



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 21 924 T2 2006.06.14**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 343 826 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 21 924.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IB00/01946**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 981 558.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 02/042335**

(86) PCT-Anmeldetag: **27.11.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **30.05.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.09.2003**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **10.08.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.06.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C08B 37/00 (2006.01)**
A61K 35/78 (2000.01)

(73) Patentinhaber:
Bomsund Grupo Asesor, S.L., Barcelona, ES

(74) Vertreter:
COHAUSZ & FLORACK, 40211 Düsseldorf

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:
FRIAS PENA, Jose Manuel, E-08008 Barcelona, ES

(54) Bezeichnung: **POLYSACCHARIDE MIT IMMUNOSTIMULIERENDER AKTIVITÄT**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die Erfindung betrifft eine eine immunstimulierende Wirkung besitzende Polysaccharidverbindung mit der Formel I, ein Verfahren zu ihrer Herstellung, ihre Verwendung bei der Behandlung immunsuppressiver Krankheiten und sie enthaltende pharmazeutische Zusammensetzungen.

STAND DER TECHNIK FÜR DIE ERFINDUNG

[0002] Das Immunsystem lässt sich definieren als eine Ansammlung von Molekülen, Zellen und Organen, deren komplexe Wechselwirkungen ein Notfallsystem bilden, das im Allgemeinen in der Lage ist, ein Individuum sowohl vor Eindringlingen von außen als auch dessen eigenen veränderten Zellen zu schützen.

[0003] Das Immunsystem kann in zwei funktionell verschiedene Teile unterteilt werden: diejenigen Bestandteile, die angeboren, und diejenigen, die erworben sind. Die angeborene Immunität betrifft Immunelemente, die unspezifisch und nicht anpassungsfähig sind. Sie sind in der Lage, fremde Gewebe/Organismen zu unterscheiden, aber nicht in der Lage, einen bestimmten Eindringling zu erkennen. Sie lassen sich am besten unterteilen in Barrieren (Haut und Schleimhäute), unspezifische chemische Mittel (in Schleimhautsekreten vorhandene Enzyme sowie Chinine und Histamine) und unspezifische Effektorzellen (Makrophagen). Erworben Immunität bezieht sich auf Elemente, die spezifisch und anpassungsfähig sind. Sie sind in der Lage, aus sich selbst heraus fremde Zellen zu unterscheiden und können ein fremdes Antigen von einem anderen unterscheiden. Die erworbene Immunität hat ein Gedächtnis. Dies erlaubt die Immunisation und Widerstandsfähigkeit gegen erneute Infektion mit dem gleichen Mikroorganismus. Die Zellen, die für die erworbene Immunität verantwortlich sind, sind Lymphocyten, von welchen es zwei Unterklassen: B- und T-Zellen gibt.

[0004] Die erworbene Immunität kann entweder durch natürliche Infektion oder Impfung (auf aktive Weise) bzw. durch Verabreichung von Immunzellen (auf passive Weise) erreicht werden. Während die erste Art und Weise lang andauernde Wirkungen hat und sogar permanent sein kann, besteht Letztere nicht lange.

[0005] Patienten, die an einer immunsuppressiven Erkrankung leiden, werden mit Immunstimulantien behandelt, um ihr Immunsystem zu aktivieren. Aus US 4 801 578, US 5 417 979 und WO 98/51319 sind verschiedene Immunstimulantien bekannt. Polysaccharid-Immunstimulantien sind aus DE 19 817 177 und EP 0 225 496 bekannt. In diesen Patenten sind Polysaccharidverbindungen mit immunstimulierender Wirkung und ihre Herstellung aus Pflanzenzellkulturen offenbart. Als Pflanzen werden *Echinacea purpurea*, *Echinacea angustifolia* und *Calendula officinalis* verwendet.

[0006] Jedoch besitzt keine dieser immunstimulierenden Verbindungen eine zufrieden stellende Wirkung auf immunsuppressive Erkrankungen. Deshalb besteht im Stand der Technik weiterhin ein Bedarf an alternativen Immunstimulanzien, die eine verbesserte und breite Wirkung aufweisen.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0007] Erfindungsgemäß wird eine eine immunstimulierende Wirkung besitzende Polysaccharidverbindung mit der Formel I, ein Verfahren zu ihrer Herstellung, ihre Verwendung bei der Behandlung immunsuppressiver Krankheiten und sie enthaltende pharmazeutische Zusammensetzungen bereitgestellt.

[0008] Ein erfindungsgemäßes Merkmal betrifft Polysaccharidverbindungen mit der Formel I

[0027] [Fig. 15](#) das ^1H - ^1H -COSY-Spektrum von PF2RS8B2,

[0028] [Fig. 16](#) das HMQC-Spektrum von PF2RS8B2,

[0029] Tabelle 2 das ^{13}C -NMR-Spektrum von PF2RS8B2,

[0030] [Fig. 17](#) das HMBC-Spektrum von PF2RS8B2,

[0031] [Fig. 18](#) das HMBC-Spektrum von PF2RS8B2,

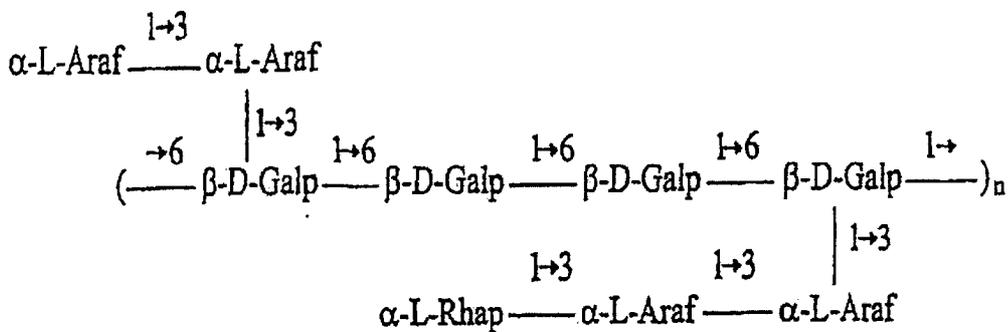
[0032] [Fig. 19](#) die DC der Hydrolyseprodukte von PF2RS8B2 mit TFA und anderen Einfachzuckern und

[0033] [Fig. 20](#) das Diagramm der Molekulargewichtsmessung zeigt.

SPEZIELLE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0034] Wie weiter oben erwähnt, betrifft das erste erfindungsgemäße Merkmal eine Polysaccharidverbindung mit der Formel I:

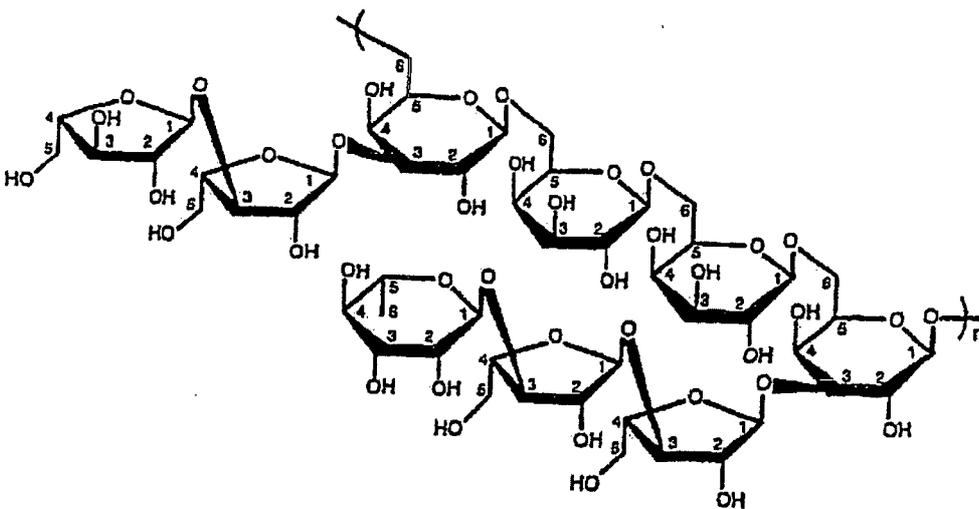
Schema I



worin n = 7 bis 8.

[0035] Die Konfigurationsstruktur der Verbindung mit der Formel I ist:

Schema II



worin n = 7 bis 8.

[0036] Das mittlere Molekulargewicht der Polysaccharidverbindung beträgt etwa 10 000.

[0037] Das zweite erfindungsgemäße Merkmal betrifft das Verfahren zur Herstellung der Polysaccharidverbindung mit der Formel I. Dieses Verfahren umfasst zunächst die Herstellung eines wässrigen Extrakts der Pflanze *Calendula officinalis* entsprechend einem Verfahren, das in einer gleichzeitig anhängigen Patentanmeldung von uns mit dem Titel "process for preparing aqueous extracts of plants and extracts so obtained", die mit der Seriennummer PCT/IB00/01947 (veröffentlicht als WO-A-02/41908 am 30. Mai 2002) gleichzeitig mit der vorliegenden Patentanmeldung eingereicht worden ist, offenbart ist, und zweitens die Isolation des Polysaccharids durch eine Kombination aus von einem Bioassay gesteuerten Abtrennungsvorgängen.

[0038] Der wässrige Extrakt von *Calendula officinalis* wird erhalten, indem die Blüten der Pflanze folgendem Verfahren unterworfen werden:

- a) Entgiften der Blüten,
- b) Zerkleinern der Blüten,
- c) Behandeln der zerkleinerten Blüten mit Laserstrahlung,
- d) Suspendieren des in Schritt c) erhaltenen Gemischs in Wasser,
- e) Mazerieren der in Schritt d) erhaltenen Suspension und
- f) Abtrennen der erhaltenen Flüssigkeit.

[0039] Die Entgiftung (Schritt a) wird durchgeführt, indem die Blüten von *Calendula officinalis* mit Wasser gewaschen werden. Dabei ist die in diesem Schritt verwendete Wassermenge nicht entscheidend und kann in Abhängigkeit vom Verunreinigungszustand der Pflanze variiert werden. Obwohl höhere und niedrigere Temperaturen nicht ausgeschlossen sind, sollte die Wassertemperatur zwischen 10 und 40°C, vorzugsweise zwischen 20 und 35°C, und am meisten bevorzugt 28°C betragen. Um diesen Schritt zu erleichtern, kann ein Waschtunnel verwendet werden. Sowohl die Wassermenge als auch die Verweilzeit der Pflanze im Waschtunnel sind nicht entscheidend und können deshalb in Abhängigkeit vom Verunreinigungszustand der Pflanze variiert werden. Der Waschschrift kann mehrmals durchgeführt werden, wobei dazwischen immer ein Trocknungsschritt liegt. Dieser Trocknungsschritt wird vorzugsweise durchgeführt, indem die Pflanze in die Sonne gelegt wird.

[0040] Nachdem die Blüten gründlich gereinigt worden sind, werden sie durch ein herkömmliches Verfahren in einer Zerkleinerungsmaschine oder auch manuell zerkleinert (Schritt b). Obwohl höhere und niedrige Temperaturen nicht ausgeschlossen sind, sollte die Temperatur, bei welcher die Blüten zerkleinert werden, zwischen 10 und 40°C betragen.

[0041] Als Nächstes werden die zerkleinerten Blüten mit Laserstrahlung (Schritt c) behandelt. Als Quelle der Laserstrahlung wird vorzugsweise eine rote lineare Laserdiode mit der Fähigkeit der Frequenzvervielfachung in Wellenlängen im Bereich von 150 bis 810 nm verwendet. Die Wellenlänge der Laserstrahlung beträgt besonders bevorzugt 200 bis 400 nm und am meisten bevorzugt 250 nm. Die Leistung der Laserstrahlung beträgt vorzugsweise 1 bis 60 Watt, besonders bevorzugt 10 bis 30 Watt, und am meisten bevorzugt 20 Watt. Der Durchmesser des Leuchtpunkts beträgt vorzugsweise 1 bis 6 mm, besonders bevorzugt 2 bis 5 mm, und am meisten bevorzugt 4 mm. Die zerkleinerte Pflanze wird der Laserstrahlung derart ausgesetzt, dass das gesamte Gemisch oder dessen größter Teil bestrahlt wird. Dies wird erreicht, indem entweder der Lasergenerator durch die zerkleinerte Pflanze manuell bewegt wird oder das zerkleinerte Material auf einem Förderband durch einen Satz aus mehreren Lasergeneratoren durchläuft. Vorzugsweise wird jedes Kilogramm zerkleinertes Material 3 bis 10 Minuten lang und besonders bevorzugt 5 Minuten lang mit der Laserstrahlung behandelt. Obwohl höhere und niedrigere Temperaturen nicht ausgeschlossen sind, sollte die Temperatur, bei welcher die zerkleinerte Pflanze mit der Laserstrahlung behandelt wird, zwischen 10 und 40°C betragen.

[0042] Das mit Laser behandelte Material wird als Nächstes in Wasser (Schritt d) suspendiert. In diesem Schritt kann ein beliebiges kommerzielles Mineralwasser verwendet werden. Das Suspendieren wird so durchgeführt, dass 50 bis 300 Gramm und vorzugsweise 100 bis 250 Gramm des mit Laserstrahlung behandelten Materials auf einen Liter Wasser kommen. Obwohl höhere und niedrigere Temperaturen nicht ausgeschlossen sind, sollte die Temperatur, bei welcher die zerkleinerte Pflanze in Wasser suspendiert wird, zwischen 10 und 40°C betragen.

[0043] Die Suspension wird dann zwischen 5 und 20 Tage und vorzugsweise 7 bis 15 Tage lang bei einer Temperatur von 2 bis 10°C und vorzugsweise 4 bis 8°C gehalten, sodass die Mazeration des Gemischs stattfindet (Schritt e).

[0044] Schließlich wird nach dem Mazerationsschritt die Flüssigphase von der festen Phase getrennt (Schritt f). Um die Abtrennung zu erleichtern, können die Feststoffe gepresst werden. Die Abtrennung kann durch De-

kantieren allein oder vorzugsweise durch Dekantieren mit anschließender Filtration durchgeführt werden. Die Filtration wird vorzugsweise unter Druck durchgeführt. Am meisten bevorzugt werden drei aufeinander folgende Druckfiltrationen mit Filtern von 5 µm, 1 µm und 0,22 µm durchgeführt. Obwohl höhere und niedrigere Temperaturen nicht ausgeschlossen sind, sollte die Temperatur, bei welcher die Abtrennung durchgeführt wird, zwischen 10 und 40°C betragen.

[0045] Schließlich wird ein ockerfarbener wässriger Extrakt erhalten.

[0046] Der so erhaltene Extrakt wird einem Isolationsvorgang unterworfen, der ein Ausfällen mit Methanol, Zentrifugieren und von einem Bioassay gesteuertes chromatographisches Abtrennen umfasst. Der Bioassay wird *in vitro*, indem die Proben zu aus Mäusen isolierten Lymphocyten gegeben werden, entsprechend der Literaturstelle Max, W. et al., Journal of Natural Products, Bd. 54, Nr. 6, 1531–1542 (1991) durchgeführt. Der Einbau von Thymidin, der die Replikation der DNA bedeutet, wird überwacht. Dieser Einbau zeigt sowohl eine Erhöhung der Anzahl als auch der Aktivität der Lymphocyten an. Diese Abtrennungsvorgänge umfassen eine wiederholte Ausfällung mit Ethanol, Zentrifugierung, Dialyse und/oder Säulenchromatographie.

[0047] 112 Liter des zuvor erhaltenen wässrigen Extrakts wurden lyophilisiert, um 800 g eines gelbbraun gefärbten Pulvers ("PF2") zu ergeben. Dieses Pulver wurde in einen MeOH-löslichen und einen MeOH-unlöslichen Rest (PF2R, 350 g), der eine Lymphocytentransformationswirkung besitzt, fraktioniert. Ein Teil (80 g) dieses Materials wurde einer MeOH-Ausfällung, Zentrifugierung, Dialyse und/oder Säulenchromatographie über Sephadex DEAE unterworfen, die zur Isolation einer Anzahl kristalliner Materialien führte, die als inaktive anorganische Salze ([Fig. 1](#)) bestimmt wurden.

[0048] Ein Teil (270 g) von PF2R, der mit MeOH auf eine Endkonzentration von 25, 50 und 67% ausgefällt worden war, führte zu aktiven Niederschlägen. Das wirksamste Material war der Niederschlag, der aus der 50%igen MeOH-Lösung erhalten wurde (PF2RS8 51,2 g, LT = +1059%). Die Aufarbeitung eines 5-g-Teils von PF2RS8, der in Wasser solubilisiert wurde, mit anschließender Zentrifugierung und chromatographischer Auftrennung des Überstands über Sephadex G-25 führte zu der mit wirksamem Polysaccharid angereicherten Fraktion, die als PF2RS8A (0,13 g, LT = +1074%) bezeichnet wurde. Anschließend wurde eine gleiche Fraktion, die als PF2RS8A' (0,3 g) bezeichnet wurde, aus einem zweiten Teil (6 g) des 50%igen MeOH-Niederschlags erhalten. Wie in [Fig. 2](#) gezeigt, wurde eine Anzahl anderer Fraktionen und kristalliner Materialien isoliert, wobei jedoch keine/s davon das Maß an LT-Aktivität von PF2RS8A aufwies.

[0049] PF2RS8A wurde durch spektroskopische (¹H-, ¹³C-NMR und DEPT-Spektren) und chemische Analyse (Hydrolyse mit TFA und Analyse über Silicagel-DC) charakterisiert, siehe die [Fig. 3](#), [Fig. 4](#) und [Fig. 5](#).

[0050] Ein aktiveres Polysaccharidgemisch PF2RS8A (1,4 g) wurde aus dem übriggebliebenen 50%igen MeOH-Niederschlag isoliert (PF2RS8). Gleichzeitig führte die Aufarbeitung eines Teils (2,0 g) der 67%igen MeOH-unlöslichen Fraktion (PF2RS9, LT = +735%) zur Isolation eines Polysaccharidgemischs (PF2RS9A, 0,3 g), das in der ¹H-NMR-Analyse sich mit PF2RS8A identisch zeigte. Somit wurde PF2RS9A (0,2 g) mit PF2RS8A (1,4 g) vereinigt und das als "PF2S8B" bezeichnete Gemisch über Sephadex G-50 (20–80 mm), wie in [Fig. 6](#) gezeigt, weiter aufgetrennt. Die Elution mit Wasser ergab sechs Fraktionen (PF2RS8B1, 2, 3, 4, 5 und 6), wovon die HPLC-Analyse unter Anwendung von sowohl der evaporative light scattering detection als auch der UV-Detektion ([Fig. 7](#) und [Fig. 8](#)) zeigte, dass nur das Hauptisolat PF2RS8B2 homogen war. ¹H- und ¹³C-NMR-Spektralanalysen ([Fig. 9](#) und [Fig. 10](#)) zeigten Spektren des Isolats, die sehr ähnlich den für PF2RS8A ([Fig. 3](#) und [Fig. 4](#)) erhaltenen waren, was bedeutet, dass dies das Hauptpolysaccharid im Gemisch war. Die PF2RS8B2-Fraktion bestand deshalb aus dem Polysaccharid mit der Formel I und Wasser. Letzteres kann durch aus dem Stand der Technik bekannte Verfahren entfernt werden. Ein Bioassay mit dem homogenen Isolat PF2RS8B2 und dessen Stammgemisch PF2RS8A im selben Assay zeigten Lymphocytentransformations-(LT-)Wirksamkeiten von 6203% bzw. 3532% (Tabelle 1). Die höhere Wirksamkeit des Isolats bedeutet, dass dieses Polysaccharid der hauptsächlich aktive Bestandteil für die biologische Wirksamkeit des erfindungsgemäßen Extrakts ist.

[0051] Das wirksame Polysaccharid PF2RS8B2 (Polysaccharid mit der Formel I) wurde durch spektroskopische (¹H-, ¹³C-NMR-, HMQC- und 2D ¹H-¹H-COSY-Spektren) und chemische Analyse (Hydrolyse mit TFA und Analyse über Silicagel-DC) aufgeklärt. Somit sind die ¹H-NMR-Signale ([Fig. 9](#)) bei δ 5,3 und 3,2 ppm ein Anzeichen für ein Polysaccharid. Die ¹³C-NMR-Signale ([Fig. 10](#) bis [Fig. 12](#)) bei δ 111,9 (d), 110,1 (d) ppm wurden den anomeren Kohlenstoffatomen der 1→3-verknüpften α-L-Arabinofuranose und der terminalen α-L-Arabinofuranose (abgekürzt mit Araf bzw. Araf') zugeordnet. Die Signale bei δ 106,1 (d) und 105,9 (d) wurden den anomeren Kohlenstoffatomen der 1→6-verknüpften β-D-Galactopyranose und 1→3, 1→6-verknüpften β-D-Galacto-

pyranose (abgekürzt mit Galp' bzw. Galp) zugeordnet, während das Signal bei δ 100,2 (d) ppm den anomeren Kohlenstoffatomen der α -L-Rhamnopyranose (abgekürzt mit Rhap) zugeordnet wurde. Die anomeren Protonensignale (H-1) wurden auch leicht aufgrund ihrer relativen Niedrigfeldverschiebung in den ^1H -NMR-Spektren erkannt. Die direkte Korrelation zwischen Protonen- und Kohlenstoff-13-Signalen, die im HMQC-Spektrum (Fig. 13) beobachtet wurden, bestimmte die ^1H -NMR-Signale von δ 5,08 (brs), 5,23 (brs), 4,47 (d, $J = 7,9$ Hz), 4,53 (d, $J = 7,3$ Hz) und 5,1 (brs) ppm als die anomeren Protone der α -L-Arabinofuranose (Araf'), α -L-Arabinofuranose (Araf), β -D-Galactopyranose (Galp'), β -D-Galactopyranose (Galp) und α -L-Rhamnopyranose (Rhap). Indem diese Signale als Referenz benutzt wurden, konnten andere Protonensignale durch Analyse der 2D ^1H - ^1H -COSY-Spektren (Fig. 14, Fig. 15) verfolgt werden. Auf ähnliche Weise wurden die entsprechenden Kohlenstoffsignale durch HMQC-Spektren (Fig. 13, Fig. 16 und Tabelle 2) definiert. Die Sequenzierung der Zuckereinheiten wurde wie folgt bestimmt. Die untere Feldverschiebung des Signals bei C-3 von Araf (δ 79,4) und Galp (δ 82,8) und der Signale bei C-6 von Galp und Galp' (δ 69,2) legten nahe, dass diese Kohlenstoffatome mit anderen Zuckereinheiten verbunden waren. Die Beobachtung von weit reichenden Korrelationen zwischen C-1 von Araf und C-6 von Galp und Galp' im HMBC-Spektrum (Fig. 17) legen ein 1 \rightarrow 6-verknüpftes β -D-Galactopyranose-Grundgerüst nahe. Die Araf war 1 \rightarrow 3-verknüpft mit Galp durch die Beobachtung einer weitreichenden Korrelation zwischen C-1 von Araf und C-3 von Galp (Fig. 18). Aus dem ^1H -NMR-Spektrum (Fig. 9) wurde das Verhältnis der Zucker entsprechend den Integrationswerten der anomeren Protonenpeaks berechnet als Araf : Araf' : Galp : Galp' : Rhap/3 : 1 : 2 : 2 : 1. PF2RS8B2 wurde deshalb als ein großes verzweigtes Polysaccharid mit der in Formel I (Schema I) gezeigten Primärstruktur aufgeklärt. Schema II ist eine Darstellung derselben Struktur, welche die stereochemische Konfiguration der einzelnen Zucker zeigt.

[0052] Um die Identität der Konstituentenzucker zu bestätigen, wurde PF2RS8B2 mit TFA (0,5 M, 100 bis 120°C) hydrolysiert und anschließend mit DC (Fig. 19) analysiert. Das Vorhandensein der großen Zucker α -L-Arabinofuranose und β -D-Galactopyranose wurde leicht erkannt, während das Vorhandensein des kleineren Zuckers α -L-Rhamnopyranose unter größeren Schwierigkeiten detektiert wurde, wahrscheinlich aufgrund der Menge des auf die DC-Platte aufgetragenen Hydrolysats.

[0053] Das Molekulargewicht von PF2RS8B2 wurde durch Gelpermeations-(Größenausschluss-)Chromatographie bestimmt. Das so bestimmte mittlere Molekulargewicht von PF2RS8B2 betrug 10 000 (siehe Fig. 20).

[0054] Die Polysaccharidverbindung mit der Formel I besitzt überraschenderweise eine sehr hohe Wirksamkeit als Immunstimulans, wie weiter unten in dem Beispiel verdeutlicht werden wird. Somit betrifft das dritte erfindungsgemäße Merkmal die Verwendung der Polysaccharidverbindung mit der Formel I als Wirkstoff bei der Behandlung von immunsuppressiven Erkrankungen wie Krebs, Tuberkulose, Influenza, Erkältungen, Allergien, Lupus erythematodes, Psoriasis und AIDS. Beispiele für Krebs sind Leber-, Lungen-, Nieren-, Darm-, Brust- und Prostatakrebs bzw. Prostataadenokarzinom, Gehirnkrebs wie Astrocytom und Glioblastom, Gebärmutterhals- und Blasenkrebs.

[0055] Das vierte erfindungsgemäße Merkmal betrifft pharmazeutische Zusammensetzungen, welche die Polysaccharidverbindung mit der Formel I enthalten.

[0056] Das erfindungsgemäße Polysaccharid kann entweder separat als reine Substanz oder in Form eines pharmazeutischen Präparats verabreicht werden, obwohl die erfindungsgemäße Verbindung vorzugsweise in einer Kombination verabreicht wird. Die Arzneimittelkombination liegt vorzugsweise in Form einer Formulierung vor, die 1) das erfindungsgemäße Polysaccharid allein, 2) ein oder mehrere geeignete Bindemittel, Träger und/oder weitere Hilfsstoffe enthält und 3) ferner zusätzliche therapeutisch wirksame Substanzen enthalten kann.

[0057] Die Trägermaterialien, Bindemittel und/oder Hilfsmaterialien müssen pharmazeutisch und pharmakologisch tolerierbar sein, sodass sie mit den anderen Komponenten der Formulierung oder des Präparats kombiniert werden können und auf den zu behandelnden Organismus keine schädlichen Nebenwirkungen haben.

[0058] Die Formulierungen umfassen solche, die für eine orale oder parenterale (einschließlich subkutane, intradermale, intramuskuläre und intravenöse) Verabreichung geeignet sind, obwohl der beste Verabreichungsweg vom Zustand des Patienten abhängig ist.

[0059] Die Formulierungen können in Form von Einzeldosen vorliegen. Die Formulierungen werden entsprechend auf dem Gebiet der Pharmakologie bekannten Verfahren hergestellt. Die geeigneten Mengen an Wirkstoffen, die für die Verabreichung geeignet sind, können in Abhängigkeit von der speziellen Therapie variieren. Im Allgemeinen beträgt die Wirkstoffkonzentration in einer Einzeldosisformulierung 5 bis 95% der gesamten

Formulierung.

[0060] Die Erfindung wird anschließend durch die folgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1: Herstellung eines wässrigen Blütenextrakts von *Calendula officinalis* entsprechend dem erfindungsgemäßen Verfahren

[0061] 500 g *Calendula-officinalis*-Blüten wurden in einen Waschtunnel gegeben und mit Wasser bei etwa 28°C gründlich gewaschen. Als Nächstes wurden die Blüten mit einer Zerkleinerungsmaschine zerkleinert. Die erhaltenen 500 g zerkleinertes Material wurden einer Behandlung mit einer roten linearen Laserdiode mit der Fähigkeit der Erzeugung von Mehrfachfrequenzen mit einer Wellenlänge von 250 nm, einer Leistung von 20 Watt und einem Leuchtpunkt von 4 mm Durchmesser behandelt. Die Behandlung wurde durchgeführt, indem der Lasergenerator 2,5 Minuten lang durch das zerkleinerte Material von Hand bewegt wurde, sodass das gesamte Gemisch oder das meiste davon bestrahlt wurde. Danach wurde das durch Laserstrahlung behandelte Material in 2 Liter Wasser mit einer Temperatur von etwa 20°C suspendiert. Die Suspension wurde 12 Tage lang bei einer Temperatur von 4°C gehalten. Schließlich wurden die flüssige und die feste Phase voneinander getrennt, zunächst durch Dekantieren der Flüssigkeit (die Feststoffe wurden gepresst, um die Abtrennung zu erleichtern) und anschließend durch drei aufeinander folgende Druckfiltrationen mit Filtern von 5, 1 und 0,22 µm bei einer Temperatur von etwa 20°C. Das Verfahren ergab etwa 1,7 Liter einer Lösung (eines wässrigen Extrakts), deren/dessen Farbe Ocker war.

Beispiel 2:

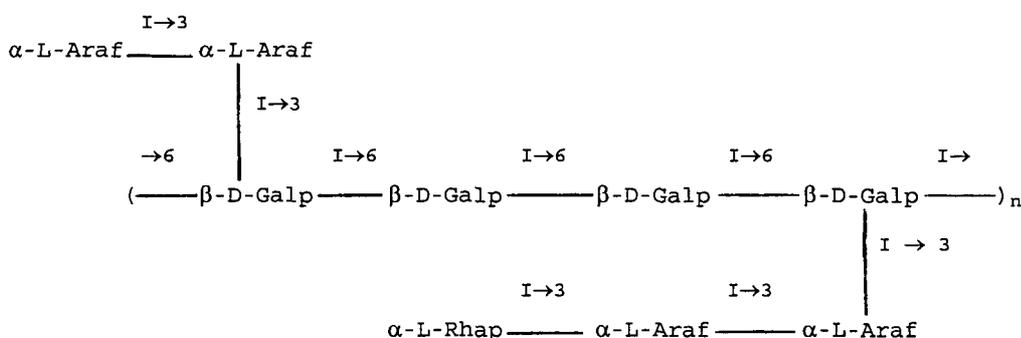
[0062] Die Isolation des Polysaccharids mit der Formel I wurde wie auf den Seiten 7 bis 9 der Beschreibung durchgeführt.

Beispiel 3:

[0063] Das Polysaccharid mit der Formel I wurde getestet, um seine Wirksamkeit als Immunstimulans durch Quantifizierung der Lymphocytentransformationsaktivität (LTA) festzustellen. Unter Lymphocytentransformationsaktivität ist die Tatsache zu verstehen, dass die Lymphocyten von einem ruhenden in einen aktiven Zustand versetzt werden, der erforderlich ist, um Krankheiten durch einen immunologischen Mechanismus zu bekämpfen, oder das Immunsystem wiederherzustellen, das durch verschiedene Faktoren geschwächt sein kann. Die Tests wurden entsprechend der Literaturstelle Max, W. et al., *Journal of Natural Products*, Bd. 54, Nr. 6, 1531–1542 (1991) durchgeführt, indem *in vitro* eine Lösung des erfindungsgemäßen Polysaccharids zu aus Mäusen isolierten Lymphocyten gegeben wurde. Der Einbau von Thymidin, der die DNA-Replikation bedeutet, wurde überwacht. Dieser Einbau ist ein Anzeichen für die Zunahme von sowohl der Lymphocytenanzahl als auch der Lymphocytenaktivität. Das Polysaccharid mit der Formel I besitzt eine LTA von +6203% in Bezug auf nicht stimulierte Lymphocyten.

Patentansprüche

1. Polysaccharid der Formel I,



worin n = 7 bis 8 ist.

2. Verfahren zum Erhalt der Verbindung nach Anspruch 1, umfassend (1) das Abtrennen der Blüten der Pflanze *Calendula officinalis*, (2) Behandlung derselben mit dem folgenden Extraktionsverfahren

a) Entgiften der Blüten,

- b) Zerkleinern der Blüten,
- c) Behandeln der zerkleinerten Blüten mit Laserstrahlung,
- d) Suspendieren des in Schritt c) erhaltenen Gemischs in Wasser,
- e) Mazerieren der in Schritt d) erhaltenen Suspension,
- f) Abtrennen der erhaltenen Flüssigkeit und (3) Unterziehen der in Schritt f) erhaltenen Flüssigkeit einem Isolierungsverfahren, umfassend die Ausfällung mit Methanol, Zentrifugation und durch einen Bioassay durchgeführte chromatografische Auftrennung.

3. Verfahren nach Anspruch 1, in welchem Schritt (3) Folgendes umfasst:

- g) Lyophilisation der in Schritt f) erhaltenen Flüssigkeit,
- h) Fällern der in Schritt g) erhaltenen lyophilisierten Substanz mit Methanol,
- i) Abtrennen der festen Phase von der flüssigen Phase,
- j) Fällern der in Schritt i) erhaltenen festen Phase mit Methanol auf Endkonzentrationen von 25%, 50% und 67%,
- k) Anlösen der in Schritt j) erhaltenen Niederschläge mit 50% und 67%, Zentrifugieren einer chromatografischen Auftrennung des Überstands,
- l) Identifizieren der aktiven Fraktion durch einen Bioassay,
- m) Zweite chromatografische Auftrennung der aktiven Fraktion,
- n) Identifizieren der aktiven Fraktion durch einen Bioassay,
- o) Entfernen des Elutionsmittels.

4. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3, worin Laserbestrahlung mit einer roten linearen Laserdiode mit der Fähigkeit der Frequenzvervielfachung in Wellenlängen im Bereich von 150 bis 180 nm, einer Leistung von 1 bis 60 Watt und einem Leuchtpunkt mit einem Durchmesser von 1 bis 6 mm bewirkt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4, worin die Wellenlänge im Bereich von 200 bis 400 nm liegt, vorzugsweise 250 nm beträgt, die Leistung 20 Watt beträgt und der Leuchtpunkt einen Durchmesser von 4 mm aufweist.

6. Verfahren nach Anspruch 4, wobei jedes Kilogramm der zerkleinerten Substanz bis 10 Minuten lang, vorzugsweise 5 Minuten lang mit der Laserstrahlung behandelt wird.

7. Verbindung, nach Anspruch 1, zur Verwendung als therapeutisches Mittel.

8. Verbindung nach Anspruch 1 zur Verwendung bei der Behandlung von immununterdrückenden Erkrankungen.

9. Verbindung nach Anspruch 1 zur Verwendung bei der Behandlung von immununterdrückenden Erkrankungen wie Krebs, Tuberkulose, Influenza, Erkältung, Allergien, Lupuserythematoses, Psoriasis und AIDS.

10. Verbindung nach Anspruch 1 zur Verwendung bei der Behandlung von Leberkarzinomen, Lungenkrebs, Nierenkrebs, Darmkrebs, Brustkrebs, Prostatakrebs oder Prostataadenokarzinomen, Gehirnkrebsen wie Strocytomen und Glioblastomen, Gebärmutterhalskrebs und Blasenkrebs.

11. Verwendung der Verbindung nach Anspruch 1 definierten Verbindung zur Herstellung eines Medikaments.

12. Verwendung nach Anspruch 11 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von immununterdrückenden Erkrankungen.

13. Verwendung nach Anspruch 12 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von immununterdrückenden Erkrankungen wie Krebs, Tuberkulose, Influenza, Erkältung, Allergien, Lupuserythematoses, Psoriasis und AIDS.

14. Verwendung nach Anspruch 13 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Leberkarzinomen, Lungenkrebs, Nierenkrebs, Darmkrebs, Brustkrebs, Prostatakrebs oder Prostataadenokarzinomen, Gehirnkrebsen wie Strocytomen und Glioblastomen, Gebärmutterhalskrebs und Blasenkrebs.

15. Pharmazeutisches Präparat, umfassend eine Verbindung nach Anspruch 1.

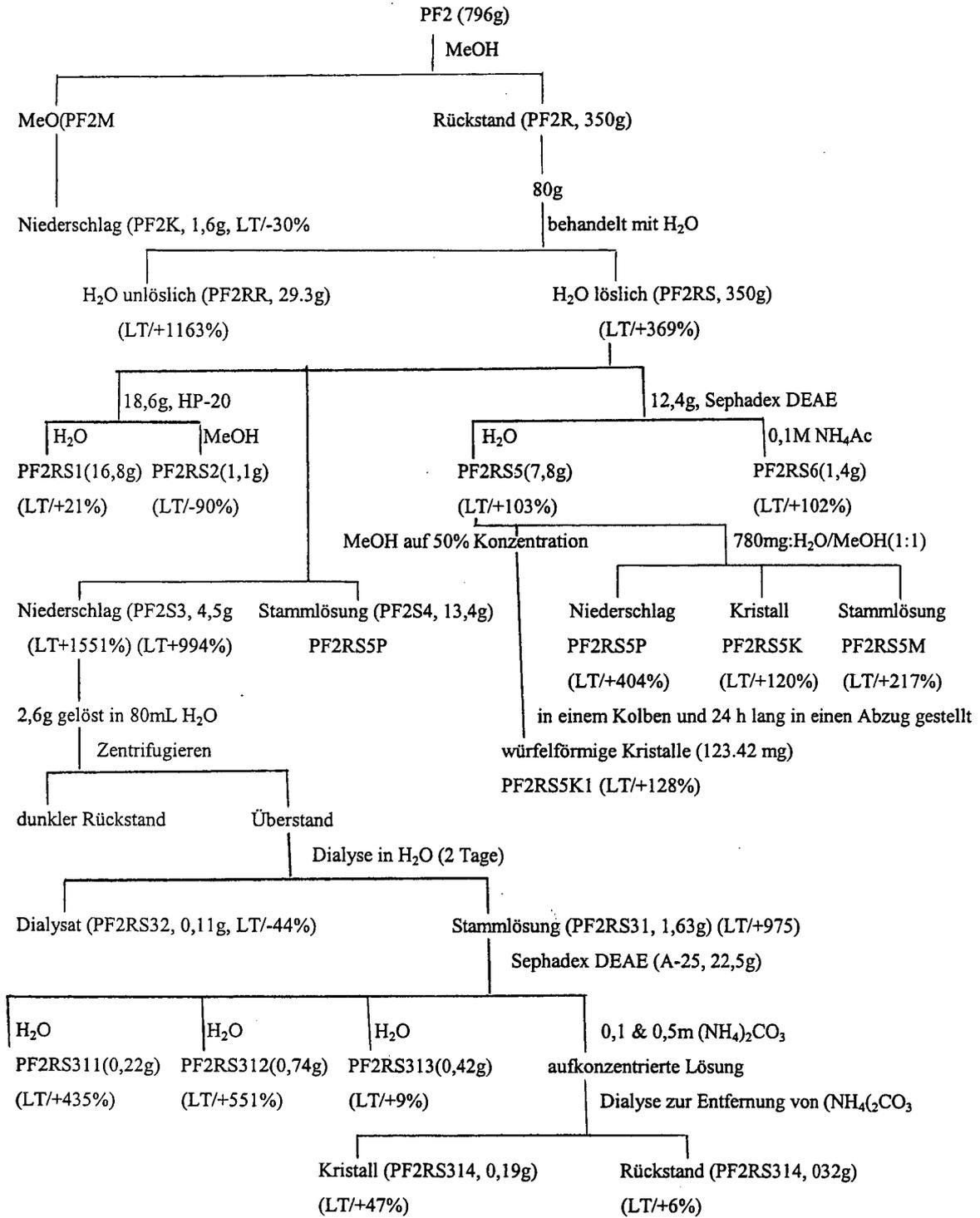
16. Pharmazeutisches Präparat nach Anspruch 15, des Weiteren einschließlich eines pharmazeutisch

verträglichen Träger.

17. Pharmazeutisches Präparat nach den Ansprüchen 15 und 16, des Weiteren einschließlich mindestens einen anderen pharmazeutischen Wirkstoff.

Es folgen 21 Blatt Zeichnungen

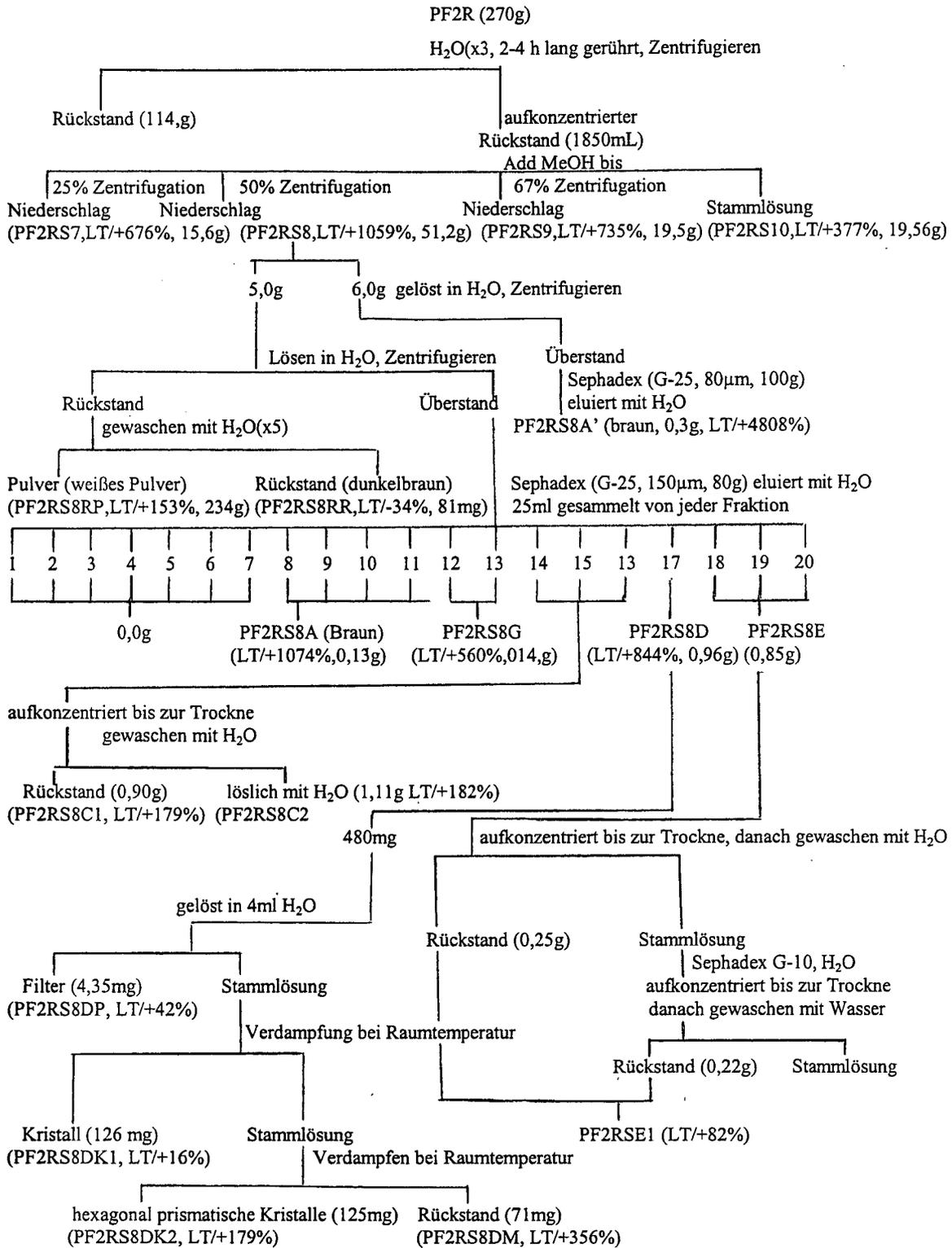
Anhängende Zeichnungen



LT: Lymphocyentransformationsaktivität

Bioaktivitäts-gesteuerte phytochemische Isolation von PF2

FIG. 1



LT: Lymphocytentransformationsaktivität

Bioaktivitäts-gesteuerte phytochemische Isolation von PF2R

FIG. 2

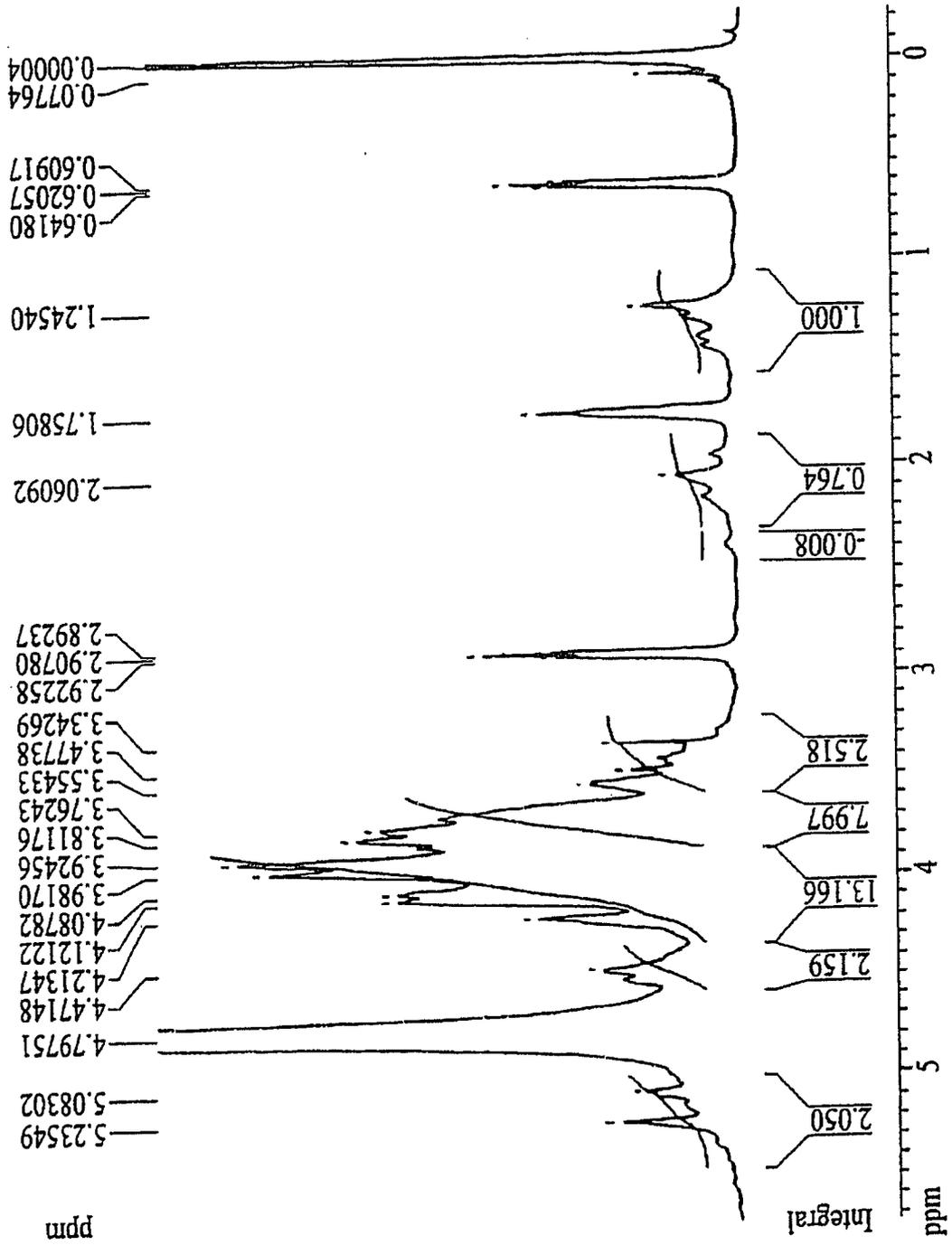
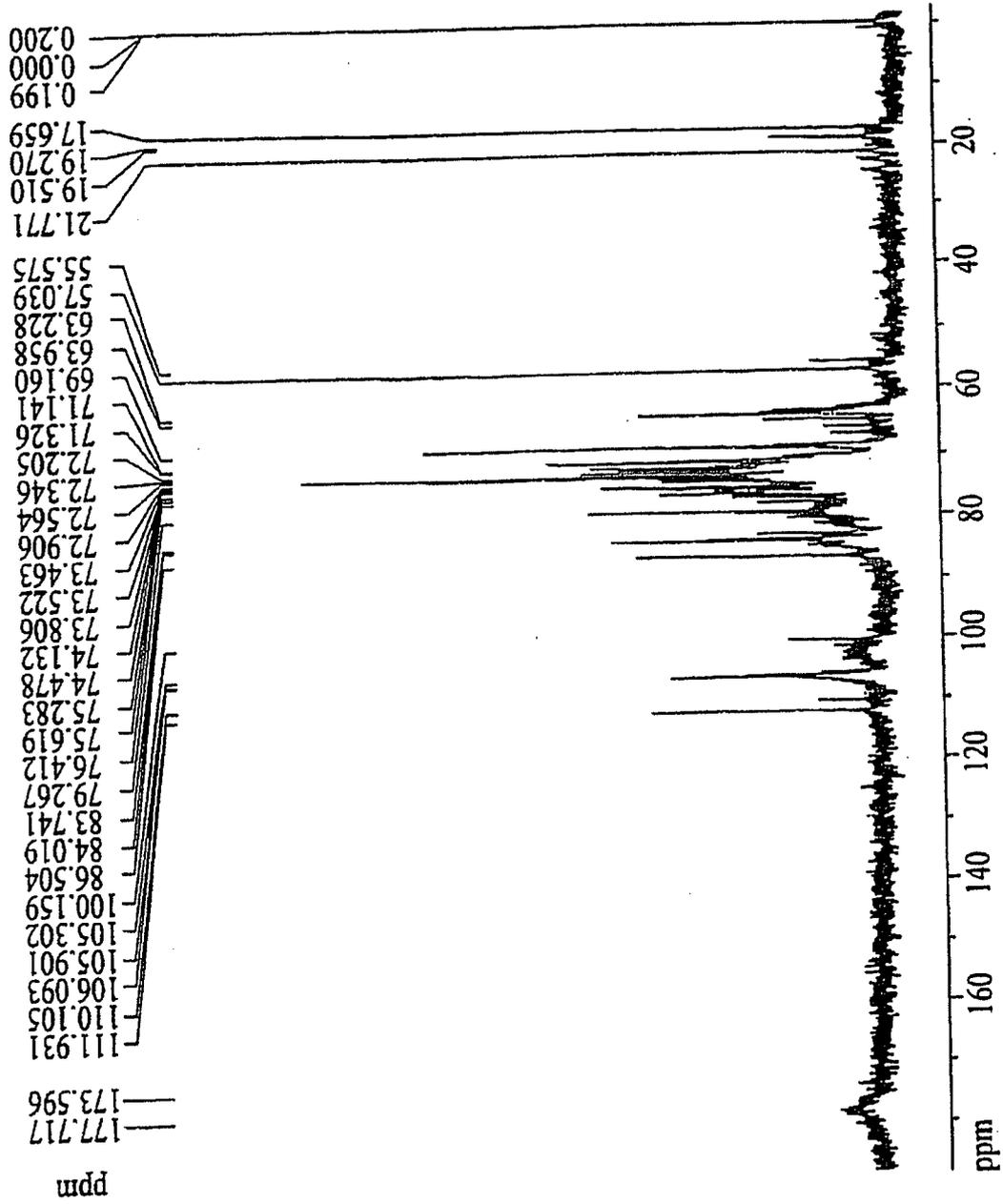
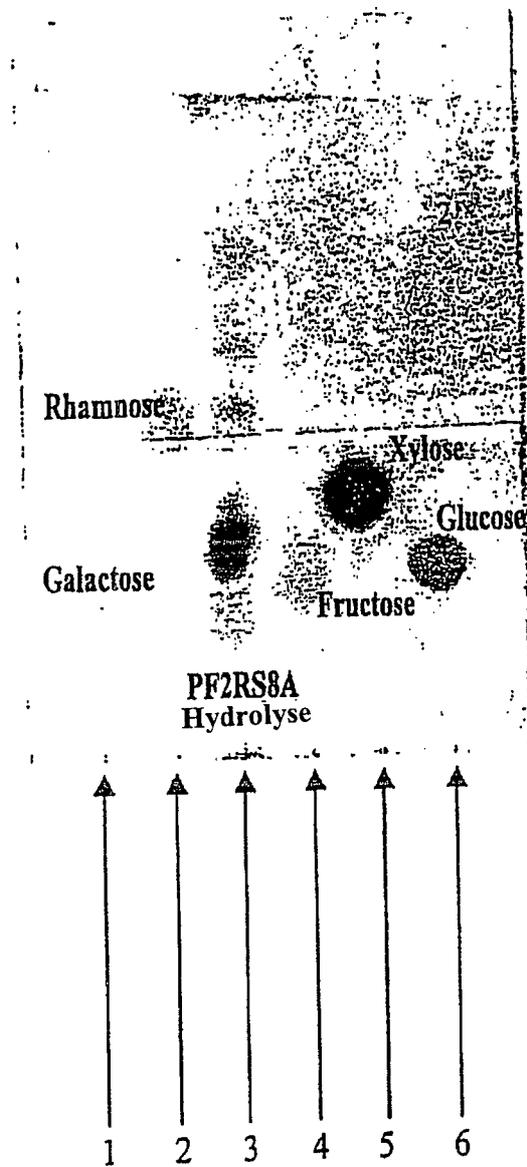


FIG. 3



¹³C-NMR-Spektrum von PF2RS8A (125 MHz, D₂O, bezogen auf DSS)

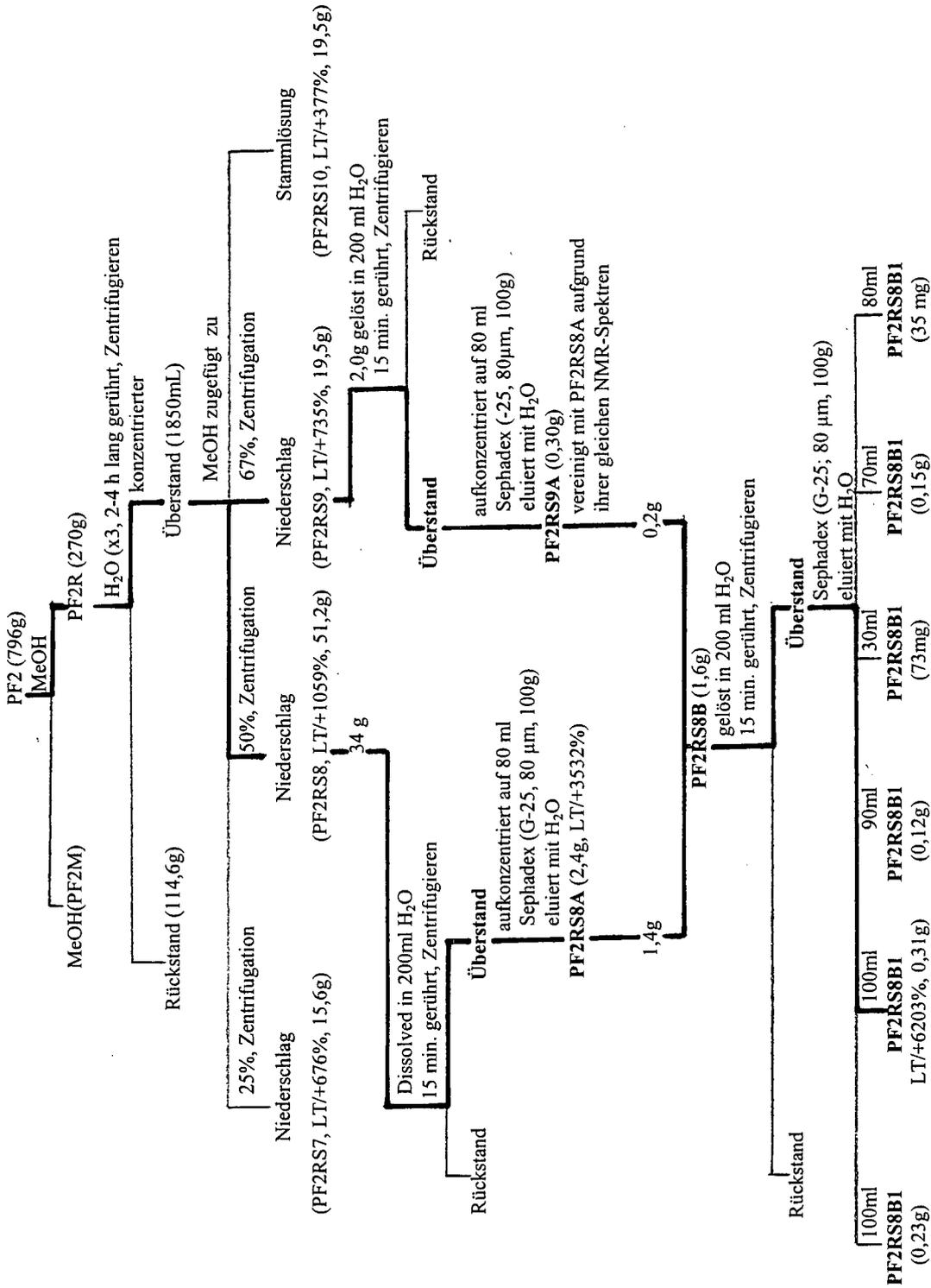
FIG. 4



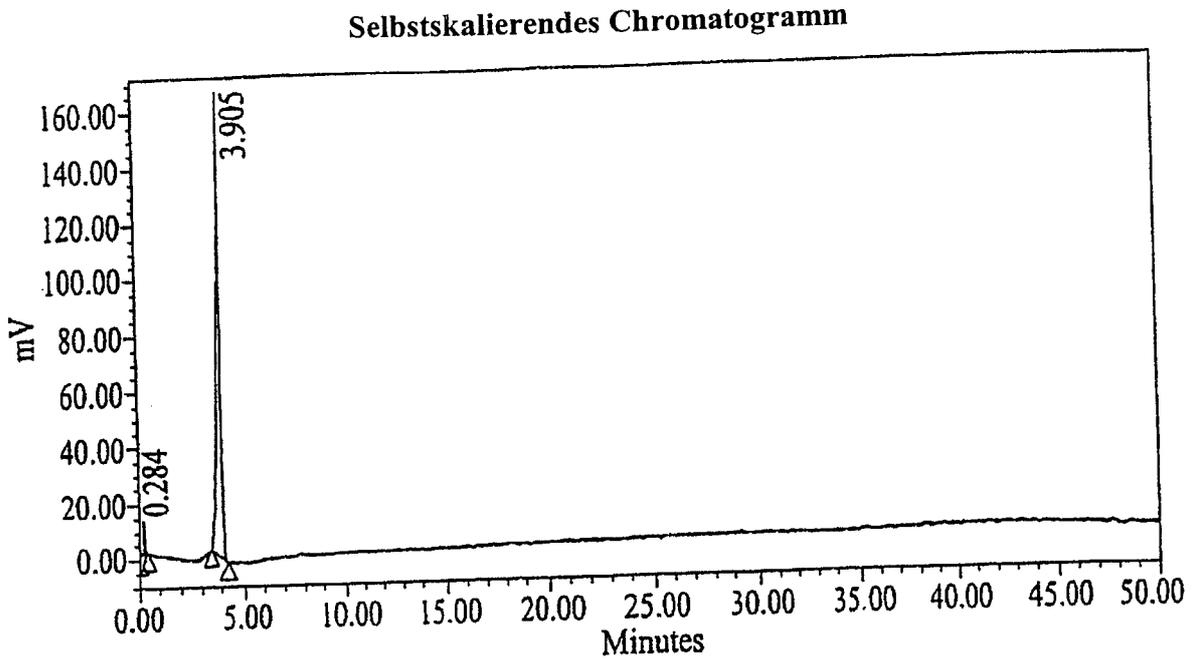
1. Galactose; 2. Rhamnose; 3. Die Hydrolyseprodukte von PF2RS8A; 4. Fructose; 5. Xylose; 6. Glucose

DC der Hydrolyseprodukte von PF2RS8A mit TFA und anderen Einfachzuckern

FIG. 5

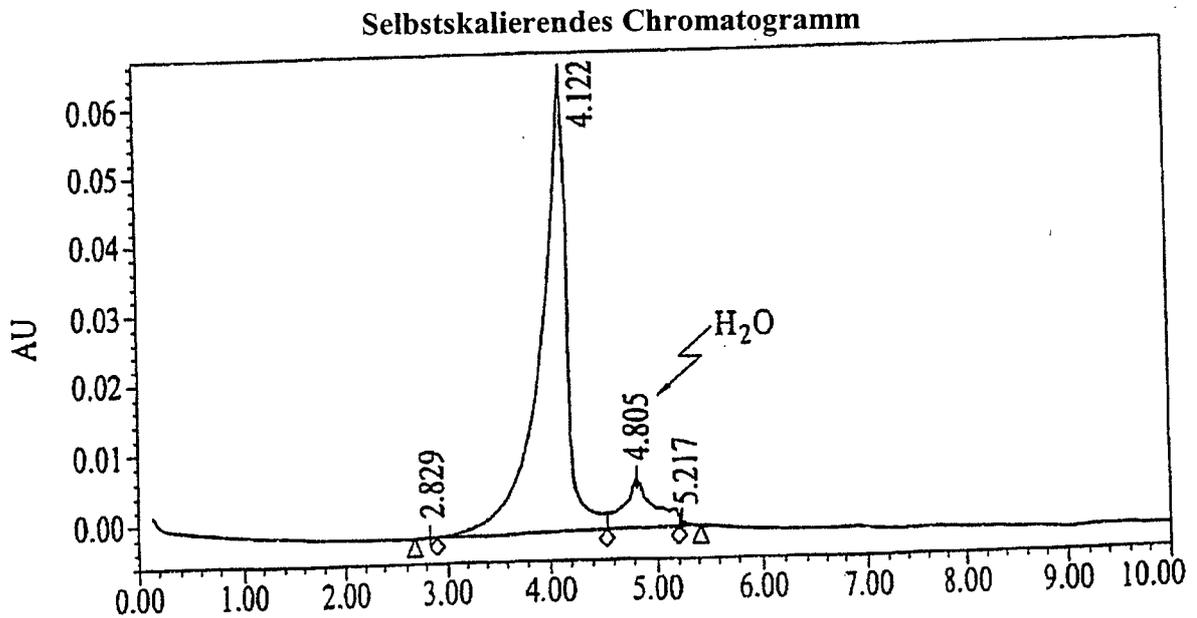


Bioaktivitäts-gesteuerte phytochemische Isolation eines aktiven Polysaccharids. **FIG. 6**



HPLC-Profil von PF2RS8B2 unter evaporative light scattering detector
(Watrex GMB 200, 250x8mm, 5µm, 1,0ml/min, H₂O)

FIG. 7



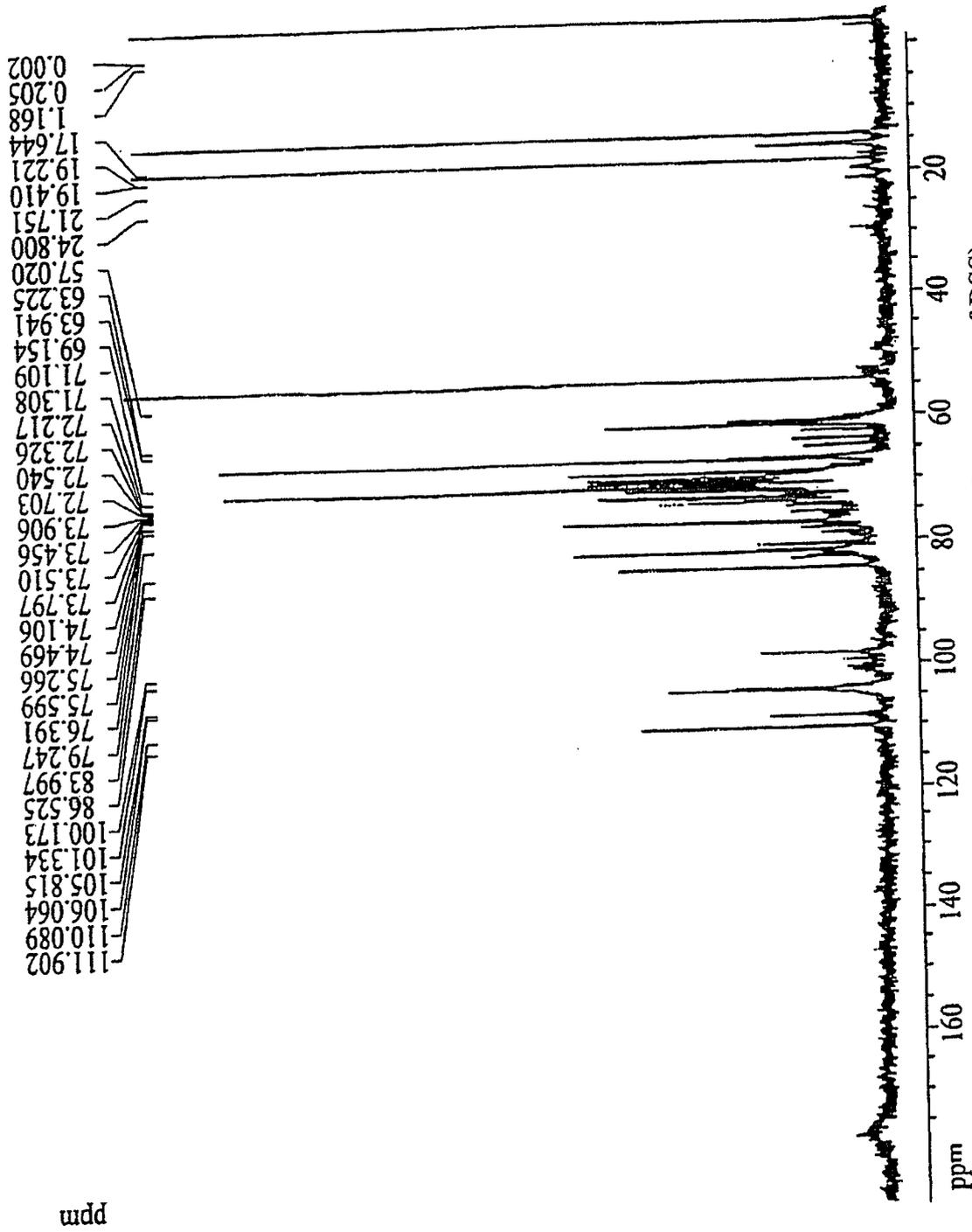
HPLC-Profil von PF2RS8B2 unter einem UV-Photodiodendetektor
(Watrex GMB 200, 250x8mm, 5µm, 1,0ml/min, H₂O)

FIG. 8

TABELLE 1

Wirkung der Proben PF2RS8A und PF2RS5B2 auf die Lymphocytentransformation
(weibliche SMC-Mäuse)

Konzentra- tion der Verbindung	Probe										
	Keine Konz.A					Keine Konz.A					
	PF2RS8A		PF2RS8B2			Mittelwert ± SA	%	Mittelwert ± SA	%	Mittelwert ± SA	%
0	165 ± 31	0	197 ± 51	0							
0,01	311 ± 41	+91	205 ± 49	+24							
0,1	371 ± 51	+127	361 ± 76	+83							
1	556 ± 26	+237	649 ± 48	+229							
10	3829 ± 380	+2220	2348 ± 305	+1092							
100	5993 ± 1760	+3532	12417 ± 3153	+6203							
Konz. A 8 µg/ml	1762 ± 349		1507 ± 250								



¹³C-NMR-Spektrum von PF2RS8B2 (125 MHz, D₂O, bezogen auf DSS)

FIG. 10

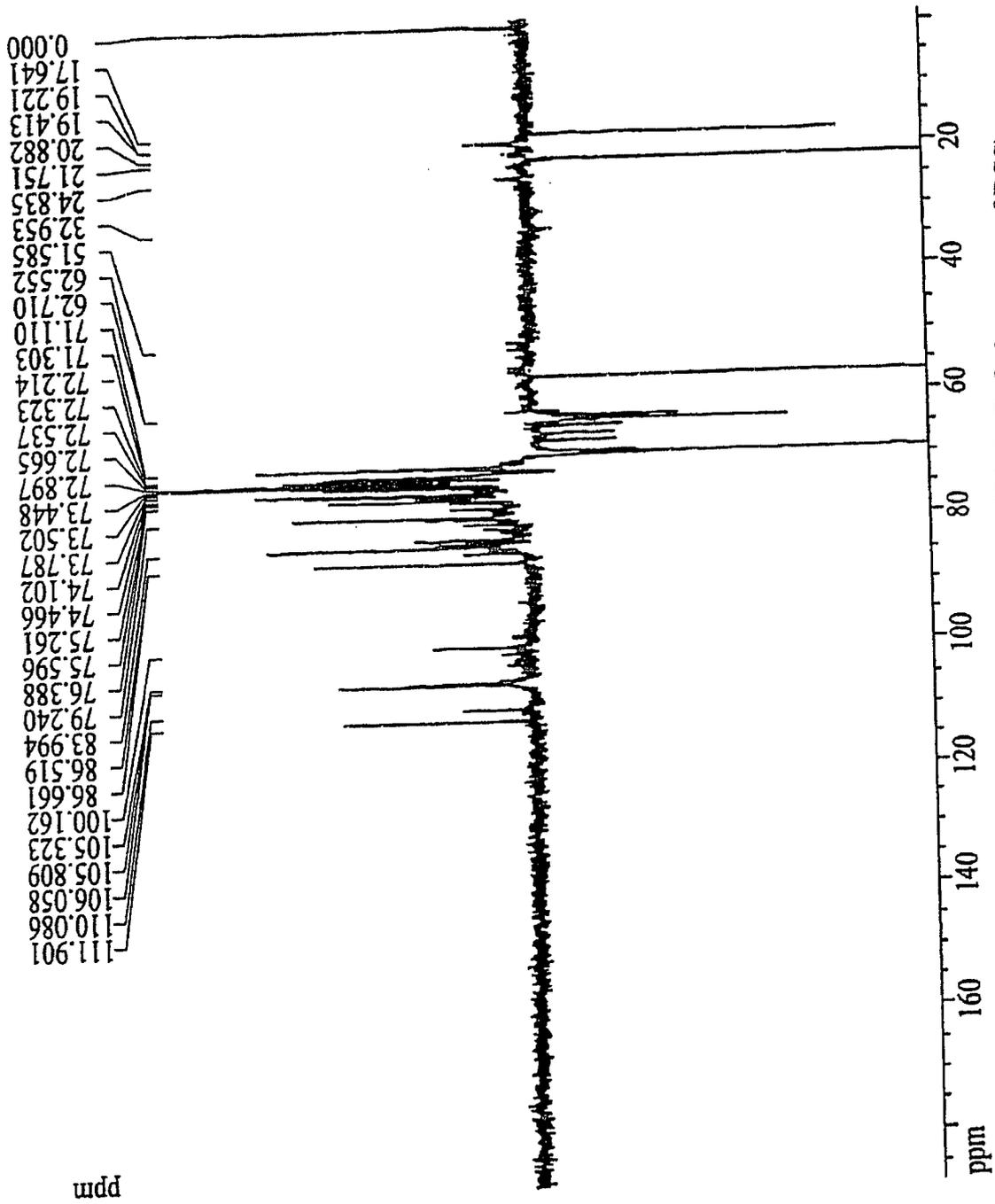


FIG. 11

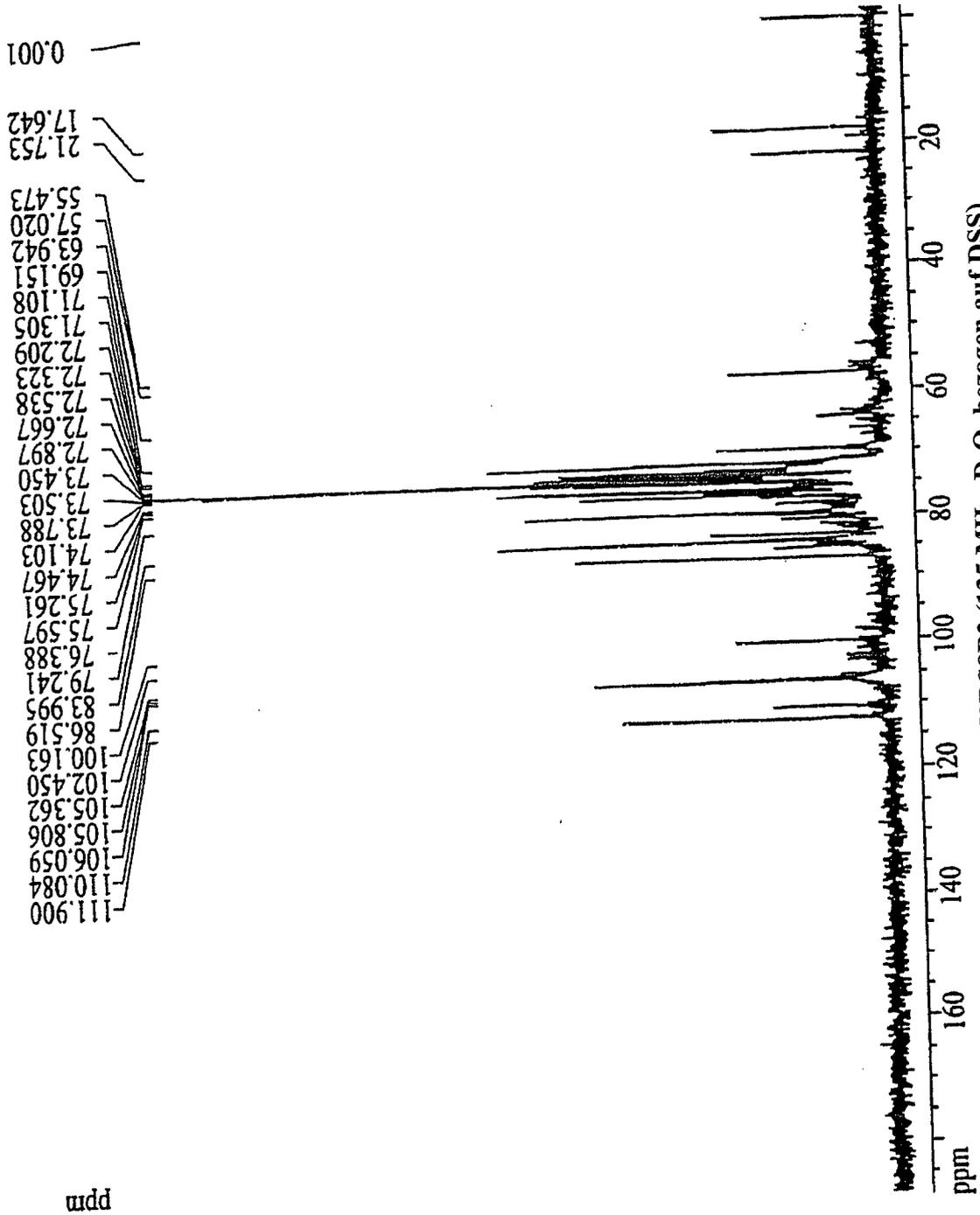
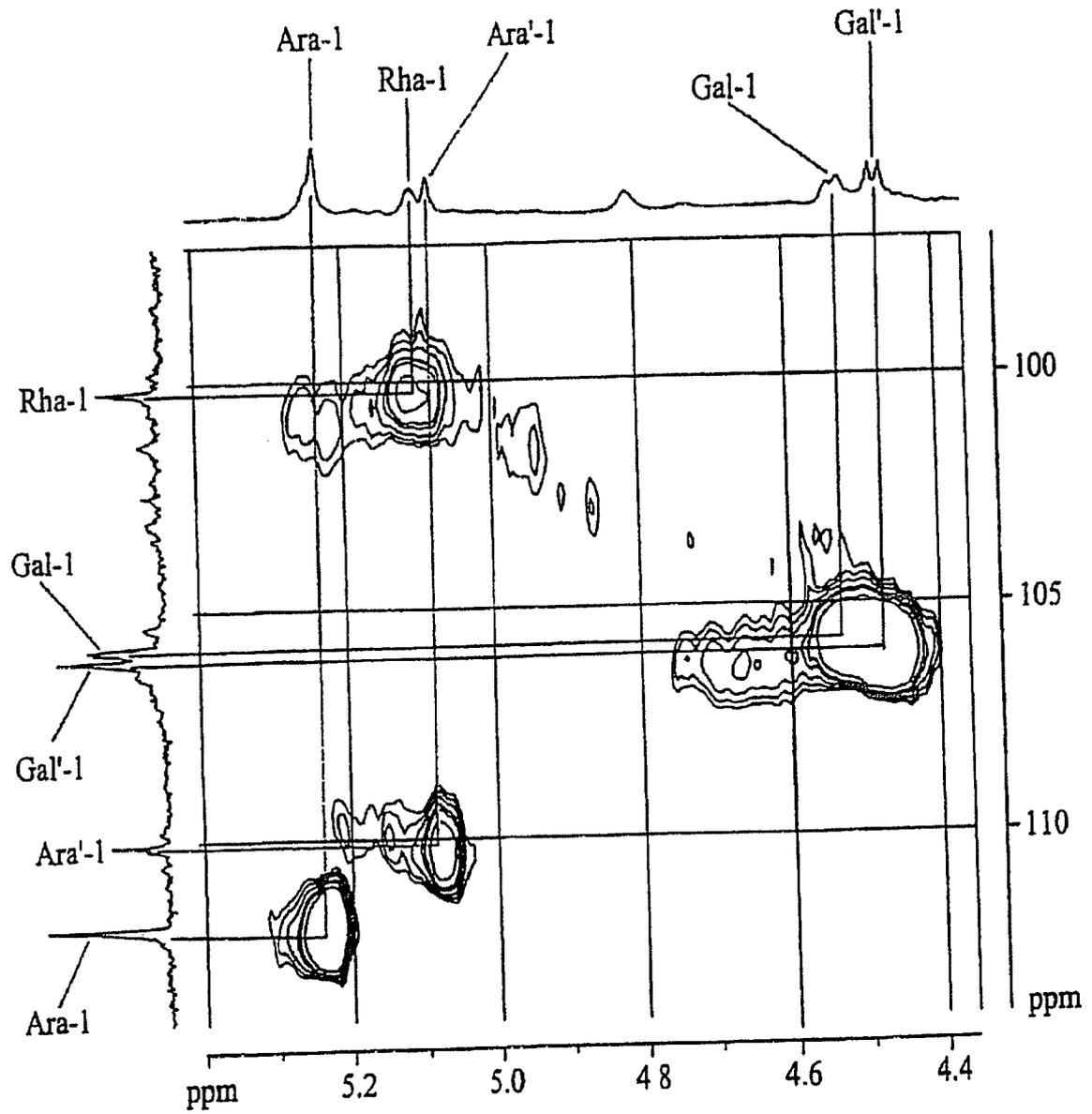
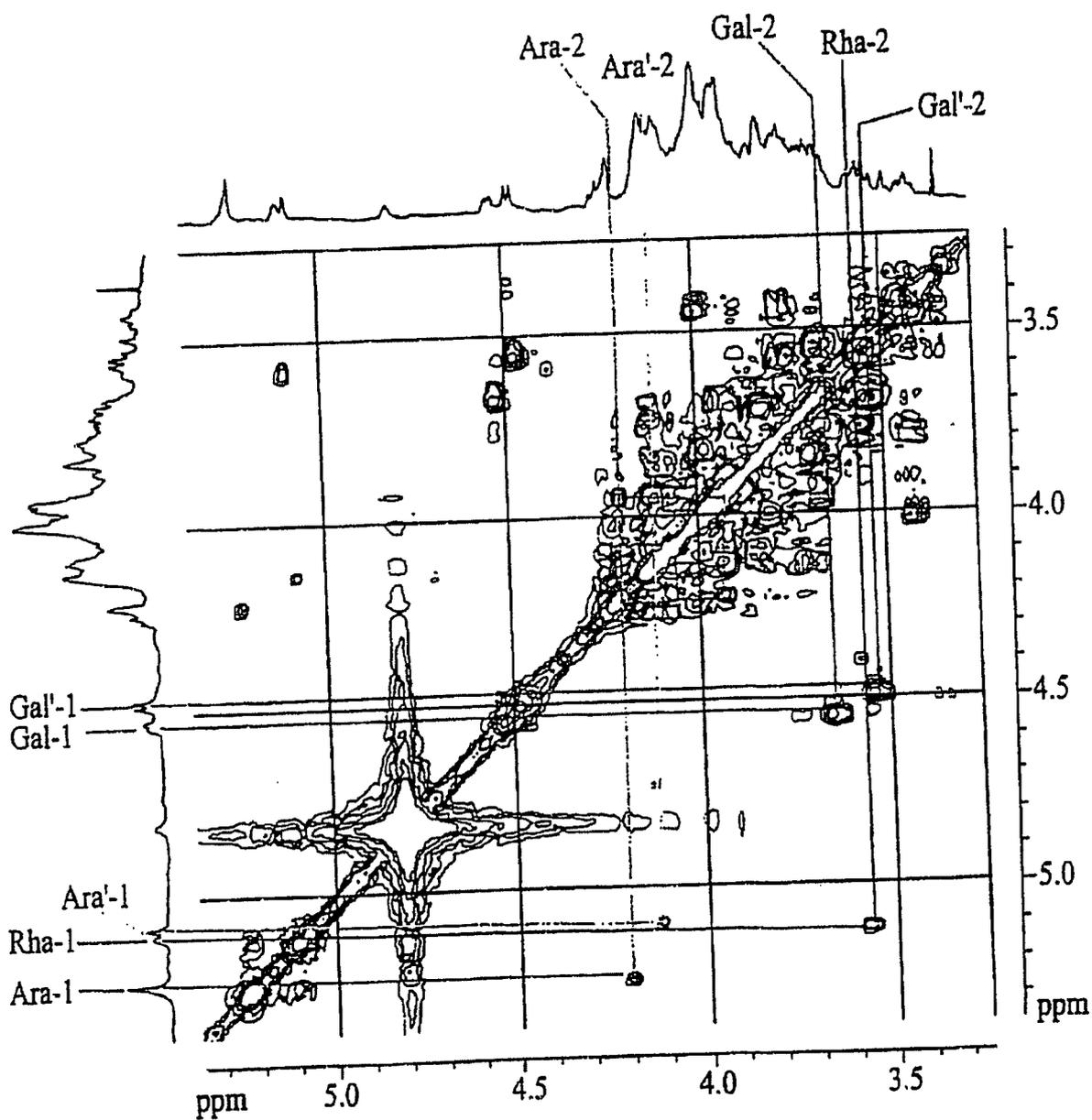


FIG. 12



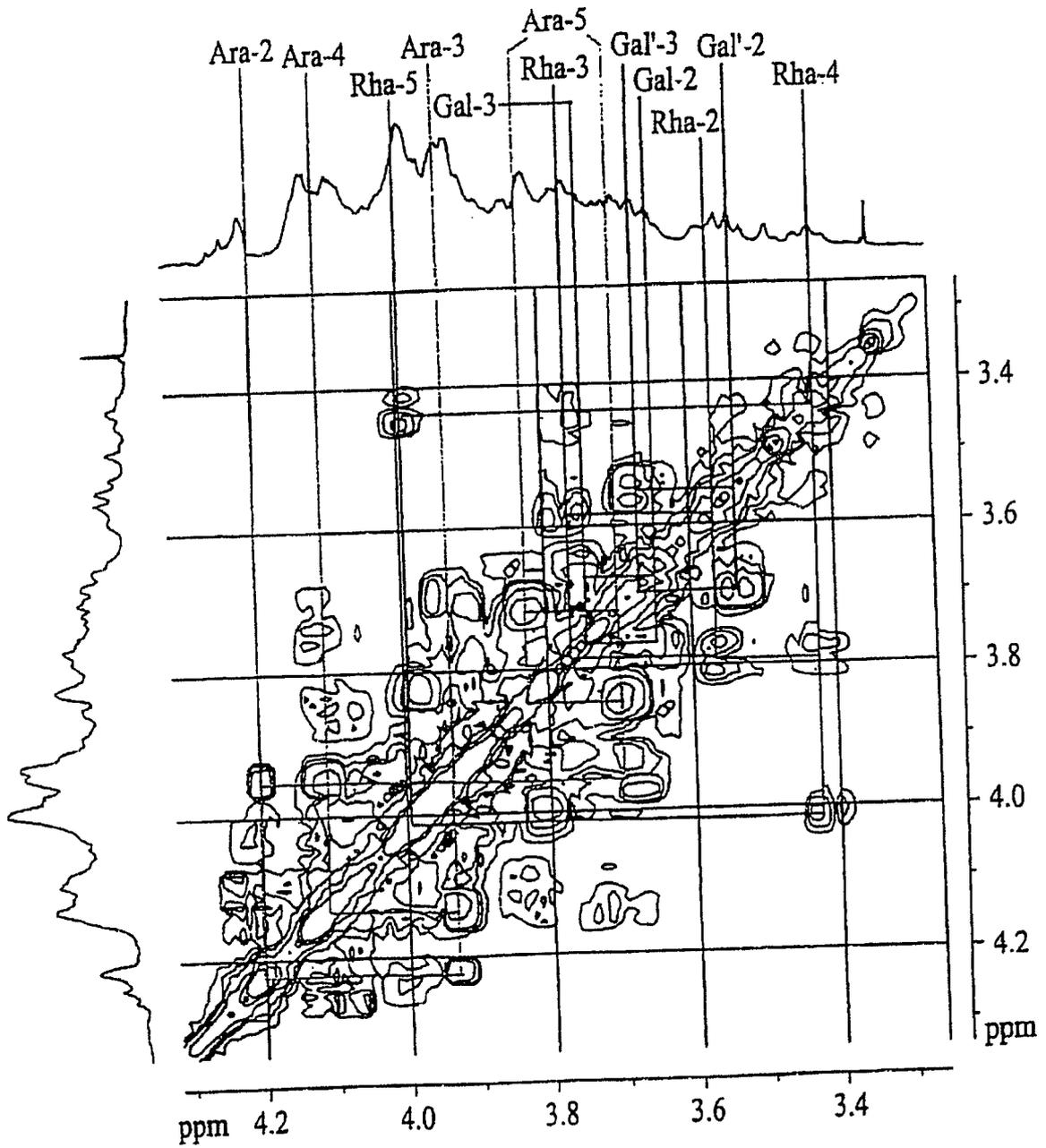
HMQC-Spektrum von PF2RS8B2 (500 MHz, D₂O)

FIG. 13



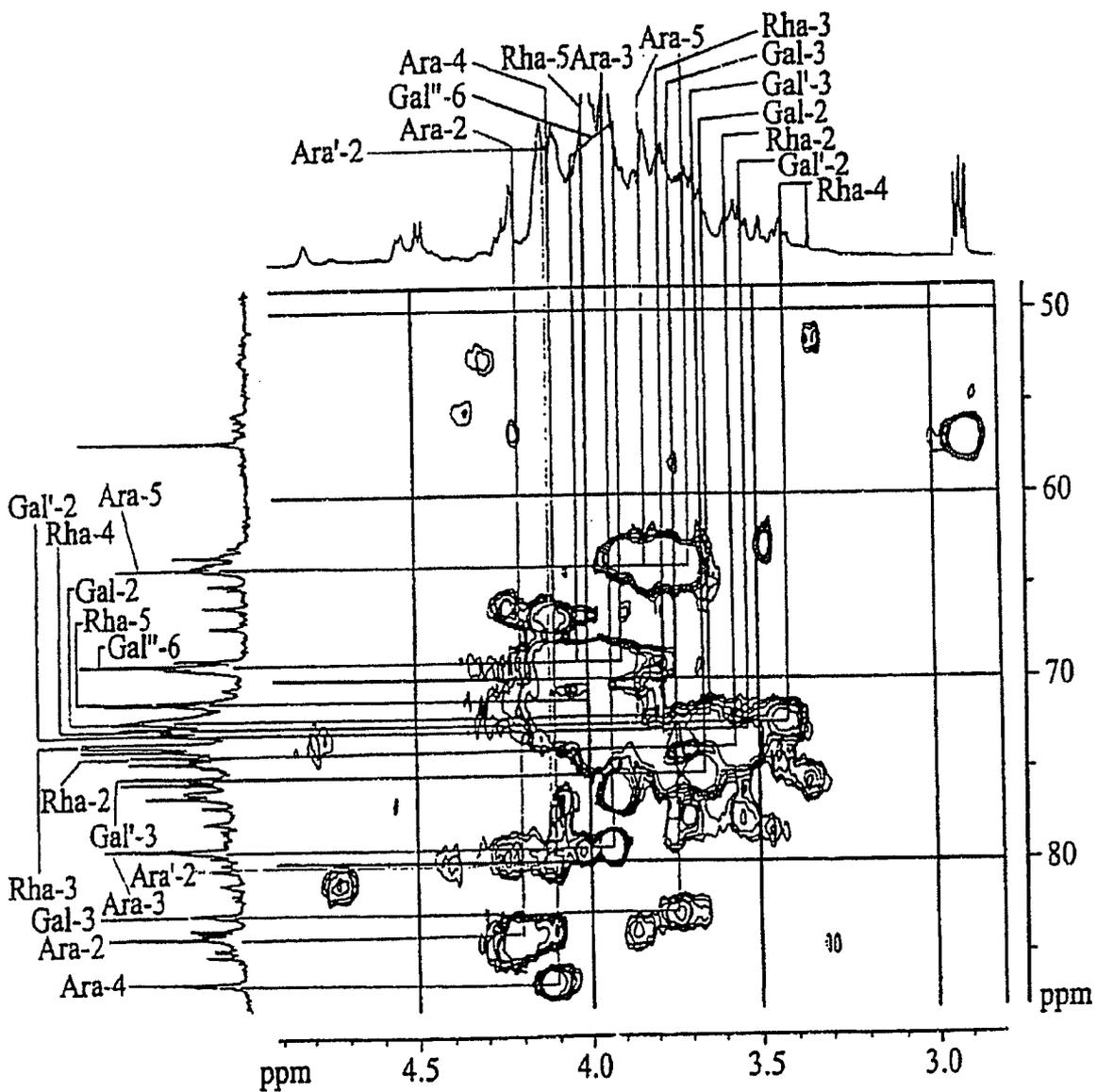
^1H - ^1H -COSY-Spektrum von PF2RS8B2 (500 MHz, D_2O)

FIG. 14



^1H - ^1H -COSY-Spektrum von PF2RS8B2 (500 MHz, D_2O)

FIG. 15

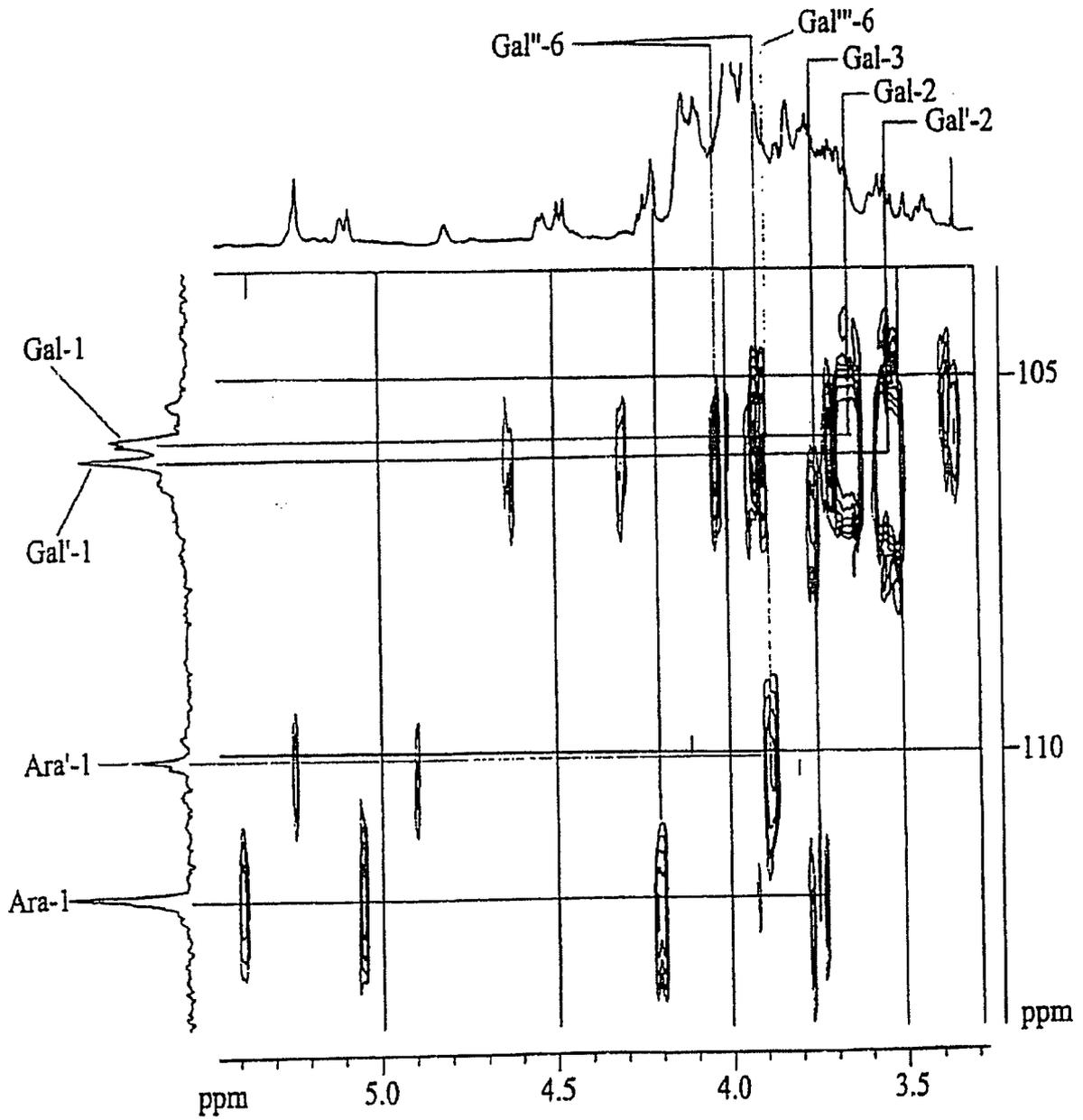


HMQC-Spektrum von PF2RS8B2 (500 MHz, D₂O)

FIG. 16

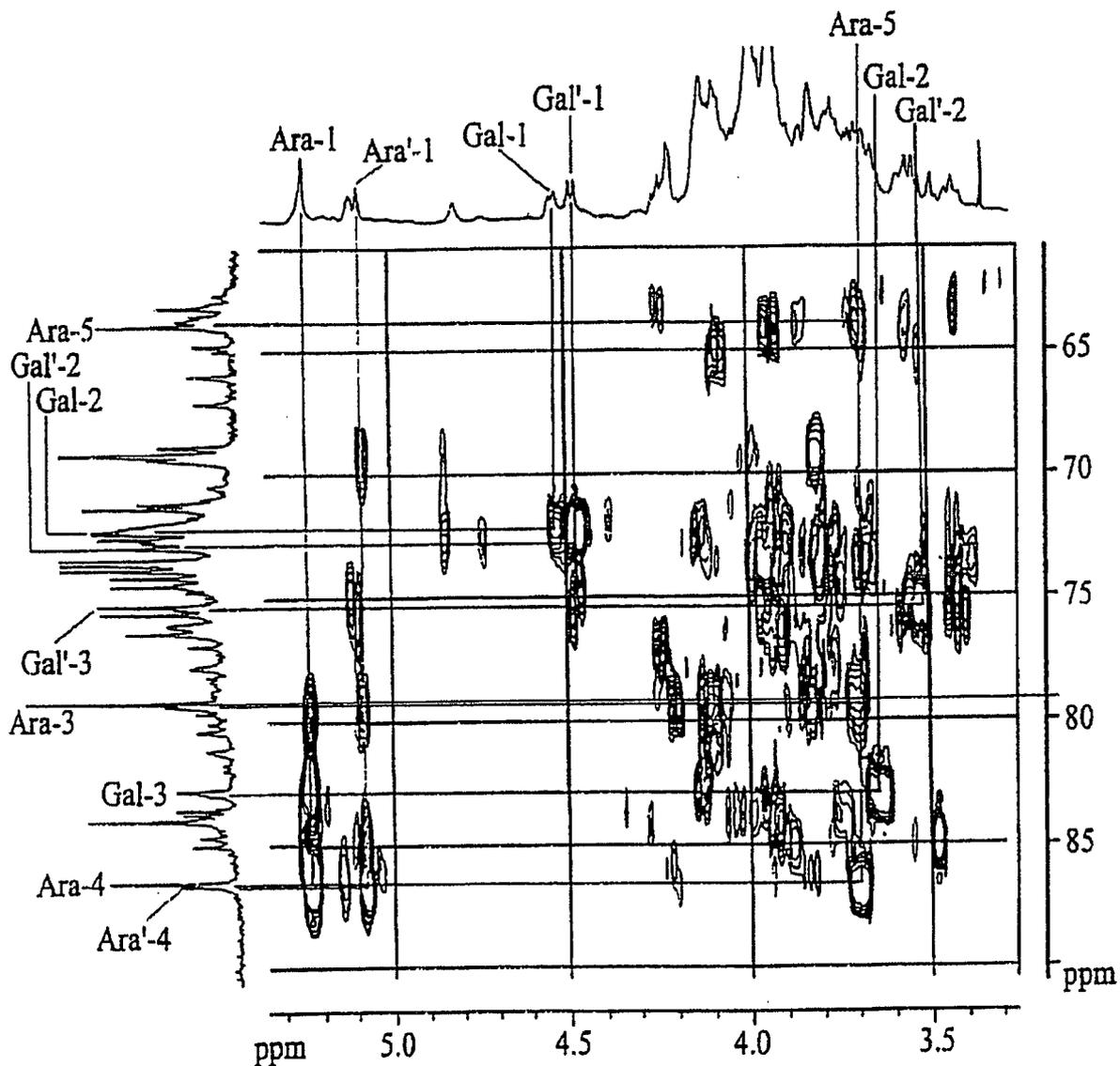
TABELLE 2¹³C-NMR-Daten von PF2RS8B-2 (D₂O, bezogen auf DSS, 125 MHz)

Zucker- Verknüpfungen	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Araf-(1 →	110.1d	85.0d 84.7d	74.5d	86.7d	63.2t	—
→3)-Araf-(1 →	111.9d	84.0d 83.9d 83.7d	79.4d	86.5d	63.9t 63.7t 64.8t	—
→6)-Galp-(1 →	106.1d	72.9d	75.3d	72.2d	76.4d	69.2t
→3) Galp-(1 →)	105.9d	73.5	82.8d	73.5d	76.1d	69.2t
→6) Galp-(1 →)	105.8d					
Rhap-(1 →	100.2d	72.2d	73.5d	72.5d	71.1d	19.2q



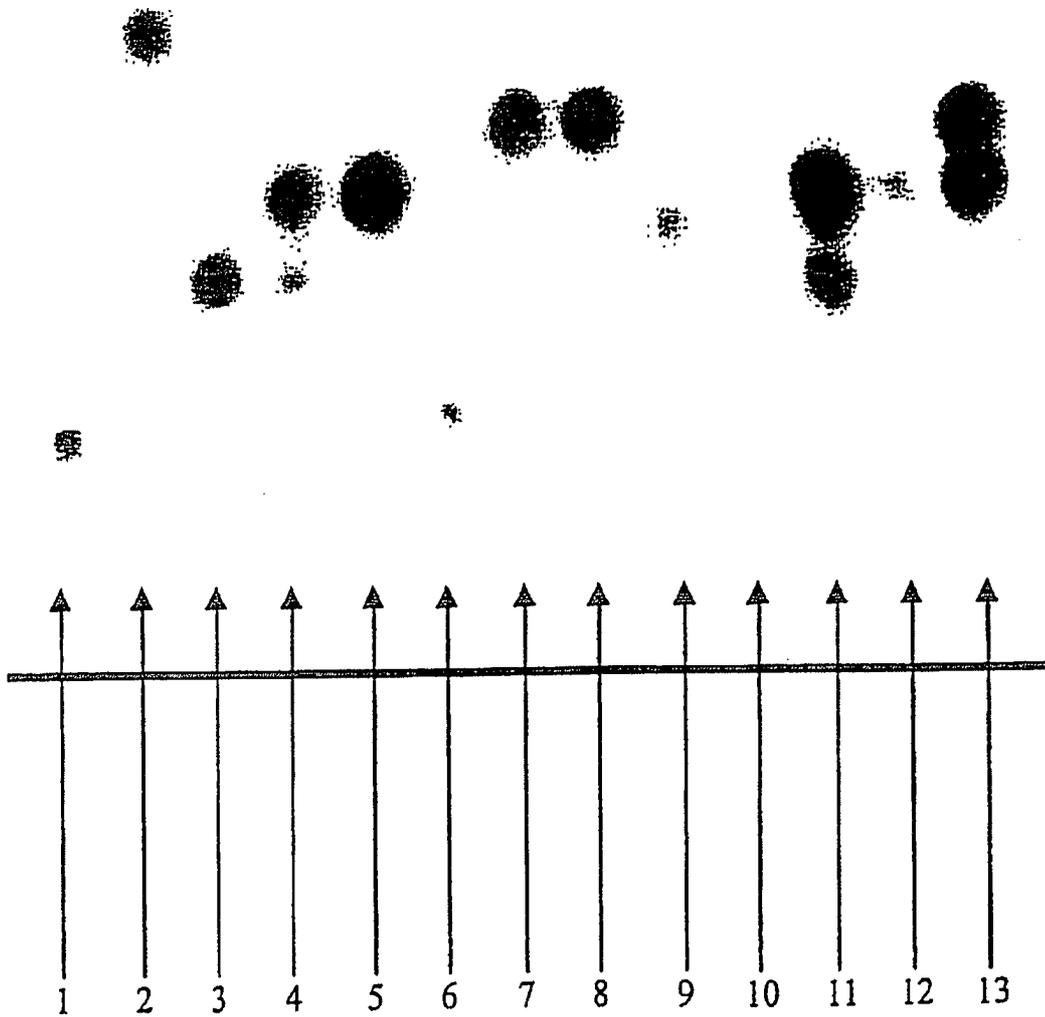
HMQC-Spektrum von PF2RS8B2 (500 MHz, D₂O)

FIG. 17



HMQC-Spektrum von PF2RS8B2 (500 MHz, D₂O)

FIG. 18



1. D-Galacturonsäure; 2. L-(+)Rhamnose; 3. D-(+)Galactose;
4. Hydrolyseprodukte von PF2RS8B-2, 6. 5. L..(+)-Arabinose;
6. D-Glucuronsäure; 7. L-(-)Fucose; 8. d.(+)Xylose; 9. D-(+)Glucose;
10. D-(-)-Fructose; 11. Gemisch aus Hydrolyseprodukten von PF2RS8B-2;
12. D-(+)Mannose; 13. Gemisch aus D-(+)Xylose und L-(+)Arabinose

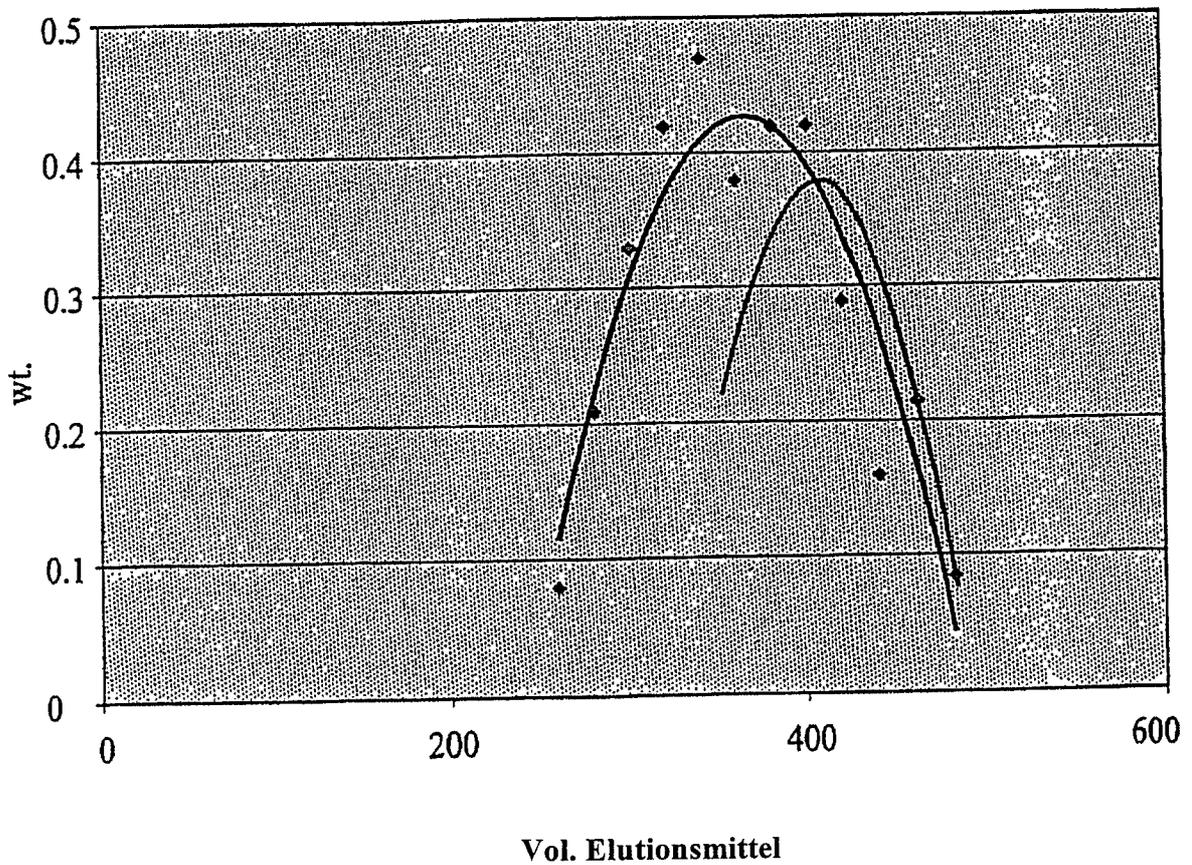
DC der Hydrolyseprodukte von PF2RS8B2 mit TFA und anderen
Einfachzuckern

FIG. 19

Molekulargewichtsbestimmung von PF23RS8B2 unter Verwendung von Sephadex G-50

— Destran 10500 standard

— PF2RS8B2



PF2RS8B2 Molekulargewicht unter 10 500

FIG. 20