



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

| | | |
|--|----|--|
| <p>(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C07D 207/16, A61K 7/48 A61K 7/06, 7/00, 9/127 A61K 31/40, 7/48</p> | A1 | <p>(11) Numéro de publication internationale: WO 92/15563</p> <p>(43) Date de publication internationale: 17 septembre 1992 (17.09.92)</p> |
| <p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/00164</p> <p>(22) Date de dépôt international: 24 février 1992 (24.02.92)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 91/02420 28 février 1991 (28.02.91) FR</p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): PARFUMS CHRISTIAN DIOR [FR/FR]; 33, avenue Hoche, F-75008 Paris (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): RENIMEL, Isabelle [FR/FR]; 165, rue de l'Ane-Vert, F-45470 Trainou (FR). ANDRE, Patrice [FR/FR]; 9, rue Charles-Vappereau, F-45170 Neuville-aux-Bois (FR). THIERY, Valérie [FR/FR]; 146, rue Maréchal-Foch, F-45370 Clery-St.-André (FR). GUILLAUMET, Gérald [FR/FR]; 2, rue Auguste-Renoir, F-45100 Orléans (FR).</p> | | <p>(74) Mandataires: PORTAL, Gérard etc.; Cabinet Beau de Loménie, 55, rue d'Amsterdam, F-75008 Paris (FR).</p> <p>(81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, KR, LU (brevet européen), MC (brevet européen), NL (brevet européen), RU, SE (brevet européen), US.</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p> |
| <p>(54) Title: USE OF CUCURBITIN FOR THE PREPARATION OF A COSMETIC OR PHARMACEUTICAL, PARTICULARLY DERMATOLOGICAL, ANTIALLERGENIC COMPOSITION AND METHOD INVOLVING APPLICATION THEREOF</p> <p>(54) Titre: UTILISATION DE LA CUCURBITINE POUR LA PREPARATION D'UNE COMPOSITION COSMETIQUE OU PHARMACEUTIQUE, NOTAMMENT DERMATOLOGIQUE, ANTI-ALLERGIQUE, ET PROCÉDE EN COMPORTANT APPLICATION</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns the use of cucurbitine or extracts of cucurbitaceous seeds for the preparation of a cosmetic or pharmaceutical, particularly dermatological, composition having antiallergenic activity, or for the preparation of cosmetic or pharmaceutical compositions with reduced risk of producing allergy.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention concerne l'utilisation de la cucurbitine ou d'extraits de pépins de cucurbitacée pour la préparation d'une composition cosmétique ou pharmaceutique, notamment dermatologique, à activité antiallergique, ou pour la préparation de compositions cosmétiques ou pharmaceutiques à risque allergisant réduit.</p> | | |

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

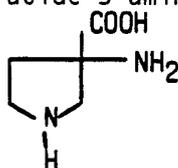
| | | | | | |
|----|---------------------------|----|--|----|-----------------------|
| AT | Autriche | FI | Finlande | ML | Mali |
| AU | Australie | FR | France | MN | Mongolie |
| BB | Barbade | GA | Gabon | MR | Mauritanie |
| BE | Belgique | GB | Royaume-Uni | MW | Malawi |
| BF | Burkina Faso | GN | Guinée | NL | Pays-Bas |
| BG | Bulgarie | GR | Grèce | NO | Norvège |
| BJ | Bénin | HU | Hongrie | PL | Pologne |
| BR | Brésil | IE | Irlande | RO | Roumanie |
| CA | Canada | IT | Italie | RU | Fédération de Russie |
| CF | République Centrafricaine | JP | Japon | SD | Soudan |
| CG | Congo | KP | République populaire démocratique de Corée | SE | Suède |
| CH | Suisse | KR | République de Corée | SN | Sénégal |
| CI | Côte d'Ivoire | LI | Liechtenstein | SU | Union soviétique |
| CM | Cameroun | LK | Sri Lanka | TD | Tchad |
| CS | Tchécoslovaquie | LU | Luxembourg | TG | Togo |
| DE | Allemagne | MC | Monaco | US | Etats-Unis d'Amérique |
| DK | Danemark | MG | Madagascar | | |
| ES | Espagne | | | | |

Utilisation de la cucurbitine pour la préparation d'une composition cosmétique ou pharmaceutique, notamment dermatologique, anti-allergique, et procédé en comportant application.

05 La présente invention concerne essentiellement l'utilisation de la cucurbitine pour la préparation de compositions cosmétiques ou pharmaceutiques, notamment dermatologiques, anti-allergiques, et un procédé en comportant application.

La cucurbitine, ou acide 3-amino-3-pyrrolidinecarboxylique, de formule I, suivante :

10



(I)

est un acide aminé naturel soluble dans l'eau que l'on trouve dans les cucurbitacées (voir V.H. Mhiranian et al., LLOYDIA (1968), 31 (1) 23-29).

15

La cucurbitine est connue comme anti-parasitaire, en particulier comme anthelminitique contre *Schistosoma japonicum*. (Morimoto Y. et al., Chem. Pharm. Bull. (1987) 35 (9) 3845-3849).

20

La cucurbitine peut être obtenue par voie d'extraction sous forme lévogyre ou par voie de synthèse sous forme racémique. Parmi les diverses méthodes de synthèse de cucurbitine, on peut citer particulièrement la méthode de synthèse de H.J. Monteiro, J. Chem. Soc., Chem. Commun. (1973) 2. Cette méthode ne conduit qu'à des rendements relativement faibles en cucurbitine racémique. Une autre méthode de synthèse permet d'obtenir séparément l'un et l'autre isomère optique de la cucurbitine. Il s'agit de la méthode de Morimoto et al., Chem. Pharm. Bull. (1987) 35 (9) 3845-3849, qui est une méthode de synthèse par voie enzymatique stéréospécifique par l'emploi d'une estérase de foie de porc. Cette méthode est cependant compliquée, et nécessite un nombre d'étapes relativement élevé.

30

35 Il a maintenant été découvert de manière inattendue que la cucurbitine inhibait la formation d'histamine, médiateur bien connu des allergies, et présentait donc une activité hypohistaminémiante précieuse. Cette activité hypohistaminémiante résulte de l'action inhibitrice de la cucurbitine sur l'histidine décarboxylase qui est l'enzyme responsable de la trans-

formation de l'histidine en histamine. De ce fait, l'administration de la cucurbitine contribue à diminuer la concentration d'histamine dans le sérum sanguin et les tissus.

Ceci constitue un progrès technique important car les manifestations allergiques, notamment les allergies pulmonaires et cutanées, posent aujourd'hui de nombreux problèmes aux thérapeutes qui disposent d'un nombre limité de substances actives et en outre, certaines de ces substances peuvent présenter des effets secondaires. Ainsi, la mise au point d'une nouvelle composition préventive et curative des allergies constitue donc un besoin important.

Ainsi, la présente invention a pour objet principal de résoudre le problème technique consistant en la fourniture d'une solution permettant d'inhiber la formation d'histamine, agent médiateur dans le cadre des manifestations allergiques, afin de permettre la prévention et le traitement des manifestations allergiques.

Selon un autre aspect, la présente invention a pour objet principal de résoudre le problème technique consistant en la fourniture d'une solution permettant de prévenir et de traiter les manifestations allergiques.

La présente invention a encore pour but de résoudre le nouveau problème technique consistant en la fourniture d'une solution permettant de diminuer le potentiel allergisant des compositions cosmétiques ou pharmaceutiques, notamment dermatologiques.

La présente invention a encore pour but de résoudre le nouveau problème technique consistant en la fourniture d'une solution permettant de réaliser la synthèse de la cucurbitine par un procédé de synthèse simple, nécessitant un minimum d'étapes, en de bons rendements.

La présente invention permet de résoudre l'ensemble de ces problèmes techniques d'une manière simple, fiable et reproductible, utilisable à l'échelle industrielle.

Ainsi, selon un premier aspect, la présente invention concerne l'utilisation de la cucurbitine ou de l'un de ses sels ou esters, ou d'un extrait de plante en contenant, pour la préparation

d'une composition cosmétique ou pharmaceutique, notamment dermatologique, à activité antiallergique.

Selon une variante de réalisation particulière, il s'agit de la préparation d'une composition cosmétique ou pharmaceutique, notamment dermatologique, destinée à la prévention ou au traitement symptomatique des manifestations allergiques, quelle qu'en soit l'origine et le point d'application, notamment les bronches, la peau et l'oeil. Ainsi, ladite composition est destinée notamment à la prévention ou au traitement symptomatique de l'asthme bronchique allergique ou de l'effort, du rhume des foins, des rhinites et trachéites spasmodiques, de l'urticaire autres éruptions allergiques, de l'eczéma, rougeurs ou irritations cutanées d'origine allergique, des prurits, de l'oedème de Quincke, des conjonctivites allergiques, ainsi que des réactions allergiques d'origine médicamenteuse.

Dans le domaine plus particulier de la cosmétologie, ladite composition est destinée avantageusement aux lignes de produits hypoallergéniques ou pour peaux sensibles ou irritables.

La cucurbitine peut être utilisée soit sous forme libre, soit sous forme de l'un de ses sels ou de ses esters cosmétiquement ou pharmaceutiquement, notamment dermatologiquement, acceptables. Les sels et esters précités peuvent être préparés par des procédés classiques bien connus de l'homme de l'art. Parmi les sels, citons le mono- et dibromohydrate et le mono- et dichlorhydrate. Parmi les esters, citons l'ester méthylique et l'ester éthylique.

Suivant une variante avantageuse, l'extrait de plante précité contenant de la cucurbitine est un extrait de cucurbitacée, en particulier de Cucurbita maxima Duch., de Cucurbita pepo L. ou de Cucurbita moschata Duch ; de préférence, il s'agit d'un extrait de pépins ou de pulpe de fruit. Encore de préférence, il s'agit d'un extrait de pépins de Cucurbitacée.

Selon une variante de réalisation avantageuse, la cucurbitine ou l'un de ses sels ou de ses esters cosmétiquement ou pharmaceutiquement, notamment dermatologiquement, acceptable est présente à une concentration de 0,001 % à 10 %, de préférence de 0,01 à 5 %, en poids de la composition totale.

05 Selon un deuxième aspect, la présente invention concerne aussi une composition cosmétique, caractérisée en ce qu'elle comprend, comme ingrédient actif, de la cucurbitine ou l'un de ses sels ou esters cosmétiquement acceptable ou un extrait de plante en contenant, éventuellement dans un excipient, véhicule ou support cosmétiquement acceptable.

Suivant une variante avantageuse, l'extrait de plante précité est un extrait de cucurbitacée tel que précédemment défini.

10 Selon une variante de réalisation préférée, la cucurbitine ou l'un de ses sels ou esters est présente en une quantité efficace pour présenter une activité antiallergique, en particulier à une concentration de 0,001% à 10 % de préférence de 0,01% à 5% en poids de la composition totale.

15 Selon un troisième aspect, la présente invention concerne une composition pharmaceutique, notamment dermatologique, de préférence à activité anti-allergique, caractérisée en ce qu'elle contient de la cucurbitine ou l'un de ses sels ou esters pharmaceutiquement acceptables en une quantité efficace pour présenter une activité antiallergique, en particulier pour prévenir ou traiter
20 les manifestations allergiques, notamment au niveau des bronches, de la peau et de l'oeil, éventuellement dans un excipient, véhicule ou support pharmaceutiquement acceptable.

25 Suivant une variante, les compositions cosmétiques et pharmaceutiques précitées contiennent un extrait d'origine végétale tel que précédemment défini.

30 Selon un quatrième aspect, la présente invention concerne encore un procédé pour diminuer le potentiel allergisant d'une composition cosmétique ou pharmaceutique, notamment dermatologique, caractérisé en ce qu'on incorpore à ladite composition une quantité efficace de cucurbitine sous forme libre ou sous forme de l'un de ses sels ou esters cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptable, ou d'un extrait végétal en contenant tel que précédemment défini, de sorte que la composition finale présente un risque allergisant réduit.

35 Dans le cadre de l'un quelconque des aspects précédents, la concentration pondérale préférée en cucurbitine, ou en ses

sels ou esters pour les compositions à usage topique, est comprise entre 0,001 % et 10 %, de préférence encore entre 0,01 % et 5 %.

Pour les compositions destinées à l'administration par voie générale (telle que voie orale, parentérale, rectale, inhalations,...) la concentration en cucurbitine n'est pas critique et peut atteindre par exemple 60 % de la composition. La posologie chez l'homme sera généralement comprise entre 0,1 mg/kg/jour et 20 mg/kg/jour et de préférence entre 1 mg/kg/jour et 15 mg/kg/jour.

Par ailleurs, on utilise généralement la cucurbitine naturelle, de forme lévogyre, ou ses sels ou esters. Des sources de cucurbitine lévogyre particulièrement intéressantes sont la pulpe et les pépins des cucurbitacées, en particulier des espèces *Cucurbita pepo* L., *Cucurbita maxima* Duch., *Cucurbita moschata* Duch. Cependant, on peut également utiliser la forme racémique de la cucurbitine ou de ses sels ou esters.

Par ailleurs, la cucurbitine peut être utilisée sous forme pure, ou sous forme d'extraits, selon l'une quelconque des procédures d'extraction connues à l'homme de l'art. Des procédures d'extraction particulièrement intéressantes sont décrites dans la publication de Valentine H. MIHRANIAN et al. dans *Lloydia* 1968, 31, (1) 23-29 qui est incorporée ici par référence, en particulier page 24. Ce procédé prévoit avantagement de traiter des graines de cucurbitacée décortiquées et dégraissées avec de l'eau avantagement chauffée à au moins 50°C sous agitation constante pendant plusieurs heures. Ensuite le mélange est centrifugé, le surnageant recueilli et les résidus réextraits une ou plusieurs fois de manière similaire avec plusieurs fractions d'eau chauffée. Le surnageant et les lavages sont recombinaés puis traités par addition dans un volume équivalent d'éthanol à 85 % pour précipiter les matériaux protéiniques en suspension et l'ensemble est maintenu au réfrigérateur toute la nuit. Le mélange est ensuite centrifugé et le surnageant est recueilli. L'alcool peut être enlevé par distillation par exemple dans un évaporateur rotatif. La solution aqueuse peut être utilisée telle quelle ou bien être ensuite passée sur une colonne de chromatographie par exemple type Dowex 50W-X-8 par exemple mesurant 75 x 2,2 cm. La colonne est lavée avec environ

200 ml d'eau puis éluée avec une solution d'hydroxyde d'ammonium aqueuse à 1 % jusqu'à ce que l'effluent donne une réponse négative au test à la ninhydrine. L'éluat peut être évaporé à sec sous pression réduite éventuellement en chauffant. Le résidu sirupeux
05 peut encore être utilisé tel quel ou bien à nouveau traité à l'eau chaude et avantageusement ajouté en un volume au moins équivalent d'éthanol à 95 %. Ensuite, on peut acidifier goutte à goutte avec un acide pour amener le pH de la solution à pH environ égal à 5, par exemple avec l'acide perchlorique à 60 %. On peut ensuite
10 placer dans un réfrigérateur pendant plusieurs jours pour obtenir un précipité de perchlorate de cucurbitine. Ce précipité peut ensuite être dissous dans quelques millilitres d'eau et éventuellement passé dans une colonne de chromatographie, de préférence de type Amberlite CG-45, par exemple mesurant 20 x 1,5 cm. L'évaporation
15 de l'éluat sous pression réduite donne la cucurbitine à l'état sensiblement pur.

Ainsi, le procédé précédent permet d'obtenir soit de la cucurbitine à l'état pur, soit des extraits ayant des teneurs variables en cucurbitine. Dans le cas où l'on utilise la cucurbitine sous forme d'extrait de cucurbitacée, la teneur en cucurbitine
20 est de préférence au moins égale à 0,5 % en poids de l'extrait. Une source préférée d'obtention de cucurbitine est constituée par les pépins de l'espèce *Cucurbita*, telles que *Cucurbita pepo* L., *Cucurbita maxima* Duch. et *Cucurbita moschata* Duch.

25 Selon un cinquième aspect, la présente invention couvre également un procédé de traitement d'un être humain ou d'un animal, pour prévenir ou traiter les manifestations allergiques, caractérisé en ce qu'on administre audit être humain ou audit animal une quantité efficace pour prévenir ou traiter les manifestations
30 allergiques de cucurbitine ou de l'un de ses sels ou esters pharmaceutiquement acceptables, ou d'un extrait végétal en contenant tel que précédemment défini.

En particulier, le traitement précité s'applique à la
35 prévention ou au traitement symptomatique de l'asthme bronchique allergique ou de l'effort, du rhume des foins, des rhinites et trachéites spasmodiques, de l'urticaire et autres éruptions aller-

giques, de l'eczéma, rougeurs ou irritations cutanées d'origine allergique, des prurits, de l'oedème de Quincke, des conjonctivites allergiques, ainsi que des réactions allergiques d'origine médicamenteuse.

05 Selon une variante de réalisation, on administre la cucurbitine ou l'un de ses sels ou esters pharmaceutiquement acceptables par voie topique à une concentration comprise de préférence entre 0,001% et 10% en poids.

