

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 310**

51 Int. Cl.:

**A61K 36/67** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08783450 .3**

96 Fecha de presentación: **15.08.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2182966**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.05.2010**

54 Título: **Uso de extractos o sustancias extractivas de Piper Cubeba L. como componentes activos en un medicamento para el tratamiento de enfermedades cancerosas**

30 Prioridad:

**16.08.2007 CH 12892007**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

**07.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**07.12.2012**

73 Titular/es:

**VIRIDIS PHARMACEUTICAL LIMITED (100.0%)  
263 Main Street P.O. Box 2196  
Road Town Tortola , VG**

72 Inventor/es:

**KREUTER, MATTHIAS-HEINRICH;  
YAM, JIAN, YING y  
BERGER-BÜTER, KARIN**

74 Agente/Representante:

**SAMMUT LINARES , Rodrigo**

ES 2 392 310 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

5      Usos de extractos o sustancias extractivas de *Piper cubeba* L. como componentes activos en un medicamento para el tratamiento de enfermedades cancerosas

10     La presente invención se refiere al uso de extractos o sustancias extractivas de *Piper cubeba* L. como componentes activos en un medicamento para el tratamiento de enfermedades cancerosas.

15     Usos de preparaciones de *Piper cubeba* L. se describen, por ejemplo, en Hunnius, Pharmazeutisches Wörterbuch, 8ª edición, 1998, páginas 1084 a 1085.

20     En este documento se describen aplicaciones populares, tales como el tratamiento de cefaleas así como el uso como diurético, desinfectante de las vías urinarias y medicamento estomacal.

25     Como fármaco se usa el fruto inmaduro, a partir del que se obtiene también aceite de cubeba, el aceite esencial de las cubebas, mediante destilación con vapor de agua.

30     El aceite de cubeba se utiliza en las mismas indicaciones que los frutos.

35     Según J. Seidemann en "World Spice Plants", Springer-Verlag, 2005, página 291 se usa *Piper cubeba* L. para la aromatización de licores, pan de jengibre y pan de miel. Como producto sirve el aceite esencial, que se obtiene a partir del fruto inmaduro.

40     En el documento JP 2000-095649 A se describen extractos, entre otros también del fruto de la cubeba, que se obtienen por medio de un disolvente hidrófilo, por ejemplo acetona, metanol y etanol, o sus mezclas con agua. Tales extractos contienen por consiguiente tanto el aceite esencial como sustancias hidrófilas.

45     Estos extractos actuarían como inhibidores de la testosterona 5 $\alpha$ -reductasa. De este modo estos extractos influirían positivamente en el crecimiento capilar.

50     Estos extractos servirían también para el tratamiento de la hiperplasia benigna de próstata.

55     En este documento se exponen en la tabla 1 valores de CI<sub>50</sub>, que están relacionados con la inhibición de la testosterona 5 $\alpha$ -reductasa.

60     El extracto de cubeba inhibe según esta tabla la enzima en un 50% a una concentración de 0,79 mg/ml.

65     A. Chatterjee *et al.*, Jour. Indian Chem. Soc., vol. 45, n.º 8, 1968, páginas 723 a 725 describen las propiedades espectrales de la sustancia pura cubebina. Este compuesto químico se aisló a partir de un extracto alcohólico de los frutos desengrasados de *Piper cubeba* L. La aplicación de cubebina se considera en la curación de mucosas en enfermedades crónicas.

70     En el documento WO 03/080600 se describe un procedimiento para la obtención de lignanos, entre ellos la sustancia pura cubebina, a partir de hojas de *Zanthoxylum naranjillo* o a partir de *Piper cubeba*. Para ello se secan y se muelen en primer lugar las hojas. El polvo que se genera se somete a extracción por medio de hexano y el extracto se filtra y se concentra. Una purificación repetida por medio de cromatografía y cristalización conduce a la sustancia pura. Se menciona que la clase de los lignanos muestra actividades antitumoral y antiviral.

75     A. Dasgupta *et al.*, Quart. J. Crude Drug Res., 18, (1980), n.º 1, páginas 17 a 25 describen el uso *del aceite esencial de Piper cubeba* L. para el tratamiento de, por ejemplo, la cistitis y la gonorrea.

80     Eun-Mi Choi *et al.*, Journal of Ethnopharmacology, Elsevier Scientific Publishers Ltd., 89, 2003, páginas 171 a 175 describen propiedades antiinflamatorias de un extracto producido con metanol al 80% a partir de los frutos secados de *Piper cubeba* L.

85     En el marco del procedimiento de selección se estudiaron *in vitro* una serie de plantas medicinales tropicales para determinar su acción con respecto a células tumorales.

90     De manera completamente sorprendente se encontró que un extracto etanólico de frutos inmaduros de cubeba destruía todas las células tumorales sometidas a prueba.

95     Puesto que en primera línea el aceite esencial de los frutos de cubeba se usa desde el punto de vista médico, resultaba evidente someter a extracción los frutos con un agente de extracción adecuado, para obtener el aceite esencial.

100    Esto se realizó mediante la extracción de agotamiento con hexano.

Los frutos liberados así del aceite esencial se sometieron a extracción adicionalmente para completar con etanol acuoso al 90%, para obtener sustancias extractivas de polaridad media.

5 Tanto el aceite esencial obtenido como el extracto secundario etanólico se sometieron a prueba a continuación para determinar sus actividades con respecto a células tumorales.

10 Tal como se esperaba, se estableció que el aceite esencial obtenido destruía todas las células tumorales sometidas a prueba. Esto indica que el efecto citotóxico observado es de naturaleza inespecífica y por tanto no representa ningún efecto antitumoral.

15 Sin embargo, de manera completamente sorprendente se encontró que si bien el extracto secundario etanólico no destruía directamente ninguna de las células tumorales sometidas a prueba, sin embargo en algunas células tumorales variaba su comportamiento de proliferación.

20 Demostraron ser especialmente sensibles con respecto al extracto secundario etanólico aquellas células tumorales, que necesitan para su crecimiento hormonas sexuales como factores de crecimiento. Como ejemplos se mencionan la línea celular de cáncer de mama MCF 7 y la línea celular de cáncer de próstata LnCAP. Esta observación permite concluir que el efecto inhibitor de la proliferación no puede basarse de manera primaria en una inhibición de la testosterona 5 $\alpha$ -reductasa, puesto que ésta es irrelevante para el crecimiento de la línea celular de cáncer de mama MCF 7.

Un objetivo de la presente invención es poner a disposición un procedimiento para la producción de un extracto a partir de frutos de *Piper cubeba* L.

25 Este extracto estará libre o prácticamente libre de aceites esenciales citotóxicos.

Este extracto inhibirá el crecimiento en particular de aquellas células tumorales, que necesitan para su crecimiento hormonas sexuales como factores de crecimiento.

30 Este extracto presentará efectos antiandrogénicos y/o antiestrogénicos.

Este extracto antagonizará los efectos de la hormona sexual dihidrotestosterona, abreviada con DHT, en particular su efecto de aumento de la proliferación y antiapoptótico sobre las células de cáncer de próstata.

35 Estos objetivos se consiguen con la presente invención.

La invención se caracteriza por las características en las reivindicaciones independientes.

