



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 34 530 T2** 2005.09.01

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 788 798 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 34 530.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/JP96/02155**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 925 957.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 97/004791**

(86) PCT-Anmeldetag: **31.07.1996**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **13.02.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **13.08.1997**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **30.03.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **01.09.2005**

(51) Int Cl.7: **A61K 35/78**

A61P 31/12

(30) Unionspriorität:

21423295 **31.07.1995** **JP**

(73) Patentinhaber:

**Mitsui Norin Co., Ltd., Tokio/Tokyo, JP; Nakano,
Masatoshi, Chiryu, Aichi, JP**

(74) Vertreter:

**Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &
Schwanhäusser, 80538 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

CH, DE, FR, GB, LI

(72) Erfinder:

NAKANO, Masatoshi, Chiryu-shi, Aichi 472, JP

(54) Bezeichnung: **ANTIVIRALES MITTEL UND VERFAHREN ZU DESSEN HERSTELLUNG**

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 vorliegende Erfindung betrifft einen anti-viralen Wirkstoff umfassend saure Polysaccharide mit einer Antioxidanz-Aktivität und einer freien Radikale (reaktive Sauerstoff-Spezies) -einfangenden Aktivität, extrahiert als aktive Komponente aus *Aspalathus linearis* gehörend zur Leguminosae-Familie, Mangroven und *Momordica charantia*, welche des weiteren effektiv gegen Retroviren sind, wie z. B. dem humanem Immundefizienzvirus (human immunodeficiency virus, HIV), ohne Nebenwirkungen auf Mensch und/oder Tiere, leicht aufzunehmen sind und präventive Aktivität gegen Virusinfektion aufweisen; und die Erfindung bezieht sich auch auf einen Prozess zur Herstellung desselben.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Verschiedene anti-virale Wirksubstanzen sind bislang bekannt.

[0003] Jedoch sind die meisten der anti-viralen Wirksubstanzen, die bislang entwickelt wurden, kostenintensiv und weisen schwache Effizienzen und üblicherweise Nebenwirkungen auf, die schwer und ernst gewesen sein hätten können.

[0004] Es gibt viele Erkrankungen, erzeugt durch Viren, wie z. B. Influenza, Hepatitis, Masern, japanische Enzephalitis, menschliche T-Zellen-Leukämie und AIDS und unglücklicherweise gibt es insbesondere, obwohl einige wenige effektive Chemotherapien bekannt sind, welche eine definitive Effektivität gegen diese Arten von viralen Erkrankungen aufweisen, keine Medizin, die hinreichend effektiv gegen Retroviren ist, welche menschliche T-Zellen-Leukämie oder AIDS erzeugen, insbesondere nicht ohne Nebenwirkungen. Desweiteren gibt es keine bekannten anti-viralen Wirksubstanzen, welche täglich aufgenommen werden können, wie Nahrungsmittel und Getränke, die des weiteren präventive Effekte ohne Nebenwirkungen aufweisen.

[0005] Von alkalischen Extrakten aus *Aspalathus linearis* ist bekannt, dass sie als farbige und geschmackvolle Tee-Extrakte (siehe JP-A-07039339) verwendet werden. In jüngster Zeit werden Heiß-Wasser und organische Lösungsmittel-Extrakte von *Aspalathus linearis* als effektiv gegen Viren angesehen (siehe JP-A-05271062), jedoch ist der Grund dafür immer noch unbekannt und eine Forschung zur Suche eines stärkeren anti-viralen Wirkstoffes ist immer noch im Gange.

[0006] Der Zweck der vorliegenden Erfindung ist die Lösung der oben genannten Probleme und die Bereitstellung eines anti-viralen Wirkstoffes mit einer Anti-Oxidanz-Aktivität und einer freien Radikale einfangenden Aktivität, die effektiv gegen Retroviren ist und eine Schutz-Aktivität ohne Nebenwirkungen aufweist; sowie die Bereitstellung eines Prozesses zur Herstellung des anti-viralen Wirkstoffes.

BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0007] Die Erfinder dieser Anmeldung unternahmen eine extensive Forschung, um die oben genannten Probleme zu lösen und entdeckten, dass saure Polysaccharide erhalten von Mangroven, *Momordica charantia* L. und *Aspalathus linearis* eine starke anti-virale Aktivität, eine Anti-Oxidanz-Aktivität und eine freie Radikale einfangende Aktivität aufweisen und sie zeigen keine Nebenwirkungen und sind sicher für Mensch und/oder Tiere und folglich wurde die vorliegende Erfindung entwickelt.

[0008] Saure Polysaccharide, wie oben erwähnt, können erhalten werden durch ein alkalisches Extrakt-Verfahren aus Mangrove, *Momordica charantia* L. und *Aspalathus linearis*, welche eine Uronsäure, neutrale Zucker und reduzierende Zucker enthalten.

[0009] Und des weiteren wird durch Hydrolisieren der sauren Polysaccharide, erhalten von den Pflanzen, in einer Säure, ein anti-viraler Wirkstoff, enthaltend Disaccharide und Trisaccharide, hergestellt.

DIE BESTE DURCHFÜHRUNG DER ERFINDUNG

[0010] Bevorzugte Pflanzen für die Extraktion sind Mangrove, *Momordica charantia* L. und *Aspalathus linearis* gehörend zur Leguminosae-Familie, etc..

[0011] Die weitere Forschung über saure Polysaccharide erhalten aus Pflanzen zeigt, dass die Polysaccha-

ride enthaltend Ursonsäure, neutrale Zucker und reduzierende Zucker eine sehr starke Antioxidanz-Aktivität aufweisen und eine freie Radikale einfangende Aktivität sowie anti-virale Effekte. Die saueren Polysaccharide mit diesen Eigenschaften werden durch ein alkalisches Heiß-Wasser-Extraktions-Verfahren erhalten.

[0012] Die effektiven Inhaltsstoffe dieser Erfindung werden durch Extrahieren der entsprechenden Pflanzen in heißem Wasser erhalten, beispielsweise von Mangrove, *Momordica charantia* L. und *Aspalathus linearis* gehörend zur Leguminosae-Familie etc., und dann durch Zugabe einer alkalischen Lösung zu den Rückständen aus der ersten Heiß-Wasser-Extraktion, wodurch die alkalischen Extrakte erhalten werden.

[0013] In dem Heiß-Wasser-Extraktions-Prozess kann die Menge an Wasser 10 bis 100 mal dem Gewicht von *Aspalathus linearis* entsprechen und vorzugsweise wurden die Pflanzen bei 70 bis 100°C für 30 Minuten bis 4 Stunden extrahiert. Nach Extraktion in heißem Wasser können die Rückstands-Pflanzen im Sonnenlicht oder in geschlossenen Räumen für 1 bis 3 Tage getrocknet werden.

[0014] Beispiele der alkalischen Lösung schließen solche aus Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, einem Ammoniumhydroxid (Ammoniaklösung), Natriumbikarbonat, Natriumkarbonat, etc. ein und ein bekanntes Verfahren zur Extraktion, wie z. B. eine Hitzeextraktion, wird für die alkalische Extraktion verwendet. Eine Isolation der extrahierten Lösung kann durchgeführt werden durch bekannte Verfahren, wie z. B. eine Filtration, eine Dekantation oder eine Zentrifugation.

[0015] Ein Ethanol, ein Aceton, etc. kann verwendet werden als Extraktions-Lösungsmittel und der Extrakt kann durch bekannte Verfahren, wie z. B. das Gefrier-Trocknungs-Verfahren oder das Sprüh-Trocknungs-Verfahren getrocknet werden.

[0016] Um die saueren Polysaccharide des Extraktes zu isolieren und aufzureinigen, wird Ethanol zum rohen alkalischen Extrakt hinzugegeben, wobei die Ethanolkonzentration auf 25 bis 75% (v/v) gebracht wird und das Ganze für 30 Minuten bis über Nacht bei 4°C stehen gelassen wird, anschließend der Niederschlag abzentrifugiert wird und getrocknet wird, um letztendlich saure Polysaccharide zu erhalten mit einer antioxidativen und freie Radikale einfangenden Aktivität.

[0017] Die saueren Polysaccharide mit antioxidativer und freie Radikale einfangender Aktivität enthalten 21% an Uronsäure, 49% an neutralem Zucker und 26% an reduzierendem Zucker im Falle *Aspalathus linearis*.

[0018] Die saueren Polysaccharide werden des weiteren hydrolisiert in einer Säure bei 75°C bis 150°C für 3 Stunden bis 24 Stunden und Oligosaccharide enthaltend Disaccharide und Trisaccharide werden erhalten. Die Konzentrationen der Säure können in der Größenordnung von 0,5 N bis 3 N liegen. Beispiele der Säure sind eine Salzsäure, eine Schwefelsäure, eine Salpetersäure, eine Trifluoressigsäure, wobei sie im Rahmen bekannter Verfahren zur Säurehydrolyse eingesetzt werden.

[0019] Die effektiven Inhaltsstoffe des Extraktes können vermischt werden mit einem geeigneten Träger, wie z. B. einem Hilfsstoff, einem Bindemittel oder einem Verdünnungsmittel, und in verschiedenen Formen zur Verfügung gestellt werden, wie z. B. in der Form von Granulaten, Pulvern, harten Kapseln, weichen Kapseln, als Gelee, als Sirup, als Zäpfchen, als eine Injektion; in irgendeiner oralen oder nicht-oralen Form, und können auch direkt in Form von Lösung, Pulvern, Granulaten, Tabletten, Emulsion, Gel etc. oder in einer anderen Form, als eine verdichtete Lösung aufgenommen werden oder alternativ vermischt mit anderen Nahrungsmitteln oder Getränken verwendet werden.

[0020] Die Dosis der Erfindung hängt vom Symptom und Zustand der Erkrankung ab, im Falle der flüssigen Form, ist es bevorzugt, 2 bis 500 ml/Tag von 1 bis 1000 mg/l Konzentration zu nehmen und im Falle der Pulverform sind 0,1 bis 5 g/Tag bevorzugt.

[0021] Ein akuter Toxizitäts-Test der saueren Polysaccharide der vorliegenden Erfindung unter Verwendung von Ratten wurde durchgeführt. Kein Tier starb im Rahmen des Toxizitäts-Tests und keine abnormalen Ergebnisse wurden in der biochemischen und pathologischen Untersuchung beobachtet.

Beispiel 1

[0022] *Aspalathus linearis*-Blätter enthaltend kleine Zweige wurden auf 5 mm Länge zugeschnitten und einem Walzprozess unterzogen, einer enzymatischen Fermentation sowie einem Trocknungsprozess unter Sonnenlicht, um getrocknete Blätter zu erhalten. 3 Gramm der getrockneten Blätter (mit Stengel) wurden mit 100 ml

an 85°C heißem Wasser für drei Stunden extrahiert und die rückständigen Blätter nach der Heiß-Wasser-Extraktion wurden im Haus getrocknet. 50 ml einer 1%igen Natriumhydroxid-Lösung wurden in die rückständigen Blätter gegossen und heftig bei 45°C für drei Stunden geschüttelt. Eine rohe alkalische Extraktlösung wurde erhalten mit einer Filtration durch eine Schicht an Mull. Der alkalische Extrakt wurde gefriergetrocknet und das getrocknete Pulver von *Aspalathus linearis* wurde erhalten. Das Pulver wurde in Wasser aufgelöst und 0,1 M Natriumacetat wurde zu dem aufgelösten Extrakt hinzugegeben. Anschließend wurde Ethanol zum Extrakt hinzugegeben, um 25 bis 75% an Konzentration zu erhalten, und das ganze wurde anschließend für mehr als 30 Minuten bei 4°C stehen gelassen. Sauerer Polysaccharide mit einer Antioxidanz-Aktivität wurden erhalten durch Abzentrifugieren des Niederschlages, welcher 22,5% an Uronsäure, 50,5% an neutralem Zucker und 26,5% an reduzierendem Zucker enthielt.

[0023] Die Antioxidanz-Aktivität der saueren Polysaccharide wurde gemessen durch Autooxidation von Linolsäure bei 30°C und die Rate der Autooxidation nach drei Wochen (anti-oxidative Aktivität) betrug 5% gegen Wasser (Kontrolle); genauer gesagt war im Fall von Wasser die Rate der Autooxidation 100%. Desweiteren zeigten, wenn die Aktivität als die Zeit ausgedrückt wurde, in welcher 50% Autooxidation an Linolsäure erreicht wurde, die saueren Polysaccharide von *Aspalathus linearis* extrem niedrige Autooxidations-Spiegel (unterhalb von 5% Autooxidation), sogar nach 60 Tagen. In diesem Typ der Darstellungsform war die anti-oxidative Aktivität der Kontrolle (Wasser) zwei Wochen. Desweiteren war die Aktivität der saueren Polysaccharide $4,7 \times 10^3$ Einheiten/g, wenn die freie radikal einfangende Aktivität durch das Verfahren der Elektronenspinresonanz gemessen wurde, als eine markant hohe Aktivität darstellt.

Beispiel 2

[0024] Die saueren Polysaccharide enthalten in Beispiel 1 wurden auf kultivierte MDCK-Zellen oder MA104-Zellen appliziert. Unmittelbar nach der Zugabe der saueren Polysaccharide wurden die MDCK-Zellen mit Influenza-Viren infiziert und die MA104-Zellen wurden mit Herpes-Viren infiziert und die entsprechende Plaque-Ausbildung wurde untersucht. Im Falle des Influenza-Virus war die Plaque-Ausbildung annähernd vollständig inhibiert durch eine 0,1 mg/ml Konzentration der saueren Polysaccharide und im Fall des Herpes-Virus war die Plaque-Ausbildung um mehr als 90% bei der Konzentration von 1 µg/ml der saueren Polysaccharide inhibiert.

Beispiel 3

[0025] Die saueren Polysaccharide in Beispiel 1 wurden auf MT-4-Zellen ($2,5 \times 10^4$ -Zellen/Well) appliziert, die sterilisiert wurden und mit HIV infiziert wurden. Nach Kultivieren der Zellen für 5 Tage bei 37°C wurde die Anzahlen der überlebenden Zellen gemessen. Die anti-virale (Anti-HIV)-Aktivität wurde als Konzentration der saueren Polysaccharide ausgedrückt, welche 50% Schutz gegen HIV induzierte Cytopathogenizität zeigten. Die EC_{50} (50% effektive Konzentration) betrug 15 µg/ml.

Beispiel 4

[0026] Die Polysaccharide enthalten in Beispiel 1 wurden des weiteren hydrolysiert mit 1 N HCl bei 75°C für 4 Stunden und mit 3 N HCl bei 100°C für 13 Stunden und ein Niederschlag und ein Überstand wurden erhalten, welche auf MT-4-Zellen appliziert wurden ($2,5 \times 10^4$ -Zellen/Wellen), die sterilisiert wurden und infiziert wurden mit HIV. Nach Kultivieren der Zellen für 5 Tage bei 37°C wurde die Anzahl der überlebenden Zellen gemessen.

[0027] Die anti-virale (Anti-HIV)-Aktivität wurde ausgedrückt als die Konzentration der saueren Polysaccharide, welche 50% Schutz gegen HIV-infizierte Cytopathogenizität zeigten. Der EC_{50} (50% effektive Konzentration) der saueren Polysaccharide hydrolysiert mit 1 N HCl bei 75°C für 3 Stunden und mit 3 N HCl bei 100°C für 13 Stunden ist in Tabelle 1 dargestellt. Sowohl die Niederschläge als auch die Überstände erhalten durch die saure Hydrolyse, wie oben beschrieben, stellten hauptsächlich eine Mischung von Disacchariden und Trisacchariden dar.

Tabelle 1
Anti-HIV-Aktivität von saueren Polysacchariden hydrolysiert mit HCl
Anti-HIV-Aktivität (Konzentration bei 50% Schutz)

	Überstand ($\mu\text{g/ml}$)	Niederschlag ($\mu\text{g/ml}$)
1N Salzsäure bei 75°C	334,0	25,6
3N Salzsäure bei 100°C	35,4	24,5

Beispiel 5

[0028] Die Zucker-Zusammensetzung der saueren Polysaccharide erhalten durch Beispiel 1 durch Alkoholausfällung wurden analysiert durch das 2-Aminopyridin-Verfahren unter Verwendung von HPLC.

[0029] Wenige Aminosäuren wurden gefunden und der größte Teil der Zusammensetzung umfaßt neutrale Zucker, wobei der Hauptanteil Glucose war und 20% an Mannose gemessen wurden. Jedoch wurde eine Uronsäure nicht durch dieses Mess-Verfahren nachgewiesen. Ein Gramm an getrocknetem Pulver enthält 12,4% an Uronsäure, 24,4% an neutralen Zuckern, 13,1% an reduzierenden Zuckern. Die Ergebnisse der Analyse zeigen, dass 0,775 an Glucose, 0,200 an Mannose, 0,125 an Galactose, 0,133 an Fructose und 0,058 an Galactosamin vorlagen (Einheit ausgedrückt als $\mu\text{mol/mg}$).

Beispiel 6

[0030] Der alkalische Extrakt (ein roher Extrakt), hergestellt in Beispiel 1, wurde aufgelöst in destilliertem Wasser und Ethanol wurde in das Aliquots hinzugegeben, um das ganze auf eine Konzentration von 25% zu bringen, und für 30 Minuten bei 4°C stehen gelassen. Das Aliquot wurde zentrifugiert bei 3 000 rpm für 20 Minuten und der Niederschlag wurde als 25P bezeichnet. Der Überstand wurde des weiteren verwendet zur weiteren Fraktionierung durch 100% Ethanol; genauer gesagt wurde Ethanol des weiteren hinzugegeben zum Überstand, um ihn auf eine 50%-Konzentration zu bringen, wie oben zentrifugiert, und der Niederschlag wurde als 50P bezeichnet. Der Überstand wurde des weiteren verwendet zur weiteren Fraktionierung durch 100% Ethanol; genauer gesagt, wurde Ethanol weiter hinzugegeben zum Überstand, um das ganze auf 75% Konzentration zu bringen, und wie oben zentrifugiert, und der Niederschlag wurde als 75P bezeichnet. Die Anti-HIV-Aktivität einer jeder Fraktion, die wie oben erhalten wurde, ist in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2
Anti-HIV-Aktivität von Alkohol-Precipitat

	Anti- HIV- Aktivität (EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$))
25P	119,0
50P	15,0
75P	3,7

Beispiel 7

[0031] Elf Monate alte Kätzchen wurden in zwei Gruppen aufgeteilt; eine war die Kontrollgruppe, der keine saueren Polysaccharide mit der Nahrung verabreicht wurde und die andere ist eine experimentelle Gruppe, welcher 2 mg der saueren Polysaccharide erhalten von den Pflanzen pro Tag mit der Nahrung über einen Monat verabreicht wurde, und jedes Kätzchen wurde mehrmals mit 0,5 ml an Katzen-Aids (Katzen-Immundefizienz Virus positivem)-Blut injiziert. Nach der Injektion des Blutes wurden die Kätzchen für die nächsten zwei Monate unter Beobachtung gestellt. Ein Antikörperwert des Aids-Virus wurde inspiziert.

[0032] 20% der experimentellen Gruppe wurde mit AIDS infiziert und 100% der Kontrollgruppe wurde infiziert.

Mögliche Anwendungen

[0033] Die vorliegende Erfindung stellt einen anti-viralen Wirkstoff zur Verfügung mit einem präventiven Effekt für neue virale Infektionen gegen Mensch und Tiere und zeigt einen merklichen Effekt gegen Retroviren und zeigt keine Nebenwirkung auf Menschen und Tiere und effektive Komponenten können oral mit der täglichen Nahrung aufgenommen werden.

Patentansprüche

1. Prozess zur Herstellung einer anti-viralen Wirksubstanz, umfassend saure Polysaccharide aus Mangrove, *Momordica charantia* L. oder *Aspalathus linearis* gehörend zur Leguminose-Familie umfassend die Schritte von
Extrahieren der entsprechenden Pflanzen in heißem Wasser,
Extrahieren der Rückstände der Heiß-Wasser-Extraktion durch ein alkalisches Extraktionsverfahren,
Zugabe von Ethanol zu besagtem rohen alkalischem Extrakt, um die Konzentration auf 25% bis 75% zu bringen, und
Abtrennen des Niederschlages durch Zentrifugation.
2. Ein Prozess zur Herstellung einer anti-viralen Wirksubstanz gemäß Anspruch 1, wobei besagter Niederschlag mit Säure hydrolysiert wird.
3. Eine anti-virale Wirksubstanz umfassend saure Polysaccharide enthaltend eine Uronsäure, einen neutralen Zucker und einen reduzierenden Zucker erhaltbar durch den Prozess gemäß den Ansprüchen 1 oder 2.
4. Eine anti-virale Wirksubstanz gemäß Anspruch 3, wobei die sauren Polysaccharide eine anti-oxidative Aktivität und eine freie Radikale einfangende Aktivität aufweisen.
5. Ein anti-viraler Wirkstoff gemäß Anspruch 3, wobei die sauren Polysaccharide Disaccharide und Trisaccharide enthalten.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen