



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 01 525 T2 2006.03.02**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 379 262 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 01 525.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FR02/01219**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 761 922.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 02/083158**

(86) PCT-Anmeldetag: **09.04.2002**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **24.10.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.01.2004**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **06.10.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **02.03.2006**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 35/78 (2000.01)**

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

0104942 10.04.2001 FR

(73) Patentinhaber:

**Société de Conseils de Recherches et
d'Applications Scientifiques (S.C.R.A.S.), Paris,
FR**

(74) Vertreter:

Abitz & Partner, 81679 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:

TENG, Beng-Poon, F-91190 Gif-sur-Yvette, FR

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES AN WIRKSTOFFEN HOCHANGEREICHERTEN EX-
TRAKTES DER BLÄTTER VON GINKGO BILOBA**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines an Wirkstoffen hoch angereicherten Extrakts von Blättern von *Ginkgo biloba*.

[0002] Verschiedene standardisierte phytopharmazeutische Präparate auf der Basis von Extrakten von Blättern von *Ginkgo biloba* werden gegenwärtig für die Behandlung von zerebralkulären und peripheren Störungen insbesondere in Europa, in den Vereinigten Staaten und im fernen Osten verwendet.

[0003] Der gegenwärtig am häufigsten verwendete *Ginkgo-biloba*-Extrakt (EGb 761®) enthält 24% Flavon-Glycoside, 3% Ginkgolide A, B, C und J insgesamt und 3% Bilobalid (vgl. K. Drieu, La Presse Médicale (1986), 15, 1455–1457). Die empfohlene Tagesdosis für einen Patienten beträgt 120 Milligramm.

[0004] Das Patent US 5,399,348 beschreibt beispielsweise ein Verfahren zur Herstellung eines *Ginkgo-biloba*-Extrakts mit einer mittleren Zusammensetzung von 24% Flavon-Glycoside, 3% Ginkgolide A, B, C und J und 3% Bilobalid. Dieses Verfahren umfasst die folgenden Schritte:

- i. Extraktion des trockenen Pulvers von Blättern in 40 Gew.-% Wasser enthaltendem Aceton;
- ii. Entfernung der Lipide durch Konzentration des Extrakts unter vermindertem Druck, bis man ein Konzentrat erhält, das etwa 30% Feststoffe enthält, um auf diese Weise das Aceton zu entfernen, und dann Verdünnung mit Wasser, um eine Konzentration von 15% an Feststoffen zu erhalten, Kühlen der erhaltenen Suspension auf etwa 10°C während einer Stunde vor der Entfernung der Lipidniederschläge durch Filtration;
- iii. Anreicherung der organischen Phase durch Versetzen des wässrigen Filtrats mit einer 30%-igen Ammoniumsulfatlösung, worauf eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit einer Mischung von Methyläthylketon und Aceton (zwischen 9 : 1 und 4 : 6) und Konzentration der organischen Phase folgt, um eine Konzentration von 50 bis 70% an Feststoffen zu erhalten;
- iv. Entfernung der Tannine durch Verdünnung des Konzentrats in einer Mischung von Wasser und Ethanol mit einem Gewichtsverhältnis von 50/50, um eine Konzentration von 10% an Feststoffen zu erhalten, Zusetzen einer wässrigen Lösung eines Bleisalzes, bis die Farbe von braun auf bernsteinfarben übergeht, und Filtration des Blei-Tannin-Niederschlags, um ein klares Filtrat zu erhalten;
- v. Entfernung des Bleis in Form seines unlöslichen Sulfats durch Konzentration des Filtrats, um einen maximalen Ethanolanteil von 5% beizubehalten, Zusetzen von Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von etwa 20%, worauf eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit einer Mischung von Methyläthylketon und Ethanol (zwischen 8 : 2 und 1 : 1) folgt; und
- vi. Trocknung des Endprodukts durch Konzentration der organischen Phase, um eine Konzentration von 50 bis 70% an Feststoffen zu erhalten, und Trocknen unter Vakuum in einem Ofen bei 60 bis 80°C, um das Endprodukt zu isolieren, das weniger als 5% Wasser enthält.

[0005] In den letzten zehn Jahren hat man sich sehr darum bemüht, den Anteil der aktiven Verbindungen der *Ginkgo-biloba*-Extrakte anzureichern und bei dieser Gelegenheit gleichzeitig den Anteil der langkettigen alkylphenolischen allergenen Verbindungen, wie Ginkgolsäuren, zu reduzieren.

[0006] Es gibt eine gewisse Anzahl von Patentanmeldungen und Patenten, die Verfahren beschreiben, mit denen an Flavon-Glycosiden und Terpen-Lactonen angereicherte Extrakte von *Ginkgo-biloba*-Blättern hergestellt werden können.

[0007] Das Patent US 5,389,370 betrifft beispielsweise Verfahren zur Herstellung von Extrakten, die hinsichtlich aktiver Verbindungen konzentriert sind. Die hierbei angewandte Technik besteht darin, dass man die durch Flüssig-Flüssig-Extraktion erhaltene an Flavon-Glycosiden reiche Fraktion mit Bilobalid und Ginkgoliden mischt, die durch eine chromatographische Trennung auf einer Säule isoliert wurden, um die gewünschten Zusammensetzungen zu erhalten, die typischerweise 50% Flavon-Glycoside und 6% Bilobalid, 50% Flavon-Glycoside und 7% Ginkgolide oder 50% Flavon-Glycoside, 6% Bilobalid und 7% Ginkgolide enthalten. Das beschriebene Verfahren nimmt die beiden ersten Schritte des oben genannten Patents US 5,399,348 auf (die im vorliegenden Text als die Schritte 1 und 2 bezeichnet werden), an die die folgenden aufeinander folgenden Schritte angefügt werden:

3. Anreicherung der organischen Phasen: Flüssig-Flüssig-Extraktion mit einer Mischung von Ethylacetat und Hexan (9 : 1), wobei die wässrige Phase mit n-Butanol wieder extrahiert wird und die erhaltene n-Butanol-Phase zur Trockene konzentriert wird, um die an Flavon-Glycosiden reiche Fraktion zu erhalten;
4. Behandlung mit Aktivkohle: Waschen der Ethylacetat-Hexan-Phase mit Wasser, wobei die gewaschene Ethylacetat-Hexan-Phase dann mit Aktivkohle behandelt wird, filtriert und zur Trockene konzentriert wird;

5. Umkristallisation: Auflösung des festen Rückstands in einer Mischung von Ethanol und Wasser in einem Gewichtsverhältnis von 50/50, Kühlung, um zu kristallisieren, und Filtration, um die Ginkgolide zu gewinnen;
 6. Säulenchromatographie: Konzentration des Überstands des Schritts 5 zur Trockene und chromatographische Trennung auf Kieselgelsäule, um an Bilobalid und Ginkgoliden reiche Fraktionen zu erhalten; und
 7. Mischung der Fraktionen: Mischung der an Flavon-Glycosiden reichen Fraktion von Schritt 3 mit den in Schritt 5 oder 6 erhaltenen Ginkgoliden und/oder mit dem in Schritt 6 erhaltenen Bilobalid.

[0008] Gemäß einer Abwandlung dieses Verfahrens können die Schritte 4 und 5 durch eine Säulenchromatographie ersetzt werden.

[0009] Das Patent US 6,030,621 beschreibt ferner ein Verfahren zur Herstellung von mit Flavon-Glycosiden und mit Terpen-Lactonen angereicherten Ginkgo-biloba-Extrakten. Die verwendete Technik ist ähnlich der des Patentes US 5,389,370: Die an Flavon-Glycosiden reiche Fraktion wird mit den an Terpen-Lactonen reichen Fraktionen gemischt, wobei letztere durch Säulenchromatographie erhalten werden. Die hergestellten Extrakte enthalten typischerweise 47,2% Flavon-Glycoside und 6,3% Terpen-Lactone oder 70% Flavon-Glycoside und 10% Terpen-Lactone. Dieses Verfahren umfasst die folgenden Schritte:

- a) Extraktion des trockenen Pulvers von Blättern in 50 Gew.-% Wasser enthaltendem Ethanol;
- b) Entfernung der Lipide durch Konzentration des Extrakts unter vermindertem Druck bis zur Entfernung des Ethanols, Verdünnung des Konzentrats mit Wasser, Ruhen der Mischung während 48 Stunden und Filtration der Lipidniederschläge;
- c) Einfangen der aktiven Verbindungen durch Durchgang des wässrigen Filtrats durch ein Harz, das aus einer Mischung von Harz XAD-4 (Mischung von porösen Polymeren) und Polyamid besteht;
- d) Eluierung der aktiven Verbindungen durch Verwendung von aufeinanderfolgenden Ethanol-Wasser-Mischungen, die 30, 60 und 90 Gew.-% Ethanol enthalten; und
- e) Kombination aller in d) erhaltenen Fraktionen, Abdampfen des Ethanols, Waschen des wässrigen Konzentrats mit Hexan und Eindampfen der gewaschenen wässrigen Phase zur Trockene, um einen Extrakt zu erhalten, der 47,2% Flavon-Glycoside und 6,3% Terpen-Lactone enthält.

[0010] Bei einer Abwandlung dieses Verfahrens wird die Fraktion, die aus der 30% Ethanol enthaltenden Ethanol-Wasser-Mischung erhalten wird, einer Blitzchromatographie unterzogen, um eine Fraktion zu erhalten, die mindestens 80% Terpen-Lactone enthält. Auf dieselbe Weise werden die Fraktionen, die aus den Ethanol-Wasser-Mischungen, die 60 und 90% Ethanol enthalten, erhalten werden, kombiniert und einer Blitzchromatographie unterzogen, um eine Fraktion zu erhalten, die mindestens 80 Flavon-Glycoside enthält. Die mindestens 80% Flavon-Glycoside enthaltende Fraktion und die mindestens 80% Terpen-Lactone enthaltende Fraktion werden in verschiedenen Verhältnissen gemischt und gestatten die Herstellung von Extrakten, die bis zu 70% Flavon-Glycoside und 10% Terpen-Lactone enthalten.

[0011] Aufgrund der steigenden Anforderungen hinsichtlich gesundheitlicher Sicherheit werden vorzugsweise immer reinere Wirkstoffe verwendet. Bei den Ginkgo-biloba-Extrakten geht also die Tendenz dahin, eines Tages Extrakte wie EGb 761[®] zu Gunsten von Extrakten, die an Wirkstoffen noch reicher sind, aufzugeben. Typischerweise könnte man Extrakte anstreben, die mindestens 50 Gew.-% Flavon-Glycoside und 12 Gew.-% Terpen-Lactone enthalten, oder auch Extrakte, die mindestens 30 Gew.-% Terpen-Lactone und mindestens 15 Gew.-% Flavon-Glycoside enthalten. Die Verfahren der Patente US 5,389,370 oder 6,030,621 würden die Herstellung eines solchen Extrakts gestatten, haben sich jedoch als zu aufwendig herausgestellt, wenn sie in industriellem Maßstab eingesetzt werden, und zwar hauptsächlich wegen des Vorhandenseins der chromatographischen Trennschritte.

[0012] Die Anmelderin hat ein Verfahren entwickelt, das die Herstellung von Extrakten von Ginkgo-biloba-Blättern gestattet, die den oben angegebenen Spezifikationen entsprechen, ohne einen Schritt der chromatographischen Trennung zu verwenden.

[0013] Gegenstand der Erfindung ist deshalb ein Verfahren zur Herstellung eines Extrakts von Blättern von Ginkgo biloba, das die folgenden aufeinanderfolgenden Schritte umfasst:

- i. Extraktion von trockenen Fragmenten von Ginkgo-biloba-Blättern in Ethanol, das maximal 20 Gew.-% Wasser enthält;
- ii. Konzentration des Extrakts unter vermindertem Druck in Gegenwart einer wässrigen Natriumchloridlösung und Entfernung des dunklen Öls aus der restlichen hellen Lösung;
- iii. Waschen der wässrigen Restlösung durch Flüssig-Flüssig-Extraktion mit n-Hexan, n-Heptan oder Cyclohexan;
- iv. Flüssig-Flüssig-Extraktion der gewaschenen wässrigen Phase mit Ethylacetat;

v. Waschen der im Schritt iv erhaltenen Ethylacetatphase mit einer Natriumchloridlösung und dann Eindampfen der gewaschenen Ethylacetatphase zur Trockene.

[0014] Unter trockenen Fragmenten von Ginkgo-biloba-Blättern versteht man in der vorliegenden Anmeldung trockene Fragmente, deren Teilchengröße 5 mm nicht überschreitet.

[0015] Erfindungsgemäß liegen die trockenen Fragmente von Ginkgobiloba-Blättern in Form von trockenem Pulver vor. Unter Pulver versteht man in der vorliegenden Anmeldung ein Pulver, dessen Teilchengröße 1 mm (und vorzugsweise 0,5 mm) nicht überschreitet.

[0016] Das erfindungsgemäße Verfahren kann angewandt werden:

- entweder auf Fragmente (und vorzugsweise auf ein Pulver) von lyophilisierten Ginkgo-biloba-Blättern, wobei man in diesem Fall Extrakte erhält, die mindestens 50 Gew.-% Flavon-Glycoside und 12 Gew.-% Terpen-Lactone enthalten;
- oder auf Fragmente (und vorzugsweise auf ein Pulver) von getrockneten Ginkgo-biloba-Blättern, wobei man in diesem Fall Extrakte – im Nachstehenden "Hauptextrakte" genannt
- erhält, die mindestens 30 Gew.-% Terpen-Lactone und mindestens 15 Gew.-% Flavon-Glycoside enthalten (das Verfahren gestattet in diesem Fall außerdem, als Nebenprodukt Extrakte – im Nachstehenden "Nebenextrakte" genannt – zu erhalten, die den in der Patentanmeldung PCT WO 96/33728 beschriebenen Extrakten entsprechen, und zwar Extrakte, die etwa 30 bis 35 Gew.-% Flavon-Glycoside und etwa 1 Gew.-% Terpen-Lactone enthalten).

[0017] Gemäß einer der Abwandlungen der Erfindung wird das oben beschriebene Verfahren auf Fragmente (oder auf ein Pulver) von lyophilisierten Ginkgo-biloba-Blättern angewandt, und der erhaltene Extrakt ist vorzugsweise so beschaffen, dass er etwa 52 Gew.-% Flavon-Glycoside und etwa 13 Gew.-% Terpen-Lactone enthält.

[0018] Gemäß der bevorzugten Variante der Erfindung wird das oben beschriebene Verfahren auf Fragmente (oder auf ein Pulver) von getrockneten Ginkgo-biloba-Blättern angewandt und ist der erhaltene Hauptextrakt vorzugsweise so beschaffen, dass er 34 bis 46 Gew.-% Terpen-Lactone und 18 bis 30 Gew.-% Flavon-Glycoside enthält. Das oben beschriebene Verfahren wird noch bevorzugter auf Fragmente (oder auf ein Pulver) von getrockneten Ginkgo-biloba-Blättern angewandt, und der erhaltene Hauptextrakt ist so beschaffen, dass er 36 bis 44 Gew.-% Terpen-Lactone und 20 bis 28 Gew.-% Flavon-Glycoside enthält. Insbesondere wird das oben beschriebene Verfahren auf Fragmente (oder auf ein Pulver) von getrockneten Ginkgo-biloba-Blättern angewandt und enthält der erhaltene Hauptextrakt etwa 40 Gew.-% Terpen-Lactone (davon etwa 24,5 Gew.-% Ginkgolide A, B und C und etwa 15,5 Gew.-% Bilobalid) und etwa 24 Gew.-% Flavon-Glycoside.

[0019] Die Extraktion des Schritts i wird vorzugsweise mit Hilfe von Ethanol ausgeführt, das zwischen 10 und 20 Gew.-% und vorzugsweise zwischen 15 und 20 Gew.-% Wasser enthält.

[0020] Die nach Konzentration des Extrakts unter vermindertem Druck in Gegenwart einer wässrigen Natriumchloridlösung im Schritt ii erhaltene Mischung wird vorzugsweise beispielsweise auf eine Temperatur von etwa 10°C gekühlt, und zwar vorzugsweise während einer Zeit von 10 oder 15 Minuten bis 1 oder 2 Stunden, bevor die Entfernung des dunklen Öls aus der restlichen klaren Lösung vorgenommen wird. Ferner wird der Mischung, die nach Konzentration des Extrakts unter vermindertem Druck in Gegenwart einer wässrigen Natriumchloridlösung im Schritt ii erhalten wird, vorzugsweise Celit zugesetzt, und wird die Gesamtheit des in dieser Mischung vorliegenden Ethanols abgedampft, bevor die Kühlung dieser Mischung vorgenommen wird.

[0021] Die Waschung von Schritt iii wird vorzugsweise mit n-Heptan durchgeführt.

[0022] Gemäß einer besonders bevorzugten Abwandlung des erfindungsgemäßen Verfahrens, wenn dieses auf Fragmente (oder auf ein Pulver) von getrockneten Ginkgo-biloba-Blättern angewandt wird, werden das Volumen der wässrigen Restlösung des Schritts iii und die Natriumchloridmenge in der Lösung zuvor so eingestellt, dass einerseits der Gewichtsgehalt an wasserlöslichen Feststoffen etwa 8 Gew.-%, bezogen auf das Gesamtgewicht der Lösung, und andererseits der Gehalt an Natriumchlorid 16 Gew.-%, bezogen auf das Gesamtgewicht der Lösung, beträgt. Der Gehalt an wasserlöslichen Feststoffen wird ermittelt, indem eine Probe von ethanolscher Lösung entnommen wird, die eingedampft wird, um das Ethanol zu entfernen, und dann mit Dichlormethan extrahiert wird, worauf die wässrige Restphase zur Trockene eingedampft wird und gewogen wird; der Gehalt an wasserlöslichen Feststoffen kann nun von der erhaltenen festen Rückstandsmasse abgeleitet werden.

[0023] Was den Schritt iv anlangt, so kann Methylethylketon, das 2 bis 10 Vol.-% Aceton oder Ethanol enthält, gegebenenfalls das Ethylacetat ersetzen.

[0024] Was die wässrigen Natriumchloridlösungen betrifft, die in den Schritten ii und v verwendet werden, so haben diese vorzugsweise eine Konzentration von mindestens 10 Gew.-% Natriumchlorid im Schritt ii, während sie im Schritt v vorzugsweise hinsichtlich Natriumchlorid gesättigt sind.

[0025] Gemäß einer bevorzugten Abwandlung des oben beschriebenen Verfahrens bei seiner Anwendung auf Fragmente (oder auf ein Pulver) von getrockneten Ginkgo-biloba-Blättern kann die am Ende der Flüssig-Flüssig-Extraktion des Schritts iv gewonnene salzhaltige wässrige Phase durch ein Verfahren nachbehandelt werden, das die folgenden Schritte umfasst:

- a) Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Hilfe einer Mischung von etwa 1 : 1 aus Ethylacetat und Ethanol; und
- b) Eindampfen der am Ende des Schritts a) gewonnenen organischen Phase zur Trockene;
- c) Auflösung des im Schritt b) erhaltenen Rückstands in absolutem Ethanol, um eine Konzentration von etwa 5 bis 10 Gew.-% Feststoffe, bezogen auf die Masse der ethanolischen Lösung, zu erhalten;
- d) Kühlen der Mischung auf eine Temperatur von vorzugsweise 10°C oder darunter (beispielsweise auf eine Temperatur von 2 bis 8°C), vorzugsweise während einer Zeit von 30 Minuten bis 12 Stunden;
- e) Filtration und Abdampfen des Ethanols des gewonnenen Filtrats, um einen Trockenextrakt zu erhalten.

[0026] Dieses zusätzliche Verfahren gestattet die Gewinnung eines zusätzlichen Extrakts, der im Allgemeinen etwa 30 bis 35 Gew.-% Flavon-Glycoside und etwa 1 Gew.-% Terpen-Lactone enthält.

[0027] Das oben beschriebene Verfahren kann wahlweise nach den Schritten i bis v den folgenden Schritt vi umfassen:

- vi) Lösen des Trockenextrakts in Ethanol und Kühlen der Lösung auf eine Temperatur von vorzugsweise 10°C oder darunter (beispielsweise auf eine Temperatur von 2 bis 8°C), Filtration des gegebenenfalls ausgefallenen Salzes und Eindampfen der gebildeten Lösung zur Trockene.

[0028] Wenn das erfindungsgemäße Verfahren in diesem Fall in industriellem Maßstab verwendet wird, bevorzugt man für den Schritt v einfach das Konzentrieren der organischen Phase, bis man eine Konzentration von etwa 50 bis 70 Gew.-% an Feststoffen erhält (und keine Abdampfung zur Trockene) und Zusetzen von Ethanol, um eine Zusammensetzung zu erhalten, die 5 bis 20 Gew.-% Wasser, 5 bis 20 Gew.-% Feststoffe und als Rest Ethanol enthält, bevor der Schritt vi durchgeführt wird. Mit dieser Vorgehensweise spart man einen Trocknungsschritt.

[0029] Die erfindungsgemäß erhaltenen Hauptextrakte sind in der Pharmazie oder im Nahrungsmittelbereich verwendbar (beispielsweise als Zutaten von Nahrungsmittelergänzungstoffen), da sie einerseits weniger als 5 ppm Alkylphenole (Messung mit Hilfe von HPLC-Dosierung) enthalten und andererseits weniger als 0,3% Prodelphinidine enthalten (vorzugsweise weniger als 0,25% und im Allgemeinen zwischen 0,05 und 0,25% Prodelphinidine). Sie enthalten ferner auch wenig lipophile Verunreinigungen und wenig Polysaccharide, andere Proanthocyanidine als die Prodelphinidine und Proteine mit hoher Molekülmasse.

[0030] Aufgrund ihres geringen Gehalts an Prodelphinidinen sind die erfindungsgemäßen Hauptextrakte insbesondere besser an eine Verabreichung an Patienten auf intravenösem Weg angepasst. Ein handelsüblicher Extrakt wie EGb 761[®] kann zum Vergleich bis zu 1,5% Prodelphinidine enthalten.

[0031] Die erfindungsgemäßen Hauptextrakte sind vorzugsweise so beschaffen, dass die Peaks, die dem O-Rhamnopyranosyl-4-O-D-(trans-p-cumaroyl-6''')glucopyranosyloxy-3-tetrahydroxy-3',4',5,7-flavonol (oder 3-(6'''-trans-p-Cumaroyl)-quercetinglucorhamnosid) und dem O-Rhamnopyranosyl-4-O-D-(trans-p-cumaroyl-6''')glucopyranosyloxy-3-trihydroxy-4',5,7-flavonol (oder 3-(6'''-trans-p-Cumaroyl)-kämpferolglucorhamnosid) entsprechen, zusammen etwa 39% der Gesamtfläche der Peaks des Chromatogramms darstellen. Die Hauptextrakte der Erfindung sind insbesondere vorzugsweise so beschaffen, dass der Peak, der dem O-Rhamnopyranosyl-4-O-D-(trans-p-cumaroyl-6''')glucopyranosyloxy-3-tetrahydroxy-3',4',5,7-flavonol (oder 3-(6'''-trans-p-Cumaroyl)-quercetinglucorhamnosid) entspricht, etwa 20 der Gesamtfläche der Peaks des Chromatogramms darstellt. Ferner sind die erfindungsgemäßen Hauptextrakte vorzugsweise so beschaffen, dass der Peak, der dem O-Rhamnopyranosyl-4-O-D-(trans-p-cumaroyl-6''')glucopyranosyloxy-3-trihydroxy-4',5,7-flavonol (oder 3-(6'''-trans-p-Cumaroyl)-kämpferolglucorhamnosid) entspricht, etwa 19% der Gesamtfläche der Peaks des Chromatogramms darstellt.

[0032] Ferner enthalten die mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens erhaltenen Nebenextrakte weniger

als 0,5% Prodelphinidine (vorzugsweise weniger als 0,40% und im Allgemeinen zwischen 0,15 und 0,40% Prodelphinide).

[0033] Gegenstand der Erfindung sind ferner die Hauptextrakte, die durch ein erfindungsgemäßes Verfahren erhalten werden können. Gegenstand der Erfindung sind auch die Hauptextrakte in Form von Medikamenten, die pharmazeutischen Zusammensetzungen, die als Wirkstoff diese Hauptextrakte enthalten, und die Verwendung dieser Hauptextrakte zur Herstellung von Medikamenten für die Behandlung von Krankheiten bzw. Störungen, die aus den folgenden Krankheiten bzw. Störungen ausgewählt sind: zerebralvaskuläre und periphere Störungen (wie Ohrgeräusche vaskulären Ursprungs; Atherosklerose, Ischämien, Thrombosen, Symptome in Zusammenhang mit Veneninsuffizienz, akute entzündliche venöse Erscheinungen und Symptome im Zusammenhang mit einer hämorrhoidalen Krise), neurodegenerative Krankheiten (wie z. B. Alzheimer'sche Krankheit, Parkinson-Krankheit, Huntington-Chorea oder amyotrophe Lateralsklerose) und der chronische pathologische neurosensorielle und kognitive Defizit des älteren Patienten (insbesondere Gedächtnisverlust, der beim älteren Patienten, der nicht an Alzheimer oder einer anderen Demenz erkrankt ist, beobachtet wird). Gegenstand der Erfindung ist schließlich die Verwendung dieser Hauptextrakte zur Herstellung von Medikamenten, die für die unterstützende Therapie bei der Behandlung von proliferativen Krankheiten (insbesondere Krebs) bestimmt sind.

[0034] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen, die einen erfindungsgemäßen Extrakt enthalten, können in fester Form vorliegen, wie beispielsweise in Form von Pulvern, Pillen, Granulat, Tabletten, Liposomen, Gelatinekapseln oder Suppositorien. Pillen, Tabletten oder Gelatinekapseln können mit einer Substanz beschichtet sein, die die Zusammensetzung solange vor der Einwirkung der Magensäure oder der Enzyme im Magen des Patienten schützen kann, dass diese Zusammensetzung unverdaut in den Dünndarm des Patienten gelangt. Der Extrakt kann auch örtlich, beispielsweise unmittelbar an der Stelle eines Tumors, verabreicht werden. Der Extrakt kann auch in einem Prozess anhaltender Freisetzung verabreicht werden (beispielsweise unter Verwendung einer Zusammensetzung mit anhaltender Freisetzung oder einer Infusionspumpe). Die geeigneten festen Träger können beispielsweise Calciumphosphat, Magnesiumstearat, Magnesiumcarbonat, Talk, Zucker, Lactose, Dextrin, Stärke, Gelatine, Cellulose, Methylcellulose, Natriumcarboxymethylcellulose, Polyvinylpyrrolidin und Wachs sein.

[0035] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen, die einen erfindungsgemäßen Extrakt enthalten, können auch in flüssiger Form vorliegen, wie z. B. in Form von Lösungen, Emulsionen, Suspensionen oder einer Formulierung mit anhaltender Freisetzung. Die geeigneten flüssigen Träger können beispielsweise Wasser, organische Lösungsmittel, wie z. B. Glycerin oder Glykole, wie Polyethylenglykol, sowie ihre Mischungen in unterschiedlichen Anteilen in Wasser sein.

[0036] Die Verabreichung eines erfindungsgemäßen Medikaments kann auf topischem, oralem oder parenteralem Weg, durch intramuskuläre Injektion usw. stattfinden.

[0037] Die Dosis eines erfindungsgemäßen Extrakts, die für die Behandlung der oben erwähnten Krankheiten oder Störungen vorzusehen ist, variiert je nach Verabreichungsart, Alter und Körpergewicht des zu behandelnden Patienten sowie nach dessen Zustand und wird endgültig von dem behandelnden Arzt oder Tierarzt entschieden. Eine solche durch den behandelnden Arzt oder Tierarzt bestimmte Menge wird im vorliegenden Text "therapeutisch wirksame Menge" genannt.

[0038] Ohne dem behandelnden Arzt in seiner Meinung vorgreifen zu wollen, und unter Berücksichtigung des Gehalts an Wirkstoffen der erfindungsgemäßen Hauptextrakte kann beispielsweise die Verabreichung einer Tagesdosis von 5 bis 150 mg und vorzugsweise einer Dosis von 10 bis 100 mg (insbesondere einer Dosis von 40 bis 80 mg, beispielsweise von 50 bis 70 mg) dieser Hauptextrakte beim Menschen in Betracht gezogen werden.

[0039] In der vorliegenden Anmeldung bezieht sich der Begriff "ungefähr" auf ein Intervall um den betreffenden Wert herum. Entsprechend der Verwendung in der vorliegenden Anmeldung bedeutet "ungefähr X" ein Intervall von X minus 10% X bis X plus 10% X und vorzugsweise ein Intervall von X minus 5% X bis X plus 5% X.

[0040] Sofern sie nicht anderes definiert werden, haben alle hier verwendeten technischen und wissenschaftlichen Ausdrücke dieselbe Bedeutung, wie sie gewöhnlich von einem normalen Fachmann des Bereichs, zu dem die Erfindung gehört, verstanden werden. Die folgenden Beispiele dienen zur Veranschaulichung der oben beschriebenen Verfahren.

BEISPIELE

Beispiel 1

[0041] 100 g lyophilisierte zerkleinerte Ginkgo-biloba-Blätter (Teilchengröße kleiner als 4 mm) werden zweimal extrahiert, einmal mit 800 ml und ein zweites Mal mit 600 ml einer Ethanol-Wasser-Mischung, die 88 Gew.-% Ethanol enthält, und zwar jedes Mal bei 60°C und während 1 Stunde. Die Extrakte der beiden Extraktionsschritte werden filtriert und die gewonnenen Blätterreste mit 200 ml derselben Lösungsmittelmischung gespült. Die kombinierten Extrakte werden durch Eindampfen auf ein Volumen von 100 ml mit einem Feststoffgehalt von ungefähr 35 g reduziert. 350 ml einer 10 gew.-%igen wässrigen Natriumchloridlösung wird dem ethanolischen Konzentrat zugesetzt und die Eindampfung wird unter vermindertem Druck bei 50°C weitergeführt, um das restliche Ethanol zu entfernen. Die hellorangefarbene klare Salzlösung wird von dem dunklen Öl durch Dekantieren durch einen Baumwolltampon auf einem Filtertrichter und dann durch Filtration auf Celit mit Absaugung getrennt. Der Extrakt in wässriger Salzlösung wird mit zwei Portionen von 150 ml n-Heptan gewaschen, bevor er zweimal mit jeweils 150 ml Ethylacetat extrahiert wird. Die kombinierten Ethylacetatphasen werden mit 50 ml einer mit Natriumchlorid gesättigten Lösung gewaschen und dann unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft. Der Trockenextrakt wird in 60 ml absolutem Ethanol wieder gelöst, über Nacht in einem Kühlschrank bei 5°C belassen, filtriert, um das gegebenenfalls ausgefällte Salz zu entfernen, und das Filtrat wird zur Trockene eingedampft, um 1,42 g Extrakt zu ergeben, der 51,7% Flavon-Glycoside und 13% Terpen-Lactone (6,55% Bilobalid) enthält.

Beispiel 2

[0042] 100 g nach Trocknung in einem rotierenden Industrieofen erhaltene und zerkleinerte Ginkgo-biloba-Blätter (Teilchengröße kleiner als 4 mm; Gehalt 1,8 Gew.-% Flavon-Glycoside und 0,12 Gew.-% Ginkgolide) werden zweimal extrahiert, einmal mit 800 ml und ein zweites Mal mit 600 ml einer Ethanol-Wasser-Mischung, die 80 Gew.-% Ethanol enthält, und zwar jedes Mal bei 60°C und während 1 Stunde. Die Extrakte der beiden Extraktionsschritte werden filtriert und die gewonnenen Blätterreste werden mit 200 ml derselben Lösungsmittelmischung gespült. Die kombinierten Extrakte werden durch Eindampfen auf ein Volumen von 800 ml mit einem Feststoffgehalt von ungefähr 33 g reduziert. 60 g Natriumchlorid, 100 ml Wasser und 22 g Celit werden dem ethanolischen Konzentrat zugesetzt und die Eindampfung wird unter vermindertem Druck bei 50°C weitergeführt, um das restliche Ethanol zu entfernen. Das wässrige Konzentrat wird während einer Stunde auf 10°C gekühlt und die hellorangefarbene klare Lösung wird von dem dunklen Öl durch Dekantieren durch einen Baumwolltampon auf einem Filtriertrichter und dann durch Filtration mit Absaugung über ein mit einem Celitbett bedecktes Sintermaterial abgetrennt. Der Extrakt in wässriger Salzlösung (ungefähr 300 ml) wird mit zwei Portionen von 125 ml n-Heptan gewaschen, bevor er zweimal mit jeweils 125 ml Ethylacetat extrahiert wird. Die kombinierten Ethylacetatphasen werden mit 50 ml einer mit Natriumchlorid gesättigten Lösung gewaschen und dann unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft. Man löst den Trockenextrakt wieder in 23 ml absolutem Ethanol, läßt ihn über Nacht in einem Kühlschrank bei 4°C ruhen und filtriert ihn dann, um das gegebenenfalls ausgefällte Salz zu entfernen, und dann wird das Filtrat zur Trockene eingedampft, um 1,06 g Extrakt zu ergeben, der 23,6% Flavon-Glycoside, 39,2% Terpen-Lactone (davon 24,6% Ginkgolide A, B und C und 14,5% Bilobalid) und ungefähr 0,14% Prodelphinidine enthält.

Beispiel 3

[0043] Die wässrige Salzphase, die nach den aufeinanderfolgenden Schritten des Waschens mit n-Heptan und der Extraktion mit Ethylacetat des Verfahrens zur Herstellung des Extrakts von Beispiel 2 gewonnen wird, wird einer Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Hilfe von zwei Portionen von 125 ml einer Ethylacetat-Ethanol-Mischung 1 : 1 unterzogen. Die gewonnene organische Phase wird zur Trockene eingedampft. Der Trockenextrakt wird in absolutem Ethanol so aufgenommen, dass man eine Konzentration von 5 Gew.-% Trockenextrakt, bezogen auf das Gesamtgewicht der Lösung, erhält. Die Mischung wird über Nacht in einem Kühlschrank bei 4°C belassen, bevor sie über Papier filtriert wird (man spült die Feststoffe mit absolutem Ethanol bei 4°C). Nach Eindampfen zur Trockene erhält man einen Extrakt, der 31,88% Flavon-Glycoside und 0,67% Terpene (davon 0,50% Ginkgolide A, B und C und 0,17% Bilobalid) und ungefähr 0,21% Prodelphinidine enthält.

Charakterisierung der erfindungsgemäßen Extrakte

A) HPLC

[0044] Die erfindungsgemäßen Extrakte können mit Hilfe der Methode der Hochleistungs-Flüssig-Chromato-

graphie (HPLC) mit Eluierung durch Gradienten gekennzeichnet werden, die im Nachstehenden beschrieben wird.

Geräte

- Flüssigchromatograph und an die im Nachstehenden angeführten Bedingungen angepasste Einrichtung
- Laborglasgeräte
- Waage mit einer Genauigkeit von 1/10 mg

Reagenzien

- Reines Wasser (HPLC-Qualität)
- Acetonitril (HPLC-Qualität)
- Isopropanol (HPLC-Qualität)
- Zitronensäure (HPLC-Qualität)
- Methanol R
- Standard-Bezugsextrakt von Ginkgo biloba

Verfahrensweise

[0045] Eine Lösung des zu testenden Extrakts wird hergestellt, indem 200 mg zu analysierender Extrakt in 10 ml Methanol gelöst werden. Parallel werden 200 mg Standardbezugsextrakt von Ginkgo biloba (EGb 761®) in 10 ml Methanol gelöst und bilden die Bezugslösung.

[0046] Es werden die folgenden Chromatographiebedingungen vorgesehen:

- | | |
|---------------------------|--|
| – Gradiententyp: | linear von 0% bis 100% sekundäre mobile Phase in 15 min und dann 5 min mit der sekundären mobilen Phase. Äquilibrieren der Säule während 10 min mit der primären mobilen Phase vor der folgenden Einspritzung. |
| – Primäre mobile Phase: | Gereinigtes Wasser ... 1000 ml
Acetonitril ... 200 ml
Isopropanol ... 30 ml
Zitronensäure ... 4,92 g |
| – Sekundäre mobile Phase: | Gereinigtes Wasser ... 1000 ml
Acetonitril ... 470 ml
Isopropanol ... 50 ml
Zitronensäure ... 6,08 g |
| – Durchsatz: | 1,5 ml/min |
| – Erfassung: | UV 360 nm |
| – Säule: | Rostfreier Stahl, 15 cm, Durchmesser 4,6 mm; gefüllt mit Kieselgel für Chromatographie R Nucleosil 5C18 Macherey-Nagel oder gleichwertiges (5 µm). |
| – Eingespritztes Volumen: | 5 µl |
| – Säulentemperatur: | 20 ± 2°C |

Ergebnisse

[0047] Das Chromatogramm für den in Beispiel 2 hergestellten Extrakt ist in [Fig. 1](#) dargestellt und das für den in Beispiel 3 hergestellten Extrakt in [Fig. 2](#).

[0048] Die für die einzelnen Peaks bestimmten Integrierungen sind in den nachstehenden Tabellen I (Extrakt von Beispiel 2) und II (Extrakt von Beispiel 3) wiedergegeben. Die größeren Peaks mit Retentionszeiten von etwa 13 und 15 Minuten unter den im Vorstehenden beschriebenen Bedingungen entsprechen jeweils dem O-Rhamnopyranosyl-4-O-D-(trans-p-cumaroyl-6''')glucopyranosyloxy-3-tetrahydroxy-3',4',5,7-flavonol (oder 3-(6'''-trans-p-Cumaroyl)-quercetinglucorhamnosid) und dem O-Rhamnopyranosyl-4-O-D-(trans-p-cumaroyl-6''')glucopyranosyloxy-3-trihydroxy-4',5-7-flavonol (oder 3-(6'''-trans-p-Cumaroyl)-kämpferolglucorhamnosid).

Nr. des Peaks	Reaktionszeit (min.)	Integrationsstyp	Fläche	% Fläche
1	5,66	BV	323169,34	1,63
2	6,09	VV	40920,21	0,21
3	7,12	VV	69832,25	0,35
4	7,53	VV	335574,32	1,69
5	7,86	VV	119797,71	0,60
6	8,42	VV	2633527,95	13,25
7	9,38	VV	272916,32	1,37
8	9,76	VV	1226466,81	6,17
9	10,04	VV	72124,84	0,36
10	10,29	Vv	97259,69	0,49
11	10,61	vv	2967432,21	14,93
12	10,88	vV	343065,16	1,73
13	11,25	VV	61980,66	0,31
14	11,58	VV	405705,79	2,04
15	12,02	VV	193158,96	0,97
16	12,32	VV	295426,85	1,49
17	12,66	VV	139571,25	0,70
18	13,25	VV	39600621,99	19,93
19	13,79	Vv	145778,77	0,73
20	13,99	vV	38952,25	0,20
21	14,26	VV	39634,91	0,20
22	14,67	VV	119350,40	0,60
23	14,87	VV	85122,51	0,43
24	15,18	VV	3789171,34	19,07
25	15,67	VV	60575,37	0,30
26	15,94	VV	118616,10	0,60
27	16,51	VV	208977,01	1,05
28	16,69	VV	345205,90	1,74
29	17,13	VV	206765,44	1,04
30	17,32	VV	241246,27	1,21
31	17,68	Vv	95087,16	0,48
32	17,80	vV	311413,97	1,57
33	18,08	VV	108167,40	0,54
34	18,40	VV	103158,38	0,52
35	18,88	VV	19884,37	0,10
36	19,15	VV	9701,13	0,05
37	19,35	VV	18389,23	0,09
38	19,75	VV	109237,26	0,55
39	20,42	VV	21754,52	0,11
40	20,82	VV	13348,93	0,07
41	21,35	VV	26491,23	0,13
42	21,82	VV	55867,45	0,28
43	22,18	VV	14634,07	0,07
44	22,58	VB	7095,01	0,04
SUMME			19872178,50	

Tabelle I

Nr. des Peaks	Reaktionszeit (min.)	Integrationstyp	Fläche	% Fläche
1	4,25	BV	1082912,49	3,74
2	4,84	VV	853793,45	2,95
3	5,52	VV	767098,18	2,65
4	6,06	VV	1634400,29	5,68
5	6,59	VV	53647,35	0,19
6	6,91	VV	127266,30	0,44
7	7,37	VV	5275614,83	18,22
8	7,69	VV	1062334,77	3,67
9	8,28	VV	1918663,93	6,63
10	8,95	Vv	103523,93	0,36
11	9,23	vV	1390204,37	4,80
12	9,63	VV	3866788,04	13,35
13	9,87	VV	2102182,30	7,26
14	10,48	VV	968935,87	3,35
15	10,97	VV	314304,16	1,0
16	11,46	VV	1167341,28	4,03
17	11,86	VV	143179,61	0,49
18	12,20	VV	193515,76	0,67
19	12,56	Vv	91823,99	0,32
20	13,13	vV	1197144,99	4,13
21	13,62	VV	94540,18	0,33
22	13,99	VV	33698,24	0,12
23	14,34	VV	78763,83	0,27
24	14,59	VV	334542,58	1,16
25	15,19	VV	944041,64	3,26
26	15,45	VV	244838,93	0,85
27	15,84	VV	473019,80	1,51
28	16,39	VV	569694,64	1,97
29	16,55	Vv	323620,29	1,12
30	16,72	vV	255311,37	0,88
31	17,02	VV	370249,91	1,28
32	17,55	Vv	106207,91	0,37
33	17,69	vV	338307,55	1,17
34	17,97	VV	134115,60	0,46
35	18,33	VV	148609,32	0,51
36	18,78	Vv	31564,17	0,11
37	18,91	vV	17047,61	0,06
38	19,20	VV	25147,79	0,09
39	19,64	VV	67214,23	0,23
40	20,06	VV	16329,48	0,06
41	20,65	VV	11266,06	0,04
42	21,23	VV	10502,29	0,04
43	21,62	VV	40624,23	0,14
SUMME			28956906,57	

Tabelle II

B) Bestimmung des Gehalts an Prodelphinidinen

[0049] Der Gehalt an Prodelphinidinen der erfindungsgemäßen Extrakte wird auf die im Nachstehenden dargelegte Weise ermittelt.

[0050] Etwa 50 mg Extrakt werden in 25 ml einer Mischung aus Isopropanol und einer 3 N Salzsäurelösung (5/1 v/v) gelöst. 5 ml der erhaltenen Mischung werden in einen mit einem dichten Stopfen verschlossenen 10-ml-Kolben übertragen und der Kolben wird dann während 45 Minuten in kochendes Wasser getaucht. Nach Abkühlen auf 20°C bringt man das Volumen auf 10 ml, indem man eine Mischung aus Isopropanol und 3 N

Salzsäurelösung zusetzt. Die Extinktion wird bei 556 nm gemessen und der Prozentsatz an Prodelphinidinen wird mit Hilfe der folgenden Rechnung erhalten:

$$\% \text{Prodelphinidine} = A \times 86,206897 / B$$

A: Extinktion bei 556 nm

B: mg Probe

[0051] Zur Verringerung der Unsicherheit im Ergebnis wird der Test dreimal wiederholt und von den erhaltenen Resultaten wird ein Mittelwert errechnet.

Pharmakologische Eigenschaften der erfindungsgemäßen Extrakte

[0052] Zum Nachweis der pharmakologischen Eigenschaften von erfindungsgemäßen Extrakten können die folgenden Tests durchgeführt werden:

1) Zellenproliferation

Zellenlinien

[0053] Die Brustkrebs-Zellenlinien MDA-231 wurden bei Lombardi Cancer Center (Georgetown University Medical Center) erworben. Die Zellenlinien werden in Kulturbehältern aus Polystyrol (Corning) gezüchtet und in Dulbecco's modifiziertem Eagle-Medium (DMEM), ergänzt mit 10% Kalbsfötusserum (FBS), vervielfältigt.

Bindungstests

[0054] Die Zellen MDA-231 werden durch Zermahlen in 5 ml Phosphatpuffer-Salzlösung (PBS) dispergiert und dann 15 Minuten mit 500 g zentrifugiert. Die zentrifugierten Zellen werden wieder in einer PBS-Lösung in Suspension gebracht und zur Messung ihres Proteingehalts getestet. Die Tests [³H] PK 11195 können durchgeführt werden, wie in Papadopoulos und Mitarb., J. Biol. Chem. (1990), 265, 3772–3779, und Hardwick und Mitarb., Cancer Res. (1999), 59, 831–842, beschrieben wird. Das [N-Methyl-³H]PK 11195 oder (1-(2-Chlorphenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isochinolincarboxamid) wurde von Du Pont-New England Nuclear (Wilmington, DE, USA) und das PK 11195 von Research Biochemicals Incorporated (Natick, MA, USA) bezogen. Die erhaltenen Ergebnisse werden mit Hilfe des Programms LIGAND (Munson et Robard, Anal. Biochem. (1976), 72, 248–254) analysiert.

Northern-RNA-Analyse

[0055] Die Expression der mRNA von peripheren Benzodiazepin-Rezeptoren (PBR) in Zellen MDA-231, die mit dem Extrakt von Beispiel 1 oder von Beispiel 2 oder mit EGb 761[®] (Bezug) behandelt wurden, kann mit Hilfe einer Northern-Analyse ermittelt werden, wie in Hardwick und Mitarb., Cancer Res. (1999), 59, 831–842, beschrieben wird. Die gesamte Zellen-RNA wurde mit Hilfe des Reagenz RNAzol B (TEL-TEST, Inc., Friendswood, TX, USA) und Chloroform isoliert. 20 µg Gesamt-RNA wird über Gel mit 1 Agarose geleitet und über Nacht auf Nylonmembranen übertragen (S & S Nytran, Schleicher & Schuell, Keene, NH, USA). Ein menschliches PBR-cDNA-Fragment mit einer Länge von 0,2 kb (abgeleitet vom Plasmidvektor pCMV5-PBR, der die vollständige Sequenz des menschlichen PBR enthält), wird mit [α -³²P]dCTP mit Hilfe eines aleatorischen Identifizierungssystems von DNA-Primern markiert (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA). Die verwendeten Hybridisierungsbedingungen sind an der oben genannten Stelle beschrieben. Die Autoradiographie wird durchgeführt, indem die Blots bei –70°C während 4–48 Stunden auf einen Film X-OMAT AR (Kodak, Rochester, NY, USA) belichtet werden. Die Quantifizierung der PBR-mRNA wird mit Hilfe der Software SigmaGel (Jan-del Scientific, San Rafael, CA, USA) durchgeführt.

Zellenproliferation

[0056] Zellen MDA-231 werden auf Schalen mit 96 Vertiefungen (Corning, NJ, USA) mit einer Konzentration von etwa 10 000 Zellen pro Vertiefung (24 h Inkubation) oder 5 000 Zellen pro Vertiefung (48 h Inkubation) in DMEM, ergänzt mit 0,1% Kalbsfötusserum, gesetzt. Die Zellen werden dann während der oben genannten Zeiten in 10%-igem Kalbsfötusserum mit unterschiedlichen Konzentrationen an Verbindung des Beispiels oder an Bezugsverbindung (EGb 761[®]) gesetzt. Die Unterschiede in der Zellenproliferation werden durch Messung der eingeführten Menge an 5-Brom-2'-deoxyuridin (BrdU) analysiert, die unter Verwendung der Einrichtung BrdU

ELISA (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA) bestimmt wird. Die Einführung von BrdU wird bei der Wellenlänge 450 nm (Bezug: 690 nm) gemessen.

2) Durch Glutamat induzierte Neurotoxizität

[0057] Ein erfindungsgemäßer Extrakt kann folgendermaßen getestet werden: Rattenhirn-Neuronen werden mit steigenden Konzentrationen von Extrakt des oben angeführten Beispiels 1 oder Beispiels 2 behandelt oder nicht und dann 30 Minuten später Glutamat mit einer Konzentration von 250 µM ausgesetzt. Die Dosis, die die Toxizität des Glutamats um 50% hemmt (mit IC₅₀ bezeichnet) kann nun ermittelt werden und dann mit derjenigen verglichen werden, die bei einem Extrakt wie EGb 761[®] erhalten wird, der weniger reich an Flavon-Glycosiden und Terpen-Lactonen ist (und zwar 100 µg EGb 761[®] pro ml).

3) Zelltoxizität

[0058] Die Wirkungen eines erfindungsgemäßen Extrakts auf die Viabilität der Zellen kann an einer Zellenlinie HT 22 (Hippocampus-Zellen der Maus) untersucht werden. Die Viabilität der Zellen wird durch Bestimmung der Menge an LDH beurteilt, die von den Zellen freigesetzt wird, die mit steigenden Dosen des Extrakts des oben angeführten Beispiels 1 oder Beispiels 2 behandelt wurden, sowie durch den Trypanblau-Exklusionstest.

Zellenlinien

[0059] Die Zellenlinie HT-22 stammt von Salk Institute for Biological Research (La Jolla, CA, USA). Diese Zellenlinie wird in Dulbecco's modifiziertem Eagle-Medium (DMEM), ergänzt mit 10 Kalbsfötusserum (FBS), im Nachstehenden Vollmedium genannt, auf 37°C gehalten.

Testprotokoll

[0060] Die Zellen HT-22 werden auf eine Schale mit 96 Vertiefungen in einer Konzentration von 5·10³ Zellen pro Vertiefung in Vollmedium gesetzt. 24 Stunden später wird der Extrakt des Beispiels in DMEM solubilisiert und in Konzentrationen von 10, 25, 50, 100, 250, 500 und 1000 µg/ml zugesetzt; dann lässt man den Extrakt während 24 oder 48 Stunden in Kontakt. Die LDH-Messung wird mit Hilfe eines Dosierkastens Promega entsprechend den Instruktionen des Herstellers durchgeführt. Die Extinktionen werden bei 470 nm abgelesen. Die maximale Freisetzung von LDH erhält man nach vollständiger Lyse der Zellen mit Hilfe von Triton X-100.

[0061] Für die Messungen der Viabilität, die mit Hilfe des Trypanblau-Exklusionstests ermittelt wird, werden die Zellen in Schalen mit 6 Vertiefungen eingebracht, und der Extrakt von Beispiel 1 oder von Beispiel 2 wird in der Konzentration von 100 µg/ml während 24 Stunden zugesetzt.

[0062] Die Zellen werden dann mit einer calcium- und magnesiumfreien Phosphatpufferlösung gewaschen und während 5 Minuten bei 37°C Trypsin ausgesetzt. Die Reaktion wird mit Vollmedium gestoppt und der Zellsuspension wird 0,04% Trypanblau zugesetzt. Die Anzahl von Zellen, die den Farbstoff ausschließen (das heißt die lebenden Zellen) wird mit Hilfe eines Hämatozytometers gemessen. Der Viabilitätsprozentsatz der Zellen wird folgendermaßen errechnet: Anzahl lebensfähige Zellen (nicht gefärbt)/Gesamtzahl der Zellen (gefärbt und nicht gefärbt) × 100.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines Extrakts von Blättern von Ginkgo biloba, das die folgenden aufeinanderfolgenden Schritte umfaßt:

- i. Extraktion von trockenen Fragmenten von Ginkgo-biloba-Blättern in Ethanol, das maximal 20 Gew.-% Wasser enthält;
- ii. Konzentration des Extrakts unter vermindertem Druck in Gegenwart einer wässrigen Natriumchloridlösung und Entfernung des dunklen Öls aus dem Rest der hellen Lösung;
- iii. Waschen der wässrigen Restlösung durch Flüssig-Flüssig-Extraktion mit n-Hexan, n-Heptan oder Cyclohexan;
- iv. Flüssig-Flüssig-Extraktion der gewaschenen wässrigen Phase mit Ethylacetat;
- v. Waschen der im Schritt iv erhaltenen Ethylacetatphase mit einer Natriumchloridlösung und dann Eindampfen der gewaschenen Ethylacetatphase zur Trockene.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es keinen Chromatographieschritt umfaßt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem die trockenen Fragmente von Ginkgo-biloba-Blättern des Schritts i durch ein trockenes Pulver von Ginkgo-biloba-Blättern ersetzt wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Extraktion des Schritts i mit Hilfe von 10 bis 20 Gew.-% Wasser enthaltendem Ethanol durchgeführt wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Waschen des Schritts iii mit n-Heptan durchgeführt wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die in den Schritten ii und v verwendeten wässrigen Natriumchloridlösungen eine Konzentration von mindestens 10 Gew.-% Natriumchlorid haben.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, das außerdem nach den Schritten i bis v den folgenden Schritt vi umfaßt:
vi. Lösung des trockenen Extrakts in Ethanol und Kühlen der Lösung, Filtration des ggf. ausgefällten Salzes und Eindampfen der sich ergebenden Lösung zur Trockene.
8. Extrakt von Blättern von Ginkgo biloba, der mit Hilfe eines Herstellungsverfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 7 erhältlich ist.
9. Extrakt von Blättern von Ginkgo biloba nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren an trockenen Fragmenten von getrockneten Ginkgo-biloba-Blättern vorgenommen wird.
10. Extrakt von Blättern von Ginkgo biloba nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß er 34 bis 46 Gew.-% Terpen-Lactone und 18 bis 30 Gew.-% Flavon-Glycoside enthält.
11. Extrakt von Blättern von Ginkgo biloba nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren an trockenen Fragmenten von lyophilisierten Ginkgo-biloba-Blättern vorgenommen wird.
12. Extrakt von Blättern von Ginkgo biloba nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß er etwa 52 Gew.-% Flavon-Glycoside und etwa 13 Gew.-% Terpen-Lactone enthält.
13. Extrakt nach einem der Ansprüche 8 bis 12 in Form eines Medikaments.
14. Pharmazeutische Zusammensetzung, die als Wirkstoff einen Extrakt nach einem der Ansprüche 8 bis 12 enthält.
15. Verwendung eines Extrakts nach einem der Ansprüche 8 bis 12 zur Herstellung eines Medikaments, das für die Behandlung von Krankheiten bzw. Störungen bestimmt ist, die aus den folgenden Krankheiten bzw. Störungen ausgewählt sind: zerebravaskuläre und periphere Störungen und neurodegenerative Krankheiten.
16. Verwendung eines Extrakts nach einem der Ansprüche 8 bis 12 zur Herstellung von Medikamenten, die für die unterstützende Therapie bei der Behandlung von proliferativen Krankheiten bestimmt sind.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

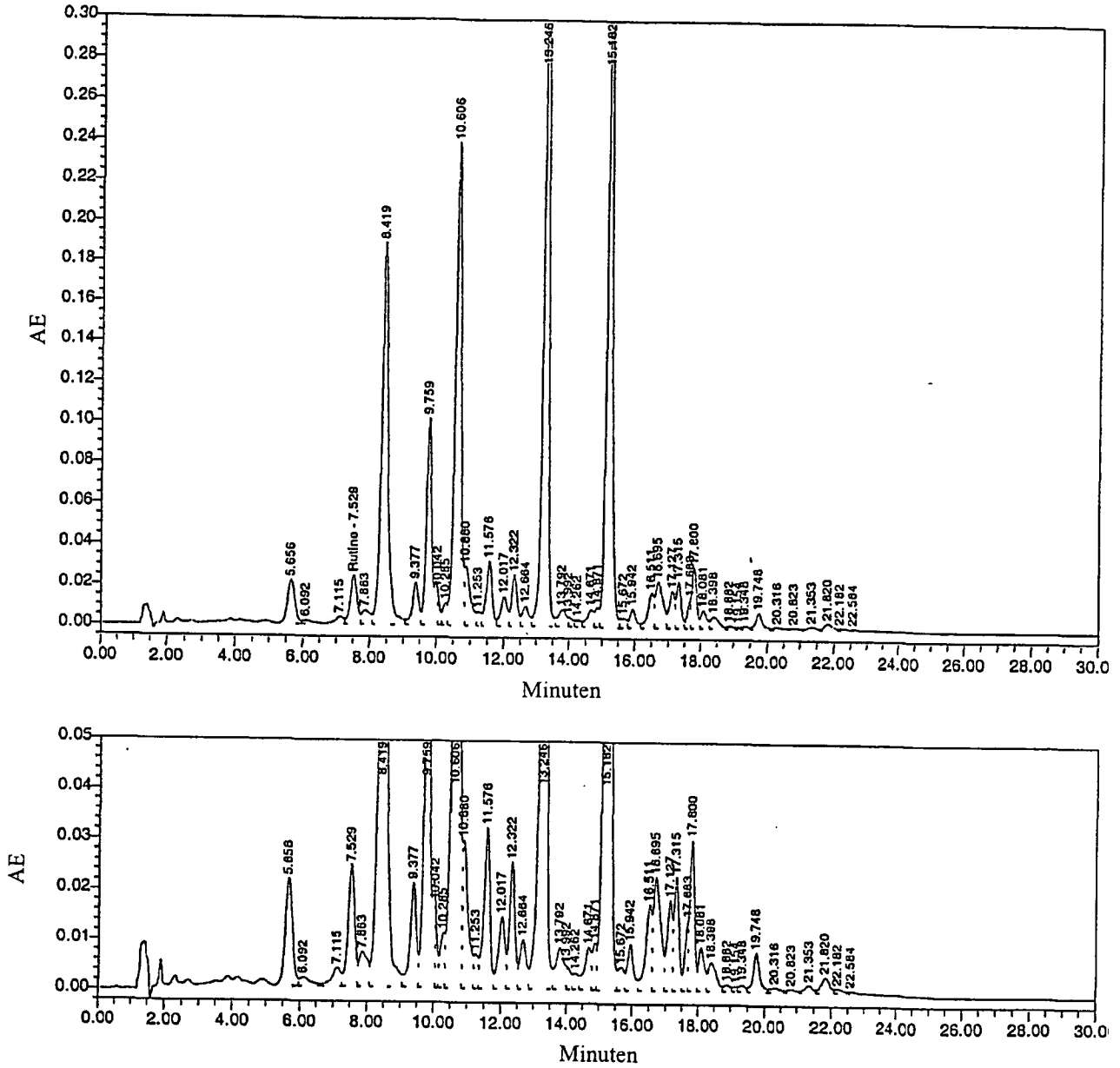


FIG. 1

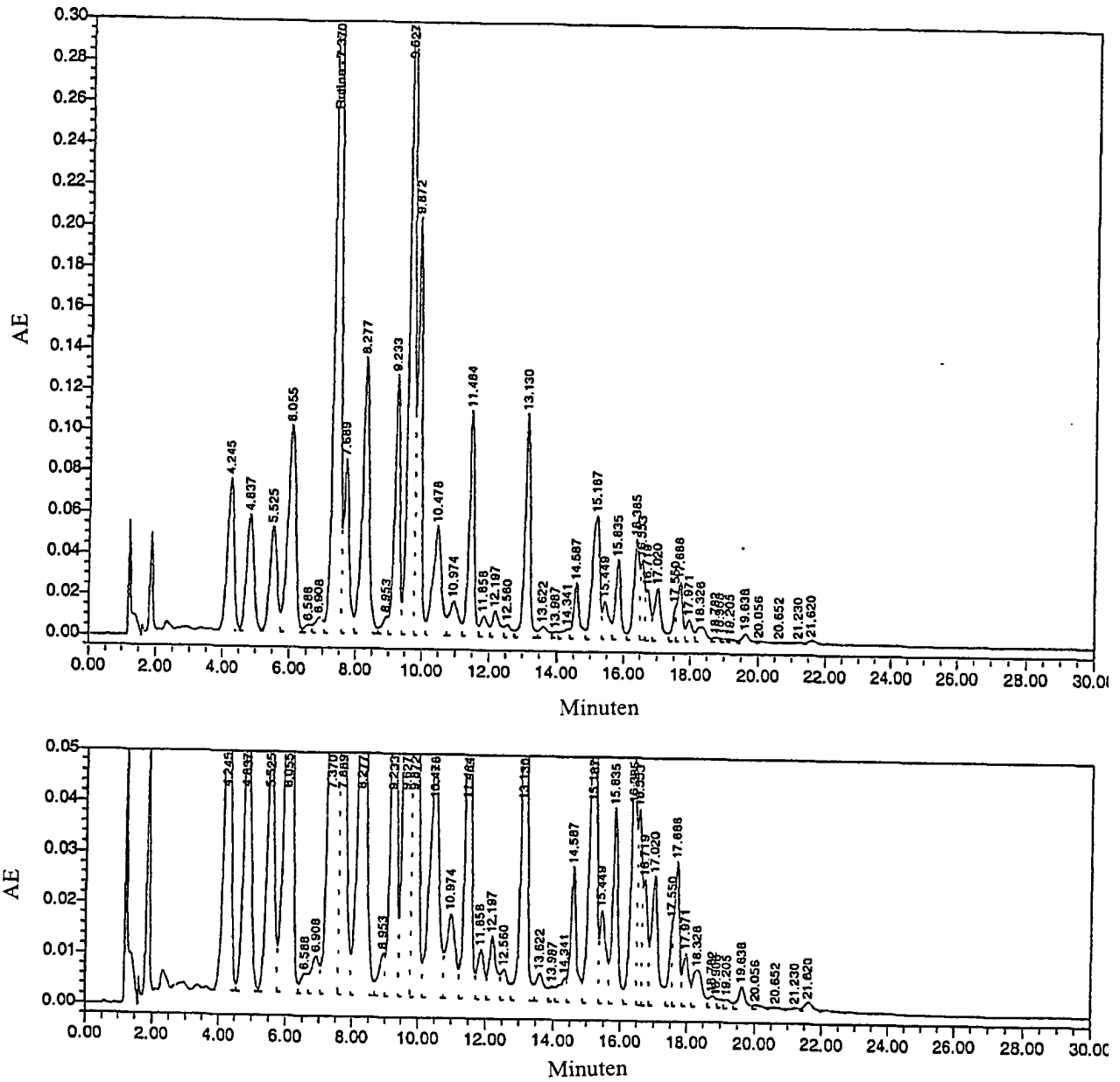


FIG. 2