

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
3. Januar 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/00237 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 35/78**,
A61P 5/30, 35/00, 19/10, 25/28, 9/00, 13/08

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/02461

(22) Internationales Anmeldedatum:
29. Juni 2001 (29.06.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 31 650.6 29. Juni 2000 (29.06.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **DR. WILLMAR SCHWABE GMBH & CO.**
[DE/DE]; Willmar-Schwabe-Strasse 4, 76227 Karlsruhe
(DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **ERDELMEIER,
Clemens** [DE/DE]; Glogauer Strasse 32, 76139 Karlsruhe
(DE). **KOCH, Egon** [DE/DE]; Am Giessbach 11a, 76229
Karlsruhe (DE).

(74) Anwalt: **ADAM, Holger**; Kraus & Weisert,
Thomas-Wimmer-Ring 15, 80539 München (DE).

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

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, 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, TR),
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 geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

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

(54) Title: THERAPEUTICAL USE OF *SOPHORA FLAVESCENS* OR *SOPHORA SUBPROSTRATA* EXTRACTS

(54) Bezeichnung: THERAPEUTISCHE VERWENDUNG VON EXTRAKTEN AUS *SOPHORA FLAVESCENS* ODER *SOPHORA SUBPROSTRATA*

(57) Abstract: The invention relates to the use of extracts from *Sophora flavescens* or *Sophora subprostrata* for the prophylaxis and therapy of pathological conditions that are caused by estrogen deficiency or by other dysregulations of the sex hormone metabolism, especially of the estrogen metabolism.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Extrakten aus *Sophora flavescens* oder *Sophora subprostrata* zur Prophylaxe und Therapie von Krankheitszuständen, die durch einen Mangel an Östrogenen oder durch eine Dysregulation des Geschlechtshormonstoffwechsels, insbesondere Östrogenstoffwechsels verursacht werden.



WO 02/00237 A1

THERAPEUTISCHE VERWENDUNG VON EXTRAKTEN AUS SOPHORA FLAVESCENS ODER SOPHORA SUBPROSTRATA

5

10

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Extrak-
ten aus *Sophora flavescens* oder *Sophora subprostrata* zur Pro-
phylaxe und Therapie von Krankheitszuständen, die durch einen
15 Mangel an Östrogenen oder durch eine Dysregulation des Ge-
schlechtshormonstoffwechsels, insbesondere Östrogenstoffwech-
sels verursacht werden.

Unregelmäßige Menstruationszyklen treten bei Frauen ab einem
20 Alter von etwa 40 Jahren auf und markieren den Beginn der Me-
nopause. Diese Phase von Veränderungen im endokrinen System,
Klimakterium genannt; kann eine Dekade und länger anhalten.
Sie resultiert aus einer Erschöpfung der Follikelbildung und
deren verminderte Reaktion auf Gonadotropin. Als Folge des
25 Follikelausfalls sinkt die Produktion von Östrogen und bleibt
schließlich völlig aus. Damit verbunden können sich eine Rei-
he von Symptomen entwickeln, z.B. Hitzewallungen, Depressio-
nen, Angstzustände, geistige Verwirrtheit, Schlaflosigkeit
usw. Außerdem können als Folge des Absinkens der Östrogenpro-
30 duktion ernsthafte Gesundheitsprobleme wie Osteoporose, Herz-
insuffizienz, Schlaganfall und Krebs auftreten.

Obwohl eine Hormonersatztherapie mit Östrogenen zur Erleich-
terung klimakterischer Beschwerden sehr wirksam ist, gibt es

- 2 -

zahlreiche Studien, die zeigen, dass damit ein erhöhtes Risiko für Brust- und Gebärmutterkrebs, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Veränderungen des Lebermetabolismus verbunden sein kann. Durch die Gabe von Progestinen kann das Krebsrisiko vermindert werden. Der protektive Effekt der Progestine scheint jedoch bei einer Langzeitanwendung zu verschwinden und es wird vermutet, dass die Hormonersatztherapie (HRT) mit einem bis zu 35-40 % erhöhten Brustkrebsrisiko verbunden ist. Wegen der Nebenwirkungen und deutlicher Zweifel an der Zuverlässigkeit einer solchen Therapie überhaupt, steht die Medizin der HRT bei Frauen in der Postmenopause eher ablehnend gegenüber. Es wird geschätzt, dass nur ca. 20 % der US-amerikanischen Frauen in der Postmenopause eine HRT erhalten, wobei lediglich 40 % dieser Frauen die Therapie über mehr als ein Jahr fortsetzen.

Substanzen, welche bei Mensch oder Tier östrogenagonistisch wirken oder mit Östrogen interagieren, wurden in vielen Pflanzen gefunden. Mindestens 20 verschiedene Stoffgruppen mit östrogenen/antiöstrogenen Eigenschaften aus mehr als 300 Pflanzen von mehr als 16 Pflanzenfamilien wurden bis jetzt gefunden. Die meisten bekannten Phytoöstrogene gehören zu den Gruppen der Isoflavone, Lignane oder Cumestane. Erst kürzlich wurde ein weiteres, hochpotentes Phytoöstrogen identifiziert, das 8-Prenylnaringenin (S.R. Milligan et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 84, 2249-2252 (1999)). Die östrogene Potenz von 8-Prenylnaringenin *in vitro* wurde anhand der Stimulation der alkalischen Phosphatase in Ishikawa-Var-I-Zellen getestet. Dabei fand man, dass 8-Prenylnaringenin wesentlich aktiver war als bislang bekannte Phytoöstrogene wie Coumestrol, Genistein oder Daidzein, und nur wenig schwächer wirkte als 17 β -Östradiol.

