



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2008 013 016 A1** 2009.04.02

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2008 013 016.8**

(22) Anmeldetag: **07.03.2008**

(43) Offenlegungstag: **02.04.2009**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A61K 31/35** (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

(30) Unionspriorität:  
**96135159**      **20.09.2007**      **TW**

(74) Vertreter:  
**Kador & Partner, 80469 München**

(71) Anmelder:  
**Golden Biotechnology Corp., Danshuei, Taipei, TW**

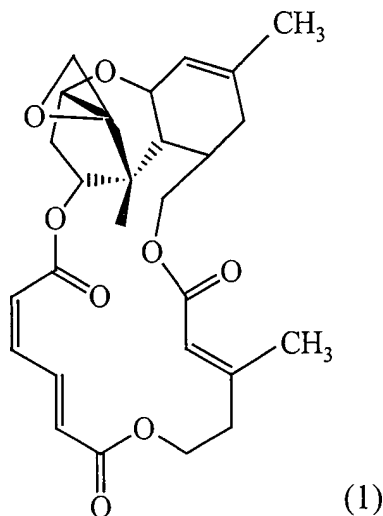
(72) Erfinder:  
**Liu, Sheng-Yun, Danshuei, Taipei, TW; Kuo, Mao-Tien, Danshuei, Taipei, TW; Wen, Wu-Che, Danshuei, Taipei, TW**

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

(54) Bezeichnung: **Verbindungen aus Myrothecium Sp. zur Hemmung des Krebszellwachstums**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zur Hemmung von Krebszellen, umfassend:

Verabreichung einer wirksamen Dosis einer Verbindung, die die folgende Formel hat, um das Wachstum von Leberkrebszellen, Lungenkrebszellen oder Prostatakrebszellen zu hemmen



**Beschreibung**

## HINTERGUND DER ERFINDUNG

## 1. Bereich der Erfindung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Verwendung einer Verbindung um das Wachstum von Krebszellen zu hemmen, insbesondere auf Verbindungen, die aus dem Myzel von *Myrothecium* sp. isoliert und aufgereinigt werden und die eine Anwendung bei der Wachstumshemmung von Lungenkrebszellen, Leberkrebszellen und Prostatakrebszellen finden können.

## 2. Stand der Technik

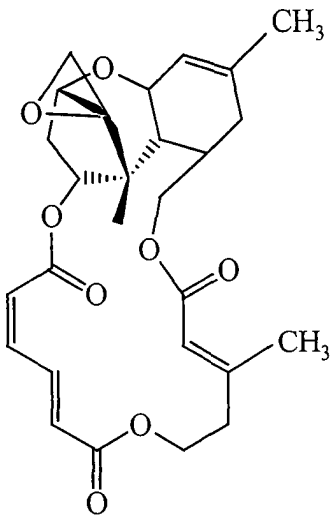
**[0002]** Nach dem 20. Jahrhundert ist Krebs zur Nummer eins der tödlichen Erkrankungen geworden. Entsprechend den Statistiken, die von dem Department of Health in Taiwan im Juni 2002 angefertigt wurden, ist maligner Krebs in den letzten 20 Jahren seit 1982 mit einer Mortalitätsrate von 147,68 pro 100.000 Einwohnern und mit etwa 33.000 Toten im Jahr 2001 zu der führenden Ursache der Top 10 Todesursachen geworden. Die Suche nach wirksamen Antikrebverbindungen mit geringen Nebenwirkungen wird deshalb zwingend erforderlich.

**[0003]** Trichothecene gehören zur Familie der Sesquiterpenoiden und haben viele verschiedene physiologische Aktivitäten. Sie werden von verschiedenen Pilzen hergestellt, einschließlich *Fusarium*, *Trichothecium*, *Trichoderma*, *Myrothecium*, *Cephalosporium*, *Stachybotrys* und *Cylindrocarpon*. Untersuchungen haben gezeigt, dass Trichothecene eine antibakterielle Aktivität aufweisen und in vitro eine cytostatische Aktivität haben. Die Trichothecene können in zwei Gruppen eingeteilt werden, die makrocyclische und nicht makrocyclische Verbindungen umfassen, basierend auf den Unterschieden in der chemischen Struktur. Mycotoxine, die makrocyclische Trichothecene wie Verrucarine, Roridine, Satratoxin, Vertisporin und Baccharinoid enthalten, sind bekannt und es wird berichtet, dass sie eine Vielzahl von biologischen Aktivitäten besitzen. Sie hemmen die Initiation der Proteintranslation und interferieren ferner mit der Proteinsynthese, indem sie an die Polysomen und 80S Ribosomen in eukaryotischen Zellen binden. Die meisten dieser Mycotoxine haben eine Anwendung in Antibiotika um das bakterielle Wachstum zu hemmen, bei der Antiinflammation und bei der Immunmodulation gefunden. Die Verrucarine, die auch als Muconomycin bekannt sind und von *Myrothecium* sp. hergestellt werden, können in Verrucarin A (Muconomycin A), Verrucarin J (Muconomycin B), Verrucarin K und dergleichen entsprechend ihren chemischen Strukturen eingeteilt werden. Für die Verrucarine ist gezeigt worden, dass sie eine anhaltende Hemmung der Protein- und Glycoproteinsynthese bewirken und eine immunsuppressive Aktivität haben. Es wurde auch von antiviralen Aktivitäten der Verrucarine gegen das Newcastle-Virus und das Tabakmosaikvirus berichtet.

