

12

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 10.04.01.

30 Priorité :

43 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 11.10.02 Bulletin 02/41.

56 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

60 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

71 Demandeur(s) : SOCIETE DE CONSEILS DE
RECHERCHES ET D'APPLICATIONS SCIENTIFI-
QUES SCRAS Société par actions simplifiée — FR.

72 Inventeur(s) : TENG BENG POON.

73 Titulaire(s) :

74 Mandataire(s) : BEAUFOR IPSEN-S.C.R.A.S.

54 PROCEDE DE PREPARATION D'UNE EXTRAIT DE FEUILLES DE GINKGO BILOBA HAUTEMENT ENRICHI EN
PRINCIPES ACTIFS.

57 L'invention concerne un procédé de préparation d'un
extrait de feuilles de Ginkgo biloba contenant au moins 50
% de flavone-glycosides et 12 % de terpène-lactones, le-
quel comporte les étapes successives suivantes:

i. extraction de la poudre sèche de feuilles de Ginkgo bi-
loba dans de l'éthanol contenant au maximum 20 % en
poids d'eau;

ii. concentration de l'extrait sous pression réduite jus-
qu'à obtenir un concentré contenant entre 30 et 40 % de so-
lides, ajout d'une solution aqueuse de chlorure de sodium
puis poursuite de l'évaporation sous pression réduite pour
éliminer l'éthanol et élimination de l'huile sombre du reste
de la solution claire;

iii. lavage de la solution aqueuse résiduelle par extrac-
tion liquide-liquide avec du n-hexane, du n-heptane ou du
cyclohexane;

iv. extraction liquide-liquide de la phase aqueuse lavée
avec de l'acétate d'éthyle;

v. lavage de la phase acétate d'éthyle obtenue à l'étape
iv avec une solution de chlorure de sodium puis évaporation
à sec de la phase acétate d'éthyle lavée.

FR 2 823 116 - A1



Procédé de préparation d'un extrait de feuilles de *Ginkgo biloba*
hautement enrichi en principes actifs

L'invention concerne un procédé de préparation d'un extrait de feuilles de *Ginkgo biloba* hautement enrichi en principes actifs.

Certaines préparations phytopharmaceutiques standardisées à base d'extraits de feuilles de *Ginkgo biloba* sont actuellement utilisées pour traiter des désordres vasculaires
 5 cérébraux et périphériques, notamment en Europe, aux Etats-Unis et en Extrême-Orient.

L'extrait de *Ginkgo biloba* le plus couramment utilisé à l'heure actuelle (EGb 761®) contient 24 % de flavone-glycosides, 3 % de ginkgolides A, B, C et J au total et 3 % de bilobalide (cf. K. Drieu, *La Presse Médicale* (1986), **15**,1455-1457). La dose journalière recommandée pour un patient est de 120 milligrammes.

- 10 Le brevet US 5,399,348 décrit une méthode pour préparer un extrait de *Ginkgo biloba* avec une composition moyenne de 24 % de flavone-glycosides, 3 % de ginkgolides A, B, C et J et 3 % de bilobalide. Cette méthode comprend les étapes suivantes :
 - i. extraction de la poudre sèche de feuilles dans de l'acétone contenant 40 % en poids d'eau ;
 - 15 ii. élimination des lipides par concentration de l'extrait sous pression réduite jusqu'à obtenir un concentré contenant environ 30 % de solides pour ainsi éliminer l'acétone puis dilution avec de l'eau pour obtenir une concentration de 15 % en solides, refroidissement de la suspension obtenue à environ 10° C pendant une heure avant d'éliminer par filtration les précipités lipidiques ;
 - 20 iii. enrichissement de la phase organique par ajout d'une solution de sulfate d'ammonium à 30 % au filtrat aqueux suivi par une extraction liquide-liquide avec un mélange de méthyléthylcétone et d'acétone (entre 9:1 et 4:6) et concentration de la phase organique pour obtenir une concentration de 50 à 70 % en solides ;
 - iv. élimination des tannins par dilution du concentré dans un mélange d'eau et
 25 d'éthanol 50/50 en poids pour obtenir une concentration de 10 % en solides, addition d'une solution aqueuse d'un sel de plomb jusqu'à ce que la couleur soit passée de brun à ambre et filtration du précipité plomb-tannins pour donner un filtrat clair ;

- v. élimination du plomb sous forme de son sulfate insoluble par concentration du filtrat pour garder une proportion maximum de 5 % en éthanol, ajout de sulfate d'ammonium jusqu'à une concentration d'environ 20 % d'éthanol suivi d'une extraction liquide-liquide avec un mélange de méthyléthylcétone et d'éthanol (entre 8:2 et 1:1) ; et
- vi. séchage du produit final par concentration de la phase organique pour obtenir une concentration de 50 à 70 % en solides et séchage sous vide dans un four à 60-80° C pour isoler le produit final contenant moins de 5 % d'eau.

Depuis ces dix dernières années, de grands efforts ont été faits pour enrichir la part des composés actifs des extraits de *Ginkgo biloba* tout en réduisant par la même occasion la part des composés allergènes alkylphénoliques à longue chaîne tels que les acides ginkgoliques.

Il existe un certain nombre de demandes de brevets et de brevets décrivant des procédés permettant d'obtenir des extraits de feuilles de *Ginkgo biloba* enrichis en flavone-glycosides et terpène-lactones.

Par exemple, le brevet US 5,389,370 concerne des méthodes de préparation d'extraits concentrés en composés actifs. La stratégie employée dans ce cas est de mélanger la fraction riche en flavone-glycosides obtenue par extraction liquide-liquide avec du bilobalide et des ginkgolides isolés grâce à une séparation chromatographique sur colonne pour obtenir les compositions désirées qui contiennent typiquement 50 % de flavone-glycosides et 6 % de bilobalide, 50 % de flavone-glycosides et 7 % de ginkgolides ou 50 % de flavone-glycosides, 6 % de bilobalide et 7 % de ginkgolides. Le procédé décrit reprend les deux premières étapes du brevet US 5,399,348 cité précédemment (qui seront ici désignées comme les étapes 1 et 2) auxquelles sont ajoutées les étapes successives suivantes :

3. enrichissement des phases organiques : extraction liquide-liquide avec un mélange d'acétate d'éthyle et d'hexane (9:1), la phase aqueuse étant ré-extraite avec du *n*-butanol et la phase *n*-butanol obtenue concentrée à sec pour obtenir la fraction riche en flavone-glycosides ;
4. traitement au charbon actif : lavage de la phase acétate d'éthyle-hexane avec de l'eau, la phase acétate d'éthyle-hexane lavée étant ensuite traitée avec du charbon actif, filtrée et concentrée à sec ;
5. recristallisation : dissolution du résidu solide dans un mélange 50/50 en poids d'éthanol et d'eau, refroidissement pour cristalliser et filtration pour récupérer les ginkgolides ;

6. chromatographie sur colonne : concentration à sec du surnageant de l'étape 5 et séparation chromatographique sur colonne de gel de silice pour obtenir des fractions riches en bilobalide et en ginkgolides ; et
7. mélange des fractions : mélange de la fraction riche en flavone-glycosides de l'étape 3 avec les ginkgolides obtenus à l'étape 5 ou 6 et/ou avec le bilobalide obtenu à l'étape 6.

Selon une variante du procédé ci-dessus, les étapes 4 et 5 peuvent être remplacées par une chromatographie sur colonne.

Par ailleurs, le brevet US 6,030,621 décrit une méthode d'obtention d'extraits de *Ginkgo biloba* enrichi en flavone-glycosides et en terpène-lactones. La stratégie employée est analogue à celle du brevet US 5,389,370 : la fraction riche en flavone-glycosides est mélangée avec les fractions riches en terpène-lactones, ces dernières étant obtenues par chromatographie sur colonne. Typiquement, les extraits préparés comprennent 47,2 % de flavone-glycosides et 6,3 % de terpène-lactones ou 70 % de flavone-glycosides et 10 % de terpène-lactones. Cette méthode comprend les étapes suivantes :

- a) extraction de la poudre sèche de feuilles dans de l'éthanol contenant 50 % en poids d'eau ;
- b) élimination des lipides par concentration de l'extrait sous pression réduite jusqu'à élimination de l'éthanol, dilution du concentré avec de l'eau, repos du mélange pendant 48 heures et filtration des précipités lipidiques ;
- c) piégeage des composés actifs par passage du filtrat aqueux à travers une résine consistant en un mélange de résine XAD-4 (mélange de polymères poreux) et de polyamide ;
- d) élution des composés actifs en utilisant des mélanges éthanol-eau successifs contenant 30, 60 et 90 % en poids d'éthanol ; et
- e) combinaison de toutes fractions obtenues en d), évaporation de l'éthanol, lavage du concentré aqueux avec de l'hexane et évaporation à sec de la phase aqueuse lavée pour obtenir un extrait contenant 47,2 % de flavone-glycosides et 6,3 % de terpène-lactones.

Dans une variante du procédé ci-dessus, la fraction obtenue à partir du mélange éthanol-eau contenant 30 % d'éthanol est soumise à une chromatographie-éclair pour obtenir une fraction contenant au moins 80 % de terpène-lactones. De la même façon, les fractions obtenues à partir des mélanges éthanol-eau contenant 60 et 90 % d'éthanol sont combinées et soumises à une chromatographie-éclair pour obtenir une fraction

contenant au moins 80 % de flavone-glycosides. La fraction contenant au moins 80 % de flavone-glycosides et la fraction contenant au moins 80 % de terpène-lactones sont mélangées dans différentes proportions et permettent d'obtenir des extraits contenant jusqu'à 70 % de flavone-glycosides et 10 % de terpène-lactones.

- 5 A cause des exigences croissantes en matière de sécurité sanitaire, il devient préférable d'utiliser des principes actifs de plus en plus purs. La tendance pour les extraits de *Ginkgo biloba* serait donc d'abandonner un jour les extraits comme l'EGB 761® au profit d'extraits encore plus riches en principes actifs. Typiquement, on pourrait viser un extrait contenant au moins 50 % de flavone-glycosides et 12 % de terpène-lactones.
- 10 Les procédés des brevets US 5,389,370 ou 6,030,621 permettraient d'obtenir un tel extrait mais s'avèrent toutefois onéreux lorsqu'il s'agit de les utiliser à une échelle industrielle en raison principalement de la présence d'étapes de séparation par chromatographie.

- La demanderesse vient de mettre au point une méthode permettant d'obtenir un extrait
- 15 de feuilles de *Ginkgo biloba* contenant au moins 50 % de flavone-glycosides et 12 % de terpène-lactones sans utiliser aucune étape de séparation par chromatographie.

L'invention a donc pour objet un procédé de préparation d'un extrait de feuilles de *Ginkgo biloba* contenant au moins 50 % de flavone-glycosides et 12 % de terpène-lactones, lequel comporte les étapes successives suivantes :

- 20 i. extraction de la poudre sèche de feuilles de *Ginkgo biloba* dans de l'éthanol contenant au maximum 20 % en poids d'eau ;
- ii. concentration de l'extrait sous pression réduite en présence d'une solution aqueuse de chlorure de sodium et élimination de l'huile sombre du reste de la solution claire ;
- 25 iii. lavage de la solution aqueuse résiduelle par extraction liquide-liquide avec du *n*-hexane, du *n*-heptane ou du cyclohexane ;
- iv. extraction liquide-liquide de la phase aqueuse lavée avec de l'acétate d'éthyle ;
- v. lavage de la phase acétate d'éthyle obtenue à l'étape iv avec une solution de chlorure de sodium puis évaporation à sec de la phase acétate d'éthyle lavée.
- 30 De préférence, l'extraction de l'étape i sera effectuée à l'aide d'éthanol contenant entre 5 et 15 % en poids d'eau, et plus préférentiellement entre 10 et 15 % en poids d'eau.

De préférence également, le lavage de l'étape iii sera effectué avec du *n*-heptane.

En ce qui concerne l'étape iv, la méthyléthylcétone pourrait éventuellement remplacer l'acétate d'éthyle.

En ce qui concerne les solutions aqueuses de chlorure de sodium employées aux étapes ii et v, elles auront de préférence une concentration d'au moins 10 % en poids de chlorure de sodium. Plus préférentiellement, elles seront saturées en chlorure de sodium.

Optionnellement, le procédé décrit ci-dessus pourra comporter, après les étapes i à v, l'étape vi suivante :

- vi. mise en solution de l'extrait sec dans de l'éthanol et refroidissement de la solution, filtration du sel éventuellement précipité et évaporation à sec de la solution résultante.

Les extraits obtenus sont utilisables en pharmacie car ils contiennent moins de 5 ppm d'alkylphénols (mesure effectuée par dosage HPLC). Par ailleurs, ils recèlent peu d'impuretés lipophiles et peu de polysaccharides, de proanthocyanidines et de protéines à haute masse moléculaire.

L'invention a de plus pour objet les extraits susceptibles d'être obtenus par un procédé selon l'invention. Elle a également pour objet lesdits extraits à titre de médicaments, les compositions pharmaceutiques comportant lesdits extraits et l'utilisation desdits extraits pour préparer des médicaments destinés à traiter des maladies / désordres choisis parmi les maladies / désordres suivants : les désordres vasculaires cérébraux et périphériques et les maladies neurodégénératives (comme par exemple la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la chorée de Huntington ou la sclérose latérale amyotrophique). Elle a enfin pour objet l'utilisation desdits extraits pour préparer des médicaments destinés à offrir une thérapie adjuvante pour traiter les maladies prolifératives (notamment le cancer).

Les compositions pharmaceutiques contenant un composé de l'invention peuvent être sous forme solide comme, par exemple, les poudres, pilules, granules, comprimés, liposomes, gélules ou suppositoires. Les pilules, les comprimés ou les gélules peuvent être revêtus d'une substance capable de protéger la composition de l'action de l'acide gastrique ou des enzymes dans l'estomac du sujet pendant une période de temps suffisante pour permettre à cette composition de passer non digérée dans l'intestin grêle de ce dernier. Le composé peut aussi être administré localement, par exemple à l'emplacement même d'une tumeur. Le composé peut aussi être administré selon un processus de libération prolongée (par exemple en utilisant une composition à libération

prolongée ou une pompe de perfusion). Les supports solides appropriés peuvent être, par exemple, le phosphate de calcium, le stéarate de magnésium, le carbonate de magnésium, le talc, les sucres, le lactose, la dextrine, l'amidon, la gélatine, la cellulose, la cellulose de méthyle, la cellulose carboxyméthyle de sodium, la polyvinylpyrrolidine et la cire.

Les compositions pharmaceutiques contenant un composé de l'invention peuvent également se présenter sous forme liquide comme, par exemple, des solutions, des émulsions, des suspensions ou une formulation à libération prolongée. Les supports liquides appropriés peuvent être, par exemple, l'eau, les solvants organiques tels que le glycérol ou les glycols tel que le polyéthylène glycol, de même que leurs mélanges, dans des proportions variées, dans l'eau.

L'administration d'un médicament selon l'invention pourra se faire par voie topique, orale, parentérale, par injection intramusculaire, etc.

La dose d'un composé selon la présente invention, à prévoir pour le traitement des maladies ou troubles mentionnés ci-dessus, varie suivant le mode d'administration, l'âge et le poids corporel du sujet à traiter ainsi que l'état de ce dernier, et il en sera décidé en définitive par le médecin ou le vétérinaire traitant. Une telle quantité déterminée par le médecin ou le vétérinaire traitant est appelée ici "quantité thérapeutiquement efficace".

Sans préjuger de l'avis du médecin traitant, et compte tenu de la teneur en principes actifs des extraits selon l'invention, l'administration à un être humain d'une dose journalière de 5 à 150 mg, et de préférence d'une dose de 10 à 100 mg (en particulier une dose de 40 à 80 mg, par exemple de 50 à 70 mg) desdits extraits pourra par exemple être envisagée.

A moins qu'ils ne soient définis d'une autre manière, tous les termes techniques et scientifiques utilisés ici ont la même signification que celle couramment comprise par un spécialiste ordinaire du domaine auquel appartient cette invention. De même, toutes les publications, demandes de brevets, tous les brevets et toutes autres références mentionnées ici sont incorporées par référence.

L'exemple qui suit est présenté pour illustrer les procédés ci-dessus et ne doit en aucun cas être considéré comme une limite à la portée de l'invention.

Exemple

100 g de feuilles de *Ginkgo biloba* pilées (taille des particules inférieure à 4 mm) sont extraites par deux fois, une fois avec 800 ml et une deuxième fois avec 600 ml d'un mélange éthanol-eau contenant 88 % en poids d'éthanol, chaque fois à 60° C et pendant 1 heure. Les extraits des deux étapes d'extraction sont filtrés et les restes de feuilles récupérés rincés avec 200 ml du même mélange de solvants. Les extraits combinés sont réduits par évaporation à un volume de 100 ml avec un contenu en produits solides d'environ 35 g. 350 ml d'une solution aqueuse de chlorure de sodium à 10 % en poids est ajouté au concentré éthanolique et l'évaporation poursuivie sous pression réduite à 50° C pour éliminer le reste d'éthanol. La solution saline limpide orange clair est séparée de l'huile sombre par décantation à travers un tampon de coton sur un entonnoir filtrant puis par filtration sur célite avec succion. L'extrait en solution aqueuse saline est lavé avec deux portions de 150 ml de *n*-heptane avant d'être extrait par deux fois avec 150 ml d'acétate d'éthyle à chaque fois. Les phases acétate d'éthyle combinées sont lavées avec 50 ml d'une solution saturée en chlorure de sodium puis évaporées à sec sous pression réduite. L'extrait sec est redissous dans 60 ml d'éthanol absolu, laissé la nuit durant dans un réfrigérateur à 5° C, filtré pour éliminer le sel éventuellement précipité et le filtrat évaporé à sec pour donner 1,42 g d'extrait contenant 51,7 % de flavone-glycosides et 13 % de terpène-lactones (6,55 % de bilobalide).

Propriétés pharmacologiques des extraits selon l'invention

Afin de démontrer les propriétés pharmacologiques d'un extrait selon l'invention, les tests suivants peuvent être menés.

1) Prolifération cellulaire*Lignées de cellules*

Les lignées de cellules de cancer du sein MDA-231 ont été acquises au Lombardi Cancer Center (Georgetown University Medical Center). Ces lignées de cellules sont cultivées dans des récipients de culture en polystyrène (Corning) et multipliées dans le milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) supplémenté avec 10 % de sérum fœtal bovin (FBS).

Tests de liaison

Les cellules MDA-231 sont dispersées par trituration dans 5 ml de solution saline de tampon phosphate (SSTP) puis centrifugées à 500 g pendant 15 minutes. Les cellules centrifugées sont resuspendues dans une SSTP et testées pour mesurer leur teneur en protéines. Des tests [³H]PK 11195 peuvent être effectués comme décrit dans Papadopoulos et coll., *J. Biol. Chem.* (1990), **265**, 3772-3779 et Hardwick et coll., *Cancer Res.* (1999), **59**, 831-842. Le [N-méthyl-³H]PK 11195 ou (1-(2-chlorophényl)-N-méthyl-N-(1-méthyl-propyl)-3-isoquinolinecarboxamide est obtenu auprès de Du Pont-New England Nuclear (Wilmington, DE, Etats-Unis) et le PK 11195 auprès de Research Biochemicals Incorporated (Natick, MA, Etats-Unis). Les résultats obtenus sont analysés à l'aide du programme LIGAND (Munson et Robard, *Anal. Biochem.* (1976), **72**, 248-254).

Analyse ARN de Northern

L'expression de l'ARNm de récepteurs benzodiazépine de type périphérique (PBR) dans des cellules MDA-231 traitées par le composé de l'exemple ou de l'EGB 761[®] (référence) peut être évaluée à l'aide d'une analyse de Northern comme décrit dans Hardwick et coll., *Cancer Res.* (1999), **59**, 831-842. L'ARN cellulaire total a été isolé à l'aide du réactif RNazol B (TEL-TEST, Inc., Friendswood, TX, Etats-Unis) et de chloroforme. 20 µg d'ARN total est passé sur du gel à 1 % d'agarose et transféré durant la nuit sur des membranes de nylon (S&S Nytran, Scheicher & Schuell, Keene, NH, Etats-Unis). Un fragment d'ADNc humain de PBR d'une longueur de 0,2 kb (dérivé du vecteur plasmide pCMV5-PBR contenant la séquence complète du PBR humain) est marqué à l'aide de [α -³²P]dCTP à l'aide d'un système aléatoire d'identification de *primers* ADN (Life Technologies, Gaithersburg, MD, Etats-Unis). Les conditions d'hybridation utilisées sont décrites dans la référence citée précédemment. L'autoradiographie est effectuée en exposant les *blots* à un film X-OMAT AR (Kodak, Rochester, NY, Etats-Unis) à -70° C pendant 4-48 heures. La quantification d'ARNm de PBR est faite à l'aide du logiciel SigmaGel (Jandel Scientific, San Rafael, CA, Etats-Unis).

Prolifération cellulaire

Des cellules MDA-231 sont placées sur des plaques à 96 puits (Corning, NJ, Etats-Unis) à une concentration d'environ 10 000 cellules par puits (24 h d'incubation) ou 5 000 cellules par puits (48 h d'incubation) dans du DMEM supplémenté avec 0,1 % de FBS. Les cellules sont ensuite incubées dans du FBS à 10 % avec des concentrations variées en composé de l'exemple ou de composé référence (EGB 761[®]) pendant les périodes indiquées ci-dessus. Les différences en terme de prolifération cellulaire sont

analysées par mesure de la quantité de 5-bromo-2'-déoxyuridine (BrdU) incorporée, laquelle est déterminée en utilisant le matériel BrdU ELISA (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, Etats-Unis). L'incorporation de BrdU est mesurée à la longueur d'onde de 450 nm (référence : 690 nm).

5 2) Neurotoxicité induite par le glutamate

Un extrait selon l'invention peut être testé comme suit : des neurones de cerveau de rat, sont traités ou non avec des concentrations croissantes d'un extrait obtenu selon l'exemple ci-dessus puis, 30 minutes après, sont exposés à du glutamate à une concentration de 250 μ M. La dose inhibant à 50 % la toxicité du glutamate (désignée
10 par IC_{50}) peut être alors être évaluée puis comparée à celle obtenue pour un extrait comme l'EGB 761[®], moins riche en flavone-glycosides et terpène-lactones (à savoir 100 μ g d'EGB 761[®] par ml).

3) Toxicité cellulaire

Les effets d'un extrait selon l'invention sur la viabilité des cellules peuvent être étudiés
15 sur une lignée de cellules HT 22 (cellules hippocampales de souris). La viabilité des cellules est estimée par détermination de la quantité de LDH libérée par des cellules traitées par des doses croissantes de l'extrait de l'exemple ci-dessus et par le test d'exclusion au bleu Trypan.

Lignées de cellules

20 La lignée de cellules HT-22 provient du Salk Institute for Biological Research (La Jolla, CA, Etats-Unis). Cette lignée de cellules est maintenue à 37° C dans le milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) supplémenté avec 10 % de sérum fœtal bovin (FBS), ci-après appelé milieu complet.

Protocole du test

25 Des cellules HT-22 sont placées sur une plaque à 96 puits à une concentration de 5.10^3 cellules par puits dans le milieu complet. 24 heures après, l'extrait de l'exemple est solubilisé dans du DMEM et ajouté à la concentration de 10, 25, 50, 100, 250, 500 et 1000 μ g/ml ; l'extrait est alors laissé en contact pendant 24 ou 48 heures. La mesure de LDH se fait à l'aide d'un coffret de dosage Promega selon les instructions données par
30 le fabricant. Les absorbances sont lues à 470 nm. La libération maximale de LDH est obtenue après lyse complète des cellules à l'aide de Triton X-100.

Pour les mesures de viabilité estimée par le test d'exclusion au bleu Trypan, les cellules sont placées dans des plaques 6 puits et l'extrait de l'exemple est ajouté à la concentration de 100 µg/ml pendant 24 heures.

