

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 466**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/22** (2015.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2009 E 09162954 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015 EP 2263681**

54 Título: **Separación y formulación de fracción bioactiva y trabajo de subfracción de orina de camello como agente anticáncer**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.10.2015**

73 Titular/es:

**KHORSHID, FATIN A. (100.0%)  
King Abdulaziz University, KAU, P.O. Box 80215  
21589 Jeddah, SA**

72 Inventor/es:

**KHORSHID, FATIN A.**

74 Agente/Representante:

**LLAGOSTERA SOTO, María Del Carmen**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 547 466 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**Descripción**

Separación y formulación de fracción bioactiva y trabajo de subfracción de orina de camello como agente anticáncer.

5

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION****1. CAMPO DE LA INVENCION**

10 La presente invención se refiere a un uso absolutamente novedoso de la orina de camello con fines medicinales y también se refiere a la preparación de la misma por liofilización como un medicamento llamado PM701 o fraccionar el mismo en fracciones activas que se codifican como PMF y PMFK. Más específicamente, la presente invención se refiere a aislar la fracción bioactiva PMF y la subfracción PMFK más eficaz a partir de PM701 liofilizado del camello árabe de una sola joroba adulto, especie *Camelus dromedarius* y el uso absolutamente nuevo de estas fracciones bioactivas como un agente selectivo anti-cáncer. El fraccionamiento estará implicado en la reducción de la dosis de la orina liofilizada completa y en el incremento de su eficacia. La invención se refiere también a la preparación de una nueva composición farmacéutica (cápsulas, jarabe, pomada y gel .... etc.) que comprende una cantidad eficaz de la fracción bio-activa PMF o de la subfracción bioactiva en una composición de 435 mg por cada cápsula o una cucharadita con un intervalo de 7 o 5 cápsulas o cucharadita / día respectivamente, que están dirigidas a los tejidos cancerosos humanos a través de sus actividades anti-proliferativas y apoptóticas sin dañar a los otros tejidos normales.

25

**2. DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA**

Los cánceres son proliferaciones celulares no controladas como resultado de la acumulación de cambios genéticos en las células dotadas de potencial proliferativo. Después de un período de latencia variable durante el cual son clínicamente silentes, las células malignas progresan a estadios invasivos y metastásicos agresivos con la formación de tumores y la difusión muy extendida por todo el cuerpo.

30

A pesar de los importantes avances en el tratamiento, el cáncer todavía representa el 28% de las muertes en los países occidentales, y un porcentaje superior en otros países. El tratamiento del cáncer se ha basado principalmente en la cirugía, la quimioterapia, la radioterapia y, más recientemente, la inmunoterapia. Sin embargo, para los tipos más frecuentes de cáncer (pulmón, mama, colorrectales y leucemias) no se ha logrado la remisión y curación completas. Por lo tanto, el desarrollo de nuevos enfoques para el tratamiento de pacientes con cáncer es altamente deseable y críticamente necesario especialmente para aquellos pacientes cuya enfermedad ha progresado a una etapa metastásica y son refractarios a la quimioterapia estándar.

35

40

La organización mundial de la salud publicó que el cáncer es la principal causa de muerte en el mundo. De un total de 58 millones de muertes en todo el mundo en el año 2005, el cáncer representó 7,6 millones (o un 13%) del total de muertes, en 2005 el cáncer mató aproximadamente a 12,000 personas en Arabia Saudita, tal como se muestra en la FIG. 1, en que 8,000 de esas personas eran menores de 70 años.

45

En la Medicina del Profeta Mohamed (la paz sea con él), se sugiere beber la orina de camello para mejorar algunos de los síntomas asociados principalmente con la formación de tumores en el cuerpo. Por lo tanto, la orina de camello se ha venido utilizando en el mundo islámico y árabe, vendida y distribuida en botellas de diferentes tamaños. Pero nunca se ha demostrado científicamente. El solicitante considera que merece la pena observar este tema científicamente y definir su valor a través de ensayos in vitro e in vivo. El solicitante ha desarrollado una curiosidad al respecto y formuló una serie de preguntas: ¿Qué posible importancia puede tener la orina de camello? ¿El componente de la orina de camello está teniendo alguna actividad en la formación del tumor en sí o en algunas de sus partes? ¿La orina fresca tiene efectos sobre los tejidos cancerosos humanos? ¿Se podría formular esta orina en una forma conveniente para uso humano? ¿La formulación de la orina aumenta su actividad o la reduce? ¿La orina de camello contiene microorganismos? ¿Es seguro utilizarla como un medicamento o tiene efectos toxicológicos sobre diversos órganos humanos?

55

60

Además, ¿se podría fraccionar la orina de camello liofilizada con el fin de separar las fracciones bioactivas? ¿Con qué parte de la célula reacciona la orina de camello? ¿Cuáles son las evidencias bioquímicas, biofísicas y biológicas para su eficacia?

65

La orina de camello puede ser considerada como una sustancia / secreción de origen animal eficaz con la capacidad de mejora de algunos de los síntomas asociados principalmente con la formación de tumores en el cuerpo, pero necesita una fundamentación a través de la experimentación científica. Por lo tanto, el solicitante considera que merece la pena adoptar una mirada científica sobre este tema y definir sus valores a través de ensayos in vitro e in vivo. En primera instancia el solicitante sondeó si contenía agente anti-cáncer dado que dicha propiedad la convertiría en una sustancia natural de gran utilidad. En la técnica relacionada, el uso de 'piperina' como un potenciador de la biodisponibilidad ha sido descrito en las Patentes nº US 5,616,593 y 5,972,382. También se utiliza orina de vaca destilada o una fracción seca

para mejorar la actividad y la biodisponibilidad de fármacos antibióticos, tal como se describe más adelante en la patente nº US 6,896,907.

5 La patente NZ522665-A (30.04.2004) describe un agente-II de diferenciación celular (CDA-II) purificado a partir de orina humana fresca, que resulta efectivo para la terapia y la prevención del cáncer.

10 M.M. Al-Harbi et al., Journal of Ethnopharmacology 52 (1996) 129-137, describe el efecto citotóxico de la orina de camello en las células de médula ósea de ratón que es comparable al del fármaco estándar ciclofosfamida. Sin embargo, la orina de camello es no clastogénica, probablemente debido a la presencia de compuestos antioxidantes y antimutagénicos.

#### BREVE RESUMEN DE LA INVENCIÓN

15 Algunas de las preguntas anteriores han sido resueltas y tratadas en el presente documento. Para responder a la primera serie de preguntas el solicitante recogió la orina de camello (PM701) en pastos naturales en diversas áreas dentro de las Provincias de Jeddah, Makkah, Medina y Riad (Arabia Saudita) en botellas de diferentes tamaños, en cualquier momento del día. La orina fue probada en medios CLED y agar de sangre en condiciones estériles y no proporcionó indicaciones de ningún crecimiento de microorganismos. Se utilizaron cultivos de tejidos de cáncer de tejidos humanos y tejidos normales en el estudio del efecto de la PM701 (orina de camello) sobre el comportamiento de las células cancerosas y las células normales. La PM701 parece actuar sobre las células cancerosas y tener eficacia anti-proliferativa y apoptótica sobre ellas.

25 Sorprendentemente, la misma PM701 exhibió efectos nutritivos sobre las células sanas normales; esto implica que la PM701 tiene un efecto de destruir selectivamente las células cancerosas y un efecto reparador sobre las células que se dividen normalmente, y estos resultados conducen a esta invención. La novedad de la invención radica en el hecho revelado a través de una experimentación precisa que la acción del PM701 y su eficacia son alcanzables sólo en el intervalo de concentración que es, literalmente, en niveles de nano a micro gramos. Esa debería ser la razón para la detección de dicho valioso potencial de la PM701 dirigido a las células cancerosas. La utilización de PM701 fresca continúa siendo no aceptable y no conveniente para el uso humano, por lo tanto, el solicitante también liofilizó aún más la PM701 líquida para obtener 0,2 g / ml de polvo. Re-examinamos la PM701 liofilizada sobre las células normales y las diversas células cancerosas en modelos tanto de cultivos celulares como animales, que mostraron la misma eficacia contra el cáncer y que fue mediada por apoptosis según lo determinado por un examen de ensayo de MTT y microscopía electrónica.

40 El solicitante pensó en la utilización de la PM701 como un fármaco alternativo para la terapia del cáncer, ya que mostró un efecto objetivo sobre las células cancerosas y ningún efecto secundario sobre los tejidos normales, pero la cantidad de dosificación liofilizada de PM701 por día era una carga sobre el cuerpo (46 cápsulas / día), y en última instancia llevó a utilizar una de las formas, que ha resultado factible para reducir drásticamente la dosis diaria de este agente anti-cáncer PM701 y aumentar también la eficiencia de la actividad de dosificación, a la vez que tiene también una importancia comercial. Por lo tanto se utilizó el enfoque de fraccionamiento bio-guiado con PM701 liofilizada, que llevaron al aislamiento y la identificación de las fracciones bioactivas, que son responsables de la eficacia anti-cáncer observada con la totalidad de la orina.

45 Para el propósito de la presente invención, los siguientes términos se definen a continuación.

50 El término "terapia anti-cáncer" se entiende que significa la inhibición / erradicación del crecimiento de los tumores primarios, la estabilización del crecimiento del tumor, la inhibición de la formación de metástasis, o la prevención de la formación de tumores. Además, la actividad contra el cáncer también cubre cualquier combinación entre nuestras sustancias y otros agentes anticáncer conocidos o de investigación, con el fin de mejorar la eficacia terapéutica de los fármacos.

55 El objetivo principal de este trabajo es conseguir un fármaco alternativo óptimo para el tratamiento del cáncer distinto de la radiación o la quimioterapia.

60 Un planteamiento mayoritario es el tratamiento de cáncer con nuevos métodos distintos de la quimioterapia y la radioterapia, que tienen efectos secundarios muy perjudiciales en los tejidos normales.

Otro objetivo de la invención es proporcionar un nuevo uso de la PM701 como un agente anti-cáncer selectivo.

65 Otro objetivo de la invención es proporcionar un método para mejorar la actividad de PM701 a través de sus fracciones bioactivas.

También otro objetivo de la invención es proporcionar un procedimiento para el aislamiento de las fracciones activas a partir de PM701 de la orina de camello.

5 Todavía otro objetivo de la invención es proporcionar las fracciones bioactivas de PM701 liofilizada en una cantidad eficaz como una composición farmacéutica novedosa (cápsulas, jarabe, pomada y gel.... etc).

10 El objetivo importante de la invención es evitar la destrucción de los tejidos normales durante el proceso de tratamiento del cáncer para conseguir un protocolo para el tratamiento de pacientes con cáncer con sustancias disponibles y a un bajo costo.

15 La invención se refiere a un nuevo uso de la orina de camello, que se conoce por estar disponible abundantemente, como agente anti-cáncer y para proporcionar las fracciones bioactivas de la misma que sean útiles en el tratamiento del cáncer. De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica anti-cáncer novedosa que comprende una cantidad anti-cáncer aceptable y eficaz de fracciones bioactivas de PM701. Las fracciones bioactivas inventadas atacaron los tejidos de cáncer sin efectos secundarios sobre los tejidos normales.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS DIVERSAS VISTAS DE LOS DIBUJOS

20 La FIG. 1 es un diagrama de las causas de muerte previstas en Arabia Saudí.  
 La FIG. 2 ilustra el subfraccionamiento cromatográfico de la fracción soluble orgánica PMF (G) que llevó al aislamiento de 7 subfracciones a las que se hace referencia como G1-G7.  
 La FIG. 3A ilustra una curva del efecto citotóxico in vitro de PM701 liofilizada usando la línea celular de carcinoma de pulmón humano, A549 en diferentes períodos de incubación en comparación con las células cancerosas no tratadas.  
 25 La FIG. 3B ilustra una curva del efecto in vitro no citotóxico de PM701 liofilizada utilizando la línea celular vero en diferentes períodos de incubación en comparación con las células normales no tratadas.  
 La FIG. 3C ilustra el efecto citotóxico in vitro de PM701 liofilizada en la morfología de las células de la línea celular de carcinoma de pulmón humano, A549 (a) en 701 PM. Debe tenerse en cuenta el daño de las células en comparación con las células de control que se incubaron en medios MEM (b) (40X).  
 30 La FIG. 4A ilustra una curva del efecto citotóxico in vitro de la fracción PMF usando la línea celular de carcinoma de pulmón humano, A549 en diferentes períodos de incubación en comparación con células cancerosas no tratadas.  
 La FIG. 4B ilustra una curva del efecto vitro no citotóxico en la fracción PMF usando línea celular de prepucio humano normal, HFS en diferentes períodos de incubación en comparación con células normales no tratadas.  
 35 La FIG. 4C ilustra el efecto citotóxico in vitro de la fracción PMF en la morfología de las células de línea celular de carcinoma de pulmón humano (A549), a. células tratadas; b. células no tratadas (40X).  
 La FIG. 5A ilustra una curva del efecto citotóxico in vitro de la subfracción PMFK usando la línea celular de carcinoma de pulmón humano, A549 en diferentes períodos de incubación en comparación con células cancerosas no tratadas.  
 40 La FIG. 5B ilustra una curva del efecto vitro no citotóxico de la subfracción PMFK usando línea celular de prepucio humano normal, HFS en diferentes períodos de incubación en comparación con células normales no tratadas.  
 La FIG. 5C ilustra el efecto citotóxico in vitro de la subfracción PMFK en la morfología de las células de la línea celular de carcinoma de pulmón humano (A549), a. células tratadas; b. células no tratadas (20X).  
 45 La FIG. 6 ilustra las características morfológicas ultraestructurales que caracterizan a la apoptosis, tal como se muestra por condensación de la cromatina y la formación de ampollas en la membrana en las células cancerosas tratadas con PM701.  
 La FIG. 7A ilustra el efecto citotóxico in vitro en de la concentración -2, -3 y -4 de PM701 utilizando células de leucemia de ratones, L1210.  
 La FIG. 7B ilustra el efecto de PM 701 en la morfología celular de las células de ratones con leucemia L1210, a-, las células tratadas; b- células no tratadas – debe llamarse la atención sobre el tamaño normal de las células (flechas) (40X).  
 50 La FIG. 8A ilustra una prueba de MTT que muestra el efecto de dos concentraciones diferentes de PM701: -2 o alta y -3 o baja en cuatro densidades diferentes de células 1, 3, 6 y 10 x 10<sup>3</sup> células / pocillo.  
 La FIG. 8B ilustra una prueba de MTT que muestra el efecto de PM701 en dos tipos de células carcinogénicas A549 y L1210 en 3 x 10<sup>3</sup> células / pocillo.  
 55 La FIG. 9 ilustra esquemáticamente el proceso de fraccionamiento y el subfraccionamiento de PM 701.  
 60  
 65

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Tal como se muestra en las FIG. 2-9, la presente invención resuelve el problema de la búsqueda y la obtención de un material abundante, disponible, barato, y natural (PM701) como un agente anti-cáncer con una potencia más alta y selectiva sobre las células cancerosas, obtenido a partir de la orina de camello. Además, se aisló la fracción bioactiva de PM701, que se codifica como PMF debido a sus propiedades altamente selectivas y altamente citotóxicas sobre las células cancerosas, que es responsable sobre todo el efecto de PM701. Además, se subfraccionó la PMF y se llevó a la purificación de siete subfracciones, en que la séptima, que se codifica como PMFK, tiene propiedades citotóxicas en las células cancerosas tanto como las propiedades citotóxicas de PMF.

La PMF y la PMFK tienen actividades citotóxicas y de supresión in vitro en la línea celular de cáncer de pulmón humano (A549), la línea celular de cáncer leucémico de ratón (L1210), las células de cáncer de colon humano (HCT116), las células cancerosas de glioma humano (U251), las células de cáncer de mama humano (MCF7), y las células de cáncer de hígado humano (HepG2) sin afectar a las células normales tales como vero y las células de prepucio humano HFS. Más importantes fueron los efectos obvios sobre la inhibición de la actividad de la división celular del cáncer a través de las características morfológicas y bioquímicas características que caracterizan a la apoptosis, tal como se muestra por la pérdida de la viabilidad celular, la condensación de la cromatina, y la reducción de la actividad metabólica usando un ensayo MTT.

En otra realización, se utilizó PM701 in vivo en el tratamiento de modelos animales que fueron inoculados con células de cáncer; el resultado de las pruebas in vivo es tan satisfactorio como el efecto in vitro a nivel de cultivo de tejidos.

En una realización de la presente invención se utilizó una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de PMF o PMFK como compuestos anticancerígenos bioactivos y aditivos farmacéuticamente aceptables seleccionados a partir de compuestos contra el cáncer.

En otra realización, se utilizan PMF y PMFK como terapia contra el cáncer de biodisponibilidad directamente o en combinación con otras moléculas contra el cáncer.

En aún otra realización, PMF y PMFK inducen la apoptosis de las células cancerosas.

En aún otra realización, el fraccionamiento PM701 nos ayuda a aislar las moléculas bio-activas, que actúan mejor en las células cancerosas objetivo debido a la disminución de su proliferación.

En aún otra realización, las células cancerosas pueden ser de pulmón, leucemia o cualquier célula cancerosa.

En aún otra realización, se utilizó PMF in vitro en el intervalo entre 80 µg / ml a 800 µg / ml y se utilizó PMFK en el intervalo entre 0.2 µg / ml a 2 µg / ml.

En otra realización, las fracciones bioactivas (PMF y PMFK) mejoran 2.8 veces las actividades antiproliferativas y apoptóticas de los agentes anti-cáncer (PM701).

La metodología seguida por nosotros para esta prueba de detección incluyó bioensayos in vitro e in vivo diseñados específicamente tal como se describe a continuación. Las líneas celulares utilizadas en esta invención se obtuvieron del banco de células de la Unidad de Cultivo de Tejidos del Centro de Investigación Médica King Fahd (KFMRC).

#### DESARROLLO DE FORMATO EN POLVO

Para mejorar la utilidad y la conveniencia de aplicación de PM701, se liofilizó PM701 líquida para conseguir una forma sólida. El solicitante fraccionó aún más la forma sólida para obtener la(s) fracción (es) bioactiva (s), que también están libres del olor típico de la orina de camello y que es más fácilmente aceptable para los seres humanos. Para este propósito se fraccionó la PM701 liofilizada tal como se describe mediante el siguiente procedimiento:

- Paso 1: se recogió PM701 en el recipiente de acero inoxidable directamente del camello, que se mantiene en ambiente higiénico.
- Paso 2: se añadieron 90g de PM701 líquida a la celulosa microcristalina (10 g). Esto dará 100 g de una mezcla, que se congeló a - 80°C en aparato de Pyrex durante 20-24 hrs.
- Paso 3: se liofilizan 100 g de la mezcla en el liofilizador a temperatura ambiente durante 5 días para obtener 20 g de forma sólida PM701.
- Paso 4: las mezclas se dejan en un desecador con cloruro de calcio, en presencia de presión de vacío durante un día a temperatura ambiente

Paso 5: Otro método que usa la máquina Spray Dryer. Esta máquina pasa el material de estado líquido a micro-polvo

Paso 6: El PM701 en polvo se envasa en una nevera en un recipiente de vidrio esterilizado para su uso posterior.

5

#### FRACCIONAMIENTO DE UNA SEPARACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS DE PM701 LIOFILIZADA

Se realizaron los siguientes pasos.

10

##### i. Método de extracción de disolvente por fraccionamiento

Paso 1: Una muestra de 5 mg de PM701 liofilizado se sometió a ultrasonidos con metanol tres veces cada 30 ml para proporcionar aproximadamente 750 mg de la fracción de metanol, lo que se denomina (G).

15

##### ii. Método de tamizado molecular para subfraccionamiento

Paso 1: Subfraccionamiento de PMF usando la columna de diferente tipo de gel con diferente capacidad de tamizado (por ejemplo, Sephadex LH-20, Sephadex-25, -50, ..).

20

Paso 2: Una muestra de 1.5 mg de la fracción de metanol (G) se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice y se eluyó con los sistemas disolventes siguientes cada 250 ml, cloroformo, 10% de metanol en cloroformo, 20% de metanol en cloroformo, 30% de metanol en cloroformo, 40% de metanol en cloroformo, 60% de metanol en cloroformo seguido de metanol.

25

Paso 3: Las siete subfracciones se purifican y las subfracciones individuales se separan por cromatografía líquida de alta resolución.

30

Paso 4: Todas las subfracciones, que salen de la columna se probaron para determinar una actividad similar a la de PM701 en el nivel de cultivo de tejidos.

Se encontró que las fracciones y subfracciones orgánicas solubles del disolvente tienen una fuerte actividad antiproliferativa en un panel de líneas celulares cancerosas humanas derivadas de pulmón, mama, colon, cerebro, hígado y leucemia. In vitro, las fracciones y subfracciones demuestran actividades antiproliferativas y antiapoptóticas en experimentos de cultivo de tejidos.

35

#### ENSAYO PARA DETERMINACIÓN DE DOSIS IN VITRO

40

a. Se evalúa y se determina la concentración inhibidora óptima de PM701 frente a diferentes células cancerosas, células de cáncer de pulmón humano (A549), células leucémicas de ratón (L1012), células de cáncer de colon humano (HCT116), células de cáncer de glioma humano (U251), células de cáncer de mama humano (MCF7) y células de cáncer de hígado humano (HepG2), a través de los experimentos de cultivo de tejidos in vitro.

45

b. La concentración inhibidora óptima de PM701 muestra un efecto citotóxico sobre las células cancerosas, mientras que no hay efecto citotóxico alguno sobre las células normales, lo que sugiere que PM701 puede actuar selectivamente sobre las células cancerosas a la vez que nutre las células normales.

50

1 ml de PM701 o PMF o PMFK disuelta en 10 ml de medio estándar, que se denomina - 1 (alto).

1 ml de PM701 o PMF o PMFK disuelta en 100 ml de medio estándar, que se denomina - 2  
1 ml de PM701 o PMF o PMFK disuelta en 1,000 ml de medio estándar, que se denomina - 3 (medio).

1 ml de PM701 o PMF o PMFK disuelta en 10,000 ml de medio estándar, que se denomina - 4.

55

1 ml de PM701 o PMF o PMFK disuelto en 100,000 ml de medio estándar, que se denomina - 5 (bajo).

Los experimentos in vitro mostraron que el mejor efecto se observa cuando se utilizan concentraciones medias (-2 y -3), por lo que fija las dosis in vitro e in vivo utilizando esta concentración media.

60

#### ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA IN VITRO (CULTIVO CELULAR)

Líneas celulares y cultivo celular

65

1. Las líneas celulares comerciales de células de cáncer de pulmón (A549), células de cáncer de colon humano (HCT116), células cancerosas de glioma humano (U251), células de cáncer de mama humano (MCF7), y células de cáncer de hígado humano (HepG2), obtenidas en el Centro

## ES 2 547 466 T3

de Investigación Médica Rey Fahd (KFMRC) se inoculan en una densidad de aproximadamente  $0,5 \times 10^5$  células en medio MEM en los pocillos de una placa de 24 pocillos. Las células L1210 se prepararon de la misma manera en medio RPMI (1640) suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor.

2. Esto se reemplazó con medio fresco después de 24 horas en cada pocillo.

3. El/ los componente (s) de ensayo se añade(n) a concentraciones deseadas en diferentes pocillos justo después de la sustitución del medio.

4. Las observaciones se registran y se cuentan las células después de 0, 24, 48, y 72 horas para lo que se requieren los siguientes pasos.

a. Se retira el medio de los pocillos.

b. Los pocillos se enjuagaron con 1 ml de PBS (solución salina tamponada con fosfato).

c. A cada pocillo se añaden 500  $\mu$ l de solución de tripsina recién preparada (0.1% en PBS).

d. La solución de tripsina se retira después de 30 segundos y la placa se golpea suavemente hasta que las células se liberan de la superficie de la placa.

e. Se añade 1 ml de medio de crecimiento fresco y se agita con una pipeta para obtener una suspensión de células.

f. Se prepara la suspensión celular (1:1): 20 ml de células con 20 ml de azul de tripano (0,4%), se toman 10  $\mu$ l de suspensión de células en el hemocitómetro y se coloca una cubierta de vidrio sobre la cámara de recuento.

g. El número de células viables se cuenta en 5 grandes cuadrados y se toman las lecturas de 5 campos microscópicos para determinar el promedio.

h. A continuación, se calcula el recuento de células (título por ml) en la muestra original como recuento medio  $\times 10^4$ .

### COMPOSICIÓN DEL MEDIO ESENCIAL MÍNIMO (MEM)

Polvo de MEM (ICN) = 9.95g, NaHCO<sub>3</sub> (Polvo) = 2.2 g, glutamina (Polvo) = 0.3 g L, aminoácido no esencial (100X) = 10 ml, solución Hepes (100X) = 10 ml, mezcla de antibióticos (penicilina + estreptomycin) = 10 ml, agua desionizada-destilada = 1 litro.

Agitador durante 1 hora a temperatura ambiente, PH (6.8 a 7.4).

Filtrado estéril a través de un filtro de 0.22 micras y almacenado a + 4° C.

### ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

La prueba de MTT se utiliza para la determinación de la citotoxicidad o los efectos anticancerígenos de PM701 sobre dos tipos de células cancerosas, A549 y L1210. Esta prueba mide la viabilidad celular como porcentaje de células de control sin tratar.

Se realizó un ensayo de MTT para evaluar los efectos de crecimiento de PM 701. El ensayo MTT es un ensayo colorimétrico basado en la sal de tetrazolio MTT que detecta la viabilidad celular. El MTT disuelto se convierte a un formazán púrpura insoluble por escisión del anillo de tetrazolio mediante enzimas de deshidrogenasa en células vivas, pero no muertas.

El MTT se disolvió en tampón fosfato salino (PBS) a 5 mg / ml y se filtró a través de un filtro de 0.22  $\mu$ m para esterilizar y eliminar la pequeña cantidad de residuo insoluble y a continuación se almacenaron a 2 - 8° C para un uso frecuente. La solución madre de MTT se añade a cada cultivo que se está ensayando para ser igual a una décima parte del volumen de cultivo original. El uso de isopropanol se mide por absorbancia de rendimiento espectrofotométrico como una función de la concentración de colorante convertido. Las células de crecimiento exponencial ( $3 \times 10^3$  células / 100  $\mu$ l) se sembraron en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 24 h. Las células se trataron a continuación de forma continua con las diversas fracciones y subfracciones. En un momento seleccionado, se añadieron 10  $\mu$ l de solución de MTT a todos los pocillos para el ensayo. Después de un período adicional de incubación (4 horas), se aspiró el medio de los pocillos tan completamente como fue posible sin afectar a los cristales de formazán. A continuación, se añaden 100  $\mu$ l de isopropanol a cada pocillo para disolver el precipitado resultante. A continuación se mide la concentración del colorante a 570 nm en un lector de placas (Lector de Microplacas Modelo 450; Bio-Rad). La densidad óptica obtenida está directamente relacionada con la viabilidad de las células.

El ensayo de MTT distingue entre células viables y no viables sobre la base de que la mitocondria fisiológicamente activa metaboliza el MTT sólo en células viables. La IC50 se calculó como la concentración de fármaco que causa una inhibición del 50% de la absorbancia en comparación con las células tratadas con disolvente solamente.

RESULTADOS

- 5 Se encontraron fracciones solubles en metanol (PMF), pero fracciones no solubles en agua, que tenían una actividad antiproliferativa potente en A549, L1210 y otras líneas celulares de cáncer. Otros subfraccionamientos cromatográficos de estos extractos solubles orgánicos llevaron al aislamiento de 7 fracciones a las que se hace referencia como G1-G7, tal como se muestra en la FIG. 2 que ilustra el subfraccionamiento cromatográfico de la fracción orgánica soluble de PMF que llevó al aislamiento de 7 subfracciones a las que se hace referencia como G1-G7. Sistema de disolvente: CHC13-MeOH-agua 65: 35: 6. Reactivo de pulverización: P-anisaldehído reactivo, calentamiento a 110° C durante 5 min.
- 10 PM 701, PMF y PMFK mostraron un efecto altamente citotóxico sobre las células de cáncer en comparación con el efecto no citotóxico en las células normales.
- 15 La FIG. 3A ilustra una curva del efecto citotóxico in vitro de PM701 liofilizada usando la línea celular de carcinoma de pulmón humano, A549 en diferentes períodos de incubación en comparación con las células cancerosas no tratadas.
- 20 La FIG. 3B ilustra una curva del efecto in vitro no citotóxico de PM701 liofilizada utilizando la línea celular vero en diferentes períodos de incubación en comparación con las células normales no tratadas.
- 25 La FIG. 3C ilustra el efecto de PM701 liofilizada en la morfología de las células de línea celular de carcinoma de pulmón humano, A549. Las células cancerosas A549 con una imagen creada (40X) tras la incubación durante 24 h, se fijaron y se tiñeron con azul de Coomassie (a) en PM 701. Debe tenerse en cuenta el daño de las células en comparación con las células de control que se incubaron en medio MEM (b).
- 30 La FIG. 4A ilustra una curva del efecto citotóxico in vitro de la fracción PMF usando la línea celular de carcinoma de pulmón humano, A549 en diferentes períodos de incubación en comparación con las células cancerosas no tratadas.
- 35 La FIG. 4B ilustra una curva del efecto no citotóxico in vitro de la fracción PMF usando la línea de células de prepucio humano, HFS en diferentes períodos de incubación en comparación con las células normales no tratadas.
- 40 La FIG. 4C ilustra el efecto de la fracción PMF en la morfología de las células de la línea de células de carcinoma de pulmón humano, A549, a. células tratadas; b. células no tratadas (40X).
- 45 La FIG. 5A ilustra una curva del efecto citotóxico in vitro de la subfracción PMFK usando la línea celular de carcinoma de pulmón humano, A549 en diferentes períodos de incubación en comparación con las células cancerosas no tratadas.
- 50 La FIG. 5B ilustra una curva del efecto no citotóxico in vitro de la subfracción PMFK usando la línea de células de prepucio humano, HFS en diferentes períodos de incubación en comparación con las células normales no tratadas.
- 55 La FIG. 5C ilustra el efecto de la subfracción PMFK en la morfología de las células de la línea de células de carcinoma de pulmón humano, A549, a. células tratadas; b. células no tratadas (20X).
- 60 Los cambios morfológicos de las células tratadas con PM701 liofilizada caracterizan la apoptosis, tal como se muestra por la pérdida de la viabilidad celular, la formación de ampollas en la membrana y la condensación de la cromatina y se muestra en la FIG. 6.
- 65 La FIG. 6 ilustra las características morfológicas ultraestructurales que caracterizan a la apoptosis, tal como se muestra por la condensación de la cromatina y la formación de ampollas en la membrana en las células tratadas con PM701.
- La FIG. 7A ilustra el efecto citotóxico in vitro de las concentraciones -2 y -3 de PM701 utilizando células de leucemia de ratón, L1210.
- La FIG. 7B ilustra el efecto de PM 701 en la morfología celular de las células de leucemia de ratón L1210, a. células tratadas; b. células no tratadas. Debe tenerse en cuenta el tamaño normal de las células (flechas) (40X).
- PM 701 redujo la actividad metabólica de las células cancerosas utilizando la prueba MTT tal como se muestra en las FIG. 8A y 8B.

## ES 2 547 466 T3

La FIG. 8A ilustra una prueba de MTT que muestra el efecto de dos concentraciones diferentes de PM701: -2 o alta y -3 o baja en cuatro densidades diferentes de células 1, 3, 6 y 10 x 10<sup>3</sup> células / pocillo.

5 La FIG. 8B ilustra una prueba de MTT que muestra el efecto de PM701 en dos tipos de células carcinogénicas A549 y L1210 en 3 x 10<sup>3</sup> / pocillo.

10 Se encontró que la PMF de fracción soluble de metanol tenía una buena actividad contra el cáncer en las líneas celulares de carcinoma. También se observó una relación de dosis, tal como se muestra en la FIG. 4A.

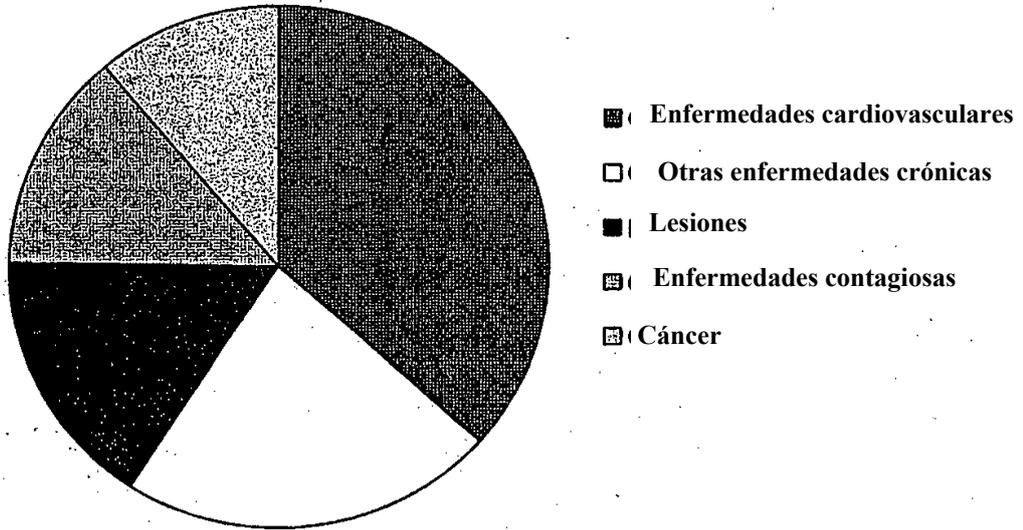
**Reivindicaciones**

1. Una fracción de orina de camello (PMF) obtenible de acuerdo con un método que comprende las etapas de:
  - 5 - liofilización de la orina de camello líquido (PM701) obtenida a partir de camellos árabes de una sola joroba adultos *Camelus dromedarius* en presencia de celulosa microcristalina; y
  - fraccionamiento de la PM701 liofilizada por sonicación con metanol con el fin de aislar la fracción bioactiva PMF que es soluble en metanol; y
- 10 2. Una subfracción de orina de camello (PMFK) que se puede obtener de acuerdo con un método que comprende las etapas de:
  - liofilización de la orina de camello líquido (PM701) obtenida a partir de camellos árabes de una sola joroba adultos *Camelus dromedarius* en presencia de celulosa microcristalina;
  - fraccionamiento de la PM701 liofilizada por sonicación con metanol con el fin de aislar la fracción bioactiva más eficaz (PMF) que es soluble en metanol; y
- 15 - someter el PMF aislado a subfraccionamiento cromatográfico en sistemas de disolventes cada 250 ml que consisten esencialmente en cloroformo y metanol para obtener siete subfracciones, con una subfracción más eficaz que se denomina PMFK.
3. La PMF o PMFK de la reivindicación 1 o 2, en el que la PM701 se obtiene en forma de polvo por la liofilización de PM701 líquida en el intervalo de 20 g por cada 100 ml de PM701 fresca líquida.
- 20 4. La PMF o PMFK de la reivindicación 1 o 2, en el que la PM701 seca de la orina de camello liofilizada se puede obtener por destilación o mediante el secador de pulverización.
5. La PMF de la reivindicación 1 y la PMFK de la reivindicación 2, en el que la PMF y la PMFK seca obtenida a partir de la orina de camello liofilizada está desprovista del olor de la orina de camello.
6. PMF de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de cáncer.
- 25 7. PMFK de acuerdo con la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento de cáncer.
8. La PMF para su utilización de acuerdo con la reivindicación 6, en que los efectos de concentración sobre la viabilidad celular y la proliferación de las células cancerosas es en concentraciones en el intervalo entre 80 µg/ml y 800 µg/ml.
- 30 9. La PMFK para su utilización de acuerdo con la reivindicación 7, en que los efectos de concentración sobre la viabilidad celular y la proliferación de las células cancerosas es en concentraciones en el intervalo entre 0.2 µg/ml y 2 µg/ml.
10. La PMF para su utilización de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende una cantidad eficaz de la PMF en la cantidad de 435 mg / cápsula con 7 cápsulas / día.
- 35 11. La PMFK para su utilización de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende una cantidad eficaz de la composición en la cantidad de 435 mg / cápsula con 5 cápsulas / día.
12. Composición farmacéutica que comprende al menos un agente contra el cáncer, y PMF o PMFK de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
13. La composición de la reivindicación 12, que comprende una cantidad eficaz de la composición en formulaciones seleccionadas entre cápsulas, jarabe, inyección, pomada, gel y champú.
- 40 14. La composición de las reivindicaciones 12 y 13, en que la composición presenta un efecto anti-cáncer selectivo objetivo en la causa de actividades apoptóticas in vitro.

15. La composición de la reivindicación 14, en el que los tipos de cáncer se seleccionan a partir de células de cáncer de pulmón humano (A549), células de leucemia de ratón (L1210), células de cáncer de colon humano (HCT116), células de cáncer de glioma humano (U251), células de cáncer de mama humano (MCF7) y células de cáncer de hígado humano (HepG2).

5

**Causas Principales de Muerte en Arabia Saudi  
Proyección 2005**



**Fig 1**

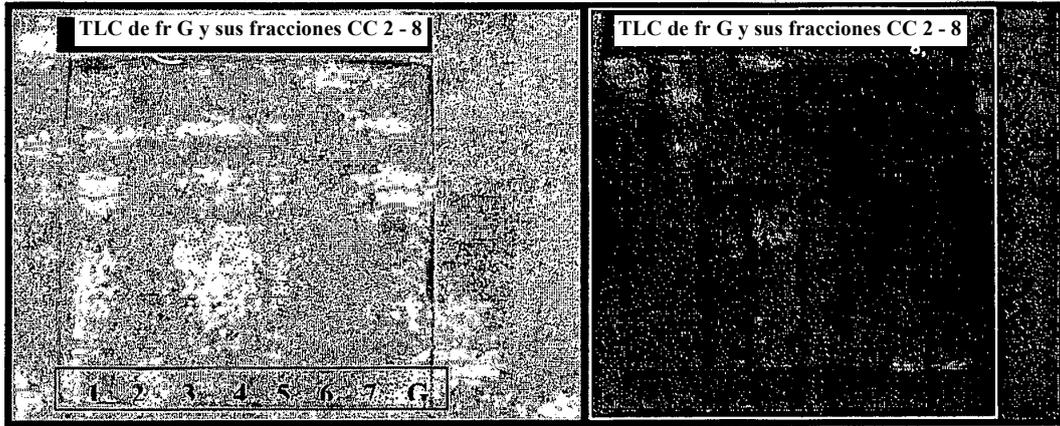


Fig 2

Células A549 con PM701 Liofilizada

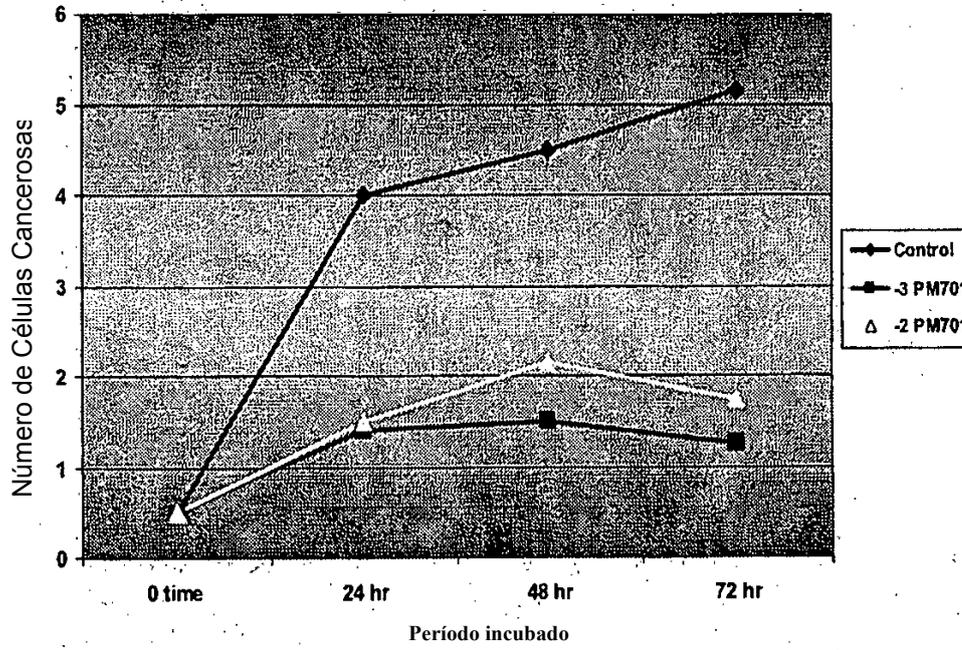


Fig 3A

Células Vero con PM701 Liofilizada

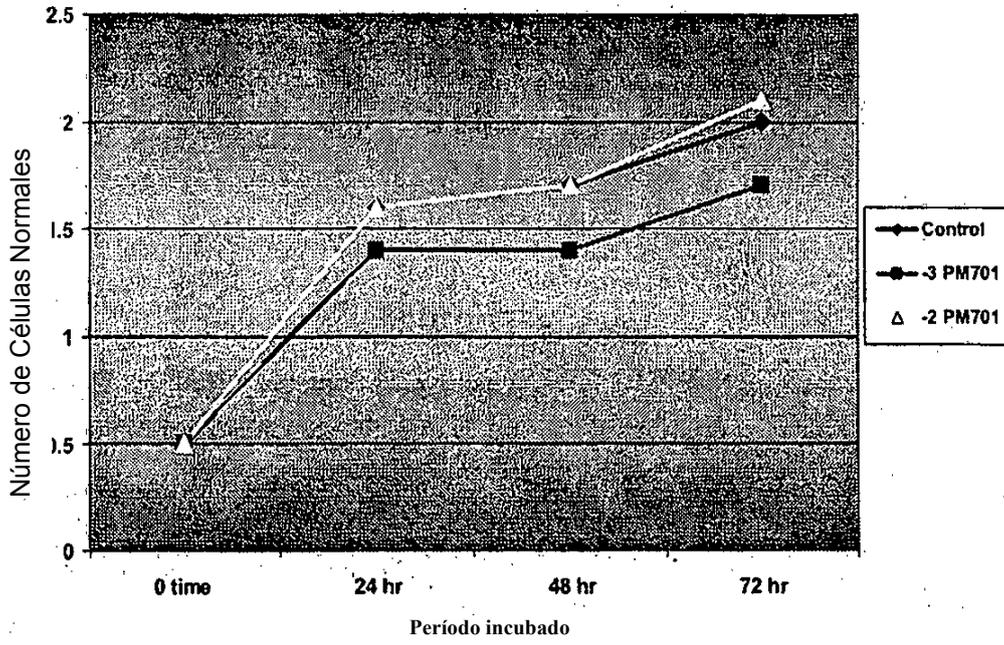


FIG. 3B

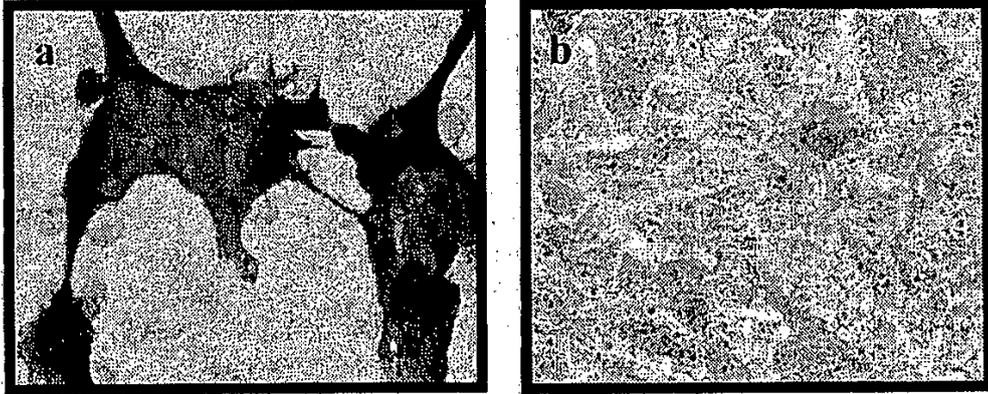


FIG. 3C

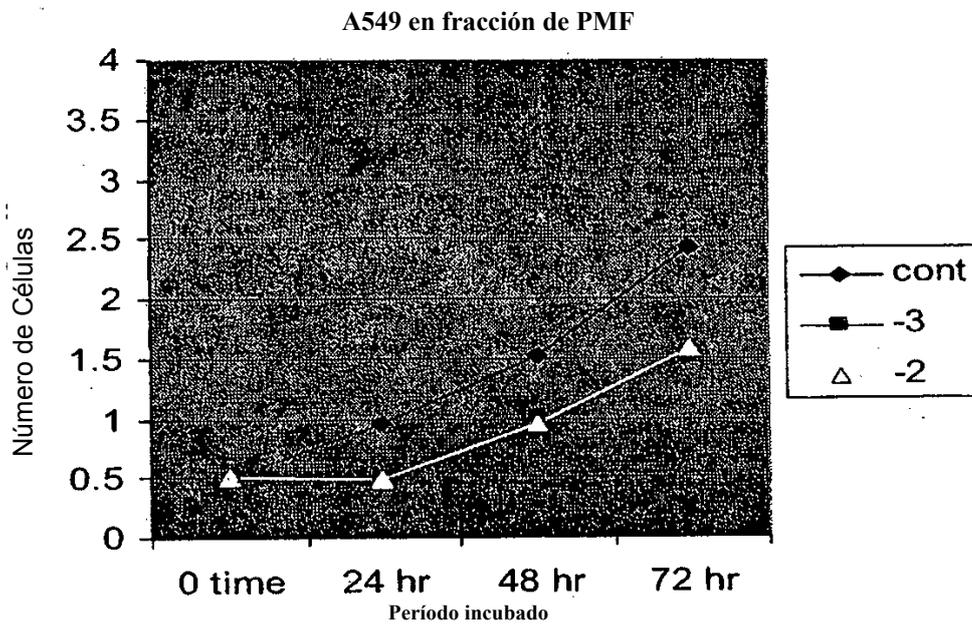


FIG. 4A

Células HFS con Fracción de PMF

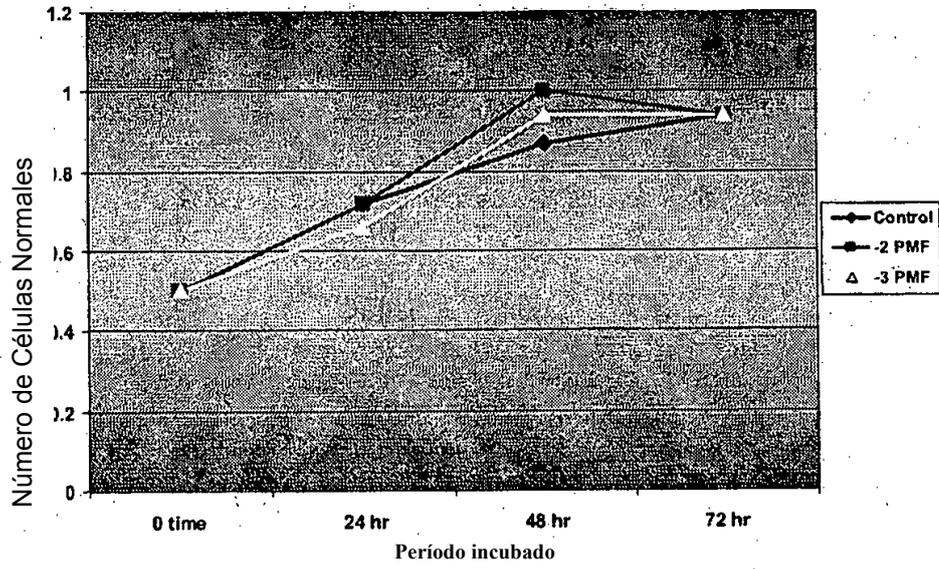


FIG. 4B

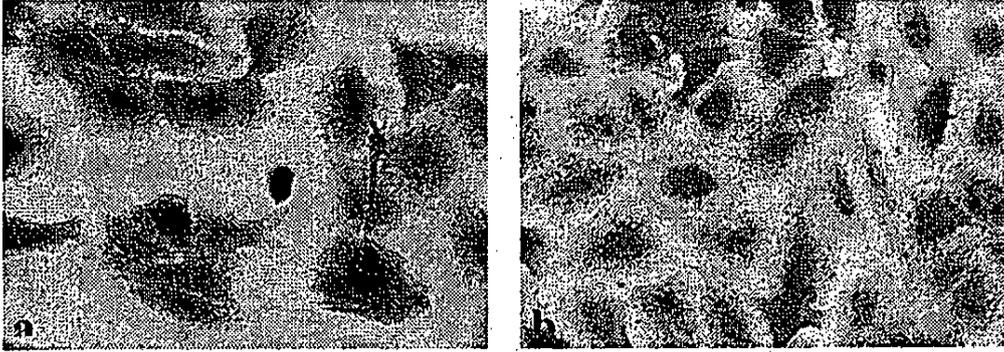


FIG. 4C

Células A549 con Subfracción de PMFK

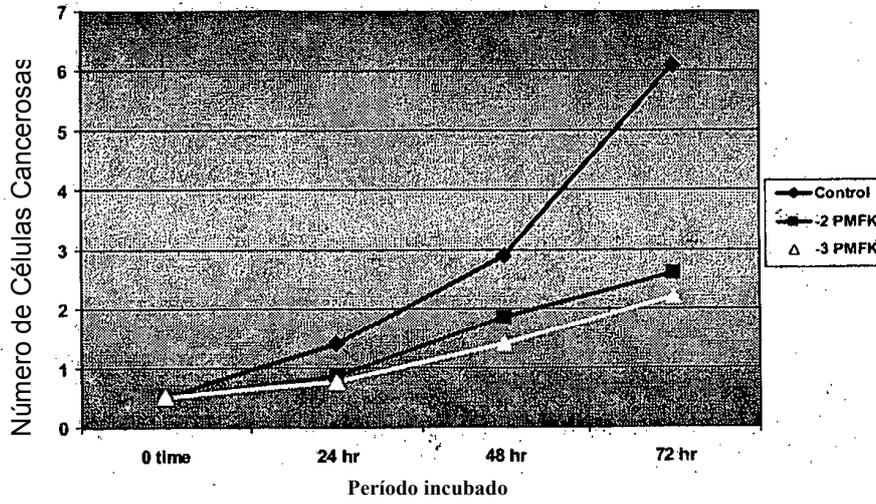


FIG. 5A

Células HFS con Subfracción de PMFK

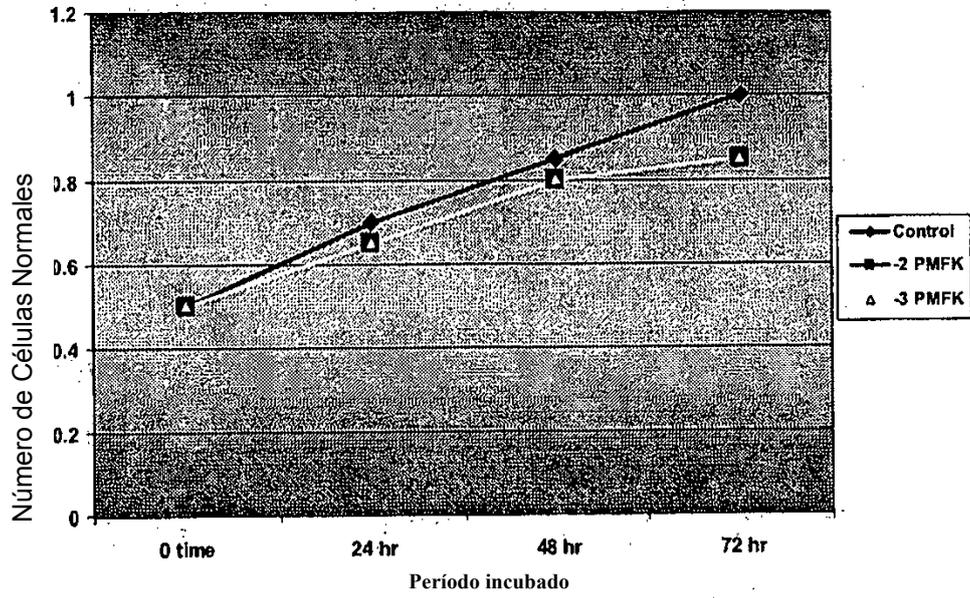


FIG. 5B

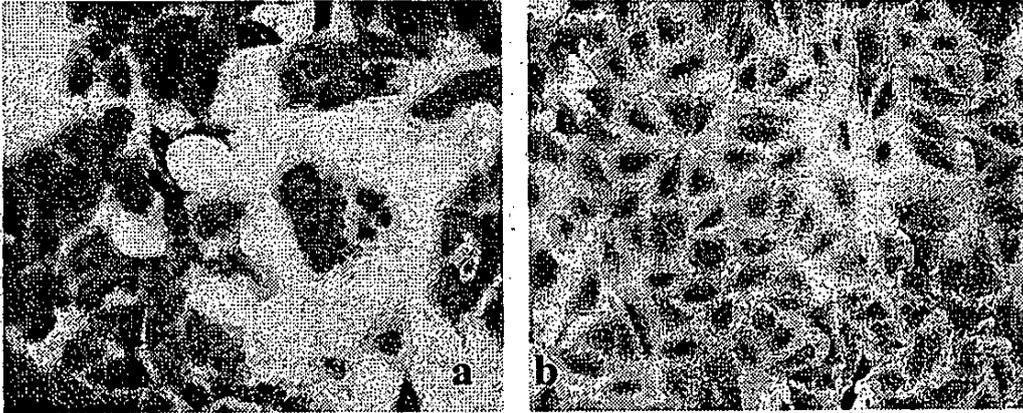


FIG. 5C

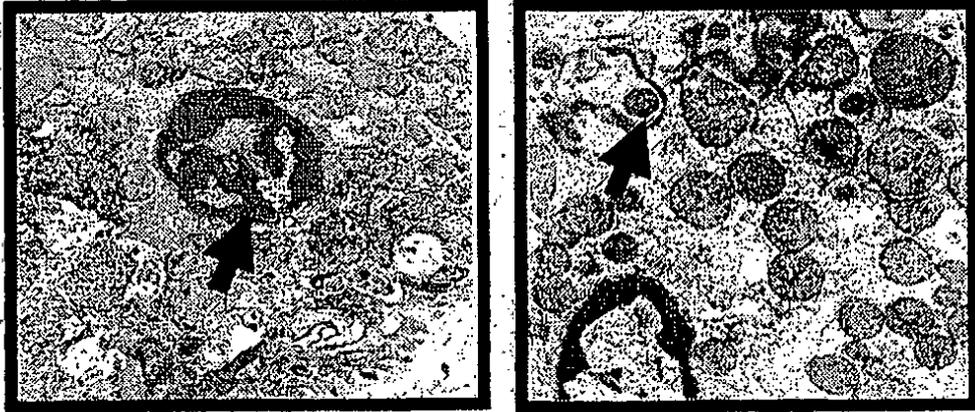


FIG. 6

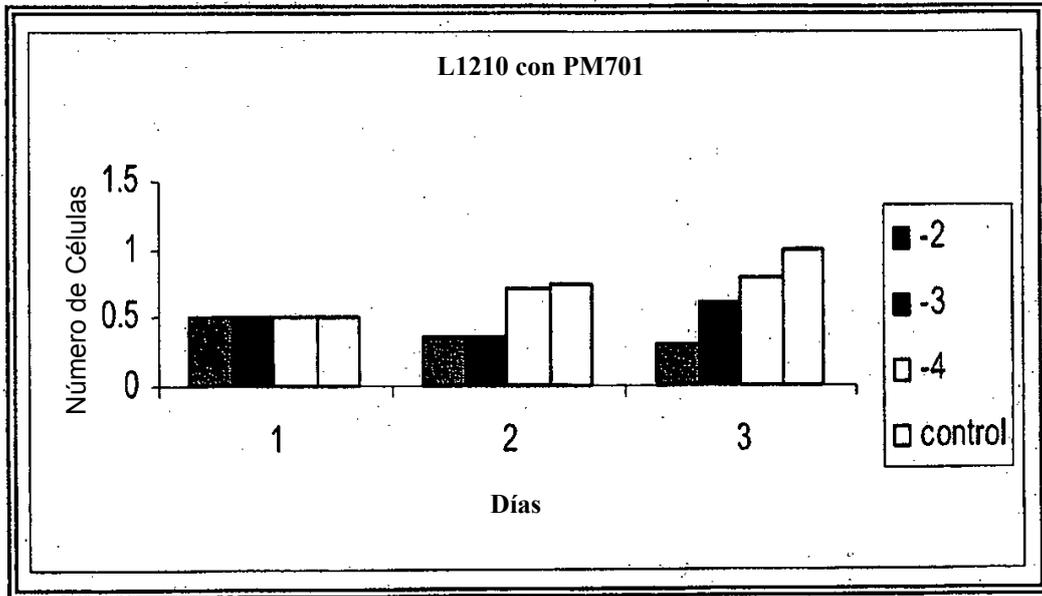


FIG. 7A

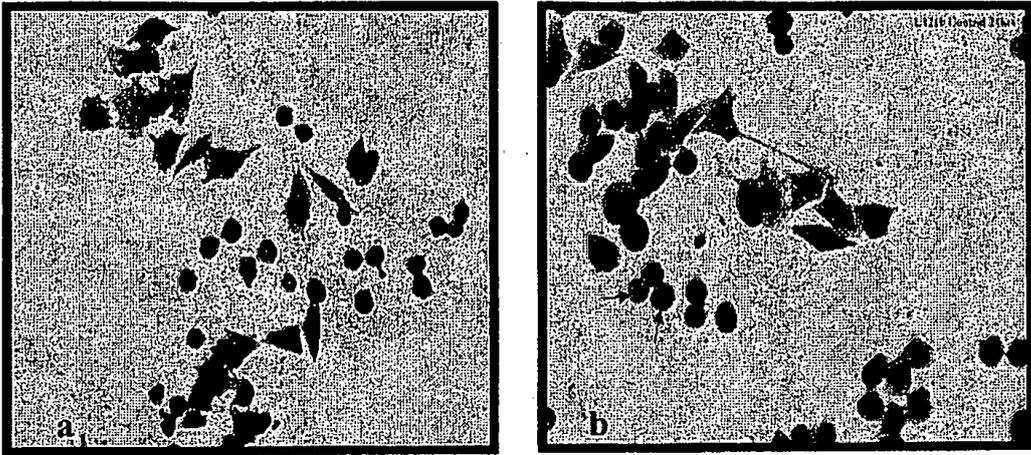


FIG. 7B

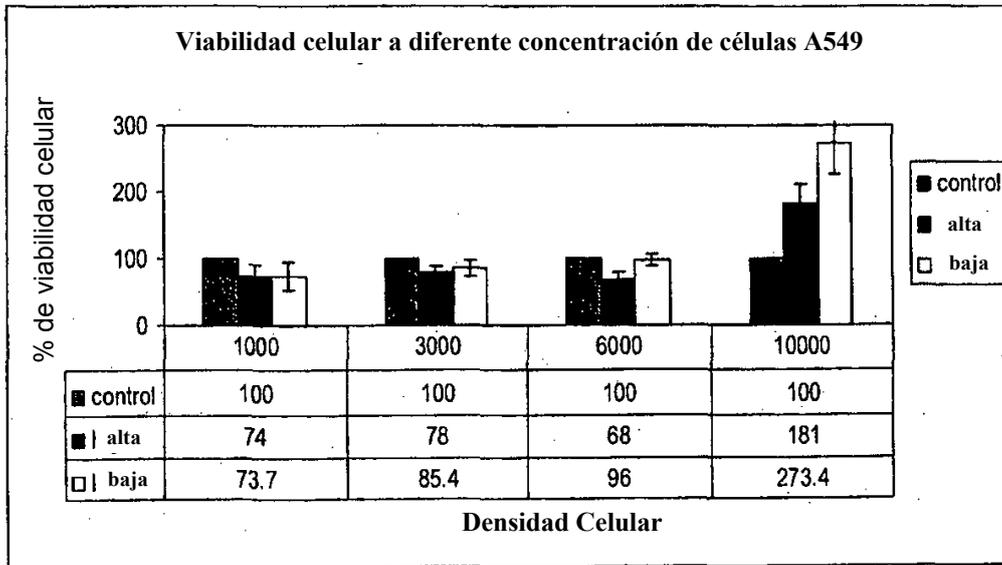
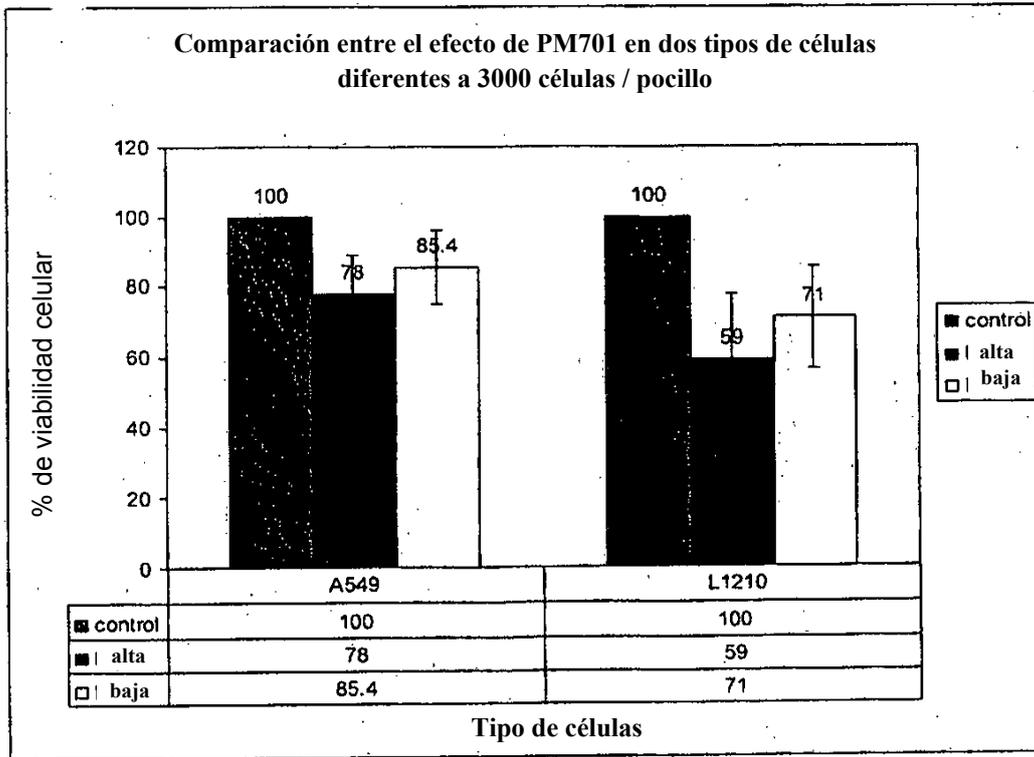


FIG. 8A



**FIG. 8B**

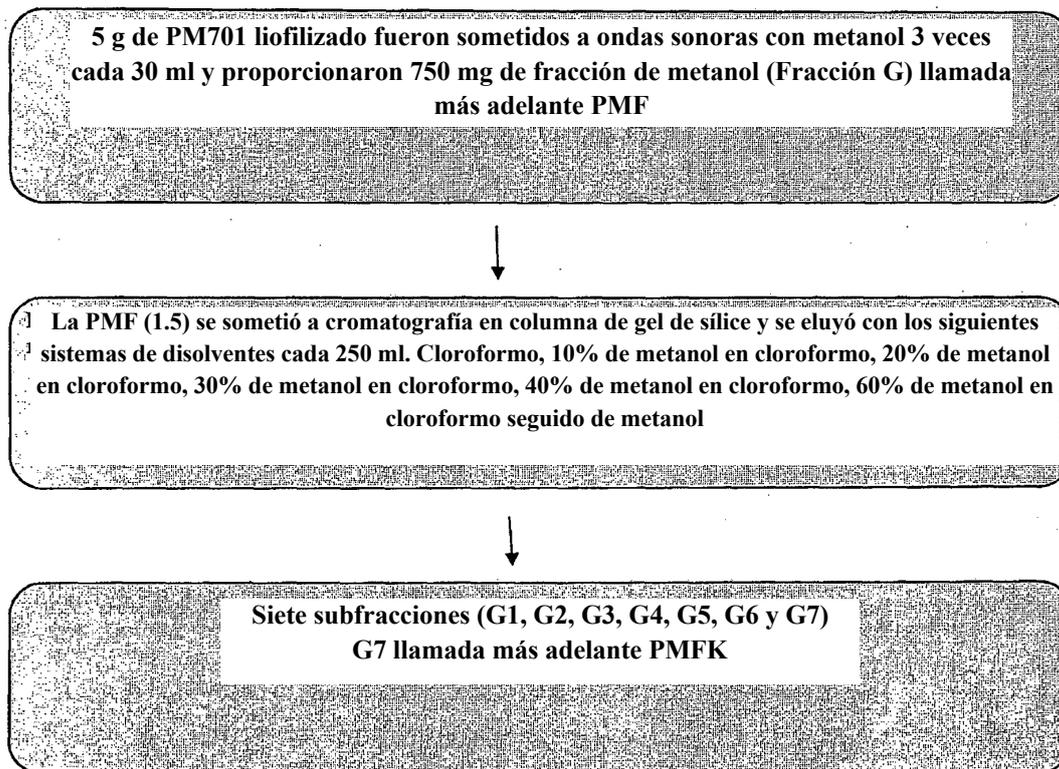


Fig 9