**[0004]** Die Hemmung von Lungenkrebs, Leberkrebs und Prostatakrebs ist in den oben erwähnten Anwendungen der Verrucarine nicht untersucht worden. Deshalb kann die Anwendung der Verrucarine bei Krebs von großem Nutzen für die Therapien von Lungenkrebs, Leberkrebs und Prostatakrebs beim Menschen sein.

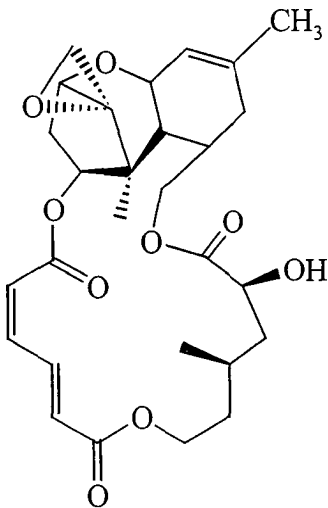
## ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0005]** Um die Antitumorverbindungen zu identifizieren bezieht sich die Erfindung auf Verbindungen mit der folgenden Strukturformel, die aus den Extrakten von *Myrothecium* sp. isoliert und aufgereinigt werden.



(1)

**[0006]** Die Verbindung mit der Formel (1) ist Verrucaric A (Muconomycin B) mit der Molekularformel  $C_{27}H_{32}O_8$  und einem Molekulargewicht von 484.



(2)

**[0007]** Die Verbindung mit der Formel (2) ist Verrucaric J (Muconomycin B) mit der Molekularformel  $C_{27}H_{34}O_9$  und einem Molekulargewicht von 502.

**[0008]** Die Verbindungen mit der Formel (1) oder der Formel (2) in der vorliegenden Erfindung werden aus organischen Lösungsmittel-extrakten von *Myrothecium* sp. aufgereinigt. Die organischen Lösungsmittel, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, umfassen, sind aber nicht darauf beschränkt, Alkohole wie Methanol, Ethanol oder Propanol, wobei Ethanol bevorzugt wird. Irgendwelche anderen organischen Flüssigkeiten, mit denen die Verbindungen der Formel (1) oder der Formel (2) extrahieren werden können, einschließlich Estern wie Ethylacetat, Alkanen wie Hexan oder Haloalkanen wie Chlormethan oder Chlorethan, können verwendet werden.

**[0009]** Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren für die Verwendung der oben erwähnten Verbindungen mit der Formel (1) und der Formel (2) bereit um das Tumorzellwachstum zu hemmen. Genauer umfasst das Verfahren die Verabreichung einer wirksamen Dosis der Verbindungen um eine Auswahl an Krebszellen einschließlich Lungenkrebs, Leberkrebs und Prostatakrebs zu hemmen, was zu einer Verlangsamung des Krebszellwachstums führt und darüber hinaus die Proliferation der Krebszellen hemmt und das Risiko für einen Malignizität verringert. Deshalb kann das Verfahren für die Verwendung der Verbindung der vorliegenden Erfindung bei der Behandlung von Lungenkrebs, Leberkrebs und Prostatakrebs verwendet werden.

**[0010]** Die vorliegende Erfindung stellt ferner ein Verfahren für die Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die eine wirksame Dosis der Verbindungen mit der Strukturformel (1) und der Strukturformel (2) enthält, für die Behandlung von Lungenkrebs, Leberkrebs und Prostatakrebs bereit um die therapeutischen Effekte gegen die Krebszellen zu steigern.

**[0011]** Die Verbindungen mit der Formel (1) und/oder der Formel (2) in der Erfindung können in den pharmazeutischen Zusammensetzungen für die Behandlung von Lungenkrebs, Leberkrebs und Prostatakrebs umfasst sein um das Wachstum von Tumorzellen zu hemmen. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen umfassen nicht nur die Verbindungen mit der Formel (1) und/oder der Formel (2), sondern auch die pharmazeutisch akzeptablen Carrier. Die Carrier umfassen, sind aber nicht darauf beschränkt, Exzipienten wie Wasser, Füllmittel wie Saccharose oder Stärke, Bindemittel wie Cellulosederivate, Verdünnungsmittel, Disintegrationsmittel, Absorptionsfördermittel oder Süßstoffe. Die Zusammensetzung der Erfindung kann durch das Mischen der Verbindungen mit der Formel (1) und/oder der Formel (2) mit mindestens einem der Carrier mittels konventioneller Verfahren hergestellt werden, die in dem technischen Bereich der Pharmazie bekannt sind, und sie kann als ein Pulver, Tabletten, Kapseln, Pellets, Granula oder in einer anderen flüssigen Formulierung formuliert werden, dies ist aber nicht darauf beschränkt.

**[0012]** Die vorliegende Erfindung wird darüber hinaus in der folgenden Ausführungsdarstellung und in den Beispiel erklärt werden. Diese unten dargestellten Beispiele sollen jedoch nicht als Einschränkung für den Bereich der Erfindung angesehen werden, sondern es ist vorgesehen, dass durch Fachleute leicht Modifikationen vorgenommen werden können, wobei die Modifikationen innerhalb des Gedankens der Erfindung und dem Bereich der angefügten Ansprüche sind.

