

PETITORIO


Industria y Comercio
 SUPERINTENDENCIA

01 101336 0

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE 2000-3

1 SOLICITUD DE: ☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad			
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: BOMSUND GRUPO ASESOR, S.L. sociedad constituida y existe bajo las leyes de España. Dirección: Mallorca 235, ppic. 1º, 08008 Barcelona, España. Teléfono: 546 09 70 E-mail: clientes@camyp.com Fax: 249 40 70 Domicilio: Barcelona, España.		IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número: _____
3 REPRESENTANTE O APODERADO (74)	Nombre: Emilio FERRERO Dirección: Carrera 4ª No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 E-mail: cavelier@cavelier.com Fax: 217 92 11 Domicilio: Bogotá, Colombia		IDENTIFICACION C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número: <u>438.019</u> TP <u>31.928</u>
4 INVENTOR(ES) (72)	Nombre: José Manuel FRIAS PEÑA Dirección: Mallorca 235, ppic. 1º, 08008 Barcelona, España.		IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número: _____
5 TITULO (54) COMPUESTO POLISACÁRIDO CON ACTIVIDAD INMUNOESTIMULANTE			
6 Clasificación Internacional (51) : <u>e08L 005/000</u> <u>A61K 35/78</u> <u>31/715</u>			
7 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen PCT.	(32) Fecha 27 de noviembre de 2000	(31) Número de Solicitud PCT/IB00/01946
8 Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los 6 meses ☐ 12 meses ☐ 18 meses ☒ Otro ☐			
9 Comprobante de pago No. 01-74.215 Por \$ 356.640.00 Fecha: 26 de noviembre de 2001 Comprobante de pago No. 01-70.790 Por \$ 100.000. Fecha: 9 de noviembre de 2001.			

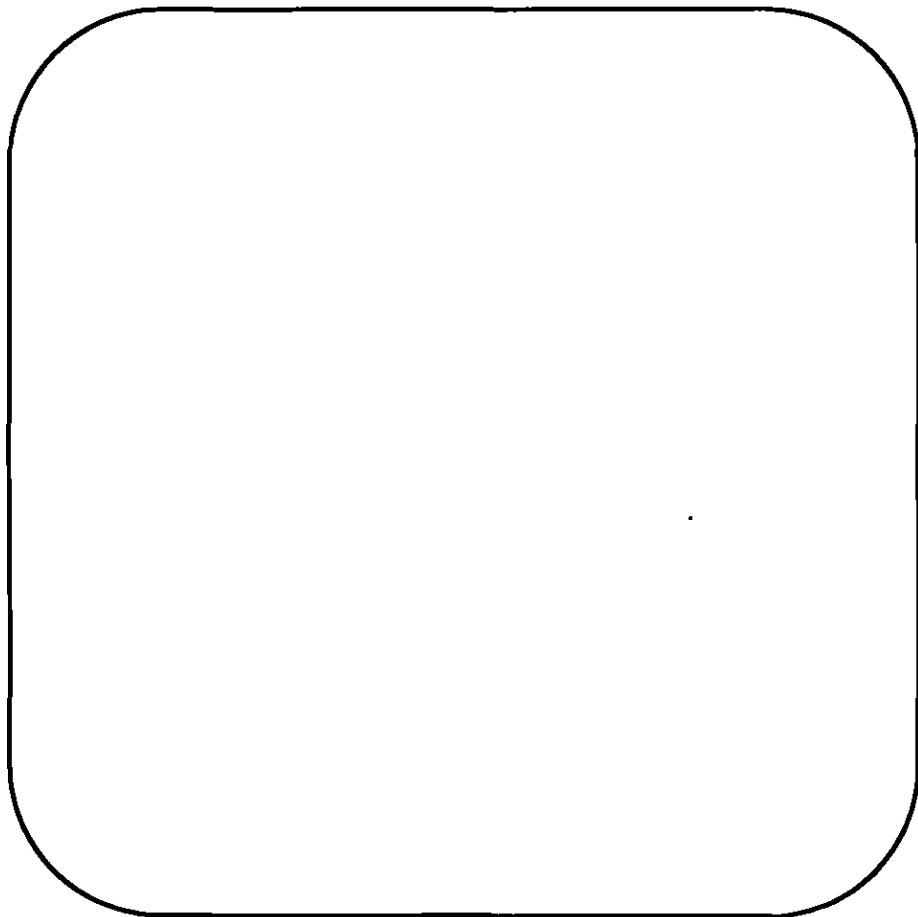
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación
- ☒ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Copia certificada de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☒ Descripción de la invención
- ☒ Una o más reivindicaciones
- ☒ Dibujos y/o planos necesarios (16 pág.)
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA:

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

COMPUESTO POLISACÁRIDO
CON ACTIVIDAD INMUNOESTIMULANTE

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un compuesto polisacárido de fórmula I que presenta actividad 5 inmunoestimulante, a un procedimiento para obtenerlo, al uso del mismo en el tratamiento de enfermedades inmunosupresoras y a composiciones farmacéuticas que lo contienen.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se puede definir el sistema inmune como el conjunto de moléculas, células y órganos cuyas complejas interacciones forman un sistema de emergencia que es 15 capaz, por lo general, de proteger a un individuo tanto de los invasores externos como de sus propias células alteradas.

El sistema inmune se puede separar en dos partes 20 funcionalmente distintas: los elementos que son innatos y los que son adquiridos. La inmunidad innata se refiere a elementos inmunes no específicos y sin capacidad de adaptación. Son capaces de distinguir los organismos o tejidos extraños pero son incapaces de reconocer un 25 invasor particular. Se pueden dividir mejor en barreras (piel y mucosas), agentes químicos no específicos (enzimas presentes en las secreciones mucosas, quininas e histaminas) y células efectoras no específicas (macrófagos). La inmunidad adquirida se refiere a 30 elementos específicos y con capacidad de adaptación. Son capaces de distinguir las células extrañas de las propias, y pueden distinguir un antígeno extraño de otro. Asimismo, la inmunidad adquirida tiene memoria. Esto permite la inmunización y la resistencia a la reinfección 35 por el mismo microorganismo. Las células que son responsables de la inmunidad adquirida son los

linfocitos, que se dividen, a su vez, en dos subclases:
células B y células T.

Se puede conseguir la inmunidad adquirida mediante
5 infección natural o vacunación (de un modo activo) o
mediante administración de células inmunes (de un modo
pasivo). Mientras que el primer modo presenta efectos de
larga duración que, incluso, pueden ser permanentes, los
efectos del último son menos duraderos.

10

Los pacientes que presentan enfermedades
inmunosupresoras se tratan con inmunoestimulantes con el
fin de activar su sistema inmune. Se describen diferentes
inmunoestimulantes en los documentos US 4801578, US
15 5417979 y WO 9851319. Se describen inmunoestimulantes
polisacáridos en los documentos DE 19817177 y EP 0 225
496. Estas patentes describen compuestos polisacáridos
con actividad inmunoestimulante así como la obtención de
los mismos a partir de cultivos de células vegetales. Se
20 emplean plantas como la *Echinacea purpurea*, la *Echinacea*
angustifolia o la *Calendula officinalis*.

Sin embargo, ninguno de estos compuestos
inmunoestimulantes presentan una actividad satisfactoria
25 para las enfermedades inmunosupresoras. Existe, por
tanto, la necesidad en la técnica de inmunoestimulantes
alternativos que presenten una actividad mejorada y más
amplia.

30

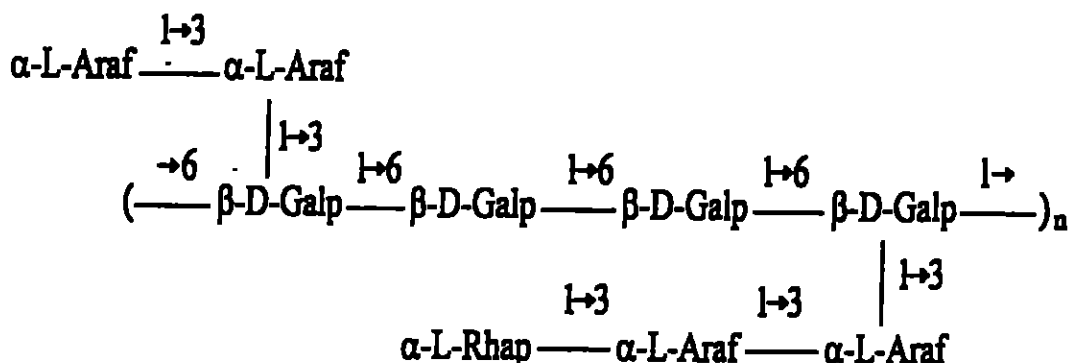
SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un compuesto
polisacárido de fórmula I que presenta actividad
inmunoestimulante, un procedimiento para obtenerlo, el
35 uso del mismo en el tratamiento de enfermedades

inmunosupresoras y composiciones farmacéuticas que lo contienen.

Un aspecto de la invención se refiere a compuestos
5 polisacáridos de fórmula I

Esquema :



en la que $n = 7$ a 8 .

10

Un segundo aspecto de la invención se refiere al procedimiento para obtener el compuesto polisacárido de fórmula I. Este procedimiento comprende, en primer lugar, la obtención de un extracto acuoso de la planta *Calendula officinalis* de acuerdo con un procedimiento descrito en una solicitud de patente en tramitación junto con la presente de los autores de esta invención y, en segundo lugar, el aislamiento del polisacárido empleando una combinación de técnicas de separación controladas mediante bioensayo.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del presente compuesto polisacárido de fórmula I como agente terapéutico en el tratamiento de enfermedades
25 inmunosupresoras tales como cáncer, tuberculosis, gripe, resfriado común, alergias, lupus eritematoso, psoriasis y SIDA.

Otro aspecto de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que incluyen el compuesto polisacárido de fórmula I.

3 La presente solicitud incluye las figuras y tablas siguientes:

La Figura 1 es un esquema del aislamiento de PF2.

La Figura 2 es un esquema del aislamiento de PF2R.

10 La Figura 3 es el espectro ^1H -RMN de PF2RS8A.

La Figura 4 es el espectro ^{13}C -RMN de PF2RS8A.

La Figura 5 es la TLC de los productos de hidrólisis de PF2RS8A con TFA y otros monosacáridos.

15 La Figura 6 es un esquema del aislamiento de PF2RS8B2, es decir, el polisacárido de fórmula I.

La Figura 7 es el perfil HPLC de PF2RS8B2 con un detector de dispersión de luz por evaporación.

La Figura 8 es el perfil HPLC de PF2RS8B2 con un detector fotodiódico de UV.

20 La Figura 9 es el espectro ^1H -RMN de PF2RS8B2.

La Tabla 1 muestra el efecto de las muestras PF2RS8A y PF2RS8B2 sobre la transformación linfocítica.

La Figura 10 es el espectro ^{13}C -RMN de PF2RS8B2, es decir, el polisacárido de fórmula I.

25 La Figura 11 es el espectro DEPT-135 de PF2RS8B2.

La Figura 12 es el espectro DEPT-90 de PF2RS8B2.

La Figura 13 es el espectro HMQC de PF2RS8B2.

La Figura 14 es el espectro COSY ^1H - ^1H de PF2RS8B2.

La Figura 15 es el espectro COSY ^1H - ^1H de PF2RS8B2.

30 La Figura 16 es el espectro HMQC de PF2RS8B2.

La Tabla 2 muestra el espectro ^{13}C -RMN de PF2RS8B2.

La Figura 17 es el espectro HMBC de PF2RS8B2.

La Figura 18 es el espectro HMBC de PF2RS8B2.

35 La Figura 19 es la TLC de los productos de hidrólisis de PF2RS8B2 con TFA y otros monosacáridos.

El compuesto polisacárido presenta un peso molecular medio de aproximadamente 10.000.

5 El segundo aspecto de la invención se refiere al procedimiento para obtener el compuesto polisacárido de fórmula I. Este procedimiento comprende, en primer lugar, la obtención de un extracto acuoso de la planta *Calendula officinalis* de acuerdo con un procedimiento descrito en
10 una solicitud de patente en tramitación junto con la presente de los autores de esta invención titulada "Procedimiento para preparar extractos acuosos de plantas y extractos obtenidos de este modo" y presentada simultáneamente con la presente solicitud con número de
15 serie ----- y, en segundo lugar, el aislamiento del polisacárido mediante una combinación de técnicas de separación controladas mediante bioensayo.

El extracto acuoso de la *Calendula officinalis* se
20 obtiene sometiendo las flores de esta planta al siguiente procedimiento:

- a) Descontaminación de las flores
- b) Trituración de las flores.
- 25 c) Tratamiento de las flores trituradas con una radiación láser.
- d) Suspensión de la mezcla obtenida en la etapa c) en agua.
- e) Maceración de la suspensión obtenida en la etapa
30 d).
- f) Separación del líquido resultante.

La descontaminación (etapa a) se lleva a cabo mediante lavado de las flores de *Calendula officinalis*
35 con agua. La cantidad de agua empleada en esta etapa no

es determinante, y puede variar dependiendo del estado de contaminación de la planta. Aunque no se descartan temperaturas superiores o inferiores, la temperatura del agua debe estar entre 10 °C y 40 °C, preferiblemente entre 20 °C y 35 °C, siendo lo más preferible que sea de 28 °C. Se puede emplear un túnel de lavado para facilitar esta etapa. Ni la cantidad de agua ni el tiempo de residencia de la planta en el túnel de lavado son determinantes y, por tanto, pueden variar dependiendo del estado de contaminación de la planta. La etapa de lavado puede efectuarse varias veces, con una etapa de secado entre ellas. Esta etapa de secado se lleva a cabo preferiblemente dejando la planta al sol.