40 Para ello se requiere un procedimiento para la producción de un extracto seco a partir de frutos de *Piper cubeba* L. como componente activo en un medicamento, en el que

- en una primera etapa los frutos de *Piper cubeba* L., para la separación de los aceites esenciales, o bien
- 45 - se someten a una destilación con vapor de agua y se separa el destilado, o bien
- se someten a extracción al menos una vez con una fase lipófila y se separa(n) este extracto lipófilo o estos extractos lipófilos,
- 50 - en una segunda etapa se someten a extracción los frutos así tratados al menos una vez o bien con al menos un alcohol o bien con una mezcla de al menos un alcohol y agua, y
- en una tercera etapa se separan las partes de los frutos extraídas, se concentra el extracto así obtenido tras la adición de un adyuvante en primer lugar hasta una concentración de alcohol de entre el 0,1 y el 10% m/m para dar un extracto espesado, luego se seca y se obtiene.

55 La invención comprende también un uso de un extracto, que puede obtenerse según el procedimiento descrito en este documento, como componente activo para la producción de un medicamento para el tratamiento de al menos una enfermedad, seleccionada del grupo compuesto por enfermedades cancerosas, en particular cáncer de próstata, cáncer de testículos, cáncer de mama, cáncer de útero, incluyendo sus metástasis, e hiperplasia benigna de próstata.

60 Además la invención tiene como objeto el uso de un extracto, que puede obtenerse según el procedimiento descrito en este documento, antagonizando este extracto los efectos de la hormona sexual dihidrotestosterona, abreviada con DHT, (en particular su efecto de aumento de la proliferación y antiapoptótico sobre las células de cáncer de próstata), para la producción de un medicamento para el tratamiento del cáncer de próstata, incluyendo sus metástasis, o de hiperplasia benigna de próstata.

65

Finalmente la invención también se refiere a un medicamento para su uso en el tratamiento de al menos una enfermedad, seleccionada del grupo compuesto por: enfermedades cancerosas, en particular cáncer de próstata, cáncer de testículos, cáncer de mama, cáncer de útero, incluyendo sus metástasis, e hiperplasia benigna de próstata, conteniendo un extracto de *Piper cubeba* L. como componentes activos y presentando este extracto efectos antiandrogénicos y/o antiestrogénicos. Los componentes activos están contenidos a este respecto en un extracto, que puede obtenerse según el procedimiento descrito en este documento.

Formas de realización preferidas se definen en las reivindicaciones dependientes.

En la parte siguiente se describen posibles formas de realización de la presente invención.

A este respecto se hace referencia también a las figuras.

La figura 1a muestra el efecto antiproliferativo del extracto producido según el ejemplo 1 sobre células LNCap y PC-3.

La figura 1b muestra el efecto antiproliferativo de la sustancia pura cubebina sobre células LNCap y PC-3.

La figura 2 muestra la inhibición de la síntesis de ADN de células LNCap mediante el extracto producido según el ejemplo 1.

La figura 3 muestra el efecto antiandrogénico del extracto producido según el ejemplo 1 sobre la proliferación celular androgenodependiente en células LNCap.

La figura 4 muestra el efecto antiandrogénico del extracto producido según el ejemplo 1 sobre la síntesis de ADN de células LNCap.

La figura 5 muestra el efecto antiestrogénico del extracto producido según el ejemplo 1 sobre la síntesis de ADN de células MCF-7.

La figura 6a muestra el efecto inhibidor del extracto producido según el ejemplo 1 y de la sustancia pura cubebina sobre la actividad de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo II.

La figura 6b muestra el efecto inhibidor del inhibidor de 5 $\alpha$ -reductasa conocido "finasterida" sobre la actividad de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo II.

La figura 7a muestra que el TNF- $\alpha$  induce la apoptosis de las células tumorales en función de la dosis, y que este efecto se neutraliza completamente mediante DHT en las células tumorales.

La figura 7b muestra que el efecto antiapoptótico de DHT se neutraliza mediante el extracto producido según el ejemplo 1.

La figura 8 muestra que tanto el extracto producido según el ejemplo 1 como la sustancia pura cubebina inhiben la secreción del antígeno específico de la próstata (PSA) en función de la respectiva dosis.

La figura 9 muestra que el extracto producido según el ejemplo 1 inhibe de manera intensa la secreción inducida mediante DHT del antígeno específico de la próstata (PSA).

La figura 10 muestra que la densidad de receptores de andrógeno en células LNCap se reduce tanto mediante el tratamiento con el extracto producido según el ejemplo 1 como mediante el tratamiento con la sustancia pura cubebina de manera creciente en función de la dosis.

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención.

#### 55 **Ejemplo 1 (producción de un extracto líquido)**

Se sometieron a extracción 110 g de frutos inmaduros secos de *Piper cubeba* L. con una finura de molido de desde 0,1 mm hasta 0,9 mm a una temperatura de entre 10°C y 20°C durante 8 horas con 0,5 litros de hexano con agitación. A continuación se separó la fase de hexano cargada con los aceites esenciales y sustancias altamente lipófilas. Se realizó nuevamente esta operación, limitándose el tiempo de extracción a 2 horas.

Se secaron entonces los frutos así desaceitados en la estufa de vacío a una temperatura de 40°C hasta alcanzar un peso constante. Se obtuvieron 92 g de material farmacológico desaceitado.

65 A continuación se sometieron a extracción los frutos así tratados a una temperatura de entre 20°C y 30°C durante 2 horas con una mezcla de 90 partes en peso de etanol y 10 partes en peso de agua con agitación.

La razón en peso de fármaco con respecto a mezcla de agentes de extracción ascendía a 1:5.

Se separó el fármaco así extraído por medio de filtración por capas. Se obtuvieron 380 g de extracto líquido marrón oscuro con un contenido en sustancia seca del 1,92% m/m, correspondiente a un rendimiento de sustancia extractiva de 7,3 g absolutos de 92 g de frutos desaceitados.

Este extracto se denomina en la parte siguiente P9605.

Este extracto contiene un 20% m/m de cubebina, con respecto al contenido en sustancia seca.

#### **Ejemplo 2 (producción de un extracto seco)**

Su dosificó un extracto líquido obtenido según el ejemplo 1 a un evaporador a una temperatura de 40°C, y se inició la concentración a vacío (de 300 mbar a 20 mbar) y temperatura elevada (de 40°C a 55°C).

Durante la destilación siguió dosificándose la parte restante del extracto fluido de manera continua al evaporador, hasta que se hubo alimentado la cantidad total del extracto fluido y hasta que se consiguió en el extracto espesado obtenido un contenido en sustancia seca de desde el 30 hasta el 40% m/m.

Se obtuvieron 20,0 g de extracto espesado de color marrón oscuro, de flujo libre y de consistencia homogénea. El extracto espesado presentaba un contenido en sustancia seca del 36,5% m/m, lo que corresponde a un contenido en sustancia extractiva de 7,3 g.

Se mezcló homogéneamente este extracto espesado concentrado con 7,8 g de una disolución de goma arábica acuosa del 40% m/m y a continuación se secó en un secador a vacío a una presión de desde 150 mbar hasta 10 mbar y una temperatura de desde 40°C 55°C.

