

Octrooiraad



⑩ A **Terinzagelegging** ⑪ **8003871**

Nederland

⑲ NL

- ⑤4 **Farmaceutische samenstelling met als actieve component extracten van Hedera Helix en werkwijze voor het winnen van de extracten.**
- ⑤1 Int.Cl.: A61K35/78.
- ⑦1 Aanvrager: Société Anonyme dite: Synthelabo te Parijs.
- ⑦4 Gem.: Ir. F.X. Noz c.s.
Algemeen Octrooibureau
Boschdijk 155
5612 HB Eindhoven.

- ②1 Aanvraag Nr. 8003871.
- ②2 Ingediend 4 juli 1980.
- ③2 Voorrang vanaf 5 juli 1979.
- ③3 Land van voorrang: Frankrijk (FR).
- ③1 Nummer van de voorrangsaanvraag: 7917451 .
- ②3 --
- ⑥1 --
- ⑥2 --

- ④3 Ter inzage gelegd 7 januari 1981.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Aanvrager: Synthélabo, Parijs, Frankrijk

Korte aanduiding: Farmaceutische samenstelling met als actieve component extracten van Hedera Helix, en werkwijze voor het winnen van de extracten.

5 De uitvinding heeft betrekking op een farmaceutische samenstelling. Met name heeft de uitvinding betrekking op farmaceutische samenstellingen die extracten bevatten van een klimplant en op een werkwijze voor het winnen van de extracten op basis van hederasaponine C door uit te gaan deze plant. Men heeft reeds extracten bereid van Hedera en
10 met name van Hedera Helix door extractie met behulp van water en/of alcohol.

De farmaceutische samenstelling volgens de uitvinding wordt hierdoor gekenmerkt dat deze als actief hoofbestanddeel een extract bevat van Hedera Helix met ongeveer 90% of 60% hederasaponine C en het verzepingsproduct van hederasaponine C te weten α -hederine.
15

De werkwijze volgens de uitvinding betreft de bereiding in eerste instantie van een extract van saponines met een zuiverheid van 60%. Hiertoe wordt eerst een uitloging van het poeder van Hedera bewerkstelligd met behulp van aceton of met een oplosmiddel dat een dielectrische constante heeft die gelijk is aan die van aceton zoals een mengsel van
20 ethylacetaat/alkohol met name methanol of ethanol. Het poeder dat opgenomen wordt door het oplosmiddel wordt vervolgens gedroogd. Daarna wordt een tweede uitloging bewerkstelligd met zuivere methanol. De oplossing die men behandelt heeft met actieve koolstof wordt ingedampt en daarna gefiltreerd.
25 Het indampen van het filtraat wordt uitgevoerd onder verlaagde druk. Aan het filtraat wordt vervolgens ethylether toegevoegd of een mengsel van oplosmiddelen met een gelijke polariteit als die van de ether, bijvoorbeeld een mengsel van chloroform en ethylacetaat ten einde de verzepingsextracten neer te slaan. Dit extract wordt opgenomen in zuivere methanol, afgefiltreerd
30 en gedroogd onder verlaagde druk of door verstuiven. Het aldus verkregen product is een complex van saponine dat ongeveer 60% Hederasaponine C bevat. Dit complex heeft een gele kleur en is zeer goed oplosbaar in water en methanol en slecht oplosbaar in ethanol. Wanneer een dunne laag chromatogram wordt gemaakt met silicagel met als oplosmiddel een mengsel van benzeen/
35 methanol/azijnzuur (65:35:10) en als loopvloeistof een oplossing van 1% vanilline in zwavelzuur ziet men duidelijk verschillende gekleurde sporen waarvan met name die van hederasaponine C bruin-zwart is gekleurd.

