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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
10. November 2005 (10.11.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/105122 A1

(51) Internationale Patentklassifikation[7]: A61K 35/78

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/004631

(22) Internationales Anmeldedatum:
29. April 2005 (29.04.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 021 276.7 29. April 2004 (29.04.2004) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **GOETECT GMBH** [DE/DE]; Pfingstgrundstrasse 72a, 97816 Lohr Am Main (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **YUANHUI, Fu** [CN/CN]; 605 Lepus, Vanova, Yangshan Road, Chaoyang, Beijing 10012 (CN).

(74) Anwalt: **HAMM, Volker**; Maiwald Patentanwalts GmbH, Ballindamm 37, 20095 Hamburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:
— *hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO Patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)*
— *hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für den folgenden Bestimmungsstaat US*
— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US*

Veröffentlicht:
— *mit internationalem Recherchenbericht*
— *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen*

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

(54) **Title:** GINKGO BILOBA EXTRACT AND METHOD FOR PRODUCING THE SAME

(54) **Bezeichnung:** GINKGO BILOBA EXTRAKT UND VERFAHREN ZU SEINER HERSTELLUNG

(57) **Abstract:** The invention relates to a Ginkgo biloba extract and to a method for producing the same. The invention especially relates to a Ginkgo extract having an increased content in desired, pharmaceutically effective active ingredients and to a method which uses water as the extractant.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft einen Ginkgo biloba Extrakt sowie Verfahren zu seiner Herstel lung. Insbesondere betrifft die Erfindung einen Ginkgoextrakt mit erhöhtem Gehalt an erwünschten, pharmazeutisch wirksamen Inhaltsstoffen sowie ein Verfahren, bei dem Wasser als Extraktionsmittel verwendet wird.

WO 2005/105122 A1

G 2007 / VH

Ginkgo biloba Extrakt und Verfahren zu seiner Herstellung

Die Erfindung betrifft einen Ginkgo biloba Extrakt sowie Verfahren zu seiner Herstellung. Insbesondere betrifft die Erfindung einen Ginkgoextrakt mit erhöhtem Gehalt an erwünschten, pharmazeutisch wirksamen Inhaltsstoffen sowie Verfahren, bei dem ausschließlich Wasser bzw. Alkohol als Extraktionsmittel verwendet wird.

Extrakte aus Blättern des Ginkgo biloba Baums (Ginkgo biloba L.) und daraus hergestellte pharmazeutische Zubereitungen sind Gegenstand breiter pharmakologischer Studien und finden Einsatz in medizinischen und kosmetischen Bereichen. Ginkgoextrakten finden im medizinischen Bereich vor allem Anwendung zur Behandlung von peripheren arteriellen Durchblutungsstörungen und Gefäßstörungen, zur Behandlung von hirnorganisch bedingten Leistungsstörungen wie Gedächtnis- und Konzentrationsstörungen, Kopfschmerzen und Ohrensausen.

Untersuchungen haben ergeben, dass Ginkgoblätter mehr als 70 verschiedene Inhaltsstoffe enthalten, wie Flavonglycoside, Quercetin, Isorhamnetin, Kaempferol, Ginkgetin, Isoginkgetin, Ginkgolide A, B, C und J, Bilobalid und andere mehr. Die pharmazeutische Wirkung von Ginkgoextrakten wird vor allem auf die Inhaltsstoffe Ginkgolflavonglycoside, Ginkgolide und Bilobalide zurückgeführt.

Die erwähnten einzelnen Inhaltsstoffe zeigen eine ähnliche pharmazeutische Wirkung wie Ginkgoblätter bzw. Extrakte aus den Blättern, ihre Wirksamkeit ist jedoch geringer als die der Blätter bzw. deren Extrakten. Dies kann vermutlich darauf zurückgeführt werden, dass die Inhaltsstoffe eine synergistische Wirkung zeigen. Es ist auch denkbar, dass einzelne, wirksame Inhaltsstoffe der Blätter noch nicht identifiziert worden sind.

Neben den erwünschten, pharmazeutisch wirksamen Inhaltsstoffen weisen Ginkgoblätter auch Gehalte an unerwünschten Inhaltsstoffen auf, die zu schweren allergischen Reaktionen führen können. So ist über allergische Reaktionen nach Kontakt mit Gink-

BESTÄTIGUNGSKOPIE

goblättern bzw. Ginkgofrüchten berichten worden (siehe W.F. Sowers et al., Arch. Dermatol., Vol. 91 (1965), 452). Als diese allergischen Reaktionen hervorrufende Substanzen sind Alkylphenolverbindungen, wie Ginkgolsäuren und Ginkgole, Proanthocyanidine sowie deren Resorcinderivate identifiziert worden (siehe J. Gellermann et al., Phytochemistry, Vol. 15 (1976), 1959).

