



(19)
 Bundesrepublik Deutschland
 Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 10 2006 033 321 A1 2008.01.24

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: 10 2006 033 321.7

(22) Anmeldetag: 17.07.2006

(43) Offenlegungstag: 24.01.2008

(51) Int Cl.⁸: **C07C 233/01** (2006.01)

C07C 271/40 (2006.01)

A61K 31/16 (2006.01)

C07D 317/30 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

A61K 8/44 (2006.01)

A61K 8/97 (2006.01)

A61K 8/30 (2006.01)

(71) Anmelder:

Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 48149
 Münster, DE

(72) Erfinder:

Hofmann, Thomas, 48161 Münster, DE; Hensel,
 Andreas, 48161 Münster, DE; Deters, Alexandra,
 48161 Münster, DE; Stark, Timo, 48147 Münster,
 DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht zu
 ziehende Druckschriften:

DE10 2004 057858 A1

DE 103 15 025 A1

US2003/01 70 199 A1

US 40 54 649

EP 03 54 554 A2

WO 00/13 696 A1

JP 2000-2 62 246 A

Patent Abstracts of Japan: JP 2000262246 A;;

Patent Abstracts of Japan: JP 2000128801 A;;

STARK,T., u.a.: Molecular Definition of the Taste
 of Roasted Cocoa Nils (Theobroma cacao) by
 Means

of Qualitative Studies and Sensory Experiments.

In: J. Agric. Food Chem. 2006, Vol.54,

S.5530-5539; bes.S.5531, Verb.16-25;

STARK,T., u.a.: Quantitative Analysis of

N-Phenylpropenoyl-L-amino Acids in Roasted

Coffee

and Cocoa Powder by Means of a Stable Isotope

Dilution Assay. In: J. Agric. Food Chem. 2006,

Vol.54, S.2859-2867; Fig.1;

STARK,T., u.a.: Isolation, Structure

Determination, Synthesis, and Sensory Activity of

N-Phenylpropenoyl-L-amino Acids from Cocoa

(Theobroma cacao). In: J. Agric. Food Chem.,

2005, Vol.53, S.5419-5428;;

JICST-EPlus Abstract 900496937 zu OSAWA,K.,

u.a.:

Inhibitory effects of aqueous extract of cacao

bean husk on collagenase of Bacteroides

gingivalis. In: Bull Tokyo Dent Coll, 1990,

Vo.31, No.2, S.125-128;;

CABA-Abstract 2006:139943 zu QYEDAPO,O.,

u.a.:

Anti-in- flammatory effect of Theobroma cacao

root extract. In: Journal of Tropical Medicinal

Plants, 2004, Vol.5, No.2, S.161-166;;

JICST-EPlus Abstract 1010296981 zu SHIMURA

FUMIO:

Drugs and meals Interaction of Western medicine

and Chinese medicine. Drugs and favorite foods,

beverage and health food. St. John's Wort and

antidepressive action. In: Yakkyoku, Journal of

Practical Pharmacy, 2001, Vol.52, No.2,

S.1083-1091;;

BIOSIS-Abstract 2002:444307 zu ARLORIO,M.,

u.a.:

Antibacterial effects of phenolic extracts from

Theobroma cacao. In: Rivista di Scienza dell'

Alimentazione, 2001, Vol.30, No.3, Suppl.,

S.251-260;;

Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis,

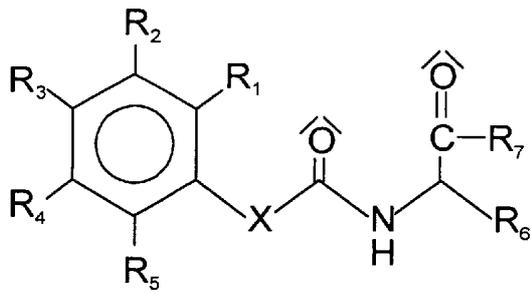
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York,

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

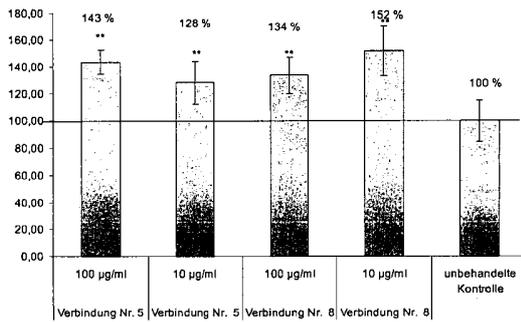
Rechercheantrag gemäß § 43 Abs. 1 Satz 1 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **Medizinische Verwendung von N-Phenylpropenoyl-Aminosäurederivaten und verwandten Verbindungen**

(57) Zusammenfassung: Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen der allgemeinen Strukturformel



zur Verwendung in einem chirurgischen, therapeutischen oder diagnostischen Verfahren zur Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers.



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die medizinische, kosmetische und lebensmitteltechnische Verwendung von N-Phenylpropenoyl-Aminosäurederivaten und verwandten Verbindungen. Bei diesen Verbindungen handelt es sich um sekundäre Pflanzenstoffe, die insbesondere aus der Kakaopflanze (*Theobroma cacao*) isoliert werden können.

[0002] Der gesundheitliche Nutzen von sekundären Pflanzenstoffen ist seit langem bekannt. Für eine Vielzahl von Stoffen wurden antimikrobielle oder antioxidative Eigenschaften beschrieben, so z.B. für Polyphenole wie das Epikatechin, das aus der Kakaopflanze gewonnen wird.

[0003] Bekannt ist ebenso die Rosmarinsäure. Hierbei handelt es sich um einen 3-(3,4-Dihydroxy-phenyl)-acrylsäure-1-carboxy-2-(3,4-dihydroxy-phenyl)-ethylester. Diese Verbindung sowie deren Derivate weisen bemerkenswerte Eigenschaften auf, so z.B. antibakterielle, antivirale, antiinflammatorische, antigonadotrope und antioxidative Eigenschaften.

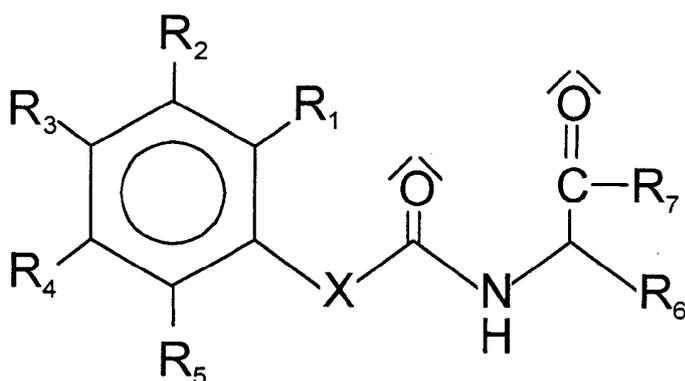
[0004] Unter physiologischen Bedingungen werden diese Verbindungen jedoch durch körpereigene Esterasen relativ schnell hydrolysiert, so dass bei einer Verabreichung nur geringe Mengen in den Blutkreislauf gelangen und die Verweildauer nur sehr kurz ist. Es können daher nur niedrige Bluttitere erreicht werden, die oftmals unter der für einen möglichen therapeutischen Nutzen erforderlichen Schwelle liegen.

[0005] Eine neue Gruppe sekundärer Pflanzenstoffe, die N-Phenylpropenoyl-Aminosäurederivate, wurden erstmals in dem Artikel [1] von Stark und Hofmann (2005), „Isolation, structure determination, synthesis, and sensory activity of N-phenylpropenoyl-L-amino acids from cocoa (*Theobroma cacao*)“, *J. Agric. Food Chem.*; 53: 5419–5428, beschrieben. Diese Verbindungen bestehen aus einem ggf. substituierten Phenyl-Propensäure-Rest, der über eine Amidbindung mit einem Aminosäurerest verbunden ist.

[0006] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, sekundäre Pflanzenstoffe mit medizinischen Indikationen bereitzustellen, die eine höhere Verweildauer im Organismus aufweisen und ähnliche oder bessere oder zusätzliche medizinische, kosmetische und lebensmitteltechnische Eigenschaften aufweisen wie bzw. als bereits bekannte sekundäre Pflanzenstoffe.

[0007] Diese Aufgabe wird mit den Merkmalen des vorgelegten Hauptanspruchs gelöst. Die Unteransprüche zeigen bevorzugten Ausführungsformen.

[0008] Demnach ist die Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Strukturformel



(Formel 1)

in einem chirurgischen, therapeutischen oder diagnostischen Verfahren zur Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers vorgesehen.

[0009] Eine solche medizinische Verwendung von Verbindungen, die unter diese allgemeine Formel fallen, wird in der vorliegenden Erfindung erstmals beschrieben. Bezüglich experimenteller Hinweise auf mögliche medizinische Indikationen wird auf die Beispiele verwiesen.

[0010] Diese Verbindungen weisen strukturell große Ähnlichkeiten mit häufig in der Natur vorkommenden

substituierten Zimtsäureestern (Rosmarinsäure, Chlorogensäure, etc.) bzw. ihren Derivaten auf. Allerdings sind die beiden Grundmoleküle bei den erfindungsgemäßen Verbindungen über eine Amidbindung verknüpft, die unter physiologischen Bedingungen sehr viel stabiler ist als die Esterbindung bei den substituierten Zimtsäureestern., die wie bereits erwähnt durch die ubiquitären Esterasen im Körper schnell hydrolysiert werden.

[0011] Bevorzugt weist die Verbindung gemäß Formel 1 an den Positionen R_1 – R_5 Wasserstoffreste (H-), Hydroxigruppen (HO-), Methoxigruppen (CH_3O -) und/oder Ethoxigruppen ($\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$ -) und/oder überbrückende Methylendioxi-(-O- CH_2 -O-) und/oder Glycosylgruppen auf.

[0012] Dabei sind die Reste R_3 und/oder R_4 besonders bevorzugt Hydroxigruppen und/oder Methoxigruppen, während es sich bei den übrigen Resten bevorzugt um Wasserstoffreste handelt.

[0013] Bei R_6 handelt es sich bevorzugt um den organischen Rest einer Aminosäure und bei R_7 um eine Hydroxigruppe (-OH) oder um den N-Terminus eines Peptides.

[0014] Unter dem Begriff „organischer Rest einer Aminosäure“ wird im Folgenden der sich an dem die Amidgruppe tragenden Kohlenstoffatom der Aminosäure befindliche organische Rest bezeichnet.

[0015] Handelt es sich bei der Aminosäure etwa um Alanin, so wäre R_6 eine Methylgruppe; bei Phenylalanin wäre R_6 eine Phenylgruppe, etc.

[0016] Besonders bevorzugt handelt es sich bei R_6 um den organischen Rest einer α -Aminosäure und/oder eine L-Aminosäure.

[0017] Bei R_7 kann es sich jedoch auch um eine weitere über eine Amidbindung gebundene Aminosäure bzw. ein Peptid mit einem finalen Carboxyterminus handeln.

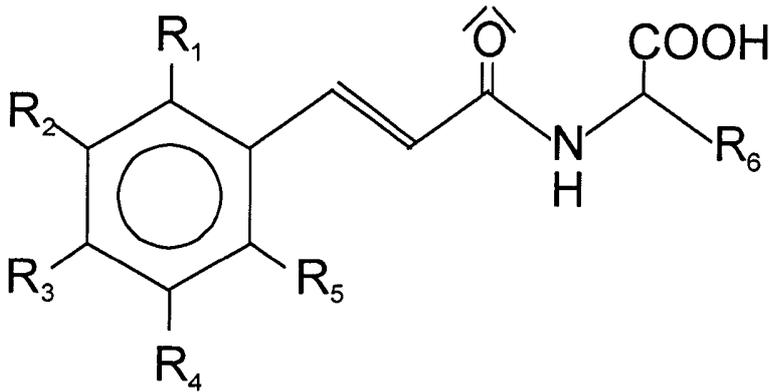
[0018] X ist bevorzugt ein C_nY_{2-n} -Rest oder einen C_nY_n -Rest mit $n = 0$ – 6 handelt, wobei Y Wasserstoffreste (H-) oder Alkylgruppen (z.B. CH_3 , C_2H_5 , C_3H_7) sein können, oder ein substituiertes Stickstoff-, Sauerstoff- oder Schwefelatom. Im Falle eines C_nY_n -Restes mit Mehrfachbindungen kann sowohl die E- als auch die Z-Konfiguration eingenommen werden.

[0019] Voraussetzung für die physiologischen Effekte und damit die Eignung für etwaige medizinische Indikationen ist mit großer Wahrscheinlichkeit einerseits die Amidbindung, die insbesondere unter physiologischen Bedingungen sehr viel stabiler ist als z.B. eine Esterbindung, und daher insbesondere die Aufnahme der erfindungsgemäßen Verbindungen durch das Dünndarmepithel in den Blutkreislauf bzw. eine ausreichend lange Verweildauer der erfindungsgemäßen Verbindungen im Blutkreislauf ermöglicht.

[0020] Andererseits scheint das Vorhandensein der Carboxylgruppe, die durch die Aminosäure, das Peptid oder die Hydroxigruppe an R_7 bereitgestellt wird, eine Voraussetzung für die physiologische Wirksamkeit zu sein.

[0021] Ebenso wichtig scheint überdies die Kettenlänge des Restes X zu sein, der eine Länge von $n = 0$ – 6 nicht überschreiten sollte.

[0022] Besonders bevorzugt handelt es sich bei X um einen C_nY_n -Rest mit $n = 2$, d.h. X ist dann ein $\text{HC}=\text{CH}$ -Rest. In diesem Fall handelt es sich bei der erfindungsgemäßen Verbindung um eine N-Phenylpropenoyl-Aminosäure. Eine solche Verbindung hat die folgende allgemeine Strukturformel:



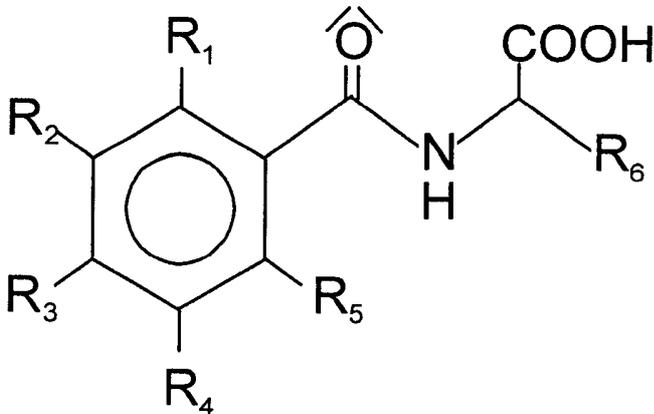
(Formel 2)

[0023] Chemisch gesehen handelt es sich hierbei um eine Amidverbindung aus einer ggf. substituierten Zimtsäure (Phenyl-Propensäure bzw. Phenyl-Acrylsäure) und einer Aminosäure. Ist der Phenylrest an R_2 und R_3 mit je einer Hydroxigruppe substituiert, handelt es sich um Kaffeesäure. Die Amidbindung ist ausgebildet zwischen der Aminogruppe der Aminosäure und der Carboxylgruppe der Zimtsäure bzw. Kaffeesäure.

[0024] Bevorzugt handelt es sich bei R_6 um den organischen Rest einer Aminosäure, ausgewählt aus der Gruppe aufweisend aliphatische, aromatische, polare, basische, saure, proteinogene, nicht proteinogene Aminosäuren, α -, β -, γ -, Aminosäuren und/oder L- oder D-Aminosäuren.

[0025] Dabei sind die Reste der α -Aminosäuren Aspartat, Glutamat, Tyrosin, Tryptophan und Dopa besonders bevorzugt.

[0026] In einer anderen, ebenfalls bevorzugten Ausführungsform ist $X = 0$. Eine solche Verbindung hat die folgende allgemeine Strukturformel:



(Formel 3)

[0027] Chemisch gesehen handelt es sich in diesem Falle um eine Amidverbindung aus einer ggf. substituierten Benzoesäure und einer Aminosäure.

[0028] Weiterhin ist die Verwendung einer Verbindung gemäß einem der vorherigen Ansprüche zur Herstellung eines Arzneimittels zur Vorbeugung und/oder Behandlung von bakteriellen, viralen oder mykologischen Infektionen vorgesehen.

[0029] Untersuchungen der Erfinder haben überraschenderweise gezeigt, dass die erfindungsgemäßen Verbindungen antiadhäsive Wirkung gegenüber der Ansiedlung von Bakterien, Viren und Pilzen auf Oberflächen wie z.B. der Haut, den Schleimhäuten, der Speiseröhre, der Magenwand und dem Dünndarmepithel aufweisen.

[0030] Diese Wirkung wurde beispielhaft an *Helicobacter pylori* auf der Magenschleimhaut gezeigt. Hierzu wird auf die Beispiele verwiesen. Es liegen zudem Hinweise für eine antiadhäsive Wirkung gegen *Campylo-*

bacter jejuni, adhärenzte E. coli, Porphyromonas gingivalis, Staphylococcus aureus und Candida albicans vor. Diese Ergebnisse lassen auf eine allgemeine antiadhäsive Wirkung gegen Mikroorganismen schließen, insbesondere gegen gram-positive und gram-negative Bakterien, Viren und Pilzen.

[0031] Eine Ursache für diese Wirkung scheint darin zu liegen, dass die erfindungsgemäßen Verbindungen die Ausbildung einer mikrobiellen Ansiedlungsmatrix (häufig bestehend aus Polysacchariden und Glycoproteinen) hemmen oder dass sie in Wechselwirkungen mit mikrobiellen, insbesondere bakteriellen Adesinen treten oder die für die Adhäsion zuständigen Rezeptorfunktionen auf der Epithelseite der zu besiedelnden Oberfläche blockieren.

[0032] Diese Eigenschaften könnten z.B. für die Herstellung eines Medikaments zur Behandlung und Prophylaxe chronischer Magenschleimhautentzündung oder für die Infektionsprävention, z.B. bei Hautverbrennungen, oder bei schlecht heilenden Wunden (z.B. Ulcus) von Nutzen sein.

[0033] Weitere potentielle Indikationen erschließen sich dem Fachmann unmittelbar.

[0034] Die Verwendung einer Verbindung gemäß einem der vorherigen Ansprüche zur Herstellung eines Arzneimittels zur hepalen Regeneration, zur Verbesserung des Zellstoffwechsels und/oder zur Verbesserung der Zellproliferation ist somit ebenfalls eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung.

[0035] In diesem Zusammenhang haben Experimente der Erfinder gezeigt, dass die erfindungsgemäßen Verbindungen eine proliferationsfördernde Wirkung auf humane Keratinocyten ausüben, ohne dass dabei die Expression zellulärer Wachstumsfaktoren beeinflusst wird. Hierzu wird auf die Beispiele verwiesen.

[0036] Die Erfinder haben gezeigt, dass die Verbindungen deutliche Wirkungen auf humane Leberzellen haben und die Energieproduktion sowie die Zellproliferation deutlich zu steigern in der Lage sind. Weiterhin wurde gezeigt, dass die erfindungsgemäßen Verbindungen eine Erhöhung der mitochondrialen Aktivität von Leberzellen hervorrufen. Hierzu wird auf die Beispiele verwiesen.

[0037] Mögliche Indikationen sind in diesem Zusammenhang die Regeneration von Leberzellen, die durch Chemotherapeutika, Strahlenbehandlung, Arzneimittelbehandlung, Arzneimittelintoxikation, Alkoholmißbrauch, Drogenmißbrauch, Vergiftungen (insb. Pilzvergiftungen), Leberinfektionen (insb. Hepatitis) geschädigt wurden.

[0038] Weitere Anwendungsmöglichkeiten sind eine Erhöhung der mitochondrialen Aktivität, insbesondere von Cytochrom P450, das als ein zelluläres Entgiftungsenzym wirkt.

[0039] Weitere Indikationen sind der Einsatz der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Herstellung eines Arzneimittels zur Förderung der Wundheilung, der Hautregeneration, der Schleimhautregeneration, der erhöhten Proliferation von Hautanhangsgebilden (z.B. Haare) und der Knorpelbildung, zur Prävention und Therapie von Dekubitus und Narbenbildung, oder zur Haut- und Geweberegeneration z.B. nach Verbrennungen, Verätzungen, Wundliegen etc.

[0040] Aufgrund der antiadhäsiven Wirkung ist eine Verwendung einer erfindungsgemäßen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels gegen orale Plaque ebenfalls denkbar.

[0041] Weiterhin ist erfindungsgemäß vorgesehen, eine Verbindung gemäß einem der vorherigen Ansprüche als Nahrungsergänzungsmittel und „functional food“ zu verwenden.

[0042] Hier kommt neben den genannten Wirkungen (antiadhäsiv, zellproliferationsfördernd, zellstoffwechselerhöhend) zum Tragen, dass die erfindungsgemäßen Verbindungen wie viele sekundäre Pflanzenstoffe mit großer Wahrscheinlichkeit eine antioxidative Wirkung haben.

[0043] Hinzu kommt, dass die erfindungsgemäßen Verbindungen wasserlöslich sind und sich daher in hohen Konzentrationen auch fettarmen, fettfreien oder kalorienreduzierten Lebensmitteln beimischen lassen und dass sie einfach zu isolieren bzw. synthetisieren sind. All diese Eigenschaften lassen die erfindungsgemäßen Verbindungen für die Verwendung in sog. „functional food“ und als Nahrungsergänzungsmittel geeignet erscheinen.

[0044] Weiterhin ist die Verwendung einer erfindungsgemäßen Verbindung als Beigabe zu einem Zellkulturmedium vorgesehen. Die erwähnte zellproliferationsfördernde Wirkung lässt die erfindungsgemäßen Verbindungen

dungen insbesondere für die Verwendung in In-vitro-Zellvermehrungskulturen als geeignet erscheinen, insbesondere bei der Herstellung künstlicher Gewebe und Organe, für Hautmodelle oder autologe Implantationssysteme. Die zellproliferationsfördernde Wirkung scheint dabei sowohl humane, tierische als auch pflanzliche Zellkulturen zu betreffen.

[0045] Ein Erklärungsansatz hierfür könnte sein, dass die erfindungsgemäßen Verbindungen natürlicher Weise insbesondere in Pflanzensamen (wie z.B. Kakaobohnen) vorkommen, und dort die Zellteilung nach der Keimung fördern.

[0046] Aufgrund der oben erwähnten antiadhäsiven Wirkung ist außerdem bevorzugt die Verwendung einer erfindungsgemäßen Verbindung zur Verhinderung der Ausbildung von mikrobiellen Belägen auf Oberflächen vorgesehen.

[0047] Hier ist insbesondere an Implantate, Prothesen, Katheter (insbesondere Pulmonal- und Blasenkathe-ther), Kanülen, chirurgische und diagnostische Instrumente (insbesondere Endoskope) und Zahnprothesen gedacht. Auf diese Weise könnte insbesondere der Verschleppung von häufig gegen Antibiotika resistenten Krankenhauskeimen begegnet werden.

[0048] Weitere Verwendungsgebiete sind Abwasserrohre, Rohrleitungen für Lebensmittel wie z.B. Milch, Rohrleitungen in sanitären Anlagen und Schwimmbädern (insbesondere Whirlpools), Antifoulinganstriche für Schiffe, Oberflächen von Windeln, Pflastern und anderer Hygieneartikel sowie kosmetische Instrumente, wie z.B. Zahnbürsten,

[0049] Aufgrund der hohen chemischen Stabilität sind die erfindungsgemäßen Verbindungen gerade für diese Einsatzbereiche an exponierten Oberflächen sehr gut geeignet.

[0050] Weiterhin ist die Verwendung einer erfindungsgemäßen Verbindung als Haut- oder Mundpflegemittel bevorzugt vorgesehen. Hierbei ist an Hautcremes, Antiageing-Produkte, Produkte zur Verhinderung der Narbenbildung oder zur Behandlung von Verbrennungen und Sonnenbränden, Zahncremes, Mundspülungen und dergleichen gedacht. Je nach Verwendung steht dabei die antiadhäsive, die zellproliferationsfördernde, die zellstoffwechselerhöhende oder die antioxidative Wirkung der erfindungsgemäßen Verbindungen im Mittelpunkt.

[0051] Ferner ist erfindungsgemäß ein Arzneimittel, Kosmetikum, Hautpflegemittel, Mittel zur Behandlung von Oberflächen, oder ein Nahrungsergänzungsmittel oder Functional food vorgesehen, das eine erfindungsgemäße Verbindung enthält.

[0052] Überdies ist eine diagnostische, therapeutische oder kosmetische Darreichungsform vorgesehen, die eine erfindungsgemäße Verbindung enthält, und in Form eines wässrigen Extrakts, einer Lösung, einer Emulsion, einer Suspension, eines pulmonalen Inhalates, eines Implantates, einer Wasser/Öl-Emulsion, eine Öl/Wasser-Emulsion, eines Gels, einer Tablette, einer Kapsel, einer Creme, einer Salbe, eines Pflasters, einer Mikroemulsion, einer Nanoemulsion, als Transferosome oder enkapsuliert in Liposomen, Micellen oder Microsphären vorliegt.

[0053] Zur Isolierung und Aufarbeitung einer erfindungsgemäßen Verbindung ist ein Verfahren vorgesehen, aufweisend die Schritte der Gewinnung von Pflanzenmaterial, Herstellung eines wässrigen oder eines wässrigen-alkoholischen Extraktes, Zentrifugation des Extrakts, ggf. Lyophilisierung des Extrakts, und Aufreinigung des Extrakts mittels chromatographischer Verfahren (z.B. IEC, GPC, Adsorptionschromatographie, Verteilungschromatographie) und/oder Ultrafiltrationsverfahren bis zu einer Konzentration von mindestens 1 g pro 100 g Extrakt vorgesehen.

[0054] Bei dem der Extraktion zu unterziehenden Pflanzenmaterial handelt es sich bevorzugt um Pflanzenmaterial von Pflanzen aus der weiter unten aufgeführten Liste. Für die wässrige Extraktion kann dabei z.B. 1 g getrocknetes Pflanzenmaterial 2 × 15 min mit 15 ml zweifach destilliertem Wasser inkubiert werden. Die Zentrifugation kann z.B. 10 min lang bei 5000 × g erfolgen.

[0055] Es sei im Weiteren erwähnt, dass die Erfinder auch ein Syntheseverfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen entwickelt haben. Hierzu wird auf die Publikation [1] verwiesen.

Zeichnungen und Beispiele

[0056] Die vorliegende Erfindung wird durch die im Folgenden gezeigten und diskutierten Beispiele und Figuren genauer erläutert. Dabei ist zu beachten, dass die Beispiele und Figuren nur beschreibenden Charakter haben und nicht dazu gedacht sind, die Erfindung in irgendeiner Form einzuschränken.

Tabelle 1

[0057] In Tabelle 1 sind verschiedene erfindungsgemäße Verbindungen gezeigt, die unter den Schutzbereich der vorliegenden Erfindung fallen, und die aus verschiedenen Pflanzen isoliert wurden. Die Strukturformeln derselben Verbindungen sind in Fig. 1 gezeigt. Es handelt sich hierbei durchweg um N-Phenylpropenoyl-Aminosäuren (siehe Formel 2). Gemäß Formel 1 in Anspruch 1 handelt es sich also bei X um einen HC=CH-Rest, während R₇ eine OH-Gruppe ist. Die chemischen Bezeichnungen gehen aus Tabelle 1 hervor.

Tabelle 1

Substanz	Nr.
(-)-N-[4'-hydroxy-(E)-cinnamoyl]-L-Glutaminsäure	1
(+)-N-[(E)-cinnamoyl]-L-Asparaginsäure	2
(+)-N-[4'-hydroxy-3-methoxy-(E)-cinnamoyl]-L-Asparaginsäure	3
(-)-N-[4'-hydroxy-(E)-cinnamoyl]-L-Tyrosin	4
(+)-N-[3',4'-dihydroxy-(E)-cinnamoyl]-L-Tryptophan	5
(+)-N-[4'-hydroxy-(E)-cinnamoyl]-L-Tryptophan	6
(+)-N-[4'-hydroxy-3-methoxy-(E)-cinnamoyl]-L-Tryptophan	7
(+)-N-[3',4'-dihydroxy-(E)-cinnamoyl]-L-Asparaginsäure	8
(+)-N-[4'-hydroxy-(E)-cinnamoyl]-L-Asparaginsäure	9
(-)-N-[3',4'-dihydroxy-(E)-cinnamoyl]-L-Glutaminsäure	10
(-)-N-[3',4'-dihydroxy-(E)-cinnamoyl]-3-hydroxy-L-Tyrosin	11
(-)-N-[3',4'-dihydroxy-(E)-cinnamoyl]-L-Tyrosin	12
(-)-N-[4'-hydroxy-(E)-cinnamoyl]-3-hydroxy-L-Tyrosin	13
(-)-N-[3',4'-dihydroxy-(E)-cinnamoyl]-D-Asparaginsäure	14
(+)-N-[3',4'-dihydroxy-(Z)-cinnamoyl]-L-Asparaginsäure	15

Beispiel 1

[0058] Getrocknetes Material der in Liste 1 aufgeführten Pflanzen wurde einer wässrigen Extraktion gemäß dem oben beschriebenen Verfahren unterzogen. Die gewonnenen Extrakte wurden dann einer HPLC (Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie), einer LCMS (Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie) bzw. einer NMR (Kernspinn-Resonanzspektrometrie) unterzogen.