Una vez que se han descontaminado las flores, se trituran (etapa b) mediante procedimientos convencionales tales como usando una máquina de trituración o, incluso, de forma manual. Aunque no se descartan temperaturas superiores o inferiores, la temperatura a la que se trituran las flores debe estar entre 10 °C y 40 °C.

Las flores trituradas se someten después a un tratamiento con radiación láser (etapa c). Como fuente de la radiación láser, se prefiere emplear un láser diódico lineal rojo con una capacidad de generación de armónicos con longitudes de onda en el intervalo de 150 a 810 nm. Más preferiblemente, la longitud de onda de la radiación láser es de 200 a 400 nm y lo más preferible es que sea de 250 nm. La potencia de la radiación láser es preferiblemente de 1 a 60 vatios, más preferiblemente de 10 a 30 vatios y lo más preferible es que sea de 20 vatios. La mancha focal tiene preferiblemente de 1 a 6 mm de diámetro, más preferiblemente de 2 a 5 mm y lo más preferible es que sea de 4 mm. La planta triturada se expone a la radiación láser de modo que se irradie toda o

la mayor parte de la mezcla. Esto se consigue bien desplazando manualmente el generador de láser a lo largo de la planta triturada, o bien haciendo pasar la materia triturada sobre una correa transportadora a lo largo de un conjunto de varios generadores de láser. Preferiblemente, se trata cada kilogramo de materia triturada con la radiación láser durante un periodo de 3 a 10 minutos, más preferiblemente durante un periodo de 5 minutos. Aunque no se descartan temperaturas superiores o inferiores, la temperatura a la que se trata la planta triturada con la radiación láser debe estar entre 10 °C y 40 °C.

La materia tratada con láser se suspende después en agua (etapa d). En esta etapa, se puede emplear cualquier agua mineral comercial. La suspensión se lleva a cabo de modo que haya de 50 a 300 gramos, preferiblemente de 100 a 250 gramos, de la materia tratada con láser por litro de agua. Aunque no se descartan temperaturas superiores o inferiores, la temperatura a la que se suspende en agua la planta triturada debe estar entre 10 °C y 40 °C.

A continuación, la suspensión se deja en reposo durante un periodo de entre 5 a 20 días, preferiblemente de 7 a 15 días, a una temperatura de 2 °C a 10 °C, preferiblemente de 4 °C a 8 °C, de modo que se produzca la maceración de la mezcla (etapa e).

Por último, y después de la etapa de maceración, se lleva a cabo la separación de la fase líquida y la fase sólida (etapa f). Se pueden prensar los sólidos para facilitar la separación. Dicha separación se puede conseguir mediante decantación o, preferiblemente, mediante decantación seguida de filtración. La filtración se lleva a cabo preferiblemente a presión. Lo más

preferible es efectuar tres filtraciones a presión con filtros de 5 μ m, 1 μ m y 0,22 μ m. Aunque no se descartan temperaturas superiores o inferiores, la temperatura a la que la separación se lleva a cabo debe estar entre 10 °C y 40 °C.

Se obtiene finalmente un extracto acuoso de color ocre.

10 El extracto obtenido de este modo se somete a continuación a un procedimiento de aislamiento que comprende la precipitación con metanol, la centrifugación y la separación cromatográfica controlada mediante bioensayo. El bioensayo empleado se realizó *in vitro*
15 mediante adición de las muestras a linfocitos aislados de ratón de acuerdo con la referencia bibliográfica Max W. et al. *Journal of Natural Products*. Vol. 54. no. 6. pp. 1531-1542 (1991). Se controló la incorporación de timidina que indica la replicación del ADN. Esta
20 incorporación es indicativa tanto de un aumento del número de linfocitos como de un aumento de la actividad de dichos linfocitos. Estas técnicas de separación empleadas incluyen la precipitación repetida con etanol, la centrifugación, y la diálisis o la cromatografía en
25 columna.

Así pues, se liofilizaron 112 litros del extracto acuoso obtenido previamente proporcionando 800 g de un polvo de color castaño («PF2»). Este polvo se fraccionó
30 en un residuo soluble en MeOH y otro insoluble en MeOH (PF2R, 350 g) que exhibe actividad de transformación linfocítica. Una porción de este material (80 g) se sometió a precipitación con MeOH, centrifugación, y diálisis o cromatografía en columna Sephadex DEAE lo que
35 produjo el aislamiento de una serie de materiales

cristalinos, que se determinó eran sales inorgánicas inactivas (figura 1).

Una porción de PF2R (270 g) que se sometió a precipitación con MeOH a unas concentraciones finales del 25%, del 50% y del 67% produjo precipitados activos. El material más activo fue el precipitado obtenido en la solución de MeOH al 50% (PF2RS8, 51,2 g, LT = +1059%). El tratamiento de una porción de 5 g de PF2RS8 solubilizado en agua, seguido de la centrifugación, y la separación cromatográfica del sobrenadante en Sephadex G-25, produjo la fracción enriquecida con el polisacárido activo denominada PF2RS8A (0,13 g, LT = +1074%). Posteriormente, se obtuvo una fracción idéntica denominada PF2RS8A' (0,3 g) a partir de una segunda porción (6 g) del precipitado en MeOH al 50%. Tal como se indica en la figura 2, se aislaron una serie de materiales cristalinos y de otras fracciones, aunque ninguno mostró el nivel de actividad LT de la fracción PF2RS8A.

20

La fracción PF2RS8A se caracterizó mediante análisis espectroscópico (^1H -RMN, ^{13}C -RMN, y espectros DEPT) y mediante análisis químico (hidrólisis con TFA y análisis de TLC sobre gel de sílice). Véanse las Figuras 3, 4 y 5.

La mezcla de polisacáridos más activa, PF2RS8A (1,4 g), se aisló a partir del precipitado en MeOH al 50% restante (PF2RS8). Al mismo tiempo, el tratamiento de una porción (2,0 g) de la fracción insoluble en MeOH al 67% (PF2RS9; LT = +735%) produjo el aislamiento de una mezcla de polisacáridos (PF2RS9A, 0,3g) que, mediante análisis ^1H -RMN, se comprobó que era idéntica a la PF2RS8A. Por tanto, se combinaron las fracciones PF2RS9A (0,2 g) y PF2RS8A (1,4 g), y la mezcla, denominada «PF2S8B», se

35

sometió a una separación adicional con Sephadex G-50 (20-30 mm) tal como se muestra en la figura 6. La elución con agua produjo seis fracciones (PF2RS8B1, 2, 3, 4, 5 y 6), de las cuales se demostró, mediante análisis de HPLC, que sólo la fracción principal aislada PF2RS8B2 era homogénea, usando tanto un detector de UV como uno de dispersión de luz por evaporación (figuras 7 y 8). Los análisis espectrales de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN (figuras 9 y 10) mostraron que los espectros de este producto aislado eran muy similares a los obtenidos para PF2RS8A (figuras 3 y 4), lo que implicaba que era el polisacárido principal de la mezcla. La fracción PF2RS8B2 está formada, por tanto, por el polisacárido de fórmula I y agua. Esta última se puede eliminar mediante procedimientos conocidos en la técnica.

El bioensayo de la fracción homogénea aislada PF2RS8B2 y de la mezcla precursora del mismo PF2RS8A en el mismo ensayo mostró actividades de transformación linfocítica (LT) del 6203% y del 3532%, respectivamente (Tabla 1). El elevado nivel de actividad mostrado por la fracción aislada implicaba que este polisacárido es el principal constituyente activo respecto al efecto biológico del presente extracto.

25

Se elucidó la estructura del polisacárido activo PF2RS8B2 (polisacárido de fórmula I) mediante análisis espectroscópico (espectros ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, HMQC y COSY ^1H - ^1H 2D) y mediante análisis químico (hidrólisis con TFA y análisis de TLC sobre gel de sílice). Por tanto, las señales de ^1H -RMN (Figura 9) a δ 5,3 y 3,2 ppm son indicativas de un polisacárido. Las señales de ^{13}C -RMN (Figuras 10-12) a δ 111,9 (d), 110,1 (d) ppm se asignaron a los carbonos anoméricos de α -L-arabinofuranosa con unión 1 $\rightarrow$ 3 y de α -L-arabinofuranosa terminal (indicadas

35

como Araf y Araf' respectivamente). Las señales a δ 106,1 (d) y 105,9 (d) ppm se asignaron a los carbonos anoméricos de β -D-galactopiranososa con unión 1 $\rightarrow$ 6 y de β -D-galactopiranososa con unión 1 $\rightarrow$ 3 y 1 $\rightarrow$ 6 (indicadas como Galp' y Galp respectivamente), mientras que la señal a δ 100,2 (d) ppm se asignó a los carbonos anoméricos de α -L-ramnopiranososa (indicada como Rhap). Las señales de protones anoméricos (H-1) fueron reconocidas fácilmente debido a sus desplazamientos de campo bajo en los espectros ^1H -RMN. La correlación directa entre señales de protón y de carbono 13 observada en el espectro HMQC (Figura 13) determinó que las señales de ^1H -RMN a δ 5,08 (s a), 5,23 (s a), 4,47 (d, J=7,9 Hz), 4,53 (d, J=7,3Hz) y 5,1 (s a) ppm correspondían a los protones anoméricos de α -L-arabinofuranosa (Araf'), α -L-arabinofuranosa (Araf), β -D-galactopiranososa (Galp'), β -D-galactopiranososa (Galp) y α -L-ramnopiranososa (Rhap). Empleando estas señales como referencia, se pueden trazar otras señales de protón analizando los espectros COSY ^1H - ^1H 2D (figuras 14, 15). Análogamente, se definieron las correspondientes señales de carbono mediante espectros HMQC (figuras 13, 16 y Tabla 2). La secuenciación de las unidades monosacáridas se determinó tal como sigue. El desplazamiento de campo bajo de la señal en C-3 de Araf (δ 79,4) y Galp (δ 82,8), y las señales en C-6 de Galp y Galp' (δ 69,2) sugirieron que estos carbonos estaban unidos a otras unidades monosacáridas. La observación de correlaciones a larga distancia entre C-1 de Araf y C-6 de Galp y Galp' en el espectro HMBC (Figura 17) sugirió una estructura de β -D-galactopiranososa con unión 1 $\rightarrow$ 6. La Araf presentaba una unión 1 $\rightarrow$ 3 con Galp a partir de la observación de una correlación a larga distancia entre C-1 de Araf y C-3 de Galp (Figura 18). A partir del espectro ^1H -RMN (Figura 9), se calculó la proporción de monosacáridos de acuerdo con los valores de integración

de los picos de protones anoméricos, que fue para Ara^f:Ara^f':Galp:Galp':Rhap de 3:1:2:2:1. Por tanto, se elucidó la estructura de PF2RS8B2 como un polisacárido de cadena larga ramificada con la estructura primaria mostrada en la fórmula I (esquema I). El esquema II es una representación de la misma estructura que muestra la configuración estereoquímica de los monosacáridos individuales.

10 Para confirmar las identidades de los monosacáridos sustituyentes, se hidrolizó el PF2RS8B2 con TFA (0,5 M, 100-120 °C) y luego se sometió a análisis de TLC (Figura 19). La presencia de los monosacáridos principales, la α-L-arábinofuranosa y la β-D-galactopiranososa, se determinó
15 fácilmente, mientras que la presencia del monosacárido secundario la α-L-ramnopiranososa, se detectó con más dificultad, debido probablemente a la cantidad de hidrolizado aplicado a la placa de TLC.

20 El peso molecular del PF2RS8B2 se estimó mediante cromatografía de filtración en gel (de exclusión molecular). El peso molecular medio del PF2RS8B2 estimado de este modo es de 10.000 (véase la Figura 20).

25 El compuesto polisacárido de fórmula I presenta de un modo inesperado una elevada actividad como inmunoestimulante, como se muestra en el ejemplo que sigue a continuación. El tercer aspecto de la invención se refiere, por tanto, al uso del compuesto polisacárido
30 de fórmula I como agente terapéutico en el tratamiento de enfermedades inmunosupresoras tales como cáncer, tuberculosis, gripe, resfriado común, alergias, lupus eritematoso, psoriasis y SIDA. Ejemplos no limitativos de cánceres son: carcinoma hepático, cáncer de pulmón,
35. cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer

de próstata o adenocarcinoma prostático; cánceres de cerebro tales como astrocitoma y glioblastoma; cáncer de cuello uterino y cáncer de vejiga.

5 El cuarto aspecto de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que incluyen el compuesto polisacárido de fórmula I.

10 El polisacárido de acuerdo con la presente invención se puede administrar bien por separado como una sustancia pura, o bien en forma de preparaciones farmacéuticas, aunque el compuesto de la invención se administra preferiblemente en una combinación. La combinación de fármaco está preferiblemente en forma de
15 una formulación que: (1) contiene el polisacárido de acuerdo con la invención solo; (2) contiene uno o más aglutinantes, vehículos u otros materiales auxiliares adecuados, y (3) puede contener además sustancias terapéuticamente activas adicionales.

20 Los aglutinantes, vehículos u otros materiales auxiliares deben ser farmacéutica y farmacológicamente aceptables, de modo que se puedan combinar con los otros componentes de la formulación o preparación y no
25 produzcan efectos adversos en el organismo tratado.

Las formulaciones incluyen aquellas que son adecuadas para administración oral o parenteral (incluyendo la administración subcutánea, intradérmica,
30 intramuscular e intravenosa), aunque la mejor vía de administración depende del estado del paciente.

Las formulaciones pueden presentarse en forma de dosis sencillas. Las formulaciones se preparan de acuerdo
35 con procedimientos conocidos en el campo de la

farmacología. Las cantidades apropiadas de sustancias activas adecuadas para su administración pueden variar en función del campo terapéutico particular. En general, la concentración de sustancia activa en una formulación de dosis sencilla es del 5% al 95% de la formulación total.

La invención proporcionada por la solicitud se ilustra mediante ejemplos presentados a continuación.

- 10 Ejemplo 1: Preparación de un extracto acuoso de flores de *Calendula officinalis* de acuerdo con el procedimiento de la invención.

Se colocan en un túnel de lavado 500 g de flores de
15 *Calendula officinalis* y se someten a un lavado cuidadoso con agua a aproximadamente 23 °C. Las flores se trituran a continuación usando una máquina de trituración. Los 500 g de materia triturada resultante se someten a un tratamiento con un láser diódico lineal rojo que tiene
20 una capacidad de generación de armónicos con una longitud de onda de 250 nm, una potencia de 20 vatios y una mancha focal de 4 mm de diámetro. El tratamiento se lleva a cabo desplazando manualmente el generador de láser a lo largo de la materia triturada durante 2,5 minutos, de modo que
25 se irradie toda o la mayor parte de la mezcla. La materia tratada con láser se suspende después en 2 litros de agua a una temperatura de aproximadamente 20 °C. A continuación, la suspensión se deja en reposo durante 12 días a una temperatura de 4 °C. Por último, se lleva a
30 cabo la separación de la fase líquida y la fase sólida, en primer lugar, mediante decantación del líquido (los sólidos se prensan para facilitar la separación) y, después, mediante tres filtraciones a presión consecutivas con filtros de 5 µm, 1 µm y 0,22 µm a una
35 temperatura de aproximadamente 20 °C. El procedimiento

proporciona aproximadamente 1,7 litros de una solución (extracto acuoso) de color ocre.

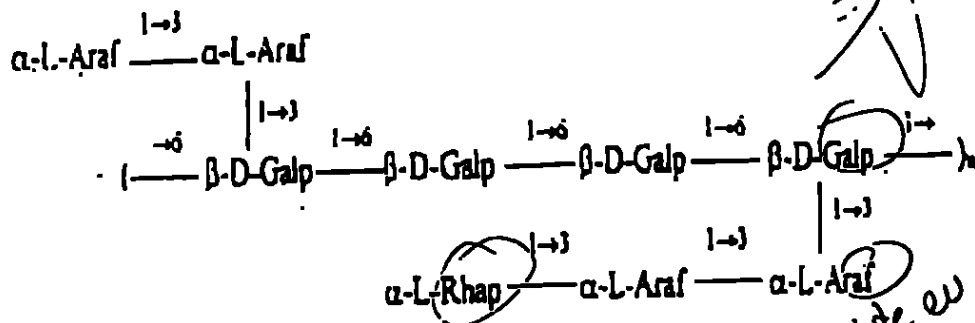
Ejemplo 2: El aislamiento del polisacárido de fórmula I se lleva a cabo tal como se muestra en las páginas 10-12 de la descripción.

Ejemplo-3: El polisacárido de fórmula I se ensayó con el fin de establecer su actividad como inmunoestimulante mediante cuantificación de la actividad de transformación linfocítica (LTA). Por actividad de transformación linfocítica se hace referencia al hecho de que los linfocitos se transforman pasando de un estado inactivo a un estado activo, lo que es necesario para luchar contra determinadas enfermedades mediante un mecanismo inmunológico, o para restablecer el sistema inmune, que puede debilitarse por diferentes factores. Los ensayos se realizaron de acuerdo con la referencia bibliográfica Max. W. et al., *Journal of Natural Products*. vol. 54. no. 6. pp. 1531-1542 (1991), mediante adición *in vitro* de una solución del polisacárido de la invención a linfocitos aislados de ratón. Se controló la incorporación de timidina que indica la replicación del ADN. Esta incorporación es indicativa tanto de un aumento del número de linfocitos como de un aumento de la actividad de dichos linfocitos.

El polisacárido de fórmula I presenta una LTA del +6203% con respecto a linfocitos no estimulados.

REIVINDICACIONES

1. El polisacárido de acuerdo con la fórmula I,



5

en la que n = 7 a 8.

2. El procedimiento para obtener el compuesto definido en la reivindicación 1 que comprende:

- 10 1) separar las flores de la planta Calendula officinalis,
- 2) someterlas al siguiente procedimiento de extracción:
 - a) Descontaminación de las flores
 - b) Trituración de las flores.
 - c) Tratamiento de las flores trituradas con una radiación láser.
 - 15 d) Suspensión de la mezcla obtenida en la etapa c) en agua.
 - e) Maceración de la suspensión obtenida en la etapa d).
 - 20 f) Separación del líquido resultante.

y 3) someter el líquido obtenido en la etapa f) a un procedimiento de aislamiento que comprende la precipitación con metanol, la centrifugación y la
25 separación cromatográfica controladas mediante bioensayo.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la etapa 3) comprende:

- g) Liofilización del líquido obtenido en la etapa f).
- h) Precipitación de la materia liofilizada obtenida en la etapa g) con metanol.
- 5 i) Separación de la fase líquida y la fase sólida.
- j) Precipitación de la fase sólida obtenida en la etapa i) con metanol a unas concentraciones finales del 25%, del 50% y del 67%.
- 10 k) Solubilización en agua del precipitado obtenido en la etapa j) al 50% y al 67%, centrifugación y realización de una separación cromatográfica del sobrenadante.
- l) Identificación de la fracción activa mediante bioensayo.
- 15 m) Realización de una segunda separación cromatográfica de la fracción activa.
- n) Identificación de la fracción activa mediante bioensayo.
- o) Eliminación del eluyente.
- 20
4. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 2 y 3, en el que el tratamiento con la radiación láser se lleva a cabo con un láser diódico lineal rojo que tiene una capacidad de generación de armónicos con longitudes de onda en el intervalo de 150 a 810 nm, una potencia de 1 a 60 vatios y una mancha focal de 1 a 5 mm de diámetro.
- 25
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la longitud de onda está en el intervalo de 200 a 400 nm, siendo preferiblemente de 250 nm, la potencia es de 20 vatios y la mancha focal es de 4 mm de diámetro.
- 30
6. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que se trata cada 35 kilogramo de materia triturada con la radiación láser

durante un periodo de 3 a 10 minutos, preferiblemente durante un periodo de 5 minutos.

7 ^{Añadido} El compuesto definido en la reivindicación 1 para su uso como agente terapéutico.

8 El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de enfermedades inmunosupresoras.

10 9 El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de enfermedades inmunosupresoras tales como cáncer, tuberculosis, gripe, resfriado común, alergias, lupus eritematoso, psoriasis y SIDA.

15 10 El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de: carcinoma hepático, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata o adenocarcinoma prostático; 20 cánceres de cerebro tales como astrocitoma y glioblastoma; cáncer de cuello uterino y cáncer de vejiga.

11 El uso del compuesto definido en la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento.

12 El uso de acuerdo con la reivindicación 11 para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de enfermedades inmunosupresoras.

30 13 El uso de acuerdo con la reivindicación 12 para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de: cáncer, tuberculosis, gripe, resfriado común, alergias, lupus eritematoso, psoriasis y SIDA.

35

14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13 para la
fabricación de un medicamento destinado al tratamiento
de: carcinoma hepático, cáncer de pulmón, cáncer de
riñón, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de
5 próstata o adenocarcinoma prostático; cánceres de cerebro
tales como astrocitoma y glioblastoma; cáncer de cuello
uterino y cáncer de vejiga.

15. Una preparación farmacéutica que incluyen un
10 compuesto de acuerdo con la reivindicación 1.

16. La preparación farmacéutica de acuerdo con la
reivindicación 15 que incluye además un vehículo
farmacéuticamente aceptable.

15

17. La preparación farmacéutica de las reivindicaciones
15 y 16 que incluye además al menos otro compuesto
farmacéuticamente activo.

**COMPUESTO POLISACÁRIDO
CON ACTIVIDAD INMUNOESTIMULANTE**

RESUMEN

La presente invención se refiere a compuestos polisacáridos de fórmula I que presentan actividad inmunoestimulante, a procedimientos para prepararlos, al uso de los mismos en enfermedades inmunosupresoras y a composiciones farmacéuticas que los contienen.

Formula I,
en la que $n = 7$ a 8

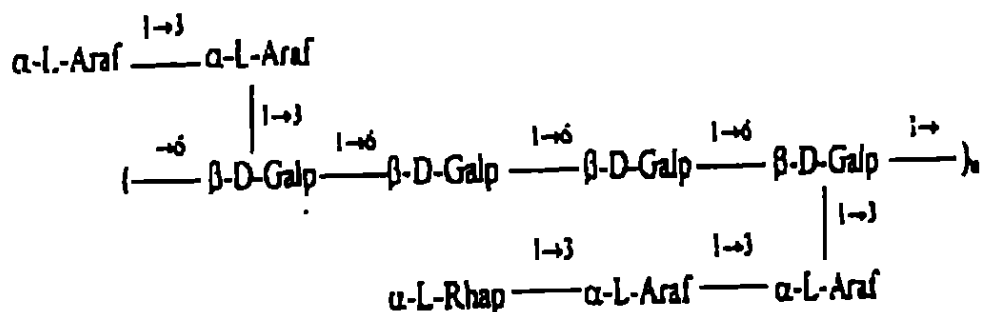
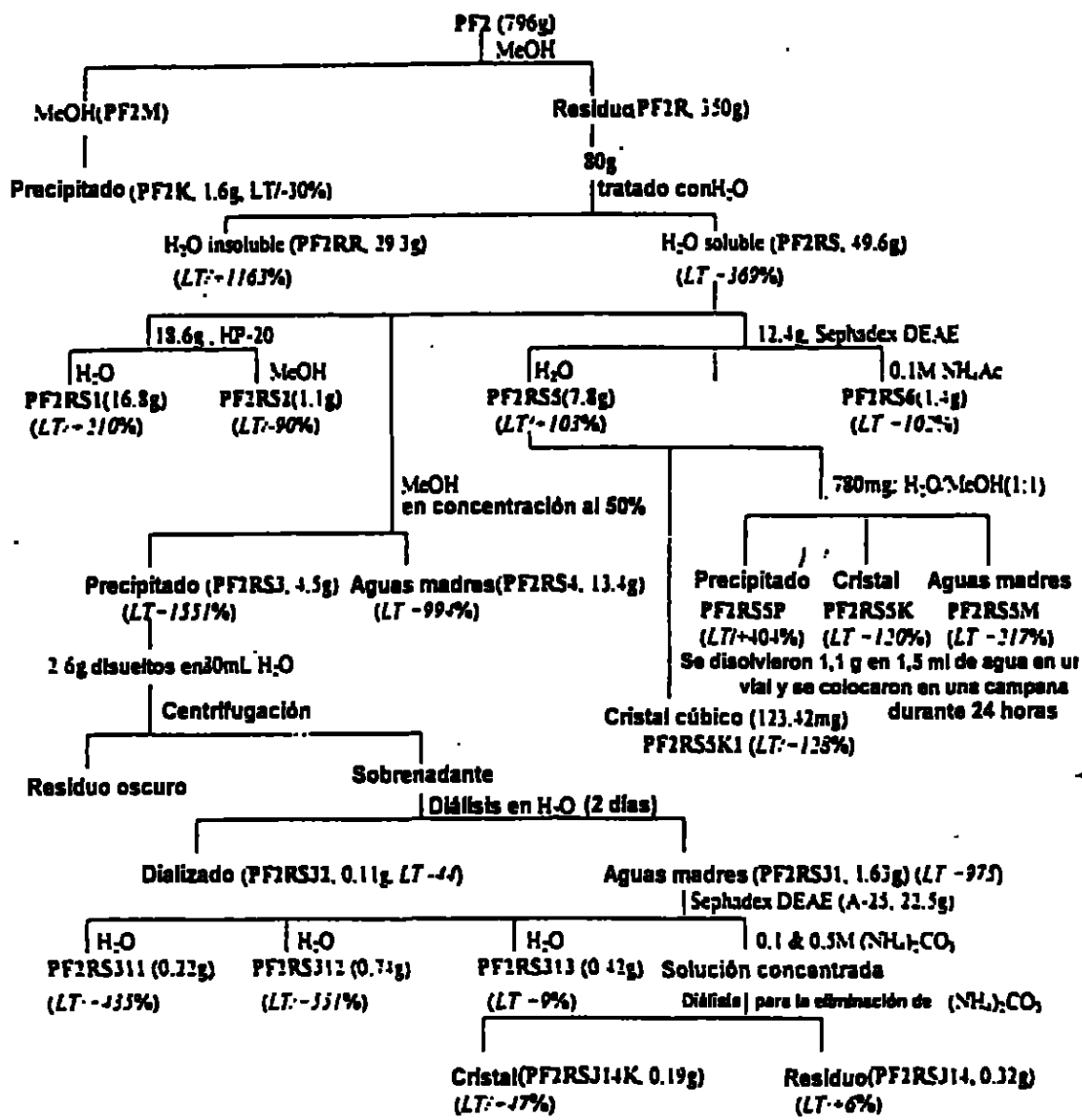
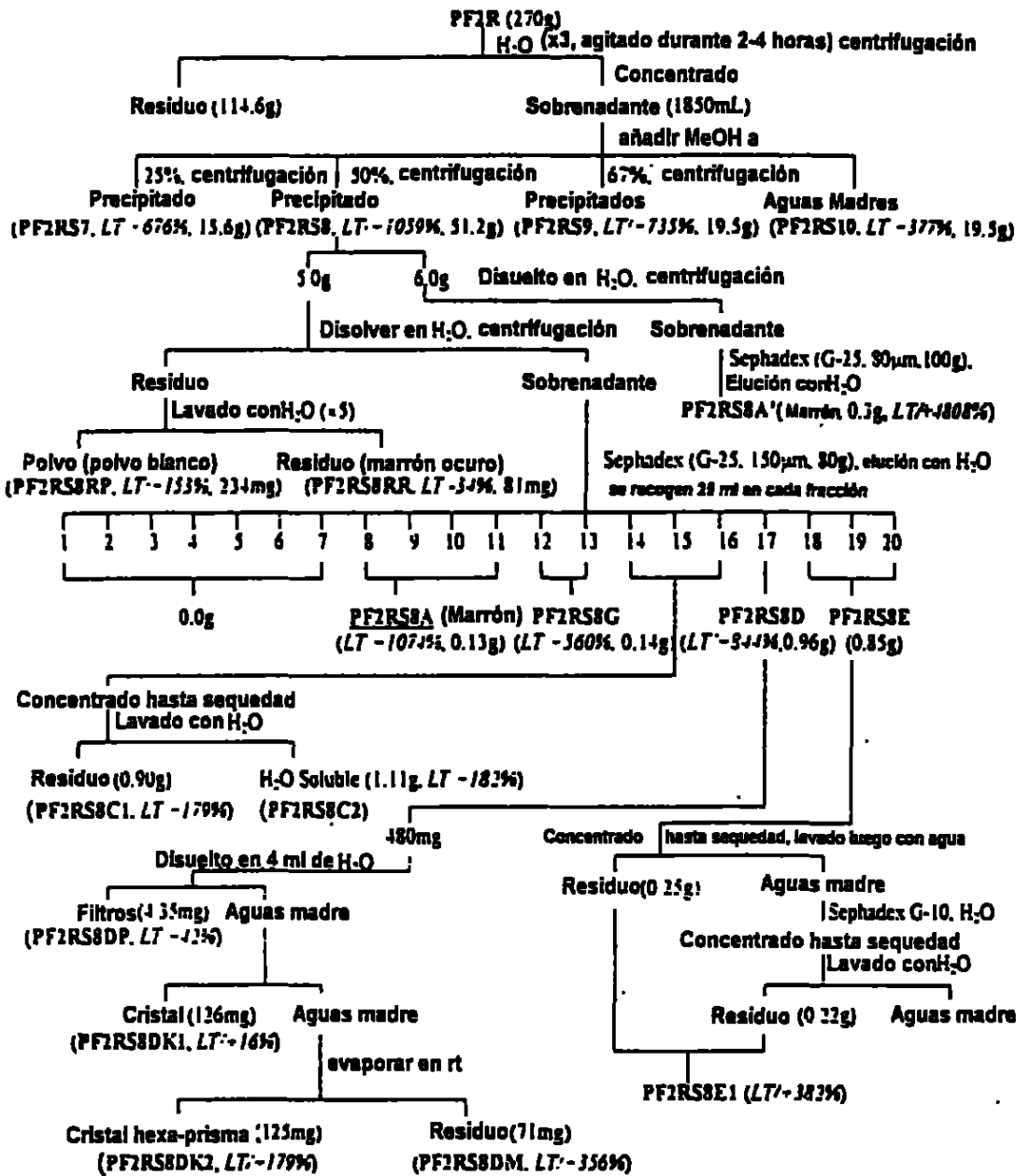


Figura 1. Aislamiento fitoquímico controlado por la bioactividad para PF2



5 LT: Transformación linfocítica

Figura 2. Aislamiento fitoquímico controlado por la bioactividad para PFR2



5

LT: Transformación linfocítica

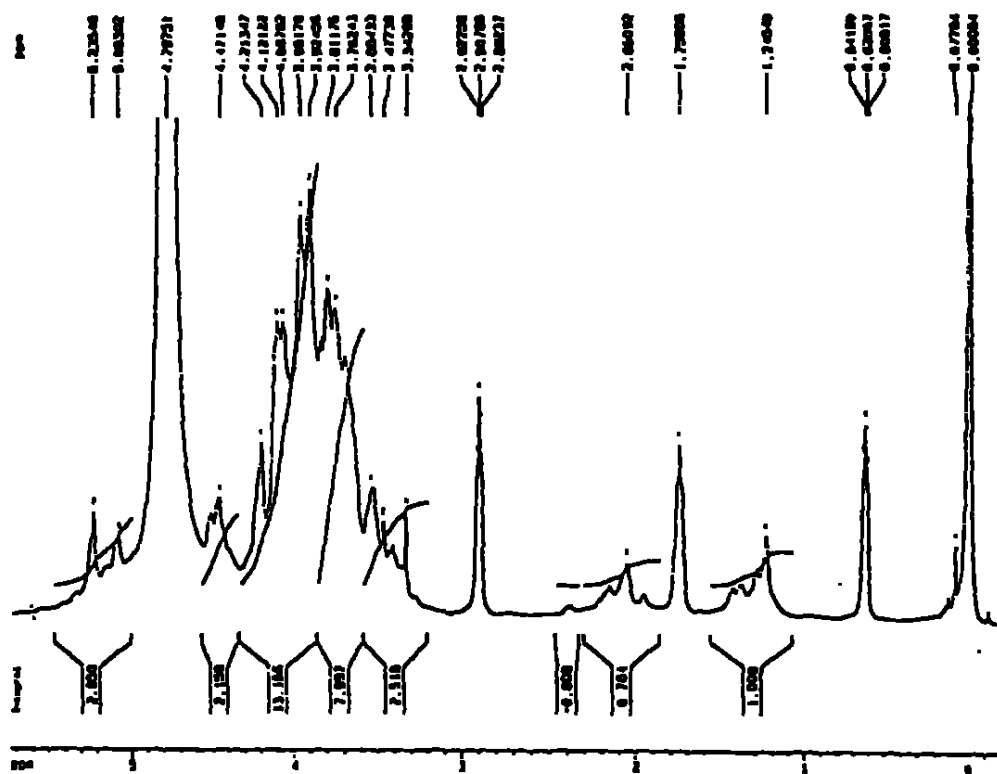


Figura 3. Espectro ^1H -RMN de PF2RS8A (500 MHz, D_2O , referido a DSS)

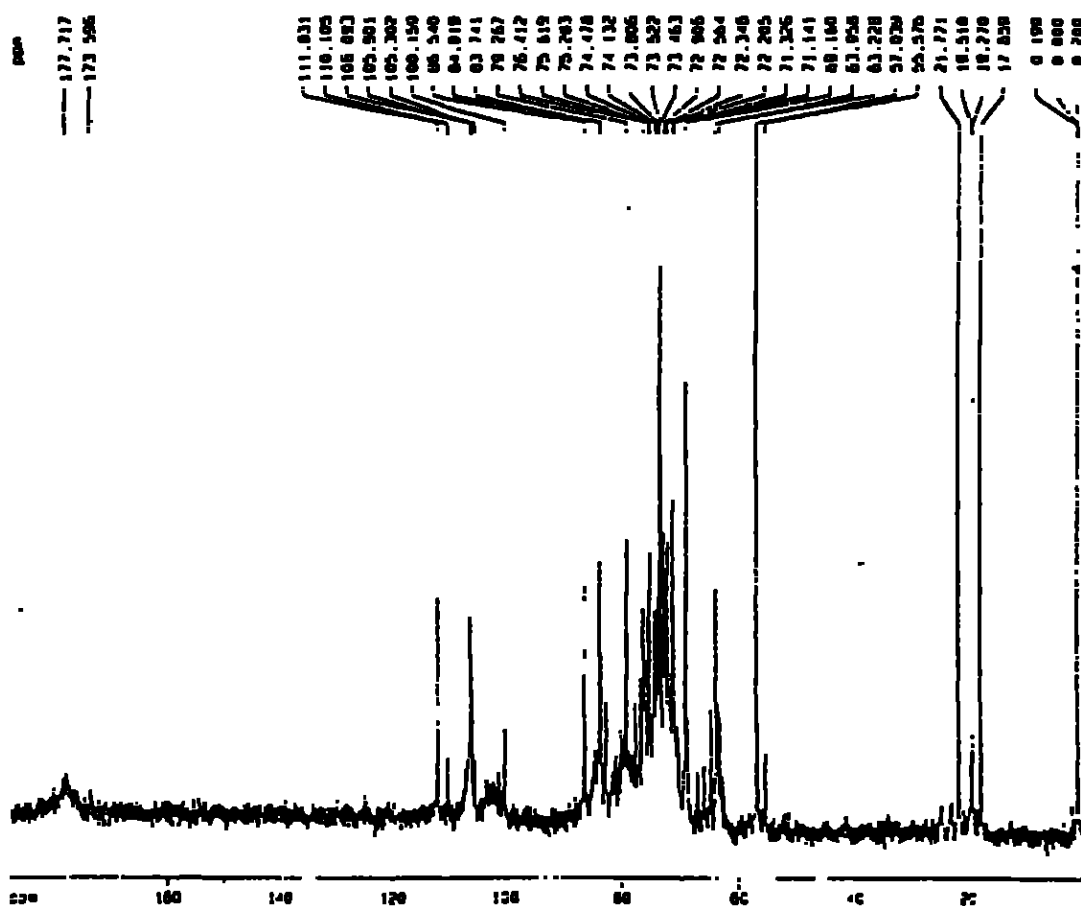


Figura 4. Espectro ^{13}C -RMN de PF2RS8A (125 MHz, D_2O , referido a DSS)



Figura 5. TLC de los productos de hidrólisis de PF2RS8A
5 con TFA y otros monosacáridos.

1. Galactosa; 2. Ramnosa; 3. Productos de hidrólisis de
PF2RS8A; 4. Fructosa; 5. Xilosa; 6. Glucosa

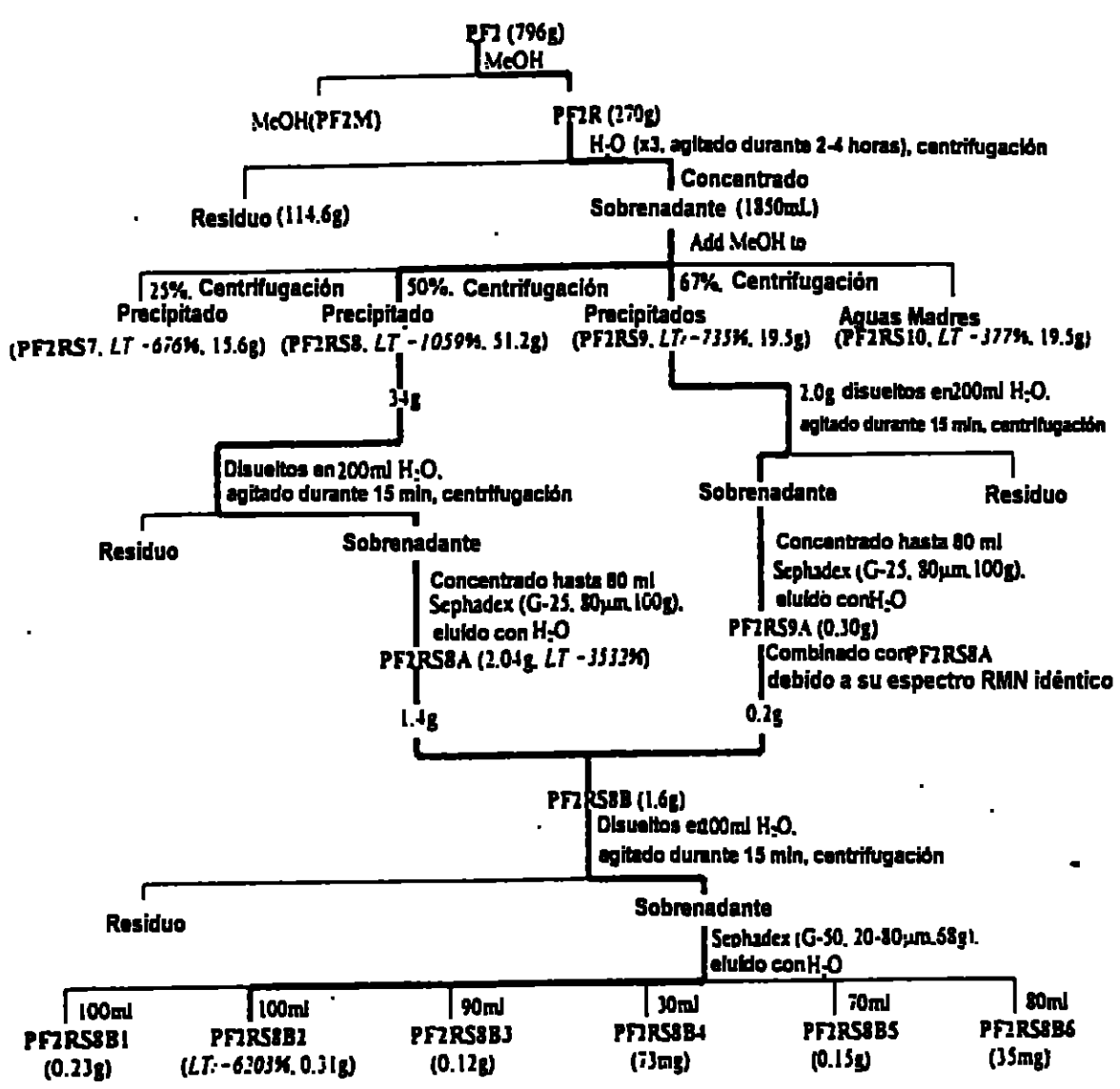


Figura 6. Aislamiento fitoquímico controlado por la bioactividad del polisacárido activo

