



CONFÉDÉRATION SUISSE  
OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑤ Int. Cl.<sup>3</sup>: A 61 K 35/78  
C 07 H 15/24

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein  
Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein



⑫ FASCICULE DU BREVET A5

⑪

630 528

⑲ Numéro de la demande: 330/78

⑶ Titulaire(s):  
Laboratoires Sarget S.A., Mérignac (FR)

⑳ Date de dépôt: 12.01.1978

⑳ Priorité(s): 20.01.1977 FR 77 01488

⑷ Inventeur(s):  
Henri Combier, Lyon (FR)  
François Fauran, Castanet-Tolosan (FR)  
Claude Andre-Mouries, Caluire (FR)  
Gisèle Prat, Talence (FR)  
Annie Thibault, Le Bouscat (FR)

㉑ Brevet délivré le: 30.06.1982

㉒ Fascicule du brevet  
publié le: 30.06.1982

⑸ Mandataire:  
Patentanwaltsbureau Isler & Schmid, Zürich

⑸ **Nouvel extrait végétal à partir de Chrysanthellum.**

⑸ Le nouvel extrait végétal riche en constituants triterpéniques obtenu à partir des sommités fleuries de *Chrysanthellum procumbens*, contient en tant que constituant principal une saponine triterpénique dérivée de l'acide échinocystique contenant dans sa fraction sucre le rhamnose, le glucose et le xylose. L'extrait est obtenu par extraction du matériau végétal avec un solvant organique ou un mélange d'un tel solvant avec de l'eau, dégraissage de la phase organique obtenue, concentration de cette phase dégraissée et purification du précipité obtenu. Le produit est utilisable en médecine humaine et vétérinaire.

## REVENDEICATIONS

1. Extrait végétal riche en constituants triterpéniques, obtenu à partir des sommités fleuries de *Chrysanthellum procumbens*, caractérisé en ce qu'il contient en tant que constituant principal une saponine triterpénique dérivée de l'acide échinocystique, contenant dans sa fraction sucre le rhamnose, le glucose et le xylose.

2. Procédé pour la préparation de l'extrait selon la revendication 1, caractérisé en ce que le matériau végétal est épuisé par un solvant organique ou un mélange solvant organique/eau, en ce que la phase organique ainsi obtenue est dégraissée puis concentrée et en ce que le précipité est purifié par dissolution dans un solvant organique et reprécipitation.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le solvant organique utilisé pour le traitement du matériau végétal est un alcool, de préférence de faible poids moléculaire, une cétone, de préférence une dialkylcétone de faible poids moléculaire, ou un ester d'acide et d'alcool aliphatique de faible poids moléculaire.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le matériau végétal est épuisé par l'acétate d'éthyle, l'acétone, le méthanol, l'éthanol ou le mélange eau/éthanol.

5. Procédé selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisé en ce que le précipité est dissous dans du chloroforme.

6. Utilisation de l'extrait selon la revendication 1 comme principe actif dans des médicaments pour la médecine humaine et vétérinaire.

La présente invention concerne un nouvel extrait végétal riche en composants triterpéniques, le procédé pour l'obtenir et l'emploi de cet extrait en tant que principe actif dans des médicaments utiles en thérapeutique humaine et vétérinaire.

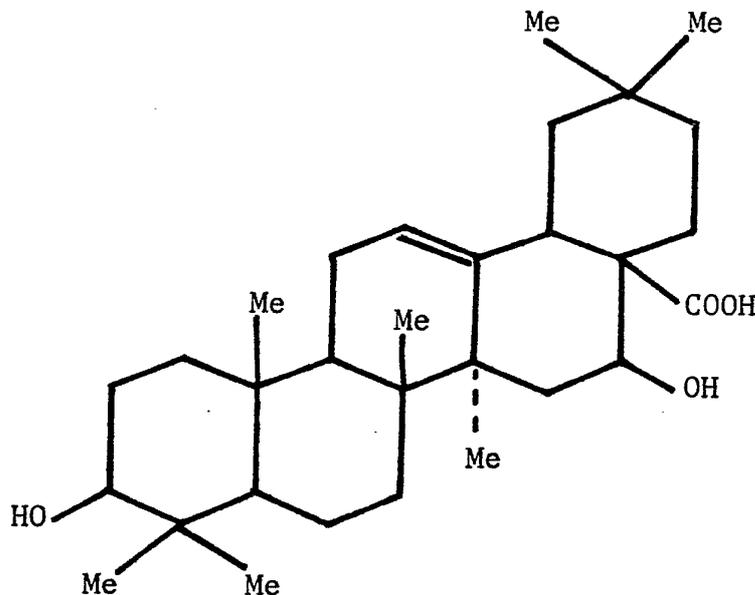
Les plantes du genre *Chrysanthellum* (famille des composées) sont des plantes tropicales et équatoriales de savane se rencontrant en Afrique centrale ou en Amérique du Sud. Les brevets français Nos 979 M et 70.25949 décrivent respectivement des extraits aqueux et hydroalcooliques de *Chrysanthellum procumbens* Rich et de *Chrysanthellum americanum* Vatke. Le brevet français N° 74.22371 décrit des extraits polyphénoliques pulvérulents obtenus à partir de plantes du genre *Chrysanthellum*.

Selon l'invention, on a maintenant préparé à partir des sommités fleuries de *Chrysanthellum procumbens* un nouvel extrait riche en composants triterpéniques et contenant en tant que constituant principal une saponine dérivée de l'acide échinocystique contenant dans sa fraction sucre le rhamnose, le glucose et le xylose. Ce nouvel extrait présente des propriétés pharmacologiques permettant son application en thérapeutique humaine et vétérinaire.

Cet extrait est obtenu par un procédé suivant lequel le matériau végétal est épuisé par un solvant organique tel qu'un alcool de préférence de faible poids moléculaire, une cétone, de préférence une dialkylcétone contenant des groupements alkyle inférieurs ou un ester d'acide et d'alcool aliphatiques de faible poids moléculaire. Si le solvant est miscible à l'eau, on pourra employer un mélange solvant/eau. On utilise de façon préférentielle l'acétate d'éthyle, l'acétone, le méthanol, l'éthanol ou le mélange eau/méthanol. La phase organique est ensuite dégraissée puis concentrée. Les composants triterpéniques précipitent. Après filtration, le résidu brut est purifié par dissolution dans un solvant organique tel qu'un alcool de faible poids moléculaire, et reprécipitation par un solvant tel que le chloroforme.

Ce nouvel extrait contient comme composant majoritaire une nouvelle saponine dérivée de l'acide échinocystique ou acide dihydroxy-3 $\beta$ , 16 $\alpha$ -oléan-12-oïque-28 contenant dans la fraction sucre le rhamnose, le glucose et le xylose.

L'acide échinocystique est une sapogénine triterpénique de structure suivante:



Il sera décrit dans l'exemple suivant, de façon plus précise, la préparation et les propriétés d'un tel extrait.

## Exemple

2 kg de matériau végétal broyé (sommités fleuries de *Chrysanthellum procumbens*) sont épuisés par le méthanol à l'ébullition. Le liquide d'extraction ainsi obtenu est évaporé sous vide à 60°C

jusqu'au volume de 1 l. 1 l d'eau et 1 l de trichloroéthylène sont ajoutés à la solution concentrée. Après agitation et décantation, le trichloroéthylène est séparé. Trois nouveaux dégraissages sont effectués, utilisant chacun 1 l de trichloroéthylène. La phase trichloroéthylène est lavée à l'eau. La phase hydrométhanolique est concentrée sous vide à 60°C jusqu'au volume de 0,5 l, puis laissée au repos une nuit. Le précipité est filtré, dissous dans le méthanol puis reprécipité par le chloroforme.

L'extrait ainsi obtenu se présente sous la forme d'une poudre de couleur chamois clair, soluble dans l'eau à raison de 0,2% en poids et soluble dans les alcools.

#### Composition de l'extrait

L'extrait ainsi obtenu a été soumis à une analyse chromatographique sur couche mince de silice avec pour solvant d'éluion le mélange acétate d'éthyle/méthanol/eau dans les proportions de 100/25/10. La révélation par le réactif formé par le mélange acide acétique/p-anisaldéhyde/acide sulfurique dans les proportions 40/1/1 suivie d'une activation pendant 10 min à 100°C permet de mettre en évidence, comme composé majoritaire représentant 80% de l'extrait total, une saponine. Celle-ci apparaît sous la forme d'une tache de coloration verte et de  $R_f \sim 0,30-0,35$ . La composition de la saponine a été déterminée après purification sur colonne de silice. L'aglycone et les sucres ont été obtenus par hydrolyse acide par le mélange  $H_2SO_4$ /dioxanne/eau pendant 6 h. La phase aqueuse résultant de l'hydrolyse est concentrée puis soumise à une analyse chromatographique permettant de mettre en évidence le rhamnose, le glucose et le xylose. On peut employer comme technique analytique soit une chromatographie sur couches minces de silice avec pour solvant le mélange n-butanol/isopropanol/eau dans les proportions 100/60/20 et pour révélateur le réactif de Stahl modifié pour les sucres, soit une chromatographie sur papier dans le solvant de Partridge (n-butanol/acide acétique/eau 4/1/15) avec pour révélateur le phtalate d'aniline, soit une chromatographie en phase gazeuse après silylation.

Le précipité résultant de l'hydrolyse contient l'aglycone. Celle-ci a été identifiée comme étant l'acide échinocystique par ses propriétés physico-chimiques :

#### Sapogénine

— *Spectre de masse*: Poids moléculaire 472, correspondant à la formule brute  $C_{30}H_{48}O_4$ .

Principaux fragments m/e 264, 246, 231, 219, 207, 189, 201.

— *Spectre IR dans KBr*: 1685-1700 (fonction COOH), 1390, 1360-1370, 1330-1340, 1310 et 1280-1290  $cm^{-1}$  (bandes caractéristiques de la série oléanique).

—  $F > 300^\circ C$ .

#### Sapogénine méthylée par le diazométhane

— *Spectre IR* 1705-1725  $cm^{-1}$ , bande ester.

— *Spectre de masse*:  $M = 486$ . Principaux fragments m/e: 278, 260, 245, 219, 201, 189, 207, 131.

—  $F = 213^\circ C$ .

—  $[\alpha]_D = +36^\circ (CHCl_3)$ .

#### Sapogénine acétylée

— *Spectre de masse*:  $M = 556$ , correspondant à l'acétylation de 2 hydroxyles.

—  $F = 247^\circ C$ .

—  $[\alpha]_D = -6^\circ (CHCl_3)$ .

#### Sapogénine silylée

— *Spectre de masse*:  $M = 668$ , correspondant à la silylation de la fonction acide et de deux fonctions alcool.

Ces données ont été comparées à celles de la littérature concernant l'acide échinocystique (en particulier Boiteau R., Pasich B., Rastimamangah, « Les triterpénoïdes en physiologie végétale et animale », édition Gauthier-Villars 1964; « Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic triterpenes »; Budzikiewicz, Wilson and Djerassi, « J. Am. Chem. Soc. », 85, 3688-99, 1963).

Pour illustrer l'intérêt thérapeutique de l'extrait selon la présente invention, les résultats pharmacologiques obtenus à partir de l'extrait préparé suivant l'exemple sont donnés comme suit:

#### Toxicité aiguë

Celle-ci a été déterminée chez la souris Eops, le rat Wistar et le rat Wistar Eops pour plusieurs voies d'administration. Les produits sont administrés pour la voie orale en suspension dans du julep gommeux, et pour les voies i.p. et i.v. en solution physiologique neutralisée par de la soude.

Dans le tableau ci-dessous, on trouvera les doses maximales tolérées (DMT) et les DL 50 déterminées par la méthode de Litchfield et Wilcoxon. Les doses sont dans tous les cas exprimées en milligrammes de produit par kilogramme de poids d'animal.

Produit	Souris						Rats Wistar		Rats Wistar Eops	
	p.o.		i.p.		i.v.		p.o.		i.p.	
	DMT	DL 50	DMT	DL 50	DMT	DL 50	DMT	DMT	DL 50	
Extrait préparé suivant l'exemple	1600	> 3200	15	15-30	$\geq 15$		$\geq 1000$	10	13,5 (12,8-14,2)	
$\beta$ -æscine			2,5	3,2	< 1,25	2,10 (1,42-3,10)		< 6,25	11 (7,8-15,6)	

#### Intoxication par perfusion lente IV chez le rat anesthésié

Les perfusions sont réalisées à la vitesse de 375 ml/min durant 30 min au maximum sur des rats Wistar mâles anesthésiés au carbamate d'éthyle à 15%. Sont enregistrés la pression carotidienne, la fréquence cardiaque, la respiration et l'électrocardiogramme en dérivation DII. Les animaux sont observés pendant 120 min. Les produits sont administrés en solution dans du sérum physiologique. Les solutions sont neutralisées au bicarbonate.

Pour l'extrait préparé suivant l'exemple, la dose minimale mortelle ou DMM est comprise entre 30 et 75 mg/kg en 30 min. La pression artérielle et la fréquence cardiaque diminuent au début de la perfusion avec un acmé à 2 min. Ces paramètres augmentent ensuite

légèrement pour diminuer jusqu'à la mort qui survient par arrêt respiratoire.

Pour l'æscine, la DMM est égale à 30 mg/kg en 30 min. Jusqu'à 0,1 mg/kg/min, la pression artérielle et les fréquences cardiaque et respiratoire tendent à augmenter. A 1 mg/kg/min, on observe au début de la perfusion une faible hypotension; la pression artérielle augmente ensuite, puis diminue brutalement pour aboutir rapidement à la mort.

#### Activité analgésique

L'expérimentation a porté sur des souris mâles de race Swiss Eops et a utilisé deux stimuli nociceptifs: l'épreuve au PBQ (stimulus chimique), l'épreuve de la plaque chauffante (stimulus thermique).

### Epreuve du PBQ

Une solution hydroalcoolique à 0,02% de phényl-p-benzoquinone (PBQ) est administrée par voie i.p. aux animaux; celle-ci provoque au bout de 5 min des torsions de l'abdomen et un étirement des pattes postérieures des souris.

Les produits à étudier sont administrés par voie i.p. en soluté physiologique neutralisé, 10 min avant le PBQ. La DE 50 analgésique est calculée à partir de la droite de régression exprimant le nombre de contractions en fonction de la dose.

### Epreuve de la plaque chauffante

Cette méthode, variante de celle de Woolfe et McDonald, détermine le nombre d'animaux qui, placés dans un cylindre chauffé à 56°C, réagissent au stimulus thermique après un temps égal ou supérieur à 150% du temps témoin après l'administration par voie i.p. du produit à étudier en soluté physiologique neutralisé.

Le tableau ci-dessous indique les DE 50 déterminées dans l'épreuve au PBQ et les DA 50 déterminées dans l'épreuve de la plaque chauffante. Les doses sont exprimées en mg/kg de poids d'animal. Dans le cas de l'épreuve au PBQ, les équations des droites de régression ainsi que les coefficients de corrélation sont mentionnés.

Produit	Test du PBQ DE 50	Test de la plaque chauffante DA 50
Extrait préparé suivant l'exemple	2,8 (2,3-3,7) Y = -(4,25 ± 1,04) × + 24,68 R = 0,70	5
β-œscine	2,7 (1,7-7,5) Y = -(4,47 ± 2,8) × + 26,97 R = 0,50	4,5
Phénylbutazone	14	125

### Activité anti-inflammatoire

Cet effet a été déterminé dans le test de l'œdème à la carragénine chez des rats mâles Wistar Eops. Un volume de 0,1 ml d'une suspension à 0,5% de carragénine dans du sérum physiologique est injecté dans le faisceau musculaire de la région métatarsienne de la patte postérieure de l'animal. La substance à étudier est administrée en soluté physiologique neutralisé, par voie i.p., en même temps que la carragénine. L'œdème est mesuré par pléthysmométrie 2, 3 et 6 h après l'administration de carragénine.

Le tableau ci-dessous indique les DE 50 exprimées en mg/kg de poids d'animal.

Produit	Œdème à la carragénine DE 50		
	2 H	3 H	6 H
Extrait préparé suivant l'exemple	3,0	3,3	4,1
β-œscine	6,5	8,5	7,5

### Action sur la musculature lisse

L'extrait préparé suivant l'exemple exerce *in vitro* une action contracturante nette et reproductible à partir de  $5 \cdot 10^{-5}$  g/ml de bain sur le jéjunum de lapin, l'iléon de cobaye et l'iléon de rat.

### Action anti-inflammatoire locale

Celle-ci a été déterminée par la technique de l'œdème de l'oreille du rat induit par de l'huile de croton, d'après la méthode de Le Douarec. Le mélange irritant est formé de deux solutions: la solution A contenant 10 ml de pyridine, 2,5 ml d'eau et 12,5 ml d'acétate d'éthyle, et dans laquelle on dissout le produit à étudier, la solution B contenant 1 ml d'huile de croton et 24 ml d'acétate d'éthyle. Les deux solutions A et B sont mélangées avant l'emploi. L'œdème est induit par badigeonnage de l'oreille à l'aide d'un coton trempé dans le mélange irritant (environ 1 ml de mélange par rat).

Le tableau ci-dessous donne le pourcentage d'inhibition de l'œdème en fonction de la concentration en produit à étudier exprimée en mg/ml de mélange.

Produit	% d'activité en fonction de la concentration			
	10 mg/ml	20 mg/ml	25 mg/ml	50 mg/ml
Extrait préparé suivant l'exemple	39	30		
Aspirine			27	65
β-œscine	58			

### Effets capillaroprotecteurs

La résistance capillaire a été déterminée par une variante de la méthode de Charlier R., Hosslet A. et Colot M. («Arch. Inter. Physiol. Biochem.», 1963, 71, 1-45) sur des rats Sprague Dowley Eops. Les produits sont administrés par voie i.p.

La perméabilité capillaire est déterminée par la méthode de Charlier R., Hosslet A. et Canivet L. («Arch. Inter. Physiol. Biochem.», 1963, 71, 51-63) chez le rat Wistar. Les produits sont administrés par voie i.p.

On donnera dans le tableau suivant:

- pour la perméabilité capillaire, la DE 50 ainsi que l'équation de la droite de régression exprimant l'effet sur la perméabilité capillaire en fonction de la dose exprimée en mg/kg;
- pour la résistance capillaire, l'effet observé en unité cmHg/h ainsi que le pourcentage d'animaux présentant un effet supérieur ou égal à 25 μcmHg/h en fonction de la dose administrée exprimée en mg/kg.

(Tableau en tête de la page suivante)

### Activité antiulcéreuse

L'activité antiulcéreuse a été déterminée chez des rats femelles Wistar Eops dans le test de l'ulcère de contrainte, selon la technique de Bonfils.

Après 24 h de jeûne, les rats légèrement anesthésiés à l'éther sont immobilisés dans des corselets en grillage métallique souple. Les pattes sont liées entre elles deux à deux. Les rats, dans leur cage de contention, sont suspendus de telle façon qu'ils ne puissent avoir aucun point d'appui. Juste avant l'anesthésie, les produits à étudier sont administrés p.o. en suspension dans du julep gommeux, sous un volume de 0,5 cc/100 g. Les animaux sont laissés sous contrainte pendant 24 h puis sacrifiés à l'éther. Les estomacs sont prélevés et découpés selon la plus grande courbure. Ils sont étalés sur des planchettes de liège recouvertes de papier glacé pour faciliter l'examen et la prise de photographies. Selon le nombre et la dimension des ulcérations, on emploie une notation de 0 à 4 (0 pas d'ulcération, 4 plus de 4 ulcérations ou une perforation).

On donne dans le tableau ci-après le pourcentage d'activité inhibitrice en fonction de la dose administrée, exprimée en mg/kg.

Produit	Perméabilité capillaire	Résistance capillaire		
		Dose	Activité en $\mu\text{cmHg/h}$	% d'animaux dont l'activité est $\geq 25$
Extrait préparé suivant l'exemple	12,5 (10-16) $y = (-5,30 \pm 1,15) \times +132$	5	$36 \pm 10$	90
		10	$56 \pm 16$	100
Escinate de sodium	12 (10-15) $y = (-6,50 \pm 1,2) \times +159$	5	$26 \pm 15$	60
		10	$78 \pm 24$	100
Témoins			$7 \pm 6$	0

Produit	Dose administrée	% de mortalité en cours d'expérience	% d'activité antiulcéreuse
Extrait préparé suivant l'exemple	250	0	26
	500	8,3	54
$\beta$ -œscine	50	0	13
	125	80	

Compte tenu de ses propriétés pharmacologiques (activité analgésique, activité anti-inflammatoire manifestée aussi bien par voie générale que par voie locale, activité capillaroprotectrice, activité antiulcéreuse), l'extrait préparé selon la présente invention pourra être utilisé à titre curatif ou préventif en phlébologie, rhumatologie, traumatologie, soit à titre d'exemples au cours du traitement des varices, des hémorroïdes, des œdèmes, des périphlébites, des purpu-

ras, de l'hypertension artérielle, des syndromes hémorragiques, des maladies du tissu conjonctif, des ulcères.

Cet extrait, associé aux véhicules appropriés aux diverses formes galéniques, peut être administré par exemple par voie orale sous forme de comprimés, gélules, dragées, gouttes, sirops, ampoules à des doses de 10 à 200 mg par jour à répartir en deux ou trois prises quotidiennes, ou par voie locale sous forme de pommades, gels, poudres.

Cet extrait peut être utilisé en association avec d'autres substances telles que des vasodilatateurs, des anti-inflammatoires stéroïdiens ou non, des antibiotiques, des vitamines.

A titre non limitatif, deux exemples de formules sont donnés :

*Comprimés:*

Extrait préparé selon l'exemple	20 mg
Excipient q.s.p.	1 comprimé

*Pommade:*

Extrait préparé suivant l'exemple	3 g
Excipient à base de polyéthylène glycol 400 et 4000 et d'eau déminéralisée q.s.p.	100 g