Zur Erzielung der gewünschten pharmazeutischen Wirkung könnten Ginkgoblätter selbstverständlich direkt verwendet werden. Dies hat jedoch den Nachteil, dass damit auch die unerwünschten, allergenen Inhaltsstoffe verabreicht werden. Darüber hinaus variieren die Gehalte an Inhaltsstoffen der Blätter stark, so dass keine gezielt dosierte medizinische Verwendung möglich ist.

Zur Lösung dieser Probleme ist die Verwendung von Ginkgoextrakten mit einem relativ konstanten Wirkstoffprofil vorgeschlagen worden. Im Stand der Technik finden sich viele Vorschläge für geeignete Extraktionsverfahren und zur Herstellung von Extrakten mit definierten Wirkstoffprofilen.

In DE 21 17 429 wird ein Verfahren zur Herstellung von Extrakten aus Ginkgoblättern vorgeschlagen, bei dem Ginkgoblätter mit wässrigem Aceton extrahiert werden, der so erhaltene Extrakt mit Tetrachlorkohlenstoff, Butanon und Ethanol extrahiert wird und mit der so erhaltenen Lösung eine Fällungsreaktion mit Bleihydroxid durchgeführt wird. Durch weitere Verfahrensschritte wird schließlich ein Extrakt erhalten.

EP 0 431 535 offenbart ein Verfahren, bei dem getrocknete Blätter von Ginkgo biloba mit wässrigem Aceton, einem wässrigen Alkanol oder wasserfreiem Methanol extrahiert werden und in weiteren Verfahrensschritten weitere organische Lösungsmittel wie Methylethylketon eingesetzt werden.

In der internationalen Patentanmeldung WO 00/01397 wird ein Extraktionsverfahren beschrieben, bei dem Ginkgoblätter mit alkoholisch-wässrigen oder ketonisch-wässrigen Lösungsmitteln extrahiert und die erhaltenen Extrakte nachfolgend einer Ultrafiltration unterworfen werden.

Die im Stand der Technik beschriebenen Extraktionsverfahren haben allesamt den Nachteil, dass mit umweltbelastenden und physiologisch nicht annehmbaren organischen Lösungsmitteln gearbeitet wird, die zum einen den schließlich erhaltenen Extrakt kontaminieren können und deren Verwendung darüber hinaus unter umweltpolitischen, sicherheitspolitischen und nicht zuletzt wirtschaftlichen Aspekten nachteilig ist. Auch die im Stand der Technik vorgeschlagene Verwendung von Schwermetallverbindungen als Fällungsreagenzien ist nachteilig, da die erhaltenen Extrakte mit Schwermetallen kontaminiert werden können.

Ferner haben die vorbekannten Verfahren den Nachteil, dass sie zu Extrakten führen, deren Gehalt an erwünschten Inhaltsstoffen relativ gering ist. So wird in EP 0 431 535 über einen Extrakt berichtet, der höchstens 30 Gew.-% Flavonglycoside, höchstens 4,5 Gew.-% Ginkgolide und höchstens 4 Gew.-% Bilobalid enthält, wobei der Gehalt an unerwünschten Alkylphenolverbindungen weniger als 10 ppm beträgt. Dieses Substanzprofil genügt den Anforderungen der Monographie „Ginkgo biloba Trockenextrakt“ der Kommission E des ehemaligen Bundesgesundheitsamtes der Bundesrepublik Deutschland.

In der internationalen Patentanmeldung WO 2004/014405 wird ein Ginkgoextrakt erwähnt, der 5,5-8 % Ginkgolide A, B, C und J, 40-60 % Flavonglycoside und 5-7 % Bilobalid enthält. Über den Gehalt an Alkylphenolverbindungen und Proanthocyanidine findet sich dort ebenso wenig eine Aussage wie zu dem Verfahren mit dem der Extrakt erhalten wird.

Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Herstellung von Extrakten aus Ginkgo biloba Blättern anzugeben, das keine Verwendung umweltbelastender oder physiologisch unakzeptabler organischer Lösungsmittel erfordert.

Es ist eine weitere Aufgabe der Erfindung, einen Ginkgo biloba Extrakt anzugeben, der keine Kontamination durch organische Lösungsmittel und/oder Schwermetalle aufweist.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung liegt darin, einen Ginkgo biloba Extrakt zur Verfügung zu stellen, der einen erhöhten Gehalt an erwünschten Inhaltsstoffen, also Flavonglycosiden, Ginkgoliden und/oder Bilobalid, bei gleichzeitig geringen toxikologisch unbedenklichen Gehalten an allergenen Inhaltsstoffen aufweist.

Diese Aufgaben werden durch die Merkmale der unabhängigen Ansprüche gelöst.

Die abhängigen Ansprüche definieren vorteilhafte Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Verfahren und Extrakte.

Im Rahmen der der Erfindung zugrundeliegenden Untersuchungen wurde überraschend gefunden, dass sich Ginkgoextrakte mit monographiertem Substanzprofil mit einem Verfahren herstellen lassen, bei dem ausschließlich Wasser als Lösungsmittel dient. Dieses Verfahren umfasst im Wesentlichen folgende Schritte:

1. Behandlung von Ginkgoblättern, vorzugsweise Blättern aus biologischem Anbau, mit einer alkalischen wässrigen Lösung, vorzugsweise mit gesättigtem Kalkwasser. Durch diesen Behandlungsschritt, bei dem Ginkgoblätter in die alkalische wässrige Lösung eingetaucht werden, werden zunächst oberflächige Verunreinigungen der Blätter entfernt und deren Wachsschicht zerstört. Dabei

werden die Blätter rehydriert, das heißt, die Zellen der Blätter nehmen Wasser auf und quellen. Vorzugsweise werden die Blätter über einen Zeitraum von ca. 4 Stunden in Wasser mit einem pH-Wert von ca. 8,5 eingetaucht. Nachfolgend wird das zur Behandlung verwendete Wasser verworfen und die zurückbleibenden Blätter mit Wasser gespült.

2. Die Blätter aus Schritt 1 werden mit Wasser, das normale Leitungswasser sein kann, bevorzugt aber entmineralisiertes bzw. destilliertes Wasser ist, extrahiert. Die eingesetzte Wassermenge beträgt ca. das 5-20-fache, bevorzugt das 5-15-fache und meist bevorzugt das 8-10-fache des Trockengewichts der Blätter. Die Extraktion kann bei Raumtemperatur oder leicht erhöhten Temperaturen zwischen 40 und 70 °C erfolgen, wobei niedrigere Temperaturen bevorzugt sind, um eine Hydrolyse auszuschließen.

Die Extraktion kann mittels üblicher Verfahren erfolgen, wie z. B. durch einfaches Eintauchen, Diakolation, Ultraschallextraktion oder unter mechanischem Rühren. Die Extraktion erfolgt, in Abhängigkeit von den gewählten Extraktionsverfahren, über einen Zeitraum von 0,5-5 Stunden.

3. Der erhaltene Extrakt wird dann zur Entfernung größerer Partikel unter Anwendung üblicher Techniken und Materialien filtriert. Verwendet werden können Filterpapier oder -gewebe, Diatomit oder dergleichen. Die Filtration kann unter Normaldruck, erhöhtem Druck oder Unterdruck erfolgen.

Der filtrierte Extrakt wird dann einer Ultrafiltration über mehrere übliche Ultrafiltrationsmembranen unterworfen. Vorzugsweise wird der Extrakt zunächst über eine Membran mit einer durchschnittlichen Porengröße von ca. 10.000 Dalton, danach über eine Membran mit einer Porengröße von ca. 6.000 Dalton

und dann über eine Membran mit einer Porengröße von ca. 2.000 Dalton gegeben. Es werden handelsübliche Filter aus Polyamid, Polypropylen oder anderen üblichen Materialien verwendet.

Durch die Ultrafiltration werden durch die gröberen Membranen zunächst größere Moleküle wie Wachsbestandteile, Proteine, Tannine oder Polysaccharide und durch die feineren Membranen kleiner Moleküle wie Proteine, Stärken oder Oligosaccharide abgetrennt.

4. Der nach Ultrafiltration erhaltene Extrakt wird dann einer Umkehrosmose unterworfen, wobei übliche semipermeable Membranen und Umkehrosmose-Vorrichtungen verwendet werden. Beispielsweise kann die Umkehrosmose unter Verwendung einer Celluloseacetat-Membran bei einem Druck von z. B. 4,5 MPa erfolgen, wobei der Druck den jeweiligen Erfordernissen angepasst werden kann. Durch die Umkehrosmose werden Schwermetallionen und kleinere Zuckermoleküle abgetrennt.

