

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 386**

51 Int. Cl.:

A61K 36/185 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.09.2010 PCT/IB2010/002504**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2011 WO11039629**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2010 E 10819989 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 2522356**

54 Título: **Fracción bioactiva de Petiveria alliacea, composición farmacéutica que la contiene y combinación con agentes inmunoestimulantes para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

02.10.2009 CO 09108636

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

28.05.2019

73 Titular/es:

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA (100.0%)
Carrera 7 No. 40-62
Bogotá, CO**

72 Inventor/es:

**FIorentino GOMEZ, SUSANA;
CIFUENTES BARRETO, MARIA CLAUDIA;
HERNANDEZ MONTAÑO, JOHN, FREDY;
SANTANDER GONZALEZ, SANDRA, PAOLA;
URUEÑA PINZON, CLAUDIA, PATRICIA y
CASTAÑEDA UVAJOA, DIANA MERCEDES**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 714 386 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

Fracción bioactiva de *Petiveria alliacea*, composición farmacéutica que la contiene y combinación con agentes inmunoestimulantes para el tratamiento del cáncer

5

CAMPO DE LA INVENCION

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 El cáncer se presenta cuando los mecanismos que mantienen la tasa de crecimiento normal de las células, se alteran y generan un exceso de división celular. Esta alteración es debida frecuentemente a mutaciones que ocurren en el genoma de cualquier célula del cuerpo, las cuales inducen una transformación celular que puede generar un tumor maligno con la capacidad de invadir tejido normal adyacente y realizar metástasis. Durante este proceso de transformación maligna, algunas de las células tumorales desarrollan resistencia simultánea
15 primaria o adquirida a múltiples fármacos citotóxicos (Cooper G. 2004, Cooper, G. 2007. The cell: A molecular approach. Tercera edición. Capítulo 15: 631-667), por lo que la búsqueda de nuevos compuestos antitumorales constituye un área de interés.

20 Los tumores se clasifican de acuerdo al tipo de célula del que proceden, siendo los más frecuentes los carcinomas (generados de células epiteliales), seguidos por los sarcomas (tumores sólidos) y las leucemias o linfomas (células de origen hematopoyético) (Cooper G. 2004).

25 A pesar de los esfuerzos realizados en programas de investigación experimental y clínica, la mortalidad causada por el cáncer se mantiene en valores extremadamente altos; de acuerdo con las estadísticas del American Cancer Society para el año 2006, el cáncer es la segunda causa de muerte en Estados Unidos – 564 830 defunciones/año – posicionado solo por debajo de las enfermedades cardiovasculares (American Cancer Society; 2007). Con los tratamientos disponibles actualmente una tercera parte de los pacientes se alivian, no obstante, en los casos restantes la micrometástasis temprana es una característica del neoplasma, lo que indica el requerimiento de un método sistémico como la quimioterapia (a menudo junto con cirugía o radiación) para el control efectivo del cáncer.
30

Más de 100 fármacos son usados actualmente en quimioterapia y se pueden clasificar dependiendo del blanco molecular que genera su actividad terapéutica; encontramos, entre otros, fármacos que generan el entrecruzamiento del ADN (cisplatino), la alquilación del ADN (dacarbazina), la alteración de microtúbulos (taxol, vinblastina), la alteración de membranas (doxorubicina), inhibidores de topoisomerasas (etopósido, topotecan) y también análogos estructurales (metotrexato). A pesar de esta amplia variedad de fármacos, las células tumorales desarrollan resistencia a múltiples fármacos, lo que genera una disminución considerable en la respuesta clínica esperada a la terapia farmacológica. Múltiples mecanismos han sido implicados en el desarrollo de la resistencia a los fármacos que actúan sobre un único blanco, entre los que se incluyen la superexpresión de la superfamilia de proteínas ABC, la expresión de modificaciones de enzimas y defectos en la inducción de apoptosis por quimioterapia (Marie, Jean-Pierre, 2001. Drug resistance in hematologic malignancies Curr Opin Oncol 13 : 463 – 469). En este sentido, los productos naturales pueden servir como fuente de nuevos compuestos con diferentes mecanismos de acción y como alternativa terapéutica como materia prima para la estandarización de extractos complejos que proporcionen un efecto sinérgico y aseguren la actividad sobre múltiples blancos moleculares al mismo tiempo.
45

Dos elementos son importantes en la eliminación de los tumores: (1) la destrucción de la célula tumoral sin efectos adversos sobre las células normales y (2) la generación de una respuesta inmune subsiguiente al tratamiento capaz de eliminar las células tumorales residuales. La utilización de un método de tratamiento que además de inducir la muerte tumoral permita el control posterior de la proliferación tumoral residual constituye un avance en la terapia antitumoral. Algunos suplementos a base de plantas elaborados a partir de plantas utilizadas en la medicina tradicional oriental, como el Sho-Saiko-to y el Juzen-taiho-to, inducen muerte tumoral inhibiendo la metástasis y subsecuentemente permiten la generación de una respuesta antitumoral (Kato M, et al. "The herbal medicine Sho-saiko-to inhibits growth and metastasis of malignant melanoma primarily developed in ret-transgenic mice." J Invest Dermatol 1998, 111:640-4.; Dai Y, et al "T-cell-immunity-based inhibitory effects of orally administered herbal medicine juzen-taiho-to on the growth of primarily developed melanocytic tumors in RET-transgenic mice." J Invest Dermatol 2001, 117:694-701.). Dentro de estas preparaciones a base de plantas se han caracterizado parcialmente los compuestos responsables de la muerte tumoral pero no se ha estudiado el tipo de muerte que sufren las células tumorales, ni se han identificado claramente los compuestos activadores de las células dendríticas (CD).
50
55
60

La terapia antitumoral efectiva debe tener en cuenta no solo la muerte de los tumores, sino el tipo de muerte que ellos van a sufrir. Aunque la muerte por apoptosis es la más estudiada, es bien sabido que la transferencia de antígenos tumorales a las CD ocurre más eficientemente si la muerte es posterior a un estrés celular, el cual genera un aumento de proteínas de choque térmico que participan en el proceso de sensibilización cruzada a las
65

CDs, permitiendo la activación de los linfocitos T citotóxicos. La muerte por apoptosis con necrosis tardía podría ser una de las mejores formas de eliminar los tumores.

La *Petiveria alliacea* Linn es una hierba perenne de la familia *Phytolaccaceae* ampliamente conocida en la medicina tradicional de los países de Centro, Suramérica, el Caribe y África (Lopes-Martins RA et al. "The anti-inflammatory and analgesic effects of a crude extract of *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae)." *Phytomedicine* 2002, 9:245-8). Tradicionalmente se ha utilizado la infusión de las hojas y la cocción o el polvo de la raíz en el tratamiento de diferentes enfermedades por sus propiedades antiespasmódicas, antirreumáticas, antiinflamatorias (Lopes-Martins RA, et al. "The anti-inflammatory and analgesic effects of a crude extract of *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae)." *Phytomedicine* 2002, 9:245-8; Morales C, et al "Preliminary screening of five ethnomedicinal plants of Guatemala." *Farmaco* 2001, 56:523-526.), antinociceptivas (Di Stasi LC, et al. "Screening in mice of some medicinal plants used for analgesic purposes in the state of Sao Paulo. " *J Ethnopharmacol* 1988, 24:205-11.), hipoglicemiantes y abortivas (De Lima TC, et al "Evaluation of antinociceptive effect of *Petiveria alliacea* (Guine) in animals. " *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991, 86 (Supl 2):153-8; De Sousa PJ, "Guiné: erva medicinal ou tóxica." *Ciênc Cult* 1987, 39:645-646.). En algunos países de Centro y Suramérica las infusiones acuosas y alcohólicas han sido utilizadas para el tratamiento de leucemias y cáncer de seno con buenos resultados (Gupta M., "Petiveria alliacea in 270 plantas medicinales iberoamericanas", Presencia ed edn 1995.; Garcia B: "Flora medicinal de Colombia," Imprenta nacional ed. Bogotá edn. Bogotá 1974). Se ha demostrado que los extractos de *Petiveria alliacea* inhiben el crecimiento de las células tumorales in vitro (Uruena C, et al., "Petiveria alliacea extracts uses multiple mechanisms to inhibit growth of human and mouse tumoral cells " *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2008, 8:60).

Diferentes compuestos han sido aislados y reportados para *P. alliacea* incluyendo flavonoides como la astilbina, miricitrina y engeletina; triterpenos como el ácido barbinérvico y el α -friedelinol; lípidos como el ácido lignocérico, el ácido nonadecanoico y el ácido oleico; otros compuestos como la alantoina, la cumarina, el daucosterol (De Sousa JR, et al. "Dibenzyl trisulphide and trans-N-methyl-4-methoxyproline from *Petiveria alliacea*." *Phytochemistry* 1990, 29:3653-3655. Delle-Monache F, et al: "11. Further Flavonoids and Triterpenes". *Gazzeta Chimica Italiana* 1996, 126:275-278. Delle Monache F, Cuca LE: "6-C-formyl and 6-C hidroxymethyl flavonones from *Petiveria alliacea*." *Phytochemistry* 1992, 31:2481-2482), diversos dipéptidos glutámicos (Kubec R, et al. "Gamma-Glutamyl dipeptides in *Petiveria alliacea*." *Phytochemistry* 2005, 66:2494-7), amino ácidos que contienen azufre tales como S-bencilcistein sulfóxidos y S-(2-hidroxietil) cistein sulfóxidos (Kubec R, et al. "Cysteine sulfoxide derivatives in *Petiveria alliacea*." *Phytochemistry* 2001, 58:981-5. Kubec R, et al. "S-Substituted cysteine derivatives and thiosulfinateformation in *Petiveria alliacea* part II." *Phytochemistry* 2002, 61:675-80) y el dibencil trisulfuro (DTS) un compuesto lipofílico que presenta actividad inmunomoduladora (Rosner H, et al. "Disassembly of microtubules and inhibition of neurite outgrowth, neuroblastoma cell proliferation, and MAP kinase tyrosine dephosphorylation by dibenzyl trisulphide." *Biochim Biophys Acta* 2001, 1540:166-77) y citotóxica relacionada con el citoesqueleto (Williams LA, et al. A critical review of the therapeutic potential of dibenzyl trisulphide isolated from *Petiveria alliacea* L [guinea hen weed, anamu]. *West Indian Med J* 2007, 56:17-21). Aun cuando el DTS mostró excelente actividad citotóxica, su alta toxicidad que incluso afecta a células normales no ha permitido su uso a nivel clínico y terapéutico (Williams LA, et al. A critical review of the therapeutic potential of dibenzyl trisulphide isolated from *Petiveria alliacea* L [guinea hen weed, anamu]. *West Indian Med J* 2007, 56:17-21).

En la presente invención se divulga una fracción bioactiva de *Petiveria alliacea*, que induce la muerte celular por diferentes vías: actúa sobre el citoesqueleto induciendo detención del ciclo celular en la fase G2; y posteriormente, induce apoptosis por mecanismos dependientes o independientes de la mitocondria relacionados con la polaridad de la fracción. La complejidad de las fracciones de la invención permite además la inducción de estrés celular alterando la expresión de HSP70 inducible y generando la senescencia de una parte de la población celular, permitiendo así la amplificación de la respuesta inmune. Por tanto, la actividad biológica de las fracciones de la invención sobre múltiples blancos moleculares de las células tumorales, abre la posibilidad de superar los mecanismos de resistencia a los fármacos desarrollados por las células tumorales.

La inducción de la respuesta inmune depende de varios factores, dentro de estos los restos celulares generados durante la apoptosis y la necrosis, han sido reportados como fuente de antígenos que pueden ser fagocitados por las CDs (células presentadoras de antígeno profesionales) para activar el sistema inmune. En la presente invención, aseguramos que la célula dendrítica inmadura pueda fagocitar y procesar los antígenos tumorales, lo cual se realiza de una forma menos eficiente por una célula activada. Posteriormente, se induce la activación de la célula dendrítica con un agente inmunoestimulante, que utilizado luego del tratamiento antitumoral, permite la presentación antigénica a los linfocitos T y la generación de una respuesta inmune efectiva. Los beneficios de este tipo de terapia son el asegurar que una vez la célula tumoral haya sido destruida, la célula CD se active totalmente para evitar la inducción de tolerancia y la activación de la respuesta inmune de una célula efectora.

Basándose en lo anteriormente presentado, la presente invención enseña una fracción bioactiva de *Petiveria alliacea* con actividad antitumoral sobre múltiples objetivos celulares y un agente inmunoestimulante para usar en un método para la eliminación de células tumorales, donde las CDs presentadoras de antígeno, las cuales han fagocitado in vivo los restos de las células tumorales se activan mediante el agente inmunoestimulante. Esta

doble terapia permite la destrucción del tumor y posteriormente, la activación de la respuesta inmune específica del tumor por un mecanismo de sensibilización cruzada.

Así mismo, la invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer que comprende una fracción bioactiva de *Petiveria alliacea* con actividad antitumoral y al menos uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Dicha composición puede ser administrada independientemente o como parte de una combinación para el tratamiento del cáncer que comprende la composición previamente definida y uno o más agentes inmunoestimulantes capaces de inducir la maduración fenotípica y/o funcional de las CDs.

OBJETOS DE LA INVENCION

En un primer objetivo, la invención se refiere a una fracción bioactiva de *Petiveria alliacea* obtenida por metodologías biodirigidas, estandarizada y marcada analíticamente para el tratamiento del cáncer.

En un segundo objetivo, la invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer que comprende la fracción bioactiva de *Petiveria alliacea* y al menos uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En un tercer objetivo, la invención proporciona una combinación farmacéutica para el tratamiento del cáncer que comprende la fracción bioactiva de *Petiveria alliacea* o una composición farmacéutica que la contiene y al menos un agente inmunoestimulante capaz de producir la maduración fenotípica y/o funcional de las células dendríticas.

Igualmente, es parte de la invención el uso de dicha fracción en la producción de medicamentos para el tratamiento del cáncer y un kit de tratamiento que comprende una composición que contiene la fracción bioactiva de *Petiveria alliacea* y al menos uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, una composición que comprende uno o más agentes inmunoestimulantes capaces de producir la maduración fenotípica y/o funcional de las células dendríticas y al menos uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables y opcionalmente, las instrucciones de uso.

Finalmente, la invención describe la fracción bioactiva de *Petiveria alliacea* o la composición que la contiene y al menos un agente inmunoestimulante para utilizar en un método para el tratamiento del cáncer que comprende la administración secuencial de una cantidad terapéuticamente efectiva de la fracción bioactiva de *Petiveria alliacea* o la composición que la contiene y, en un intervalo de tiempo entre 24 horas y 2 semanas, la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un agente inmunoestimulante capaz de producir la maduración fenotípica y/o funcional de las células dendríticas.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra la viabilidad de la línea celular tumoral NB4 tratadas con extractos de *Petiveria alliacea* obtenidos con etanol, acetato de etilo y diclorometano.

La figura 2 muestra el efecto inducido por la fracción bioactiva FAST de *Petiveria alliacea* de la invención sobre la capacidad clonogénica de la línea celular 4T1.

La figura 3 muestra el incremento del RNAm de la Piruvato quinasa en la línea celular 4T1 tratada con la fracción bioactiva FAST de *Petiveria alliacea* de la invención.

La figura 4 muestra el espectro de masas de la fracción bioactiva FAST de *Petiveria alliacea* de la invención obtenido con una cromatografía líquida con espectrometría de masas de tiempo de vuelo (LC-TOF-MS) con ESI en modo positivo y negativo.

La figura 5 muestra la detención en la fase G2/M del ciclo celular la línea celular tumoral A375 inducido por la fracción bioactiva F4 de *Petiveria alliacea* (que no forma parte de la invención). (A) Distribución del ciclo celular para los tratamientos: etanol (control negativo), fracción bioactiva F4 y vincristina (control positivo). (B) Distribución del ciclo celular de la línea celular tumoral A375 tratada con la fracción bioactiva F4 durante 12, 24 y 48 h.

La figura 6 muestra la organización de las fibras de actina en la línea celular tumoral A375 (A) y tratada con la fracción bioactiva F4 de *Petiveria alliacea* (que no forma parte de la invención).

La figura 7 muestra la fragmentación del ADN en la línea celular tumoral A375 inducida por el tratamiento con la fracción bioactiva F4 de *Petiveria alliacea* (que no forma parte de la invención) (B) comparado con el control (A).

La figura 8 muestra el efecto de la fracción bioactiva F4 de *Petiveria alliacea* (que no forma parte de la invención) sobre el crecimiento de las células mononucleares humanas con (B) o sin (A) fitohemaglutinina.

5 La figura 9 corresponde al cromatograma de la fracción bioactiva F4 (que no forma parte de la invención) obtenido por HPLC (columna RP-18, fase móvil H₂O: ACN (4:6)) con detector PDA.

La figura 10 muestra el espectro de masas de la fracción bioactiva F4 de *Petiveria alliacea* (que no forma parte de la invención) obtenido con un detector MALDI-TOF con matriz HCCA.

10 La figura 11 muestra los efectos de la fracción bioactiva S3 de *Petiveria alliacea* (que no forma parte de la invención) en la morfología y la viabilidad de NB4 (A), Mel-Rel (B) y K562 (C).

15 La figura 12 muestra el efecto en la membrana mitocondrial inducido por la fracción bioactiva S3 de *Petiveria alliacea* (que no forma parte de la invención) sobre las líneas celulares tumorales NB4, Mel-Rel y K562.

La figura 13 muestra la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear en las líneas celulares tumorales NB4 tratadas con la fracción bioactiva S3 de *Petiveria alliacea* (que no forma parte de la invención) a una concentración de 31,2 µg/ml durante 24 h.

20 La figura 14 muestra la disminución en la expresión de la Hsp70 inducida por la fracción bioactiva S3 de *Petiveria alliacea* (que no forma parte de la invención) en la línea celular tumoral K562 con (A) o sin (B) choque térmico.

25 La figura 15 muestra el espectro de masas de la fracción bioactiva S3 de *Petiveria alliacea* (que no forma parte de la invención) obtenido con una cromatografía líquida con espectrometría de masas de tiempo de vuelo (LC-TOF-MS) con ESI en modo positivo y negativo.

30 La figura 16 muestra la expresión de CD86 y HLA-DR sobre una población de CD tratada con agua (control negativo), LPS (control positivo) y el polisacárido inmunoestimulante.

La figura 17 muestra la producción de TNF-α determinada por ELISA en una población de CD estimulada por el polisacárido.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

35 La expresión “**agente inmunoestimulante**” hace referencia a un agente que es capaz de producir la maduración fenotípica (aumento de CD86 y HLA-DR) y/o funcional de las células dendríticas (producción de TNF-α) y son ejemplos especialmente considerados dentro de la invención polisacáridos y/o glicopéptidos obtenidos a partir de: *Ganoderma lucidum*, *Astragalus membranaceus*, *Grifola frondosa*, *Phellinus linteus*, *Cordyceps militaris*, *Lentinus edodes*, *Coriolus versicolor*, *Agaricus blazei* o *Petiveria alliacea*.

40 La expresión “**fracción bioactiva estandarizada**” es utilizada para denominar una fracción o mezcla compleja de moléculas activas con actividad biológica obtenida a partir de *Petiveria alliacea* por métodos de separación convencionales que incluyen maceración del material vegetal, calentamiento a reflujo y cromatografía de tipo analítico, semipreparativo o preparativo. La estandarización de fracciones con actividad biológica requiere de la implementación de las buenas prácticas de agricultura y de manufactura ya que la composición cualitativa y cuantitativa puede variar dependiendo de factores relacionados con la planta (condiciones climáticas, prácticas de cosecha y recolección) y metodologías de extracción. En este sentido, las normas internacionales de la OMS [WHO Guidelines on good Manufacturing Practices (GMP) for Herbal Medicines. World Health Organization 2007] establecen la huella cromatográfica obtenida mediante técnicas analíticas modernas (GC, HPLC y HPTLC) como una herramienta idónea para realizar el control de calidad y la estandarización de las preparaciones a base de plantas (World Health Organization, Geneva 2007). Este patrón brinda una fotografía completa de la proporción de los analitos, la cual permite realizar una aproximación cualitativa y cuantitativa para autenticar el material vegetal, evaluar la calidad y medir la estabilidad de las preparaciones a base de plantas (Peishan Xie. 2006). El análisis de esta huella se realiza mediante un sistema multivariado quimiométrico a partir de la evaluación de la semejanza (coeficientes de correlación y congruencia) y los métodos de reconocimiento de patrones químicos tales como K-nearest neighbors – KNN - y modelado suave independiente por analogía de clases (soft independent modeling of class analogy) - SIMCA - (Liang Y., Xie P., Chan K., 2004).

60 La expresión “**fracción bioactiva de *Petiveria alliacea* obtenida por metodologías biodirigidas**” se entiende como un extracto semiprocésado obtenido a partir de un proceso de fraccionamiento racional y dirigido que se realiza a partir del extracto crudo de la planta, utilizando pruebas biológicas como criterio para la tamización y selección de las fracciones.

La expresión “**fracción bioactiva marcada analíticamente**” hace referencia a una fracción bioactiva en la cual sus componentes han sido cuantificados a partir de la utilización de compuestos marcadores internos o externos por medio de técnicas cromatográficas.

5 La expresión “**administración secuencial**” hace referencia a la administración de dos o más composiciones farmacéuticas de la fracción bioactiva de *Petiveria alliacea* con actividad antitumoral y un agente inmunoestimulante en un tiempo entre 24 horas y 2 semanas, preferiblemente, entre 72 y 192 horas. Esta administración secuencial permite la fagocitosis de los restos tumorales por las células dendríticas inmaduras.

10 La expresión “**administración simultánea**” hace referencia a la administración conjunta de una composición farmacéutica de la fracción bioactiva de *Petiveria alliacea* con actividad antitumoral y un medicamento convencional utilizado en quimioterapia.

15 La expresión “**cantidad terapéuticamente efectiva**” se entiende como el nivel de dosificación suficiente de los medicamentos o fracciones bioactivas necesarios para inducir un efecto biológico deseado en un balance riesgo/beneficio aceptable. La expresión “**terapéutico**” incluye el tratamiento o profilaxis de una enfermedad para un mamífero incluyendo el hombre.

20 La presente invención proporciona entonces, una serie de fracciones biológicamente activas – fracciones bioactivas – obtenidas a partir de *Petiveria alliacea* por metodologías convencionalmente mediante un enfoque bio guiado. Las fracciones estandarizadas se entienden como mezclas complejas y se denominaron de acuerdo con la metodología de extracción y purificación aplicada como FAST (fracción de la invención), F4 (que no forma parte de la invención) y S3 (que no forma parte de la invención). Para la obtención de las diferentes fracciones bioactivas, se procedió al lavado y descontaminación de la planta, su secado y molido hasta lograr el tamaño de
25 partícula requerido.

Inicialmente, se obtuvieron los extractos crudos de *Petiveria alliacea* en solventes orgánicos (etanol, diclorometano y acetato de etilo) para evaluarlos en las líneas celulares tumorales. El ejemplo 1 (figura 1) muestra claramente que el extracto obtenido con acetato de etilo induce la mayor citotoxicidad en las células tumorales NB4, comparado con etanólico (el cual ha sido el más comúnmente utilizado y obtenido por diferentes laboratorios) y con diclorometano.

30 A partir de estos resultados, se seleccionó el extracto de acetato de etilo como matriz para la obtención de las fracciones. La fracción bioactiva FAST fue obtenida por extracción a reflujo en etanol, filtración y evaporación, extracción líquido-líquido en acetato de etilo, secado y separación por RP-18 usando como fase móvil MeOH-H₂O (1:1, 7:3 y 9:1). Una de las fracciones eluidas con MeOH:H₂O 7:3 se denominó FAST, que es la fracción de la invención.

40 La fracción bioactiva F4 (que no forma parte de la invención) fue obtenida por extracción a reflujo en etanol, filtración y evaporación, extracción líquido-líquido en acetato de etilo, secado y separación por RP-18 usando como fase móvil MeOH-H₂O (1:1, 7:3 y 9:1). Una de las fracciones obtenidas con MeOH:H₂O 7:3 se denominó F4 (que no forma parte de la invención).

45 La fracción bioactiva S3 (que no forma parte de la invención) fue obtenida por extracción en Soxhlet con éter (4L), diclorometano, acetato de etilo y etanol 96 % durante 48 h. Los extractos fueron filtrados y evaporados hasta la sequedad. El extracto de acetato de etilo se floculó con EtOH:H₂O 1:1 y se sometió a calentamiento a 65 °C durante 20 min. El sobrenadante se recupero y se percoló a través de Silica Gel G-60 con diclorometano, acetato de etilo y etanol 96%. La fracción de acetato de etilo fue recuperada y sometida a fraccionamiento en una columna de Silica Gel G-60 y eluida con diclorometano: acetato de etilo (7:3, 1:1), acetato de etilo y etanol 96%. La fracción denominada S3 (que no forma parte de la invención) corresponde a la fracción eluida con el sistema de solventes diclorometano: acetato de etilo (7:3).

50 La fracción bioactiva FAST de la invención disminuye la capacidad clonogénica en las líneas celulares tumorales 4T1 y K562 (ejemplo 2, figura 2), induciendo adicionalmente una alteración del metabolismo de la glucosa reflejado por un aumento en la expresión del ARNm de la Piruvato kinasa en la línea celular tumoral 4T1, determinada por RT-PCR (ejemplo 3, figura 3). La fracción fue caracterizada mediante HPLC-UV y espectrometría de masas (MS) (figura 4) usando una cromatografía líquida con espectrometría de masas de tiempo de vuelo (LC-TOF-MS) en modos ESI positivo y negativo, lo que permitió establecer la presencia de los siguientes compuestos, por la técnica de derivatización:
55
60

RT (min)	Relación m/z	Compuestos identificados
29,37	314	Petiveral/leridol
33,42	298	Leridal 7-demetil
48,27	278	Dibencil trisulfuro

A partir de los resultados obtenidos por MS se estableció la abundancia relativa de los compuestos marcadores de la fracción bioactiva FAST de *Petiveria alliacea* de la invención como parámetro de caracterización de la misma.

5

Compuesto	% en peso respecto a fracción bioactiva total
4-etil petiveral	0,01-31
Ácido Lignocérico	0,01-25
Dibencil disulfuro	0,01-9
Dibencil tetrasulfuro	0,01-9,5
Dibencil trisulfuro	3,8-14
Leridal 7- demetil	0,01-7
Leridal Chalcona	0,01-16,5
Leridol	0,01-15
Miricitrina	0,01-9
Petiveral	20 – 55
Pinitol	0,01-19
S-bencil cistein sulfóxido	0,1-4
Senfol	0,01-16

Preferiblemente, la fracción bioactiva FAST de *Petiveria alliacea* de la invención comprende los compuestos marcadores según la Tabla 3:

Tabla 3	
Compuesto	% en peso respecto a fracción bioactiva total
4-etil petiveral	0,01-5
Ácido Lignocérico	0,01-5
Dibencil disulfuro	0,01-5
Dibencil tetrasulfuro	0,01-5
Dibencil trisulfuro	3,8-7
Leridal 7- demetil	3,8-7
Leridal Chalcona	0,01-5
Leridol	0,01-5
Miricitrina	0,01-5
Petiveral	20,6-38,2
Pinitol	0,01-5
S-bencil cistein sulfóxido	0,01-5
Senfol	0,01-5

10

La fracción bioactiva F4 (que no forma parte de la invención) presenta múltiples actividades induciendo un aumento en la población apoptótica (G₀/G) con un incremento en la fase G₂ en las diferentes líneas celulares tumorales. Así mismo, induce reorganización de los filamentos de actina a nivel del citoesqueleto y fragmentación del ADN independiente de la vía mitocondrial (ejemplos 4 a 7, figuras 5 a 8). La fracción fue caracterizada con HPLC-PDA (figura 9) y MS-MALDI-TOF (figura 10). La fracción bioactiva F4 (que no forma parte de la invención) presenta siete (7) picos característicos en un análisis por HPLC con detector PDA en una columna RP-18 y una fase móvil H₂O: ACN (4:6), su huella cromatográfica característica se muestra en la Tabla 4:

20

Pico	Tiempo de retención (min)	Área (%)	λ (nm)
1	1,46	8,5	279
2	1,79	30,8	278
3	2,29	30,0	266-319
4	2,57	6,0	285
5	2,80	7,5	317
6	3,16	12,2	284
7	3,78	5,0	316

Para realizar la identificación de los compuestos presentes en la fracción bioactiva de *Petiveria alliacea* se realizó la determinación por MS-MALDI-TOF con matriz HCCA, y mediante la técnica de derreplicación se estableció la presencia de los siguientes compuestos:

5

PM	Compuesto
140	Senfol
193	Pinitol
206	Leridal Chalcona
213	Dibencil disulfuro
270	Dibencil trisulfuro
340	4-etil petiveral
369	Ácido Lignocérico
468	Miricitrina

A partir de los resultados obtenidos MS se estableció la abundancia relativa de los compuestos marcadores dentro de la fracción bioactiva F4 de *Petiveria alliacea* (que no forma parte de la invención) como parámetro de caracterización de la misma.

10

Compuesto	% en peso respecto a fracción bioactiva
4-etil petiveral	17-31
Ácido Lignocérico	13-25
Dibencil disulfuro	4,5-9
Dibencil tetrasulfuro	0,01-5
Dibencil trisulfuro	8-14
Leridal-7-demetil	9-16,5
Leridal Chalcona	0,01-5
Leridol	0,01-5
Miricitrina	4,5-9
Petiveral	0,01-5
Pinitol	10-19
S-bencil cistein sulfóxido	0,01-5
Senfol	9-16

La fracción bioactiva S3 (que no forma parte de la invención) disminuye la viabilidad celular tumoral en forma dosisdependiente induciendo depolarización temprana no reversible de la membrana mitocondrial (sin afectar las fases del ciclo celular) en diferentes líneas tumorales humanas y murinas (ejemplos 8 a 11, figuras 11 a 13), así mismo, disminuye la expresión de Hsp70 sobre las células tumorales sometidas o no a choque térmico (figura 14). La muerte de las células tumorales inducida por la fracción bioactiva S3 (que no forma parte de la invención) asociada a cambios morfológicos y fragmentación coordinada del ADN sugiere que la apoptosis es posiblemente mediada por activación endógena de endonucleasas corriente abajo de la mitocondria. La fracción fue caracterizada usando una espectrometría de masas (MS) en una cromatografía líquida con espectrometría de masas de tiempo de vuelo (LC-TOF-MS) con ESI en modo positivo y negativo (figura 15) y por HPLC-UV:

15

20

RT (min)	relación m/z	Compuestos identificados
22,58	228	S-bencil cistein sulfóxido
34,12	278	Dibencil trisulfuro
28,32	310	Dibencil tetrasulfuro
26,68	312	Leridal chalcona
8,31	314	Petiveral o leridol
20,38	314	Leridal o petiveral

A partir de los resultados obtenidos por MS se estableció la abundancia relativa de los compuestos marcadores de la fracción bioactiva S3 de *Petiveria alliacea* (que no forma parte de la invención) como parámetro de caracterización de la misma.

5

Compuesto	% en peso respecto a fracción bioactiva
4-etil petiveral	0,01-5
Ácido Lignocérico	0,01-5
Dibencil disulfuro	0,01-5
Dibencil tetrasulfuro	5-9.5
Dibencil trisulfuro	4,5-8,7
Leridal-7-demetil	0,01-5
Leridal chalcona	19-36
Leridol	8-15
Miricitrina	0,01-5
Petiveral	32-55
Pinitol	0,01-5
S-bencil cistein sulfóxido	2-4
Senfol	0,01-5

Dentro del alcance de la invención, las fracciones bioactivas FAST de *Petiveria alliacea* de la invención pueden ser formuladas como composiciones farmacéuticas que incluyen uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Estas composiciones farmacéuticas pueden ser especialmente diseñadas para administración oral en formas de dosificación farmacéutica sólidas o líquidas, para administración tópica en formas heterodispersas (por ejemplo, cremas W/O, cremas O/W, geles, etc.) o para administración parenteral o rectal. Estas composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administradas a humanos y otros mamíferos oralmente, rectalmente, parenteralmente, tópicamente, intravaginalmente, o como spray nasal.

10

Las composiciones para administración oral, pueden incluir formas de dosificación farmacéutica convencionales, como comprimidos, cápsulas, formas bucales y líquidos orales, suspensiones o soluciones. Las cápsulas pueden contener moléculas activas mezcladas con excipientes y diluyentes como, pero no restringidos a, almidones farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, maíz, patata, etc.), azúcares, agentes endulzantes artificiales, celulosa en polvo (CMC, MC, EC, HPMC), harinas, gelatinas y gomas entre otros.

20

Las composiciones en comprimidos pueden elaborarse por métodos de compresión convencional, granulación húmeda o seca y pueden utilizarse excipientes tales como, pero no limitados a, diluyentes o agentes de relleno, ligantes, desintegrantes, lubricantes, agentes de modificación de superficie, agentes colorantes, agentes de suspensión o estabilización, incluyendo pero no limitado al estearato de magnesio, ácido esteárico, talco, laurilsulfato de sodio, celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, gelatina, ácido alginico,

25

goma acacia, goma xantoma, citrato de sodio, silicatos complejos, carbonato de calcio, lactosa, caolín, manitol, cloruro de sodio, almidones secos y azúcar en un grado farmacéuticamente aceptable. Así mismo, las composiciones farmacéuticas orales de la invención pueden ser formulaciones de liberación convencional o de liberación controlada y sostenida para alterar la liberación de los agentes activos.

En otro aspecto adicional, la invención presenta una combinación farmacéutica para el tratamiento del cáncer que comprende una fracción bioactiva FAST de *Petiveria alliacea* de la invención o la composición farmacéutica que la contiene y al menos un agente inmunoestimulante capaz de producir la maduración fenotípica y/o funcional de las células dendríticas.

En el alcance de la invención, los agentes inmunoestimulantes capaces de producir la maduración fenotípica y/o funcional de las células dendríticas son fracciones o compuestos aislados de hongos o plantas, son ejemplos preferidos los polisacáridos y/o glicopéptidos obtenidos a partir de *Ganoderma lucidum*, *Astragalus membranaceus*, *Grifola frondosa*, *Phellinus linteus*, *Cordyceps militaris*, *Lentinus edodes*, *Coriolus versicolor*, *Agaricus blazei* o *Petiveria alliacea*. *Ganoderma lucidum* es un hongo ampliamente utilizado en China, Corea y Japón que cuenta con un historial de uso en la medicina tradicional superior a cuatro milenios. En Japón es llamado Reishi o Mannetake, en China y Corea es llamado Ling Chu, Ling Chih y Ling Zhi (Hongo de Inmortalidad). El hongo y el micelio contienen esteroides, lactonas, alcaloides, polisacáridos y triterpenos. *G. lucidum* ha mostrado actividad como modulador inmune, antiviral y antitumoral, dentro de sus metabolitos activos ha sido aislado un glicopéptido ((PS-G) (1→6)-(β-D-glucano (95 %) y péptido (5 %), el cual ha mostrado actividad antineoplásica (Wang et al., 1997). El péptido también aumenta la actividad citotóxica en células NK y la liberación de TNF-α y IFN-γ en macrófagos y linfocitos, respectivamente (Lee et al., 1995). Así mismo, ha sido mostrado que PS-G induce importantes cambios en el fenotipo y función de CD (Lin et al., 2005).

Astragalus membranaceus (Bunge) es una planta china ampliamente conocida por su actividad inmunomoduladora. Diversos polisacáridos han sido aislados a partir de su raíz, entre los que se encuentran Astragalan I, el cual es un heteropolisacárido neutral (36KD) que contiene glucosa, galactosa y arabinosa, astragalan II y III que tienen glucanos de 12 y 34kD, respectivamente, AmemP, un polisacárido de carácter ácido (60KD) con un alto contenido de ácido urónico, AmonS, un polisacárido ácido de 76KD compuesto por arabinosa, galactosa, ácido galacturónico y ácido glucurónico en relación 18:18:1:1 (Shimizu et al., 1991) y APSID-3, un heteropolisacárido compuesto de arabinosa, ramnosa y metil galacturonato (Wang et al., 2006). Las fracciones de estos polisacáridos inducen maduración morfológica de las CD in vitro junto a un incremento en la expresión de CD-11c y MHC clase II sobre la superficie, así mismo, disminuyen la capacidad fagocítica (recaptación de FITC-dextrano) frente a CD inmaduras (Shao, et al., 2006).

Grifola frondosa, conocido como Maitake, es un hongo comestible de un excelente sabor y aroma, es componente de una amplia variedad de medicinas tradicionales Chinas. A partir *G. frondosa* se obtiene un polisacárido denominado fracción D, el cual es utilizado como suplemento nutricional en el tratamiento contra el cáncer. Esta fracción es obtenida a partir del micelio o el fruto por medio de una extracción en agua caliente, precipitación con etanol y posteriormente tratamiento con ácido acético y álcalis, comprende β-1,6-glucanos ramificados en posiciones β-1,3 (grifolan, soniflan y SSG) y proteína de 1000KD. La fracción D ha mostrado un aumento de la respuesta inmune innata y adaptativa en ratones normales C3H/HeJ, donde los resultados sugieren que la fracción induce una respuesta dominante Th₂ a través de la activación de macrófagos y el incremento en la producción de IL4 e IL10 complementario a la activación de células presentadoras de antígeno (incremento en la expresión de CD69 y CD89) después de 4 h de tratamiento (Kodama, Muraya & Nanba, 2004).

Phellinus linteus es un Basidiomiceto perenne originario de la China y Corea a partir del cual se han aislado complejos de proteína-polisacárido (PPC). El polisacárido del complejo es ácido con propiedades inmunoestimuladoras. El PPC tiene un peso de 73KD, donde 73 % corresponde al polisacárido (compuesto principalmente glucosa y manosa) y 13 % a la proteína (Asp, Thr, Ser, Glu, Pro, Gly, Ala, Val). El PPC induce un aumento dosisdependiente en la expresión de las moléculas coestimuladoras CD86 y MHC clase II, así como una maduración fenotípica acompañada de disminución en la capacidad endocítica de las CD mieloides in vitro tras 24 h de tratamiento (Kim, et al., 2006). De la misma forma, polisacáridos de tipo ácido han mostrado actividad como estimulantes de la proliferación de LT, inhibidores de crecimiento tumoral e inductores de la maduración fenotípica de CD derivadas de médula ósea murina incrementando la expresión de CD80, CD86, MHC I, MHC II e IL12 y reduciendo la recaptación de dextrano (Park SK, et al., 2003).

Cordyceps militaris es un hongo parasitario de larvas de Lepidoptera, ha sido usado por siglos en la medicina tradicional China por sus propiedades antitumorales e hipoglicemiantes, dentro de los compuestos bioactivos aislados de su micelio se tienen nucleósidos (cordicepina, opicordina), galactomanano, triptófano y polisacáridos (Li et al., 2006). La fracción acuosa de *C. militaris* rica en polisacáridos ha mostrado actividad antitumoral e inmunomoduladora in vivo e in vitro, así mismo esta fracción induce la maduración fenotípica y funcional de las CD murinas mieloides, incrementando la expresión de CD40, CD54, CD80, CD86, MHC II y la secreción de IL-12. De la misma forma, las CD tratadas con la fracción y pulsadas con lisado tumoral P815 promueven la citotoxicidad de LT citotóxicos (Gi-Young, et al., 2006).

Lentinus edodes conocido como "Shiitake" en Japón y "Xiang gu" en China es un hongo ampliamente utilizado como alimento y medicina tradicional. Su actividad antitumoral e inmunoestimulante ha sido demostrada en diferentes estudios realizados en animales y humanos. Al menos cinco polisacáridos han sido aislados de las fracciones activas de *L. edodes*, lentinan, disponible comercialmente en US y Europa, es un polisacárido de alto peso molecular (450KD) que corresponde a un β -1,3-glucano ramificado con dos unidades de β -1,6-D-glucopiranosil por cada cinco unidades de β -1,3-glucopiranosido lineal, es soluble en agua y se encuentra en muy bajas concentraciones (0,02 %) en hongos frescos (Sasaki and Takasuka, 1976), LEM un heteropolisacárido asociado a proteína derivado del micelio y el KS-2 un péptido β -manano que contiene los amino ácidos serina, treonina, alanina y prolina. Los extractos acuosos de *L. edodes* han mostrado actividad citostática in vitro evaluada en células MCF-7 (adenocarcinoma humano de mama) mediante el test de citotoxicidad MTT e inmunomoduladora en términos de actividad mitogénica y comitogénica establecida a través del test de transformación linfocitaria (LTT). LTT es un test basado en el aumento de la proliferación de timocitos de rata a mitógenos de LT in vitro (Israilides, et al., 2008).

Coriolus versicolor es un hongo Basidiomiceto utilizado en la medicina tradicional China con propiedades inmunoestimulantes y antitumorales. Diferentes extractos obtenidos a partir de *C. versicolor* son comercializados en Japón y otros países como medicamentos contra el cáncer (PSK) o suplementos dietéticos (PSP y VPS). PSK un polisacárido unido a proteína compuesto principalmente por un β -1,4-glucano aislado de la cepa CM-101 que induce aumento en la secreción de citocinas en células mononucleares humanas de sangre periférica in vitro y aumenta la expresión de TNF- α e IL-8 en voluntarios sanos y pacientes con cáncer gástrico. Así mismo, PSK promueve la maduración fenotípica y funcional de CD (derivadas de células mononucleares CD14+ cultivadas en presencia de PSK), incrementa la expresión de HLA clase II, CD80, CD86 y CD83, disminuye la recaptación de FITC-dextrano, aumenta la producción de IL-12, la reacción de linfocitos mixtos alogénicos e induce citotoxicidad antígeno específica (Kanazawa, et al., 2004). PSP un polisacárido-péptido aislado de la cepa COV-1 que corresponde químicamente a un heteropolisacárido compuesto por α -1,4-glucano, β -1,3-glucano, ramnosa y arabinosa, con un tamaño de 100KD. PSP ha mostrado actividad antitumoral en pacientes con cáncer esofágico, gástrico y pulmonar, así mismo induce la producción de IL-2 e IFN- γ y la proliferación de LT en modelos animales (Ng TB, 1998).

Agaricus blazei Murril conocido popularmente como "Cogumelo do Sol" en Brasil o "Himematsutake" en Japón. El hongo se utiliza tradicionalmente utilizado en tratamientos de aterosclerosis, hepatitis, hiperlipidemia, diabetes, dermatitis y cáncer (Firenzouli, et al., 2007). Dentro de sus metabolitos activos se tiene un proteoglicano soluble en agua compuesto por un 45 % de proteína y un 50 % de un β -1,6-glucano (ramificado β -1,3), el cual induce la activación policlonal de las células B y ejerce una potente actividad como inhibidor del crecimiento tumoral y de la metástasis. Así mismo, aumenta la expresión de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) y MHC clase II, disminuye la recaptación de FITC-dextrano e incrementa la proliferación de linfocitos T alogénicos en CD murinas derivadas de médula ósea después de 24 h de tratamiento con el proteoglicano (Kim, et al., 2005).

En un objeto adicional, la invención comprende el uso de la fracción bioactiva FAST de *Petiveria alliacea* de la invención como ingrediente activo para la preparación de medicamentos para tratar el cáncer. Asimismo, la invención muestra el uso de dicha fracción bioactiva FAST de *Petiveria alliacea* de la invención junto con otros compuestos, fracciones o extractos aislados para la preparación de medicamentos. También se considera parte de la invención, la fracción bioactiva de *Petiveria alliacea* de la invención o la composición farmacéutica que la contiene para su uso en el tratamiento del cáncer, donde la fracción bioactiva de *Petiveria alliacea* de la invención o la composición farmacéutica que la contiene es agente coadyuvante de la quimioterapia para el tratamiento del cáncer.

En un objeto adicional, la invención abarca un kit para el tratamiento del cáncer que comprende una primera composición farmacéutica que contiene la fracción bioactiva FAST de *Petiveria alliacea* de la invención, una segunda composición farmacéutica que contiene uno o más agentes inmunoestimulantes capaces de producir la maduración fenotípica y/o funcional de las células dendríticas y al menos uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, instrucciones de uso.

En otro objeto, la invención incluye al menos la fracción bioactiva FAST de *Petiveria alliacea* de la invención o la composición farmacéutica que la contiene y al menos un agente inmunoestimulante o composición farmacéutica que lo contiene para usar en un método de tratamiento del cáncer, que comprende la administración secuencial de la fracción bioactiva FAST de *Petiveria alliacea* de la invención o la composición farmacéutica que la contiene y en un intervalo de tiempo entre 24 horas y 2 semanas, la administración del al menos un agente inmunoestimulante o composición farmacéutica que lo contiene capaz de producir la maduración fenotípica y/o funcional de las células dendríticas.

Opcionalmente, se proporciona al menos la fracción bioactiva FAST de *Petiveria alliacea* de la invención o la composición farmacéutica que la contiene y un medicamento quimioterapéutico usado en la quimioterapia para su uso en un método para el tratamiento del cáncer, donde la al menos la fracción bioactiva FAST de *Petiveria alliacea* de la invención o la composición farmacéutica que la contiene y el medicamento quimioterapéutico se administran simultánea o secuencialmente.

Los niveles de dosificación de las fracciones y los agentes inmunoestimulantes en la combinación farmacéutica de la invención pueden variar para obtener la cantidad de principio activo requerida para alcanzar la respuesta terapéutica deseada dependiendo de las condiciones fisiológicas y patológicas del sujeto, la composición y la ruta de administración. Los niveles de dosificación seleccionados dependen de la potencia de la fracción, la ruta de administración, la severidad de la condición tratada y la historia médica previa de cada paciente.