Se obtuvieron 10,4 g de extracto seco de color ocre con un contenido del 30% m/m de goma arábica como adyuvante.

#### **Ejemplo 3 (producción de una suspensión oleosa de extracto seco)**

Se dosificó un extracto líquido obtenido según el ejemplo 1 a un evaporador a una temperatura de 40°C, y se inició la concentración a vacío (de 300 mbar a 20 mbar) y temperatura elevada (de 40°C a 55°C).

Durante la destilación siguió dosificándose la parte restante del extracto fluido de manera continua al evaporador, hasta que se hubo alimentado la cantidad total del extracto fluido y hasta que se consiguió en el extracto espesado un contenido en sustancia seca de desde el 10 hasta el 20% m/m.

Se obtuvieron 54,0 g de extracto espesado de color marrón oscuro, de flujo libre y de consistencia homogénea. El extracto espesado presentaba un contenido en sustancia seca del 15,7% m/m, lo que corresponde a un contenido en sustancia extractiva de 7,3 g.

Se mezcló este extracto espesado muy fluido con 6,8 g de triglicéridos de cadena media (Ph. Eur.) y 0,5 g de lecitina de soja (ÖAB 90) y se dosificó a un evaporador a una temperatura de 40°C. Se realizó la concentración de esta mezcla a vacío (de 300 mbar a 40 mbar) y temperatura elevada (de 40°C a 50°C), hasta que se consiguió en el extracto espesado obtenido un contenido en sustancia seca de desde el 70 hasta el 80% m/m.

Se obtuvo un extracto espesado viscoso, que se secó a continuación en un secador a vacío a una presión de desde 150 mbar hasta 10 mbar y una temperatura de desde 40°C hasta 55°C, hasta que se consiguió un contenido en sustancia seca del 99,5% m/m.

Se obtuvieron 14,9 g de una suspensión oleosa de extracto seco marrón oscura con un contenido del 49% m/m en triglicéridos de cadena media y un 3,36% m/m de lecitina de soja como adyuvantes.

#### **Ejemplo 4 (inhibición de la proliferación celular)**

Con el extracto fluido P9605 producido según el ejemplo 1 se realizaron pruebas de proliferación celular. Como control se analizó conjuntamente un componente típico de los frutos de cubeba, el lignano cubebina.

Para la medición de la inhibición de la proliferación celular se añadió este extracto a células LNCap y a células PC-3. Se cultivaron las células así tratadas durante 4 días en medio de cultivo FBS al 10%.

Para la comparación se añadió el lignano cubebina puro, que está contenido en el extracto producido según la invención según el ejemplo 1 en un 20% mm de la masa seca, también a células LNCap y a células PC-3. Se cultivaron las células así tratadas durante 4 días en medio de cultivo FBS al 10%.

A este respecto se procedió según T. Lindl, Zell- und Gewebekultur, 4ª edición revisada, 2000, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

5 Todos los datos obtenidos se indican en tanto por ciento con respecto al control de disolvente (prueba sin extracto y sin cubebina); son los valores medios con desviaciones estándar de 4 experimentos indicados por triplicado.

A partir de los datos mostrados en las figuras 1a y 1b resulta evidente que tanto el extracto producido según la invención como la sustancia pura cubebina muestran un efecto antiproliferativo en células tanto LNCap como PC-3 en función de la respectiva dosis.

10

La inhibición es más acentuada en las células LNCap que en las células PC-3.

Tal como resulta evidente a partir de las figuras 1a y 1b, el efecto inhibitor del extracto producido según el ejemplo 1 P9605 es varias veces más intenso que lo que podía explicarse por su contenido en cubebina. El extracto contenía únicamente un 20% m/m de cubebina, pero presenta un efecto inhibitor igual de intenso (LNCap) o más intenso (PC-3).

15

#### **Ejemplo 5 (inhibición de la síntesis de ADN)**

20 Con el extracto fluido P9605 producido según el ejemplo 1 se realizaron pruebas de síntesis de ADN.

Para la medición de la inhibición de la síntesis de ADN se añadió el extracto producido según la invención a células LNCap. Se cultivaron las células así tratadas durante 4 días en medio de cultivo FBS al 10%.

25 A continuación se midió la cantidad de <sup>3</sup>H-timidina incorporada.

A este respecto se procedió según T. Lindl, Zell- und Gewebekultur, 4ª edición revisada, 2000, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

30 Todos los datos obtenidos se indican en tanto por ciento con respecto al control de disolvente (prueba sin extracto); son los valores medios con desviaciones estándar de 4 experimentos indicados por triplicado.

A partir de los datos mostrados en la figura 2 resulta evidente que el extracto producido según la invención inhibe la síntesis de ADN en función de la respectiva dosis.

35

#### **Ejemplo 6 (efecto antiandrogénico sobre la proliferación celular)**

Se determinó el efecto antiandrogénico sobre la proliferación celular androgenodependiente del extracto fluido P9605 producido según el ejemplo 1.

40

A este respecto se añadió el extracto producido según la invención a células LNCap. Se cultivaron las células así tratadas durante 6 días en medio de cultivo CSS al 10%.

45 Este cultivo tuvo lugar una vez sin la adición de dihidrotestosterona, abreviada con DHT, y una vez con la adición de DHT 1 nM.

A continuación se determinó la influencia del extracto producido según la invención sobre la proliferación celular de las células tumorales mediante el contenido en ADN.

50 Todos los datos obtenidos se indican en tanto por ciento con respecto al control de disolvente (prueba sin extracto); son los valores medios con desviaciones estándar de 4 experimentos indicados por triplicado.

A partir de los datos mostrados en la figura 3 resulta evidente que el extracto producido según la invención sobrerregula el efecto estimulante de DHT sobre la proliferación celular de las células tumorales en función de la dosis y además reduce la proliferación basal de las células.

55

Se sabe que la DHT aumenta la proliferación celular; véase el valor de control a cero.

#### **Ejemplo 7 (efecto antiandrogénico sobre la síntesis de ADN)**

60

Se determinó el efecto antiandrogénico sobre la síntesis de ADN del extracto fluido P9605 producido según el ejemplo 1.

A este respecto se añadió el extracto producido según la invención a células LNCap. Se cultivaron las células así tratadas durante 6 días en medio de cultivo CSS al 10%.

65

Este cultivo tuvo lugar una vez sin la adición de dihidrotestosterona, abreviada con DHT, y una vez con la adición de DHT 1 nM.

A continuación se midió la cantidad de <sup>3</sup>H-timidina incorporada.

A este respecto se procedió según T. Lindl, Zell- und Gewebekultur, 4ª edición revisada, 2000, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Todos los datos obtenidos se indican en tanto por ciento con respecto al control de disolvente (prueba sin extracto); son los valores medios con desviaciones estándar de 4 experimentos indicados por triplicado.

A partir de los datos mostrados en la figura 4 resulta evidente que el extracto producido según la invención sobrerregula el efecto estimulante de DHT sobre la síntesis de ADN de las células tumorales en función de la dosis y además reduce la síntesis de ADN basal de las células.

Se sabe que la DHT aumenta la síntesis de ADN; véase el valor de control a cero.

#### **Ejemplo 8 (efecto antiestrogénico sobre la síntesis de ADN de células de cáncer de mama)**

Se determinó el efecto antiestrogénico sobre la síntesis de ADN de células de cáncer de mama del extracto fluido P9605 producido según el ejemplo 1.

A este respecto se cultivaron células MCF-7 durante 3 días en medio de cultivo CSS al 10%, al que se le añadieron diferentes concentraciones de estradiol.

Este cultivo tuvo lugar una vez sin la adición de extracto producido según la invención y una vez con la adición de 10 µg/ml de extracto.

A continuación se midió la cantidad de <sup>3</sup>H-timidina incorporada.

A este respecto se procedió según T. Lindl, Zell- und Gewebekultur, 4ª edición revisada, 2000, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Todos los datos obtenidos se indican en DPM (degradación radiactiva por minuto; *degradation per minute*); son los valores medios con desviaciones estándar de 4 experimentos indicados por triplicado.

A partir de los datos mostrados en la figura 5 resulta evidente que el extracto producido según la invención impide de manera completa o de manera prácticamente completa la estimulación de la síntesis de ADN de células de cáncer de mama mediante estradiol.

Se sabe que el estradiol aumenta la síntesis de ADN de células de cáncer de mama; véase el valor de control a cero.

#### **Ejemplo 9 (inhibición de la actividad 5α-reductasa tipo II)**

Se determinó la inhibición de la actividad 5α-reductasa tipo II por medio del extracto fluido P9605 producido según el ejemplo 1.

Se realizó el ensayo con un homogeneizado de células HEK293, que sobreexpresan la 5α-reductasa tipo II (Reichert W., Hartmann R.W. y Jose J.; 2001, Journal Enzyme Inhibition, vol. 16, 47-53).

Se determinó la influencia del extracto producido según la invención y de la sustancia pura cubebina sobre la actividad 5α-reductasa tipo II por medio de la determinación de la transformación de <sup>3</sup>H-testosterona en <sup>3</sup>H-DHT.

Como sustancia de control sirvió el inhibidor de 5α-reductasa conocido "finasterida".

Todos los datos obtenidos se indican en tanto por ciento con respecto al control de disolvente (prueba sin extracto); son los valores medios con desviaciones estándar de 4 experimentos indicados por triplicado.

A partir de los datos mostrados en la figura 6a resulta evidente que tanto el extracto producido según la invención como la sustancia pura cubebina muestran un efecto inhibitor sobre la actividad de la 5α-reductasa tipo II.

La inhibición es más intensa en el extracto que en la sustancia pura cubebina.

El extracto inhibe con un valor CI<sub>50</sub> de 3,6 µg/ml, mientras que la sustancia pura cubebina inhibe con un valor CI<sub>50</sub> de

9,9 µg/ml.

La evolución de la curva dosis-respuesta del extracto y de la sustancia pura cubebina es análoga a la evolución de la curva dosis-respuesta del inhibidor de 5α-reductasa conocido "finasterida" (figura 6b).

5 **Ejemplo 10 (aumento de la apoptosis)**

Se determinó la inducción de la apoptosis por medio del extracto fluido P9605 producido según el ejemplo 1.

10 Como ensayo previo se añadió para la medición de la inducción de la apoptosis del factor de necrosis tumoral TNF-α solo así como en combinación con dihidrotestosterona, abreviada con DHT, 100 nM a células LNCap. Se cultivaron las células así tratadas durante 2 días en medio de cultivo FBS al 10%.

15 Se midió la apoptosis de las células por medio de la aplicación de un kit de inmunoensayo de apoptosis comercial, en el que se detectan específicamente los fragmentos de ADN e histona, que existen como mono y oligonucleosoma.

20 A partir de los datos mostrados en la figura 7a resulta evidente que el TNF-α induce la apoptosis de las células tumorales en función de la dosis.

Este efecto se neutraliza de manera completa o de manera prácticamente completa mediante DHT en las células tumorales.

25 Se realizaron ensayos análogos con DHT sola así como en combinación con 10 µg/ml del extracto producido según la invención.

A partir de los datos mostrados en la figura 7b resulta evidente que el efecto antiapoptótico de DHT se neutraliza mediante el extracto producido según la invención.

30 **Ejemplo 11 (inhibición de la secreción del antígeno específico de la próstata)**

Se determinó la inhibición del antígeno específico de la próstata (PSA) por medio del extracto fluido P9605 producido según el ejemplo 1.

35 A este respecto se cultivaron en un ensayo células LNCap durante 2 días en medio de cultivo CSS al 10%, al que se le añadieron diferentes concentraciones o bien del extracto producido según la invención o bien de la sustancia pura cubebina.

40 A continuación se midió la cantidad de PSA secretada en el sobrenadante celular por medio de un inmunoensayo. Adicionalmente se determinó la cantidad de ADN.

En la figura 8 se indica la razón de la cantidad de PSA con respecto a la cantidad de ADN en tanto por ciento.

45 Son valores medios con desviaciones estándar de 4 experimentos indicados por triplicado.

A partir de los datos mostrados en la figura 8 resulta evidente que tanto el extracto como la sustancia pura cubebina inhiben la secreción del antígeno específico de la próstata (PSA) en función de la respectiva dosis.

50 En un segundo ensayo se cultivaron células LNCap durante 2 días en medio de cultivo CSS al 10%, al que se le añadieron diferentes concentraciones de dihidrotestosterona, abreviada con DHT.

Este cultivo tuvo lugar una vez sin la adición de extracto producido según la invención y una vez con la adición de 10 µg/ml de extracto.

55 A continuación se midió la cantidad de PSA secretada en el sobrenadante celular por medio de un inmunoensayo. Adicionalmente se determinó la cantidad de ADN.

En la figura 9 se indica la razón de la cantidad de PSA con respecto a la cantidad de ADN en tanto por ciento.

60 Son valores medios con desviaciones estándar de 4 experimentos indicados por triplicado.

A partir de los datos mostrados en la figura 9 resulta evidente que la secreción inducida mediante DHT del antígeno específico de la próstata (PSA) se inhibe intensamente mediante el extracto producido según la invención.



**Ejemplo 12 (formación de receptores de andrógeno)**

Se determinó la influencia de la formación de receptores de andrógeno por medio del extracto fluido P9605 producido según el ejemplo 1.

5 A este respecto se cultivaron en un ensayo células LNCap durante 2 días en medio de cultivo FBS al 10%, al que se le añadieron diferentes concentraciones o bien del extracto producido según la invención o bien de la sustancia pura cubebina.

10 A continuación se determinó la variación de la cantidad de receptores de andrógeno por medio un análisis Westernblot.

En la figura 10 se muestran las bandas del receptor de andrógeno.

15 La densidad de receptores de andrógeno in células LNCap se reduce tanto mediante el tratamiento con el extracto producido según la invención como mediante el tratamiento con la sustancia pura cubebina de manera creciente en función de la dosis.

**Conclusiones**

20 Mediante los ejemplos 1 a 3 se señala mediante qué combinaciones de etapas de procedimiento pueden producirse extractos de frutos de cubeba, que están libres o prácticamente libres de aceite esencial, presentan nuevas propiedades y alcanzan los objetivos de la presente invención.

