



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 699 18 339 T2 2005.08.25

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 171 146 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 699 18 339.1

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/KR99/00189

(96) Europäisches Aktenzeichen: 99 916 052.6

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 00/64462

(86) PCT-Anmeldetag: 21.04.1999

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 02.11.2000

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 16.01.2002

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 23.06.2004

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 25.08.2005

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: A61K 35/78

A61K 31/135, A61P 25/16, A61P 25/28

(73) Patentinhaber:

Yuyu Inc., Anyang, Kyungki, KR

(74) Vertreter:

Schwabe, Sandmair, Marx, 81677 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

DE, FR, GB

(72) Erfinder:

Ann, Hyung Soo, Seoul 139-230, KR; Lee, Jeong Mi, Seoul 138-225, KR; Kim, Hyung Chun, Kangwon-do 200-030, KR; Kang, Sung An, Seoul 137-049, KR

(54) Bezeichnung: PHARMAZETISCHE ZUSAMMENSETZUNGEN DIE SELEGILIN UND GINKGO BILOBA EXTRAKT ENTHALTEN ZUR BEHANDLUNG VON DEMENZ

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

### Gebiet der Erfindung

**[0001]** Die Erfindung betrifft pharmazeutische Zusammensetzungen oder Zubereitungen, enthaltend Selegilin und Ginkgo-Biloba-Extrakt als aktive Bestandteile, die zur Behandlung der Parkinson'schen Erkrankung und zur Verbesserung der Symptome einer Demenz nützlich sind.

### Beschreibung des Standes der Technik

**[0002]** Selegilin (auch als „Deprenyl“ bekannt) wird klinisch für Parkinson benutzt, da es indirekt die Dopaminerhöhung, indem es selektiv die Monoaminoxidase B ( $MAO_B$ ) inhibiert (Arch. Gen. Psychiatry, 44, 427 (1987)). Darüber hinaus gibt es einige klinische Berichte, die angeben, dass es auch bei der Alzheimer'schen Erkrankung wirksam ist, da es dank seiner antioxidativen Wirkungen schützende Wirkung auf neuronale Zellen ausübt, wie auch dass es antidepressive Wirkungen durch Inhibition der Reabsorption der Monoaminoxidase besitzt (Arch. Gen. Psychiatry, 46, 45 (1989); Ann. Neurol., 26, 689 (1989), Arch. Gen. Psychiatry, 44, 427 (1987)).

**[0003]** Andererseits handelt es sich bei Ginkgo-Biloba-Extrakt um einen Extrakt, der durch Extraktion der Blätter von Ginkgo-Biloba-Linne mit Aceton und Wasser erhalten wird, und dieser enthält 24 % Flavonoide oder Ginkgo-Flavon-Glycoside und 6 % Terpenoide oder Ginkgolide oder Bilobalide als repräsentative Bestandteile. Daneben umfasst er auch Proanthocyanidin und organische Säuren usw. (Vanhaelen, Planta Med., 55, 202 (1989)).

**[0004]** Flavonoide sind freie Radikalfänger und üben eine antioxidative Wirkung aus, während Ginkgolid B die Aggregation von Plättchen inhibiert, da es über eine PAF-inhibierende Wirkung verfügt (Eur. J. Pharmacol., 127 (1-2), 83, 1986).

**[0005]** Ginkgo-Biloba-Extrakt lindert Blutzirkulationsstörungen von Mikrogefäßen eher über die kombinierte als durch die einzelne Wirkung dieser verschiedenen Bestandteile und wird zur Behandlung von Hirndysfunktionen eingesetzt, die Demenz ähnliche Symptome begleiten, eingeschlossen solche wie Tinnitus, Kopfschmerzen, Gedächtnisverlust, Konzentrationsstörungen und Depression usw..

### Zusammenfassung der Erfindung

**[0006]** Aus dem obigen kann man von der kombinierten Verabreichung von Selegilin und Ginkgo-Biloba-Extrakt an einen Demenzpatienten erwarten, dass diese synergistische Wirkungen zweier verschiedener Wirkmechanismen antidepressiver Effekte und den Blutfluss steigernder Effekte ergibt und die schützende Wirkungen auf neuronale Zellen potenziert, die beiden Komponenten gemeinsam sind. Somit besteht der Zweck der vorliegenden Erfindung darin, pharmazeutische Zusammensetzungen bereitzustellen, von denen anzunehmen ist, dass sie Wirkungen hinsichtlich der Verbesserung der Symptome der Parkinson'schen Erkrankung und der Demenz ausüben.

**[0007]** Die Erfindung betrifft pharmazeutische Zusammensetzungen, enthaltend Selegilin und Ginkgo-Biloba-Extrakt, die zur Behandlung der Symptome der Parkinson'schen Erkrankung und Demenz geeignet bzw. nützlich sind, in denen die Kombinationsverhältnisse von Selegilin und Ginkgo-Biloba-Extrakt im Bereich zwischen 1:15 und 1:30 in Gewicht liegen, vorzugsweise enthaltend 2-5 mg Selegilin und 30-150 mg Ginkgo-Biloba-Extrakt pro Dosisform.

### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

**[0008]** [Fig. 1](#) stellt die Wirkungen einer einfachen oder kombinierten, dreiwöchigen Verabreichung von Selegilin (2 mg/kg/Tag, p.o.) und Ginkgo-Biloba-Extrakt (48 mg/kg/Tag, p.o.) in einem Test der passiven Vermeidung dar, ausgeführt an Ratten, denen Scopolamin (6 mg/kg, s.c.) injiziert wurde.  
(\* p < 0,05, \*\* p < 0,01; signifikant unterschiedlich von der Kontrolle)

**[0009]** [Fig. 2](#) stellt die Wirkungen von einzelnen oder kombinierten, dreiwöchigen Verabreichungen von Selegilin (2 mg/kg/Tag, p.o.) und Ginkgo-Biloba-Extrakt (48 mg/kg/Tag, p.o.) auf die Anzahl der Besuchsfehler von Ratten dar, die nach dreiwöchiger Vorbehandlung mit dem oder den Wirkstoffen auf einen achtarmigen, radialen Irrgarten als Test gesetzt wurden.

**[0010]** [Fig. 3](#) stellt die Auswirkungen der einzelnen oder kombinierten, dreiwöchigen Verabreichung von Selegilin (2 mg/kg/Tag, p.o.) und Ginkgo-Biloba-Extrakt (48 mg/kg/Tag, p.o.) auf die Level von Dopamin und seinen Metaboliten im cerebralen Cortex ischämischer Ratten dar.  
(\* p < 0,05, \*\*\* p < 0,001; signifikanter Unterschied zur Kontrolle)

**[0011]** [Fig. 4](#) stellt einen Satz von Fotografien neuronaler Degenerationen, gezeigt durch die Cresyl-violett-Färbung des Hippocampus der Mongolischen Wüstenrennmaus (Mongolian gerbil), dar, reperfundiert nach induzierter Ischämie nach dreiwöchiger Vorbehandlung mit der oder den Wirkstoff(en), worin darstellen:

**[0012]** [Fig. 4a](#): pyramidale neuronale Zellen in der CA1-Fläche (Ammon's Horn) des Hippocampus der normalen Wüstenrennmaus, gezeigt in niedriger Vergrößerung ( $\times 40$ );

**[0013]** [Fig. 4b](#): pyramidale neuronale Zellen der CA1-Fläche (Ammon's Horn) des Hippocampus der normalen Wüstenrennmaus, gezeigt in höherer Vergrößerung ( $\times 200$ );

**[0014]** [Fig. 4c](#): pyramidale neuronale Zellen der CA1-Fläche (Ammon's Horn) des Hippocampus von Kontroll-Wüstenrennmäusen, reperfundiert für 7 Tage nach Ischämie, induziert durch Ligation der Carotisarterie, gezeigt bei niederer Vergrößerung ( $\times 40$ );

**[0015]** [Fig. 4d](#): pyramidale neuronale Zellen der CA1-Fläche (Ammon's Horn) des Hippocampus von Kontroll-Wüstenrennmäusen, reperfundiert für 7 Tage nach Ischämie, induziert durch Ligation der Carotisarterie, gezeigt bei höherer Vergrößerung ( $\times 200$ );

**[0016]** [Fig. 4e](#): pyramidalen neuronale Zellen der CA1-Fläche (Ammon's Horn) des Hippocampus von Wüstenrennmäusen, die eine einfache dreiwöchige Verabreichung von Selegilin erhielten, gezeigt in niederer Vergrößerung ( $\times 40$ );

**[0017]** [Fig. 4f](#): pyramidalen neuronale Zellen der CA1-Fläche (Ammon's Horn) des Hippocampus von Wüstenrennmäusen, die eine einfache dreiwöchige Verabreichung von Selegilin erhielten, gezeigt in höherer Vergrößerung ( $\times 200$ );

**[0018]** [Fig. 4g](#): pyramidale neuronale Zellen der CA1-Fläche (Ammon's Horn) des Hippocampus von Wüstenrennmäusen, unterworfen einer einfachen dreiwöchigen Verabreichung von Ginkgo-Biloba-Extrakt, gezeigt bei niederer Vergrößerung ( $\times 40$ );

**[0019]** [Fig. 4h](#): pyramidale neuronale Zellen der CA1-Fläche (Ammon's Horn) des Hippocampus von Wüstenrennmäusen, unterworfen einer einfachen dreiwöchigen Verabreichung von Ginkgo-Biloba-Extrakt, gezeigt bei höherer Vergrößerung ( $\times 200$ );

**[0020]** [Fig. 4i](#): pyramidale neuronale Zellen der CA1-Fläche (Ammon's Horn) des Hippocampus von Wüstenrennmäusen, unterworfen einer kombinierten, dreiwöchigen Verabreichung von Selegilin und Ginkgo-Biloba-Extrakt, gezeigt in niederer Vergrößerung ( $\times 40$ );

**[0021]** [Fig. 4j](#): pyramidale neuronale Zellen der CA1-Fläche (Ammon's Horn) des Hippocampus von Wüstenrennmäusen, unterworfen einer kombinierten, dreiwöchigen Verabreichung von Selegilin und Ginkgo-Biloba-Extrakt, gezeigt in höherer Vergrößerung ( $\times 200$ ).

#### Genaue Beschreibung der Erfindung

**[0022]** Pharmazeutische Zubereitungen der vorliegenden Erfindung, die Symptome der Parkinson'schen Erkrankung und der Demenz verbessern können, umfassen pharmazeutisch wirksame Dosen von Selegilin und Ginkgo-Biloba-Extrakt, und das Verhältnis der Kombination reicht von 1:15 bis 1:30 in Gewicht. Stärker bevorzugt sind Kombinationen von Selegilin zwischen 2,0 und 5,0 mg und Ginkgo-Biloba-Extrakt zwischen 30 und 150 mg pro Dosisform.

