



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 18 166 T2** 2005.07.07

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 140 127 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 18 166.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP99/10177**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 965 511.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/38700**

(86) PCT-Anmeldetag: **15.12.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **06.07.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **10.10.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **16.06.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **07.07.2005**

(51) Int Cl.⁷: **A61K 35/78**

C07C 69/00, C07H 17/08, A61P 33/02

(30) Unionspriorität:

98204409 22.12.1998 EP

(73) Patentinhaber:

Janssen Pharmaceutica N.V., Beerse, BE

(74) Vertreter:

derzeit kein Vertreter bestellt

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**MAES, Jules, Louis, B-2275 Wechelderzande, BE;
GERMONPREZ, Albert, Nils, B-8370
Blankenberge, BE; VAN PUYVELDE, Emiel, Luc,
B-9250 Waasmunster, BE; VAN TRI, Mai, Hanoi,
VN; NGOC NINH, Tran, Hanoi, VN; DE KIMPE, G.,
Norbert, B-9070 Destelbergen, BE**

(54) Bezeichnung: **ANTIPROTOZOALE SAPONINE**

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 vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolation von antiprotozoalen Saponinen aus Pflanzen, die zur Familie Myrsinaceae gehören, und die Verwendung dieser Saponine zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von sowohl menschlichen als auch tierischen Wirten, die mit Protozoen-Parasiten der Gattung *Leishmania* infiziert sind, sowie für die Linderung von klinischen Manifestationen von, bzw. Heilung von Krankheiten, die unter der Bezeichnung Leishmaniasen bekannt sind, bei diesen Wirten.

[0002] Bei den Leishmaniasen existieren verschiedenste Krankheitsanzeichen, die sich in ihrer Schwere und ihrer Auswirkung auf die Gesundheit stark unterscheiden. In erster Linie handelt es sich bei Leishmaniasen um Leiden mit Erschöpfungszuständen, die von verschiedenen *Leishmania*-Arten verursacht und von unterschiedlichen Phlebotomine-Sandfliegen übertragen werden. Leishmaniasen scheinen wesentlich öfter vorzukommen und von größerer Bedeutung für die Volksgesundheit zu sein, als bis jetzt angenommen wurde. Die Bekämpfung von *Leishmania*-Infektionen ist deshalb kompliziert, weil viele Sandfliegenarten als Vektoren in Frage kommen, weil viele Tierarten als Zwischenwirte dienen können und weil Diagnoseverfahren (klinische, serologische, parasitologische Verfahren) nicht immer anwendbar sind bzw. diagnostisch nur von beschränktem Wert sind.

[0003] Bei den Manifestationen kann es sich um Manifestationen an den Eingeweiden, an Haut und Schleimhaut sowie nur an der Haut handeln; der Stamm des infizierenden Organismus sowie der immunologische Zustand des Wirts können die klinischen Manifestationen und das Endergebnis der parasitischen Erkrankung beeinflussen. Die Behandlung von Leishmaniasen ist kompliziert, und eine längere systemische Behandlung unabdingbar. Die Behandlungsziele bestehen darin, den menschlichen oder tierischen Patienten von einer intrazellulären parasitischen Infektion zu heilen, Rückfälle zu vermeiden, zu vermeiden, daß der Patient nicht ansprechend wird und die Kosten für einen Krankenhausaufenthalt und die Behandlung insgesamt so gering wie möglich zu halten. Um diese Ziele zu erreichen, müssen geeignete Arzneistoffe in entsprechenden Dosierungen und in einer entsprechenden Häufigkeit ausreichend lang verabreicht werden. Trotz intensiver Forschung bei der Suche nach wirksamen, gut verträglichen Leishmanienmitteln wurden nur wenige Mittel entdeckt, die für den Patienten verfügbar sind. Zur Zeit werden üblicherweise als Arzneistoffe der ersten Wahl zwei fünfwertige Antimonverbindungen verwendet, die tief in den Muskel injiziert werden müssen, nämlich Meglumin-Antimonat (GlucantimTM, Farmitalia) sowie Natriumstibogluconat (PentostamTM, Wellcome). Arzneistoffe der zweiten Wahl sind Amphothericin-B (insbesondere die Liposomenformulierungen), Pentamidin und Allopurinol. Die zur Zeit verfügbaren Therapien sind nur ungenügend wirksam und führen zu toxischen Nebenwirkungen beim Patienten. Außerdem ist ihr Wirkungsspektrum nicht breit genug. Deshalb besteht nach wie vor ein Bedarf an neuen Arzneistoffen. Die vorliegende Identifikation von neuen Wirkstoffen wird bei der Behandlung von Krankheiten, die von Protozoen-Parasiten der Gattung *Leishmania* verursacht werden, Verwendung finden.

[0004] In *Phytochemistry*, 41 (1), 1996, S. 269-277 und *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 18 (4,5), 1998, S. 737-743 werden Triterpenoidsaponine beschrieben, die aus den Blättern von *Maesa lanceolata* isoliert werden. In *Journal of Natural products* 61 (5), 1998, S. 585-590 wird die Auswertung von biologischen Wirksamkeiten von Triterpenoidsaponinen aus *Maesa lanceolata* in Viruzid-Assays, antimykotischen Assays und Molluskizid-Assays beschrieben.

[0005] Unerwarteterweise wurden Triterpensaponine mit einer sehr guten prophylaktischen und therapeutischen Wirksamkeit gegen *Leishmania* aus der Pflanze *Maesa balansae*, einer Art der Familie Myrsinaceae, Gattung *Maesa*, isoliert.

[0006] Die Erfindung betrifft auch ein alternatives Verfahren zur Isolation von Triterpensaponinen aus Pflanzen, die zur Familie Myrsinaceae gehören, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren die folgenden Schritte umfaßt:

- (a) Extrahieren der getrockneten Pflanzenteile mit einem Alkohol und Einengen des Extrakts,
- (b) Entfernen der unpolaren Fraktion aus dem Extrakt mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion mit einem unpolaren Lösungsmittel,
- (c) weitere Aufreinigung der Saponine in dem Alkoholextrakt mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion, Filtration und Chromatographie.

[0007] Der Alkohol ist insbesondere Methanol, Ethanol, Isopropanol, Butanol, jeweils gegebenenfalls in Abmischung mit Wasser, vorzugsweise eine 70:30-Mischung aus Ethanol und Wasser; das unpolare Lösungsmittel ist ein Kohlenwasserstoff, z.B. Hexan.

[0008] Werden die Saponine aus der Pflanzengattung *Maesa* isoliert, kann die Chromatographie eine Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie mit einem Gradientenelutionssystem unter Verwendung von
 A: 0,5% Ammoniumacetat in Wasser
 B: Methanol
 C: Acetonitril
 wobei zum Zeitpunkt $t = 0$ (A:B:C)=(60:20:20)
 und zum Zeitpunkt $t = \text{Ende}$ (A:B:C)=(0:50:50), oder eine Direktphasen-Flüssigkeitschromatographie an Silica-gel umfassen.

[0009] Bei diesen Verfahren fällt ein Gemisch an, das im wesentlichen aus Saponinen besteht. Dieses Saponingemisch wurde in vielen pharmakologischen Versuchen, die im Versuchsteil beschrieben sind, verwendet. Für die Strukturaufklärung wurde dieses Gemisch wie im Versuchsteil beschrieben mittels HPLC in die Einzelbestandteile aufgetrennt.

[0010] Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch ein oder mehrere Triterpensaponine, die nach den im vorliegenden Text beschriebenen Verfahren hergestellt werden können, egal, ob als Gemisch oder in Form der aufgereinigten Produkte.

[0011] Insbesondere betrifft die Erfindung Triterpensaponine, die von der Pflanzengattung *Maesa* mittels Chromatographie umfassend eine Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie mit einem Gradientenelutionssystem unter Verwendung von

A: 0,5% Ammoniumacetat in Wasser

B: Methanol

C: Acetonitril

wobei zum Zeitpunkt $t = 0$ (A:B:C)=(60:20:20)

und zum Zeitpunkt $t = \text{Ende}$ (A:B:C)=(0:50:50) und

wobei das Saponin die folgenden Kennwerte aufweist:

Verbindung 1: MG = 1532, λ_{max} = 228,6 nm, $\lambda_{\text{max}2}$ = 273,3 nm; t_R = 8,97

Verbindung 2: MG = 1510, λ_{max} = 223,9 nm, $\lambda_{\text{max}2}$ = 274,5 nm; t_R = 9,39

Verbindung 3: MG = 1532, λ_{max} = 279,2 nm, $\lambda_{\text{max}2}$ = 223,9 nm; t_R = 9,68

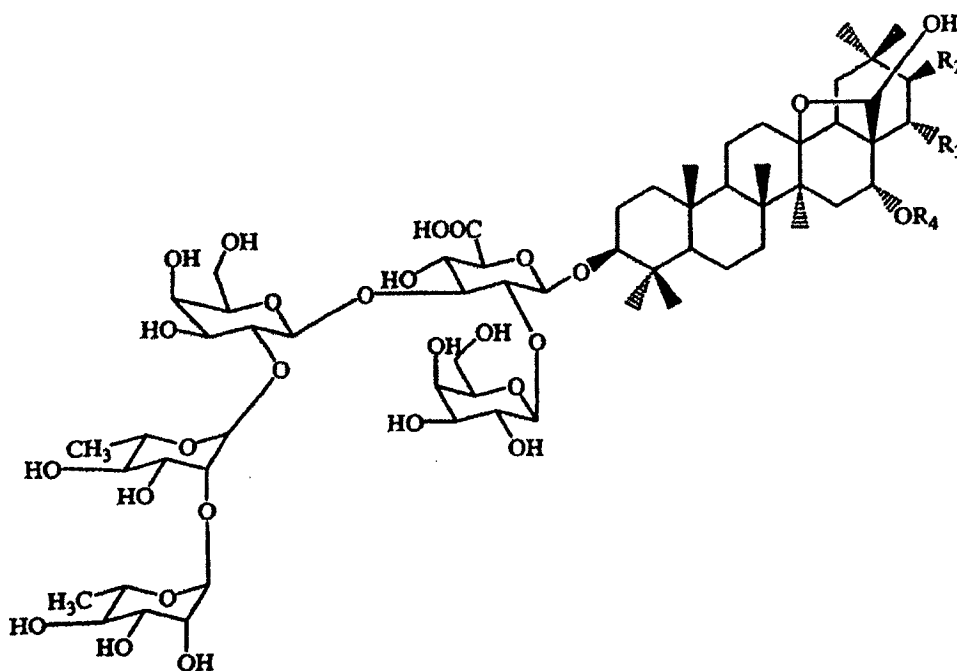
Verbindung 4: MG = 1510, λ_{max} = 280,4 nm, $\lambda_{\text{max}2}$ = 222,7 nm; t_R = 10,09

Verbindung 5: MG = 1574, λ_{max} = 276,8 nm, $\lambda_{\text{max}2}$ = 225,0 nm; t_R = 10,87 bzw.

Verbindung 6: MG = 1552, λ_{max} = 279,2 nm, $\lambda_{\text{max}2}$ = 223,9 nm; t_R = 11,37;
 erhältlich sind.

[0012] Die relative Retentionszeit t_R ist der Mittelwert von 10 Bestimmungen gegen die Retentionszeit von Uracil an einer Hypersil BDS C-18 Säule, 3 μm , 100 \times 4 mm.

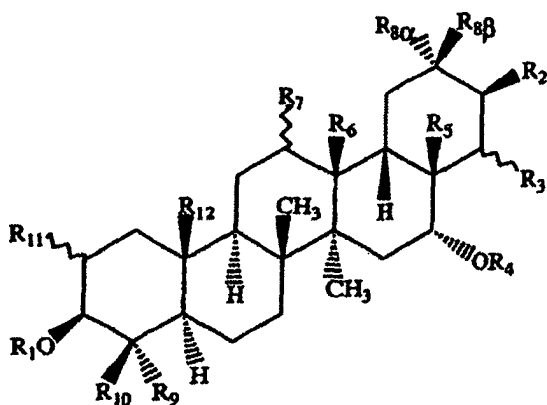
[0013] Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung Triterpensaponine der Formel



in der R_2 $-O(C=O)C_6H_5$ oder $-O(C=O)C(CH_3)=CHCH_3$ bedeutet,
 R_3 (E)- oder (Z)- $O(C=O)CH=CH-C_6H_5$ bedeutet und
 R_4 Wasserstoff oder $-(C=O)CH_3$ bedeutet,
 insbesondere diejenigen, bei denen
 in Verbindung 1 R_2 $-O(C=O)C_6H_5$ bedeutet,
 R_3 (Z)- $O(C=O)CH=CH-C_6H_5$ bedeutet,
 R_4 Wasserstoff bedeutet;
 in Verbindung 2 R_2 $-O(C=O)C(CH_3)=CHCH_3$ bedeutet,
 R_3 (Z)- $O(C=O)CH=CH-C_6H_5$ bedeutet,
 R_4 Wasserstoff bedeutet;
 in Verbindung 3 R_2 $-O(C=O)C_6H_5$ bedeutet,
 R_3 (E) $-O(C=O)CH=CH-C_6H_5$ bedeutet,
 R_4 Wasserstoff bedeutet;
 in Verbindung 4 R_2 $-O(C=O)C(CH_3)=CHCH_3$ bedeutet,
 R_3 (E)- $O(C=O)CH=CH-C_6H_5$ bedeutet,
 R_4 Wasserstoff bedeutet;
 in Verbindung 5 R_2 $-O(C=O)C_6H_5$ bedeutet,
 R_3 (E) $-O(C=O)CH=CH-C_6H_5$ bedeutet,
 R_4 $-(C=O)CH_3$ bedeutet;
 in Verbindung 6 R_2 $-O(C=O)C(CH_3)=CHCH_3$ bedeutet,
 R_3 (E) $-O(C=O)CH=CH-C_6H_5$ bedeutet,
 R_4 $-(C=O)CH_3$ bedeutet.

[0014] Bevorzugte Verbindungen zur Verwendung in den erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen und Behandlungsverfahren sind die Verbindungen 3 und 4, insbesondere Verbindung 3.

[0015] Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von einem oder mehreren Triterpensaponinen für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Leishmaniasen in Wirten, die mit Leishmania-Arten infiziert sind, dadurch gekennzeichnet, daß das Saponin die Formel (I)



oder eine ihrer stereoisomeren Formen oder eines ihrer pharmazeutisch unbedenklichen Additionssalze aufweist, in der

R_1 Wasserstoff, $-(C=O)C_{1-5}$ -Alkyl, $-(C=O)C_{2-5}$ -Alkenyl, phenylsubstituiertes $-(C=O)C_{2-5}$ -Alkenyl, eine Monosaccharidgruppe oder eine Oligosaccharidgruppe bedeutet;
 R_2 Wasserstoff, Hydroxy, $-O(C=O)C_{1-5}$ -Alkyl, $-O(C=O)C_{2-5}$ -Alkenyl, $-O(C=O)C_6H_5$ oder phenylsubstituiertes $-O(C=O)C_{2-5}$ -Alkenyl bedeutet;
 R_3 Wasserstoff, Hydroxy, $-O(C=O)C_{1-5}$ -Alkyl, $-O(C=O)C_{2-5}$ -Alkenyl, $-O(C=O)C_6H_5$ oder phenylsubstituiertes $-O(C=O)C_{2-5}$ -Alkenyl bedeutet;
 R_4 Wasserstoff, C_{1-6} -Alkyl, $-(C=O)C_{1-5}$ -Alkyl, $-(C=O)C_{2-5}$ -Alkenyl, $-(C=O)C_6H_5$ oder phenylsubstituiertes $-(C=O)C_{2-5}$ -Alkenyl bedeutet;
 R_5 CH_3 , CH_2OH , CH_2OCH_3 , $CH_2O-C(=O)CH_3$, CHO , $COOH$ bedeutet; oder
 R_5 und R_2 einen zweiwertigen Rest der Formel $-C(=O)-O-$ bilden;
 R_6 und R_7 Wasserstoff bedeuten oder gemeinsam eine Bindung bilden; oder
 R_5 und R_6 einen zweiwertigen Rest der Formel