La dosis diaria total de las fracciones y compuestos usados en las composiciones farmacéuticas puede variar en el rango de 0,001 a 1000 mg/Kg/día. Para el modo de administración oral, las dosis preferibles se encuentran en el rango de 0,001 a 5 mg/Kg/día. La dosis efectiva diaria puede ser dividida en dosis múltiples, consecuentemente la invención comprende composiciones farmacéuticas de dosis múltiples que contienen la cantidad efectiva o dosis múltiples que alcanzan la dosis diaria efectiva tras varias administraciones.

A continuación se presentan a título ilustrativo los hechos científicos que sustentan la presente invención y no deben entenderse como límites de la invención.

LÍNEAS CELULARES

Mel-Rel se estableció como línea celular de melanoma y fue obtenida a partir de un tumor de ratón transgénico REL (donada por la Dra. Armell Prevost, Cochin Hospital, París, Francia). A375 son células de melanoma humano, donadas por el Instituto de Investigaciones de la Universidad del Rosario (Bogotá, Colombia). NB4 (leucemia mieloide humana), 4T1 (tumor mamario murino) y K562 (eritroleucemia humana) son líneas celulares de ATCC. Las células fueron suspendidas en medio RPMI-1640 suplementado (10 % suero fetal bovino, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 mg/ml estreptomina, 0,01 M HEPES) e incubadas a 37 °C con 5 % CO₂ en atmósfera húmeda. Después de alcanzar 80 % de confluencia, las células adherentes fueron despegadas (tripsina/EDTA), lavadas (PBS) y suspendidas en medio completo. El análisis de la citotoxicidad fue realizado en placas de 96 pozos y los las fracciones se diluyeron en etanol o DMSO en porcentajes inferiores al 0,2 % (concentración final).

Para los ensayos en células normales, células mononucleares de sangre periférica humanas (CMSP) de voluntarios sanos fueron separadas por centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll-Hipaque, Amersham Biosciences). Las CMSP fueron mantenidas en medio RPMI-1640 suplementado (10 % suero fetal bovino, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 mg/ml estreptomina, 0,01 M HEPES) e incubadas a 37 °C con 5 % CO₂ en atmósfera húmeda.

EJEMPLO 1. EVALUACIÓN DE LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR EXTRACTOS CRUDOS DE *PETIVERIA ALLIACEA*.

Las células NB4 fueron tratadas con 250 µg/ml de los diferentes extractos de *Petiveria alliacea* por 24 horas, y la viabilidad celular fue calculada con azul de tripano. Como control positivo se utilizó etopósido a 100 µg/ml. Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad (Figura 1). La figura muestra claramente que el extracto crudo etanólico (utilizado en el estado de la técnica) induce solamente un 50 % de mortalidad de las células tumorales mientras que el extracto obtenido con acetato de etilo (base de la presente invención) induce una mortalidad de cerca del 80 %, mostrando la superioridad biológica del extracto de la invención con respecto a los extractos utilizados convencionalmente.

A partir de estos resultados, se selecciono el extracto crudo de acetato de etilo como matriz para la obtención de las fracciones que serán descritas a continuación y que son reivindicadas en la presente invención.

EJEMPLO 2. EFECTO DE LA FRACCIÓN FAST DE *PETIVERIA ALLIACEA* SOBRE LA CAPACIDAD CLONOGÉNICA DE LAS LÍNEAS CELULARES 4T1

Las células 4T1 (2,5x10⁵ células/pozo) sembradas (placas de 24 pozos), fueron tratadas con la fracción FAST 7:3 de la invención a 40 y 20 µg/ml, Vincristina 100 mM (fármaco quimioterapéutico convencional) como control positivo o Etanol 0,2 %, e incubadas por 6 horas en atmosfera húmeda 37 °C y 5 % CO₂. Después del tratamiento, las células fueron resembradas sobre placas de agar al 0,5 % (20 000 células/placas de 60 mm), se incubaron por 14 días (37 °C y 5 % CO₂) y se tiñeron con cristal violeta (0,4 % en etanol). Las colonias celulares con más de 50 células fueron contadas. Los tratamientos se llevaron a cabo por triplicado, y los resultados se expresaron como la media ± DS (figura 2).

La fracción bioactiva FAST de la invención induce una disminución estadísticamente significativa en el número de colonias de las líneas celulares tumorales 4T1 en concentraciones de 40 y 20 µg/mL mostrando la actividad de la fracción de *P. alliacea* como inhibidor de la capacidad clonogénica de líneas tumorales.

EJEMPLO 3. EXPRESIÓN DEL GEN PARA PIRUVATO KINASA ISOFORMA P-KL EN LA LÍNEA CELULAR 4T1 TRATADA CON FRACCIÓN BIOACTIVA FAST

Las células 4T1 fueron tratadas con la fracción FAST 7:3 a 20 µg/ml o etanol (control negativo) por 6, 12, 16 y 24 h. El RNA fue extraído utilizando trizol y la síntesis del cADN fue realizada utilizando superscript III. Para la amplificación del gen de la piruvato kinasa por PCR-TR se utilizó LightCycler FastStart ADN Master Plus SYBR Green I.

Se observó un aumento superior a 20 veces del RNAm de piruvato kinasa en la línea celular 4T1 tratada con la fracción bioactiva FAST de *Petiveria alliacea* de la invención. Este resultado confirma la alteración en el metabolismo de la glucosa inducida por la fracción de *P. alliacea* que explica la actividad antitumoral reportada para la fracción de *P. alliacea* (figura 3).

EJEMPLO 4. ARRESTO EN LA FASE G₂/M DEL CICLO CELULAR DE LA LÍNEA CELULAR TUMORAL A375 INDUCIDO POR EL TRATAMIENTO CON LA FRACCIÓN BIOACTIVA F4 DE *PETIVERIA ALLIACEA* (que no forma parte de la invención)

La actividad citotóxica de la fracción bioactiva F4 (que no forma parte de la invención) fue evaluada sobre la línea celular tumoral A375 en concentraciones de 3,9 a 125 µg/ml. Las evaluaciones fueron realizadas cuando más del 50 % de la población estaba muerta o presentaba alteraciones morfológicas. Después del tratamiento por 24 h se observa la actividad citotóxica de la fracción y alteraciones morfológicas (células deformadas y despegadas) a 31,2 mg/mL.

A partir de estos resultados se evaluó el efecto sobre el ciclo celular para lo cual las células fueron sincronizadas durante 72 h (para inducir arresto en G₁), sembradas en una placa de 12 pozos (4,0 x 10⁵ células/pozo), donde fueron tratadas con una fracción F4 (que no forma parte de la invención) (31,2 µg/ml) durante 12, 18, 24 y 48 h en atmósfera húmeda a 37 °C y 5 % CO₂. Después del tratamiento, las células fueron lavadas y fijadas con etanol (muy frío 70 %) durante 18 h. Después de haber sido fijadas, las células fueron suspendidas en PBS IX, 100 U/ml RNAsa y 50 µg/ml de yoduro de propidio (Sigma, St. Louis, MO) e incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos. El contenido de ADN por célula fue estimado por citometría de flujo en un FACScalibur (Becton Dickinson, Fullerton, CA). Los datos de citometría fueron recolectados para 50 000 eventos celulares por muestra y analizados usando Cell Quest software (Becton Dickinson). Los porcentajes de distribución de ciclos celulares se calculan usando Modfit LT software. La calibración FACScalibur se lleva a cabo con el ADN QC Particle Kit (Beckton Dickinson).

La figura 5B muestra claramente el arresto en G₂/M del ciclo celular de las células tumorales inducido por la fracción bioactiva F4 (que no forma parte de la invención) como la vincristina usada como control positivo. La figura 5B muestra el efecto de F4 (31,2 mg/mL) sobre ciclo celular de A375. El gráfico muestra la acumulación en la fase G₂ (60%) para las células tratadas con el F4 comparado con el 18% de las células sin tratamiento. La vincristina induce un arresto en G₂ /M del ciclo celular cercano al 80 %.

EJEMPLO 5. ALTERACIONES EN EL CITOESQUELETO DE A375 TRATADAS CON LA FRACCIÓN F4 (que no forma parte de la invención)

Las células A375 y Mel-Rel (5 x 10⁴ células/m¹) fueron colocadas sobre láminas de vidrio (13 mm diámetro), recubiertas con colágeno (Sigma, St. Louis, MO) y se dejaron adherir por 16 h. Después, las células fueron tratadas con la fracción F4 por 24 h e incubadas en atmósfera húmeda a 37 °C con 5 % de CO₂. Las células tratadas fueron lavadas (PBS) y fijadas (paraformaldehído al 2 % en PBS) por 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, las células fijadas fueron lavadas dos veces con PBS-BSA 1 %, incubadas con acetona fría por 1 min, lavadas (PBS-BSA 1 %) e incubadas con faloidina conjugada con Oregon-green (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EE.UU.) diluido en PBS-BSA 1 % (1/40) por 30 min. Las láminas fueron montadas con Prolong antifade kit (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EE.UU.) y observadas por microscopia de fluorescencia (Olympus, Japan).

La figura 6 muestra en el panel B el efecto inducido por la fracción bioactiva F4 (que no forma parte de la invención) sobre la arquitectura y organización de los filamentos de actina. Las células tratadas con la fracción F4 no se extienden y las estructuras filamentosas se observan desensambladas o reorganizadas y acumuladas en las áreas submembranas. Los filamentos de actina se observan como gránulos, principalmente localizados en los bordes de las células A375. Las células control (panel A) muestran organización en la arquitectura del citoesqueleto.

EJEMPLO 6. FRAGMENTACIÓN DEL ADN DE LA LÍNEA CELULAR TUMORAL A375 INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON LA FRACCIÓN BIOACTIVA F4 DE *PETIVERIA ALLIACEA* (que no forma parte de la invención)

Las células A375 y Mel-Rel (5 x 10⁴ células/m¹) fueron colocadas sobre láminas de vidrio (13 mm diámetro), recubiertas colágeno (Sigma, St. Louis, MO) y se dejaron adherir por 16 h. Después, las células fueron tratadas con la fracción F4 (que no forma parte de la invención) (31,2 µg/ml) por 24 h e incubadas en atmósfera húmeda a

37 °C con 5 % de CO₂. Las células tratadas fueron lavadas (PBS) y fijadas (paraformaldehído al 2 % en PBS) por 30 min a 4 °C. Posteriormente, las células fijadas fueron lavadas dos veces con PBS-BSA 1 %, incubadas con acetona fría por 1 min, lavadas (PBS-BSA 1 %) e incubadas con 300 nM de DAPI (Sigma, St. Louis, MO) por 5 min. Las láminas fueron montadas con Prolong antifade kit (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EE.UU.) y las células fueron observadas por microscopia de fluorescencia (Olympus, Japón).

La figura 7 (panel B) muestra el efecto de la fracción F4 (que no forma parte de la invención) sobre la fragmentación del ADN inducida posiblemente por la activación endógena de endonucleasas de una forma independiente de la mitocondria.

EJEMPLO 7. EFECTO DE LA FRACCIÓN BIOACTIVA F4 (que no forma parte de la invención) SOBRE EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS

Las CMSP humanas (2 x 10⁵ células/pozo) fueron cultivadas en placas de 96 pozos con o sin de fitohemaglutinina (PHA, GibcoBRL). Después, las CMSP fueron tratadas con la fracción F4 (que no forma parte de la invención) (250 a 1,9 µg/ml) o vincristina por 30 h. Después del tratamiento, las células fueron centrifugadas, la fracción F4 (que no forma parte de la invención) fue retirada y, por último, las células fueron lavadas cuidadosamente tres veces (PBS) antes de añadir MTT. A continuación, se adicionaron 10 µl de MTT 12 mM [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromuro] (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) en PBS a cada pozo y se incubaron por 4 h a 37 °C. Los cristales de formazan fueron disueltos en SDS-HCl 0,01 M. Los resultados de MTT fueron medidos a 540 nm usando un Multiskan MCC/340 (Labsystems).

La figura 8 muestra el efecto de la fracción bioactiva F4 (que no forma parte de la invención) sobre el crecimiento de las células mononucleares humanas con (B) o sin (A) fitohemaglutinina. El gráfico muestra claramente que la fracción F4 (que no forma parte de la invención) no tiene efectos sobre las células mononucleares normales al igual que la vincristina. La falta de efecto de la vincristina es explicada por su actividad específica sobre el citoesqueleto de las células con una alta tasa de replicación, tales como las células tumorales. Es decir que la fracción F4 (que no forma parte de la invención) y la vincristina presentan una alta especificidad sobre las células tumorales.

EJEMPLO 8. EFECTO DE LA FRACCIÓN BIOACTIVA S3 (que no forma parte de la invención) SOBRE LA MORFOLOGÍA Y LA VIABILIDAD DE NB4 (A), MEL-REL (B) Y K562 (C).

Las células NB4 (A), Mel-Rel (B) y K562 (C) colocadas en placas (placas de 96 pozos) fueron tratadas con la fracción S3 (que no forma parte de la invención) (125 a 7,8 µg/mL) y observadas en microscopio invertido para establecer cambios morfológicos (vesículas intracelulares) y test de viabilidad celular (tinción por exclusión de azul de tripano). La fracción bioactiva S3 induce cambios morfológicos sobre las tres líneas celulares tumorales sugiriendo la muerte celular vía apoptosis y/o necrosis de acuerdo a la presencia de cuerpos apoptóticos y células estalladas (figura 11). El gráfico muestra la fracción S3 (que no forma parte de la invención) (barras grises) frente al control positivo – etopósido - (barras negras) y el control negativo (etanol). El valor de IC₅₀ (50 % de inhibición del crecimiento celular) fue de 45 µg/ml para las diferentes líneas celulares, calculado usando Minitab 14 Probit analysis (MINITAB® Release 14.1. Minitab Inc. 2003 Statistical Software).

EJEMPLO 9. ALTERACIONES DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL INDUCIDAS POR TRATAMIENTO CON LA FRACCIÓN BIOACTIVA S3 (que no forma parte de la invención) SOBRE LAS LÍNEAS CELULARES TUMORALES NB4, MEL-REL Y K562

La membrana mitocondrial potencial (MMP) fue medida por citometría de flujo con JC-1, una sonda catiónica lipófila (5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianina yoduro, Sigma, St. Louis, MO). JC-1 es añadido a 3 X 10⁵ células/ml e incubadas por 10 min a 37 °C. El análisis de datos fue procesado por Cell Quest software (Becton Dickinson). Los tratamientos fueron desarrollados por triplicado y los resultados son expresados como la media ± SD. La figura 12 muestra la depolarización de la membrana mitocondrial inducida por el tratamiento de la fracción S3 (que no forma parte de la invención) (31,2 µg/ml) frente al control negativo (EtOH) sobre las líneas celulares NB4, Mel-Rel y K562. La depolarización de la membrana mitocondrial inducida por el tratamiento con S3 en las diferentes líneas celulares tumorales es mantenida en el tiempo (hasta 8 h), sugiriendo la muerte celular programada a través de la vía mitocondrial. Ensayos adicionales han permitido establecer que el efecto en la membrana mitocondrial se genera en concentraciones de 15,6 µg/ml.