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

**[0013]** Das Myzel von *Myrothecium* sp. wurde kultiviert und geerntet. Das Myzel wurde dann mit organischen Lösungsmitteln extrahiert um die organischen Lösungsmittel-extrakte von *Myrothecium* sp. durch Extraktionsmethoden zu erhalten, die im Fach gut bekannt sind. Die organischen Lösungsmittel umfassen, sind aber nicht darauf beschränkt, Alkohole wie Methanol, Ethanol oder Propanol, Ester wie Ethylacetat, Alkane wie Hexan oder Haloalkane wie Chlormethan oder Chlorethan. Von diesen wird Alkohol bevorzugt und 95% Ethanol wird besonders bevorzugt.

**[0014]** Die organischen Lösungsmittel-extrakte von *Myrothecium* sp. wurden einer präparativen Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) für die Isolierung und Reinigung unterworfen. Jede Fraktion wurde eingeholt und auf biologische Aktivitäten untersucht. Die potenten Fraktionen mit Antikrebswirkungen wurden hinsichtlich der Zusammensetzung analysiert und weiter gegen verschiedene Tumorzellen untersucht. Der oben genannte Ansatz führte dann zu der Identifizierung von den Verbindungen mit der Formel (1) und der Formel (2), die das Wachstum der Tumorzellen von Lungenkrebs, Leberkrebs und Prostatakrebs hemmen.

**[0015]** Für die Verbindungen mit der Formel (1) und der Formel (2) wurden Antikrebswirkungen gezeigt, wobei ein 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid(MTT)-Assay entsprechend dem Screeningmodell für Antitumormittel des National Cancer Institute (NCI) der United States National Institutes of Health zur Untersuchung der Überlebensraten verwendet wurde, wobei Lungenkrebs-, Leberkrebs- und Prostatakrebszelllinien und der gleichen verwendet wurden. Die oben genannten Assays haben belegt, dass Varrucararin A und Verrucararin J die Überlebensraten der Lungenkrebszelllinie (A-549), der Leberkarzinomzelllinien (Hep3B und HepG2) und der Prostatakrebszelllinien (LNCaP und DU-145) verringerten, wobei sie zur gleichen Zeit eine relativ geringe maximale Hemmkonzentrationswerte ( $IC_{50}$ ) aufwiesen. Deshalb können Verrucararin A und Verrucararin J für die Hemmung des Krebszellwachstums von Lungenkrebs, Leberkrebs und Prostatakrebs verwendet werden, und sie können darüber hinaus bei der Krebsbehandlung von Lungenkrebs, Leberkrebs, Prostatakrebs und dergleichen eingesetzt werden. Die Details der Beispiele sind wie folgt beschrieben.

#### Beispiel 1

##### Kultivierung von *Myrothecium* sp.

**[0016]** Die Medien für *Myrothecium* sp. wurde wie unten beschrieben hergestellt. Die Medien enthielten 0,1–2 g NaCl, 5–10 g Pepton, 1–2 g Hefeextrakt, 3–10 g Agar, 3–10 g Zerealie (ausgewählt aus Reis, Weizen, Klebreis oder Mais und dergleichen), 1–2 g Stickstoffquelle ( $NH_4NO_3$  oder  $KNO_3$ ), 1–3 g Kohlenstoffquelle (Glukose, Fruktose oder Saccharose), einige Phosphatsalze, geringe Mengen an Metallionen (Magnesium oder Kalzium) in 800–1000 ml doppelt destilliertem Wasser. Der End-pH wurde auf 6,5–7,5 mit 1 N NaOH oder 1 N HCl eingestellt. Die Medien wurden bei 120°C für 20 min in einem Erlenmeyerkolben mit einem Wattestopfen autoklaviert. Es wurden *Myrothecium verrucaria* oder *Myrothecium rodium* in die gekühlten Medien unter einem Laminarströmungsabzug inokuliert und bei 20–30°C für 4–8 Wochen inkubiert um das Myzel von *Myrothecium* sp. zu erhalten. *Myrothecium* sp. wurde aus der Erde unter Baumen an der Hangseite der Snow Mountains in Taiwan gesammelt und durch Professor Tseng, Hsien-Hsiung der National Taiwan University identifiziert. Die

mikrobiellen Quellen von Interesse schließen auch irgendwelche alternativen Stämme ein, die verwendet werden können um Verrucarín A und Verrucarín J bereitzustellen, und sind nicht auf die oben genannten Stämme beschränkt.

### Beispiel 2

#### Isolierung der Verbindungen mit Antikrebsaktivitäten

**[0017]** Es wurden 100 g des Myzels von *Myrothecium* sp. aus dem Beispiel 1 in eine Flasche gegeben. Es wurden eine angemessene Menge 95% Alkohol in die Flasche zugegeben und dies bei 20–25°C für mindestens 1 Stunde gerührt. Die Lösung wurde durch einen Filter mit einer 0,45 µm Membran gefiltert und das Filtrat als der Extrakt gesammelt. Die verwendeten organischen Lösungsmittel umfassten, sind aber nicht darauf beschränkt, Alkohole wie Methanol, Ethanol oder Propanol, wobei Ethanol bevorzugt wird.

**[0018]** Das Filtrat von *Myrothecium* sp. wurde einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographieanalyse (HPLC) mit einer Silicagelsäule unterworfen. Die mobile Phase bestand aus Hexan und Ethylacetat (EA). Das Säuleneffluent wurde mit einem UV-Erkennungsdetektor überwacht. Es wurden 10 Fraktionen gesammelt und auf ihre biologischen Aktivitäten untersucht. Die Zusammensetzungen der Fraktionen, die biologische Aktivitäten enthielten, wurden analysiert. Eine Trennung dieser Fraktionen mit verschiedenen Verhältnissen von Hexan und Aceton ergab die Verbindungen mit der Formel (1) und der Formel (2). Die Verbindung mit der Formel (1) ist nach der Analyse Verrucarín A, das eine Molekularformel mit  $C_{27}H_{32}O_8$  aufwies und ein Molekulargewicht von 484 hatte. Die Verbindung mit der Formel (2) ist nach der Analyse Verrucarín J, das eine Molekularformel mit  $C_{27}H_{34}O_9$  aufwies und ein Molekulargewicht von 502 hatte.

### Beispiel 3

#### In vitro-Assay für die Antitumoraktivität auf Leberkrebs

**[0019]** Es wurde das NCI-Screeningmodell für Antitumormittel eingesetzt um die Antikrebswirkung von Verrucarín A und Verrucarín J in der Erfindung zu untersuchen. Es wurden das Verrucarín A und Verrucarín J, die in dem Beispiel 2 isoliert worden sind, in die Kulturmedien der humanen Leberkrebszellen Hep3B oder HepG2 zur Bestimmung des Tumorzellüberlebens mittels eines MTT-Assays zugegeben. Es war bekannt, dass mit dem MTT-Assay die Überlebensraten von Zellen abgeschätzt werden können. Die Leberkrebszellen Hep3B (BCRC-Zugangsnummer 60434) und HepG2 (BCRC-Zugangsnummer 60025) wurden von der Bioresources Collection and Research Center (BCRC) des Food Industry Research and Development Institute erhalten.

**[0020]** Der MTT-Assay wird landläufig verwendet um die Zellproliferation, den Prozentsatz an lebensfähigen Zellen und die Zytotoxizität zu analysieren. MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium-bromid) ist ein gelber Farbstoff, der von lebenden Zellen absorbiert und zu violetten, unlöslichen Formazanprodukten durch die Succinat-Tetrazolium-Reduktase in den Mitochondrien reduziert werden kann. Die Bildung von Formazanprodukten in lebenden Zellen kann deshalb verwendet werden um die Zellüberlebensrate abzuschätzen und zu beurteilen.

**[0021]** Die humanen Leberkrebszellen Hep3B und HepG2 wurden für 24 Stunden in Medien kultiviert, die fötales Rinderserum enthielten. Die proliferierten Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, dann mit  $1 \times$  Trypsin-EDTA behandelt und bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml frischem Kulturmedium durch sanftes Schütteln resuspendiert. Die Zellen wurden in eine 96-Lochplatte gegeben. Beide Rohextrakte von *Myrothecium* sp. (Kontrollgruppe, Ethanolgesamtextrakte von *Myrothecium* sp. ohne HPLC-Aufreinigung) oder Verrucarín A und Verrucarín J (experimentelle Gruppe) wurden zu jedem der Löcher in den folgenden Konzentrationen zugegeben: 100, 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1 bzw. 0,03 ng/ml. Die Zellen wurden bei 37°C in einem 5% CO<sub>2</sub> Inkubator für 48 Stunden inkubiert. Es wurde der MTT-Farbstoff mit einer Konzentration von 2,5 mg/ml in jedes Loch im Dunkeln zugegeben und für 4 Stunden inkubiert, gefolgt von der Zugabe von 100 µl Lysepuffer um die Reaktion anzuhalten. Anschließend wurde die Absorption in einem Enzym-Immunoassay-Analysegerät bei 570 nm für die Messung der Lebendzellenzahl und zur Bestimmung der Überlebensraten gemessen. Die Werte der halben maximalen Hemmkonzentration (IC<sub>50</sub>) der Kontrollgruppe und der experimentellen Gruppe wurden auch berechnet und sind in der Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1 Ergebnis des Überlebensassays in vitro für die Antitumoraktivität auf Leberkrebszellen

Proben		IC <sub>50</sub> (ng/ml)	
		Hep3B	HepG2
Kontrollgruppe	Rohextrakte von <i>Myrothecium</i> sp.	23,81	45,89
Experimentelle Gruppe	Verrucarín A	2,31	10,21
	Verrucarín J	3,12	13,31

**[0022]** Nach dem Ergebnis aus der Tabelle 1 können Verrucarín A und Verrucarín J wirksam die Überlebensraten der humanen Leberkrebszelllinien Hep3B und HepG2 vermindern. Die IC<sub>50</sub>-Werte von Verrucarín A und Verrucarín J gegenüber Hep3B waren 2,31 ng/ml bzw. 3,12 ng/ml, was 90,3% und 86,9% weniger waren als die IC<sub>50</sub>-Werte der Rohextrakte von *Myrothecium* sp.. Die IC<sub>50</sub>-Werte von Verrucarín A und Verrucarín J gegenüber HepG2 waren 10,21 ng/ml bzw. 13,31 ng/ml, was 77,75% und 71% weniger waren als die der Rohextrakte von *Myrothecium* sp.. Zusätzlich zeigten die Leberkrebszellen, die mit Verrucarín A behandelt worden sind, geringere IC<sub>50</sub>-Werte als die Zellen, die mit Verrucarín J behandelt worden sind, das heißt es war eine geringere Konzentration von Verrucarín A für die Wachstumshemmung der Hälfte der Krebszellen notwendig. Verrucarín A hat eine bessere Hemmwirkung als Verrucarín J auf das Wachstum der Leberkrebszellen.

## Beispiel 4

## In vitro-Überlebensassay für die Antitumoraktivität auf Lungenkrebs

**[0023]** Es wurde das NCI-Screeningmodell für Antitumormittel eingesetzt um die Antikrebswirkung von Verrucarín A und Verrucarín J in der Erfindung zu untersuchen. Es wurden das Verrucarín A und Verrucarín J, die in dem Beispiel 2 isoliert worden sind, in die Kulturmedien der humanen Lungenkrebszellen A549 für einen Tumorzellenüberlebensassay zugegeben und die Überlebensraten der Lungenkrebszellen mit dem oben genannten MTT-Assay analysiert. Die Lungenkrebszellen A549 wurden von der Bioresources Collection and Research Center (BCRC) des Food Industry Research and Development Institute unter der BCRC-Zugangsnummer 60074 erhalten.

**[0024]** Die humanen Lungenkrebszellen A549 wurden für 24 Stunden in Medien kultiviert, die fötales Rinderserum enthielten. Die proliferierten Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, dann mit 1 × Trypsin-EDTA behandelt und bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml frischem Kulturmedium durch sanftes Schütteln resuspendiert. Die Zellen wurden in eine 96-Lochplatte gegeben. Beide Rohextrakte von *Myrothecium* sp. (Kontrollgruppe, Ethanolgesamtextrakte von *Myrothecium* sp. ohne HPLC-Aufreinigung) oder Verrucarín A und Verrucarín J (experimentelle Gruppe) wurden zu jedem der Löcher in den folgenden Konzentrationen zugegeben: 100, 30, 10, 3, 1, 0,3 bzw. 0,1 ng/ml. Die Zellen wurden bei 37°C in einem 5% CO<sub>2</sub> Inkubator für 48 Stunden inkubiert. Es wurde der MTT-Farbstoff mit einer Konzentration von 2,5 mg/ml in jedes Loch im Dunkeln zugegeben und für 4 Stunden inkubiert, gefolgt von der Zugabe von 100 µl Lysepuffer um die Reaktion anzuhalten. Anschließend wurden die Platten in einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm ausgelesen um die Überlebensraten zu bestimmen. Die Werte der halben maximalen Hemmkonzentration (IC<sub>50</sub>) wurden berechnet und sind in der Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2 Ergebnis des Überlebensassays in vitro für die Antitumoraktivität auf Lungenkrebszellen

Proben		IC <sub>50</sub> (ng/ml)
		A549
Kontrollgruppe	Rohextrakte von <i>Myrothecium</i> sp.	52
Experimentelle Gruppe	Verrucarín A	1,12
	Verrucarín J	2,34

**[0025]** Nach dem Ergebnis aus der Tabelle 2 können Verrucarín A und Verrucarín J wirksam die Überlebensraten der humanen Lungenkrebszelllinie A549 vermindern. Die IC<sub>50</sub>-Werte von Verrucarín A und Verrucarín J gegenüber A549 waren 1,12 ng/ml bzw. 2,34 ng/ml, was 97,85% und 95,5% weniger waren als die der Rohextrakte von *Myrothecium* sp. (52 ng/ml). Sowohl Verrucarín A als auch Verrucarín J wiesen bemerkenswert

reduzierte  $IC_{50}$ -Werte gegenüber der Kontrollgruppe auf. Deshalb können Verrucarin A und Verrucarin J für die Wachstumshemmung von Lungenkrebszellen verwendet werden.

**[0026]** Zusätzlich zeigten die Lungenkrebszellen, die mit Verrucarin A behandelt worden sind, geringere  $IC_{50}$ -Werte als die Zellen, die mit Verrucarin J behandelt worden sind, das heißt es war eine geringere Konzentration von Verrucarin A für die Wachstumshemmung der Hälfte der Krebszellen notwendig. Die zeigt, das Verrucarin A eine bessere Hemmwirkung als Verrucarin J auf das Wachstum der Lungenkrebszellen hat.

#### Beispiel 5

##### In vitro-Überlebensassay für die Antitumoraktivität auf Prostatakrebs

**[0027]** Entsprechend dem NCI-Screeningmodell für Antitumormittel des United States National Institutes of Health wird der oben genannte MTT-Assay durch die Zugabe von Verrucarin A und Verrucarin J in das Kulturmedium der humanen Prostatakrebstumorzellen LNCaP bzw. DU-145 durchgeführt.

**[0028]** Prostatakrebs ist ein Krebs, der seinen Ursprung in den Epithelzellen der Prostata Drüse hat und im frühen Stadium androgenabhängig ist. Anfänglich sind alle Prostatakrebszellen androgenabhängig und sie können mit einer Androgendeprivationstherapie behandelt werden. LNCaP repräsentiert diesen Typ von Prostatakrebs in einem frühen Stadium. Bei 30% der Patienten wird der Krebs jedoch wieder auftreten und die Sekretionsmengen von Androgen werden sehr gering. Letztendlich entwickelt sich der rezidivierende Krebs zu einem androgenunabhängigen Prostatakrebs, für den es bisher keine wirksame Behandlung gibt. DU-145 repräsentiert diesen Krebstyp. Sowohl LNCaP als auch DU-145 wurden bei dem Bioresources Collection and Research Center (BCRC) des Food Industry Research and Development Institute unter den Zugangsnummern BCRC 60088 und BCRC 60348 bestellt.

**[0029]** Die humanen Prostatakrebszellen LNCaP und DU-145 wurden für 24 Stunden in Medien kultiviert, die mit fötalem Rinderserum versetzt waren. Die proliferierten Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, dann mit  $1 \times$  Trypsin-EDTA behandelt und bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml frischem Kulturmedium durch sanftes Schütteln resuspendiert. Die Zellen wurden in eine 96-Lochplatte gegeben. Es wurden Wasser (Negativkontrollgruppe), 4,2 ng/ml Taxol (Positivkontrolle), 100, 10, 1, 0,1 und 0,01 ng/ml Rohextrakte von *Myrothecium* sp. (experimentelle Kontrollgruppe, Rohextrakte von *Myrothecium* sp. ohne HPLC-Aufreinigung) oder 100, 10, 1, 0,1, 0,01 und 0,001 ng/ml Verrucarin A und Verrucarin J (experimentelle Gruppe) entsprechend zu jedem der 96 Löcher zugegeben. Die Zellen wurden bei  $37^{\circ}C$  in einem 5%  $CO_2$  Inkubator für 48 Stunden inkubiert. Es wurde der MTT-Farbstoff mit einer Konzentration von 2,5 mg/ml in jedes Loch im Dunkeln zugegeben und für 4 Stunden inkubiert, gefolgt von der Zugabe von 100  $\mu$ l Lysepuffer um die Reaktion anzuhalten. Die Platten wurden in einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm ausgelesen um die Überlebensraten (%) zu bestimmen. Die Werte der halben maximalen Hemmkonzentration ( $IC_{50}$ ) wurden berechnet und sind in der Tabelle 3 und der Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 3 Ergebnis des Überlebensassays in vitro für die Antitumoraktivität auf Prostatakrebszellen

Proben		$IC_{50}$ (ng/ml)	
		LNCaP	DU-145
Kontrollgruppe	Rohextrakte von <i>Myrothecium</i> sp.	29,31	33,16
Experimentelle Gruppe	Verrucarin A	2,85	0,02
	Verrucarin J	0,31	0,28

**[0030]** Nach dem Ergebnis aus der Tabelle 3 wurden die Zellüberlebensraten von LNCaP und DU-145 durch die Funktionen von Verrucarin A und Verrucarin J wirksam verringert. Die  $IC_{50}$ -Werte von Verrucarin A und Verrucarin J gegenüber LNCaP waren 2,85 ng/ml bzw. 0,31 ng/ml, was relativ 90,28% und 98,94% weniger waren als die  $IC_{50}$ -Werte der experimentellen Kontrollgruppe (29,31 ng/ml). Die  $IC_{50}$ -Werte von Verrucarin A und Verrucarin J gegenüber DU-145 waren 0,02 ng/ml bzw. 0,28 ng/ml, was relativ 99,93% und 99,16% weniger waren als die  $IC_{50}$ -Werte der experimentellen Kontrollgruppe (33,16 ng/ml). Deshalb können Verrucarin A und Verrucarin J aus *Myrothecium* sp. für die Wachstumshemmung von Prostatakrebszellen verwendet werden, die viel geringere  $IC_{50}$ -Werte als die Rohextrakte auswiesen (29,31 ng/ml und 33,16 ng/ml). Zusätzlich zeigten die LNCaP-Prostatakrebszellen, die mit Verrucarin J behandelt worden sind, geringere  $IC_{50}$ -Werte als die mit Verru-

carin A behandelt Zellen, das heißt das Verrucarin J eine bessere Hemmwirkung als Verrucarin A auf das Wachstum der LNCaP-Prostatakrebszellen hat. Während DU-145-Prostatakrebszellen, die mit Verrucarin A behandelt worden sind, geringere IC<sub>50</sub>-Werte zeigten als die mit Verrucarin J behandelten Zellen, das heißt das Verrucarin A eine bessere Hemmwirkung als Verrucarin A auf das Wachstum der DU-145-Prostatakrebszellen hat.

Tabelle 4 Wirkung von Verrucarin A und Verrucarin J auf das Wachstum von DU-145 Prostatakrebszellen

Proben		Konzentration (ng/ml)	Zellüberlebensrate (%)
Negativkontrollgruppe	Wasser		100
Positivkontrolle	Taxol	4,2	63,88
Experimentelle Kontrollgruppe	Rohextrakte von Myrothecium sp.	100	20,60
		10	91,01
		1	94,30
		0,1	101,31
Experimentelle Gruppe	Verrucarin A	100	16,96
		10	17,07
		1	16,99
		0,1	21,01
		0,01	72,31
		0,001	94,33
		Verrucarin J	100
	10		18,95
	1		19,93
	0,1		81,11
	0,01		101,30
	0,001		100,21