$-CH_2-O-$

(a),

-CH(OR₁₃)-O- (b),

-C(=O)-O- (c)

in der R₁₃ Wasserstoff, C₁₋₆-Alkyl oder -(C=O)C₁₋₅-Alkyl bedeutet, bilden;

R_{8α} und R_{8β} jeweils unabhängig voneinander CH₃, CH₂OH, CH₂OCH₃, CH₂O-C(=O)C₁₋₅-Alkyl, CHO, CH (OCH₃)₂, CH=NOH, COOH bedeuten; oder

R_{8β} und R₃ einen zweiwertigen Rest der Formel -C(=O)-O- bilden; oder

R_{8β} und R₅ einen zweiwertigen Rest der Formel -CH₂O-CHOH- bilden;

R₉ CH₃, CH₂OH, CH₂OCH₃, CH₂O-C(=O)C₁₋₅-Alkyl, CHO, COOH bedeutet;

R₁₀ CH₃, CH₂OH, CH₂OCH₃, CH₂O-C(=O)C₁₋₅-Alkyl, CHO, COOH bedeutet;

R₁₁ Wasserstoff, Hydroxy oder O-C(=O)C₁₋₅-Alkyl bedeutet, oder R₁₀ und R₁₁ einen zweiwertigen Rest der Formel -CH₂O- bilden; und

R₁₂ CH₃, CH₂OH, CH₂OCH₃, CH₂O-C(=O)CH₃, CHO, CH=NOH oder COOH bedeutet.

[0016] Bevorzugte Verbindungen der Formel (I) sind diejenigen, in denen

R₁ Wasserstoff, -(C=O)C₁₋₅-Alkyl oder eine Oligosaccharidgruppe bedeutet;

R₃ Wasserstoff, Hydroxy, -O(C=O)C₁₋₅-Alkyl, -O(C=O)C₂₋₅-Alkenyl, phenylsubstituiertes -O(C=O)C₂₋₅-Alkenyl bedeutet;

R₄ Wasserstoff, C₁₋₆-Alkyl, -(C=O)C₁₋₅-Alkyl, -(C=O)C₂₋₅-Alkenyl bedeutet;

R₅ CH₂OH, CH₂O-C(=O)CH₃, CHO bedeutet; und

R₆ und R₇ gemeinsam eine Bindung bilden; oder

R₅ und R₆ einen zweiwertigen Rest der Formel

-CH₂-O- (a),

-CH(OR₁₃)-O- (b),

-C(=O)-O- (c)

in der R₁₃ Wasserstoff, C₁₋₆-Alkyl oder -(C=O)C₁₋₅-Alkyl bedeutet, bilden; und

R₇ Wasserstoff bedeutet;

R_{8α} CH₃ bedeutet;

R_{8β} CH₃, CH₂OH, CHO, CH (OCH₃)₂, CH=NOH, COOH bedeutet; oder

R_{8β} und R₃ einen zweiwertigen Rest der Formel -C(=O)-O- bilden; oder

R_{8β} und R₅ einen zweiwertigen Rest der Formel -CH₂O-CHOH- bilden;

R₁₀ CH₃, CH₂OH bedeutet;

R₁₁ Wasserstoff, Hydroxy oder O-C(=O)C₁₋₅-Alkyl bedeutet; oder

R₁₀ und R₁₁ einen zweiwertigen Rest der Formel -CH₂O- bilden; und

R₁₂ CH₃, CH₂OH, CH₂O-C(=O)CH₃, CHO oder CH=NOH bedeutet.

[0017] Besonders bevorzugte Verbindungen der Formel (I) sind diejenigen, in denen

R₁ Wasserstoff oder eine Oligosaccharidgruppe bedeutet;

R₂ Wasserstoff, Hydroxy, -O(C=O)C₁₋₅-Alkyl, -O(C=O)C₂₋₅-Alkenyl, -O(C=O)C₆H₅ oder phenylsubstituiertes -O(C=O)C₂₋₅-Alkenyl bedeutet;

R₃ Wasserstoff, Hydroxy, -O(C=O)C₁₋₅-Alkyl, -O(C=O)C₂₋₅-Alkenyl oder phenylsubstituiertes -O(C=O)C₂₋₅-Alkenyl bedeutet;

R₉ Wasserstoff, C₁₋₆-Alkyl, -(C=O)C₁₋₅-Alkyl, -(C=O)C₂₋₅-Alkenyl oder phenylsubstituiertes -(C=O)C₂₋₅-Alkenyl bedeutet;

R₅ CH₂OH, CH₂OCH₃, CH₂O-C(=O)CH₃, CHO, COOH bedeutet; und

R₆ und R₇ gemeinsam eine Bindung bilden; oder

R₅ und R₆ einen zweiwertigen Rest der Formel

-CH₂-O- (a),

-CH(OR₁₃)-O- (b),

-C(=O)-O- (c),

in der R_{13} Wasserstoff bedeutet, bilden; und
 R_7 Wasserstoff bedeutet;
 $R_{8\alpha}$ und $R_{8\beta}$ beide CH_3 bedeuten;
 R_9 CH_3 bedeutet;
 R_{10} CH_3 bedeutet;
 R_{11} Wasserstoff bedeutet; und
 R_{12} CH bedeutet.

[0018] Die Verbindungen der Formel (I) können nach fachbekannten Verfahren ineinander überführt werden. Besonders interessante Verfahren sind die Verseifung in basischen Medien, die Umesterung in sauren Medien, sowie der enzymatische Abbau des Oligosaccharidrests zu Aglyconen, d.h. Verbindungen der Formel (I), in denen R_1 Wasserstoff bedeutet.

[0019] Für die Behandlung von Leishmaniasen können die Verbindungen der Formel (I) oral, topisch, parenteral, mittels Inhalationsspray oder rektal in Einzeldosisformen, die traditionelle nichttoxische pharmazeutisch annehmbare Träger, Hilfsstoffe und Grundstoffe enthalten, verabreicht werden. Im vorliegenden Zusammenhang beinhaltet der Ausdruck parenteral die subkutane Injektion, die intravenöse, intramuskuläre, intrasternale Injektion, die intraartikuläre Injektion oder Infusionstechniken bei Patienten, die von Infektion mit Leishmanien bedroht sind.

[0020] Die den Wirkstoff enthaltenden pharmazeutischen Zusammensetzungen können in einer Form vorliegen, die sich für die orale Verwendung eignet, z. B. in Form von Tabletten, Trochisci, Pastillen, wäßrigen oder öligen Lösungen oder Suspensionen, dispergierbaren Pulvern oder Granulaten, Emulsionen, Stechkapseln, Weichkapseln, Sirupen oder Elixiren. Zusammensetzungen, die für die orale Verwendung bestimmt sind, können nach einem beliebigen galenischen Verfahren hergestellt werden, und diese Zusammensetzungen können einen oder mehrere Mittel aus der Reihe Süßungsmittel, Geschmacksstoffe, Farbstoffe und Konservierungsmittel enthalten, um zu einem pharmazeutisch eleganten und schmackhaften Präparat zu gelangen. Tabletten enthalten den Wirkstoff in Abmischung mit nichttoxischen pharmazeutisch annehmbaren Grundstoffen, die sich für die Tablettenherstellung eignen, darunter inerte Streckmittel, Granulierhilfsmittel, Sprengmittel und Gleitmittel, was jedoch keine Einschränkung darstellen soll. Die Tabletten können unbeschichtet oder auf bekannte Weise beschichtet sein, um das Zerfallen und die Resorption im Magen-Darm-Trakt zu verzögern, wodurch man zu einer Arzneiform mit hinhaltender Wirkstofffreigabe über einen längeren Zeitraum gelangt, um einen unangenehmen Geschmack bzw. ein unangenehmes Mundgefühl zu maskieren, oder um das Aussehen und die Erkennbarkeit zu verbessern.

