

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 646 852**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **89 06282**

⑤1 Int Cl⁵ : C 07 G 17/00; A 61 K 35/78.

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 12 mai 1989.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 46 du 16 novembre 1990.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : *CARIEL Léon et JEAN Daniel.* — FR.

⑦2 Inventeur(s) : Léon Cariel ; Daniel Jean.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : S.C. Ernest Gutmann-Yves Plasseraud.

⑤4 Produit polyphénolique à activité antivirale.

⑤7 L'invention concerne un produit polyphénolique.
Ce produit est caractérisé par le fait qu'il peut être obtenu
par extraction à partir d'organes végétaux, au moyen d'un
solvant polaire volatil et par concentration de l'extrait.
Application à la fabrication de compositions pharmaceuti-
ques antivirales.

FR 2 646 852 - A1

La présente invention concerne un nouveau produit à activité anti-virale. Elle a plus particulièrement pour objet une famille de substances extraites de plantes très diverses. Ces plantes possèdent entre elles des caractéristiques propres à assurer l'activité anti-virale optimale.

5 Les thérapeutiques anti-virales, notamment contre l'herpès, employées à ce jour, ont souvent des effets secondaires indésirables et une toxicité souvent importante.

C'est pourquoi un but de la présente invention est de fournir des produits à activité anti-virale, notamment anti-herpétique, dont les effets
10 secondaires et la toxicité sont faibles.

Un autre but de la présente invention est de fournir des procédés de préparation des produits spécifiés ci-dessus.

Un autre but de la présente invention est de fournir des compositions pharmaceutiques notamment pour usage topique.

15 Ces buts et d'autres qui apparaîtront par la suite sont atteints par des produits polyphénoliques, de la famille des proanthocyanidols, caractérisés par le fait qu'ils être peuvent obtenus par extraction d'organes végétaux au moyen d'un solvant polaire volatil et concentration de l'extrait.

20 Les proanthocyanidols ont en commun de se dégrader en anthocyanidols par hydrolyse acide et de se polymériser par oxydation en solution aqueuse en devenant de moins en moins solubles dans l'eau.

On trouve ainsi dans la nature des monomères tels que la catéchine, l'épicatéchine et des flavanes 3-4, diols, des oligomères d'un
25 poids moléculaire compris entre 600 et 1000, et des polymères d'un poids moléculaire plus élevé.

Un très grand nombre d'espèces végétales peuvent être utilisées comme source de procyanidols. Parmi celles-ci, on peut citer à titre d'exemple les plantes à proanthocyanidols (à l'exclusion d'autres proantho-
30 cyanidols) telles que *Pinus maritima*, *Cupressus sempervirens*, *Alpinia galanga*, les plantes à procyanidols et prodolphinidols telles que *Vitis*

vinifera, Vaccinum myrtillus, Fragaria vesca et des plantes à proanthocyanidols plus rares tels que les plantes à profisetinidols du genre Schinopsis et à proguibourtinidols extraits de divers Acacia.

5 Au cours de l'étude qui a mené à la présente invention, il a été montré que certains extraits avaient des propriétés anti-virales remarquables, notamment contre le virus de l'herpès, mais aussi que, ramenée au poids d'organe végétal sec utilisé l'activité des extraits variait de manière importante selon la technique d'extraction utilisée, le solvant et la purification de l'extrait.

10 En particulier, les techniques de concentration et de purification permettent d'éliminer non seulement des produits inactifs ou faiblement actifs, tels que les résidus insolubles d'organes végétaux, mais aussi des produits qui pourraient avoir une action antagoniste.

15 De préférence, ledit solvant est choisi dans le groupe de l'eau, des alcools linéaires ou ramifiés de moins de 5 atomes de carbone et leurs mélanges monophasés. Avantageusement, ledit solvant polaire est une solution hydroalcoolique, l'alcool choisi dans ce cas étant de préférence un alcool de 1 à 3 atomes de carbone, de préférence le méthanol.

20 L'extraction est une extraction solide/liquide et peut consister aussi bien en une décoction qu'une infusion à diverses températures.

25 L'extraction peut être menée de manière à éviter la dégradation des composés polyphénoliques visés. Pour ce faire, il est préférable d'éviter de trop hautes températures et de réduire la quantité d'oxygène en contact avec lesdits composés polyphénoliques. Ainsi, l'extraction peut être réalisée sous atmosphère inerte, par exemple sous azote.

30 Afin d'éviter toute dégradation des produits actifs de l'extrait, il est également préférable que la concentration s'effectue par élimination dudit solvant polaire à des températures relativement faibles et pendant une durée courte. Pour cette raison, l'élimination du solvant polaire se fait avantageusement sous pression réduite. Lorsque le solvant polaire contient une proportion importante d'eau, l'élimination du solvant polaire peut se faire par une lyophilisation.

L'élimination du solvant polaire se fait jusqu'à obtention d'un extrait sec. Cet extrait est repris deux fois de suite dans une proportion minimale d'eau distillée à une température comprise entre environ 15°C et 40°C, de préférence aux alentours d'environ 20°C (les zéros sauf indication contraire, ne sont pas des chiffres significatifs), puis filtré pour séparer les solubles des insolubles. Avantagement, l'eau distillée de reprise a un volume compris entre 1/10e et 1/100e du volume de solution alcoolique utilisée pour la décoction. A titre indicatif, le poids d'eau distillée est voisin de celui du poids d'organe végétal sec extrait. Les produits polyphénoliques selon l'invention se répartissent alors dans les deux phases selon des proportions variables et qui dépendent de l'origine de l'extrait et de la répartition des proanthocyanidols en fonction de leur poids moléculaire au sein du végétal. Les poids moléculaires élevés sont insolubles (supérieurs à $5 \cdot 10^3$), les poids moléculaires faibles (inférieurs à $5 \cdot 10^3$) sont solubles. Avantagement, pour des questions de facilité de formulation galénique, on utilise des proanthocyanidols solubles, c'est-à-dire des proanthocyanidols dont le poids moléculaire est inférieur à environ $5 \cdot 10^3$. La fraction ainsi obtenue représente de 1% à 20 % du poids initial d'organe sec.

A la suite de ces opérations, il est avantageux de poursuivre l'enrichissement par élimination des substances non proanthocyanidoliques. Cette élimination peut être réalisée par tout moyen connu en lui-même, mais est de préférence réalisée par des extractions liquide-liquide au moyen d'un solvant organique non miscible à l'eau successives dans le cas des proanthocyanidols hydrosolubles et par décoctions successives dans le cas des proanthocyanidols non hydrosolubles.

Plus précisément dans le cas des proanthocyanidols hydrosolubles, la purification est réalisée de la manière suivante :

- dissolution de l'extrait dans une phase aqueuse, avantagement le volume de la phase aqueuse sera voisin du volume utilisé à l'occasion de la dernière reprise à l'eau distillée spécifiée ci-dessus, le volume étant de préférence légèrement supérieur à cette dernière valeur ;

- extraction liquide/liquide au moyen de solvants dont la polarité est voisine de celle de l'éther éthylique et de l'acétate d'éthyle ou dont la polarité est intermédiaire aux valeurs de ces deux derniers solvants ;

5 - extraction de la phase aqueuse à l'aide d'un solvant non miscible à l'eau et de polarité supérieure à l'acétate d'éthyle. Avantagusement, un alcool ayant au plus 1 à 10 atomes de carbone et dont la chaîne est linéaire ou ramifiée, de préférence, les alcools non miscibles à l'eau en en toute proportion dont le nombre de carbones n'excède pas 6.

