


  
**PCT** WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
   
 Internationales Büro
   
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
   
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>A61K 31/56, 47/06</b></p>	<b>A1</b>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 98/32443</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 30. Juli 1998 (30.07.98)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/CH97/00023</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 24. Januar 1997 (24.01.97)</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MARI- GEN S.A. [CH/CH]; Eugster Carl, Hackbergstrasse 40, CH-4125 Riehen (CH).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EUGSTER, Carl [CH/CH]; Hackbergstrasse 40, CH-4125 Riehen (CH). EUGSTER, Conrad, Hans [CH/CH]; Herrengütlistrasse 18, CH-8304 Wallisellen (CH).</p> <p>(74) Gemeinsamer Vertreter: MARI-GEN S.A.; Eugster Carl, Hackbergstrasse 40, CH-4125 Riehen (CH).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>	
<p>(54) Title: ULTRAMICRO-EMULSIONS OF SPONTANEOUSLY DISPERSIBLE CONCENTRATES CONTAINING ANTITUMORALLY, ANTIVIRALLY AND ANTIPARASITICALLY ACTIVE ESTERS OF PENTACYCLIC TRITERPENES</p> <p>(54) Bezeichnung: ULTRAMIKROEMULSIONEN AUS SPONTAN DISPERGIERBAREN KONZENTRATEN ENTHALTEND ANTI-TUMORAL, ANTIVIRAL UND ANTIPARASITÄR WIRKSAME ESTER VON PENTACYCLISCHEN TRITERPENEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to spontaneously dispersible concentrates containing selected esters of pentacyclic triterpene compounds with antitumoral, antiviral and antiparasitic action, aqueous ultramicro-emulsions of such concentrates, methods for producing and processing said esters, and their use as agents for producing a pharmaceutical systemic product active against tumours, eczema, psoriasis, and viral and parasitic infections, for lasting tumour prophylaxis and enhanced absorption of exogenous activators, modulators and regulators.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Spontan dispergierbare Konzentrate mit ausgewählten, antitumoral, antiviral und antiparasitär einsetzbaren Estern von pentacyclischen Triterpenverbindungen, wässrige Ultramikroemulsionen aus solchen Konzentraten, Verfahren zur Herstellung dieser Ester und zu ihrer Aufbereitung, sowie ihre Verwendung als Mittel zur Erzeugung eines pharmazeutischen Systempräparates mit Wirksamkeit gegen Tumore, Ekzeme, Psoriasis, virale und parasitäre Infektionen, zur anhaltenden Tumorphylaxe und zur verstärkten Aufnahme von exogenen Aktivatoren, Modulatoren und Regulatoren werden beschrieben.</p>		

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

ULTRAMIKROEMULSIONEN AUS SPONTAN DISPERGIERBAREN KONZENTRATEN ENTHALTEND ANTI-TUMORAL, ANTIVIRAL UND ANTIPARASITÄR WIRKSAME ESTER VON PENTACYCLISCHEN TRITERPENEN

### **EINLEITUNG**

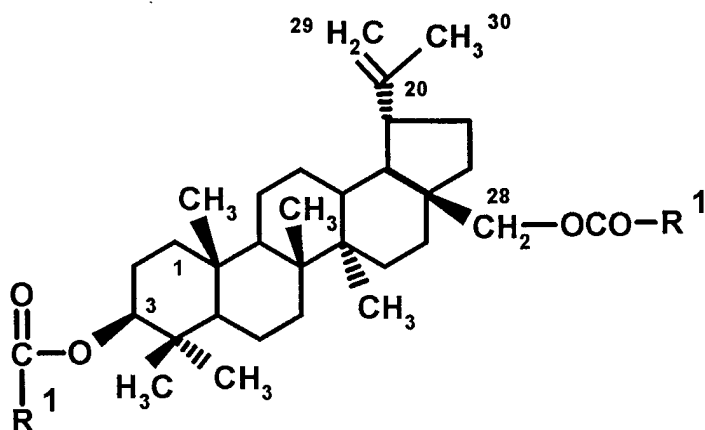
Die vorliegende Erfindung betrifft Ultramikroemulsionen aus spontan dispergierbaren Konzentraten mit Estern von pentacyclischen Triterpenverbindungen, neue Triterpenester, Verfahren zu ihrer Herstellung und Aufbereitung in geeignete pharmazeutische Darreichungsformen, sowie die Verwendung der Ester-haltigen, spontan dispergierbaren Konzentrate und Mikroemulsionen als Arzneimittel mit Wirksamkeit gegen Tumore, Ekzeme, Psoriasis, virale und parasitäre Infektionen, sowie zur Vorbeugung gegen Tumorbildung im Wege der gesteigerten Aufnahme exogener Aktivatoren, Modulatoren und Regulatoren .

Die Ester der ausgewählten, pflanzlichen Grundstoffe und ihrer Transformationsprodukte haben überraschenderweise eine sehr gute antitumorale, antivirale und/oder viruzide, sowie antiparasitäre Wirkung, und sie eignen sich auch zur Behandlung von Ekzemen und Psoriasis. In vorbeugender und Therapie-unterstützender Hinsicht sind sie bedeutungsvoll, weil sie die Aufnahme exogener Aktivatoren, Modulatoren und Regulatoren erhöhen und dadurch das metabolische wie auch das immunitäre Leistungsvermögen anheben.

Die therapeutischen und prophylaktischen Eigenschaften derartiger Ester treten dann verstärkt auf, wenn sie in spontan dispergierbare MARIGENOL®-Konzentrate eingearbeitet und anschliessend mit destilliertem Wasser oder 5%-iger Glucoselösung oder physiologischer Kochsalzlösung (Ringerlösung) verdünnt worden sind, wobei sich thermodynamisch stabile Ultramikroemulsionen ergeben, welche sehr kleine, globuläre Mizellen mit einem hydrodynamischen Radius von 2.2 bis 3.0 nm enthalten.

**BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG**

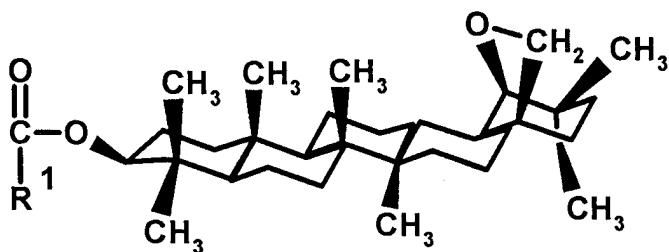
Die erfindungsgemässen Ester von ausgewählten, pflanzlichen Grundstoffen mit pentacyclischer Triterpenstruktur haben die allgemeinen Formeln (I) bis (XI) :



(I)

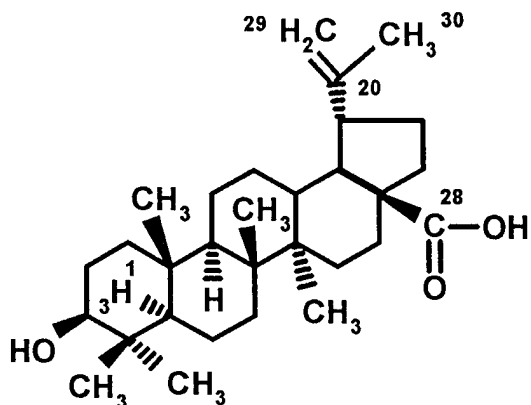
BETULIN [Lup-20(29)-en-3,28-diol], lup-20(30)-en-3 $\beta$ ,28-diol; Betulinol. Merck-Index 11.1212, Sigma B 9757, Aldrich 12,376-5.

L. Ruzicka et al., Helv.Chim.Acta 19, 506 (1936)



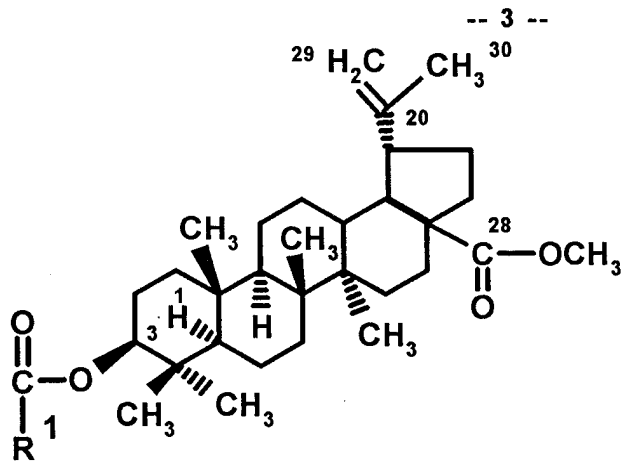
(II)

ALLOBETULIN



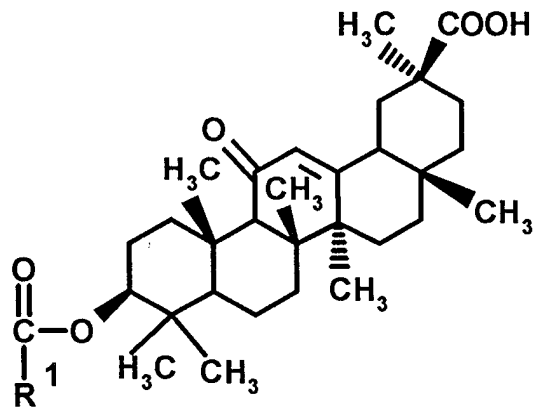
(III)

BETULINSÄURE; Beil: 10(3), 1059; Aldrich 85,505-7



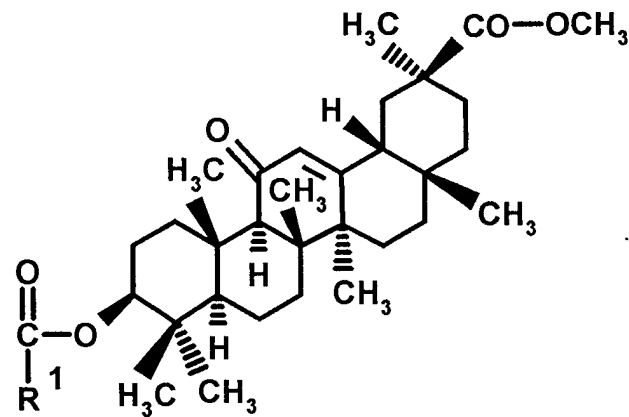
(IV)

BETULINSÄURE-METHYLESTER



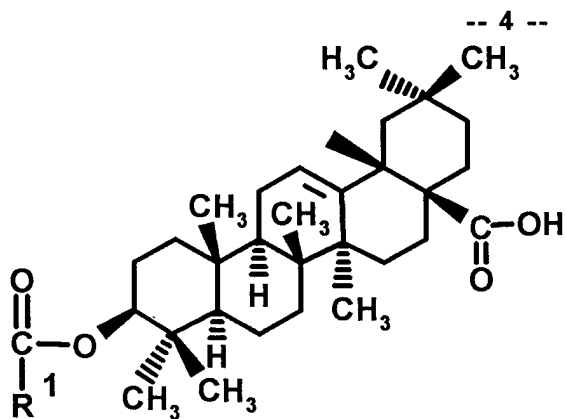
(V)

ENOXOLON (3-Hydroxy-11-oxoolean-12-en-29-oic acid);  
 18β-Glycyrrhetinsäure; Uralenic acid; Merck-Index 11.3543  
 L. Ruzicka et al., *Helv.Chim.Acta* **26**, 2143, 2278 (1943)



(VI)

ENOXOLON-METHYLESTER



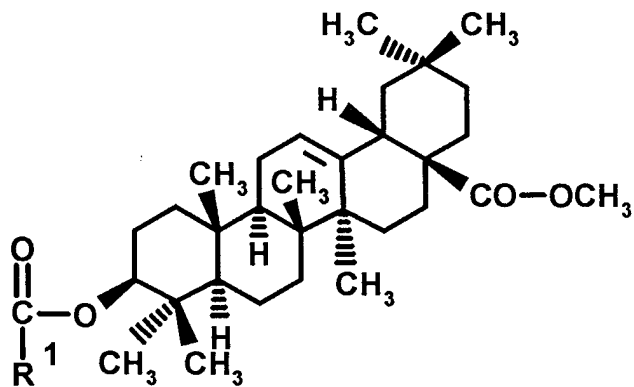
(VII)

OLEANOLSÄURE; 3-Hydroxyolean-12-en-28-oic acid; Oleanol; Caryophyllin.

Merck-Index 11.6787; Aldrich 30,170-1

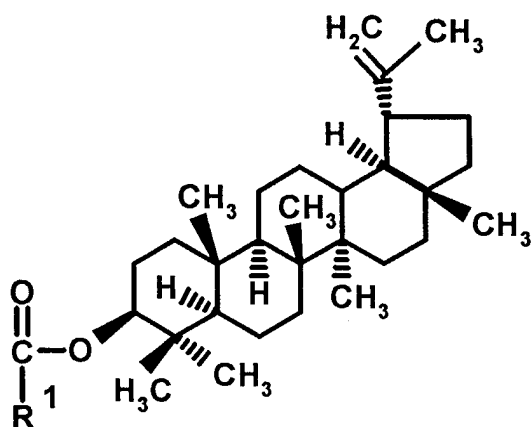
L. Ruzicka et al., *Helv.Chim.Acta* 19, 114 (1936)

L. Ruzicka et al., *Helv.Chim.Acta* 29, 210 (1946)



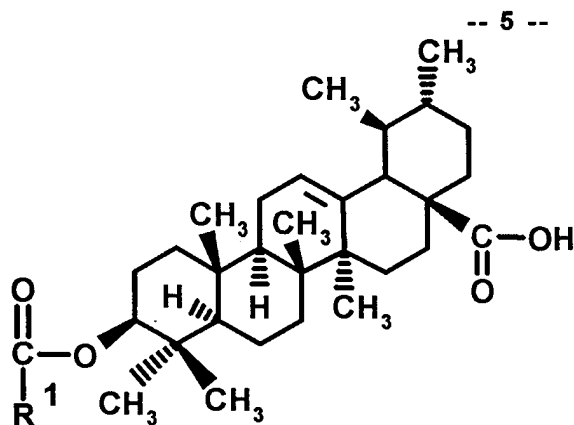
(VIII)

OLEANOLSÄURE-METHYLESTER



(IX)

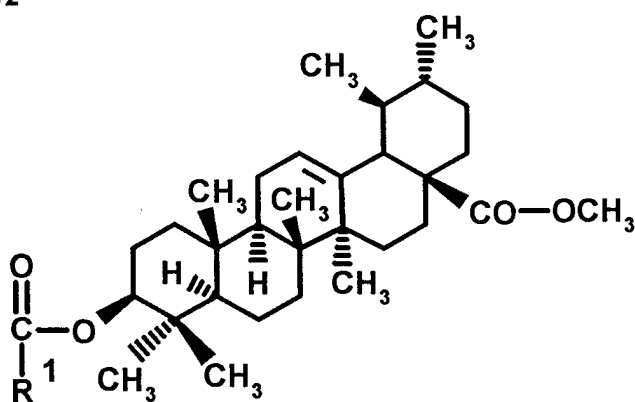
LUPEOL (Fagasterol); Merck-Index 11.5478



(X)

URSOLSÄURE (3 $\beta$ -Hydroxyurs-12-en-28 oic acid)

L. Ruzicka et al., *Helv.Chim.Acta*, 28, 199 (1945), Beil. 10(2), 202; Merck-Index 11.9802



(XI)

URSOLSÄURE-METHYLESTER

wobei in den Formeln (I) bis (XI) R<sup>1</sup> eine C<sub>3-31</sub>-Alkyl-, eine C<sub>3-31</sub>-Alkenyl-, eine C<sub>17-23</sub>-Alkapolyen- oder eine Retinoylgruppe ist.

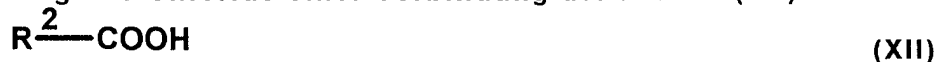
Die Verbindungen der Formeln (I) bis (XI) lassen sich allgemein nach folgenden, an sich bekannten Verfahren, herstellen:

a) Umsetzung einer Verbindung der Formel (XII) :



worin R<sup>2</sup> für eine C<sub>3-31</sub>-Alkyl-, eine C<sub>3-31</sub>-Alkenyl-, eine C<sub>17-23</sub>-Alkapolyen- oder eine Retinoylgruppe steht, mit 1,1'-Carbonyldiimidazol oder mit N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid in einem indifferenten Lösungsmittel, wie z.B. Toluol oder Tetrahydrofuran, bei 0 bis 70°C, unter Schutzgasleitung und Zusatz einer katalytischen Menge eines Alkoholates, und anschließende Alkohololyse der gebildeten Imidazole mit einer Verbindung der Formeln (I) bis (XI).

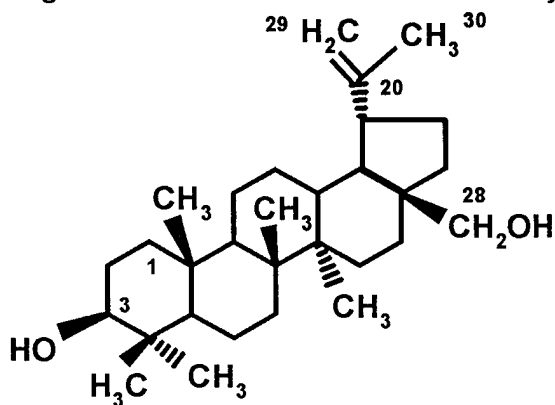
b) Bildung des Chlorids einer Verbindung der Formel (XII) :



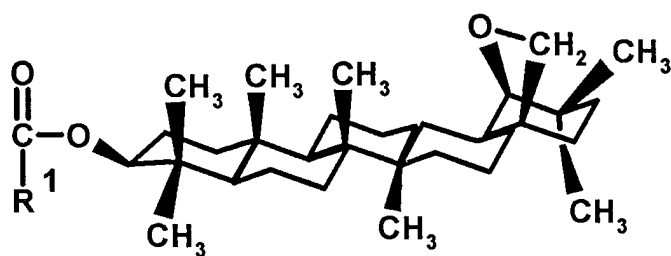
worin R<sup>2</sup> für eine C<sub>3-31</sub>-Alkyl-, eine C<sub>3-31</sub>-Alkenyl- oder eine C<sub>17-23</sub>-Alkapolyengruppe steht, mit einem Chlorierungsmittel, wie z.B. Thionylchlorid

oder Oxalylchlorid, und anschliessende Umsetzung mit einer Verbindung der Formeln (I) bis (X) bei einer Temperatur von 0°C bis 60°C, unter Schutzgaszuleitung, in einem indifferenten Lösungsmittel, wie z.B. Toluol oder Tetrahydrofuran, und in Gegenwart eines Katalysators, wie z.B. Dimethylformamid und/oder p-Dimethylaminopyridin.

c) Bildung des Allobetulins durch Partialsynthese aus Betulin:



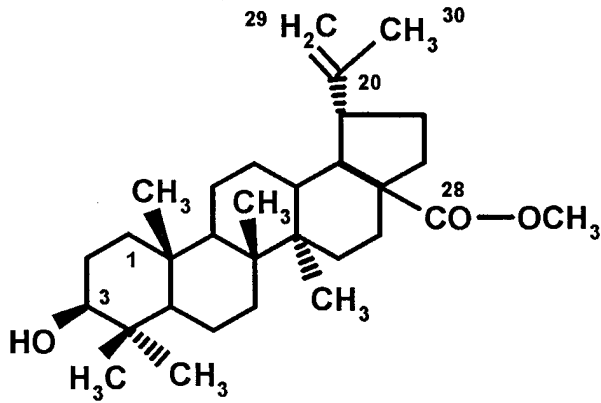
und darauf Acylierung an Position O-C(3) mit einer aktivierten, gesättigten C<sub>5-31</sub>- oder einer ungesättigten C<sub>8-31</sub>-Carbonsäure:



(II)

und anschliessende Aufarbeitung wie nachstehend im Einzelnen beschrieben.

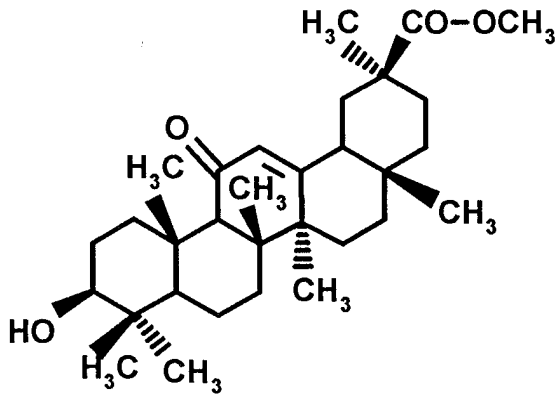
d) Bildung des Betulinsäure-Methylesters laut Formel (IV):



(IV)

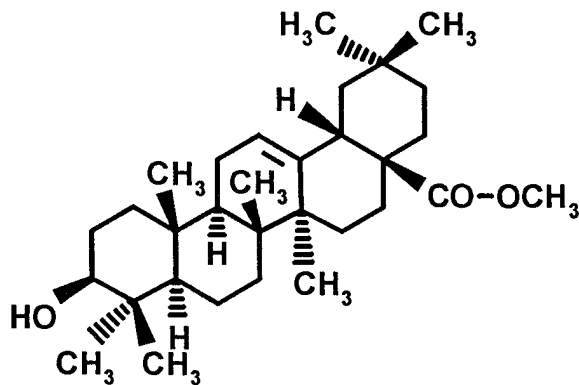
und dann Umsetzung an O-C(3) durch Reaktion mit dem Chlorid einer höheren Carbonsäure, samt anschließender Aufarbeitung wie nachstehend im Einzelnen beschrieben.

In entsprechender Weise kann auch der Methylester der 18β-Glycyrrhetinsäure:



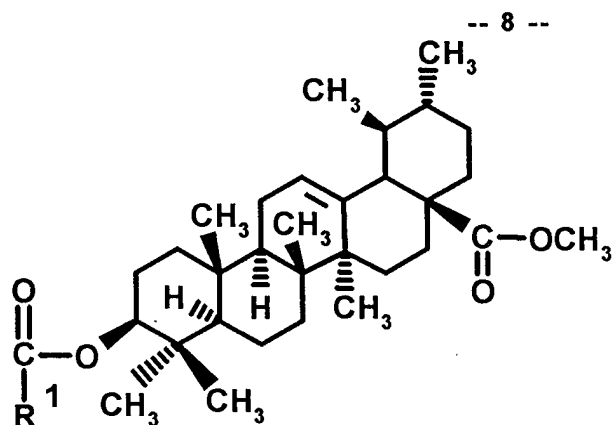
(VI),

bzw. der Oleanolsäure:



(VIII)

bzw. der Ursolsäure:



(XI)

an O-C(3) acyliert werden.

Die Ester der ausgewählten, pentacyclischen Triterpenverbindungen der Formeln (I) bis (XI) haben überraschenderweise eine ausgezeichnete antitumorale, antivirale, viruzide und antiparasitäre Wirkung, und sie eignen sich auch zur Bekämpfung von Ekzemen, von Psoriasis, sowie von metabolischen und von immunitären Störungen, vornehmlich dann, wenn sie gemäss der vorliegenden Erfindung in spontan dispergierbare MARIGENOL®-Konzentrate eingearbeitet worden sind, welche mit destilliertem Wasser, mit 5%-iger Glucoselösung oder mit Ringerlösung verdünnt, thermodynamisch stabile Oel-in-Wasser *Ultramikroemulsionen* ergeben.

Derartige Ultramikroemulsionen weisen kugelförmige Mizellen mit einem hydrodynamischen Radius von 2.2 bis 3.0 nm auf. [Messungen mit QLS = quasi-elastischer, dynamischer Lichtstreuung wurden an der E.T.H., Zürich, Institut für Polymere (Prof.Dr. Pier-Luigi LUISI und Prof.Dr. Peter SCHURTENBERGER) durchgeführt]. Zur angewandten Methodik vgl.:

P. Schurtenberger, R. Scartazzini, P.-L. Luisi, *Rheol.Acta* 28, 372 (1989).

P. Schurtenberger, R. Scartazzini, L.J. Magid, M.E. Leser, P.-L. Luisi, *J.Phys. Chem.* 94, 3695 (1990).

P.-L. Luisi, R. Scartazzini, G. Haering, P. Schurtenberger, *Colloid Polym.Sci.* 268, 356 (1990) : Organogels from water-in-oil microemulsions.

T. Gisler et al.: "Mode-selective dynamic light scattering: theory versus experimental realization". *Applied Optics/Vol. 34, No. 18.* 20 June 1995.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind demnach vorab *spontan dispergierbare Konzentrate* mit den antitumoral, antiviral, viruzid oder antiparasitär wirkenden Estern der Verbindungen (I) bis (XI), welche auch die Apoptosis von Tumor- oder Wirtzellen einleiten können. Die bezeichneten Ester sind nahezu wasserunlösliche und hoch agglomerierte Verbindungen. Damit solche Verbindungen aber durch die Membranbarriere der Tumor- oder Wirtzellen,

-- 9 --

bzw. die Proteinhülle von Viren oder Parasiten diffundieren und im Innern der Zelle, bzw. des Capsids wirksam werden können, müssen sie vorerst in geeigneter Weise im wässrigen Medium *solubilisiert* werden. Im Wege der Bildung von thermodynamisch stabilen Oel-in-Wasser *Ultramikroemulsionen*, mithilfe von besonders ausgewählten und als System zusammengeführten Co-tensiden oder Lösungsvermittlern einerseits und geeigneten Tensiden andererseits gelingt es, einen *optimalen Solubilisierungsgrad der therapeutisch und prophylaktisch wirksamen Ester* zu erzielen.

Alle experimentellen Beobachtungen an dergestalt ausgebildeten Ultramikroemulsionen lassen sich einheitlich durch die Annahme deuten, dass die ausgewählten Tenside und Cotenside, als ausgewogene Formulierung genommen, in der wässrigen Phase organisierte Aggregate, sog. *Mizellen* bilden. Diese besitzen mehr oder weniger kugelförmige Gestalt, mit einem hydrodynamischen Radius von 2.2 bis 3.0 nm. Die Tenside und Hydrotrope (Cotenside) lassen zwischen der äusseren, wässrigen Phase und der inneren, öligen Phase der Mikroemulsion [enthaltend die Ester der Formeln (I) bis (XI), gelöst im biotensiden Lösungsvermittler] eine *Grenzschicht* entstehen, wodurch die Mischung dieser beiden Phasen unterbleibt, also keine Marangoni-Effekte auftreten. In der öligen, inneren Phase sind die Moleküle der bezeichneten Esterverbindungen gelöst und liegen im mizellaren Kern in monomerer oder in oligomer agglomerierter Form vor, was einen ganz entscheidenden Unterschied zu blossen *Makro-Emulsionen* (z.B. Liposomen) ausmacht.

Die *Mizellen* der Ester-haltigen *inneren Phase* der erfindungsgemässen Ultramikroemulsionen sind demnach an ihrer Oberfläche, d.h. an ihrer Grenzschicht mit einem Tensidmantel geschützt, was sie instand setzt, leicht durch die Zellmembran oder die Proteinhülle ins Innere der Tumor- oder Wirtzelle zu diffundieren. Die Diffusion durch die Plasmamembran von abartigen Zellen erfolgt ausschliesslich aufgrund thermischer Molekularbewegungen; die fraktalen Verhältnisse an der Zellmembran kommen ihr dabei entgegen. Es lässt sich aufzeigen, dass die Geschwindigkeit des Diffusionsvorganges, bzw. die Stärke des Wirkstofftransportes durch die Membran der Zielzelle bestimmt wird:

1. vom Konzentrationsunterschied zwischen dem intrazellulären und dem interzellulären Bereich
2. vom Teilchenradius des diffundierenden Wirkstoffmoleküls oder Wirkstoffsystems
3. von der Viskosität der diffundierenden wässrigen Lösung (Emulsion)
4. von der Temperatur.

-- 10 --

Wie aus der nachstehenden Tabelle ersichtlich ist, hat eine globuläre "Mizelle" mit einem hydrodynamischen Radius von einem Centimeter ein Volumen von 4,189 cm<sup>3</sup> und eine Phasenoberfläche von 12,564 cm<sup>2</sup>.

Demgegenüber weisen 10<sup>18</sup> Mizellen mit einem hydrodynamischen Radius von je nur 10<sup>-6</sup> cm (10 nm), welche zusammen das gleiche Volumen von 4,187 cm<sup>3</sup> ausmachen, schon eine Gesamt-Phasenoberfläche von 1'256,4 m<sup>2</sup> auf.

**MIZELLEN: VERHÄLTNIS VOLUMEN ZU GESAMTOBERFLÄCHE**

ZAHL der MIZELLEN	Hydrodynamischer RADIUS der Mizellen	VOLUMEN der Mizellen	GESAMT-OBERFLÄCHE der Mizellen
1	1 cm	4,187 cm <sup>3</sup>	12,564 cm <sup>2</sup>
10 <sup>3</sup>	0,1 cm = 1 mm	4,187 cm <sup>3</sup>	125,64 cm <sup>2</sup>
10 <sup>6</sup>	0,01 cm	4,187 cm <sup>3</sup>	1'256,4 cm <sup>2</sup>
10 <sup>9</sup>	0,001 cm	4,187 cm <sup>3</sup>	12'564 cm <sup>2</sup>
10 <sup>12</sup>	0,0001 cm = 1 μm = 1'000 nm	4,187 cm <sup>3</sup>	125'640 cm <sup>2</sup>
10 <sup>15</sup>	0,00001 cm = 100 nm	4,187 cm <sup>3</sup>	1'256'400 cm <sup>2</sup>
10 <sup>18</sup>	10 <sup>-6</sup> cm = 10 nm	4,187 cm <sup>3</sup>	1'256,4 m <sup>2</sup>
10 <sup>21</sup>	10 <sup>-6</sup> mm = 1 nm	4,187 cm <sup>3</sup>	12'564 m <sup>2</sup>

$$\text{Kugelvolumen} = \frac{4}{3} \pi r^3$$

$$\text{Kugeloberfläche} = 4 \pi r^2$$

**Fazit:** Durch die enorm grosse Phasenoberfläche, welche die Mizellen mit einem hydrodynamischen Radius von 1 bis 5 nm in Ultramikroemulsionen ausbilden, wird zusätzlich zu deren gesteigertem Diffusionsvermögen die rheologische Verteilung (Spreitung = "spreading") und somit die Bioverfügbarkeit und Bioreaktivität der Wirkstoffe, welche in der inneren Phase der Mizellen in monomer oder oligomer agglomerierter Form vorliegen, ebenfalls stark verbessert, weil keine Marangoni-Effekte auftreten. Das kann eine beträchtliche Ermässigung der kritischen Dosierung erlauben und damit unerwünschte Nebenwirkungen ganz vermeiden oder wenigstens verringern helfen.

Die "Packungsdichte" eines spontan dispergierbaren, stabilen MARIGENOL®-Konzentrates nimmt in exponentieller Funktion mit der kleiner werdenden Teilchengrösse der Mizellen zu. Entscheidend sind die richtige Ausbildung

der inneren Phase, ihr ausgewogenes Verhältnis zum Gesamtkonzentrat und die Auswahl der je dazu passenden Tenside.

#### ZUSAMMENSETZUNG der MARIGENOL®-KONZENTRATE

Die erfindungsgemäss spontan dispergierbaren Konzentrate enthalten:

0,1 bis 10 Gewichts-% einzelner Ester der Formeln (I) bis (XI), bzw. Kombinationen solcher Ester, sowie

0 bis 5 Gewichts-% einer synergistischen, pharmazeutischen oder kosmetischen Wirksubstanz, wie in der Patentschrift CH 683'426 (U.S. 08/179,729, erteilt 03. September 1996) im Einzelnen aufgezählt,

1 bis 25 Gewichts-% eines als Hydrotrop, bzw. Co-Emulgator dienenden, pharmaverträglichen Lösungsmittels oder Lösungsmittelgemisches,

5 bis 90 Gewichts-% eines pharmaverträglichen Tensides oder Tensidgemisches,

bis zu 10 Gewichts-% eines Vitamins oder Provitamins,

bis zu 10 Gewichts-% eines Stabilisators, Radikalfängers, biologischen Vektors oder Penetrationsverbesserers und Trägerstoffe und/oder Verdünnungsmittel.

Wegen ihrer ausgeprägten Schutzwirkung auf die Wirtzelle und ihrer unmittelbaren Aktivität gegen Viren und Parasiten lassen sich zur therapeutischen Unterstützung die nachstehend bezeichneten, in der Patentschrift CH 2239-95 besonders genannten, *synergistisch wirksamen Esterverbindungen* in die erfindungsgemässen, spontan dispergierbaren Konzentrate mit einarbeiten:

**trans-2-Butensäure-3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -cholestanylester  
(Cholestanyl-Crotonat)**

**Isovaleriansäure-3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -cholestanyl-Ester  
(Cholestanyl-iso-Valerat)**

**10-Undecensäure-3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -cholestanyl-Ester  
(Cholestanyl-10-Undecenoat)**

**Laurylsäure-3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -cholestanyl-Ester  
(Cholestanyl-Laurat)**

**Palmitinsäure-3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -cholestanyl-Ester  
(Cholestanyl-Palmitat)**

**3 $\beta$ -Stigmast-5-en-3-laurat ( $\beta$ -Sitosteryl-laurat)**

**3 $\beta$ -Stigmast-5-en-3-palmitat ( $\beta$ -Sitosteryl-palmitat)**

**3 $\beta$ -Stigmast-5-en-3-stearat ( $\beta$ -Sitosteryl-stearat)**

**3 $\beta$ -Stigmast-5-en-3-arachidat ( $\beta$ -Sitosteryl-arachidat)**

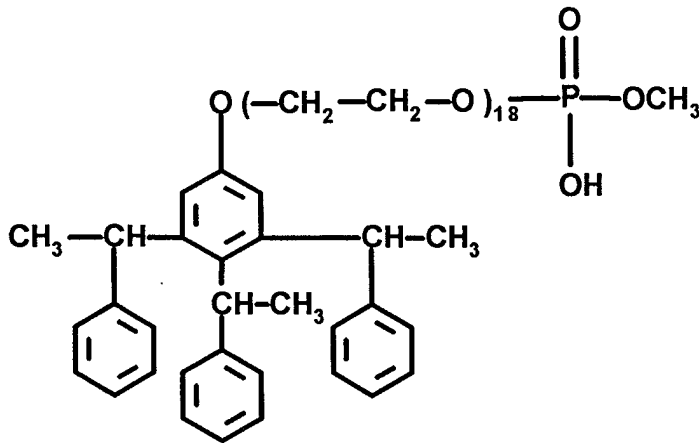
-- 12 --

**3 $\beta$ -Stigmast-5-en-3-behenat ( $\beta$ -Sitosteryl-behenat)**  
**3 $\beta$ -Stigmast-5-en-3-10-undecenoat ( $\beta$ -Sitosteryl-10-undecenoat)**  
**3 $\beta$ -Stigmast-5-en-3-oleat ( $\beta$ -Sitosteryl-oleat)**  
**3 $\beta$ -Stigmast-5-en-3-all trans-retinat ( $\beta$ -Sitosteryl-all-trans-retinat).**  
**(3 $\beta$ , 22E)-Ergosta-5,7,22-trien-3-ol-10-undecenoat**  
**[Ergosteryl-10-undecenoat, Provitamin D<sub>2</sub>-undecenoat]**  
**(3 $\beta$ , 22E)-Ergosta-5,7,22-trien-3-ol-laurat**  
**[Ergosteryl-laurat, Provitamin D<sub>2</sub>-laurat]**  
**(3 $\beta$ , 22E)-Ergosta-5,7,22-trien-3-ol-palmitat**  
**[Ergosteryl-palmitat, Provitamin D<sub>2</sub>-palmitat]**  
**(3 $\beta$ , 22E)-Ergosta-5,7,22-trien-3-ol-arachidat**  
**[Ergosteryl-laurat, Provitamin D<sub>2</sub>-arachidat]**  
**(3 $\beta$ , 22E)-Ergosta-5,7,22-trien-3-ol-all-trans-retinat**  
**[Ergosteryl-retinat, Provitamin D<sub>2</sub>-retinat]**  
**10-Undecensäure-9,10-Secocholesta-5,7,10(19)-trien-3-ol**  
**[Vitamin D<sub>3</sub>-undecenoat, Cholecalciferyl-undecenoat,**  
**Calciol-undecenoat]**  
**Laurinsäure-9,10-Secocholesta-5,7,10(19)-trien-3-ol**  
**[Vitamin D<sub>3</sub>-laurat, Cholecalciferyl-laurat, Calciol-laurat]**  
**Palmitinsäure-9,10-Secocholesta-5,7,10(19)-trien-3-ol**  
**[Vitamin D<sub>3</sub>-palmitat, Cholecalciferyl-palmitat, Calciol-palmitat]**  
**Oelsäure-9,10-Secocholesta-5,7,10(19)-trien-3-ol**  
**[Vitamin D<sub>3</sub>-oleat, Cholecalciferyl-oleat, Calciol-oleat]**  
**Retinsäure-9,10-Secocholesta-5,7,10(19)-trien-3-ol**  
**[Vitamin D<sub>3</sub>-all trans-retinat, Cholecalciferyl-all trans-retinat,**  
**Calciol-all trans-retinat]**  
**Z-Gly-Phe-Vitamin D<sub>3</sub>**  
**[CBO-Glycyl-L-phenylalanin-dipeptid Calciol-Ester].**

Die erfindungsgemäss einzusetzenden Tenside oder Tensidgemische können anionaktiv, kationaktiv, amphoter oder nicht-ionogen sein. Bevorzugt sind sie amphoter oder nicht-ionogen und haben ein HLB-Verhältnis (d.h. eine "hydrophilic-lipophilic balance") zwischen 2 und 18; für Gemische liegt es vorzugsweise zwischen 2 bis 6 einerseits und 10 bis 15 andererseits.

In hohem Masse bevorzugt zur Herstellung von erfindungsgemässen, spontan dispergierbaren Konzentraten sind einerseits Phosphorsäureestertenside, wie z.B.: das praktisch wasserfreie Tristyrylphenolpolyoxyethylen-18-phosphorsäureester TEA-Salz-Tensid:

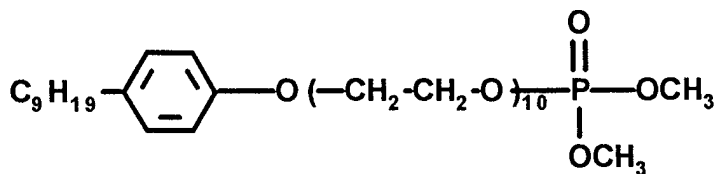
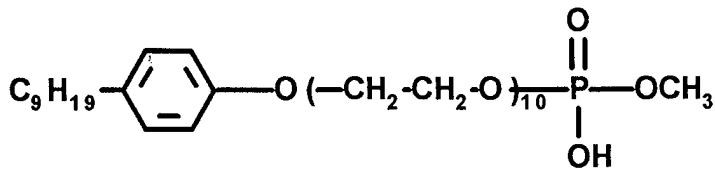
-- 13 --



(Soprophor® FL, RHÔNE-POULENC);

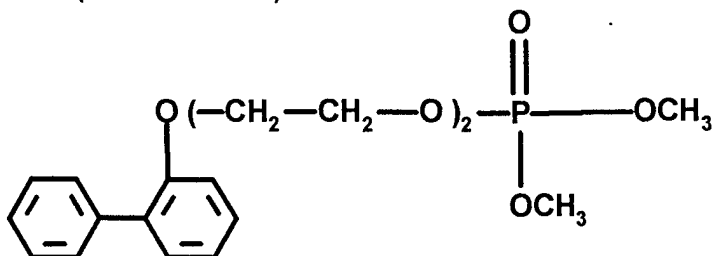
Ferner.:

Diphasol® 3873 (CIBA-GEIGY), bzw. das identische Sermul® EA 188 (SERVO), ein Mischemulgator, bestehend aus je 50 % der beiden Verbindungen mit den Formeln:



Diphasol® 3873 (CIBA-GEIGY), ein Alkylphenol Polyglycolether-Phosphat-Tensid

Tensid 508 (CIBA-GEIGY)



(Tensid 508, CIBA-GEIGY);

Tinovetin® JU (CIBA-GEIGY), ein Hydroxybiphenyl-10-Ethoxy-Phosphorsäure-ester

Butyl-mono-4-Ethoxy-Phosphorsäureester (Zerostat® AT, CIBA-GEIGY), bzw.

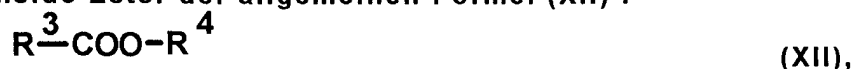


Ester aus einem Poly(2-7)ethylenglykolglyzerinether mit mindestens einer freien Hydroxylgruppe mit einer aliphatischen Carbonsäure (C<sub>6-22</sub>), wie z.B. aliphatische Alkohole (C<sub>12-22</sub>), somit u.a. Dodecanol, Tetradecanol, Oleylalkohol, 2-Hexyldecanol und 2-Octyldecanol.

Ester mit mindestens einer freien Hydroxylgruppe, aus Poly-(2-10)glykol mit einer aliphatischen Carbonsäure (C<sub>6-22</sub>), Monoether aus einem Polyethylenglykol mit einem aliphatischen Alkohol (C<sub>12-18</sub>), wie z.B. Polyoxyethylen (C<sub>10</sub>)-octylether.

Heterocyclische Verbindungen, wie z.B. 1-Methyl-2-Pyrrolidon.

Biotenside Ester der allgemeinen Formel (XII) :



worin R<sup>3</sup> eine C<sub>2-31</sub>-Alkyl-, eine C<sub>3-31</sub>-Alkenyl- oder eine C<sub>3-31</sub>-Alkapolyengruppe und R<sup>4</sup> Citronellyl-, Farnesyl-, Geranyl-, Isophytyl- oder Phytyl- bedeuten.

Alle technischen Tenside wurden vor dem Eintrag in die spontan dispergierbaren Konzentrate mittels Filtration, bzw. Chromatographie über neutralem Aluminiumoxyd mit einem inerten Lösungsmittel wie z.B. Tetrahydrofuran, Ethylalkohol oder Dichlormethan gereinigt.

Als Zusätze in die erfindungsgemässen, spontan dispergierbaren Konzentrate eignen sich Vitamine und Provitamine (wie z.B. Vitamin A-Säure, Retinol, Tocopherole), sowie auch ausgewählte Penetrationsverbesserer ("Flux enhancers") und Radikalfänger.

## HERSTELLUNG

### a) Herstellung von 3-O-All-trans-Retinoyl Oleanolsäure

Zu 600 mg All-trans-Retinsäure in 50 ml Dioxan oder Chloroform gibt man bei 15°C unter Luftabschluss 650 mg N,N'-Carbonyldiimidazol. Die Reaktionslösung wird bei 15°C während 24h stehen gelassen. Anschliessend wird die Lösung mit dem entstandenen All-trans-Retinsäure-Imidazolid bei 20°C zu einer Lösung von 900 mg Oleanolsäure, 60 mg Dimethylformamid und 50 mg p-Dimethylaminopyridin in 50 ml Dioxan oder Chloroform zugetropft. Nach 3-stündiger Erwärmung auf 40°C wird das Lösungsmittel durch Vakuumdestillation entfernt. Der Rückstand wird in Essigester oder Dichlormethan aufgenommen, neutralisiert, getrocknet und dann auf einer Aluminiumoxydsäule (neutral, Brockmann Aktivität I) mit Cyclohexan/Essigester oder Methylcyclohexan/Dichlormethan (90:10, bzw. 98:2) als Eluiermittel chromatographiert.

Man erhält das Produkt 3-all-trans-Retinoyl-Oleanolsäure.

-- 16 --

Smp. 147,5-149,5°C; Rf.-Wert auf DC Hexan/Essigester (90:10): 0,75.

In vergleichbarer Weise können auch folgende Verbindungen hergestellt werden:

3-O-all-trans-Retinoyl Glycyrrhetinsäure,

Smp. 159-160,5 °C; Rf.-Wert auf DC Hexan/Essigester (90:10): 0,70.

3-O-Linoleoyl Glycyrrhetinsäure

3-O-Linolenoyl Glycyrrhetinsäure

3-O-Linoleoyl Oleanolsäure

3-O-Linolenoyl Oleanolsäure

*b) Herstellung von 3-O-(10-Undecenoyl) Oleanolsäure*

Zu 900 mg Oleanolsäure und 75 mg Dimethylformamid in 50 ml Toluol werden bei 20°C 600 mg 10-Undecenoylchlorid in 30 ml Toluol zugetropft. Die Reaktionslösung wird am Rückfluss während drei Stunden auf 60°C erhitzt. Anschliessend wird das Lösungsmittel durch Vakuumdestillation entfernt. Der Rückstand wird auf einer Silicalgelsäule mit Cyclohexan/Essigester (95:5) als Eluiermittel chromatographiert. Man erhält das Produkt:

3-O-(10-Undecenoyl) Oleanolsäure,

mit einem Brechungsindex (BI) von 1.44455.

In vergleichbarer Weise können auch hergestellt werden:

3-Isovaleroyl Oleanolsäure, BI 1.43150

3-O-Lauroylester Oleanolsäure, BI 1.43150

3-Oleyl Oleanolsäure

3-Lauroyl Glycyrrhetinsäure

3-Oleyl Glycyrrhetinsäure

3,28-Diundecenoylbetulin

3,28-Dilauroylbetulin

3,28-Dipalmitoylbetulin

*c) Herstellung von 3-O, 28-O-Dilauroylbetulin*

In einem trockenen Dreihalskolben, versehen mit Magnetrührer, Einlass für Schutzgas, Kühler und Septum wurde die Lösung von 347 mg Betulin in 4 ml abs. Pyridin mit einigen Kriställchen 4-Dimethylaminopyridin versetzt und dann auf 0°C gekühlt. Hierauf erfolgte die tropfenweise Zugabe von 0,3 ml Lauroylchlorid durch das Septum mittels einer Spritze. Nach dem Entfernen des Kühlbades wurde die Lösung unter ständigem Rühren auf Raumtemperatur gebracht. Nach 12 h wurde sie mit Benzol verdünnt, dann die Suspen-

-- 17 --

sion filtriert und das Filtrat mit H<sub>2</sub>O, 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Sole ausgewaschen und die Benzollösung über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet.

DC auf Kieselgel mit Essigester/Toluol/Aceton 11:9:1 und Besprühen mit dem Cer-Ammoniummolybdat-Reagens ergab für Betulin einen R<sub>f</sub>-Wert von 0,03 und für das Dilaurat einen solchen von 0,93.

Die weitere Reinigung erfolgte durch Säulenchromatographie an basischem Alox, Aktivität II. Ausbeute 83% an blassgelbem, sehr viskosem Oel nach Trocknen bei 50°C und 0,01 Torr.

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) : 1722 cm<sup>-1</sup> ss

CIMS (NH<sub>3</sub>) : m/z 624,2 (6,2%; M<sup>+</sup> +1 von Allobetulinlaurat); 608,2 (46,4, M<sup>+</sup> +1 - Laurinsäure); 607,2 (100%, M<sup>+</sup> - Laurinsäure); 407,2 (31,65% M<sup>+</sup> - 2 Laurinsäure); 409,2 (5,32%, M<sup>+</sup> von Allobetulinlaurat - Laurinsäure).

{Bei der HV-Destillation tritt teilweise Abspaltung von Laurinsäure und Umlagerung in Allobetulin ein}.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>), 300 MHz): 4,69 (d, J=2,1, 1H von C=CH<sub>2</sub>); 4,60 (q, J=1,3, 1H von C=CH<sub>2</sub>); 4,48 (d,d, J=9,5 und 10,6 (H-C(3))); 4,27 (d, breit, J=10,3, 1H von H<sub>2</sub>-C(28)); 3,84 (d, J=11,0, 1H von CH<sub>2</sub>); 1,69 (s, CH<sub>3</sub>(29)); 1,26 (s, Rest der (CH<sub>2</sub>)-Protonen).

<sup>13</sup>C-NMR ; 174,3 und 173,7 (je ein Lauroyl-CO), 150,2 (C(22)); 109,8 (C(30)); 80,6 (C(3)); 62,5 (C(28)).

#### d) Herstellung von 3-O-Lauroylbetulin

Die Darstellung erfolgt aus 3O,28O-Dilauroylbetulin analog einer Vorschrift von L. Ruzicka et al. [Helv.Chim.Acta 1938, 21, 1708]: die Lösung von 495 mg 3,28-Di-O-lauroylbetulin in 3 ml Benzol wurde mit 6,25 ml 0,1N KOH in Ethanol versetzt und unter Rühren während 12h bei 50°C gehalten. Die klar gewordene Lösung gaben wir auf eine Kieselgelsäule (Kieselgel Merck, 0,04 - 0,063 mm/2,6 x 43 cm, nass gefüllt mit Essigester/Benzol/Aceton 11:9:1). Detektion der gesuchten Substanz mit dem Cer-Ammoniummolybdat-Reagens. Das Monolaurat hat einen R<sub>f</sub>-Wert von 0,84. Ausbeute 280 mg farbloses, sehr zähes Oel, das beim Trocknen bei 50°C/0,01 Torr langsam zu einer halbfesten Masse erstarrt.

R<sub>f</sub> (Kieselgel Merck, AcOEt/Toluol/Aceton 11:9:1) : 0,84.

Zum Vergleich: Betulin 0,63; 3,28-Di-O-Lauroylbetulin: 0,94.

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) : 3615 (OH frei), 2930, 2858, 1720; (CHCl<sub>3</sub>) : 3627, 3492, 2954, 2856, 1717.

CIMS / NH<sub>3</sub>) : m/z 425,3 (100%, M<sup>+</sup> +1 - Laurinsäure);

<sup>1</sup>H-NMR : weitgehend analog zu dem von c), charakteristisch sind die Signale von H<sub>2</sub>-C(28) bei 3,80 (d,d, J=1,5 und 10,8), und bei 3,34 (d, J=10,8)

-- 18 --

**e) Herstellung von 3-O-Lauroylallobetulin**

Allobetulin wurde nach der Vorschrift von H. Schulze und K. Pieroh (Ber. Deutsch.Chem.Ges., 1922, 55, 2332) dargestellt. Je 0,31 und 0,47 g von reinem Allobetulin wurden in 2 ml abs. Pyridin und 10 ml 1,2-Dichlorethan gelöst, dann mit einigen Kriställchen 4-Dimethylaminopyridin versetzt und bei RT via Spritze mit je 1,2 Äquivalenten Säurechlorid tröpfchenweise versetzt. Nach 2 h bei RT wurde während 30 min. auf 50°C erwärmt, dann gekühlt, mit genügend Et<sub>2</sub>O versetzt und mit Wasser, 2N HCl und Kochsalzlösung ausgeschüttelt. Nach Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Filtrieren und Eindampfen wurde in Benzol aufgenommen und die Lösung durch eine kurze Säule von aktiviertem Aluminiumoxid filtiert und das Filtrat eingedampft.

**3-O-Lauroylallobetulin (n = 10):** farbloses, zähes Öl, das im Vakuum allmählich erstarrt. R<sub>f</sub> 0,85

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) : keine OH-Banden, 2925, 2855, 1720 (Estercarbonyl)

CIMS (NH<sub>3</sub>) : 425,3 (100%, M+ +1 - Laurinsäure);

NMR: analog zu 3-O-Palmitoylbetulin (n = 14)

**3-O-Palmitoylallobetulin (n = 14):** farblose Kristalle aus Tetrahydrofuran/Pentan/Methanol, Smp. (Vak.) 185-189°C; Ausbeute 82%.

R<sub>f</sub> Laurat : 0,92, Palmitat 0,93 (Allobetulin 0,72, Betulin 0,65)

IR (CHCl<sub>3</sub>) : keine OH-Banden, 2959, 2927, 2855, 1717; (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) : keine OH-Banden, 2950, 2931, 2855, 1767, 1720.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>), 300 MHz, Auswahl von strukturbeweisenden Signalen): 4,487 (d,d, H-C<sub>3</sub>); 3,775 und 3,444 (je d, J=8,2, H<sub>2</sub>-(28)); 3,530 (s breit, H-C(19)); 2,294 (t, J=7,3, α-CH<sub>2</sub>).

CIMS (NH<sub>3</sub>) : 425,4 m/z (100%, M+1 - Palmitinsäure);

<sup>13</sup>C-NMR : 171,4 Palmitoyl-CO); 87,8 (C(3)); 71,2 (C(28)); 80,4 (C(19)).

**f) Herstellung von 3-O-Palmitoyl-Betulinsäure-Methylester**

Aus reiner Betulinsäure wurde der Methylester durch Verestern ihrer Lösung in THF/MeOH mit frisch hergestellter etherischer Diazomethanlösung im Überschuss hergestellt (vgl. V. Bruckner, J. Kovács, J. Kozka, J.Chem.Soc. 1948, 948). Die Lösung von 0,62 g reinem Methylester in 2 ml abs. Pyridin und 10 ml 1,2-Dichlorethan wurde mit wenig 4-Dimethylaminopyridin versetzt und hierauf wie oben unter e) acyliert und aufgearbeitet. Erhalten wurden 0,75 g farbloses, sehr zähes Öl, das bei RT nicht kristallisierte.

R<sub>f</sub> : 0,91 (Betulinsäuremethylester 0,74)

IR (CHCl<sub>3</sub>) : 2928, 2855, 1719, 1641, 1465.

In entsprechender Weise kann auch der Methylester der Oleanolsäure, der 18 $\beta$ -Glycyrrhetinsäure (Enoxolon), bzw. der Ursolsäure hergestellt und an O-C(3) mit einer aktivierten, gesättigten oder ungesättigten Carbonsäure acyliert werden. Vgl. dazu auch A. Winterstein, W. Hämmerle, Z.Physiol.Chem., 1931, 199, 71.

**g) 3-O-Palmitoyloleanolsäuremethylester (n = 14)**

Farblose Kristalle aus Diisopropylester/Pentan, Smp. 62-63°C, Rf 0,88 (Oleanolsäuremethylester 0,69; Oleanolsäure 0,60). IR (CHCl<sub>3</sub>) : 2928, 2855, 1717, 1464.

**h) 3-O-Palmitoylglycyrrhetinsäuremethylester (n = 14)**

Farblose Kristalle aus Diisopropylether/Pentan; Smp. 130°C.

UV (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) :  $\lambda_{\max}$  247 nm ( $\epsilon$  14'500)

IR (CHCl<sub>3</sub>) : keine OH-Banden, 2928, 2855, 1722, 1653, 1465 cm<sup>-1</sup>

CIMS (NH<sub>3</sub>) : 724,6 m/z (50%, M<sup>+</sup> +1), 723,5 (100%, M<sup>+</sup>), 467,4 (14%, M<sup>+</sup> - Palmitinsäure).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>), Auswahl von Banden): 5,662 (s, H-C(12); 4,48 (dd, J=11,3 und 5,0, H-C(3); 3,68 (s, OCH<sub>3</sub>); 2,80 (m, H-C(18)); 1,254 (s, CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR : 200,0 (C-11); 176,9 (C-30), 173,6 (Palmitoyl-CO); 169,1 (C-13); 128,5 (C-12); 80,2 (C-3); 51,7 (OCH<sub>3</sub>).

-- 20 --

**ZUSAMMENSETZUNGSBEISPIELE** von *erfindungsgemässen, spontan dispergierbaren KONZENTRATEN*, welche die Wirkstoffe der Formeln (I) bis (VI) enthalten und welche, wenn sie mit Wasser oder 5%-iger Glucoselösung oder physiologischer Kochsalzlösung (Ringerlösung) verdünnt werden, thermodynamisch stabile ULTRAMIKROEMULSIONEN mit einem hydrodynamischen Radius von 2.2 bis 3.0 nm ergeben.

g) 0,1 bis 10 Gewichts-% eines oder mehrerer Ester von ausgewählten pentacyclischen Triterpenverbindungen der Formeln (I) bis (XI),  
 0 bis 5 Gewichts-% einer bekannten, pharmazeutischen Wirksubstanz,  
 1 bis 25 Gewichts-% Isopropylmyristat, Isopropylpalmitat oder Neutralöl, wie z.B. Miglyol® 812 (DYNAMIT NOBEL oder HÜLS),  
 0 bis 45 Gewichts-% eines Phosphorsäureester-Tensides, wie z.B. Diphasol® 3873 (CIBA-GEIGY), Tensid 508 (CIBA-GEIGY), Zerostat® AN oder AT (CIBA-GEIGY), Tinovetin® JU (CIBA-GEIGY), Soprophor® FL (RHÔNE-POULENC),  
 5 bis 90 Gewichts-% Invadin JFC 800 % (CIBA-GEIGY) und/oder Tween®-20 (ICI Specialty Chemicals),  
 bis zu 10 Gewichts-% eines Vitamins oder Provitamins.  
 bis zu 10 Gewichts-% eines Stabilisators, Radikalfängers, biologischen Vektors oder Penetrationsverbesserers und Trägerstoffe und/oder Verdünnungsmittel.

h) 0,5 bis 5 Gewichts-% eines oder mehrerer Wirkstoffe der Formeln (I) bis (XI),  
 5 bis 25 Gewichts-% eines oder mehrerer biotensider Ester der allgemeinen Formel (XIII):



worin R<sup>4</sup> eine C<sub>2-31</sub>-Alkyl-, eine C<sub>3-31</sub>-Alkenyl- oder eine C<sub>3-31</sub>-Alkapolyengruppe und R<sup>5</sup> Citronellyl-, Farnesyl-, Geranyl-, Isophytyl- oder Phytyl- bedeuten.

30 bis 45 Gewichts-% Invadin® JFC 800% und/oder Tween®-20,  
 30 bis 45 Gewichts-% Soprophor® FL oder Diphasol® 3873.

N.B.: INVADIN® JFC 800% (CIBA-GEIGY) ist ein wasserfreies tert. Octylphenylpolyoxyethylenether-Tensid mit 9 bis 10 Oxyethylen Gruppen.  
 TWEEN®-20 ist ein Polyoxyethylen-(20)-sorbitan-monolaurat, bzw. das Polysorbate-20 in der CTFA-Classification.

-- 21 --

**BEISPIEL für die pharmazeutische Herstellung eines Systempräparates mit erfindungsgemässen Konzentraten in der Form von "multiple units".**

**i) Granulierung**

Metolose® 90 SH-4000 (SHIN-ETSU CHEMICAL)	90.0 g
Avicel® PH-101	80.3 g
Erfindungsgemässes MARIGENOL®-KONZENTRAT	139.4 g
Aerosil® 200	80.3 g
	Σ 390.0 g

Granulieren/formen im Schnellmischer oder im Rotationsbett unter Zusatz von 110 g Ethanol, brechen, sieben 18 bis 42 mesh, trocknen 24 h bei 40 °C.

**k) MSR- und RETARD-Ausrüstung**

im Rotationsbett mit AQOAT® AS-HG (SHIN-ETSU CHEMICAL) und Talk

**l) Zusammensetzung fertiges Granulat/bzw. Micropellets**

Kernmaterial	44 %
Erfindungsgemässes MARIGENOL®-KONZENTRAT	25 %
MSR-Beschichtung	31 %
	Σ 100 %

N.B.: MSR = Magensaft-Resistenz. Die Pellets/Granulate gemäss a) können auch ohne Befilmung unmittelbar in Kapseln abgefüllt werden, welche aus AQOAT® (HPMC-AS-M oder HPMC-AS-N) hergestellt sind, mit Aceton/Ethanol 1:1 verschlossen werden und so die Funktionen der MSR und der verzögerten Abgabe (Retard) angemessen steuern.

**BIOLOGISCHE PRÜFUNGEN**

Die antitumorale/antivirale/antiparasitäre Wirkung von spontan dispergierbaren Konzentraten mit Wirkstoffen gemäss den Herstellungsbeispielen a) bis e), sowie den Aufarbeitungsbeispielen f) und g) wird anhand folgender Prüfungsergebnisse bestätigt:

**1. In vitro-Tests mit geeigneten Tumorzell-Linien**

Es wurde ein biologisches Assay-System entwickelt, das mit Mikrotiterplatten und Verdünnungsreihen arbeitet. Angesetzt werden je  $10^4$ /ml Tumorzellen in Kulturmedium RPMI 1640 mit 10% fötalem Kalbserum inaktiviert (GIBCO); sie werden so undicht ausgesät, dass sie während des Assays in nichtkonfluenten Monolayers wachsen können. Die Probenzugabe erfolgt nach 6 bis 24 Stunden, mit 100  $\mu$ l pro Reihe, die man dann im 1. Loch mit 100  $\mu$ l Medium versetzt. Davon wird die Hälfte entnommen und in das folgende Loch eingebracht, wieder mit 100  $\mu$ l Medium versetzt, usf. Es entsteht eine geometrische Verdünnungsreihe  $n\%$ .

Die Proben werden im Plaque Assay während 3 bis 5 Tagen bei 37°C mit 3½% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschliessend färben/fixieren mit 0,1% Kristallviolett (Fluka, Buchs) in einer Lösung von 70% Methanol, 1% Formaldehyd, 29% Wasser. Die Auswertung wird am Mikroskop vorgenommen, Vergrösserung 300-fach. Man bestimmt die grösste cytotoxische Verdünnung. Die quantitative Auswertung lässt sich auch mittels Scanning und Absorptionsmessung am Spektrophotometer vornehmen.

## 2.0 Prüfung auf Zytotoxizität

2.1 Zytotoxizität der MARIGENOL®-KONZENTRATE  
geprüft an Py6-Zellen (Virus infizierten 3T3 Maus-Fibroblasten)

SUBSTANZ	PRÄPARATE im Test	EXPOSITION 24 h In Verdünnung wirksam bis zu 1:	EXPOSITION 96 h In Verdünnung wirksam bis zu 1:
BETULIN-3-O-MONOLAURAT	MIKROEMULSION (ME) 1:100 AKTIVSUBSTANZ	20'000 2 Mio.	20'000 2 Mio.
ALLOBETULIN-3-O-MONOLAURAT	ME 1:100 A.S.	80'000 8 Mio.	640'000 64 Mio.
BETULIN-3,28-DILAURAT	ME 1:100 A.S.	20'000 2 Mio.	40'000 4 Mio.
ENOXOLON-3-O-LAURAT	ME 1:100 A.S.	16'000 400'000	128'000 3.2 Mio.
ENOXOLON-10-UNDECENOAT	ME 1:100 A.S.	16'000 400'000	128'000 3.2 Mio.
3-Iso-VALEROYL-OLEANOLSÄURE	ME 1:100 A.S.	128'000 6,4 Mio.	512'000*) 25,6 Mio.
3-O-10-UNDECENOYL-OLEANOLSÄURE	ME 1:100 A.S.	16'000 400'000	128'000 3.2 Mio.
3-O-LAUROYL-OLEANOLSÄURE	ME 1:100 A.S.	64'000 3,2 Mio.	256'000*) 12,8 Mio.
3-O-OLEYL-OLEANOLSÄURE	ME 1:100 A.S.	256'000 12,8 Mio.	1'024'000*) 51,2 Mio.
3-RETINOYL-OLEANOLSÄURE	ME 1:100 A.S.	64'000 3,2 Mio.	512'000*) 25,6 Mio.

## FORTSETZUNG

SUBSTANZ	PRÄPARATE im Test	EXPOSITION 24 h In Verdünnung wirksam bis zu 1:	EXPOSITION 96 h In Verdünnung wirksam bis zu 1:
3-UNDECENOYL- GLYCYRRHETIN- SÄURE	MIKROEMULSION (ME) 1:100 AKTIVSUBSTANZ	128'000 6,4 Mio.	512'000*) 25,6 Mio.
3-LAUROYL- GLYCYRRHETIN- SÄURE	ME 1:100 AKTIVSUBSTANZ	64'000 3,2 Mio.	256'000*) 64 Mio.
3-PALMITOYL- GLYCYRRHETIN- SÄURE	ME 1:100 AKTIVSUBSTANZ	128'000 6,4 Mio.	512'000*) 25,6 Mio.

\*) 72 h Verdünnungen: Erste Zeile auf Konzentrat berechnet

Zweite Zeile auf Aktivsubstanz-Gehalt berechnet

## WIEDERHOLUNG in-vitro Test auf Py6-Zellen

SUBSTANZ	EXPOSITION 24 h In Verdünnung wirksam bis zu 1:	EXPOSITION 48 h In Verdünnung wirksam bis zu 1:	EXPOSITION 72 h In Verdünnung wirksam bis zu 1:
Allobetulin-Monolaurat	20'000 2 Mio.	80'000 8 Mio.	160'000 16 Mio.
Allobetulin-Monopalmitat	10'000 1 Mio.	40'000 4 Mio.	160'000 16 Mio.
Betulinsäuremethylester palmitat	20'000 2 Mio.	40'000 4 Mio.	160'000 16 Mio.
Oleanolsäuremethylester monopalmitat	40'000 4 Mio.	80'000 8 Mio.	160'000 16 Mio.
Glycyrrhetinsäuremethy- ester monopalmitat	40'000 4 Mio.	80'000 8 Mio.	160'000 16 Mio.
Hesperidin-dilaurat	10'000 1 Mio.	40'000 4 Mio.	160'000 16 Mio.
Biochanin A dipalmitat	20'000 2 Mio.	80'000 8 Mio.	80'000 8 Mio.

N.B. Verdünnungen: Obere Zahl auf Konzentrat berechnet

Untere Zahl auf Wirksubstanzgehalt berechnet

-- 25 --

**3.0 In-Vitro-Prüfung mit humanen Tumor-Zell-Linien****VITALITÄTSTEST***mit humanen Tumorzell-Linien***1% Konzentrat mit 3-O-Lauroyl-Oleanolsäure****Proliferationstest (Tritium: 1 µCi/pro well H+)**

Verdünnungen	LC 89		U 937		T O M	
	cpm	%	cpm	%	cpm	%
10-2	474	16	583	0.3	788	0.4
10-3	775	26	1'370	0.7	8'328	4.4
10-4	7'265 (?)	250	88'61	45.5	17'766	9.5
10-5	2'782	95	175'127	89.7	22'895	12.2
10-6	2'926	100	191'432	98.0	46'602	24.8
10-7	3'800	131	198'796	101.0	159'207	84.9

cpm-Kontrollen      2'906                              195'125                              187'601

Zell-Linien:      LC 89:      Lungenadenocarcinom  
                             U 938:      Leucemia mieloide acuta  
                             TOM:      Melanoma umano

**AUSWEIS:** %-Vitalität nach 48h mit 1% MARIGENOL®-KONZENTRATEN, als wässrige Ultramikroemulsion dem Medium einmalig beigegeben. Bei der Beurteilung beachte man die verhältnismässig kurze Expositionszeit.

Tests durchgeführt von Dottoressa Anna-Rita Guarini, Università degli Studi di Torino, Clinica medica, Torino, März-April 1995.

**3.1 Übrige Befunde**

Zu den für die unveresterten Grundkörper von Lupeol, Betulin, Betulinsäure und Ursolsäure festgestellten pharmakologischen Wirkungen vgl. u.a.:

Bhattacharyya J. et al., *Phytochemistry*, 1976, 15, 431.

Aszalos Adorjan: "Antitumor Compounds of Natural Origin", CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980, N° 220, 221, 222, 224.

Recío Maria delCarmen et al., *Planta Medica*, 57 (1991)

Yasukawa K. et al., *Oncology* 48, 72-76

Macias F.A. et al., *Phytochemistry*, 1994, 36, 1369

Recío Maria delCarmen et al.: "Investigations on the Steroidal anti-inflammatory Activity of Triterpenoids from *Diospyros leucomelas*", *Planta Medica*, 61 (1995) pp. 9-12

Pisha Emily et al.: "Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis", *Nature Medicine* 1, (1995), 1046-51.

Vgl. auch: O. Gessner: "Die Gift- und Arzneipflanzen von Mitteleuropa", Verlag Winter, Heidelberg, 1953.

Betulin macht in der weissen Rinde von Betula platyphylla bis zu 35% des Trockengewichtes aus. [K. Hirota et al., *Chem.Abstr.* 1948, 42, 6090], was nahelegt, dass es dort eine Schutzfunktion für die Pflanze übernimmt. Der Extrakt aus der trockenen Destillation diente als Heilmittel für verschiedene Anwendungen, sowie als "Birkenteer" zur Herstellung des berühmten russischen Juchtenleders.

Therapeutisch ganz besonders bedeutsam scheinen unter den pentacyclischen Triterpenverbindungen der Lupanreihe die Wirkungen der *Allobetulin-Monoester*, deren Grundgerüst mit seinen fünf anellierten, trans-konfigurierten Cyclohexanringen und mit der polaren Hydroxylgruppe auf der einen und dem diagonal dazu stehenden Tetrahydrofuranring auf der anderen Seite über einen ausgesprochen *flachen Molekülbau* verfügt. Dessen Zentralteil ("Core") wird in seiner Lipophilie durch die senkrecht stehenden Methylgruppen noch verstärkt, während gleichzeitig die hydrophilen (polaren) Gruppen des Moleküls an entgegengesetzten Seiten des "Core"-Teils zu liegen kommen. Damit ist eine Bindung an relativ entfernt liegende polare Gruppen des Rezeptors möglich geworden. Der Mittelteil dient demnach gewissermaßen als "Spacer"; er übernimmt die Haftung an ausgedehnte lipophile Bezirke.

-- 27 --

**3.2 APOPTOSE TEST**  
**mit Py6-Virus transformierten Mausfibroblasten**  
**%-Zellvitalität**

Cytofluor 2300 System; Inkubation 72h, Alama blue; Platte CoStar 96  
 Behandlung: 46 h; Messung EX Filter 530/25; EM Filter 590/35, Sensitivity 2

1%-Konzentrat	1 : 10'000	1 : 20'000	1 : 40'000	1 : 80'000	1 : 160'000
Biochanin A- dipalmitat	0.2	43.4	61.3	79.2	94.0
Enoxolone (Glycyrrhetinsäure) methylester- palmitat	0.8	52.2	65.5	96.8	102.4
Oleanolsäure methylester monopalmitat	4.2	50.6	63.7	95.2	100.4
Betulinsäure monopalmitat	0.7	42.6	51.6	90.0	96.5
Allobetulin monopalmitat	0.6	38.8	59.3	86.1	89.5
Allobetulin monolaurat	23.9	63.3	66.2	94.9	99.2
Hesperidin perlaurat	0.1	34.5	55.1	79.0	94.4
C <sub>5:0</sub> -Cholestanyl ester	15.4	52.0	72.0	100.4	100.7

Konzentrat Verdünnungen: 1:10'000 (100 ppm) bis 1:160'000 (6,6 ppm)

Wirkstoffgehalt: 1 ppm bis 67 ppb

Versuch durchgeführt beim STI, Basel, 15. bis 20. Dezember 1996

(File 201296-001/03).

**4.0 Prüfung auf Stimulierung der Immunresponse**

Mit humanen Tumorzellen

(Lungencarcinom LC 89)

KONZENTRAT enthaltend	VITALITÄT in % Verdünnung 10 <sup>-5</sup>	VITALITÄT in % Verdünnung 10 <sup>-6</sup>
4% C 22:0-SITOSTERYL- ESTER	88.8	133.0
4% 3-LAUROYL- OLEANYLSÄURE	116.3	136.1

cpm 27'360, Exposition 48 h

Tests durchgeführt von Dottoressa Anna-Rita Guarini, Università degli Studi di Torino, Clinica medica, Torino, 21.-24.3.1995

### **5.0 Prüfung auf antivirale Wirkung.**

**5.1 Prüfung auf Schutz- und antivirale Wirkung gegenüber sensitiven MT4-Zellen, infiziert mit dem AIDS-VIRUS HIV ("Human Immunodeficiency Virus").** Die Tests wurden am Institut für Infektionskrankheiten der Universität Turin vorgenommen (Direktor: Prof.Dott. P. GIOANNINI), und von Prof.Dott. Alberto BIGLINO, Leiter der Abteilung für Infektionskrankheiten am Ospedale di Asti, U.S.L. 19, unter Mitarbeit von Dott<sup>a</sup>. Brunella FORNO und Dott<sup>a</sup>. Annamaria POLLONO durchgeführt. Juni/Juli 1994 und März/April 1995.

### **5.2 Schutzeffekt auf die Wirtszellen (MT4-Lymphozyten)**

MT4-Zellen (eine eternalisierte T-Zell-Linie, welche sehr empfindlich gegen den HIV zytopathogenen Effekt "CEP" ist) aus einer 24h-alten Kultur wurden bei einer Konzentration von  $2 \times 10^5$ /ml suspendiert, in 1.2 ml aliquote Teile in Polypropylen Röhrchen aufgeteilt und mittels Zentrifugierung pelletiert. Die Pellets wurden dann entweder infiziert mit 200  $\mu$ l einer Stammlösung von HIV III B Zellen (Titer: 600 CCID<sub>50</sub>/ml) oder scheininfiziert mit reinem Medium, für 90 Min. bei 37°C inkubiert und anschliessend mit 1 ml reinem Medium versetzt, um die anfängliche Zellkonzentration wieder einzustellen und die HIV-Konzentration auf 100 CCID<sub>50</sub>/ml zu bringen. [CCID<sub>50</sub>/ml = 50% cell culture infective dose].

100  $\mu$ l-Volumina der im Test eingesetzten MARIGENOL®-Konzentrate, verdünnt zu wässrigen Ultramikroemulsionen  $10^{-3}$  und dann zusätzlich verdünnt von  $10^{-3}$  auf  $10^{-5}$  mit Medium RPMI 1640, wurden dreifach eingebracht in flachbödige Mikrotiterplatten mit 96 Löchern. In jedes Loch wurden 100  $\mu$ l der HIV-infizierten oder der scheininfizierten MT4-Kultur eingegeben, um so 4 Versuchsreihen aufzustellen:

- einfache Kultur (Kontrollen; Prüfung auf Lebensfähigkeit der MT4 Zellen:  $10^5$  Zellen/ml oder  $2 \times 10^4$ /Loch)
- Kultur + HIV (Virus CPE-Kontrolle; Konzentration 50 CCID<sub>50</sub>/ml oder 10 CCID<sub>50</sub>/Loch)
- Kultur + Wirksubstanz in Mikroemulsion
- Kultur + HIV + Wirksubstanz-Mikroemulsion in den Verdünnungen  $10^{-3}$  bis  $10^{-5}$  (= 1'000 ppm, 100 ppm und 10 ppm, bzw. 10 ppm, 1 ppm und 0.1 ppm W.S.-Gehalt)

-- 29 --

Inkubation der Kulturen bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> + 95% Luftfeuchte. 5 Tage nach der Infektion werden 100 µl der Überstandes in jedem Loch entfernt und die Lebensfähigkeit der Zellen mithilfe eines Methyltetrazolsalzes überprüft (MTT, Sigma, 25 µl/Loch in 5 mg/ml Lösung), in einem 2-h Inkubationstest, dem sich eine Solubilisierung mit 100 µl DMSO/Loch und die photometrische Ablesung auf optische Dichte bei 550 nm anschliesst. Restwerte der Zell-Vitalität (Überlebenstest) werden ausgedrückt als %-Differenz gegenüber den HIV CPE-Kontrollen, das Mittel als Null gesetzt. Der gemessene Titer ist Dosis-abhängig. Er sinkt vom Anfangswert von 300% CCID<sub>50</sub> auf 120% CCID<sub>50</sub> und bis auf 2% CCID<sub>50</sub>.

Die *beste Schutzwirkung auf die Wirtszellen* wurde bislang mit einem 1%-igen Konzentrat von β-Sitosteryl-Palmitat bei einer Konzentration von 10<sup>-4</sup> (= 100 ppm Konzentrat in wässriger Ultramikroemulsion) erzielt; sehr beachtenswert sind auch die Ergebnisse mit 1%-igen Konzentraten, enthaltend β-Sitosteryl-Caproylat, β-Sitosteryl-Laurat, β-Sitosteryl-Arachidat oder β-Sitosteryl-Behenat.

**5.3 Wirkung auf die HIV-Infizierbarkeit.** (Virulenz, direkte antivirale, bzw. viruzide Wirkung gegen die erworbene Immunschwäche, das humane "Acquired Immuno-Deficiency Syndrome: AIDS", bzw. gegen pathologisch wirksame Prionen).

Aliquote Mengen von 2 klinisch aufbereiteten Präparaten von Aids-Patienten ("Isolates" mit den Stämmen 21/4 und 4/5) wurden in vollständigem RPMI Medium bei einem Titer von 300 CCID<sub>50</sub>/ml resuspendiert und während 3 h bei +4°C inkubiert mit einem MARIGENOL®-Konzentrat, als Mikroemulsionen in komplettem Medium auf die Konzentrationen 10<sup>-2</sup> bis 10<sup>-5</sup> verdünnt, und sodann zusammen mit einem "leeren" Trägerkonzentrat und mit reinem Medium allein auf ihre Wirkung geprüft.

Nach der Vorinkubation wurde der HIV Titer mittels der CCID<sub>50</sub>-Methode erfasst (CCID<sub>50</sub> = cell culture infective dose 50 %). Von jeder der 6 Virus-Suspensionen wurden kurz zweifache Reihenverdünnungen angefertigt, wovon je 200 µl während 90 Min. mit MT4-Zellen Pellets inkubiert wurden, wie oben angegeben (Siehe 5.1). Am Schluss der Inkubierung werden die Pellets auf die ursprüngliche Zellkonzentration gebracht, indem man jeder Probe die nötige Menge Medium zufügt und sie anschliessend mit je 200 µl in 8 Löcher einer Mikrotiterplatte einbringt. Nach der Inkubation während 5 Tagen wird die Vitalität der Zellen mittels MTT-Test gemessen, wie oben dargestellt. Der HIV Titer wird als reziproker Wert jener Verdünnung angegeben, welche 4 von

-- 30 --

8 Proben einer Reihe (50%) infiziert. Der Inhalt eines Lochs gilt als infiziert, wenn die Ablesung der O.D. bei 550 nm tiefer ausfällt als das Mittel der 8 Kontroll-Löcher minus 2.8 Mal die Standard-Abweichung (untere 95% Vertrauensgrenze). Mit den Wirksubstanzen Ergosteryl-10-Undecenoat und  $\beta$ -Sistosteryl-Palmitat lässt sich in-vitro als Folge der Vorbehandlung der Stämme eine sehr deutliche Replikationshemmung und eine eigentliche Elimination feststellen. Ihre Abwehrwirkung gegen eine Infektion ist Dosis-abhängig. Gar keine Hemmung trat nach der Behandlung mit reinem Carrier-Konzentrat allein ein.

## Auswertung der Prüfergebnisse:

TESTSUBSTRAT	RESTWERTE im HIV-TITER (CCID <sub>50</sub> ) (Mittelwert aus 3 Kulturen)
HIV-Stamm 21/4 ("Clinical isolate") + Medium	300
HIV-Stamm 4/5 ("Clinical isolate") + Medium	200
HIV (2 Stämme) + CARRIER-KONZENTRAT	200 (Mittlerer Titer aus 2 Stämmen)
HIV (2 Stämme) + ERGOSTERYL-10-UNDECENOAT KONZENTRAT 1'000 ppm WIRKSUBSTANZ 10 ppm	25 (Mittlerer Titer aus 2 Stämmen)
HIV (2 Stämme) + β-SITOSTERYL-PALMITAT KONZENTRAT 1'000 ppm WIRKSUBSTANZ 10 ppm	2 (Mittlerer Titer aus 2 Stämmen)
HIV (2 Stämme) + β-SITOSTERYL-PALMITAT KONZENTRAT 100 ppm WIRKSUBSTANZ 1 ppm	50 (Mittlerer Titer aus 2 Stämmen)
HIV (2 Stämme) + β-SITOSTERYL-PALMITAT KONZENTRAT 50 ppm WIRKSUBSTANZ 0.5 ppm	76 (Mittlerer Titer aus 2 Stämmen)
HIV (2 Stämme) + β-SITOSTERYL-PALMITAT KONZENTRAT 10 ppm WIRKSUBSTANZ 0.1 ppm	120 (Mittlerer Titer aus 2 Stämmen)

Restwerte des HIV-1 Titers nach Vorinkubation während 3 h bei + 4°C

-- 32 --

Für die angewandte Prüfmethode vgl. u.a.: Rudi Pauwels, Erik De Clercq et al.: "Sensitive and rapid assay on MT-4 cells for detection of antiviral compounds against the AIDS virus". Rega Institute for Medical Research, Katholieke Universiteit Leuven, 3000 Leuven, Belgium, Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), 1987 (0166-0934/87/503.50); *J.Virol.Methods* 1987; 16, 171-85.

A. Bergamini, C.F. Perna, et al.: A tetrazolium-based colorimetric assay for quantification of HIV-induced cytopathogenicity in monocyte-macrophages exposed to macrophage colony-stimulating factor. *J.Virol. Methods*, 1992; 40(3), 275-86.

Jay A. Levy: "HIV research: a need to focus on the right target", *The Lancet*, Vol. 345, June 24, 1995, pp. 1619-21.

*Molecular Cell Biology*, second Edition, by J. Darnell, H. Lodish, D. Baltimore; Scientific American Books, Chapter 5: Viruses, Structure and Functions, pp. 177-188. New York, 1990 (W.H. Freeman & Co.)

## **6.0 Andere Viren**

### **6.1 Cytomegalie-Virus (CMV)**

Die Prüfung wurde mit humanen, embryonalen Lungenfibroblasten als Wirtszellen vorgenommen, die dann mit dem CMV-Stamm AD 169 infiziert wurden. Der Stamm "CVM umano AD169" wurde während 4h bei +4°C mit unterschiedlichen Konzentrationen der Prüfsubstanz C<sub>16:0</sub>-β-Sitosterylester, formuliert als 1%-iges Konzentrat und dann verdünnt zu einer wässrigen Mikroemulsion 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> und 10<sup>-5</sup>, inkubiert und daraufhin als vorbehandelte Virus-Suspensionen auf Kulturen von menschlichen, embryonalen Lungenfibroblasten überimpft. Ansatz als konfluente Kultur mit 120'000 Zellen pro shellvial. Die Infektion wurde mittels Zentrifugation während 45 Minuten bei 1500 rpm und bei RT vollzogen, worauf die Injektionssuspension entfernt und 1 ml Kulturmedium MEM mit 2% fötalem Kalbserum (wie bei der Anzucht) beigegeben wurde; die infizierten Zellen wurden sodann während 20h bei 37°C und unter 5%-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre gehalten.

Am Schluss der Inkubation wurde das Medium entfernt, die Zellen gesammelt, mit 2% Aceton-Methanol (2:1) fixiert und 3 Mal mit PBS gewaschen.

Die Quantifizierung erfolgte mittels Immunofluoreszenz-Messung. Die Vials wurden mit dem monoklonalen Antikörper "Anti-P-72 CMV" (einem unmittelbaren Vorläuferprotein des CMV, das schon nach 6 h in den infizierten Zellen nachgewiesen werden kann) versetzt und während 30 Minuten bei 37°C in feuchter Atmosphäre inkubiert.

-- 33 --

Es folgten 3 Waschungen in PBS, eine zweite Inkubation mit dem Fluoreszenz-markierten Antikörper IgG Ziege anti-IgG Maus. Es schliesst sich eine nochmalige Inkubation während 30 Minuten bei 37°C, wie oben angegeben, an, gefolgt von einer 3-maligen Waschung mit PBS. Die Proben werden dann mit 50% Glycerol in PBS auf Glasträger montiert.

Gleichzeitig wurden Kontrollen aufbereitet mit infizierten Zellen, die unter gleichen Bedingungen, aber ohne Vorbehandlung mit der Prüfsubstanz aufbereitet worden sind.

Gezählt werden die für das CMV-spezifische Antigen positiven Nuclei, mithilfe eines Fluoreszenz-Mikroskopes bei 25-facher Vergrößerung in wässriger Phase.

*Es lässt sich ganz eindeutig eine Dosis-abhängige, direkt viruzide Wirkung feststellen.* Das Virus ist nicht mehr virulent genug, um die empfindlichen Wirtszellen zu infizieren.

ERGEBNIS:

**VIRUZIDE WIRKUNG**  
des  $\beta$ -SITOSTERYL-PALMITATES  
(als MARIGENOL®-KONZENTRAT formuliert)

KONTROLLEN: Anzahl der Antigen- gene (anti P-72)	KONZENTRATION MIKROEMULSION 1:1'000	KONZENTRATION MIKROEMULSION 1:10'000	KONZENTRATION MIKROEMULSION 1:100'000
115'000	0	2	82'000

Anzahl der "Nuclei positivi per P-72" (der infizierten Fibroblasten)

Prüfungen durchgeführt von Dottoressa Rossana CAVALLO, Istituto di Microbiologia, Università di Torino, Juli-November 1995.

## 6.2 Herpes-Virus (Herpes simplex, HSV)

Die antivirale/viruzide Wirkung einer wässrigen Mikroemulsion von geeigneten MARIGENOL®-Konzentraten wird mithilfe einer konfluenten Monolayer-Kultur von VERO-Zellen (d.h. "African green monkey kidney cells") festgestellt. Die Wirtszellen werden während 3 h bei 4°C mit der Mikroemulsion oder mit dem Kulturmedium allein vorbehandelt und dann mit einer konstanten Dosis von  $10^4$  Herpes simplex Viren, sog. "plaque forming units" = PFU infiziert. Dauer der Virus-Absorption 1h. Dann Zugabe von 2% Methylcellulose zur Verhinderung der Spreitung des Virus; es entsteht ein elastisches Vlies

-- 34 --

im Kulturmedium MEM + 2% Kalbserum. Anzüchtung während 48h, dann Fixieren und Färben der Monolayers mit 1% Kristallviolett in Methanol.

Die antivirale Wirkung korreliert mit der Zahl von "plaques" von lysierten Zellen, die sich im Kulturmedium MEM + 2% FCS noch bilden. Die Herabsetzung des viralen Titer wird im %-Verhältnis zu den Kontrollen (21 Plaques pro Zelle) angegeben.

Als Prüfsbstanzten wurden folgende Konzentrate in wässriger Verdünnung (ausgehend von einer Mikroemulsion 1:100) eingesetzt:

- 1 % C<sub>20:0</sub>- $\beta$ -SITOSTERYL-ESTER
- 1 % QUERCETIN-PENTA-10-UNDECENOAT
- 1 % C<sub>16:0</sub>- $\beta$ -SITOSTERYL-ESTER
- 1 % C<sub>12:0</sub>-ERGOSTERYL-ESTER

Auswertung:

VERDÜNNUNG	C <sub>20:0</sub> - $\beta$ -SITOESTER: (ARACHIDAT)	QUERCETIN-PENTA-UNDECENOAT	C <sub>16:0</sub> - $\beta$ -SITOESTER (PALMITAT)	C <sub>12:0</sub> -ERGOESTER (LAURAT)
1 : 1'000	Zell-Lysis	Zell-Lysis	Zell-Lysis	Zell-Lysis
1 : 10'000	76 %	48 %	24 %	62 %
1 : 100'000	5 %	0 %	0 %	0 %

Die Ergebnisse zeigen eine deutliche direkte Wirkung auf die HS-Virus-infizierten VERO-Wirtzellen. Bei einer Konzentration von 10<sup>-4</sup>  $\beta$ -Sitosterylarachidat erscheint die Zahl der Plaques, im Vergleich mit den Kontrollen, um 76% herabgesetzt. Der HSV-Titer ist deutlich vermindert.

Bei dieser Konzentration der geprüften Substanzen findet auch keine Lysierung von eternalisierten Lymphozyten vom Typus MT-4, noch der VERO-Zellen selber statt. (Siehe oben unter 5.0)

Prüfungen durchgeführt von Dottoressa Rossana CAVALLO, Istituto di Microbiologia, Università degli Studi di Torino, Juli 1995.

### 6.3 Herpes-Virus (Herpes simplex, HSV)

Wiederholung der Prüfung mit Fluoreszenz-Markierung wie beim CMV-Versuch. Vgl. oben. Ergebnis:

-- 35 --

**VIRUZIDE WIRKUNG**  
**des  $\beta$ -SITOSTERYL-ARACHIDATES**  
**(als MARIGENOL®-KONZENTRAT formuliert)**

KONTROLLEN: Anzahl der infizierten Zellen	KONZENTRATION MIKROEMULSION 1:1'000	KONZENTRATION MIKROEMULSION 1:10'000	KONZENTRATION MIKROEMULSION 1:100'000
38	0	0	20

#### 6.4 Hepatitis B Virus (HBV)

Die Tests wurden mit immortalisierten Leberhämatom-Zellen vorgenommen, die nach Infektion mit dem Hepatitis B Virus die beiden Antigene Hbs Ag (ein "surface antigen" aus der äusseren Hülle des Virus) und Hbe Ag (ein "core antigen" aus dem Kern des DNA Virus) sezernieren. Orientierende Versuche in-vitro wurden mit je einem 1%-igen Konzentrat der drei Prüfsubstanzen  $\beta$ -Sitosteryl-Palmitat,  $\beta$ -Sitosteryl-Arachidat und Ergosteryl-Isovalerat von Prof. Dott. Antonio Ponzetto und von Dott<sup>a</sup> Rossana Cavallo, Università degli Studi di Torino, durchgeführt.

Bei einer Verdünnung von  $10^{-5}$  und Inkubation über 72h zeigte bislang das  $\beta$ -Sitosteryl-Palmitat Konzentrat die stärkste Wirksamkeit. Die Ergebnisse sind deutlich Dosis-abhängig und variieren auch mit der Inkubationszeit. Besonders ausgeprägt tritt die Wirkung beim Oberflächen-Antigen Hbs Ag in Erscheinung.

#### HEPATITIS B Virus

##### Sezernierte Antigene

PRÄPARAT	Hbs Ag	Hbe Ag
KONTROLLEN in Medium 1:4 Titerbestimmung	17.97 pos.	18.707 pos.
$\beta$ -SITOSTERYL-PALMITAT	1.47 neg.	1.777 neg.
$\beta$ -SITOSTERYL-ARACHIDAT	3.76 pos.	3.935 pos.
ERGOSTERYL-ISOVALERAT	5.78 pos.	6.27 pos.

**7.0 Antiparasitäre Wirkungen**

Orientierende Prüfungen wurden am Schweizerischen Tropeninstitut Basel (PD. Dr. Ronald Kaminsky und Frau Yvonne Grether) durchgeführt. Es wurde in ersten Testreihen untersucht, ob signifikante Ergebnisse in-vitro zu verzeichnen seien gegen *Trypanosoma rhodesiense* (den Erreger von Schlafkrankheit), gegen *Trypanosoma cruzi* (den Erreger der Chagas-Krankheit) und gegen *Leishmania donovani* (den Erreger von Leishmaniose).

Eine beachtliche antiparasitäre Wirksamkeit liess sich vorab für ausgewählte Cholestanyl- und Bioflavonoid-Ester-Konzentrate, sowie für das Z-Gly-Phe-D<sub>3</sub>-Esterkonzentrat nachweisen, bei Konzentrationen, welche keine basale zytotoxische Wirkung auf murine Muskelzellen oder Makrophagen erzeugen. Sie ist spezifisch gegen *Leishmania donovani*.

**Vorläufige Ergebnisse:**

SWISS TROPICAL INSTITUTE, BASEL  
In-vitro assays, WHO-screening as SOP

<i>Parasite</i>	<i>Strain</i>	<i>Stage</i>	<i>Standard</i>	<i>Test N°</i>
T.b.rhodesiense	STIB 900	trypomastigotes	Melarsoprol	T9611
L.donovani	MHOM-ET-67/L82	amastigotes	Pentostam	L9604/05
T.cruzi	MHOM/Br/00/Y	trypomastigotes	Benznidazol	C0606/08

All values as:        μg/ml

**Legend\***    r = active on T.b.rhodesiense  
               d = active on L. donovani        t = cytotoxic on mammalian cells  
               c = active on T. cruzi            - = inactive or low activity

MIC = minimum inhibitory concentration  
 IC<sub>50</sub> = 50% killing rate concentration

TDR-Code	T.b. rhodensiense		T. cruzi	L. donovani	Cytotoxicity		Test score * r,d,c, t,-,
	MIC	IC-50	MIC	IC-50	L-6 MIC	Macroph MIC	
<b>Standards</b>	<b>0.011</b>	<b>0.0004</b>	<b>3.7</b>	<b>30</b>	<b>&gt;100</b>	<b>&gt;90</b>	
EP1	100	-	100	<30	>100	90	d
EP2	100	-	100	<30	>100	90	d
EP3	100	-	ne	<30	11	90	d
EP4	100	-	100	<30	>100	>90	d
EP5	100	-	100	<30	100	90	d
EP6	100	-	11		33	30	
EP7	100	-	100		>100	30	
EP8	100	-	100		100	30	
EP9	100	-	100		>100	30	
EP10	100	-	100	<30	100	90	d
EP11	100	-	100		100	30	
EP12	100	-	100		>100	30	
EP13	100	-	100		>100	30	
EP14	100	-	100		>100	30	
EP15	100	-	100		>100	30	
EP16	100	-	100		>100	30	
1N	33	15	33	20	100	90	
2N	33	7	100	20	100	90	
T0	>100	>100	>100	-	>100	>90	-
T1	>100	18,0	100	<30	100	90	d
T10	100	16	100	<30	100	90	d
T11	100	18	100	<30	100	90	d
T12	100	20		<30		90	d

EP 1	1% Konzentrat	CHOLESTANYL-ISOVALERAT
EP 2	1% Konzentrat	CHOLESTANYL-10-UNDECENOAT
EP 3	1% Konzentrat	CHOLESTANYL-PALMITAT
EP 4	1% Konzentrat	CHOLESTERYL-n-VALERAT
EP 5	1% Konzentrat	CHOLESTERYL-LAURAT
EP 6	1% Konzentrat	CHOLESTERYL-PALMITAT
EP 7	1% Konzentrat	SITOSTERYL-LAURAT
EP 8	1%-Konzentrat	$\beta$ -SITOSTERYL-PALMITAT
EP 9	1%-Konzentrat	$\beta$ -SITOSTERYL-ARACHIDAT
EP 10	1%-Konzentrat	$\beta$ -SITOSTERYL-BEHENAT
EP 11	1%-Konzentrat	STIGMASTERYL-LAURAT

-- 38 --

EP 12	1%-Konzentrat	STIGMASTERYL-PALMITAT
EP 13	1%-Konzentrat	ERGOSTERYL-n-VALERAT
EP 14	1%-Konzentrat	ERGOSTERYL-LAURAT
EP 15	1%-Konzentrat	ERGOSTERYL-PALMITAT
EP 16	1%-Konzentrat	ERGOSTERYL-BEHENAT
1N	1%-Konzentrat	$\beta$ -SITOSTERYL-PALMITAT
2N	1%-Konzentrat	$\beta$ -SITOSTERYL-PALMITAT
T0	100%	C11:1-CITRONELLYL-ESTER (COEMULGATOR)
T1	100%	COEMULGATOR + TENSIDE
T10	1%-Konzentrat	$\beta$ -SITOSTERYL-PALMITAT
T11	1%-Konzentrat	$\beta$ -SITOSTERYL-ARACHIDAT
T12	1%-Konzentrat	ERGOSTERYL-LAURAT

Werden die Messwerte der Konzentrate auf W.S.-Gehalt bezogen, sind sie um den Faktor 100 kleiner.

### **8.0 Allgemeine Verträglichkeit der MARIGENOL®Präparate**

#### **8.1 Toxizität in-vivo**

Test mit normalen 8-wöchigen weiblichen BALB/c nAncr (H-2d)-Mäusen, geliefert von Charles River Laboratories, Calco (Italien). Während 4 Wochen täglich zweimalige Injektion i.v. von je 0,250 ml wässriger Mikroemulsion, gebildet aus den angegebenen Konzentraten, bzw. mit physiologischem Puffer für die Kontrollen. Färbung mit May Grünwald-Giemsa.

Zeit der Behandlung: 28 Tg.

Blutanalyse: nach der letzten Injektion

Anzahl Tiere: 13 Gruppen zu 5 je Tieren

**RESULTAT:** *Es treten keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollen auf. Es konnte zudem keine Toxizität der Konzentrate auf die Leukozyten-Population festgestellt werden. Auch die Erythrozyten-Population zeigte normale Werte. Alle Tiere waren und blieben gesund bis zum Schluss der Versuche.*

Durchführung der Proben: Prof. Dott. Guido FORNI, Dott<sup>a</sup> Stefania VAI, Università di Torino, Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Ospedale San Luigi Gonzaga, I-10'043 ORBASSANO (TO).

**8.2 Untersuchung des Blutbildes****Effekt auf normale humane LYMPHOMONOCYTEN**

Zellen: normale humane phagozytische weisse Blutzellen  
(Macrophagen);  $2 \times 10^5$  Zellen pro well

Stimulation der Kontrollen: 1 % PHA (Phytohemagglutinin)

PRÄPARAT	VERDÜNNUNG	TEST 1	TEST 2	TEST 3
<b>KONTROLLEN PHA 1%</b>	<i>(stimuliert)</i>	cpm 2682 80'981	cpm 3386 61'966	cpm 3386 61'966
<b>KONZENTRATE als wässrige MIKROEMUL- SIONEN: mit 100'000 bis 1 ppm Konzen- tratgehalt</b>	10-1 10-2 10-3 10-4 10-5 10-6	1076 1396 1431 1386 1656 2536	3826 3726 2141 3221 2888 2105	3936 3845 2939 2752 3093 3046

Test 1 : 2 %-Konzentrat enthaltend C<sub>12:0</sub>-Cholesteryl Ester

Test 2 : 2 %-Konzentrat enthaltend C<sub>16:0</sub>-Ergosteryl Ester

Test 3 : 2 %-Konzentrat enthaltend C<sub>5:0</sub>-Cholecalciferyl Ester

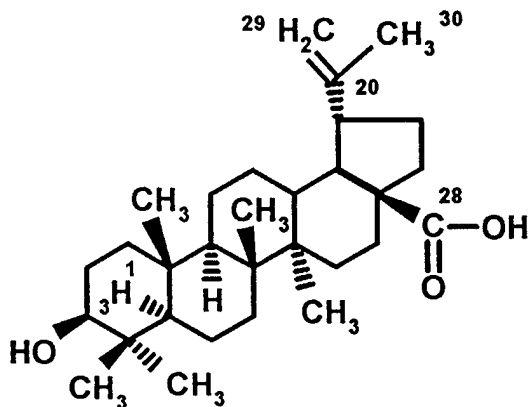
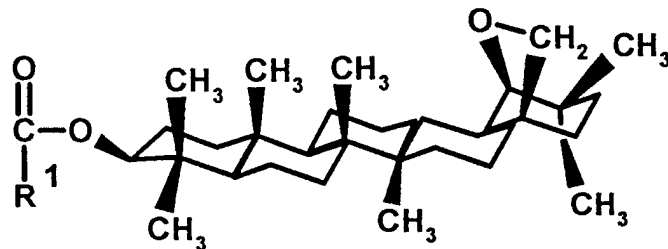
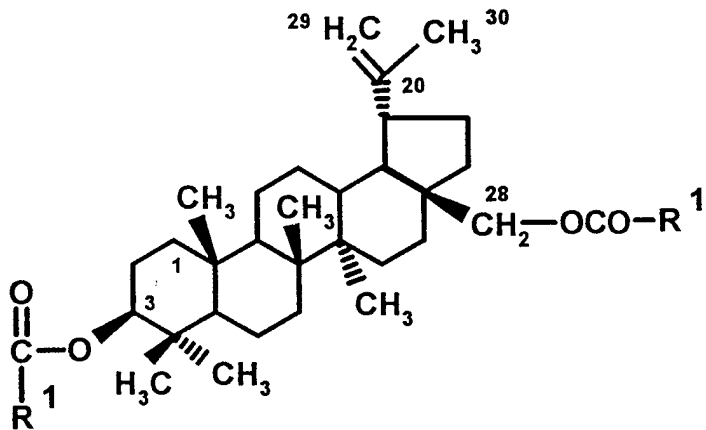
(Vitamin D<sub>3</sub>-iso-Valerate)

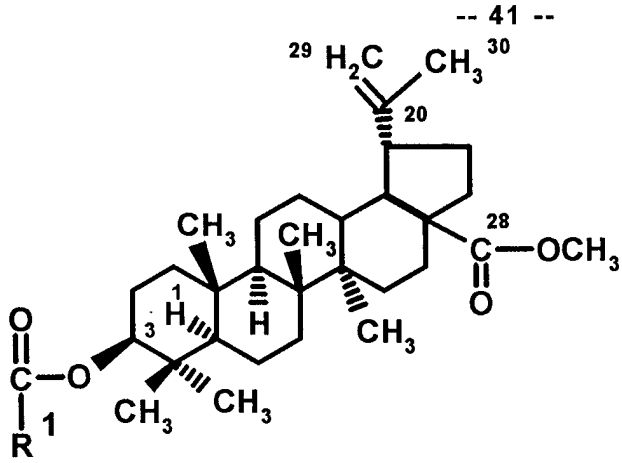
Tests durchgeführt von Dottoressa Anna-Rita GUARINI, Università degli Studi di Torino, Clinica medica, I-10'126 TORINO, 21. bis 24. März 1994.

## PATENTANSPRÜCHE

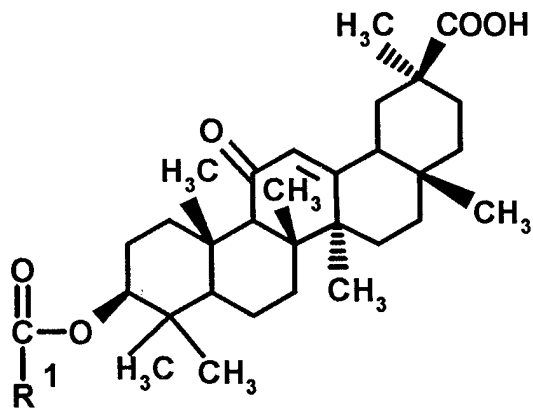
1. Spontan dispergierbares Konzentrat, welches mit Wasser, mit 5%-iger Glucoselösung oder mit Ringerlösung verdünnt, thermodynamisch stabile Ultra-mikroemulsionen ergibt, die Mizellen mit einem hydrodynamischen Radius von 2.2 bis 3.0 nm aufweisen, dadurch gekennzeichnet, dass folgende Bestandteile zu einem pharmazeutisch verwendbaren System zusammengefügt sind:

0,1 bis 10 Gewichts-% einzelner oder mehrerer Ester von pentacyclischen Triterpenverbindungen laut den Formeln (I) bis (XI), bzw. einer Kombination solcher Wirkstoffe:

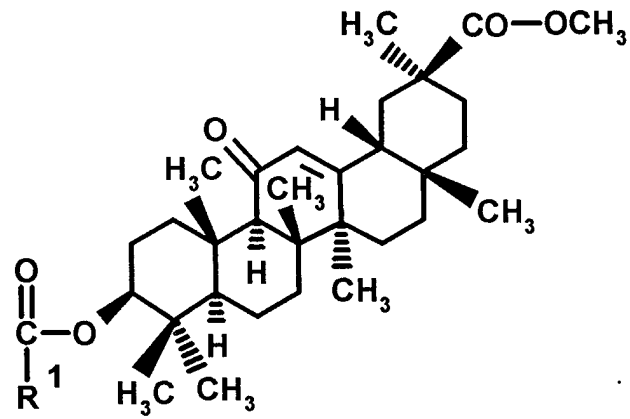




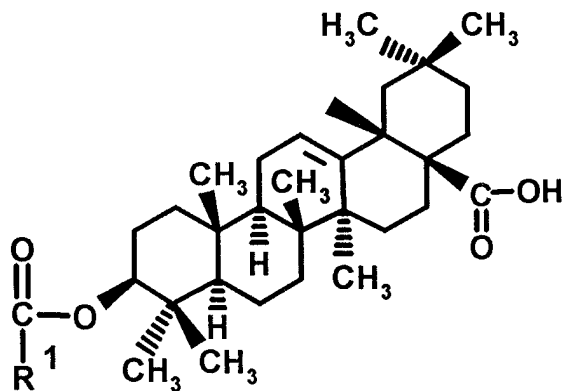
(IV)



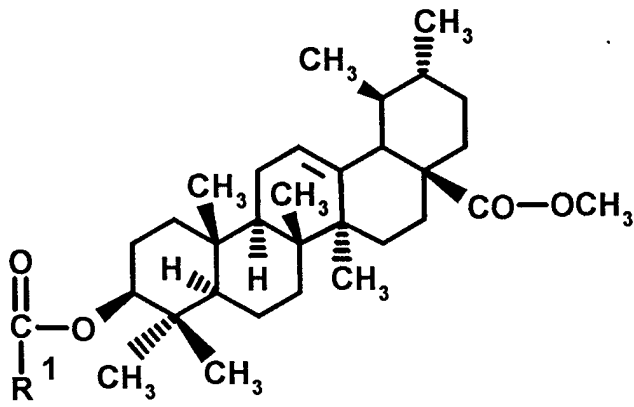
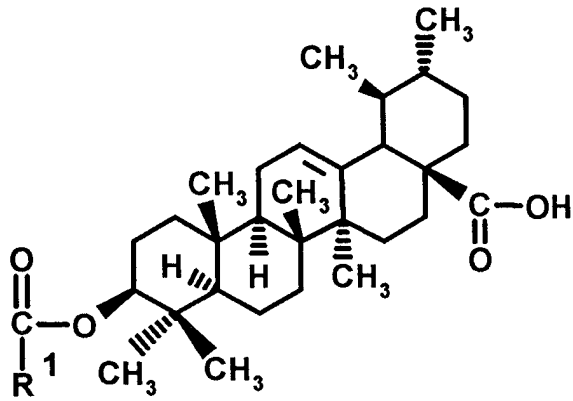
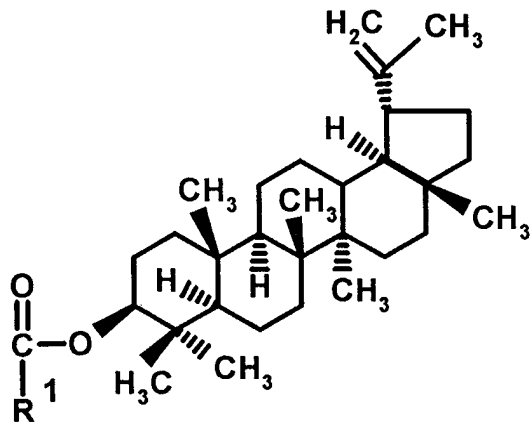
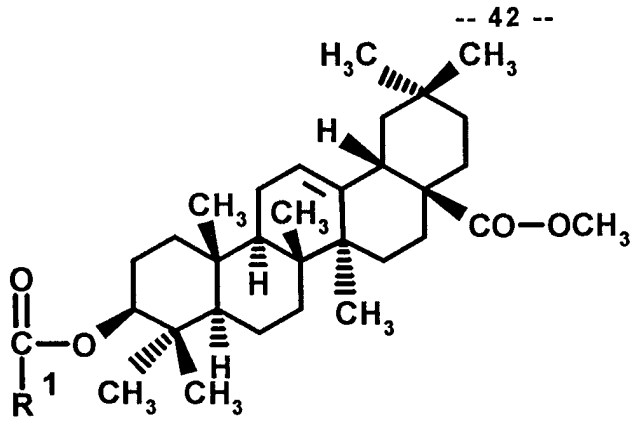
(V)



(VI)



(VII)



wobei in den Formeln (I) bis (XI) R<sup>1</sup> eine C<sub>3-31</sub>-Alkyl-, eine C<sub>3-31</sub>-Alkenyl-, eine C<sub>17-23</sub>-Alkapolen- oder eine Retinoylgruppe ist,  
 0 bis 5 Gewichts-% einer synergistischen, pharmazeutischen Wirksubstanz,

-- 43 --

1 bis 25 Gewichts-% eines als Hydrotrop, bzw. Co-Emulgator dienenden, pharmaverträglichen Lösungsmittels oder Lösungsmittelgemisches,

0,1 bis 90 Gewichts-% eines pharmaverträglichen Tensides oder Tensidgemisches,

bis zu 10 Gewichts-% eines Vitamins oder Provitamins,

bis zu 10 Gewichts-% eines Stabilisators, Radikalfängers, biologischen Vektors oder Penetrationsverbesserers und Trägerstoffe und/oder Verdünnungsmittel.

2. Spontan dispergierbares Konzentrat, enthaltend Verbindungen der Formeln (I) bis (XI) gemäss Anspruch 1, als Mittel zur Herstellung von pharmazeutischen Präparaten mit Wirksamkeit gegen Tumore, Ekzeme und Psoriasis, sowie gegen virale und parasitäre Infektionen.

3. Spontan dispergierbares Konzentrat, enthaltend Verbindungen der Formeln (I) bis (XI) gemäss Anspruch 1, als Mittel zur Herstellung von pharmazeutischen und paramedizinischen Präparaten mit anhaltender prophylaktischer Wirksamkeit gegen Tumore, virale und parasitäre Infektionen, sowie zur Unterstützung der Aufnahme exogener Aktivatoren, Modulatoren und/oder Regulatoren.

4. Spontan dispergierbares Konzentrat gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass folgende Bestandteile vereinigt sind:

0,5 bis 2 Gewichts-% eines oder mehrerer Ester von pentacyclischen Triterpenverbindungen laut den Formeln (I) bis (XI),

5 bis 25 Gewichts-% Isopropylmyristat, Isopropylpalmitat oder Neutralöl (Oleum neutrale), oder eines oder mehrerer biotensider Ester der allgemeinen Formel (XIII) :



worin R<sup>3</sup> eine C<sub>2-31</sub>-Alkyl-, eine C<sub>3-31</sub>-Alkenyl- oder eine C<sub>3-31</sub>-Alkapolyengruppe und R<sup>4</sup> Citronellyl-, Farnesyl-, Geranyl-, Isophytyl- oder Phytyl- bedeuten,

0 bis 45 Gewichts-% eines pharmaverträglichen Phosphorsäureester-Tensides,

5 bis 90 Gewichts-% des wasserfreien tert. Octylphenylpolyoxyethylenether Tensids mit 9 bis 10 Oxyethylen Gruppen und/oder Polysorbate 20.

5. Spontan dispergierbares Konzentrat gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass folgende Bestandteile zusammengefügt sind:

0,5 bis 2 Gewichts-% eines oder mehrerer Ester von pentacyclischen Triterpenverbindungen laut den Formeln (I) bis (XI),

5 bis 25 Gewichts-% eines oder mehrerer biotensider Ester der allgemeinen Formel (XIII) :



worin R<sup>3</sup> eine C<sub>2-31</sub>-Alkyl-, eine C<sub>3-31</sub>-Alkenyl- oder eine C<sub>3-31</sub>-Alkapolyengruppe und R<sup>4</sup> Citronellyl-, Farnesyl-, Geranyl-, Isophytyl- oder Phytyl- bedeuten.

30 bis 45 Gewichts-% des wasserfreien tert. Octylphenylpolyoxyethylenether Tensids mit 9 bis 10 Oxyethylen Gruppen und/oder Polysorbate 20,

30 bis 45 Gewichts-% eines Alkylphenolpolyglykolether Phosphat-Tensides oder des Tristyrylphenol-Polyoxyethylen-18-phosphorsäureester, TEA-Salztensides.

6. Therapeutisches Systempräparat, welches 1 bis 95 Gewichts-% des spontan dispergierbaren Konzentrates gemäss einem der Ansprüche 1, 4 oder 5 und bis zu 10 Gewichts-% eines pharmaverträglichen Zusatzstoffes, Lösungsmittels oder Stabilisators oder eines Gemisches davon enthält und welches in Dosis-Einheitsform als Micropellets, Granulat, Dragées, Suppositorien, Ampullen oder als Kapseln vorliegt.

7. Ein Verfahren zur Herstellung von Estern von pentacyclischen Triterpenverbindungen gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der Formel (XII) :



worin R<sup>2</sup> eine C<sub>3-31</sub>-Alkyl-, eine C<sub>3-31</sub>-Alkenyl-, eine C<sub>17-23</sub>-Alkapolyengruppe oder eine Retinoylgruppe bezeichnet, mit 1,1'-Carbonyldiimidazol oder mit N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid in einem indifferenten Lösungsmittel umgesetzt und anschliessend das entstandene Imidazolid mit einer Verbindung der Formeln (I) bis (X) reagieren lässt.

8. Ein Verfahren zur Herstellung von Estern von pentacyclischen Triterpenverbindungen gemäss Anspruch 1, darauf beruhend, dass eine Verbindung der Formel (XII):



-- 45 --

worin R<sup>2</sup> eine C<sub>3-31</sub>-Alkyl-, eine C<sub>3-31</sub>-Alkenyl- oder einer C<sub>17-23</sub>-Alkapolyengruppe bezeichnet, mit einem Chlorierungsmittel umgesetzt wird und man anschliessend das entstehende Produkt mit einer Verbindung der Formeln (I) bis (X) reagieren lässt.

9. Ein Verfahren zur Herstellung von Allobetulin-Carbonsäureestern, darin bestehend, dass man das Transformationsprodukt Allobetulin durch Kochen am Rückfluss mit 85% Ameisensäure gewinnt und anschliessend mit dem Säurechlorid einer Carbonsäure C<sub>5-31</sub> in abs. Pyridin unter Zusatz von 4-Dimethylaminopyridin acyliert.

10. Ein Verfahren zur Veresterung des Betulinsäuremethylesters, des 18β-Glycyrrhetinsäuremethylesters und des Oleanolsäuremethylesters an Position O-C(3), darin bestehend, dass man diese Produkte mit einer aktivierten Carbonsäure in abs. Pyridin unter Zusatz von 4-Dimethylaminopyridin acyliert.

11. Die Verwendung eines spontan dispergierbaren Konzentrates gemäss Anspruch 1 oder einer daraus bereiteten wässrigen Mikroemulsion als Heilmittel mit Wirksamkeit gegen Tumore, Psoriasis, Ekzeme, virale und parasitäre Infektionen und zur verstärkten Aufnahme exogener Aktivatoren, Modulatoren und Regulatoren.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CH 97/00023

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC <sup>6</sup> : A61K31/56 A61K47/06 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC <sup>6</sup> : A61K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 92 21670 A (MARIEN S A RIEHEN) 10 December 1992 see page 1, lines 1-9 see page 10, line 35 - page 11, line 17; claims 8-14 ---	1-6,11
Y	WO 92 12989 A (MARIEN SA) 6 August 1992 see page 19, lines 1-24; claims 10-15 ---	1-6,11
Y	WO 91 01139 A (MARIEN SA) 7 February 1991 see claims 2-15 ---	1-6,11
Y	EP 0 243 248 A (PHARMA ROCHE POSAY LAB ;VENENCIE PIERRE YVES (FR)) 28 October 1987 see column 4, pages 37-38; claim 5 ---	1-6,11
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 January 1998 (27.01.98)		Date of mailing of the international search report 4 March 1998 (04.03.98)
Name and mailing address of the ISA/ Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CH 97/00023

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 96 39033 A (UNIV NORTH CAROLINA ;BIOTECH RESEARCH LAB INC (US)) 12 December 1996 see abstract; claims 1-4, 12,13 ---	1-6,11
Y	WO 95 35103 A (BERG KURT ;CHRISTENSEN SOEREN BROEGGER (DK); BOYE KNUDSEN CARSTEN) 28 December 1995 see abstract ---	1-6,11
Y	WO 95 04526 A (GLYCOMED INC) 16 February 1995 see abstract ---	1-6,11
Y	MAURYA S K ET AL: "CONTENT OF BETULIN AND BETULINIC ACID, ANTITUMOR AGENTS OF ZIZYPHUS SPECIES" FITOTERAPIA, Bd. 60, Nr. 5, 1989, pages 68/469 XP000612857 see the whole document ---	1-6,11
Y	JP 04 026 650 A (KURARAY CO LTD;OTHERS: 01) 29 January 1992 see abstract ---	1-6,11
Y	JP 07 048 260 A (JAPAN ENERGY CORP) 21 February 1995 see abstract ---	1-6,11
Y	DATABASE EPODOC EPO 28 August 1996 HU YOUPU: "CN-A-1129573" XP002041152 see abstract & CN 1 129 573 A (HU YOUPU) ---	1-6,11
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 67, no. 11, 11 September 1967 Columbus, Ohio, US; abstract no. 54279z, page 5113; column r; XP002053423 see abstract & G.A. TOLSTKOV ET AL: ZH. PRIKL. KHIM, Bd. 40, Nr. 4, 1967, RUSSIA, pages 920-921 ---	9

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CH 97/00023

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 115, no. 23, 9 December 1991 Columbus, Ohio, US; abstract no. 256427s, page 894; column 1; XP002053424 see abstract &amp; SEJBAL ET AL: COLLECT. CZECH. CHEM. COMMUN., Bd. 56, Nr. 8, 1991, TCHECKIEN, pages 1732-1743, -----</p>	9

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/CH 97/00023****Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

**Claims 1-6, 11**  
**Claim 7**  
**Claim 8**  
**Claim 9**  
**Claim 10**

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:  
**Claims 1-6, 11, 9**
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/CH 97/00023

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9221670    A	10-12-1992	CH    681152 A	29-01-1993
		DE    59202618 D	27-07-1995
		EP    0550704 A	14-07-1993
		EP    0636618 A	01-02-1995
		JP    6502185 T	10-03-1994
		US    5502224 A	26-03-1996
		US    5629302 A	13-05-1997
-----			
WO 9212989    A	06-08-1992	CH    681153 A	29-01-1993
		DE    59105470 D	14-06-1995
		EP    0548261 A	30-06-1993
		US    5496813 A	05-03-1996
-----			
WO 9101139    A	07-02-1991	CH    678276 A	30-08-1991
		DE    59004337 D	03-03-1994
		EP    0436682 A	17-07-1991
		JP    2656997 B	24-09-1997
		JP    4501858 T	02-04-1992
		US    5270041 A	14-12-1993
-----			
EP 0243248    A	28-10-1987	LU    86396 A	02-09-1986
		JP    1230518 A	14-09-1989
-----			
WO 9639033    A	12-12-1996	US    5679828 A	21-10-1997
		AU    6328896 A	24-12-1996
-----			
WO 9535103    A	28-12-1995	AU    2734095 A	15-01-1996
		CA    2193396 A	28-12-1995
		EP    0762876 A	19-03-1997
		FI    965114 A	19-12-1996
		NO    965468 A	19-02-1997
-----			
WO 9504526    A	16-02-1995	US    5643884 A	01-07-1997
		AU    7520594 A	28-02-1995
		CA    2169291 A	16-02-1995
		EP    0714291 A	05-06-1996
		JP    9501656 T	18-02-1997
-----			
JP 04026650    A	29-01-1992	NONE	
-----			

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/CH 97/00023

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 07048260 A	21-02-1995	NONE	
-----			

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/CH 97/00023

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
 IPK 6 A61K31/56 A61K47/06

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K

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

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>o</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 92 21670 A (MARIGEN S A RIEHEN) 10.Dezember 1992 siehe Seite 1, Zeile 1-9 siehe Seite 10, Zeile 35 - Seite 11, Zeile 17; Ansprüche 8-14 ---	1-6,11
Y	WO 92 12989 A (MARIGEN SA) 6.August 1992 siehe Seite 19, Zeile 1-24; Ansprüche 10-15 ---	1-6,11
Y	WO 91 01139 A (MARIGEN SA) 7.Februar 1991 siehe Ansprüche 2-15 ---	1-6,11
Y	EP 0 243 248 A (PHARMA ROCHE POSAY LAB ;VENENCIE PIERRE YVES (FR)) 28.Oktober 1987 siehe Spalte 4, Zeile 37-38; Anspruch 5 ---	1-6,11
	-/--	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

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

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
27. Januar 1998	4 March 1998 (04.03.98)

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

8

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 96 39033 A (UNIV NORTH CAROLINA ;BIOTECH RESEARCH LAB INC (US)) 12.Dezember 1996 siehe Zusammenfassung; Ansprüche 1-4,12,13 ---	1-6,11
Y	WO 95 35103 A (BERG KURT ;CHRISTENSEN SOEREN BROEGGER (DK); BOYE KNUDSEN CARSTEN) 28.Dezember 1995 siehe Zusammenfassung ---	1-6,11
Y	WO 95 04526 A (GLYCOMED INC) 16.Februar 1995 siehe Zusammenfassung ---	1-6,11
Y	MAURYA S K ET AL: "CONTENT OF BETULIN AND BETULINIC ACID, ANTITUMOR AGENTS OF ZIZYPHUS SPECIES" FITOTERAPIA, Bd. 60, Nr. 5, 1989, Seite 468/469 XP000612857 siehe das ganze Dokument ---	1-6,11
Y	JP 04 026 650 A (KURARAY CO LTD;OTHERS: 01) 29.Januar 1992 siehe Zusammenfassung ---	1-6,11
Y	JP 07 048 260 A (JAPAN ENERGY CORP) 21.Februar 1995 siehe Zusammenfassung ---	1-6,11
Y	DATABASE EPODOC EPO 28.August 1996 HU YOUPU: "CN-A-1129573" XP002041152 siehe Zusammenfassung & CN 1 129 573 A (HU YOUPU) 28.Juni 1996 ---	1-6,11
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 67, no. 11, 11.September 1967 Columbus, Ohio, US; abstract no. 54279z, Seite 5113; Spalte r; XP002053423 siehe Zusammenfassung & G.A. TOLSTKOV ET AL: ZH. PRIKL. KHIM, Bd. 40, Nr. 4, 1967, RUSSIA, Seiten 920-921, ---	9
	-/--	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie <sup>o</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 115, no. 23, 9.Dezember 1991 Columbus, Ohio, US; abstract no. 256427s, Seite 894; Spalte 1; XP002053424 siehe Zusammenfassung &amp; SEJBAL ET AL: COLLECT. CZECH. CHEM. COMMUN., Bd. 56, Nr. 8, 1991, TCHECKIEN, Seiten 1732-1743, -----</p>	9

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr. weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
  
2.  Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
  
3.  Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

Claims 1-6, 11  
Claim 7  
Claim 8  
Claim 9  
Claim 10

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
  
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
  
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.  
Claims 1-6, 11, 9
  
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 111 170 A (FERAG AG) 20.Juni 1984 -----	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/CH 97/00023

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9221670 A	10-12-1992	CH 681152 A	29-01-1993
		DE 59202618 D	27-07-1995
		EP 0550704 A	14-07-1993
		EP 0636618 A	01-02-1995
		JP 6502185 T	10-03-1994
		US 5502224 A	26-03-1996
		US 5629302 A	13-05-1997
-----			
WO 9212989 A	06-08-1992	CH 681153 A	29-01-1993
		DE 59105470 D	14-06-1995
		EP 0548261 A	30-06-1993
		US 5496813 A	05-03-1996
-----			
WO 9101139 A	07-02-1991	CH 678276 A	30-08-1991
		DE 59004337 D	03-03-1994
		EP 0436682 A	17-07-1991
		JP 2656997 B	24-09-1997
		JP 4501858 T	02-04-1992
		US 5270041 A	14-12-1993
-----			
EP 0243248 A	28-10-1987	LU 86396 A	02-09-1986
		JP 1230518 A	14-09-1989
-----			
WO 9639033 A	12-12-1996	US 5679828 A	21-10-1997
		AU 6328896 A	24-12-1996
-----			
WO 9535103 A	28-12-1995	AU 2734095 A	15-01-1996
		CA 2193396 A	28-12-1995
		EP 0762876 A	19-03-1997
		FI 965114 A	19-12-1996
		NO 965468 A	19-02-1997
-----			
WO 9504526 A	16-02-1995	US 5643884 A	01-07-1997
		AU 7520594 A	28-02-1995
		CA 2169291 A	16-02-1995
		EP 0714291 A	05-06-1996
		JP 9501656 T	18-02-1997
-----			
JP 04026650 A	29-01-1992	KEINE	
-----			
JP 07048260 A	21-02-1995	KEINE	
-----			