[0021] Wäßrige Suspensionen enthalten die Wirkstoffe in Abmischung mit Grundstoffen, die sich für die Herstellung von wäßrigen Suspensionen eignen. Solche Grundstoffe sind Suspendiermittel, Dispergiermittel oder Netzmittel. Diese wäßrigen Suspensionen können auch ein oder mehrere Konservierungsmittel enthalten, und ölige Suspensionen können dadurch formuliert werden, daß man den Wirkstoff in einem geeigneten pflanzlichen Öl oder in einem Mineralöl, wie Paraffinöl, suspendiert. Die öligen Suspensionen können Verdickungsmittel, Süßmittel und Geschmacksstoffe enthalten, um zu einem schmackhaften Oralpräparat zu gelangen. Diese Zusammensetzungen können durch Zusatz eines annehmbaren Antioxidans konserviert werden.

[0022] Dispergierbare Pulver und Granulate, die sich für die Herstellung von wäßrigen Suspensionen durch Zugabe von Wasser eignen, stellen den Wirkstoff in Abmischung mit einem Dispergiermittel oder Netzmittel, Suspendiermittel und einem oder mehreren Konservierungsmitteln bereit.

[0023] Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen können auch in Form von Öl-in-Wasser- (o/w) oder Wasser-in-Öl- (w/o) Emulsionen vorliegen. Bei der Ölphase kann es sich um ein pharmazeutisch geeignetes pflanzliches Öl, Erdnußöle, oder ein Mineralöl handeln, das geeignete Emulgatoren und Antioxidantien enthält. Die wäßrige Phase kann Emulgatoren, Verdickungsmittel und Konservierungsmittel enthalten. Die Emulsionen können auch Süßmittel, Farbstoffe und Geschmacksstoffe enthalten.

[0024] Sirupe und Elixiere können mit Süßmitteln formuliert werden. Solche Formulierungen können auch ein reizstillendes Mittel, ein Konservierungsmittel sowie Geschmacks- und Farbstoffe enthalten.

[0025] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können in Form eines sterilen Injektionspräparats, z.B. als sterile wäßrige oder ölige Injektionslösung oder -suspension in einem nichttoxischen parenteral annehmbaren Verdünnungsmittel oder Lösungsmittel, vorliegen. Zu den annehmbaren Konstituenten und Lösungsmitteln, die verwendet werden können, zählen Wasser, Ringersche Lösung sowie isotonische Natriumchloridlösungen.

sungen. Zusätzlich werden sterile fixierte Öle traditionell als Lösungsmittel oder Suspensionsmittel verwendet. Für diesen Zweck kann jedes neutrale fixierte Öl verwendet werden, darunter synthetische Mono- oder Diglyceride, Fettsäuren und andere geeignete Zusatzstoffe für Iniektabilia. Suspensionen können gemäß bekannten Techniken unter Verwendung von geeigneten Dispergier- oder Netzmitteln und Suspensionsmitteln hergestellt werden.

[0026] Die Verbindungen der Formel (I) können auch in Form von Suppositorien oder anderen Formulierungen, wie Lösungen oder Suspensionen für die rektale Verabreichung des Arzneistoffs, verabreicht werden. Suppositorien können dadurch hergestellt werden, daß man den Arzneistoff mit einem geeigneten nichtreizenden Grundstoff, der bei Normaltemperaturen fest, bei der Rektaltemperatur jedoch flüssig ist und so den Arzneistoff abgibt, vermischt.

[0027] Die Tagesdosis der Verbindungen der Formel (I) können in einem weiten Bereich schwanken, z.B. von 1,0 bis 2000 mg. Vorzugsweise wird die Verbindung der Formel (I) in Form einer pharmazeutischen Zusammenstellung gemeinsam mit einem Träger für eine geeignete Dosierung für den zu behandelnden Patienten in unterteilten Dosen, die 5, 10, 25, 50, 100, 150, 250 oder 500 mg Wirkstoff enthalten, verabreicht. Eine wirksame Menge des Arzneistoffs wird normalerweise in einem Dosierbereich von ungefähr 0,01 mg bis ungefähr 50 mg/kg Körpergewicht bereitgestellt. Vorzugsweise beträgt der Bereich ungefähr 0,1 mg bis ungefähr 7 mg/kg Körpergewicht.

[0028] Es ist natürlich klar, daß das spezifische Dosisniveau für einen bestimmten Patienten von verschiedenen Faktoren, darunter der Wirksamkeit der jeweiligen verwendeten Verbindung, dem Alter, dem Körpergewicht, dem allgemeinen Gesundheitszustand, dem Geschlecht, der Ernährung, der Verabreichungszeit, dem Verabreichungsweg, der Ausscheidungsgeschwindigkeit, der Arzneistoffkombination sowie der Schwere und den betroffenen Organsystemen, denen die Therapie gelten soll, abhängt.

VERSUCHSTEIL

AUFREINIGUNG VON TRITERPENSAPONINEN AUS MAESA BALANSAE

[0029] Die luftgetrockneten pulverisierten Blätter (3 kg) von *Maesa balansae* wurden zur Entfernung von unpolaren Substanzen mit Chloroform und anschließend mit Methanol:Wasser (9:1) extrahiert. Der alkoholische Extrakt wurde unter verringertem Druck eingedampft und der Rückstand zwischen n-Butanol (wassergesättigt) und Wasser verteilt. Die organische Schicht wurde zur Trockne abgedampft und der Rückstand wurde mit Aceton gewaschen und filtriert. Der acetonunlösliche Teil, der die Saponine enthält (10 g), wurde mittels Umkehrphasen-HPLC (stationäre Phase: RP-18 HS BDS Hyperprep 100 Å, 8 µm; 200 g, Ø der Säule: 5 cm) mit einem gradientenelutionsmittelsystem unter Verwendung von:

A: 0,5% Ammoniumacetat in Wasser,

B: Methanol sowie

C: Acetonitril

bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 80 ml/min und UV-Detektion bei 235 nm gereinigt. Mit dem Gradientenelutionssystem von A:B:C (60:20:20) zum Zeitpunkt t = 0 min nach A:B:C (0:50:50) zum Zeitpunkt t = 50 min erhält man ein reines Saponingemisch (5 g), das sechs Verbindungen umfaßt.

[0030] Jedes dieser sechs Saponine wurde an der gleichen Säule unter den gleichen Bedingungen unter Verwendung des oben beschriebenen Lösungsmittelgradientensystems aufgereinigt. Es eluierten der Reihe nach die folgenden Verbindungen:

Verbindung 1: MG = 1532, λ_{\max} = 223,3 nm, wurde weiter mit dem isokratischen Lösungsmittelsystem A:B:C (33:64:03) gereinigt; Ausbeute 230 mg.

Verbindung 2: MG = 1510, λ_{\max} = 209,2 nm; Gradientenelutionssystem: von A:B:C (42:29:29) zum Zeitpunkt t = 0 min bis A:B:C (24:38:38) zum Zeitpunkt t = Ende; Ausbeute 110 mg.

Verbindung 3: MG = 1532, λ_{\max} = 222,1 nm; isokratisches Lösungsmittelsystem A:B:C (40:30:30); Ausbeute 1000 mg.

Verbindung 4: MG = 1510, λ_{\max} = 202,2 nm; isokratisches Lösungsmittelsystem A:B:C (59:00:41); Ausbeute 1000 mg.

Verbindung 5: MG = 1574, λ_{\max} = 203,4 nm; isokratisches Lösungsmittelsystem A:B:C (32:34:34); Ausbeute 220 mg.

Verbindung 6: MG = 1552, λ_{\max} = 216,3 nm; isokratisches Lösungsmittelsystem A:B:C (32:34:34) unter 4maliger Wiederverwendung; Ausbeute 230 mg.