Epidemiologische und kontrollierte Studien an Populationen in den USA, Europa, China und Japan haben gezeigt, daß ein enge

- 3 -

negative Korrelation zwischen der Aufnahme von Phytoöstrogenen mit der Nahrung und dem Auftreten verschiedener Tumoren, insbesondere Brustkrebs und Prostatakarzinom, besteht. Hemmende Wirkungen von Phytoöstrogenen auf das Wachstum von Mamma- und Prostatatumorzellen wurde auch in tierexperimentellen Untersuchungen bestätigt. Die präventiven Eigenschaften von Phytoöstrogenen beruhen offenbar auf einer Vielzahl von unterschiedlichen biologischen Eigenschaften, die diese Verbindungen von synthetischen und natürlichen Östrogenen unterscheiden. Abhängig von der Dosis und dem endogenen Hormonstatus verfügen Phytoöstrogene über östrogene oder auch antiöstrogene Wirkungen. Andere biologische Effekte beinhalten z.B. die Hemmung von Tyrosinkinasen, DNA Topoisomerasen, ribosomale S6Kinase, Ornithindecarboxylase, Aromatase oder 5 α -

15 Reduktase. Außerdem verfügen Phytoöstrogene häufig über antioxidative Eigenschaften und es ist offensichtlich die Summe dieser unterschiedlichen Aktivitäten, die zur Hemmung der Tumorentstehung und des Tumorwachstums beiträgt (Tham et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 83, 2223-2235 (1998)).

20 Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, die Verwendung von Pflanzenextrakten zur Prophylaxe und Therapie von Krankheitszuständen vorzuschlagen, die durch einen Mangel an Östrogenen oder durch eine Dysregulation des Geschlechtshormonstoffwechsels, insbesondere Östrogenstoffwechsels verursacht werden.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Verwendung von Extrakten aus *Sophora flavescens* oder *Sophora subprostrata* gemäß den Patentansprüchen 1-3 und durch die Verfahren gemäß den Patentansprüchen 4-7 gelöst.

30

Die traditionelle chinesische Medizin kennt einige *Sophora*-Arten (Fabaceae), deren Wurzeln arzneilich verwendet werden.

- 4 -

Diese sind *Sophora flavescens*, *S. subprostrata*, *S. alopecu-*
loides, *S. tonkinensis*, *S. tomentosa*, *S. moorcroftiana* und *S.*
leachiana. Von diesen kommt *Sophora flavescens* größere Bedeu-
5 tung zu. Sie ist deshalb Bestandteil des chinesischen Arznei-
buchs (*Sophorae falvescentis radix*, "Ku-shen", Arzneibuch der
chinesischen Medizin 9/1997) und wird traditionell zur Be-
handlung von Durchfall, gastrointestinalen Hämorrhagien und
Ekzemen medizinisch verwendet (W. Tang, G. Eisenbrand, Chine-
se Drugs of Plant Origin, Springer Verlag, Berlin, 1992).

10

Die Wurzeln von *S. flavescens*, aber auch anderer *Sophora*-
Arten enthalten eine Reihe von Chinolizidin-Alkaloiden als
Hauptinhaltsstoffe. Das chinesische Arzneibuch schreibt vor,
dass der titrimetrische Gesamtgehalt an Alkaloiden 2 % nicht
15 unterschreiten darf. Hauptalkaloide sind Matrin und Oxy-
matrin.

20

Neben den Alkaloiden wurde auch eine Vielzahl von Flavonen
und verwandten Verbindungen und Triterpensaponine in den Wur-
zeln von *S. flavescens* sowie etlichen anderen *Sophora*-Arten
gefunden.

25

Verschiedene pharmakologische Eigenschaften sind für *Sophora*
flavescens und einzelne Inhaltsstoffe bzw. Inhaltsstoffgrup-
pen beschrieben worden. Insbesondere die Alkaloide werden für
antiarrhythmische, antiasthmatische und antitussive Effekte
sowie für Antiulcus-Effekte verantwortlich gemacht (Tang und
Eisenbrand, s.o.). Auch antineoplastische Effekte und immu-
n-suppressive Eigenschaften wurden beobachtet.

30

M. Kuroyanagi et al. Journal of Natural Products 1999,
62(12), 1595-1599, berichten über antibakterielle und antian-
drogene Flavonoide aus *Sophora flavescens*. Es wurde gefunden,

- 5 -

dass nahezu alle aus *Sophora flavescens* isolierten Prenylflavon-Derivate eine antiandrogene Wirkung aufwiesen.

W.M. Mazur et al., Nutritional Biochemistry 1998, 9, 193-200, berichten über die quantitative Bestimmung der Isoflavone Formononetin, Biochanin A, Daidzein, Genistein und Coumestrol und der Lignane Secoisolariciresinol und Matairesinol in Leguminosensamen, wobei u.a. auch Samen von *Sophora japonica* untersucht worden sind.

10

S. flavescens und *S. japonica* werden in der Toxikologie als toxisch eingestuft. Als Gifte werden vor allem Alkaloide vom Matrin-Typ vermutet (T. Blaszczyk, Deutsche Apoth. Ztg. 2001, 141 (14), 1687-1696). In klinischen Prüfungen wurden auch toxische Effekte wie heftiges Herzklopfen, Atemnot und Krämpfe für die *Sophora*-Alkaloide beobachtet. In Tierversuchen konnten toxische Effekte für Oxymatrin nachgewiesen werden (K.-C. Huang, The Pharmacology of Chinese Herbs, CRC Press, Boca Raton, 1993).

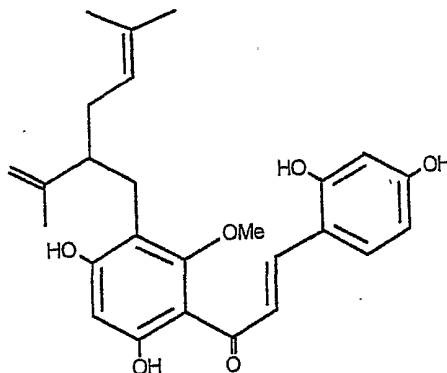
20

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung besonders bevorzugte *Sophora*-Arten sind *Sophora flavescens* und *Sophora subprostrata*, für deren Extrakte aus den Wurzeln überraschenderweise im Rahmen der vorliegenden Erfindung starke östrogenen Wirkungen festgestellt wurden. Diese Extrakte konnten durch weitere Trennung und Aufreinigung angereichert werden. Es zeigte sich, dass die beobachteten pharmakologischen Effekte durch das Zusammenspiel der in den Extrakten vorliegenden Isoflavone wie Genistein und Daidzein, Flavone wie 8-Prenylnaringenin, Kushenol X, 8-Prenylkämpferol, Leachianon G und Kushenol E, Chalkone und Pterocarpane wie Maackiain und Maackiainglucosid sowie noch nicht identifizierte weitere flavonoidartige Verbindungen verursacht werden. In diesem Zusammenhang ist auch das von den Erfindern neu gefundene Chal-

30

- 6 -

kon 2,4,4',6'-Tetrahydroxy-3'-lavandulyl-2'-Methoxychalcon
der nachstehenden Formel



zu nennen.

Figur 1 beschreibt die östrogene Aktivität von 70 % (v/v) (62 % (w/w)) Ethanol-Extrakten (gemäß der Beispiele 1a) und 2a)) aus *Sophora flavescens* und *Sophora subprostrata* in einem Hefe-Assay, verglichen mit 17 β -Östradiol.

Figur 2 beschreibt die östrogene Aktivität von Extrakten (70 % (v/v) bzw. 62 % (w/w) Ethanol-Extrakte nach Verteilung mit Ethylacetat; gemäß der Beispiele 1b) und 2b)) aus *Sophora flavescens* und *Sophora subprostrata* in einem Hefe-Assay, verglichen mit 17 β -Östradiol.

Figur 3 beschreibt die östrogene Aktivität von Extrakten (60 % (w/w) Ethanol-Extrakte nach Verteilung mit Ethylacetat gemäß Beispiel 3) aus *Sophora flavescens* in einem Hefe-Assay, verglichen mit 17 β -Östradiol.

Entsprechende Extrakte können allgemein zum Beispiel durch Extraktion mit einem Lösungsmittel mittlerer Polarität, das aus der Gruppe umfassend wässrige Alkohole, wässrige Ketone und Ester einschließlich wässrigen oder wassergesättigten Es-

- 7 -

tern ausgewählt ist, Abziehen des Lösungsmittels und nachfolgende Flüssig-Flüssig-Verteilung zwischen einem organischen Lösungsmittel und Wasser erhalten werden.

- 5 Die vorstehend genannten Alkohole bzw. Ketone können als 10-96 % (v/v) oder (w/w), bzw. 10-99% (v/v) oder (w/w), insbesondere 50-92 % (v/v) oder (w/w) wässrige Gemische verwendet werden, wobei 70 % (v/v) (62 % (w/w)) Ethanol, 60 % (w/w) Ethanol oder wassergesättigtes Ethylacetat ganz besonders be-
10 vorzuzug sind.

Zur Flüssig-Flüssig-Verteilung können organische Lösungsmittel ausgewählt aus der Gruppe umfassend Ethylacetat, tert-Butylmethylether, n-Butanol und Butanon verwendet werden, wo-
15 bei Ethylacetat bevorzugt ist.

Die auf diese Weise erhaltenen Extrakte sind dadurch gekennzeichnet, dass der Gesamtalkaloidgehalt unterhalb 0,2 %, vorzugsweise unterhalb 0,1 % liegt. Insbesondere ist der Extrakt
20 alkaloidfrei. Alkaloidfrei bedeutet in diesem Zusammenhang, dass Alkaloidverbindungen mit den gängigen analytischen Verfahren wie HPLC nicht nachweisbar sind.

Erfindungsgemäß werden die Extrakte aus *Sophora flavescens*
25 und *Sophora subprostrata* zur Prophylaxe und Therapie von Krankheitszuständen verwendet, die durch einen Mangel an Östrogenen oder durch eine Dysregulation des Geschlechtshormonstoffwechsels, insbesondere Östrogenstoffwechsels verursacht werden.

30

Die Krankheitszustände können aus der Gruppe bestehend aus klimakterischen Beschwerden, geschlechtshormonabhängigen Krebserkrankungen, benigne Prostatahyperplasie, Osteoporose, Alzheimersche Krankheit und Herz-Kreislaufkrankungen ausge-

- 8 -

wählt sein, wobei die Krebserkrankungen Brustkrebs, Prostatakrebs und Gebärmutterkrebs umfassen.

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

Die Extrakte werden am Menschen in einer Dosierung von 1-1000 mg/täglich, vorzugsweise 100-1000 mg/täglich angewandt.

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

Beispiel 1: Herstellung eines Extraktes aus *Sophora flavescens*

a) Extraktion

2 kg gemahlene Wurzeln von *S. flavescens* wurden mit 14 kg 70 % (v/v) (62 % (w/w)) Ethanol versetzt, 5 min wirbelextrahiert (Ultraturrax) und 1 h bei 50°C intensiv gerührt. Anschließend wurde über ein Supra Seitz 1500-Filter abgesaugt und der Drogenrückstand in der gleichen Weise noch ein zweites Mal extrahiert. Die beiden Extraktlösungen wurden vereinigt und mit einem Aliquot wurde der Trockenextraktgehalt bestimmt. Es ergab sich ein Trockenrückstand von 475,6 g entsprechend einer Ausbeute von 23,8 %.

b) Verteilung

- 9 -

Der Extraktionslösung wurde am Rotationsverdampfer bei 50°C das Ethanol entzogen. Der wässrige Rückstand (5 l) wurde 3x mit jeweils 2 l Ethylacetat ausgerührt, die Ethylacetat-Phasen vereinigt und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt:

Ethylacetat-Extrakt = 67,84 g (3,4 % bez. auf Droge; 14,3 % bez. auf Gesamtextrakt)

10

Der Ethylacetat-Extrakt enthält gemäß HPLC-Analyse Flavone, Isoflavone, Chalkone und Pterocarpane (z.B. 8-Prenylnaringenin, Daidzein, Kushenol X, Norkurarinon, Maackiain, Genistein, 8-Prenylkämpferol). Alkaloide konnten nicht nachgewiesen werden.

15

Diese Substanzkombination ist in idealer Weise zur Prophylaxe und Therapie von Krankheitszuständen geeignet, die durch einen Mangel an Östrogenen oder durch eine Dysregulation des Geschlechtshormonstoffwechsels, insbesondere Östrogenstoffwechsels verursacht werden (vgl. Beispiel 5).

20

Beispiel 2: Herstellung eines Extraktes aus *Sophora subprostrata*

25

a) Extraktion

1 kg gemahlene Wurzeln von *S. subprostrata* wurden mit 7 kg 70 % (v/v) (62 % (w/w)) Ethanol versetzt, 5 min wirbelextrahiert (Ultraturrax) und 1 h bei 50°C intensiv gerührt. Anschließend wurde über ein Supra Seitz 1500-Filter abgesaugt und der Drogenrückstand in der gleichen Weise noch ein zweites Mal extrahiert. Die beiden Extraktlösungen wurden vereinigt und mit einem Aliquot wurde der Trockenextraktgehalt be-

30

- 10 -

stimmt. Es ergab sich ein Trockenrückstand von 111,8 g entsprechend einer Ausbeute von 11,2 %.

b) Verteilung

5

Der Extraktionslösung wurde am Rotationsverdampfer bei 50°C das Ethanol entzogen. Der wässrige Rückstand (2,5 l) wurde 3x mit jeweils 1 l Ethylacetat ausgerührt, die Ethylacetat-Phasen vereinigt und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt:

10

Ethylacetat-Extrakt = 10,4 g (1,0 % bez. auf Droge; 9,3 % bez. auf Gesamtextrakt)

15

Beispiel 3

20

36 kg gemahlene *Sophora flavescens* Droge wurden mit der 7,7-fachen Gewichtsmenge 60 Gew.% Ethanol versetzt. Unter starkem Rühren und über Dispax (Ultraturrax) im Kreislauf wurde die Extraktlösung 1 h bei 50°C extrahiert. Die Extraktlösung wurde klarfiltriert, der Drogenrückstand noch einmal mit der 7-fachen Gewichtsmenge 60Gew.% Ethanol unter gleichen Bedingungen extrahiert und anschließend filtriert.

25

Die Extraktlösung wurde dann im Zentrifugalverdampfer auf einen Ethanol Gehalt von 3,5% und einen Trockenextraktgehalt von 10,52% eingeeengt. Anschließend wurde diese konzentrierte Lösung 3 mal mit 1:0,4 Volumenteilen gegen wassergesättigten Ethylacetat verteilt. Die Ethylacetat-Phase wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt und im Trockenschrank bei 60°C nachgetrocknet.

30

Es resultierten:

35

- 11 -

Ethylacetat-Extrakt: 1,188 kg nach Vermahlung (3,3% bez. auf Droge)

HPLC-Gehalte pharmakologisch relevanter Inhaltsstoffe:

5

	Maackiainglucosid	2,8 %
	8-Prenylnaringenin	0,4 %
	Maackiain	0,6 %
	Kushenol X	1,3 %
10	8-Prenylkämpferol	0,7 %
	Leachianon G	6,6 %
	Kushenol E	0,3 %
	2,4,4',6'-Tetrahydroxy-3'-lavandulyl-2'-	
15	Methoxychalcon	0,7 %

Daidzein und Genistein konnten ebenfalls nachgewiesen werden. Alkaloide waren nicht nachweisbar.

20 Die östrogene Aktivität konnte für jeden der angegebenen Inhaltsstoffe in einem Hefe-Assay entsprechend Beispiel 5 nachgewiesen werden. Für den Extrakt ergibt sich die östrogene Aktivität aus dem Reporter-gen-Assay unter Verwendung von Hefezellen gemäß Beispiel 5; vgl. Figur 3.

25

HPLC-Methode

Säule	LiChrospher 100 5 µm, 250 x 4 mm	
Eluens	A: 1000 ml bidest Wasser / 3 ml Phosphorsäure (85%) / 2 ml Triethylamin	
	B: 100 ml Acetonitril / 3 ml Phosphorsäure (85%) / 2 ml Triethylamin / 60 ml bidest Wasser	
Gradient	% A	% B

- 12 -

Säule	LiChrospher 100 5 μ m, 250 x 4 mm	
	0 min 70	30
	30 min 30	70
	35 min 0	100
Fluß	1,2 ml/min	
Detektion	220 nm	

Beispiel 4

5 150 g gemahlene *Sophora flavescens* Droge wurde zweimal mit wassergesättigtem Ethylacetat im Verhältnis 1:7 (m/m) extrahiert. Dazu wurde die Droge zuvor jeweils 5 Minuten mit einem Ultra-Turrax aufgeschlossen (Bewegungsextraktion). Die Droge wurde sodann je 1 h bei 60°C unter Rückfluss extrahiert. Die

10 vereinigten Extraktlösungen wurden danach abfiltriert und die erhaltene Ethylacetat-Extraktlösung zweimal mit Ethylacetat-gesättigtem Wasser im Verhältnis 1:1 (V/V) zurückgeschüttelt. Die vereinigten Ethylacetat-Phasen wurden zur Trockene eingengt:

15

Ausbeute: 3,99% bez. auf die Droge

Beispiel 5: Prüfung der hergestellten Ethylacetatextrakte auf östrogene Aktivität mit transfizierten Hefezellen, die den

20 menschlichen α -Östrogenrezeptor exprimieren.

Die Prüfung von Extrakten auf östrogene Eigenschaften erfolgte mit einem Reporter-gen-Assay unter Verwendung von Hefezellen (*Saccharomyces*). Die Zellen sind stabil mit dem humanen

25 α -Östrogenrezeptor und einem Expressionsplasmid, das ein Östrogenresponse-Element und das Gen für das Enzym β -Galaktosidase enthält, transfiziert. Alle Proben wurden in einer Konzentration von 20 mg/ml in DMSO gelöst und unver-

- 13 -

dünnt oder nach Verdünnen mit DMSO im Verhältnis 1/10, 1/100 oder in einem Volumen von 1 µl zu 100 µl Kulturmedium in 96-Well Flachboden-Mikrotiterplatten gegeben. Anschließend wurden 100 µl Hefesuspension und das chromogene Substrat Chlorphenolrot-β-D-Galactopyranosid zugefügt. Auf jeder Platte wurden zur Kontrolle Wells vorbereitet, in die nur Kulturmedium bzw. das Lösungsmittel eingefüllt wurde oder die die Standardkonzentrationen von 17β-Östradiol enthielten. Die Hefezellen wurden 72 h bei 32°C inkubiert und dann wurde die Absorption des Mediums bei 540 nm in einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen. Die Proben wurden teilweise zweimal geprüft.

Ergebnisse:

Probenkonzentrationen:

Verdünnung	Konzentration
unverdünnt	100 µg/ml
1:10	10 µg/ml
1:100	1 µg/ml

Probenbezeichnung:

Proben-Nr.	Probe	Versuch	Sophora-Art
A	70 % (v/v) (62 % (w/w)) Ethanol-Extrakt gemäß Beispiel 1a)	1	<i>Sophora flavescens</i>
B	70 % (v/v) (62 % (w/w)) Ethanol-Extrakt gemäß Beispiel 2a)	1	<i>Sophora subprostrata</i>
C	70 % (v/v) (62 % (w/w)) Ethanol-Extrakt gemäß Beispiel 1a)	2	<i>Sophora flavescens</i>
D	Ethylacetat-Extrakt gemäß Beispiel 1b)	1	<i>Sophora flavescens</i>
E	Ethylacetat-Extrakt gemäß Beispiel 2b)	1	<i>Sophora subprostrata</i>
F	Ethylacetat-Extrakt gemäß Beispiel 3	1	<i>Sophora flavescens</i>

Die Ergebnisse des Assays sind in den Fig. 1, 2 und 3 dargestellt. Hierbei wird die östrogene Aktivität der Extrakte mit der Aktivität von 17 β -Östradiol verglichen. Als "aktiv" können hierbei jene Extrakte bezeichnet werden, deren Aktivität beim Vergleich mit 17 β -Östradiol einer 17 β -Östradiol-Aktivität entspricht, die innerhalb des deutlich ansteigenden Abschnitts (also ab einer Konzentration von etwa 0,1-0,2 nM 17 β -Östradiol) der Aktivitätskurve des 17 β -Östradiol angesiedelt ist.

- 15 -

Insbesondere beschreibt Figur 1 die östrogene Aktivität von 70 % (v/v) (62 % (w/w)) Ethanol-Extrakten (gemäß der Beispiele 1a) und 2a)) aus *Sophora flavescens* und *Sophora subprostrata* in einem Hefe-Assay, verglichen mit 17 β -Östradiol.

Figur 2 beschreibt die östrogene Aktivität von Extrakten (70 % (v/v) bzw. 62 % (w/w) Ethanol-Extrakte nach Verteilung mit Ethylacetat; gemäß der Beispiele 1b) und 2b)) aus *Sophora flavescens* und *Sophora subprostrata* in einem Hefe-Assay, verglichen mit 17 β -Östradiol.

Figur 3 beschreibt die östrogene Aktivität von Extrakten (60 % (w/w) Ethanol-Extrakte nach Verteilung mit Ethylacetat gemäß Beispiel 3) aus *Sophora flavescens* in einem Hefe-Assay, verglichen mit 17 β -Östradiol.

- 16 -

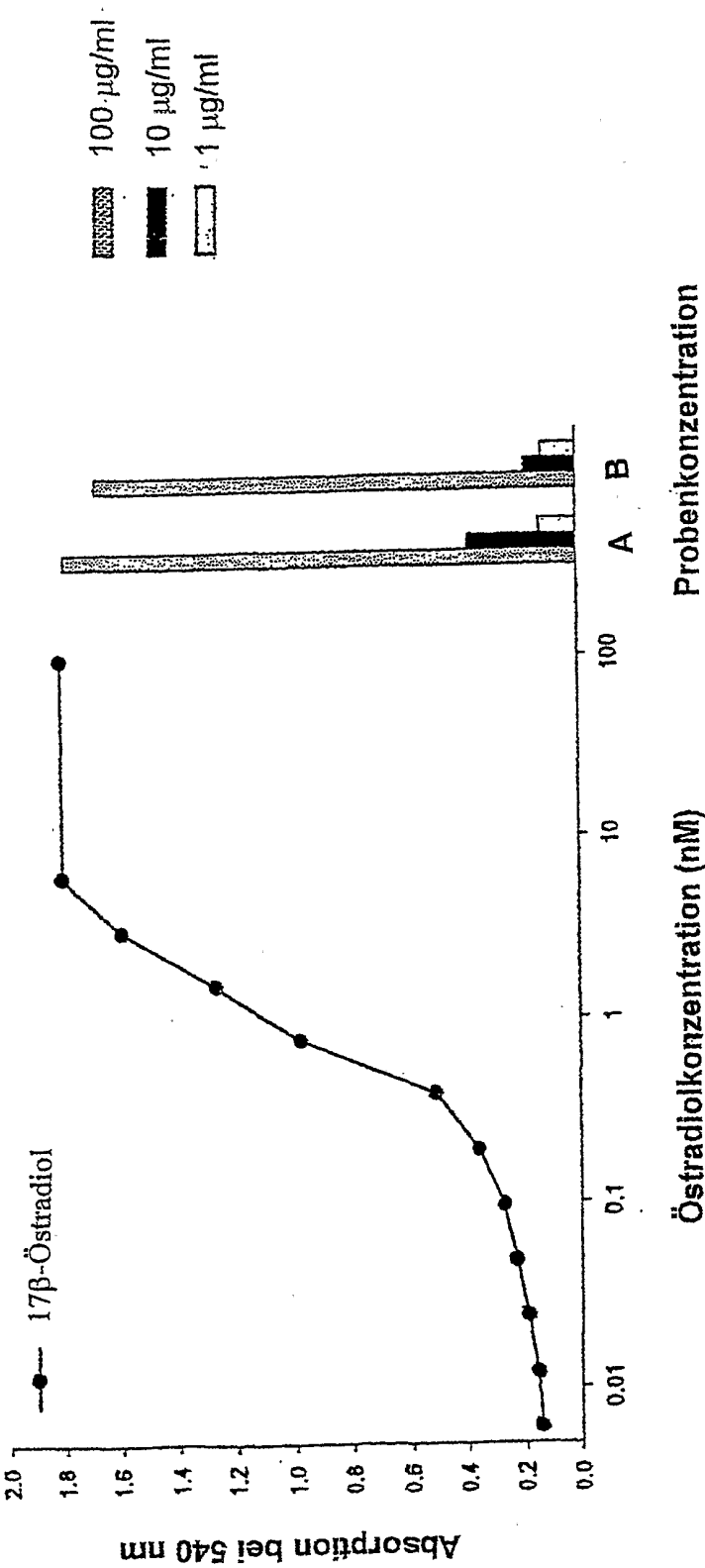
Patentansprüche

1. Verwendung eines Extrakts aus *Sophora flavescens* oder *Sophora subprostrata* zur Herstellung eines Medikaments zur Prophylaxe und Therapie von Krankheitszuständen, die durch einen Mangel an Östrogenen oder durch eine Dysregulation des Geschlechtshormonstoffwechsels, insbesondere Östrogenstoffwechsels verursacht werden.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Krankheitszustände aus der Gruppe bestehend aus klimakterischen Beschwerden, geschlechtshormonabhängigen Krebserkrankungen, benigne Prostatahyperplasie, Osteoporose, Alzheimersche Krankheit und Herz-Kreislaufkrankungen ausgewählt sind.
3. Verwendung nach Anspruch 2, wobei die geschlechtshormonabhängigen Krebserkrankungen aus der Gruppe bestehend aus Brustkrebs, Prostatakrebs und Gebärmutterkrebs ausgewählt sind.
4. Verfahren zur Prophylaxe und Therapie von Krankheitszuständen, die durch einen Mangel an Östrogenen oder eine Dysregulation des Geschlechtshormonstoffwechsels, insbesondere Östrogenstoffwechsels verursacht werden, wobei das Verfahren die Verabreichung einer wirksamen Menge eines Extraktes aus *Sophora flavescens* oder *Sophora subprostrata* umfasst.
5. Verfahren zur Prophylaxe und Therapie von Krankheitszuständen, die durch einen Mangel an Östrogenen oder eine Dysregulation des Geschlechtshormonstoffwechsels, insbesondere Östrogenstoffwechsels verursacht werden, wobei das Verfahren die Verabreichung einer wirksamen Menge eines einen Extrakt aus *Sophora flavescens* oder *Sophora subprostrata* enthaltenden Arzneimittels umfasst.

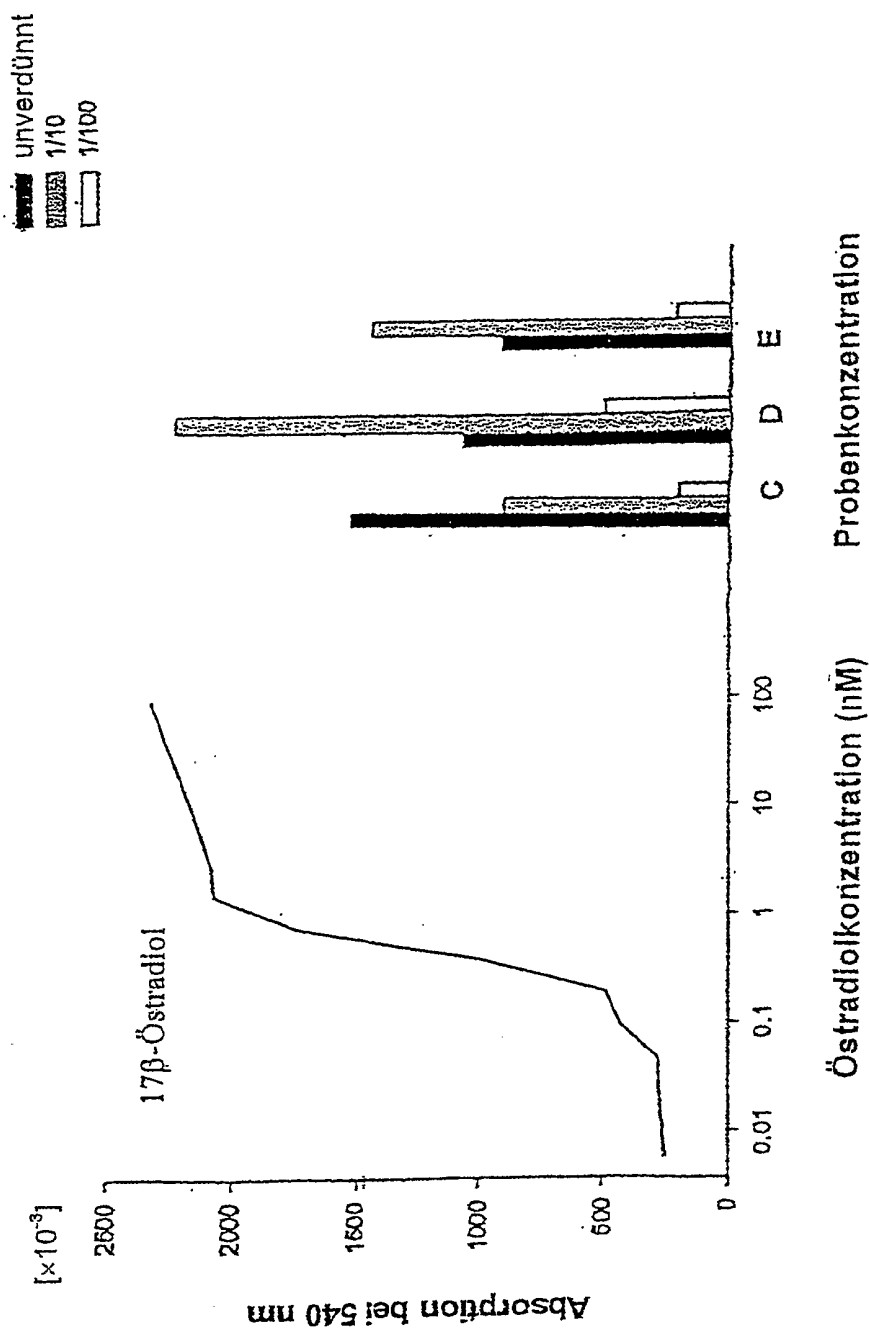
- 17 -

6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, wobei die Krankheits-
zustände aus der Gruppe bestehend aus klimakterischen Be-
schwerden, geschlechtshormonabhängigen Krebserkrankungen, be-
5 nigne Prostatahyperplasie, Osteoporose, Alzheimersche Krank-
heit und Herz-Kreislaufferkrankungen ausgewählt sind.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die geschlechtshormon-
abhängigen Krebserkrankungen aus der Gruppe bestehend aus
10 Brustkrebs, Prostatakrebs und Gebärmutterkrebs ausgewählt
sind.

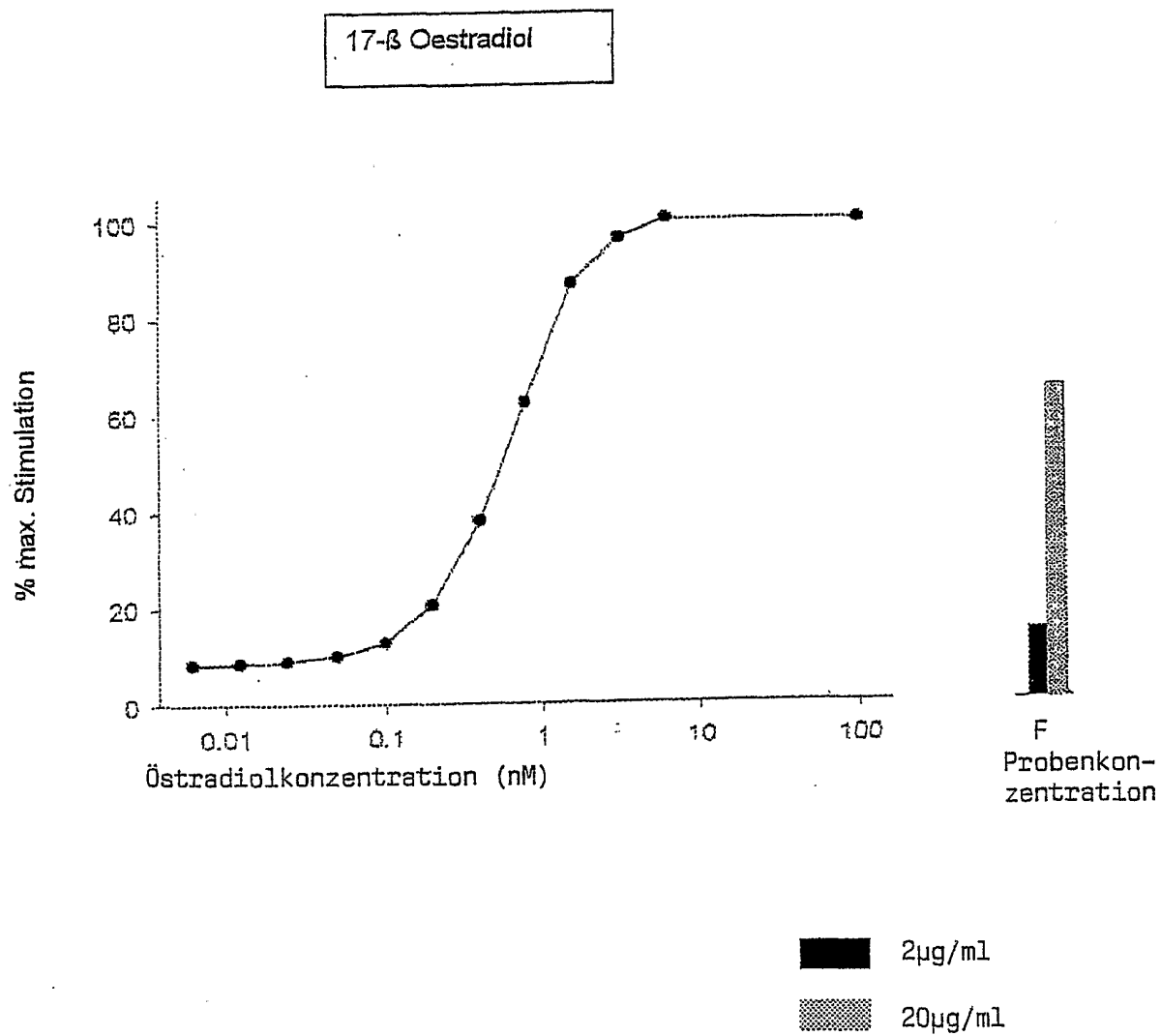


Figur 1



Figur 2

3/3



Figur 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 01/02461

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K35/78 A61P5/30 A61P35/00 A61P19/10 A61P25/28
A61P9/00 A61P13/08

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, EPO-Internal, PAJ, WPI Data, FSTA

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; 1989 XU Q ET AL: "IMMUNOLOGICAL MECHANISMS OF ANTITUMOR ACTIVITY OF SOME KINDS OF CRUDE DRUGS ON TUMOR NECROSIS FACTOR PRODUCTION" Database accession no. PREV199089006631 XP002182663 abstract & INTERNATIONAL JOURNAL OF IMMUNOPHARMACOLOGY, vol. 11, no. 6, 1989, pages 607-614, ISSN: 0192-0561 --- -/--	1-7



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

13 November 2001

Date of mailing of the international search report

22/11/2001

Name and mailing address of the ISA

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

Authorized officer

Rempp, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 01/02461

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; 1996 MAO HUI-SHENG LIU HONG-YIN ET AL: "Modulation of the malignant phenotype and the immunological response of tumor cells by Sophora flavescens Ait (AF-7)." Database accession no. PREV199799338003 XP002182665 abstract & ZHONGGUO ZHONGLIU LINCHUANG, vol. 23, no. 11, 1996, pages 799-803, ISSN: 1000-8179 ----	1-7
X	OHYAMA M ET AL: "Antitumor Agents 200. Cytotoxicity of Naturally Occurring Resveratrol Oligomers and their Acetate Derivatives" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, OXFORD, GB, vol. 9, no. 20, 18 October 1999 (1999-10-18), pages 3057-3060, XP004180537 ISSN: 0960-894X the whole document ----	1-7
X,P	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; October 2000 (2000-10) KO W G ET AL: "Lavandulylflavonoids: A new class of in vitro apoptogenic agents from Sophora flavescens." Database accession no. PREV200000462363 XP002182664 abstract & TOXICOLOGY IN VITRO, vol. 14, no. 5, October 2000 (2000-10), pages 429-433, ISSN: 0887-2333 ----	1-7
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 013, no. 556 (C-664), 11 December 1989 (1989-12-11) & JP 01 230525 A (NITTO DENKO CORP), 14 September 1989 (1989-09-14) abstract -----	

Continuation of box I.1

Although claims 4-7 relate to a method for the treatment of the human/animal body, a search was carried out and was based on the indicated effects of the compound/composition.

Continuation of box I.1

Claims Nos.: 4-7

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 01/02461

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 01230525	A	14-09-1989	NONE

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/02461

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K35/78 A61P5/30 A61P35/00 A61P19/10 A61P25/28
A61P9/00 A61P13/08

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 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)

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

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1989 XU Q ET AL: "IMMUNOLOGICAL MECHANISMS OF ANTITUMOR ACTIVITY OF SOME KINDS OF CRUDE DRUGS ON TUMOR NECROSIS FACTOR PRODUCTION" Database accession no. PREV199089006631 XP002182663 Zusammenfassung & INTERNATIONAL JOURNAL OF IMMUNOPHARMACOLOGY, Bd. 11, Nr. 6, 1989, Seiten 607-614, ISSN: 0192-0561 --- -/--	1-7

☒ 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

g Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. November 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

22/11/2001

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

Bevollmächtigter Bediensteter

Rempp, G

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1996 MAO HUI-SHENG LIU HONG-YIN ET AL: "Modulation of the malignant phenotype and the immunological response of tumor cells by Sophora flavescens Ait (AF-7)." Database accession no. PREV199799338003 XP002182665 Zusammenfassung & ZHONGGUO ZHONGLIU LINCHUANG, Bd. 23, Nr. 11, 1996, Seiten 799-803, ISSN: 1000-8179 ---	1-7
X	OHYAMA M ET AL: "Antitumor Agents 200. Cytotoxicity of Naturally Occurring Resveratrol Oligomers and their Acetate Derivatives" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, OXFORD, GB, Bd. 9, Nr. 20, 18. Oktober 1999 (1999-10-18), Seiten 3057-3060, XP004180537 ISSN: 0960-894X das ganze Dokument ---	1-7
X,P	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; Oktober 2000 (2000-10) KO W G ET AL: "Lavandulylflavonoids: A new class of in vitro apoptogenic agents from Sophora flavescens." Database accession no. PREV200000462363 XP002182664 Zusammenfassung & TOXICOLOGY IN VITRO, Bd. 14, Nr. 5, Oktober 2000 (2000-10), Seiten 429-433, ISSN: 0887-2333 ---	1-7
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 013, no. 556 (C-664), 11. Dezember 1989 (1989-12-11) & JP 01 230525 A (NITTO DENKO CORP), 14. September 1989 (1989-09-14) Zusammenfassung -----	

WEITERE ANGABEN**PCT/ISA/ 210**

Fortsetzung von Feld I.1

Obwohl die Ansprüche 4-7 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

Fortsetzung von Feld I.1

Ansprüche Nr.: 4-7

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

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/02461

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
JP 01230525 A	14-09-1989	KEINE	