



CONFÉDÉRATION SUISSE

OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑪

**Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein**

Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

⑪ CH 647 787 A5

 ⑤① Int. Cl.<sup>4</sup>: C 07 H 15/256  
 A 61 K 35/78  
 A 61 K 31/70

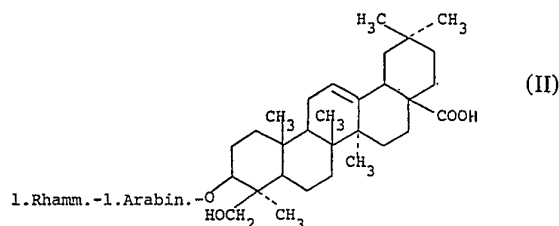
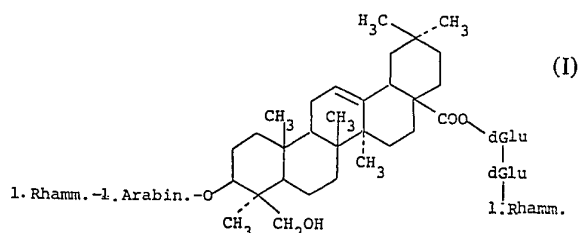
// A 61 K 45/06

## ⑫ FASCICULE DU BREVET A5

②① Numéro de la demande: 5153/80	⑦③ Titulaire(s): Synthélabo, Paris 7e (FR)
②② Date de dépôt: 04.07.1980	
③⑩ Priorité(s): 05.07.1979 FR 79 17451	⑦② Inventeur(s): Bernard, Pierre, Marseille (FR) Balansard, Guy, Marseille (FR)
②④ Brevet délivré le: 15.02.1985	
④⑤ Fascicule du brevet publié le: 15.02.1985	⑦④ Mandataire: A. Braun, Braun, Héritier, Eschmann AG, Patentanwälte, Basel

## ⑤④ Procédé d'obtention d'extraits de lierre grimpant, extraits obtenus et compositions pharmaceutiques.

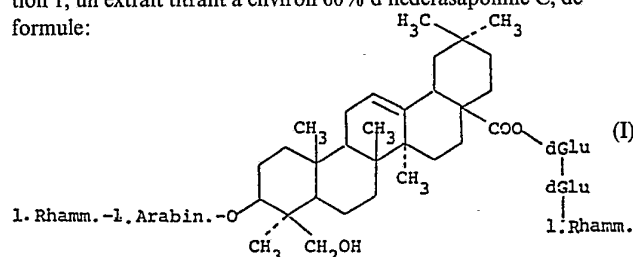
⑤⑦ Le principe actif consiste en un extrait de lierre grimpant à 60 % ou 90 % d'hédérasaponine C de formule I ou en l' $\alpha$ -hédérine de formule II, produit de saponification de l'hédérasaponine C. On obtient le principe actif sous forme de l'extrait à 60 % par lixiviation de la poudre de lierre au moyen d'acétone ou d'un solvant de même constante diélectrique, lixiviation au moyen de méthanol, traitement au charbon actif, précipitation de l'extrait méthanolique par l'éther éthylique et extraction du produit précipité au moyen de méthanol. En traitant cet extrait sur une colonne d'alumine par du méthanol, on obtient l'extrait à 90 %, et de là, par saponification, on parvient à l' $\alpha$ -hédérine. Les compositions pharmaceutiques respectives ont un effet antifongique et antiparasitaire; elles peuvent être utilisées en médecine humaine et vétérinaire.



## REVENDICATIONS

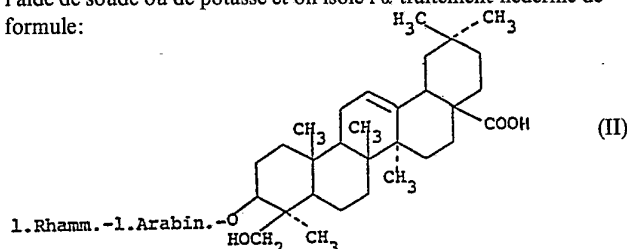
1. Procédé d'obtention d'extraits de lierre grimpant, actifs en tant qu'agents antiparasitaires et antifongiques et consistant en un mélange complexe de saponines titrant à environ 60% d'hédérasaponine C, caractérisé en ce que l'on effectue une lixiviation de la poudre de lierre à l'aide d'acétone ou d'un solvant présentant une constante diélectrique identique à celle de l'acétone, on sèche la poudre épuisée par le solvant, on effectue une seconde lixiviation avec du méthanol pur, on concentre la solution que l'on traite avec du charbon activé neutre, puis on filtre, on concentre le filtrat sous pression réduite, on ajoute au filtrat de l'éther éthylique ou un mélange de solvants de polarité identique à celle de l'éther pour précipiter l'extrait de saponines, on reprend ce dernier par du méthanol pur, on le filtre et sèche, obtenant ainsi l'extrait désiré.

2. Procédé d'obtention d'extraits de lierre grimpant, actifs en tant qu'agents antiparasitaires et antifongiques et consistant en un mélange complexe de saponines titrant à 90% d'hédérasaponine C, caractérisé en ce que l'on prépare, par le procédé selon la revendication 1, un extrait titrant à environ 60% d'hédérasaponine C, de formule:



et on traite cet extrait sur une colonne d'alumine en éluant avec du méthanol pur.

3. Procédé d'obtention d' $\alpha$ -hédérine ou de ses sels alcalins, actifs en tant qu'agents antiparasitaires et antifongiques, à partir de lierre grimpant, caractérisé en ce que l'on prépare, par le procédé selon la revendication 2, un extrait consistant en un mélange complexe de saponines titrant à 90% d'hédérasaponine C, on saponifie cet extrait à l'aide de soude ou de potasse et on isole l' $\alpha$ -traitement-hédérine de formule:



4. Extrait de lierre grimpant actif en tant qu'agent antiparasitaire et antifongique et consistant en un mélange complexe de saponines titrant à environ 60% d'hédérasaponine C, obtenu par le procédé selon la revendication 1.

5. Extrait de lierre grimpant actif en tant qu'agent antiparasitaire et antifongique et consistant en un mélange complexe de saponines titrant à 90% d'hédérasaponine C, obtenu par le procédé selon la revendication 2.

6.  $\alpha$ -Hédérine et ses sels alcalins, actifs en tant qu'agent antiparasitaire et antifongique, obtenus par le procédé selon la revendication 3.

7. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient à titre de principe actif un extrait de lierre grimpant selon la revendication 4.

8. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient à titre de principe actif un extrait de lierre grimpant selon la revendication 5.

9. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient à titre de principe actif de l' $\alpha$ -hédérine ou l'un de ses sels alcalins selon la revendication 6.

10. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 7, 8 ou 9, caractérisée en ce qu'elle est présentée en vue de l'adminis-

tration orale sous forme de gélules, en vue de l'administration parentérale sous forme de solutions injectables éventuellement lyophilisées, en vue de l'administration topique sous forme de pommades, de collyres ou de solutés.

On a déjà préparé des extraits de lierre (*Hedera*) et plus particulièrement de lierre grimpant (*Hedera helix*) par extraction à l'aide d'eau et/ou d'alcool.

La présente invention concerne l'obtention, à partir de lierre grimpant, d'un extrait consistant en un mélange complexe de saponines titrant à environ 60% d'hédérasaponine C, puis l'obtention d'un extrait consistant en saponines purifiées titrant à 90% en hédérasaponine C, et enfin l'obtention d' $\alpha$ -hédérine.

Le procédé selon l'invention consiste à préparer, dans un premier temps, un extrait de saponines titrant à environ 60%. A cet effet, on effectue d'abord une lixiviation de la poudre de lierre à l'aide d'acétone ou d'un solvant présentant une constante diélectrique identique à celle de l'acétone, par exemple un mélange acétate d'éthyle/alcool tel que méthanol ou éthanol. La poudre épuisée par le solvant est ensuite séchée. On effectue alors une seconde lixiviation avec du méthanol pur.

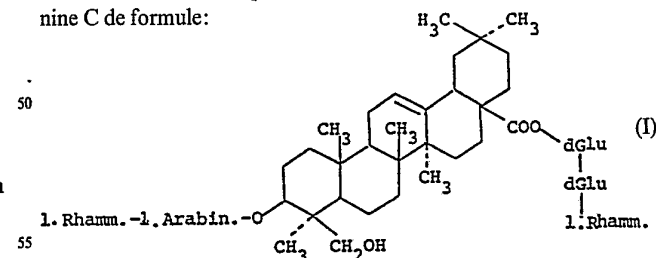
On concentre la solution que l'on traite avec du charbon activé neutre, puis on filtre. On concentre le filtrat sous pression réduite. On ajoute alors au filtrat de l'éther éthylique ou un mélange de solvants ayant une polarité identique à celle de l'éther, par exemple un mélange chloroforme/acétate d'éthyle, afin de précipiter l'extrait de saponines. Cet extrait est repris par du méthanol pur, filtré et séché, de préférence sous pression réduite ou par atomisation.

Le produit ainsi obtenu est un mélange complexe de saponines contenant environ 60% d'hédérasaponine C. Ce complexe de couleur jaune est très soluble dans l'eau et le méthanol et peu soluble dans l'éthanol.

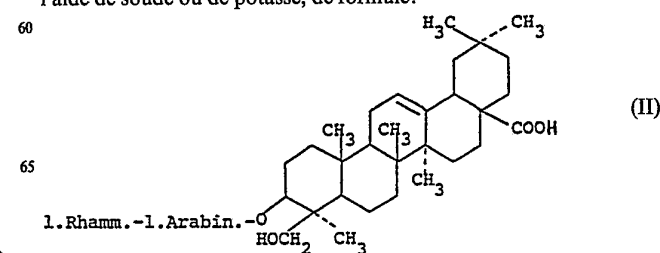
En chromatographie sur couche mince sur gel de silice, avec pour solvant un mélange benzène 65/méthanol 35/acide acétique 10 et comme révélateur une solution à 1% de vanilline dans de l'acide sulfurique, on met en évidence différentes taches colorées, dont en particulier celle de l'hédérasaponine C colorée en brun-noir.

Selon le procédé de l'invention, dans un second temps, on prépare un extrait titré à 90% en hédérasaponine C. A cet effet, on traite le précédent extrait à 60% d'hédérasaponine C sur une colonne d'alumine en éluant avec du méthanol pur.

On recueille l'éluat qui contient au minimum 90% d'hédérasaponine C de formule:



Selon le procédé de l'invention, on prépare enfin l' $\alpha$ -hédérine ou ses sels alcalins à partir de l'extrait précédent par saponification à l'aide de soude ou de potasse, de formule:



Les trois substances, obtenues à chaque stade du procédé de l'invention, ont été étudiées quant à leur activité antifongique et antiparasitaire *in vitro* et *in vivo*.

L'exemple suivant illustre le procédé de l'invention.

#### Exemple:

1. On traite 25 kg de poudre de lierre grimpant avec 120 l d'acétone. On concentre et sèche. On obtient une masse visqueuse vert foncé pesant environ 1000 g. On sèche.

On ajoute 110 l de méthanol pur. On concentre sous pression réduite jusqu'à 25 l. On agite avec 100 à 200 g de charbon activé neutre. On filtre. On concentre le filtrat sous pression réduite à 10 l environ. On ajoute aux 10 l de filtrat 20 l d'éther éthylique. On obtient un précipité P<sub>1</sub>. On ajoute au filtrat, concentré à 6 l, 20 l d'éther éthylique. Il se forme un précipité P<sub>2</sub> que l'on réunit avec le précipité P<sub>1</sub>. On reprend les précipités par 10 l de méthanol pur, on filtre et on sèche sous pression réduite. On obtient 1,5 à 2 kg d'extrait contenant 60% d'hédérasaponine C.

2. La séparation sur colonne d'alumine afin d'obtenir l'extrait contenant 90% d'hédérasaponine C est effectuée de la manière suivante:

On disperse 1 kg d'alumine neutre W<sub>200</sub> dans du méthanol pur. On la place alors dans la colonne. On élue avec du méthanol pur jusqu'à ce que l'éluat soit parfaitement limpide. On introduit alors 300 g de l'extrait précédent dilués dans 2 l de méthanol pur. On élue avec du méthanol pur. On recueille 4 l d'éluat que l'on évapore sous pression réduite. On obtient 190 g d'extrait contenant au minimum 90% d'hédérasaponine C.

3. On traite l'extrait à 90% d'hédérasaponine C, en milieu aqueux, par NaOH ou KOH 2N, à chaud pendant 1 h. On acidifie et lave le précipité. On le reprend par du méthanol pur. On filtre et sèche. On obtient l' $\alpha$ -hédérine.

Les extraits de lierre grimpant obtenus selon le procédé de l'invention, l'extrait titré à 60% en hédérasaponine C, l'extrait titré à 90% en hédérasaponine C et l' $\alpha$ -hédérine, se sont révélés être actifs en tant qu'antiparasitaires et antifongiques.

La toxicité des extraits a été déterminée chez la souris par voie intrapéritonéale.

La DL<sub>50</sub> (24 h) varie de 2000 à 3200 mg. La DL<sub>50</sub> (8 d) varie de 1500 à 2500 mg.

#### Activité antiparasitaire

L'activité anthelminthique et l'activité protozoocide des extraits de l'invention ont été étudiées.

1. L'activité anthelminthique vis-à-vis des cestodes, des nématodes et des trématodes a été déterminée *in vitro* et *in vivo*.

1.1 L'activité à l'égard des cestodes a été étudiée sur le ténia de la souris:

#### Essai *in vitro*:

Les *Hymenolepis nana* var. *fraterna* sont récupérés par dissection de l'intestin grêle des souris parasitées, et sont placés dans un milieu de Sen et Hawking à l'étuve à 37°.

L'essai consiste à mettre en contact les différentes dilutions des produits à essayer avec les vers maintenus en survie et à déterminer la dose létale après 24 h.

On opère par rapport à:

- 1 lot de vers non traités qui doivent survivre plusieurs jours,
- 1 lot de vers traités par des produits de référence, hélénine et santoline.

#### Essai *in vivo*:

Il consiste à faire ingérer à la souris parasitée des doses variables de produits à tester et de contrôler dans les fèces l'émission des œufs d'*Hymenolepis*.

On évalue la guérison en effectuant une numération des œufs par gramme de selle. Cette numération doit être négative en fin de traitement.

Pour avoir la certitude que le déparasitage est total, on réalise après autopsie une dissection de l'intestin de la souris afin de s'assurer qu'il n'y a plus de vers ou encore qu'ils sont tous morts.

Les substances de référence utilisées dans le test *in vivo* sont la mépacrine et l'hélénine.

Les résultats des essais *in vitro* sont exprimés en doses létales DL<sub>100</sub> après 24 h, c'est-à-dire en quantités de produits suffisantes pour tuer 100% des cestodes au bout de 24 h.

Les résultats des essais *in vivo* indiquent le pourcentage de déparasitage obtenu pour les quantités indiquées.

In vitro	Substance	DL <sub>100</sub> (24 h) (µg/ml)
15	Hélénine (substance de référence)	50
	Santonine (substance de référence)	100
	$\alpha$ -Hédérine	100
	Extrait à 90%	1
	Extrait à 60%	5

In vivo	Substance	Dose (mg/kg)	% de déparasitage
25	Mépacrine	220	100
	Hélénine	300	60
	$\alpha$ -Hédérine	400	20
	Extrait à 90%	400	30
	Extrait à 60%	400	60

1.2 L'activité nématocide a été étudiée sur *Syphacia obvelata* de la souris.

On effectue les tests *in vitro* et *in vivo* de la même manière que ceux qui ont été pratiqués pour la recherche de l'activité ténicide.

Les produits de référence sont ici la santoline et l'hélénine *in vitro* et la pipérazine et l'hélénine *in vivo*.

In vitro	Substance	DL <sub>100</sub> (24 h) (µg/ml)
45	Hélénine	10
	Santonine	100
	$\alpha$ -Hédérine	1
	Extrait à 90%	5
	Extrait à 60%	5

In vivo	Substance	Dose (mg/kg)	% de déparasitage
55	Citrate de pipérazine	200	90
	Hélénine	300	80
	$\alpha$ -Hédérine	400	10
	Extrait à 90%	400	30
	Extrait à 60%	400	70

1.3 L'activité à l'égard des trématodes a été étudiée à l'égard des douves *in vitro* et *in vivo*.

#### Essai *in vitro*:

Les douves *Fasciola hepatica* (grande douve) et *Dicrocoelium lan-  
ceolatum* (petite douve) sont récoltées aussitôt après l'abattage des

ovins et des bovins parasités, par dissection des canaux biliaires et hépatiques de ces animaux. Ces vers sont directement placés dans le milieu de survie de Benex modifié par Cavier, à l'étuve à 37°.

Les produits à tester sont mis en contact à différentes concentrations et on détermine la dose létale (DL<sub>100</sub>) après 24 h; les substances de référence sont l'hélénine et la santonine.

#### Essai in vivo sur des ovins parasités:

On contrôle au préalable, par une numération des œufs de douves dans les fèces, le taux d'infestation des moutons à traiter. Puis on fait ingérer aux animaux, à l'aide d'un pistolet doseur placé au fond de la gorge, trois doses successives des différents produits à 8 d d'intervalle. La durée du traitement est donc de 3 semaines.

Pendant tout le temps du traitement, on contrôle par numération la diminution des œufs dans les fèces jusqu'à disparition. Enfin, pour s'assurer de la guérison, on abat les moutons et on recherche la disparition des douves dans les canaux hépatiques et biliaires, ce qui est la preuve irréfutable de l'activité douvicide des produits essayés.

Les résultats sont exprimés de la même manière que dans les essais précédents:

In vitro	
a) Sur <i>Fasciola hepatica</i> Substance	DL <sub>100</sub> (24 h) (µg/ml)
Santonine	100
Hélénine	10
α-Hédérine	5
Extrait à 90%	5
Extrait à 60%	1
b) Sur <i>Dicrocoelium lanceolatum</i> Substance	DL <sub>100</sub> (24 h) (µg/ml)
Santonine	50
Hélénine	10
α-Hédérine	10
Extrait à 90%	5
Extrait à 60%	500

#### In vivo:

Trois cures de 800 mg/kg à 8 d d'intervalle ont été faites sur des moutons parasités par la petite douve (*Dicrocoelium lanceolatum*). Avec l'α-hédérine, il y a diminution des œufs dans les fèces alors que, avec les deux extraits de 60 à 90% en hédérasaponine C, il y a disparition totale des œufs.

Le contrôle après autopsie a montré qu'il y avait effectivement disparition des douves ou que les douves étaient mortes lorsque les animaux avaient été traités à l'aide des deux extraits à 60 et à 90%.

2. L'activité protozoocide a été étudiée à l'égard des protozoaires intestinaux (amibes) et à l'égard des *Trichomonas intestinalis*.

L'activité des substances est étudiée sur deux tests:

#### — Inhibition au départ des cultures

On détermine la concentration minimale inhibitrice (CMI), c'est-à-dire la plus petite quantité de produit qui, introduite dans le milieu de culture avant ensemencement, arrête complètement le développement de la culture après un délai de contact de 72 h à 37°.

#### — Action létale sur une culture de 48 h

On détermine la plus petite quantité de produit à étudier qui, introduite dans une culture de 2 d en pleine croissance, est susceptible de tuer tous les protozoaires (amibes ou *Trichomonas*) après une incubation de 48 h à 37°.

Ces deux tests sont menés en parallèle avec un produit de référence connu, le métronidazole.

Pour ces tests, on a effectué un contrôle de l'activité des produits en réalisant des rétrocultures à partir des milieux où les protozoaires ont été tués. Ces rétrocultures négatives ont confirmé l'activité des produits essayés.

Les résultats sont les suivants:

Substance	CMI (µg/ml)
Métronidazole	5
α-Hédérine	50
Extrait à 90%	> 10
Extrait à 60%	> 10

#### Activité antifongique

L'activité a été étudiée sur les levures et les dermatophytes.

1. L'activité sur les levures (*Candida albicans*) a été étudiée in vitro et in vivo.

#### In vitro:

On met en culture la levure de *Candida albicans* sur le milieu de Sabouraud liquide à double concentration d'une suspension de 10<sup>6</sup> cellules.

On met en contact une quantité déterminée de cet inoculum avec des doses décroissantes des dilutions des produits à tester. La lecture se fait après 24 h d'incubation à 37°.

Les tubes dans lesquels les produits ont agi restent limpides. On contrôle cette activité antifongique en pratiquant des rétrocultures qui, 72 h après incubation à l'étuve à 37°, doivent rester négatives.

La substance de référence est l'amphotéricine B.

#### In vivo:

L'étude est effectuée sur la souris.

Après épilation dorsale des souris et exposition aux UV pour entraîner une réaction inflammatoire, on réalise un abcès candidosique sous-cutané en inoculant 0,25 ml d'une culture diluée au 1/10 de *Candida albicans*.

2 d plus tard, on commence le traitement en répartissant les souris en différents lots qui recevront des concentrations différentes de produits à tester par ingestion forcée à l'aide d'une sonde stomacale. Ce traitement est mené en parallèle avec un produit de référence, l'amphotéricine B. Le temps de traitement est de 10 d.

La guérison se manifeste par la disparition progressive des abcès candidosiques.

Les témoins non traités conservent ces abcès pendant plus d'un mois.

Les résultats sont exprimés en concentrations minimales d'inhibition (CMI) pour le test in vitro.

Substance	CMI (µg/ml)
Amphotéricine B	2,5
α-Hédérine	500
Extrait à 90%	> 50
Extrait à 60%	> 50

Pour le test in vivo, on détermine la disparition ou non de l'abcès sous-cutané provoqué chez la souris.

— L'abcès persiste plus d'un mois chez les animaux non traités.

— L'abcès persiste chez les animaux traités par 2,5 mg/kg d'amphotéricine B, mais un nouveau traitement pendant 10 d permet la disparition de l'abcès.

— Les trois substances de l'invention, l'α-hédérine, les extraits à 90% et 60% d'hédérasaponine C, à la dose de 50 mg/kg/d pendant 10 d, entraînent la disparition des abcès dans tous les cas.

2. L'activité sur les dermatophytes a été étudiée in vitro sur le *Microporum canis*.

La mise en culture du dermatophyte est effectuée de la manière suivante:

L'inoculum est une dilution au  $\frac{1}{10}$  dans de l'eau stérile d'une culture de 7 d. Chaque tube reçoit 0,1 ml de cette dilution, 1 ml de milieu de Sabouraud double concentration et 1 ml de dilution des produits.

La lecture de l'activité antifongique sera faite au bout de 7 d. On recherche l'inhibition de croissance dans les différents tubes. Lorsque cette inhibition est constatée, on procède à une rétroculture pour contrôle et la lecture sera faite 15 d après; la négativité de cette rétroculture confirme alors l'activité antifongique du produit.

La substance de référence est l'amphotéricine B.

Les résultats sont exprimés en CMI

Substance	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )
Amphotéricine B	2,5
$\alpha$ -Hédérine	50

Les résultats des essais précédents montrent que les substances obtenues selon l'invention sont des médicaments à activité antiparasitaire et antifongique.

Les substances obtenues par le procédé de l'invention, l' $\alpha$ -hédérine, l'extrait de lierre à 90% d'hédérasaponine C et l'extrait de lierre à 60% d'hédérasaponine C, peuvent être utilisées pour le traitement des affections parasitaires et fongiques, en thérapeutique humaine et vétérinaire.

Les substances peuvent être présentées sous toute forme appropriée pour l'administration par voie locale, orale ou parentérale, en association avec tout excipient approprié, par exemple sous forme de comprimés, gélules, capsules, solutions buvables et injectables, poudres lyophilisées, crèmes, lotions, etc.

A titre d'exemple, les gélules peuvent avoir la composition suivante:

200 mg de l'extrait à 60% d'hédérasaponine C,  
20 mg de mannitol,  
35 mg de cellulose microcristalline,  
5 mg de stéarate de magnésium, pour une gélule N° 1.