EJEMPLO 10. CONDENSACIÓN DE CROMATINA Y FRAGMENTACIÓN NUCLEAR EN LA LÍNEA CELULAR TUMORAL NB4 TRATADA CON LA FRACCIÓN BIOACTIVA S3 (que no forma parte de la invención)

Las células teñidas con Hematoxilina-eosina y DAPI (4',6-diamidin-2-fenilindol) fueron analizadas por microscopia para estudiar el tipo de muerte celular inducida por la fracción bioactiva S3 (que no forma parte de la invención). En resumen, las células fueron tratadas con la fracción S3 por 24 h a 37 °C y atmósfera húmeda con CO₂ al 5 %, posteriormente fueron colocadas sobre láminas portaobjetos por citocentrifugación (Vybra cytopspin, Japón) por 5 min a 500 rpm, fijadas con etanol y teñidas con hematoxilina (2 min) y eosina (45 seg). El exceso de

colorante es removido con etanol (3 lavados) y las láminas son analizadas y fotografiadas por microscopia óptica (Olympus CH30, Japón) en magnificación de 100X. Para la tinción de DAPI las células fueron colocadas sobre láminas de vidrio (13 mm AE) previamente recubiertas con colágeno (6-10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) en una densidad de 5×10^4 células por 16 h, tratadas con la fracción S3 por 24 h a 37 °C y atmósfera húmeda con CO_2 al 5 %.

5

Subsecuentemente lavadas con (PBS) y fijadas con para-formaldehído (2 % en PBS) por 30 min a 4 °C. Después de lavar dos veces con PBS-BSA (1 %) las células fueron incubadas en acetona fría (1 min), lavadas (PBS-BSA, 1 %) e incubadas por 5 min con DAPI 300 nM (Sigma, St. Louis, MO). Las láminas con Prolong antifade kit (Molecular Probes) fueron observadas bajo un microscopio de fluorescencia (Olympus, Japón).

10

15

Las células NB4 fueron tratadas con la fracción S3 (que no forma parte de la invención) (31,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y el fármaco estaurosporina como control positivo, la figura 13 ejemplifica las células tumorales tratados con control negativo (EtOH) en mitosis activa sin interferencia del ciclo celular (A), las células tratadas con la fracción S3 (B) y estaurosporina (C), las cuales muestran fragmentación nuclear y fragmentación del ADN, características de la muerte celular por apoptosis.

20

EJEMPLO 11. EXPRESIÓN DE HSP70 EN LA LÍNEA CELULAR TUMORAL MEDIANTE EL TRATAMIENTO CON LA FRACCIÓN BIOACTIVA S3 (que no forma parte de la invención)

La tinción con DAPI muestra resultados similares, la figura 13-D presenta núcleos normales (vehículo) y 13-E núcleos fragmentados después de la activación de endonucleasas en las células tratadas con la fracción S3 (31,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La presencia de fragmentos nucleares fue confirmada por el test de fragmentación del ADN mostrando una ruptura coordinada del ADN.

25

Las células K562 incubadas en placas de 6 pozos (2 x 10^6 cel/pozo) en 3 ml de medio suplementado fueron tratadas con la fracción S3 (que no forma parte de la invención) (6,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o quercetina y rutina (100 μM , control positivo). Las células tratadas fueron divididas en dos grupos: el primer grupo fue incubado por 10 h a 37 °C y sometido a choque térmico (42 °C, 60 min) en un baño serológico y posteriormente puestas en recuperación por 4 h a 37 °C. El segundo grupo fue incubado por 15 h a 37 °C. Durante el procedimiento, los dos grupos fueron mantenidos con tratamientos.

30

Después del tratamiento, las células fueron lisadas usando buffer TDLB (Tris-HCl 1 M pH 8, NaCl 5 M, azida sódica 20 %, SDS 10 %, NP40 10 %, desoxicolato sódico 10 %, PMSF 1 %) por 30 min a 4 °C. Las proteínas fueron cuantificadas por Bradford (BIORAD), separadas mediante electroforesis (gel poliacrilamida 10 %) y transferidas a membranas de PVDF. La identificación de las proteínas fue realizada utilizando un anticuerpo monoclonal primario anti-Hsp70 (Hsp70 clone 283-48, proporcionado amablemente por el Dr. Peter Van Endert INSERM Unidad 580 Necker Hospital, París, Francia). La detección de la proteína fue realizada mediante un kit de quimioluminiscencia West Dura Extended Duration Substrate (Pierce Lab).

35

La figura 14 muestra la disminución en la expresión de la proteína chaperona Hsp70 sobre las células tumorales K562 sometidas a choque térmico (panel A) o sin choque térmico (panel B), mostrando un comportamiento similar a las tratadas con la quercetina, un flavonoide conocido por su efecto sobre la expresión de la proteína Hsp70. Dado que la fracción S3 reduce la expresión de la Hsp70 con o sin choque térmico se puede asumir que la fracción actúa sobre el factor de choque térmico 1 (HSF-1) o sobre su promotor, mecanismo reportado en la regulación de la expresión de la Hsp70 para la quercetina.

40

En los ejemplos 12 y 13 relacionados con la capacidad de diferentes compuestos o fracciones para inducir la maduración fenotípica y/o funcional de células presentadoras de antígeno, las células dendríticas se obtuvieron de acuerdo con este protocolo.

45

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) a partir de capas leucocitarias frescas (60 ml) de voluntarios sanos. Las células mononucleares se purificaron por centrifugación de gradiente de densidad de Ficoll (Amersham, GE Health Care Europe GmbH). Los monocitos fueron aislados por selección positiva con anticuerpos monoclonales anti-CD14 acoplados a perlas magnéticas utilizando el sistema MiniMaCs (MiltenyiBiotec, BergischGladbach, Alemania). Las células usadas en los ensayos tenían más del 98% de pureza según las estimaciones por citometría de flujo. Los monocitos se cultivaron durante 5 días en medio RPMI 1640, suero fetal bovino (SFB) al 10%, glutamina 2 mM, 100 UI/ml de penicilina, estreptomycin (Eurobio, París, Francia), factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (800 UI/ml) e IL-4 (1000 UI/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.). El día 3, la mitad del medio se reemplaza con medio fresco que contiene GM-CSF e IL-4. El día 5, las MDDC se trataron con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como control positivo y como control negativo se utilizaron células sin estímulo de maduración.

50

EJEMPLO 12. EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS COESTIMULADORAS SOBRE UNA POBLACIÓN DE CD TRATADA CON POLISACÁRIDOS OBTENIDOS DE *P. ALLIACEA*

Las CDs derivadas de monocitos fueron estimuladas por 48 h con el solvente, el lipopolisacárido (LPS) y un polisacárido purificado de *P. alliacea* (hojas y tallos)- PACO - (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en presencia de polimixina B (PolB). Los

55

60

análisis de la expresión de marcadores de maduración realizados por citometría de flujo mostraron un fenotipo maduro de las CDs derivadas de monocitos estimuladas con polisacárido purificado de *P. alliaceae* evidenciado por un aumento de la expresión de moléculas inductoras de la respuesta inmune efectora como CD86 y HLA-DR (figura 16, panel A y B, respectivamente). Adicionalmente, la secreción de TNF- α se midió por la técnica de ELISA utilizando en un sobrenadante de las CDs derivadas de monocitos estimuladas por 48 horas con el solvente, LPS y un polisacárido purificado de *P. alliaceae* (hojas y tallos) – PACO - (25 μ g/ml). La figura 17 muestra un aumento en la secreción de la citoquina, lo que concuerda con el estado de maduración fenotípica observada por citometría (figura 17).

EJEMPLO 13. EFECTOS *IN VIVO* DE LA TERAPIA CON LA FRACCIÓN FAST DE *P. ALLIACEAE* DE LA INVENCIÓN Y UN AGENTE INMUNOESTIMULANTE.

Se tomaron 8 ratones Balb/c hembra, a las cuales se les inocularon 1×10^4 células 4T1 en el cojín mamario y, luego de verificar el desarrollo del tumor, los ratones fueron tratados por inoculación intraperitoneal (IP) de la fracción bioactiva FAST de *Petiveria alliaceae* de la invención (2 mg) o de vehículo de control. El tamaño del tumor se determinó semanalmente. A partir de la segunda semana, se administraron fracciones bioactivas de *P. alliaceae* y 24 horas después se administró también por vía IP el agente inmunoestimulante a bajas dosis. Luego de 3 semanas, se observó una reducción estadísticamente significativa en el tamaño del tumor en ambos grupos (con y sin agente inmunoestimulante. El análisis de la respuesta proliferativa frente a los antígenos tumorales mostró que los ratones tratados con el agente inmunoestimulante presentaba una mayor proliferación en comparación con el grupo tratado solamente con la fracción de *P. alliaceae*.

A partir de los resultados presentados se puede establecer que las fracciones bioactivas FAST de *Petiveria alliaceae* de la invención inducen alteraciones en el citoesqueleto, detención en la fase G2 del ciclo celular y posterior muerte por apoptosis con fragmentación del ADN. Los cuerpos apoptóticos pueden ser fagocitados por las CDs, las cuales van a ser posteriormente activadas por el agente inmunoestimulante, permitiendo la presentación de los antígenos tumorales tanto a los linfocitos CD4 como CD8, induciendo de esta forma una respuesta inmune que permite el control de la metástasis desarrollada por células tumorales que hayan escapado del tratamiento antitumoral directo.

Los resultados permiten establecer que la fracción bioactiva FAST obtenida a partir de *P. alliaceae* tiene actividad sobre diferentes blancos moleculares existentes en las células tumorales debido a la diversidad de compuestos presentes en las fracciones, los cuales pueden actuar en sinergia potenciando la actividad antitumoral. Este hecho contrasta con los fármacos convencionales utilizados en tratamientos de quimioterapia, los cuales actúan sobre un único blanco molecular que le permite a la célula tumoral desarrollar una resistencia al tratamiento de forma más rápida que al utilizar fracciones complejas como las reivindicadas en la presente solicitud. Sumado a lo anterior, el costo de producción de las fracciones aquí divulgadas es notablemente inferior al requerido para la manufactura de fármacos sintéticos.

REIVINDICACIONES

1. Fracción bioactiva de *Petiveria alliacea* obtenible por extracción a reflujo en etanol, filtración y evaporación, extracción líquido-líquido en acetato de etilo, secado y separación usando RP-18 y fase móvil MeOH-H₂O (7:3) para usar en el tratamiento del cáncer, dicha fracción que comprende:

COMPUESTO	% en peso respecto a la fracción bioactiva total
4-etil petiveral	0.01-31
Ácido Lignocérico	0.01-25
Dibencil disulfuro	0.01-9
Dibencil tetrasulfuro	0.01-9.5
Dibencil trisulfuro	3.8-14
Leridal 7- demetil	0.01-7
Leridal Chalcona	0.01-16.5
Leridol	0.01-15
Miricitrina	0.01-9
Petiveral	20-55
Pinitol	0.01-19
S-bencil cistein sulfóxido	0.01-4
Senfol	0.01-16

2. Fracción bioactiva de *Petiveria alliacea* de acuerdo con la reivindicación 1 para usar de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha fracción comprende:

COMPUESTO	% en masa respecto a la fracción bioactiva total
4-etil petiveral	0.01-5
Ácido Lignocérico	0.01-5
Dibencil disulfuro	0.01-5
Dibencil tetrasulfuro	0.01-5
Dibencil trisulfuro	3.8-7
Leridal 7- demetil	3.8-7
Leridal Chalcona	0.01-5
Leridol	0.01-5
Miricitrina	0.01-5
Petiveral	20.6-38.2
Pinitol	0.01-5
S-bencil cistein sulfóxido	0.01-5
Senfol	0.01-5

3. Fracción bioactiva de *Petiveria alliacea* de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 para usar de acuerdo con la reivindicación 1, donde la fracción muestra la huella cromatográfica siguiente en un análisis por HPLC con detector DAD, utilizando una columna RP-18 y una fase móvil de H₂O: ACN (4:6):

Pico	Tiempo de retención (min)	λ (nm)
1	29.37	324
2	33.42	265
3	48.27	265

4. Composición farmacéutica para usar según la reivindicación 1, donde dicha composición farmacéutica comprende la fracción bioactiva de *Petiveria alliacea* de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3 y al menos uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

5. Combinación farmacéutica para usar según la reivindicación 1, donde dicha composición farmacéutica comprende una fracción bioactiva de *Petiveria alliacea* de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3 y al menos un agente inmunoestimulante capaz de producir la maduración fenotípica y/o funcional de las células dendríticas, donde dicho agente inmunoestimulante es un polisacárido y/o glicopéptido obtenido a partir de: *Ganoderma lucidum*, *Astragalus membranaceus*, *Grifola frondosa*, *Phellinus linteus*, *Cordyceps militaris*, *Lentinus edodes*, *Coriolus versicolor*, *Agaricus blazei* o *Petiveria alliacea*.

- 5 6. Fracción bioactiva de *Petiveria alliacea* de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3 o composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, para usar el en tratamiento según la reivindicación 1, donde dicho tratamiento comprende el uso de la fracción como agente coadyuvante en un régimen de quimioterapia para el tratamiento del cáncer.
- 10 7. Combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5 para usar según la reivindicación 5, donde la combinación farmacéutica adopta la forma de un kit que comprende una primera composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, una segunda composición farmacéutica que comprende uno o más agentes inmunoestimulantes capaces de producir la maduración fenotípica y/o funcional de las células dendríticas y al menos uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, las instrucciones de uso.
- 15 8. Fracción bioactiva de *Petiveria alliacea* de acuerdo con la reivindicación 1 a 3 o composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4 para usar en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho tratamiento comprende la administración secuencial de al menos la fracción bioactiva de *Petiveria alliacea* o la composición farmacéutica y, en un tiempo entre 24 horas y 2 semanas, la administración de al menos un agente inmunoestimulante o una composición farmacéutica que contenga el mismo que puede producir la maduración fenotípica y/o funcional de las células dendríticas, siendo dicho agente inmunoestimulante un polisacárido y/o glucopéptido obtenido de: *Ganoderma lucidum*, *Astragalus membranaceus*, *Grifola frondosa*, *Phellinus linteus*, *Cordyceps militaris*, *Lentinus edodes*, *Coriolus versicolor*, *Agaricus blazei* o *Petiveria alliacea*.
- 20 9. Fracción bioactiva de *Petiveria alliacea* de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3 o composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4 para usar en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo dicho tratamiento la administración simultánea o secuencial de al menos la fracción bioactiva de *Petiveria alliacea* o la composición farmacéutica y un fármaco quimioterapéutico utilizado en el régimen de quimioterapia, y en un tiempo entre 24 horas y 2 semanas, la administración de al menos un agente inmunoestimulante o composición farmacéutica que contenga el mismo que puede producir la maduración fenotípica y/o funcional de las células dendríticas, siendo dicho agente inmunoestimulante un polisacárido y/o glucopéptido obtenido de: *Ganoderma lucidum*, *Astragalus membranaceus*, *Grifola frondosa*, *Phellinus linteus*, *Cordyceps militaris*, *Lentinus edodes*, *Coriolus versicolor*, *Agaricus blazei* o *Petiveria alliacea*.
- 25 30

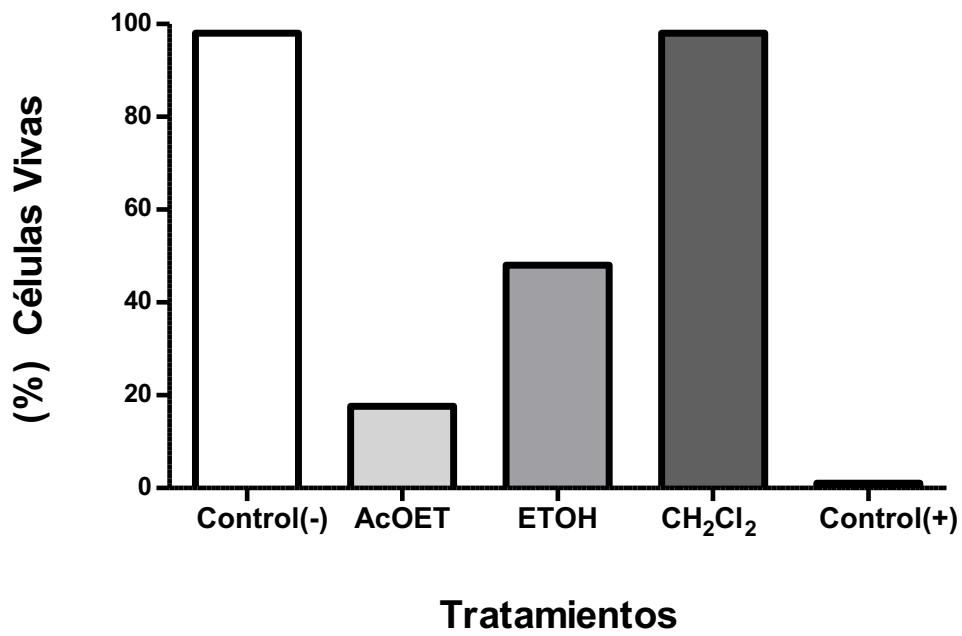


FIGURA 1

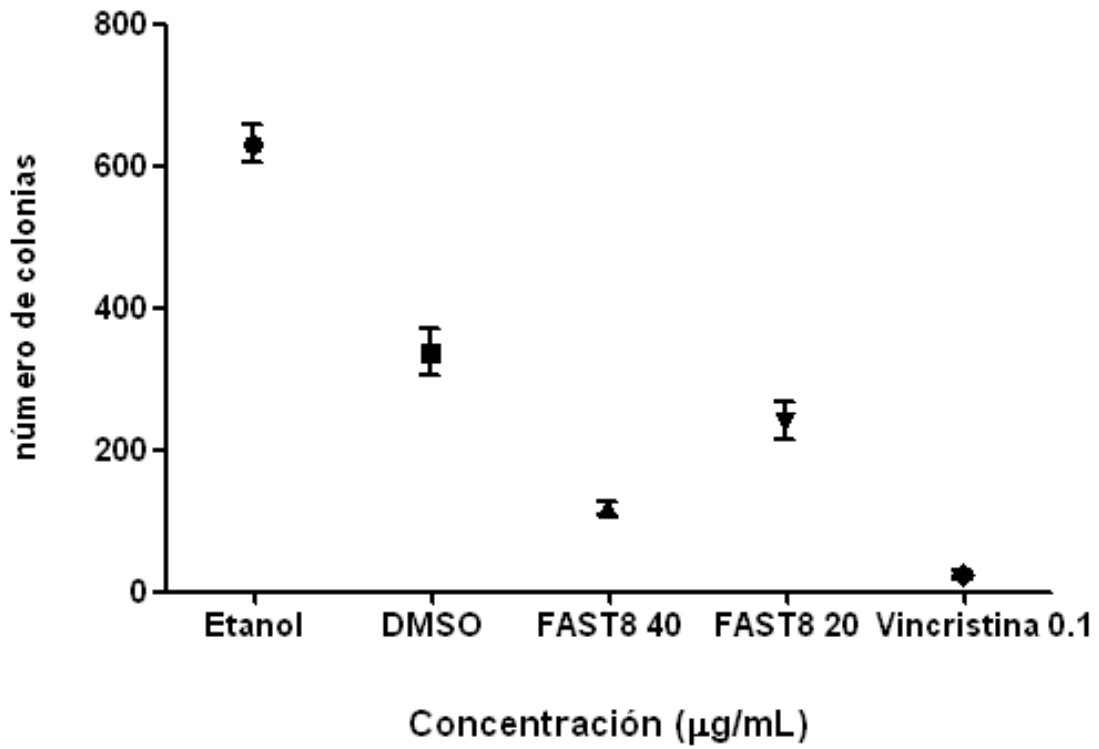


FIGURA 2

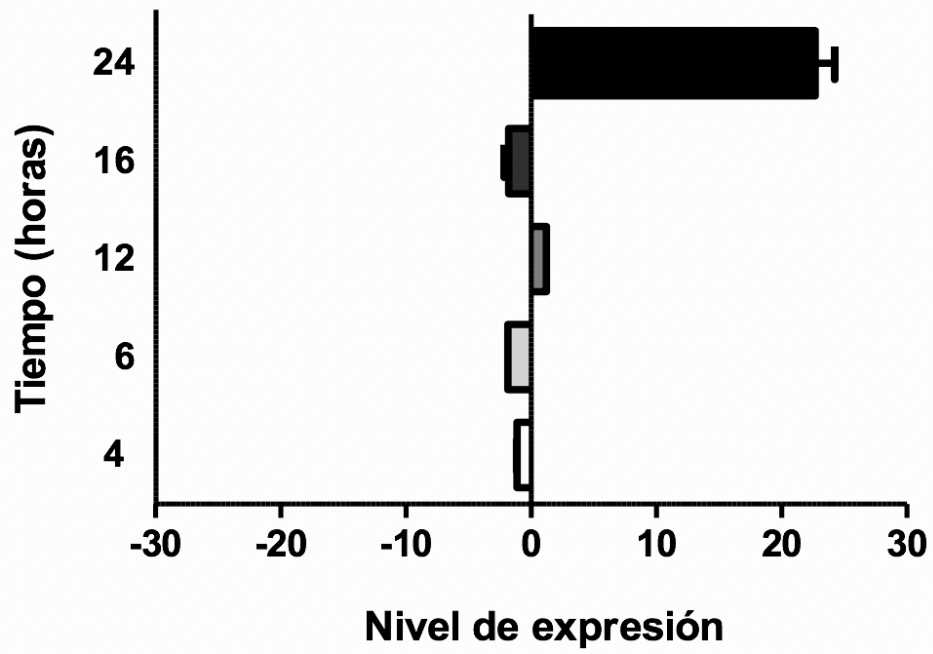
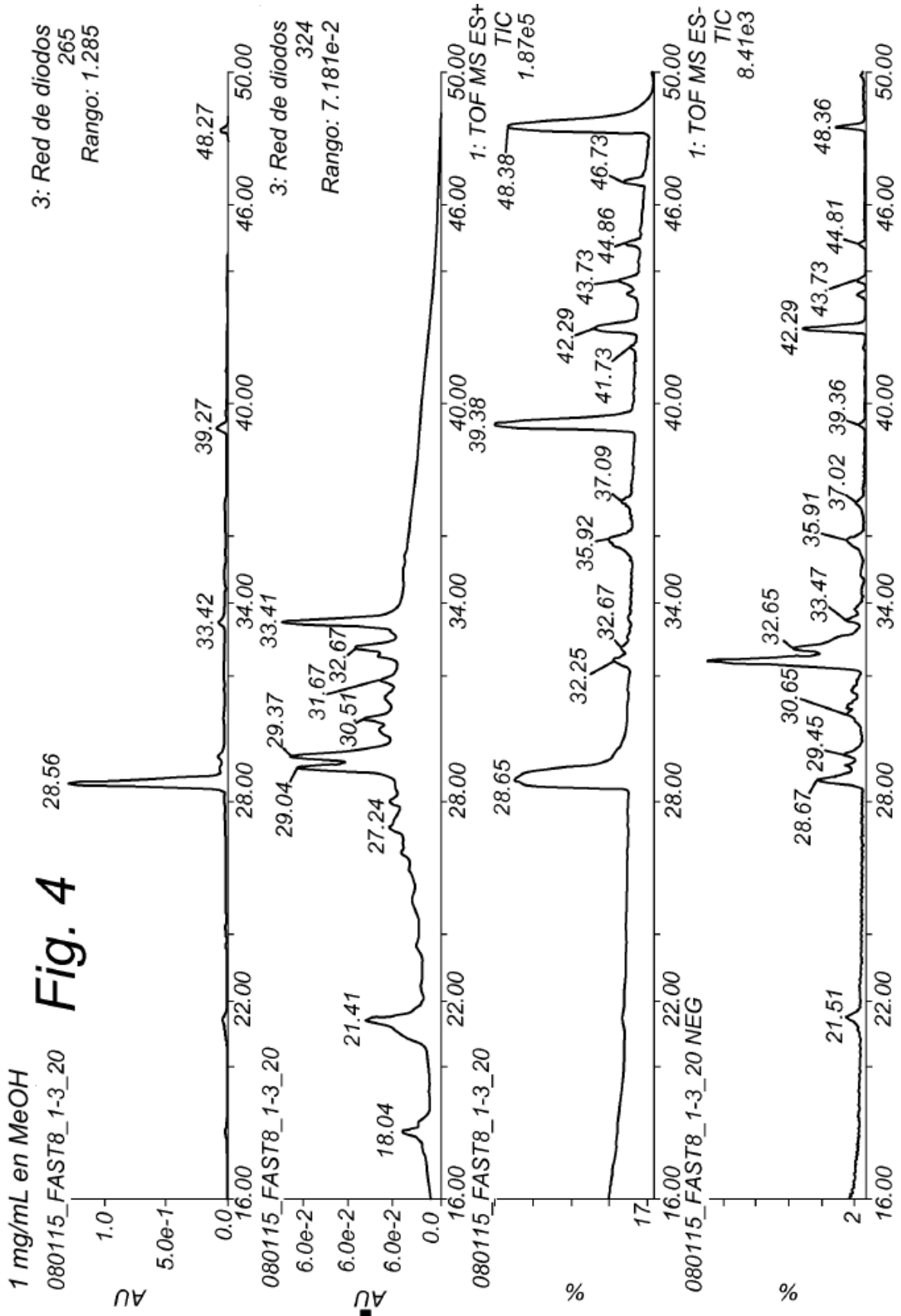