**[0031]** Alternativ zeigt Tabelle 4, dass das Wachstum von DU-145-Prostatakrebszellen wirksam durch die Funktion von Verrucarin A und Verrucarin J reduziert worden ist. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen wurden die Überlebensraten der Krebszellen auf 20% reduziert, wenn Verrucarin A oder Verrucarin J in einer Konzentration von 1 ng/ml bis 100 ng/ml eingesetzt worden sind. Die Zellüberlebensraten verringerten sich in Übereinstimmung mit der zugegebenen Konzentration von dem Rohextrakt von Myrothecium sp., von Verrucarin A oder Verrucarin J. Im Gegensatz dazu stiegen die Zellüberlebensraten an, wenn die eingesetzte Konzentration verringert wurde. Wenn die Konzentration der Kontrollgruppe und der experimentellen Gruppe auf 10 ng/ml verringert wurde, stieg die Zellüberlebensrate auf 91,01% mit der Zugabe des Rohextrakts von Myrothecium sp. an, während die Zellüberlebensraten mit der Zugabe des gereinigten Verrucarins A bzw. Verrucarins J bei rund 19% verblieben. Es ist gezeigt worden, dass Verrucarin A und Verrucarin J aktive Bestandteile für die Hemmung von DU-145-Prostatakrebszellen waren. Zusätzlich war die Überlebensrate 63,88%, wenn sie mit 4,2 ng/ml Taxol behandelt worden sind, während sich die Zellüberlebensraten auf erheblich unter 20% senkten, wenn die eingesetzte Konzentration von Verrucarin A und Verrucarin J in dem Bereich von 1 ng/ml bis 10 ng/ml war. Dies zeigt einen überragenden Hemmeffekt von Verrucarin A und Verrucarin J auf humane Prostatakrebszellen verglichen mit Taxol. Es sind sogar signifikante krebshemmende Wirkungen beobachtet worden, wenn die eingesetzte Konzentration einen so geringen Wert wie 0,1 ng/ml und 1 ng/ml erreichte.

**[0032]** Auf der anderen Seite waren die Zellüberlebensraten ähnlich, wenn die eingesetzte Konzentration von Verrucarin A und Verrucarin J über 1 ng/ml lag (in dem Bereich von 1 ng/ml bis 10 ng/ml). Das heißt, dass beide ähnliche Antikrebswirkungen innerhalb dieser Konzentrationsbereiche aufwiesen. Verrucarin A hat jedoch eine bessere Wirkung als Verrucarin J bei der Wachstumshemmung von DU-145-Prostatakrebszellen, wenn die eingesetzte Konzentration geringer als 0,1 ng/ml war (in dem Bereich von 0,001 ng/ml bis 0,1 ng/ml).

**[0033]** Zusammengefasst können Verrucarin A und Verrucarin J, die aus den Extrakten von Myrothecium sp. aufgereinigt worden sind, wirksam das Wachstum der Prostatakrebszellen LNCaP und DU-145 mit unterschiedlichen Merkmalen hemmen. Deshalb können sowohl Verrucarin A als auch Verrucarin J nicht nur für die Wachstumshemmung der androgenabhängigen Prostatakrebszellen LNCaP sondern auch für die Wachstumshemmung der androgenunabhängigen Prostatakrebszellen DU-145 verwendet werden. Dies wird für die Therapie von Prostatakrebs und rezidivierendem Prostatakrebs von Nutzen sein.

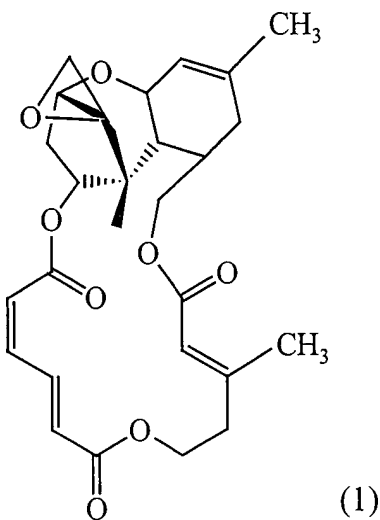


**[0034]** Auf der anderen Seite können Verrucarin A und Verrucarin J in pharmazeutischen Zusammensetzungen enthalten sein. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen schließen nicht nur die aktive Verbindung Verrucarin A und Verrucarin J ein sondern auch die pharmazeutisch akzeptablen Carrier. Beispiele für solche Carrier umfassen, sind aber nicht darauf beschränkt, Exzipienten wie Wasser, Füllmittel wie Saccharose oder Stärke, Bindemittel wie Cellulosederivate, Verdünnungsmittel, Disintegrationsmittel, Absorptionsfördermittel oder Süßstoffe. Die Zusammensetzung der Erfindung kann durch das Mischen der Verbindung von Verrucarin A und Verrucarin J aus *Myrothecium* sp. mit mindestens einem der Carrier mittels konventioneller Verfahren hergestellt werden, die in dem technischen Bereich der Pharmazie bekannt sind, und sie kann in Form von Pulver, Tabletten, Kapseln, Pellets, Granula oder einer anderen flüssigen Formulierung formuliert werden, dies ist aber nicht darauf beschränkt. Der Zweck der vorliegenden Erfindung für die Tumorbehandlung und die Hemmung des Krebszellenwachstums kann sodann durchgeführt werden.

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Hemmung von Krebszellen, umfassend:

Verabreichung einer wirksamen Dosis einer Verbindung, die die folgende Formel hat, um das Wachstum von Leberkrebszellen, Lungenkrebszellen oder Prostatakrebszellen zu hemmen



2. Verfahren nach Anspruch 1, worin die Verbindung aus *Myrothecium* sp. isoliert wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, worin die Verbindung aus dem Myzel von *Myrothecium* sp. isoliert wird.

4. Verfahren nach Anspruch 1, worin die Leberkrebszellen von einer Hep3B-Zelllinie oder einer HepG2-Zelllinie sind.

5. Verfahren nach Anspruch 4, worin die Hälfte der maximalen Hemmkonzentration ( $IC_{50}$ ) für die Leberkrebszelllinie Hep3B 2,31 ng/ml ist.

6. Verfahren nach Anspruch 4, worin die Hälfte der maximalen Hemmkonzentration ( $IC_{50}$ ) für die Leberkrebszelllinie HepG2 10,21 ng/ml ist.

7. Verfahren nach Anspruch 1, worin die Lungenkrebszellen von einer A549-Zelllinie sind.

8. Verfahren nach Anspruch 7, worin die Hälfte der maximalen Hemmkonzentration ( $IC_{50}$ ) für die Lungenkrebszelllinie A549 1,12 ng/ml ist.

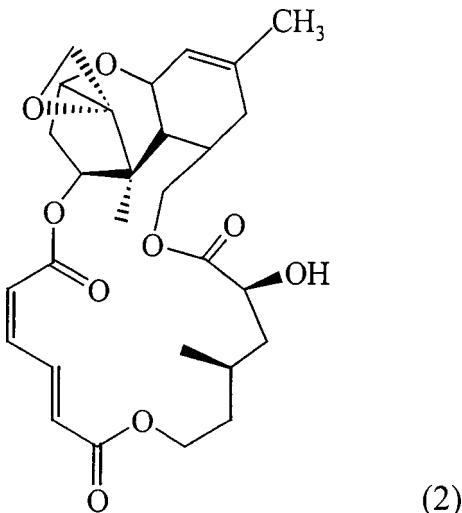
9. Verfahren nach Anspruch 1, worin die Prostatakrebszellen von einer LNCaP-Zelllinie oder einer DU-145-Zelllinie sind.

10. Verfahren nach Anspruch 9, worin die Hälfte der maximalen Hemmkonzentration ( $IC_{50}$ ) für die Prostatakrebszelllinie LNCaP 2,85 ng/ml ist.

11. Verfahren nach Anspruch 9, worin die Hälfte der maximalen Hemmkonzentration ( $IC_{50}$ ) für die Prostatakrebszelllinie DU-145 0,02 ng/ml ist.

12. Pharmazeutische Zusammensetzung, die für die Hemmung des Krebszellwachstums verwendet wird, wobei sie eine aktive Dosis der Verbindung, wie sie in dem Anspruch 1 beansprucht wird, und einen pharmazeutisch akzeptablen Carrier umfasst, worin die Krebszellen aus Leberkrebs, Lungenkrebs oder Prostatakrebs ausgewählt sind.

13. Verfahren zur Hemmung von Krebszellen, umfassend: Verabreichung einer wirksamen Dosis einer Verbindung, die die folgende Formel hat, um das Wachstum von Leberkrebszellen, Lungenkrebszellen oder Prostatakrebszellen zu hemmen.



14. Verfahren nach Anspruch 13, worin die Verbindung aus *Myrothecium* sp. isoliert wird.

15. Verfahren nach Anspruch 14, worin die Verbindung aus dem Myzel von *Myrothecium* sp. isoliert wird.

16. Verfahren nach Anspruch 13, worin die Leberkrebszellen von einer Hep3B-Zelllinie oder einer HepG2-Zelllinie sind.

17. Verfahren nach Anspruch 16, worin die Hälfte der maximalen Hemmkonzentration ( $IC_{50}$ ) für die Leberkrebszelllinie Hep3B 3,12 ng/ml ist.

18. Verfahren nach Anspruch 16, worin die Hälfte der maximalen Hemmkonzentration ( $IC_{50}$ ) für die Leberkrebszelllinie HepG2 13,31 ng/ml ist.

19. Verfahren nach Anspruch 13, worin die Lungenkrebszellen von einer A549-Zelllinie sind.

20. Verfahren nach Anspruch 19, worin die Hälfte der maximalen Hemmkonzentration ( $IC_{50}$ ) für die Lungenkrebszelllinie A549 2,34 ng/ml ist.

21. Verfahren nach Anspruch 13, worin die Prostatakrebszellen von einer LNCaP-Zelllinie oder einer DU-145-Zelllinie sind.

22. Verfahren nach Anspruch 21, worin die Hälfte der maximalen Hemmkonzentration ( $IC_{50}$ ) für die Prostatakrebszelllinie LNCaP 0,31 ng/ml ist.

23. Verfahren nach Anspruch 21, worin die Hälfte der maximalen Hemmkonzentration ( $IC_{50}$ ) für die Prostatakrebszelllinie DU-145 0,28 ng/ml ist.

24. Pharmazeutische Zusammensetzung, die für die Hemmung des Krebszellwachstums verwendet wird, wobei sie eine aktive Dosis der Verbindung, wie sie in dem Anspruch 13 beansprucht wird, und einen pharmazeutisch akzeptablen Carrier umfasst, worin die besagten Krebszellen aus Leberkrebs, Lungenkrebs oder Prostatakrebs ausgewählt sind.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen