PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :
A61K 35/78, 31/35

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 99/47149**

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 23. September 1999 (23.09.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/01860

(22) Internationales Anmeldedatum: 19. März 1999 (19.03.99)

(30) Prioritätsdaten:
198 12 204.7 19. März 1998 (19.03.98) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: PLANTAMED ARZNEIMITTEL GMBH [DE/DE]; Kerschensteinerstrasse 11–15, D–92318 Neumarkt (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: WUTTKE, Wolfgang [DE/DE]; Domäne 8, D–37120 Bovenden (DE). JARRY, Hubertus [DE/DE]; Am Wasserturm 5, D–37249 Neu–Eichenberg (DE). CHRISTOFFEL, Volker [DE/DE]; Giehlstrasse 13, D–92318 Neumarkt (DE). SPENGLER, Barbara [DE/DE]; Karl–Speierer–Strasse 16, D–92318 Neumarkt (DE). POPP, Michael [DE/DE]; Weinbergstrasse 3, D–91207 Lauf (DE).

(74) Anwalt: KAISER, Jürgen; Winter, Brandl & Partner, Alois–Steinecker–Strasse 22, D–85354 Freising (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, 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, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: UTILIZATION OF EXTRACTS FROM IRIS PLANTS, CIMICIFUGA RACEMOSA AND TECTORIGENIN AS AN ESTROGEN–LIKE ORGAN–SELECTIVE MEDICAMENT WITHOUT UTEROTROPIC EFFECTS

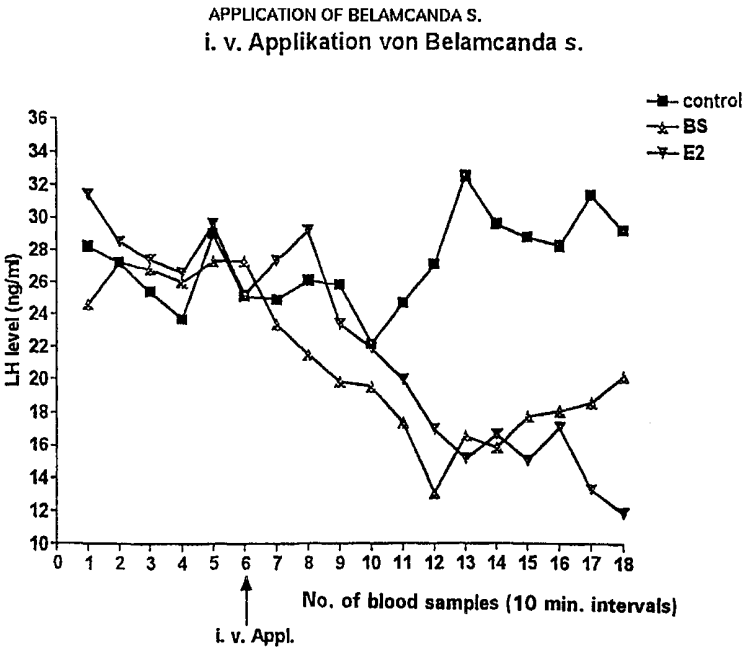
(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON EXTRAKTEN AUS IRISGEWÄCHSEN UND CIMICIFUGA RACEMOSA UND TECTORIGENIN ALS ESTROGENARTIGES ORGANSELEKTIVES ARZNEIMITTEL OHNE UTEROTROPE WIRKUNG

(57) Abstract

The invention relates to the utilization of extracts from iris plants, cimicifuga racemosa and tectorigenin as an estrogen–like organ–selective medicament for selectively treating and/or for the prophylaxis of cardiovascular diseases, especially arteriolosclerosis, osteoporosis and climacteric symptoms, for example, for preventing or alleviating hot flashes. Virtually no uterotropic effects are observed when using said abstracts.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Extrakten aus Irisgewächsen und aus Cimicifuga racemosa sowie Tectorigenin als estrogenartiges organselektives Arzneimittel zur selektiven Behandlung und/oder Prophylaxe von cardiovaskulären Erkrankungen, insbesondere Atherosklerose, Osteoporose sowie klimakterischen Beschwerden, beispielsweise zur Verhinderung oder Linderung von Hitzewallungen. Es werden praktisch keine uterotropen Wirkungen beobachtet.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	**ES**	Spanien	**LS**	Lesotho	**SI**	Slowenien
AM	Armenien	**FI**	Finnland	**LT**	Litauen	**SK**	Slowakei
AT	Österreich	**FR**	Frankreich	**LU**	Luxemburg	**SN**	Senegal
AU	Australien	**GA**	Gabun	**LV**	Lettland	**SZ**	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	**GB**	Vereinigtes Königreich	**MC**	Monaco	**TD**	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	**GE**	Georgien	**MD**	Republik Moldau	**TG**	Togo
BB	Barbados	**GH**	Ghana	**MG**	Madagaskar	**TJ**	Tadschikistan
BE	Belgien	**GN**	Guinea	**MK**	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	**TM**	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	**GR**	Griechenland			**TR**	Türkei
BG	Bulgarien	**HU**	Ungarn	**ML**	Mali	**TT**	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	**IE**	Irland	**MN**	Mongolei	**UA**	Ukraine
BR	Brasilien	**IL**	Israel	**MR**	Mauretanien	**UG**	Uganda
BY	Belarus	**IS**	Island	**MW**	Malawi	**US**	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	**IT**	Italien	**MX**	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	**JP**	Japan	**NE**	Niger	**UZ**	Usbekistan
CG	Kongo	**KE**	Kenia	**NL**	Niederlande	**VN**	Vietnam
CH	Schweiz	**KG**	Kirgisistan	**NO**	Norwegen	**YU**	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	**KP**	Demokratische Volksrepublik Korea	**NZ**	Neuseeland	**ZW**	Zimbabwe
CM	Kamerun			**PL**	Polen		
CN	China	**KR**	Republik Korea	**PT**	Portugal		
CU	Kuba	**KZ**	Kasachstan	**RO**	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	**LC**	St. Lucia	**RU**	Russische Föderation		
DE	Deutschland	**LI**	Liechtenstein	**SD**	Sudan		
DK	Dänemark	**LK**	Sri Lanka	**SE**	Schweden		
EE	Estland	**LR**	Liberia	**SG**	Singapur		

Beschreibung

Verwendung von Extrakten aus Irisgewächsen und Cimicifuga racemosa und Tectorigenin als estrogenartiges organselektives Arzneimittel ohne uterotrope Wirkung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Extrakten aus Irisgewächsen, (Iridaceae) gemäß Anspruch 1 sowie die aus Cimicifuga racemosa als estrogenartiges organselektives Arzneimittel und Tectorigenin und/oder Tectorigeninglykosiden als Arzneimittel gemäß Anspruch 8.

