



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2010109750/15**, **15.08.2008**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.08.2008

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
16.08.2007 СН 1289/07(43) Дата публикации заявки: **27.09.2011** Бюл. № 27(45) Опубликовано: **27.12.2012** Бюл. № 36(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **EP 1094813 B1**, **10.09.2003**. **US 20050154215 A1**, **14.07.2005**. **A. Chatterjee et al. Spectral properties of Cubebin // Jour. Indian Chem. Soc, Vol.45, no 8, 1968, p.423-725.**(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: **16.03.2010**(86) Заявка РСТ:
СН 2008/000350 (15.08.2008)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2009/021347 (19.02.2009)

Адрес для переписки:

**129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"**

(72) Автор(ы):

**КРОЙТЕР Маттиас Хайнрих (СН),
ЯМ Цзян Ин (СН),
БЕРГЕР-БЮТЕР Карин (СН)**

(73) Патентообладатель(и):

**ВИРИДИС ФАРМАСЬЮТИКАЛ
ЛИМИТЕД (VG)****(54) ПРИМЕНЕНИЕ ЭКСТРАКТОВ ИЛИ ЭКСТРАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ Piper cubeba L. В КАЧЕСТВЕ АКТИВНЫХ ИНГРЕДИЕНТОВ В ЛЕКАРСТВЕННОМ СРЕДСТВЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической промышленности, в частности к сухому экстракту из плодов *Piper cubeba* L. Способ получения сухого экстракта из плодов *Piper cubeba* L. в качестве активного ингредиента в лекарственном средстве для лечения раковых заболеваний, в котором на первой стадии удаляют эфирные масла плодов *Piper cubeba* L., на второй стадии обработанные плоды экстрагируют по меньшей мере один раз по

меньшей мере спиртом одного вида или смесью по меньшей мере спирта одного вида и воды и на третьей стадии проэкстрагированные части плодов удаляют, полученный экстракт после прибавления вспомогательного вещества концентрируют до получения густого экстракта с концентрацией спирта от 0,1 до 10%мас. и затем высушивают. Применение экстракта из плодов *Piper cubeba* L. в качестве активного ингредиента в лекарственном средстве для лечения раковых заболеваний

(варианты). Лекарственное средство для лечения раковых заболеваний и доброкачественной гиперплазии простаты, которое содержит экстракт из плодов *Piper cubeba* L. в качестве активного ингредиента.

Вышеописанный сухой экстракт из плодов *Piper cubeba* L. эффективен в качестве активного ингредиента в средстве для лечения раковых заболеваний. 6 н. и 10 з.п. ф-лы, 10 ил., 12 пр.

RU 2 4 7 0 6 5 7 C 2

RU 2 4 7 0 6 5 7 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 36/67 (2006.01)**B01D 11/02** (2006.01)**A61P 35/00** (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2010109750/15, 15.08.2008**(24) Effective date for property rights:
15.08.2008

Priority:

(30) Convention priority:
16.08.2007 CH 1289/07(43) Application published: **27.09.2011 Bull. 27**(45) Date of publication: **27.12.2012 Bull. 36**(85) Commencement of national phase: **16.03.2010**(86) PCT application:
CH 2008/000350 (15.08.2008)(87) PCT publication:
WO 2009/021347 (19.02.2009)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**KROJTER Mattias Khajnrigh (CH),
JaM Tszjan In (CH),
BERGER-BJuTER Karin (CH)**

(73) Proprietor(s):

VIRIDIS FARMAS'JuTIKAL LIMITED (VG)**(54) USE OF EXTRACTS OR EXTRACTIVE SUBSTANCES OF *Piper cubeba* L. AS ACTIVE INGREDIENTS IN DRUG FOR TREATING CANCEROUS DISEASES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention refers to pharmaceutical industry, particularly a dry extract of *Piper cubeba* L. fruit. A method for preparing a dry extract of *Piper cubeba* L. fruit as an active ingredient of the drug for treating cancerous diseases wherein the first stage involves the removal of *Piper cubeba* L. essences; at the second stage, the processed fruit are extracted at least once in at least an alcohol of one type and water; at the third stage, the extracted portions of the fruit are removed; the prepared

extract with an excipient added is concentrated to produce a solid extract of the alcohol concentration of 0.1 to 10 wt %, and then dried. The use of the extract of *Piper cubeba* L. as an active ingredient of the drug for treating cancerous diseases (versions). The drug for treating cancerous diseases and benign prostate hyperplasia which contains the extract of *Piper cubeba* L. as an active ingredient.

EFFECT: dry extract of *Piper cubeba* L. is effective as an active ingredient of the drug for treating cancerous diseases.

16 cl, 10 dwg, 12 ex

Описание

Данное изобретение относится к применению экстрактов или экстрактивных веществ из *Piper cubeba* L. в качестве активных ингредиентов в лекарственном средстве для лечения раковых заболеваний.

5 Применение композиций *Piper cubeba* L. описано, например, в Hunnius, Pharmazeutisches Wörterbuch, 8. Auflage, 1998, 1084-1085.

В данном документе описаны широко распространенные варианты применения, например, при лечении головных болей, а также применение в качестве диуретика, дезинфектанта мочи и средства, улучшающего пищеварение.

В качестве лекарственного сырья используют незрелый плод, из которого отгонкой с водяным паром получают также масло кубебы и эфирное масло кубебы.

Масло *Oleum Cubebae* применяют при похожих показаниях, как и в случае плодов.

15 Согласно информации J. Seidemann в "World Spice Plants", Springer-Verlag, 2005, 291, *Piper cubeba* L. применяют для ароматизации ликеров, имбирных и медовых пряников. В качестве исходного продукта используют эфирное масло, получаемое из незрелых плодов.

В JP 2000-095649 A описаны экстракты, в частности, также из плодов кубебы, получаемые посредством гидрофильного растворителя, например ацетона, метанола и этанола или их смесей с водой. Такие экстракты содержат, таким образом, как эфирное масло, так и гидрофильные вещества.

Такие экстракты должны действовать как ингибитор тестостерон-5 α -редуктазы. Вследствие этого такие экстракты должны положительно влиять на рост волос.

25 Такие экстракты должны также оказывать действие при лечении доброкачественной гиперплазии простаты.

В таблице 1 данного документа приведены значения IC₅₀ в отношении ингибирования тестостерон-5 α -редуктазы.

30 Согласно данной таблице экстракт из кубебы ингибирует фермент на 50% при концентрации 0,79 мг/мл.

A. Chatterjee et al., Jour. Indian Chem. Soc., Vol.45, No.8, 1968, 723-725, описаны спектральные свойства чистого кубебина. Данное химическое соединение было выделено из спиртового экстракта обезжиренных плодов *Piper cubeba* L.