FIGURA 3



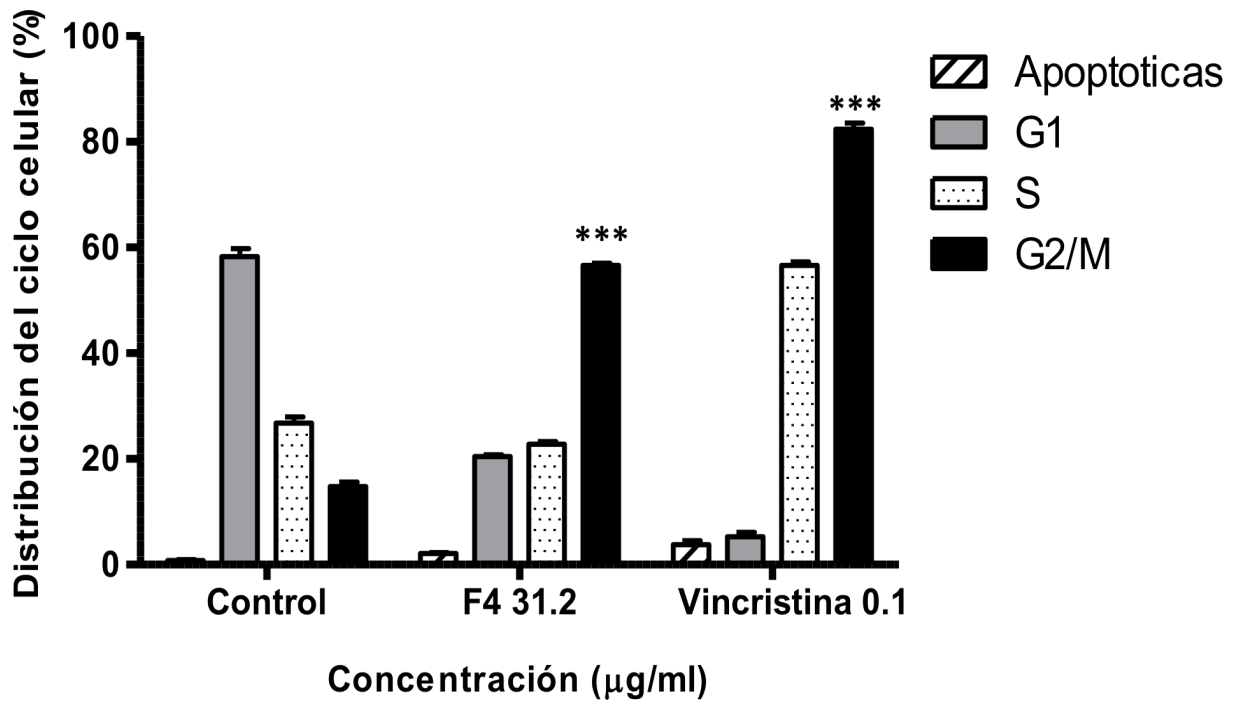


Figura 5a

Fig. 5b

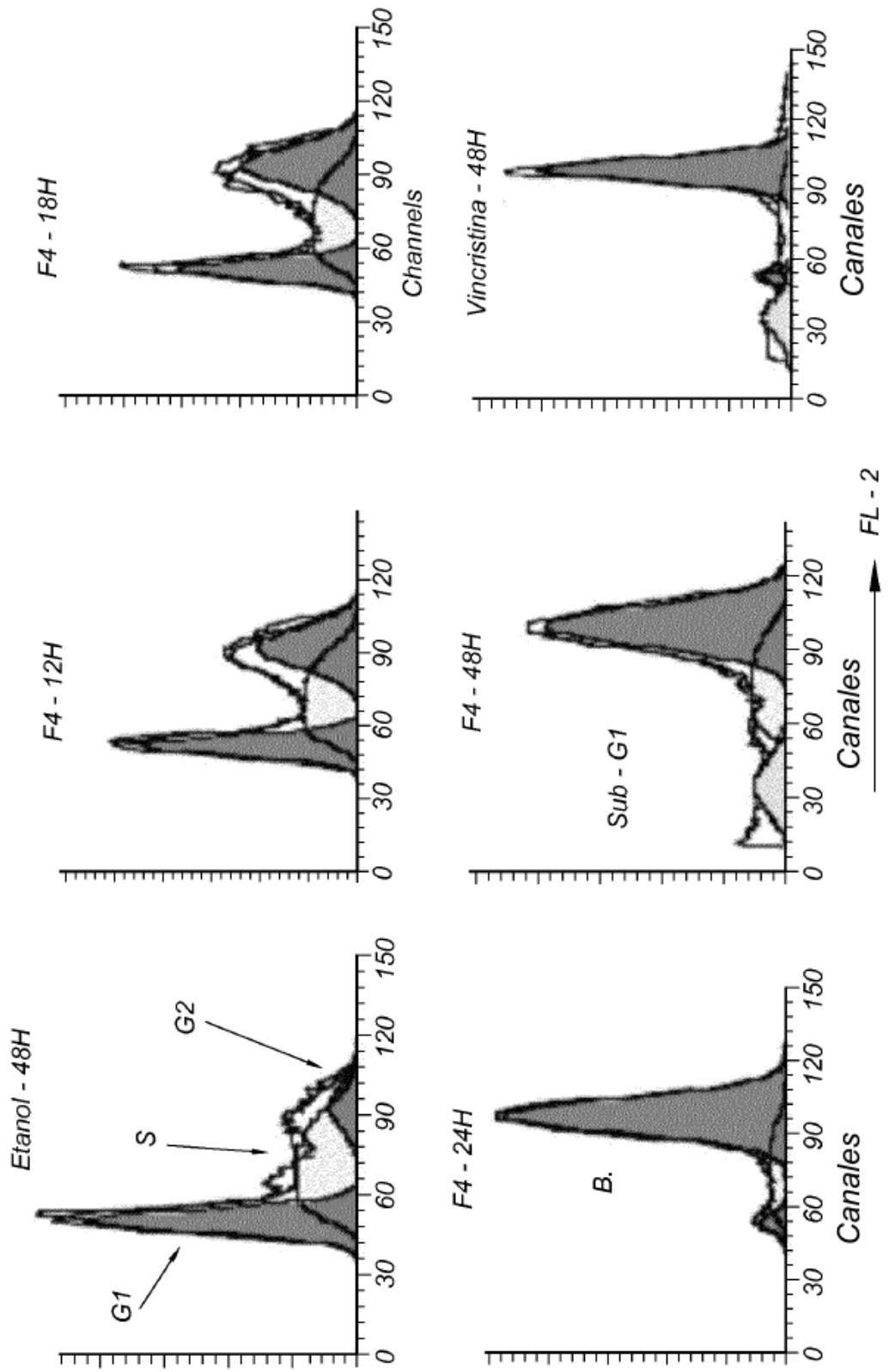


Fig. 6a

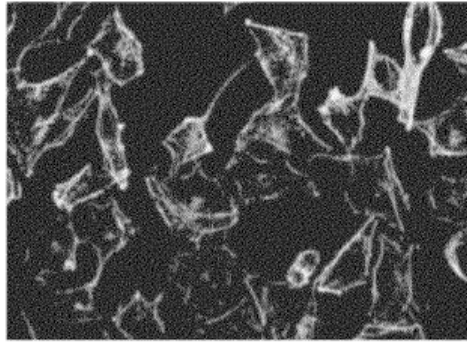


Fig. 6b

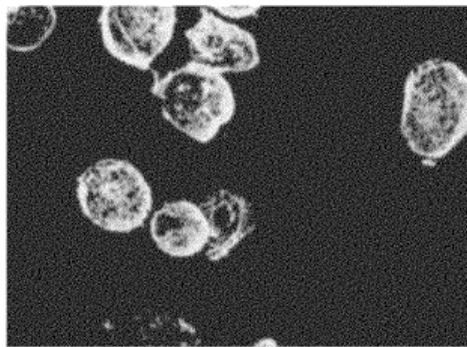


Fig. 7a

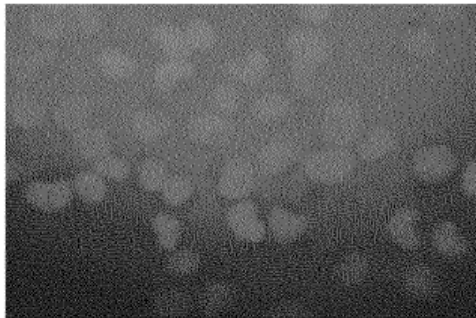


Fig. 7b

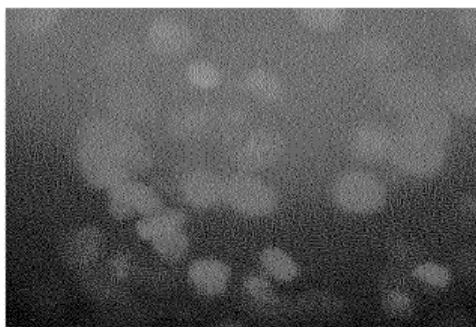


Fig. 8a

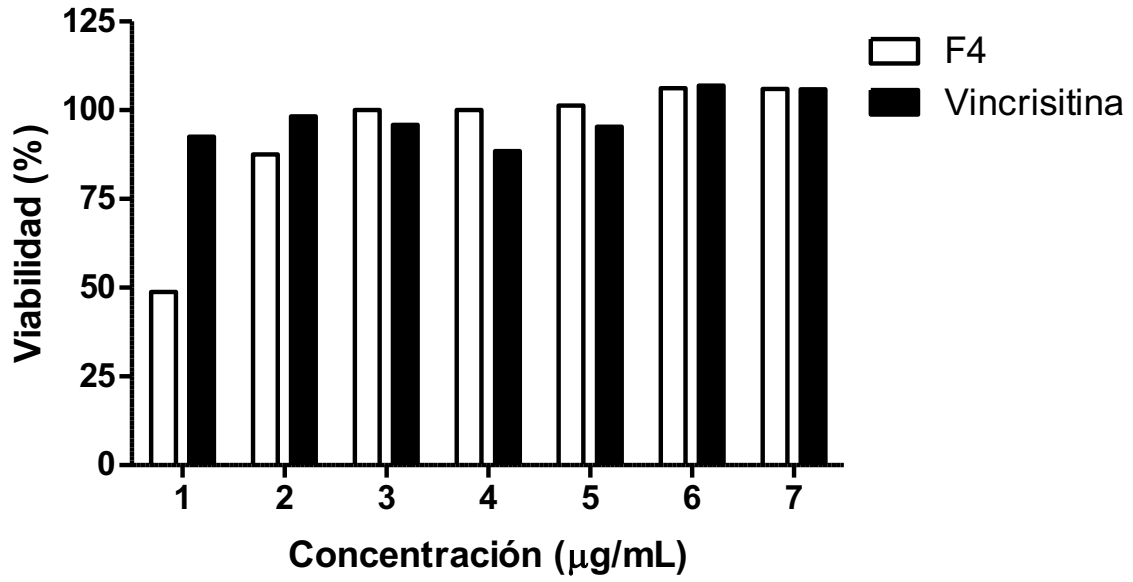


Fig. 8b

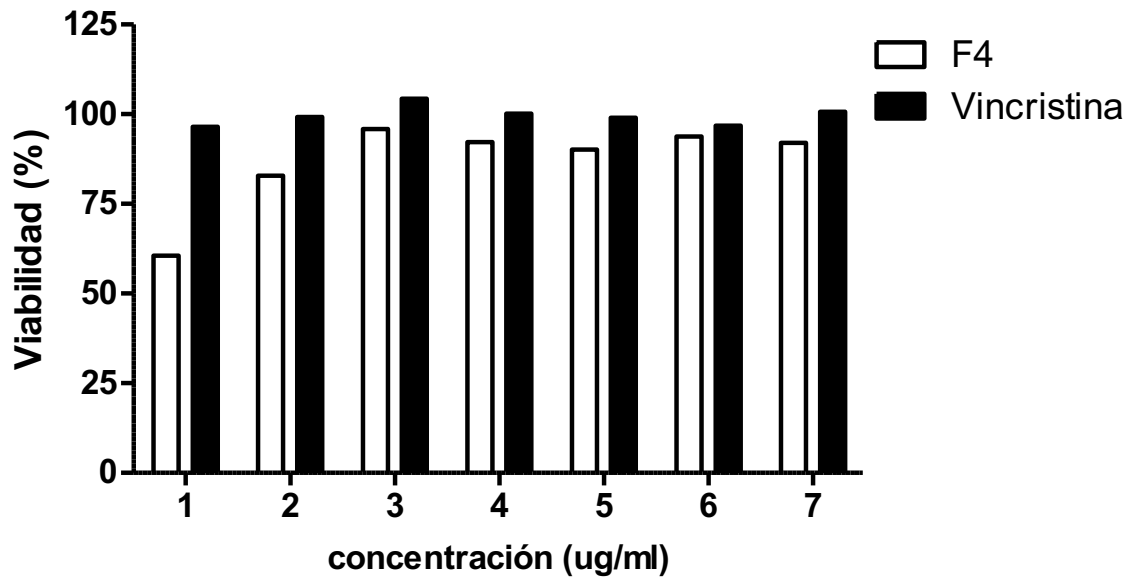
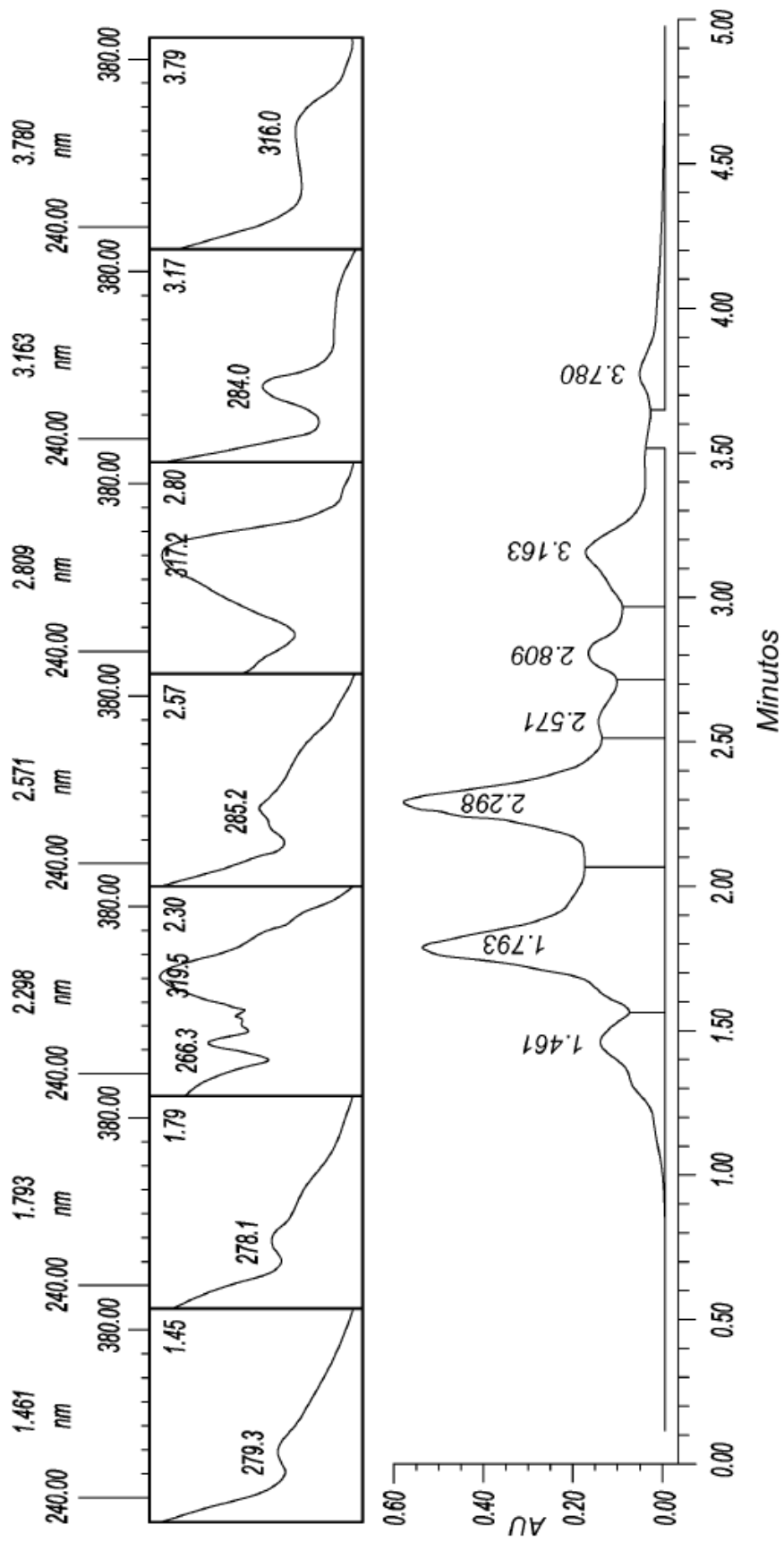


Fig. 9



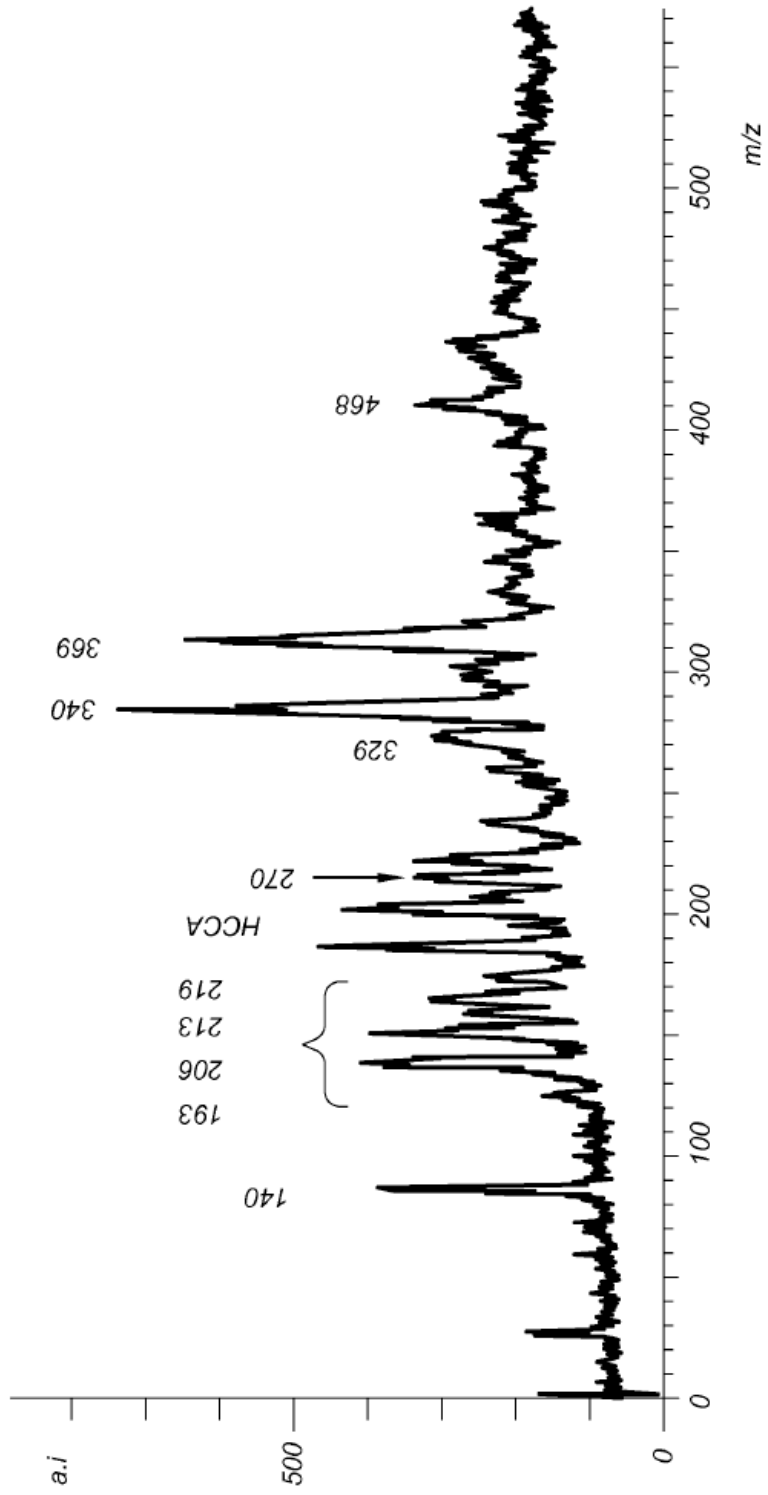


Fig. 10

Fig. 11a

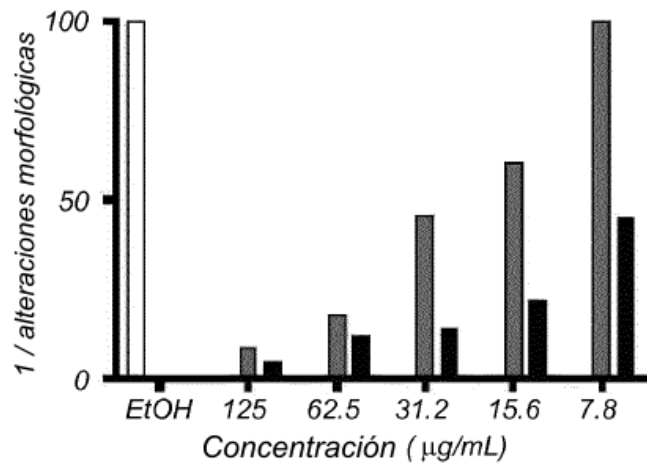


Fig. 11b

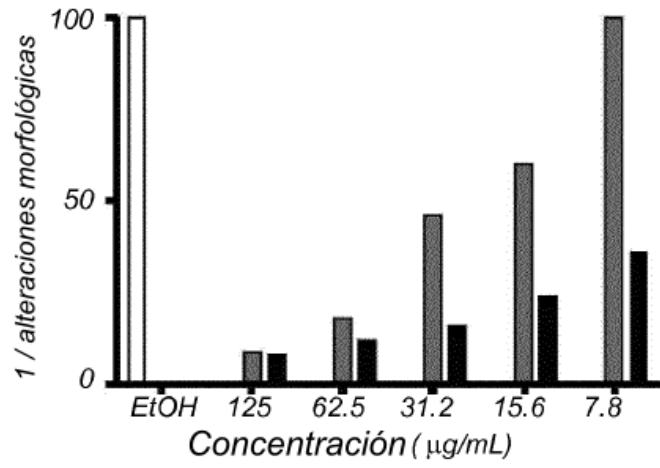


Fig. 11c

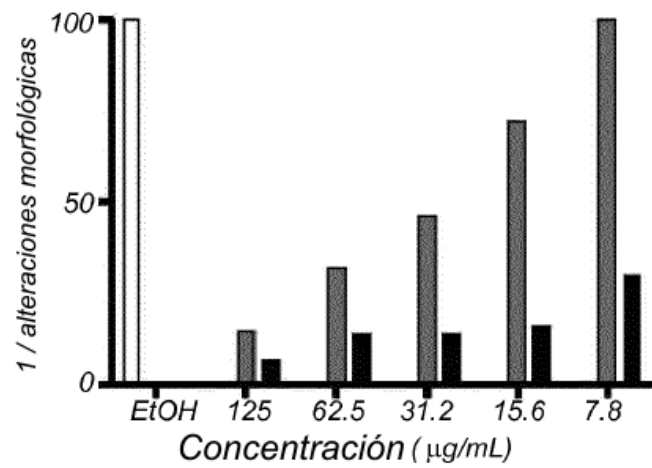


Fig. 12a

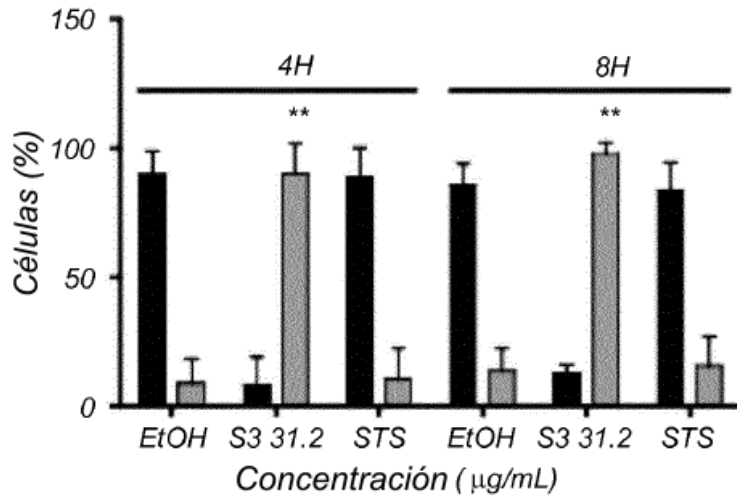


Fig. 12b

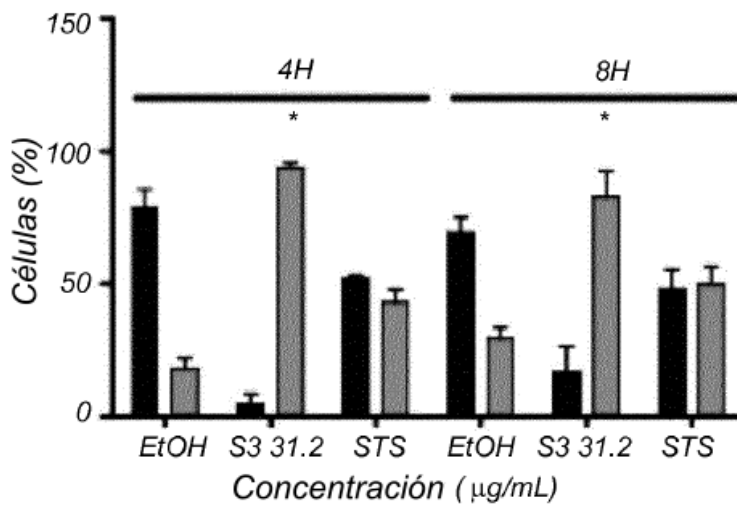


Fig. 12c

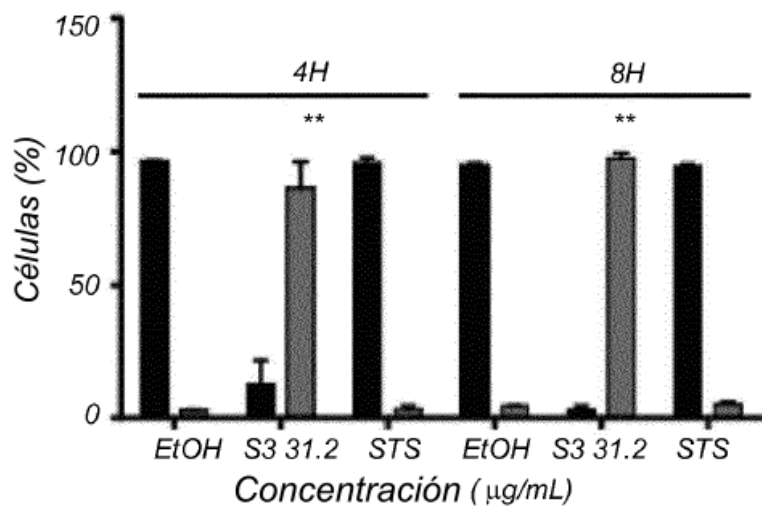


Fig. 13

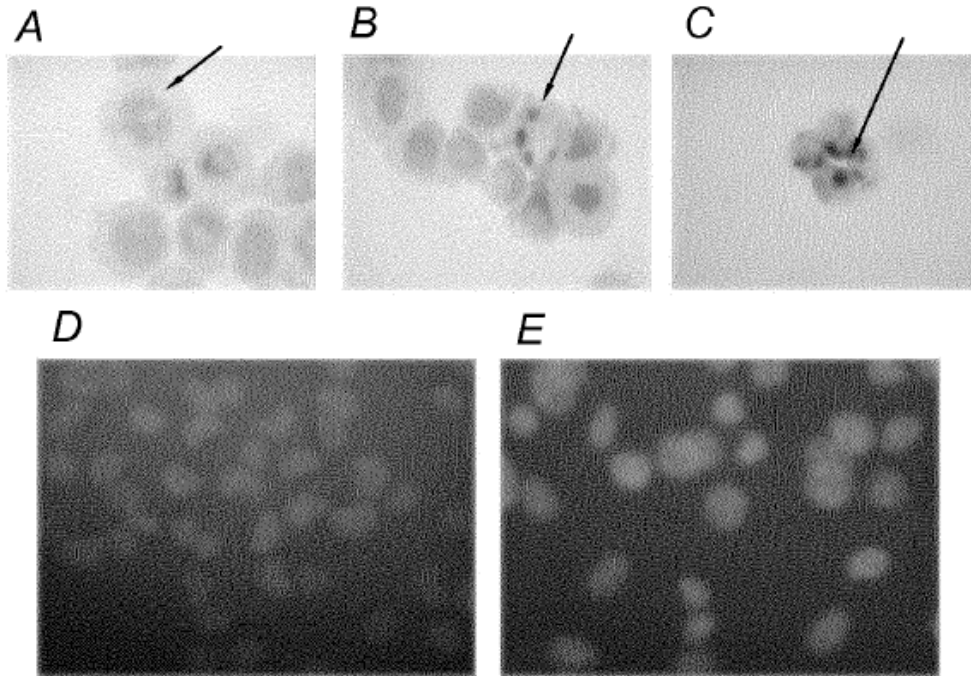
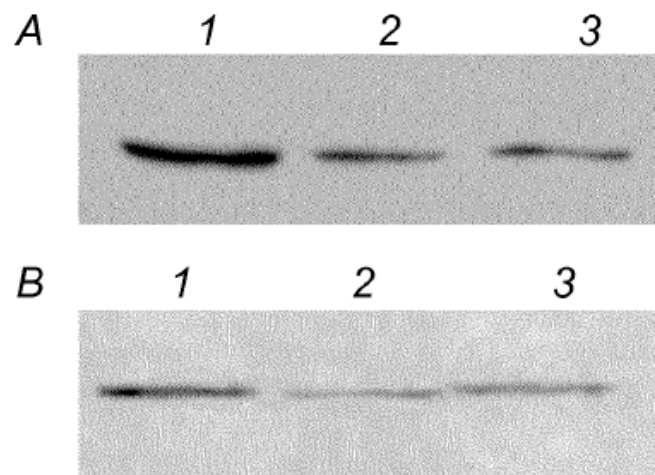


Fig. 14



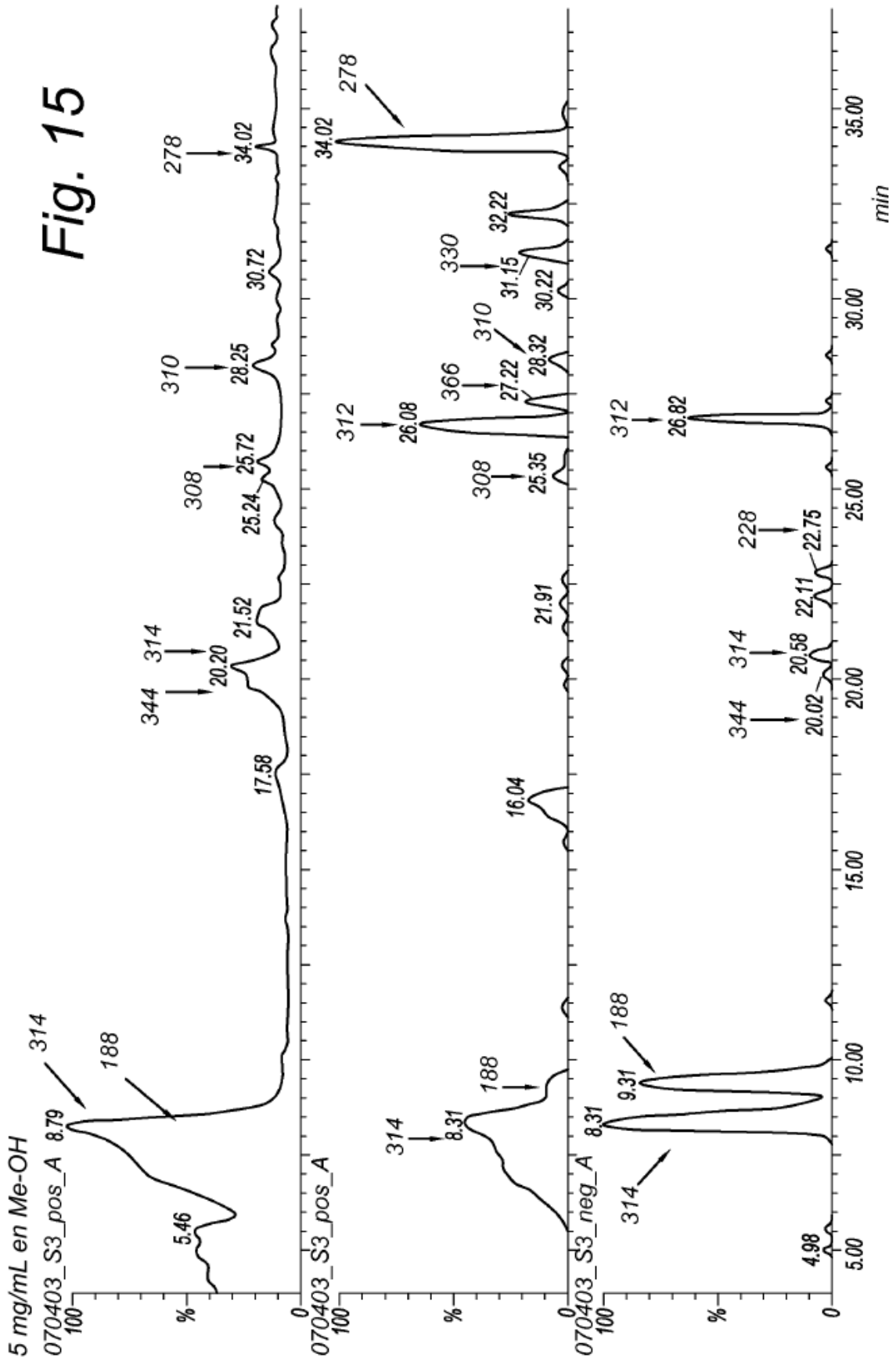


Fig. 16a

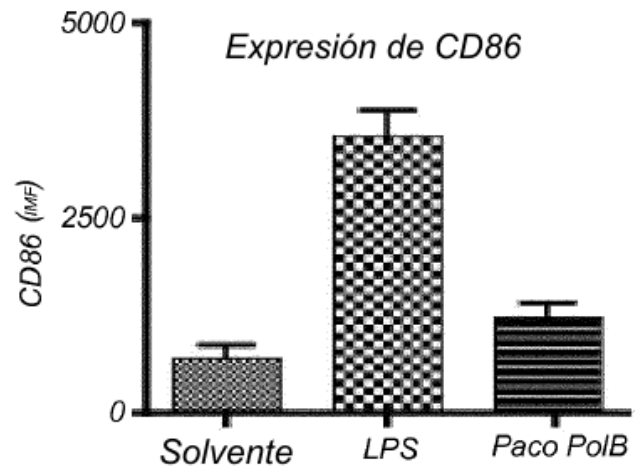


Fig. 16b

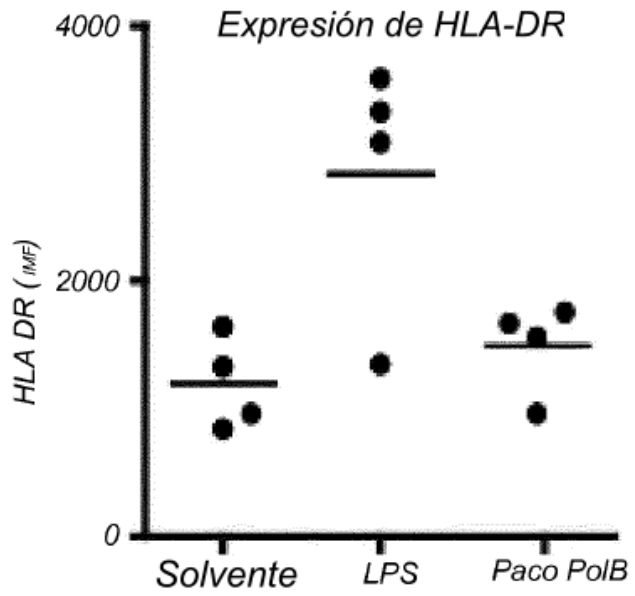


Fig. 17