25 Los ejemplos 4 a 12 demuestran la actividad antitumoral de los extractos producidos según la invención e ilustran los mecanismos de acción en los que se basa la actividad frente a las células tumorales dependientes de hormonas. Estos ejemplos muestran el elevado potencial terapéutico de los extractos producidos según la invención, en particular para el tratamiento de enfermedades malignas, cuya progresión está influida por hormonas sexuales femeninas o masculinas.

30 Si se observa la intensidad de acción (CI<sub>50</sub>: 3,6 µg/ml) de los extractos producidos según la invención con respecto a la 5α-reductasa humana en comparación con la actividad citada en el documento JP 2000-095649 A (CI<sub>50</sub>: 790 µg/ml), se muestra que los extractos producidos según la invención presentan una actividad aproximadamente 200 veces mayor y por consiguiente también abren para el tratamiento de la hiperplasia de próstata posibilidades  
35 completamente nuevas.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de un extracto seco a partir de frutos de *Piper cubeba* L. como componente activo en un medicamento, caracterizado porque
- 5 - en una primera etapa los frutos de *Piper cubeba* L., para la separación de los aceites esenciales, o bien
- - se someten a una destilación con vapor de agua y se separa el destilado, o bien
- 10 - - se someten a extracción al menos una vez con una fase lipófila y se separa(n) este extracto lipófilo o estos extractos lipófilos,
- en una segunda etapa se someten a extracción los frutos así tratados al menos una vez o bien con al menos un alcohol o bien con una mezcla de al menos un alcohol y agua, y
- 15 - en una tercera etapa se separan las partes de los frutos extraídas, se concentra el extracto así obtenido tras la adición de un adyuvante en primer lugar hasta una concentración de alcohol de entre el 0,1 y el 10% m/m para dar un extracto espesado, luego se seca y se obtiene.
- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se usan los frutos inmaduros de *Piper cubeba* L., e inmediatamente antes de la extracción se muelen y se someten a extracción en forma molida, en particular con una finura de molido de desde 0,1 mm hasta 0,9 mm.
- 25 3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque en la primera etapa se usa como fase lipófila o bien CO<sub>2</sub> supercrítico o bien un hidrocarburo lineal o ramificado con de 4 a 9 átomos de carbono, en particular hexano o isopentano.
- 30 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque en la primera etapa se utilizan por parte en peso de frutos que deben someterse a extracción desde 1 hasta 20 partes en peso, en particular desde 6 hasta 12 partes en peso, de fase lipófila.
- 35 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque en la primera etapa tiene lugar la extracción con la fase lipófila a una temperatura de desde 0°C hasta 50°C, en particular desde 5°C hasta 15°C, y durante un tiempo de desde 2 hasta 4 horas.
- 40 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque en la segunda etapa el alcohol es un alcohol con de 1 a 5 átomos de carbono, en particular etanol, y porque la mezcla está compuesta por al menos un alcohol y agua, por del 50 al 90% m/m de alcohol y del 50 al 10% m/m de agua, preferiblemente por del 80 al 90% mm de alcohol y del 20 al 10% m/m de agua, prefiriéndose etanol.
- 45 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque en la segunda etapa se utilizan por parte en peso de frutos que deben someterse a extracción desde 1 hasta 20 partes en peso, en particular desde 6 hasta 12 partes en peso, de al menos un alcohol o una mezcla de al menos un alcohol y agua.
- 50 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque en la segunda etapa tiene lugar la extracción con al menos un alcohol o con una mezcla de al menos un alcohol y agua, a una temperatura de desde 20°C hasta 60°C y durante un tiempo de desde 2 hasta 4 horas.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el adyuvante usado en la tercera etapa es un adyuvante de secado, por ejemplo manitol, y porque se concentra hasta una concentración de alcohol del 5% m/m, y porque el secado tiene lugar mediante secado por pulverización, secado en cinta o secado con paletas.
- 55 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque el extracto obtenido en la tercera etapa está libre o prácticamente libre de  $\alpha$ -cubebeno ( $\alpha$ -cubebene) y  $\beta$ -cubebeno ( $\beta$ -cubebene).
- 60 11. Uso de un extracto, obtenible según el procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, como componente activo para la producción de un medicamento para el tratamiento de al menos una enfermedad, seleccionada del grupo compuesto por enfermedades cancerosas, en particular cáncer de próstata, cáncer de testículos, cáncer de mama, cáncer de útero, incluyendo sus metástasis, e hiperplasia benigna de próstata.
- 65 12. Uso de un extracto, obtenible según el procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, antagonizando este extracto los efectos de la hormona sexual dihidrotestosterona, abreviada con DHT, en particular su efecto de aumento de la proliferación y antiapoptótico sobre las células de cáncer de próstata, como componente activo para la producción de un medicamento para el tratamiento del cáncer de próstata, incluyendo sus metástasis, o de hiperplasia benigna de próstata.

- 5 13. Medicamento para su uso en el tratamiento de al menos una enfermedad, seleccionada del grupo compuesto por enfermedades cancerosas, en particular cáncer de próstata, cáncer de testículos, cáncer de mama, cáncer de útero, incluyendo sus metástasis, e hiperplasia benigna de próstata, caracterizado porque contiene un extracto de *Piper cubeba* L. como componentes activos, presentando este extracto efectos antiandrogénicos y/o antiestrogénicos, y estando contenidos los componentes activos en un extracto, obtenible según el procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10.
- 10 14. Uso de un extracto, obtenible según el procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, antagonizando este extracto los efectos de la hormona sexual dihidrotestosterona, abreviada con DHT, en particular su efecto de aumento de la proliferación y antiapoptótico sobre las células de cáncer de próstata, para la producción de un medicamento para el tratamiento del cáncer de próstata, incluyendo sus metástasis, o de hiperplasia benigna de próstata.

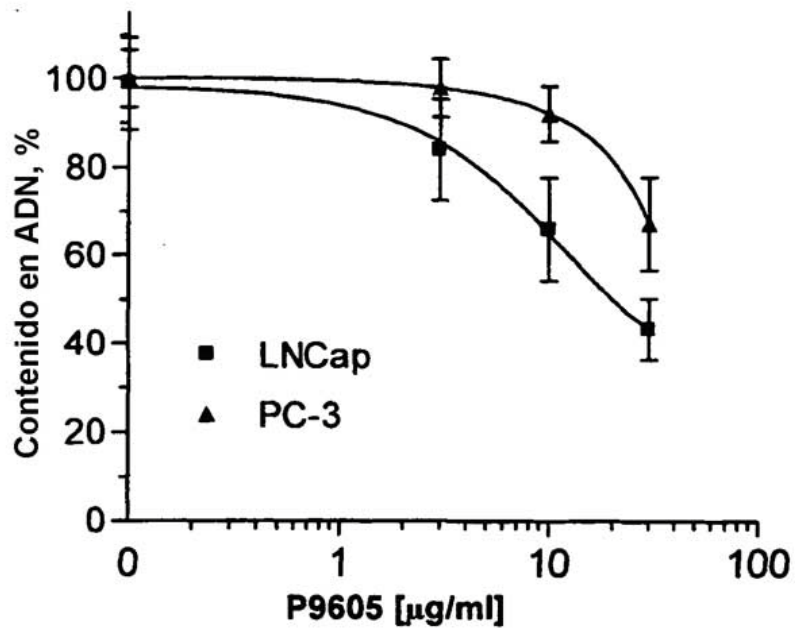


Fig. 1a

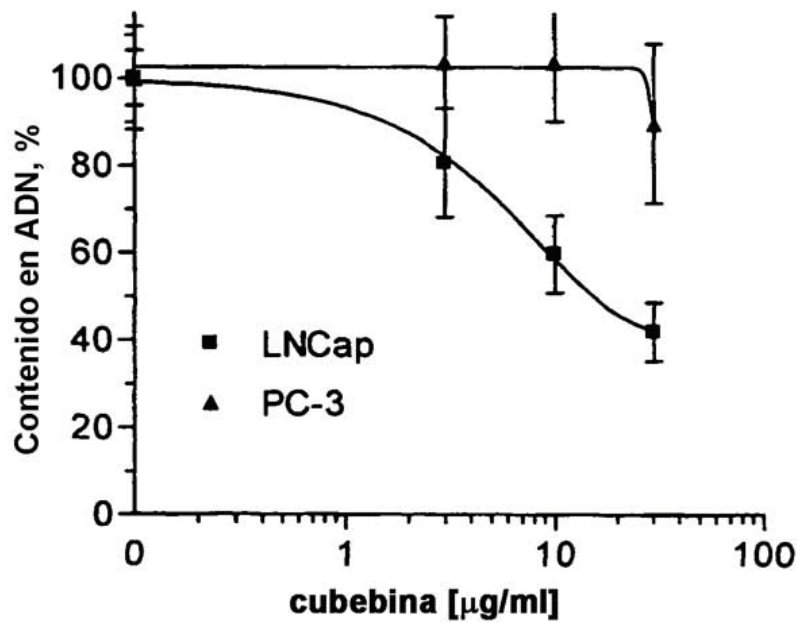


Fig. 1b

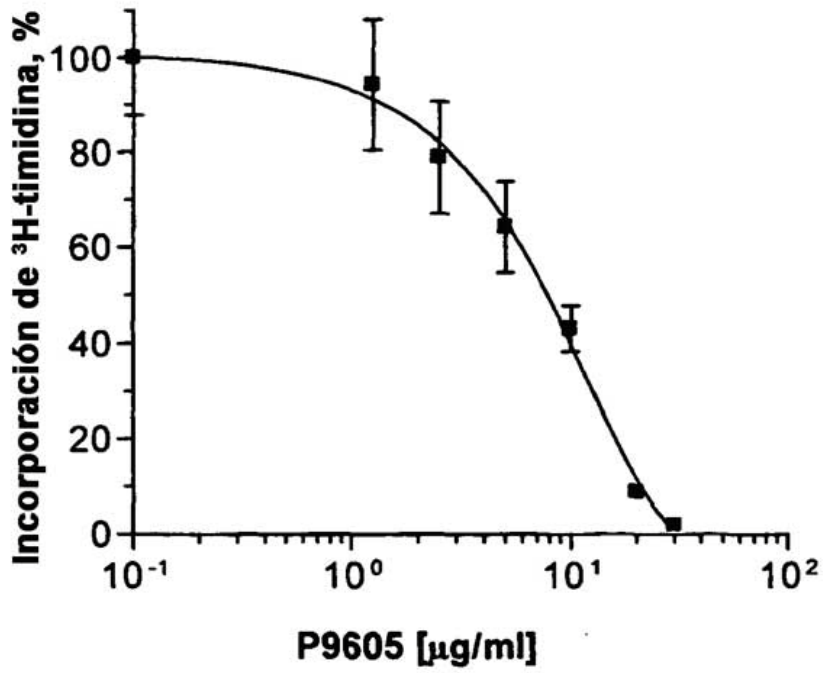


Fig. 2

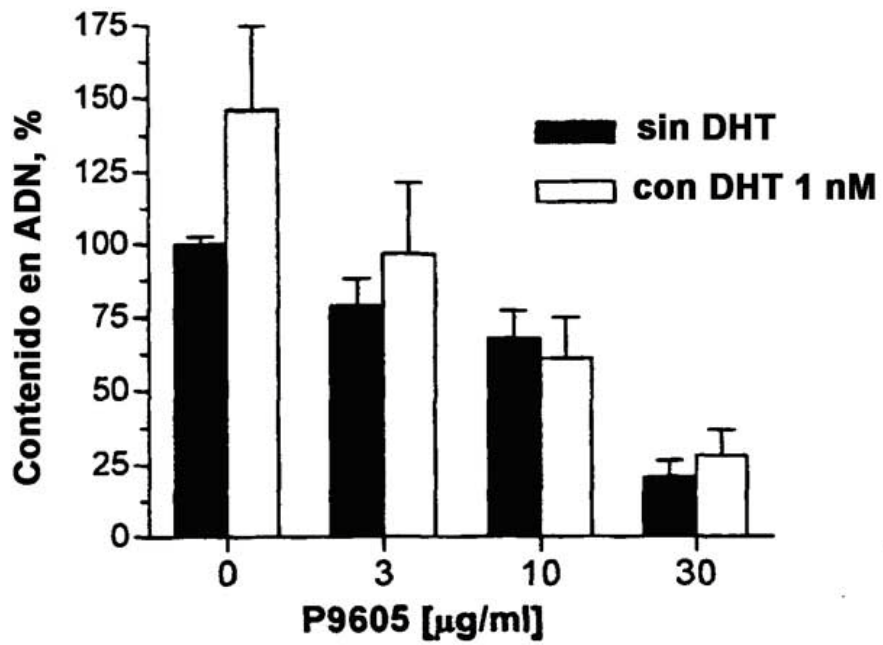
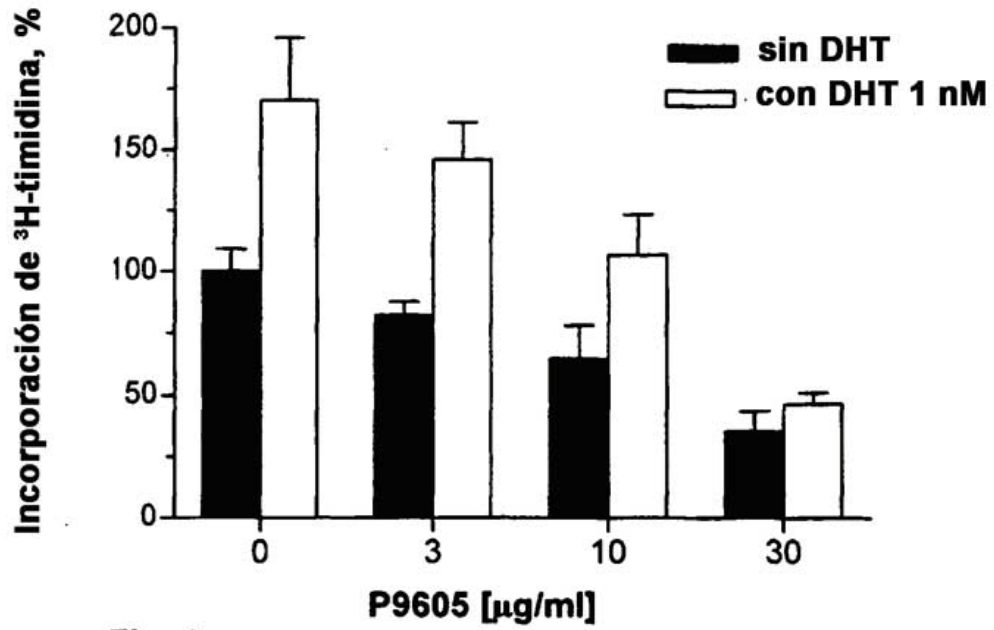
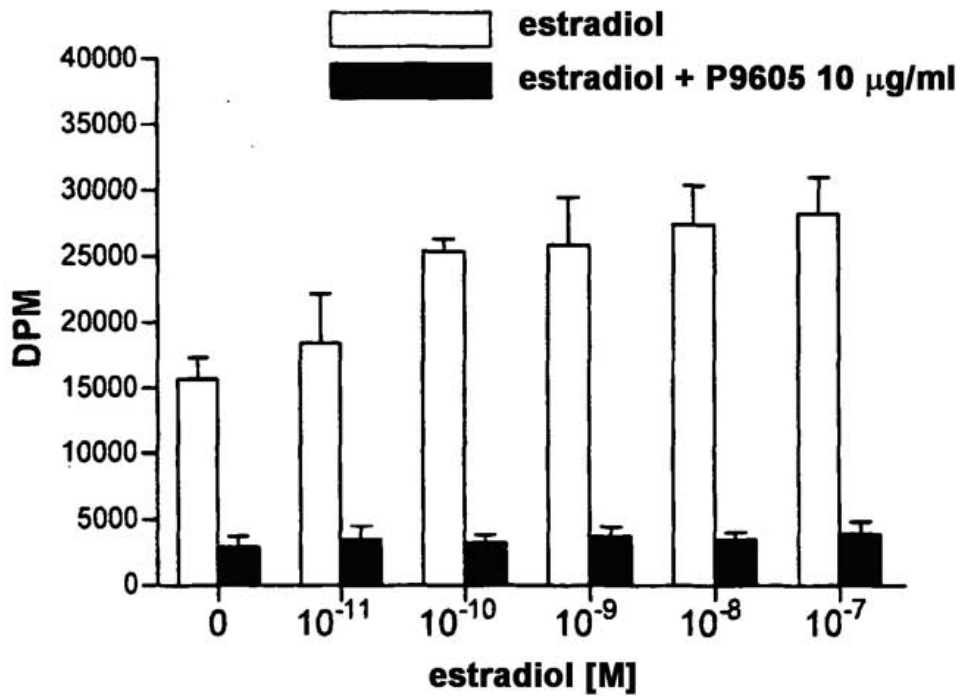


Fig. 3



**Fig. 4**



**Fig. 5**

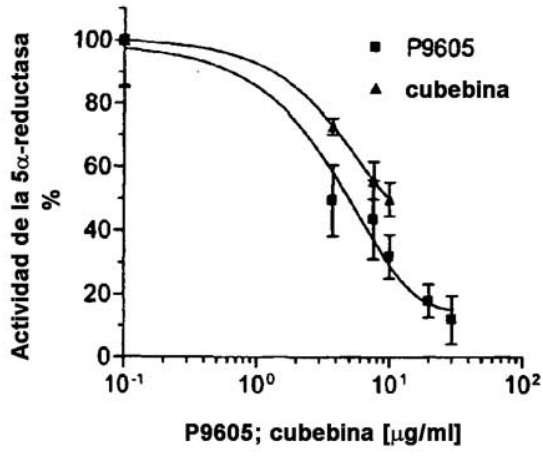


Fig. 6a

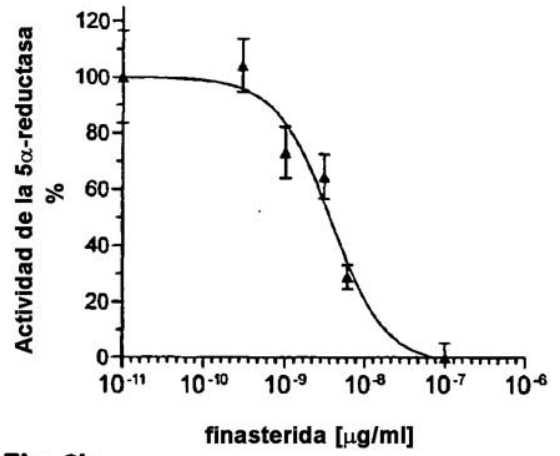


Fig. 6b

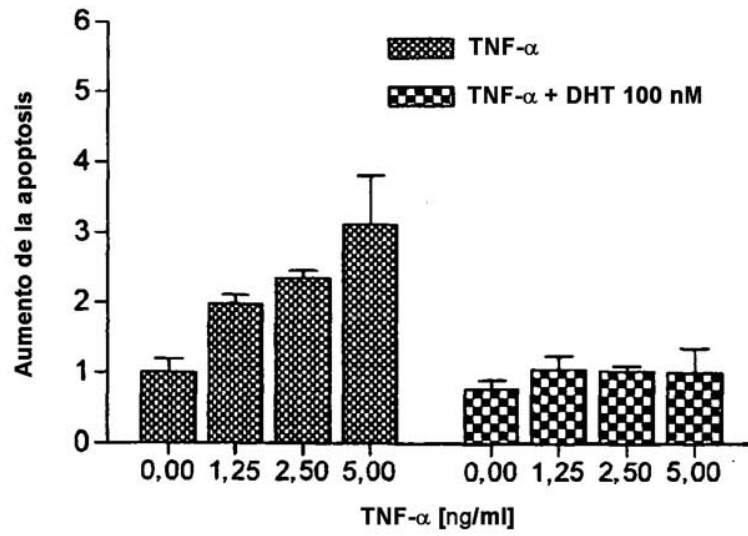


Fig. 7a

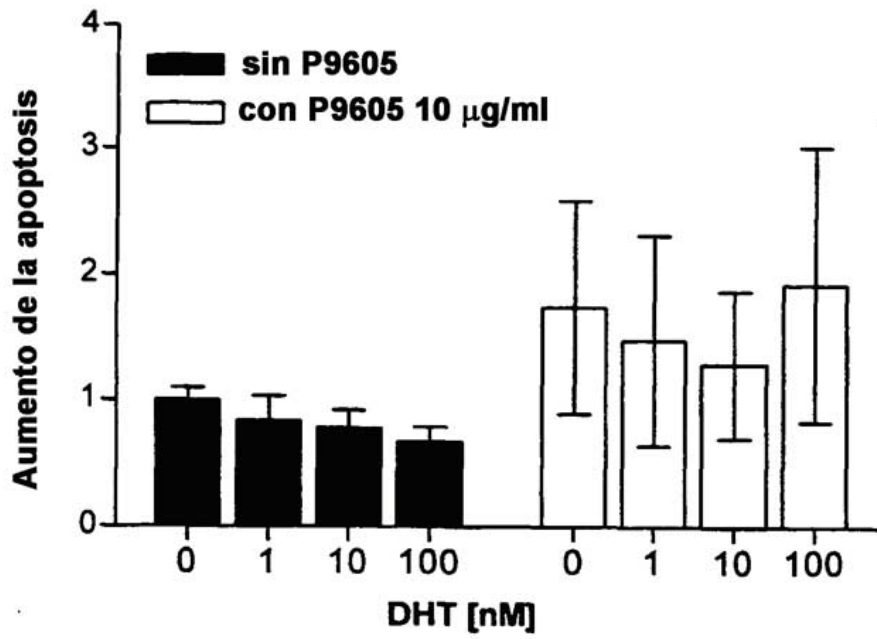


Fig. 7b

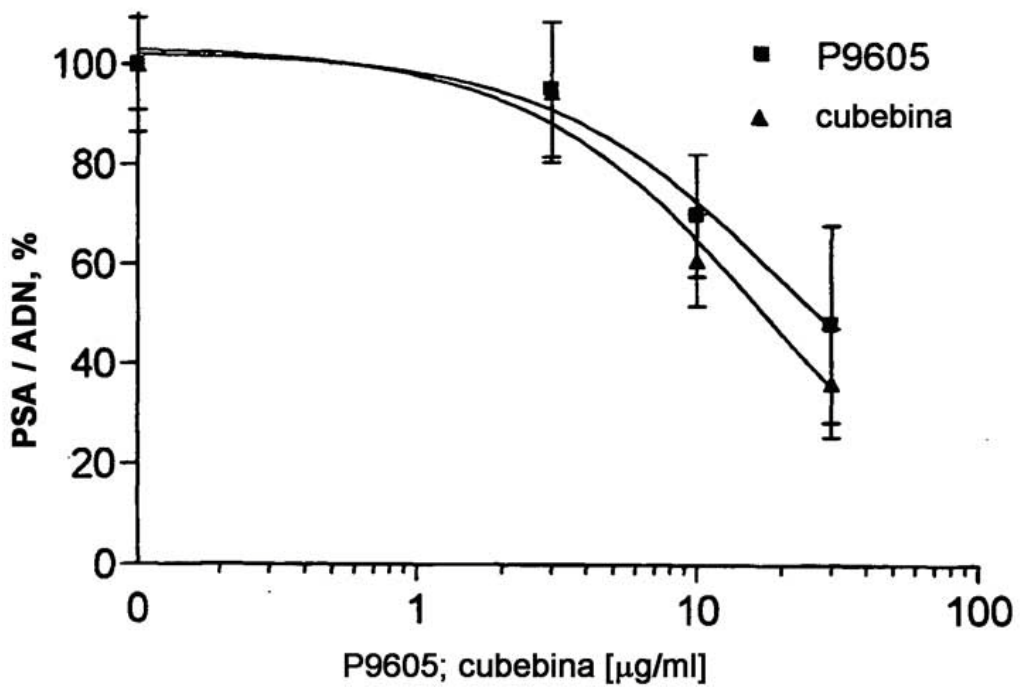


Fig. 8



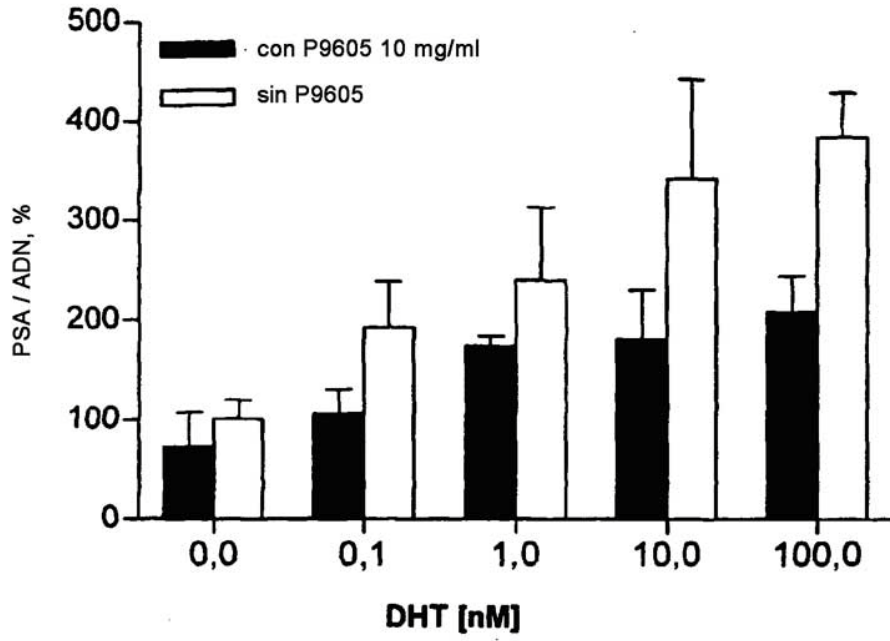


Fig. 9

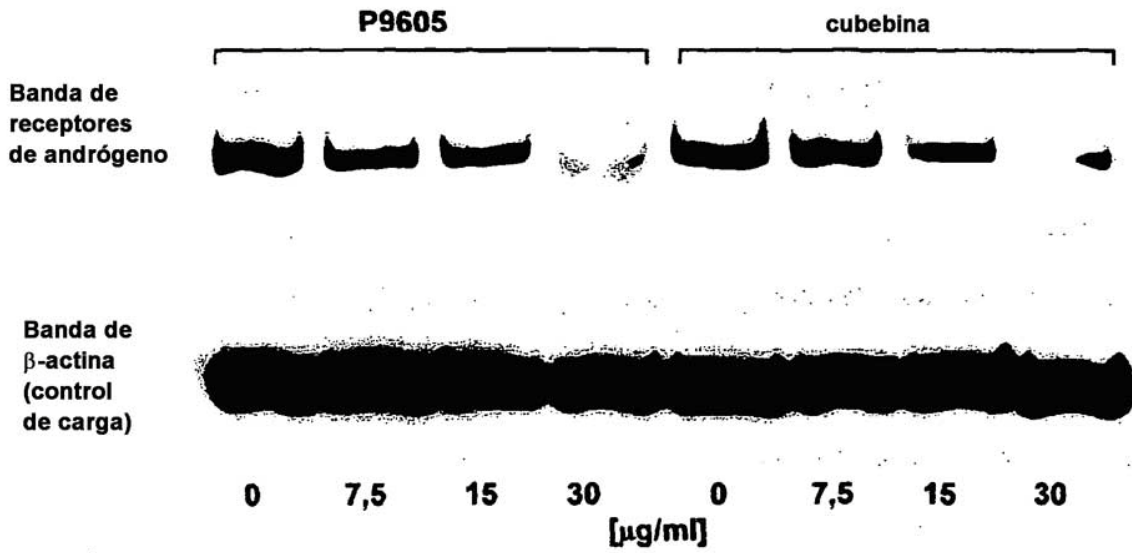


Fig. 10