[0059] Hierbei wurden synthetisierte, mit Deuterium markierte Analoga der Verbindungen 2, 4, 5, 7, 8, 9, 11 und 12 aus Tabelle 1 als Marker mitgemessen.

Liste 1

Acorus calamus, Angelica archangelica, Arnica montana, Arnica chamissonis, Betula spec., Cassia angustifolia, Cassia senna, Cinnamomum ceylanicum, Cola nitida, Coriandrum sativum, Crocus sativus, Eucalyptus spec., Gentiana lutea, Hedera helix, Hypericum perforatum, Ilex paraguariensis, Illicium verum, Juniperus communis, Lavandula spec., Matricaria recutita, Pausinystalia yohimbe, Physostigma venenosum, Primula veris, Primula elatior, Ricinus communis, Salix sp., Sambucus nigra, Silybum marianum, Syzygium aromaticum, Theobroma cacao, Thymus vulgaris, Thymus zygis, Trigonella foenum-graecum

[0060] In folgenden Pflanzen konnten die erfindungsgemäßen Verbindungen nachgewiesen werden (Nummerierung der Verbindungen gemäß Tabelle 1):

Tabelle 2

Pflanze	Teil	(Verbindung Nr.) µg/g
Acorus calamus	Rhizom	(2) 0.10
Angelica archangelica	Wurzel	(9) 0.73; (1) 0.05; (2) 2.29
Arnica montana, Arnica chamissonis	Blüte	(3) 0.02; (2) 0.08
Cassia angustifolia, Cassia senna	Frucht	(3) 1.22
Cola nitida	Samen	(2) 0.11
Coriandrum sativum	Frucht	(8) 1.43; (9) 3.96; (1) 0.03; (3) 1.75; (2) 1.24
Hedera helix	Blatt	(4) 0.013; (2) 0.16; (5) 0.21; (6) 3.49; (7) 0.03
Hypericum perforatum	Kraut	(1) 0.49
Lavandula spec.	Blüte	(8) 0.72; (9) 3.67; (1) 0.36; (3) 0.54; (2) 4.36
Physostigma venenosum	Frucht	(9) 0.82; (1) 0.08; (3) 0.19
Sambucus nigra	Blüte	(8) 1.29; (9) 3.95; (2) 0.56; (1) 1.09; (3) 0.92 (2) 3.42
Silybum marianum	Frucht	(5) 0.04
Theobroma cacao	Samen	siehe Referenz 8
Thymus vulgaris, Thymus zygis	Kraut	(2) 0.09

Beispiele 2–4:

[0061] Um mögliche pharmakologische Eigenschaften der erfindungsgemäßen Verbindungen zu untersuchen, wurden die Verbindungen Nr. 5 ((+)-N-[3',4,-dihydroxy-(E)-cinnamoyl]-L-Tryptophan; Kaffeesäure-L-Tryptophan als Beispiel für einen aliphatischen Aminosäurerest an R₆), und Nr. 8 ((+)-N-[3',4,-dihydroxy-(E)-cinnamoyl]-L-Asparaginsäure; Kaffeesäure-L-Aspartat als Beispiel für einen aromatischen Aminosäurerest an R₆) verwendet.

Beispiel 2: Untersuchungen an einer menschlichen Leberzelllinie

[0062] Die HepG2-Zelllinie, Klon H20, wurde von Prof. Mersch-Sundermann, Universität Giessen erhalten und wie in [2] beschrieben kultiviert. Die Zellen wurden in low glucose (1 g/l) Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit L-Glutamine und 25 mM Hepes, das mit 15 % (v/v) hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS) und Gentamycin (30 µg/ml) versetzt war, in einer feuchten Atmosphäre bei 37±0.5°C, 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden trypsinisiert, mit PBS (pH 7.4) gewaschen, leicht zentrifugiert und anschließend im Zellmedium eine Zellsuspension hergestellt, indem das Sediment durch eine Kanüle gepresst wurde. Das Medium wurde alle drei bis fünf Tage ausgewechselt. Die zu testenden Verbindungen Nr. 5 und 8 wurden in einer Konzentration von 1 mg/ml in HepG2-Medium, dem statt FCS das serumfreie Supplement SerEx zugegeben wurde, gelöst und durch einen 0.2 µm Zelluloseazetatfilter filtriert.

[0063] Die Zellen wurden in 96-well Mikrotiterplatten (1×10^4 Zellen/Well) ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden den zu testenden Verbindungen, in Konzentrationen von 100 und 10 $\mu\text{g/ml}$ 48 h lang ausgesetzt. Die Zellstoffwechselaktivität wurde gemäß [3] mit 2.5 mg/ml MTT quantifiziert. Das extrazytosolische LDH [4] wurde mit einem Zytotoxizitätsassay quantifiziert.

[0064] Sowohl die Verbindung Nr. 5 als auch die Verbindung Nr. 8 erhöhten die mitochondriale Aktivität nach 48-stündiger Inkubation (siehe [Fig. 2](#)). Eine verkürzte Inkubationszeit von 24 Stunden zeigte, dass Verbindung Nr. 8 den Energiestatus signifikant erhöhte, während Verbindung Nr. 5 keine Wirkung zeigte. Es konnte festgestellt werden, dass Verbindung Nr. 8 einen schnellen und intensiven stimulierenden Effekt aufweist. Die Bestimmung der LDH zeigte, dass keine nekrotische Zelltoxizität festzustellen war.

Beispiel 3: Untersuchungen an einer menschlichen Keratinocyten-Zelllinie

[0065] Humane primäre Keratinocyten (NHK) wurden aus menschlicher Haut isoliert, die durch operative Resektion kaukasischer Patienten erhalten wurde. Es wurden in-vitro-Tests in Bezug auf die mitochondriale Aktivität [3], den BrdU-Einbau [5] und auf nekrotische Effekte mittels LDH-Assay [4] durchgeführt.

[0066] Für eine quantitative Real-Time-PCR wurden die NHK mit den zu testenden Verbindungen, die in serumfreien Keratinocyten-Medium gelöst waren, 6 Stunden lang inkubiert. Als Positivkontrolle wurde Keratinocyten-Medium mit verschiedenen Wachstumsfaktoren verwendet. Die Gesamt-RNA wurde mit dem Perfect RNA eukaryotic Mini Kit aufgereinigt. RNA-Aliquots wurden für Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR), die mit TaqMan Reverse Transcription Reagents[®] durchgeführt wurde, hergestellt.

[0067] Die quantitative RT-PCR wurde mit dem TaqMan Universal PCR Master Mix und spezifischen TaqMan Genexpressions-Assays für KGF, den KGF-Rezeptor, den EGF-Rezeptor, den Insulin-Rezeptor, STAT6 und 18srRNA als endogene Kontrolle in einem 7300 Real-Time PCR-System von Applied Biosystems durchgeführt.

[0068] Die Untersuchungen wurden mit Zellen der 2. bis 6. Passage durchgeführt. Sowohl die Verbindung Nr. 5 als auch die Verbindung Nr. 8 erhöhten in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/mL}$ sowohl die mitochondriale Aktivität als auch die Proliferation ([Fig. 3](#)). Eine Zelltoxizität wurde nicht festgestellt.

[0069] Da in vielen Fällen Auswirkungen auf die Physiologie von Keratinocyten durch eine erhöhte Expression von Wachstumsfaktoren oder Wachstumsfaktoren-Rezeptoren vermittelt wird, wurde der Einfluss der Verbindungen Nr. 5 und 8 auf die Genexpression des Keratinocyten-Wachstumsfaktors KGF, seines Rezeptors (KGFR), den Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR und den Insulinrezeptor InsR mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Außerdem wurde die Expression des Transkriptionsfaktors STAT6 und des Gens für Involucrin (ein spezifisches Protein für die frühe Zell-Differenzierung) untersucht.

[0070] Es wurde keine erkennbare Wirkung auf die Expression von KGF, KGFR, EGFR, InsR und Involucrin beobachtet. Für STAT 6 wurde eine signifikant erhöhte Expression festgestellt (9 \times höher im Vergleich zu den Kontrollen).

Beispiel 4: Untersuchungen zur Adhäsion von Helicobacter pylori.

[0071] Adhäsionstests wurden gemäß [6, 7] durchgeführt. Dabei wurden FITC-markierte Bakterien mit den zu testenden Verbindungen (1 mg/ml) inkubiert. Deparaffinierte Magengewebstücke wurden mit den Bakterien inkubiert. Mikroorganismen, die an dem Epithel anhaften, wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop gezählt und mit einer nicht-behandelten Kontrolle verglichen

[0072] Die maximale Adhäsion, wie z. B. in den unbehandelten Kontrollgruppen (Negativkontrolle), festgestellt wurde, wurde mit einem Wert von +++++ belegt, während geringere Adhäsionen mit Werten von +++, ++, + oder – belegt wurden, wobei in der Positivkontrolle (Sialyllactose, [7]) ein Wert von – festgestellt wurde.

[0073] Insbesondere nach Inkubation der Bakterien mit Verbindung Nr. 8 (1 mg/mL) wurde ein starker und reproduzierbarer antiadhäsiver Effekt gegen Helicobacter pylori mit nahezu vollständiger Unterbindung der Adhäsion beobachtet, während Verbindung Nr. 5 keine Wirkung zeigte. Um eine direkte Cytotoxizität der zu testenden Verbindungen gegen H. pylori zu untersuchen, wurden die Verbindungen in Konzentrationen von 2,5 mg/mL in einem Scheibendiffusionsassay gegen den Mikroorganismus getestet (Positivkontrolle mit 0.5 μg

Amoxicillin). Dabei wurden keine Anzeichen einer bakteriziden oder bakteriostatischen Wirkung der zu testenden Verbindungen festgestellt.

[0074] Die in den Beispielen 2–4 beschriebenen Versuche wurden auch mit der Verbindung Nr. 11 durchgeführt. Diese zeigte jedoch keinen der beschriebenen Effekte. Gleichwohl deuten die mit den aufgrund ihrer exemplarischen Strukturen ausgewählten Verbindungen Nr. 5 und 8 gezeigten Ergebnisse darauf hin, dass auch andere der erfindungsgemäßen Verbindungen gemäß Formel 1 oder 2 bzw. [Fig. 1](#) ähnliche Wirkungen aufweisen. Es ist daher zulässig, die erwähnten medizinischen Indikationen für alle der unter die genannten Formeln fallenden Verbindungen zu beanspruchen.

Literatur

- (1) Stark T, Hofmann T. Isolation, structure determination, synthesis, and sensory activity of N-phenylpropenoyl-L-amino acids from cocoa (*Theobroma cocoa*). *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 5419-5428
- (2) Dauer A, Hensel A, Lhoste F, Knasmueller S, Mersch-Sundermann V. Genotoxic and antigenotoxic effects of catechin and tannins from the bark of *Hamamelis virginiana* L. in metabolically competent, human hepatoma cells (HepG2) using single cell electrophoresis. *Phytochem.* 2003; 63: 199–207
- (3) Mosmann M. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: applications to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immun. Meth.* 1983; 65: 55–63
- (4) Martin A, Clynes M. Comparison of 5 microplate colorimetric assays for in vitro cytotoxicity testing and cell proliferation assays. *Cytotechnol.* 1993; 11: 49–58
- (5) Porstmann T, Ternyk T, Avrameas S. Quantification of 5-bromo-2'-deoxyuridine into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. *J. Immun. Meth.* 1985; 82:
- (6) Lengsfeld C, Deters A, Faller G, Hensel A. High molecular weight polysaccharides from black currant seeds inhibit adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa. *Planta Med.* 2004; 70: 620–626
- (7) Lengsfeld C, Titgemeyer F, Faller G, Hensel A. Glycosylated compounds from okra inhibit adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52: 1495–1503
- (8) Stark T, Justus H, Hofmann T. A stable isotope dilution analysis (SIDA) for the quantitative determination of N-phenylpropenoyl-L-amino acids in coffee beverage and cocoa. *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54: 2859–2867

Zeichnungen

[0075] [Fig. 1](#): Strukturformeln einiger erfindungsgemäßer N-Phenylpropenoyl-Aminosäuren

[0076] [Fig. 2](#): Einfluss der Verbindungen Nr. 5 und Nr. 8 (10 und 100 µg/ml) auf die mitochondriale Aktivität menschlicher Leberzellen (HEPG2) nach 48-stündiger Inkubation.

[0077] Als Meßwert ist in [Fig. 2](#) die relative mitochondriale Dehydrogenase-Aktivität (unbehandelte Kontrolle = 100%) aufgetragen. Die Balken stellen die Mittelwerte eines repräsentativen Versuchs mit n = 10 dar.

[0078] **Fig. 3**: Einfluss der Verbindungen Nr. 5 und Nr. 8 (10 µg/ml) auf die mitochondriale Aktivität (A) und die mitotische Proliferation (B) von HaCaT Keratinocyten nach 60-stündiger Inkubation.

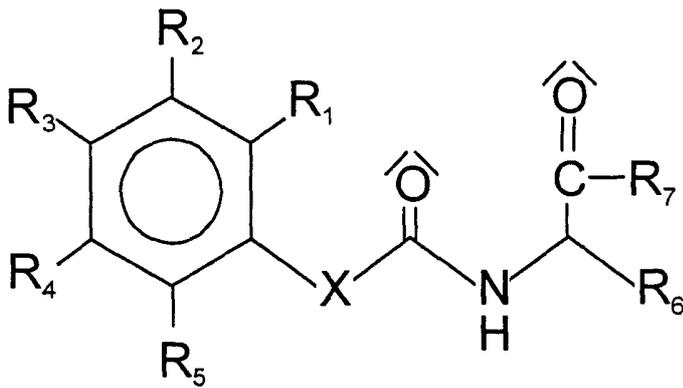
[0079] Als Meßwert ist in [Fig. 3A](#) die relative mitochondriale Dehydrogenase-Aktivität (unbehandelte Kontrolle = 100%) und in [Fig. 3b](#) die relative mitochondriale Proliferationsrate (unbehandelte Kontrolle = 100%) aufgetragen.

[0080] Die mitochondriale Aktivität wurde mit dem MTT Test untersucht und die Proliferation durch BrdU-Incorporations-ELISA. Die Balken stellen die Standardfehler mit n = 10 dar. Negativkontrolle: unbehandelte Zellen, Positivkontrolle: Fibroblasten-Wachstumsfaktor FGF.

[0081] [Fig. 4](#): Fluoreszenzmikroskope (200 ×) eines repräsentativen in situ-Experiments mit FITC-markierten *H. pylori* auf menschlicher Magenschleimhaut: (A) Vollständige Adhäsion (+++++) nichtbehandelter Bakterien, Fluoreszenzintensität auf 100 % standardisiert (Negativkontrolle), (B) Positivkontrolle (–), Fluoreszenzintensität 10% (C) Verbindung Nr. 5 (++++), Fluoreszenzintensität 78%, (D) Verbindung Nr. 8 (+) Fluoreszenzintensität 19%.

Patentansprüche

1. Verbindungen der allgemeinen Strukturformel



(Formel 1)

zur Verwendung in einem chirurgischen, therapeutischen oder diagnostischen Verfahren zur Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers.

2. Verbindungen gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei
 a) R₁-R₅ um Wasserstoffreste (H-), Hydroxigruppen (HO-), Methoxigruppen (CH₃O-), Ethoxigruppen (C₂H₅O-) und/oder überbrückende Methylendioxy-(-O-CH₂-O-) und/oder Glycosylgruppen handelt, bei
 b) R₆ um den organischen Rest einer Aminosäure, bei
 c) R₇ um eine Hydroxigruppe (-OH) oder eine über eine Amidbindung gebundene Aminosäure bzw. ein Peptid mit einem finalen Carboxyterminus,
 d) X um einen C_nY_{2n}-Rest oder einen C_nY_n-Rest mit n = 0-6 handelt, wobei Y Wasserstoffreste (H-), Alkylgruppen oder ein substituiertes Stickstoff-, Sauerstoff- oder Schwefelatom sein können.

3. Verbindungen gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei X um einen HC=CH-Rest handelt (ggf. substituierte N-Phenylpropenoyl-Aminosäure).

4. Verbindungen gemäß einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es sich R₆ um den organischen Rest einer Aminosäure, ausgewählt aus der Gruppe aufweisend aliphatische, aromatische, polare, basische, saure, ptoteinogene, nicht proteinogene Aminosäuren, α-, β-, γ-, Aminosäuren und/oder L- oder D-Aminosäuren.

5. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der vorherigen Ansprüche zur Herstellung eines Arzneimittels zur Vorbeugung und/oder Behandlung von bakteriellen, viralen oder mykologischen Infektionen.

6. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der vorherigen Ansprüche zur Regeneration, zur Verbesserung des Zellstoffwechsels und/oder zur Verbesserung der Zellproliferation.

7. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der vorherigen Ansprüche zur Herstellung eines Arzneimittels gegen orale Plaque.

8. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der vorherigen Ansprüche als Nahrungsergänzungsmittel.

9. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der vorherigen Ansprüche als Beigabe zu einem Zellkulturmedium.

10. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der vorherigen Ansprüche zur Verhinderung der Ausbildung von mikrobiellen Belägen auf Oberflächen.

11. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der vorherigen Ansprüche als Haut- oder Mundpflegemittel.

12. Arzneimittel, Kosmetikum, Hautpflegemittel, Mittel zur Behandlung von Oberflächen, Nahrungsergänzungsmittel, oder Functional food, enthaltend eine Verbindung gemäß einem der vorherigen Ansprüche.

13. Diagnostische oder therapeutische Darreichungsform enthaltend eine Verbindung gemäß einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass diese in Form eines wässrigen Extrakts, einer Lösung,

einer Emulsion, einer Suspension, eines pulmonalen Inhalates, eines Implantates, einer Wasser/Öl-Emulsion, eine Öl/Wasser-Emulsion, eines Gels, einer Tablette, einer Kapsel, einer Creme, einer salbe, eines Pflasters, einer Mikroemulsion, einer Nanoemulsion oder enkapsuliert in Liposomen, Micellen oder Microsphären vorliegt.

14. Verfahren zur Isolierung und Aufarbeitung einer Verbindung gemäß einem der vorherigen Ansprüche, aufweisend die folgenden Schritte:

- a) Gewinnung von Pflanzenmaterial,
- b) Herstellung eines wässrigen oder wässrigen-alkoholischen Extrakts,
- c) Zentrifugieren des Extrakts,
- d) ggf. lyophilisieren des Extrakts, und
- e) Aufreinigung des Extrakts mittels chromatographischer Verfahren und/oder Ultrafiltrationsverfahren bis zu einer Konzentration von mindestens 1 g einer Verbindung gemäß einem der vorherigen Ansprüche pro 100 g Extrakt.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

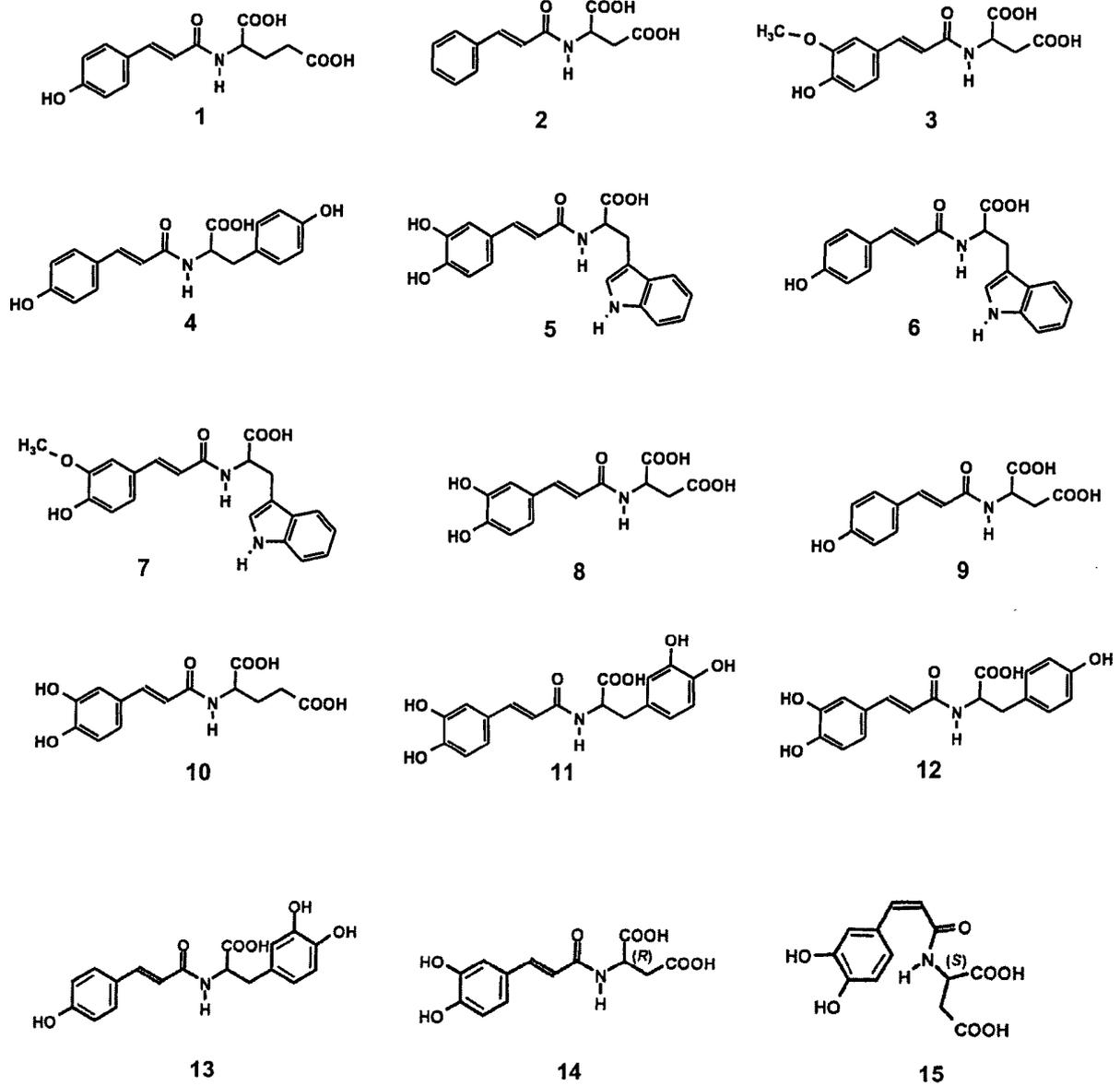


Fig. 1

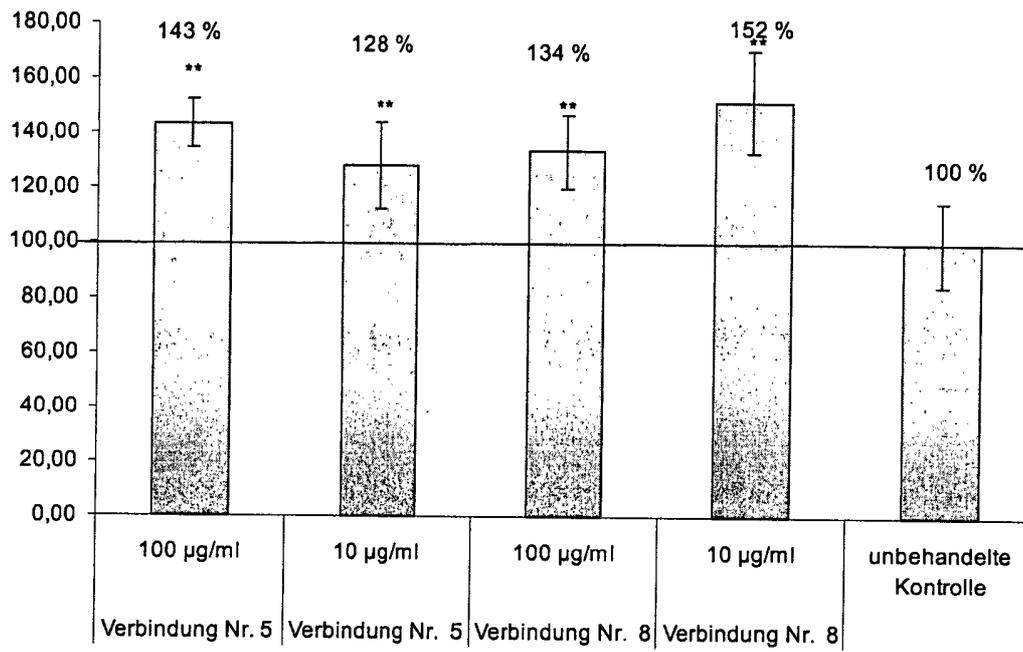
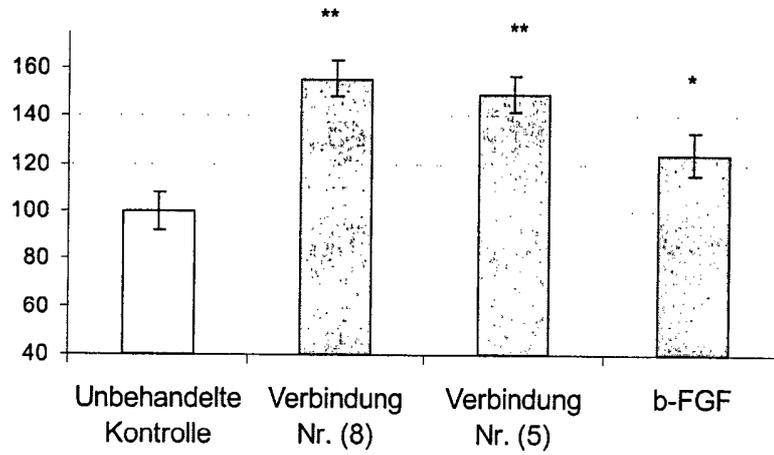
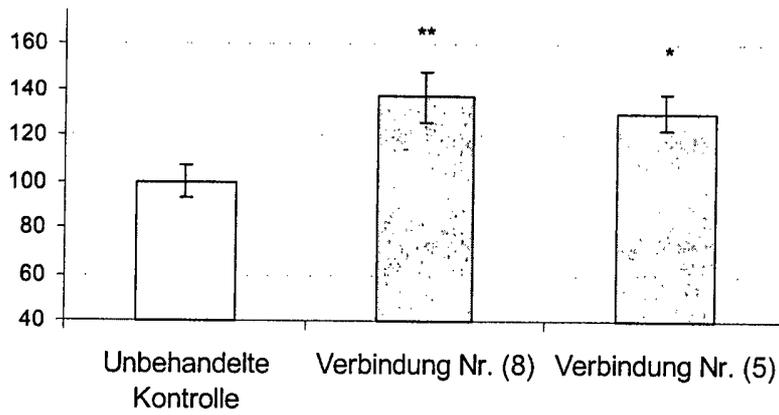


Fig. 2



**: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$

Fig. 3a



**: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$

Fig. 3b

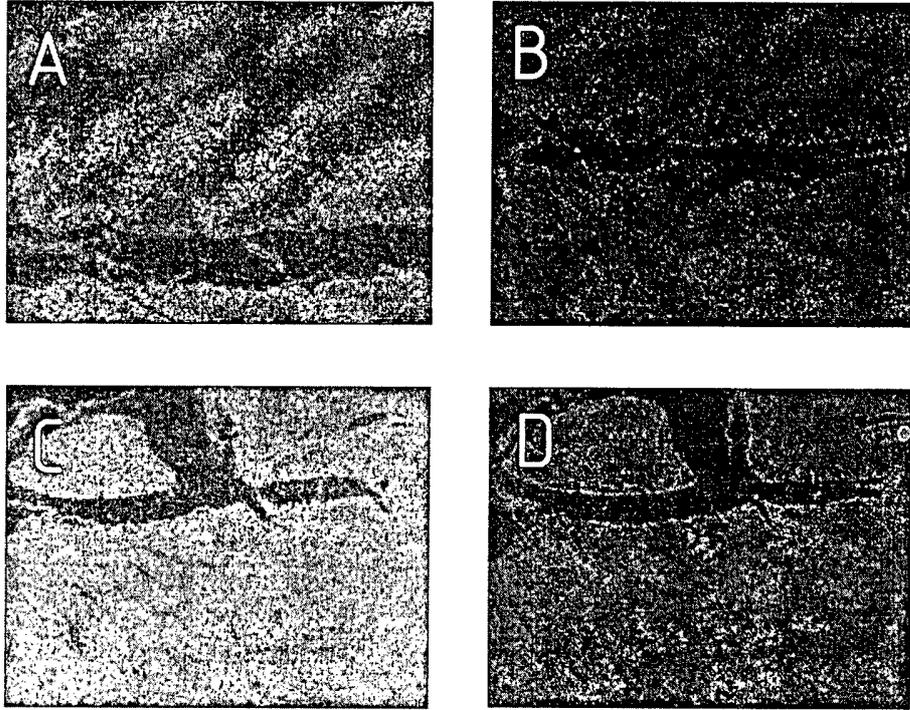


Fig. 4