



19



CONFÉDÉRATION SUISSE

INSTITUT FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

11 CH 688 022 A5

51 Int. Cl.⁶: A 61 K 031/35

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein

Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

12 FASCICULE DU BREVET A5

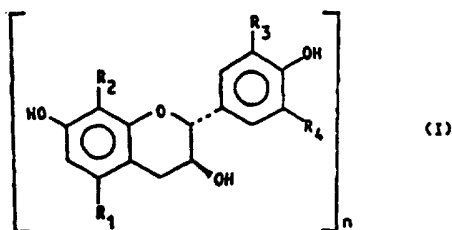
21 Numéro de la demande: 00663/94

22 Date de dépôt: 07.03.1994

24 Brevet délivré le: 30.04.1997

45 Fascicule du brevet
publiée le: 30.04.199773 Titulaire(s):
Sonnig S.A., 14, quai du Seujet, 1201 Genève (CH)72 Inventeur(s):
Tarasenko, Robert, South Port (AU)74 Mandataire:
Cabinet Roland Nithardt
Conseils en Propriété Industrielle S.A.,
Y-PARC Chemin de la Sallaz, Case postale 3347,
1400 Yverdon (CH)

54 Médicament à activité anti-inflammatoire à base de pycnogénols.

57 Ce médicament est réalisé à base de pycnogénols de
formule (I)

Les pycnogénols de formule (I) sont isolés et purifiés
à partir d'extraits de *Ribes nigrum*.



Description

L'invention concerne un médicament à activité anti-inflammatoire à base de pycnogénols.

L'invention concerne plus particulièrement une nouvelle utilisation thérapeutique de pycnogénols contenus dans des extraits de *Ribes nigrum* ou isolés et purifiés à partir de tels extraits.

De nombreux végétaux sont connus pour leur activité anti-inflammatoire ou des activités apparentées, telles que l'activité anti-rhumatismale. C'est le cas en particulier de la variété *Ribes nigrum*, de la famille des Saxifragaceae. L'activité anti-inflammatoire d'extraits hydroalcooliques totaux de feuilles de *Ribes nigrum* ou de leurs lyophilisats administrés par voie orale a été récemment rapportée par C. Declume dans J. Ethnopharmacol., 1989, 1989, 27, 91-98.

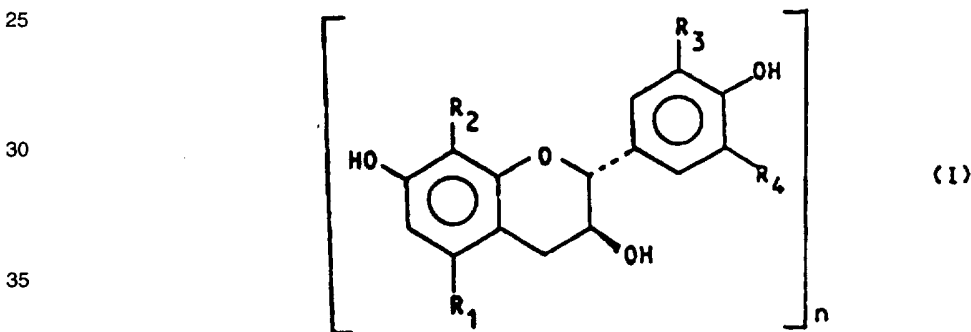
Bien que l'activité thérapeutique de tels extraits soit connue, le ou les principes actifs responsables de l'activité anti-inflammatoire ou d'activités apparentées n'ont pas encore été identifiés.

On a maintenant trouvé, de manière surprenante, que l'activité anti-inflammatoire d'extraits de *Ribes nigrum* était essentiellement due à la présence de pycnogénols dans ces extraits. Les pycnogénols sont des composés constitués d'unités flavane-3-ol qui sont présents dans divers végétaux. L'unité de base de ces polymères est le plus souvent la catéchine. On appelle alors ces polymères des procyanidines.

Des procédés permettant la préparation d'extraits contenant des pycnogénols ont été décrits dans les brevets GB 1 541469 et FR 2 092 743.

Par ailleurs, la demande EP 275 224 décrit la préparation de complexes phospholipidiques d'extraits de *Vitis vinifera*, ces derniers étant constitués d'oligomères procyanidoliques, ainsi que des compositions pharmaceutiques à activité protectrice vasculaire et des compositions cosmétiques contenant lesdits complexes.

L'invention concerne un médicament à activité anti-inflammatoire à base de pycnogénols de formule:



40 dans laquelle R_1 , R_2 , R_3 et R_4 représentent H ou OH et n est un nombre entier de 2 à 40, lesdits pycnogénols étant soit contenus dans des extraits végétaux à raison d'au moins 2% en poids, soit sous forme isolée et purifiée.

Dans un aspect préféré, les pycnogénols de formule (I) ci-dessus sont contenus dans des extraits de *Ribes nigrum* ou sont sous forme isolée et purifiée d'extraits de *Ribes nigrum*. Notamment, on extrait les pycnogénols de formule (I) à partir des feuilles ou des bourgeons de *Ribes nigrum*.

45 Avantageusement, on a pu montrer par l'analyse chimique des extraits de *Ribes nigrum* les plus actifs sur le plan pharmacologique que l'unité de base des pycnogénols présents dans ces extraits était le plus souvent la gallocatéchine, et non la catéchine. De tels polymères sont appelés prodelphinidines.

Dans un aspect avantageux, l'invention concerne donc l'utilisation de prodelphinidines, c'est-à-dire de pycnogénols de formule (I) dans laquelle R_1 , R_3 et R_4 représentent OH, et R_2 représente H, et n un nombre entier de 2 à 40, lesdits pycnogénols étant soit contenus dans des extraits végétaux à raison d'au moins 2% en poids, soit sous forme isolée et purifiée pour la préparation de médicaments à activité anti-inflammatoire. Les prodelphinidines se différencient des oligomères procyanidoliques par le fait que le substituant R_1 représente OH dans le cas des prodelphinidines, alors qu'il représente H dans le cas des procyanidoliques.

55 La préparation des pycnogénols utilisables selon l'invention peut être résumée en deux étapes principales:

- 1) préparation d'un extrait total selon les techniques usuelles d'extraction végétale, telles que, par exemple, les extractions aqueuses, hydroalcooliques ou hydroacétoniques;
- 2) isolement et purification des pycnogénols.

65 Dans un procédé avantageux pour préparer un extrait de *Ribes nigrum* (1ère étape), on pulvérise un lot de feuilles que l'on épuise par percolation lente au moyen d'éthanol à 70°. L'éthanol est éliminé par distillation à l'évaporateur rotatif, sous pression réduite, à une température inférieure à 50°C. La solution

aqueuse restante est filtrée afin d'éliminer une partie importante de chlorophylle. On pratique ensuite un fractionnement en utilisant successivement des solvants de polarité croissante, tels que:

- a) l'éther diéthylique afin d'éliminer la chlorophylle restante et diverses substances liposolubles;
- b) l'acétate d'éthyle;
- c) le n-butanol.

Dans un autre procédé avantageux d'extraction, on épuise un lot de poudre de feuilles sèches de *Ribes nigrum* par percolation lente, au moyen d'un mélange acétone-eau. Après obtention du dernier percolat, on exprime la poudre à la presse et on rassemble tous les liquides. L'extrait total est agité vigoureusement avec du NaCl, ajouté jusqu'à l'obtention de deux phases: une phase supérieure acétonique et une phase inférieure aqueuse. La phase acétonique est évaporée sous pression réduite à 30°C et le résidu aqueux est additionné d'un égal volume d'eau, filtré puis ré-extrait, soit par de l'acétate d'éthyle, soit par du butanol. Les extraits sont ensuite évaporés à sec.

On obtient ainsi des extraits contenant au moins 2% en poids de pycnogénols de formule (I).

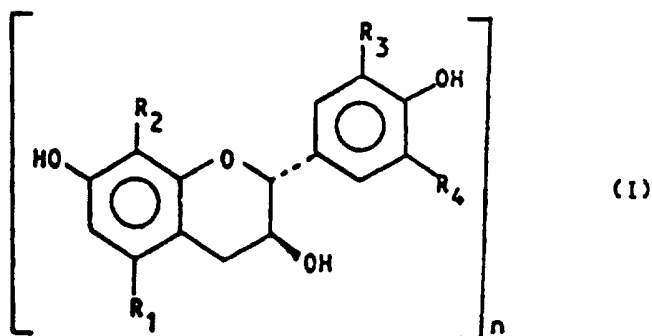
L'isolement et la purification des pycnogénols utilisables selon l'invention (2^e étape) peuvent être réalisés par différentes techniques de chromatographie sur gel, ou encore des techniques d'ultra-filtration connues de l'homme du métier.

Parmi les techniques chromatographiques, on citera notamment l'utilisation de la colonne Fractogel TSK (Merck USA) en éluant à l'aide d'eau, puis d'un mélange eau/méthanol à pourcentage croissant en méthanol; de la colonne Sephadex® LH 20 (Pharmacia, Suède) en éluant à l'aide d'alcool puis d'alcool additionné d'eau; ou encore sur une colonne Lobar Lichroprep RP8 (Merck, USA), l'élution étant réalisée à l'aide d'un mélange eau/acétone. Ces différentes techniques peuvent être combinées entre elles pour obtenir un plus haut degré de purification.

Ceci permet d'obtenir les pycnogénols de formule (I) sous forme isolée et purifiée.

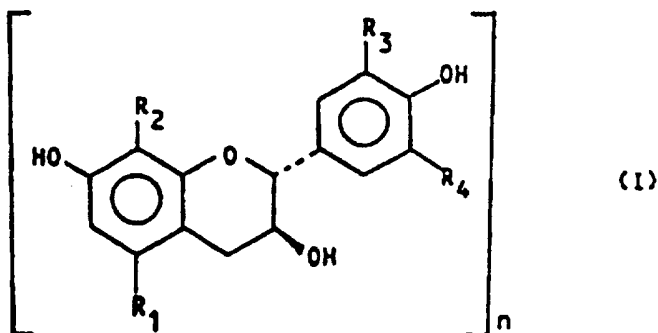
Les pycnogénols isolés et purifiés ont été soumis à différentes techniques spectrales en vue de déterminer leur structure.

On a ainsi pu mettre en évidence des pycnogénols particuliers sous forme de dimères de gallocatéchine. Ces molécules répondent à la formule (I):



dans laquelle R_1 , R_3 et R_4 représentent OH, R_2 représente H et $n = 2$.

D'autres pycnogénols particuliers se présentent sous forme de trimères de gallocatéchine, c'est-à-dire de composés de formule (I)



dans laquelle R_1 , R_3 et R_4 représentent OH, R_2 représente H et $n = 3$.

L'utilisation de ces pycnogénols particuliers sous forme de dimères ou de trimères de gallocatéchine

ainsi que leurs isomères pour la préparation de médicaments anti-inflammatoires représente un aspect préféré de la présente invention.

L'activité anti-inflammatoire des pycnogénols extraits de *Ribes nigrum* tels que décrits plus haut a été testée notamment à l'aide du test de l'œdème de la carraghénine, tel que décrit dans Winter et al., Exp. Biol. Med., 1962, 111, 544-547. Le principe de ce test consiste à provoquer un gonflement aigu de la patte d'un rat par une injection de carraghénine.

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des composés étudiés est basée sur leur pouvoir de réduire cet œdème par comparaison avec des animaux témoins traités par le seul solvant. La mesure est effectuée en comparant, à différents temps, le volume de la patte ayant reçu la carraghénine à celui de la patte controlatérale ayant reçu le même volume de sérum physiologique.

Les pycnogénols de formule (I) contenus dans des extraits de *Ribes nigrum* à raison d'au moins 2% en poids ou sous forme isolée et purifiée ont montré une activité significative dans ce test.

Les composés de formule (I) peuvent être utilisés pour la préparation de médicaments à activité anti-inflammatoire, caractérisés en ce qu'ils contiennent un ou plusieurs composés de formule (I) contenus dans des extraits de *Ribes nigrum* à raison d'au moins 2% en poids ou sous forme isolée et purifiée en tant que principe actif en association avec un véhicule pharmaceutique.

Avantageusement, lesdits médicaments à activité anti-inflammatoire contiendront une quantité standardisée de pycnogénols de formule (I).

L'invention concerne notamment l'utilisation des composés de formule (I) pour la préparation de médicaments à activité anti-inflammatoire sous une forme convenant pour l'administration par voie orale, telle que comprimé, gélule ou pilule. Notamment, les pycnogénols de formule (I) seront utilisés dans des compositions pour l'administration par voie orale sous forme de complexes liposolubles.

Les pycnogénols de formule (I) peuvent également être utilisés pour la préparation de médicaments à activité anti-inflammatoire sous une forme convenant pour l'administration parentérale, notamment par voie intraveineuse, sous-cutanée ou intramusculaire ou encore sous une forme convenant pour l'administration locale.

La quantité de principe actif à administrer dépendra de la nature et de la sévérité de l'inflammation, ainsi que du poids du patient et de la voie d'administration.

A titre indicatif, les doses seront de l'ordre de 500 mg/j pour l'administration par voie parentérale, et de l'ordre de 1,5 g/j pour l'administration orale.

Pour détecter et doser les pycnogénols de formule (I) totaux dans un extrait végétal, on utilisera avantageusement un dosage spectrophotométrique en lumière visible, par mesure de l'absorbance de la delphinidine formée lors du chauffage en milieu butanol/HCl.

A titre d'exemple, on prépare un extrait de 50 mg en utilisant les techniques décrites plus haut, que l'on solubilise dans 10 ml de méthanol. On pipette 5 ml de cette solution à laquelle on ajoute, dans un ballon de 50 ml, une solution de butanol contenant 5 ml de HCl. On chauffe à reflux à 100°C pendant deux heures, puis on transfère le contenu du ballon dans un ballon jaugé à 50 ml et on amène au trait à l'aide de butanol, ayant servi au préalable à rincer le ballon. On mesure l'absorbance de cette solution à 558 nm sous une épaisseur d'un cm en prenant l'eau comme liquide de compensation.

On peut également effectuer un dosage gravimétrique en calculant la quantité de pycnogénols retenus sur de la poudre de peau.

A titre d'exemple, l'extraction de ces substances peut se faire suivant le mode opératoire décrit plus haut pour la chromatographie en utilisant 2 g de feuilles, l'extrait étant amené en fin d'opération à 100 ml avec de l'eau.

– 25,0 ml du filtrat sont évaporés à sec à l'évaporateur rotatif et pesés suivant des conditions opératoires bien précises. Ce résidu correspond au résidu total R1.

– A 50,0 ml de filtrat restant, on ajoute 1 g de poudre de peau faiblement chromée (ref 4352, Merck, USA) et on agite énergiquement pendant une heure. On filtre sur filtre serré et on évapore à sec 25,0 ml de ce filtrat dans les mêmes conditions que ci-dessus. Ce résidu correspond aux substances non retenues sur la poudre de peau = R2.

Le pourcentage de pycnogénols adsorbés sur la poudre de peau se calcule en appliquant la formule:

$$\frac{(R1 - R2) \times 400}{pg}$$

dans laquelle pg représente la quantité de feuilles mise en œuvre.

La détection et le dosage de pycnogénols de formule (I) déterminés, tels que notamment le dimère et le trimère de gallocatéchine décrits plus haut, seront avantageusement effectués par chromatographie sur couche mince ou par HPLC (chromatographie liquide haute performance).

A titre d'exemple de protocole utilisable en chromatographie sur couche mince, on peut effectuer une extraction sur 2 g de feuilles pulvérisées laissées en contact pendant 2 heures avec quelques ml de mélange acétone-eau (7:3). Puis on percole avec ce même mélange jusqu'à obtenir 25 ml de solution. Cette solution est évaporée sous pression réduite à une température inférieure à 45°C. Le résidu est repris par 10 ml de mélange méthanol-eau (1:1). On dépose 10 µl de cette solution sur une plaque de silicagel en utilisant la phase supérieure d'un mélange acétate d'éthyle-eau-acide formique (70:20:3:2)

pour le développement. La révélation est effectuée par une solution à 1% de vanilline dans HCl/méthanol (1:1). Les pycnogénols se présentent à la lumière du jour sous forme de plusieurs bandes rouges. La zone des Rf les plus élevés correspond aux monomères; une bande importante se situant vers le milieu du chromatogramme correspond aux dimères de la gallocatéchine. Il apparaît d'autres bandes

5 rouges à des Rf inférieurs correspondant aux molécules plus polymérisées.

Pour étudier des extraits par la méthode HPLC, on peut utiliser par exemple un appareil Diode-Array (Pharmacia, Suède) couplé à un microordinateur PC MEMOREX en utilisant une colonne C18 de 25 cm (Pharmacia, Suède).

10 L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples illustratifs ci-après, qui ne présentent aucun caractère limitatif.

Exemple 1: Mise en évidence de l'activité anti-inflammatoire des pycnogénols.

15 1 kg de feuilles de Ribes nigrum est pulvérisé et épuisé par percolation lente au moyen de 10 l d'éthanol à 70°C. L'éthanol est éliminé par distillation à l'évaporateur rotatif, sous pression réduite, à une température inférieure à 50°C. La solution aqueuse restante est filtrée afin d'éliminer une partie importante de chlorophylle. Le tiers de la solution aqueuse est lyophilisé tel quel et conservé comme référence = extrait brut (70 g).

20 Sur les deux-tiers restants on pratique un fractionnement en utilisant successivement des solvants de polarité croissante et en soumettant à chaque étape la solution résiduelle à un nouveau fractionnement: à 10 ml de solution aqueuse, on ajoute 30 ml d'éther diéthylique afin d'éliminer par décantation la chlorophylle restante et diverses substances liposolubles. On ajoute ensuite à la solution 30 ml d'acétate d'éthyle. Après décantation et évaporation, le résidu est récupéré et séché. 30 ml de n-butanol sont ensuite ajoutés à la solution aqueuse restante. Le résidu est récupéré et séché. La solution aqueuse résiduelle donne, après lyophilisation, un résidu correspondant à environ 11% du produit de départ.

25 L'activité anti-inflammatoire de ces différents extraits a été testée dans le test de l'œdème à la carraghénine, tel que décrit par Damas (Thèse d'Agrégation, Université de Liège, 1981).

Les extraits recueillis aux différentes étapes de l'extraction sont dilués à l'eau au 1/10 puis lyophilisés.

30 On injecte par voie intrapéritonéale à six rats Wistar (pesant environ 240 g) 0,5 ml d'extrait lyophilisé dissous dans du sérum physiologique aux doses de 50 et 250 mg/kg. Une demi-heure après, on injecte dans le 2ème espace intermétatarsien d'une patte postérieure 0,1 ml d'une solution à 1% de carraghénine Lambda pure (Sigma, USA), la patte controlatérale recevant le même volume de sérum physiologique.

35 Le volume de chaque patte est mesuré à différents temps (2, 3 et 4 h) à l'aide d'un pléthysmomètre (Ugobasile, Italie) et les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'œdème par rapport aux animaux témoins ayant reçu 0,5 ml de sérum physiologique.

Les résultats sont rapportés dans le tableau 1 ci-après.

Tableau 1

	% d'inhibition à 50 mg/kg	% d'inhibition à 250 mg/kg
Extrait total	33% (a)	68% (a)
Extrait acétate d'éthyle	16% (b)	65% (a)
Extrait butanolique	35% (c)	92% (a)
Solution aqueuse restante	46% (c)	94% (a)
(a) p < 0,001	b) p < 0,05	(c) p < 0,005

Ces résultats montrent que l'extrait butanolique et la solution aqueuse restante présentent les activités les plus intéressantes.

55 Afin de déterminer la nature des molécules responsables de l'activité anti-inflammatoire, on fait réagir une solution aqueuse contenant 3 g d'extrait aqueux avec 5 g de poudre de peau standardisée faiblement chromée (référence 4332, Merck, USA) sous agitation constante, pendant 1 heure. En effet, les pycnogénols ont une très grande affinité pour les protéines et forment avec ces dernières différents types de complexes.

60 On réalise alors un essai comparatif entre la solution aqueuse précédemment testée et un échantillon de solution aqueuse passée sur poudre de peau, à la dose de 200 mg/kg, dans le modèle expérimental décrit plus haut. Les résultats sont rapportés dans le tableau 2 ci-après.

Tableau 2

		% d'inhibition à 200 mg/kg
5	Solution aqueuse	62% p < 0,001
	Solution aqueuse passée sur poudre de peau	29% p < 0,005

Ces résultats montrent que l'activité de l'extrait aqueux est considérablement réduite lorsque la majorité des pycnogénols présents en a été éliminée.
 On peut donc relier l'activité anti-inflammatoire en grande partie à la présence de pycnogénols dans les extraits de *Ribes nigrum*.

Exemple 2: Mise en évidence de l'activité anti-inflammatoire de pycnogénols purifiés.

On prépare un extrait total de *Ribes nigrum* en utilisant la méthode suivante: 500 g de feuilles broyées sont mis à macérer dans un mélange eau/acétone (rapport 7/3) pendant 12 h, puis la préparation subit une percolation lente permettant d'obtenir 5 kg de solution.

Après pressage des feuilles, une nouvelle percolation est effectuée avec le mélange eau/acétone, suivie d'une distillation sous vide. Après évaporation de l'acétone, la solution est filtrée pour éliminer la chlorophylle précipitée. Le résidu aqueux est réextrait 5 fois consécutivement par 300 ml de n-butanol. Les extraits obtenus sont ensuite évaporés à sec et réunis.

On effectue une chromatographie préparative basse pression de cet extrait, sur colonne Lobar Li-chroprep RP8 (Merck, USA) en éluant avec un mélange eau + 10% d'acétone, en augmentant progressivement le pourcentage d'acétone. On obtient ainsi:

- 1) une fraction très polaire ne contenant pas de pycnogénols et précipitant en présence de méthanol;
- 2) une fraction contenant différents pycnogénols et des acides phénols;
- 3) une fraction renfermant surtout les flavonoïdes et les tanins catéchiques les plus polymérisés.

En faisant repasser la fraction 2 sur colonne Sephadex® LH20 (Pharmacia, Suède) en éluant au moyen d'alcool, puis d'un mélange hydroalcoolique contenant 10, 20 puis 50% d'eau, on obtient des molécules purifiées qui ont été caractérisées comme des pycnogénols constitués respectivement d'un dimère et d'un trimère de gallocatéchine.

Différentes fractions ainsi que des molécules purifiées ont été soumises au test de l'œdème à la carraghénine décrit dans l'exemple 1:

- une fraction provenant de la chromatographie sur Lobar RP8 et ne renfermant ni pycnogénols, ni flavonoïdes mais des substances solubles dans l'eau et précipitant par le méthanol (fraction 1);
- une fraction contenant presque exclusivement des acides phénols (fraction 2);
- l'isoquercitrin, flavonoïde majoritaire des feuilles;
- le dimère et le trimère de la gallocatéchine.

Les résultats sont rapportés dans le tableau 3 ci-après:

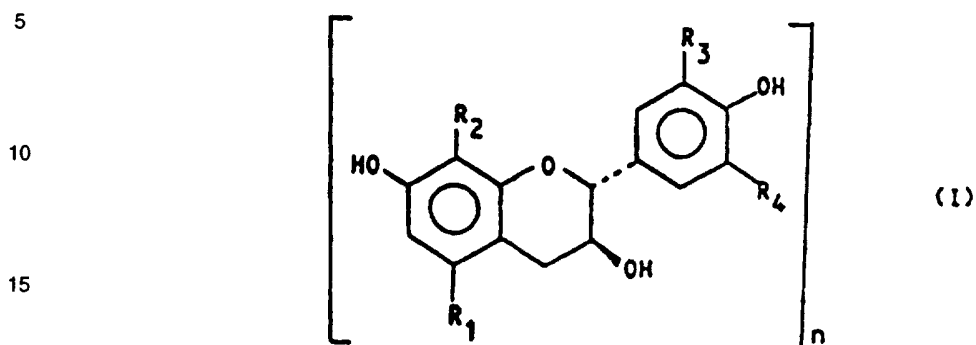
Tableau 3

Fractions ou molécules testées	Concentration mg/kg	Pourcentage d'inhibition	
		après 2 h	après 4 h
Fraction 1	100	n.s.	n.s.
Fraction 2	100	n.s.	n.s.
Isoquercitrin	100	n.s.	n.s.
Dimère	5	18	19
	10	37	7
	40	45	29
Trimère	5	18	15
	10	35	30
	40	58	50
n.s.: non significatif			

Ces résultats montrent que les molécules isolées présentent une inhibition de l'œdème à la carraghénine de l'ordre de 45 à 60% à la dose de 40 mg/kg.

Revendications

1. Médicament à activité anti-inflammatoire à base de pycnogénols de formule (I)



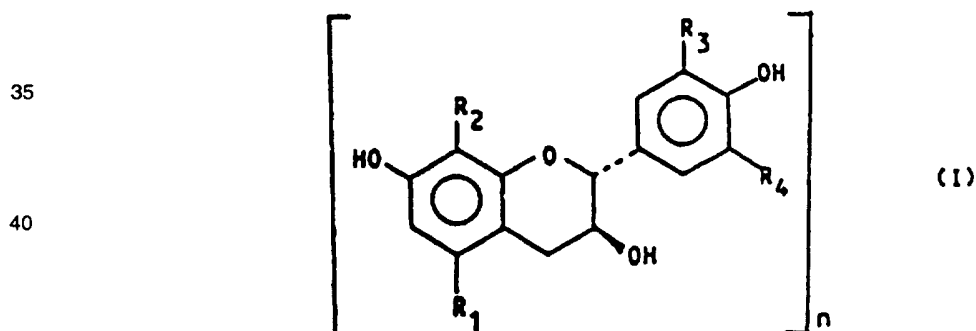
20 dans laquelle R_1 , R_2 , R_3 et R_4 représentent H ou OH, et n est un nombre entier de 2 à 40, lesdits pycnogénols étant soit contenus dans des extraits végétaux à raison d'au moins 2% en poids, soit sous forme isolée et purifiée.

2. Médicament selon la revendication 1, caractérisé en ce que les pycnogénols de formule (I) sont contenus dans des extraits de *Ribes nigrum*.

25 3. Médicament selon la revendication 1, caractérisé en ce que les pycnogénols de formule (I) sont sous forme isolée et purifiée, extraits de *Ribes nigrum*.

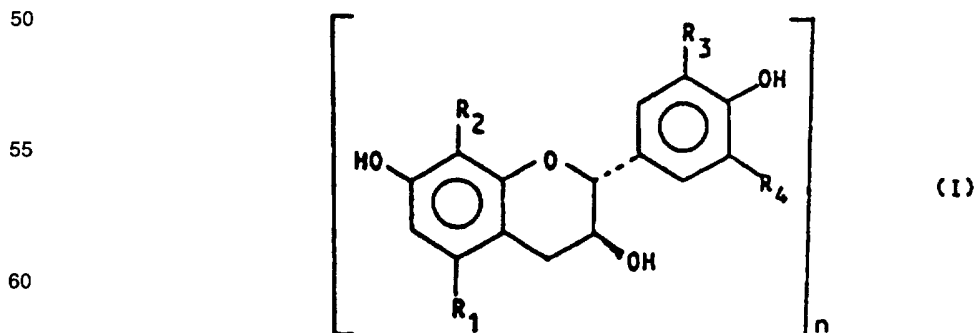
4. Médicament selon l'une quelconque des revendications 1, 2 ou 3, caractérisé en ce que les pycnogénols sont constitués en majorité d'unités de formule (I) dans laquelle R_1 , R_3 et R_4 représentent OH, et R_2 représente H.

30 5. Médicament selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les pycnogénols répondent à la formule (I)



dans laquelle R_1 , R_3 et R_4 représentent OH, R_2 représente H, et $n = 2$.

6. Médicament selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les pycnogénols répondent à la formule (I)



dans laquelle R_1 , R_3 et R_4 représentent OH, R_2 représente H et $n = 3$.