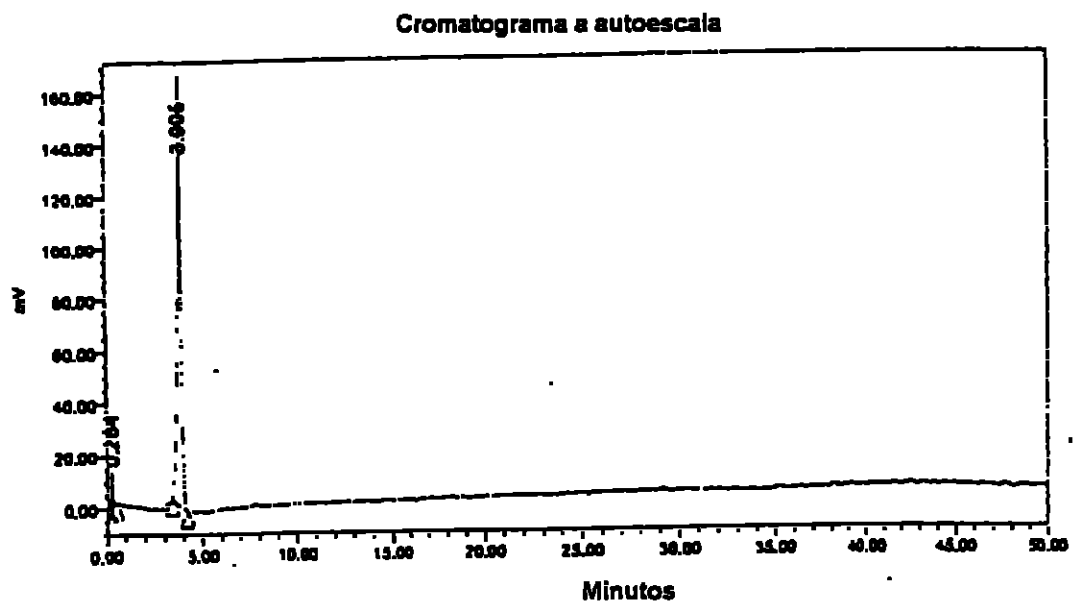
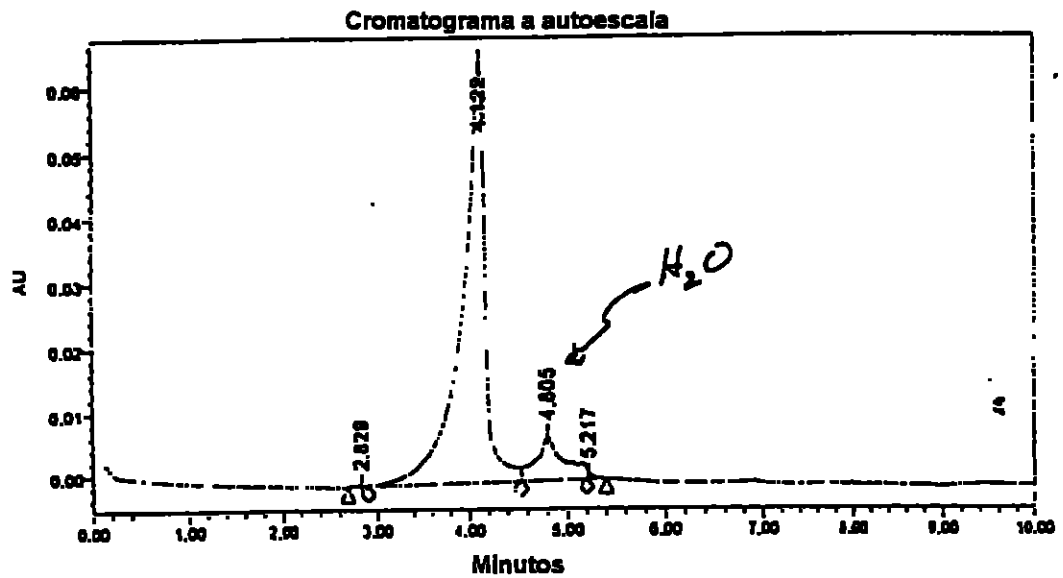


Figura 7. Perfil HPLC de PF2RS8B2 con un detector de dispersión de luz por evaporación (Watrex GMB 250x8 mm, 5 μ m, 1,0 ml/min, H₂O)



5

Figura 8. Perfil HPLC de PF2RS8B2 con un detector fotodiódico de UV (Watrex GMB 250x8 mm, 5 μ m, 1,0 ml/min, H₂O)

10

37

37

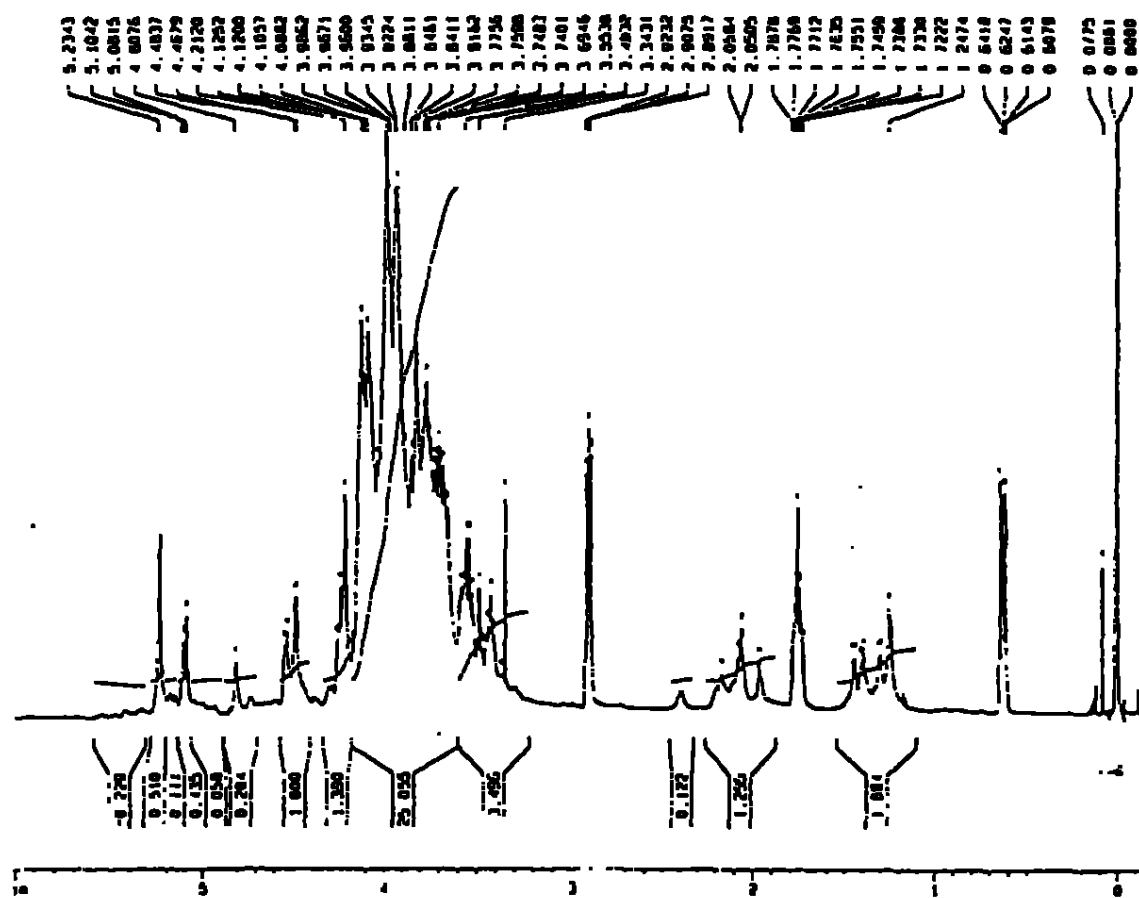


Figura 9. Espectro ^1H -RMN de PF2RS8B2 (500 MHz, D_2O , δ referido a DSS)

Tabla 1. Efecto de las muestras PF2RS8A y PF2RS8B2 sobre la transformación linfocítica (ratón SMC hembra)

Concentración de Compuesto	Muestra							
	No ConA				No ConA			
	PF2RS8A		PF2RS8B					
	Media $\pm$ SD	%	Media $\pm$ SD	%	Media $\pm$ SD	%	Media $\pm$ SD	%
0	193 $\pm$ 31	0	197 $\pm$ 31	0				
0,01	311 $\pm$ 41	+91	205 $\pm$ 49	+24				
0,1	371 $\pm$ 51	+127	361 $\pm$ 76	+83				
1	556 $\pm$ 28	+237	694 $\pm$ 48	+223				
10	3829 $\pm$ 330	+2220	2349 $\pm$ 305	+1092				
100	5993 $\pm$ 1760	+3532	12417 $\pm$ 3153	+52032				
Con A 5 μ g/ml	1762 $\pm$ 349		1507 $\pm$ 250					

33

33

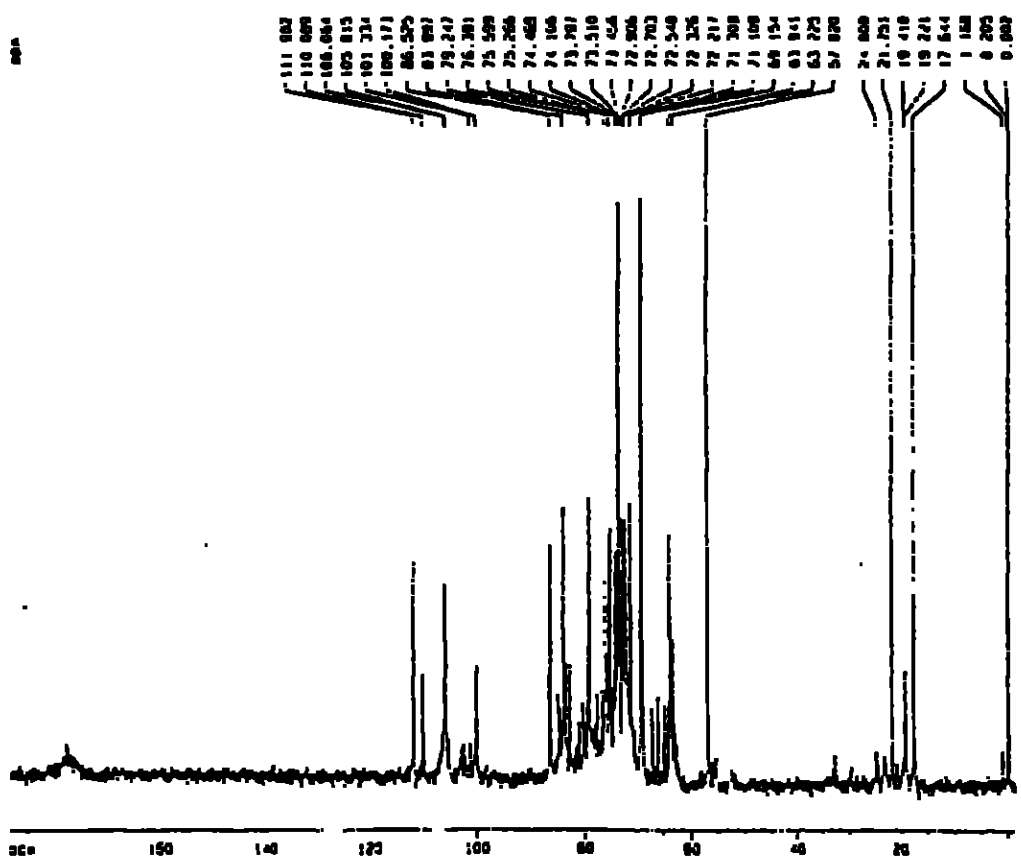


Figura 10. Espectro ^{13}C -RMN de PF2RS8B2 (125 MHz, D_2O , referido a DSS)

34.

34

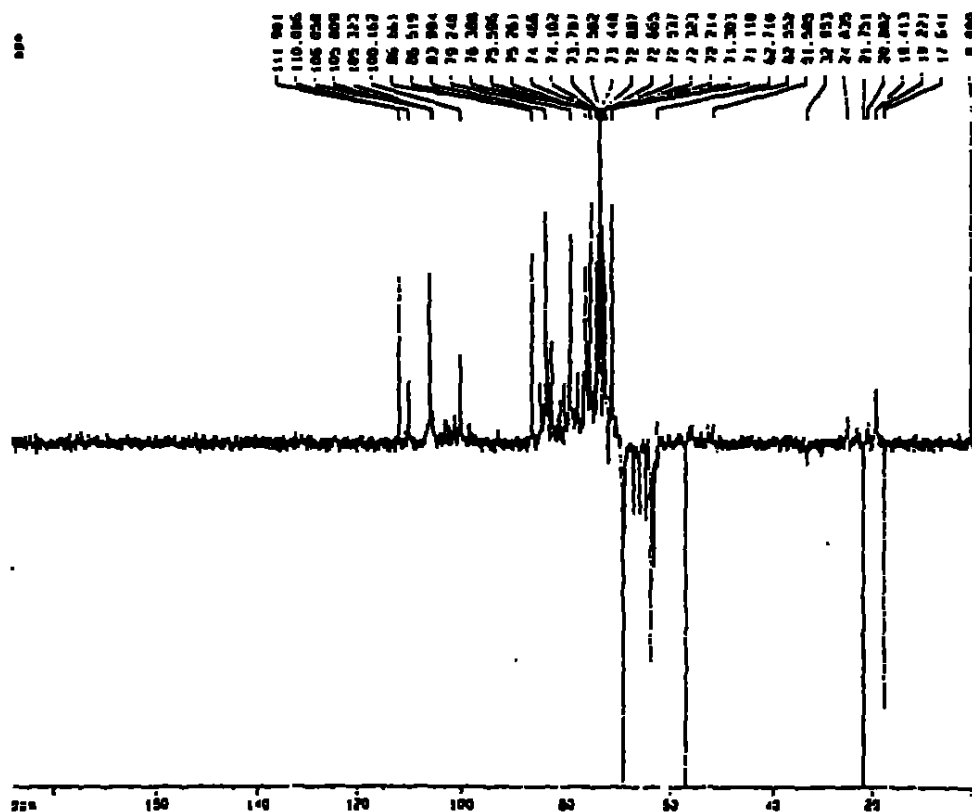


Figura 11. Espectro DEPT-135 de PF2RS8B2 (125 MHz, D₂O, 5 referido a DSS)

35

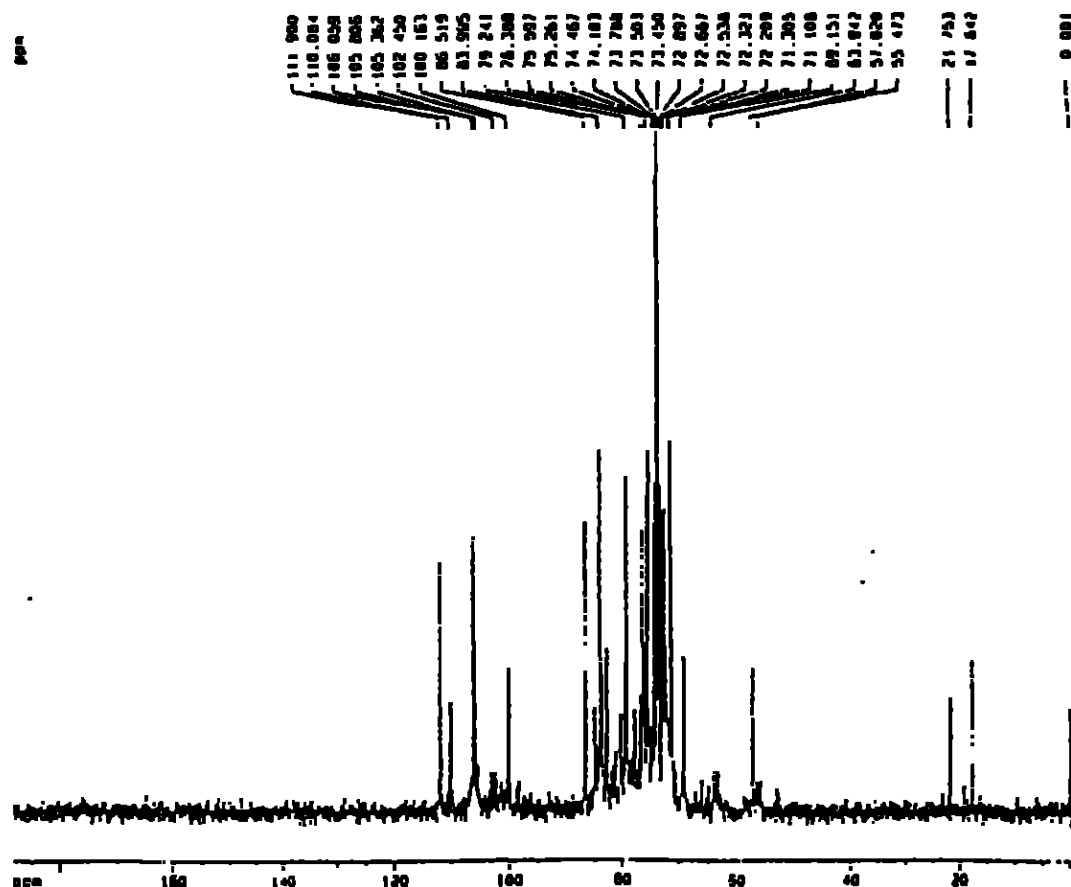


Figura 12. Espectro DEPT-90 de PF2RS8B2 (125 MHz, D₂O, referido a DSS)

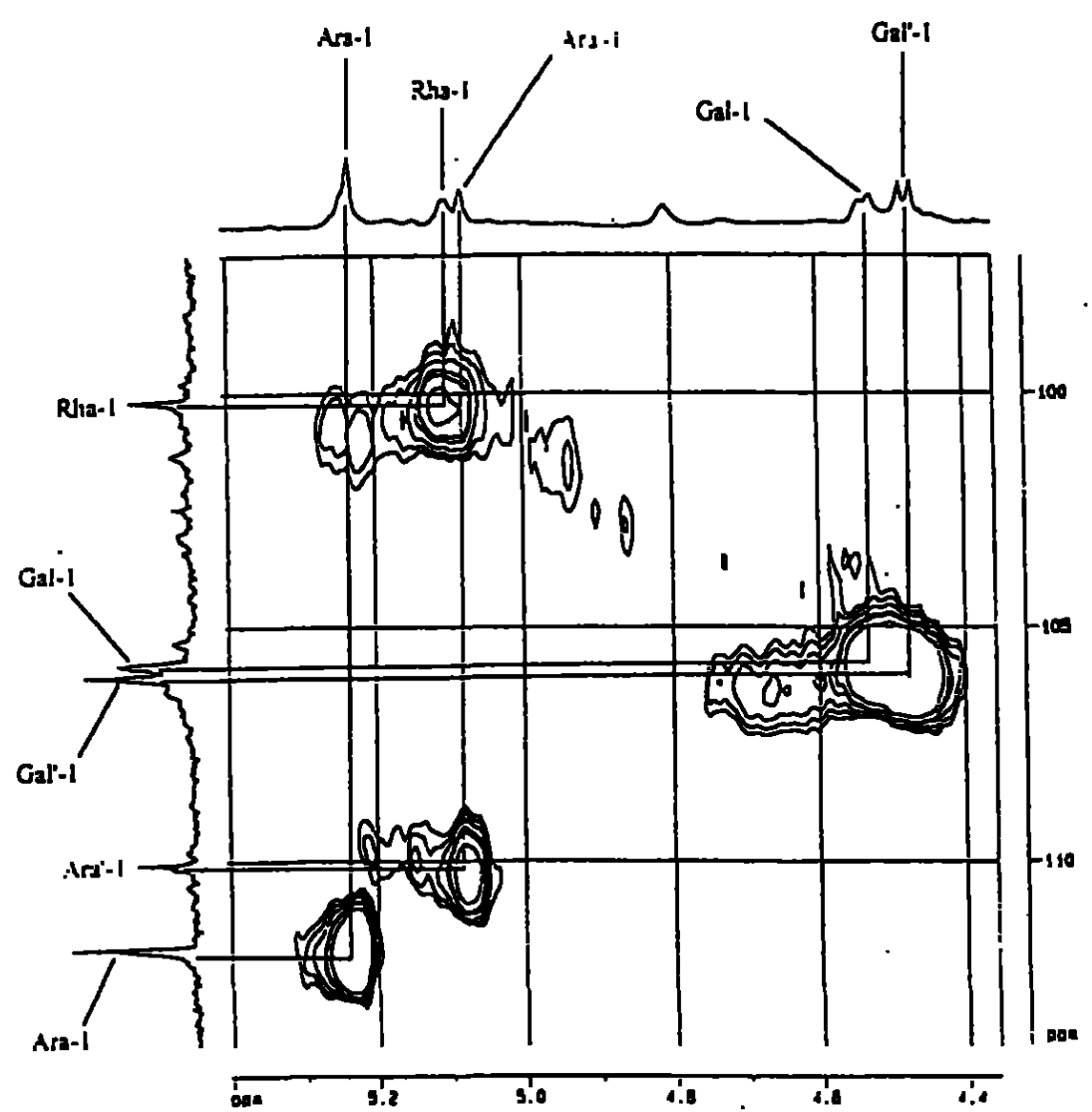


Figura 13. Espectro HMQC de PF2RS8B2 (500 MHz, D₂O)

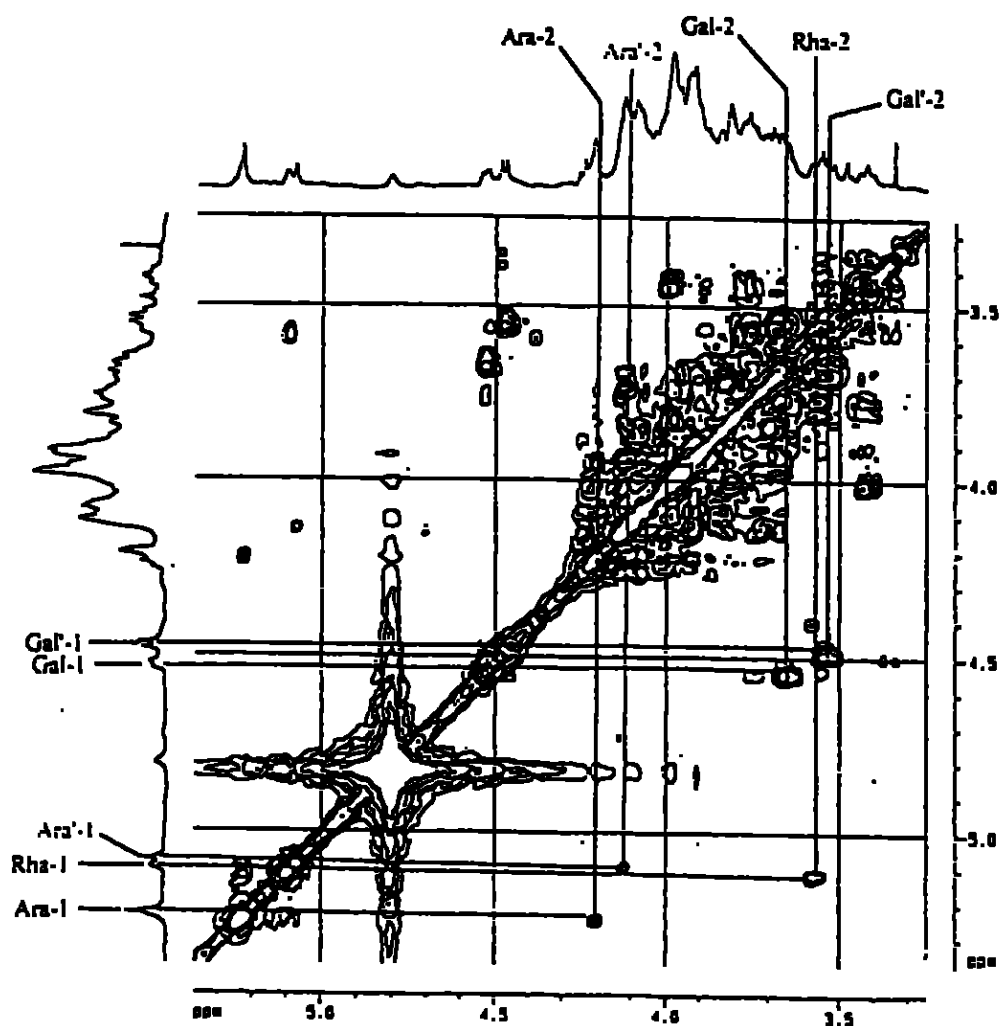


Figura 14. Espectro COSY ^1H - ^1H de PF2RS8B2 (500 MHz, D_2O)

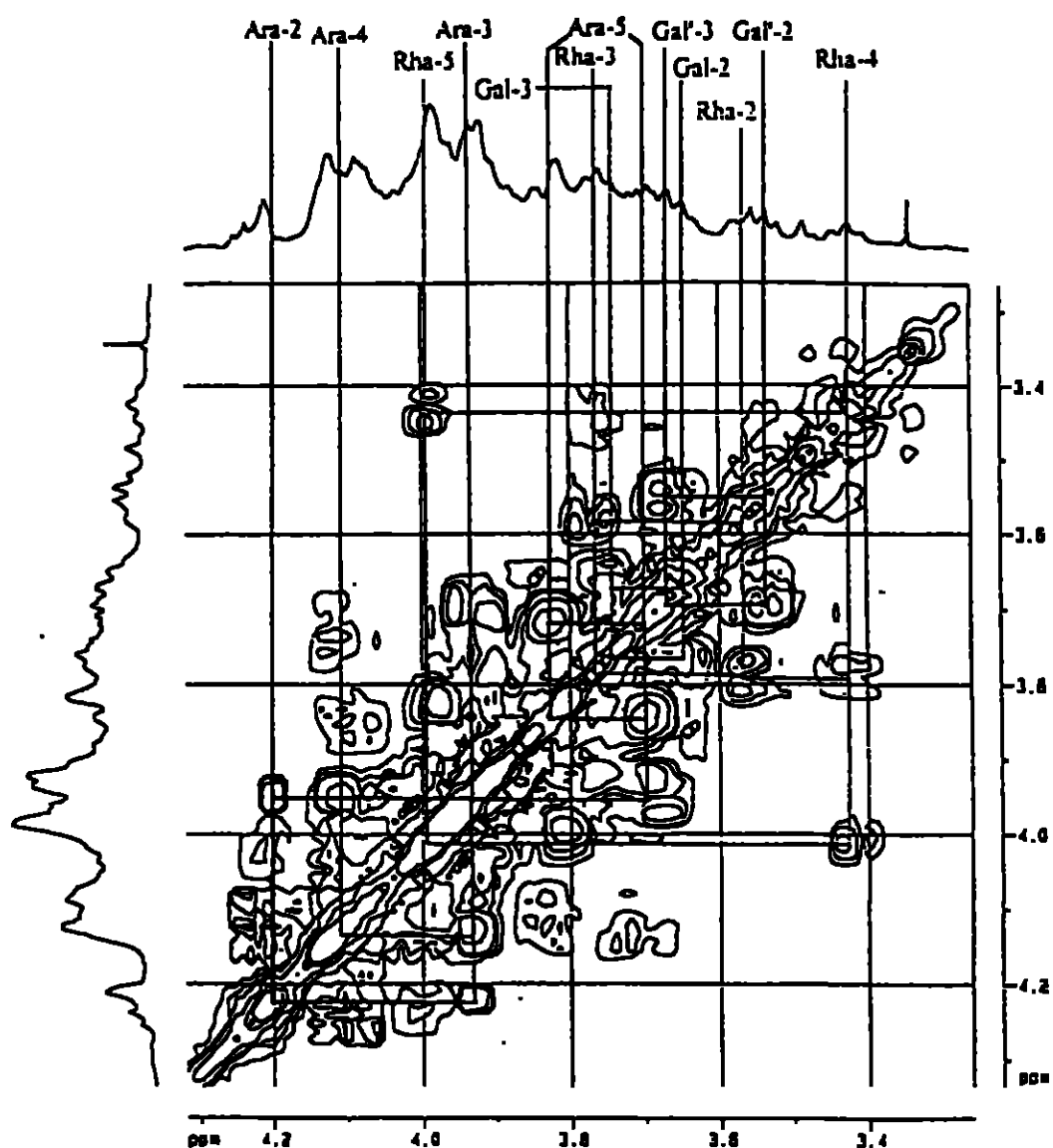


Figura 15. Espectro COSY ^1H - ^1H de PF2RS8B2 (500 MHz, D_2O)

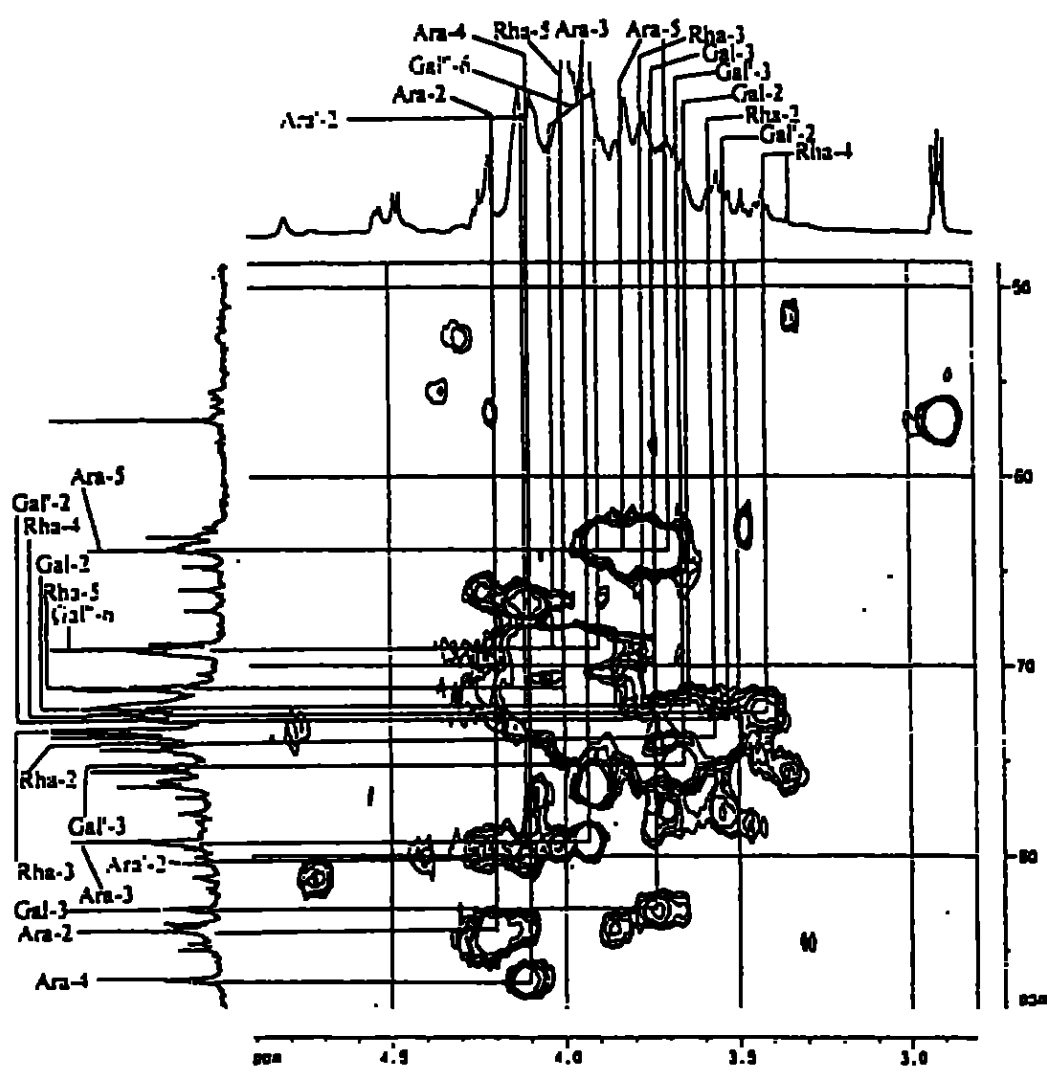


Figura 16. Espectro HMQC de PF2RS8B2 (500 MHz, D₂O)

70

Tabla 2. Datos de ¹³C-RMN de PF2RS8B2 (D₂O, referido a DSS, 125 MHz)

Uniones monosacáridos	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Araf-(1→	110,1d	85,0d	74,5 d	86,7d	63,2t	-
→3)-Araf-(1→		84,7d				
	111,9d	84,0d	79,4d	86,5d	63,9t	-
		83,9d			63,7t	
		83,7d			64,8t	
→6)-Galp-(1→	106,1d	72,9d	75,3d	72,2d	76,4d	69,2t
→3) /	105,9d	73,5d	82,8d	73,5d	76,1d	69,2t
Galp-(1→	105,8d					
→6) /						
Rhap-(1→	100,2d	72,2d	73,5d	72,5d	71,1d	19,2q

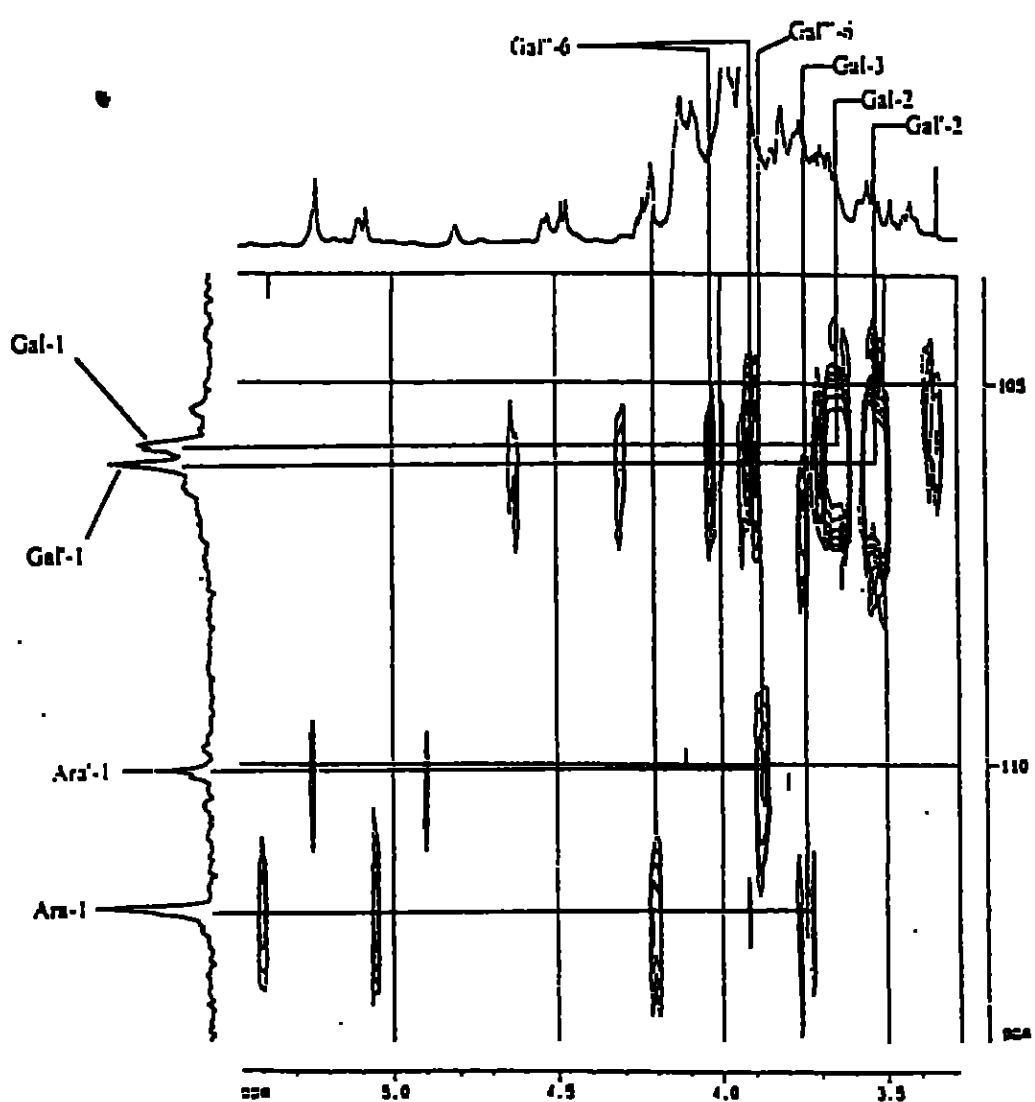


Figura 17. Espectro HMBC de PF2RS8B2 (500 MHz, D₂O)

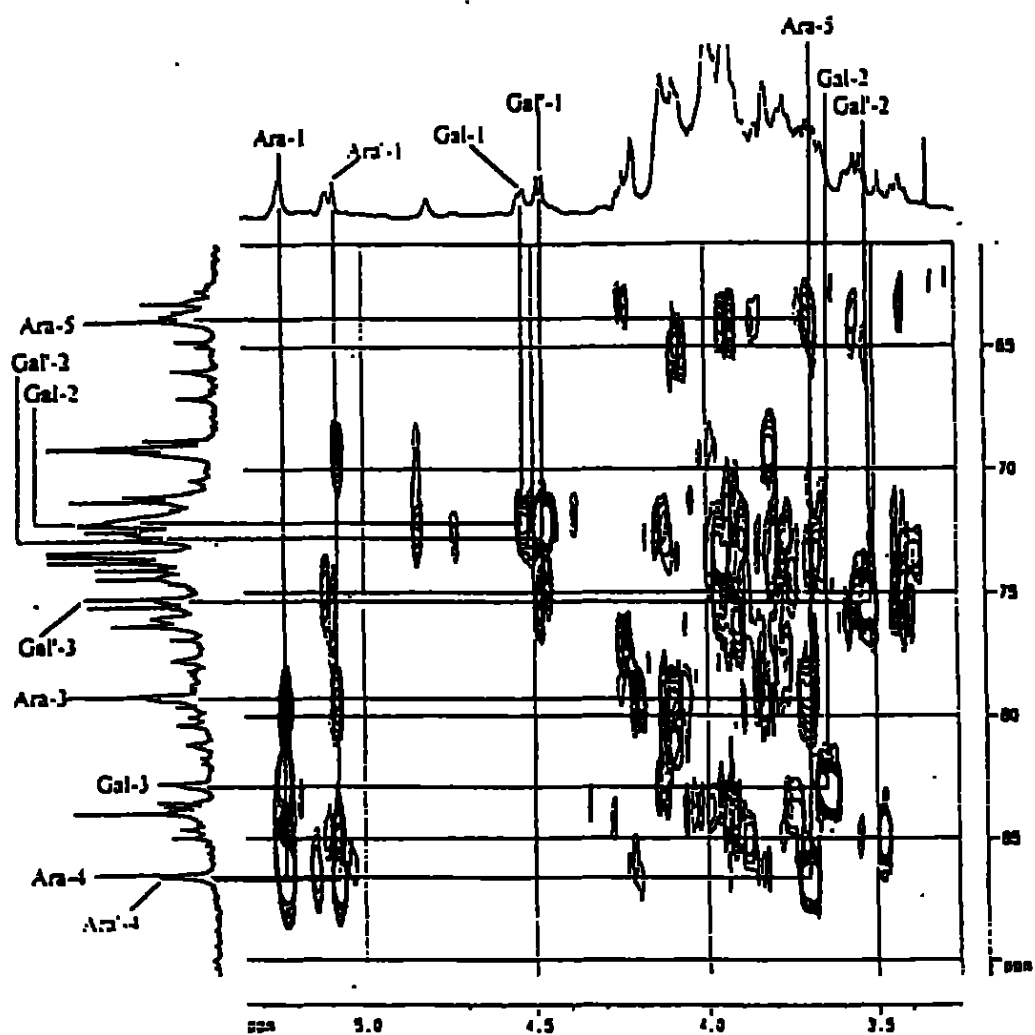


Figura 18. Espectro HMBC de PF2RS8B2 (300 MHz, D₂O)

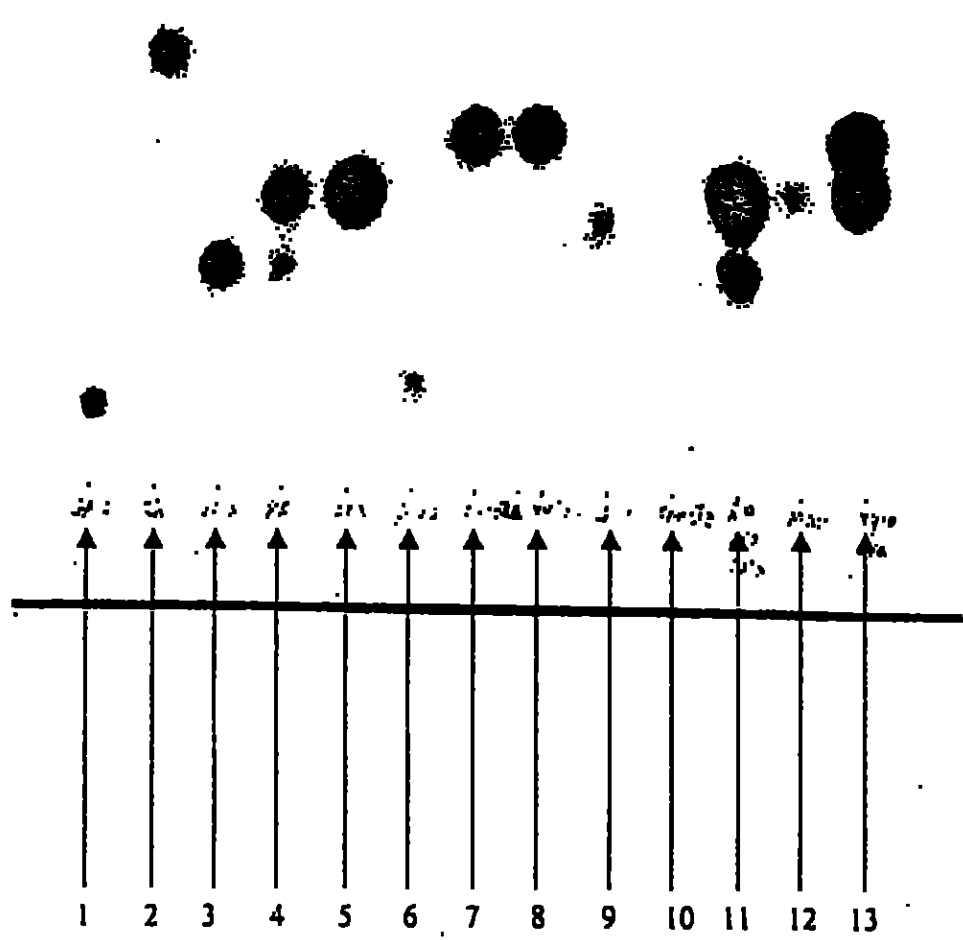


Figura 19. TLC de los productos de hidrólisis de PF2RS8B2 con TFA y otros monosacáridos.

1. Ácido D-galacturónico; 2. L-(+)Ramnosa; 3. D-(+)Galactosa; 4. Productos de hidrólisis de PF2RS8B2; 5. L-(+)Arabinosa; 6. Ácido D-glucurónico; 7. L-(-)Fucosa; 10 8. D-(+)Xilosa; 9. D-(+)Glucosa; 10. D-(-)Fructosa; 11. Mezcla de productos de hidrólisis de PF2RS8B2, L-(+)Arabinosa y D-(+)Galactosa; 12. D-(+)Manosa; 13. Mezcla de D-(+)Xilosa y L-(+)Arabinosa

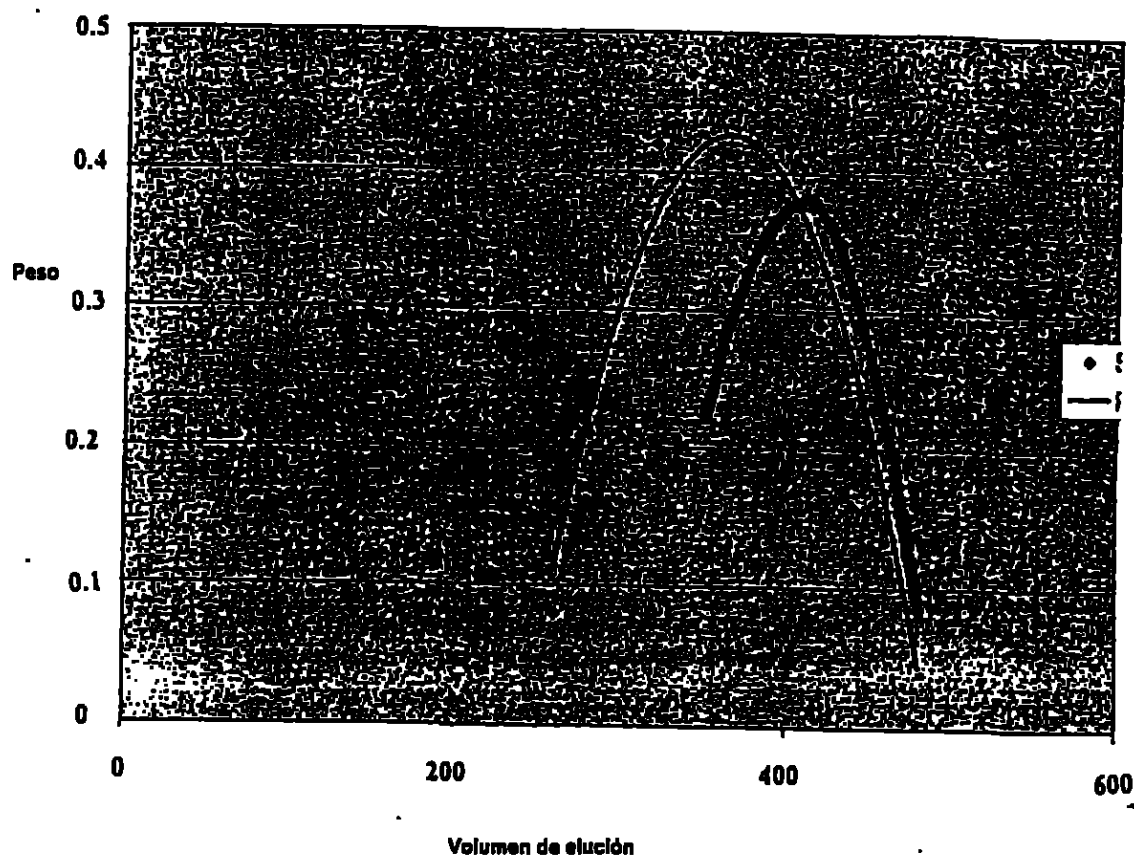


Figura 20. Medida de los pesos moleculares de PF2RS8B2 by
5 usando Shephadex G-50

— Dextrano 10500 estándar

PF2RS8B2

(ordenadas: peso; abscisas: vol. Eluyente)

PF2RS8B2 peso molecular inferior a 10500



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 - 74.215
FECHA : NOVIEMBRE 26 DE 2001

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	8478742	26/11/2001	27.589.880.00

C O N C E P T O

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	356.640.00
		TOTAL :	\$ 356.640.00

SON: TRESCIENTOS CINCUENTA Y SEIS MIL SEISCIENTOS CUARENTA PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

Bole 13059-801-001-0

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

46



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

NIT : 900176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 - 70,790
FECHA : NOVIEMBRE 9 DE 2001

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	05000110-6	0478740	09/11/2001	29,531,120.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	02 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NU	100,000.00
	TOTAL :	\$ 100,000.00

SON: CIENTO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

Bole 13059-B01-001-0

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@slc.gov.co
www.slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION []		
MODELO DE UTILIDAD []		
• Indicación de que se solicita la concesión de una patente	[]	[]
• Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	[]	[]
• Descripción de la invención	[]	[]
• Dibujos de ser estos pertinentes	[]	[]
• Comprobante de Pago de las tasas establecidas	[]	[]
COMPLETA []		
INCOMPLETA	[]	[]

DISEÑO INDUSTRIAL []		
• Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	[]	[]
• Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	[]	[]
• Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño.	[]	[]
• Comprobante de pago de las tasas establecidas.	[]	[]
COMPLETA []		
INCOMPLETA	[]	[]

ESQUEMA DE TRAZADO []		
• Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de trazado.	[]	[]
• Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	[]	[]
• Representación gráfica del esquema de trazado	[]	[]
• Comprobante de pago de las tasas establecidas.	[]	[]
COMPLETA []		
INCOMPLETA	[]	[]


Firma Responsable

Fecha:

Forma 13-92 27.03.1994 210022.0000
Controlador 147 08 40
60 52 20 e-mail: mte@superind.com
Dpto. I.D. C. - 147 08 40

Folio 46

2020
Bogotá, D. C.

Doctor
EMILIO FERRERO

Oficio No. **08726**

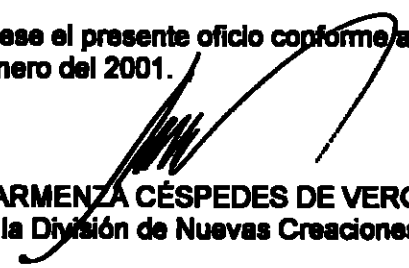
REFERENCIA: Radicación 01-101338
Trámite 002
Evento 001
Actuación 430
Folios 001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que:

- Debe allegar copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente otorgado por el inventor al solicitante o a su causante (art. 26-k, Dec 486/2000).
- Enviar el poder otorgado al abogado que aparece en la solicitud como apoderado, con el lleno de los requisitos exigidos en el Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante.
- Se recuerda al interesado que el formulario de solicitud debe diligenciarse en su totalidad, y que la modalidad de la solicitud hace parte integral del mismo, razón por la cual debe confirmar a qué modalidad se refiere la presente solicitud.

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486, en concordancia con el artículo 85 de la misma decisión, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el artículo 8 de la Resolución 210 del 15 de enero del 2001.

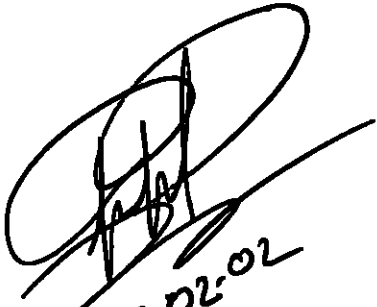

ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 21 FEB. 2002

Se recuerda al interesado que debe presentar, dentro de los dieciséis meses siguientes contados a partir de la fecha de presentación de la solicitud cuya prioridad se invoca, copia de la misma certificada por la autoridad que la expidió y, en los casos en que haya lugar, la traducción simple del capítulo reivindicatorio. El incumplimiento de éste plazo, acarreará la pérdida de la prioridad invocada.

202027

Carrera 13 N° 27-00 Piso 5° y 10°
Conmutador 334 1221-2-3-4
Fax 281 3125
Santafé de Bogotá, D.C. - Colombia


2702-02

08780