Das in den Ovarien gebildete 17ß-Estradiol (wenn im folgenden von Estradiol gesprochen wird, ist immer das physiologische 17ß-Estradiol gemeint) [im folgenden auch mit E_2 bezeichnet] hat im Organismus eine allgemein proliferationsfördernde Wirkung. Neben der Steuerung des Zyklus der Frau besitzt es u.a. einen homöostatischen Einfluss auf den Stoffwechsel des Knochens und verhindert am Endothel der Gefäße die Entstehung atherotischer Plaques.

In der Menopause kommt es zu einem Absinken der Estradiolspiegel in Folge des Erlöschens der Ovarialfunktion. Dies resultiert in einer Abschwächung proliferativer Prozesse und führt im Hypothalamus zu einer Verstärkung der Aktivität des GnRH-Pulsgenerators. (Der Gonadotropin-Releasing-Hormon-Pulsgenerator ist eine Art Taktgeber im Hypothalamus und taktet die pulsatile Ausschüttung von LH, wobei Steroide die Amplitude und die Frequenz beeinflussen.) Die resultierende stimulierte LH-Ausschüttung führt bei der klimakterischen Frau zu störend empfundenen aufsteigenden Hitzwallungen, den sogenannten „Hot flushes".

In Abwesenheit genügend hoher Estradiolspiegel im Blut überwiegt im Knochengewebe die Aktivität der Osteoklasten und damit der Abbau der Knochenmasse, der mit erhöhter Bruchgefahr des Skelettes einhergeht. Gleichzeitig besteht langfristig die Gefahr der Plaquebildung im Gefäßsystem und damit das erhöhte Risiko von Infarkten.

Sowohl von Extrakten aus Cimicifuga racemosa als auch aus Belamcanda sinensis ist aus der Volksmedizin bekannt, dass sie peri- und postmenopausale Beschwerden lindern können. Dies wurde bislang darauf zurückgeführt, dass die Extrakte beider pflanzlicher Drogen estrogenartige Wirkung mit allen deren positiven Wirkungen auf eine Vielzahl von Organen des menschlichen Körpers, insbesondere Gehirn, Ovarien, Knochen, Gefäßsystem, aufweisen. Nachteilig wären estrogenartige Wirkungen auf Uterus, Vagina, Brustgewebe und Leber. Unerwünscht hieran ist jedoch, dass bislang kein Arzneimittel aus diesen Pflanzendrogen im Stand der Technik zur Verfügung stand, welches zu einer organselektiven Prophylaxe oder Therapie bei Estrogenmangel verwendet werden kann.

Ausgehend von diesem Stand der Technik ist es daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, pflanzliche Arzneimittel mit estrogenartiger Wirkung zur Verfügung zu stellen, welche eine organselektive Wirkung ohne oder mit nur geringer Wirkung auf den Uterus aufweisen.

Die Lösung dieser Aufgabe erfolgt unabhängig voneinander durch die Merkmale des Anspruchs 1 bezüglich der Verwendung von Extrakten aus Irisgewächsen (Iridaceae), durch die Verwendung von Extrakten aus Cimicifuga racemosa gemäß Anspruch 3. Die obige Aufgabe wird ferner durch die Merkmale des Anspruchs 2 bezüglich eines Arzneimittels auf

Basis von Tectorigenin und/oder dessen Glykosiden gemäß Anspruch 8 gelöst.

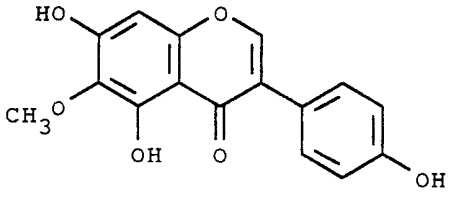
Eine weitere unabhängige Lösung stellt ein Tectorigenin und/oder Tectorigeninglykosid-haltiger oder Tectorigenin und/oder Tectorigeninglykosid-angereicherter Pflanzenextrakt gemäß Anspruch 11 dar.

Bei in vitro und in vivo Versuchen hat sich überraschend herausgestellt, dass sowohl aus Irisgewächsen (Iridaceae), insbesondere Belamcanda sinensis, als auch aus Cimifuga racemosa mit organischen Lösungsmitteln oder mit überkritischem CO_2 hergestellte Extrakte organselektiv auf das Zentralnervensystem, das Knochensystem und auf das Gefäßsystem wirken, wobei eine Wirkung auf den Uterus die sogenannte uterotrope Wirkung - fehlt. Daher sind die erfindungsgemäß verwendeten Extrakte zur Herstellung eines fertig formulierten Mittels zur selektiven Behandlung und/oder Prophylaxe der Osteoporose geeignet.

Sie sind ferner zur Herstellung eines fertig formulierten Mittels zur selektiven Behandlung und/oder Prophylaxe von kardiovaskulären Erkrankungen, insbesondere der Atherosklerose geeignet.

Sie sind ferner zur Herstellung eines fertig formulierten Mittels zur selektiven Behandlung und/oder Prophylaxe der peri- und postmenopausalen psychovegetativen Beschwerden, wie z.B. Hitzewallungen geeignet.