AUSWERTUNG DER WIRKSAMKEIT GEGEN LEISHMANIEN

[0031] Der in den folgenden Beispielen verwendete Testarzneistoff PX umfaßt das aus *Maesa balansae* aufgereinigte Saponingemisch.

1. Wirksamkeit gegen Leishmanien in vitro

[0032] In der internationalen Literatur finden sich zahlreiche Beschreibungen von Verfahren für die in-vitro-Züchtung von *Leishmania*-Organismen und die Durchmusterungstechnik. Die Testprotokolle sind flexibel und können an die jeweiligen Ziele und Eigenschaften der Prüfverbindungen angepaßt werden. Kurz gefaßt wurde die folgende in-vitro-Technik verwendet:

Von Labornagetieren oder von Makrophagenzelllinien stammende primäre peritoneale Makrophagen wurden in Multiwell-Gewebekulturgefäße überimpft und ungefähr 24 Stunden lang anheften gelassen. Amastigoten der *Leishmania*-Arten (die von Zielgeweben eines infizierten Donatortiers oder von mit Amastigoten infizierten Gewebekulturen stammten) oder Promastigoten der *Leishmania*-Arten wurden in einem geeigneten Infektionsverhältnis gemeinsam mit unterschiedlich reihenverdünnten Konzentrationen des Arzneistoffs bzw. der Prüfverbindung gegeben. Der Prüfarnzneistoff wurde in einem geeigneten Lösungsmittel, das mit dem in-vitro-Testsystem verträglich war (DMSO; Wasser, Alkohole und dergleichen funktionieren auch gut) vorgelöst und zu dem Gewebekulturmedium gegeben. Die Kulturen wurden 5-15 Tage bei 37°C in 5% CO₂ inkubiert. Um einen Selektivitätsindex zu bestimmen, wurde auch eine Behandlung von nichtinfizierten Kontrollkulturen mitgeführt. Außerdem wurden mit Referenzarzneistoffen behandelte Kulturen mitgeführt, um die relative Wirksamkeit des Prüfarnzneistoffs zu bestimmen. Die Wirksamkeit des Arzneistoffs wurde in gefärbten Präparaten als prozentuale Verringerung der Gesamtparasitenbelastung bzw. Anzahl infizierter Makrophagen im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollkulturen bestimmt. Die Auswertung wurde mikroskopisch durchgeführt, und es wurden die EC₅₀-Werte (wirksame Konzentration für eine 50%ige Hemmung) bestimmt. Die prozentuale Verringerung und der EC₅₀-Wert dienen als Anhaltspunkt für die Wirksamkeit gegen Leishmaniasen in vitro und dienen als wichtige Hinweise auf klinisch nützliche Mittel.

Tabelle I: Wirksamkeit gegen Leishmanien in vitro bei primären Maus-Makrophagen

Leishmania-Art		EC ₅₀ (Mikrogramm/ml)				
		PX	Meglumin	Pento-stam	Ampho-B	Itra-conazol
Darm	<i>L. donovani</i>	0,05	12	6	0,1	>12,5
	<i>L. infantum</i>	0,05	12	6	0,1	>12,5
Haut	<i>L. mexicana</i>	1	>50	25	0,1	n.b.
	<i>L. major</i>	5	>50	>50	0,2	n.b.
Haut/	<i>L. panamensis</i>	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Schleimhaut	<i>L. major</i>	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

n.b.: nicht bestimmt

2. Wirksamkeit gegen Leishmanien in vivo

[0033] In der internationalen Literatur finden sich zahlreiche Beschreibungen von Verfahren für die Erhaltung von *Leishmania*-Organismen in vivo und Tiermodellen. Die bevorzugte Labortierart für die Primärisolation, Erhaltung und Verwendung in künstlichen Infektionsmodellen sind Balb-C-Mäuse und Goldhamster. Die Testprotokolle sind flexibel und können an die jeweiligen Ziele und Eigenschaften der Prüfverbindungen angepaßt werden. Kurz gefaßt wurde die folgende in-vivo-Technik verwendet:

Für den Darm befallende *Leishmania*-Arten: Balb-C-Mäuse oder junge Hamster wurden intravenös mit ungefähr 10⁶-10⁷ Amastigoten, die von den Zielorganen (im allgemeinen der Milz) eines infizierten Donatortiers oder von einer in-vitro-Kultur der Parasitenformen stammten, infiziert. Die Tiere wurden mit unterschiedlichen Do-

sismengen der Prüfverbindung behandelt (Dosisbereich: 0,1 bis 80 mg/kg in 100% DMSO oder einem beliebigen anderen verträglichen Konstituenten), wobei unterschiedliche Verabreichungswege und Behandlungsschemata verwendet wurden. Mit der Behandlung wurde entweder zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion (kurativ), zugleich mit der Infektion (prophylaktisch) oder vor der Infektion (Residualwirkung) begonnen. In der Anlage der prophylaktischen Studie wird die erste Verabreichung des Prüfartzeinstoffs unmittelbar vor oder zusammen mit der künstlichen Infektion mit der Leishmania-Art gegeben. In der Anlage der kurativen Studie wird die erste Verabreichung des Prüfartzeinstoffs mehrere Wochen nach der künstlichen Infektion mit der Leishmania-Art gegeben (früh-kurativ = wenn die ersten klinischen Symptome in Erscheinung treten; spät-kurativ = wenn die klinischen Symptome gut etabliert sind bzw. chronisch werden). Die Wirksamkeit des Arzneistoffs wurde durch Bestimmung der Gesamtparasitenbelastung in der Leber oder einem beliebigen anderen relevanten Zielgewebe/Organ im Vergleich mit der Belastung des Gewebes/Organs bei unbehandelten Kontrolltieren ausgewertet. Die mittlere Amastigotenzahl wird quantitativ oder semiquantitativ anhand von gefärbten Abdruck-Ausstrichpräparaten oder Objektträgern ausgezählt. Die prozentuale Verringerung dient als Anhaltspunkt für die Wirksamkeit gegen Leishmaniasen und gibt wichtige Hinweise auf klinisch nützliche Mittel. Die minimale Wirkdosis (Lowest Active Dose; LAD) wird als niedrigste Dosis definiert, bei der die Parasitenbelastung in dem Primärzielorgan/Gewebe um mindestens 80% verringert wird.

Tabelle II: Wirksamkeit gegen Leishmanien in vivo bei der Maus und beim Hamster gegen Leishmania-Arten, die den Darm befallen

Tier	Dosierungsschema		% Reduktion der Parasitenbelastung im Zielorgan nach parenteraler Verabreichung von (mg/kg)							
			40	20	10	5	2,5	1,25	0,63	0,32
Art	Häufigkeit	Zeitpunkt								
Maus	5x	proph.	100	100	100	100	100	100	100	98
		kurat.	100	100	100	100	100			
	1x	proph.	100	100	100	100	100			
		kurat.				98	90	80		
Hamster	5x	proph.	100	100	100					
		kurat.				100	100			
	1x	proph.				100	100	100		
		kurat.								

Tabelle III: In-vitro- und in-vivo-Wirkung gegen die den Darm befallende Art *Leishmania infantum*

Produkt	Wirksamkeit gegen <i>L. infantum</i>		Ergebnis Wirksamkeits- beurteilung
	in vitro IC50 (ng/ml)	in vivo LAD (mg/kg 1x)	
PX	50	0,4	+++
Verbindung 1	70	0,8	++
Verbindung 2	50	>0,8	++
Verbindung 3	20	0,2	+++
Verbindung 4	20	0,4	+++
Verbindung 5	3400	>0,8	+
Verbindung 6	700	>0,8	+
Tri-OH-Derivat	10 000	>40	unwirksam
Aglycon-Derivat	>50 000	>40	unwirksam

[0034] Für die Haut bzw. die Haut/Schleimhaut befallende *Leishmania*-Arten: Balb-C-Mäuse oder junge Hamster wurden intradermal oder subkutan mit ungefähr 10^6 bis 10^7 Amastigoten, die von den Zielorganen (im allgemeinen Hautläsionen) eines infizierten Donortiers oder von einer in-vitro-Kultur der Parasitenformen stammten, infiziert. Die Tiere wurden mit unterschiedlichen Dosismengen der Prüfverbindung behandelt mg/kg in 100 DMSO oder einem beliebigen anderen verträglichen Konstituenten), wobei unterschiedliche Verabreichungswege und Behandlungsschemata verwendet wurden. Mit der Behandlung wurde entweder vor der Infektion (prophylaktisch) oder zu unterschiedlichen Zeiten nach der Infektion (kurativ) begonnen. In der Anlage der prophylaktischen Studie wird die erste Verabreichung des Prüfpräparates unmittelbar vor oder zusammen mit der künstlichen Infektion mit der *Leishmania*-Art gegeben. In der Anlage der kurativen Studie wird die erste Verabreichung des Prüfpräparates mehrere Wochen nach der künstlichen Infektion mit der *Leishmania*-Art gegeben (früh-kurativ = wenn die ersten Hautläsionen in Erscheinung treten; spät-kurativ = wenn die Hautläsionen gut etabliert sind bzw. chronisch werden). Die Aktivität des Arzneistoffs wurde entweder durch Bestimmung der Schwere der Läsion in dem entsprechenden Zielgewebe/Organ (primärer Parameter) oder der Parasitenbelastung in dem entsprechenden Zielgewebe/Organ (sekundärer Parameter) im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren bestimmt. Die Läsionsgröße wurde quantitativ nach dem Verfahren von J. El-On. und A. D. Hamburger [Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 81, 734-737 (1987)] beurteilt. Die prozentuale Verringerung dient als Anhaltspunkt für die Wirksamkeit gegen Leishmaniasen und gibt wichtige Hinweise auf klinisch nützliche Mittel. Die minimale Wirkdosis (Lowest Active Dose; LAD) wird als niedrigste Dosis definiert, die die Entwicklung von Läsionen verhindert, ein weiteres Fortschreiten der Läsionen aufhält oder eine klinische Heilung der Läsionen in dem primären Zielorgan oder -gewebe induziert.

Tabelle IV: in-vivo-Wirkung gegen Leishmanien bei Mäusen und Hamstern gegen die Haut bzw. die Haut/Schleimhaut befallende *Leishmania*-Arten

A. Prophylaktische Behandlung

[0035] Bei der Anlage der prophylaktischen Studie wird die erste Verabreichung des Prüfpräparates unmittelbar vor der künstlichen Infektion mit der *Leishmania*-Art gegeben

<i>L.mexicana</i> (proph.) Gruppe	Größe der Hautläsion* nach der angegebenen Anzahl Wochen nach der Infektion												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Unbehandelte Kontrolle	0	0	0	0	0	1	1	10	33	59	86	108	98
Ampho-B 10 mg/kg	0	0	0	0	0	1	2	7	13	34	85	101	112
Pentostam 250 mg/kg	0	0	0	0	0	0	1	9	13	22	37	50	51
PX 10 mg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PX 5 mg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PX 2,5 mg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* Berechnung nach der folgenden Formel:

[senkrechter Durchmesser x waagerechter Durchmesser]/2 mm²)

<i>L.major</i> (proph.) Gruppe	Größe der Hautläsion* nach der angegebenen Anzahl Wochen nach der Infektion								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Unbehandelte Kontrolle	0	0	1	1	17	20	27	72	113
Ampho-B 10 mg/kg	0	0	1	1	12	31	41	57	95
Pentostam 250 mg/kg	0	0	1	1	7	16	20	32	60
PX 10 mg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PX 5 mg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PX 2,5 mg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* Berechnung nach der folgenden Formel:

[senkrechter Durchmesser x waagerechter Durchmesser]/2 mm²)

<i>L.panamensis</i> (proph.) Gruppe	Größe der Hautläsion* nach der angegebenen Anzahl Wochen nach der Infektion												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Unbehandelte Kontrolle	0	0	0	0	1	6	30	42	49	58	55	67	56
Ampho-B 10 mg/kg	0	0	0	0	1	9	15	30	30	42	42	43	39
Pentostam 250 mg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PX 10 mg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PX 5 mg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PX 2,5 mg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* Berechnung nach der folgenden Formel:

$[\text{senkrechter Durchmesser} \times \text{waagerechter Durchmesser}] / 2 \text{ mm}^2$

B. Kurative Behandlung

[0036] Bei der Anlage der kurativen Studie wird die erste Verabreichung des Prüfärzneistoffs mehrere Wochen nach der künstlichen Infektion mit der Leishmania-Art gegeben (im allgemeinen dann, wenn die ersten klinischen Anzeichen auftreten).

<i>L.mexi- cana</i> (kurat.) Gruppe	Dosis mg/kg	Häufigk./ Woche	Größe der Hautläsion* nach der angegebenen Anzahl Wochen nach der Infektion				
			5**	6	7	8	9
Unbe- handelte Kontrolle			1,7	3,6	10,7	17,7	32,8
Pentostam	250	2x	2,5	4,9	8,5	13,3	19,2
PX	1	1x	1,8	3,6	4,2	3,1	2,2
PX	1	2x	2,2	3,7	3,6	2,4	2,3
PX	2	1x	1,6	2,6	1,3	1,3	1,4
PX	2	2x	1,3	1,1	1,8	0,7	0,6

* Berechnung nach der folgenden Formel:

$[\text{senkrechter Durchmesser} \times \text{waagerechter Durchmesser}] / 2 \text{ mm}^2$

** Behandlungsbeginn

<i>L. major</i> (kurat.) Gruppe	Dosis mg/kg	Häufigk./ Woche	Größe der Hautläsion* nach der angegebenen Anzahl Wochen nach der Infektion							
			2**	3	4	5	6	7	8	9
Unbe- handelte Kontrolle			1	14	32	42	50	59	64	148
Pentostam	250	2x	1	13	24	33	36	42	48	123
PX	1	1x	1	14	27	34	40	46	59	64
PX	1	2x	1	12	19	27	32	33	32	33
PX	2	1x	1	16	25	30	33	38	42	42
PX	2	2x	1	9	23	29	30	28	32	35

* Berechnung nach der folgenden Formel:

[senkrechter Durchmesser x waagerechter Durchmesser]/2 mm²)

** Behandlungsbeginn

<i>L. pana- mensis</i> (kurat.) Gruppe	Dosis mg/kg	Häufigk./ Woche	Größe der Hautläsion* nach der angegebenen Anzahl Wochen nach der Infektion				
			5**	6	7	8	9
Unbe- handelte Kontrolle			2,8	8,5	20,8	30,5	
Pentostam	250	2x	2,3	1,2	0,5	0,1	
PX	1	1x	2,2	2,1	3,5	3,7	
PX	1	2x	1,2	1,8	2,8	1,2	
PX	2	1x	1,9	4,0	4,8	2,6	
PX	2	2x	2,9	1,6	2,3	1,7	

* Berechnung nach der folgenden Formel:

[senkrechter Durchmesser x waagerechter Durchmesser]/2 mm²)

** Behandlungsbeginn

Tabelle V: in-vivo-Antileishmanien-Wirkung der PX-Mischung gegen unterschiedliche Leishmania-Arten

Modell	Behandlung mit der minimalen Wirkdosis (LAD) bei Balb-C-Mäusen*		
	PX	Natrium- Stibogluconat Pentostam®	Amphotericin-B Fungizone®
<i>L. donovani</i>			
prophylaktisch	0,4 mg/kg, 1x	250 mg/kg, 1x	unwirksam
früh-kurativ	1,6 mg/kg, 1x	250 mg/kg, 1x	unwirksam
spät-kurativ	n.b.	n.b.	n.b.
Residualwirkung	5 Tage nach 2,5 mg/kg Einzeldosis	n.b.	unwirksam
<i>L. mexicana</i>			
prophylaktisch	<0,5 mg/kg, 6x (alle zwei Tage)	>>250 mg/kg, 6x (alle zwei Tage)	unwirksam
früh-kurativ	<1 mg/kg, 4x (innerhalb 4 Wochen)	>>250 mg/kg, 8x (innerhalb 4 Wochen)	n.b.
spät-kurativ	<1 mg/kg, 2x pro Woche über 4 Wochen	n.b.	n.b.
<i>L. panamensis</i>			
prophylaktisch	<0,5 mg/kg, 6x (alle zwei Tage)	<250 mg/kg, 6x (alle zwei Tage)	unwirksam
früh-kurativ	1 mg/kg, 4x (innerhalb 4 Wochen)	<250 mg/kg, 8x (innerhalb 4 Wochen)	n.b.
spät-kurativ	<1 mg/kg, 2x pro Woche über 4 Wochen	n.b.	n.b.

	Behandlung mit der minimalen Wirkdosis (LAD) bei Balb-C-Mäusen*		
Modell	PX	Natrium- Stibogluconat Pentostam®	Amphotheri- cin-B Fungizon®
<i>L. major</i> prophylaktisch	2 mg/kg, 6x (alle zwei Tage)	>>250 mg/kg, 6x (alle zwei Tage)	unwirksam
früh-kurativ	1 mg/kg, 4x (innerhalb 4 Wochen)	>>250 mg/kg, 8x (innerhalb 4 Wochen)	n.b.
spät-kurativ	1 mg/kg, 22x (innerhalb 11 Wochen)	n.b.	n.b.

*: Bestimmung aufgrund der Amastigotenbelastung in der Leber für die Eingeweideformen und der Läsionsgröße für die Hautformen

Patentansprüche

1. Triterpensaponin, das mit einem Verfahren zur Isolation von Triterpensaponinen aus der Familie Myrsinaceae erhältlich ist, wobei die Saponine aus der Pflanzenart *Maesa balansae* isoliert werden, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfaßt:

- (a) Extrahieren der getrockneten Pflanzenteile mit einem Alkohol und Einengen des Extrakts,
- (b) Entfernen der unpolaren Fraktion aus dem Extrakt mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion mit einem unpolaren Lösungsmittel,
- (c) weitere Aufreinigung der Saponine in dem Alkoholextrakt mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion, Filtration und Chromatographie, und
- (d) die Chromatographie umfaßt eine Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie mit einem Gradientenelutionssystem unter Verwendung von

A: 0,5% Ammoniumacetat in Wasser

B: Methanol

C: Acetonitril

wobei zum Zeitpunkt $t = 0$ (A:B:C)=(60:20:20) und zum Zeitpunkt $t = \text{Ende}$ (A:B:C)=(0:50:50) und

wobei das Saponin die folgenden Kennwerte aufweist:

Verbindung 1: MG = 1532, λ_{max} = 228,6 nm, $\lambda_{\text{max}2}$ = 273,3 nm;

Verbindung 2: MG = 1510, λ_{max} = 223,9 nm, $\lambda_{\text{max}2}$ = 274,5 nm;

Verbindung 3: MG = 1532, λ_{max} = 279,2 nm, $\lambda_{\text{max}2}$ = 223,9 nm;

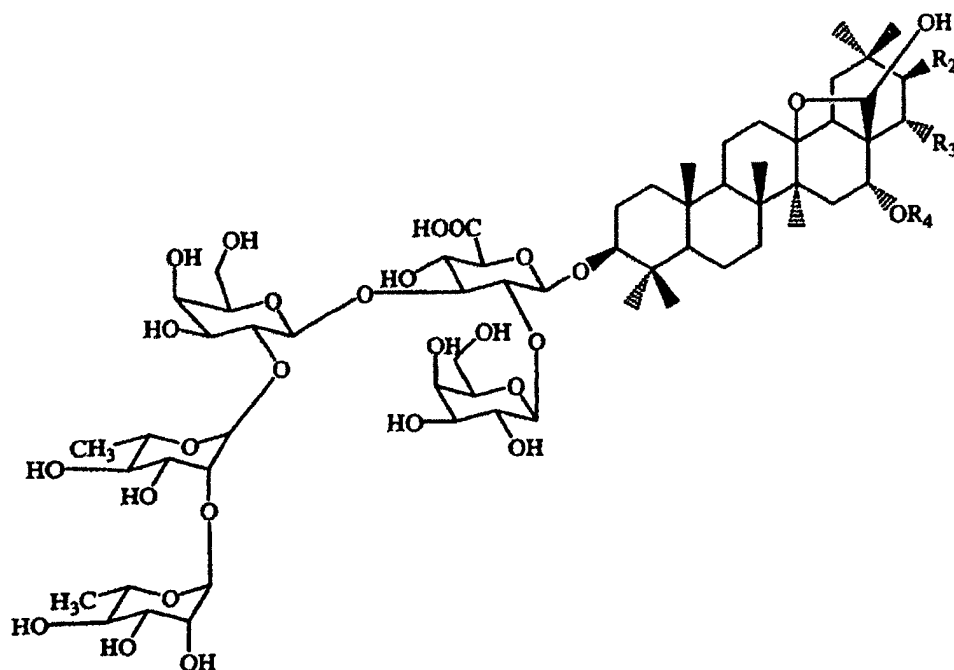
Verbindung 4: MG = 1510, λ_{max} = 280,4 nm, $\lambda_{\text{max}2}$ = 222,7 nm;

Verbindung 5: MG = 1574, λ_{max} = 276,8 nm, $\lambda_{\text{max}2}$ = 225, 0 nm bzw.

Verbindung 6: MG = 1552, λ_{max} = 279,2 nm,

$\lambda_{\text{max}2}$ = 223,9 nm.

2. Triterpensaponin mit der Formel



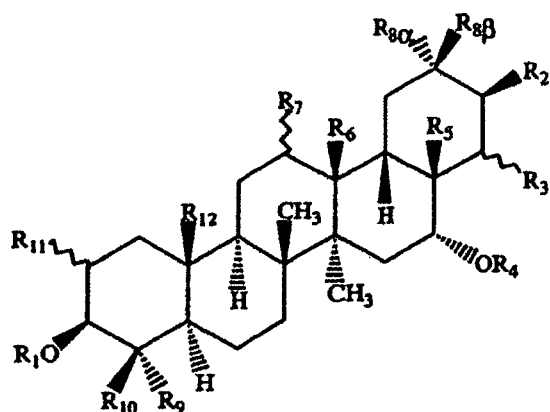
in der R_2 $-\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{C}_6\text{H}_5$ oder $-\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_3$ bedeutet,
 R_3 (E)- oder (Z)- $\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{CH}=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_5$ bedeutet und
 R_4 Wasserstoff oder $-(\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ bedeutet.

3. Verbindung nach Anspruch 2, wobei
 in Verbindung 1 R_2 $-\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{C}_6\text{H}_5$ bedeutet,
 R_3 (Z)- $\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{CH}=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_5$ bedeutet,
 R_4 Wasserstoff bedeutet;
 in Verbindung 2 R_2 $-\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_3$ bedeutet,
 R_3 (Z)- $\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{CH}=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_5$ bedeutet,
 R_4 Wasserstoff bedeutet;
 in Verbindung 3 R_2 $-\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{C}_6\text{H}_5$ bedeutet,
 R_3 (E)- $\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{CH}=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_5$ bedeutet,
 R_4 Wasserstoff bedeutet;
 in Verbindung 4 R_2 $-\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_3$ bedeutet,
 R_3 (E)- $\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{CH}=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_5$ bedeutet,
 R_4 Wasserstoff bedeutet;
 in Verbindung 5 R_2 $-\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{C}_6\text{H}_5$ bedeutet,
 R_3 (E)- $\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{CH}=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_5$ bedeutet,
 R_4 $-(\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ bedeutet;
 in Verbindung 6 R_2 $-\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_3$ bedeutet,
 R_3 (E)- $\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{CH}=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_5$ bedeutet,
 R_4 $-(\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ bedeutet.

4. Pharmazeutische Zusammensetzung, die einen pharmazeutisch unbedenklichen Träger sowie als Wirkstoff ein wie in Anspruch 1, 2 oder 3 definiertes Triterpensaponin enthält.

5. Zusammensetzung nach Anspruch 4, das an den parenteralen Verabreichungsweg angepaßt ist.

6. Verwendung von einem oder mehreren Triterpensaponinen zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Leishmania-Erkrankungen in Wirten, die mit Leishmania-Arten infiziert sind, dadurch gekennzeichnet, daß das Saponin die Formel



oder eine ihrer stereoisomeren Formen oder eines ihrer pharmazeutisch unbedenklichen Additionssalze aufweist, in der

R_1 Wasserstoff, $-(C=O)C_{1-5}$ -Alkyl, $-(C=O)C_{2-5}$ -Alkenyl, phenylsubstituiertes $-(C=O)C_{2-5}$ -Alkenyl, eine Monosaccharidgruppe oder eine Oligosaccharidgruppe bedeutet;

R_2 Wasserstoff, Hydroxy, $-O(C=O)C_{1-5}$ -Alkyl, $-O(C=O)C_{2-5}$ -Alkenyl, $-O(C=O)C_6H_5$ oder phenylsubstituiertes $-O(C=O)C_{2-5}$ -Alkenyl bedeutet;

R_3 Wasserstoff, Hydroxy, $-O(C=O)C_{1-5}$ -Alkyl, $-O(C=O)C_{2-5}$ -Alkenyl, $-O(C=O)C_6H_5$ oder phenylsubstituiertes $-O(C=O)C_{2-5}$ -Alkenyl bedeutet;

R_4 Wasserstoff, C_{1-6} -Alkyl, $-(C=O)C_{1-5}$ -Alkyl, $-(C=O)C_{2-5}$ -Alkenyl, $-(C=O)C_6H_5$ oder phenylsubstituiertes $-(C=O)C_{2-5}$ -Alkenyl bedeutet;

R_5 CH_3 , CH_2OH , CH_2OCH_3 , $CH_2O-C(=O)CH_3$, CHO , $COOH$ bedeutet; oder

R_5 und R_2 einen zweiwertigen Rest der Formel $-C(=O)-O-$ bilden;

R_6 und R_7 Wasserstoff bedeuten oder gemeinsam eine Bindung bilden; oder

R_5 und R_6 einen zweiwertigen Rest der Formel

$-CH_2-O-$ (a),

$-CH(OR_{13})-O-$ (b),

$-C(=O)-O-$ (c),

in der R_{13} Wasserstoff, C_{1-6} -Alkyl oder $-(C=O)C_{1-5}$ -Alkyl bedeutet, bilden;

$R_{8\alpha}$ und $R_{8\beta}$ jeweils unabhängig voneinander CH_3 , CH_2OH , CH_2OCH_3 , $CH_2O-C(=O)C_{1-5}$ -Alkyl, CHO , $CH(OCH_3)_2$, $CH=NOH$, $COOH$ bedeuten;

$R_{8\beta}$ und R_3 einen zweiwertigen Rest der Formel $-C(=O)-O-$ bilden;

$R_{8\beta}$ und R_5 einen zweiwertigen Rest der Formel $-CH_2O-CHOH-$ bilden;

R_9 CH_3 , CH_2OH , CH_2OCH_3 , $CH_2O-C(=O)C_{1-5}$ -Alkyl, CHO , $COOH$ bedeutet;

R_{10} CH_3 , CH_2OH , CH_2OCH_3 , $CH_2O-C(=O)C_{1-5}$ -Alkyl, CHO , $COOH$ bedeutet;

R_{11} Wasserstoff, Hydroxy oder $O-C(=O)C_{1-5}$ -Alkyl bedeutet, oder R_{10} und R_{11} einen zweiwertigen Rest der Formel $-CH_2O-$ bilden; und

R_{12} CH_3 , CH_2OH , CH_2OCH_3 , $CH_2O-C(=O)CH_3$, CHO , $CH=NOH$ oder $COOH$ bedeutet.

7. Verwendung nach Anspruch 6, wobei

R_1 Wasserstoff, $-(C=O)C_{1-5}$ -Alkyl oder eine Oligosaccharidgruppe bedeutet;

R_3 Wasserstoff, Hydroxy, $-O(C=O)C_{1-5}$ -Alkyl, $-O(C=O)C_{2-5}$ -Alkenyl, phenylsubstituiertes $-O(C=O)C_{2-5}$ -Alkenyl bedeutet;

R_4 Wasserstoff, C_{1-6} -Alkyl, $-(C=O)C_{1-5}$ -Alkyl, $-(C=O)C_{2-5}$ -Alkenyl bedeutet;

R_5 CH_2OH , $CH_2O-C(=O)CH_3$, CHO bedeutet; und

R_6 und R_7 gemeinsam eine Bindung bilden; oder

R_5 und R_6 einen zweiwertigen Rest der Formel

$-CH_2-O-$ (a),

$-CH(OR_{13})-O-$ (b),

$-C(=O)-O-$ (c),

in der R_{13} Wasserstoff, C_{1-6} -Alkyl oder $-(C=O)C_{1-5}$ -Alkyl bedeutet, bilden; und

R_7 Wasserstoff bedeutet;

$R_{8\beta}$ CH_3 , CH_2OH , CHO , $CH(OCH_3)_2$, $CH=NOH$, $COOH$ bedeutet;

$R_{8\alpha}$ CH_3 bedeutet;

$R_{8\beta}$ und R_3 einen zweiwertigen Rest der Formel $-C(=O)-O-$ bilden; oder

$R_{8\beta}$ und R_5 einen zweiwertigen Rest der Formel $-CH_2O-CHOH-$ bilden;

R_{10} CH_3 , CH_2OH bedeutet;

R_{11} Wasserstoff, Hydroxy oder $O-C(=O)C_{1-5}$ -Alkyl bedeutet; oder

R_{10} und R_{11} einen zweiwertigen Rest der Formel $-CH_2O-$ bilden; und

R_{12} CH_3 , CH_2OH , $CH_2O-C(=O)CH_3$, CHO oder $CH=NOH$ bedeutet.

8. Verwendung nach Anspruch 7, wobei

R_1 Wasserstoff oder eine Oligosaccharidgruppe bedeutet;

R_2 Wasserstoff, Hydroxy, $-O(C=O)C_{1-5}$ -Alkyl, $-O(C=O)C_{2-5}$ -Alkenyl, $-O(C=O)C_6H_5$ oder phenylsubstituiertes $-O(C=O)C_{2-5}$ -Alkenyl bedeutet;

R_3 Wasserstoff, Hydroxy, $-O(C=O)C_{1-5}$ -Alkyl, $-O(C=O)C_{2-5}$ -Alkenyl oder phenylsubstituiertes $-O(C=O)C_{2-5}$ -Alkenyl bedeutet;

R_4 Wasserstoff, C_{1-6} -Alkyl, $-(C=O)C_{1-5}$ -Alkyl, $-(C=O)C_{2-5}$ -Alkenyl oder phenylsubstituiertes $-(C=O)C_{2-5}$ -Alkenyl bedeutet;

R_5 CH_2OH , CH_2OCH_3 , $CH_2O-C(=O)CH_3$, CHO , $COOH$ bedeutet; und

R_6 und R_7 gemeinsam eine Bindung bilden; oder

R_5 und R_6 einen zweiwertigen Rest der Formel

$-CH_2-O-$ (a),

$-CH(OR_{13})-O-$ (b),

$-C(=O)-O-$ (c),

in der R_{13} Wasserstoff bedeutet, bilden; und

R_7 Wasserstoff bedeutet;

$R_{8\alpha}$ und $R_{8\beta}$ beide CH_3 bedeuten;

R_9 CH_3 bedeutet;

R_{10} CH_3 bedeutet;

R_{11} Wasserstoff bedeutet; und

R_{12} CH_3 bedeutet.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen