



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

<p>(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> : <b>A61K 31/35, 31/765, 35/78</b></p>	<p><b>A1</b></p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 92/14457</b> (43) Date de publication internationale: 3 septembre 1992 (03.09.92)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/00147 (22) Date de dépôt international: 14 février 1992 (14.02.92) (30) Données relatives à la priorité: 91/01842 15 février 1991 (15.02.91) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): LABORATOIRES DOLISOS [FR/FR]; 71, rue Beaubourg, F-75003 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): TITS, Monique [BE/BE]; 143, rue Visé-Voie, B-4041 Votten (BE). ANGENOT, Luc [BE/BE]; 34, rue Hena, B-4400 Flemalle (BE). (74) Mandataires: GILLARD, Marie-Louise etc.; Cabinet Beau de Loménie, 55, rue d'Amsterdam, F-75008 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), BF (brevet OAPI), BJ (brevet OAPI), CA, CF (brevet OAPI), CG (brevet OAPI), CH (brevet européen), CI (brevet OAPI), CM (brevet OAPI), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GA (brevet OAPI), GB (brevet européen), GN (brevet OAPI), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), MC (brevet européen), ML (brevet OAPI), MR (brevet OAPI), NL (brevet européen), SE (brevet européen), SN (brevet OAPI), TD (brevet OAPI), TG (brevet OAPI), US.</p> <p><b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>
<p>(54) Title: NOVEL THERAPEUTIC USE OF PYCNOMETOLS FOR THE PREPARATION OF ANTI-INFLAMMATORY MEDICAMENTS</p>		
<p>(54) Titre: UTILISATION EN THERAPEUTIQUE DE PYCNOGENOLS POUR LA PREPARATION DE MEDICAMENTS A ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE</p>		
<p>(I)</p>		
<p>(57) Abstract</p> <p>The use of pycnometols of formula (I) is described where R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> and R<sub>4</sub> each represent H or OH, R<sub>5</sub> and R<sub>6</sub> are different and represent H or OH, and n is an integer from 2 to 40, the said pycnometols being contained in plant extracts in a proportion of at least 2 % by weight or in isolated and purified form, for the preparation of anti-inflammatory medicaments. A novel therapeutic use of pycnometols extracted from <i>Ribes nigrum</i> is described in particular.</p>		
<p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention a pour objet l'utilisation de pycnogénols de formule (I) dans laquelle R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> et R<sub>4</sub> représentent indépendamment H ou OH, R<sub>5</sub> et R<sub>6</sub> sont différents et représentent H ou OH, et n est un nombre entier de 2 à 40, lesdits pycnogénols étant contenus dans des extraits végétaux à raison d'au moins 2 % en poids ou sous forme isolée et purifiée, pour la préparation de médicaments à activité anti-inflammatoire. Elle concerne plus particulièrement une nouvelle utilisation en thérapeutique de pycnogénols extraits de <i>Ribes nigrum</i>.</p>		

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MN	Mongolei
AU	Australien	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BB	Barbados	GA	Gabon	MW	Malawi
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	PL	Polen
BJ	Benin	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BR	Brasilien	IE	Irland	RU	Russische Föderation
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE*	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
ES	Spanien	ML	Mali		

UTILISATION EN THERAPEUTIQUE DE PYCNOGENOLS POUR LA PREPARATION  
DE MEDICAMENTS A ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE

L'invention concerne une nouvelle utilisation en  
05 thérapeutique de pycnogénols pour la préparation de médicaments à  
activité anti-inflammatoire.

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

De nombreux végétaux sont connus pour leur activité anti-  
inflammatoire ou des activités apparentées, telle que l'activité  
anti-rhumatismale. C'est le cas en particulier de la variété Ribes  
nigrum, de la famille des Saxifragaceae. L'activité anti-  
15 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  
20 connue, le ou les principe(s) actif(s) responsable(s) 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  
25 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  
30 contenant des pycnogénols ont été décrits dans les brevets  
GB 1 541 469 et FR 2 092 743.

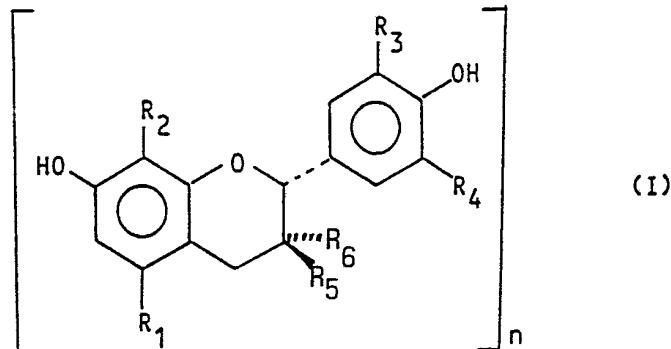
Par ailleurs, la demande EP 275 224 décrit la préparation  
de complexes phospholipidiques d'extraits de Vitis vinifera, ces  
35 derniers étant constitués d'oligomères procyanidoliques, ainsi que

des compositions pharmaceutiques à activité protectrice vasculaire et des compositions cosmétiques contenant lesdits complexes.

L'invention concerne donc l'utilisation de pycnogénols de formule (I) :

05

10



dans laquelle

- 15 -  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  et  $R_4$  représentent indépendamment H ou OH ,  
 -  $R_5$  et  $R_6$  sont différents et 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, pour la préparation de médicaments à activité anti-inflammatoire.

20

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

25

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.

30

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,  $R_5$  et  $R_6$  étant tels que définis plus haut, et n et un nombre entier de 2 à 40, lesdits pycnogénols étant soit contenus

35

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<sub>1</sub> représente OH dans le cas des prodelphinidines, 05 alors qu'il représente H dans le cas des procyanidines.

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 10 extractions aqueuse, hydroalcoolique ou hydroacétonique ;

2) Isolement et purification des pycnogénols.

Dans un procédé avantageux pour préparer un extrait de Ribes nigrum (1ère étape), on pulvérise un lot de feuilles que l'on 15 épuise par percolation lente au moyen d'éthanol à 70<sup>0</sup>. L'éthanol est éliminé par distillation à l'évaporateur rotatif, sous pression réduite, à une température inférieure à 50<sup>0</sup>C. La solution aqueuse restante est filtrée afin d'éliminer une partie importante de chlorophylle. On pratique ensuite un fractionnement en utilisant 20 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.

25 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 30 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<sup>0</sup>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 35 extraits sont ensuite évaporés à sec.

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

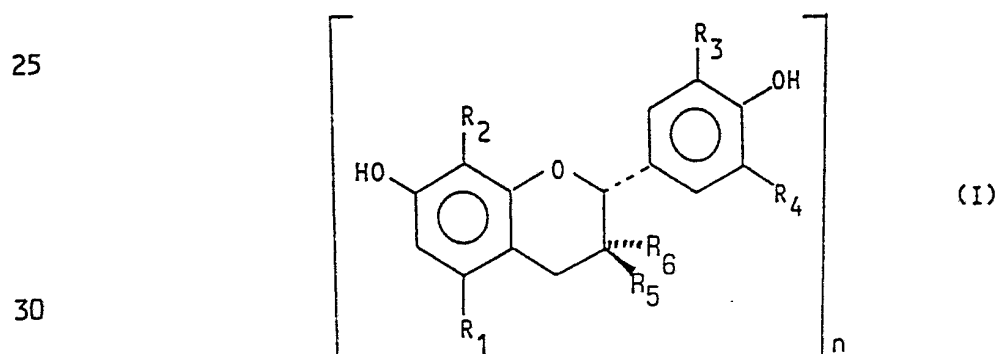
L'isolement et la purification des pycnogénols utilisables selon l'invention (2e étape) peuvent être réalisés par différentes techniques de chromatographie sur gel, ou encore des techniques d'ultra-filtration connues de l'homme du métier.

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 ; la colonne Sephadex<sup>®</sup> LH 20 (PHARMACIA, SUEDE) en éluant à l'aide d'alcool puis d'alcool additionné d'eau ; ou encore sur une colonne Lobar Lichroprep RP8 (MERCK, USA), l'éluion 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) :

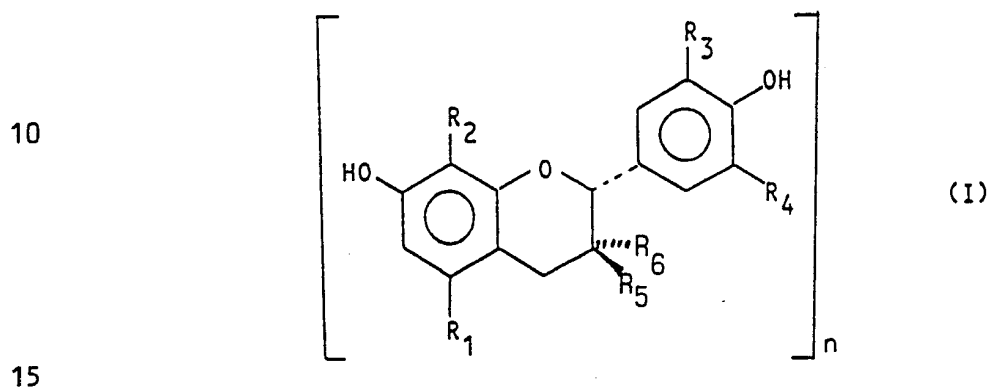


dans laquelle

- R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub> et R<sub>4</sub> représentent OH,
- 35 - R<sub>2</sub> représente H,

- $R_5$  et  $R_6$  sont différents et représentent H ou OH, et
- $n = 2$ .

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



dans laquelle

- $R_1$ ,  $R_3$  et  $R_4$  représentent OH,
- 20 -  $R_2$  représente H,
- $R_5$  et  $R_6$  sont différents et représentent H ou OH, et
- $n = 3$ .

L'utilisation de ces pycnogénols particuliers sous forme de dimères ou de trimères de gallocatéchine ainsi que leurs iso-  
25 mères pour la préparation de médicaments anti-inflammatoires représente un aspect préféré de la présente invention.

Dans un aspect avantageux, on utilisera des dimères ou des trimères de gallocatéchine dans lesquels  $R_5$  représente OH et  $R_6$  représente H.

30 Dans un autre aspect préféré, on utilisera des dimères ou des trimères de gallocatéchine dans lesquels  $R_5$  représente H et  $R_6$  représente OH.

L'activité anti-inflammatoire des pycnogénols extraits de Ribes nigrum tels que décrits plus haut a été testée notamment à  
35 l'aide du test de l'oedème à 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 aigü 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 oedème par comparaison à 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.

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 ou rectale.

Notamment, les pycnogénols de formule (I) seront utilisés dans des compositions pour administration par voie orale sous forme de complexes liposolubles.

Pour l'administration par voie digestive (orale ou



rectale) on peut avantageusement associer les pycnogénols de formule (I) à un dérivé d'antraquinone améliorant le passage à travers la muqueuse digestive, en particulier l'istizine (1,8-dihydroxyantraquinone).

05 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  
10 de 1,5 g/j pour l'administration orale.

Les pycnogénols de formule (I) peuvent également constituer des composés marqueurs de l'activité anti-inflammatoire dans des extraits végétaux. Par "composé marqueur" on entend un composé dont la présence est indicatrice de l'activité recherchée. Dans un  
15 aspect avantageux, l'invention concerne donc également un procédé de détermination de l'activité anti-inflammatoire dans un extrait végétal, caractérisé en ce qu'on effectue la détection et le dosage des pycnogénols de formule (I) dans cet extrait.

Pour détecter et doser les pycnogénols de formule (I)  
20 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  
25 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 2 heures puis on transfère le contenu du ballon dans un ballon jaugé à 50 ml  
30 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  
35 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.

05 - 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.

10 - 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 1 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.

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

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

20 dans laquelle pg représente la quantité de feuilles mise en oeuvre.

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

25 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.

30 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 - ac.formique - ac.acétique (70:20:3:2)

35 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 importance se situant vers le milieu du chromatogramme correspond aux dimères de la gallocatéchine. Il apparaît d'autres  
05 bandes rouges à des Rf inférieurs correspondant aux molécules plus polymérisées.

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

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  
15 pycnogénols par voie intrapéritonéale.

1 kg de feuilles de Ribes nigrum est pulvérisé et épuisé par percolation lente au moyen de 10 l 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  
20 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).

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  
25 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  
30 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  
35 de départ.

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.

On injecte par voie intrapéritonéale à 6 rats Winstar (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.

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 :

20

Tableau 1

	% d'inhibition à 50 mg/kg	% d'inhibition à 250 mg/kg
25 Extrait total	33% (a)	68% (a)
Extrait acétate d'éthyle	16% (b)	65% (a)
30 Extrait butanolique	35% (c)	92% (a)
Solution aqueuse restante	46% (c)	94% (a)

35

(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.

05 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 h. En effet, les pycnogénols ont une très grande affinité pour les protéines et forment avec ces  
10 dernières différents types de complexes.

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  
15 tableau 2 ci-après.

Tableau 2

	% d'inhibition à 200 mg/kg
20 Solution aqueuse	62% p > 0,001
25 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.

30 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 par voie intrapéritonéale.  
35

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. 05 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 10 obtenus sont ensuite évaporés à sec et réunis.

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

- 15 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 ;
- 20 3) une fraction renfermant surtout des flavonoïdes et les tanins catéchiques les plus polymérisés.

En faisant repasser la fraction 2 sur colonne Sephadex<sup>R</sup> LH20 (PHARMACIA, SUEDE) 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 25 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'oedème à la carraghénine décrit dans l'exemple 1 :

30 - 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) ;

35 - 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 :

05

Tableau 3

Fractions ou molé- cules 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

25 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.

30

35

Exemple 3 : Mise en évidence de l'activité anti-inflammatoire des pycnogénols par voie rectale.

On utilise un extrait brut acétonique préparé selon la méthode décrite dans l'exemple 2 en s'arrêtant avant l'étape de chromatographie préparative.

Pour améliorer le passage des pycnogénols à travers la muqueuse digestive, l'extrait de Ribes nigrum est associé à un dérivé des anthraquinones, l'istizine (1,8-dihydroxyanthraquinone).

1 mg d'istizine est dissous dans de l'alcool puis ajouté à raison de 0,01% à l'extrait acétonique de Ribes nigrum. Le mélange est assuré par sonication pendant 4 mn. Les rats sont anesthésiés à l'éther, un cathéter est ensuite introduit jusqu'à 6-7 cm du sphincter anal et la préparation administrée à raison de 0,5ml par rat (concentration de la solution : 50 mg/ml). L'injection de la carraghénine est pratiquée une heure après l'administration rectale de l'extrait. La mesure de l'œdème est effectuée 3 heures après l'injection. Les résultats, exprimés en pourcentage d'augmentation du volume de la patte par rapport au volume initial, sont rapportés dans le tableau 4 ci-après :

Tableau 4

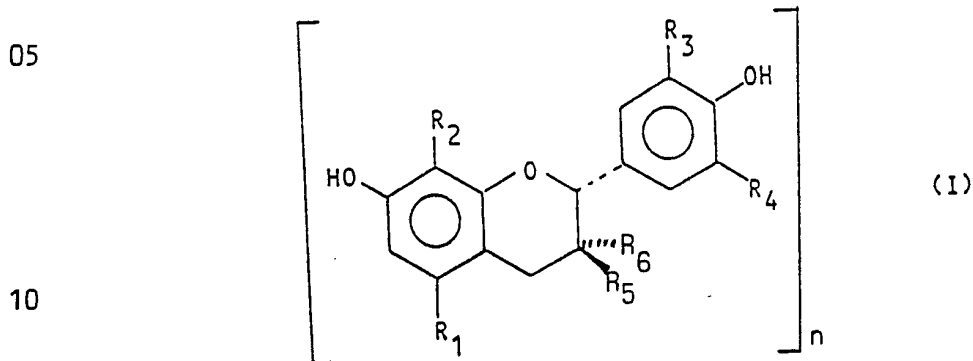
	Pourcentage d'augmentation du volume de la patte
Animaux traités ( n = 6)	30,1 + 5,3
Animaux témoins ( n = 6)	77,8 + 8,3

Ces résultats montrent que l'association de pycnogénols et d'un dérivé des anthraquinones, l'istizine, induit une inhibition significative de l'œdème à la carraghénine de 61% ( $p < 0,01$ ) pour une dose d'environ 100 mg/kg d'extrait.



REVENDEICATIONS

## 1. Utilisation de pycnogénols de formule (I)



dans laquelle

- $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  et  $R_4$  représentent indépendamment H ou OH,
- $R_5$  et  $R_6$  sont différents et représentent H ou OH, et
- 15 -  $n$  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, pour la préparation de médicaments à activité anti-inflammatoire.

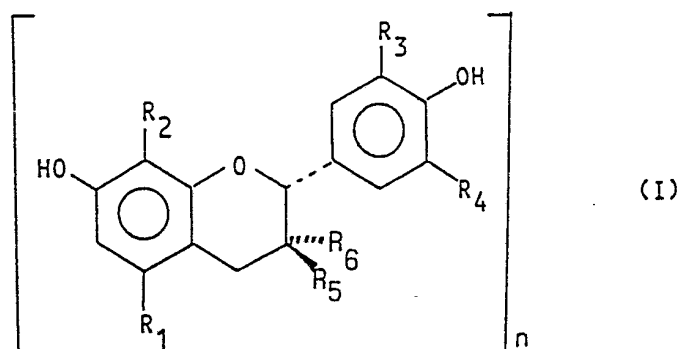
20 2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que les pycnogénols de formule (I) sont contenus dans des extraits de Ribes nigrum.

3. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que les pycnogénols de formule (I) sont isolés et purifiés à  
25 partir d'extraits de Ribes nigrum.

4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1, 2 ou 3, caractérisée 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. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que les pycnogénols répondent à la formule (I)

05



10

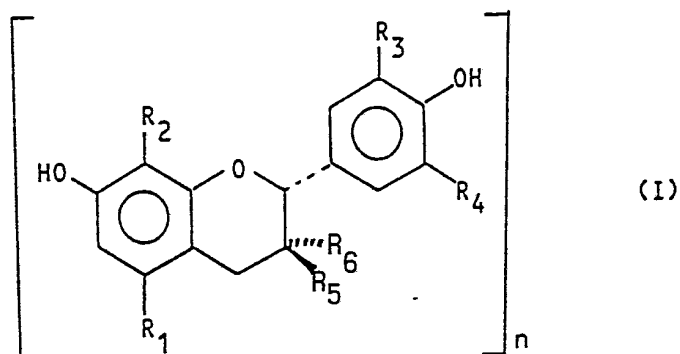
dans laquelle

- $R_1$ ,  $R_3$  et  $R_4$  représentent OH,
- $R_2$  représente H
- $R_5$  et  $R_6$  sont différents et représentent H ou OH, et
- $n = 2$ .

15

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

20



25

dans laquelle  $R_1$ ,  $R_3$  et  $R_4$  représentent OH,

- $R_2$  représente H
- $R_5$  et  $R_6$  sont différents et représentent H ou OH, et
- $n = 3$ .

30

7. Utilisation selon l'une des revendications 5 ou 6, caractérisée en ce que  $R_5$  représente OH et  $R_6$  représente H.

8. Utilisation selon l'une des revendications 5 ou 6, caractérisée en ce que  $R_5$  représente H et  $R_6$  représente OH.

35

9. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que pour l'administration par voie digestive, on associe les pycnogénols de formule (I) à un dérivé

d'anthraquinone, notamment la 1,8-dihydroxyanthraquinone.

10. Procédé de détermination de l'activité anti-inflammatoire dans un extrait végétal, caractérisé en ce qu'il consiste à doser les pycnogénols de formule (I) dans cet extrait.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 92/00147

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl. <sup>5</sup> : A 61 K 31/35      A 61 K 31/765      A 61 K 35/78		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. <sup>5</sup> :	A 61 K	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> *		
Category *	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
P,X	Planta Medica, vol. 57, suppl. 2, December 1991, M. TITS et al.: "Anti-inflammatory prodelphinidins from black currant ( <i>Ribes nigrum</i> ) leaves", page A134, see the whole article -.-	1-8,10
X,Y	Journal of Ethnopharmacology, vol. 27, No: 1, November 1989, (IE), C. DECLUME: "Anti-inflammatory evaluation of a hydroalcoholic extract of black currant leaves ( <i>Ribes nigrum</i> )", pages 91-98, see abstract; pages 91,92,94,95,97 (cited in the application) -.-	1-8,10
X,Y	DE, A, 2740346 (INVERNI DELLA BEFFA S.p.A., MAILAND (IT) 9 March 1978, see claims 13,14,19; pages 7,9 -.-	1-8,10
X	Acta Physiologica Acad. Sci. Hung., vol. 56, No: 2, 1980, G. BLAZSO et al.: "Oedema-inhibiting effect of procyanidin", pages 235-240, see abstract; pages 235-239 -.-	1
X,Y	FR, A, 2624737 (LABORATOIRES NATURA MEDICA, SOC. ANONYME) 23 June 1989, see abstract; pages 1-3; ./.	1-8,10
<p>* Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
27 May 1992 (27.05.92)	10 July 1992 (10.07.92)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
European Patent Office		

## II. 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
	claims 1,11 --	
X	"Dictionnaire Vidal", 63rd edition, 1987, page 1690, Paris, FR, see page 1690, paragraph; "Veinobiase" --	1-8,10
X	Phytochemistry, vol. 14, 1975, (GB), E.C. BATE-SMITH: "Phytochemistry of proanthocyanidins", pages 1107-1113, see abstract; page 1111 --	1-8,10
Y	FR, A, 2092743 (SOCIETE CIVILE D'INVESTIGATIONS PHARMACOLOGIQUES D'AQUITAINE) 28 January 1972, see pages 1,2,4,5; claims 1-8  -----	1-8,10

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

FR 9200147  
SA 57466

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 29/06/92. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

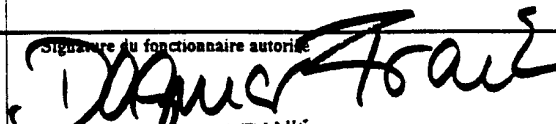
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE-A- 2740346	09-03-78	GB-A- 1589294	13-05-81
		BE-A- 858522	02-01-78
		FR-A, B 2364030	07-04-78
		JP-B- 3014286	26-02-91
		JP-A- 60011416	21-01-85
		JP-C- 1275525	31-07-85
		JP-A- 53062838	05-06-78
		JP-B- 59053883	27-12-84
		US-A- 4258055	24-03-81
		US-A- 4413004	01-11-83
FR-A- 2624737	23-06-89	None	
FR-A- 2092743	28-01-72	DE-A, B, C 2129654	23-12-71

EP0 FORM P0479

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No **PCT/FR 92/00147**

<b>I. CLASSEMENT DE L'INVENTION</b> (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
Int.C1.5                      A 61 K 31/35                      A 61 K 31/765                      A 61 K 35/78		
<b>II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b>		
Documentation minimale consultée <sup>8</sup>		
Système de classification	Symboles de classification	
Int.C1.5	A 61 K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b> <sup>10</sup>		
Catégorie <sup>9</sup>	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, <sup>12</sup> des passages pertinents <sup>13</sup>	No. des revendications visées <sup>14</sup>
P,X	Planta Medica, vol. 57, suppl. 2, décembre 1991, M. TITS et al.: "Anti-inflammatory prodelphinidins from black currant ( <i>Ribes nigrum</i> ) leaves", page A134, voir article en entier ---	1-8,10
X,Y	Journal of Ethnopharmacology, vol. 27, no. 1, novembre 1989, (IE), C. DECLUME: "Anti-inflammatory evaluation of a hydroalcoholic extract of black currant leaves ( <i>Ribes nigrum</i> )", pages 91-98, voir abrégé; pages 91,92,94,95,97 (citée dans la demande) ---	1-8,10
X,Y	DE,A,2740346 (INVERNI DELLA BEFFA S.p.A., MAILAND (IT)) 9 mars 1978, voir revendications 13,14,19,; pages 7,9 --- -/-	1-8,10
<p><sup>9</sup> Catégories spéciales de documents cités:<sup>11</sup></p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"&amp;" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
27-05-1992	10. 07. 92	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS		

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS <sup>14</sup>		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie °	Identification des documents cités, <sup>16</sup> avec indication, si nécessaire des passages pertinents <sup>17</sup>	No. des revendications visées <sup>18</sup>
X	Acta Physiologica Acad. Sci. Hung., vol. 56, no. 2, 1980, G. BLAZSO et al.: "Oedema-inhibiting effect of procyanidin", pages 235-240, voir abrégé; pages 235,239 ---	1
X,Y	FR,A,2624737 (LABORATOIRES NATURA MEDICA, SOC. ANONYME) 23 juin 1989, voir abrégé; pages 1-3; revendications 1,11 ---	1-8,10
X	"Dictionnaire Vidal", 63 édition, 1987, page 1690, Paris, FR, voir page 1690, paragraphe: "Veinobiase" ---	1-8,10
Y	Phytochemistry, vol. 14, 1975, (GB), E.C. BATE-SMITH: "Phytochemistry of proanthocyanidins", pages 1107-1113, voir abrégé; page 1111 ---	1-8,10
Y	FR,A,2092743 (SOCIETE CIVILE D'INVESTIGATIONS PHARMACOLOGIQUES D'AQUITAINE) 28 janvier 1972, voir pages 1,2,4,5; revendications 1-8 -----	1-8,10



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

FR 9200147  
SA 57466

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 29/06/92  
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
DE-A- 2740346	09-03-78	GB-A- 1589294	13-05-81
		BE-A- 858522	02-01-78
		FR-A, B 2364030	07-04-78
		JP-B- 3014286	26-02-91
		JP-A- 60011416	21-01-85
		JP-C- 1275525	31-07-85
		JP-A- 53062838	05-06-78
		JP-B- 59053883	27-12-84
		US-A- 4258055	24-03-81
		US-A- 4413004	01-11-83
FR-A- 2624737	23-06-89	Aucun	
FR-A- 2092743	28-01-72	DE-A, B, C 2129654	23-12-71

EPO FORM P0472