

8 2 5 8 3

GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG

Brevet N°
 du 4 juillet 1980
 Titre délivré : 8 007. 1980



Monsieur le Ministre
 de l'Économie Nationale et des Classes Moyennes
 Service de la Propriété Industrielle
 LUXEMBOURG

Demande de Brevet d'Invention

I. Requête

La société dite: SYNTHELABO, 1, avenue de Villars, à 75341 (1)
PARIS CEDEX 07, France, représentée par Monsieur Jacques
de Muyser, agissant en qualité de mandataire (2)

dépose ce quatre juillet 1980 quatre-vingt (3)
 à 15 heures, au Ministère de l'Économie Nationale et des Classes Moyennes, à Luxembourg :

1. la présente requête pour l'obtention d'un brevet d'invention concernant :
"Compositions pharmaceutiques contenant des extraits de (4)
lierre grim pant".

déclare, en assumant la responsabilité de cette déclaration, que l'(es) inventeur(s) est (sont) :
1.- Pierre BERNARD, 229, avenue du Pradot, à 13008 MARSEILLE, (5)
France
2.- Guy BALANSARD, 12, rue du Camas, à 13005 MARSEILLE, France

2. la délégation de pouvoir, datée de PARIS le 16 juin 1980
 3. la description en langue française de l'invention en deux exemplaires ;
 4. // planches de dessin, en deux exemplaires ;
 5. la quittance des taxes versées au Bureau de l'Enregistrement à Luxembourg,

le 4 juillet 1980
revendique pour la susdite demande de brevet la priorité d'une (des) demande(s) de
 (6) brevet déposée(s) en (7) France
 le 5 juillet 1979 (No. 79 17451) (8)

au nom de la déposante (9)
élit domicile pour lui (elle) et, si désigné, pour son mandataire, à Luxembourg
35, bld. Royal (10)

sollicite la délivrance d'un brevet d'invention pour l'objet décrit et représenté dans les annexes
 susmentionnées, avec ajournement de cette délivrance à // mois.

Le mandataire

II. Procès-verbal de Dépôt

La susdite demande de brevet d'invention a été déposée au Ministère de l'Économie Nationale
 et des Classes Moyennes, Service de la Propriété Industrielle à Luxembourg, en date du :

4 juillet 1980

à 15 heures

Pr. le Ministre
 de l'Économie Nationale et des Classes Moyennes,
 p. d.



A 68007

(1) Nom, prénom, firme, adresse — (2) s'il n'y a lieu de représenter par ... agissant en qualité de mandataire — (3) date du
 dépôt en toutes lettres — (4) titre de l'invention — (5) noms et adresses — (6) brevet, certificat d'addition, modèle d'utilité
 — (7) pays — (8) date — (9) déposant original — (10) adresse — (11) 6, 12 ou 18 mois.

REVENDICATION DE LA PRIORITE

de la demande de brevet / *du dépôt/de/du dépôt*

En FRANCE

Du 5 JUILLET 1979



Mémoire Descriptif

déposé à l'appui d'une demande de

BREVET D'INVENTION

au

Luxembourg

au nom de: SYNTHELABO

pour: "Compositions pharmaceutiques contenant des extraits de
lierre grimpant".



La présente invention concerne des compositions pharmaceutiques contenant des extraits de lierre grimpant et l'obtention des extraits à base d'hédérasaponine C à partir du lierre.

On a déjà préparé des extraits de lierre (Hedera) et plus particulièrement de lierre grimpant (Hedera Helix) par extraction à l'aide d'eau et/ou d'alcool.

La présente invention concerne l'obtention d'un extrait de saponines à 60% à partir de lierre grimpant et plus particulièrement l'obtention d'un extrait de saponines purifiées titré à 90% en hédérasaponine C et enfin l'obtention d' α -hédérine.

Le procédé de l'invention consiste à préparer dans un premier temps un extrait de saponines titré à 60%. A cet effet, on effectue d'abord une lixiviation (de la poudre de lierre) à l'aide d'acétone ou d'un solvant présentant une constante diélectrique identique à celle de l'acétone ; par exemple un mélange acétate d'éthyle/alcanol, tel que méthanol ou éthanol.

La poudre épuisée par le solvant est ensuite séchée. On effectue alors une seconde lixiviation avec du méthanol pur.

On concentre la solution que l'on traite avec du charbon activé neutre puis on filtre. On concentre le filtrat sous pression réduite.

On ajoute alors au filtrat de l'éther éthylique ou un mélange de solvants ayant une polarité identique à celle de l'éther, par exemple un mélange chloroforme/acétate d'éthyle afin de précipiter l'extrait de saponines. Cet extrait est repris par du méthanol pur, filtré et séché sous pression réduite ou par atomisation.

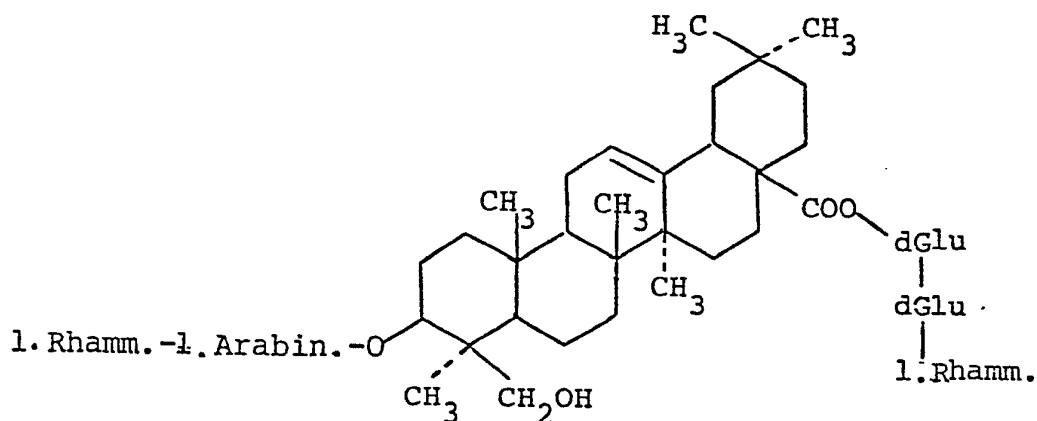
Le produit ainsi obtenu est un complexe de saponines contenant environ 60% d'hédérasaponine C.

Ce complexe de couleur jaune est très soluble dans l'eau et le méthanol et peu soluble dans l'éthanol.

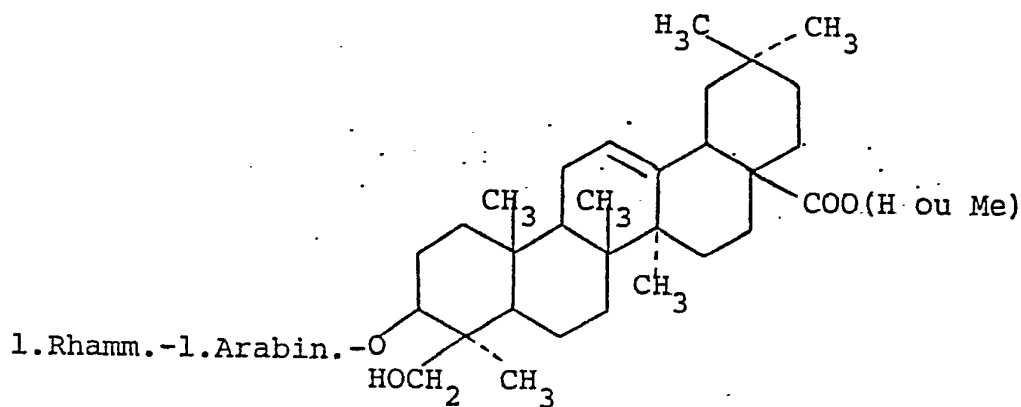
En chromatographie sur couche mince sur gel de silice, avec pour solvant un mélange benzène 65/méthanol 35/acide acétique 10 et comme révélateur une solution à 1% de vanilline dans de l'acide sulfurique, on met en évidence différentes taches colorées dont en particulier celle de l'hédérasaponine C colorée en brun noir.

Selon le procédé de l'invention, dans un second temps, on prépare un extrait titré à 90% en hédérasaponine C. A cet effet on traite le précédent extrait à 60% d'hédérasaponine C sur une colonne d'alumine en éluant avec du méthanol pur.

On recueille l'éluat qui contient au minimum 90% d'hédérasaponine C de formule



Selon le procédé de l'invention on prépare enfin l'α-hédérine ou ses sels alcalins à partir de l'extrait précédent par saponification à l'aide de soude ou de potasse ; de formule



Les trois substances, obtenues à chaque stade du procédé de l'invention ont été étudiées quant à leur activité antifongique et antiparasitaire in vitro et in vivo.

L'exemple suivant illustre le procédé de l'invention.

EXEMPLE

1. On traite 25 kg de poudre de lierre grimpant avec 120 l d'acétone. On concentre et sèche. On obtient une masse visqueuse vert foncé pesant environ 1000 g. On sèche.

5 On ajoute 110 l de méthanol pur. On concentre sous pression réduite jusqu'à 25 l. On agite avec 100 à 200 g de charbon activé neutre. On filtre. On concentre le filtrat sous pression réduite à 10 l environ. On ajoute au 10 l de filtrat, 20 l d'éther éthylique. On obtient un précipité P_1 . On ajoute au filtrat, concentré à 6 l, 20 l d'éther
10 éthylique. Il se forme un précipité P_2 que l'on réunit avec le précipité P_1 . On reprend les précipités par 10 l de méthanol pur, on filtre et on sèche sous pression réduite. On obtient 1,5 à 2 kg d'extrait contenant 60% d'hédérasaponine C.

2. La séparation sur colonne d'alumine afin d'obtenir l'extrait contenant 90% d'hédérasaponine C est effectuée de la manière suivante :

15 On disperse 1 kg d'alumine neutre W_{200} dans du méthanol pur. On la place alors dans la colonne. On élue avec du méthanol pur jusqu'à ce que l'éluat soit parfaitement limpide. On introduit alors 300 g de l'extrait précédent dilués dans 2 l de méthanol pur. On élue avec
20 du méthanol pur. On recueille 4 l d'éluat que l'on évapore sous pression réduite. On obtient 190 g d'extrait contenant au minimum 90% d'hédérasaponine C.

3. On traite l'extrait à 90% d'hédérasaponine C, en milieu aqueux, par NaOH ou KOH2N, à chaud pendant 1 heure.

25 On acidifie et lave le précipité. On le reprend par du méthanol pur. On filtre et sèche.

On obtient l' α -hédérine.

Les extraits de lierre grimpant obtenus selon le procédé de l'invention, l'extrait titré à 60% en hédérasaponine C, l'extrait titré à 90% en hédérasaponine C et l' α -hédérine, se sont révélés être actifs en tant qu'antiparasitaires et antifongiques.

5 La toxicité des extraits a été déterminée chez la souris par voie intrapéritonéale.

La DL 50 (24 heures) varie de 2000 mg à 3200 mg. La DL 50 (8 jours) varie de 1500 mg à 2500 mg.

Activité antiparasitaire

10 L'activité anthelminthique et l'activité protozoocide des extraits de l'invention ont été étudiées.

1. L'activité anthelminthique vis à vis des cestodes, des nématodes et des trématodes a été déterminée in vitro et in vivo.

1.1 L'activité à l'égard des cestodes a été étudiée sur le Taenia
15 de la souris :

Essai in vitro :

Les Hymenolepis nana var. fraterna sont récupérés par dissection de l'intestin grêle des souris parasitées, et sont placés dans un milieu de Sen et Hawking à l'étuve à 37°.

20 L'essai consiste à mettre en contact les différentes dilutions des produits à essayer avec les vers maintenus en survie et à déterminer la dose léthale après 24 heures.

On opère par rapport à

- 1 lot de vers non traités qui doivent survivre plusieurs
25 jours
- 1 lot de vers traités par des produits de référence :
hélénine et santonine.

Essai in vivo :

Il consiste à faire ingérer à la souris parasitée des doses variables de produits à tester et de contrôler dans les feces l'émission des oeufs d'*Hymenolepis*.

On évalue la guérison en effectuant une numération des oeufs par gramme de selle. Cette numération doit être négative en fin de traitement.

Pour avoir la certitude que le déparasitage est total, on réalise après autopsie une dissection de l'intestin de la souris afin de s'assurer qu'il n'y a plus de vers ou encore qu'ils sont tous morts.

Les substances de référence utilisées dans le test in vivo sont la mépacrine et l'hélénine.

Les résultats des essais in vitro sont exprimés en doses léthales DL 100 après 24 heures, c'est à dire en quantités de produits suffisantes pour tuer 100% des cestodes au bout de 24 heures.

Les résultats des essais in vivo indiquent le pourcentage de déparasitage obtenus pour les quantités indiquées.

<u>In vitro</u>	
Substance	DL 100 (24h)
Hélénine (substance de référence)	50 µg/ml
Santonine "	100 µg/ml
α-hédérine	100 µg/ml
Extrait à 90%	1 mg/ml
Extrait à 60%	5 mg/ml

<u>In vivo</u>		
Substance	Dose (mg/kg)	% de déparasitage
Mépacrine	220	100
Hélénine	300	60
α-hédérine	400	20
Extrait à 90%	400	30
Extrait à 60%	400	60

1.2 L'activité nématicide a été étudiée sur *Syphacia obvelata* de la souris.

On effectue les tests *in vitro* et *in vivo* de la même manière que ceux qui ont été pratiqués pour la recherche de l'activité taenicide.

Les produits de référence sont ici la santonine et l'hélenine *in vitro* et la pipérazine et l'hélenine *in vivo*.

In vitro

Substance	DL 100 (24h)
Hélenine	10 µg/ml
Santonine	100 µg/ml
α-hédérine	1 mg/ml
Extrait à 90%	5 mg/ml
Extrait à 60%	5 mg/ml

In vivo

Substance	Dose (mg/kg)	% de déparasitage
Citrate de pipérazine	200	90
Hélenine	300	80
α-hédérine	400	10
Extrait à 90%	400	30
Extrait à 60%	400	70

1.3 L'activité à l'égard des trématodes a été étudiée à l'égard des douves *in vitro* et *in vivo*.

Essai *in vitro* :

Les douves : *Fasciola hepatica* (grande douve) et *Dicrocoelium lanceolatum* (petite douve) sont récoltées aussitôt après l'abattage des ovins et des bovins parasités, par dissection des canaux biliaires et hépatiques de ces animaux.

Ces vers sont directement placés dans le milieu de survie de Benex modifié par Cavier, à l'étuve à 37°.

Les produits à tester sont mis en contact à différentes concentrations et on détermine la dose létale (DL 100) après 24 heures ; les substances de référence sont l'hélénine et la santonine.

Essai in vivo sur des ovins parasités.

On contrôle au préalable par une numération des oeufs de douves dans les feces, le taux d'infestation des moutons à traiter. Puis on fait ingérer aux animaux à l'aide d'un pistolet doseur placé au fond de la gorge des moutons 3 doses successives des différents produits à 8 jours d'intervalle. La durée du traitement est donc de 3 semaines.

Pendant tout le temps du traitement on contrôle par numération la diminution des oeufs dans les fèces jusqu'à disparition.

Enfin pour s'assurer de la guérison, on abat les moutons et on recherche la disparition des douves dans les canaux hépatiques et biliaires ce qui est la preuve irréfutable de l'activité douvicide des produits essayés.

Les résultats sont exprimés de la même manière que dans les essais précédents ;

In vitroa) sur *Fasciola hepatica*

Substance

DL 100 (24 h)

Santonine

100 µg/ml

Hélénine

10 µg/ml

α-hédérine

5 µg/ml

Extrait à 90%

5 mg/ml

Extrait à 60%

1 mg/ml

b) sur *Dicrocoelium lanceolatum*

Substance

DL 100 (24 h)

Santonine

50 µg/ml

Hélénine

10 µg/ml

α-hédérine

10 µg/ml

Extrait à 90%

5 mg/ml

Extrait à 60%

500 µg/ml

In vivo

3 cures de 800 mg/kg à 8 jours d'intervalle ont été faites sur des moutons parasités par la petite douve (*Dicrocoelium lanceolatum*). Avec l'α-hédérine il y a diminution des oeufs dans les feces alors qu'avec les deux extraits à 60 et 90% en hédérasaponine C il y a disparition totale des oeufs.

Le contrôle après autopsie a montré qu'il y avait effectivement disparition des douves ou que les douves étaient mortes lorsque les animaux avaient été traités à l'aide des 2 extraits à 60 et 90%.

2. L'activité protozoocide a été étudiée à l'égard des protozoaires intestinaux (amibes) et à l'égard des *Trichomonas intestinalis*.

L'activité des substances est étudiée sur 2 tests :

- inhibition au départ des cultures :

on détermine la concentration minimale inhibitrice (CMI) c'est à dire la plus petite quantité de produit qui, introduite dans le milieu de culture avant ensemencement arrête complètement le développement de la culture après un délai de contact de 72h à 37°.

Action létale sur une culture de 48 heures. On détermine la plus petite quantité de produit à étudier qui, introduite dans une culture de 2 jours en pleine croissance, est susceptible de tuer tous les protozoaires (amibes ou Trichomonas) après une incubation de 48 heures à 37°.

Ces 2 tests sont menés en parallèle avec un produit de référence connu : le métronidazole.

Pour ces tests on a effectué un contrôle de l'activité des produits en réalisant des rétrocultures à partir des milieux où les protozoaires ont été tués. Ces rétrocultures négatives ont confirmé l'activité des produits essayés.

Les résultats sont les suivants:

Substance	CMI
Métronidazole	5 µg/ml
α -hédérine	50 µg/ml
Extrait à 90%	> 10 mg/ml
Extrait à 60%	> 10 mg/ml

Activité antifongique

L'activité a été étudiée sur les levures et les dermatophytes.

1. L'activité sur les levures (Candida albicans) a été étudiée in vitro et in vivo.

In vitro :

On met en culture la levure de *Candida albicans* sur le milieu de Sabouraud liquide à double concentration d'une suspension de 10^6 cellules.

On met en contact une quantité déterminée de cet inoculum avec des doses décroissantes des dilutions des produits à tester. La lecture se fait après 24 heures d'incubation à 37° .

Les tubes dans lesquels les produits ont agi restent limpides.

On contrôle cette activité antifongique, en pratiquant des rétro-cultures qui, 72 heures après incubation à l'étuve à 37° , doivent rester négatives.

La substance de référence est l'amphotéricine B.

In vivo :

L'étude est effectuée sur la souris.

Après épilation dorsale des souris et exposition aux UV pour entraîner une réaction inflammatoire, on réalise un abcès candidosique sous-cutané en inoculant 0,25 ml d'une culture diluée au 1/10 de *Candida albicans*.

Deux jours plus tard on commence le traitement en répartissant les souris en différents lots qui recevront des concentrations différentes de produits à tester par ingestion forcée à l'aide d'une sonde stomacale. Ce traitement est mené en parallèle avec un produit de référence : l'amphotéricine B. Le temps de traitement est de 10 jours.

La guérison se manifeste par la disparition progressive des abcès candidosiques.

Les témoins non traités conservent ces abcès pendant plus d'un mois.

Les résultats sont exprimés en concentrations minimales d'inhibition (CMI) pour le test in vitro.

Substance	CMI
Amphotéricine B	2,5 $\mu\text{g/ml}$
α -hédérine	500 $\mu\text{g/ml}$
Extrait à 90%	> 50 mg/ml
Extrait à 60%	> 50 mg/ml

Pour le test in vivo on détermine la disparition ou non de l'abcès sous-cutané provoqué chez la souris :

- L'abcès persiste plus d'un mois chez les animaux non traités.
- L'abcès persiste chez les animaux traités par 2,5 mg/kg d'amphotéricine B, mais un nouveau traitement pendant 10 jours permet la disparition de l'abcès.
- Les trois substances de l'invention, l' α -hédérine, les extraits à 90% et 60% d'hédérasaponine C, à la dose de 50 mg/kg par jour pendant 10 jours, entraînent la disparition des abcès dans tous les cas.

2. L'activité sur les dermatophytes a été étudiée in vitro sur le *Microsporum Canis*.

La mise en culture du dermatophyte est effectuée de la manière suivante :

L'inoculum est une dilution au 1/10 dans de l'eau stérile d'une culture de 7 jours. Chaque tube reçoit 0,1 ml de cette dilution, 1 ml de milieu de Sabouraud double concentration et 1 ml de dilution des produits.

La lecture de l'activité antifongique sera faite au bout de 7 jours. On recherche l'inhibition de croissance dans les différents tubes. Lorsque cette inhibition est constatée, on procède à une rétroculture pour contrôle et la lecture sera faite 15 jours après ; la négativité de cette rétroculture confirme alors l'activité antifongique du produit.