35 A. Dasgupta et al., Quart. J. Crude Drug Res., 18, (1980), No.1, 17-25, описано применение эфирного масла *Piper cubeba* L. для лечения, например, цистита и гонореи.

Eun-Mi Choi et al., Journal of Ethnopharmacology, Elsevier Scientific Publishers Ltd., 89, 2003, 171-175, описаны противовоспалительные свойства полученного с 80%-ным метанолом экстракта из высушенных плодов *Piper cubeba* L.

40 В рамках скринингового исследования был проанализирован ряд тропических лекарственных растений в отношении их действия *in vitro* на опухолевые клетки.

Совершенно неожиданно было найдено, что этанольный экстракт из незрелых плодов кубебы вызывал гибель всех испытуемых опухолевых клеток.

45 Так как в первую очередь с медицинской целью применяют эфирное масло плодов кубебы, то напрашивалось осуществление экстракции плодов приемлемым экстрагентом для получения эфирного масла.

Масло было получено исчерпывающей экстракцией гексаном.

50 Плоды, освобожденные таким образом от эфирного масла, для полноты экстрагировали дополнительно 90%-ным водным этанолом для получения экстрактивных веществ средней полярности.

Полученное эфирное масло, а также этанольный вторичный экстракт были

проверены затем на активность в отношении опухолевых клеток.

Как и следовало ожидать, было установлено, что полученное эфирное масло вызывало гибель всех испытуемых опухолевых клеток. Это указывает на то, что наблюдаемое цитотоксическое действие имеет неспецифическую природу и тем самым не означает проявление противоопухолевого эффекта.

Однако совершенно неожиданно было найдено, что хотя этанольный вторичный экстракт не вызывал непосредственно гибель испытуемых опухолевых клеток, но в случае некоторых опухолевых клеток изменял характер их пролиферации.

Таковыми опухолевыми клетками, особенно чувствительными к этанольному вторичному экстракту, оказались клетки, которые для своего роста нуждаются в половых гормонах в качестве факторов роста. В качестве примеров следует упомянуть линию клеток рака молочной железы MCF 7 и линию клеток рака простаты LnCAP. Данное наблюдение позволяет сделать вывод, что действие, тормозящее пролиферацию, может не основываться в первую очередь на ингибировании тестостерон-5 α -редуктазы, так как она не является существенной для роста раковых клеток молочной железы линии MCF 7.

Целью данного изобретения является разработка способа получения экстракта из плодов *Piper cubeba* L.

Данный экстракт должен быть свободен или почти свободен от цитотоксичных эфирных масел.

Данный экстракт должен, в частности, тормозить рост опухолевых клеток, которые для своего роста нуждаются в половых гормонах в качестве факторов роста.

Данный экстракт должен обладать антиандрогенным и/или антиэстрогенным действием.

Данный экстракт должен препятствовать действию полового гормона дигидротестостерона, сокращенно ДНТ, в частности его увеличивающему пролиферацию и антиапоптотическому действию на клетки рака простаты.

Данные цели достигаются настоящим изобретением.

Изобретение характеризуется отличительными признаками в независимых пунктах формулы изобретения.

Предпочтительные варианты осуществления определены в зависимых пунктах формулы изобретения.

В последующей части описаны возможные примеры осуществления данного изобретения.

При этом в примерах имеются ссылки на фигуры.

На фиг.1a показано антипролиферативное действие экстракта, полученного по примеру 1, на клетки LNCap и PC-3.

На фиг.1b показано антипролиферативное действие чистого кубебина на клетки LNCap и PC-3.

На фиг.2 показано ингибирование синтеза ДНК в клетках LNCap экстрактом, полученным по примеру 1.

На фиг.3 показано антиандрогенное действие экстракта, полученного по примеру 1, на андрогенозависимую пролиферацию клеток в отношении клеток LNCap.

На фиг.4 показано антиандрогенное действие экстракта, полученного по примеру 1, на синтез ДНК в клетках LNCap.

На фиг.5 показано антиэстрогенное действие экстракта, полученного по примеру 1, на синтез ДНК в клетках MCF-7.

На фиг.6a показано ингибирующее действие экстракта, полученного по примеру 1,

и чистого кубебина на активность 5 α -редуктазы типа II.

На фиг.6b показано ингибирующее действие известного ингибитора 5 α -редуктазы "финастерид" на активность 5 α -редуктазы типа II.

5 На фиг.7a показаны индуцирование апоптоза опухолевых клеток посредством TNF- α в зависимости от дозы и полное подавление данного действия посредством DHT в случае опухолевых клеток.

На фиг.7b показано подавление антиапоптотического действия DHT экстрактом, полученным по примеру 1.

10 На фиг.8 показано ингибирование секреции простатаспецифического антигена (PSA) как экстрактом, полученным по примеру 1, так и чистым кубебином в зависимости от соответствующей дозы.

15 На фиг.9 показано значительное ингибирование экстрактом, полученным по примеру 1, секреции простатаспецифического антигена (PSA), индуцированной посредством DHT.

На фиг.10 показано прогрессирующее в зависимости от дозы уменьшение плотности рецепторов андрогенов в клетках LNCap как при обработке экстрактом, полученным по примеру 1, так и при обработке чистым кубебином.

20 Данное изобретение поясняется следующими далее примерами.

Пример 1 (получение жидкого экстракта)

110 г незрелых высушенных плодов *Piper cubeba* L., измельченных до крупности в интервале от 0,1 до 0,9 мм, при перемешивании экстрагировали при температуре в интервале от 10 до 20°C в течение 8 часов посредством 0,5 л гексана. Затем отделяли 25 гексановый слой, содержащий эфирные масла и сильнолипофильные вещества. Данный процесс повторяли, причем продолжительность экстракции ограничивали 2 часами.

30 Затем обезжиренные таким образом плоды сушили в вакуумируемом шкафу при температуре 40°C до постоянства массы. Было получено 92 г обезжиренного лекарственного сырья.

Затем обработанные таким образом плоды при перемешивании экстрагировали при температуре в интервале от 20 до 30°C в течение 2 часов смесью из 90 массовых долей этанола и 10 массовых долей воды.

35 Массовое соотношение лекарственного сырья и смеси экстрагентов составляло 1:5.

40 Экстрагированное таким образом лекарственное сырье отделяли фильтрованием через слоевой фильтр. Было получено 380 г жидкого экстракта темно-коричневого цвета с содержанием сухого вещества 1,92% мас., что соответствует абсолютному выходу 7,3 г экстрактивных веществ из 92 г обезжиренных плодов.