5. Der nach der Ultrafiltration erhaltene Extrakt wird dann über eine chromatographische Absorptionssäule gegeben. Die Säule ist mit einem Absorptionsmedium gefüllt, das allergene Substanzen, wie z. B. Ginkgolsäure, absorbieren kann und nicht mit den erwünschten Inhaltsstoffen des Extraktes reagiert. Als immobile Phase können insbesondere großporige Absorptionsharze oder Aktivkohle verwendet werden. Als geeignetes Absorptionsmaterial hat sich im Rahmen der der Erfindung zugrundeliegenden Untersuchungen auch aus Ginkgonussschalen hergestellte Kohle (Aktivkohle aus verkohlten Ginkgonussschalen) erwiesen. Besonders bevorzugte Harze sind die unter den Handelsbezeichnungen GARA 1 und GARA 2 von der Firma Woxun Bioengineering Ltd., Shanghai, China bzw. Mitsubishi SP700 erhältlichen Harze.

Mittels des vorstehend beschriebenen Verfahrens erhaltene Extrakte können durch übliche Verfahren getrocknet werden, z. B. durch Destillation unter ggf. vermindertem Druck oder durch Gefriertrocknung. Die so erhaltenen Extrakte weisen Substanzprofile auf, die Anforderungen der Monographie „Ginkgo biloba Trockenextrakt" der Kommission E des ehemaligen Bundesgesundheitsamtes der Bundesrepublik Deutschland entsprechen. Sie enthalten typischerweise 24-27 Gew.-% Flavonglycoside, 3,5-4 Gew.-% Ginkgolide und 2,4-2,6 Gew.-% Bilobalid, weniger als 10 ppm, sogar weniger als 2 ppm Alkylphenolverbindungen und weniger als 10 Gew.-% Proanthocyanidine. Die Extrakte haben Gehalte an Schwermetallen von weniger als 0,12 mg/kg Blei, weniger als 0,1 mg/kg Cadmium und weniger als 0,08 mg/kg Quecksilber. Die Wasserlöslichkeit der mittels des vorgeschriebenen Verfahrens erhaltenen Trockenextrakte beträgt mehr als 1,2 g/100 ml Wasser.

Erfindungsgemäß wurde gefunden, dass sich der Gehalt an Flavonglycosiden, Ginkgoliden und Bilobaliden in den Extrakten noch deutlich erhöhen lässt, indem ein weiterer Verfahrensschritt vorgenommen wird.

Der nach obigem Schritt 5 erhaltene wässrige Extrakt kann zusätzlich über eine chromatographische Säule geleitet werden, die als stationäre Phase ein Absorptionsharz, vorzugsweise auf Basis von quervernetztem Polystyrol, bevorzugt die unter den Kennzeichnungen Diaion® und Sepabeads® von Mitsubishi, besonders bevorzugt Mitsubishi Diaion HP20, vertriebenen Harze, enthält. Durch Waschen des beladenen Harzes mit Wasser, nachfolgendes Spülen mit einer alkoholisch-wässrigen Lösung und abschließendes Eluieren des die gewünschten Inhaltsstoffe enthaltenden Extraktes können Extrakte mit variablen Substanzprofilen erhalten werden. Das Spülen mit alkoholisch-wässriger Lösung kann mehrfach mit steigender Konzentration an Alkohol durchgeführt werden, wobei die Alkohol-Konzentration vorzugsweise zwischen 10 und 25 % liegt.

Beispielsweise kann in einem ersten Schritt mit 10 %igem Alkohol und in einem zweiten Schritt mit 20 %igem Alkohol gewaschen werden, um weitere unerwünschte Inhaltsstoffe abzutrennen. Die zum Spülen eingesetzte alkoholisch wässrige Lösung enthält bis zu 25 %, vorzugsweise 10-20 % eines niedermolekularen Alkohols wie Isopropanol, Methanol oder Ethanol, wobei Ethanol besonders bevorzugt ist. Die nach dem Spülen erhaltenen Lösungen werden verworfen; zur nachfolgenden Elution des Extraktes wird eine wässrig-alkoholische Lösung verwendet, die mindestens 75 % eines wie zuvor beschriebenen Alkohols, bevorzugt Ethanol, enthält. In Abhängigkeit der gewählten Bedingungen können Extrakte mit folgenden Substanzprofilen gewonnen werden:

Flavonglycoside	8,0-52 Gew.-%
Ginkgolide A, B, C, J	2,8-41 Gew.-%
Bilobalide	2,6-39 Gew.-%
Proanthocyanidine	1-20 Gew.-%
Alkylphenole	weniger als 2,0 ppm
Tannine	weniger als 5 Gew.-%

Sämtliche Gewichtsangaben beziehen sich auf das Gewicht des erhaltenen Trockenextraktes.

Unter Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es somit möglich , Ginkgo biloba Extrakte mit gegenüber vorbekannten Extrakten deutlich höheren Gehalten an erwünschten Inhaltsstoffen (Flavonglycosiden, Ginkgoliden und Bilobaliden) zu erhalten, wobei die Gehalte an unerwünschten, allergenen Substanzen nicht signifikant erhöht werden und den Vorschriften der Monographie entsprechen.

Die nachfolgenden Beispiele veranschaulichen die Erfindung weiter.

Beispiel 1

50 kg getrocknete Ginkgoblätter wurden in gesättigtes Kalkwasser mit einem pH-Wert von 9,5 bei Umgebungstemperatur eingetaucht, bis die Blätter mit Wasser gesättigt waren. Das Kalkwasser wurde abgegossen und verworfen. Die zurückbleibenden Blätter wurden dann mit reinem Wasser gewaschen und zerstoßen. Danach wurden sie mit 450 kg deionisiertem Wasser versetzt und unter Ultraschall 1,5 Stunden extrahiert. Die Wassertemperatur stieg während der Ultraschallbehandlung an und wurde bei 45 bis höchstens 48 °C gehalten.

Nachdem die Extraktion abgeschlossen war, wurden grobteilige Rückstände durch Filtration abgetrennt. Der erhaltene Extrakt wurde dann über eine Polypropylen-Ultrafiltrationsmembran mit einer Porengröße von 10.000 Dalton, nachfolgend über eine Ultrafiltrationsmembran mit einer Porengröße von 6.000 Dalton und abschließend über eine Ultrafiltrationsmembran mit einer Porengröße von 2.000 Dalton gegeben. Das schließlich erhaltene Filtrat wurde dann einer Umkehrosmose unter Verwendung einer Celluloseacetat-Membran unterworfen. Die Salzpermeationsrate betrug mindestens 95 Gew.-%, die Wasserpermeationsrate 90-120 l/m^2 h bei 4,5 MPa.

Das so erhaltene Filtrat wurde dann über eine chromatographische Säule mit einem Durchmesser von 30 cm und einer Höhe von 1,2 m gegeben, die mit verkohlten Ginkgonussschalen befüllt war. Die chromatographische Trennung erfolgte bei Umgebungsdruck- und temperatur.

Der Eluent wurde unter Verwendung einer wie oben beschriebenen Umkehrosmosemembran auf eine Masse von weniger als 8 kg konzentriert und abschließend sprühgetrocknet, um 1,4 kg Extrakt zu erhalten.

Der erhaltene Extrakt wurde mittels HPLC analysiert. Der Gesamtflavongehalt betrug 26,7 Gew.-%, der Gehalt an Ginkgoliden A, B und C 3,54 Gew.-%, der Gehalt an Bilobalid betrug 2,58 Gew.-%, der Gehalt an Ginkgolsäuren 1 (a und b) betrug 0,39 bzw. 3,37 ppm, der Gehalt an Ginkgolsäure 2 betrug weniger als 0,3 ppm und der Gehalt an Schwermetallen betrug weniger als 0,12 mg/kg Blei, weniger als 0,1 mg/kg Cadmium und weniger als 0,08 mg/kg Quecksilber. (Die Gewichtsprozent-Angaben beziehen sich wiederum auf die Masse des erhaltenen Trockenextrakts).

Beispiel 2

1 kg getrocknete Ginkgoblätter wurden in 8 kg mit CaO gesättigtes Wasser (ca. 120 g CaO pro Liter Wasser) gegeben und für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurde das Wasser abgegossen und die feuchten Blättern mit deionisiertem Wasser gewaschen. Dann wurde pro 100 g Blätter ein Liter Wasser zugesetzt und der Ansatz über ca. 45 Minuten im Ultraschallbad behandelt (ca. 20-24 kHz). Dann wurde der erhaltene wässrige Extrakt abgetrennt und aufbewahrt. Nach Zusatz eines weiteren Liters Wasser zu 100 g Blätter wurde die Ultraschallbehandlung wiederholt und der erhaltene wässrige Extrakt mit dem zunächst erhaltenen Extrakt vereint.

Die vereinten Extrakte wurden dann bei 15.000 U/min zentrifugiert und die Feststoffe und Ölanteile von dem Extrakt abgetrennt.

Der erhaltene Extrakt wurde dann unter Verwendung eines Millipore Labscale TTF Pellicon XL Ultrafiltrationssystems filtriert, wobei Ultrafiltrationsmembranen mit Porengrößen von 10.000 Dalton, 8.000 Dalton und 5.000 Dalton verwendet wurden. Nachfolgend erfolgte eine Filtration unter Verwendung von Membranen mit einer Porengröße von 3.000 Dalton und 1.000 Dalton. Das so erhaltene Filtrat wurde dann einer

Umkehrosmose unter Verwendung einer Celluloseacetat-Membran unterworfen. Die Salzpermeationsrate betrug mindestens 95 Gew.-%, die Wasserpermeationsrate 90-120 $l/m^2 h$ bei 4,5 MPa.

Zur Entfernung von Ginkgolsäuren wurde der so erhaltene Extrakt über eine mit dem Harz Gara 1 gepackte Säule gegeben. Pro 100 ml Extrakt werden 5 g des Harzes verwendet. Die chromatographische Trennung erfolgte bei Umgebungsdruck.

Zur Entfernung von Proanthocyanidinen wurde die nach dem vorhergehenden Schritt erhaltene Flüssigkeit über eine Säule gegeben, die mit dem Harz Diaion HP2MGL gepackt war. Pro 100 ml Flüssigkeit wurden 5 g des Harzes eingesetzt. Die Chromatographie erfolgte bei Umgebungstemperatur und Umgebungsdruck.

Die so erhaltene Flüssigkeit wurde dann auf eine mit dem Harz Mitsubishi Diaion HP20 gepackte Säule gegeben; pro 100 ml Flüssigkeit wurden 2 g des Harzes verwendet. Sobald irgendwelche teefarbenen Anteile die Säule verlassen, wird der Vorgang gestoppt. Danach wird die Säule mit reinem Wasser und nachfolgend mit 10 %iger wässriger ethanolischer Lösung gewaschen. Die Waschlösungen werden verworfen. Danach wurde die Säule mit einer 75 %igen ethanolisch-wässrigen Lösung eluiert und die erhaltene Flüssigkeit aufgefangen. Die erhaltene Flüssigkeit wurde bei niedriger Temperatur getrocknet, um den gewünschten Extrakt zu erhalten.

Unter Variation der Konzentration der zum Waschen der Säule verwendeten ethanolisch-wässrigen Lösung wurden Extrakte mit folgenden Substanzprofilen erhalten:

a) Zusammensetzung des Extraktes:

Flavonglycoside	39 Gew.-%
Ginkgolide A, B, C und J	2,9 Gew.-%
Bilobalide	2,78 Gew.-%
Proanthocyanidine	10,5 Gew.-%
Alkylphenole	< 0,7 ppm
Tannine	< 5 Gew.-%

b) Zusammensetzung des Extraktes:

Flavonglycoside	35 Gew.-%
Ginkgolide A, B, C und J	6,67 Gew.-%
Bilobalide	6,49 Gew.-%
Proanthocyanidine	14 Gew.-%
Alkylphenole	< 0,70 ppm
Tannine	< 5 Gew.-%

c) Zusammensetzung des Extraktes:

Flavonglycoside	31 Gew.-%
Ginkgolide A, B, C und J	10 Gew.-%
Bilobalide	9 Gew.-%
Proanthocyanidine	11 Gew.-%
Alkylphenole	< 0,70 ppm
Tannine	< 5 Gew.-%

d) Zusammensetzung des Extraktes:

Flavonglycoside	18 Gew.-%
Ginkgolide A, B, C und J	21,23 Gew.-%
Bilobalide	20,17 Gew.-%
Proanthocyanidine	14 Gew.-%
Alkylphenole	< 0,70 ppm
Tannine	< 5 Gew.-%

e) Zusammensetzung des Extraktes:

Flavonglycoside	49 Gew.-%
Ginkgolide A, B, C und J	3 Gew.-%
Bilobalide	2,7 Gew.-%
Proanthocyanidine	< 2 Gew.-%
Alkylphenole	< 3 ppm
Tannine	< 1 Gew.-%

f) Zusammensetzung des Extraktes:

Flavonglycoside	51,5 Gew.-%
Ginkgolide A, B, C und J	2,8 Gew.-%
Bilobalide	2,6 Gew.-%
Proanthocyanidine	< 2 Gew.-%
Alkylphenole	< 3 ppm
Tannine	< 1 Gew.-%

(Alle Gew.-%-Angaben beziehen sich auf die Masse des Trockenextraktes)

Die Beispiele zeigen, dass mit dem erfindungsgemäßen Verfahren Trockenextrakte aus Ginkgo biloba Blättern erhalten werden, die deutlich gesteigerte Gehalte an erwünschten Inhaltsstoffen bei gleichzeitig hinreichend niedrigen Gehalten an unerwünschten, allergenen Inhaltsstoffen aufweisen.

Die erfindungsgemäßen Extrakte erlauben somit die Herstellung von pharmazeutischen und kosmetischen Zusammensetzungen mit erhöhten Wirkstoffgehalten. Sie können problemlos zu an sich üblichen pharmazeutischen Zusammensetzungen verarbeitet werden, vorzugsweise zu Tabletten, Injektionslösungen und Lösungen für die orale Verabreichung.

Beispiel 3

Unter Verwendung der Extrakte aus Beispiel 1 und 2 wurden Lösungen zur oralen Verabreichung folgender Zusammensetzung hergestellt:

Ginkgo biloba Extrakt	3,0 g
Ethanol	50,0 g
Wasser für Injektionszwecke	ad 100 ml

Beispiel 4

Unter Verwendung der Extrakte aus Beispiel 1 und 2 wurden Tabletten folgender Zusammensetzung hergestellt:

Ginkgo biloba Extrakt	30,00 mg
Mikrokristalline Cellulose	100,00 mg
Lactose	60,00 mg

Kolloidales Siliciumoxid	20,00 mg
Magnesiumstearat	3,00 mg
HPMC	10,00 mg
Talkum	0,5 mg

5

ANSPRÜCHE

1. Extrakt aus den Blättern von Ginkgo biloba, der mehr als 8 Gew.-% Ginkgolide A, B, C und J (insgesamt) und/oder mehr als 7 Gew.-% Bilobalid enthält.

2. Extrakt nach Anspruch 1, der weniger als 10 ppm Alkylphenolverbindungen und weniger als 20 Gew.-% Proanthocyanidine enthält.

3. Extrakt nach Anspruch 1 oder 2, der

- mehr als 30 Gew.-% bis zu 60 Gew.-% Flavonglycoside,
- mehr als 8 Gew.-% bis zu 40 Gew.-% Ginkgolide A, B, C und J (insgesamt),
- mehr als 7,0 bis zu 35 Gew.-% Bilobalid,
- weniger als 10 ppm Alkylphenolverbindungen und
- weniger als 20 Gew.-% Proanthocyanidine enthält.

4. Verfahren zur Herstellung eines Extraktes aus Ginkgo biloba Blättern, umfassend folgende Schritte:

- Behandeln von Ginkgo biloba Blättern mit Wasser mit einem pH-Wert von mehr als ca. 8,5 bis die Blätter mit Wasser gesättigt sind;
- Extraktion der erhaltenen Blätter mit Wasser;
- Filtration des erhaltenen Extraktes;
- chromatographische Reinigung des erhaltenen Extraktes mit einem großporigen Absorptionsharz oder Aktivkohle, und

- chromatographische Reinigung des im vorigen Schritt erhaltenen Extraktes mit einem Absorptionsharz.

5. Verfahren nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet, dass die Extraktion mit gesättigtem Kalkwasser durchgeführt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5,
dadurch gekennzeichnet, dass der Filtrationsschritt eine Ultrafiltration umfasst.

7. Verfahren nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet, dass die Ultrafiltration mit Membranen mit Porengrößen von 10.000 Dalton, 6.000 Dalton und 2.000 Dalton durchgeführt wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 4-7,
dadurch gekennzeichnet, dass die abschließende chromatographische Reinigung das Spülen mit einer bis zu 25%igen alkoholisch-wässrigen Lösung und das Eluieren des Extraktes mit einer mindestens 75%igen alkoholisch-wässrigen Lösung umfasst.

9. Verfahren nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet, dass als Alkohol Ethanol verwendet wird.

10. Arzneimittel umfassend einen Gehalt an Ginkgo biloba Extrakt gemäß einem der Ansprüche 1-8.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/004631

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K35/78

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Data, SCISEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LICHTBLAU D ET AL: "Efficient extraction of ginkgolides and bilobalide from Ginkgo biloba leaves" JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS 01 OCT 2002 UNITED STATES, vol. 65, no. 10, 1 October 2002 (2002-10-01), pages 1501-1504, XP009053834 ISSN: 0163-3864 im besonderen the whole document figure 3	1-3
X	EP 1 163 908 A (LINNEA S.A) 19 December 2001 (2001-12-19) paragraph '0014!	1-3

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 September 2005	07/10/2005

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Hornich, E

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 199751 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class E13, AN 1997-550558 XP002345310 & CN 1 129 218 A (GENG P) 21 August 1996 (1996-08-21) abstract	1-10
A	EP 0 436 129 A (MONTANA LIMITED; WALLINGSTOWN COMPANY LIMITED) 10 July 1991 (1991-07-10) page 3, line 35 - line 45	1-3
P,X	DATABASE WPI Section Ch, Week 200448 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B02, AN 2004-507689 XP002345311 & WO 2004/056792 A1 (PRO-HERB GMBH) 8 July 2004 (2004-07-08) abstract	1-10

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP2005/004631

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1163908 A	19-12-2001	AT 265858 T	15-05-2004
		AU 4376801 A	20-12-2001
		DE 60010450 D1	09-06-2004
		DE 60010450 T2	12-05-2005
		DK 1163908 T3	12-07-2004
		ES 2219259 T3	01-12-2004
		JP 2002047191 A	12-02-2002
		US 2002012713 A1	31-01-2002
CN 1129218 A	21-08-1996	NONE	
EP 0436129 A	10-07-1991	AT 120961 T	15-04-1995
		CA 2031384 A1	05-06-1991
		DE 3940094 A1	06-06-1991
		ES 2070981 T3	16-06-1995
		JP 2503107 B2	05-06-1996
		JP 3264533 A	25-11-1991
		KR 175067 B1	01-02-1999
WO 2004056792 A1	08-07-2004	AU 2002349731 A1	14-07-2004

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen
PCT/EP2005/004631

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K35/78

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Data, SCISEARCH

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LICHTBLAU D ET AL: "Efficient extraction of ginkgolides and bilobalide from Ginkgo biloba leaves" JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS 01 OCT 2002 UNITED STATES, Bd. 65, Nr. 10, 1. Oktober 2002 (2002-10-01), Seiten 1501-1504, XP009053834 ISSN: 0163-3864 im besonderen das ganze Dokument Abbildung 3	1-3
X	EP 1 163 908 A (LINNEA S.A) 19. Dezember 2001 (2001-12-19) Absatz '0014!	1-3

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
16. September 2005	07/10/2005

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

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Januar 2004)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 199751 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class E13, AN 1997-550558 XP002345310 & CN 1 129 218 A (GENG P) 21. August 1996 (1996-08-21) Zusammenfassung	1-10
A	EP 0 436 129 A (MONTANA LIMITED; WALLINGSTOWN COMPANY LIMITED) 10. Juli 1991 (1991-07-10) Seite 3, Zeile 35 - Zeile 45	1-3
P,X	DATABASE WPI Section Ch, Week 200448 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B02, AN 2004-507689 XP002345311 & WO 2004/056792 A1 (PRO-HERB GMBH) 8. Juli 2004 (2004-07-08) Zusammenfassung	1-10

1

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/004631

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 1163908	A	19-12-2001	AT	265858 T	15-05-2004
			AU	4376801 A	20-12-2001
			DE	60010450 D1	09-06-2004
			DE	60010450 T2	12-05-2005
			DK	1163908 T3	12-07-2004
			ES	2219259 T3	01-12-2004
			JP	2002047191 A	12-02-2002
			US	2002012713 A1	31-01-2002
CN 1129218	A	21-08-1996	KEINE		
EP 0436129	A	10-07-1991	AT	120961 T	15-04-1995
			CA	2031384 A1	05-06-1991
			DE	3940094 A1	06-06-1991
			ES	2070981 T3	16-06-1995
			JP	2503107 B2	05-06-1996
			JP	3264533 A	25-11-1991
			KR	175067 B1	01-02-1999
WO 2004056792	A1	08-07-2004	AU	2002349731 A1	14-07-2004