Volgens de werkwijze van de uitvinding bereidt men een

8003871

tweede keer een extract met een zuiverheid van 90% hederasaponine C. Hiertoe leidt men het eerste extract met 60% hederasaponine C over een kolom met aluminiumoxyde met zuivere methanol. Zodoende verkrijgt men een eluaat dat minimaal 90% hederasaponine C bevat overeenkomend met formule 1, aangegeven op het formuleblad. Volgens de werkwijze van de uitvinding bereidt men tenslotte α -hederine of het alkalische zout hiervan door uit te gaan van het eerder genoemde extract door verzeping met behulp van natriumhydroxyde of kaliumhydroxyde overeenkomend met formule 2, aangegeven op het formuleblad.

De drie stoffen die verkregen zijn bij elke stap van het procédé volgens de uitvinding worden nader bestudeerd met betrekking tot de antischimmel- en antiparasitaire werking in vitro en in vivo.

De uitvinding wordt nader toegelicht aan de hand van het volgende voorbeeld.

15 Voorbeeld I

Men behandelt 25 kg Hedera Helix met 120 liter aceton. Het mengsel wordt ingedampt en gedroogd en zodoende verkrijgt men een viskeuze massa die donker-groen is, in een hoeveelheid van 1000 g. Dit mengsel wordt gedroogd. Hieraan wordt 110 liter zuivere methanol toegevoegd. Het mengsel wordt vervolgens ingedampt onder verlaagde druk tot een hoeveelheid van 25 liter. Dit mengsel wordt geroerd met 100-200 g neutrale actieve kool. Daarna wordt het mengsel afgefiltreerd en het filtraat wordt ingedampt onder verlaagde druk tot ongeveer 10 liter. Vervolgens wordt aan 10 liter van het filtraat 20 liter diethylether toegevoegd. Zodoende verkrijgt men een neerslag P_1 . Aan het filtraat dat ingedampt is tot 6-liter voegt men 20 liter diethylether toe. Zodoende wordt een neerslag P_2 gevormd dat men samenvoegt met het neerslag P_1 . De neerslagen worden opnieuw opgenomen in 10 liter zuivere methanol, het mengsel wordt afgefiltreerd en gedroogd onder verlaagde druk. Zodoende verkrijgt men 1,5-2 kg van een extract dat 60% hederasaponine C bevat.

Voorbeeld II

De scheiding over een kolom met aluminiumoxyde ten einde het extract te verkrijgen dat 90% hederasaponine C bevat, welke werking op de volgende wijze wordt uitgevoerd.

Men dispergeert 1 kg neutraal aluminiumoxyde W_{200} in zuivere methanol. Dit mengsel wordt in een kolom aangebracht en geëluëerd met methanol totdat het eluaat volledig helder is. Vervolgens voegt men 300 g van het eerste extract toe verdunt het in 2 liter zuivere methanol. Dit

wordt geëluëerd met zuivere methanol en men verzamelt 4 liter eluaat dat men onder verlaagde druk indampt. Zodoende verkrijgt men 190 g extract dat ten minste 90% hederasaponine C bevat.

Voorbeeld III

5 Het extract met 90% hederasaponine C wordt in een waterig mengsel behandeld met 2N en NaOH of KOH bij verhoogde temperatuur gedurende 1 uur. Het mengsel wordt aangezuurd en het neerslag gewassen. Het neerslag wordt opgenomen in zuivere methanol, afgefiltreerd en gedroogd. Zodoende verkrijgt men α -hederine.

10 De extracten van de Hedera Helix verkregen volgens de werkwijze volgens de uitvinding welke extracten een zuiverheid hebben van 60% met betrekking tot hederasaponine C, en met 90% hederasaponine C en α -hederine zijn actieve stoffen gebleken als antiparasitaire middelen en schimmelbestrijdende middelen.

15 De toxiciteit van de extracten is bepaald op muizen door intraperitoneale toediening. De DL_{50} -waarde na 24 uren varieerde van 2000 mg tot 3200 mg. De DL_{50} -waarde na 8 dagen varieerde van 1500 mg tot 2500 mg.

De antiparasitaire activiteit.

20 De anthelmintische activiteit en de protozoïdische activiteit van de extracten volgens de uitvinding is nader onderzocht.

1) De anthelmintische activiteit ten opzichte van cestodes, nematodes en trematodes werd in vitro en in vivo bepaald.

1a) De activiteit ten opzichte van cestodes is nader
25 onderzocht met betrekking tot de Taenia van muizen.

Proefneming in vitro:

De Hymenolepis nana ver. fraterna werden gewonnen door de dunne darm van muizen waarop geparasiteerd is in stukken te delen en deze stukken worden in een milieu van Sen en Hawking gedaan in een
30 droogstoof bij 37 °C. Het experiment bestaat hieruit dat de verschillende oplossingen van de producten met de wormen die in leven zijn gebleven en de lethale dosis wordt bepaald na 24 uren. Men gaat hierbij zodanig te werk dat een aantal wormen die niet zijn behandeld die gedurende enkele dagen in leven moeten blijven en

35 een aantal behandelde wormen met de vergelijkende producten te weten helenine en santonine.

Bepalingen in vivo.

Deze bepaling bestaat hieruit dat men aan de muis waarop

8003871

geparasiteerd is variabele doseringen van het te onderzoeken product inbrengt en in de faeces de uitstoting onderzoekt van eieren van Hymenolepis. Het herstel of de genezing worden bepaald aan de hand van de telling van de eieren per gram faeces. Deze telling moet negatief zijn op het einde van de behandeling. Om de zekerheid te hebben dat de beëindiging van de parasitering volledig is bewerkstelligt men na de autopsie een verdeling van de dunne darm van de muis om er zeker van te zijn dat er geen wormen meer achter zijn gebleven of dat de alle dood zijn. De toegepaste vergelijkende stoffen in de test die in vivo wordt uitgevoerd zijn mepacrine en helenine.

De resultaten van de proefnemingen in vitro zijn uitgedrukt in lethale doseringen (DL-100) na 24 uren hetgeen overeenkomt met de hoeveelheden van de producten die voldoende zijn om 100% van de cestodes (lintwormen) na 24 uren te doden.

De resultaten van de proefnemingen in vivo geven het percentage aan van de onderdrukking van de parasitering verkregen met gelijke hoeveelheden. Deze gegevens zijn samengevat in tabel A.

TABEL A

in vitro - stof	DL-100 (na 24 uren)
helenine (ter vergelijking)	50 µg/ml
santonine (ter vergelijking)	100 µg/ml
α-hederine	100 µg/ml
extract met 90%	1 mg/ml
extract met 60%	5 mg/ml

in vivo - stof	dosering (mg/kg)	deparasitering %
mepacrine	220	100
helenine	300	60
α-hederine	400	20
extract met 90%	400	30
extract met 60%	400	60

1b) De nematocide activiteit is onderzocht bij Syphacia obvelata (parasieten voorkomend bij muizen) bij muizen.

Men heeft experimenten in vitro en in vivo bewerksteld.

8003871

ligt op dezelfde wijze als toegepast voor het onderzoek naar de activiteit van het taenifugum (lintworm dodend respectievelijk verdrijvend middel). De vergelijkende producten zijn hierbij santonine en helenine in vitro en piperazine en helenine in vivo. De verkregen resultaten zijn weergegeven in tabel B.

TABEL B

	in vitro - stof	DL-100 (na 24 uren)
10	helenine	10 µg/ml
	santonine	100 µg/ml
	α-hederine	1 mg/ml
	extract met 90%	5 mg/ml
15	extract met 60%	5 mg/ml

	in vivo- stof	dosering (mg/ml)	deparasitering (%)
20	piperazinecitraat	200	90
	helenine	300	80
	α-hederine	400	10
	extract met 90%	400	30
	extract met 60%	400	70

25

1c) De activiteit ten opzichte van trematoden (wormen) is onderzocht ten opzichte van leverbotten in vitro en in vivo.

De bepaling die in vitro werd uitgevoerd bestond hieruit dat leverbotten met name *Fasciola hepatica* en *Dicrocoelium lanceolatum* werden verzameld direct na het doden van schapen en runderen die besmet waren met parasieten door het afscheiden van de galbuizen en de lever van deze dieren. De wormen worden direct overgebracht in een overlevingsmilieu van Benex gemodificeerd door Cavier in een stoof bij 37 °C. De te onderzoeken producten worden in verschillende concentraties aangebracht en de lethale dosis (DL-100) wordt bepaald na 24 uren. De vergelijkende stoffen zijn helenine en santonine.

De bepalingen in vivo op runderen met parasieten.

Eerst regelt men het aantal eieren van de leverbotten

8003871

in de faeces, en de mate van besmetting van de te behandelen schapen. Daarna brengt men met behulp van een pistool een bepaalde dosering aan beneden in de keel van schapen waarbij drie achtereenvolgende verschillende producten worden aangebracht met een tussenpoos van acht dagen. De duur van de behandeling is zodoende drie weken.

Gedurende de behandelingstijd wordt de vermindering van de eieren in de faeces gecontroleerd tot ze verdwenen zijn. Om zeker te zijn van de genezing worden de schapen gedood en het verdwijnen van de leverbotten in de lever en in de gal wordt onderzocht, hetgeen het onomstotelijke bewijs levert dat de onderzochte producten een leverbotdodende werking hebben. De hierbij verkregen resultaten zijn vermeld in tabel C.

TABEL C

15	<u>in vitro</u>	
	a) ten opzichte van <i>Fasciola hepatica</i>	DL-100 (na 24 uren)
	stof	
20	santonine	100 µg/ml
	helenine	10 µg/ml
	α-hederine	5 µg/ml
	extract met 90%	5 mg/ml
	extract met 60%	1 mg/ml
25	b) ten opzichte van <i>Dicrocoelium lanceolatum</i>	DL-100 (na 24 uren)
	stof	
30	santonine	50 µg/ml
	helenine	10 µg/ml
	α-hederine	10 µg/ml
	extract met 90%	5 mg/ml
	extract met 60%	500 µg/ml

In vivo, met tussenpozen van 8 dagen werden drie behandelingsdelingen verricht met 800 mg/kg bij schapen die parasieten bevatten van *Dicrocoelium lanceolatum* (leverbot). Met α-hederine heeft er een verlaging van het aantal eieren plaats in de faeces terwijl met de twee extracten met 60% en 90% van hederasaponine C er een totale ver-

8003871

5 2) De activiteit tegen een-celligen (protozao) is
onderzocht met betrekking tot in de darmen aanwezige eencelligen en met
betrekking tot *Trichomonas intestinalis*.

Men bepaalde de minimale remmende concentratie (CMI) hetgeen betekent de kleinste hoeveelheid van het product dat wanneer toegevoegd aan het cultuurmengsel voordat de uitzaaiing plaats had de ontwikkeling van de cultuur volledig stopte na een contacttijd van 72 uren bij een temperatuur van 37 °C.

De lethale werking werd bepaald in een cultuur gedurende 48 uren. Men bepaalt de kleinste hoeveelheid van het te onderzoeken product dat na te zijn toegevoegd aan een cultuur gedurende 2 dagen terwijl deze groeit in staat is om alle protozoaire een-celligen (amiben of Trichomonas) te doden na een incubatietijd van 48 uren bij een temperatuur van 37 °C.

Deze twee experimenten werden parallel bewerkstelligd met een vergelijkend , bekend product te weten metronidazool.

Voor deze testen bewerkstelligt men een bepaling
25 van de activiteit van de producten waarbij men retrocultures bereidt,
door uit te gaan van mengsels waarvan de protozoaire een-celligen zijn
gedood. Deze negatieve retrocultures worden ook gebruikt ter bevestiging
van de activiteit van de onderzochte producten . De hierbij verkregen
resultaten zijn samengevat in tabel D.

TABEL D

	stof	CMI
35	metronidazoöl	5 µg/ml
	α-hederine	50 µg/ml
	extract met 90%	> 10 mg/ml
	extract met 60%.	> 10 mg/ml

8003871

Fungicidale werking. De fungicidale werking is onderzocht met betrekking tot dermatofyten.

1). De activiteit ten opzichte van gist (*Candida albicans*) is onderzocht in vitro en in vivo.

5 Voor de bepaling in vitro bereidde men een cultuur van het gist *Candida albicans* op een Sabouraudvloei-stof met een verdubbelde concentratie van een suspensie van 10^6 cellen. Hiermee in contact bracht men een bepaalde hoeveelheid van het ent-medium met een stijgende dosis van de verdunde producten die onderzocht werden. De bepaling werd uitgevoerd na een bewaartijd van 24 uren bij een temperatuur van 37°C . De testbuizen waarin de producten werden geroerd bleven helder. Men bepaalde de fungicidale activiteit door de retrocultures die 72 uren na incubatie in een stoof bij een temperatuur van 37°C negatief moesten blijven. De ter vergelijking gebruikte stof was amfotericine B.

15 In vivo werd het onderzoek uitgevoerd bij muizen.

Na dorsale epilatie werden de muizen blootgesteld aan UV-bestraling om een inflammatoire reactie te bewerkstelligen en men bewerkstelligde een ontsteking onder invloed van *Candida albicans* sous-cutaan door het inbrengen van 0,25 ml van een verdunde cultuur van *Candida albicans* verdund tot 1/10.

Twee dagen later begon de behandeling waarbij de muizen werden verdeeld in verschillende groepen die verschillende concentraties kregen van de te onderzoeken producten door kunstmatige voeding met behulp van een maagsonde. Deze behandeling werd parallel uitgevoerd met een stof ter vergelijking te weten amfotericine B. De behandelingstijd was 10 dagen.

De genezing kwam tot uiting door het geleidelijk aan verdwijnen van het abces veroorzaakt door het gist *Candida*. De niet-behandelde blanco dieren hielden het abces gedurende meer dan 1 maand. De verkregen resultaten zijn uitgedrukt in minimale inhibiterende concentraties (CMI) voor de test in vitro en deze gegevens zijn samengevat in tabel E.

8003971

TABEL E

	stof	CMI
5	amfotericine B	2,5 µg/ml
	α-hederine	500 µg/ml
	extract met 90%	> 50 mg/ml
	extract met 60%	> 50 mg/ml

10

Voor de test die in vivo werd uitgevoerd bepaalde men het al of niet minder worden van het abces dat subcutaan was veroorzaakt bij muizen. De hierbij verkregen resultaten waren dat het abces gedurende meer dan 1 maand bleef bij de niet-behandelde dieren. Het abces bleef bij dieren die behandeld waren met 2,5 mg/kg amfotericine B maar een nieuwe behandeling gedurende 10 dagen bewerkstelligde de verdwijning van het abces terwijl de subcutane toediening van stoffen volgens de uitvinding zoals α-hederine, de extracten met 90% en 60% hederasaponine C bij een dosering van 50 mg/kg per dag gedurende 10 dagen bewerkstelligde de verdwijning van het abces in alle gevallen.

2. De activiteit ten opzichte van infecties veroorzaakt met dermatofylis is nader onderzocht in vitro voor *Microsporum canis*. Het in cultuur brengen van dermatofyten werd als volgt bewerkstelligd. Het entmedium is een verdunning tot 1/10 in gesteriliseerd water van een cultuur van 7 dagen. In elke buis werd 0,1 ml van deze verdunde vloeistof gedaan evenals 1 ml Sabouraud-milieu met een dubbele concentratie en 1 ml verdunde producten. De bepaling van de fungicidale activiteit werd verricht op het einde van 7 dagen. De remming van de groei werd onderzocht in de verschillende buizen. Wanneer een dergelijke remming werd geconstateerd werd het experiment voortgezet met een retrocultuur om de bepaling te controleren, hetgeen 15 dagen later werd gedaan. De negatieve uitslag van deze retrocultuur bevestigde dan de fungicidale werking van het product. De stof die ter vergelijking werd gebruikt was amfotericine B. De resultaten van de onderzochte stoffen zijn dat de CMI-waarde voor amfotericine B is 2,5 µg/ml en voor α-hederine is de CMI-waarde 50 µg/ml.

De resultaten van deze proefnemingen geven aan dat de stoffen volgens de uitvinding een farmaceutische werking hebben met

8003871

name een antiparasitaire en fungicidale activiteit. De stoffen volgens de uitvinding te weten α -hederine, het extract van Hedera met 90% hederasaponine C en het extract van Hedera met 60% hederasaponine C kunnen worden toegepast voor de behandeling van parasitaire en schimmel-
5 vormige aandoeningen voor het behandelen van mensen en dieren.

De stoffen kunnen worden toegediend in een voor geneeskundige doeleinden geschikte vorm zoals door plaatselijke, orale of parenterale toediening samen met hiervoor geschikte hulpstoffen bijvoorbeeld in de vorm van tabletten, gelulen, capsules, oplossingen die inge-
10 nomen kunnen worden of geïnjecteerd kunnen worden, gelyofiliseerde poeders, crème, lotions en dergelijke. De gelatine capsule (gelule) kan bijvoorbeeld worden bereid door uit te gaan van de volgende stoffen:

200 mg extract met 60% hederasaponine C
20 mg mannitol
15 35 mg microkristallijne cellulose en
5 mg magnesiumstearaat,
voor een gelatinecapsule.

-conclusies-

8003871

CONCLUSIES:

1. Farmaceutische samenstelling, met het kenmerk, dat deze als actief hoofdbestanddeel een extract bevat van Hedera Helix met
5 ongeveer 90% of 60% hederasaponine C of het verzepingsproduct van hederasaponine C te weten α -hederine.

2. Geneesmiddel met een antiparasitaire en fungicidale werking, met het kenmerk, dat dit als actieve stof de verbindingen bevat zoals aangegeven in conclusie 1.

10 3. Farmaceutische samenstellingen met een werking tegen wormen, met het kenmerk, dat deze samenstelling als actieve component stoffen bevat zoals aangegeven in conclusie 1,

4. Farmaceutische samenstelling met een activiteit tegen wormen, voor orale toediening, met het kenmerk, dat deze als actief bestanddeel een extract bevat Hedera Helix met ongeveer 90 of 60% hederasaponine C.
15

5. Farmaceutische samenstellingen met een activiteit tegen een-celligen, met het kenmerk, dat deze samenstelling als actief bestanddeel een extract van Hedera Helix bevat met ongeveer 90 of 60%
20 hederasaponine C of het verzepingsproduct van hederasaponine C te weten α -hederine.

6. Farmaceutische samenstellingen met een fungicidale activiteit, met het kenmerk, dat deze als actief bestanddeel een extract bevatten van Hedera Helix met ongeveer 90% of 60% hederasaponine C,
25 of het verzepingsproduct van hederasaponine C te weten α -hederine.

7. Farmaceutische samenstellingen, met een fungicidale werking, met het kenmerk, dat deze als actief bestanddeel een extract bevatten van Hedera Helix met ongeveer 90% of 60% hederasaponine C.

8. Farmaceutische samenstellingen volgens conclusie
30 1-7, met het kenmerk, dat deze worden samengesteld zodat ze oraal kunnen worden toegediend in de vorm van een gelatinecapsule, parenteraal kunnen worden toegediend in de vorm van een injecteerbare oplossing eventueel gelyofiliseerd, of plaatselijk kunnen worden aangebracht in de vorm van een zalf, lotion of oplossing.

35 9. Werkwijze voor het bereiden van een extract van Hedera Helix, met het kenmerk, dat men een uitloging bewerkstelligt van het Hederapoeder met behulp van aceton of een oplosmiddel dat een dielectrische constante heeft die gelijk is aan die van aceton, het met het

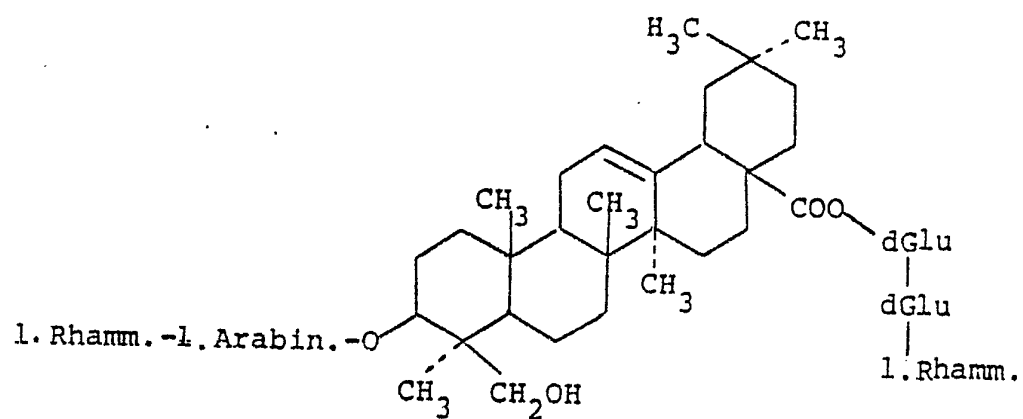
oplosmiddel uitgeloogde poeder wordt gedroogd, een tweede uitloging wordt
bewerkstelligd met zuivere methanol, de verkregen oplossing, na behandeling
met neutrale actieve kool en filtratie wordt ingedampt, waarbij het fil-
traat wordt ingedampt onder verlaagde druk, aan het filtraat diethylether
5 wordt toegevoegd of een mengsel van oplosmiddelen met een polariteit die
gelijk is aan die van de ether om het verzepingsextract neer te slaan
waarbij dit weer wordt opgenomen in zuivere methanol, afgefiltreerd en ge-
droogd, waarna men een extract verkrijgt met 60% hederasaponine C, dat
men vervolgens leidt over een kolom met aluminiumoxyde door elueren met
10 zuivere methanol zodat men tenslotte het extract verkrijgt met ongeveer
90% hederasaponine C.

Eindhoven, 25 juni 1980

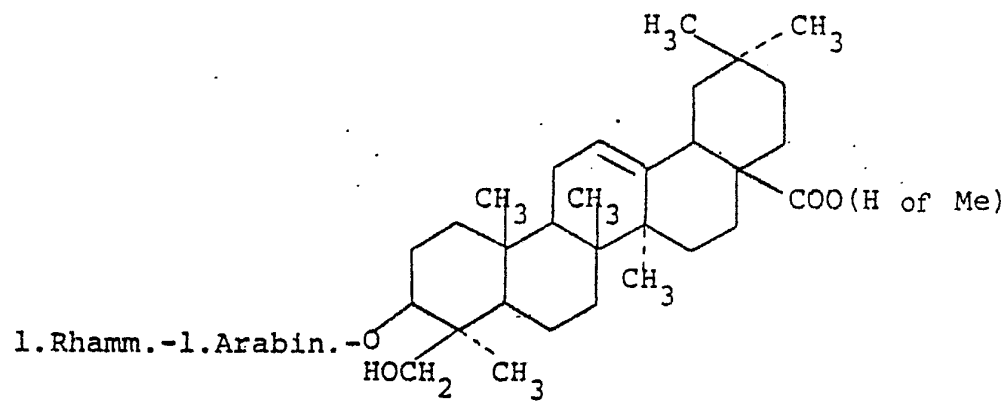
8003871

FORMULEBLAD

1.



2.



8003871