



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2005102102/04, 26.06.2003

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.06.2003

(30) Конвенционный приоритет:
30.07.2002 (пп.1-18) IT MI2002A001692

(43) Дата публикации заявки: 10.07.2005

(45) Опубликовано: 20.10.2007 Бюл. № 29

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: US 4857512 A (LOHMANN RUDOLF
LOMAPHARM) 15.08.1989. RU 2137490 C2,
20.09.1999. DE 3217214 A, 10.11.1983. DE
950674 (GRUENENTHAL CHEMIE) 11.10.1956. RU
2182011 C1, 10.05.2002.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную
фазу: 28.01.2005

(86) Заявка РСТ:
EP 03/06717 (26.06.2003)

(87) Публикация РСТ:
WO 2004/014958 (19.02.2004)

Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег. № 517

(72) Автор(ы):

ДЖИОРИ Андреа (IT),
АНЕЛЛИ Алессандро (IT),
МОРАЦЦОНИ Паоло (IT),
ДИ ПЬЕРО Франческо (IT)

(73) Патентообладатель(и):
ИНДЕНА С.П.А. (IT)

(54) ПОЛИСАХАРИД ИЗ КОРНЕЙ ECHINACEA ANGUSTIFOLIA, СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ

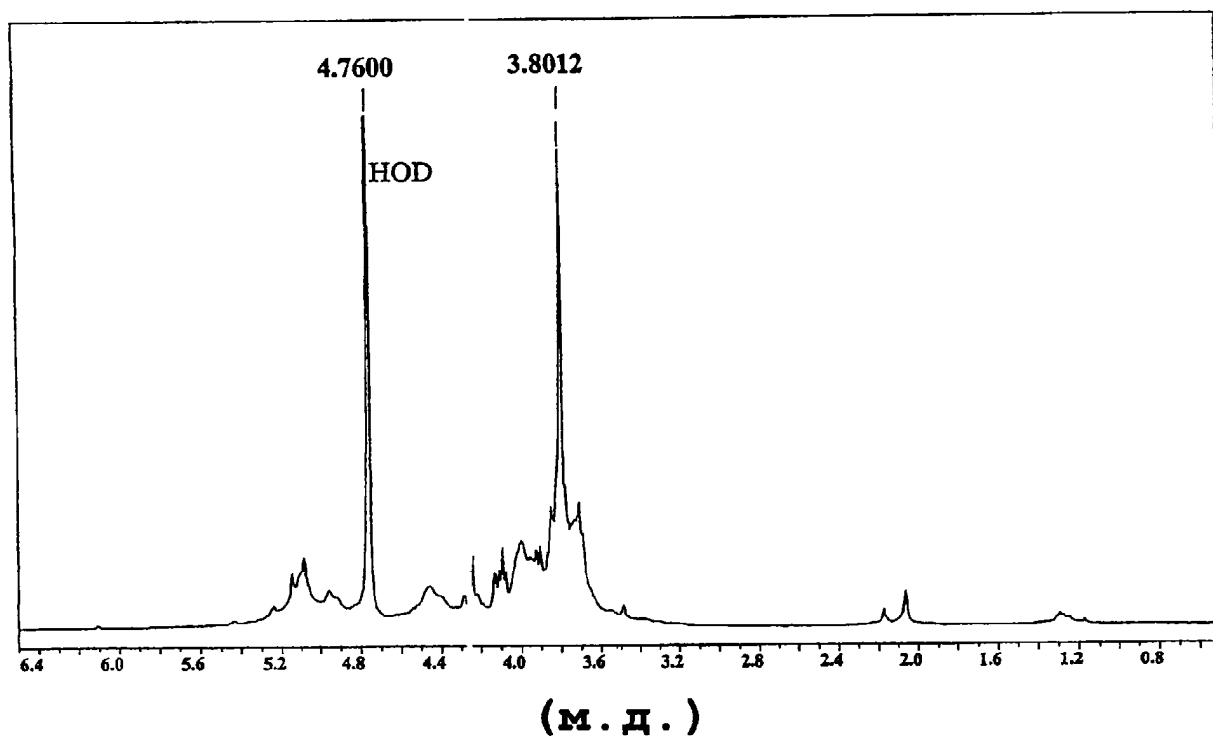
(57) Реферат:

Изобретением является полисахарид из корней Echinacea angustifolia, имеющий молекулярную массу $1,3 \times 10^5$ Да и состоящий из рамнозы, арабинозы, галактозы и галактуроновой кислоты в соотношении 0,5:2,5:1,75:10,25, причем он имеет остов с чередующимися прямыми и разветвленными участками, причем прямые участки состоят из частично ацетилированных и метилированных остатков галактуроновой кислоты, связанных α -(1-4) связями, и разветвленные участки состоят из чередующихся остатков галактуроновой кислоты и рамнозы, к которым присоединены боковые цепи, состоящие из арабинозы и галактозы в соотношении 2,5:1,75.

Полисахарид применяется для получения лекарственного средства для усиления защитных реакций иммунной системы организма. Также описан способ получения полисахарида, включающий следующие стадии: а) удаление непполисахаридных компонентов из корней Echinacea angustifolia экстракцией растворителем, представляющим собой ацетон или спирт, имеющий от одного до трех атомов углерода, с содержанием воды в растворителе, не превышающим 40% об./об.; б) экстракцию полученной непосредственно на стадии а) полисахаридной фракции из корней Echinacea angustifolia растворителем, представляющим собой воду или смесь воды и ацетона, или воды и спирта, имеющего от одного до

трех атомов углерода, с содержанием воды в смеси растворителей, составляющим 60% или более; с) выделение полисахарида хроматографией из

полученной после предварительной очистки полисахаридной фракции. 4 н. и 14 з.п. ф-лы, 3 ил., 2 табл.



^1H ЯМР спектр полисахарида 1

ФИГ. 1

RU 2308460 C2

RU 2308460 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C08B 37/00 (2006.01)**C08B 37/18** (2006.01)**A61K 31/715** (2006.01)**A61P 37/00** (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2005102102/04, 26.06.2003**(24) Effective date for property rights: **26.06.2003**(30) Priority:
30.07.2002 (cl.1-18) IT MI2002A001692(43) Application published: **10.07.2005**(45) Date of publication: **20.10.2007 Bull. 29**(85) Commencement of national phase: **28.01.2005**(86) PCT application:
EP 03/06717 (26.06.2003)(87) PCT publication:
WO 2004/014958 (19.02.2004)Mail address:
**129010, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i
Partnery", pat.pov. E.E.Nazinoj, reg. № 517**

(72) Inventor(s):

**DZHIORI Andrea (IT),
ANELLI Alessandro (IT),
MORATsTsONI Paolo (IT),
DI P'ERO Franchesko (IT)**

(73) Proprietor(s):

INDENA S.P.A. (IT)(54) **POLYSACCHARIDE FROM ECHINACEA ANGUSTIFOLIA ROOTS, METHOD FOR PRODUCTION THEREOF AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION**

(57) Abstract:

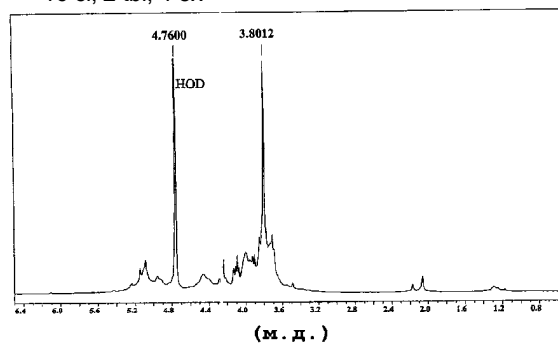
FIELD: biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to polysaccharide from Echinacea angustifolia roots with molecular mass of 1.3×10^9 Da and comprising of ramnose, arabinose, galactose, and galacturonic acid in ratio of 0.5:2.5:1.75:10.25. Said polysaccharide has skeleton with linear and branched repeated units, wherein linear units comprise partially acetylated and methylated galacturonic acid residues bonded via α -(1-4) bonds and branched units comprise repeated units of galacturonic acid residues and ramnose bearing side chains comprising arabinose and galactose in ratio of 2.5:1.75. Said polysaccharide is useful in production of drug for amplification of immune system. Method for production of polysaccharide includes removing of non-polysaccharide components from Echinacea angustifolia roots by extraction with solvent such as acetone or C_1 - C_3 -alcohol containing not more than 40 % v/v of water; extraction of polysaccharide fraction from Echinacea angustifolia roots

directly obtained in the first stage with solvent such as water or mixture of water and acetone, or water and C_1 - C_3 -alcohol containing at least 60 % of water; polysaccharide isolating by chromatography from polysaccharide fraction obtained after preliminary purification.

EFFECT: new polysaccharide with pharmaceutical properties.

16 cl, 2 tbl, 4 ex

¹H ЯМР спектр полисахарида 1

ФИГ. 1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области полисахаридов, в частности к полисахариду *Echinacea angustifolia* и к способу его получения. Полисахарид может использоваться для лечения патологических состояний, при которых желательно усилить иммунную защитную реакцию.

Уровень развития данной области

Echinacea представляет собой растение, происходящее из Северной Америки и Мексики; его лекарственные свойства были хорошо известны коренному населению Америки, использовавшему его для заживления ран. Благодаря тому, что *Echinacea* считали способной усиливать сопротивляемость инфекциям, в течение первых лет прошлого столетия ее использование для лечения местных и общих инфекций стало широко распространенным. *Echinacea*, в частности, *Echinacea angustifolia*, в настоящее время интенсивно рекомендуется для лечения синдромов гриппа и, в частности, для лечения простуды, для заживления ран и лечения микоза.

Основное действие предположительно обусловлено неспецифическим стимулированием иммунной системы и сенсibilизацией бактерий и патогенных микроорганизмов к химиотерапии и антибиотикам. Живляющие свойства, по-видимому, можно приписать способности, проявляемой одним из действующих начал, содержащихся в растении, т.е. эхинакозиду, и стабилизировать гиалуроновые кислоты за счет ингибирования гиалуронидазы и массовой активации макрофагов, индуцированной полисахаридами. Таким образом, любые очаги инфекции остаются локализованными и поддерживается аккумуляция мукополисахаридов и гистопластического материала, необходимых для репаративных процессов.

Поскольку большая фракция полисахаридов *Echinacea* состоит из инулина, который не может считаться ответственным за вышеупомянутые свойства, необходимо идентифицировать активный полисахарид и обеспечить эффективный способ его экстракции и очистки.

Подробное описание изобретения

Предметом изобретения является полисахарид из корней *Echinacea angustifolia* (здесь и далее обозначаемый как «полисахарид»), имеющий молекулярную массу $1,3 \times 10^5$ Да и состоящий из рамнозы, арабинозы, галактозы и галактуроновой кислоты в соотношении 0,5:2,5:1,75:10,25. В скелете полисахарида чередуются прямые и разветвленные участки, прямые участки состоят из частично ацетилированных (9%) и метилированных (35%) остатков галактуроновой кислоты, связанных α -(1-4) связями, и разветвленные участки состоят из чередующихся остатков галактуроновой кислоты и рамнозы, к которым присоединены боковые цепи, содержащие арабинозу и галактозу в соотношении 2,5:1,75. Полисахарид характеризуется ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР спектрами и профилем гельпроникающей хроматографии (GCP), как показано на фиг. 1-3.

Полисахарид выделяют из корней дикорастущей или культивируемой *Echinacea angustifolia* способом, включающим следующие стадии:

- a) удаление неполисахаридных компонентов экстракцией растворителем;
- b) экстракция полисахаридной фракции из корней, непосредственно получаемой в предыдущей стадии;
- c) выделение полисахарида хроматографией полисахаридной фракции.

Цель стадии a) заключается в удалении неполисахаридных компонентов корней, главным образом эхинакозида и его аналогов, а также большой группы алкиламидов, которые также представляют собой характерные компоненты *Echinacea angustifolia* (R. Bauer et al., *Phytochemistry* 28, 505, 1989; *Planta Med.* 55, 367, 1989).

Соответственно, корни экстрагируют растворителем, выбираемым из ацетона или спирта, имеющего от одного до трех атомов углерода, возможно с примесью воды, при температуре в диапазоне от 20°C до температуры кипения, предпочтительно при кипячении с обратным холодильником. Содержание воды в растворителе не должно превышать 40% (об./об.). Этанол в концентрации от 80 до 95% (об./об.) является предпочтительным растворителем.

Цель стадии b) состоит в экстракции смеси полисахаридных компонентов из корней.

Экстракцию производят водой, ацетоном или спиртом, имеющим от одного до трех углеродных атомов, с примесью воды, при температуре в диапазоне от 20°C до температуры кипения растворителя, предпочтительно от 40 до 70°C. При использовании смеси растворителей содержание воды может быть 60% или выше, предпочтительно 85% (об./об.). Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения растворитель представляет собой 15% (об./об.) этанол.

Стадия с) обеспечивает фракционирование экстракта из стадии b) и отделение полисахарида от других полярных компонентов экстракта. Эта стадия предпочтительно заключается в исключающей по размеру хроматографии или ионообменной хроматографии.

В первом случае полисахарид очищают на основании размеров его молекул: фактически полисахарид имеет характеристическую массу, отличную от масс всех других компонентов. Подходящим образом сшитая смола может разделять типы химических реагентов с разными размерами; пропускание экстракта из стадии b) через смолу этого типа (например, Toyopearl HW-65S и Superdex® 2200HR) позволяет очистить полисахарид по изобретению.

Очистка полисахарида ионообменной хроматографией основана на кислотном характере полисахарида, обусловленном присутствием карбоксильной группы в звеньях галактуроновой кислоты. Пропускание экстракта из стадии b) через анионообменную смолу позволяет удерживать только полисахарид и любые другие кислотные компоненты (которые присутствуют в малых количествах) и удалять все нейтральные или основные компоненты. Смолу промывают физиологическим или кислым водным раствором для получения молекул, захваченных смолой. Соли или кислоты в очищенном растворе затем удаляют ультрафильтрационным диализом. Выбирают достаточно высокую отсечку (например, 10000 или 100000 Да) для удаления также и кислых примесей в исходном экстракте, задержанных анионной смолой.

Предпочтительные анионообменные смолы являются сильными ионообменными смолами, такими как Diaion HPA 25 и Q Sepharose® Fast Flow.

Очищенный раствор полисахарида, полученный по одному из хроматографических способов, описанных на стадии с), затем концентрируют и сушат в вакууме или сублимацией. Полисахарид представляет собой порошок цвета слоновой кости.

Стадия с) может также включать предварительные стадии очистки, необходимые для облегчения хроматографии. Не являясь обязательными, эти стадии позволяют удалить первую аликвоту примесей из экстракта стадии b) и уменьшить количество смолы.

Предварительную обработку выбирают из:

с1) концентрации экстракта из стадии b) при пониженном давлении и последующей очистки обработкой смесью воды и ацетона или воды и спирта, содержащего от одного до трех атомов углерода, предпочтительно этанола. Смесь может содержать 50-70%, предпочтительно 66,5%, спирта или ацетона. Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения остаток, полученный концентрацией экстракта, растворяют при комнатной температуре с тремя частями воды и разбавляют при перемешивании 7 объемами 95% этанола. Фракцию осадка, содержащую полисахарид, собирают фильтрацией, промывают этанолом концентрации от 50 до 70% и подвергают хроматографической очистке;

с2) обработки фракции полисахарида из стадии b) или обогащенной фракции из стадии с1) водой при комнатной температуре. Таким образом, полисахарид по изобретению, хорошо растворимый в воде, отделяют от других труднорастворимых полисахаридов. Экстракт, полученный на стадии b) (или фракцию, обогащенную полисахаридами из стадии с1), суспендируют в воде при комнатной температуре и перемешивают для облегчения растворения. Нерастворимый остаток отделяют, и водный раствор подвергают хроматографии;

с3) ферментативной обработки, используемой для гидролиза инулин-подобных олигосахаридов и полисахаридов, представляющих собой одну из основных примесей экстракта из стадии b). Экстракт (или один из частично очищенных продуктов из стадий

с1) или с2)) обрабатывают в водном растворе каталитическим количеством инулиназы в течение 10-24 часов. Затем фермент инактивируют повышением температуры или трипсином, углеводные фрагменты, образующиеся в ходе гидролиза, удаляют диализом (тангенциальная ультрафильтрация с отсечкой выше 10000 Да, предпочтительно 100000

Да). Полученный таким образом концентрат (retentate) затем подвергают хроматографии; с4) ультрафильтрации с высокой отсечкой (отсечка выше 10000 Да, предпочтительно 100000 Да) для удаления низкомолекулярных примесей. В данном случае экстракт из стадии b) (или один из частично очищенных продуктов из стадий с1) или с2)) растворяют в воде, предпочтительно в 10 или 20 объемах, и подвергают диализу. Концентрат, содержащий полисахарид по изобретению, затем подвергают хроматографии.

Полисахарид по изобретению проявлял иммуностимулирующие свойства у мышей, в частности была доказана его способность стимулировать активацию Т-лимфоцитов и нейтрализовать действие циклоспорина А, таким образом уменьшая смертность, обусловленную заражением *Candida albicans*. Полисахарид по изобретению может быть, таким образом, использован для получения лекарственных средств, пищевых добавок и питательных композиций для введения в ситуациях, при которых необходимо усиление защитных реакций иммунной системы организма.

Полисахарид может быть введен в состав лекарственного средства в соответствии с обычными способами, например согласно описанным в Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook, XVII ed. Mack Pub., NY, USA.

Настоящее изобретение далее проиллюстрировано несколькими примерами.

Примеры

Во всех последующих примерах определение ВЭЖХ титра полисахарида проводили на TosohHaas TSK-Gel G 5000 PWXL колонке, элюируемой водой, содержащей 0,5% триэтиламина, в изократических условиях при скорости потока 0,5 мл/мин. В ходе анализа, который продолжался 30 минут, колонку поддерживали при 50°C. Объем вводимой пробы составлял 50 мкл. С колонкой был соединен испарительный детектор ELSD (Испарительный детектор рассеяния света (Evaporative Light Scattering Detector)) Sedex mod. 75 (S.E.D.E.R.E.), распылитель которого поддерживали при 60°C при давлении газа 2,2 бар.

Пример 1

Экстракция корней *Echinacea angustifolia* (стадии а) и б))

600 г измельченных корней *Echinacea angustifolia* экстрагировали при кипячении с обратным холодильником в течение 4 часов 2,5 л 90% (об./об.) этанола. Продукт перколяции собирали и проводили еще семь экстракций тем же растворителем (стадия а)). Полученный экстракт удаляли. Затем корни экстрагировали семь раз при 70°C 15% (об./об.) этанолом, каждая экстракция продолжалась 4 часа. Объединенный продукт перколяции фильтровали в вакууме, получая 170 г коричневого осадка (суммарный экстракт полисахаридов, стадия б)).

Пример 2

Выделение полисахарида предварительной очисткой растворителями и анионообменной хроматографией

170 г суммарного экстракта полисахаридов из стадии б) примера 1 растворяли в 570 мл воды и затем добавляли 1,13 л этанола. Смесь перемешивали в течение примерно одного часа, осадок декантировали в течение примерно 20 минут, фильтровали, промывали 850 мл 66,5% (об./об.) этанола и сушили при 55°C в вакууме в течение 48 часов с получением 140 г светло-коричневого твердого вещества. Твердое вещество помещали в 2,1 л воды и полученную суспензию оставляли при перемешивании на 20 минут, затем отделяли от нерастворимого остатка (который выбрасывали).

Из водного раствора, обогащенного полисахаридом по изобретению, получали 38,7 г твердого остатка. Раствор загружали на хроматографическую колонку, содержащую 0,9 л Diaion HPA 25 смолы, уравновешенной буфером AcOH/AcNH₄ при pH 6,1. Смола промывали 5,4 л раствора буфера AcOH/AcNH₄ при pH 6,1 и фракцию, содержащую полисахарид, элюировали 5,4 л водного 0,5 М раствора AcNH₄. Элюат концентрировали до

0,3 л при пониженном давлении. Концентрированный раствор подвергали диализу тангенциальной ультрафильтрацией с использованием 6 л очищенной воды, с использованием спирально-закрученной мембраны с отсечкой 10000 Да в полиэфирсульфоне.

5 Концентрат выделяли и концентрировали при пониженном давлении и остаток сушили нагреванием в вакууме, получая 7,1 г порошка цвета слоновой кости (титр ВЭЖХ полисахарида: 96%).

Полисахарид имеет среднюю молекулярную массу $1,3 \times 10^5$ Да ($s=5365$) с $<M_n$ 14320 ($s=2180$), что соответствует определению LALLS (Лазерное рассеяние с малым углом разориентировки (Low Angle Laser Light Scattering)), и состоит из галактуриновой кислоты, галактозы, арабинозы и рамнозы в соотношении 10,25:1,75:2,5:0,5 (НРАЕС анализ). Полисахарид имел характерные ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР спектры и профиль гельпроникающей хроматографии (GPC), как показано на фиг. 1-3 соответственно.

Пример 3

15 Получение полисахарида ультрафильтрацией, предварительной очисткой и исключаяющей по размеру хроматографией

170 г суммарного экстракта полисахаридов из стадии b) примера 1 растворяли в 850 мл очищенной воды. Раствор подвергали диализу тангенциальной ультрафильтрацией с использованием 10 л очищенной воды, при использовании спирально-закрученной мембраны с отсечкой 50000 Да в полиэфирсульфоне.

20 Концентрат, содержащий 110,5 г очищенного экстракта, получали и загружали на хроматографическую колонку, поддерживаемую при среднем давлении и содержащую 22 л Toyopearl HW-65S смолы, уравновешенной водой. Элюирование проводили очищенной водой, разделяя элюаты на фракции, каждая по 200 мл. Фракции анализировали гельпроникающей хроматографией (GPC) и фракции, содержащие достаточно чистый полисахарид, объединяли.

Объединенные фракции затем концентрировали при пониженном давлении и остаток сушили при нагревании в вакууме, получая 5,7 г порошка цвета слоновой кости (ВЭЖХ титр полисахарида: 95%).

Пример 4

30 Получение полисахарида предварительной ферментативной очисткой и анионообменной хроматографией

170 г суммарного экстракта полисахаридов из стадии b) примера 1 растворяли в 3230 мл очищенной воды и затем добавляли 850 мг фермента инулиназы. Смесь поддерживали при легком перемешивании при 40°C в течение 24 часов, затем фермент инактивировали 80 мг трипсина, при перемешивании в течение 2 часов при 36°C. Раствор нагревали при 85°C в течение 2 часов и концентрировали при пониженном давлении до 1,7 л.

40 Концентрированный раствор подвергали диализу тангенциальной ультрафильтрацией с использованием 17 л очищенной воды при использовании спирально-закрученной мембраны с отсечкой 100000 Да в полиэфирсульфоне. Концентрат (содержащий 11,5 г очищенного экстракта) получали и загружали на хроматографическую колонку, содержащую 0,8 л Diaion HPA 25 смолы, уравновешенной буфером $\text{AcOH}/\text{AcNH}_4$ при pH 6,1. Смолу промывали 4,8 л раствора буфера $\text{AcOH}/\text{AcNH}_4$ при pH 6,1 и фракцию, содержащую полисахарид, элюировали 4,8 л водного 0,5 М раствора AcNH_4 . Элюат концентрировали до 150 мл при пониженном давлении и концентрат подвергали диализу тангенциальной ультрафильтрацией с использованием 1,5 л очищенной воды, при использовании спирально-закрученной мембраны с отсечкой 50000 Да в полиэфирсульфоне.

Концентрат концентрировали при пониженном давлении и остаток сушили нагреванием в вакууме, получая 6,9 г порошка цвета слоновой кости (ВЭЖХ титр полисахарида: 97%).

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Опыт 1

Тест на продуцирование γ -интерферона в Т-лимфоцитах (Zucca M. et al, New Microbiol., 1996, 19, 34-46)

Мышиные Т-лимфоциты, полученные разделением спленоцитов на колонке нейлон-

шерсть, культивировали в среде 1640 RPMI с 4% зародышевой телячьей сыворотки на титрационных микропланшетах, необязательно с предварительным инкубированием с α -CD3 (анти-CD3 моноклональное антитело в качестве активатора клеточной функции, ответственного за выработку интерферона). Вещества для исследования добавляли в лунки и через 48 часов оценивали количество γ -интерферона, высвободившееся в инкубационную среду.

Таблица 1	
ОБРАБОТКА	γ -интерферон, пг/мл
Среда	4,5 $\pm$ 0,5
α -CD3	149,5 $\pm$ 25,0
α -CD3 + полисахарид 0,1 мкг/мл	410,0 $\pm$ 45,7
α -CD3 + полисахарид 1,0 мкг/мл	466,3 $\pm$ 71,8
α -CD3 + полисахарид 10,0 мкг/мл	690,5 $\pm$ 95,5

Опыт 2

Влияние на смертность, вызванную *Candida albicans*, у мышей (Microbiology, 2000, 146, 1881-9)

Дрожжи культивировали на агаровой среде Sabouraud и в концентрации $2,9 \times 10^5$ внутривенно вводили мышам с иммунитетом, подавленным внутрибрюшинным введением 1 мг/кг циклоспорина А (CsA). Мышам ежедневно вводили внутрибрюшинно 5 и 10 мг/кг полисахарида по изобретению до момента смерти всех контрольных мышей (без лечения). Результаты оценивали по выжившим животным в группах лечения.

Таблица 2	
ОБРАБОТКА	% ВЫЖИВШИХ ЖИВОТНЫХ
<i>Candida albicans</i> (CA) + CsA	0
CA + CsA + полисахарид 5 мг/кг	30
CA + CsA + полисахарид 10 мг/кг	50

Формула изобретения

1. Полисахарид из корней *Echinacea angustifolia*, имеющий молекулярную массу $1,3 \cdot 10^5$ Да и состоящий из рамнозы, арабинозы, галактозы и галактуроновой кислоты в соотношении 0,5:2,5:1,75:10,25, причем он имеет остов с чередующимися прямыми и разветвленными участками, причем прямые участки состоят из частично ацетилированных и метилированных остатков галактуроновой кислоты, связанных α -(1-4) связями, и разветвленные участки состоят из чередующихся остатков галактуроновой кислоты и рамнозы, к которым присоединены боковые цепи, состоящие из арабинозы и галактозы в соотношении 2,5:1,75.

2. Полисахарид по п.1 для применения для получения лекарственного средства для усиления защитных реакций иммунной системы организма.

3. Способ получения полисахарида по п.1, включающий следующие стадии:

а) удаление непполисахаридных компонентов из корней *Echinacea angustifolia* экстракцией растворителем, представляющим собой ацетон или спирт, имеющий от одного до трех атомов углерода, с содержанием воды в растворителе, не превышающим 40% об./об.;

б) экстракцию полученной непосредственно на стадии а) полисахаридной фракции из корней *Echinacea angustifolia* растворителем, представляющим собой воду или смесь воды и ацетона, или воды и спирта, имеющего от одного до трех атомов углерода, с содержанием воды в смеси растворителей, составляющим 60% или более;

с1) предварительную очистку, выбранную из

с1.1) осаждения и выделения фракции, обогащенной полисахаридами, растворением в смеси воды и 50-70% ацетона или воды и 50-70% спирта, содержащего от одного до трех атомов углерода;

с1.2) удаления нерастворимой полисахаридной фракции водой;

с1.3) обработки инсулиназой;

с1.4) ультрафильтрации с отсечкой 10000 Да или выше;

с) выделение полисахарида хроматографией из полученной после предварительной очистки полисахаридной фракции.

4. Способ по п.3, в котором растворитель, используемый на стадии а), представляет собой ацетон или спирт, имеющий от одного до трех атомов углерода.

5. Способ по п.4, в котором растворитель находится в смеси с водой.

6. Способ по п.5, в котором водная составляющая растворителя, составляет не более 40%.

7. Способ по любому из пп.4-6, в котором растворитель представляет собой этанол в концентрации от 80 до 95%.

8. Способ по любому из пп.4-6, в котором температура экстракции составляет от 20°C до температуры кипения растворителя.

9. Способ по п.3, в котором растворитель, используемый на стадии б), представляет собой воду или смесь воды и ацетона или воды и спирта, имеющего от одного до трех атомов углерода.

10. Способ по п.9, в котором содержание воды в смеси растворителей составляет 60% или более.

11. Способ по п.9, в котором растворитель представляет собой 15% этанол.

12. Способ по п.9, в котором экстракцию проводят при температуре в диапазоне от 20°C до температуры кипения растворителя.

13. Способ по п.3, в котором хроматография стадии с) представляет собой исключаящую по размеру хроматографию или ионообменную хроматографию.

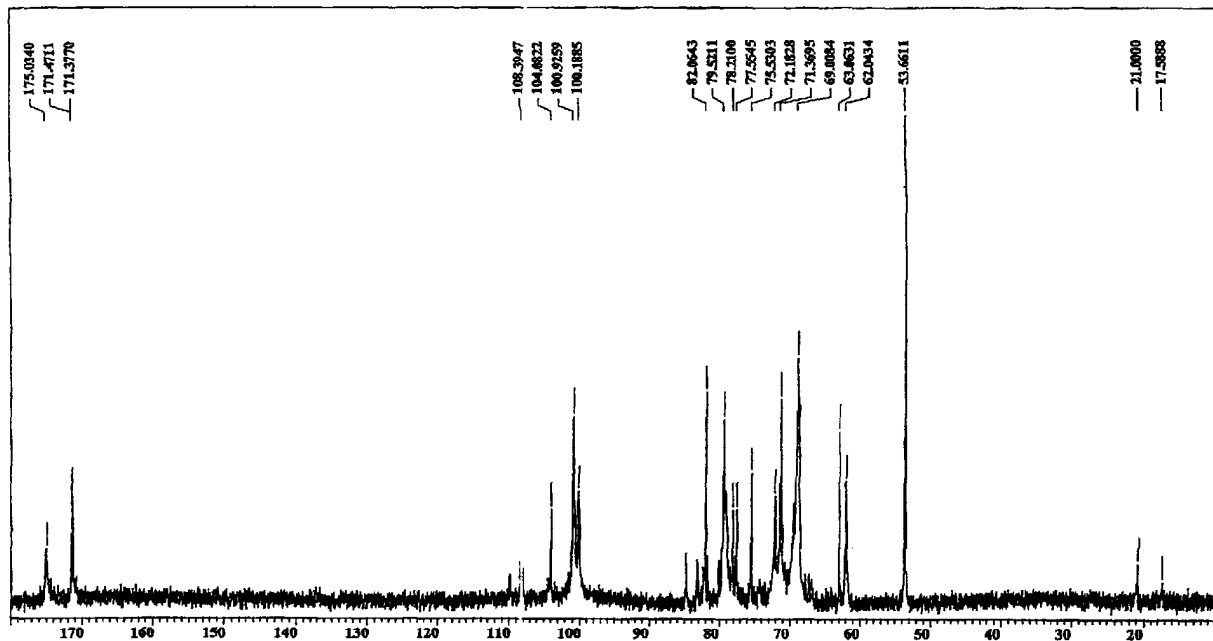
14. Способ по п.3, в котором проводят процедуры предварительной очистки с1.1) и с1.2).

15. Способ по п.3, в котором проводят процедуру предварительной очистки с 1.3), необязательно предваряемую одной или обеими процедурами очистки с1.1) и с1.2).

16. Способ по п.3, в котором проводят процедуру предварительной очистки с1.4), необязательно предваряемую одной или обеими процедурами очистки с1.1) и с1.2).

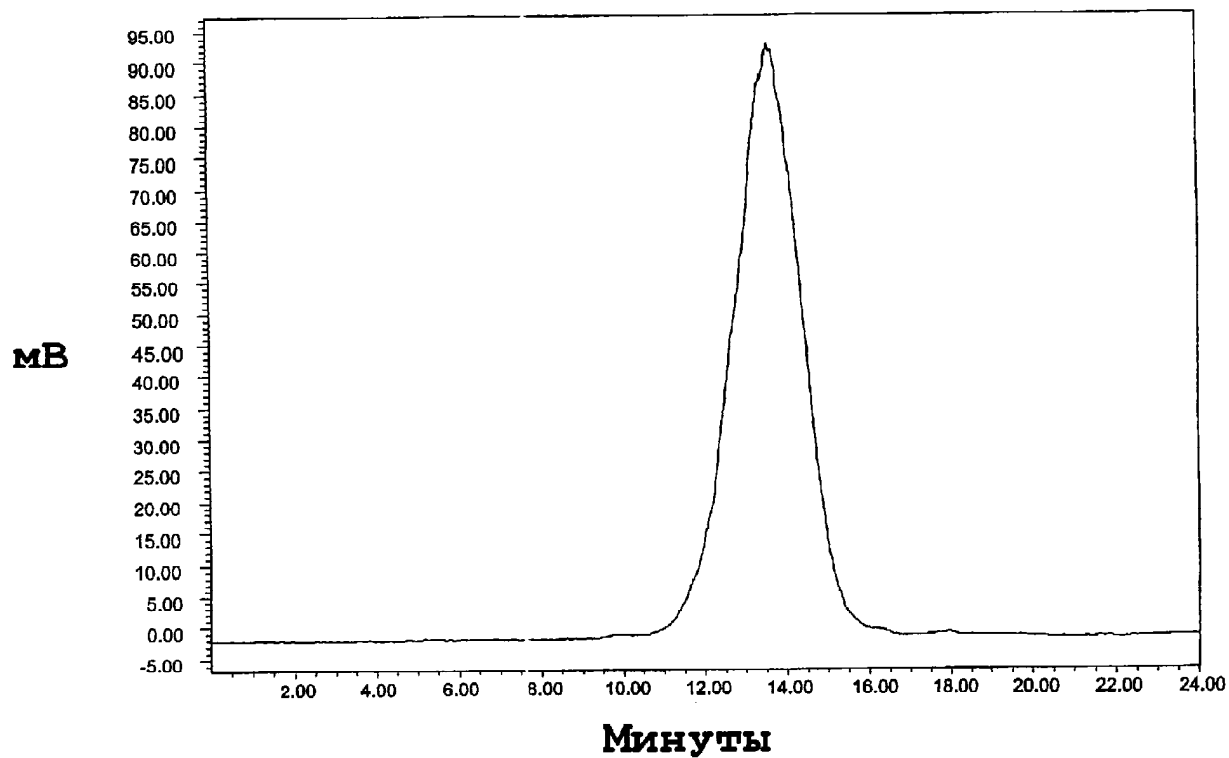
17. Полисахарид *Echinacea angustifolia*, получаемый способом по любому из пп.3-16.

18. Применение полисахарида по п.1 для получения фармацевтической композиции для усиления защитных реакций иммунной системы организма.



(м.д.)
 ^{13}C ЯМР спектр полисахарида 1

ФИГ. 2



Профиль гель-проникающей
 хроматографии (GPC) полисахарида 1

ФИГ. 3