10 Selon une autre variante de réalisation, on administre la cucurbitine ou l'un de ses sels ou esters pharmaceutiquement acceptables par voie générale à une posologie chez l'homme comprise entre 0,1 mg/kg/jour et 20 mg/kg/jour et de préférence entre 1 mg/kg/jour et 15 mg/kg/jour.

15 L'invention concerne encore un procédé de préparation d'une composition cosmétique ou pharmaceutique, notamment dermatologique, caractérisé en ce qu'on incorpore la cucurbitine ou l'un de ses sels ou esters cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptables, ou d'un extrait végétal en contenant tel que précédemment défini, dans un support, véhicule ou excipient cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptable.

20 Selon une variante de réalisation, la cucurbitine ou un de ses sels ou esters cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptables est incorporé dans une formulation cosmétique ou pharmaceutique complète pour diminuer le risque allergisant de celle-ci.

25 Selon une autre variante de réalisation, on prépare une composition à activité antiallergique. Des variantes de préparation résultent également de la description précédente.

30 Suivant un mode particulier de réalisation de l'invention dans le cadre de l'un quelconque des aspects exposés plus haut, la composition précitée contenant la cucurbitine ou un de ses sels ou esters ou l'extrait de plante précité contient en outre des vésicules de type liposome. Selon une variante particulière, la cucurbitine, son sel ou ester, est encapsulée, au moins en partie, dans des vésicules de type liposome. Par l'expression "vésicule de type liposome", on entend aussi bien des phases lamellaires lipidiques hydratées que des vésicules lipidiques formées de lipides amphi-

philes ioniques ou non-ioniques. Egalement, par l'expression "incorporer au moins en partie dans des vésicules de type liposome", on entend dans la présente description et les revendications que la cucurbitine, son sel ou ester est combiné à des vésicules de type liposome quelle que soit la forme de cette combinaison. Cependant, une combinaison préférée réside dans l'encapsulation de la cucurbitine, son sel ou ester dans des vésicules de type liposome. Mais il n'est pas nécessaire que la totalité soit incorporée ou encapsulée pour obtenir l'effet anti-allergique recherché selon l'invention.

On sait que les vésicules de type "liposome" sont préparées à partir de substances lipidiques. Le terme "lipidique" couvre toutes les substances comprenant une chaîne carbonée dite grasse, comportant généralement plus de 5 atomes de carbone, cette substance étant habituellement dénommée "lipide".

Selon l'invention, on utilise à titre de lipide, pour former soit les phases lamellaires lipidiques, soit les vésicules de type liposome, des lipides amphiphiles, c'est-à-dire constitués de molécules possédant un groupe hydrophile indifféremment ionique ou non ionique et un groupe lipophile, ces lipides amphiphiles étant susceptibles de former des phases lamellaires lipidiques ou des vésicules de type liposome en présence d'une phase aqueuse.

En particulier, parmi ces lipides, on peut citer : les phospholipides, les phosphoaminolipides, les glycolipides, les alcools gras polyoxyéthylénés, les esters de polyol éventuellement polyoxyéthylénés. De telles substances sont par exemple constituées par une lécitine d'oeuf ou de soja éventuellement hydrogénées, une phosphatidylcholine, une phosphatidylsérine, une sphingomyéline, un cérébroside ou un stéarate de polyglycérol oxyéthyléné.

L'incorporation dans des phases lamellaires lipidiques hydratées ou dans des liposomes des composés utilisés conformément à la présente invention peut être réalisée selon des techniques de préparation connues, décrites par exemple dans le document US-A-4 508 703 et éventuellement en combinaison avec le document US-A-4 621 023.

Selon un septième aspect, la présente invention couvre encore un procédé de synthèse de la cucurbitine, caractérisé en ce qu'on utilise comme produit de départ de la 1-benzyl-3-pyrrolidinone.

05 Selon une variante de réalisation particulière de ce procédé de synthèse, on traite la 1-benzyl-3-pyrrolidinone avec une solution ammoniacale de chlorure d'ammonium et de cyanure de potassium, pour obtenir la (+)3-amino-1-benzyl-3-cyano-pyrrolidine. On transforme ensuite ce composé par hydrolyse acide ou basique en
10 acide (+)3-amino-1-benzyl-3-pyrrolidinecarboxylique, et enfin on procède à une réduction hydrogénée, de préférence une hydrogénéolyse catalytique pour obtenir l'acide (+)3-amino-3-pyrrolidinecarboxylique ou (+)cucurbitine.

 Suivant une variante préférée, la solution ammoniacale
15 précitée est une solution hydroalcoolique, l'alcool étant avantageusement de l'isopropanol ou du méthanol.

 Suivant une autre variante préférée, l'hydrolyse précitée est effectuée au moyen d'une solution aqueuse 6 N d'acide bromhydrique.

20 Selon encore une autre variante, l'hydrogénéolyse catalytique est effectuée dans l'eau sous hydrogène à pression atmosphérique en présence d'un catalyseur tel que du palladium sur charbon dispersé dans le milieu réactionnel aqueux.

 Selon un mode de réalisation préféré du procédé de
25 synthèse, on laisse réagir la 1-benzyl-3-pyrrolidinone avec le chlorure d'ammonium et le cyanure de potassium dans un rapport molaire 1/4/4 à la température ambiante pendant au moins 48 h.

 Selon une autre variante de réalisation particulière, on
30 sépare les isomères optiques du mélange racémique, selon toute technique de séparation connue de l'homme de l'art, et en particulier par l'intermédiaire de la préparation de diastéréoisomères.

 Le procédé de synthèse de la cucurbitine selon l'invention conduit à des rendements particulièrement élevés en cucurbitine racémique, en moyenne 2 à 3 fois plus élevés que ceux des
35 procédés connus.

D'autres buts, caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront clairement à la lumière de la description explicative qui va suivre faite en référence à divers exemples de préparation de cucurbitine, ainsi qu'à divers exemples rapportant les résultats d'essais pharmacologiques, ainsi que divers exemples de formulation cosmétique ou pharmaceutique. Dans les exemples, les pourcentages sont donnés en poids, sauf indication contraire.

10

Exemple 1Synthèse de la cucurbitine sous forme de mélange racémique

On procède de la manière suivante :

a) Synthèse de la (+)3-amino-1-benzyl-3-cyano-pyrrolidine

0,5 g de 1-benzyl-3-pyrrolidinone (2,85 mmol) dissous dans 3 ml de propanol-2 sont ajoutés à une solution de 0,741 g (11,4 mmol) de cyanure de potassium et de 0,615 g (11,4 mmol) de chlorure d'ammonium dans 7 ml d'ammoniaque à 28 %. Le mélange reste à température ambiante sous agitation pendant 3 jours. La solution est lavée avec 15 ml d'une solution de carbonate de potassium à 10 %, et extraite au dichlorométhane (3 xc 15 ml). Après séchage sur sulfate de magnésium et évaporation des solvants, on obtient une huile (0,475 g).

20

On purifie sur colonne de silice avec dépôt solide. On élue avec un mélange éther-éther de pétrole 4 : 2.

25

On obtient 0,402 g d'un solide beige (rendement : 70%) constitué par la 3-amino-1-benzyl-3-cyano-pyrrolidine ayant le spectre RMN suivant :

RMN¹H, 300 MHz, CDCl₃

1,8 (s large, 2H, NH₂) ; 1,97 (ddd, 1H, J_{4,4'} = 13,4, J_{4,5} = 8, J_{4,5'} = 5,4) ; 2,5 (ddd, 1H, J_{4,4'} = 8, J_{4,5} = 8, J_{4',5'} = 5,4) ; 2,64 (d, 1H, J_{2,2'} = 9,4) ; 3,04 (d, 1H, J_{2',2} = 9,4) ; 3,67 (s, 2H, CH₂-C₆H₅) ; 7,33 (m, 5H, protons aromatiques).

30

b) Synthèse de l'acide (+)3-amino-1-benzyl-3-pyrrolidinecarboxylique ou (+)1-benzyl-cucurbitine

On peut réaliser l'hydrolyse du composé précédemment obtenu soit en milieu acide, soit en milieu basique.

05 Hydrolyse en milieu acide :

0,3 g (1,49 mmol) de 3-amino-1-benzyl-3-cyano-pyrrolidine, obtenue à l'étape a) dissous dans 5 ml d'acide bromhydrique à 48 %, sont portés à 40-50°C pendant 4 h. Après évaporation de l'acide, on purifie sur colonne de silice. Les impuretés sont éliminées par CH₂Cl₂/MeOH 10 % et l'acide est sorti par MeOH/H₂O 15 %.

Après élimination du méthanol, on décolore le composé au noir animal dans un minimum aqueux à chaud puis on lyophilise.

15 On obtient un solide jaune foncé (rendement : 80%) constitué par l'acide (+)3-amino-1-benzyl-3-pyrrolidinecarboxylique sous forme mono- ou dibromhydrate ayant le spectre RMN suivant :

RMN¹H, 300 MHz, D₂O
2,47-2,69 (m, 1H, H₄) ; 2,75-2,91 (m, 1H, H₄') ; 3,69-3,94 (m, 3H, H₅, H₅', H₂) ; 4,12 (d, J_{2,2'} = 14,2, 1H, H₂) ; 4,58 (2d, J = 13,8, 2H, CH₂-C₆H₅) ; 7,62 (s, 5H, protons aromatiques).

20 Hydrolyse en milieu basique :

On dissout 280 mg (1,39 mmol) de 3-amino-1-benzyl-3-cyano-pyrrolidine de l'étape a) dans 2 ml d'éthanol. On ajoute 5 ml d'une solution de soude à 10 % puis on porte à reflux pendant 5 h. Après refroidissement, on acidifie avec de l'acide bromhydrique à 48 %.

30 On purifie sur colonne de silice : MeOH/H₂O 10 %. On décolore au noir animal puis on lyophilise. La présence des sels de bromure de sodium entraîne l'obtention d'un rendement supérieur à 100 %.

Pour éliminer les sels présents, on prélève 200 mg de pyrrolidine que l'on porte à pH = 8 avec une solution de soude à 10 %. On charge la Duolite Cl⁻ avec une solution d'acide bromhydrique 2N. On élimine les sels avec de l'eau distillée. Pour décro-

cher la pyrrolidine, on utilise une solution d'acide bromhydrique 0,1 N.

Après lyophilisation, on obtient 120 mg d'acide (+)3-amino-1-benzyl-3-pyrrolidinecarboxylique (rendement : 40%).

05

c) Synthèse de l'acide (+)3-amino-3-pyrrolidinecarboxylique ou (+)cucurbitine

300 mg de bromhydrate d'acide (+)3-amino-1-benzyl-3-pyrrolidinecarboxylique obtenu à l'étape b) sont dissous dans 10 ml d'eau. On disperse 0,5 mg de charbon à 10 % de palladium, puis on place cette suspension en atmosphère d'hydrogène sous pression atmosphérique. L'agitation est maintenue pendant 18 h. Après filtration sur papier-filtre et lyophilisation, on obtient un solide jaune (98 %) constitué par l'acide (+)3-amino-3-pyrrolidinecarboxylique ou (+)cucurbitine ayant le spectre RMN suivant :

15

RMN¹H, 300 MHz, D₂O

2,45 (m, 1H, H₄) ; 2,69 (m, 1H, H₄) ; 3,61 (d, 1H, J_{2,2'} = 13,4) ; 3,67-3,78 (m, 2H, H₅, H₅) ; 4 (d, 1H, J_{2',2} = 13,4).

20

Exemple 2

Optimisation du rendement de la synthèse de la (+)cucurbitine

On opère comme indiqué comme à l'exemple 1, en choisissant à l'étape b) l'hydrolyse par l'acide bromhydrique 6 N, en faisant toutefois varier la proportion des réactifs de l'étape a).

25

Les rendements obtenus figurent au tableau I ci-après.

TABLEAU I

| | Nombre équivalents | | | Conditions expérimentales de l'étape a) | Rendement | |
|----|--------------------|--------------------------|-----|---|-----------|--------|
| | N.B.P | moles NH ₄ Cl | KCN | | CN | COOH |
| 30 | 1 | 1-1 | 1 | 6 h température ambiante | * | < 10 % |
| 35 | 1 | 1-1 | 1 | 4 h 40°-50° | * | < 10 % |
| | 1 | 4 | 4 | 4 h 40°-50° | * | 20 % |

TABLEAU I (suite)

| 05 | Nombre équivalents | | | Conditions expérimentales de l'étape a) | Rendement | |
|----|--------------------|-----------------------------|-----|---|-----------|------|
| | N.B.P | moles NH ₄ Cl | KCN | | CN | COOH |
| | 1 | 8 | 8 | 4 h 40 ⁰ -50 ⁰ | * | 20 % |
| 10 | 1 | 4 | 4 | 48 h température ambiante | 66 % | 44 % |
| | 1 | 4 | 4 | 72 h température ambiante | 70 % | 49 % |
| | 1 | 4 | 4 | 84 h température ambiante | 70 % | 56 % |

N.B.P. : 1-benzyl-3-pyrrolidinone

15 * : amino-nitrile non isolé

CN : rendement en 3-amino-1-benzyl-3-cyano-pyrrolidine

COOH : rendement global en acide 3-amino-3-pyrrolidinecarboxy-
lique

20 La dernière colonne du tableau I contient les rendements en (+)cucurbitine par rapport aux réactifs de départ.

On observe que les rendements sont maximums si la réaction est menée à température ambiante pendant une durée supérieure à 48 h en utilisant des proportions 1/4/4 entre les réactifs : 1-
25 benzyl-3-pyrrolidone, chlorure d'ammonium et cyanure de potassium.

On a par ailleurs observé que l'hydrolyse au moyen de l'acide bromhydrique conduisait également à de meilleurs rendements que lorsque l'on utilise de l'acide chlorhydrique, à la même concentration, comme agent d'hydrolyse.

30

Exemple 3

Séparation des isomères optiques de la cucurbitine

La méthode de séparation, connue en elle-même, est basée sur la préparation de dérivés diastéromères par couplage de la
35 (+)cucurbitine avec certains réactifs optiquement actifs, après protection de la fonction acide par estérification et de la fonc-

tion amine cyclique. Chaque forme de ces stéréoisomères, correspondant à l'un ou l'autre isomère de la cucurbitine, sera isolée par chromatographie, notamment par chromatographie liquide à haute performance ou sur colonne de silice. Pour régénérer ensuite les
05 deux énantiomères de la cucurbitine, il suffit de saponifier l'ester de protection puis d'hydrolyser pour libérer la fonction acide, et de libérer la fonction amine, par exemple par hydrogénéolyse comme décrit à l'exemple 1 dans le cas où la fonction amine était protégée par substitution avec un radical benzyle.

10 Comme réactifs pour la présente méthode, on peut utiliser des composés optiquement actifs lévogyres S, tels que :

- le chlorure de camphanyl-1S,
- l'acide (S)--(-)-- α -méthoxy- α -trifluorométhyl-phénylacétique,
- 15 - la N-(tertio-butoxycarbonyl)-L-phénylalanine.

Le présent exemple décrit la résolution du racémique de la cucurbitine au moyen du couplage avec le chlorure de camphanyl-1S.

20 **a) Protection de la fonction acide de la (+)1-benzyl-cucurbitine :
synthèse de son ester méthylique**

0,1 g de (+)1-benzyl-cucurbitine (0,20 mmol), obtenu à l'étape b de l'exemple 1, est ajouté lentement à une solution glacée de chlorure de thionyle (0,28 mmol) et de méthanol (2 ml).
25 La température de la réaction ne doit pas s'élever au-dessus de -5°C. Le mélange est mis sous agitation à 0°C pendant 2 h, puis ramené à température ambiante pendant deux jours.

Après évaporation, on purifie sur colonne de silice avec dépôt solide. (Eluant CH₂Cl₂/MeOH de 10 à 50 %).

30 On obtient un produit jaune avec un rendement à 70 %, constitué par l'ester méthylique de la (+)1-benzyl-cucurbitine.

b) Couplage avec le chlorure de camphanyl-1S (-)

On neutralise 1 mol d'ester méthylique de la (+)1-benzyl-cucurbitine en solution dans 1,5 ml de chlorure de méthylène
35 avec 1 mole de triéthylamine. On ajoute 1,1 équivalent de 1S (-)

chlorure de camphanyl. On laisse sous agitation à température ambiante pendant 16 h.

On purifie sur colonne de silice avec dépôt solide (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10 %).

05 La séparation des diastéréoisomères a été effectuée par H.P.L.C. sur diverses colonnes notamment des Zorbax[®] NH_2 greffées.

Exemple 4

Obtention de cucurbitine à partir de pulpe de Cucurbita pepo

10 On coupe en deux des fruits frais de Cucurbita pepo, on enlève les pépins qui peuvent servir à la fabrication des extraits de pépins. On broie la pulpe ainsi obtenue que l'on lyophilise. On récupère la poudre que l'on dégraisse à l'éther de pétrole à raison de 1 l pour 100 g de poudre. On récupère l'insoluble par filtration
15 qui constitue l'extrait de pulpe de Cucurbita pepo recherché. On dose la proportion de cucurbitine dans cet extrait par H.P.L.C. et l'on obtient une concentration de 0,03% en poids de cucurbitine dans l'extrait sec dégraissé.

L'extrait sec dégraissé est ensuite introduit dans de
20 l'eau chauffée à environ 50°C sous agitation jusqu'à dissolution complète. On ajoute un volume équivalent d'éthanol à 95 % pour précipiter les matériaux protéiniques en suspension que l'on élimine par centrifugation. Le surnageant clair restant est ensuite acidifié jusqu'à pH 5.0 par de l'acide perchlorique à 60 %. La
25 solution ainsi acidifiée est mise au réfrigérateur pendant au moins 2 jours pour précipiter le perchlorate de cucurbitine que l'on recueille. La cucurbitine peut être obtenue à partir de ce perchlorate de cucurbitine de manière classique pour l'homme de l'art, en particulier par passage sur une colonne à résine échangeuse de
30 cations (type Na^+) et par évaporation de l'éluat sous pression réduite.

Exemple 5

Préparation d'un extrait de graines de Cucurbita pepo

35 On broie 1,5 kg de graines préalablement décortiquées de Cucurbita pepo. La poudre obtenue est soumise trois fois à une

05 extraction à l'hexane (3 litres, 2 litres et 1,8 litre), pour éliminer les matières grasses. Le gâteau séché obtenu est extrait par une solution aqueuse d'acide chlorhydrique maintenue à environ pH 4. Cette extraction est faite en trois fois : deux à température ambiante - environ 22°C -, et la troisième à 70°C. A chaque fois, le maintien en contact du gâteau-solution avec la solution chlorhydrique (2 litres la première fois et 2,5 litres les deux fois suivantes) est de 24 h.

10 Après essorage, on élimine le résidu solide et on recueille la phase aqueuse que l'on évapore partiellement et que l'on centrifuge. Les culots de centrifugation sont lavés à l'eau distillée, puis éliminés. Les eaux de lavage sont réunies aux concentrats de centrifugation.

15 La fraction aqueuse est reconcentrée, puis traitée poids pour poids avec de l'éthanol. Il se forme un précipité blanc que l'on élimine par centrifugation. Le surnageant hydro-alcoolique, que l'on neutralise par exemple avec de la soude, constitue un extrait contenant de la (-)-cucurbitine, que l'on peut utiliser en l'état.

20 On peut aussi évaporer l'alcool, puis atomiser la solution aqueuse obtenue, de manière à obtenir une poudre titrant 3 à 5 % en (-)-cucurbitine, selon les lots de graines utilisés.

Exemple 6

25 Préparation d'un extrait de graines de Cucurbita pepo riche en (-)-cucurbitine, et obtention de (-)-cucurbitine purifiée.

A - Préparation d'un extrait de graines de cucurbita pepo

30 La matière première est constituée soit de graines de Cucurbita, décortiquées ou non, ayant une teneur en (-)-cucurbitine de 2 à 4 pour mille en poids, selon le lot ou l'origine, soit de tourteaux de graines de Cucurbita exempts d'huile, à teneur en (-)-cucurbitine de 4 à 8 pour mille en poids, selon le lot ou l'origine.

35 La matière première est de préférence broyée jusqu'à environ 100 micromètres. Le broyat est ensuite traité par trempage

à température ordinaire par de l'eau acidulée (acide sulfurique à 1 pour mille en poids) à pH 3,5 environ, pendant 2 h s'il s'agit de tourteaux broyés ou jusqu'à 16 h s'il s'agit de graines. La quantité d'eau acidulée utilisée est d'environ cinq fois le poids de la matière première. Le tout est ensuite porté à ébullition, à pression atmosphérique, pendant 1 h. Après refroidissement à 80°C, on filtre, puis, éventuellement, on centrifuge. La phase aqueuse obtenue est ensuite portée à une température de 80°C à 90°C, puis microfiltrée sur filtre de 0,5 micromètres. On obtient ainsi un jus titrant environ 10 g de matière sèche par litre.

Ce jus subit ensuite une préconcentration thermique sous vide partiel, jusqu'à une concentration d'environ 250 g/l de matière sèche. Ce préconcentrat est ensuite placé à 4°C pendant 48 h, puis subit une nouvelle concentration sous pression réduite, jusqu'à 500 g de matière sèche par litre, et laissé à nouveau au repos à 4°C pendant 48 h. Ces opérations sont suivies d'une filtration sur filtre-pressé. On obtient ainsi un extrait contenant de 40 à 50 % de matière sèche et titrant entre 1 et 2 % en (-)-cucurbitine. Les rendements sont d'environ 200 l d'extrait par tonne de matière première.

B - Obtention de (-)-cucurbitine purifiée

Le préconcentrat précité, titrant de 250 g à 300 g de matière sèche par litre est neutralisé par de la soude pour obtenir un pH de 7,5. On filtre sur filtre-pressé, puis le filtrat est passé sur résine échangeuse de cations (de type Na⁺). L'éluat est effectué au moyen d'une solution d'ammoniaque. Après concentration thermique de l'éluat, sous vide partiel, on obtient un sirop, dont la matière sèche contient environ 50 % en poids de (-)-cucurbitine. Si on le souhaite, ce sirop peut être lyophilisé. Pour cela, on le mélangera avantageusement avec un support poudreux neutre, tel que du talc.

Exemple 7

Mise en évidence de l'activité inhibitrice de la formation d'histamine par la cucurbitine

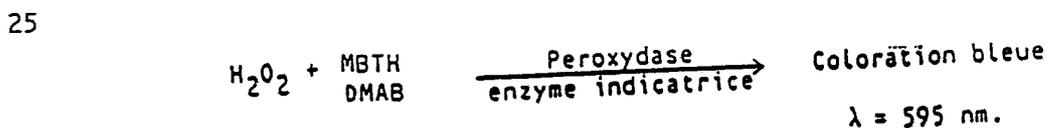
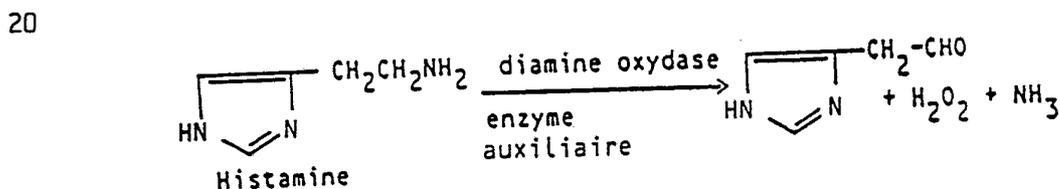
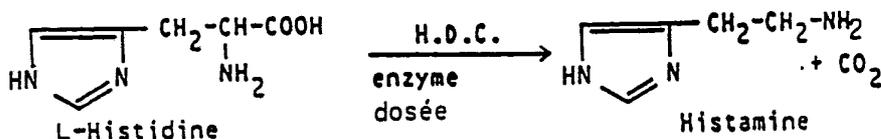
1 - A par un test enzymatique

05 Ce test est basé sur l'action inhibitrice de la cucurbitine sur l'enzyme histidine décarboxylase (HDC) qui transforme l'histidine en histamine, par rapport à celle de la tritoqualine, qui est un inhibiteur connu de l'HDC (voir Carpi C., Maggi G.C. Bull. Soc Ital. Sper. 1968, 44 (6 543-4), et qui est utilisée en

10 thérapeutique comme hypohistaminémiant sous le nom de Hypostamine®.

L'activité inhibitrice sur l'HDC peut être aisément réalisée par un dosage colorimétrique sur la base de la réaction chimique suivante :

15 Dosage colorimétrique



30 MBTH = 3-méthyl-2-benzothiazolinone hydrazone
 DMAB = 3-(diméthylamino)benzoic acid

En pratique, on observe que la formation de la coloration bleue est proportionnelle à la concentration en histidine consommée. On a ainsi pu définir des vitesses initiales de réaction et

35 établir des courbes dites de Mickaelis comme décrit dans Fundamentals of Enzymology, 2nd Ed. Oxford Univ. Press, 1989.

La vitesse initiale est exprimée en variation d'absorbance par minute.

Les résultats obtenus avec diverses concentrations initiales d'histidine, à savoir à 132 nmol, 265 nmol, et 530 nmol, respectivement sans effecteur, avec tritoqualine comme inhibiteur d'HDC connu, et avec la cucurbitine sous forme racémique comme inhibiteur selon l'invention sont répertoriés au tableau II ci-après et font l'objet de la courbe de Mickaelis, objet de la figure 1.

10

Tableau II

| Histidine | 132 nmol | 265 nmol | 530 nmol |
|---------------------------------|----------|----------|----------|
| Sans effecteur | 0,062 | 0,089 | 0,1132 |
| Tritoqualine (art antérieur) | 0,021 | 0,0374 | 0,0604 |
| Cucurbitine (invention) | 0,013 | 0,0242 | 0,042 |

Il ressort clairement du tableau II et de la courbe de Mickaelis objet de la figure 1, que la cucurbitine est un inhibiteur d'HDC beaucoup plus puissant que la tritoqualine, ce qui constitue un résultat tout à fait surprenant pour un homme de l'art.

1 - B par un dosage RIA

On peut également mettre en évidence l'activité anti-histaminique de la cucurbitine par un dosage radioimmunologique (Radio Immuno Assay ou "RIA") de la manière suivante.

Ce dosage a lieu en dosant l'histamine directement produite sous l'action de l'enzyme HDC, par la méthode RIA, bien connue à l'homme de l'art, et notamment décrite dans la notice d'utilisation d'un kit de dosage dénommé HISTAMINE Radioimmunoassay

kit (Cat. # 1302) commercialisé par la Société IMMUNOTECH (Marseille-France).

05 On dose au cours du temps la quantité d'histamine libérée (en nanomoles) pour une concentration de 16.10^{-3} molaire d'histidine dans un tampon phosphate à pH 6,3, respectivement sans effecteur, avec la tritoqualine comme effecteur de comparaison et avec de la cucurbitine racémique de synthèse comme agent anti-histaminique selon l'invention. La tritoqualine et la cucurbitine sont utilisées à la concentration de 2.10^{-3} molaire.

10 Les résultats obtenus exprimés en nanomoles d'histidine libérée sont répertoriés au tableau III ci-après et font l'objet de la courbe de la figure 2 où l'on a indiqué en ordonnées le nombre de nanomoles d'histamine libérée et en abscisses le temps exprimé en minute. La courbe sans effecteur est tracée en trait continu,
15 la courbe obtenue avec la tritoqualine est tracée en trait mixte et la courbe obtenue avec la cucurbitine est tracée en pointillés.

TABLEAU III

| Temps | 5 min** | 10 min** | % I* (à 5 min) | % I* (à 10 min) |
|-------------------|---------|----------|----------------|-----------------|
| 05 Sans effecteur | 32,66 | 140,79 | 0 | 0 |
| Tritoqualine | 16,48 | 49,27 | 49 | 65 |
| 10 Cucurbitine | 14,85 | 38,29 | 55 | 73 |

* I = Inhibition

** = nanomoles d'histamine libérée

15 On voit clairement à partir du tableau III que la quantité d'histamine libérée est nettement la plus faible en présence de cucurbitine.

Les résultats obtenus par la méthode RIA confirment donc que la cucurbitine a une activité inhibitrice de la formation d'histamine nettement plus puissante que la tritoqualine au bout
20 de quelques minutes.

Divers exemples de formulation de compositions cosmétiques ou pharmaceutiques, notamment dermatologiques selon l'invention sont les suivants :

25

Exemple 8

Comprimés

Par comprimé pour administration orale :

| | | |
|----|--|--------|
| 30 | - (+) cucurbitine | 100 mg |
| | - amidon | 38 mg |
| | - lactose | 75 mg |
| | - talc | 10 mg |
| | - autres excipients pour comprimés (dont stéarate de magnésium) qsp | 250 mg |

Indications : traitement préventif et curatif des manifestations allergiques, notamment cutanées et respiratoires.

Posologie : 1 à 10 comprimés par jour chez l'adulte. Diminuer les doses par 2 chez l'enfant jusqu'à 15 ans.

05

Exemple 9

Poudre pour aérosol

Pour 100 g dans un flacon pressurisé :

| | | |
|----|------------------|------|
| | - (+)cucurbitine | 3 g |
| 10 | - mannitol | 1 g |
| | - gaz pulseurs | 96 g |

Indications : traitement préventif et curatif de toutes manifestations allergiques respiratoires telles que asthme bronchique et bronchites asthmatiformes.

15

Posologie : administration intrabronchique, à raison de 4 à 6 aspirations par jour en moyenne.

Exemple 10Emulsion adoucissante pour peaux sensibles

- | | | |
|----|---|-------|
| 05 | - extrait de pépins selon l'exemple 5 titrant 3 % en (-) cucurbitine | 10 g |
| | - émulsion cosmétique classique pour peaux sensibles (alcools gras, alcools gras polyoxy- éthylénés huile minérale, palmitate d'isopropyle, glycérine, gélifiant, conservateurs, parfums, eau) qsp | 100 g |

10

Exemple 11Fond de teint hypoallergénique

- | | | |
|----|---|-------|
| 15 | - extrait de pulpe de Cucurbita pepo renforcé en (-)-cucurbitine selon l'exemple 4, ayant une teneur de 1 % en (-)-cucurbitine | 10 g |
| | - composition classique pour fond de teint (esters gras, squalane, lécithine de soja, silicone volatile, propylène glycol, gomme xanthane, filtre solaire, pigments, conserva- teurs, parfum, eau) qsp | 100 g |

20

Exemple 12Mascara anti-irritant

- | | | |
|----|----------------------------|--------|
| 25 | - (+)-cucurbitine | 1,0 g |
| | - bleu outre-mer | 9,0 g |
| | - alcool hexadécylique | 7,4 g |
| | - propylèneglycol | 9,0 g |
| | - acide stéarique | 11,3 g |
| | - monostéarate de glycérol | 4,4 g |
| | - triéthylamine | 3,6 g |
| | - conservateur | 0,3 g |
| 30 | - eau qsp... | 100 g |

REVENDEICATIONS

05 1. Utilisation de la cucurbitine ou de l'un de ses sels ou esters, ou d'un extrait de plante en contenant, pour la préparation d'une composition cosmétique ou pharmaceutique, notamment dermatologique, à activité antiallergique.

10 2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une composition cosmétique ou pharmaceutique, notamment dermatologique, destinée à la prévention ou au traitement des manifestations allergiques, notamment au niveau des bronches, de la peau et de l'oeil.

15 3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la cucurbitine est présente sous forme de l'un de ses sels ou de ses esters cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptables, tel que le mono- ou le dibromohydrate ou le mono- ou le dichlorohydrate, l'ester méthylique ou éthylique.

20 4. Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 3, caractérisée en ce que l'extrait de plante précité est un extrait de cucurbitacée, en particulier de Cucurbita maxima Duch, de Cucurbita pepo L. ou de Cucurbita moschata ; de préférence, il s'agit d'un extrait de pépins de Cucurbitacée.

25 5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l'extrait de plante précitée est un extrait de pulpe de fruits de cucurbitacée contenant au moins 0,5 % en poids en cucurbitine.

30 6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la composition contenant la cucurbitine ou un de ses sels ou esters, contient en outre des vésicules de type liposome, en particulier, la cucurbitine, son sel ou ester ou l'extrait de plante précité étant encapsulé au moins en partie dans lesdits vésicules de type liposome.

35 7. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que la cucurbitine ou l'un de ses sels ou esters cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptable est présente à une concentration de 0,001 % à 10 %, de préférence de 0,01 % à 5 %, en poids de la composition totale.

8. Composition cosmétique, caractérisée en ce qu'elle comprend, comme ingrédient actif, de la cucurbitine ou l'un de ses sels ou esters cosmétiquement acceptables, ou un extrait de plante en contenant, éventuellement dans un excipient, véhicule ou support cosmétiquement acceptable.

9. Composition cosmétique selon la revendication 8, caractérisée en ce que l'extrait de plante précité est un extrait de cucurbitacée, en particulier de Cucurbita maxima Duch, de Cucurbita pepo L. ou de Cucurbita moschata ; de préférence, il s'agit d'un extrait de pépins de Cucurbitacée.

10. Composition cosmétique selon la revendication 8 ou 9, caractérisée en ce qu'il s'agit d'un extrait de pulpe de fruits de cucurbitacée contenant au moins 0,5 % en poids en cucurbitine.

11. Composition cosmétique selon la revendication 8, 9 ou 10, caractérisée en ce que la cucurbitine ou l'un de ses sels ou esters cosmétiquement acceptables est présente en une quantité efficace pour présenter une activité antiallergique, en particulier à une concentration de 0,001 % à 10 %, de préférence de 0,01 % à 5 %, en poids de la composition totale.

12. Composition pharmaceutique, notamment dermatologique, à activité antiallergique, caractérisée en ce qu'elle comprend comme ingrédient actif, de la cucurbitine ou l'un de ses sels ou esters pharmaceutiquement acceptables, ou un extrait de plante en contenant, en une quantité efficace pour présenter une activité antiallergique, notamment au niveau des bronches, de la peau et de l'oeil, éventuellement dans un excipient, véhicule ou support pharmaceutiquement acceptable.

13. Composition pharmaceutique selon la revendication 12, caractérisée en ce que l'extrait de plante précité est un extrait de cucurbitacée, en particulier de Cucurbita maxima Duch, de Cucurbita pepo L. ou de Cucurbita moschata ; de préférence, il s'agit d'un extrait de pépins de Cucurbitacée.

14. Composition pharmaceutique selon la revendication 12 ou 13, caractérisée en ce que l'extrait de plante précitée est un extrait de pulpe de fruits de cucurbitacée contenant au moins 0,5 % en poids en cucurbitine.

15. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisée en ce qu'elle est destinée à l'usage topique et que la concentration en cucurbitine, ou en ses sels ou esters, est comprise entre 0,001 % et 10 %, de préférence entre 0,01 % et 5 %.

16. Composition selon l'une des revendications 8 à 15, caractérisée en ce qu'elle contient en outre des vésicules de type liposome, en particulier la cucurbitine, son sel ou ester ou l'extrait de plante précité étant encapsulé au moins en partie dans lesdits vésicules de type liposome.

17. Composition selon l'une des revendications 8 à 16, caractérisée en ce que la cucurbitine est présente sous forme lévogyre.

18. Composition selon la revendication 17, caractérisée en ce que la cucurbitine est obtenue à partir de pépins ou de pulpe de fruits de cucurbitacée, en particulier de *Cucurbita maxima* Duch., de *Cucurbita pepo* L., ou de *Cucurbita moschata* Duch.

19. Procédé pour diminuer le potentiel allergisant d'une composition cosmétique ou pharmaceutique, notamment dermatologique, caractérisé en ce qu'on incorpore à ladite composition une quantité efficace de cucurbitine sous forme libre ou sous forme de l'un de ses sels ou esters cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptables, ou d'un extrait de plante en contenant, de sorte que la composition finale présente un risque allergisant réduit.

20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que la concentration en cucurbitine, ou en ses sels ou esters, est comprise entre 0,001 % et 10 %, de préférence entre 0,01 % et 5 %.

21. Procédé de synthèse de la cucurbitine, caractérisé en ce qu'on utilise comme produit de départ de la 1-benzyl-3-pyrrolidinone.

22. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce qu'on traite la 1-benzyl-3-pyrrolidinone avec une solution ammoniacale de chlorure d'ammonium et de cyanure de potassium, en obtenant la (+) 1-benzyl-3-amino-3-cyano-pyrrolidine que l'on transforme ensuite par hydrolyse acide ou basique en acide (+) 3-amino-1-benzyl-3-pyrrolidinecarboxylique, puis on procède à une réduction

hydrogénée, de préférence une hydrogénolyse catalytique pour obtenir l'acide (+) 3-amino-3-pyrrolidinecarboxylique ou (+) cucurbitine.

05 23. Procédé selon la revendication 21 ou 22, caractérisé en ce qu'on réalise la réaction de la 1-benzyl-3-pyrrolidinone avec le chlorure d'ammonium et le cyanure de potassium dans un rapport molaire 1/4/4 à la température ambiante pendant au moins 48 h.

10 24. Procédé selon l'une des revendications 21 à 23, caractérisé en ce qu'on isole l'isomère lévogyre de l'acide 3-amino-3-pyrrolidinecarboxylique à partir du mélange racémique, en particulier par l'intermédiaire de la préparation des diastéréoisomères.

15 25. Procédé de traitement d'un être humain ou d'un animal, pour prévenir ou traiter les manifestations allergiques, caractérisé en ce qu'on administre audit être humain ou audit animal une quantité efficace pour prévenir ou traiter les manifestations allergiques de cucurbitine ou de l'un de ses sels ou esters pharmaceutiquement acceptables, ou d'un extrait végétal en contenant.

20 26. Procédé selon la revendication 25, caractérisé en ce qu'on administre la cucurbitine ou l'un de ses sels ou esters pharmaceutiquement acceptables par voie topique à une concentration comprise entre 0,001 % et 10 % en poids.

25 27. Procédé selon la revendication 25, caractérisé en ce qu'on administre la cucurbitine ou l'un de ses sels ou esters pharmaceutiquement acceptable par voie générale à une posologie chez l'homme comprise entre 0,1 mg/kg/jour et 20 mg/kg/jour.

1 / 2

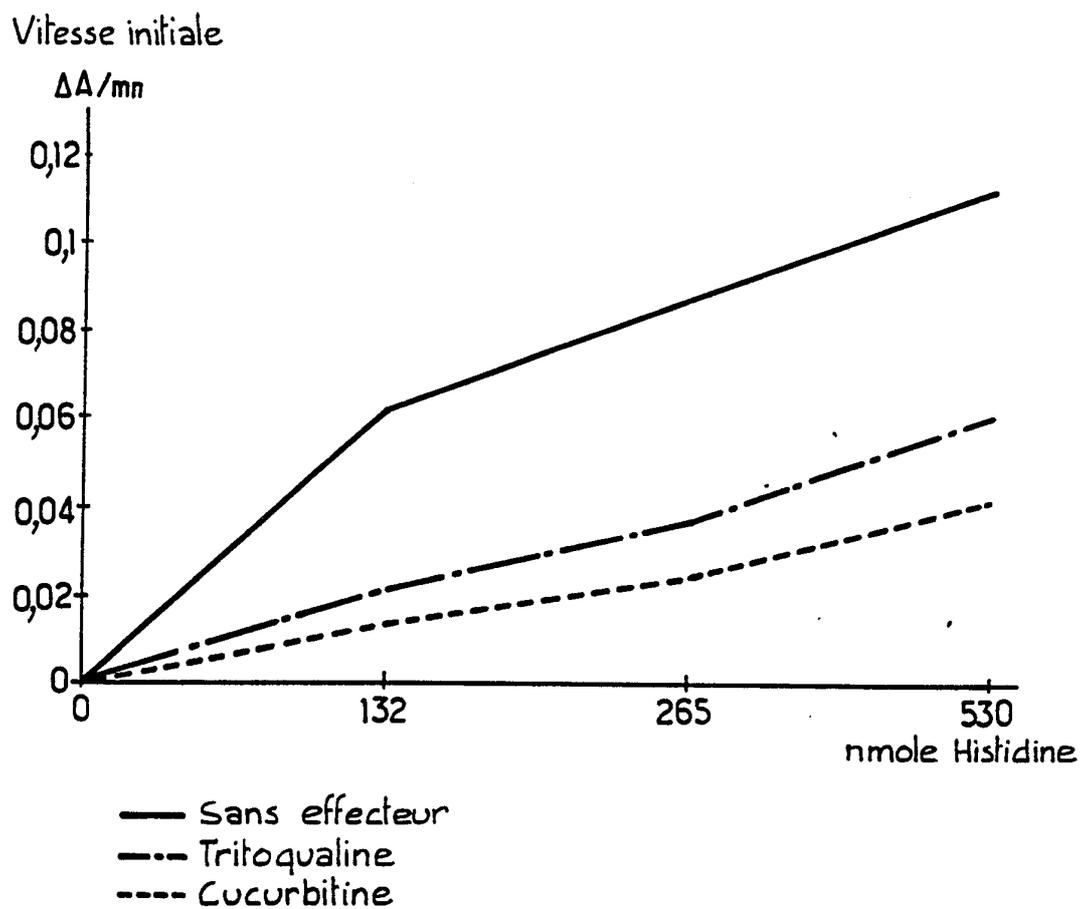
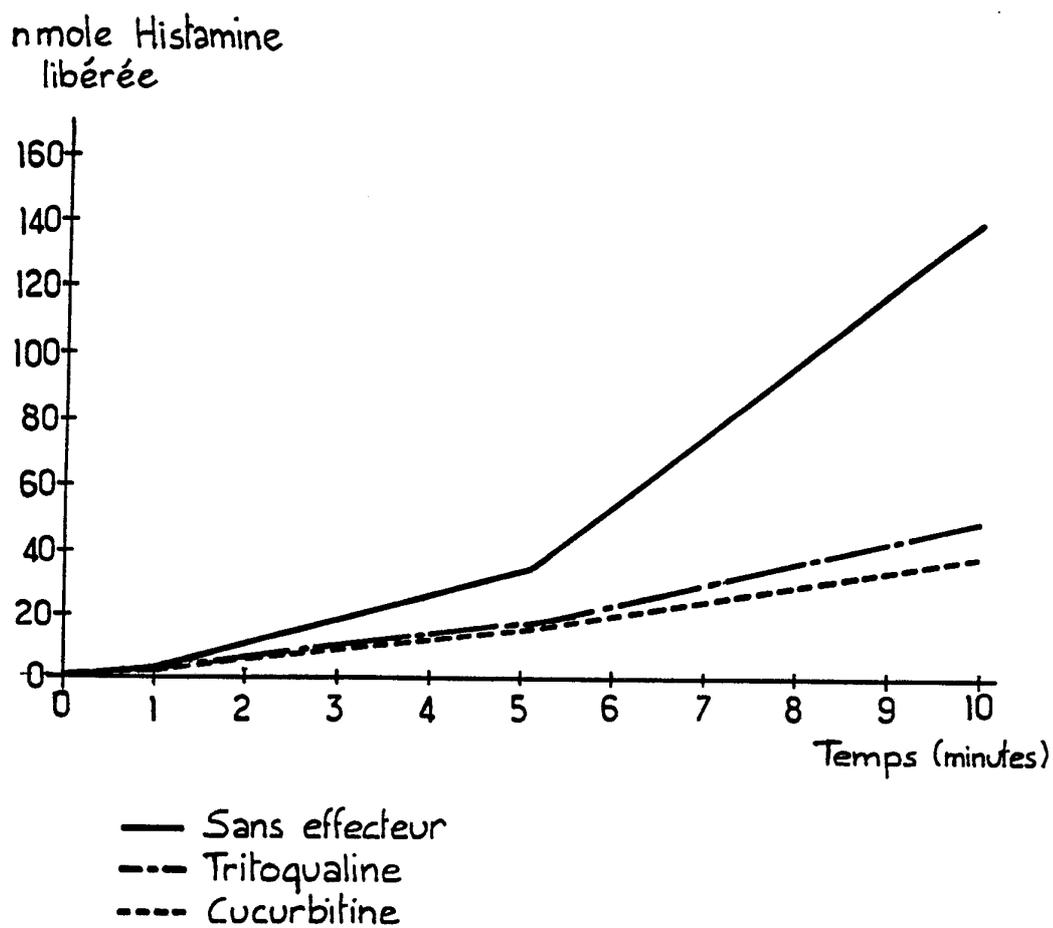
FIG.1Courbe de Mickaelis

FIG. 2

Dosage RIA



| III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET) | | |
|--|--|----------------------|
| Category * | Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to Claim No |
| X | Scientia Sinica, vol. X, No.7, 1961, T.-T. SUN et al.: "Chemical studies on cucurbita moschata duch", pages 852-859, see the whole document | 21-24 |
| A | Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1973, (Ipswich, GB), H.J. MONTEIRO: "New synthesis of the amino acid (+)-Cucurbitine", page 2 | 21-24 |
| A | Chemical and Pharmaceutical Bulletin, vol. 35, No. 9, September 1987, (Tokyo, JP), Y. MORIMOTO et al.: "Enzymes and catalysts. II. Pig liver esterase-catalysed asymmetric synthesis of (-)- and (+)- Cucurbitine and its (-)- thio analogue", pages 3845-3849, see the whole document | 21-24 |
| A | J. FALBE: "Methoden der Organischen Chemie", vol. E5, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, DE, see pages 534-543 | 21-24 |
| X | World Patents Index Latest, 1977, AN 77-39162Y [22], Derwent Publications Ltd, London, GB, & JP, A, 52051033 (OGAWA) 23 April 1977, see abstract | 1-20 |
| X | World Patents Index Latest, 1987, AN 87-273386 [39], Derwent Publications Ltd, London, GB, & JP, A, 62087241 (LION CORP.) 21 April 1987, see abstract | 1-20 |
| X | World Patents Index Latest, 1987, AN 87-105806 [15], Derwent Publications Ltd, London, GB, & JP, A, 62053911 (SHISEIDO) 9 March 1987, see abstract | 1-20 |
| X | World Patents Index Latest, 1987, AN 87-032891 [05], Derwent Publications Ltd, London, GB, & JP, A, 61289021 (SHISEIDO) 19 December 1986, see abstract | 1-20 |

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

V. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE ¹

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. Claim numbers because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although the claims 25-27 concern a method for treatment of (diagnostic method applied to) the human or animal body, the search has been carried out and based on the alleged effect of the product/composition.

2. Claim numbers because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claim numbers because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

VI. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING ²

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.
2. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:
3. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:
4. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

**FR 9200164
SA 57685**

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 22/06/92. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| FR-A- 2522500 | 09-09-83 | None | |
| ----- | | | |

| III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴ | | (SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE) |
|--|---|---|
| Catégorie ^o | Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷ | No. des revendications visées ¹⁸ |
| A | Chemical Abstracts, vol. 112, no. 10, 1990, (Columbus, Ohio, US), O.V. NESTEROVA et al.: "Development of standardization methods for kukurbin from pumpkin seeds", page 457, abrégé no. 84295s, & FARMATSIYA (MOSCOW) 1989, 38(6), 36-8, voir l'abrégé --- | 1-20 |
| X | Scientia Sinica, vol. X, no. 7, 1961, T.-T. SUN et al.: "Chemical studies on cucurbita moschata duch", pages 852-859, voir le document en entier --- | 21-24 |
| A | Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1973, (Ietchworth, GB), H.J. MONTEIRO: "New synthesis of te amino acid (±)-Curcurbitine", page 2 --- | 21-24 |
| A | Chemical and Pharmaceutical Bulletin, vol. 35, no. 9, septembre 1987, (Tokyo, JP), Y. MORIMOTO et al.: "Enzymes and catalysts. II. Pig liver esterase-catalyzed asymmetric synthesis of (-)- and (+)-Cucurbitine and its (-)-thio analogue", pages 3845-3849, voir le document en entier --- | 21-24 |
| A | J. FALBE: "Methoden der Organischen Chemie", vol. E5, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, DE, voir pages 534-543 --- | 21-24 |
| X | World Patents Index Latest, 1977, AN 77-39162Y [22], Derwent Publications Ltd, Londres, GB, & JP,A,52051033 (OGAWA) 23 avril 1977, voir l'abrégé --- | 1-20 |
| X | World Patents Index Latest, 1987, AN 87-273386 [39], Derwent Publications Ltd, Londres, GB, & JP,A,62087241 (LION CORP.) 21 avril 1987, voir l'abrégé --- | 1-20 |
| X | World Patents Index Latest, 1987, AN 87-105806 [15], Derwent Publications Ltd, Londres, GB, & JP,A,62053911 (SHISEIDO) 9 mars 1987, voir l'abrégé --- | 1-20 |
| X | World Patents Index Latest, 1987, AN 87-032891 [05], Derwent Publications Ltd, Londres, GB, & JP,A,61289021 (SHISEIDO) 19 décembre 1986, voir l'abrégé ----- | 1-20 |

SUIITE DES RESEIGNEMENTS INDIQUÉS SUR LA DEUXIEME FEUILLE

V. **OBSERVATIONS LORSQU'IL A ÉTÉ ESTIMÉ QUE CERTAINES REVENDICATIONS NE POUVAIENT PAS FAIRE L'OBJET D'UNE RECHERCHE**

Selon l'article 17.2)a) certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. Les revendications numéros se rapportent à un objet à l'égard duquel la présente administration n'a pas l'obligation de procéder à la recherche, à savoir:

Bien que les revendications 25-27 concernent une méthode de traitement du (méthode de diagnostic appliqué au) corps humain/animal la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit/ a la composition.

2. Les revendications numéros se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas les conditions prescrites dans une mesure telle qu'une recherche significative ne peut être effectuée, précisément:

3. Les revendications numéros sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément à la deuxième et la troisième phrases de la règle 6.4.a) du PCT.

VI. **OBSERVATIONS LORSQU'IL Y A ABSENCE D'UNITÉ DE L'INVENTION ²**

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la présente demande internationale, c'est-à-dire:

1. Comme toutes les taxes additionnelles demandées ont été payées dans les délais, le présent rapport de recherche internationale couvre toutes les revendications de la demande internationale pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. Comme seulement une partie des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais, le présent rapport de recherche internationale couvre seulement celles des revendications de la demande pour lesquelles les taxes ont été payées, c'est-à-dire les revendications:
3. Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale est limité à l'invention mentionnée en premier dans les revendications; elle est couverte par les revendications numéros:
4. Etant donné que toutes les revendications susceptibles de faire l'objet d'une recherche le pouvaient sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration chargée de la recherche internationale n'a sollicité le paiement d'aucune taxe additionnelle.

Remarque quant à la réserve

- Les taxes additionnelles de recherche étaient accompagnées d'une réserve du déposant
- Aucune réserve n'a été faite lors du paiement des taxes additionnelles de recherche.

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9200164
SA 57685

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 22/06/92
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| FR-A- 2522500 | 09-09-83 | Aucun | |

EPO FORM P0472

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82