Es wurde weiterhin gefunden, dass der Inhaltsstoff Tectorigenin, der aus der Belamcanda sinensis isoliert wurde, im wesentlichen die gleichen Wirkungen ausübt wie der Gesamtextrakt.



Tectorigenin

Dieser Inhaltsstoff wird neben der Belamcanda sinensis auch in weiteren Irisgewächsen gefunden, wie z.B. Iris germanica, I. tectorum, I. illyrica, I. dichotoma.

Taxonomisch gesehen stellt sich die Einordnung von Belamcanda sinensis wie folgt dar:

Ordnung:	Liliales
Familie	Iridaceae
Gattung	Belamcanda
Art	Belamcanda sinensis (Leman) DC. = Pardanthus chinensis (L.) Ker-Gawler auch Ixia chinensis L. (=Gemmingia chinensis (L.) O. Kuntze)

Bevorzugt werden zur Herstellung der Extrakte Rhizome, Stengel, Blätter und/oder Blütenblätter der Pflanzen verwendet.

Eine grundsätzliche phytochemische Beschreibung von Belamcanda sinensis und ihrer Inhaltsstoffe erfolgte in der Dissertation von Frau A. Nenninger: (LMU München, 1997) mit dem Titel „Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen von Belamcanda sinensis, einer Arzneipflanze der TCM und anderer Irisarten".

Mit den erfindungsgemäßen Arzneimitteln stehen erstmals Mittel aus Cimicifuga racemosa und Belamcanda sinensis und anderen Irisarten sowie Mittel auf Tectorigenin-Basis zur Verfügung, welche als volle

Estrogenrezeptor-Agonisten in Knochen, dem kardiovaskulären System und dem Gehirn fungieren.

Weitere Vorteile und Merkmale der vorliegenden Erfindung ergeben sich anhand der Beschreibung von experimentellen Daten sowie anhand der Zeichnung.

Es zeigt:

Fig. 1: Einen Vergleich der organischen und wässrigen Phase von Cimicifuga racemosa. Verdrängungskurve eines repräsentativen Estrogenrezeptor - Ligandenbindungsassays. Die Konzentration der Ausgangslösung ist 17,66 mg/ml. Es folgen Verdünnungen 1:2, 1:4 etc. bis 1:64,

Fig. 2: Serum LH vor und 2 Stunden nach der intravenösen Injektion von Belamcanda sinensis Extrakt, E2 und Vehikel. Der Belamcanda sinensis Extrakt hat eine ähnliche Potenz, die erhöhten Serum LH-Spiegel zu senken wie E2;

Fig. 3. Wirkungen von Cimicifuga racemosa und E2 auf Uterusgewichte (Fig. 3a) und LH Spiegel im Blut (Fig. 3b) in ovariektomierten Ratten nach siebentägiger subkutaner Behandlung; (Mittelwerte + SEM, n = 8, * = $p < 0.05$ vs. Cremophor als Vehikel);

Fig. 3a) Uterusgewichte;

Fig. 3b) LH Konzentrationen im Blut;

Fig 4a) Wirkungen von Cimicifuga racemosa und E2 in ovariektomierten Ratten nach siebentägiger subkutaner Behandlung; (Mittelwerte + SEM, n = 8, * = $p < 0.05$ vs. Cremophor als Vehikel) auf die Expression der mRNA für E2- Rezeptor α in der präoptischen Region des Hypothalamus;

Fig 4 b) die Expression der mRNA für IGF1 und C3 im Uterus von ovariektomierten Ratten nach 7 Tagen subkutaner Gabe; und

Fig 4 c) die Expression der mRNA für Collagen 1 (Coll1) und Osteocalcin im Knochen von ovariektomierten Ratten nach 7 Tagen subkutaner Gabe.

Experimenteller Nachweis der estrogenen Wirkung von Cimicifuga racemosa und Belamcanda sinensis

Der Nachweis der selektiven estrogenen Wirkung wurde stufenweise in einer Reihe von unterschiedlich komplexen Testsystemen geführt.

1. in vitro Versuche

1.1 in vitro Versuche zu Cimicifuga racemosa

Die Erkennung der estrogenartigen Struktur von Inhaltsstoffen durch einen gegen 17ß-Estradiol (=E2) gerichteten Antikörper wurde in vitro gezeigt.
Der Cimicifuga racemosa Extrakt wurde zur Trockene gebracht. Durch Phasenverteilung zwischen Dichlormethan und Wasser wurden Substanzen mit unterschiedlicher Polarität angereichert. Die Bindungsaffinität der Inhaltsstoffe der beiden Phasen wurde in vitro an Estrogenrezeptoren aus

Schweineuterus bestimmt. Die zytosolischen Estrogenrezeptoren aus den Uteri von Schweinen wurden nach Standardprozeduren isoliert und für die Ligandenverdrängungsexperimente eingesetzt.

Dabei wurde gefunden, daß die estrogenartigen Strukturen z.B. aus Cimicifuga racemosa nicht hydrophil, sondern lipophiler Natur sind, da sie sich mit einem organischen Lösungsmittel aus dem Extrakt extrahieren lassen. Die Substanzen, die sich in der organisch extrahierten Phase befinden, binden etwa zehnfach stärker an den Antikörper als die in der wässrigen Phase verbliebenen Stoffe.

Noch größer ist der Unterschied zwischen den beiden Phasen im Estradiol-Rezeptorbindungsassay. Die Ähnlichkeit der bindenden Substanz mit Estradiol muss so groß sein, dass eine selektive - kompetitive - Interaktion mit dem Estradiolrezeptor in einer zellfreien Präparation stattfinden kann. In diesem Testsystem besitzt die wässrige Phase keine Aktivität, wohingegen die organische Phase sehr fest an den Rezeptor bindet.

Die Ergebnisse sind in Fig. 1 gezeigt.

1.2 In vitro Belamcanda sinensis

Es ist aus anderen Untersuchungen bekannt, dass Extrakte aus Belamcanda sinensis ebenfalls Inhaltsstoffe besitzen, die von einem Antikörper gegen 17-ß-Estradiol erkannt werden und an den 17ß-Estradiolrezeptor binden (vgl. Nenninger ibd.). Überraschenderweise haben die Erfinder der vorliegenden Anmeldung jedoch gefunden, dass diese Extrakte auf verschiedene Organsysteme unterschiedlich estrogen wirken, insbesondere, daß sie nicht uterotrop wirken.

2. in vivo Versuche: Nachweis der estrogenen Wirkung an der ovariektomierten Ratte

Die Bindung an den Rezeptor E2 ist sehr selektiv; es kann aber nicht ausgesagt werden, ob die nachgeschalteten Prozesse in der Zelle gefördert oder gehemmt werden, d.h. ob die Substanz ein Agonist oder ein Antagonist ist. Diese Eigenschaft kann nur in geeigneten zellulären Systemen oder im Ganztier bestimmt werden.

Die ovariektomierte Ratte ist anerkanntes Modell für die postmenopausale Frau, bei der die endogene Estradiol-Produktion zum Erliegen gekommen ist. Durch die externe Zufuhr von 17ß-Estradiol oder von Stoffen, die estrogenartig wirken, kommt es zu einer Restauration estrogensensibler anatomisch-morphologischer Parameter wie Zunahme des Uterusgewichtes und dem Auftreten von verhornten d.h. Schollen-Epithelzellen am Vaginalepithel oder hormoneller Veränderungen, wie einem Absinken des LH-Spiegels im Blut der behandelten Tiere.
Alle im nachfolgenden beschriebenen Versuche wurden mit ovariektomierten Sprague-Dawley-Ratten (=ovx Ratten) mit einem Gewicht zwischen 240 und 280 g durchgeführt.

2.1 Einmalige Gabe von Belamcanda sinensis

Der Wirkungseintritt der Estradiol-artigen Wirkung von Belamcanda sinensis Extrakt erfolgt sehr rasch. Bereits nach einmaliger i.v. Gabe von Vehikel, Estradiol und Belamcanda sinensis-Extrakt an ovx-Ratten sistiert die Pulsatilität unter E_2 wie auch unter Belamcanda sinensis. Im Mittelwertverlauf ergeben sich signifikante Hemmungen der Serum-LH-Spiegel, sowohl im Vergleich zu den Vorwerten als auch im Vergleich zu den Cremophor-behandelten Kontrolltieren. Cremophor ist ein Emulgator auf Basis polyethoxylierter Ricinusölderivate.

Die Ergebnisse sind in Fig. 2 dargestellt.

Im Uterus der Tiere ist sechs Stunden nach Injektion des Belamcanda sinensis-Extraktes die Expression der uterinen VEGF-, IGF1- und C3-Gene im Vergleich zu den Kontrollen nicht verändert, während die Estradiolinjektion eine deutliche Erhöhung der Genexpression dieser drei Estrogen-regulierten Proteine zur Folge hat. Das konstitutiv exprimierte CCO-Gen war durch keine der Behandlungen signifikant beeinflußt.

Aus den Befunden ergibt sich, dass Inhaltsstoffe von Belamcanda sinensis in hypothalamischen estrogen-rezeptiven Strukturen eine Hemmung des GnRH-Pulsgenerators bewirken und somit estrogen-agonistische Wirkungen haben. Dadurch wird die hypophysäre LH-Sekretion sowohl durch Inhaltsstoffe in Belamcanda sinensis als auch durch Estradiol signifikant gehemmt. Im Gegensatz zu Estradiol haben die Inhaltsstoffe in Belamcanda sinensis keine uterotrope Wirkung. Estradiol reguliert die Genexpression von VEGF, IGF1 und C3 signifikant herauf, ein Effekt, der unter Belamcanda sinensis nicht beobachtet wird.

Durchführung des Akutversuches zur Wirkung einer i.v.-Injektion von Belamcanda sinensis-Extrakt

24 Ratten (i.e. 8 Tiere/Gruppe) wurden am Vortag des Versuches unter Äthernarkose Jugularvenenkatheter implantiert. Am Versuchstag wurden 6 Blutproben im Abstand von 10 Min. entnommen. Unmittelbar nach Entnahme der 6. Probenentnahme wurden 62,5 mg des Belamcanda sinensis-Extraktes oder 10 µg 17ß-Estradiol (E_2) bzw. das Lösungsmittel (5 %) Cremophor in isotoner NaCl 1 ml) intravenös injiziert und Blutproben für weitere 2 Stunden in 10minütigen Intervallen entnommen. 6 Stunden nach der intravenösen Gabe wurden die Tiere dekapitiert, Blut gewonnen und die Uteri entnommen, gewogen und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

2.2 Einmalige Gabe von Tectorigenin

Nach einmaliger Gabe von Tectorigenin wurden der zeitliche Verlauf der Beeinflussung der LH-Spiegel im Blut und die Estradiol-ähnliche Immunreaktivität bestimmt. Die Konzentration von Tectorigenin im Blut der Tiere, bestimmt mittels E2-RIA, entspricht nach 20 min etwa 100 pg Äquivalent Estradiol.

Tectorigenin löst eine rasche Senkung des LH aus. Dabei entspricht die Kinetik der unter Tectorigenin erreichten LH-Senkung bis zum Zeitpunkt 60 min nach i.v. Gabe exakt derjenigen des Estradiols, führt dann aber zu keiner weiteren Senkung, sondern steigt langsam wieder an.

Durchführung: Ovx-Ratten wurden in Ethernarkose 24 Stunden vor Versuchsbeginn Katheter in die Vena jugularis externa nach der Methode von Harms und Ojeda gelegt (Harms PG; Ojeda SR: A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. J. Appl. Physiol. (1974) 36: 391-392). Das Schlauchende wurde in eine Hauttasche im Nacken verlegt. Um die Tiere zur Gewinnung der Blutproben nicht berühren zu müssen, wurde der Katheter mit einem Silikonschlauch verlängert. Katheter und Schlauch wurden mit Ringerlösung, die 50 IU Heparin/ml enthielt, gespült.

Bei den Tieren wurde in 10 min Abständen Blutproben von 100 µl gezogen und das entnommene Volumen durch Ringer/Heparin-Lösung ersetzt. Nach der 6. Probe wurden 1,0 ml der jeweiligen Testlösung intravenös appliziert. Als Testlösungen wurden eingesetzt: 2% Cremophor (=Vehikellösung), Tectorigenin 7mg/ml Vehikel, 17ß-Estradiol 10µg/ml Vehikel. Die Blutentnahme erfolgte in zehnminütigem Abstand über weitere 140 min.

Die so gewonnenen Blutproben wurden in ein 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß, das 10 µl Heparin-Lösung (5000 IU/ml, Liquemin) enthielt gefüllt, 10 min bei 10 000 * g zentrifugiert und das Plasma bis zur Durchführung der Radioimmunoassays bei -20°C gelagert.

Die RIAs für LH und Prolaktin basieren auf Antiseren, Referenz- und Jodierungspräparaten des NIH (Bethesda, Maryland, USA). Die Konzentrationen von Estradiol und der kreuzreagierenden Isoflavone wurde mit einem RIA der Fa. DPC, Bad Nauheim gemessen.

2.3 Wirkung von Belamcanda sinensis-Extrakt nach Verabreichung über 7 Tage

Die Auswirkungen der wiederholten Gabe von Estradiol, Belamcanda sinensis-Extrakt und Vehikel auf Gesamtgewicht, Uterusgewicht, Hormonspiegel und Genaktivierung von Uterus und Knochen wurde an ovariektomierten Ratten nach täglicher s.c. Applikation über sieben Tage untersucht.

Die durchschnittlichen Körpergewichte der Cremophor- und Belamcanda sinensis-behandelten Tiere unterscheiden sich nicht, während die E_2-behandelten Tiere signifikant leichter waren. Auch die Uterusgewichte, der mit Cremophor- und Belamcanda sinensis-behandelten Tieren unterscheiden sich nicht signifikant, während die E_2-Behandlung die Uterusgewichte mehr als verdreifachte.

Die Serum-LH-Spiegel bei den Belamcanda sinensis-behandelten Tieren waren geringfügig, aber signifikant gegenüber den Cremophor-Kontrollen reduziert; deutlicher war die Reduktion durch Estradiol.

In dem uterinem mRNA-Extrakt erhöhte Estradiol nach einwöchiger Behandlung die Genexpression von VEGF signifikant auf 149% des

Kontrollwertes. Unter Belamcanda sinensis-Extrakt war die Expression leicht, aber nicht signifikant erhöht. Die Expression des nicht estrogen-regulierten konstitutiven Gens für die Cytochrom C Oxidase (= CCO) wurde nicht beeinflußt

In Extrakten des Femurkopfes wurde die Collagen-1A1-, die Osteocalcin-, die IGF1- sowie die TGFß-mRNA-Expression bestimmt. Estradiol wie auch Belamcanda sinensis inhibierten die Expression aller 4 Gene signifikant, ohne einen Einfluß auf das konstitutive CCO-Gen auszuüben.

Die unterschiedliche Wirkung von Estradiol und Belamcanda kommt nach der siebentägigen Behandlung sehr deutlich zum Ausdruck. Belamcanda sinensis Extrakt hat auf die hypophysäre LH-Sekretion durch Hemmung des GnRH-Pulsgenerators sowie auf die Genexpression von vier estrogen-regulierten Genen im Knochen einen Estradiol-agonistischen Einfluß. Dagegen besteht keine estrogene Wirkung auf den Uterus: weder das Uterusgewicht noch das Estrogen-regulierte VEGF-Gen werden durch den Belamcanda sinensis-Extrakt beeinflußt. Im Gegensatz dazu führt Estradiol zu einer Ballonierung des Uterus und zu einer Aktivierung des VEGF-Gens.

Durchführung des subakuten Versuches zur Wirkung von täglicher s.c.-Injektion über 7 Tage:
Jeweils 8 Tiere pro Versuchsgruppe (insgesamt 24) wurden täglich zwischen 08.00 und 09.00 Uhr 62,5 mg Belamcanda sinensis-Extrakt bzw. 10 µg Estradiol oder dem Lösungsmittel (5%iges Cremophor, 1 ml) subkutan injiziert. 6 Std. nach der letzten Applikation wurden die Tiere dekapitiert und jedem Tier die Aorta, der Uterus und der linke Femurkopf entnommen, gesäubert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.
In den Blutproben wurde LH und die Estradiol-Immunoreaktivität bestimmt.

2.4 Wiederholte Gabe von Cimicifuga racemosa

Die Tiere erhalten frühestens 14 Tage nach der Ovariektomie die jeweilige Prüfsubstanz in einer Dosis von 62,5 mg Cimicifuga racemosa/Ratte oder 8 µg Estradiol/Ratte einmal täglich morgens über einen Zeitraum von 7 Tagen subkutan injiziert. Beide Substanzen waren in 5% Cremophor gelöst, die Kontrolltiere erhielten nur das Vehikel.

Nach der Dekapitierung der Tiere wurden Gehirn, Uterus und Femur für die mRNA-Gewinnung präpariert. Im Blut der Tiere wurde mittels RIA die LH-Konzentration bestimmt. Die Expression der estrogen-regulierten Gene in den oben genannten Organen wurde mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmt.

Die Uteri der Estradiol-behandelten Tiere sind mehr als dreimal so schwer wie die der Cimicifuga racemosa und Vehikel-behandelten Tiere, die sich in ihren Mittelwerten praktisch nicht unterscheiden. Das bedeutet, dass die Inhaltsstoffe von Cimicifuga racemosa keinen Einfluß auf die Gebärmutter der Tiere haben. Dies gilt auch für die Vagina, wo bei den Cimicifuga racemosa und Vehikel-behandelten Tiere keine Verhornung des Epithelgewebes auftritt, ganz im Gegensatz zu den Estradiol-behandelten Tieren.

Die LH-Spiegel der Vehikel-behandelten Tiere bleiben hoch, während sie sowohl durch Estradiol wie auch durch Cimicifuga racemosa signifikant gesenkt werden.

Die Ergebnisse sind in den Fig. 3a) und 3b) gezeigt.

Uterusgewichte (feucht)

	Cremophor [Kontrolle]	Cimicifuga racemosa	E2
Anzahl Tiere	8	8	8

Mittelwerte [mg]	185,6	192,3	702,1
SD	18,81	22,53	194,97
SEM	6,65	7,97	68,92

LH-Konzentrationen im Blut

	Cremophor [Kontrolle]	Cimicifuga racemosa	E2
Anzahl Tiere	8	8	8
Mittelwerte [ng/ml]	16,9	12,5	7,83
SD	3,99	3,4	5,57
SEM	1,41	1,2	1,97

Als weiterer Marker für die estrogene Wirkung wurde die Aktivierung von mRNA von estrogen-induzierbaren Proteinen gemessen. Untersucht wurde dabei Gewebe aus Uterus, aus Knochengewebe (Femur) und aus der präoptischen Region des Hypothalamus und.

Im Hypothalamus stimulieren sowohl Cimicifuga racemosa als auch E2 die Expression der mRNA für den Estrogenrezeptor α **(Fig 4a).** Auch im Knochengewebe verhält sich Cimicifuga racemosa wie ein Estrogen und verringert analog zu Estradiol die Expression der mRNA für die knochenspezifischen Kollagen 1 und für Osteocalcin-Gene **(Fig 4b)**.

Im Gegensatz dazu wird keine Wirkung von Cimicifuga racemosa auf estrogen-regulierte Gene im Uterus beobachtet. Nur Estradiol erhöht die mRNA für IGF1 und Komplementfaktor C3 **(Fig 4c)**.

Diese Befunde belegen, daß die Inhaltsstoffe aus Cimicifuga racemosa selektiv auf einzelne Organe wirken: Der Extrakt wirkt estrogen im Hypothalamus (Expression des E2-Rezeptors α, Freisetzung von LH) und am Knochen, nachgewiesen durch die Expression der Gene für Kollagen 1 und Osteocalcin. Im Gegensatz zu Estradiol besitzt Cimicifuga racemosa aber keine Wirkung auf den Uterus, wie die fehlende Wirkung auf die Uterusgewichte und die Expression der Gene für IGF1 und C3 zeigt.

Mit den in vitro und in vivo durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass Cimicifuga racemosa- und Belamcanda sinensis - Extrakte eine estrogene Wirkung ausüben. Überraschend wurde gefunden, dass die Extrakte aus den genannten Drogen organselektiv an ZNS, Knochen und Gefäßen, aber nicht am Uterus wirken und sich damit hervorragend für die Prophylaxe und Therapie des Estrogenmangels eignen, ohne einen negativen Einfluss auf das Endometrium auszuüben.

Identische Effekte werden durch das in Belamcanda erhaltene Tectorigenin erzielt.

Somit stehen erstmals Arzneimittel zur Verfügung, die eine estrogenartige Wirkung, jedoch ohne uterotrope Wirkung aufweisen.

Derartige Arzneimittel können zur Behandlung und/oder Prophylaxe von kardiovaskulären Erkrankungen, insbesondere Atherosklerose, Osteoporose sowie von peri- und postmenopausalen psychovegetativem Beschwerden, wie z. B. Hitzewallungen eingesetzt werden.

Als Applikationsarten stehen die orale, intravenöse und subkutane Applikation im Vordergrund.

Ansprüche

1. Verwendung von Extrakten aus Irisgewächsen (Iridaceae) zur Herstellung eines estrogenartigen organselektiven Arzneimittels ohne oder wenigstens mit zu vernachlässigender uterotroper Wirkung.

2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Extrakte aus Belamcanda sinensis hergestellt werden.

3. Verwendung von Extrakten aus Cimicifuga racemosa zur Herstellung eines estrogenartigen organselektiven Arzneimittels ohne oder wenigstens mit zu vernachlässigender uterotroper Wirkung.

4. Verwendung von Tectorigenin und/oder Tectorigeninglykosid-haltigen oder Tectorigenin und/oder Tectorigeninglykosid-angereicherten Extrakten zur Herstellung eines estrogenartigen organselektiven Arzneimittels ohne oder wenigstens mit zu vernachlässigender uterotroper Wirkung.

5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Extrakt zur Herstellung eines fertig formulierten Mittels zur selektiven Behandlung und/oder Prophylaxe von kardiovaskulären Erkrankungen, insbesondere Atherosklerose, dient.

6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Extrakt zur Herstellung eines fertig formulierten Mittels zur selektiven Behandlung und/oder Prophylaxe der Osteoporose dient.

7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Extrakt zur Herstellung eines fertig formulierten Mittels zur selektiven Behandlung und/oder Prophylaxe von klimakterischen Beschwerden, insbesondere zur Verhinderung oder Linderung von Hitzewallungen, dient

8. Tectorigenin und/oder dessen Glykoside als Arzneimittel.

9. Arzneimittel nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es ein estrogenartiges organselektives Arzneimittel ohne oder wenigstens mit zu vernachlässigender uterotroper Wirkung ist.

10. Arzneimittel nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Arzneimittel zur selektiven Behandlung und/oder Prophylaxe von kardiovaskulären Erkrankungen, insbesondere Atherosklerose;

Osteoporose; sowie klimakterischen Beschwerden, insbesondere zur Verhinderung oder Linderung von Hitzewallungen, ist.

11. Tectorigenin- und/oder Tectorigeninglykosid-haltiger oder Tectorigenin- und/oder Tectorigeninglykosid-angereicherter Pflanzenextrakt.

12. Pflanzenextrakt nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß er ein estrogenartiges organselektives Arzneimittel ohne oder wenigstens mit zu vernachlässigender uterotroper Wirkung ist.

13. Pflanzenextrakt nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß er ein Arzneimittel zur Behandlung und/oder Prophylaxe von kardiovaskulären Erkrankungen, insbesondere Atherosklerose;

5

Osteoporose; sowie klimakterischen Beschwerden, insbesondere zur Verhinderung oder Linderung von Hitzewallungen, ist.

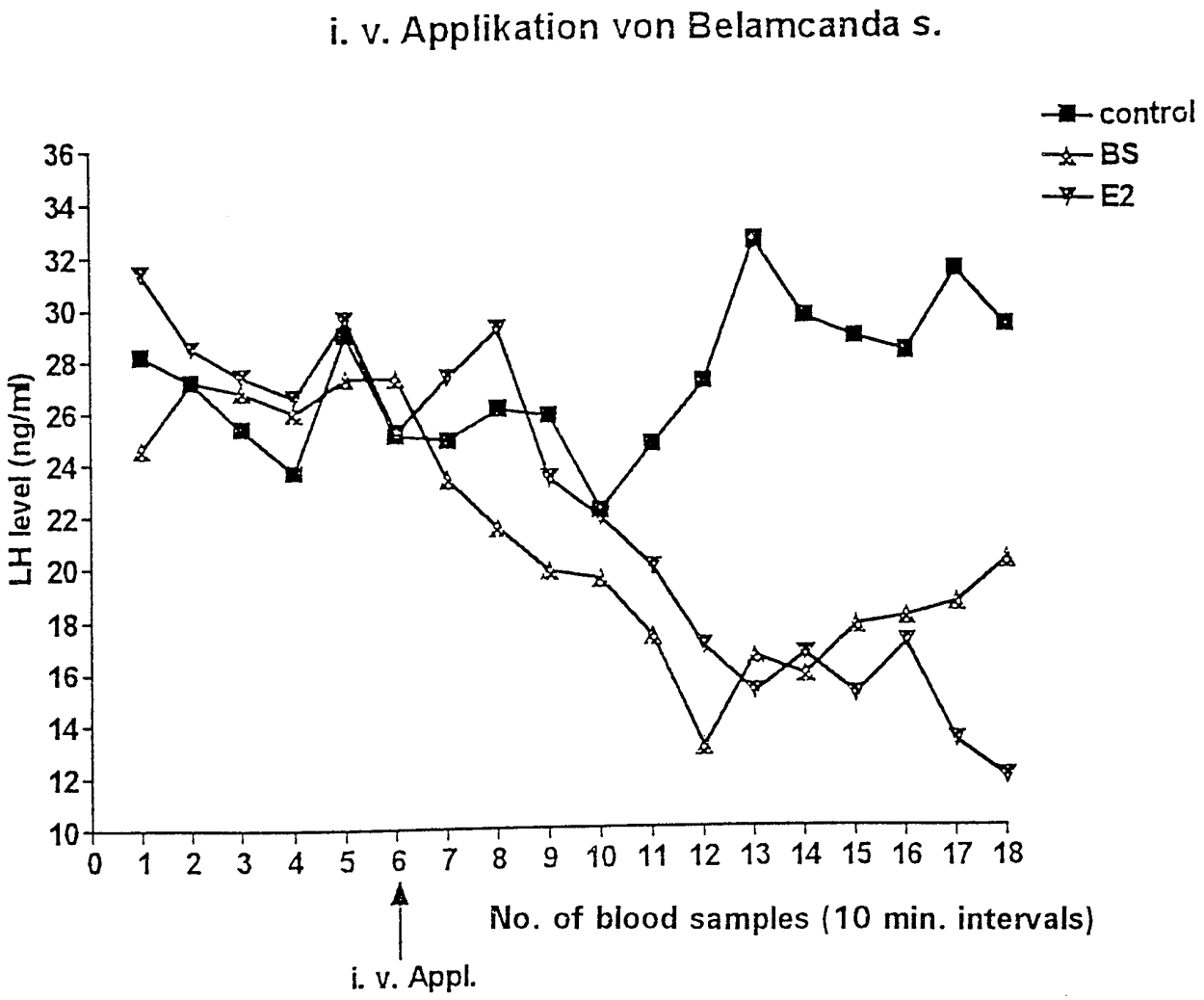
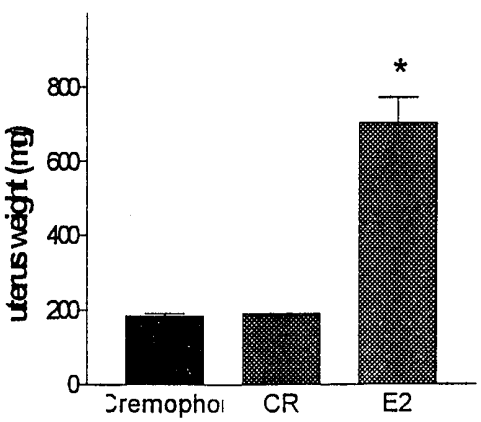
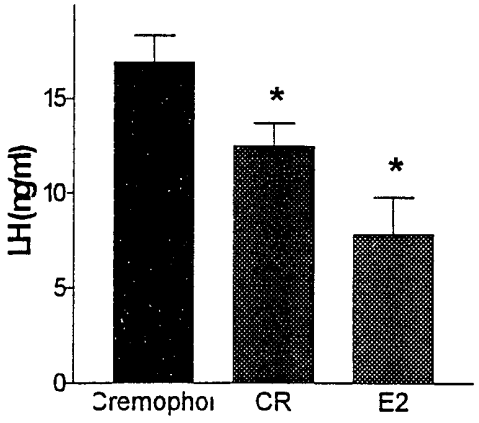

i. v. Applikation von Belamcanda s.
control
BS
E2
LH level (ng/ml)
36
34
32
30
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
No. of blood samples (10 min. intervals)
i. v. Appl.

Fig. 2



3a) Uterusgewichte

Fig. 3a



3b) LH Konzentrationen im Blut

Fig. 3b

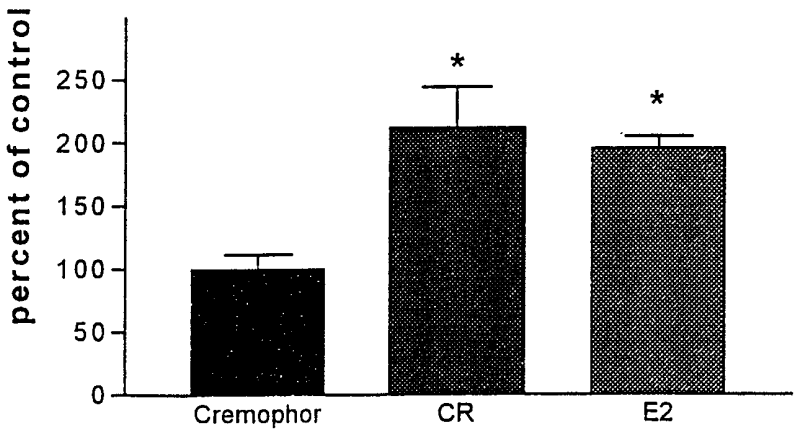


Fig. 4a

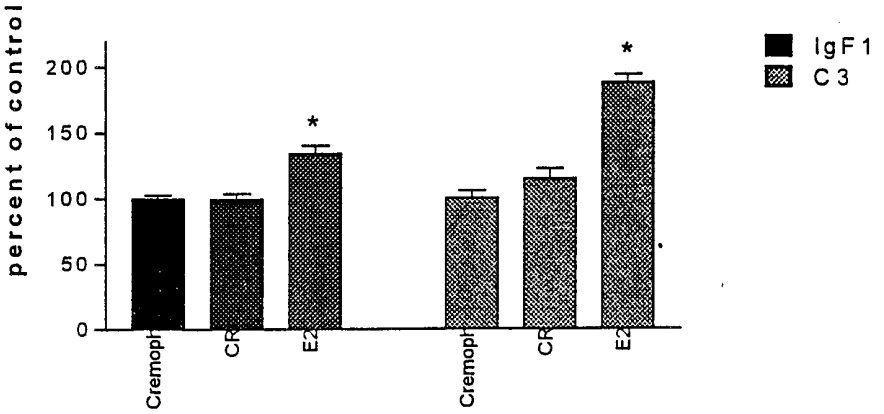

percent of control
200
150
100
50
0
*
*
IgF1
C3
Cremoph
CR
E2
Cremoph
CR
E2

Fig. 4b

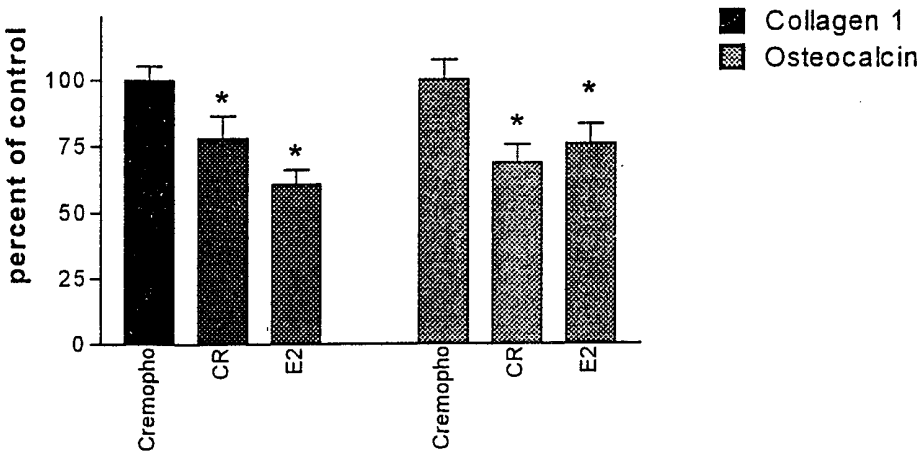

percent of control
100
75
50
25
0
*
*
*
*
Collagen 1
Osteocalcin
Cremopho
CR
E2
Cremopho
CR
E2

Fig. 4c

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte ional Application No
PCT/EP 99/01860

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K35/78 A61K31/35

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 6 A61K

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)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 012, no. 237 (C-509), 6 July 1988 & JP 63 030417 A (TSUMURA JUNTENDO INC), 9 February 1988 see abstract ---	1,2,4-12
X	DE 196 52 183 C (SCHAPER & BRUEMMER GMBH) 12 February 1998 see column 1, line 1 - column 2, line 24 & EP 0 847 755 A cited in the application -----	1,3

☐ 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.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
2 July 1999	12/07/1999

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
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	Rempp, G

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int tional Application No
PCT/EP 99/01860

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19652183 C	12-02-1998	AU 4830097 A	18-06-1998
		AU 5549098 A	15-07-1998
		CA 2245890 A	25-06-1998
		WO 9826791 A	25-06-1998
		EP 0847755 A	17-06-1998
		NO 975858 A	15-06-1998
		PL 323617 A	22-06-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte ionales Aktenzeichen
PCT/EP 99/01860

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K35/78 A61K31/35

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 A61K

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)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 012, no. 237 (C-509), 6. Juli 1988 & JP 63 030417 A (TSUMURA JUNTENDO INC), 9. Februar 1988 siehe Zusammenfassung ---	1,2,4-12
X	DE 196 52 183 C (SCHAPER & BRUEMMER GMBH) 12. Februar 1998 siehe Spalte 1, Zeile 1 - Spalte 2, Zeile 24 & EP 0 847 755 A in der Anmeldung erwähnt -----	1,3

☐ 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	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
2. Juli 1999	12/07/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
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	Rempp, G

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Inte .onales Aktenzeichen
PCT/EP 99/01860

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19652183 C	12-02-1998	AU 4830097 A	18-06-1998
		AU 5549098 A	15-07-1998
		CA 2245890 A	25-06-1998
		WO 9826791 A	25-06-1998
		EP 0847755 A	17-06-1998
		NO 975858 A	15-06-1998
		PL 323617 A	22-06-1998