

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 80 18419

(54) Extraits de *Marsdenia cundurango* Reichenbach fil, des procédés de préparation de ceux-ci, des agents anti-tumeur les contenant et des compositions les contenant.

(51) Classification internationale (Int. Cl. ³). A 61 K 35/78.

(22) Date de dépôt 22 août 1980.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : Japon, 23 août 1979, n° 107366/1979; 22 octobre 1979, n° 136061/1979; 5 mars 1980, n° 27696/1980; 5 mars 1980, n° 27697/1980; 19 avril 1980, n° 52097/1980.

(41) Date de la mise à la disposition du public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 9 du 27-2-1981.

(71) Déposant : Société dite : ZENYAKU KOGYO KK, résidant au Japon.

(72) Invention de : Hiroshi Mitsuhashi, Den-Ichi Mizuno, Koji Hayashi, Shigeru Abe, Muneaki Takase et Toshiharu Narita.

(73) Titulaire :

(74) Mandataire : Cabinet Z. Weinstein,
20, av. de Friedland, 75008 Paris.

La présente invention concerne essentiellement des extraits de *Marsdenia cundurango* Reichenbach fil, des procédés de préparation de ceux-ci, des agents anti-tumeur les comprenant, et des compositions pharmaceutiques les
5 contenant.

En outre, l'invention concerne des procédés de traitement de tumeur avec ceux-ci.

Le *Marsdenia cundurango* Reichenbach fil appartenant à la famille Asclepiadaceae est un arbrisseau ou arbuste
10 d'un type quelque peu sinueux croissant naturellement sur et entre les montagnes du nord-ouest de l'Amérique du Sud. Son écorce est employée comme aromate mais amère à l'estomac lors de désordre digestif et/ou d'anorexie, habituellement sous la forme d'extrait fluide (commentaire pour la
15 neuvième Pharmacopée japonaise).

Les composants de l'écorce de *Marsdenia cundurango* Reichenbach fil incluent la condurangogenine-A, la condurangogenine-C et de nombreux autres composés de type prégnane et leurs esters et glycosides, et l'extraction, la
20 séparation, les structures, etc de ceux-ci ont été rapportés par exemple dans les documents suivants. Mais, leurs détails ne sont toujours pas clairs en ce qui concerne de nombreux points. R. Tschesche et al., Tetrahedron, 21, p. 1777 (1965); 21, p. 1797 (1965); 23, p. 1461 (1967);
25 et 24, p. 4359 (1968). M. Pailer et al., Monatshefte für chemie, 106, p. 37 (1975). Hiroshi Mitsuhashi et al., Chem. Pharm. Bull., 16, p. 2522 (1968).

Comme résultat de leur étude, les inventeurs de la présente invention ont découvert que certains extraits
30 de *Marsdenia cundurango* Reichenbach fil et certaines fractions d'élution obtenues en soumettant les extraits à une chromatographie liquide à pression élevée (ci-après référencée comme HPLC) ont une activité anti-tumeur. Ainsi, la présente invention a été réalisée.

35 La présente invention sera maintenant présentée en détail.

Selon la présente invention, on préfère l'écorce

de Marsdenia cundurango Reichenbach fil. Cette écorce peut être disponible commercialement, mais on préfère une écorce bien séchée et finement divisée aussitôt après sa collecte.

5 Au vu de la nature de la préparation des extraits, l'ordre de l'emploi des solvants n'est pas critique également dans la réalisation de la présente invention et il peut être changé à convenance. Un mode de réalisation préféré d'un procédé de la présente invention est le
10 suivant :

(Première opération)

Du Marsdenia cundurango Reichenbach fil, par exemple, son écorce, est finement divisé et extrait avec un solvant organique, et l'extrait est concentré à sec sous pression
15 réduite. Comme solvant organique, on peut employer le méthanol, l'éthanol, l'isopropanol ou tout autre alcool inférieur, mais on préfère le méthanol.

Ici, avant l'extraction, le Marsdenia cundurango Reichenbach fil peut être dégraissé avec un hydrocarbure
20 aliphatique tel que le pentane, l'hexane, l'heptane, la ligroïne, ou l'éther de pétrole. On désire effectuer ce pré-traitement en employant de l'hexane en une quantité de 4 à 7 fois (volume/poids) par rapport à celui du Marsdenia cundurango Reichenbach fil.

25 Dans un mode de réalisation de cette opération d'extraction, l'extraction est effectuée en laissant le mélange de solvant-matériau de départ rester à la température ambiante pendant plusieurs heures à plusieurs dizaines d'heures. Ensuite, le mélange est filtré pour obtenir un
30 filtrat. Le résidu est soumis à la même extraction-filtration de manière répétée, et tous les filtrats sont combinés et concentrés à sec sous pression réduite pour obtenir un extrait.

L'extrait est habituellement effectué à des
35 températures normales, mais peut être effectué tout en chauffant de façon à raccourcir le temps d'extraction.

Cette extraction sous chauffage est de préférence réalisée au bain-marie avec de l'eau à une température de bain d'eau de 35-55°C pendant 4-6 heures en employant un condenseur de reflux. Elle peut être effectuée selon la
5 méthode de percolation.

La quantité du solvant employé est de 2 à 5 fois (volume/poids) celle de l'écorce de *Marsdenia cundurango* Reichenbach fil. Le résidu d'extraction est de préférence soumis à l'extraction dans les mêmes conditions au moins
10 trois fois en employant le solvant en une quantité allant de 0,4 à 0,8 fois (volume/volume) celle du solvant tout d'abord employé.

La séparation peut être conduite par filtration sur papier, centrifugation ou analogues. De meilleurs
15 résultats sont obtenus en réalisant la séparation par filtration par succion en employant des additifs de filtration disponibles commercialement, par exemple, les additifs dénommés "Radiolite" (Showa Chemical Industry Co, Ltd Japon), "Celite" (Wako Junyaku Industry Co, Ltd Japon),
20 "Fibra Cel" (Johns Manville Co, Ltd U.S.A.), etc.

La réduction de la pression est réalisée d'une manière habituelle, par exemple, en employant un appareil d'aspiration, une pompe à vide ou analogues.

Comme récipient d'extraction, un récipient à
25 surface interne vitrée ou émaillée, satinée ou vernie ou glacée ou un réalisé en acier inoxydable est employé.

(Seconde opération)

A l'extraît obtenu par la première opération, on ajoute un hydrocarbure chloré autre que le tétrachlorure
30 de carbone tel que du chloroforme ou du dichlorométhane suivi par une vigoureuse agitation pour enlever la portion insoluble. La portion insoluble est soumise à la même opération de manière répétée. Toutes les solutions restantes sont combinées et concentrées à sec sous pression réduite
35 directement ou après une filtration par succion. La quantité du solvant employé est de 2 à 6 fois (volume/poids) celle de l'extraît obtenu par la première opération. Les

résidus respectifs sont de préférence soumis à la même opération 4 à 5 fois, mais en employant le solvant en une quantité allant de 0,2 à 0,4 fois (volume/volume) celle du solvant tout d'abord employé.

- 5 La filtration par succion peut être réalisée de la même manière que la première opération.

(Troisième opération)

- L'extrait obtenu par la seconde opération est dissous dans un hydrocarbure chloré autre que du tétra-
10 chlorure de carbone tel que du chloroforme ou du dichloro-
méthane dans la quantité minimum nécessaire pour dissoudre l'extrait complètement. A la solution résultante, on ajoute un hydrocarbure aliphatique tel que du pentane, du
n-hexane ou de l'heptane à une quantité 2 à 4 fois (volume/
15 volume) celle de la solution suivi par une bonne agitation et on laisse rester pendant plusieurs heures à plusieurs dizaines d'heures pour recueillir la portion insoluble. Alternativement, le tétrachlorure de carbone ou un hydrocarbure aromatique tel que du toluène ou du benzène
20 peuvent être ajoutés à l'extrait directement en une quantité égale ou jusqu'à 3 fois (volume/poids) celle de ce dernier et ensuite travaillés comme dans ce qui précède pour recueillir la portion insoluble.

- La portion insoluble est soumise à la même opération
25 de manière répétée. Cette opération est de préférence réalisée 2 ou 3 fois, chaque fois en employant un solvant en une quantité égale à 0,4-0,6 fois (volume/ volume) celle du solvant premièrement employé. La portion insoluble ainsi obtenue est bien séchée à une température de 50°C
30 ou inférieure sous pression réduite et ensuite broyée pour obtenir un extrait brun semblable à une poudre (ci-après référencé comme extrait A).

- La collection de la portion insoluble peut être réalisée par décantation, filtration par succion ou
35 centrifugation de manière avantageuse.

De façon à diminuer le coût total du procédé de la présente invention et pour rendre l'opération plus facile

à suivre, du *Marsdenia cundurango* Reichenbach fil finement divisé, par exemple son écorce, peut tout d'abord être extrait avec une cétone aliphatique telle que l'acétone ou de la méthyléthylcétone, un ester aliphatique inférieur
5 tel que de l'acétate de méthyle, de l'acétate d'éthyle ou de l'acétate de butyle, un éther tel que du diéthyléther, du tétrahydrofuranne ou du dioxane ou de l'eau chaude ou être traité thermiquement (110-130°C pendant 30 minutes ou davantage) directement suivi par l'extraction avec de
10 l'eau ou un alcool inférieur aqueux, et ensuite l'extrait peut être soumis aux trois opérations mentionnées ci-dessus. Ici, l'extraction peut être réalisée de la même manière que dans la première opération précitée. Habituellement, une β -glycosidase capable de rompre les liaisons
15 glucose des glycosides est présente dans les extraits des plantes, et cet enzyme est activé en présence d'eau. Pour cette raison, le traitement thermique est requis lorsqu'on emploie de l'eau ou un alcool inférieur aqueux.

L'extrait A ainsi obtenu est un mélange de six
20 composants montrant des pics caractéristiques dans les diagrammes montrés aux figures 1-17 des dessins annexés lorsqu'ils sont soumis à une HPLC analytique, et possède une activité anti-tumeur.

(Quatrième opération)

25 De façon à obtenir une portion plus active de l'extrait A, celui-ci est dissous dans du chloroforme dans la quantité minimale nécessaire pour la dissolution complète de celui-ci, et à la solution résultante on ajoute du n-hexane en une quantité telle que la solution
30 ne devient pas turbide. La solution d'échantillon obtenue est soumise à une HPLC à phase normale pour la collection de masse [éluant : un mélange de n-hexane/chloroforme/méthanol (rapport volumétrique = 6:3:1)]. Tout en observant les pics d'élution avec un détecteur, deux
35 fractions choisies sur la base des pics correspondant aux fractions Fr-2 et Fr-3 montrées dans le diagramme (figure 18 des dessins annexés) obtenues auparavant par des essais

préliminaires sont recueillies, respectivement , et
ensuite chacune est concentrée à sec pour obtenir des
extraits.

Alternativement, l'extrait A obtenu par la troi-
sième opération peut être soumis à l'élution par méthode
à colonne ouverte successivement avec du chloroforme et
un mélange de chloroforme et de méthanol (rapport volumé-
trique : 97:3-95:5) pour enlever la portion la moins
polaire, et ensuite en éluant avec un mélange de chloroforme
et de méthanol (rapport volumétrique = 93:7) pour obtenir
deux fractions correspondant aux fractions Fr-2 et Fr-3
mentionnées précédemment.

Ici, habituellement la première moitié de l'éluant
correspond à la fraction Fr-2, et la dernière moitié ,
à la fraction Fr-3, mais on désire que le rapport
volumétrique des deux fractions soit de 60:40.

Ensuite, l'extrait correspondant à la fraction
Fr-2 est, comme mentionné précédemment, soumis à une HPLC
à phase normale pour la collection de masse [éluant : un
mélange de n-hexane/chloroforme/méthanol (rapport volu-
métrique = 6:1:1)]. Tout en observant les pics d'élution
avec un détecteur, des fractions choisies sur la base
des pics correspondant aux fractions Fr-2-1 et Fr-2-2
montrées dans les diagrammes (figure 19 des dessins annexés)
obtenues au préalable par des essais préliminaires sont
recueillies, respectivement et chacune est concentrée à sec
pour obtenir des extraits blancs semblables à une poudre
(ci-après référencés comme extrait B-1 et extrait B-2).

Par ailleurs, l'extrait correspondant à la fraction
Fr-3 est soumis à une HPLC à phase inversée pour la
collection de masse (éluant : une solution de méthanol
aqueux 65-75% (volume/volume). Tout en observant les pics
d'élution avec un détecteur, des fractions choisies sur la
base du pic correspondant à la fraction Fr-3-1 montrée
dans le diagramme (figure 22 des dessins annexés) obtenue
au préalable par des essais préliminaires sont recueillies

et concentrées à sec pour obtenir un extrait blanc semblable à une poudre (ci-après référencé comme extrait B-3).

Les extraits ainsi obtenus de la présente invention ont les aspects caractéristiques suivants :

1.- Propriétés

(1) L'extrait A est une poudre brune tandis que les extraits B-1, B-2 et B-3 sont des poudres blanches. Tous ont un goût amer et donnent une odeur analogue à l'acide cinnamique lorsqu'on y ajoute une solution de soude caustique suivie par un chauffage.

(2) Solubilité (extraits A, B-1, B-2 et B-3)

Ils sont solubles dans des alcools inférieurs et dans des hydrocarbures chlorés autres que le tétrachlorure de carbone.

Ils sont insolubles dans des hydrocarbures aliphatiques, le tétrachlorure de carbone ou des hydrocarbures aromatiques.

2.- Spectre U.V. (extraits A, B-1, B-2 et B-3)

$\lambda_{\max} = 280 \text{ nm}$ (dans le méthanol)

3.- Spectre de masse (extraits A, B-1, B-2 et B-3)

Ils montrent un pic de base du cation cinnamyle à $m/e = 131$ et un pic d'ion de cation acétyle à $m/e = 43$.

Ainsi, la présence des esters cinnamique et acétique dans les extraits est suggérée.

4.- Chromatographie liquide
(conditions)

Charge : gel de silice (Wako-gel LC-5H-du type broyé totalement poreux, 5 microns, dénomination commerciale d'un gel fabriqué par Wako Junyaku Co, Ltd Japon)

Colonne : d.i. x l. = 4 mm x 200 mm

Eluant : un mélange de n-hexane/chloroforme/méthanol (rapport volumétrique = 7:2:1)

Vitesse d'écoulement : 1,5 ml/mn.

Pression : 29,4 bars

Détection : à U.V. 280 nm (0,64 AUFS)

Dans les conditions précitées, on soumet 20 mg de

chacun des extraits A, B-1, B-2 et B-3 dissous dans 10 ml de chloroforme à une chromatographie liquide. Les diagrammes caractéristiques obtenus sont répertoriés dans les figures 1, 20-21 et 23 des dessins annexés (ils reflètent les résultats obtenus sur l'extrait A préparé dans l'exemple 1, les extraits B-1 et B-2 préparés à l'exemple 18 et l'extrait B-3 préparé à l'exemple 19, respectivement).

5.- Réaction colorée (extraits 1, B-1, B-2 et B-3)

Réaction de Keller Kiliani (Helvetica Chimica Acta, 10 31, page 883 (1948)) : positive (brune verdâtre)

Réaction de Liebermann Burchard (Dictionnaire de Physique et Chimie de Iwanami, 3ème édition, page 1411 (1977)) : positive (verte bleuâtre)

Ainsi, on suppose que les extraits consistent principalement des glycosides stéroïdes ayant des 2,6-désoxysucres.

L'activité anti-tumeur des extraits de la présente invention a été confirmée par l'essai d'écran mentionné ci-dessous.

20 Deux types de tumeurs, le Sarcoma-180 et l'Ehrlich carcinoma, sont employées dans l'évaluation des propriétés anti-tumeur, et la tumeur testée est du type tubercule sous-cutanée.

Le groupe auquel les extraits de la présente invention sont administrés consiste de sept souris tandis que le groupe de contrôle consiste de dix souris.

Méthode d'essai

(1) Sarcoma-180

Les animaux d'expérience consistent de souris mâles ICR agréés de six semaines (poids du corps : 30-32 g).

Les tumeurs sont transplantées intrapéritonialement dans la souris. Le septième jour après la transplantation, on prend les cellules des tumeurs de bonne croissance, et on transplante 4×10^6 cellules d'entre elles de manière sous-cutanée dans la région inguinale de la souris pour former des tumeurs solides. A partir de, et après, 24 heures

après la transplantation, les extraits de la présente invention dissous dans des solutions salines physiologiques sont administrées aux souris intrapéritonialement.

Le volume des solutions respectives administrées
5 est de 0,2 ml par souris en une fois, et l'administration est continuée pendant 10 jours à un taux d'une fois par jour. On donne seulement des solutions salines physiologiques aux souris du groupe de contrôle.

Le trentième jour après la transplantation, on
10 prend les tumeurs pour mesurer le poids moyen des tumeurs des souris du groupe auquel les extraits de la présente invention ont été administrés (T) et celle du groupe de contrôle (C) pour calculer le rapport T/C (%).

(2) Ehrlich carcinoma

15 Les animaux d'expérience sont des souris mâles ddY agées de six semaines (poids du corps : 28-30 g).

On transplante des tumeurs intrapéritonialement dans les souris. Le dixième jour après la transplantation, les cellules de bonne croissance des tumeurs sont prises,
20 et on transplante $1,5 \times 10^6$ cellules parmi celles-ci de manière sous-cutanée dans la région inguinale de la souris pour former des tumeurs solides, et ensuite on procède comme dans le cas du Sarcoma-180 pour calculer le rapport T/C (%).

25 Les résultats sont répertoriés au tableau suivant.

TABLEAU

Extrait	Dose (mg/kg x nbre de fois)	T/C (%)	
		Ehrlich carcinoma	Sarcoma- 180
Extr. A de Ex. 1	40 x 10	34,1	15,2
Extr. A de Ex. 3	"	39,0	23,5
Extr. A de Ex. 4	"	32,3	35,2
Extr. A de Ex. 5	"	44,7	31,0
Extr. A de Ex. 6	"	40,1	39,3
Extr. A de Ex. 7	"	38,5	41,3
Extr. A de Ex. 8	"	13,5	19,8
Extr. A de Ex. 9	"	15,0	39,8
Extr. A de Ex.10		22,8	26,6
Extr. A de Ex.11	"	32,1	40,0
Extr. A de Ex.12	"	30,5	32,7
Extr. A de Ex.13	"	40,3	28,4
Extr. A de Ex.15	"	30,0	22,2
Extr. A de Ex.17	"	23,1	19,0
Extr.B-1 de Ex.18	15 x 10	24,3	13,6
Extr.B-2 de Ex.18	"	29,8	5,0
Extr.B-3 de Ex.19	"	31,0	20,0
Extr.B-1 de Ex.20	"	18,0	9,2
Extr.B-2 de Ex.20	"	21,0	4,7
Extr.B-3 de Ex.21	"	30,3	15,2

Ensuite, les extraits de la présente invention sont administrés à des souris mâles ddY âgées de 5 semaines (poids du corps : 21- 25 g) intrapéritonialement pour déterminer les valeurs de toxicité aiguë (LD₅₀).

5

Résultats

10

15

Extrait	LD ₅₀ (mg/kg)
Extr. A de l'Ex. 1	400
Extr. A de l'Ex. 8	415
Extr. A de l'Ex. 12	398
Extr. B-1 de l'Ex. 18	610
Extr. B-2 de l'Ex. 18	78
Extr. B-3 de l'Ex. 19	382
Extr. B-1 de l'Ex. 20	608
Extr. B-2 de l'Ex. 20	80
Extr. B-3 de l'Ex. 21	370

Les extraits de la présente invention peuvent être administrés au corps humain de manière orale, par injection (de manière intraveineuse, sous-cutanée ou intramusculaire) ou de toute autre manière.

Lorsque les extraits de la présente invention sont employés sous la forme de préparations solides pour l'administration orale, les préparations peuvent être des comprimés, granules, poudres, capsules ou analogues. Les préparations peuvent contenir des additifs, par exemple, un excipient tel qu'une préparation de saccharide ou de cellulose, un liant tel qu'une pâte d'amidon ou de la méthylcellulose, une charge, un désintégrateur et analogues, tous étant habituellement employés dans la fabrication de préparations médicales. Dans le cas où les extraits de la présente invention sont employés comme préparations liquides orales, elles peuvent être sous n'importe quelle forme choisie parmi des préparations aqueuses à emploi interne, des suspensions, des émulsions, des sirops, etc et en outre elles peuvent être sous la forme de produits

secs qui sont dissous avant l'emploi.

Lorsque les extraits de la présente invention sont administrés oralement à des adultes, ils peuvent être employés en une dose allant de 3,0-30,0 mg/kg (extrait A),
5 1,2-48,0 mg/kg (extrait B-1), 1,2-6,0 mg/kg (extrait B-2) ou 1,2-30,0 mg/kg (extrait B-3) par jour. Ici, naturellement, la dose peut être augmentée ou diminuée de manière appropriée selon les conditions de la maladie, l'âge du patient, la forme de la préparation, etc.

10 Les extraits de la présente invention peuvent être injectés sous la forme de solutions aqueuses, de suspensions ou émulsions huileuses ou aqueuses, mais habituellement les injections sont préparées en les dissolvant ou les mettant en suspension dans un milieu liquide aqueux tel que de
15 l'eau stérile de solutions salines et physiologiques. Si nécessaire, des agents dissolvants habituellement employés, des stabilisants, des agents de conservation, des additifs habituellement employés pour la préparation de solutions isotoniques, etc. peuvent être ajoutés aux injections.

20 Les préparations d'injection ainsi obtenues sont administrées de manière intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée ou de toute autre manière appropriée. Lorsque les injections sont administrées à des adultes de manière parentérale, elles peuvent contenir de 1,0-10,0 mg/kg
25 d'extrait A, 0,4-16,0 mg/kg d'extrait B-1, 0,4-2,0 mg/kg d'extrait B-2 ou 0,4-10,0 mg/kg d'extrait B-3 par jour. Naturellement, ce niveau de dose est augmenté ou diminué de manière appropriée selon les conditions de la maladie, l'âge du patient, la forme de la préparation, le mode
30 d'administration et analogues.

La présente invention sera expliquée en détail ci-après en référence aux exemples suivants donnés simplement à titre d'illustration et qui ne sauraient donc en aucune façon limiter la portée de la présente invention.

35 Exemple 1 .

On ajoute 1 litre de méthanol à 500 g d'écorce de Marsdenia cundurango Reichenbach fil finement divisé, et

on laisse le mélange rester toute la nuit à la température ambiante. Ensuite, on filtre le mélange, et on traite en outre le résidu trois fois de la même manière, chaque fois en employant 0,75 l de méthanol.

5 On combine tous les filtrats, et ensuite on concentre à sec à 45°C sous pression réduite pour obtenir 69 g d'un extrait. A cet extrait transféré dans un entonnoir de séparation, on ajoute 150 ml de chloroforme suivi par une vigoureuse agitation, et ensuite on obtient la couche de
10 chloroforme. Au résidu, on ajoute 50 ml de chloroforme pour répéter la même opération que précédemment trois fois. Tous les extraits de chloroforme sont combinés et ensuite on soumet à une filtration par succion en employant du
15 Fibra Cel BH-40 dénomination commerciale d'un produit vendu par Johns Manville Co, Ltd, comme aide de filtration. Le filtrat résultant est concentré à sec à 40°C sous pression réduite pour obtenir 40 g d'un extrait. Cet extrait est dissous dans 50 ml de chloroforme suivi par l'addition de 100 ml de n-hexane. Le mélange résultant est bien agité et
20 laissé rester pendant 12 heures. Ensuite, on soumet à la décantation pour obtenir la portion insoluble. Cette portion est dissoute dans 25 ml de chloroforme suivi par l'addition de 50 ml de n-hexane, et la solution est bien agitée et laissée rester pendant 2 heures. On soumet la
25 solution à une décantation pour obtenir la portion insoluble et ensuite on traite de la même manière que précédemment trois fois. La portion insoluble finalement obtenue est séchée à 45°C sous pression réduite pendant 6 heures et broyée pour obtenir 18 g d'extrait A brun sous forme de
30 poudre.

On dissout 20 mg de l'extrait A ainsi préparé dans 10 ml de chloroforme, et on soumet la solution résultante à une HPLC analytique (charge : gel de silice (Wako-gel LC-5H, fabriqué par Wako Junyako Industry Co, Ltd, de type
30 broyé totalement poreux, 5 μ); colonne : d.i. x l = 4 mm x 200 mm; éluant : un mélange de n-hexane/chloroforme/éthanol (rapport volumétrique = 7:2:1); vitesse d'écoulement:

1,5 ml/mn ; pression : 29,4 bars et détection : à U.V.
280 nm(0,64 AUFS)) . Les résultats obtenus sont répertoriés
dans le diagramme de la figure 1 des dessins annexés.

Exemple 2

5 De la même manière qu'à la première opération de
l'exemple 1, on extrait 500 g d'écorce de Marsdenia
cundurango Reichenbach fil finement divisé avec du
chloroforme.

Tous les filtrats sont combinés et concentrés à sec
10 à 40°C sous pression réduite pour obtenir 46 g d'un extrait.
A cet extrait, on ajoute 100 ml de méthanol, et on agite
bien le mélange et ensuite on filtre. On traite le résidu
avec 30 ml de méthanol de la même manière que précédemment
quatre fois. Tous les filtrats sont combinés et concentrés
15 à sec à 45°C sous pression réduite pour obtenir 24 g d'un
extrait. On dissout cet extrait dans 50 ml de chloroforme,
et ensuite on traite comme dans l'exemple 1 pour obtenir
13 g d'un extrait A brun sous forme de poudre. Les résultats
obtenus en soumettant cet extrait A à une HPLC dans les
20 mêmes conditions que dans l'exemple 1 sont répertoriés
dans le diagramme de la figure 2 des dessins annexés.

Exemple 3

De la même manière qu'à l'exemple 1, mais en
employant de l'éthanol au lieu du méthanol dans la première
25 opération, on produit 14,1 g d'un extrait A brun sous
forme de poudre.

Les résultats obtenus en soumettant cet extrait A
à une HPLC dans les mêmes conditions qu'à l'exemple 1 sont
répertoriés dans le diagramme de la figure 3 des dessins
30 annexés.

Exemple 4

De la même manière qu'à l'exemple 1, mais en
employant l'isopropanol au lieu du méthanol dans la première
opération, on produit 13,7 g d'un extrait A brun analogue
35 à une poudre.

Les résultats obtenus en soumettant cet extrait A
à une HPLC dans les mêmes conditions qu'à l'exemple 1 sont

répertoriés dans le diagramme de la figure 4 des dessins annexés.

Exemple 5

De la même manière qu'à l'exemple 1, mais en
5 employant du dichlorométhane au lieu de chloroforme dans la seconde opération, on produit 16 g d'un extrait A brun analogue à une poudre.

Les résultats obtenus en soumettant cet extrait A à une HPLC dans les mêmes conditions qu'à l'exemple 1 sont
10 répertoriés dans le diagramme de la figure 5 des dessins annexés.

Exemple 6

De la même manière qu'à l'exemple 1, mais en
employant du pentane au lieu de n-hexane dans la troisième
15 opération, on produit 15,9 g d'un extrait A brun analogue à une poudre.

Les résultats obtenus en soumettant cet extrait A à une HPLC dans les mêmes conditions qu'à l'exemple 1 sont
répertoriés dans le diagramme de la figure 6 des dessins
20 annexés.

Exemple 7

De la même manière qu'à l'exemple 1, mais en
employant l'heptane au lieu du n-hexane dans la troisième
opération, on produit 16,8 g d'un extrait A brun analogue
25 à une poudre.

Les résultats obtenus en soumettant cet extrait A à une HPLC dans les mêmes conditions qu'à l'exemple 1 sont
répertoriés dans le diagramme de la figure 7 des dessins
annexés.

Exemple 8

30 A 40 g de l'extrait obtenu en réalisant les première et seconde opérations de l'exemple 1, on ajoute 50 ml de tétrachlorure de carbone, et on agite bien le mélange et on laisse rester pendant 12 heures. Ensuite, on soumet le
35 mélange à une décantation pour obtenir la portion insoluble. A cette portion insoluble, on ajoute 25 ml de tétrachlorure de carbone, et on agite bien le mélange et on laisse rester

pendant 5 heures. On soumet le mélange à une décantation pour obtenir la portion insoluble qui est ensuite traitée de la même manière que précédemment deux fois supplémentaires. La portion insoluble finalement obtenue est séchée à 45°C sous pression réduite pendant 6 heures et on broie pour obtenir 17,4 g d'un extrait A brun sous forme de poudre.

Les résultats obtenus en soumettant cet extrait A à une HPLC dans les mêmes conditions qu'à l'exemple 1 sont répertoriés dans le diagramme de la figure 8 des dessins annexés.

Exemple 9

De la même manière qu'à l'exemple 8, mais en utilisant du toluène au lieu du tétrachlorure de carbone dans la troisième opération, on produit 12,3 g d'un extrait A brun sous forme de poudre.

Les résultats obtenus en soumettant cet extrait A à une HPLC dans les mêmes conditions qu'à l'exemple 1 sont montrés dans le diagramme de la figure 9 des dessins annexés.

Exemple 10

De la même manière qu'à l'exemple 8, mais en employant du benzène au lieu du tétrachlorure de carbone dans la troisième opération, on produit 16,4 g d'un extrait A brun sous forme de poudre.

Les résultats obtenus en soumettant cet extrait A à une HPLC dans les mêmes conditions qu'à l'exemple 1 sont montrés au diagramme de la figure 10 des dessins annexés.

Exemple 11

De la même manière qu'à la première opération de l'exemple 1, on extrait 500 g d'écorce de *Marsdenia cundurango* Reichenbach fil finement divisé avec de l'acétone.

Tous les filtrats sont combinés et concentrés à sec à 40°C sous pression réduite pour obtenir 43 g d'un extrait.

A cet extrait, on ajoute 100 ml de méthanol, et on agite bien le mélange et on filtre. On traite le résidu

avec 30 ml de méthanol que l'on y ajoute de la même manière que précédemment quatre fois. Tous les filtrats sont combinés et on concentre à sec à 45°C sous pression réduite pour obtenir 22 g d'un extrait. A cet extrait, on ajoute
5 150 ml de chloroforme, et on agite bien le mélange et on filtre. Le résidu avec 50 ml de chloroforme que l'on y ajoute est traité de la même manière que précédemment trois fois. On combine tous les filtrats et on soumet à une filtration par succion en employant du Fibra Cel BH-40
10 (produit commercialisé par Johns Manville Co, Ltd U.S.A.) comme aide de filtration, et on concentre le filtrat résultant à sec à 40°C sous pression réduite pour obtenir 20 g d'un extrait. On dissout cet extrait dans 50 ml de chloroforme que l'on y ajoute et ensuite on travaille comme
15 dans l'exemple 1 pour obtenir 11,3 g d'un extrait A brun sous forme de poudre.

Les résultats obtenus en soumettant cet extrait A à une HPLC dans les mêmes conditions qu'à l'exemple 1 sont montrés dans le diagramme de la figure 11 des dessins
20 annexés.

Exemple 12

De la même manière qu'à la première opération de l'exemple 1, on extrait 500 g d'écorce de Marsdenia cundurango Reichenbach fil finement divisé avec de l'acétate
25 d'éthyle. On combine tous les filtrats et on concentre à sec à 45°C sous pression réduite pour obtenir 38 g d'un extrait. On traite cet extrait avec 100 ml de méthanol que l'on y ajoute de la même manière qu'à l'exemple 11 pour obtenir 15,8 g d'un extrait A brun analogue à une
30 poudre.

Les résultats obtenus en soumettant cet extrait A à une HPLC dans les mêmes conditions qu'à l'exemple 1 sont montrés dans le diagramme de la figure 12 des dessins annexés.

Exemple 13

De la même manière qu'à la première opération de l'exemple 1, on extrait 500 g d'écorce de Marsdenia

cundurango Reichenbach fil finement divisé avec du dioxane.

On combine tous les filtrats et on concentre à sec à 50°C sous pression réduite pour obtenir 60 g d'un extrait.

A cet extrait, on ajoute 100 ml de méthanol, et
5 ensuite on traite le mélange comme dans l'exemple 11 pour obtenir 16 g d'un extrait A brun analogue à une poudre.

Les résultats obtenus en soumettant cet extrait A à une HPLC dans les mêmes conditions qu'à l'exemple 1 sont montrés dans le diagramme de la figure 13 des dessins
10 annexés.

Exemple 14

A 500 g d'écorce de Marsdenia cundurango Reichenbach fil finement divisé, on ajoute 1 l de méthanol, et on soumet au reflux le mélange sur un bain d'eau à 50°C en
15 employant un condenseur de reflux pendant 5 heures pour l'extraction. On conduit la filtration tandis que le mélange est chaud, et on traite le résidu avec 0,75 ml de méthanol que l'on y ajoute de la même manière que précédemment trois fois. Ensuite, on travaille le mélange comme dans l'exemple 1
20 pour obtenir 21,5 g d'un extrait A brun analogue à une poudre.

Les résultats obtenus en soumettant cet extrait A à une HPLC dans les mêmes conditions qu'à l'exemple 1 sont montrés dans le diagramme de la figure 14 des dessins
25 annexés.

Exemple 15

A 500 g d'écorce de Marsdenia cundurango Reichenbach fil finement divisé, on ajoute 2,5 l d'eau chaude suivi par une bonne agitation. On laisse le mélange rester à la
30 température ambiante toute la nuit. On filtre le mélange, et on traite le résidu de la même manière que précédemment quatre fois, mais à chaque fois en employant 1 l d'eau chaude. On combine tous les filtrats et on concentre à sec à 50°C sous pression réduite pour obtenir 94 g d'un extrait.

A cet extrait, on ajoute 300 ml de méthanol et on agite bien le mélange et on filtre. On traite le résidu avec 100 ml de méthanol que l'on y ajoute de la même

manière que précédemment quatre fois. Tous les filtrats sont combinés et concentrés à sec à 45°C sous pression réduite pour obtenir 53 g d'un extrait.

5 A cet extrait transféré dans un entonnoir de séparation, on ajoute 150 ml de chloroforme, et ensuite on traite le mélange de la même manière qu'à l'exemple 1 pour obtenir 5,6 g d'un extrait A brun analogue à une poudre.

10 Les résultats obtenus en soumettant l'extrait A à une HPLC dans les mêmes conditions qu'à l'exemple 1 sont montrés dans le diagramme de la figure 15 des dessins annexés.

Exemple 16

15 On chauffe de l'écorce de *Marsdenia cundurango* Reichenbach fil finement divisé (500 g) dans un autoclave à 120°C pendant 30 minutes suivi par l'addition de 2 l d'eau, et ensuite on laisse le mélange rester à la température ambiante toute la nuit. Ensuite, on filtre le mélange et le résidu avec 1 l d'eau que l'on y ajoute est
20 ensuite traité de la même manière que précédemment quatre fois. On combine tous les filtrats et on concentre à sec à 50°C sous pression réduite pour obtenir 96 g d'un extrait. Ensuite, on traite le mélange de la même manière qu'à l'exemple 15 pour obtenir 6,8 g d'un extrait A brun
25 analogue à une poudre.

Les résultats obtenus en soumettant l'extrait A à une HPLC dans les mêmes conditions qu'à l'exemple 1 sont montrés au diagramme de la figure 16 des dessins annexés.

Exemple 17

30 De l'écorce de *Marsdenia cundurango* Reichenbach fil finement divisé (500 g) est chauffée dans un autoclave à 120°C pendant 30 minutes suivi par l'addition de 1,5 l d'une solution de méthanol aqueux à 50% (volume/volume), et on laisse le mélange rester à la température ambiante
35 toute la nuit. Ensuite, on filtre le mélange, et on traite le résidu avec 0,75 l d'une solution de méthanol aqueux à 50% (volume/volume) que l'on y ajoute de la même manière

que précédemment quatre fois. On combine tous les filtrats et on concentre à sec à 50°C sous pression réduite pour obtenir 103 g d'un extrait. Ensuite, on travaille le mélange de la même manière qu'à l'exemple 15 pour obtenir 9 g d'un extrait A brun analogue à une poudre.

Les résultats obtenus en soumettant cet extrait A à une HPLC dans les mêmes conditions qu'à l'exemple 1 sont montrés dans le diagramme de la figure 17 des dessins annexés.

Exemple 18

On dissout 6 g d'extrait A obtenu à l'exemple 1 dans 50 ml de chloroforme. Ensuite, on ajoute du n-hexane au mélange résultant dans la quantité maximale mais ne provoquant pas de turbidité, et on soumet la solution résultante à une HPLC pour une collection de masse (système 500 fabriqué par Waters Co, Ltd, charge : Preppak 500-silice (dénomination commerciale d'un produit fabriqué par Waters Co, Ltd, gel de silice totalement poreux, sphérique, aire spécifique = $320 \text{ m}^2/\text{g}$); colonne : d.i. x l. = 57 mm x 300 mm; chacune contient 325 g de charge; éluant : un mélange de n-hexane/chloroforme/méthanol (rapport volumétrique = 6:3:1); vitesse d'écoulement : 150 ml/mn; et détection: à RI ($1/20 \times 10^{-4}$ RIUFS)). Tout en observant les pics d'élution avec un détecteur, un éluat choisi sur la base du pic correspondant à la fraction Fr-2 montré à la figure 18 des dessins annexés est recueilli pendant 12 minutes. On répète l'opération précédente deux fois supplémentaires, chaque fois en employant 6 g d'extrait A obtenu dans l'exemple 1. On combine tous les éluats, et on concentre à sec à 40°C pour obtenir 5,54 g d'un extrait. On dissout cet extrait dans 50 ml de chloroforme suivi par l'addition de n-hexane dans la quantité maximale mais ne causant pas de turbidité. On soumet ensuite la solution résultante à une HPLC dans les mêmes conditions que précédemment sauf qu'on emploie un mélange de n-hexane/chloroforme/méthanol (rapport volumétrique = 6:1:1) comme éluant. Tout en observant les

pics d'élution avec un détecteur, un éluat choisi sur la base du pic correspondant à la fraction Fr-2-1 montrée à la figure 19 des dessins annexés est recueilli pendant 6 minutes et 30 secondes, et on recueille pendant 8 minutes
5 séparément un autre éluat choisi sur la base du pic correspondant à la fraction Fr-2-2 montrée dans le même diagramme.

On concentre les fractions respectives à sec à 40°C pour obtenir 1,98 g d'un extrait B-1 blanc semblable à une
10 poudre (correspondant à la fraction Fr-2-1) et 0,91 g d'un extrait B-2 blanc analogue à une poudre (correspondant à la fraction Fr-2-2).

Les résultats obtenus en soumettant les extraits B-1 et B-2 ainsi obtenus à une HPLC dans les mêmes conditions
15 qu'à l'exemple 1, respectivement, sont montrés aux figures 20 et 21 des dessins annexés, respectivement.

Exemple 19

On concentre un éluat à partir de la première HPLC pour la collection de masse de l'exemple 18 recueilli
20 pendant 13 minutes sur la base du pic correspondant à la fraction Fr-3 de la figure 18 des dessins annexés à sec pour obtenir 2,88 g d'un extrait. On dissout cet extrait dans une solution de méthanol aqueux à 170% (volume/volume), et ensuite on soumet à une HPLC pour la collection de
25 masse (système 500 fabriqué par Waters Co, Ltd, charge : Preppak 500-C18 (dénomination commerciale d'un produit fabriqué par Waters Co, Ltd, du type chimiquement lié C-18); colonne : d.i. x l. = 57 mm x 300 mm; éluant : une solution de méthanol aqueux à 170% (volume/volume);
30 vitesse d'écoulement : 100 ml/mn; et détection : à RI ($1/50 \times 10^{-4}$ RIUFS)). Tout en observant les pics d'élution avec un détecteur, un éluat choisi sur la base du pic correspondant à la fraction Fr-3-1 de la figure 22 des dessins annexés est collecté pendant 12 minutes et
35 concentré à sec à 40°C pour obtenir 0,88 g d'un extrait B-3 blanc analogue à une poudre.

Les résultats obtenus en soumettant l'extrait B-3

ainsi obtenu à une HPLC dans les mêmes conditions qu'à l'exemple 1 sont montrés dans le diagramme de la figure 23 des dessins annexés.

Exemple 20

- 5 On dissout l'extrait A obtenu dans l'exemple 2 (13 g) dans 30 ml de chloroforme et on adsorbe sur 80 g de gel de silice (Wako-gel C-200 produit commercial fabriqué par Wako Junyaku Co, Ltd de granulométrie correspondant à un tamis standard ayant 200 mailles/2,54 cm)
- 10 avec lequel une colonne est remplie (d.i. x l. = 3 cm x 22 cm) par le procédé sec.

- Tout d'abord, les éluats obtenus par l'élution avec 160 ml de chloroforme, 200 ml d'un mélange de chloroforme et de méthanol (rapport volumétrique = 97:3) et ensuite
- 15 200 ml d'un mélange de chloroforme et de méthanol (rapport volumétrique = 95:5) sont mis de côté, et ensuite un éluat obtenu par l'élution avec 1 l d'un mélange de chloroforme et de méthanol (rapport volumétrique = 93:7) est divisé en une première fraction de 600 ml et une fraction restante de
- 20 400 ml. La première fraction de 600 ml est concentrée et ensuite séchée à 45°C sous pression réduite pendant 6 heures et broyée pour obtenir 4,21 g d'un extrait.

- Cet extrait est dissous dans 40 ml de chloroforme suivi par l'addition de n-hexane dans la quantité maximale
- 25 mais ne provoquant pas de turbidité. On soumet la solution résultante à une HPLC pour collection de masse [système 500 fabriqué par Waters Co, Ltd; charge : Preppak 500-silice (gel de silice totalement poreux fabriqué par Waters Co, Ltd, sphérique, aire spécifique : $320 \text{ m}^2/\text{g}$); colonne :
- 30 d.i. x l. = 57 mm x 300 mm, chacune contient 325 g de charge; éluant : un mélange de n-hexane/chloroforme/méthanol (rapport volumétrique = 6:1:1); vitesse d'écoulement : 150 ml/mn; et détection : à RI ($1/20 \times 10^{-4}$ RIUFS)].
- Tout en observant les pics d'élution avec un détecteur, on
- 35 collecte un éluat choisi sur la base du pic correspondant à la fraction Fr-2-1 montrée à la figure 19 des dessins annexés pendant 6 minutes et 30 secondes et on collecte

un autre éluat choisi sur la base du pic correspondant à la fraction Fr-2-2 montrée dans le même dessin. Les fractions respectives sont concentrées à sec pour obtenir 0,85 g d'un extrait B-1 blanc analogue à une poudre (correspondant à la fraction Fr-2-1) et 0,72 g d'un extrait B-2 blanc analogue à une poudre (correspondant à la fraction (r-2-2).

Les résultats obtenus en soumettant les extraits B-1 et B-2 ainsi obtenus à une HPLC dans les mêmes conditions que dans l'exemple 1 sont montrés dans les diagrammes des figures 24 et 25 des dessins annexés, respectivement.

Exemple 21

400 ml de la dernière moitié de l'éluat obtenu en éluant la teneur de la colonne de gel de silice avec le mélange de chloroforme et de méthanol (rapport volumétrique = 93:7) dans l'exemple 20 est concentré et ensuite séché à 45°C sous pression réduite pendant 6 heures et broyé pour donner 1,76 g d'un extrait.

On dissout cet extrait dans 30 ml d'une solution de méthanol aqueux à 170% (volume/volume) et on soumet ensuite à une HPLC pour la collection de masse [système 500 fabriqué par Waters Co, Ltd; charge : Preppak 500-C18 (fabriqué par Waters Co, Ltd, du type C-18 chimiquement lié); colonne : d.i. x l. = 57 mm x 300 mm); éluant : une solution de méthanol aqueux à 170% (volume/volume); vitesse d'écoulement : 100 ml/mn; et détection : à RI ($1/50 \times 10^{-4}$ RIUFS)].

Tout en observant les pics d'élution avec un détecteur, on collecte un éluat choisi sur la base du pic correspondant à la fraction Fr-3-1 montrée à la figure 22 des dessins annexés pendant 10 minutes et ensuite on concentre à sec pour obtenir 0,48 g d'un extrait B-3 blanc semblable à une poudre.

Les résultats obtenus en soumettant l'extrait B-3 ainsi obtenu à une HPLC dans les mêmes conditions qu'à l'exemple 1 sont montrés dans le diagramme de la figure 26 des dessins annexés.

Ainsi, dans les dessins annexés :

- les figures 1 à 17 représentent un diagramme obtenu en soumettant l'extrait A de la présente invention
5 obtenu respectivement dans les exemples 1 à 17 à une HPLC analytique;
- la figure 18 représente un diagramme obtenu en soumettant l'extrait A de la présente invention obtenu dans l'exemple 1 à une HPLC pour collection de masse;
- 10 - la figure 19 représente un diagramme obtenu en soumettant la fraction Fr-2 représentée à la figure 18 à une HPLC pour collection de masse;
- la figure 20 représente un diagramme obtenu en soumettant l'extrait B-1 de la présente invention obtenu
15 à l'exemple 18 à une HPLC analytique;
- la figure 21 représente un diagramme obtenu en soumettant l'extrait B-2 de la présente invention obtenu à l'exemple 18 à une HPLC analytique;
- la figure 22 représente un diagramme obtenu en
20 soumettant la fraction Fr-3 représentée à la figure 18 à une HPLC pour collection de masse;
- la figure 23 représente un diagramme obtenu en soumettant l'extrait B-3 de la présente invention obtenu à l'exemple 19 à une HPLC analytique;
- 25 - la figure 24 représente un diagramme obtenu en soumettant l'extrait B-1 de la présente invention obtenu à l'exemple 20 à une HPLC analytique;
- la figure 25 représente un diagramme obtenu en soumettant l'extrait B-2 de la présente invention obtenu
30 à l'exemple 20 à une HPLC analytique; et
- la figure 26 représente un diagramme obtenu en soumettant l'extrait B-3 de la présente invention obtenu à l'exemple 21 à une HPLC analytique.

Bien entendu, l'invention n'est nullement limitée
35 aux modes de réalisation décrits et représentés qui n'ont été donnés qu'à titre d'exemple. En particulier, elle comprend tous les moyens constituant des équivalents

techniques des moyens décrits ainsi que leurs combinaisons si celles-ci sont exécutées suivant son esprit et mises en oeuvre dans le cadre de la protection comme revendiquée.

Il est à noter que les dessins annexés font partie intégrante de l'invention notamment par le fait qu'ils servent à caractériser les extraits de Marsdenia Cundurango Reichenbach fil.

R E V E N D I C A T I O N S

- 1.- Extrait de *Marsdenia cundurango* Reichenbach fil, caractérisé en ce qu'il est soluble dans des alcools inférieurs et dans des hydrocarbures chlorés autres que le tétrachlorure de carbone et insoluble dans des hydrocarbures aliphatiques, le tétrachlorure de carbone ou des hydrocarbures aromatiques, et présente un diagramme représenté à la figure 20 des dessins annexés lorsqu'il est soumis à une HPLC analytique [charge : gel de silice (type broyé totalement poreux, 5μ); colone : d.i. x l. = 4 mm x 200 mm; éluant : un mélange de n-hexane/chloroforme/méthanol (rapport volumétrique = 7:2:1); vitesse d'écoulement : 1,5 ml/mn; pression : 29,4 bars; et détection : à U.V. 280 nm (0,64 AUFS)].
- 2.- Extrait de *Marsdenia cundurango* Reichenbach fil, caractérisé en ce qu'il est soluble dans les alcools inférieurs et dans des hydrocarbures chlorés autres que le tétrachlorure de carbone et insoluble dans des hydrocarbures aliphatiques, le tétrachlorure de carbone ou des hydrocarbures aromatiques et en ce qu'il présente un diagramme représenté à la figure 21 des dessins annexés lorsqu'il est soumis à une HPLC analytique conforme à celle indiquée à la revendication 1.
- 3.- Extrait de *Marsdenia cundurango* Reichenbach fil, caractérisé en ce qu'il est soluble dans des alcools inférieurs et dans des hydrocarbures chlorés autres que le tétrachlorure de carbone et insoluble dans des hydrocarbures aliphatiques, le tétrachlorure de carbone ou des hydrocarbures aromatiques, et en ce qu'il présente un diagramme représenté à la figure 23 des dessins annexés lorsqu'il est soumis à une HPLC analytique conforme à celle indiquée à la revendication 1.
- 4.- Extrait de *Marsdenia cundurango* Reichenbach fil, caractérisé en ce qu'il est soluble dans des alcools inférieurs et dans des hydrocarbures chlorés autres que le

tétrachlorure de carbone et insoluble dans les hydrocarbures aliphatiques, le tétrachlorure de carbone ou des hydrocarbures aromatiques, en ce qu'il présente un diagramme représenté à la figure 1 des dessins annexés lorsqu'il
5 est soumis à une HPLC analytique conforme à celle de la revendication 1.

5.- Procédé de préparation de l'extrait selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend la soumission d'un extrait de *Marsdenia cundurango* Reichenbach
10 fil obtenu en le traitant avec les trois types suivants de solvants dans l'ordre éventuel : 1°) un alcool inférieur pour collecter la portion qui est soluble dans celui-ci; 2°) un hydrocarbure chloré autre que le tétrachlorure de carbone pour recueillir la portion qui est soluble dans
15 celui-ci; et 3°) un hydrocarbure aliphatique, du tétrachlorure de carbone ou un hydrocarbure aromatique pour enlever la portion qui est soluble dans celui-ci; à une HPLC de préférence en employant l'appareil Système 500 fabriqué par Waters Co, Ltd; charge : Preppak 500-silice
20 (dénomination commerciale d'un produit fabriqué par Waters Co, Ltd, gel de silice totalement poreux, sphérique, aire spécifique : $320 \text{ m}^2/\text{g}$); colonne : d.i. x l. = 57 mm x 300 mm; éluant : un mélange de n-hexane/chloroforme/méthanol (rapport volumétrique = 6:3:1); vitesse d'écoulement :
25 150 ml/mn; et détection : à RI ($1/20 \times 10^{-4}$ RIUFS) pour recueillir ou collecter la fraction d'élution choisie sur la base du pic correspondant à la fraction Fr-2 représentée à la figure 18 des dessins annexés, et ensuite la soumission de la fraction à une HPLC dans les mêmes conditions que
30 précédemment sauf que l'on emploie un autre mélange de n-hexane/chloroforme/méthanol ayant un rapport volumétrique de 6:1:1 au lieu du rapport de 6:3:1 comme éluant pour recueillir la fraction d'élution choisie sur la base du pic correspondant à la fraction Fr-2 représentée à la
35 figure 19 des dessins annexés.

6.- Procédé de préparation de l'extrait selon la

revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend la soumission d'un extrait de Marsdenia cundurango Reichenbach fil obtenu en le traitant avec les trois types de solvants suivants dans l'ordre éventuel : 1°) un alcool inférieur
5 pour recueillir la portion qui est soluble dans celui-ci; 2°) un hydrocarbure chloré autre que le tétrachlorure de carbone; et 3°) un hydrocarbure aliphatique, du tétrachlorure de carbone ou un hydrocarbure aromatique pour enlever la portion qui est soluble dans celui-ci; à une HPLC de
10 préférence telle que définie à la revendication 5, pour recueillir la fraction d'élution choisie sur la base du pic correspondant à la fraction Fr-2 représentée à la figure 18 des dessins annexés, et ensuite la soumission de la fraction à une HPLC dans les mêmes conditions que
15 précédemment sauf qu'un autre mélange de n-hexane/chloroforme/méthanol ayant un rapport volumétrique de 6:1:1 au lieu de 6:3:1 est employé comme éluant pour recueillir la fraction d'élution choisie sur la base du pic correspondant à la fraction Fr-2-2 représentée à la
20 figure 19 des dessins annexés.

7.- Procédé de préparation de l'extrait selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il comprend la soumission d'un extrait de Marsdenia cundurango Reichenbach fil obtenu en le traitant avec les trois types de solvants
25 suivants dans l'ordre éventuel : 1°) un alcool inférieur pour recueillir la portion qui est soluble dans celui-ci; 2°) un hydrocarbure chloré autre que le tétrachlorure de carbone pour recueillir la portion qui est soluble dans celui-ci; et 3°) un hydrocarbure aliphatique, du tétra-
30 chlorure de carbone ou un hydrocarbure aromatique pour enlever la portion qui est soluble dans celui-ci; à une HPLC de préférence dans les conditions définies à la revendication 5, pour recueillir la fraction d'élution choisie sur la base du pic correspondant à la fraction
35 Fr-3 représentée à la figure 18 des dessins annexés, et ensuite la soumission de la fraction à une autre HPLC (de préférence sur l'appareil Système 500 fabriqué par

Waters Co, Ltd; charge : Preppak 500-C18 (fabriqué par Waters Co, Ltd, du type C-18 chimiquement lié); colonne : d.i. x l. = 57 mm x 300 mm; éluant : une solution de méthanol aqueux à 170% (volume/volume); vitesse d'écoulement: 5 100 ml/mn; et détection à RI ($1/50 \times 10^{-4}$ RIUFS) pour collecter la fraction d'élution choisie sur la base du pic correspondant à la fraction Fr-3-1 représentée à la figure 22 des dessins annexés.

8.- Procédé selon la revendication 5 ou 6, 10 caractérisé en ce que l'extrait est soumis à, au lieu de la première HPLC, une méthode à colonne ouverte dans une colonne à gel de silice en éluant avec du chloroforme et ensuite des mélanges du chloroforme/méthanol (rapport volumétrique = 97 :3 et 95:5), et ensuite avec un mélange 15 de chloroforme/méthanol (rapport volumétrique = 93:7) pour collecter la première moitié de la fraction d'élution.

9.- Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'extrait est soumis à, au lieu de la première HPLC, une méthode de colonne ouverte dans une colonne à 20 gel de silice en éluant avec du chloroforme et ensuite des mélanges de chloroforme/méthanol (rapport volumétrique = 97:3 et 95:5), et ensuite avec un mélange de chloroforme/méthanol (rapport volumétrique = 93:7) pour recueillir la dernière moitié de la fraction de l'élution.

10.- Procédé de préparation de l'extrait selon 25 la revendication 4, caractérisé en ce qu'il comprend le traitement de *Marsdenia cundurango* Reichenbach fil avec les trois types de solvants suivants dans un ordre éventuel : 1°) un alcool inférieur pour collecter la fraction qui est 30 soluble dans celui-ci; 2°) un hydrocarbure chloré autre que le tétrachlorure de carbone pour collecter la portion qui est soluble dans celui-ci; et 3°) un hydrocarbure aliphatique, du tétrachlorure de carbone ou un hydrocarbure aromatique pour enlever la portion qui est soluble dans 35 celui-ci.

11.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 10, caractérisé en ce que l'extrait obtenu en

extrayant le *Marsdenia cundurango* Reichenbach fil avec une cétone aliphatique, un ester ou éther aliphatique inférieur ou de l'eau chaude ou avec de l'eau ou un alcool inférieur aqueux après le traitement direct à la chaleur (110-130°C pendant 30 minutes) est employé comme matériau de départ.

12.- Agent anti-tumeur caractérisé en ce qu'il comprend l'extrait de *Marsdenia cundurango* Reichenbach fil selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

13.- Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend comme ingrédient actif l'extrait de *Marsdenia cundurango* Reichenbach fil selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 notamment comme agent anti-tumeur en mélange avec un support ou excipient pharmaceutiquement acceptable.

Fig. 1

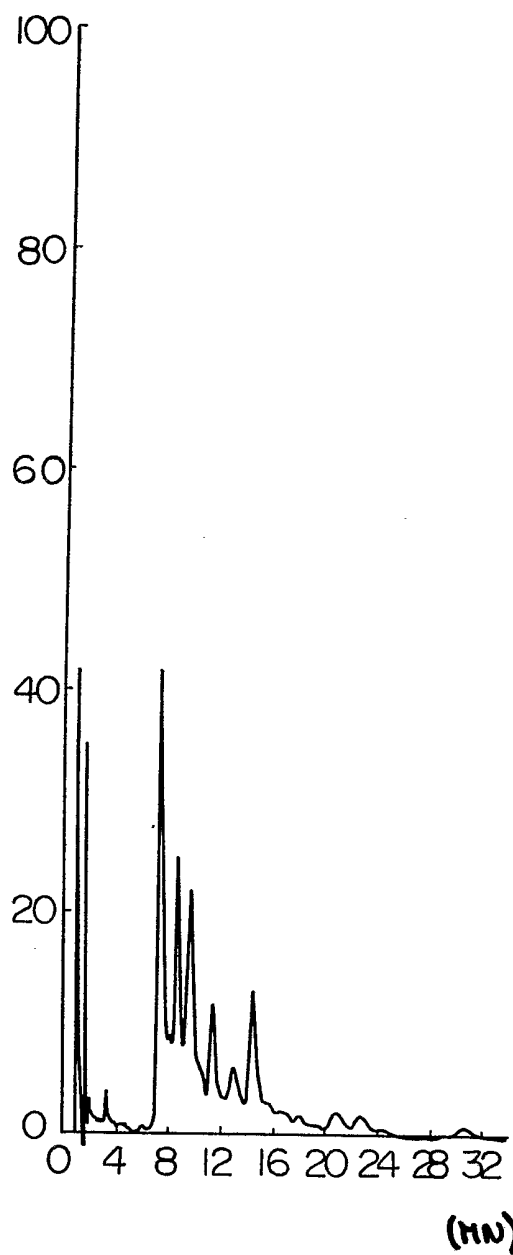


Fig. 2

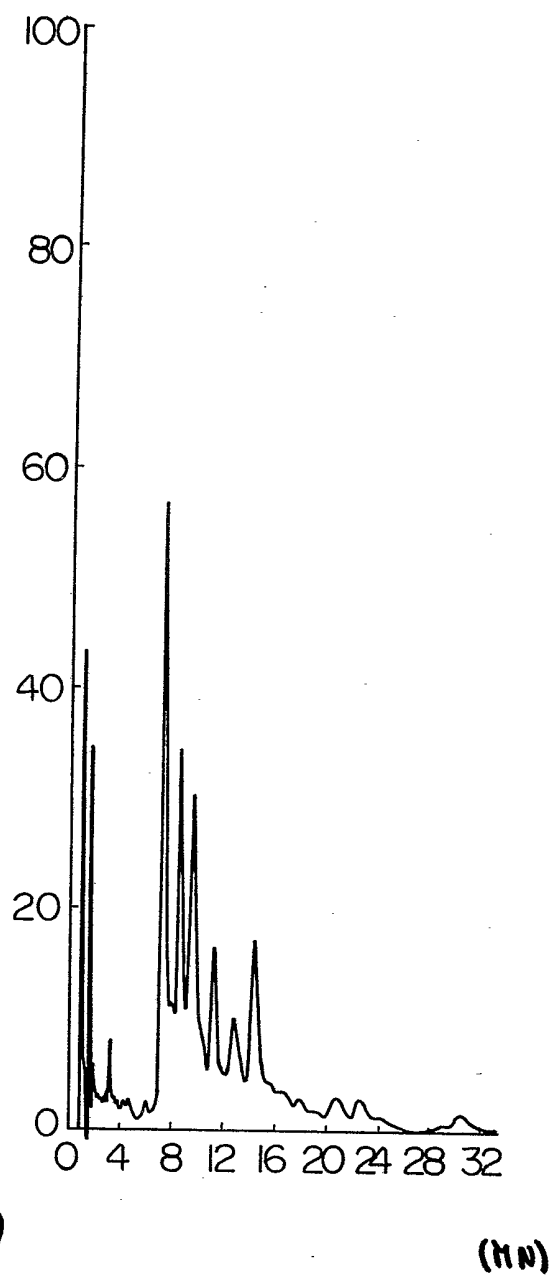


Fig. 3

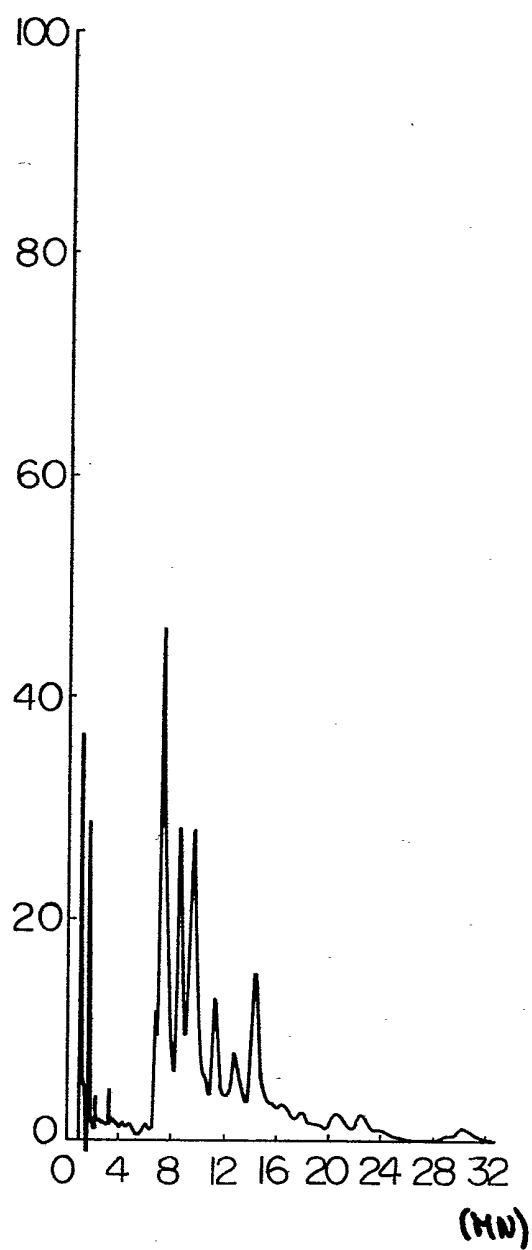


Fig. 4

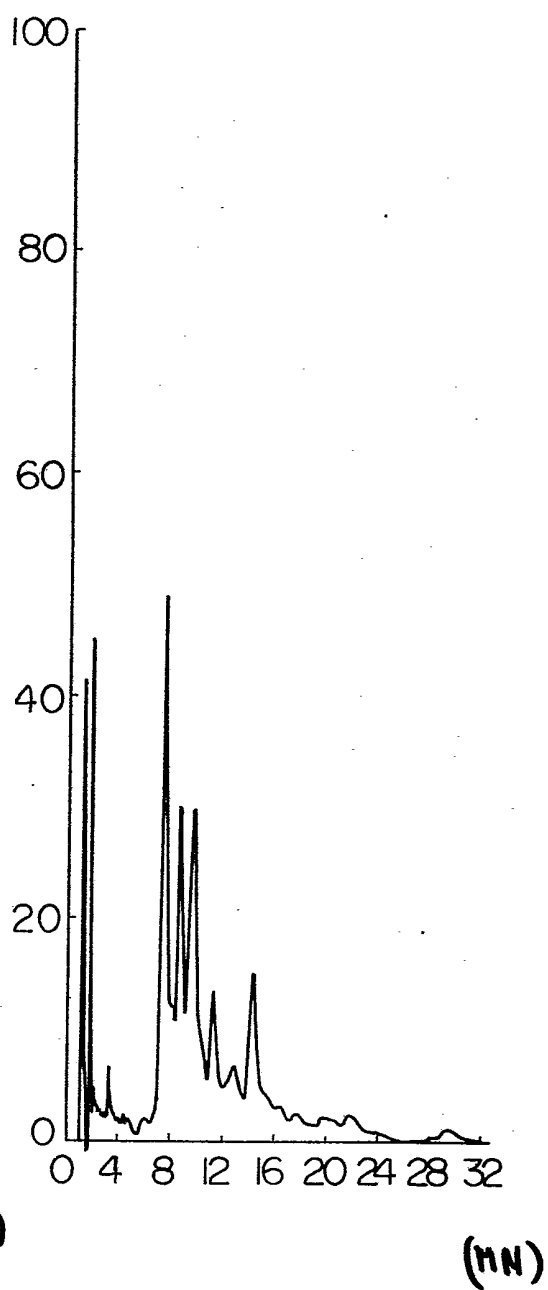


Fig. 5

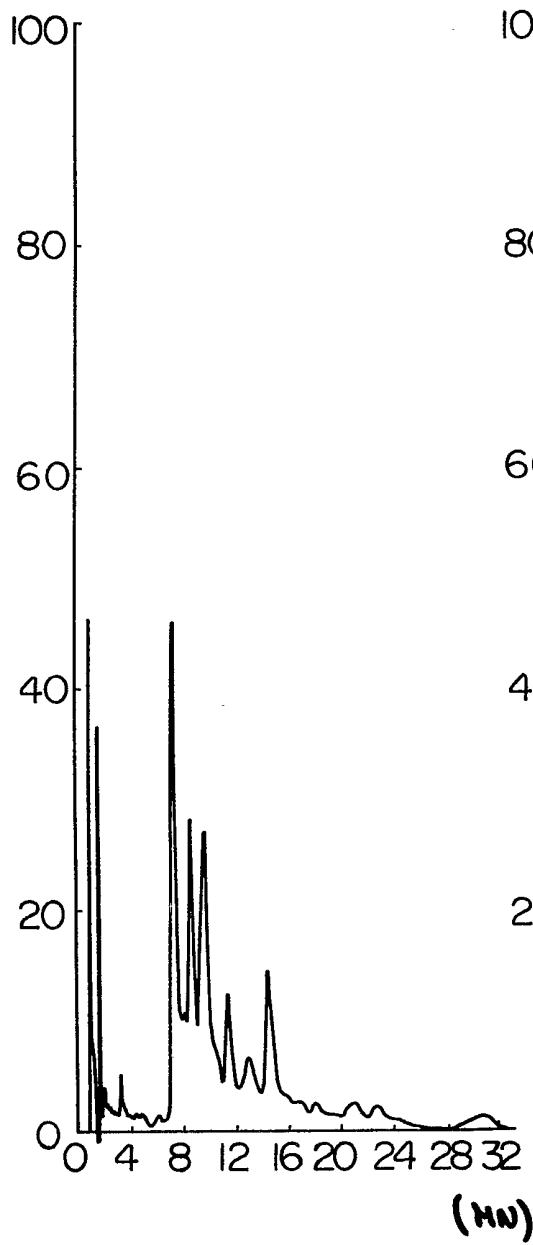


Fig. 6

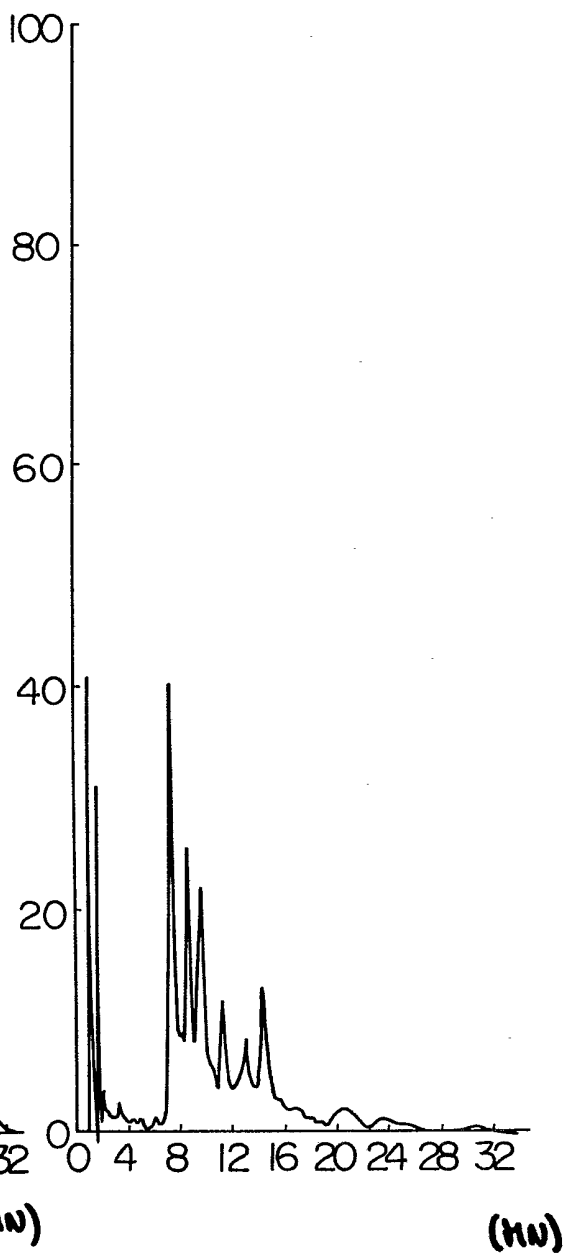


Fig. 7

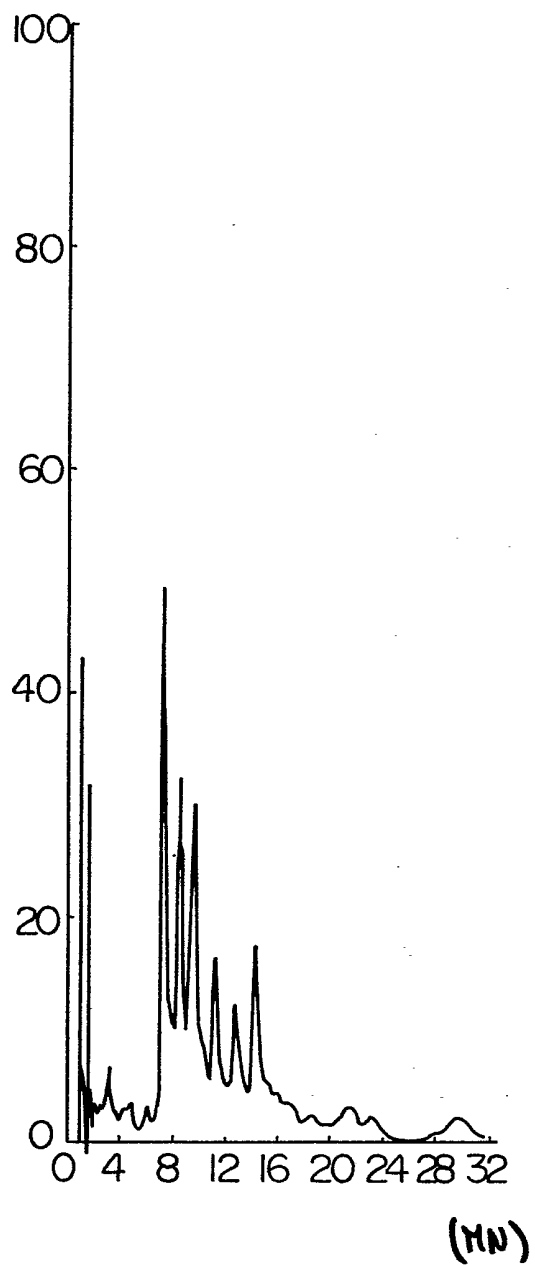


Fig. 8

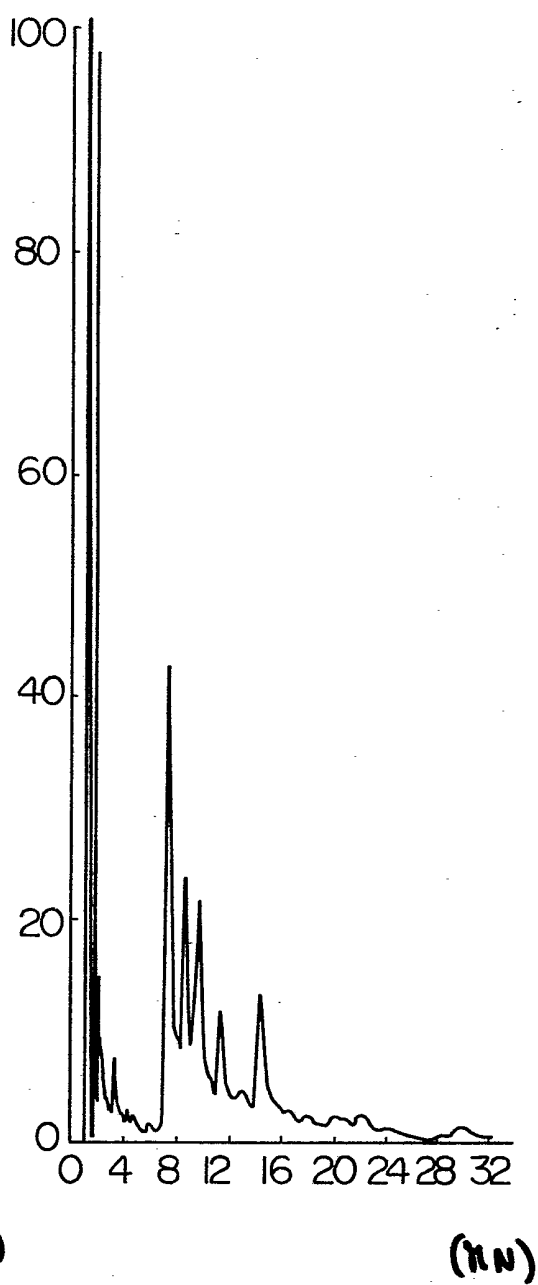
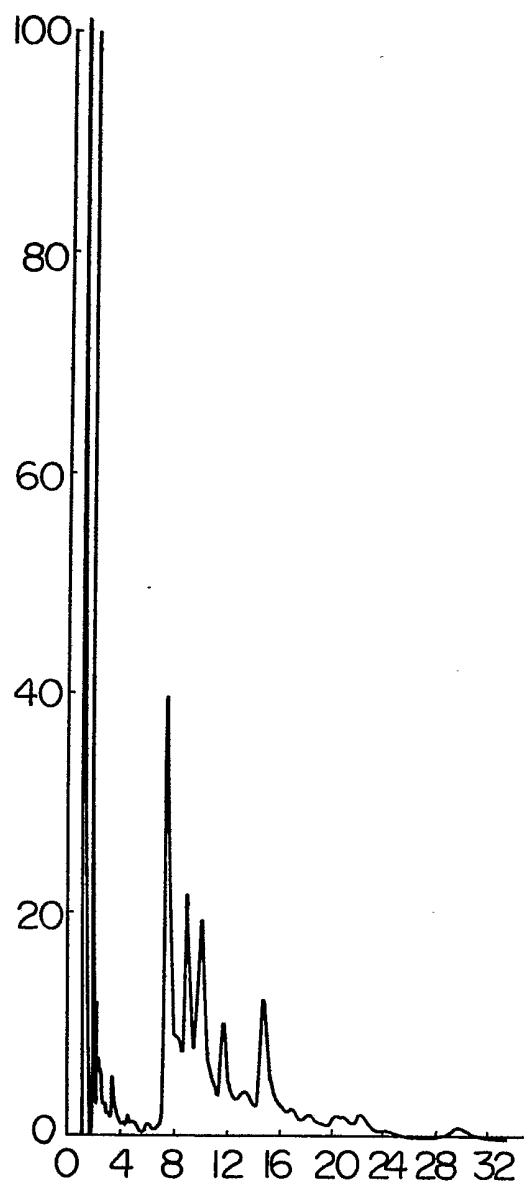
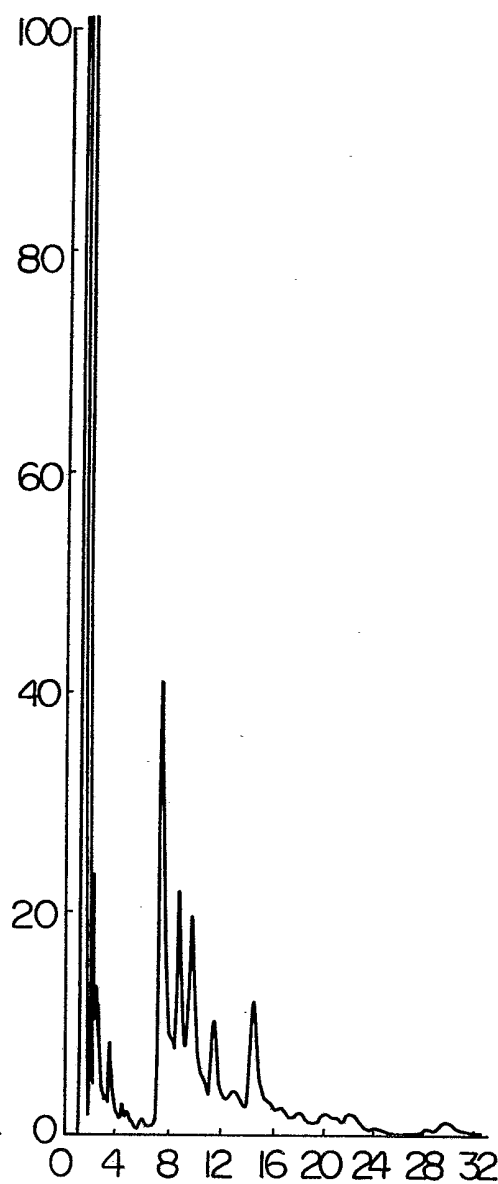


Fig. 9



(eV)

Fig. 10



(eV)

Fig. 11

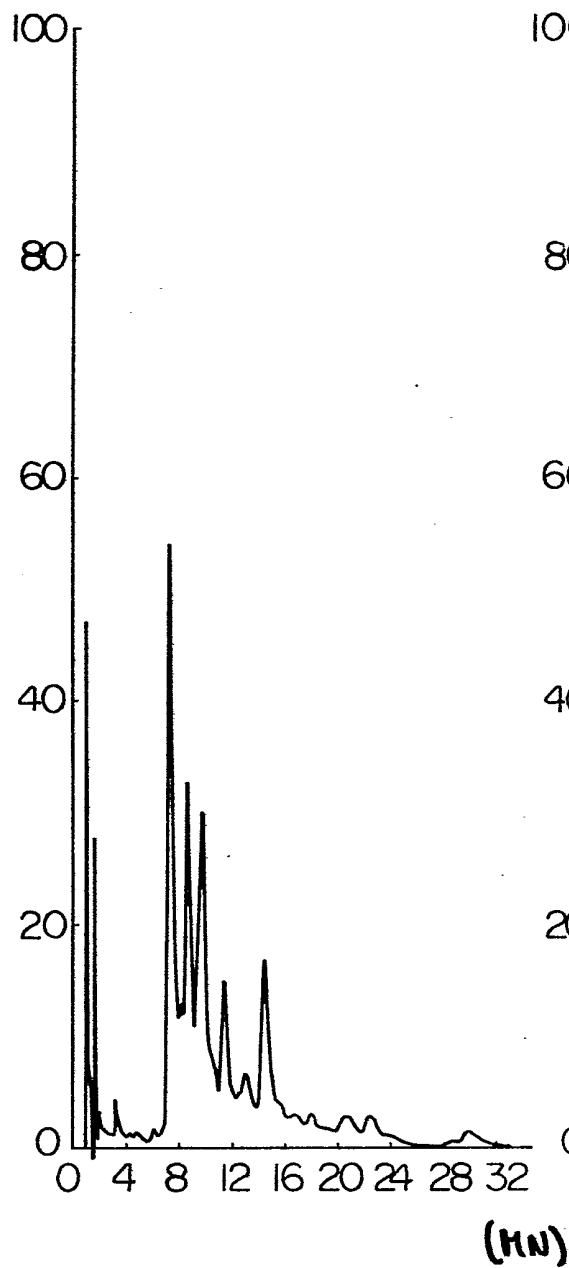


Fig. 12

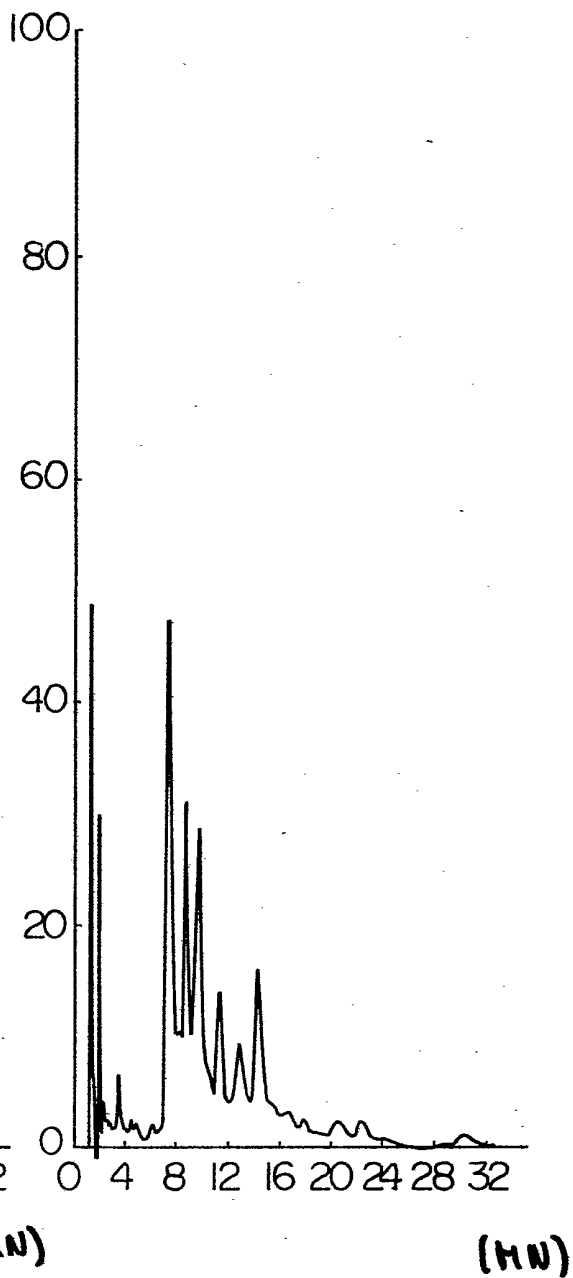


Fig. 13

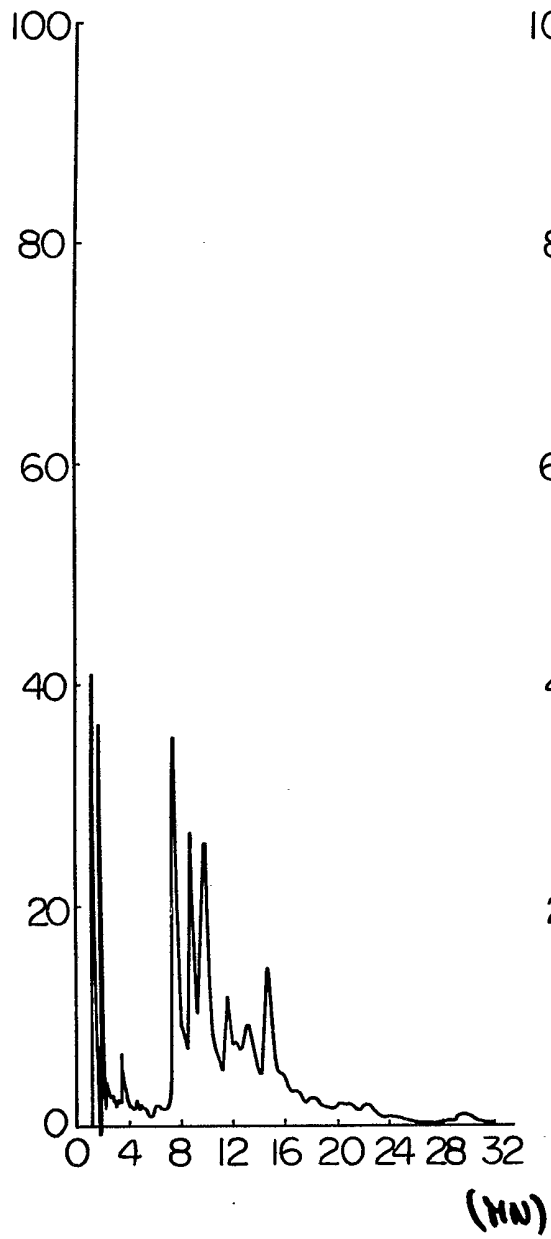


Fig. 14

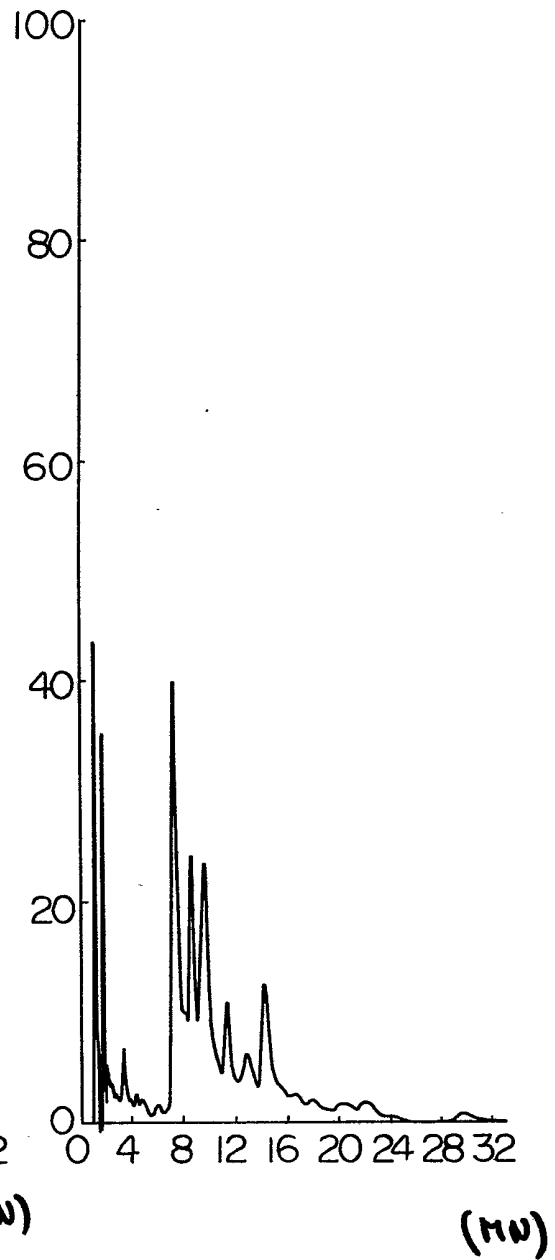


Fig. 15

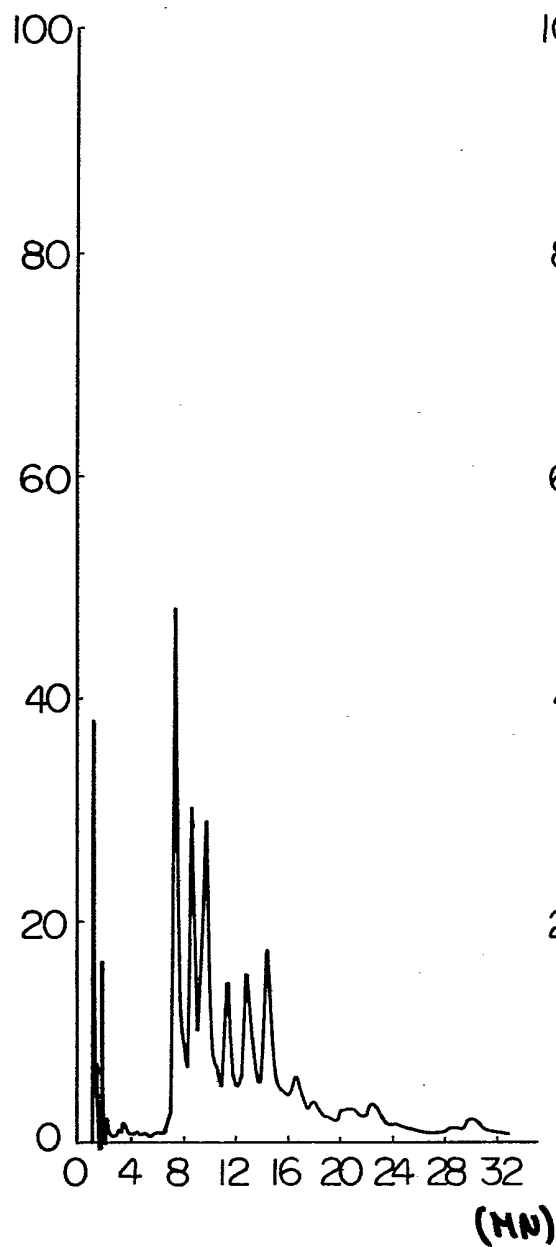


Fig. 16

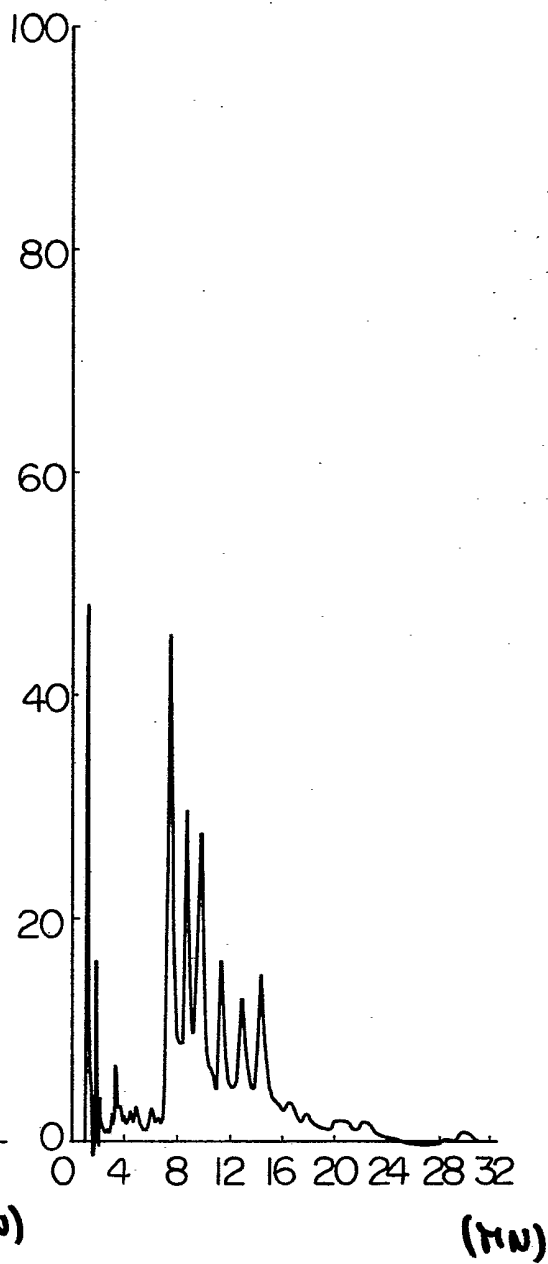


Fig. 17

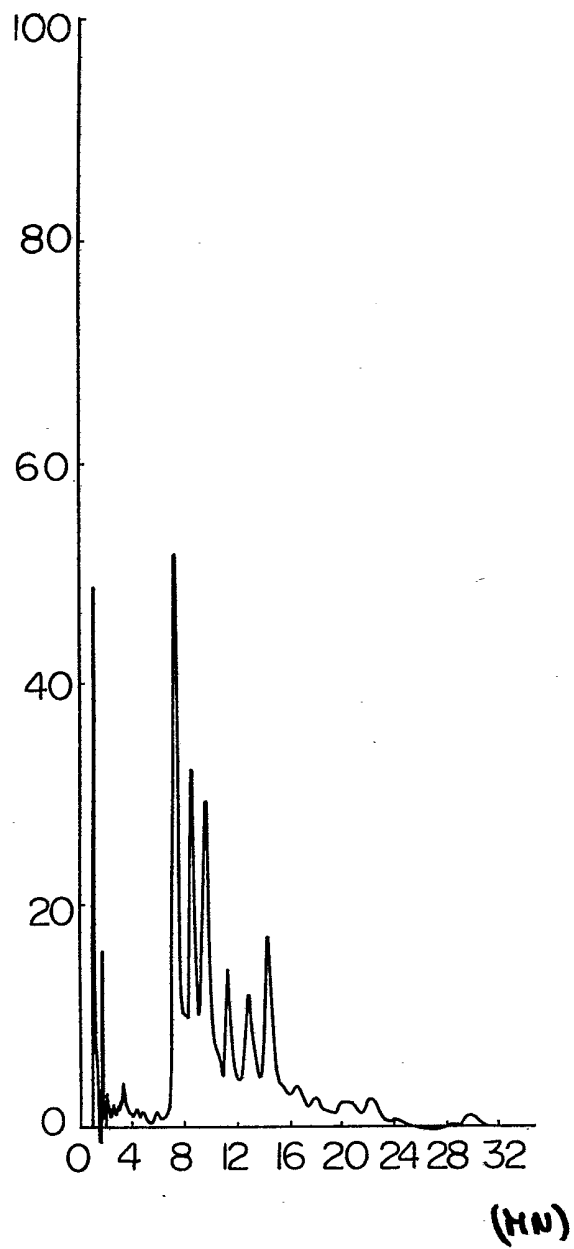


Fig. 18

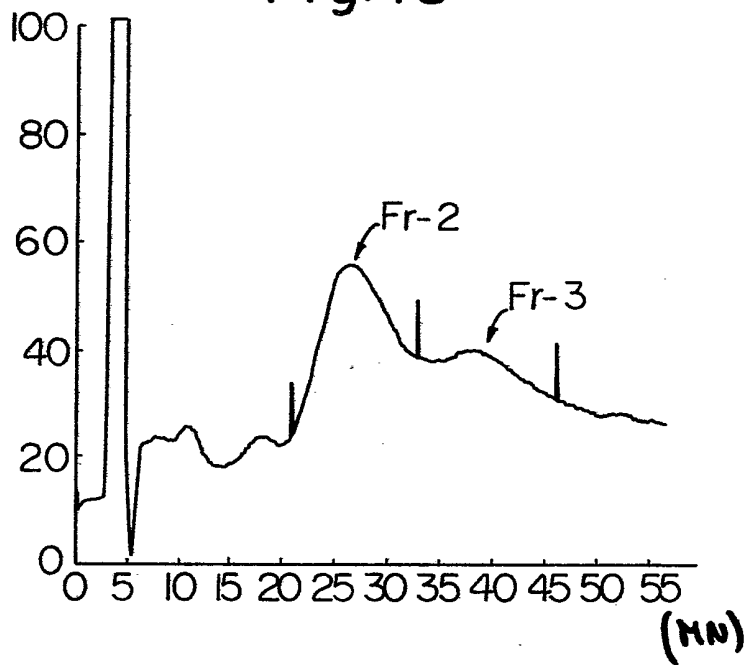


Fig. 19

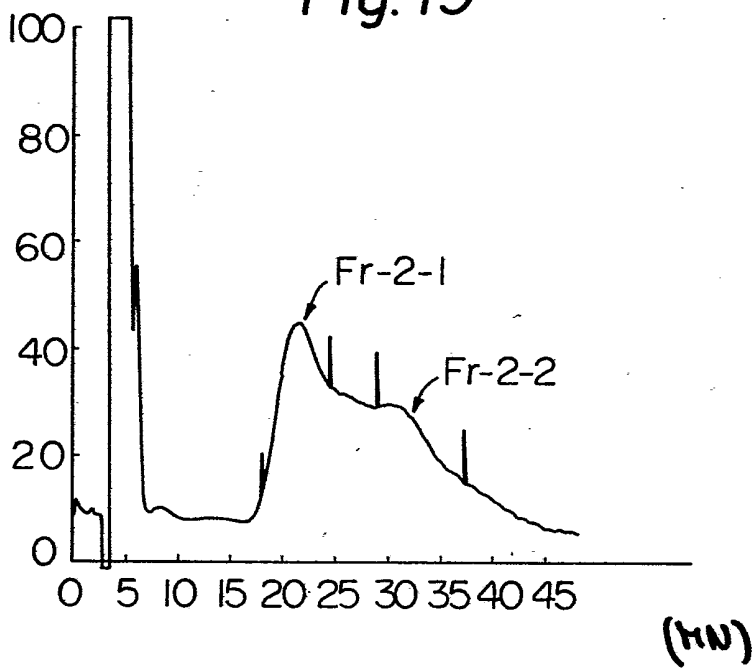


Fig. 20

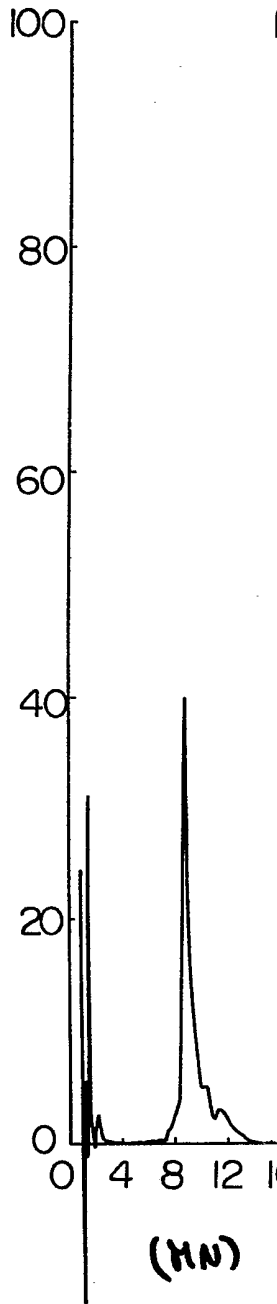


Fig. 21

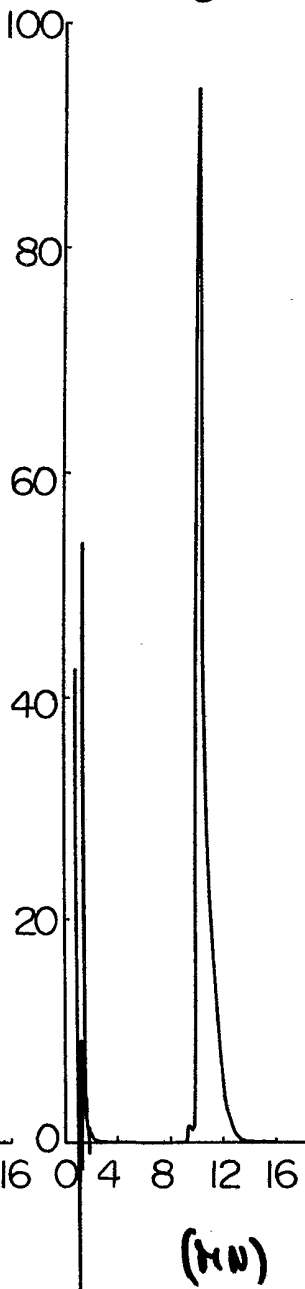


Fig. 22

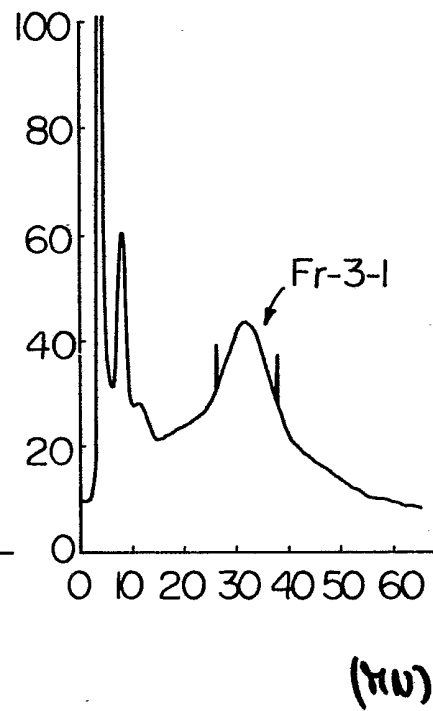


Fig. 23

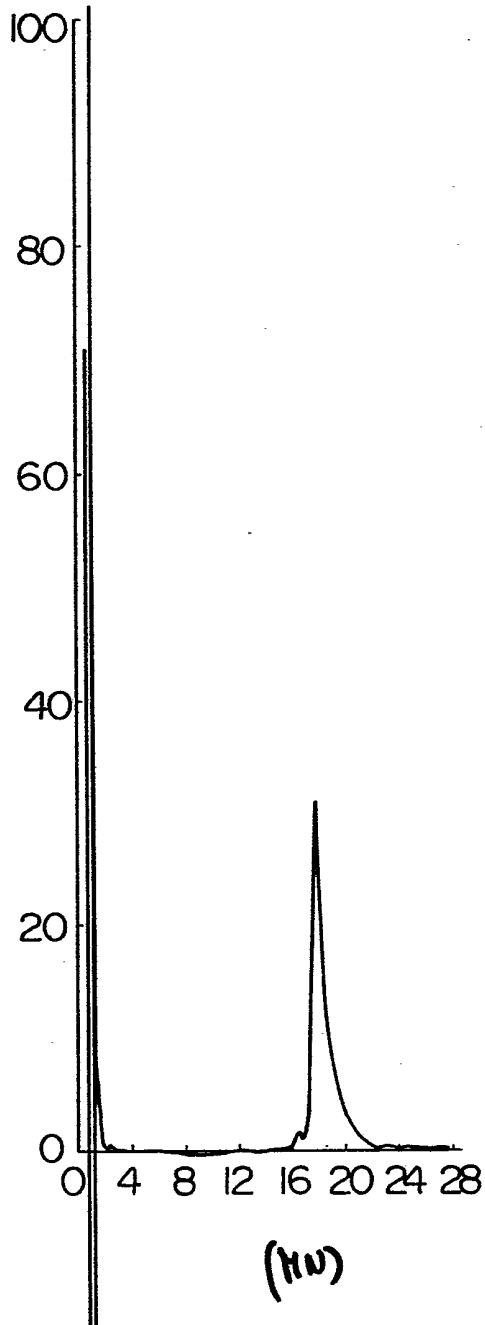


Fig. 24

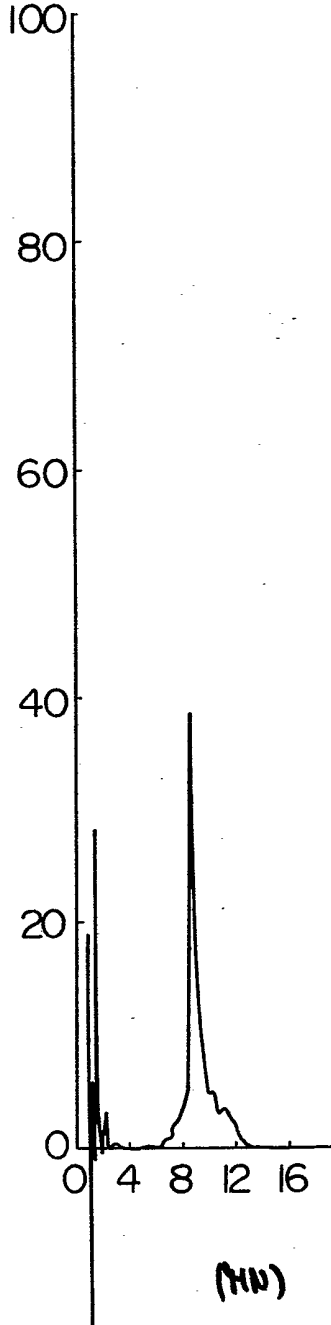


Fig. 25

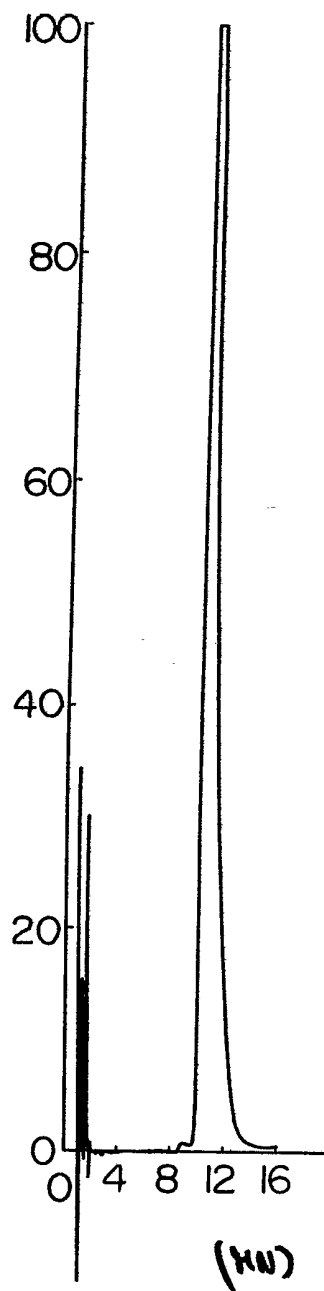


Fig. 26

