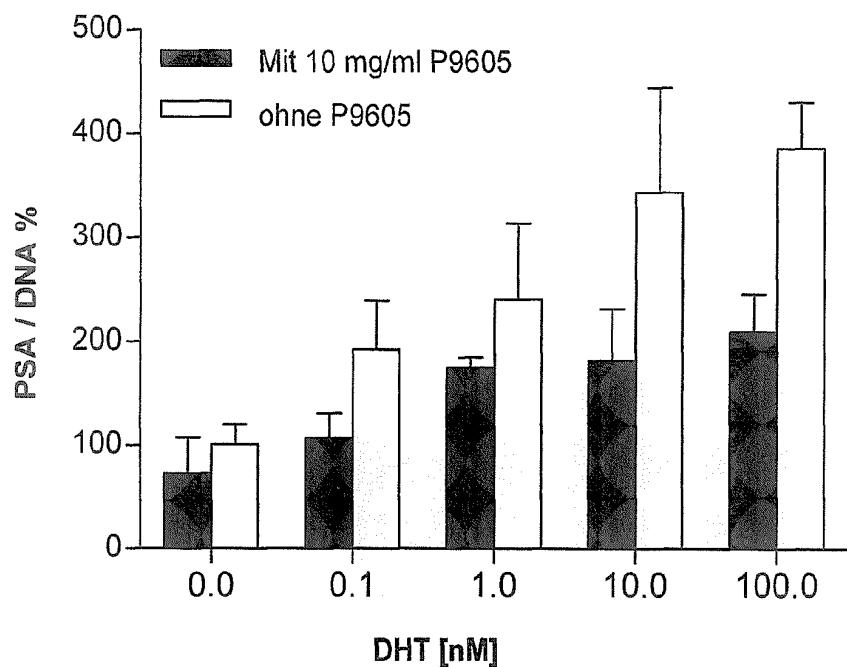


Fig. 9

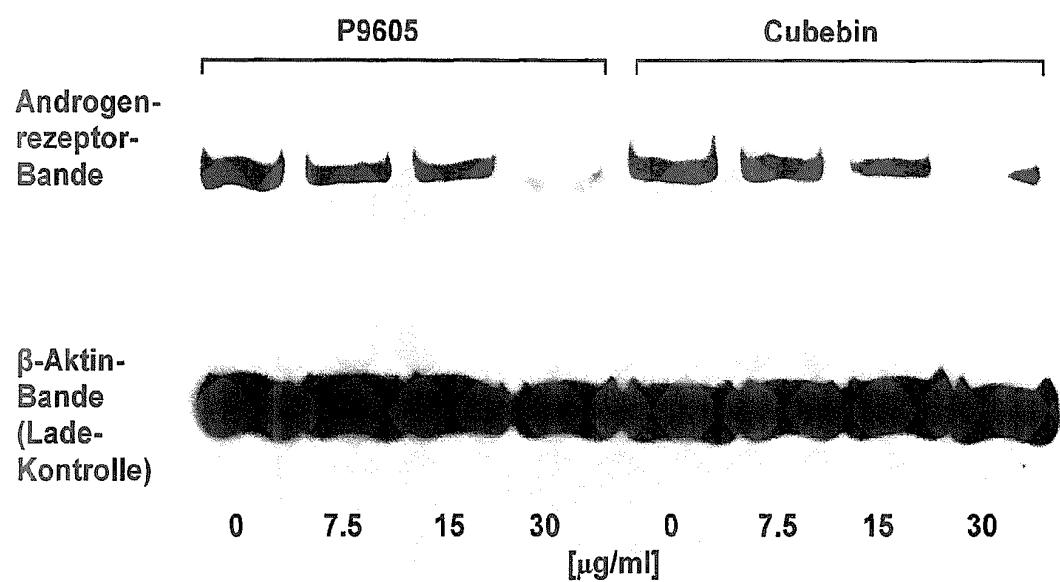


Fig. 10