



PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : A61K 31/00, 35/78</p>	<p>A2</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/18957</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 1. September 1994 (01.09.94)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE94/00163</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 17. Februar 1994 (17.02.94)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 43 05 926.0 26. Februar 1993 (26.02.93) DE P 43 16 347.5 15. Mai 1993 (15.05.93) DE</p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: LEVI, Ina [DE/DE]; Schrock- strasse 13, D-14165 Berlin (DE).</p> <p>(74) Anwalt: WINKLER, Andreas; Boehmert & Boehmert, Norde- mann und Partner, Hollerallee 32, D-28209 Bremen (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, LU, LV, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SK, UA, US, UZ, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>
<p>(54) Title: USE OF ACTIVE SUBSTANCES IN THE THERAPY OF CERTAIN DISEASES, PROCESS FOR PREPARING A PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR THAT PURPOSE AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS THUS PREPARED</p> <p>(54) Bezeichnung: BEHANDLUNG VON (RETRO)VIRALEN ERKRANKUNGEN SOWIE VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINER PHARMAZEUTISCHEN ZUBEREITUNG</p> <p>(57) Abstract .</p> <p>An active substance from the group composed of tannins, catechins, humines, humic acids, gallic acid, gallates, tanning substances, depsides, gallic extracts, ellagic acid, chikimic acid and flavonoids, as well as compounds, in particular salts, derivates and precursors from said substances, or a combination of two or more of said active substances, are used in the therapy of asymptomatic HIV infections, other diseases caused by retroviruses, systemic opportunistic infections of clinical AIDS, hepatitis B infections, malaria and/or cancerous diseases.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Verwendung einer Wirksubstanz aus der Gruppe: Tannine, Catechine, Huminstoffe, Huminsäuren, Gallussäure, Gallate, Gerbstoffe, Depside, Gallenextrakte, Ellagsäure, Chikimsäure und Flavonoide sowie Verbindungen, insbesondere Salze, und Derivate und Vorstufen der vorgenannten Substanzen, oder einer Kombination von zwei oder mehreren dieser Wirksubstanzen zur Behandlung von asymptomatischen HIV-Infektionen und/oder anderen retroviral verursachten Erkrankungen und/oder systemischen opportunistischen Infektionen bei Vollbild AIDS und/oder Hepatitis B-Infektionen und/oder Malaria und/oder Krebserkrankungen.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

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

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LV	Lettland	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	MC	Monaco	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MD	Republik Moldau	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MG	Madagaskar	UA	Ukraine
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich			VN	Vietnam

Verwendung von Wirksubstanzen zur Behandlung bestimmter Erkrankungen sowie Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung für diese Verwendung und die nach diesem Verfahren herstellbaren pharmazeutischen Zubereitungen

Die Erfindung betrifft die Verwendung einer oder mehrerer Wirksubstanzen zur Behandlung von asymptomatischen HIV-Infektionen und/oder anderen retroviral verursachten Erkrankungen und/oder systemischen opportunistischen Infektionen bei Vollbild AIDS und/oder Hepatitis B-Infektionen und/oder Malaria und/oder Krebserkrankungen sowie Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung für diese Verwendung und die nach diesen Verfahren herstellbaren pharmazeutischen Zubereitungen.

Die als neue Geißel der Menschheit bezeichnete, mit dem Akronym AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) benannte

- 2 -

Störung des zellulären Immunsystems, die erstmals 1981 in den U.S.A. beschrieben wurde, wird verursacht durch heute einheitlich als HIV (human immunodeficiency virus) bezeichnete Retroviren. Eine HIV-Infektion muß nicht notwendigerweise zum Krankheitsbild AIDS führen, und epidemiologische Daten sprechen dafür, daß HIV-positive Träger mehr als 5 Jahre symptomlos und ohne Beeinträchtigung ihre Gesundheitszustandes leben können; sie gelten jedoch als potentielle Virusausscheider und damit potentielle Virusüberträger.

Bisher sind zur Bekämpfung von HIV lediglich Präparate mit hoher Cytotoxizität und einer Reihe von anderen schwerwiegenden Nebenwirkungen bekannt geworden. Darüberhinaus ist den bekannten Präparaten gemeinsam, daß sie zwar eine Hemmung des Krankheitsverlaufes mit sich bringen, den Patienten jedoch nicht von HIV befreien können.

Zum Teil sehr ähnliche Probleme stellen sich bei der Bekämpfung von anderen retroviral verursachten Erkrankungen und systemischen opportunistischen Infektionen bei Vollbild AIDS oder Erkrankungen, die auf Hepatitis B-Viren oder Plasmodien (Malaria) zurückzuführen sind, sowie für bekannte Cytostatika zur Krebsbekämpfung.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, Wirkstoffe anzugeben, die mit möglichst geringen Nebenwirkungen eine vollständige Therapie der genannten Erkrankungen ermöglichen.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch die Verwendung einer Wirksubstanz aus der Gruppe: Tannine, Catechine, Huminstoffe, Huminsäuren, Gallussäure, Gallate,

- 3 -

Gerbstoffe, Depside, Gallenextrakte, Ellagsäure, Chikimsäure und Flavonoide sowie Verbindungen, insbesondere Salze, und Derivate und Vorstufen der vorgenannten Substanzen, oder einer Kombination von zwei oder mehreren dieser Wirksubstanzen gelöst.

Bevorzugt ist vorgesehen, daß mindestens eine der Wirksubstanzen synthetisch gewonnen ist.

Alternativ oder gleichzeitig kann mindestens eine der Wirksubstanzen aus mindestens einem Naturstoff gewonnen sein.

Dabei wird vorgeschlagen, daß mindestens eine der Wirksubstanzen aus Kohle, bevorzugt aus Braunkohle, gewonnen ist.

Die Erfindung schlägt auch vor, daß mindestens eine der Wirksubstanzen aus Erz(en) gewonnen ist.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß mindestens eine der Wirksubstanzen aus Humusschlamm, Moorschlamm, Klärschlamm oder Meerschlamme gewonnen ist.

Besonders bevorzugt ist es, daß mindestens eine der Wirksubstanzen aus Torf, entweder aus Übergangsmoor- oder Niedermoortorf oder aus Hochmoortorf gewonnen ist, wobei vorzugsweise mindestens eine der Wirksubstanzen aus Torf mit einem Humositätsgrad (nach von Post) von H3 - H10 gewonnen ist.

Dabei kann es bevorzugt sein, daß mindestens eine der Wirksubstanzen aus grubenfrischem Torf gewonnen ist.

Die Erfindung kann eine Aufbereitung des Wirkstoffes oder der Wirkstoffkombination als oral verabreichbares Arzneimittel, eine Aufbereitung des Wirkstoffes oder der Wirkstoffkombination als injizierbares Arzneimittel, oder eine Aufbereitung des Wirkstoffes oder der Wirkstoffkombination als äußerlich anwendbares Arzneimittel vorsehen.

Die Erfindung betrifft außerdem Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zur erfindungsgemäßen Verwendung mit wahlweise folgender Schrittabfolge:

a. Desintegrieren von Torfmaterial; Extrahieren des Torfmaterials durch Wasserdampfdestillation zur Gewinnung eines Destillates; und Aufbereitung des Destillates in üblicher Weise zur Verwendung als injizierbares, oral verabreichbares oder äußerlich anwendbares Arzneimittel.

b. Desintegrieren von Torfmaterial; alkalischer Aufschluß des Torfmaterials; Zentrifugieren der überstehenden Flüssigkeit nach Abkühlen der Reaktionsmischung; Abtrennen der überstehenden Flüssigkeit nach Zentrifugation; Neutralisieren der überstehenden Flüssigkeit; Entfernung des durch die Neutralisation gebildeten Salzes; und Aufbereitung in üblicher Weise zur Verwendung als injizierbares, oral verabreichbares oder äußerlich anwendbares Arzneimittel.

c. Desintegrieren von Torfmaterial; Extrahieren des Torfmaterials durch Wasserdampfdestillation zur Gewinnung eines Destillates; alkalischer Aufschluß des verbleibenden Rückstandes aus der Wasserdampfdestillation; Zentrifugieren der überstehenden Flüssigkeit nach Abkühlen der Reaktionsmischung; Abtrennen der überstehenden

- 5 -

Flüssigkeit nach Zentrifugation; Neutralisieren der überstehenden Flüssigkeit; Entfernung des durch die Neutralisation gebildeten Salzes; Zusammenführen der überstehenden Flüssigkeit und des Destillates aus der Wasserdampfdestillation; und übliche weitere Aufbereitung der Mischung zur Verwendung als injizierbares und verabreichbares oder äußerlich anwendbares Arzneimittel.

d. Desintegrieren von Torfmaterial; Extrahieren des Torfmaterials durch Wasserdampfdestillation zur Gewinnung eines Destillates; alkalischer Aufschluß des verbleibenden Rückstandes aus der Wasserdampfdestillation; Zentrifugieren der überstehenden Flüssigkeit nach Abkühlen der Reaktionsmischung; Abtrennen der überstehenden Flüssigkeit nach Zentrifugation; Neutralisieren der überstehenden Flüssigkeit; Zentrifugieren der neutralisierten Flüssigkeit; Abtrennen des festen Rückstandes aus der Zentrifugation; Trocknung des Rückstandes und Aufbereitung in üblicher Weise zur Verwendung als injizierbares, oral verabreichbares oder äußerlich anwendbares Arzneimittel.

Bei der Vorgehensweise nach c. wird das Torfmaterial nach dem Desintegrieren und vor der Wasserdampfdestillation vorzugsweise zusätzlich mit Wasser gequollen wird.

Dabei ist erfindungsgemäß bevorzugt vorgesehen, daß zum Aufschluß des festen Rückstandes nach der Wasserdampfdestillation NaOH in einer Konzentration von 10 - 25 Gew.-%, bezogen auf den Rückstand nebst Wassergehalt, verwendet wird.