La substance de référence est l'amphotéricine B.

Les résultats sont exprimés en CMI

Substance	CMI
Amphotéricine B	2,5 μ g/ml
α -hédérine	50 μ g/ml

Les résultats des essais précédents montrent que les substances de l'invention sont des médicaments à activité antiparasitaire et antifongique.

Les substances de l'invention, l' α -hédérine, l'extrait de lierre à 90% d'hédérasaponine C et l'extrait de lierre à 60% d'hédérasaponine C, peuvent être utilisées pour le traitement des affections parasitaires et fongiques ; en thérapeutique humaine et vétérinaire.

Les substances peuvent être présentées sous toute forme appropriée pour l'administration par voie locale, orale ou parentérale en association avec tout excipient approprié, par exemple sous la forme de comprimés, gélules, capsules, solutions buvables et injectables, poudres lyophilisées, crèmes, lotions, etc...

A titre d'exemple, les gélules peuvent avoir la composition suivante :


200 mg de l'extrait à 60% d'hédérasaponine C

20 mg de mannitol


35 mg de cellulose microcristalline

5 mg de stéarate de magnésium

pour une gélule n° 1.



Revendications

1. Compositions pharmaceutiques caractérisées en ce qu'elles contiennent à titre de principe actif un extrait de lierre grimpant à 90% ou 60% d'hédérasaponine C ou le produit de saponification de l'hédérasaponine C, l' α -hédérine.
 2. Compositions pharmaceutiques selon la revendication 1, à activité antiparasitaire et antifongique.
 3. Compositions pharmaceutiques ayant une activité anthelminthique, caractérisées en ce qu'elles contiennent à titre de principe actif un extrait de lierre grimpant à 90% ou 60% d'hédérasaponine C ou le produit de saponification de l'hédérasaponine C, l' α -hédérine.
 4. Compositions pharmaceutiques ayant une activité anthelminthique destinées à l'administration par voie orale, caractérisées en ce qu'elles contiennent à titre de principe actif un extrait de lierre grimpant à 90% ou 60% d'hédérasaponine C.
 5. Compositions pharmaceutiques ayant une activité protozoocide, caractérisées en ce qu'elles contiennent à titre de principe actif un extrait de lierre grimpant à 90% ou 60% d'hédérasaponine C ou le produit de saponification de l'hédérasaponine C, l' α -hédérine.
 6. Compositions pharmaceutiques ayant une activité antifongique, caractérisées en ce qu'elles contiennent à titre de principe actif un extrait de lierre grimpant à 90% ou 60% d'hédérasaponine C ou le produit de saponification de l'hédérasaponine C, l' α -hédérine.
 7. Compositions pharmaceutiques ayant une activité antifongique, caractérisées en ce qu'elles contiennent à titre de principe actif un extrait de lierre grimpant à 90% ou 60% d'hédérasaponine C.
- 

8. Compositions pharmaceutiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisées en ce qu'elles sont présentées en vue de l'administration orale sous la forme de gélules, en vue de l'administration parentérale sous la forme de solutions injectables éventuellement lyophilisées ou en vue de l'administration topique sous la forme de pommades ou de collyres ou de solutés.

9. Procédé d'obtention d'extraits de lierre grimpant, procédé caractérisé en ce que l'on effectue une lixiviation de la poudre de lierre à l'aide d'acétone ou d'un solvant présentant une constante diélectrique identique à celle de l'acétone, on sèche la poudre épuisée par le solvant, on effectue une seconde lixiviation avec du méthanol pur, on concentre la solution que l'on traite avec du charbon activé neutre puis on filtre, on concentre le filtrat sous pression réduite, on ajoute au filtrat de l'éther éthylique ou un mélange de solvants de polarité identique à celle de l'éther pour précipiter l'extrait de saponines, on reprend ce dernier par du méthanol pur, on le filtre et sèche, on obtient l'extrait à 60% d'hédérasaponine C que l'on traite sur une colonne d'alumine par élution avec du méthanol pur, on obtient alors l'extrait à 90% d'hédérasaponine C.

10. Extraits de lierre grimpant à 60 et 90% d'hédérasaponine C obtenus selon le procédé de la revendication 9.