10 La purification par extraction au moyen d'éther ou d'acétate d'éthyle peut être réalisée en une ou plusieurs opérations d'extraction, avec un ou plusieurs solvants. De préférence on réalise cette étape d'extraction purificatrice en mettant en contact une ou plusieurs fois la phase aqueuse avec une phase étherée, puis en mettant une ou plusieurs fois la phase aqueuse ainsi purifiée avec une phase acétate d'éthyle. Les solvants utilisés
15 peuvent être récupérés par exemple par distillation, cependant que les extraits sont écartés dans ces extractions liquide-liquide les rapports O/A, c'est-à-dire phase organique sur phase aqueuse, sont avantagusement inférieurs à 1/2, de préférence entre 1/3 et 1/5.

20 Lorsqu'on utilise des solvants qui comme l'éther forment facilement des peroxydes, il est préférable avant tout usage d'éliminer ces derniers. Lorsque cette opération de purification par extraction est menée, en continu ; on peut utiliser des séries de mélangeurs/décanteurs fonctionnant à contre-courant. On peut ainsi réaliser plusieurs extractions successives sur la même phase aqueuse en utilisant des solvants dont la
25 polarité est croissante depuis l'éther jusqu'à l'acétate d'éthyle.

La phase alcoolique de la dernière étape qui contient les proanthocyanidols peut être lavée à l'eau puis évaporée et pourra être utilisée pour fabriquer des compositions pharmaceutiques. Cette fraction représente moins de 5 %, en général entre environ 0,01 et 2 % du poids de l'organe végétal sec.

30 Ces compositions pharmaceutiques seront particulièrement actives, car on aura éliminé de ces dernières toutes les parties de la plante

qui sont soit inefficace, soit antagoniste de l'action des proanthocyanidols. Ces extraits ayant une efficacité bien supérieure à celle de la plante elle-même. Ainsi, on aura éliminé les fractions contenant les insolubles dans ledit solvant polaire volatil tel que les lignines, les celluloses et les amidons.

Les compositions pharmaceutiques peuvent comporter des excipients ou des adjuvants utilisés pour une utilisation topique. Ces compositions contiennent entre 0,1 % et 5 % du produit obtenu par la présente invention.

Toutes les opérations ci-dessus sont avantageusement menées sous atmosphère inerte. Les fractions finales recueillies présentent une masse moléculaire supérieure à 1000, plus précisément 80 à 90 % des proanthocyanidols qui présentent un poids moléculaire supérieur à 1000.

Les essais in vitro et cliniques démontrent une remarquable activité jointe à une innocuité quasi-totale, c'est-à-dire dans ce cas non mesurable.

Les exemples non limitatifs suivants illustrent la présente invention.

Exemple 1 : Extrait hydrométhanolique de cônes de Cupressus sempervirens

200 g de cônes secs concassés sempervirens sont décoctés trois fois de suite pendant une demi-heure par 2000 ml de méthanol à 80 %. Les extraits hydrométhanoliques sont réunis et évaporés à sec sous pression réduite. On reprend ce résidu par 200 ml d'eau distillée à 20°C environ. On filtre. On reprend l'insoluble par 200 ml d'eau distillée à 20°C environ. On filtre. Les filtrats sont réunis. Le résidu de cette solution est d'environ 33 g soit un rendement de 16,5 %.

1.2 - Fraction procyanidolique

La solution aqueuse obtenue précédemment est ajustée à 400 ml par de l'eau distillée et extraite à contre courant par 5 fois 100 ml d'éther éthylique. La phase étherée est éliminée, l'éther éthylique est chassé de la phase aqueuse par évaporation sous pression réduite. On complète le volume de la solution aqueuse à 400 ml par de l'eau distillée, puis on extrait à contre courant par 5 fois 100 ml d'acétate d'éthyle.

La phase organique est éliminée. On chasse l'acétate d'éthyle de la solution aqueuse par évaporation sous pression réduite. On complète le volume de la solution à 400 ml par de l'eau distillée, puis on l'extrait à contre courant par 5 fois 100 ml de n-butanol. La phase butanolique est lavée par 2 fois 100 ml d'eau distillée puis évaporée à sec sous pression réduite. Ce résidu est dissous dans 20 ml de méthanol et la solution méthanolique est filtrée puis évaporée à sec. Le résidu est de 780 mg soit un rendement de 0,39 %.

Le produit ainsi obtenu chromatographié sur plaque de gel de silice, révèle l'absence de substances susceptibles de migrer dans le solvant acétate d'éthyle, acide formique, eau (8-1-1 V/V), ce qui indique l'absence de substances de bas poids moléculaires ($< 10^3$). Cette technique permet de suivre la purification du produit. D'autre part, ce résidu dissous dans un alcool et traité à chaud par de l'acide chlorhydrique donne lieu à la formation d'une coloration rouge. Une chromatographie sur plaque contre un témoin révèle la formation de cyanidine, à l'exclusion d'autre anthocyane. La détermination du poids moléculaire de ce résidu en perméation de gel en milieu non aqueux révèle une répartition de poids moléculaires de 1000 à 5000 environ, avec la présence minoritaire de polymères de haut poids moléculaire ($> 5.10^3$).

Exemple 2 : Extrait hydroéthanolique de rhizomes d'Alpinia galanga

2.1 - Extrait brut soluble

1 kg de rhizomes frais d'Alpinia galanga contenant 88 % d'eau sont broyés puis soumis à une première décoction d'une demi-heure dans 9,2 litres d'éthanol à 65,8 % afin de réaliser en fait une décoction de l'équivalent de 220 g de rhizomes secs par 10 l d'éthanol à 60 %. Puis les rhizomes sont décoctés deux fois de suite par 10 l d'éthanol à 60 % pendant une demi-heure. Les extraits sont réunis et évaporés à sec sous pression réduite. On reprend ensuite ce résidu par 220 ml d'eau distillée à 20°C environ et on filtre. L'insoluble est repris par 220 ml d'eau distillée à 20°C. Les filtrats sont réunis. Le résidu de cette solution aqueuse est de 38,4 g soit un rendement de 3,84 % par rapport aux rhizomes frais et de 17,45 % par rapport aux rhizomes secs.

2.2 - Fraction procyanidolique

La solution aqueuse précédente est traitée de la même façon que dans le cas de l'exemple 12 jusqu'à l'évaporation de la phase butanolique. Le résidu est alors lavé à 20°C environ par deux fois 20 ml d'eau distillée. le résidu final est de 104 mg soit un rendement de 0,01 % par rapport aux rhizomes frais et de 0,4 % par rapport aux rhizomes secs. Cette fraction présente les mêmes caractéristiques qualitatives que celles des cônes de *Cupressus sempervirens*. La mesure du poids moléculaire révèle un poids moyen de 4000.

Exemple 3 : Fraction procyanidolique insoluble de *Cupressus Sempervirens*

200 g de cônes secs concassés de *Cupressus sempervirens* sont décoctés trois fois de suite pendant une demi-heure par 2000 ml de méthanol à 80 %. Les extraits hydrométhanoliques sont réunis et évaporés à sec sous pression réduite. On lave ce résidu par deux fois 200 ml d'eau distillée à 20°C environ. Les eaux de lavage sont éliminées. Le résidu est séché sous vide au dessiccateur puis lavé à reflux par deux fois 200 ml d'éther éthylique. La phase étherée est éliminée. Le résidu est ensuite lavé par deux fois 200 ml d'acétate d'éthyle. La phase soluble dans l'acétate d'éthyle est éliminée. Puis le résidu est repris par 20 ml de méthanol à 20°C environ. La solution méthanolique est filtrée. Le résidu de cette solution méthanolique est de 1,74 g soit un rendement de 0,87 %. Cette fraction insoluble dans l'eau présente les mêmes caractéristiques qualitatives que la fraction soluble obtenue à l'exemple 1. La détermination des poids moléculaires indique la présence très prépondérante de molécules de hauts poids moléculaires ($> 5.10^4$).

Exemple 4 : Essais antiviraux in vitro

Les essais antiviraux ont été réalisés sur le virus de l'herpès simplex de type I implanté sur des fibroblastes de poumon embryonnaire humain. On a déterminé sur un même lot de dilution virale correspondant à une dose infectante 50 (DI 50) 105,7 virus par nuit, l'efficacité antivirale des différents produits procyanidoliques obtenus, c'est-à-dire la quantité de produit par nuit, c'est-à-dire 100 µl de milieu qui provoque une diminution de moitié de la DI 50.

5 A titre de comparaison, ont été testés également les oligomères (PM $< 10^3$) de Pinus maritima obtenus à partir d'écorce de Pinus maritima sèche comme dans le cas de l'exemple 1. On retrouve ces oligomères en solution dans l'acétate d'éthyle qui sert normalement au lavage du résidu de poids moléculaire plus élevé.

10	EXTRAIT	QUANTITE PROVOQUANT LA DIMINUTION DE MOITIE DE LA DI 50
	Procyanidols solubles de Cupressus sempervirens	4 µg/100 µl
	Procyanidols insolubles de Cupressus sempervirens	7,2 µg/100 µl
15	Procyanidols solubles d'Alpinia galanga	1 µg/100 µl
	Oligomères procyanidoliques de Pinus maritima	15,6 µg/100 µl

20 Exemple 5 : Essais de toxicité sur l'animal des proanthocyanidols obtenus dans les exemples précédents

La toxicité par voie orale de tous les proanthocyanidols obtenus recherchée chez la souris n'a pu être évaluée, les doses à intégrer dépassant les possibilités des animaux.

25 Les tests d'irritation primaire cutanée des mêmes produits ainsi que les tests d'irritation oculaire pratiqués chez le lapin en solution aqueuse à 5 % pour les fractions solubles ont permis de définir les produits comme non irritants. Les tests d'irritation primaire cutanée des protanthocyanidols insolubles en solution à 5 % dans un mélange à 50 % de mono-
 30 propylèneglycol et d'eau ont permis de définir ces produits comme non irritants comparativement à un mélange pur de mono-
 propylèneglycol et d'eau à 50 %.

Exemple 6 : Essais cliniques sur les procyanidols d'Alpinia galanga

Les essais cliniques ont été réalisés sur les proanthocyanidols d'Alpinia galanga obtenus à l'exemple 2.

5 L'étude a porté sur 140 malades, présentant des symptômes herpétiques débutant depuis moins de 24 heures, répartis comme suit :

. 24 femmes d'âges compris entre 17 et 47 ans présentant un herpès récurrent lié au cycle menstruel. Parmi elles, on comptait 18 cas d'herpès labial et 6 cas d'herpès touchant des régions diverses du corps non muqueuses (ailes du nez, fesses, joues).

10 . 116 hommes d'âges compris entre 19 et 54 ans présentant tous un herpès labial.

Les femmes ont été réparties en quatre groupes :

- 15 . un groupe témoin d'herpès labial récurrent,
. un groupe essai de la même affection soit à chaque fois 9 personnes,
. un groupe témoin d'herpès divers,
. un groupe essai d'herpès divers, soit à chaque fois 3 personnes.

Les hommes ont été répartis en deux groupes égaux de 58 personnes, un groupe essai et un groupe témoin aussi homogène que possible.

20 Les témoins sont traités jusqu'à disparition des lésions à raison d'une application à 7h, 9h, 11h, 13h, 15h, 17h et 19 h pendant trois jours puis d'une application matin, midi et soir jusqu'à la fin d'un gel placebo de composition suivante :

- 25 Polyacrylate de sodium réticulé : 0,75 %
Caramel : qs pour coloration
Conservateurs : paraoxybenzoate de propyle et de méthyle :
0,35%
Eau distillée : qs 100 %.

Les groupes essais sont traités dans les mêmes conditions que les témoins avec un gel de la composition suivante :

- 30 Polyacrylate de sodium réticulé : 0,75 %
Fraction polysaccharidique : 2 %
Conservateurs : paraoxybenzoate de propyle et de méthyle :
0,35 %
Eau distillée : qs 100 %.

Résultats :

On apprécie le temps que met la lésion à disparaître complètement ne laissant plus qu'une trace cicatricielle totalement fermée et sèche.

5	Groupe témoin des hommes :	5ème jour :	1
		6ème jour :	4 et 1 abandon
		7ème jour :	4
		8ème jour :	16 et 2 abandons
		9ème jour :	11
10		10ème jour :	14
		11ème jour :	2
		12ème jour :	3
	Groupe essai des hommes :	1er jour :	1
15		2ème jour :	5
		3ème jour :	37
		4ème jour :	12
		5ème jour :	1
		6ème jour :	0
20		7ème jour :	1 abandon
		8ème jour :	1
	Premier groupe témoin des femmes :		
		5ème jour :	1
		6ème jour :	1
25		7ème jour :	4
		8ème jour :	0
		9ème jour :	2 abandons
		10ème au 15ème jour :	0
30		16ème jour :	1

Premier groupe essai des femmes :

5
2ème jour : 1
3ème jour : 2
4ème jour : 2
6ème jour : 2
9ème jour : 2

Deuxième groupe témoin des femmes :

10
13ème jour : 2
17ème jour : 1

Deuxième groupe essai des femmes :

15
4ème jour : 1
8ème jour : 2

Outre une efficacité importante du produit, on note chez tous les sujets traités une excellente tolérance au traitement, aucun effet secondaire n'ayant été signalé, les abandons en cours d'essai ne sont pas liés à une intolérance au produit.

REVENDICATIONS

1. Produit polyphénolique, caractérisé par le fait qu'il peut être obtenu par extraction à partir d'organes végétaux, au moyen d'un solvant polaire volatil et par concentration de l'extrait.
- 5 2. Produit selon la revendication 1, caractérisé par le fait que ledit solvant polaire est choisi dans le groupe de l'eau, des alcools linéaires ou ramifiés de moins de 5 atomes de carbone et leurs mélanges.
3. Produit selon la revendication 2, caractérisé par le fait que ledit solvant polaire est une solution hydro-alcoolique.
- 10 4. Produit selon l'une des revendications 1 à 3 prises séparément, caractérisé par le fait que l'étape de concentration comporte une évaporation dudit solvant polaire sous pression réduite.
5. Produit selon l'une des revendications 2 à 4 prises séparément, caractérisé par le fait que ledit solvant polaire est choisi dans le groupe
15 des alcools linéaires ou ramifiés ayant au plus 5 atomes de carbone et leurs mélanges avec l'eau et par le fait qu'après évaporation dudit solvant polaire, le résidu est repris dans une phase aqueuse, puis filtré et soumis à une nouvelle évaporation de la phase aqueuse.
6. Produit selon les revendications 4 et 5 prises séparément,
20 caractérisé par le fait que l'étape de concentration comporte l'élimination des molécules les plus légères et les plus lourdes pour obtenir un poids moléculaire moyen entre 10^3 et 5.10^3 .
7. Composition pharmaceutique, caractérisée par le fait qu'elle comporte le produit selon les revendications 1 à 6.
- 25 8. Composition pharmaceutique selon la revendication 7, caractérisée par le fait qu'elle comporte en outre des excipients et des adjuvants utilisés pour une utilisation topique.
9. Utilisation du produit selon l'une des revendications 1 à 6, pour fabriquer des compositions pharmaceutiques antivirales.