Данный экстракт в последующей части описания обозначен как P9605.

Данный экстракт содержит 20% мас. кубебина в пересчете на содержание сухого вещества.

Пример 2 (получение сухого экстракта)

45 Жидкий экстракт, полученный по примеру 1, подавали в испаритель при температуре 40°C и упаривали в вакууме (от 300 до 20 мбар) и при повышенной температуре (от 40 до 55°C).

50 Во время отгонки оставшуюся часть жидкого экстракта непрерывно подавали в испаритель до исчерпания всего количества жидкого экстракта и до достижения в получаемом густом экстракте содержания сухого вещества в интервале от 30 до 40% мас.

Было получено 20,0 г подвижного густого экстракта темно-коричневого цвета и

гомогенной консистенции. Содержание сухого вещества в густом экстракте составило 36,5% мас., что соответствует содержанию экстрактивных веществ 7,3 г.

Данный концентрированный густой экстракт смешивали с 7,8 г водного раствора гуммиарабика с концентрацией 40% мас. до гомогенности и затем сушили в устройстве для сушки в вакууме при давлении от 150 до 10 мбар и температуре от 40 до 55°C.

Было получено 10,4 г сухого экстракта охряно-коричневого цвета с содержанием 30% мас. гуммиарабика в качестве вспомогательного вещества.

Пример 3 (получение масляной суспензии сухого экстракта)

Жидкий экстракт, полученный по примеру 1, подавали в испаритель при температуре 40°C и упаривали в вакууме (от 300 до 20 мбар) и при повышенной температуре (от 40 до 55°C).

Во время отгонки оставшуюся часть жидкого экстракта непрерывно подавали в испаритель до исчерпания всего количества жидкого экстракта и до достижения в получаемом густом экстракте содержания сухого вещества в интервале от 10 до 20% мас.

Было получено 54,0 г подвижного густого экстракта темно-коричневого цвета и гомогенной консистенции. Содержание сухого вещества в густом экстракте составило 15,7% мас., что соответствует содержанию экстрактивных веществ 7,3 г.

Данный маловязкий густой экстракт смешивали с 6,8 г триглицеридов с цепями средней длины (Ph. Eur.) и 0,5 г соевого лецитина (ÖAB 90) и подавали в испаритель при температуре 40°C. Упаривание данной смеси осуществляли в вакууме (от 300 до 40 мбар) и при повышенной температуре (от 40 до 50°C) до достижения в получаемом густом экстракте содержания сухого вещества от 70 до 80% мас.

Был получен вязкотекучий густой экстракт, который затем сушили в устройстве для сушки в вакууме при давлении от 150 до 10 мбар и температуре от 40 до 55°C до достижения содержания сухого вещества 99,5% мас.

Было получено 14,9 г темно-коричневой масляной суспензии сухого экстракта с содержанием 49% мас. триглицеридов с цепями средней длины и 3,36% ма. соевого лецитина в качестве вспомогательных веществ.

Пример 4 (ингибирование пролиферации клеток)

С жидким экстрактом P9605, полученным по примеру 1, осуществляли испытание на пролиферацию клеток. В качестве контроля использовали лигнан кубебина, являющийся типичным ингредиентом плодов кубебы.

Для определения ингибирования пролиферации клеток данный экстракт прибавляли к клеткам LNCap и PC-3. Обработанные таким образом клетки культивировали в течение 4 дней в 10%-ной питательной среде FBS.

Для сравнения чистый лигнан кубебина, содержащийся в экстракте, полученном по примеру 1 настоящего изобретения, в количестве до 20% мас. от сухого остатка, прибавляли к клеткам LNCap и PC-3. Обработанные таким образом клетки культивировали в течение 4 дней в 10%-ной питательной среде FBS.

При этом процедуры осуществляли согласно T. Lindl, Zell- und Gewebekultur, 4. überarbeitete Auflage, 2000, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Все полученные данные указаны в процентах по отношению к контрольному растворителю (испытание без обработки экстрактом и кубебином); приведены средние значения со стандартным отклонением из 4 экспериментов с 3-кратным повторением.

Из показанных на фиг. 1a и 1b данных следует, что как экстракт, полученный по настоящему изобретению, так и чистый кубебин оказывает антипролиферативное действие как на клетки LNCap, так и на клетки PC-3 в зависимости от

соответствующей дозы.

Ингибирование в случае клеток LNCap выражено более сильно, чем в случае клеток PC-3.

Как следует из фиг. 1a и 1b, ингибирующее действие экстракта P9605, полученного по примеру 1, в несколько раз сильнее действия, которое можно было бы объяснить содержанием в нем кубебина. Экстракт содержит только 20% мас. кубебина, но оказывает равносильное (в случае клеток LNCap) или более сильное ингибирующее действие (в случае клеток PC-3).

Пример 5 (ингибирование синтеза ДНК)

С жидким экстрактом P9605, полученным по примеру 1, осуществляли испытание в отношении синтеза ДНК.

Для определения ингибирования синтеза ДНК экстракт, полученный по настоящему изобретению, прибавляли к клеткам LNCap. Обработанные таким образом клетки культивировали в течение 4 дней в 10%-ной питательной среде FBS.

Затем измеряли количество внедренного ^3H -тимидина.

При этом процедуры осуществляли согласно T. Lindl, Zell- und Gewebekultur, 4. überarbeitete Auflage, 2000, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Все полученные данные указаны в процентах по отношению к контрольному растворителю (испытание без обработки экстрактом); приведены средние значения со стандартным отклонением из 4 экспериментов с 3-кратным повторением.

Из показанных на фиг. 2 данных следует, что экстракт, полученный по настоящему изобретению, тормозит синтез ДНК в зависимости от соответствующей дозы.

Пример 6 (антиандрогенное действие на пролиферацию клеток)

Было определено антиандрогенное действие жидкого экстракта P9605, полученного по примеру 1, на андрогенозависимую пролиферацию клеток.

При этом экстракт, полученный по настоящему изобретению, прибавляли к клеткам LNCap. Обработанные таким образом клетки культивировали в течение 6 дней в 10%-й питательной среде CSS.

Такое культивирование осуществляли в одном опыте без добавления дигидротестостерона, сокращенно DHT, и в одном опыте с добавлением 1 нМ DHT.

Затем по содержанию ДНК определяли влияние экстракта, полученного по настоящему изобретению, на пролиферацию опухолевых клеток.

Все полученные данные указаны в процентах по отношению к контрольному растворителю (испытание без обработки экстрактом); приведены средние значения со стандартным отклонением из 4 экспериментов с 3-кратным повторением.

Из показанных на фиг. 3 данных следует, что экстракт, полученный по настоящему изобретению, подавляет стимулирующее действие DHT на пролиферацию опухолевых клеток в зависимости от дозы и при этом уменьшает базальную пролиферацию клеток.

Известно, что DHT увеличивает пролиферацию клеток; см. контрольное значение при отсутствии добавки.

Пример 7 (антиандрогенное действие на синтез ДНК)

Было определено антиандрогенное действие жидкого экстракта P9605, полученного по примеру 1, на синтез ДНК.

При этом экстракт, полученный по настоящему изобретению, прибавляли к клеткам LNCap. Обработанные таким образом клетки культивировали в течение 6 дней в 10%-ной питательной среде CSS.

Такое культивирование осуществляли в одном опыте без добавления дигидротестостерона, сокращенно DHT, и в одном опыте с добавлением 1 нМ DHT.

Затем измеряли количество внедренного ^3H -тимидина.

При этом процедуры осуществляли согласно T. Lindl, Zell- und Gewebekultur, 4. überarbeitete Auflage, 2000, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Все полученные данные указаны в процентах по отношению к контрольному растворителю (испытание без обработки экстрактом); приведены средние значения со стандартным отклонением из 4 экспериментов с 3-кратным повторением.

Из показанных на фиг.4 данных следует, что экстракт, полученный по настоящему изобретению, подавляет стимулирующее действие DHT на синтез ДНК в опухолевых клетках в зависимости от дозы и при этом уменьшает базальный синтез ДНК в клетках.

Известно, что DHT увеличивает синтез ДНК; см. контрольное значение при отсутствии добавки.

Пример 8 (антиэстрогенное действие на синтез ДНК в раковых клетках молочной железы)

Было определено антиэстрогенное действие жидкого экстракта P9605, полученного по примеру 1, на синтез ДНК в раковых клетках молочной железы.

При этом клетки MCF-7 культивировали в течение 3 дней в 10%-ной питательной среде CSS, к которой прибавляли эстрадиол в различных концентрациях.

Такое культивирование осуществляли в одном опыте без добавления экстракта, полученного по настоящему изобретению, и в одном опыте с добавлением 10 мкг/мл экстракта.

Затем измеряли количество внедренного ^3H -тимидина.

При этом процедуры осуществляли согласно T. Lindl, Zell- und Gewebekultur, 4. überarbeitete Auflage, 2000, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Все полученные данные указаны в DPM (в актах радиоактивного распада в минуту; degradation per minute); приведены средние значения со стандартным отклонением из 4 экспериментов с 3-кратным повторением.

Из показанных на фиг.5 данных следует, что экстракт, полученный по настоящему изобретению, полностью или почти полностью подавляет стимуляцию эстрадиолом синтеза ДНК в раковых клетках молочной железы.

Известно, что эстрадиол увеличивает синтез ДНК в раковых клетках молочной железы; см. контрольное значение при отсутствии добавки.

Пример 9 (ингибирование активности 5α -редуктазы типа II)

Было определено ингибирование активности 5α -редуктазы типа II посредством жидкого экстракта P9605, полученного по примеру 1.

Испытание осуществляли с гомогенатом клеток HEK293, которые сверхэкспрессируют 5α -редуктазу типа II (Reichert W., Hartmann R.W. und Jose J.; 2001, Journal Enzyme Inhibition, Vol.16, 47-53).

Было определено влияние экстракта, полученного по настоящему изобретению, и чистого кубебина на активность 5α -редуктазы типа II посредством определения степени превращения ^3H -тестостерона в ^3H -DHT.

В качестве контрольного вещества был использован известный ингибитор 5α -редуктазы "финастерид".

Все полученные данные указаны в процентах по отношению к контрольному растворителю (испытание без обработки экстрактом); приведены средние значения со стандартным отклонением из 4 экспериментов с 3-кратным повторением.

Из показанных на фиг.6а данных следует, что как экстракт, полученный по настоящему изобретению, так и чистый кубебин оказывают ингибирующее действие

на активность 5 α -редуктазы типа II.

Ингибирование в случае экстракта является более сильным, чем в случае чистого кубебина.

Экстракт ингибирует со значением IC₅₀, равным 3,6 мкг/мл, в то время как чистый кубебин ингибирует со значением IC₅₀, равным 9,9 мкг/мл.

Характер кривой "доза-действие" для экстракта и чистого кубебина являются аналогичными характеру кривой "доза-действие" для известного ингибитора 5 α -редуктазы "финастерид" (фиг.6b).

Пример 10 (повышение апоптоза)

Было определено индуцирование апоптоза посредством жидкого экстракта P9605, полученного по примеру 1.

В качестве предварительного опыта для определения индуцирования апоптоза к клеткам LNCар прибавляли фактор TNF- α некроза опухоли как отдельно, так и в комбинации с 100 нМ дигидротестостерона, сокращенно DHT. Обработанные таким образом клетки культивировали в течение 2 дней в 10%-ной питательной среде FBS.

Определение апоптоза клеток осуществляли с использованием коммерческого набора для иммунологического определения апоптоза, посредством которого специфически детектируют фрагменты ДНК и гистонов, существующие в виде моно- и олигонуклеосом.

Из показанных на фиг.7а данных следует, что TNF- α индуцирует апоптоз опухолевых клеток в зависимости от дозы.

Данное действие полностью или почти полностью подавляется посредством DHT в случае опухолевых клеток.

Аналогичные испытания были осуществлены с DHT как отдельно, так и в комбинации с 10 мкг/мл экстракта, полученного по настоящему изобретению.

Из показанных на фиг.7b данных следует, что антиапоптотическое действие DHT подавляется экстрактом, полученным по настоящему изобретению.

Пример 11 (ингибирование секреции простатаспецифического антигена)

Было определено ингибирование секреции простатаспецифического антигена (PSA) посредством жидкого экстракта P9605, полученного по примеру 1.

При этом в первой серии опытов клетки LNCар культивировали в течение 2 дней в 10%-ной питательной среде CSS, к которой прибавляли в различных концентрациях экстракт, полученный по настоящему изобретению, или чистый кубебин.

Затем количество PSA, секретированного в жидкой фракции клеток, определяли в иммунологическом испытании. Дополнительно определяли количество ДНК.

На фиг.8 показано процентное отношение количества PSA к количеству ДНК.

Показаны средние значения со стандартным отклонением из 4 экспериментов с 3-кратным повторением.

Из показанных на фиг.8 данных следует, что как экстракт, так и чистый кубебин тормозят секрецию простатаспецифического антигена (PSA) в зависимости от соответствующей дозы.

Во второй серии опытов клетки LNCар культивировали в течение 2 дней в 10%-ной питательной среде CSS, к которой прибавляли в различных концентрациях дигидротестостерон, сокращенно DHT.

Такое культивирование осуществляли в одном опыте без добавления экстракта, полученного по настоящему изобретению, и в одном опыте с добавлением 10 мкг/мл экстракта.

Затем количество PSA, секретированного в жидкой фракции клеток, определяли в

иммунологическом испытании. Дополнительно определяли количество ДНК.

На фиг.9 показано процентное отношение количества PSA к количеству ДНК.

Показаны средние значения со стандартным отклонением из 4 экспериментов с 3-кратным повторением.

Из показанных на фиг.9 данных следует, что секреция простатаспецифического антигена (PSA), индуцированная посредством ДНТ, сильно тормозится экстрактом, полученным по настоящему изобретению.

Пример 12 (образование рецепторов андрогенов)

Было определено влияние жидкого экстракта Р9605, полученного по примеру 1, на образование рецепторов андрогенов.

При этом в первой серии опытов клетки LNCap культивировали в течение 2 дней в 10%-ной питательной среде FBS, к которой прибавляли в различных концентрациях экстракт, полученный по настоящему изобретению, или чистый кубебин.

Затем определяли изменение количества рецепторов андрогенов посредством анализа методом вестерн-блоттинга.

На фиг.10 показаны полосы рецептора андрогенов.

Плотность рецепторов андрогенов в клетках LNCap уменьшается прогрессирующим образом в зависимости от дозы как при обработке экстрактом, полученным по настоящему изобретению, так и при обработке чистым кубебином.

Выводы

В примерах с 1 по 3 показаны комбинации технологических стадий, позволяющие получать экстракты из плодов кубебы, которые не содержат или почти не содержат эфирное масло, обладают новыми свойствами и обеспечивают достижение целей данного изобретения.

В примерах с 4 по 12 продемонстрирована противоопухолевая активность экстрактов, полученных по настоящему изобретению, и пояснены механизмы действия, лежащие в основе активности в отношении гормонозависимых опухолевых клеток. Данные примеры показывают высокий терапевтический потенциал экстрактов, полученных по настоящему изобретению, в частности, для лечения злокачественных заболеваний, на прогрессирование которых влияют женские или мужские половые гормоны.

Если рассматривать силу действия ($IC_{50}=3,6$ мкг/мл) экстрактов, полученных по настоящему изобретению, в отношении 5α -редуктазы человека по сравнению с активностью, приведенной в JP 2000-095649 A ($IC_{50}=790$ мкг/мл), то оказывается, что экстракты, полученные по настоящему изобретению, имеют активность приблизительно в 200 раз выше и, таким образом, открывают совершенно новые возможности также для лечения гиперплазии простаты.

Формула изобретения

1. Способ получения сухого экстракта из плодов *Piper cubeba* L. в качестве активного ингредиента в лекарственном средстве для лечения раковых заболеваний, отличающийся тем, что:

- на первой стадии для удаления эфирных масел плоды *Piper cubeba* L.:
- подвергают отгонке с водяным паром и дистилят удаляют или
- по меньшей мере один раз подвергают экстракции липофильной фазой и один или несколько таких липофильных экстрактов удаляют,
- на второй стадии обработанные таким образом плоды экстрагируют по меньшей мере один раз по меньшей мере спиртом одного вида или смесью по меньшей мере

спирта одного вида и воды, и

- на третьей стадии проэкстрагированные части плодов удаляют, полученный таким образом экстракт после прибавления вспомогательного вещества сначала концентрируют до получения густого экстракта с концентрацией спирта от 0,1 до 10 мас.% и затем высушивают.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что используют незрелые плоды *Piper cubeba* L., которые измельчают непосредственно перед экстракцией и экстрагируют в измельченной форме, в частности, при измельчении до крупности в интервале от 0,1 мм до 0,9 мм.

3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что на первой стадии в качестве липофильной фазы применяют надкритический CO₂ или линейный или разветвленный углеводород, содержащий от 4 до 9 атомов углерода, в частности гексан или изопентан.

4. Способ по любому из пп.1 или 2, отличающийся тем, что на первой стадии используют липофильную фазу в массовой доле по отношению к подлежащим экстрагированию плодам в интервале от 1 до 20 мас. долей, в частности от 6 до 12 мас. долей.

5. Способ по любому из пп.1 или 2, отличающийся тем, что на первой стадии осуществляют экстракцию липофильной фазой при температуре в интервале от 0 до 50°C, в частности в интервале от 5 до 15°C, и в течение от 2 до 4 ч.

6. Способ по любому из пп.1 или 2, отличающийся тем, что на второй стадии спирт представляет собой спирт, содержащий от 1 до 5 атомов углерода, в частности этанол, а смесь состоит по меньшей мере из спирта одного вида и воды и содержит от 50 до 90 мас.% спирта и от 50 до 10 мас.% воды, предпочтительно от 80 до 90 мас.% спирта и от 20 до 10 мас.% воды, причем этанол является предпочтительным.

7. Способ по любому из пп.1 или 2, отличающийся тем, что на второй стадии применяют по меньшей мере спирт одного вида или смесь по меньшей мере спирта одного вида и воды в мас. доле по отношению к подлежащим экстрагированию плодам в интервале от 1 до 20 мас. долей, в частности в интервале от 6 до 12 мас. долей.

8. Способ по любому из пп.1 или 2, отличающийся тем, что на второй стадии осуществляют экстракцию по меньшей мере спиртом одного вида или смесью по меньшей мере спирта одного вида и воды при температуре в интервале от 20 до 60°C и в течение от 2 до 4 ч.

9. Способ по любому из пп.1 или 2, отличающийся тем, что применяемое на третьей стадии вспомогательное вещество представляет собой вспомогательное вещество, способствующее сушке, например маннит, концентрирование осуществляют до концентрации спирта, равной 5 мас.%, и сушку осуществляют посредством распылительной, ленточной или гребковой сушилки.

10. Способ по любому из пп.1 или 2, отличающийся тем, что полученный на третьей стадии экстракт не содержит или почти не содержит α-кубебена (α-кубебенов) и β-кубебена (β-кубебенов).

11. Применение экстракта из *Piper cubeba* L., получаемого с помощью способа по любому из пп.1-10, причем такой экстракт обладает антиандрогенным и/или антиэстрогенным действием, в качестве активного ингредиента в лекарственном средстве для лечения по меньшей мере одного заболевания, выбранного из группы, в которую входят раковые заболевания, в частности рак простаты, рак яичка, рак молочной железы, рак матки, включая их метастазы.

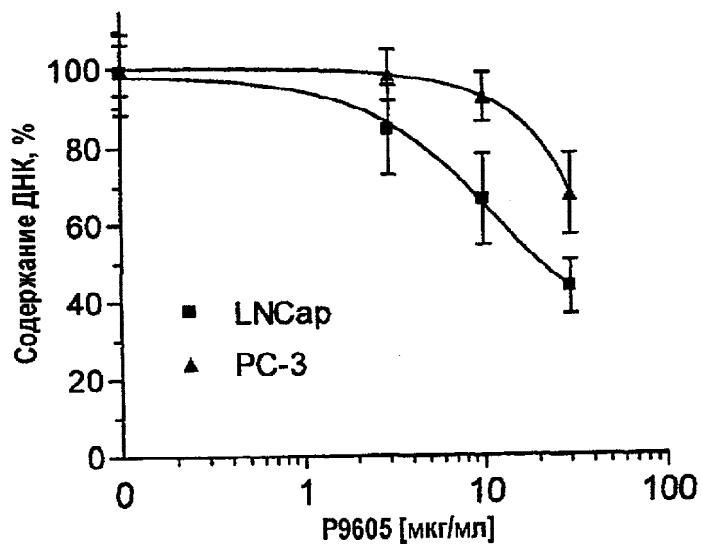
12. Применение экстракта, полученного способом по любому из пп.1-10, в качестве активного ингредиента в лекарственном средстве для лечения по меньшей мере одного заболевания, выбранного из группы, состоящей из раковых заболеваний, в частности рака простаты, рака яичка, рака молочной железы, рака матки, включая их метастазы, и доброкачественной гиперплазии простаты.

13. Применение экстракта, полученного способом по любому из пп.1-10, причем данный экстракт препятствует действию полового гормона дигидротестостерона, сокращенно ДНТ, в частности его увеличивающему пролиферацию и антиапоптическому действию на клетки рака простаты, в качестве активного ингредиента в лекарственном средстве для лечения рака простаты, включая его метастазы, или доброкачественной гиперплазии простаты.

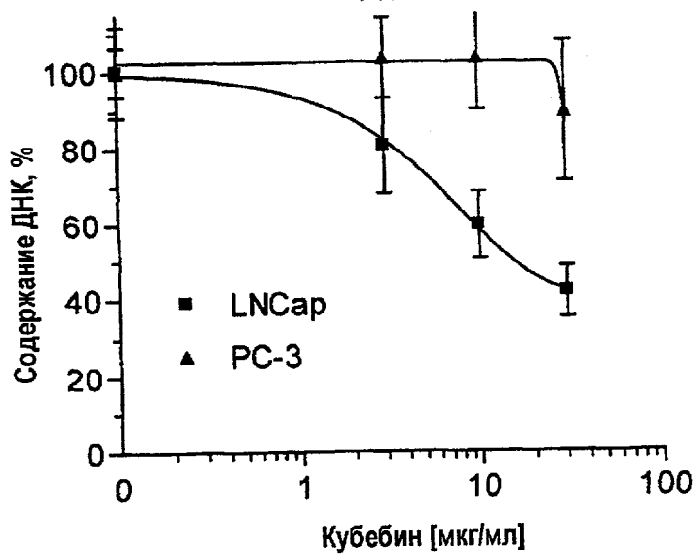
14. Лекарственное средство для лечения по меньшей мере одного заболевания, выбранного из группы, состоящей из раковых заболеваний, в частности рака простаты, рака яичка, рака молочной железы, рака матки, включая их метастазы, и доброкачественная гиперплазия простаты, отличающееся тем, что оно содержит экстракт из *Piper cubeba* L. в качестве активного ингредиента, причем такой экстракт обладает антиандрогенным и/или антиэстрогенным действием, и где этот экстракт получают с помощью способа по любому из пп.1-10.

15. Лекарственное средство по п.14, отличающееся тем, что активные ингредиенты содержатся в экстракте, полученном способом по любому из пп.1-10.

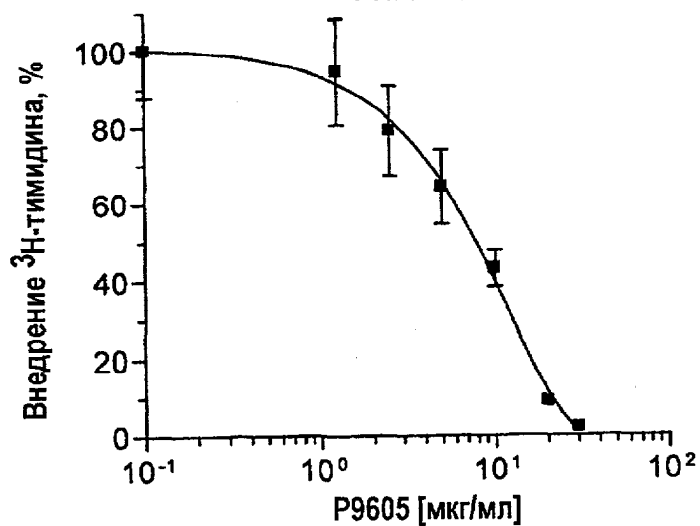
16. Применение экстракта, полученного способом по любому из пп.1-10, причем данный экстракт препятствует действию полового гормона дигидротестостерона, сокращенно ДНТ, в частности его увеличивающему пролиферацию и антиапоптическому действию на клетки рака простаты, для получения лекарственного средства для лечения рака простаты, включая его метастазы, или доброкачественной гиперплазии простаты.



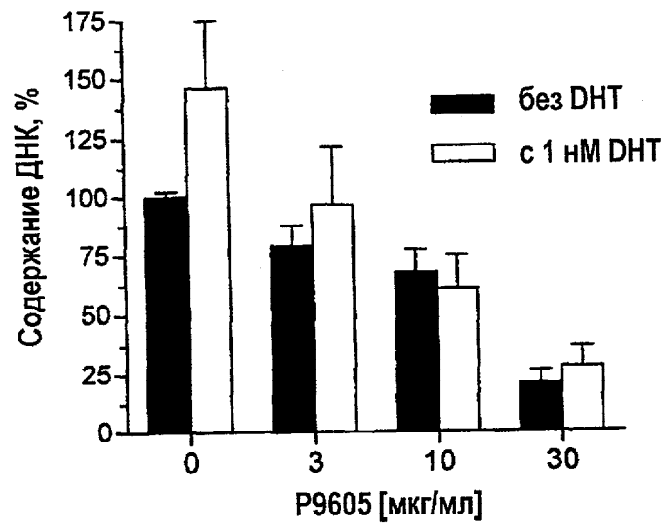
Фиг. 1а



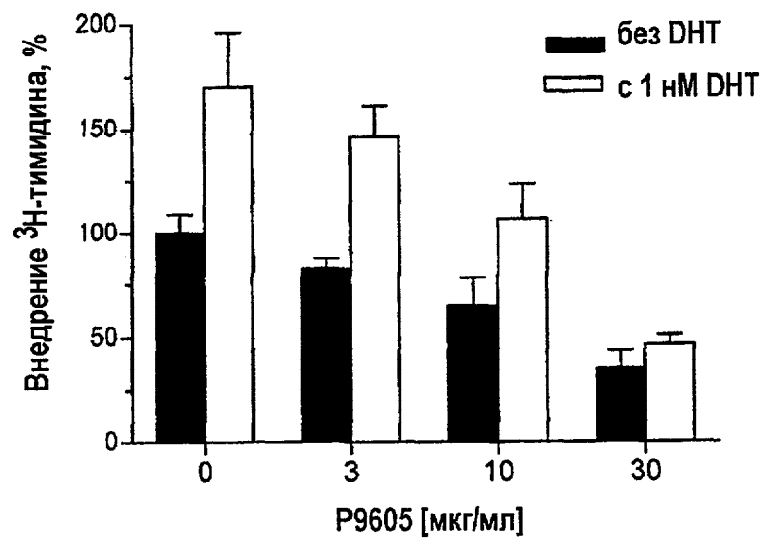
Фиг. 1б



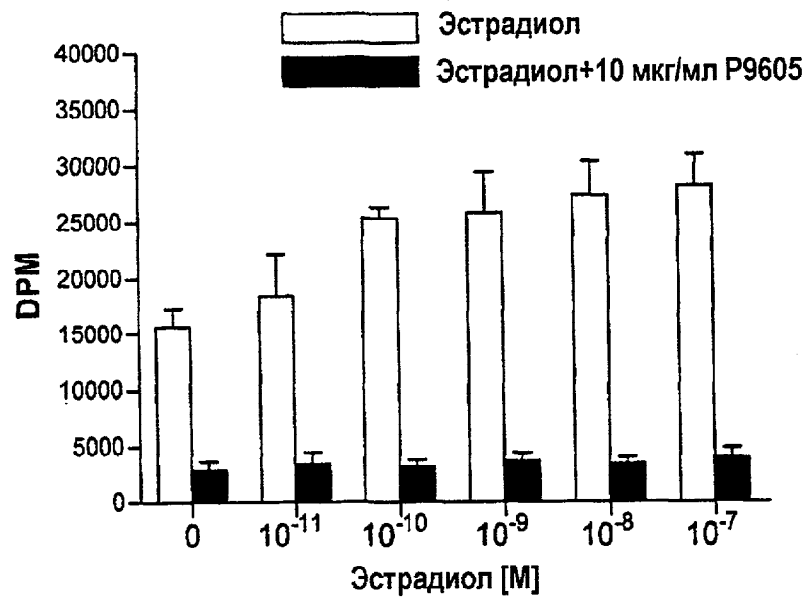
Фиг. 2



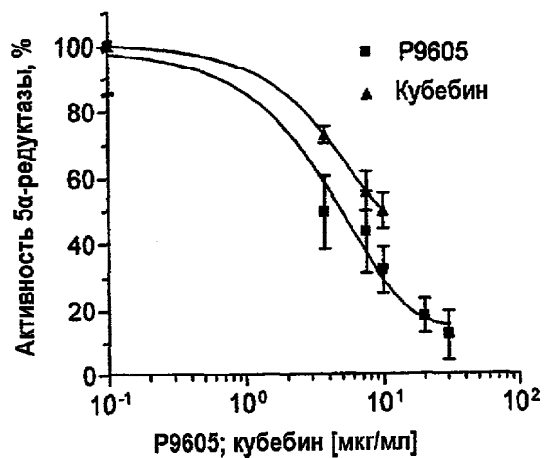
Фиг. 3



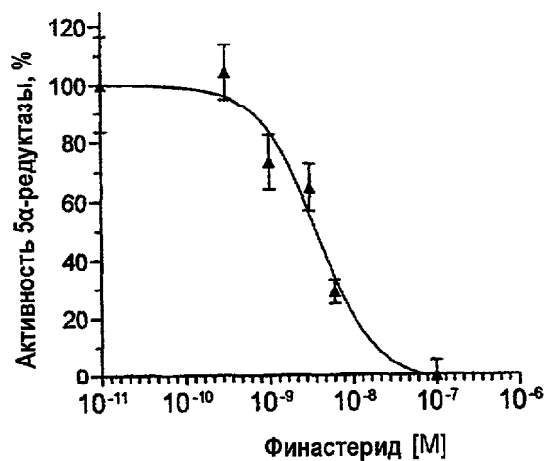
Фиг. 4



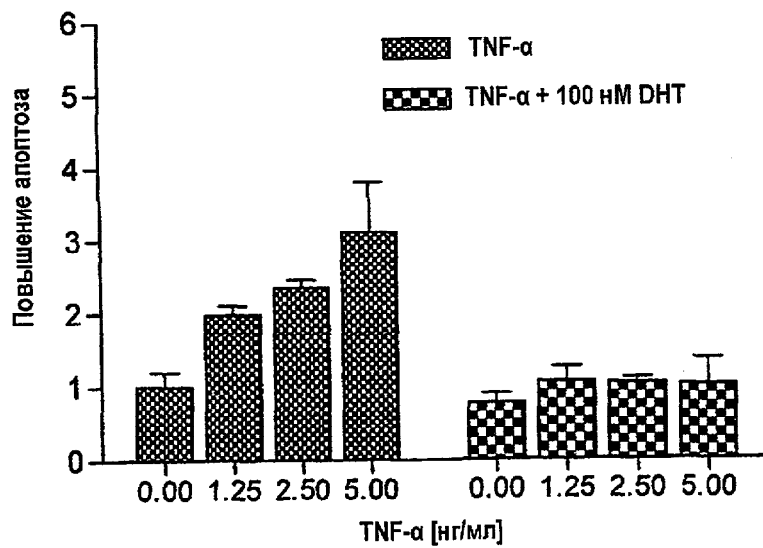
Фиг. 5



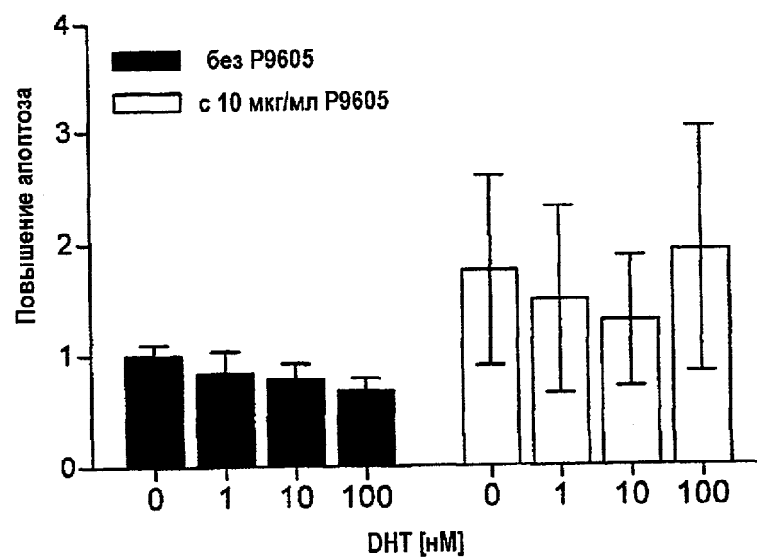
Фиг. 6а



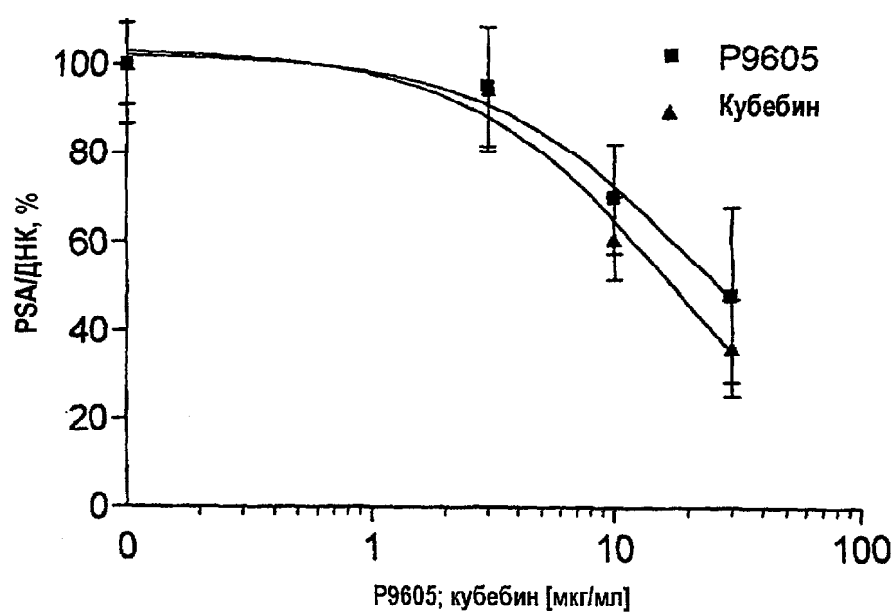
Фиг. 6b



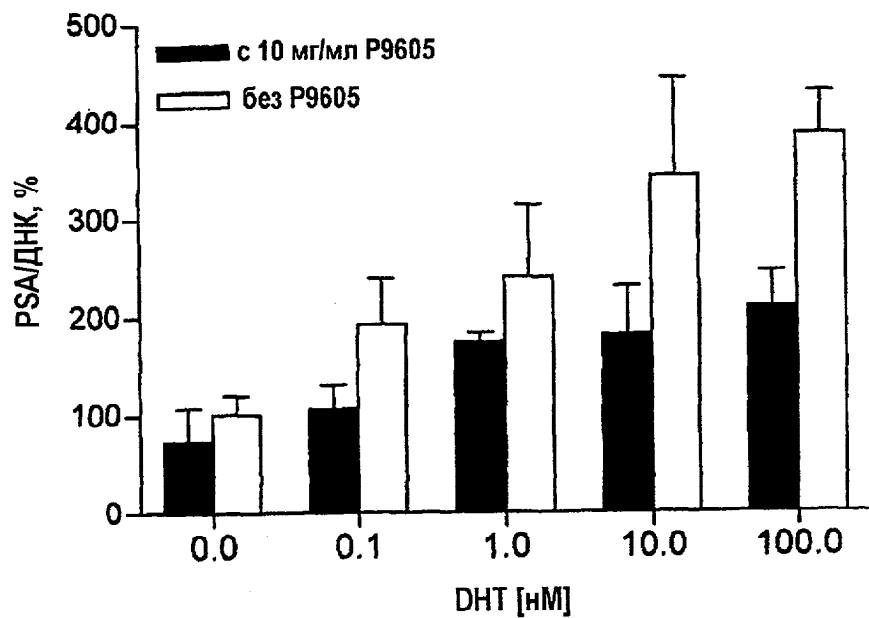
Фиг. 7а



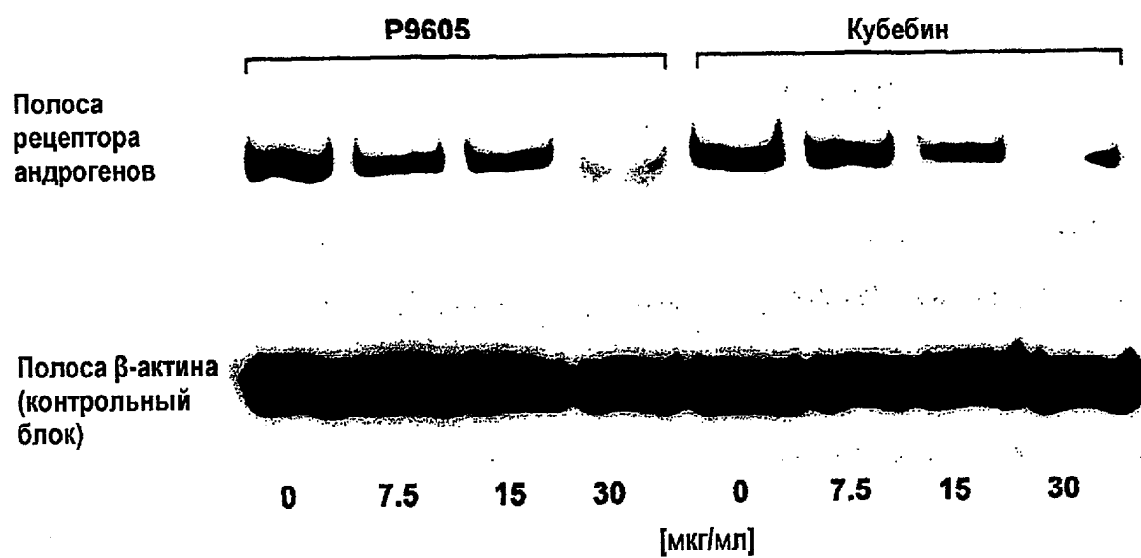
Фиг. 7b



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10