**[0023]** Die pharmazeutischen Zubereitungen der vorliegenden Erfindung enthalten zusätzlich zu den obigen Komponenten eine oder mehrere pharmazeutische Komponenten, ausgewählt aus einer Gruppe, bestehend aus Hilfsstoffen, Sprengmitteln, Bindemitteln und Gleitmitteln usw.. Bezüglich der pharmazeutischen Dosisformen sind filmbeschichtete Tabletten, Hartgelatinekapseln oder Granulate wünschenswert. Jede filmbeschichtete Tablette enthält 5 mg Selegilinhydrochlorid und 120 mg Ginkgo-Biloba-Extrakt und wird oral ein- oder zwei-

mal täglich in Abhängigkeit vom Schweregrad der Symptome verabreicht, und die Dosis sollte für einen Patienten insbesondere mit Nierenversagen angemessen reduziert werden.

**[0024]** Ausführungsformen der Erfindung werden in den folgenden Beispielen für die Praxis und den Experimenten veranschaulicht.

Beispiele

Formulierungsbeispiel 1

Filmbeschichtete Tablette

**[0025]** Herstellung: In Übereinstimmung mit üblichen, in der pharmazeutischen Herstellungstechnologie bekannten Verfahren werden gewogene Mengen sowohl der aktiven als auch der Hilfskomponenten der vorliegenden Erfindung, wie unten gezeigt, in einem Bandmischer gemischt und anschließend in einen Kompressionsgranulator zum Erhalt von Granulat gegeben.

**[0026]** Nach Trocknen bei 50 ° C werden die Granulate zu Tabletten unter Anwendung einer rotierenden Tabbettiermaschinen komprimiert, und die Tabletten werden gemäß herkömmlicher pharmazeutischer Methoden filmbeschichtet. Diese filmbeschichtete Tablette (420 mg) enthält 120 mg Ginkgo-Biloba-Extrakt und 5 mg Selegilinhydrochlorid pro Tablette.

## Zusammensetzung

Jede Tablette (420 mg) enthält:

aktive Bestandteile:	Ginkgo-Biloba-Extrakt (Mitteilung Nr. 96-2, Suppl. 6, Korea Food and Drug Administration Office) (ent- sprechend 28,8 mg als Ge- samt-Ginkgo-Flavonoid- glycoside)	120,000 mg
	Selegilinhydrochlorid	5000 mg
Hilfsstoffe:	Lactose (K.P.)	63,760 mg
	microkristalline Cellulose (NF)	95,125 mg
	Maisstärke (K.P.)	48,000 mg
	colloidales Silicat wasserfrei (NF)	40,500 mg
Sprengmittel:	Natrium-Croscarmellose (NF)	15,750 mg
Gleitmittel:	Magnesiumstearat (K.P.)	1,875 mg
Beschichtungsmittel:	Hydroxymethylcellulose 2910 (K.P.)	17,340 mg
	Polyethylenglycol 4000 (K.P.)	8,675 mg
	Talkum (K.P.)	1,080 mg
	Simethicon-Emulsion (USP)	0,015 mg
Sonnenschutzmittel:	Titanoxid (K.P.)	q.s.
Färbemittel:	Eisen(II)oxid (NF)	q.s.
Glanzmittel:	Carnaubawachs (K.P.)	q.s.

## Formulierungsbeispiel 2

## Hartgelatinekapsel

**[0027]** Herstellung: In Übereinstimmung mit üblichen, in der pharmazeutischen Herstellungstechnologie bekannten Verfahren werden gewogene Mengen sowohl der aktiven als auch der Hilfskomponenten der vorliegenden Erfindung, wie unten gezeigt, in einem Bandmischer gemischt und anschließend in einen Kompressi-

onsgranulator zum Erhalt von Granulat gegeben.

**[0028]** Nach Trocknen bei 50°C werden die Granulate in Kapseln der Größe Nr. 2 in einem Gewicht von 250 mg pro Kapsel eingefüllt. Diese Kapsel enthält 120 mg Ginkgo-Biloba-Extrakt und 5 mg Selegilinhydrochlorid pro Kapsel.

Zusammensetzung:

**[0029]** Jede Kapsel (250 mg) enthält:

aktive Bestandteile:	Ginkgo-Biloba-Extrakt (Mitteilung Nr. 96-2, Suppl. 6, Korea Food and Drug Administration Office) (ent- sprechend 28,8 mg als Ge- samt-Ginkgo-Flavonoid- glycoside)	120,000 mg
	Selegilinhydrochlorid	5000 mg
Hilfsstoffe:	Laktose (K.P.)	115,000 mg
Beschichtungsmittel:	Magnesiumstearat (K.P.)	10,000 mg
Kapsel:	gelb oben und hellgelb unten (K.P.)	q.s.

Formulierungsbeispiel 3

Granulate

**[0030]** Herstellung: In Übereinstimmung mit üblichen, in der pharmazeutischen Herstellungstechnologie bekannten Verfahren werden gewogene Mengen sowohl der aktiven als auch der Hilfskomponenten der vorliegenden Erfindung, wie unten gezeigt, in einem Bandmischer gemischt und anschließend in einen Kompressionsgranulator zum Erhalt von Granulat gegeben.

**[0031]** Nach Trocknen bei 50°C werden die Granulate in stiftähnliche Sackets in einem Gewicht von 1,000 mg pro Packung verteilt. Dieser Sacket enthält 120 mg Ginkgo-Biloba-Extrakt und 5 mg Selegilinhydrochlorid pro Packung.

Zusammensetzung:

**[0032]** Jede Packung (1,000 mg) an Sacket enthält:

aktive Bestandteile:	Ginkgo-Biloba-Extrakt (Mitteilung Nr. 96-2, Suppl. 6, Korea Food and Drug Administration Office) (ent- sprechend 28,8 mg als Ge- samt-Ginkgo-Flavonoid- glycoside)	120,000 mg
	Selegilinhydrochlorid	5000 mg
Hilfsstoff:	Laktose (K.P.)	350,000 mg
	Carboxymethylcellulose (K.P.)	8,50 mg
	Maisstärke (K.P.)	495,000 mg
	colloidales Silicat wasserfrei (NF)	20,500 mg
	Talkum (K.P.)	1,000 mg

## Experimentalbeispiele

## Experimentalbeispiel 1

**[0033]** Stabilitätstest (sechs Monate bei Raumtemperatur und bei 40°C, 75 % relative Feuchte, beschleunigter Kurzzeittest)

**[0034]** Für die in dem Formulierungsbeispiel 1 oben hergestellten Tabletten wurde ein Stabilitätstest durchgeführt und die Testergebnisse sind in den Tabellen 1, 2 und 3 gezeigt.

## Analytische Testmethoden

1. Aussehen: Betrachtung mit dem Auge auf sichtbare Defekte
2. Tests:

## 1. Selegilin (HPLC-Verfahren)

**[0035]** Man gebe mehr als 20 der Tabletten aus Formulierungsbeispiel 1 in einen Mörser, pulverisiere, wiege und nehme genau die Menge an Pulver, entsprechend 50 mg Selegilin, in einen 50 ml Messkolben. Man setze 40 ml des Lösungsmittels für die mobile Phase zu, extrahiere für 10 Minuten unter Ultraschallröhren und fülle auf die Markierung auf.

**[0036]** Nach Entnahme von 25 ml dieser Lösung in ein Zentrifugenröhrchen, zentrifugiere man für 10 Minuten bei 3500 rpm und transferiere dann genau 10 ml des Überstandes in einen 100 ml Messkolben, setze das Lösungsmittel der mobilen Phase bis auf die 100 ml-Markierung zu und nutze dieses als Testlösung.

**[0037]** Getrennt hiervon wiege und gebe man genau 50 mg eines Selegilin-Referenzstandards in einem 50 ml-Messkolben ein, löse durch Zusatz des Lösungsmittels der mobilen Phase bis zur Markierung, transferiere 10 ml dieser Lösung in einen 100 ml-Messkolben, setze Lösungsmittel der mobilen Phase bis zur Markierung zu und nutze dies als Standardlösung.

**[0038]** Für 20 µl jeweils der Test- und der Standardlösung führe man eine Flüssigchromatographie unter den

folgenden Bedingungen durch und bestimme die jeweiligen Flächen unter den Peaks AT und AS gemäß der gegebenen Formel.

$$\text{Selegilin (mg)} = 500 \frac{\text{C}}{\text{AT/AS}}$$

worin:

- C: Konzentration der Standardlösung (mg/ml)
- AT: Fläche unter dem Peak der Testlösung
- AS: Fläche unter dem Peak der Standardlösung

#### Betriebsbedingungen der HPLC

Detektor:	UV-Absorptionsspektrometer (Wellenlänge 205 nm)
Säule:	C8-Säule mit innerem Durchmesser von 3,9 mm und Länge 30 cm
mobile Phase:	eine 80:20-Mischung von 0,1 M Ammoniumphosphat (pH 3,1): Acetonitril
Fließgeschwindigkeit:	1,0 ml/min

#### 2. Test auf Ginkgo-Flavonglycoside (HPLC-Verfahren)

**[0039]** Man gebe mehr als 20 der Tabletten aus Formulierungsbeispiel 1 in einen Mörser, pulverisiere, wiege und gebe genau die Menge an Pulver, entsprechend 150 mg Ginkgo-Biloba-Extrakt, in einen 50 ml-Messkolben. Man setze 30 ml Methanol zu, extrahiere für zehn Minuten unter Ultraschallröhren und fülle auf die Markierung auf.

**[0040]** Nach Entnahme von 25 ml dieser Lösung in ein Zentrifugationsröhrchen zentrifugiere man für 10 Minuten bei 3500 rpm und transferiere genau 10 ml des Überstands in ein 30 ml-Teströhrchen. Nach Zusatz von 10 ml 1,5 N Salzsäure mische man gut, verschließe das Teströhrchen dicht und gebe und halte es in einem Wasserbad von 90-100°C Temperatur für 25 Minuten, um die Hydrolyse abzuschließen. Anschließend kühle man schnell, filtriere die Lösung und nutze das Filtrat als Testlösung.

**[0041]** Getrennt hiervon wiege man genau je 5,0 mg der jeweiligen Referenzstandards von Quercetin, Kampferol und Isorhamnetin ein und gebe diese einzeln in 50 ml-Kolben, löse durch Zusatz von Methanol auf die 50 ml Markierungslinie und nutze diese als jeweilige Standardlösungen.

**[0042]** Man führe Flüssigchromatographien für 20 µl jeder sowohl der Standard- als auch der Testlösungen gemäß den unten angegebenen Betriebsbedingungen durch, messe die jeweiligen Flächen unter den Peaks und bestimme die Gehalte jeder Komponente mit der unten angegebenen Formel.

**[0043]** Gesamt-Ginkgo-Flavonoidglycoside (mg) = Quercetinglycosid (mg) + Kampferolglycosid (mg) + Isorhamnetinglycosid (mg)

#### Betriebsbedingungen für die HPLC

Detektor:	UV-Absorptionsspektrometer (Wellenlänge 365 nm)
Säule:	Nova pak C18-Säule
mobile Phase:	Wasser: Methanol: Eisessig = 60:40:3
Fließgeschwindigkeit:	1,0 ml/min

#### Ergebnisse aus Experiment 1

**[0044]** Wie in Tabelle 1, Tabelle 2 und Tabelle 3 unten gezeigt, wurden drei Chargen des Formulierungsbeispiels 1 hergestellt, eng gepresst in Ampullen gefüllt und für 6 Monate bei Raumtemperatur oder bei 45°C mit 75 % relativer Feuchte gelagert und anschließend den analytischen Tests unterworfen.

**[0045]** Man beobachtete keine signifikanten Änderungen hinsichtlich des Aussehens, Gehalts oder der Ei-

genschaften, und das Produkt war stabil. So wurde angenommen, dass das Produkt für ein Verfallsdatum von 24 Monaten gut wäre.

Tabelle 1

Lagerung	getestet	Standard	anfänglich	Monat 2	Monat 4	Monat 6
Raum-temperatur	Aussehen	gelbe, rechteckige, filmbeschichtete Tablette	Ja	Ja	Ja	Ja
	Feuchtigkeit	< 5 %	3,11	3,29	3,44	3,43
	Zerfall	< 30 min	11-13	11-13	11-13	11-13
	Selegilin	5 mg	5,2	5,3	5,2	5,3
	Ginkgo-Flavon-glycosid	28,8 mg	30,8	30,3	31,6	30,5
	Terpen-lacton	7,2 mg	7,7	7,7	7,8	7,7
40°C 75 % RF	Aussehen	gelbe, rechteckige, filmbeschichtete Tablette	Ja	Ja	Ja	Ja
	Feuchtigkeit	< 5 %	3,11	3,64	3,64	3,73
	Zerfall	< 30 min	11-13	12-14	11-14	12-14
	Selegilin	5 mg	5,2	5,2	5,3	5,2
	Ginkgo-Flavon-Glycosid	28,8 mg	30,8	31,6	30,3	30,9
	Terpen-lacton	7,2 mg	7,7	7,8	7,7	7,6

Tabelle 2

Lagerung	getestet	Standard	anfänglich	Monat 2	Monat 4	Monat 6
Raum-temperatur	Aussehen	gelbe, rechtecke- ge, filmbe- schichtete Tablette	Ja	Ja	Ja	Ja
	Feuchtig- keit	< 5 %	3,19	3,17	3,36	3,69
	Zerfall	< 30 min	11-13	11-13	11-13	11-12
	Selegilin	5 mg	5,2	5,3	5,2	5,3
	Ginkgo- Flavon- glycosid	28,8 mg	31,6	31,3	32,2	31,5
	Terpen- lacton	7,2 mg	7,4	7,3	7,2	7,3
40°C 75 % RF	Aussehen	gelbe, rechtecke- ge, filmbe- schichtete Tablette	Ja	Ja	Ja	Ja
	Feuchtig- keit	< 5 %	3,19	3,64	3,64	3,73
	Zerfall	< 30 min	11-13	12-15	11-14	11-16
	Selegilin	5 mg	5,2	5,3	5,3	5,2
	Ginkgo- Flavon- Glycosid	28,8 mg	31,6	31,9	30,8	31,3
	Terpen- lacton	7,2 mg	7,4	7,3	7,5	7,4

Tabelle 3

Lagerung	getestet	Standard	anfänglich	Monat 2	Monat 4	Monat 6
Raum-temperatur	Aussehen	gelbe, rechteckige, filmbeschichtete Tablette	Ja	Ja	Ja	Ja
	Feuchtigkeit	< 5 %	3,07	3,16	3,14	3,13
	Zerfall	< 30 min	11-16	11-15	11-13	11-15
	Selegilin	5 mg	5,3	5,3	5,2	5,2
	Ginkgo-Flavon-glycosid	28,8 mg	32,0	30,3	31,6	30,5
	Terpen-lacton	7,2 mg	7,6	7,9	7,9	7,7
40°C 75 % RF	Aussehen	gelbe, rechteckige, filmbeschichtete Tablette	Ja	Ja	Ja	Ja
	Feuchtigkeit	< 5 %	3,07	3,64	3,64	3,73
	Zerfall	< 30 min	11-16	12-14	11-14	12-17
	Selegilin	5 mg	5,3	5,2	5,3	5,1
	Ginkgo-Flavon-Glycosid	28,8 mg	32,0	31,6	30,3	30,9
	Terpen-lacton	7,2 mg	7,6	7,6	7,5	7,5

## Experimentalbeispiel 2

**[0046]** Experiment bezüglich der Wirkungen der vereinigten Verabreichung von Selegilin und Ginkgo-Biloba-Extrakt auf die Verbesserung der Symptome der Demenz

## 1. Vorwort

**[0047]** Als Teil eines Plans zur Entwicklung der Kombinationsformel aus 5 mg Selegilin und 120 mg Ginkgo-Biloba-Extrakt (1:24), basierend auf der jeweiligen klinischen Dosis der Praxis, als Wirkstoff für die senile Demenz haben wir präklinische Bewertungen hinsichtlich der Wirkungen der Kombinationsformel im Vergleich mit den jeweiligen einzelnen Wirkstoffen durchgeführt.

**[0048]** Pharmakologische Verhaltensbewertungen erfolgten für die Verbesserung hinsichtlich des Gedächtnisses und der Lernfunktionen in Ratten mit durch Scopolamin induziertem Erinnerungsverlust. Da bekannt ist, dass die hauptsächliche Pathologie der senilen Demenz eng mit der Alzheimer'schen Erkrankung in Beziehung steht, die durch denaturierte Proteine in den neuronalen Zellen verursacht wird, und auch mit den neuronalen Schäden, die durch Ischämie verursacht werden, wurden gleichzeitig Untersuchungen bezüglich biochemischer Änderungen im Cerebellum und histopathologische Untersuchungen des Hippocampus, einer mit der Gedächtnisfunktion in Verbindung stehenden Stelle, an ischämischen Ratten durchgeführt.

## 2. Experimentelle Methoden

## (1) Tiere und Materialien

**[0049]** Männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Körpergewicht von 200-300 g und männliche Wüstenrennmäuse wurden verwendet. Nahrung stand frei zur Verfügung und die Wirkstoffe wurden gelöst in der Wasserversorgung verabreicht. Umgebungskontrollen wurden bei einer Temperatur von  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  und einer relativen Feuchte von  $55 \pm 5\%$  gehalten, wobei Dunkel/Licht in 12 Stunden-Intervallen alternierten.

**[0050]** Die Tiere wurden in vier Gruppen eingeteilt, nämlich eine normale Gruppe, eine Selegilin-Gruppe mit einer Dosis von 2 mg/kg/Tag, eine Ginkgo-Biloba-Extrakt-Gruppe in einer Dosis von 48 mg/kg/Tag und eine Gruppe, die eine Kombinationsformel von Selegilin 2 mg/kg/Tag und Ginkgo-Biloba-Extrakt von 48 mg/kg/Tag einnahm; die Wirkstoffe wurden oral für drei Wochen verabreicht.

**[0051]** Selegilin (Charge Nr. 9706005) wurde von Sanofi S.A., Frankreich, bereitgestellt und Ginkgo-Biloba-Extrakt (Charge Nr. 708601-1) von Yuyu Industrial Co., Ltd..

## (2) Methoden

## 1. Pharmakologisches Verhaltensexperiment

**[0052]** Um die Auswirkungen auf Gedächtnis- und Lernfunktionen zu bewerten, wurden die Ratten jeder Gruppe mit einer Scopolamininjektion getestet, einem Wirkstoff, der den Gedächtnisverlust verursacht, und anschließend dem folgenden Test unterzogen.

## (i) Test auf passive Vermeidungsantwort

**[0053]** Ratten jeder Gruppe wurden zuvor einem Adaptionstraining und anschließenden Übungen in einer Pendelbox vom Durchtrittstyp unterworfen. Im echten Experiment wurde Scopolamin in einer Dosis von 6 mg/kg intraperitoneal verabreicht und nach 30 Minuten Antworten des passiven Vermeidens ermittelt. Eine längere Latenz hinsichtlich der Antwortszeit zeigte verbesserte Gedächtnis- und Lernfunktionen an.

## (ii) Irrgartentest

**[0054]** Gemäß dem Verfahren von Olton und Samuelson (J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Proc. 2, 97 (1976)) wurde ein achtarmiges radiales Irrgartentestsystem verwendet. Dementsprechend wurden die Ratten jeder Gruppe in die Mitte des achtarmigen Irrgartensystems mit 65 cm Armen gesetzt, die sich radial erstrecken, und 45 mg pelletisiertes Futter wurden am Ende jedes Arms angeordnet. Die Ratten wurden darauf trainiert, die Armenden zu besuchen, um an das pelletisierte Futter zu gelangen. Im realen Experiment wurden die Ratten mit intraperitonealer Scopolamininjektion in einer Dosis von 6 mg/kg als Belastung vorbehandelt und dem Test 30 Minuten nach Injektion unterworfen.

**[0055]** Der Test erfolgte für 10 Minuten und die Anzahl der nicht besuchten Arme und die Anzahl der Arme, die wiederholt besucht wurden, wurde kollektiv als Besuchsfehler gezählt und aufgezeichnet. Der Test wurde 50 mal wiederholt. Kleinere Besuchsfehler zeigten gewonnene Verbesserung hinsichtlich der Gedächtnis- und Lernfunktionen an.

## 2. Änderungen hinsichtlich des Dopamin- und Energiemetabolismus bei Partialischämie

**[0056]** Ratten jeder Gruppe wurden unter Urethanästhesie operiert, um eine Ligation der Carotisarterie für 15 Minuten durchzuführen, um eine partielle Ischämie des Cerebellums zu induzieren. Anschließend wurde das Cerebellum sofort ausgeschnitten und unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff gelagert.

## (i) Messung der Konzentration von Dopamin und seiner Metabolite

**[0057]** Zu 0,1 g des aus dem Cerebellum entnommenen Cerebralcortex gab man 0,1 ml Ascorbatoxidase in einer Konzentration von 1,0 mg/ml und 1,9 ml einer Mischung von 0,1 M Essigsäure und 1,0 mM Glutathion hinzu und homogenisierte. Anschließend wurden 100 µl Aliquots des Homogenats als Probe in zwei Eppendorff-Hütchen transferiert und die Proteinkonzentration in einem Hütchen gemessen.

**[0058]** In das verbleibende Hütchen gab man 2,0 ml (oder ein Volumen proportional zur Menge an Probe) 0,1 M Perchlorsäure und 2 ng/50 ml DHBA (3,4-Dihydroxybenzylamin) und homogenisierte. Anschließend wurde die Lösung für 20 Minuten bei 11.000 rpm zentrifugiert, der Überstand genommen und durch einen 0,2 µm Membranfilter (MFS-13 CA-Membran) filtriert und 15 µl des Filtrats in ein HPLC-System injiziert.

**[0059]** Das verwendete HPLC-System war von Waters & Co., USA, und als elektrochemischer Detektor wurden eine Ag/AgCl-Referenzelektrode und eine einzelne Arbeitselektrode aus Glaskohlenstoff genutzt. Der elektrische Strom (1. Bereich) wurde auf 10 nA gesetzt, die Teilzeitkonstante auf 1,0 Sekunden und E (Spannung) auf + 0,75 Volt.

**[0060]** Für die Herstellung der Lösung der mobilen Phase wurden 29,2 mg Di-NatriumEDTA, 21,9 g Natriumphosphat und 368 mg Oktansulfonsäure in einem Liter destillierten Wassers gelöst und der pH-Wert auf 3,5 eingestellt. Anschließend wurden 900 ml dieser Lösung mit 100 ml Methanol gemischt und durch eine 0,2 µm Membranfilter filtriert. Die Lösung wurde anschließend zur Entfernung von Luftblasen mit Ultraschall behandelt und verwendet.

**[0061]** Als Säule wurde eine µ-Novapack C18-Umkehrphasensäule verwendet, und die Strömungsgeschwindigkeit wurde auf 0,6 ml/Minute festgelegt. Ein Test auf jede Komponente erfolgte durch den Vergleich von Flächen unter den Peaks für Standards und Testproben. Hinsichtlich der Standards wurden DOPA (3,4-Dihydroxyphenylessigsäure), DA (Dopamine) und HVA (Homovanillinsäure) in einer Lösung von 0,1 M Perchlorsäure und 0,05 mM Glutathion auf eine Konzentration von 20 ng/ml gelöst und 15 µl jeweils injiziert.

#### (ii) Messung von Engeriemetaboliten im cerebralen Cortex

**[0062]** Das erhaltene Cerebellum wurde eingeschnitten und mit einer gemischten Lösung von 0,3 HClO<sub>4</sub> und 0,25 mM EDTA in einer Menge vom 4-fachen des Gewebege wichts versehen, bei Raumtemperatur für 10 Minuten stillgehalten, homogenisiert und wiederum für 15 Minuten stillgehalten und anschließend mit 2,5 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> neutralisiert. Nach Zentrifugation für 20 Minuten bei 1000 g wurde dieses durch einen 0,45 µm Filter filtriert und als Probe genutzt.

**[0063]** Unter Anwendung von Reagenzkits wurden die Konzentrationen von Glukose, Pyruvat, Laktat und ATP mit einem Spektralphotometer bestimmt.

### 3. Antioxidierende Wirkungen in der partiellen Ischämie und Reperfusion

**[0064]** Ratten jeder Gruppe wurden durch Injektion von Natriumpentobarbital (30 mg/kg, i.p.) und Ketamin (5 mg/kg, s.c.) betäubt und operiert, um die ganze Karotisarterie zu exponieren. Anschließend wurde die Karotisarterie ligiert, um die Ischämie für 30 Minuten zu injizieren, wodurch der Blutstrom durch das Hirn blockiert wurde, gefolgt von einer anschließenden Reperfusion für 3 Stunden; danach wurde der cerebrale Cortex ausgeschnitten und die antioxidativen Wirkungen gemessen.

#### (i) Messung von Malondialdehyd

**[0065]** Nach Zusatz von 1,5 M Kaliumchlorid-Lösung zu dem ausgeschnittenen Cerebral cortex in einem Volumenverhältnis von 9 ml pro Gramm Gewebe wurde das Gewebe homogenisiert und zentrifugiert (3000 rpm, 15 Minuten, 4°C).

**[0066]** Anschließend wurden 1,0 ml des Überstandes in ein Teströhrchen transfiziert, enthaltend 2,0 ml TBA (Thiobarbitursäure) als Reagenz, mit einem Wirbelmischer geschüttelt, in einem Thermostat bei 100 °C für 15 Minuten gekocht, nachdem ein Glasball auf die Öffnung des Pyrex-Teströhrchens gegeben worden war.

**[0067]** Nach 15 Minuten wurden die Inhalte sofort durch Anwenden von fließendem Wasser oder Eintauchen in Eiswasser gekühlt und zentrifugiert (3000 rpm, 15 Minuten, 4 °C). Der Überstand wurde auf Absorption bei 535 nm getestet unter Anwendung eines TBA-Reagenzes (Thiobarbitursäure-Reagenzes) als Kontrolle (Gerontology, 43, 218 (1987)).

#### (ii) Messen der SOD-Aktivität (SOD = Superoxiddismutase)

**[0068]** Nach Zusatz von 1,5 M Kaliumchloridlösung zum ausgeschnittenen Cerebral cortex in einem Volumenverhältnis von 9 ml pro Gramm wurde das Gewebe homogenisiert und zentrifugiert (3000 rpm, 15 Minuten, 4

°C). Der Überstand wurde als Probe verwendet.

**[0069]** Zuvor wurde ein Teströhrchen, enthaltend 2,3 ml Phosphatpuffer (pH 7,8), 300 µl, 0,5 mM Na-Xanthin, 100 µl 50 µM K-Cyanid und 100 µl 2,4 mM Na-Desoxycholat, vorbereitet und in einem Wasserbad auf 25 °C gehalten. Zu diesem Teströhrchen gab man 300 µl 0,1 mM Ferricytochrom und Probe hinz.

**[0070]** Anschließend wurde die Lösung in eine Zelle transferiert, 100 µl Xanthinoxidase zugesetzt, ein Abdichtungsband auf der Zelle angeordnet und die Zelle, während man diese mit dem Fingern verschloss, sorgfältig zum Mischen geschüttelt. Absorptionsänderungen wurden gemessen und für eine Minute bei der Wellenlänge von 550 nm aufgezeichnet.

(iii) Messung der Glutathionperoxidaseaktivität (GSH)

**[0071]** Nach Zusatz einer 1,5 M Kaliumchloridlösung zum ausgeschnittenen Cerebralcortex in einem Volumenverhältnis von 9 ml pro Gramm Gewebe wurde das Gewebe homogenisiert und zentrifugiert (3000 rpm, 15 Minuten, 4°C). Der Überstand wurde als Probe genutzt. Zu einem Teströhrchen, enthaltend 1,0 ml Phosphatpuffer (pH 7,0), 0,2 ml 0,01 M NaN<sub>3</sub>, 0,2 ml 0,01 M GSH (Glutathione), 0,2 ml 1,5 mM NADPH (Nikotinamidadenindinukleotidphosphat) und 0,2 ml 0,5 % Glutathionreduktase, wurden 0,2 ml Probe und 1,0 ml destilliertes Wasser auf ein Endvolumen von 3,0 ml zugesetzt.

**[0072]** Nach gutem Mischen mit Verwirbeln ließ man das Teströhrchen 5 Minuten bei 25 °C stehen und gab anschließend 0,1 ml 5,0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zum Starten der Reaktion zu. Die anfängliche Absorption wurde bei 340 nm genommen und dann nach und nach Absorptionen jede Minute dreimal gemessen und Berechnungen gemäß der folgenden Formel angestellt:

$$\Delta C(\text{nmol/min}) = (\Delta OD/\epsilon) \times 10^3$$

worin:

- C: Enzymaktivität, ausgedrückt in Einheiten. Eine Einheit entspricht der Menge an Enzym, die ein nmol NADPH pro Minute verbrauchen kann.
- OD: Optische Dichte
- ε: Molare Absorptionskonstante:  $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

#### 4. Histopathologische Untersuchung des Hippocampus nach vollständiger Ischämie und Reperfusion

**[0073]** Wüstenrennmäuse sowohl aus der Kontroll- als auch der Testgruppe wurden durch Injektion mit Natrumpentobarbital in einer Dosis von 50 mg/kg betäubt und die Karotisarterien an beiden Seiten für 5 Minuten geschlossen, um eine vollständige Ischämie zu induzieren 7 Tage nach Beginn der Reperfusion wurden die Gewebe mit Hilfe der Cresyl-Violet-Färbung untersucht.

**[0074]** Die Gewebsuntersuchung mittels Cresyl-Violet-Färbung, wie oben erwähnt, wurde wie folgt durchgeführt. Das ausgeschnittene Cerebellum wurde unter Verwendung eines Gleitmikrotoms in Scheiben geschnitten, und die Schnitte würden nacheinander mit Xylol und Alkohol für 5 Minuten behandelt und schließlich für weitere 5 Minuten in destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurde der Schnitt mit Cresyl-Violet gefärbt, das zuvor hergestellt worden war.

**[0075]** Nach dem Färben wurde der Schnitt einmal für 30 Minuten unter fließendem Wasser gewaschen, gefolgt von der Entwässerung in Alkohol und zwei folgenden Waschungen mit Xylol für 10 Minuten. Anschließend wurde ein Deckglas aufgelegt und die Probe unter einem optischen Mikroskop untersucht.

\* Statistische Behandlung

**[0076]** Die Testergebnisse wurde in Form eines Mittelwertes ± Standardabweichungen (S.E.) dargestellt und die statistische Signifikanz mit Hilfe des Student t-Test bewertet.

## 3. Ergebnisse und Diskussion

## (I) Wirkungen hinsichtlich der Verhaltenspharmakologie

## (1) Test of passive Vermeidungsantwort

**[0077]** In einem Durchtrittstest auf passive Vermeidung wurden Ratten sowohl der normalen als auch der Testgruppe, behandelt mit Wirkstoffen für 3 Wochen, in Pendelboxen gesetzt und hinsichtlich der Latenzzeit getestet, die zum vermeiden der Antwort erforderlich ist, nachdem sie eine Scopolamininjektion zum Induzieren des Erinnerungsverlustes erhalten hatten; die Ergebnisse sind in [Fig. 1](#) gezeigt.

**[0078]** Im Gegensatz zur normalen Gruppe wurde ein signifikanter Anstieg der Ansprechzeit ( $p < 0,05$ ) in der Selegilingruppe beobachtet, der ein einziger Wirkstoff gegeben worden war, und ein noch signifikanterer Anstieg ( $p < 0,01$ ) war mit der Gruppe zu sehen, die sowohl Selegilin als auch Ginko-Biloba-Extrakt in Kombination erhalten hatte.

**[0079]** Solche Anstiege der Vermeidungsansprechzeit legen erhöhte Gedächtnisfähigkeiten und Lernfunktionen nahe. Im Fall der Gruppe, die nur Ginko-Biloba-Extrakt erhalten hatte, wurde kein signifikanter Anstieg der Responsezeit beobachtet. Wenn jedoch Selegilin in Kombination mit dem Extrakt gegeben wurde, führte dies tendenziell zu einer stärkeren Erhöhung der Responsezeit als derjenigen, die mit Selegilin alleine erhalten wurde. Dieses Ergebnis ist in guter Übereinstimmung mit dem früheren Bericht, der feststellte, dass ein merklicher Anstieg der Gedächtnisfunktion das Ergebnis des erhöhten Dopaminlevels war, der durch Inhibition der Monoaminoxidase B durch Selegilin induziert wird [Psychopharmacology 91, 489 (1987); The neurosciences second study program, 324 (1970)].

## (2) Irrgarten Test

**[0080]** Um einen Erinnerungsverlust zu induzieren, wurde Scopolamin in Ratten sowohl der normalen als auch der Testgruppen injiziert, die Wirkstoffbehandlung für 3 Wochen erhielten; anschließend wurden die Ratten in die Mitte eines achtarmigen Irrgartentestsystems gesetzt, um die Anzahl der Besuchsfehler in den jeweiligen Armen aufzuzeichnen. Die Ergebnisse sind in [Fig. 2](#) gezeigt.

**[0081]** Im Vergleich zur normalen Gruppe gab es einen sichtlichen Anstieg der Besuchsfehler bei Ratten der Kontrollgruppe, die mit Scopolamin behandelt worden war.

**[0082]** In beiden Gruppen, Selegilin alleine und Ginko-Biloba-Extrakt alleine, neigten die Besuchsfehler zu einer Abnahme in vergleichbaren Ausmaß, wenn sie mit der Kontrollgruppe verglichen wurden. Im Falle der Gruppe, der Selegilin und Ginko-Biloba-Extrakt in Kombination gegebenen worden war, wurden die Besuchsfehler sehr viel kleiner als diejenigen, die in den Gruppen, die mit der jeweiligen einzelnen Droge behandelt worden waren, und mit voranschreiten des Experiments wurde die Lernfähigkeit graduell verbessert und ein Testergebnis vergleichbar demjenigen mit der normalen Gruppe erhalten.

**[0083]** Dieses Ergebnis ist dem früheren Bericht von Blavet et al. sehr ähnlich, die über eine Verbesserung der Lernfunktion im Irrgartentest bei Ratten, behandelt mit Ginko-Biloba-Extrakt in einer Dosis von 30 mg/kg/Tag, berichten [Effect of Ginko biloba extract (Ebg 761) on the Central Nervous System, Y. Christien eds Elservier (Paris) 119 (1992)].

## (2) Änderungen des Dopamin- und Energiemetabolismus bei partieller Ischämie

## 1. Messung von Dopamin und seinen Metaboliten

**[0084]** Die partielle Ischämie wurde in Ratten sowohl der normalen als auch der Behandlungsgruppen induziert, um Hirnschäden zu verursachen, die mit der Demenz in Beziehung stehen sollen. Die Konzentrationen von Dopamin und seinen Metaboliten im Cerebralcortex wurden gemessen und die Ergebnisse sind in [Fig. 3](#) gezeigt.

**[0085]** Sowohl in der nur Seligilingruppe als auch in der Selegilin/Ginko-Biloba-Extrakt-Kombinationsgruppe beobachtete man signifikante Steigerungen des Gehalts an Dopamin ( $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,001$ ), die Gehalte an HVA (Homovanillinsäure) nahmen jedoch signifikant ab. Diese Ergebnisse sind dem unterdrückten Abbau des Dopamins zuzuschreiben, der durch die selektive Inhibition der MAO<sub>B</sub> durch Selegilin induziert wird.

**[0086]** Andererseits gab es keine signifikanten Änderungen bei der nur Ginko-Biloba-Extraktgruppe [Biogenic Amins., (1887)]; Wenn dieses jedoch in Kombination mit Selegilin gegeben wurde, schien es, dass das erstere die Steigerung des Dopamins durch das letztere weiter potenzierte.

## 2. Messung des Energiemetabolismus im Cerebralcortex

**[0087]** In der Ischämie ist die Glykolyse unter Sauerstoffmangel simuliert, und somit nimmt der ATP-Level bekanntermaßen ab, während derjenige an Laktaten erhöht ist. Nach Induktion der Ischämie im Hirn von Ratten sowohl der normalen als auch der Testgruppe wurden die Konzentrationen von ATP, Laktaten, Pyruvaten und Glukose gemessen; die Ergebnisse sind in Tabelle 4 gezeigt.

**[0088]** Im Vergleich zur normale Gruppe zeigten Ratten der Testgruppen mit induzierter Ischämie eine signifikante Abnahme des ATP-Levels, während ein signifikanter Anstieg des Laktat-Levels im cerebralen Cortex der Ratte beobachtet wurde.

**[0089]** Obwohl hinsichtlich dieser Parameter in der nur Selegilin erhaltenden Gruppe keine signifikanten Änderungen zu sehen waren, wurde eine signifikante Supression des Laktatanstiegs in der nur Ginkgo-Biloba-Extrakt erhaltenden Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet ( $p < 0.05$ ).

**[0090]** Darüber hinaus war im Falle der Selegilin/Ginkgo-Biloba-Extrakt Kombinationsgruppe ein signifikanter Anstieg des ATP-Levels ( $p < 0.05$ ) zusammen mit einer sehr signifikanten Abnahme der Laktat-Level ( $p < 0.001$ ) zu beobachten.

**[0091]** Diese Ergebnisse legen die Möglichkeit nahe, dass der Ginkgo-Biloba-Extrakt eine Störung des Energiemetabolismus aufgrund der Ischämie verbessert hat, und zwar durch seine den Blutstrom steigernde Wirkung. Darüber hinaus berichten Karcher et al. über eine Steigerung des ATP-Levels im Cerebellum nach Verabreichung von Ginkgo-Biloba-Extrakt [Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol., 327, 31 (1984)]; sie berichten auch über Änderungen des Energiemetabolismus im Hirn, das Glukose und Desoxyglukose aufnimmt. Aus diesen Ergebnissen wurde postuliert, dass der Wirkstoff sich vorteilhaft hinsichtlich der Unterdrückung von Schäden des Hirns und hinsichtlich der Verbesserung von Gedächtnis- und Lernfunktionen auswirken kann.

Tabelle 4

Auswirkungen einer 3-wöchigen Behandlung mit nur Selegilin, nur Ginkgo-Biloba-Extrakt und Selegilin-Ginkgo-Biloba-Extrakt in Kombination auf den Energiemetabolismus im cerebralen Cortex ischämischer Ratten.

Wirkstoff	ATP ( $\mu\text{mol/g Feuchtgewicht}$ )	Laktat ( $\mu\text{mol/g Feuchtgewicht}$ )	Pyruvate ( $\mu\text{mol/g Feuchtgewicht}$ )	Glukose ( $\mu\text{mol/g Feuchtgewicht}$ )
Normal	$2,30 \pm 0,04$	$1,39 \pm 0,12$	$0,08 \pm 0,00$	$1,61 \pm 0,11$
Kontrolle	$0,86 \pm 0,23^{***}$	$11,7 \pm 0,84^{***}$	$0,09 \pm 0,005$	$1,01 \pm 0,34$
Selegilin	$1,12 \pm 0,04$	$5,42 \pm 0,15$	$0,10 \pm 0,011$	$1,21 \pm 0,02$
Ginkgo Ext.	$1,45 \pm 0,12$	$3,21 \pm 0,11^{**}$	$0,10 \pm 0,005$	$1,22 \pm 0,15$
Selegiline + Ginkgo Ext.	$2,15 \pm 0,15^*$	$1,29 \pm 0,01^{***}$	$0,11 \pm 0,009$	$1,51 \pm 0,07$

**[0092]** Jeder Wert stellt einen Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 6$ ) dar.

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ; Signifikante Unterschiede zur Kontrolle;

\*\*\*  $p < 0.001$ ; Signifikanter Unterschied zum Normalwert

## 3. Antioxidative Wirkungen in der Partialischämie und anschließenden Reperfusion

**[0093]** Es ist bekannt, dass es dann, wenn das Hirn nach induzierter Ischämie reperfundiert wird, zu Schäden

an den neuronalen Zellen des Hirns kommt. Andererseits wird von sowohl Selegilin als auch von Ginkgo-Biloba-Extrakt berichtet, dass diese antioxidative Wirkungen haben. Bei Ratten sowohl in den normalen als auch in Testgruppen, behandelt mit Wirkstoffen für 3 Wochen, wurde das Hirn nach induzierter Partialischämie für einige Zeit reperfundierte und der Gehalt an MDA (Malondialdehyd) gemessen wie auch die Enzymaktivitäten der SOD (Superoxiddismutase) und der Glutathionperoxidase bestimmt. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 5 gezeigt.

**[0094]** Im Vergleich zur Normalgruppe war ein signifikanter Anstieg des MDA-Levels (Malondialdehyd-Levels), bei dem es sich um einen Indikator für die Lipidhyperoxidation handelt, in Ratten der Kontrollgruppe zu sehen, in denen eine Partialischämie induziert worden war, gefolgt von der Reperfusion.

**[0095]** Sowohl in der nur Seleginin als auch in der nur Ginkgo-Biloba-Gruppe wurden keine signifikanten Änderungen beobachtet. In Gegensatz hierzu wurde jedoch im Falle der Kombinationsgruppe von Selegilin/Ginkgo-Biloba-Extrakt eine tendenzielle Abnahme des MDA-Levels (Malondialdehyd-Levels) beobachtet und waren signifikante Steigerungen ( $p < 0,05$ ) der Aktivitäten der SOD (Superoxiddismutase), die Superoxidanionen entfernt, und der Glutathion (GSH) Peroxidase, die Wasserstoffperoxid entfernt, zu sehen.

**[0096]** Diese Ergebnisse legen nahe, dass die antioxidative Wirkungen in der vereinigten Verabreichung von Selegilin und Ginkgo-Biloba-Extrakt stärker potenziert sind, als bei der einzelnen Verabreichung jedes Wirkstoffes.

Tabelle 5

Wirkungen der 3-wöchigen Behandlungen mit nur Selegilin, nur Ginkgo-Biloba-Extrakt und Selegilin/Ginkgo-Biloba-Extrakt in Kombination auf den MDA-Level und die Aktivitäten der SOD und der Glutathionperoxidase.

Wirkstoff-behandlung	MDA (nmol/mg Protein)	SOD-Aktivität (Einheiten/mg Protein)	GSH Peroxidase (Einheiten/mg Protein)
Normal	0,90 ± 0,14	0,45 ± 0,05	2,42 ± 0,21
Kontrolle	1,86 ± 0,23**	0,41 ± 0,04	1,98 ± 0,14
Selegilin	1,80 ± 0,22	0,42 ± 0,04	2,04 ± 0,22
Ginkgo Ext.	1,69 ± 0,08	0,40 ± 0,03	2,28 ± 0,25
Selegilin + Ginkgo Ext.	1,50 ± 0,23	0,65 ± 0,07*	3,34 ± 0,37*

**[0097]** Jeder Wert stellt einen Mittelwert ± Standardabweichungen dar (n = 6)

\*  $p < 0,05$ ; Signifikanter Unterschied zur Kontrolle

\*\*  $p < 0,01$ ; Signifikanter Unterschied zum Normalwert

#### 4. Histopathologische Untersuchung des Hippocampus bei vollständiger Ischämie und anschließender Reperfusion

**[0098]** Bei der vollständigen Ischämie und anschließenden Reperfusion werden anfänglich biochemische Änderungen auftreten, einige morphologische Änderungen können jedoch nach wenigen Tagen erscheinen. Nach Induktion einer vollständigen Ischämie im Hirn und Durchführung der anschließenden Reperfusion für 7 Tage an Wüstenrennmäusen, behandelt mit Wirkstoffen über 3 Wochen, erfolgte eine mikroskopische, histopathologische Untersuchung des Hippocampus unter Cresyl-Violet-Färbung; die Ergebnisse sind in den [Fig. 4a](#) bis [Fig. 4j](#) gezeigt.

**[0099]** [Fig. 4a](#) zeigt eine Ansicht der Pyramidalzellen an der CA 1-Stelle (Ammon's Horn) des Hippocampus in geringerer ( $\times 40$ ) Vergrößerung, während [Fig. 4b](#) dieselbe Photographie in höherer Vergrößerung ( $\times 200$ ) zeigt.

[0100] [Fig. 4c](#) ist eine Ansicht der Pyramidalzellen an der CA1-Stelle (Ammon's Horn) des Hippocampus einer Kontrollratte, reperfundierte für 7 Tage nach einer induzierten vollständigen Ischämie mittels Ligation der Karotisarterie auf beiden Seiten des Hirns, gezeigt in geringerer Vergrößerung ( $\times 40$ ), während [Fig. 4d](#) dieselbe Fotographie in einer höheren Vergrößerung ( $\times 200$ ) zeigt, in der die meisten der Pyramidalzellen sichtlich zerstört oder deformiert sind.

[0101] Währenddessen zeigt [Fig. 4e](#) eine Ansicht der Pyramidalzellen an der CA1-Stelle (Ammon's Horn) des Hippocampus der nur Selegilingruppe, welche warum auch immer keine Wirkungen eines signifikanten Schutzes der Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigt, und [Fig. 4f](#) zeigt dieselbe Fotographie in höherer Vergrößerung ( $\times 200$ ), in der die meisten Pyramidalzellen zerstört oder deformiert sind.

[0102] [Fig. 4g](#) ist von einer Ratte in der nur Ginkgo-Biloba-Extrakt-Gruppe, welcher teilweise schützende Wirkungen zeigt; und [Fig. 4h](#) ist eine Ansicht derselben Fotographie in höherer Vergrößerung ( $\times 200$ ), die ebenfalls belegt, dass die Zerstörung der Nervenzellen in gewissen Ausmaß verzögert ist.

[0103] [Fig. 4i](#) ist schließlich diejenige einer Ratte der Selegilin/Ginkgo-Biloba-Extrakt-Kombinationsgruppe, worin die Pyramidalzellen an der CA1-Stelle (Ammon's Horn) sich recht wohl erhalten darstellen und worin die schützenden Wirkungen stärker sichtbar sind als in der nur Ginkgo-Biloba-Extrakt-Gruppe. [Fig. 4j](#) ist eine Ansicht derselben Fotographie 4i in höherer Vergrößerung ( $\times 200$ ).

[0104] Diese Ergebnisse waren in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Messung der Nervenzellendichte an der CA1-Stelle des Hippocampus, die in Tabelle 6 unten gezeigt sind.

Tabelle 6 Nervenzellendichte an der CA1-Stelle

Wirkstoffbehandlung	Nervenzelldichte (/mm)
Normal	$230 \pm 16$
Kontrolle	$42 \pm 5$
Selegilin	$45 \pm 10$
Ginkgo-Extrakt	$169 \pm 10$
Selegilin + Ginkgo Extrakt	$201 \pm 12$

#### Anmerkungen:

1. Jeder Wert ist ein Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 3 - 4$ )
2. Bildanalysesystem: Polaroid, digitale Mikroskopkamera (Optimas-Version 6,2)

#### 4. Schlussfolgerung

[0105] Es wurde der Versuch unternommen, eine stärkere therapeutische Wirkung bei der Behandlung der senilen Demenz zu erzielen durch kombinierte Verabreichung von Selegilin, einen bekannten MAO<sub>B</sub>-Inhibitor, der bei der Behandlung der Alzheimerschen Erkrankung wirksam ist, indem er antidepressive Wirkungen über die selektive Steigung des Dopamin-Levels hervorruft, und von Ginkgo-Biloba-Extrakt, bei dem bekannt ist, dass er einen PAF-Antagonismus, antioxidative Wirkungen zeigt und bei der senilen Demenz, die von Gehirnischämie verursacht wird, wirksam ist.

[0106] Pharmakologische Verhaltensexperimente wurden an Ratten durchgeführt unter Verwendung derjenigen mit einem Gedächtnisverlust, induziert durch Vorbehandlung mit Scopolamin als Kontrolle; andere Experimente wurden an Ratten oder Wüstenrennmäusen ausgeführt unter Verwendung derjenigen, mit aufgrund der Ligation der Carotisarterien auf beiden Seiten induzierte Ischämie als Kontrolle. Als Testwirkstoffe wurden Selegilin in einer Dosis von 2 mg/kg/Tag oder Ginkgo-Biloba-Extrakt in einer Dosis von 48 mg/kg/Tag entweder einzeln oder in Kombination für drei aufeinanderfolgende Wochen über die orale Route verabreicht, und die Wirkungen wurden verglichen.

[0107] In den pharmakologischen Verhaltensexperimenten oder genauer im Responsetest auf passive Ver-

meidung und im Irrgartentest wurden signifikant verbesserte Wirkungen sowohl in der nur Selegilingruppe ( $p < 0,05$ ) als auch in der Selegilin/Ginkgo-Biloba-Extrakt-Kombinationsgruppe ( $p < 0,01$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet.

**[0108]** Im Partialischämie-Modell der Ratte war die Dopamin-Konzentration im cerebralen Cortex in der Selegilin/Ginkgo-Biloba-Kombinationsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht, während diejenigen von DOPAC und HVA gesenkt waren. Zusätzlich belegte die Messung des Energiemetabolismus im cerebralen Cortex eine Abnahme des ATP-Levels, während die Laktate erhöht waren.

**[0109]** Im Falle des ATP-Levels konnte nur die vereinigte Verabreichung eine signifikante Erhöhung ( $p < 0,05$ ) bewirken, während im Fall der Laktate sowohl nur Ginkgo-Biloba-Extrakt als auch die vereinigte Verabreichung signifikante Abnahmen zeigt. Im Falle der Partialischämie und anschließenden 3-stündigen Reperfusion als Modell war tendenziell eine Repression der Hyperoxidation im cerebralen Cortex zu beobachten und waren die Aktivitäten der SOD und der Glutathionperoxidase erhöht.

**[0110]** Andererseits zeigten die Schäden, die an den Pyramidalzellen an der CA1-Stelle des Hippocampus von Wüstenrennmäusen verursacht werden, die nach Induktion der vollständigen Ischämie reperfundierte werden, bei Untersuchung unter Cresyl-Violet-Färbung keine Verbesserung in der nur Selegilin-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, zeigten jedoch einige Effekte des Zellschutzes in der nur Ginkgo-Biloba-Extrakt-Gruppe, wobei die schützenden Wirkungen in der Selegilin/Ginkgo-Biloba-Extrakt-Kombinationsgruppe größer waren.

**[0111]** Die oben gezeigten Ergebnisse legen im weitesten Sinne nahe, dass die kombinierte Verwendung von Selegilin und Ginkgo-Biloba-Extrakten synergistisch hinsichtlich der Linderung verschiedener Symptome der Demenz wirken und die neuronalen Zellen durch Verringerung des oxidativen Stresses aufgrund der Ischämie durch gesteigerte antioxidative Wirkung schützen kann.

### Experimentalbeispiel 3

**[0112]** Einzeldosis-Toxizitätsstudie für ein Kombinationsprodukt, enthaltend Selegilin 5 mg und Ginkgo-Biloba-Extrakt 120 mg.

#### 1) Experimentelle Methode

**[0113]** Dieses Experiment erfolgte in Übereinstimmung mit den Methoden der Einzeldosis-Toxizitätsstudie, beschrieben in der Mitteilung Nr. 1998-116 des Korea Food and Drug Administration Office, betitelt „Standards for Toxicity Studies of Drugs etc (December 3, 1998)“.

**[0114]** Tiere: gesunde, männliche (30-35 g Körpergewicht) und weibliche (20-25 g Körpergewicht) ICR-Mäuse, gezüchtet unter denselben Umweltbedingungen, wurden für das Experiment genutzt. Die Tiere wurden in Polycarbonatkäfigen gehalten, die in einer gesteuerten Umgebung mit einer Temperatur von  $23 \pm 3^\circ\text{C}$  und einer relativen Feuchtigkeit von  $50 \pm 10\%$  standen. Sterilisiertes festes Tierfutter und gereinigtes Wasser waren frei verfügbar.

**[0115]** Reagenzien und Zubereitungen: Selegilin (Charge Nr. 9706005) wurde von Sanofi S.A., Frankreich, bereitgestellt und Ginkgo-Biloba-Extrakt (Charge Nr. 708601-1) wurde von Yuyu Industrials Co., Ltd., bezogen.

**[0116]** Experimentelle Methoden: Eine Einzeldosis-Toxizitätsstudie bezüglich des Kombinationsproduktes, enthaltend 5 mg Seligilin und 120 mg Ginkgo-Biloba-Extrakt, wurde durchgeführt. Die Tiere wurden auf 5 Dosigruppen von 1.000, 2.000, 4.000, 6.000 und 8.000 mg pro Kilogramm Körpergewicht eingeteilt, wobei jede Gruppe aus 10 Köpfen sowohl männlicher als auch weiblicher ICR-Mäuse bestand, und der Wirkstoff wurde oral in einer einzelnen Dosis an jedes einzelne Tier verabreicht.

**[0117]** Nach Wirkstoffverabreichung wurden tägliche Beobachtungen auf den Allgemeinzustand durchgeführt; und Körpergewichtskontrollen erfolgten mehr als dreimal solange, bis die Todesrate nach 14 Tagen festgestellt wurde.

**[0118]** Auf Basis der Wirkstoffkonzentration, der Todesrate und gemäß dem Litchfield & Wilcoxon-Verfahren wurden die Werte für  $\text{LD}_{50}$  berechnet. Weiterhin wurden die Tiere nach 14 Tagen getötet und anatomische Untersuchungen vorgenommen.

## 2. Ergebnisse und Diskussion

**[0119]** An jede der 10 männlichen ICR-Mäuse (30-35 Gramm Körpergewicht) in jeder Gruppe wurde das Kombinationsprodukt, enthaltend 5 mg Selegilin und 120 mg Ginkgo-Biloba-Extrakt, oral in einer einzelnen Dosis, definiert für jede Gruppe, verabreicht, wobei 1.000, 2.000, 4.000, 6.000 und 8.000 mg pro Kilogramm Körpergewicht gewählt wurden.

**[0120]** In den Gruppen mit Dosen über 4.000 mg/kg waren starke Reduktionen hinsichtlich des Aktivitätslevels zu beobachten, dieser kehrte jedoch am nächsten Tag auf den Normalwert zurück und sah der Vergleichsgruppe von außen ähnlich.

**[0121]** Darüber hinaus wurden alle Todesfälle ein oder zwei Tage nach Wirkstoffverabreichung beobachtet, und die Todeszahlen waren 1 bei der Dosis von 2000 mg/kg, 2 jeweils für Dosen von 4.000 mg/kg und 6.000 mg/kg und 6 für die Dosis von 8.000 mg/kg.

**[0122]** Aus diesem Ergebnis wurde der LD<sub>50</sub>-Wert für männliche ICR-Mäusen auf 10.964 mg/kg (5.770-20.831 mg/kg : 95 % Vertrauengrenze) berechnet. Berücksichtigt man die Tatsache, dass der Wirkstoff in einer 1 : 24 Kombination von Selegilin und Ginkgo-Biloba-Extrakt verabreicht wurde, entspricht dieser Wert der gleichzeitigen Verabreichung von 438 mg/kg Selegilin bzw. 10.526 mg/kg an Ginkgo-Biloba-Extrakt.

**[0123]** Anderseits betrugen die Todeszahlen bei weiblichen Mäusen nach 14 Tagen 2 für die Dosis von 4.000 mg/kg, 3 für die Dosis von 6.000 mg/kg und 6 für die Dosis von 8.000 mg/kg. Aus diesem Ergebnissen wurde der LD<sub>50</sub>-Wert zu 9.332 mg/kg berechnet (5.832-14.931 mg/kg:95 % Vertrauengrenze).

**[0124]** Berücksichtigt man die Tatsache, dass der Wirkstoff in einer 1 : 24-Kombination von Selegilin und Ginkgo-Biloba-Extrakt verabreicht wurde, entspricht dieser Wert der gleichzeitigen Verabreichung von 373 mg/kg an Selegilin bzw. 8.959 mg/kg an Ginkgo-Biloba-Extrakt.

**[0125]** Gemäß der veröffentlichten Literatur beträgt der LD<sub>50</sub>-Wert für eine einzelne orale Verabreichung von Selegilin bei Mäusen 385 mg/kg. Somit entspricht der LD<sub>50</sub>-Wert für das Kombinationsprodukt an Selegilin und Ginkgo-Biloba-Extrakt (1 : 24) demjenigen der einzelnen Verabreichung von Selegilin; es wurde geschlossen, dass der Wert durch die Kombination mit Ginkgo-Biloba-Extrakt nicht wesentlich beeinflusst wurde.

**[0126]** Daneben waren die Änderungen des Körpergewichts wie Tabelle 7 gezeigt. Eine Verringerungen des Körpergewichts wurden einen Tag nach Wirkstoffverabreichung bei männlichen Mäusen in den Dosisgruppen von 4.000 mg/kg und 8.000 mg/kg und bei weiblichen Mäusen in der Dosisgruppe 8.000 mg/kg beobachtet; die Körpergewichte erholteten sich jedoch graduell und kehrten 7 Tage nach Wirkstoffverabreichung nahezu auf den Normalwert zurück.

Tabelle 7

Wirkungen der oralen Verabreichung des Kombinationsprodukts von Selegilin und Ginkgo-Biloba-Extrakt auf Körpergewichte bei Mäusen

Geschlecht	Dosis (mg/kg, p.o)	Tage nach Behandlung				Nettokörpergewichtszunahme (g)
		0	1	3	7	
	1.000	34±1	33±1	33±1	34±1	0±0
	2.000	32±1	31±1	31±1	31±1	-1±0
männlich	4.000	32±1	29±1	30±1	31±1	-1±0
	6.000	33±1	32±1	32±1	32±0	-1±0
	8.000	32±1	29±1	32±0	31±1	-1±0
	1.000	23±1	23±0	23±0	24±1	1±0
	2.000	23±0	23±1	24±1	24±1	1±0
weiblich	4.000	24±1	23±1	23±1	23±1	-1±0
	6.000	25±1	25±2	24±1	24±1	-1±0
	8.000	23±1	20±1	21±1	22±1	-1±0

**[0127]** 14 Tage nach Wirkstoffverabreichung wurden die Tiere im Abdomen operiert und anatomische Untersuchungen angestellt. Es waren jedoch keine merklichen Läsionen in den wesentlichen Organen von männlichen und weiblichen Mäusen zu beobachten.

### 3. Schlussfolgerung

**[0128]** Der LD<sub>50</sub>-Wert einer einzelnen oralen Verabreichung des 1 : 24-Kombinationsproduktes aus 5 mg Selegilin und 120 mg Ginkgo-Biloba-Extrakt bei männlichen ICR-Mäusen (30 – 35 g Körpergewicht) betrug 10.964 mg/kg (5.770-20.831 mg/kg : 95 % Vertrauengrenze) und derjenige für weibliche Mäuse (20-25 g Körpergewicht) betrug 9.332 mg/kg (5.832-14.931 mg/kg : 95 % Vertrauengrenze).

### Auswirkungen der Erfindung

**[0129]** Die vorliegende Erfindung stellt neue Zusammensetzungen als Wirkstoffe zur Behandlung der Parkinsonschen Erkrankung und Demenz bereit, enthaltend Selegilin und Ginkgo-Biloba-Extrakt in Verhältnissen zwischen 1 : 15 und 1 : 30.

**[0130]** Daneben waren die Zusammensetzungen als Produkte der vorliegenden Erfindung für mehr als 24 Monate als Ablaufdatum hinsichtlich der pharmazeutischen Stabilität stabil und erwiesen sich bei Tests so sicher, dass jegliche Toxizitäten vernachlässigt werden können.

### Patentansprüche

1. Pharmazeutische Zusammensetzung für die Behandlung der Parkinsonschen Erkrankung und Demenz, bestehend im Wesentlichen aus Selegilin und Ginkgo-Biloba-Extrakt, vermischt in Verhältnissen zwischen 1:15 und 1:30 in Gewicht.
2. Zusammensetzung gemäß Anspruch 1, die Selegilin in einer Menge von zwischen 2 mg und 5 mg und

Ginko-Biloba-Extrakt in einer Menge von zwischen 30 mg und 150 mg pro Dosisform enthält.

3. Zusammensetzung gemäß Anspruch 1 oder 2, die 5 mg Selegilinhydrochlorid und 120 mg Ginko-Biloba-Extrakt enthält.

4. Zusammensetzung gemäß Anspruch 3, die 5 mg Selegilinhydrochlorid, 120 mg Ginko-Biloba-Extrakt und einen oder mehrere pharmazeutisch annehmbare Träger enthält, ausgewählt aus einer Gruppe, bestehend aus Hilfsstoffen, Desintegrationsmitteln, Bindern und Gleitmitteln.

5. Zusammensetzung gemäß Anspruch 4, bei der es sich um eine pharmazeutische Dosisform handelt, ausgewählt aus einer Gruppe, bestehend aus filmbeschichteten Tabletten, Hartgelatinekapseln und Granulat.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

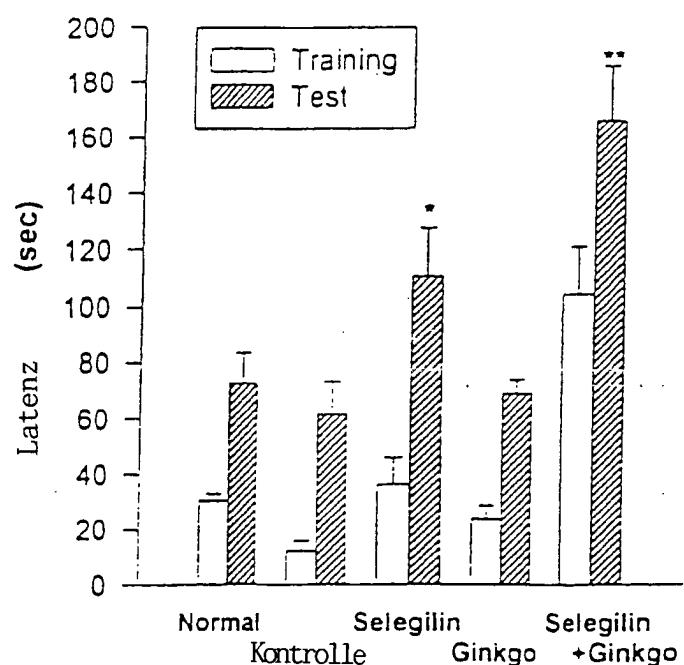


FIG. 2

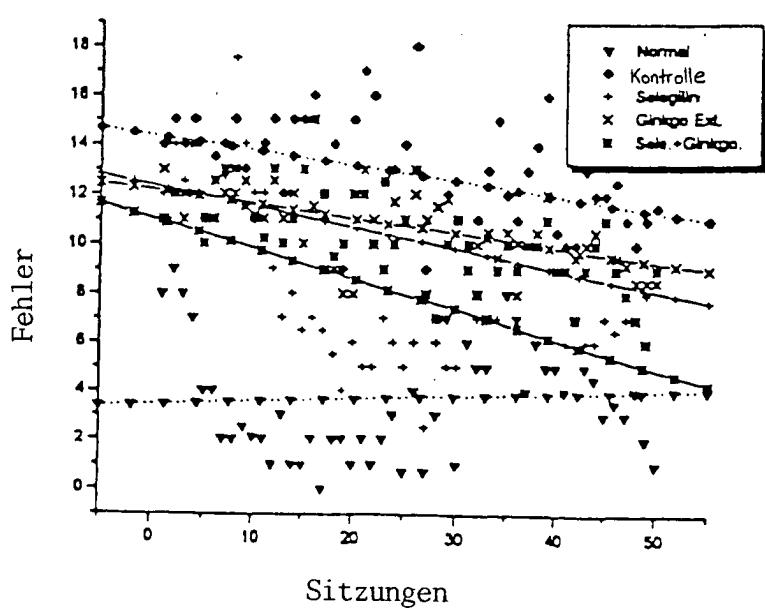


FIG. 3

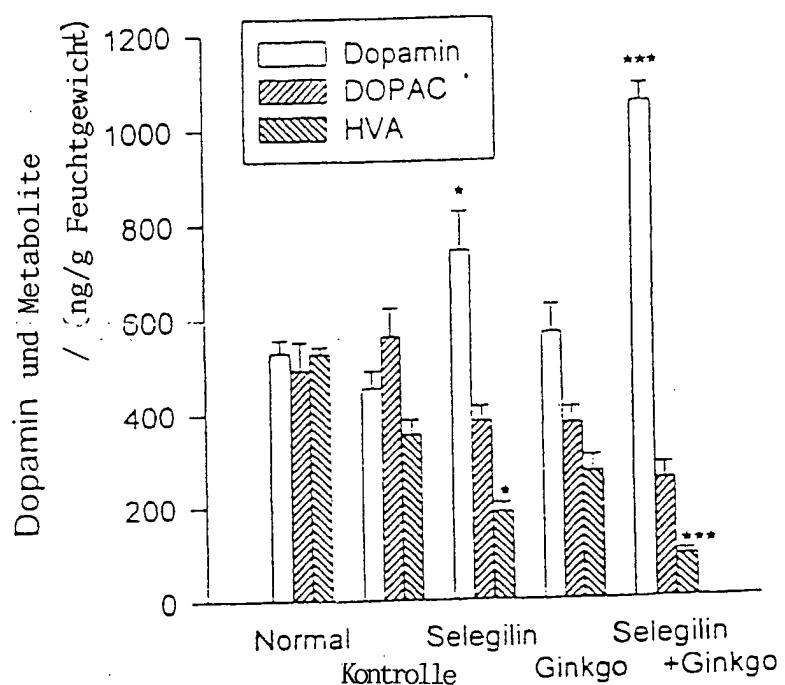


FIG. 4a



FIG. 4b

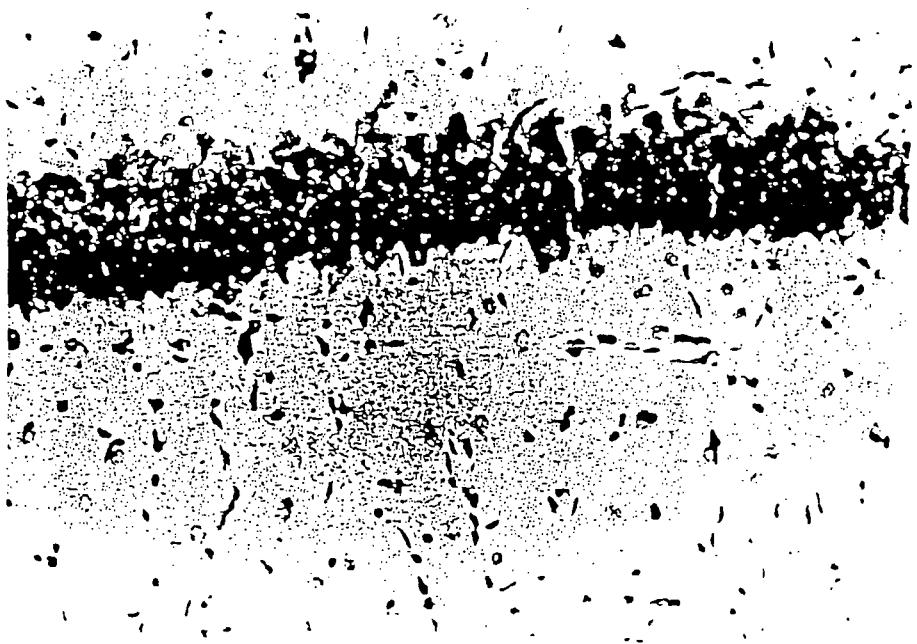


FIG. 4c



FIG. 4d

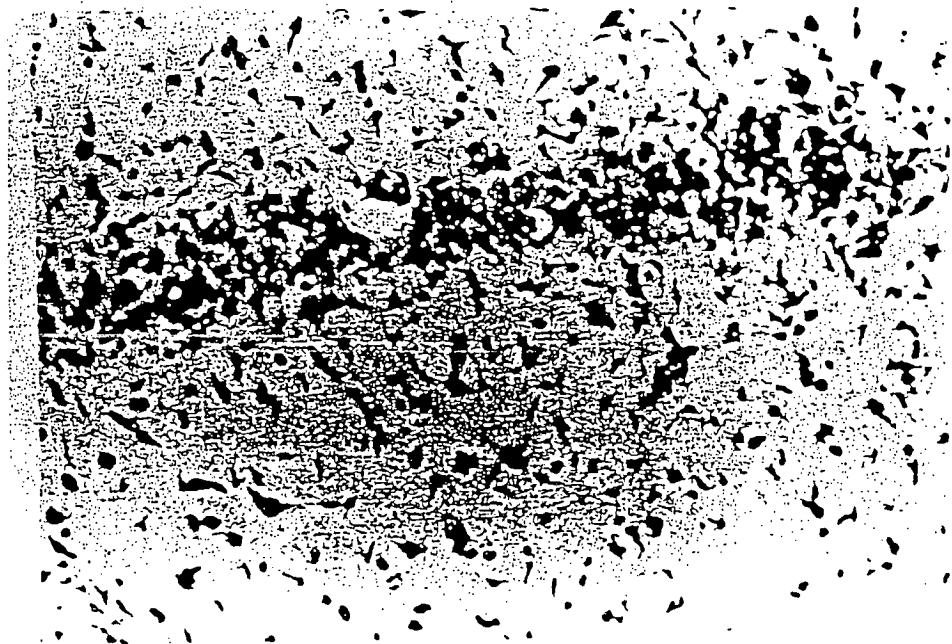


FIG. 4e



FIG. 4f

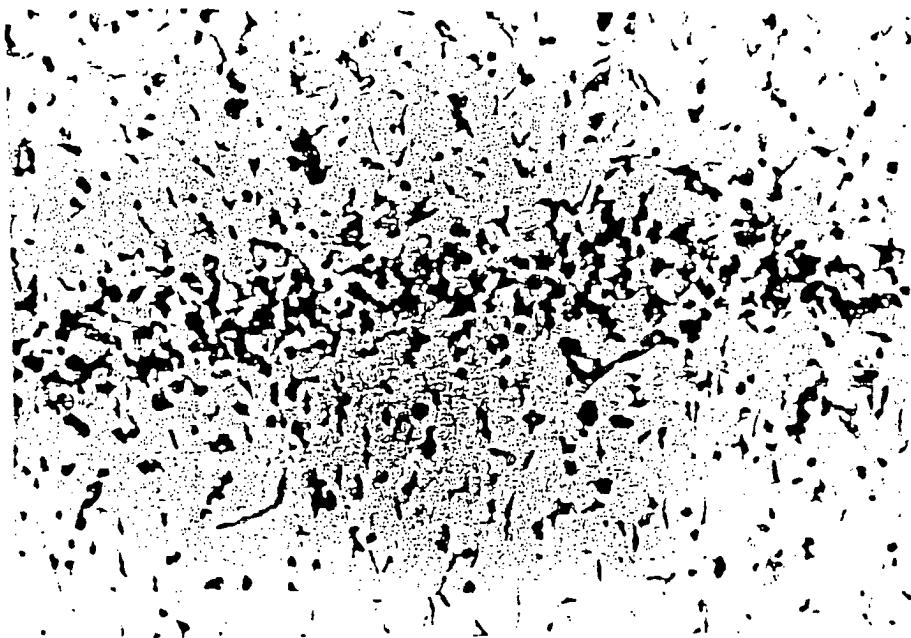


FIG. 4g



FIG. 4h

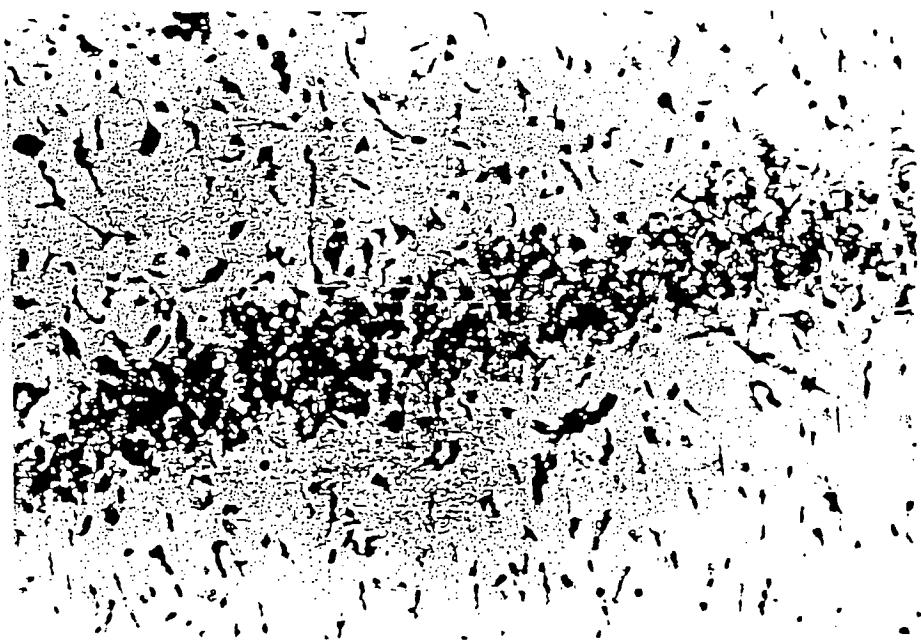


FIG. 4i



FIG. 4j