5 Les cellules sont ensuite lavées avec une solution tampon phosphate exempte de calcium et de magnésium et exposées à de la trypsine pendant 5 minutes à 37° C. La réaction est stoppée avec du milieu complet et 0,04 % de bleu de trypan est ajouté à la suspension cellulaire. Le nombre de cellules qui excluent le colorant (i.e. les cellules vivantes) est déterminé à l'aide d'un hématocytomètre. Le pourcentage de viabilité des
10 cellules est calculé comme suit : nombre de cellules viables (non colorées) / nombre total de cellules (colorées et non colorées) x 100.

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation d'un extrait de feuilles de *Ginkgo biloba* contenant au moins 50 % de flavone-glycosides et 12 % de terpène-lactones, lequel comporte les étapes successives suivantes :
 - 5 i. extraction de la poudre sèche de feuilles de *Ginkgo biloba* dans de l'éthanol contenant au maximum 20 % en poids d'eau ;
 - ii. concentration de l'extrait sous pression réduite en présence d'une solution aqueuse de chlorure de sodium et élimination de l'huile sombre du reste de la solution claire ;
 - 10 iii. lavage de la solution aqueuse résiduelle par extraction liquide-liquide avec du *n*-hexane, du *n*-heptane ou du cyclohexane ;
 - iv. extraction liquide-liquide de la phase aqueuse lavée avec de l'acétate d'éthyle ;
 - v. lavage de la phase acétate d'éthyle obtenue à l'étape iv avec une solution de chlorure de sodium puis évaporation à sec de la phase acétate d'éthyle lavée.
- 15 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'extraction de l'étape i est effectuée à l'aide d'éthanol contenant de 5 à 15 % en poids d'eau.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le lavage de l'étape iii est effectué avec du *n*-heptane.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les solutions aqueuses de chlorure de sodium employées aux étapes ii et v ont une concentration d'au
20 moins 10 % en poids de chlorure de sodium.
5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4 comprenant en outre, après les étapes i à v, l'étape vi suivante :
 - 25 vi. mise en solution de l'extrait sec dans de l'éthanol et refroidissement de la solution, filtration du sel éventuellement précipité et évaporation à sec de la solution résultante.
6. Extrait de feuilles de *Ginkgo biloba* susceptible d'être obtenu par un procédé de préparation selon l'une des revendications 1 à 5.

7. A titre de médicament, un extrait selon la revendication 6.
8. Composition pharmaceutique comportant un extrait selon la revendication 6.
9. Utilisation d'un extrait selon la revendication 6 pour préparer un médicament destiné à traiter des maladies / désordres choisis parmi les maladies / désordres suivants : les
5 désordres vasculaires cérébraux et périphériques et les maladies neurodégénératives.
10. Utilisation d'un extrait selon la revendication 6 pour préparer des médicaments destinés à offrir une thérapie adjuvante pour traiter les maladies prolifératives.

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 602852
FR 0104942

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 200143 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B05, AN 2001-398915 XP002184929 & CN 1 287 121 A (UNIV TIANJIN), 14 mars 2001 (2001-03-14) * abrégé * ---	1,6-10	A61K35/78 A61P25/28 A61P35/00
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 199602 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B03, AN 1996-018388 XP002184930 & KR 9 402 796 B (SUN KYONG IND LTD), 2 avril 1994 (1994-04-02) * abrégé * ---	1,6-10	
X	DATABASE BIOSIS 'en ligne! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; mars 2000 (2000-03) KOCH E ET AL: "Evidence for immunotoxic effects of crude Ginkgo biloba L. leaf extracts using the popliteal lymph node assay in the mouse." Database accession no. PREV200000180755 XP002184928 * abrégé * & INTERNATIONAL JOURNAL OF IMMUNOPHARMACOLOGY, vol. 22, no. 3, mars 2000 (2000-03), pages 229-236, ISSN: 0192-0561 -----	1,6-10	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
6 décembre 2001		Rempp, G	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0104942 FA 602852

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
 Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 06-12-2001
 Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
CN 1287121	A	14-03-2001	AUCUN	
KR 9402796	B	02-04-1994	KR 9402796 B1	02-04-1994