

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-521075

(P2004-521075A)

(43) 公表日 平成16年7月15日(2004.7.15)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/78	A 6 1 K 35/78	C 4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 35/78	Y 4 C 0 8 8
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 5/24	A 6 1 P 5/24	
A 6 1 P 15/10	A 6 1 P 15/10	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 35 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-522919 (P2002-522919)	(71) 出願人	503080626
(86) (22) 出願日	平成13年2月14日 (2001.2.14)		マレーシア国
(85) 翻訳文提出日	平成15年2月28日 (2003.2.28)		マレーシア国 50662 クアラルンプール、ジャラン ラジャ ラウト、ウィスマ シム ダービー、14ス フロア、シーノオー ミニストリー オブ サイエンス、テクノロジー アンド ジ エンヴァイオロメント マレーシア
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/040101		
(87) 国際公開番号	W02002/017946		
(87) 国際公開日	平成14年3月7日 (2002.3.7)		
(31) 優先権主張番号	PI 20003988		
(32) 優先日	平成12年8月29日 (2000.8.29)		
(33) 優先権主張国	マレーシア (MY)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ユウリコマロンギフォリアの生理活性フラクション

(57) 【要約】

本発明は、性機能障害または男性不妊症の治療のための新規使用および製品を提供する。製品は、局所的適用および投与のために製剤に混合された植物ユウリコマロンギフォリアの根の抽出物の生理活性成分を含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ユウリコマ ロンギフォリアの水性抽出物のフラクションを含む組成物であって、該フラクションが、約 4300 ダルトンの分子量を有するペプチドを含む、前記組成物。

【請求項 2】

フラクションが、テストステロン合成の増大、細胞からのテストステロン放出の増大、精子数の増大および精子運動性の増大からなる群から選択される活性を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

ペプチドがグリコペプチドである、請求項 1 に記載の組成物。

10

【請求項 4】

ペプチドが約 30 ~ 39 個のアミノ酸を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

ペプチドが約 36 個のアミノ酸を有する、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

ユウリコマ ロンギフォリアの水性抽出物から生理活性成分を単離するための方法であって、

ユウリコマ ロンギフォリアの水性抽出物を調製すること、および
逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) およびサイズ排除クロマトグラフィーからなる群から選択されるクロマトグラフィー法により生理活性成分を単離することを含み、
ここで、該生理活性成分が、約 4300 ダルトンの分子量を有するペプチドを含む、前記方法。

20

【請求項 7】

逆相 HPLC が、C4 および C18 からなる群から選択されるクロマトグラフィー媒体を用いて実施される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

逆相 HPLC のクロマトグラフィーによる分離前に、Bio-Gel P-2 および Bio-Gel P-4 からなる群から選択される、少なくとも 1 つのサイズ排除クロマトグラフィー媒体を用いて、水性抽出物を分別することをさらに含む、請求項 6 に記載の方法。

30

【請求項 9】

生理活性が、テストステロン合成の増大、細胞からのテストステロン放出の増大、精子数の増大および精子運動性の増大からなる群から選択される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

請求項 6 に記載の方法により調製される、ユウリコマ ロンギフォリアの生理活性成分。

【請求項 11】

性機能障害または男性不妊症の治療のための請求項 1 に記載の組成物の使用であって、テストステロン合成の増大、細胞からのテストステロン放出の増大、精子数の増大および精子運動性の増大からなる群から選択される活性を増大させるために効果的な組成物の量を、かかる治療が必要な対象に投与することを含む、前記使用。

40

【請求項 12】

テストステロン合成を増大させるための請求項 1 に記載の組成物の使用であって、テストステロン合成を増大させるために効果的な組成物の量を、かかる治療が必要な対象に投与することを含む、前記使用。

【請求項 13】

精巣細胞からのテストステロン放出を増大させるための請求項 1 に記載の組成物の使用であって、精巣細胞からのテストステロン放出を増大させるために効果的な組成物の量を、かかる治療が必要な対象に投与することを含む、前記使用。

【請求項 14】

精子数を増大させるための請求項 1 に記載の組成物の使用であって、精子数を増大させる

50

ために効果的な量を、かかる治療が必要な人に投与することを含む、前記使用。

【請求項 15】

精子運動性を増大させるための請求項 1 に記載の組成物の使用であって、精子運動性を増大させるために効果的な量を、かかる治療が必要な対象に投与することを含む、前記使用。

【請求項 16】

効果的な量の請求項 1 に記載の組成物および薬学的に許容し得るキャリアを含む、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、一般に、生理活性天然物の分野、そして特に、ユウリコマ ロンギフォリア (*Eurycoma longifolia*) のフラクションに由来する組成物に関する。

【0002】

発明の背景

ユウリコマ ロンギフォリア (マレーシアではトンカット アリ (*Tongkat Ali*) としても知られている) の成分は、伝統的な民間薬に用いられている。植物の抽出物は、一般に、マラリア、癌、不安症、潰瘍並びに男性不妊症および性機能障害などの複数の疾患および症候群の治療に有用であると考えられている。従来、植物の薬理効果に関する情報の多くは逸話であった。

【0003】

十分に制御された、再現可能な抽出および生理活性アッセイは、成分の機能を明確にし得る。例えば、細胞毒性効果を有することが示されているユウリコマ ロンギフォリアの抽出物を調査するための研究が進行中である。クアシノイドを含むこれらの抽出物は、細胞毒性特性ならびに抗癌、抗マラリアおよび抗潰瘍剤としての潜在的な使用について調査がなされているユウリコマラクトン (*eurycomalactone*)、ユウリコマノール (*eurycomanol*) およびユウリコマノン (*eurycomanone*) などの化合物を包含する。

【0004】

ユウリコマ ロンギフォリアからクアシノイド抽出物を製造するためのクロマトグラフィック法が、Chan, et al. (1998) に開示されている。この文献は、癌、潰瘍、マラリアおよび発熱の治療における、かかるクアシノイド抽出物の潜在的な有用性を報告している。

【0005】

その効果がストリンジェントな精製ストラテジーにより調査されたクアシノイドとは対照的に、性欲促進活性を起こし得、且つ男性不妊症および性機能障害のための治療としての可能性を有するユウリコマ ロンギフォリアの成分は、単離されなかった。ユウリコマ ロンギフォリアのブタノール、メタノール、水およびクロロホルム抽出された粗フラクションは、哺乳類における行動的な作用について調査がなされている。これらの基本的な方法により分離した化合物の混合物は、動物の性的行動および能力を評価するために、雄マウスおよびラットに投与された。

【0006】

ユウリコマ ロンギフォリアの性的効果の調査は、受容可能な雌に対する、性的経験があり且つ実験未使用の雄ラットの方向付け活動 (*orientation activities*) において粗抽出物の影響を中心に取扱った。処置されたラットにおいて観察された活動は、マウンティング、リッキング (*licking*) および肛門性器におい嗅ぎ (*anogenital sniffing*) を含み、および処置されたラットの環境に対する行動もまた評価され、これは、挙動、探索、立ち上がり (*rearing*)、よじ登り (*climbing*) などの活動の分析を含んだ。さらに、ラットは、性器および非性器のグルーミンのレベルに関しても評価された。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 7 】

これらの種類の行動的要素の分析は、ユウリコマ ロンギフォリアの逸話的な性欲促進特性を研究するためのアッセイとして機能し、そして粗抽出物の投与は、処置された動物の性的能力の増大に関連付けられた。

【 0 0 0 8 】

行動アッセイの使用は、粗ユウリコマ ロンギフォリア抽出物の性生理学における効果を示すが、その研究は、単離された成分を生じる精製ストラテジーは用いなかった。したがって、この技術は、ユウリコマ ロンギフォリアの催淫性化合物の候補の物理的性質を同定しておらず、またはユウリコマ ロンギフォリアから単離された化合物の不妊症若しくは性的機能障害における効果を細胞レベルで評価できなかった。

10

【 0 0 0 9 】

発明の概要

現在、ユウリコマ ロンギフォリアの水性抽出物の特定の精製された成分が、テストステロン合成および放出並びに精子活性および精子数の増大という生理活性を示すことが発見された。これらの精製された成分は、約 4 3 0 0 ダルトンの分子量を有するペプチドを含む。精製された成分を用いて、男性不妊症および性機能障害を治療するための方法が提供される。ユウリコマ ロンギフォリア植物の根の抽出物を含む製剤もまた提供される。製剤は、適用または投与のために、種々の手段により調製され得る。

【 0 0 1 0 】

本発明の一側面により、ユウリコマ ロンギフォリアの水性抽出物のフラクションを含む組成物が提供される。該フラクションは、約 4 3 0 0 ダルトンの分子量を有するペプチドを含む。ある態様において、フラクションは、テストステロン合成の増大、細胞からのテストステロン放出の増大、精子数の増大および精子運動性の増大からなる群から選択される活性を有する。

20

【 0 0 1 1 】

いくつかの好ましい態様において、ペプチドはグリコペプチドである。他の好ましい態様において、ペプチドは、約 3 0 ~ 3 9 個のアミノ酸を有し、好ましくは、ペプチドは、約 3 6 個のアミノ酸を有する。

【 0 0 1 2 】

本発明の別の側面により、ユウリコマ ロンギフォリアの水性抽出物から生理活性成分を単離するための方法が提供される。該方法は、ユウリコマ ロンギフォリアの水性抽出物の調製およびフラクションからの生理活性成分の単離を含む。生理活性成分は、クロマトグラフィー法、好ましくは、逆相高速液体クロマトグラフィー (H P L C) およびサイズ排除クロマトグラフィーからなる群から選択されるものにより単離される。

30

【 0 0 1 3 】

生理活性成分は、約 4 3 0 0 ダルトンの分子量を有するペプチドを含む。ある好ましい態様において、逆相 H P L C は、C 4 および C 1 8 からなる群から選択されるクロマトグラフィー媒体を用いて実施される。他の態様において、本方法は、さらに、逆相 H P L C のクロマトグラフィーによる分離前に、B i o - G e l P - 2 および B i o - G e l P - 4 からなる群から選択される少なくとも 1 つのサイズ排除クロマトグラフィー媒体を用いて、水性抽出物を分別することを含む。他の好ましい態様において、生理活性は、テストステロン合成の増大、細胞からのテストステロン放出の増大、精子数の増大および精子運動性の増大からなる群から選択される。

40

【 0 0 1 4 】

本発明のさらに別の側面により、前記方法により調製されたユウリコマ ロンギフォリアの生理活性化合物が提供される。

本発明のさらに別の側面により、性機能障害または男性不妊症の治療における使用のためのユウリコマ ロンギフォリアの水性抽出物を含む組成物が提供される。該使用は、ユウリコマ ロンギフォリアの水性抽出物のフラクションを含む組成物の量を、かかる治療を必要とする対象に投与することを含む。フラクションは、約 4 3 0 0 ダルトンの分子量を

50

有するペプチドを含む。

【0015】

投与される量は、テストステロン合成の増大、細胞からのテストステロン放出の増大、精子数の増大および精子運動性の増大からなる群から選択される活性を増大するために効果的な量である。本発明の更なる側面により、テストステロン合成の増大、細胞からのテストステロン放出の増大、精子数の増大および/または精子運動性の増大のためのユウリコマ ロンギフォリアの水性抽出物を含む組成物の使用が提供される。

【0016】

該使用は、かかる治療が必要な対象に、テストステロン合成、精巣細胞からのテストステロン放出、精子数および精子運動性を増大させるためにそれぞれ効果的な量の、前記ユウリコマ ロンギフォリア組成物を投与することを含む。 10

本発明のさらに別の側面により、医薬組成物が提供される。該組成物は、効果的な量の前記組成物とともに薬学的に許容し得るキャリアを含む。

本発明のこれらおよび他の側面は、以下に一層詳細に記載されるであろう。

【0017】

発明の詳細な説明

本発明は、男性不妊症および性機能障害の治療における使用のための、ユウリコマ ロンギフォリアの抽出物の生理活性フラクションの使用を対象とする。男性不妊症は、広く知れ渡った問題であり、限定されずに、異常な性欲、異常な精子運動性および異常な精子数を含む多くの側面を包含する。これらの種類の異常は、異常に低いテストステロンレベルに関連する。男性不妊症は、治療が困難である。 20

【0018】

例えば、「不妊男性の三分の二は、精液パラメータの部分的な減少および低い受精能力 (subfertility) を有し」、そして「多様な経験的治療法 (例えば、テストステロンリバウンド、性腺刺激ホルモン、抗エストロゲン) は、失敗に終わった」 (Harrison's Principles of Internal Medicine, 1998)。不妊症に加えて、減少したテストステロンレベルは、多くの高齢および時には若い男性を悩ます性的機能の欠如および減少した性欲に関連し得る。本発明はまた、かかる生理活性フラクションを含む、生殖能力および抗性機能障害製剤を対象とする。

【0019】

本発明は、(テストステロンの放出若しくは産生または精子運動性若しくは精子数を増大させるための) ユウリコマ ロンギフォリアの生理活性成分の、ペプチド分子、おそらくグリコペプチドとしての同定を含む。以下の例に示されるように、約 4300 ダルトンの分子量を有するペプチドが、最終的に逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 精製工程で終わる、一連のクロマトグラフィー法により精製された。単離および精製された生理活性フラクションの分析は、数種の糖残基を伴う約 4300 ダルトンの生理活性ペプチドの存在を示した。 30

【0020】

本明細書記載のクロマトグラフィー法における出発物質としてのユウリコマ ロンギフォリア抽出物は、ユウリコマ ロンギフォリアの水性抽出により得ることができる。好ましい態様においては、植物の根だけが用いられる。好ましい態様においては、根は粉末にされる。多様な親水性溶媒が抽出手順に使用され、これは、例えば水、メタノール、エタノールおよび他の低級アルキルアルコールを含む。粉末にされた根は、溶媒中でボイルされてもよく、そして残屑は遠心分離により抽出物から除去される。水性抽出物をさらに精製するために、多回抽出が実施され得る。 40

【0021】

本明細書に記載されるように、多様なクロマトグラフィー手順を、ユウリコマ ロンギフォリアの活性成分を含有するフラクションの単離に用いることができる。かかるクロマトグラフィー法は、サイズ排除クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、逆相 HPLC およびイオン交換クロマトグラフィー 50

を含む。

【0022】

一態様において、クロマトグラフィー手順は、サイズ排除クロマトグラフィーであり得る。当業者には理解されるであろうが、いくつかの態様において、サイズ排除クロマトグラフィーは、Bio-Gel P-2またはBio-Gel P-4などのポリアクリルアミドビーズで実施してもよく、および他の態様において、サイズ排除クロマトグラフィーは、同一または他の製造業者からのサイズ排除製品で実施され得る。サイズ排除材料および方法の選択方法は、クロマトグラフ技術に精通する人にとっては、慣例的であろう。

【0023】

他の態様において、クロマトグラフィー手順は逆相HPLCであり得る。好ましくは、一態様において、カラムは、シリカベーズの吸着剤を含む。いくつかの態様において、逆相HPLCカラムは、C4（ブチルジメチルクロロシラン）カラムである。他の態様においては、逆相HPLCカラムは、C18（オクタデシル）カラムである。当業者には理解されるであろうが、カラムもまた、限定されずに、C8、C1（トリメチルクロロシラン）、CNまたはフェニルカラムの中から選択され得る。逆相HPLCカラム、吸着剤、および吸着剤修飾の選択方法は、クロマトグラフ技術に精通する人にとっては、慣例的であろう。

【0024】

ユウリコマ ロンギフォリア抽出物フラクションの特性を評価するために、フラクションの製剤を用いて、多様な実験が実施された。これらの実験の詳細は、以下の例において、提供する。精子の運動性、数およびテストステロンレベルをアッセイするための代替的な方法は、当業者には十分に公知であり（例えば、Harrison's Principles of Internal Medicine, 1998; Winters et al., 1991; Froman and McLean, 1996; Bomman, et al., 1993を参照）、そして生理活性のフラクションのアッセイに有用であることが理解されるであろう。他の態様において、ユウリコマ ロンギフォリア抽出物フラクションの評価は、本明細書で記載されるように、行動パラメータをモニターすることを含み得る。

【0025】

一組の態様において、ユウリコマ ロンギフォリア由来組成物（例えば、ユウリコマ ロンギフォリア抽出物のフラクション）に加えて、本発明の製剤は、経口投与のための薬学的に許容し得るキャリアを含む。経口投与を容易にするために、ユウリコマ ロンギフォリア由来組成物は、任意の多様な経口投与のための薬学的に許容し得るキャリアと混合され得る。

【0026】

用語「経口投与のための薬学的に許容し得るキャリア」に関しては、組成物が、無毒性であり、ヒト胃腸系を刺激せず、そして溶液、シロップ、エマルジョン、ゲルまたは固体を形成するために、ユウリコマ ロンギフォリア由来組成物と混合可能であることを意味する。静脈内、筋肉内、皮下または一般に、非経口投与のための製剤もまた、当該技術分野において公知の方法により製造され得る。

【0027】

経口投与のために薬学的に許容し得るキャリアとして機能することができる物質のいくつかの例は、ラクトース、グルコースおよびスクロースなどの糖；トウモロコシ澱粉およびジャガイモ澱粉などの澱粉；セルロースおよびその誘導体、例えばナトリウムカルボキシメチルセルロース、エチルセルロースおよびセルロースアセテートなど；粉末トラガカント；麦芽；ゼラチン；タルク；ステアリン酸；ステアリン酸マグネシウム；硫酸カルシウム；

【0028】

落花生油、綿実油、胡麻油、オリーブ油、トウモロコシ油などの植物油；プロピレングリコール、グリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコールなどの

10

20

30

40

50

ポリオール；ポリビニルピロリドン；アルギン酸；パイロジェンフリー水；等張生理食塩液；リン酸緩衝溶液；ココアバター；乳化剤；並びに医薬製剤に用いられる他の無毒の適合物質が挙げられる。

【0029】

湿潤剤およびステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤、並びに着色剤、着香剤、賦形剤、錠剤加工剤、安定剤、酸化防止剤および防腐剤もまた存在可能である。他の適合医薬添加物および活性成分は、本発明の組成物への使用のための薬学的に許容し得るキャリアに含まれる。

【0030】

経口投与のための製剤は、遅延放出性および長期放出性製剤を含む、錠剤、キャプレット、ソフトおよびハードゼラチンカプセル、ピル、分散可能な粉末剤または顆粒剤、トローチ剤、サシェ、カシェ剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤、液剤、シロップ剤、噴霧剤、（固体としてまたは液状媒体中）等の形態であり得る。

10

【0031】

他の態様の組において、ユウリコマ ロンギフォリア由来組成物（例えばユウリコマ ロンギフォリア抽出物のフラクション）に加えて、本発明の製剤は、局所適用のための薬学的に許容し得るキャリアを含む。かかる薬学的に許容し得るキャリアは、当該技術分野において十分に公知であり、本質的に、現在使用されており、且つ市販の任意の皮膚用製剤若しくは化粧用製剤、または現在使用されており、且つ市販の皮膚用製剤若しくは化粧用製剤の組み合わせを含み得る。

20

【0032】

したがって、ユウリコマ ロンギフォリア由来組成物を付加し、そして所望により、局所適用に好適な粘度を維持するために、水性成分および非水性成分の比率を調節することにより、市販の皮膚用製剤若しくは化粧用製剤を簡単に改質することができる。

【0033】

本明細書で用いられているように、用語「局所適用のための薬学的に許容し得るキャリア」は、ヒトの皮膚の刺激の原因とならず、且つ溶液、エマルジョン、ゲル、ローション、軟膏、バーム、クリームまたは広げられる固体若しくはペーストを形成するために、ユウリコマ ロンギフォリア由来組成物と混合できる、塗布またはすり込みによるヒトの皮膚への局所適用に好適な組成物を意味する。

30

【0034】

かかる薬学的に許容し得るキャリアは、緩和剤、界面活性剤、湿潤剤、潤滑剤、増粘剤、防水剤、殺菌剤、経皮浸透剤および防腐剤を含み得る。さらに、芳香剤、顔料などの種々の化粧剤が、局所適用のための薬学的に許容し得るキャリアに含まれる。

【0035】

性機能障害または男性不妊症の治療のための組成物の使用の一態様は、本明細書に記載されるように、ユウリコマ ロンギフォリア由来の生理活性剤を対象に投与することである。本明細書で用いられているように、対象はヒト、非ヒト霊長類、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコまたは齧歯類である。全態様において、ヒト対象が好ましい。全態様において、雄の対象が好ましい。好ましくは、対象は、性機能障害を有するかまたは不妊である疑いがある、または性機能障害若しくは不妊症と診断されたヒトである。

40

【0036】

本発明の一態様において、生理活性剤を含んでいるユウリコマ ロンギフォリア由来組成物を含む製剤を用いた、テストステロン合成、精巣細胞からのテストステロン放出、精子数および/または精子運動性を増大させるための方法が開示される。一態様において、ユウリコマ ロンギフォリア由来組成物の製剤は、テストステロン合成、テストステロン放出、精子数または精子運動性を増大させるために、当業者に公知の他の医薬とともに、投与され得る。例えば、徐放性のテストステロンパッチの適用は、ユウリコマ ロンギフォリア生理活性剤の同時投与を伴ない得る。

【0037】

50

本発明のユウリコマ ロンギフォリア生理活性製剤は、効果的な量で単独または他の化合物との複合物で投与される。効果的な量は、テストステロン合成、精巣からのテストステロン放出、精子数または精子運動性を増大させるために十分な量である。効果的な量は、当然ながら、治療されている症状の重症度；年齢、体調、大きさおよび体重を含む個々の患者のパラメータ；併用している治療；治療の頻度；並びに投与の形態に依存するであろう。

【0038】

これらの要素は、当業者に十分に公知であり、常用の実験法だけで対応できる。一般に、最大用量、即ち、信頼できる医学的判断による最高の安全用量が用いられることが好ましい。

10

【0039】

一般に、活性化合物の1日用量は、1日約0.01ミリグラム/kg～1日2000ミリグラム/kgであろう。1日1回または数回の投与において、10～500ミリグラム/kgの範囲の経口用量により、所望の結果が得られると考えられる。かかる用量で、対象の応答が十分でない場合、患者の耐性が許容する範囲で、さらにより高い用量（または異なる、より局所的な送達経路による事実上より高い用量）を用いてもよい。用量範囲は、個々の患者の治療に必要であるようにそして治療される具体的な症状に応じて調節してもよい。化合物の適切な全身的なレベルを達成するために、1日当たりの複数回投与が意図される。

【0040】

20

多様な投与経路が使用可能である。選択される特定の様式は、当然ながら、選択された特定の製剤、治療されている症状の重症度および治療的な有効性のために必要とされる用量に依存するであろう。この発明の方法は、一般的に言えば、医学的に許容可能な任意の投与様式を用いて実施してもよく、該投与様式は、臨床的に許容し得ない副作用をもたらさずに活性化合物の効果的なレベルをもたらす任意の形態を意味する。

【0041】

かかる投与形態は、経口、直腸内、局所的、鼻腔内、経皮的または非経口経路を含む。用語「非経口」は、皮下、静脈内、筋肉内または注入を含む。静脈内および筋肉内経路は、長期治療および予防には特に好適ではない。急性の緊急的な状況においては、静脈内投与が好ましい。経口投与は、患者および投与計画に好都合であるため、予防的な治療に好ましい。

30

【0042】

組成物は、好都合に、単位投薬形態で提出されてもよく、そして薬学の技術分野において十分に公知の任意の方法により調製され得る。一般に、組成物は、活性化合物を液体キャリア、細かく分割された固体キャリアまたはその両方に一樣且つ十分に結び付け、および必要であれば、次に生成物を成形することにより調製される。

【0043】

経口投与に好適な組成物は、それぞれが活性化合物の既定量を含有するカプセル剤、カシエ剤、錠剤またはトローチ剤などの離散性ユニットとして提示され得る。他の組成物は、シロップ剤、エリキシル剤、乳剤などの水性液または非水性液中の懸濁剤を含む。

40

【0044】

他の送達システムは、持続放出性、遅延放出性または徐放性送達システムを含むことができる。かかるシステムは、本発明の活性化合物の繰返される投与を回避することができ、対象および医師の利便性が増大する。多種の放出送達システムが使用可能であり、当業者に公知である。

【0045】

それらは、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリ酸無水物およびポリカプロラクトンなどのポリマーベースのシステム；コレステロールなどのステロール、コレステロールエステル並びに脂肪酸またはモノ-、ジ-およびトリ-グリセリドなどの中性脂肪を含む脂質の非ポリマーシステム；ヒドロゲル放出システム；サイラスティックシステム；ペプチドベ-

50

スのシステム；ワックスコーティング；慣用の結合剤および賦形剤を用いた圧縮錠剤、部分的に連結されたインプラントなどを含む。

【0046】

具体例としては、限定されずに：(a)マトリックス内の形態に多糖類が含有されている、米国特許第4,452,775号(Kent)；同第4,667,014号(Nestoret al.)；並びに同第4,748,034号および同第5,239,660号(Leonard)に記載のエロージョンシステム(erosional systems)、並びに(b)活性成分が制御された割合でポリマーを介して浸透する、米国特許第3,832,253号(Higuchi et al.)および同第3,854,480号(Zaffaroni)に記載の拡散システムが挙げられる。さらに、ポンプベースのハードウェア送達システムが使用可能であり、このいくつかは、移植に適合する。

【0047】

例

例1：ユウリコマ ロンギフォリア生理活性フラクションの単離

イントロダクション

部分的に精製されたユウリコマ ロンギフォリアの根の抽出物が、還流および二回のサイズ排除クロマトグラフィーを含むいくつかの精製工程により得られた。

【0048】

方法

ユウリコマ ロンギフォリアの生理活性フラクションの単離の第一工程は、ユウリコマ ロンギフォリア根500gの粉末化であり、次いで8Lの蒸留水で8時間ボイルした。次に、ボイルされた混合物を遠心分離し、ペレットを廃棄し、そして洗浄した上澄み液を回収および凍結乾燥して、収量約30gを得た。このフラクションを「FDAE」として識別し、例3および例4における更なる精製およびアッセイのため、FDAEの一部を残した。

【0049】

残りの凍結乾燥されたFDAEペレットから、15gを蒸留水50mlに再懸濁し、内径45-mmおよびベッド体積280mlを有するBio-Gel P-2カラム(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)に負荷し、蒸留水によりカラムから溶出させた。溶出液を2つのフラクション(第一のフラクションは茶色および第二のフラクションは黄色の蛍光色であり、色で区別された)で回収した。第一のフラクション(フラクション1)を凍結乾燥した。

【0050】

凍結乾燥したフラクションから1.5gを、10~15mlの蒸留水に再懸濁し、20×800mm、ベッド体積260mlのBio-Gel P-4カラム(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)に負荷し、蒸留水で溶出した。彩色を区別することにより、溶出液を4つのフラクションで回収し、凍結乾燥して、生理活性の測定に用いた。図1は、精製の模式図を要約するものである。

【0051】

結果

第三の溶出されたフラクションを、「F3AE」として識別した。F3AEの一部を、例2で記載されるように生理活性実験に利用し、F3AEの一部を、さらに、例3で記載したように精製した。

【0052】

例2：ユウリコマ ロンギフォリア精製手順からの生理活性フラクションのバイオアッセイ

イントロダクション

第三の溶出フラクションF3AEの生理活性を評価するために、溶出したフラクションの一部を、標準のテストステロンおよび精液評価方法を用いて評価した。

【0053】

10

20

30

40

50

方法

標準の手順を用い、テストステロンのインビボ放射免疫測定を、テストおよびコントロール動物の血漿を用いて実施した。さらに、インビトロホルモンアッセイを、標準のガスクロマトグラフィー法を用いて実施した。濃度および運動性に関する精子の分析を、標準の方法を用いて実施した。

結果

バイオアッセイの結果を表 1 に示す。

【 0 0 5 4 】

表 1 . インビボおよびインビトロにおける生理活性アッセイ結果

【 表 1 】

10

アッセイ	試料	コントロール
インビボ ホルモンアッセイ — RIA	114.6pg/ml	67.6pg/ml
インビトロ ホルモンアッセイ — GC	2.4 µg	0.9 µg
精子分析 — 濃度	99 Mil/ml	74 Mil/ml
— 前進精子	39%	22%
— 運動率	71%	64%

20

【 0 0 5 5 】

例 3 : ユウリコマ ロンギフォリアの生理活性フラクシジョンの単離のための代替的方法
イントロダクション

ユウリコマ ロンギフォリアからのフラクシジョンの最初の分離 (例 1 参照) 後に、F D A E の一部 (例 1 参照) およびユウリコマ ロンギフォリア根から単離した生理活性フラクシジョン F 3 A E の一部 (例 2 参照) を、逆相 H P L C 方法を用いて精製し、アミノ酸分析、糖分析および質量分析法を用いて特性評価した。

【 0 0 5 6 】

方法

フラクシジョン F D A E またはフラクシジョン F 3 A E (例 1 および例 2 の方法の項を参照) の一方を、逆相分離のために R a i n i n H P L C システム (R a i n i n I n s t r u m e n t C o . , W o b u r n , M A) の R a i n i n C 4 カラムに負荷した。H P L C 精製を、一定の 1 m l / 分の流速で、6 0 分実施した。時間 0 に、蒸留水約 1 m g / m l で、フラクシジョン F D A E またはフラクシジョン F 3 A E の一方を注入した。

30

【 0 0 5 7 】

最初の 1 0 分間は、移動相は、0 . 1 % トリフルオロ酢酸 (T F A) が 1 0 0 % であり、次いで、実行の残りの 5 0 分間は、0 . 1 % T F A が 1 0 0 % からアセトニトリルが 1 0 0 % に移行した。実行中にフラクシジョンを回収し、溶出液を 2 4 5 - n m U V 検出でモニターし、次いで、凍結乾燥した。図 3 は、分離によるクロマトグラフトレースを提供するものであり、上図が F D A E についてのものおよび下図が F 3 A E についてのものである。

40

【 0 0 5 8 】

図 3 の下図において、「*」により示されているシングルピークは、例 2 で特性評価された生理活性フラクシジョンを示す。9 分に溶出されたシングルピークの内容は、標準の方法を用いた、ペプチド分析および糖分析に供された。質量分析法もまた、製造業者の使用説明書に従い、表面増強レーザー脱離イオン化 (S E L D I ; 例えば、C i p h e r g e n , P a l o A l t o , C A) を用いて、9 分フラクシジョンについて実施した。

【 0 0 5 9 】

結果

9 分の溶出シングルピークは、例 2 に記載したバイオアッセイに基づき、生理活性を有す

50

ることが決定された。該ピークは、その組成物を決定するために、数種の方法により分析された。9分に溶出した化合物は、約33～36個のペプチドからなり；キシロース、グルコース、フコースを含む約3つのタイプの糖と結び付いており；そして約4300ダルトンの質量を有することが決定された。

【0060】

参考文献

- Chan K. L., C. Y. Choo, H. Morita, and H. Itokawa, (1998) High performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis of *Eurycoma longifolia*. *Planta Medica* 64: 741 - 745. 10
- Harrison's Principles of Internal Medicine, 14/e, (1998) McGraw-Hill Companies, New York.
- Winter, S. J., R. Medhamurthy, V. L. Gay, and T. M. Plant (1991) A comparison of moment to moment and diurnal changes in circulating inhibin and testosterone concentrations in male rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* 129(4): 1755 - 61.
- Froman, D. P. and D. J. McLean (1996) Objective measurement of sperm motility based upon sperm penetration of Accudenz. *Poult. Sci.* 75(6): 776 - 84. 20
- Du Toit, D., M. S. Bornman, M. P. Van Der Merwe, D. J. Du Plessis, and J. M. Oosthuizen (1993) Differential sperm motility scoring and sperm ATP concentrations. *Arch. Androl.* 30(1): 69 - 71.

【0061】

本発明は、種々の現在の好ましい態様に関して、上記のように記載されたが、多くの変更および改変がなされ得ることは、当業者であれば明らかであろう。したがって、本発明は、本明細書に記載の特定の態様に限定して理解されるものではなく、むしろ、ここに添付される請求項の思想および範囲に含まれる、全てのかかる変更および改変を包含するものとして理解されるものである。 30

本明細書で開示されている全ての参考文献は、参照によりその全体が組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

ユウリコマ ロンギフォリアの生理活性フラクションを単離するためのサイズ排除クロマトグラフィー手順の概略フローチャートを示す図である。生理活性フラクションである F D A E および F 3 A E は、指示された工程で回収される。 40

【図2】

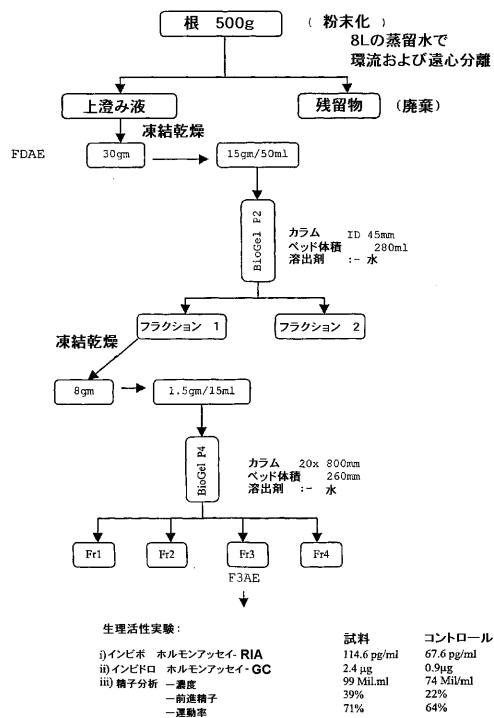
ユウリコマ ロンギフォリアの生理活性フラクションについての逆相 H P L C 精製の概略フローチャートを示す図である。

【図3】

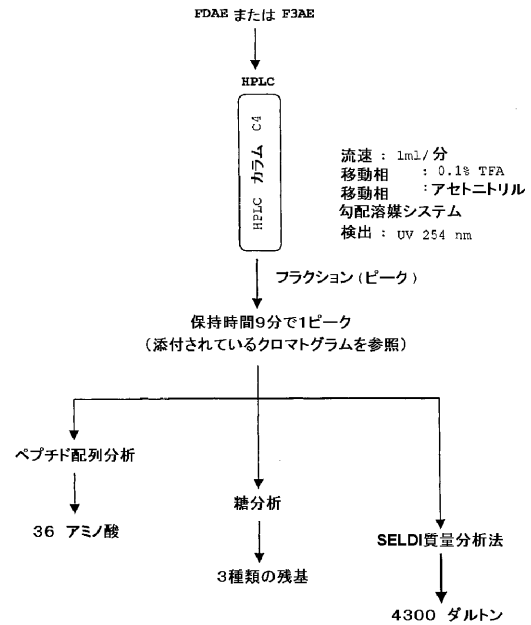
F A D E (上図) および F 3 A E (下図) について行われたユウリコマ ロンギフォリア 逆相 H P L C 精製のクロマトグラムを示す図である。トレースの下部を横切る数字および区分は、時間を分で表したものである。アスタリスク(*)は、生理活性フラクションまたはピークを示す。

【 図 1 】

図1 ユウリコマ ロンギフォリアの生理活性フラクションの単離

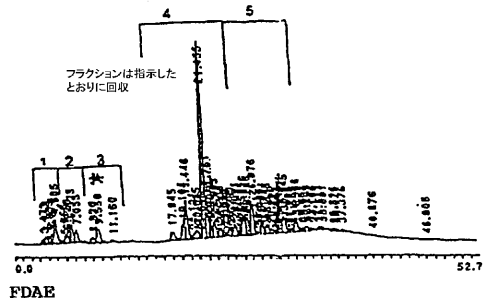


【 図 2 】

図 2
生理活性フラクション-F3AEおよびF3AEの特性評価および同定

【 図 3 】

方法: sam1
サンプリング インターバル: 0.1秒
データ:



方法: sam1
サンプリング インターバル: 0.1秒
データ:

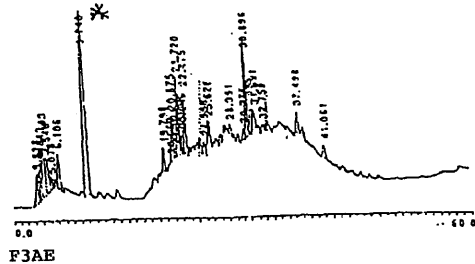


図 3 — F3AE(上図)およびF3AE(下図)について行った
ユウリコマロンギフォリア逆相HPLC精製の
クロマトグラム

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
7 March 2002 (07.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/17946 A1

(51) International Patent Classification: A61K 35/78

(21) International Application Number: PCT/US01/40101

(22) International Filing Date: 14 February 2001 (14.02.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
PI 20003988 29 August 2000 (29.08.2000) MY

(71) Applicants (for all designated States except US): GOVERNMENT OF MALAYSIA [MY/MY]; c/o Ministry of Science, Technology and the Environment, Malaysia, 14th Floor, Wisma Sime Darby, Jalan Raja Laut, 50662 Kuala Lumpur (MY); MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY [US/US]; 77 Massachusetts Avenue, Cambridge, MA 02139 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): SAMBANDAN, T. G. [MY/US]; Massachusetts Institute of Technology, 77 Massachusetts Avenue, Room 56-265, Cambridge, MA 02139 (US). RHA, ChoKyun [US/US]; Massachusetts Institute of Technology, 77 Massachusetts Avenue, Room 56-265, Cambridge, MA 02139 (US). AMINUDIN, Norhaniza [MY/MY]; Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Malaya, Kuala Lumpur

(MY). SAAD, Johari, Mohammed [MY/MY]; Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Malaya, Kuala Lumpur (MY). ABDUL KADIR, Azizol [MY/MY]; Forest Research Institute of Malaysia, Kepong, Kuala Lumpur (MY).

(74) Agent: VAN AMSTERDAM, John, R., Wolf, Greenfield & Sacks, P.C., 600 Atlantic Avenue, Boston, MA 02210 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/17946 A1

(54) Title: BIOACTIVE FRACTION OF EURYCOMA LONGIFOLIA

(57) Abstract: The invention provides new uses and products for treatment of sexual dysfunction and male infertility. The products include bioactive components of extracts from roots of the plant *Eurycoma longifolia* mixed in preparations for topical application and administration.

WO 02/17946

PCT/US01/40101

- 1 -

BIOACTIVE FRACTION OF EURYCOMA LONGIFOLIA**Field of the Invention**

The present invention relates generally to the field of bioactive natural products and, in particular, to composition derived from fractions of *Eurycoma longifolia*.

Background of the Invention

Components of *Eurycoma longifolia*, also known in Malaysia as Tongkat Ali, have been used in traditional and folk medicine. Extracts of the plant are generally believed to be useful in the treatment of multiple disorders and syndromes such as: malaria, cancer, anxiety, ulcers, and male infertility and sexual dysfunction. In the past, much of the information on the medicinal value of the plant has been anecdotal. Well-controlled, repeatable extractions and bioactivity assays may clarify the function of components. For example, studies are underway to examine extracts of *Eurycoma longifolia* that have been shown to have cytotoxic effects. These extracts, which include quassinoids, encompass compounds such as eurycomalactone, eurycomanol, and eurycomanone, which have been examined for cytotoxic properties and potential use as anti-cancer, anti-malarial, and anti-ulcer agents.

Chromatographic processes for producing quassinoid extracts from *Eurycoma longifolia* were disclosed in Chan, et. al. (1998). This reference reports the potential usefulness of such quassinoid extracts in the treatment of cancer, ulcers, malaria, and fever.

In contrast to quassinoids, whose effects have been examined following stringent purification strategies, components of *Eurycoma longifolia* with possible aphrodisiac activity and potential as treatments for male infertility and sexual dysfunction have not been isolated. Crude butanol, methanol, water, and chloroform extracted-fractions of *Eurycoma longifolia* have been examined for behavioral effects in mammals. Mixtures of compounds separated with these basic methods have been administered to male mice and rats to assess effects on the animals' sexual behaviors and performance.

Examination of the sexual effects of *Eurycoma longifolia* have focussed on the influence of the crude extracts on orientation activities of sexually experienced and naive male rats toward receptive females. Activities monitored in the treated rats include mounting, licking, and anogenital sniffing; and behaviors of the treated rats in relation to their environment were also assessed including analysis of activities such as movement,

WO 02/17946

PCT/US01/40101

- 2 -

exploration, rearing, and climbing. In addition, rats were assessed for levels of genital and non-genital grooming. Analysis of these types of behavioral elements has served as the assay for investigating the anecdotal aphrodisiac properties of *Eurycoma longifolia* and administration of the crude extracts has been correlated with increased sexual performance of treated animals. Although use of behavioral assays indicate an effect on sexual physiology from crude *Eurycoma longifolia* extracts, the research has not utilized purification strategies yielding isolated components; therefore, the art has not identified the physical properties of the *Eurycoma longifolia* candidate aphrodisiac compounds or been able to assess the effects of compounds isolated from *Eurycoma longifolia* on infertility or sexual dysfunction at the cellular level.

Summary of the Invention

It now has been discovered that particular purified components of *Eurycoma longifolia* aqueous extracts exhibit bioactivity of increasing testosterone synthesis and release and sperm activity and number. These purified components include peptides having a molecular weight of about 4300 daltons. Methods for treating male infertility and sexual dysfunction using the purified components are provided. Preparations including extracts of roots of the *Eurycoma longifolia* plant also are provided. The preparations may be formulated for application or administration by several routes.

According to one aspect of the invention, compositions including a fraction of an aqueous extract of *Eurycoma longifolia* are provided. The fraction comprises a peptide having a molecular weight of about 4300 daltons. In certain embodiments, the fraction has an activity selected from the group consisting of increasing testosterone synthesis, increasing testosterone release from cells, increasing sperm count, and increasing sperm motility. In some preferred embodiments, the peptide is a glycopeptide. In other preferred embodiments, the peptide has about 30-39 amino acids; preferably the peptide has about 36 amino acids.

According to another aspect of the invention, methods for isolating a bioactive component from an aqueous extract of *Eurycoma longifolia* are provided. The methods include preparing an aqueous extract of *Eurycoma longifolia*, and isolating the bioactive component from the fraction. The bioactive component is isolated by a chromatographic method, preferably one selected from the group consisting of reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC) and size-exclusion chromatography. The bioactive

WO 02/17946

PCT/US01/40101

- 3 -

component comprises a peptide having a molecular weight of about 4300 daltons. In certain preferred embodiments, the reverse-phase HPLC is performed using a chromatographic medium selected from the group consisting of C4 and C18. In other embodiments, the methods further include fractionating the aqueous extract using at least one size-exclusion chromatography medium selected from the group consisting of Bio-Gel P-2 and Bio-Gel P-4 prior to separation by chromatography by reversed phase HPLC. In other preferred embodiments, the bioactivity is selected from the group consisting of increasing testosterone synthesis, increasing testosterone release from cells, increasing sperm count and increasing sperm motility.

10 According to still another aspect of the invention, bioactive components of *Eurycoma longifolia* prepared by the foregoing methods are provided.

According to yet another aspect of the invention, there is provided a composition comprising an aqueous extract of *Eurycoma longifolia* for use in the treatment of sexual dysfunction or male infertility. The use includes administering to a subject in need of such treatment an amount of a composition comprising a fraction an aqueous extract of *Eurycoma longifolia*. The fraction includes a peptide having a molecular weight of about 4300 daltons. The amount administered is effective to increase an activity selected from the group consisting of increasing testosterone synthesis, increasing testosterone release from cells, increasing sperm count and increasing sperm motility. According to further aspects of the invention, use of the composition comprising an aqueous extract of *Eurycoma longifolia* for increasing testosterone synthesis, increasing testosterone release from testis cells, increasing sperm count and/or increasing sperm motility are provided. The use includes administering to a subject in need of such treatment an amount of the foregoing *Eurycoma longifolia* compositions effective to increase testosterone synthesis, testosterone release from testis cells, sperm count and sperm motility, respectively.

25 According to still another aspect of the invention, pharmaceutical compositions are provided. The compositions include an effective amount of the foregoing compositions along with a pharmaceutically acceptable carrier.

These and other aspects of the invention will be described in greater detail below.

30

Brief Description Of The Drawings

WO 02/17946

PCT/US01/40101

- 4 -

Fig. 1 shows a schematic flowchart of the size-exclusion chromatographic procedure for isolating the bioactive fraction of *Eurycoma longifolia*. Bioactive fractions FDAE and F3AE are recovered at the steps indicated.

Fig. 2 shows a schematic flowchart of the reverse-phase HPLC purification for the bioactive fraction of *Eurycoma longifolia*.

Fig. 3 shows a chromatogram of the *Eurycoma longifolia* reverse-phase HPLC purification runs for FDAE (top trace) and F3AE (lower trace). Numbers and divisions across bottom of traces indicate time of elution in minutes. The asterisks (*) indicate bioactive fraction or peak.

Detailed Description of the Invention

The present invention is directed to the use of bioactive fractions of extracts of *Eurycoma longifolia* for use in treatment of male infertility and sexual dysfunction. Male infertility is a widespread problem and encompasses many aspects including but not limited to: abnormal libido, abnormal sperm motility, and abnormal sperm count. These types of abnormalities may be related to abnormally low testosterone levels. Male infertility is difficult to treat. For example, "two thirds of infertile men have a partial reduction in semen parameters and subfertility" and "a variety of empirical therapies (e.g. testosterone rebound, gonadotrophins, antiestrogens) have been unsuccessful" (Harrison's Principles of Internal Medicine, 1998). In addition to infertility, reduced testosterone levels may be correlated to lack of sexual function and reduced libido that plague many aging, and in some cases young, men. The present invention is also directed to fertility and anti-sexual dysfunction preparations including such bioactive fractions.

The present invention includes the identification of the bioactive component of *Eurycoma longifolia* (for increasing testosterone release or production or sperm motility or number) as a peptide molecule, likely a glycopeptide. As shown in the Examples below, a peptide having a molecular weight of about 4300 daltons was purified by a series of chromatographic processes culminating in a reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) purification step. Analysis of the isolated and purified bioactive fraction indicated the presence of a bioactive peptide of about 4300 daltons associated with several types of sugar residues.

WO 02/17946

PCT/US01/40101

- 5 -

Eurycoma longifolia extracts as starting materials for the chromatographic processes described herein may be obtained by aqueous extraction of *Eurycoma longifolia*. In preferred embodiments, only the roots of the plant are used. In preferred embodiments the roots are pulverized. A variety of hydrophilic solvents can be used in the extraction procedure, including e.g., water, methanol, ethanol, and other lower alkyl alcohols. Pulverized roots may be boiled in a solvent and debris removed from the extract by centrifugation. Multiple extractions may be performed to further refine the aqueous extract.

As described herein, a variety of chromatographic procedures can be used to isolate fractions containing the active ingredient of *Eurycoma longifolia*. Such chromatographic processes include size-exclusion chromatography, gel-filtration chromatography, high-performance liquid chromatography (HPLC), reverse-phase HPLC, and ion-exchange chromatography. In one embodiment the chromatographic procedure may be size-exclusion chromatography. As would be understood by one skilled in the art, in some embodiments size-exclusion chromatography may be performed with polyacrylamide beads such as Bio-Gel P-2 or Bio-Gel P-4 and in other embodiments the size exclusion chromatography may be performed with other size-exclusion products from the same or other manufacturers. Methods of selecting size-exclusion materials and methods would be routine to those familiar with the chromatographic arts.

In other embodiments the chromatographic procedure may be reverse-phase HPLC. Preferably, in one embodiment the column comprises a silica based adsorbent. In some embodiments the reverse-phase HPLC column is a C4 (butyldimethylchlorosilane) column. In other embodiments the reverse-phase HPLC column is a C18 (octadecyl) column. As would be understood by one of ordinary skill in the art, also the column may be selected from among, but is not limited to: C8, C1 (trimethylchlorosilane), CN, or phenyl columns. Methods of selecting reverse-phase HPLC columns, adsorbents, and adsorbent modifications would be routine to those familiar with the chromatographic arts.

To assess the properties of *Eurycoma longifolia* extract fractions, a variety of experiments were performed using formulations of fractions. The details of these experiments are provided in the Examples below. Alternative methods to assay sperm motility, number, and testosterone levels are well known to those in the art, (e.g. see: Harrison's Principles of Internal Medicine, 1998; Winters et al., 1991; Froman and McLean, 1996; Bomman, et al, 1993) and would be understood to be usable in the assay of the

WO 02/17946

PCT/US01/40101

- 6 -

bioactive fraction. In other embodiments, assessment of *Eurycoma longifolia* extract fractions may involve monitoring behavioral parameters as described herein.

In one set of embodiments, in addition to *Eurycoma longifolia* derived-compositions, e.g., fractions of *Eurycoma longifolia* extracts, the preparations of the present invention

5 include a pharmaceutically acceptable carrier for oral administration.

In order to facilitate oral administration, *Eurycoma longifolia*-derived compositions may be mixed with any of a variety of pharmaceutically acceptable carriers for oral administration. By the term "pharmaceutically acceptable carrier for oral administration" is meant a composition which is non-toxic, is not irritating to the human gastrointestinal system,

10 and which can be mixed with *Eurycoma longifolia*-derived compositions to form a solution, syrup, emulsion, gel, or solid. Preparations for intravenous, intramuscular, subcutaneous or, in general, parenteral administration may also be produced by methods known in the art.

Some example of substances which can serve as pharmaceutically acceptable carriers for oral administration are sugars such as lactose, glucose and sucrose; starches such as corn starch and potato starch; cellulose and its derivatives, such as sodium carboxymethylcellulose, ethylcellulose, and cellulose acetate; powdered tragacanth; malt; gelatin; talc; stearic acid; magnesium stearate; calcium sulfate; vegetable oils such as peanut oil, cotton seed oil, sesame oil, olive oil, and corn oil; polyols such as propylene glycol, glycerine, sorbitol, mannitol, and polyethylene glycol; polyvinylpyrrolidone; alginic acid; pyrogen-free water; isotonic saline;

20 phosphate buffer solutions; cocoa butter; emulsifiers; as well as other non-toxic compatible substances used in pharmaceutical formulations. Wetting agents and lubricants such as magnesium stearate, as well as coloring agents, flavoring agents, excipients, tableting agents, stabilizers, antioxidants, and preservatives, can also be present. Other compatible pharmaceutical additives and actives may be included in the pharmaceutically acceptable carrier for use in the compositions of the present invention.

The preparations for oral administration may be in the form of tablets, caplets, soft and hard gelatin capsules, pills, including delayed or prolonged release formulations, dispersible powders or granules, lozenges, sachets, cachets, elixirs, suspensions, emulsions, solutions, syrups, aerosols, (as a solid or in a liquid medium), and the like.

30 In other sets of embodiments, in addition to *Eurycoma longifolia*-derived-compositions, e.g., fractions of *Eurycoma longifolia* extracts, the preparations of the present invention include a pharmaceutically acceptable carrier for topical application. Such

WO 02/17946

PCT/US01/40101

- 7 -

pharmaceutically acceptable carriers are well known in the art and, in essence, may include any currently used and commercially available dermatological or cosmetic preparation, or combinations of currently used and commercially available dermatological or cosmetic preparations. Thus, one may simply modify an available dermatological or cosmetic preparation by adding a *Eurycoma longifolia*-derived composition and adjusting, as necessary, the ratios of aqueous and non-aqueous components to maintain a consistency suitable for a topical application.

As used herein, the term "pharmaceutically acceptable carrier for topical application" means a composition suitable for topical application to human skin by spreading or rubbing, which does not cause irritation to human skin, and which can be mixed with *Eurycoma longifolia*-derived compositions to form a solution, emulsion, gel, lotion, ointment, balm, cream, or spreadable solid or paste. Such pharmaceutically acceptable carriers may include emollients, surfactants, humectants, lubricants, thickeners, waterproofing agents, bactericidal agents, percutaneous penetrating agents and preservatives. In addition, various cosmetic agents, such as fragrances and pigments may be included in a pharmaceutically acceptable carrier for topical application.

One embodiment where use of a composition for the treatment of sexual dysfunction or male infertility as described herein is the administration to a subject the bioactive agent derived from *Eurycoma longifolia*. As used herein, a subject is a human, non-human primate, cow, horse, pig, sheep, goat, dog, cat, or rodent. In all embodiments human subjects are preferred. In all embodiments male subjects are preferred. Preferably the subject is a human suspected of having sexual dysfunction or of being infertile or having been diagnosed with sexual dysfunction or infertility.

In one embodiment of the present invention, a method for increasing: testosterone synthesis, testosterone release from testis cells, sperm count, and/or sperm motility is disclosed which employs a preparation including a *Eurycoma longifolia*-derived composition that comprises the bioactive agent. In one embodiment, the preparation of *Eurycoma longifolia*-derived composition may be administered in conjunction with other medicaments known to those of skill in the art to increase: testosterone synthesis, testosterone release, sperm count, or sperm motility. For example, application of a slow-release testosterone patch may be accompanied with concurrent administration of the *Eurycoma longifolia* bioactive formulation.

WO 02/17946

PCT/US01/40101

- 8 -

The *Eurycoma longifolia* bioactive formulations of the invention are administered in effective amounts, alone or in a cocktail with other compounds. An effective amount is one sufficient to increase: testosterone synthesis, testosterone release from the testis, sperm count or sperm motility. Effective amounts will depend, of course, on the severity of the condition being treated; individual patient parameters including age, physical condition, size and weight; concurrent treatment; frequency of treatment; and the mode of administration. These factors are well known to those of ordinary skill in the art and can be addressed with no more than routine experimentation. It is preferred generally that a maximum dose be used, that is the highest safe dose according to sound medical judgement.

Generally, daily doses of active compounds will be from about 0.01 milligrams/kg per day to 2000 milligrams/kg per day. It is expected that oral doses in the range of 10 to 500 milligrams/kg, in one or several administrations per day, will yield the desired results. In the event that the response in a subject is insufficient at such doses, even higher doses (or effective higher doses by a different, more localized delivery route) may be employed to the extent that patient tolerance permits. Dose ranges can be adjusted as necessary for the treatment of individual patients and according to the specific condition treated. Multiple doses per day are contemplated to achieve appropriate systemic levels of compounds.

A variety of administration routes are available. The particular mode selected will depend of course, upon the particular formulation selected, the severity of the condition being treated and the dosage required for therapeutic efficacy. The methods of this invention, generally speaking, may be practiced using any mode of administration that is medically acceptable, meaning any mode that produces effective levels of the active compounds without causing clinically unacceptable adverse effects. Such modes of administration include oral, rectal, topical, nasal, transdermal or parenteral routes. The term "parenteral" includes subcutaneous, intravenous, intramuscular, or infusion. Intravenous and intramuscular routes are not particularly suited for long term therapy and prophylaxis. Intravenous administration is preferred in acute emergency situations. Oral administration will be preferred for prophylactic treatment because of the convenience to the patient as well as the dosing schedule.

The compositions may conveniently be presented in unit dosage form and may be prepared by any of the methods well known in the art of pharmacy. In general, the compositions are prepared by uniformly and intimately bringing the active compounds into

WO 02/17946

PCT/US01/40101

- 9 -

association with a liquid carrier, a finely divided solid carrier, or both, and then, if necessary, shaping the product.

Compositions suitable for oral administration may be presented as discrete units such as capsules, cachets, tablets, or lozenges, each containing a predetermined amount of the active compound. Other compositions include suspensions in aqueous liquors or non-aqueous liquids such as a syrup, an elixir, or an emulsion.

Other delivery systems can include time release, delayed release or sustained release delivery systems. Such systems can avoid repeated administrations of the active compounds of the invention, increasing convenience to the subject and the physician. Many types of release delivery systems are available and known to those of ordinary skill in the art. They include polymer based systems such as polylactic and polyglycolic acid, polyanhydrides and polycaprolactone; nonpolymer systems that are lipids including sterols such as cholesterol, cholesterol esters and fatty acids or neutral fats such as mono-, di- and triglycerides; hydrogel release systems, silastic systems; peptide based systems; wax coatings, compressed tablets using conventional binders and excipients, partially fused implants and the like. Specific examples include, but are not limited to: (a) erosional systems in which the polysaccharide is contained in a form within a matrix, found in U.S. Patent Nos. 4,452,775 (Kent); 4,667,014 (Nestor et al.); and 4,748,034 and 5,239,660 (Leonard) and (b) diffusional systems in which an active component permeates at a controlled rate through a polymer, found in U.S. Patent Nos. 3,832,253 (Higuchi et al.) and 3,854,480 (Zaffaroni). In addition, a pump-based hardware delivery system can be used, some of which are adapted for implantation.

Examples

Example 1: Isolation of *Eurycoma longifolia* bioactive fractions

25

Introduction

Partially purified extracts of roots from *Eurycoma longifolia* were obtained through several purification steps including reflux and two rounds of size-exclusion chromatography.

30

Method

The initial step in the isolation of bioactive fraction of *Eurycoma longifolia* was the pulverization of 500gm *E. longifolia* root followed by boiling 8hr in 8L distilled water. The

WO 02/17946

PCT/US01/40101

- 10 -

boiled mixture was then centrifuged, the pellet discarded, and the clarified supernatant collected and freeze dried yielding approximately 30gm. This fraction was identified as "FDAE" and a portion of the FDAE was set aside for additional purification and assay in Examples 3 and 4. From the remaining freeze-dried FDAE pellet, 15gm was resuspended in 50ml distilled water and loaded onto a Bio-Gel P-2 column (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) with 45-mm internal diameter and 280-ml bed volume, and eluted from the column with distilled water. The eluate was collected in two fractions, which were distinguished by color with the initial fraction brown in color and second fraction fluorescent yellow in color. The initial fraction (fraction one) was freeze dried.

From the freeze-dried fraction 1.5 gm was resuspended in 10-15ml distilled water and loaded onto a 20 x 800mm, 260ml bed volume Bio-Gel P-4 column (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) and eluted off with distilled water. Based on distinguishing coloration, four fractions of the eluate were collected and freeze dried and used to measure bioactivity. Figure 1 summarizes the purification scheme.

Results

The third eluted fraction was identified as "F3AE". A portion of F3AE was utilized in bioactivity experiments as described in Example 2 and a portion of F3AE was further purified as described in Example 3.

Example 2: Bioassay of bioactive fractions from *Eurycoma Longifolia* purification procedures.

Introduction

To assess the bioactivity of the third eluted fraction F3AE a portion of the eluted fraction was assayed using standard testosterone and sperm assessment methods.

Method

Using standard procedures, *in vivo* radioimmunoassay measurements of testosterone were made using plasma from test and control animals. In addition, *in vitro* hormone assays were performed using standard gas chromatographic methods. Sperm analysis for concentration and motility were performed using standard methods.

WO 02/17946

PCT/US01/40101

- 11 -

Results

The results of the bioassays are given in Table 1.

5 **Table 1. Results of *in vivo* and *in vitro* assays of bioactivity**

Assay	Sample	Control
<i>In vivo</i> hormone assays - RIA	114.6pg/ml	67.6pg/ml
<i>In vitro</i> hormone assay - GC	2.4 µg	0.9 µg
Sperm analysis -concentration	99 Mil/ml	74 Mil/ml
-progressive sperm	39%	22%
-motility rate	71%	64%

Example 3: Alternative method for isolation of bioactive fractions of *Eurycoma longifolia*

10

Introduction

Following the initial separation of the fractions from *Eurycoma longifolia* (see Example 1). A portion of FDAE (See Example 1) and a portion of the bioactive fraction F3AE isolated from the *E. longifolia* root (see Example 2) was purified using reverse-phase HPLC methods and characterized using amino acid analysis, sugar analysis, and mass spectroscopy methods.

15

Method

Either fraction FDAE or fraction F3AE (see Example 1 and 2 Methods sections) was loaded onto a Rainin C4 column on a Rainin HPLC system (Rainin Instrument Co., Woburn, MA) for reverse-phase separation. The 60 minute HPLC purification was run utilizing a constant 1ml/min flow rate. Either FDAE or F3AE at about 1mg/ml distilled water, was injected at time 0. The mobile phase was 100% 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) for the first 10 minutes and was then transitioned from 100% 0.1% TFA to 100% acetonitrile over the remaining 50 minutes of the run. Fractions were collected throughout the run and the eluate was monitored with 245-nm UV detection, and subsequently freeze dried. Fig. 3 provides

20

25

WO 02/17946

PCT/US01/40101

- 12 -

chromatographic traces from the separations with A from the FDAE run and B from the F3AE run. A single peak indicated by the "*" in lower trace in Fig. 3 represents the bioactive fraction characterized in Example 2. The content of the single peak eluted at nine minutes was subjected to peptide analysis and sugar analysis using standard methods. Mass

5 spectroscopy analysis was also performed on the nine-minute fraction as per manufacturer's instructions using surface enhanced laser desorption ionization (SELDI; e.g., Ciphergen, Palo Alto, CA).

Results

10 The single peak elution at nine minutes was determined to be bioactive based on the bioassays described in Example 2. The peak was analyzed by several methods to determine its composition. The compound eluted at nine minutes was determined to consist of about 33-36 peptides; to be associated with about three types of sugars including: xylose, glucose, and fucose; and to have a mass of about 4300 daltons.

15

References

Chan K.L., C.Y. Choo, H. Morita, and H. Itokawa, (1998) High performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis of *Eurycoma longifolia*. *Planta Medica* 64:741-
20 745.

Harrison's Principles of Internal Medicine, 14/e, (1998) McGraw-Hill Companies, New York.

25 Winter., S.J., R. Medhamurthy, V.L. Gay, and T.M. Plant (1991) A comparison of moment to moment and diurnal changes in circulating inhibin and testosterone concentrations in male rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* 129(4):1755-61.

Froman, D.P. and D.J. McLean (1996) Objective measurement of sperm motility based upon sperm penetration of Accudenz. *Poult. Sci.* 75(6):776-84.
30

WO 02/17946

PCT/US01/40101

- 13 -

Du Toit, D. , M. S. Bornman, M. P. Van Der Merwe, D. J. Du Plessis, and J.M. Oosthuizen
(1993) Differential sperm motility scoring and sperm ATP concentrations. *Arch. Androl.*
30(1):69-71.

5 Although the invention has been described above with respect to various presently
preferred embodiments, it will be apparent to one of ordinary skill in the art that many
variations and modifications may be made. Therefore, the invention is not to be understood
as limited to the particular embodiments recited herein but, rather, is to be understood as
embracing all such variations and modifications which fall within the spirit and scope of the
10 claims appended hereto.

 All references disclosed herein are incorporated by reference in their entirety.

 We claim:

WO 02/17946

PCT/US01/40101

- 14 -

CLAIMS:

1. A composition comprising a fraction of an aqueous extract of *Eurycoma longifolia*,
wherein the fraction comprises a peptide having a molecular weight of about 4300 daltons.
5
2. The composition of claim 1, wherein the fraction has an activity selected from the
group consisting of increasing testosterone synthesis, increasing testosterone release from
cells, increasing sperm count, and increasing sperm motility.
- 10 3. The composition of claim 1, wherein the peptide is a glycopeptide.
4. The composition of claim 1, wherein the peptide has about 30-39 amino acids.
5. The composition of claim 4, wherein the peptide has about 36 amino acids.
15
6. A method for isolating a bioactive component from an aqueous extract of *Eurycoma
longifolia*, comprising
preparing an aqueous extract of *Eurycoma longifolia*, and
isolating the bioactive component by a chromatographic method selected from the
20 group consisting of reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC) and size-
exclusion chromatography, wherein the bioactive component comprises a peptide having a
molecular weight of about 4300 daltons.
7. The method of claim 6, wherein the reverse-phase HPLC is performed using a
25 chromatographic medium selected from the group consisting of C4 and C18.
8. The method of claim 6, further comprising fractionating the aqueous extract using at
least one size-exclusion chromatography medium selected from the group consisting of Bio-
Gel P-2 and Bio-Gel P-4 prior to separation by chromatography by reversed phase HPLC.
30

WO 02/17946

PCT/US01/40101

- 15 -

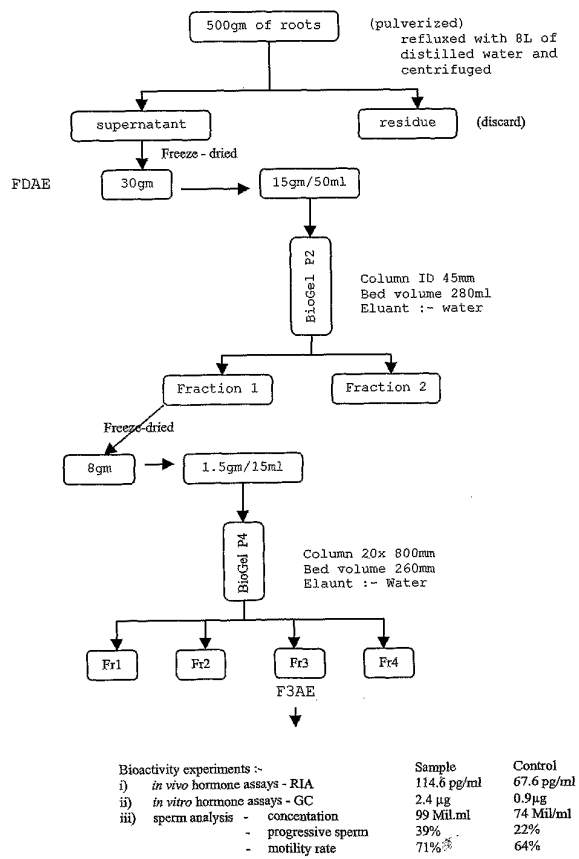
9. The method of claim 6, wherein the bioactivity is selected from the group consisting of increasing testosterone synthesis, increasing testosterone release from cells, increasing sperm count and increasing sperm motility.
- 5 10. A bioactive component of *Eurycoma longifolia* prepared by the method of claim 6.
11. Use of the composition of claim 1 for the treatment of sexual dysfunction or male infertility comprising administering to a subject in need of such treatment an amount of the composition effective to increase an activity selected from the group consisting of increasing
- 10 testosterone synthesis, increasing testosterone release from cells, increasing sperm count and increasing sperm motility.
12. Use of the composition of claim 1 for increasing testosterone synthesis comprising administering to a subject in need of such treatment an amount of the composition effective to
- 15 increase testosterone synthesis.
13. Use of the composition of claim 1 for increasing testosterone release from testis cells comprising administering to a subject in need of such treatment an amount of the composition effective to increase testosterone release from testis cells.
- 20 14. Use of the composition of claim 1 for increasing sperm count comprising administering to a subject in need of such treatment an amount of the composition effective to increase sperm count.
- 25 15. Use of the composition of claim 1 for increasing sperm motility comprising administering to a subject in need of such treatment an amount of the composition effective to increase sperm motility.
- 30 16. A pharmaceutical composition comprising an effective amount of the composition of claim 1 and a pharmaceutically acceptable carrier.

WO 02/17946

PCT/US01/40101

1/3

Figure 1 -Isolation of Bioactive Fraction of *Eurycoma longifolia*

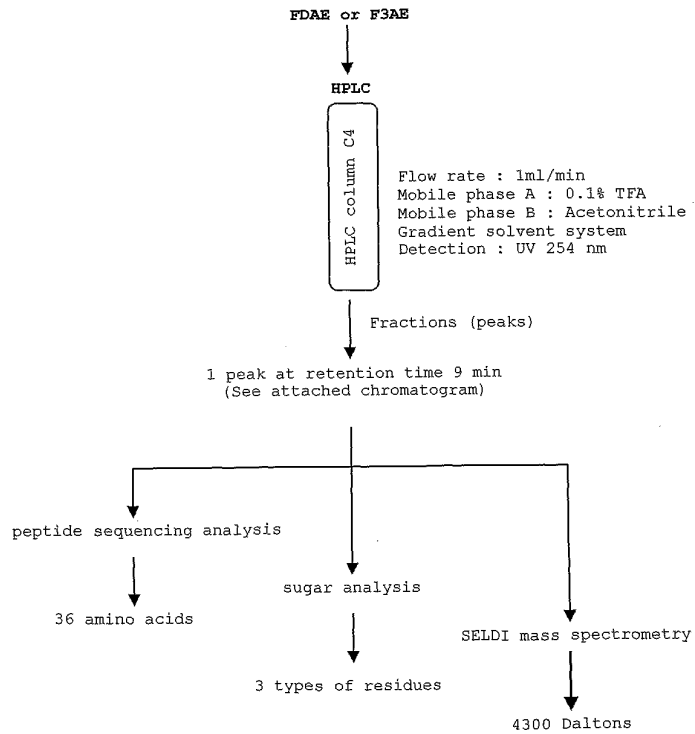


WO 02/17946

PCT/US01/40101

2/3

Figure 2
Characterization & Identification
of bioactive fraction - FDAE and F3AE



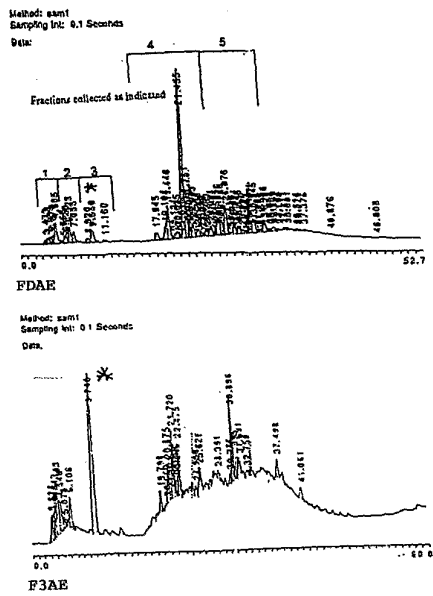


Figure 3 - Chromatogram of the Eurycoma Longifolia reverse-phase HPLC purification runs for FDAE (top trace) and F3AE (Lower trace)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. Application No. PCT/US 01/40101
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K35/78		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 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) BIOSIS, WPI Data, PAJ, EPO-Internal, FSTA, MEDLINE, PASCAL, LIFESCIENCES, CHEM ABS Data, EMBASE, CAB Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; January 2000 (2000-01) ANG HOOI HOON ET AL: "Effects of Eurycoma longifolia Jack (Tongkat Ali) on the initiation of sexual performance of inexperienced castrated male rats." Database accession no. PREV200000100869 XP002180953 abstract & EXPERIMENTAL ANIMALS (TOKYO), vol. 49, no. 1, January 2000 (2000-01), pages 35-38, ISSN: 1341-1357 --- -/-	1,2,6, 9-16
☒ 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 claim or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed. *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 October 2001		Date of mailing of the international search report 05/11/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5010 Patentlaan 2 NL - 2220 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer Rempp, 6

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inter- national Application No. PCT/US 01/40101
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; April 1997 (1997-04) ANG H H ET AL: "Enhancement of sexual motivation in sexually naive male mice by Eurycoma longifolia." Database accession no. PREV199800082360 XP002180954 abstract & INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACOGNOSY, vol. 35, no. 2, April 1997 (1997-04), pages 144-146, ISSN: 0925-1618	1,2,6, 9-16

International Application No. PCT/US 01 A0101

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 11-15 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 11-15

Rule 39.I(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 33/06	A 6 1 P 33/06	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(71)出願人 500219537

マサチューセッツ インスティテュート オブ テクノロジー
 MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 02139、ケンブリッジ、マサチューセッツ アベニュー 77
 77 Massachusetts Avenue, Cambridge, Massachusetts 02139, U.S.A

(74)代理人 100102842

弁理士 葛和 清司

(72)発明者 サンバンダン、ティー・ジー・

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02139、ケンブリッジ、ルーム 56-265、マサチューセッツ アベニュー 77、マサチューセッツ インスティテュート オブ テクノロジー

(72)発明者 ラ、チョーキュン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02139、ケンブリッジ、ルーム 56-265、マサチューセッツ アベニュー 77、マサチューセッツ インスティテュート オブ テクノロジー

(72)発明者 アミヌディン、ノーハニザ

マレーシア国 クアラルンプール、ユニバーシティ オブ マレーシア、ファカルティ オブ メディシン、デパートメント オブ バイオケミストリー

(72)発明者 サアド、ジョハリ モハメッド

マレーシア国 クアラルンプール、ユニバーシティ オブ マレーシア、ファカルティ オブ メディシン、デパートメント オブ バイオケミストリー

(72)発明者 アブドゥール カディール、アジゾル

マレーシア国 クアラルンプール、ケポング、フォレスト リサーチ インスティテュート オブ マレーシア

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA07 BA03 BA19 MA01 NA14 ZA682 ZA812 ZB262 ZB382

ZC102

4C088 AB12 BA09 BA16 CA05 CA14 MA08 NA14 ZA68 ZA81 ZB26

ZB38 ZC10