Der alkalische Aufschluß des Rückstandes aus der Wasserdampfdestillation kann durch Aufschlammung mit einer

- 6 -

wäßrigen alkalischen Lösung, Aufkochen und Siedenlassen der Aufschlammung für mindestens 5, höchstens aber 100 min., Auffüllen mit heißem Wasser auf das 1,5-5,0fache Volumen und Autoklavieren, vorzugsweise bei einem Druck von 2,5 bar und 150°C, erfolgen.

Zur Neutralisierung der überstehenden Flüssigkeit aus der Zentrifugation nach dem alkalischen Aufschluß wird vorzugsweise HCl eingesetzt.

Die Erfindung schlägt in dieser Zusammensetzung vor das gebildete Chlorid durch Dialyse zu entfernen.

Bei der Vorgehensweise nach d. wird Neutralisierung der überstehenden Flüssigkeit aus der Zentrifugation nach dem alkalischen Aufschluß wird bevorzugt HCl eingesetzt.

Das gebildete Salz wird danach vorzugsweise entfernt.

Der feste Rückstand aus der letzten Zentrifugation kann mehrfach mit destilliertem Wasser gewaschen werden.

Bevorzugt erfolgt die Trocknung in einem Gefriertrockner.

Schließlich betrifft die Erfindung noch eine pharmazeutische Zubereitung zur Behandlung von asymptomatischen HIV-Infektionen und/oder systemischen opportunistischen Infektionen bei Vollbild AIDS (und/oder einer anderen retroviral verursachten Erkrankungen) und/oder Hepatitis B-Infektionen und/oder Malaria und/oder Krebserkrankungen, herstellbar nach einem der geschilderten Verfahren.

Der Erfindung liegt die überraschende Erkenntnis zugrunde,

- 7 -

daß es gelingt, die aufgeführten Erkrankungen wirksam zu bekämpfen, und zwar unter weitestgehender Vernichtung der Krankheitserreger, wie z.B. HIV, HepB-Viren oder Plasmodien (Malaria-Erreger), und/oder Hemmung der Vermehrung von Krebszellen, indem zumindest eine der in Anspruch 1 angegebenen Wirksubstanzen in einer therapeutisch wirksamen Menge verwendet wird. Eine bevorzugte pharmazeutische Zubereitung zur Behandlung der aufgeführten Erkrankungen wird gemäß den in den Ansprüchen 16-28 angegebenen Verfahren auf Torfbasis hergestellt.

Torf ist ein überwiegend aus pflanzlichen, zu einem geringen Teil auch aus tierischen Organismen gebildetes Material. In seiner Lagerstätte, dem Moor, vollzieht sich der biochemische Vorgang der Vertorfung (Humifizierung) abgestorbener Pflanzen in sedimentären Ablagerungen seit etwa 8.000 bis 10.000 Jahren. Die ersten Torf-Bildungen setzten vor etwa 12.000 Jahren in der Nacheiszeit ein. Sie sind in ungestörten Mooren bis heute noch nicht abgeschlossen.

Hochmoore sind unabhängig von Quell-, Grund- oder stehendem Wasser, sie leben nur vom Regenwasser und haben ein autonomes Wasserregime. Die Torfe der Hochmoore sind sehr homogen, sauerstoffarm, kalk- und stickstoffarm und sehr sauer. Die vom Hochmoor abweichende Biologie und Chemie der Übergangsmoor- und Niedermoortorfe bedingt andersartige Erhaltungsformen; während in Hochmoortorfen nur die Proteine überleben, erfolgt in Übergangsmoor- und Niedermoortorfen eine chemische Umwandlung von Körpereiweiß.

Die gerbende Wirkung von Torfen ist weithin bekannt, wobei diese im wesentlichen einerseits auf die im Torf enthaltenen

Huminstoffe, andererseits auf die im Torf enthaltenen Tannine zurückgeführt werden kann.

Das Potential von Torf als Quelle von therapeutisch wirksamen Verbindungen ist bis heute kaum erschlossen. Von einigen Inhaltsstoffen von Torf, wie sie auch in Anspruch 1 der vorliegenden Erfindung aufgeführt sind, ist allerdings bereits ein therapeutischer Einsatz bekannt. So beschreibt die DE-OS 22 06 570 die Verwendung von (+)-Catechin bei der oralen, rektalen und parenteralen Behandlung von Leberaffektionen. Aus der DE-OS 36 03 576 ist die Verwendung von Gerbstoffen auf Tannin- oder Catechin-Basis und/oder von isolierter Chlorogensäure, bzw. deren physiologisch verträglichen Derivaten als Mittel zur Reduzierung der Magensäuresekretion und/oder zum Schutz der Magenschleimhaut bekannt. Die DE-OS 36 03 227 beschreibt eine pharmazeutische Zubereitung zur Behandlung entzündlicher und allergischer Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, der Lungen und der Haut, sowie von Erkrankungen, die mit einem erhöhten Histamingehalt im Blut einhergehen, wobei diese pharmazeutische Zubereitung als aktive Substanz eine Mischung von (+)-Catechin und Ascorbolysinat enthält. Aus der DE-OS 30 31 710 ist schließlich die Verwendung eines Reaktionsproduktes von (+)-Catechin mit einer im wesentlichen äquimolaren Menge an L-Lysin oder L-Arginin und an Salzsäure, Essigsäure, Ascorbinsäure oder einer äquivalenten Menge an Zitronensäure zur Behandlung von degenerativen Erkrankungen des Bindegewebes bekannt geworden.

Die DE-OS 39 03 773 beschreibt die bakteriozide oder bakteriostatische Aktivität von aus Kohle hergestellter Huminsäure, Salzen oder Derivaten derselben. Aus der DE-OS 37 07 909 ist die Verwendung von niedermolekularen Alkali-

oder Ammoniumsalzen von Huminsäuren als Heilmittel in der Wundheilung oder zur Herstellung von hochwirksamen Moorbädern bekannt geworden. Die DE-OS 37 07 910 beschreibt die gleichen Verwendung von niedermolekularen Alkalihuminaten, die nach einem anderen Verfahren hergestellt sind.

Aus der DE-OS 38 30 333 ist eine pharmazeutische Zusammensetzung zur externen Behandlung der durch Herpes-Viren verursachten Bläschenkrankheit bekannt geworden, die Kalium- oder Natriumsulfid und Huminsäure, deren Salze oder entsprechende Anteile an Moorerde oder Moorextrakt in flüssiger Phase enthält.

Demgegenüber gänzlich unerwartet ist, daß die in der vorliegenden Anmeldung beanspruchten Substanzen, insbesondere eine Kombination derselben, die aus Torf gewonnen werden kann, Retroviren, wie z.B. HIV, HepB-Viren und Plasmodien vollständig vernichten und im Falle von Krebs zumindest die Ausbreitung von Krebsgeschwüren reduzieren können. In-vitro-Tests haben gezeigt, daß mit den vollkommen untoxischen und zu 100% zellverfügbaren pharmazeutischen Zubereitungen nach der Erfindung, eine 100%ige Vernichtung von HIV und Plasmodien bewirkt werden kann. Darüberhinaus gibt es auch in-vitro-Testergebnisse und Hinweise auf die Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Wirksubstanzen bei der Bekämpfung anderer Retroviren und Hep B-Viren, bei der Behandlung von systemischen opportunistischen Infektionen bei Vollbild AIDS, sowie für die inhibierende Wirkung in Tumorlinien.

Hervorzuheben ist, daß durch den erstmaligen Einsatz derartiger Wirksubstanzen in einer therapeutischen Zubereitung zur Therapie der aufgeführten Erkrankungen in

- 10 -

der Humanmedizin nebenwirkungsarme Ergebnisse erzielt werden können, die den besten auf diesem Gebiet bisher bekannten Therapeutika überlegen sind. Festzuhalten ist auch die besondere synergistische Wirkung der aus Torf extrahierbaren Substanzen, wobei die erfindungsgemäßen Verfahren deren weitgehende Überführung in pharmazeutisch aktive Substanzen gewährleisten.

Weitere Merkmale und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus der nachstehenden Beschreibung, in der Ausführungsbeispiele im einzelnen erläutert sind.

Beispiel 1:

Zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung nach der Erfindung wurde grubenfrischer Hochmoortorf verwendet. Es sei darauf hingewiesen, daß mit vergleichbaren Ergebnissen auch andere Torfarten insbesondere auch aus Übergangsmoor und Niedermoor eingesetzt wurden.

Das Torfmaterial wurde zunächst desintegriert und ggf. mittels eines Vibrosiebes von Grobbestandteilen befreit. Nach einer fakultativen Sterilisation durch Gamma-Bestrahlung unter Verwendung von Kobalt 60 bei einer Dosis von 10-50 kGy erfolgte bei unterhalb 80°C eine Vakuumtrocknung auf eine Restfeuchte von mindestens 20-25%.

Das so erhaltene Material wurde mit Wasser unter ständigem Rühren für 24-72 Stunden gequollen. Anschließend wurde eine Wasserdampfdestillation durchgeführt, wobei das Destillat gesammelt und aufbewahrt wurde. Tests mit diesem Destillat zeigten bereits eine bemerkenswerte physiologische Wirksamkeit (etwa 50% der Wirkung des

endgültigen Präparats).

Der Rückstand aus der Wasserdampfdestillation wurde anschließend basisch aufgeschlossen, wobei ein Zusatz von festem NaOH in einer Menge von 10-25 Gew.-%, bezogen auf den Rückstand nebst Wassergehalt, erfolgte, unter Einstellung einer Endfeuchtigkeit von 80-90%. Selbstverständlich können auch andere basische Materialien, wie KOH und dergleichen, für den basischen Aufschluß verwendet werden.

Die hergestellte Aufschlammung wurde unter ständigem Rühren zum Sieden gebracht, mindestens 5, aber höchstens 100 min siedengelassen und alsdann mit heißem Wasser auf das 1,5-5,0fache Volumen aufgefüllt und autoklaviert, vorzugsweise bei einem Druck von 2,5 bar bei 150°C. Nach dem Abkühlen wird die überstehende Flüssigkeit abgetrennt und für 40 Minuten bei 8-10 UPM zentrifugiert.

Der Vorgang wurde nochmal unter erneuter Abtrennung der Flüssigkeit wiederholt.

Die überstehende Flüssigkeit aus der (den) Zentrifugation(en) wird mit Säure, wie z.B. HCl, neutralisiert. Das gebildete Salz, z.B. NaCl, wird bevorzugt durch eine Dialyse entfernt.

Anschließend wird das Destillat aus der Wasserdampfdestillation zu der Lösung hinzugefügt und auf einen pH-Wert von 6-7 eingestellt. Dann wird physiologische Kochsalzlösung zugeführt und die Gesamtmischung wird sterilisiert und abschließend ampulliert. Die so hergestellte pharmazeutische Zubereitung ist ohne weiteres injizierbar.

- 12 -

Ein ohne vorgeschaltete Wasserdampfdestillation, d.h. durch alkalischen Aufschluß des desintegrierten Ausgangsmaterials und nachfolgende Schritte, hergestelltes Präparat zeigte in weiter unten beschriebenen Tests eine Wirksamkeit von 70 - 80% des endgültigen Präparats.

Beispiel 2:

Die Aufarbeitung des Torfmaterials erfolgte zunächst in Übereinstimmung mit den in Beispiel 1 angegebenen Schritten. Nach der (den) Zentrifugation(en) wurde die überstehende Flüssigkeit ebenfalls mit Säure, z.B. HCl, neutralisiert und anschließend noch einmal zentrifugiert. Der Bodensatz aus der Zentrifugation wurde mit destilliertem Wasser mehrmals gewaschen, erneut zentrifugiert und auf einen pH-Wert von 6-7 eingestellt. Das Material wurde in einem Gefriertrockner getrocknet, anschließend sterilisiert und schließlich zu oral verabreichbaren Dragees tablettiert oder zu einem entsprechend äußerlich anwendbaren Präparat aufbereitet.

Toxizität und Verträglichkeit

Obwohl nicht singuläre, sondern multifaktorielle Wirkungen nach Verabreichungen zu erwarten sind, dürften als potentiell wirksame Inhaltsstoffe vor allem die in den Ansprüchen genannten Säuren in Betracht kommen.

Diese natürlichen organischen Säuren haben mehrere wichtige Eigenschaften.

Bei oraler Applikation an Versuchstieren finden sich keine Sensibilisierungen in Form allergischer Reaktionen, Resistenzen, toxischen Nebenwirkungen in Organsystemen und

Rückständen in den Geweben.

Die akute LD50 i.p. bei Ratten beträgt 255,0 mg/kg.

Die pränatal-toxischen Untersuchungen an Laborratten zeigen, daß unter dem Einfluß dieser Säuren keinerlei makroskopisch sichtbaren Mißbildungen, Retardierungen und keine kanzerogenen, embryotoxischen und teratogenen Schäden auftraten.

Das untersuchte Präparat weist hohe orale Verträglichkeit auf, und die orale Applikation ist in prophylaktischer, und therapeutischer Höhe diesbezüglich als unbedenklich einzuschätzen.

Die pharmakodynamischen Funktionen dieser Säuren ergeben sich aus ihren chemischen, biochemischen, toxikologischen und stoffwechselphysiologischen Eigenschaften.

Diese Säuren wirken nach oraler Aufnahme im Magen-Darm-Trakt antiphlogistisch und schützend.

Das Präparat wirkt virucid, antibakteriell und throphisch. Es ist geruch- und geschmacklos, enthält keine störenden Partikel und löst sich nach Umrühren restlos im Wasser.

Seine orale Applikation wird im Vergleich zu anderen Medikamenten als sehr gut eingeschätzt.

Die Tiere nahmen die Mischgetränke in prophylaktischer und therapeutischer Dosis nach kurzer Angewöhnung komplikationslos auf. Damit gelangte die geforderte Arzneimittelmenge in einer gut dosierbaren und von Streßfaktoren freien Applikationsform völlig problemlos

in den Magen-Darm-Trakt der Tiere.

Wirksamkeitsprüfung HIV:

Die Wirksamkeitsprüfungen der gemäß Beispiel 1 und 2 hergestellten Präparate wurden im Institut für molekularbiologische Diagnostik (DIAGEN, D-4010 Hilden, Max-Vollmer-Straße 4) in speziell für die Wirksamkeitsprüfung von HIV entwickelten in-vitro-Testsystemen durchgeführt.

Der Toxizitätstest wurde nach der bekannten Methodik vorgenommen: Die Substanzen wurden in Endkonzentrationen von 1:100, 1:1.000, 1:10.000 und 1:100.000 mit nicht-infizierten Lymphozyten kokultiviert. Nach vier Tagen wurde die proliferative Aktivität der Zellen im MTT-Test quantifiziert. Die im folgenden aufgeführten Ergebnisse beziehen sich auf die Proliferationsaktivität unbehandelter Kontrollzellen.

Für den Viabilitätstest wurden Lymphozyten mit HIV infiziert und ebenfalls für vier Tage in Gegenwart der Substanzen kultiviert. Die Viabilität der Zellen wurde mit dem Trypanblau-Ausschlusstest untersucht; es wurde der prozentuale Anteil lebender Zellen bestimmt.

Anschließend wurden die Zubereitungen aus Beispiel 1 und 2 in einer Endverdünnung von jeweils 1:100 auf potentielle Anti-HIV-Aktivität getestet. Hierzu wurden humane Lymphozyten de novo mit HIV infiziert und für 4 Tage in Gegenwart der Substanzen kultiviert. Nach 2, 3 und 4 Tagen wurde in Kulturüberständen das synthetische HIV core protein p24 mittels ELISA gemessen. Die in den untersuchten Kulturen synthetisierte Menge an p24 wurde

- 15 -

mit Hilfe einer Eichkurve, die mit kalibriertem rekombinanten p24 erstellt wurde, berechnet. Als Kontrolle wurden wiederum Kulturen mitgeführt, die keine Testsubstanz enthielten. Auch hier wurde die synthetische Menge an p24 pro ml Kulturvolumen berechnet.

Eine prozentuale Hemmung (% Inhibition) der HIV-Replikation wurde wie folgt berechnet:

$$\% \text{ Inhibition} = 100 - \left[\frac{(\text{ng p24/ml in Kulturen mit Testsubstanz})}{(\text{ng p24/ml in Kontroll-Kulturen})} \cdot 100 \right]$$

Aus der prozentualen Hemmung wurde ein antiviraler Infekt auf einer Skala von 0 bis 9 errechnet. Einer substanzinduzierten Hemmung zwischen 0 und 10% wurde der antivirale Effekt 0 zugeordnet, einer Hemmung zwischen 10 und 20% der antivirale Effekt 1, einer Hemmung zwischen 20 und 30% der antivirale Effekt 2, usw. .

Als Referenzsubstanz wurde AZT in einer Dosis-Wirkungskurve von 100 mg/ml bis 0,1 mg/ml getestet.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den beigefügten Tabellen 1 bis 3 dargestellt, wobei die mit K763 und K764 bezeichneten Präparate gemäß Beispiel 1 und das mit K765 bezeichnete Präparat gemäß Beispiel 2 hergestellt worden war.

- 16 -

<u>Hemmung der HIV-Replikation auf Protein-Basis</u>				
		Tag 2	Tag 3	Tag 4
K763	(ng p24/ml)	0,0	0,0	5,9
Kontrolle	(ng p24/ml)	0,0	97,3	129,7
Hemmung	%		100,0	95,5
Antiviraler Effekt	(0-9)		9	9

Datum des Tests: 7. Januar 1993

<u>Hemmung der HIV-Replikation auf Protein-Basis</u>				
		Tag 2	Tag 3	Tag 4
K764	(ng p24/ml)	0,0	0,0	8,8
Kontrolle	(ng p24/ml)	0,0	97,3	129,7
Hemmung	%		100,0	93,2
Antiviraler Effekt	(0-9)		9	9

Datum des Tests: 7. Januar 1993

<u>Hemmung der HIV-Replikation auf Protein-Basis</u>				
		Tag 2	Tag 3	Tag 4
K765	(ng p24/ml)	0,0	2,4	0,0
Kontrolle	(ng p24/ml)	0,0	97,3	129,7
Hemmung	%		97,5	100,0
Antiviraler Effekt	(0-9)		9	9

Datum des Tests: 7. Januar 1993

Die Untersuchungen zeigen, daß die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Substanzen in vitro eine ausgezeichnete Wirkung bei der Vernichtung von HIV zeigen. Es wird angenommen, daß diese außerordentlich erstaunlichen Ergebnisse durch eine synergistische Wirkung der aus dem Torf extrahierten Substanzen begründet ist. Es gibt jedoch Anhaltspunkte, daß auch einzelne der im Torf enthaltenen Wirksubstanzen, wie sie in Anspruch 1 aufgeführt und auch aus anderen Quellen synthetisierbar oder erhältlich sind, ähnlich gute Ergebnisse zeigen.

Wirksamkeitsprüfung Plasmodien (Malaria)

Die Überprüfung der antiparasitären Wirkung erfolgte in vitro an erythrozytären Zellkulturen, die mit Plasmodien falciparum infiziert waren. Es wurden je 2 Testserien durchgeführt, in denen Lösungen in einer Verdünnung von 1:70 eingesetzt wurden. Alle Lösungen übten eine Hemmung auf die intraerythrozytäre Entwicklung der Malariaparasiten aus. Der Hemmeffekt war mikroskopisch in

allen drei Entwicklungsstadien der Plasmodien nachweisbar. Nach 3 Tagen waren im Ansatz keine reifen Parasitenformen mehr zu finden. Die Kulturen wurden über 8 Tage im Abstand von 24 Stunden analysiert. Alle drei Tage wurde ein Medienwechsel vorgenommen; das nach den ersten drei Tagen neu hinzugesetzte Medium enthielt keine Wirksubstanz mehr.

Es kann gefolgert werden, daß die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Lösungen eine starke antiparasitäre Wirkung ausüben.

Wirksamkeitsprüfung Krebs

Die nachfolgenden Untersuchungen wurden durchgeführt im Universitätsklinikum Rudolf Virchow der Freien Universität Berlin.

Kultiviert wurden a) K 562-Zellen und b) NHL-87-Zellen. Benutzt wurde Iscoves modifiziertes Dulbecco-Medium mit Zusatz von 10% (v/v) fötalem Kälberserum. Die Inkubation erfolgte für 120 Stunden. Als Testsubstanzen wurden jeweils 1% (v/v) eingesetztes Material, bezeichnet als "3", "16" und "22".

Die bezeichneten Materialien wurden vor dem Test durch Filtration (niedrig Protein-bindender Filter, 0,22 µm) teilsterilisiert.

Eine fungale oder bakterielle Kontamination trat nicht auf. Die Messungen sind Mittelwerte von Dreifach-Messungen. Analysiert wurde die Zellzahl und die Expression des Transferrin-Rezeptors.

- 19 -

A. ZELLZAHL

	1. K562	2. NHL
Zellzahl ($\times 10^6$ /ml)		
bei Kulturbeginn	6,5	1,1
t120h/ Kontrolle	29.	6,0
+ "3"	24.	5,0
+ "16"	27.	6,0
+ "22"	28.	5,0

B. TRANSFERRIN-REZEPTOR

Die Analyse erfolgte mittels "live-gating" mit Propidiumiodid ausschließlich bezüglich vitaler Zellen. In den Kulturen mit den erfindungsgemäßen Material fanden sich bei beiden Zelllinien verminderte Prozentwerte CD71-positiver Zellen.

Getestet wurden die erfindungsgemäßen Substanzen bezüglich zytotoxischer Wirkung auf zwei permanente Zelllinien. Sie zeigten eine deutlich inhibierende Wirkung in den Testsystemen.

Es gibt erste in-vitro-Ergebnisse zur Wirksamkeit des Präparats auch bei Hepatitis B-Infektionen sowie systemischen opportunistischen Infektionen bei Vollbild AIDS. Zur Erläuterung sei noch angeführt, daß unter systemischen opportunistischen Infektionen üblicherweise Infektionen durch die Erreger Mycobacterium tuberculosis (und atypische Mykobakterien), Salmonellen, Toxoplasma gondii, Cryptosporidium, Isospora belli, Strongyloides, Pneumocystis carinii, Candida, Cryptococcus neoformans, Aspergillus fumigatus, Cytomegalie-Virus, Herpes-simplex-

Virus, Papova-Virus und Varicella-Zoster-Virus verstanden werden.

Diese Eigenschaften wirken sich insbesondere günstig aus bei gleichzeitiger Prophylaxe oder Behandlung der systemischen opportunistischen Infektionen bei Patienten mit AIDS, die das Präparat bereits wegen seiner antiviralen Wirkung erhalten. Es hat überraschende Wirkungen bei allen pathologischen Prozessen, wo bisher bekannte medizinischen Methoden kaum Erfolg zeigen.

Die in der vorstehenden Beschreibung sowie in den Ansprüchen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebigen Kombinationen für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausführungsformen wesentlich sein.

Ansprüche

1. Verwendung einer Wirksubstanz aus der Gruppe: Tannine, Catechine, Huminstoffe, Huminsäuren, Gallussäure, Gallate, Gerbstoffe, Depside, Gallenextrakte, Ellagsäure, Chikimsäure und Flavonoide sowie Verbindungen, insbesondere Salze, und Derivate und Vorstufen der vorgenannten Substanzen, oder einer Kombination von zwei oder mehreren dieser Wirksubstanzen zur Behandlung von asymptomatischen HIV-Infektionen und/oder anderen retroviral verursachten Erkrankungen und/oder systemischen opportunistischen Infektionen bei Vollbild AIDS und/oder Hepatitis B-Infektionen und/oder Malaria und/oder Krebserkrankungen.

2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Wirksubstanzen synthetisch gewonnen ist.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Wirksubstanzen aus mindestens einem Naturstoff gewonnen ist.
4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Wirksubstanzen aus Kohle gewonnen ist.
5. Verwendung nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Wirksubstanzen aus Braunkohle gewonnen ist.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Wirksubstanzen aus Erz(en) gewonnen ist.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 3 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Wirksubstanzen aus Humusschlamm, Moorschlamm, Klärschlamm oder Meerschlamm gewonnen ist.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 3 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Wirksubstanzen aus Torf gewonnen ist.
9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Wirksubstanzen aus Übergangsmoor- und Niedermoortorf gewonnen ist.
10. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet,

- 23 -

daß mindestens eine der Wirksubstanzen aus Hochmoortorf gewonnen ist.

11. Verwendung nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Wirksubstanzen aus Torf mit einem Humositätsgrad (nach von Post) von H3 - H10 gewonnen ist.

12. Verwendung nach einem der Ansprüche 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Wirksubstanzen aus grubenfrischem Torf gewonnen ist.

13. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch eine Aufbereitung des Wirkstoffes oder der Wirkstoffkombination als oral verabreichbares Arzneimittel.

14. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, gekennzeichnet durch eine Aufbereitung des Wirkstoffes oder der Wirkstoffkombination als injizierbares Arzneimittel.

15. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, gekennzeichnet, durch eine Aufbereitung des Wirkstoffes oder der Wirkstoffkombination als äußerlich anwendbares Arzneimittel.

16. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

Desintegrieren von Torfmaterial; Extrahieren des Torfmaterials durch Wasserdampfdestillation zur Gewinnung eines Destillates; und Aufbereitung des Destillates in üblicher Weise zur Verwendung als injizierbares, oral

verabreichbares oder äußerlich anwendbares Arzneimittel.

17. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

Desintegrieren von Torfmaterial; alkalischer Aufschluß des Torfmaterials; Zentrifugieren der überstehenden Flüssigkeit nach Abkühlen der Reaktionsmischung; Abtrennen der überstehenden Flüssigkeit nach Zentrifugation; Neutralisieren der überstehenden Flüssigkeit; Entfernung des durch die Neutralisation gebildeten Salzes; und Aufbereitung in üblicher Weise zur Verwendung als injizierbares, oral verabreichbares oder äußerlich anwendbares Arzneimittel.

18. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

Desintegrieren von Torfmaterial; Extrahieren des Torfmaterials durch Wasserdampfdestillation zur Gewinnung eines Destillates; alkalischer Aufschluß des verbleibenden Rückstandes aus der Wasserdampfdestillation; Zentrifugieren der überstehenden Flüssigkeit nach Abkühlen der Reaktionsmischung; Abtrennen der überstehenden Flüssigkeit nach Zentrifugation; Neutralisieren der überstehenden Flüssigkeit; Entfernung des durch die Neutralisation gebildeten Salzes; Zusammenführen der überstehenden Flüssigkeit und des Destillates aus der Wasserdampfdestillation; und Aufbereitung der Mischung in üblicher Weise der Mischung zur Verwendung als injizierbares, und verabreichbares oder äußerlich anwendbares Arzneimittel.

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet,

daß das Torfmaterial nach dem Desintegrieren und vor der Wasserdampfdestillation zusätzlich mit Wasser gequollen wird.

20. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß zum Aufschluß des festen Rückstandes nach der Wasserdampfdestillation NaOH in einer Konzentration von 10 - 25 Gew.-%, bezogen auf den Rückstand nebst Wassergehalt, verwendet wird.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß der alkalische Aufschluß des Rückstandes aus der Wasserdampfdestillation durch Aufschlammung mit einer wäßrigen alkalischen Lösung, Aufkochen und Siedenlassen der Aufschlammung für mindestens 5, höchstens aber 100 min, Auffüllen mit heißem Wasser auf das 1,5-5,0fache Volumen und Autoklavieren, vorzugsweise bei einem Druck von 2,5 bar und 150°C, erfolgt.

22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß zur Neutralisierung der überstehenden Flüssigkeit aus der Zentrifugation nach dem alkalischen Aufschluß HCl eingesetzt wird.

23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß das gebildete Chlorid durch Dialyse entfernt wird.

24. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

Desintegrieren von Torfmaterial; Extrahieren des Torfmaterials durch Wasserdampfdestillation zur Gewinnung

eines Destillates; alkalischer Aufschluß des verbleibenden Rückstandes aus der Wasserdampfdestillation; Zentrifugieren der überstehenden Flüssigkeit nach Abkühlen der Reaktionsmischung; Abtrennen der überstehenden Flüssigkeit nach Zentrifugation; Neutralisieren der überstehenden Flüssigkeit; Zentrifugieren der neutralisierten Flüssigkeit; Abtrennen des festen Rückstandes aus der Zentrifugation; Trocknung des Rückstandes und Aufbereitung in üblicher Weise zur Verwendung als injizierbares, oral verabreichbares oder äußerlich anwendbares Arzneimittel.

25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß zur Neutralisierung der überstehenden Flüssigkeit aus der Zentrifugation nach dem alkalischen Aufschluß HCl eingesetzt wird.

26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß das gebildete Salz entfernt wird.

27. Verfahren nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß der feste Rückstand aus der letzten Zentrifugation mehrfach mit destilliertem Wasser gewaschen wird.

28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Trocknung in einem Gefriertrockner erfolgt.

29. Pharmazeutische Zubereitung zur Behandlung von asymptomatischen HIV-Infektionen und/oder systemischen opportunistischen Infektionen bei Vollbild AIDS (und/oder anderen retroviral verursachten Erkrankungen) und/oder Hepatitis B-Infektionen und/oder Malaria und/oder Krebserkrankungen, herstellbar nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 28.